

독말풀(*Datura stramonium* var. *tatula* Torr.) 모상근의 성장과 tropane alkaloid 생성에 미치는 pH, 서당 및 비타민의 영향

양덕조* · 강현미 · 이강섭 · 김용해 · 양덕춘¹
충북대학교 자연과학대학 생명과학부, ¹한국인삼연초연구원

Effects of pH, Sucrose and Vitamins on the Growth and Tropane Alkaloid Production of Hairy Roots of *Datura stramonium* var. *tatula* Torr.

YANG, Deok Cho* · KANG, Hyun Mi · LEE, Kang Seop · KIM, Yong Hae · YANG, Deok Chun¹

School of Life Sciences, College of Natural Sciences, Chungbuk National University, Cheongju, 360-763, Korea: and
¹Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejeon 305-345, Korea. *Corresponding author

The optimum concentrations of pH, sucrose and vitamins for the growth and tropane alkaloid production of hairy root clone DTLA9 (best growth line) were investigated. The optimum pH in growth and tropane alkaloid production of DTLA9 clone in SH (Schenk and Hildebrandt, 1972) basal medium without growth regulator were pH 6.3 and 6.5, respectively. Also, the optimum sucrose concentration in growth and tropane alkaloid production in the same medium were 3.0 and 2.8%, respectively. The optimum concentrations of ascorbic acid, D-pantothenate, nicotinic acid, pyridoxine, riboflavin, and thiamine on the growth of DTLA9 clone in SH basal medium without vitamins were 0.1 mM, 0.003 mM, 0.07 mM, 0.002 mM, 0.025 mM, and 0.01 mM, respectively. In particular, supplement of 0.1 mM ascorbic acid to SH basal medium without vitamins stimulated the tropane alkaloid production.

Key words: *Datura stramonium* var. *tatula* Torr., alkaloid production, Hairy roots

Agrobacterium spp.에 의하여 형질전환된 모상근 배양으로부터 2차대사산물의 생성은 모식물에서 보다 높기때문에 (Christen et al., 1989; Granicher et al., 1992), 모상근을 이용한 tropane alkaloids 생성에 관한 연구가 *Datura*속의 *D. stramonium* (Payne et al., 1987), *D. innoxia* (Ionkova et al., 1994), *D. candida* hybrid (Christen et al., 1990), *D. quercifolia* (Dupraz et al., 1994) 등의 식물에서 수행되었다. 그러나 모상근으로부터 고함량의 tropane alkaloids를 생성하기 위해서는 최적배지의 조건, 즉 배지에 첨가되는 여러 가지 성분의 함량 등이 구명되어야 한다(Maldonado-Mendoza et al., 1993). Yang 등 (1997)은 독말풀(*Datura stramonium* var. *tatula* Torr.)의 모상근으로부터 모상근의 성장 및 tropane alkaloids의 생성에 있어서 최적배지는 각각 SH (Schenk and Hildebrandt, 1972)와 GD (Gresshoff and Doy, 1972)배지임을 구명한 바 있다. 그러나 동일한 배지에서도 배지의 pH (Payne et al., 1987) 및 서당농도(Christen et al.,

1992; Dupraz et al., 1993)에 따라 모상근의 성장률과 tropane alkaloids의 함량은 다르게 나타난다. 또한 *Lithospermum erythrorhizon*의 배양세포로부터 shikonin생성은 배지에 첨가되는 비타민 종류에 의해 억제되기도 한다 (Fujita et al., 1981). 따라서 본 연구는 독말풀(*Datura stramonium* var. *tatula* Torr.)모상근의 성장 및 tropane alkaloids 생성에 있어 최적 pH, 서당 및 비타민의 농도를 구명하고자 시도되었다.

재료 및 방법

식물재료 및 모상근의 유도

일년생 초본인 독말풀(*Datura stramonium* var. *tatula* Torr.)의 유식물의 잎에 *Agrobacterium tumefaciens* A4T를 접

중하여 모상근을 유도하였다(Yang et al., 1997).

모상근의 배양

Agrobacterium tumefaciens AT가 접종된 독말풀의 잎절편은 1,000 mg/L carbenicillin이 첨가되고 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 MS (Murashige and Skoog, 1962) 기본배지(고체배지)에 배양하였다. 배지는 MS기본배지에 30 g/L sucrose, 8 g/L agar를 첨가하여 pH는 5.8로 조정하고, 120°C에서 고압멸균하여 사용하였다. 균을 접종하고 7-10일 경과한 후에 유도된 모상근을 1,000 mg/L의 carbenicillin이 첨가되고 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 SH (Schenk and Hildebrandt, 1972) 기본배지에 이식하여 균을 제거한 후, 이를 항생제 및 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 액체배지인 SH기본배지에 이식하여 25°C, 암상태의 조건하에서 배양하였다. 모상근의 성장 및 tropane alkaloids생성에 미치는 pH, 서당 그리고 비타민의 영향을 구명하기 위하여, pH (5.3-6.5)와 서당 (2.4-3.6%)을 각각 농도별로 SH기본배지에 처리하여 25일간 현탁배양하였다. 6종류의 비타민(ascorbic acid, D-pantothenate, nicotinic acid, pyridoxine, riboflavin, thiamine)을 각각 농도별(0.001-0.5 mM)로 대조구인 SH액체배지(SH기본배지에서 5 mg/L nicotinic acid, 0.5 mg/L pyridoxin 그리고 5 mg/L thiamine을 첨가하지 않은 배지)에 처리하여 25일간 배양하였다.

모상근의 선별 및 tropane alkaloid의 추출

식물체의 앞에서 유도된 모상근의 선별은 Yang 등(1997)의 방법에 따라 수행하였으며, tropane alkaloid의 추출은 Mano 등 (1986)의 방법에 준하였다.

Tropane alkaloid의 정량분석

Tropane alkaloids의 분석은 UV detector가 장착된 HPLC (Pharmacia LKB, Sweden)를 이용하였다. Column은 Shim-pack CLC-ODS (Shimadzu Co., Japan, 5 µm, 4.6 × 250 nm)을 사용하였으며, eluents는 methanol과 10 mM의 sodium-1-heptane sulfonate를 48:52(v/v)로 혼합하여 acetic acid로 pH를 4.0으로 조정하여 사용하였다. Injection양은 20 µL로 하였고 flow rate는 분당 1 mL로 하여 215 nm에서 얻어진 chromatogram의 peak height를 표준품과 비교하여 tropane alkaloids를 정량하였다.

결 과

pH의 효과

SH 기본배지에서 모상근 (DTLA9 clone)의 성장 및 tropane alkaloids의 함량에 미치는 pH의 영향을 조사한 결과, 가장 높은 성장률은 pH가 5.9인 처리구(원래의 SH기본배지)에서 보다 pH 6.3의 처리구에서 191.6 mg dr wt /flask로 나타났으며, pH 6.5처리구에서는 성장률이 현저하게 감소되었다(Fig. 1). 한편, hyoscyamine과 scopolamine의 두 종

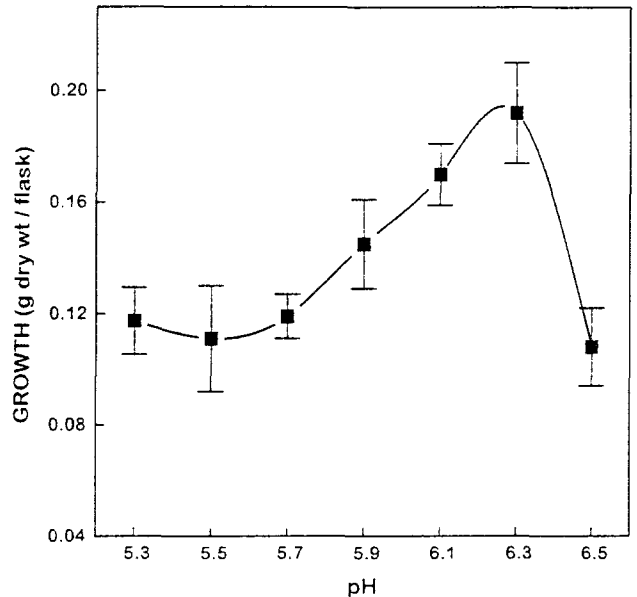


Figure 1. Effects of pH on the growth of hairy root (DTLA9 clone) of *Datura stramonium* var. *tatula* Torr. Data indicate the mean ± SE of triplicates, were measured after 25 days of culture in SH basal liquid medium.

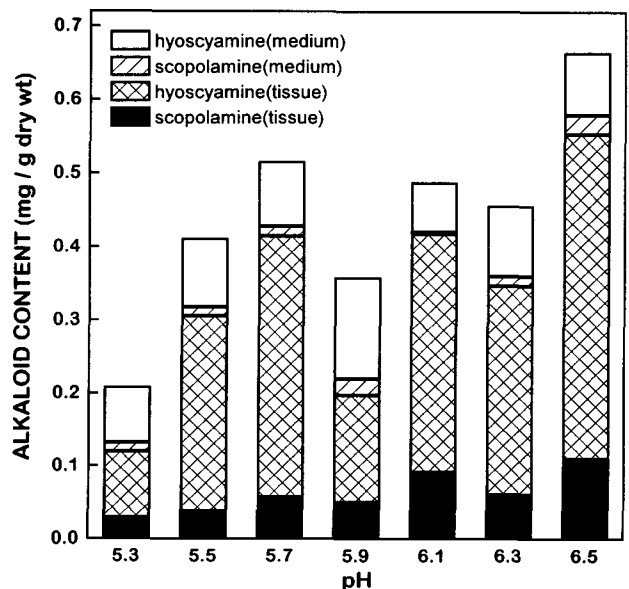


Figure 2. Effects of pH on the tropane alkaloid production of hairy root. Data were measured after 25 days of culture in SH basal liquid medium.

류의 tropane alkaloids가 모상근 및 배지에서 검출되었다. 두 종류의 tropane alkaloids의 전체합량(모상근 및 배지에서 검출된 양)은 모든 pH처리구에서 배지에서 보다 모상근에서 더 높게 나타났다. 모상근에서 hyoscyamine의 함량은 scopolamine보다 pH에 상관없이 현저히 높게 나타나는 경향이였다. 모상근 및 배지에서 검출된 tropane alkaloids의 전체합량을 비교하여 보면, 성장률이 가장 낮았던 pH 6.5처리구에서 0.665 mg/g dr wt로 가장 낮은 pH 5.3의 처리구(0.209 mg/g dr wt)에 비하여 약 3.2배 높게 나타났다(Fig. 2).

서당의 효과

모상근의 성장에 미치는 서당의 영향을 조사한 결과, 3.0%의 농도에서 성장률은 186.6 mg dr wt/flask로 다른 처리구에 비하여 가장 높게 나타났다. 그런데, 서당의 농도가 3%보다 조금 낮은 2.8%처리구와 3%보다 조금 높은 3.2% 처리구에서 모상근의 성장은 3%의 처리구에서보다 저조하였다(Fig. 3). Tropane alkaloids 함량에 미치는 서당의 영향을 조사한 결과, 2.8%의 서당처리구에서 총 함량은 0.193 mg/g dr wt로 성장률이 가장 좋았던 3.0% 처리구에서의 함량(0.182 mg/g dr wt)에 비하여 다소 높게 나타났다(Fig. 4).

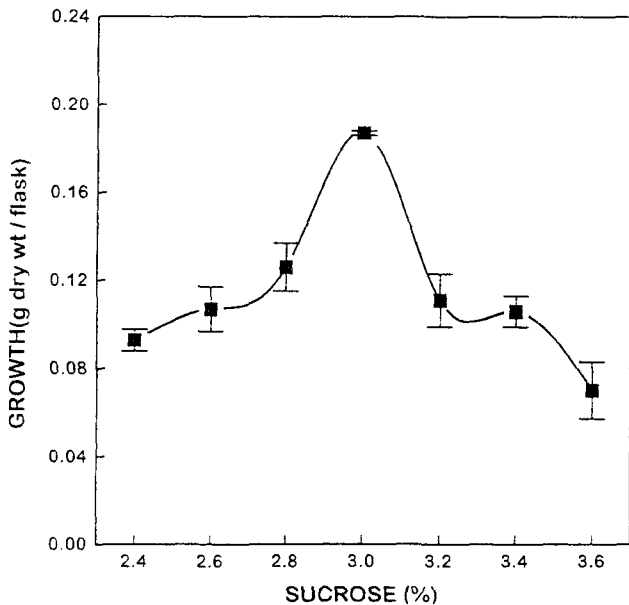


Figure 3. Effects of sucrose on the growth of hairy root. Data indicate the mean \pm SE of triplicates, were measured after 25 days of culture in SH basal liquid medium.

비타민의 효과

6종류의 비타민을 각각 농도별로 처리하여 모상근의 성장과 tropane alkaloids 함량에 미치는 영향을 조사하였다(Fig.

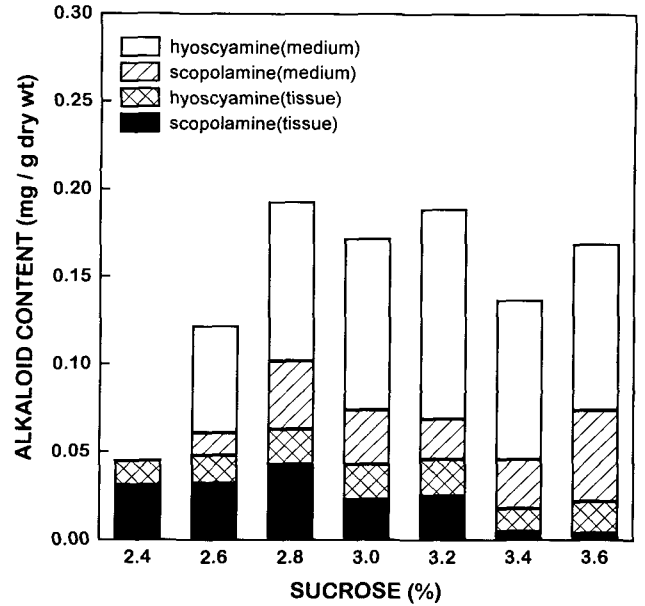


Figure 4. Effects of sucrose on the tropane alkaloid production of hairy root. Data were measured after 25 days of culture in SH basal liquid medium.

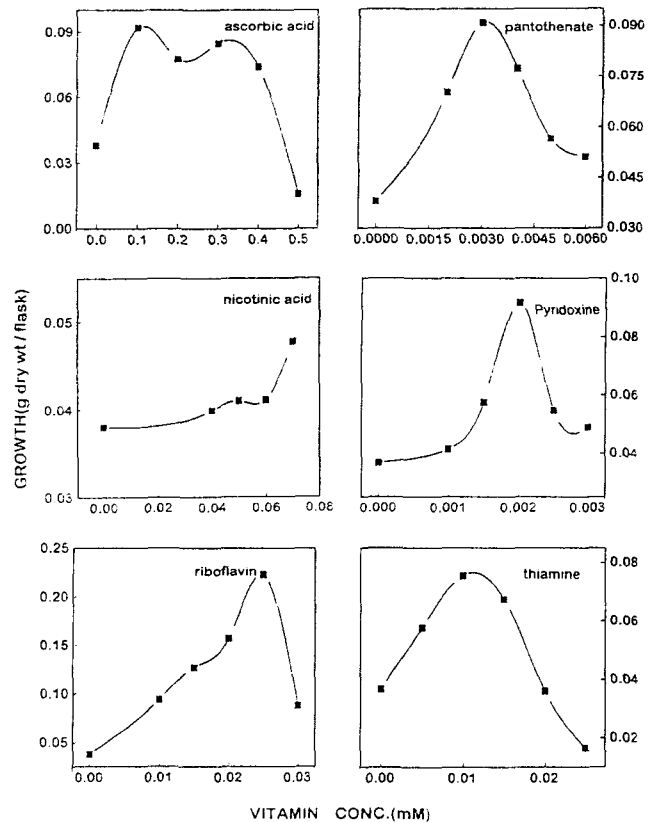


Figure 5. Effects of vitamins on the growth of hairy root. Data were measured after 25 days of culture in SH basal liquid medium.

5, 6). Ascorbic acid처리의 경우, 모상근의 성장률은 0.1-0.4 mM의 처리구에서는 대조구(vitamin-free구)에 비하여 높게

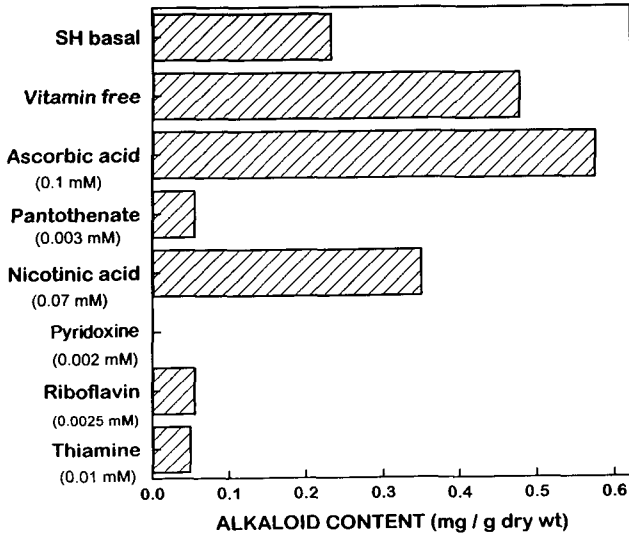


Figure 6. Effects of vitamins on the tropene alkaloid production of hairy root. Data were measured after 25 days of culture in SH liquid medium.

나타났으나, 0.5 mM의 처리구에서는 성장률이 감소되었다. 특히 성장률은 0.1 mM 처리구에서 91.9 mg dr wt/flask로 대조구(38.6 mg dr wt/flask)에 비하여 약 2.4배 높게 나타났다(Fig. 5). 가장 성장률이 좋은 0.1 mM에서의 tropene alkaloids 함량을 조사한 결과, 총 함량(0.576 mg/g dr wt)은 대조구(0.478 mg/g dr wt)에 비하여 높게 나타났다(Fig. 6).

D-pantothenate 처리의 경우, 모상근의 성장률은 0.002-0.006 mM의 전체 처리구에서는 대조구(vitamin-free구)에 비하여 증가되었다. 특히 성장률은 0.003 mM 처리구에서 90.9 mg dr wt/flask로 가장 높게 나타났으며, 대조구의 38.6 mg dr wt/flask보다 약 2.3배 정도 높은 성장률을 나타냈으며(Fig. 5), 이 처리구에서 tropene alkaloids의 함량(0.056 mg/g dr wt)은 대조구(0.478 mg/g dr wt)에서 보다 더 적게 나타났다(Fig. 6).

Nicotinic acid 처리의 경우, 모상근의 성장률은 0.04-0.07 mM의 전체 처리구에서 대조구(vitamin-free구)에 비하여 높게 나타났다. 특히 0.07 mM의 처리구에서 모상근의 가장 높은 성장률(47.7 mg dr wt/flask)을 나타내어 대조구(38.6 mg dr wt/flask)에 비하여 약 1.2배 정도 높았으며(Fig. 5), 이 처리구에서 tropene alkaloids의 총함량(0.35 mg/g dr wt)은 대조구(0.478 mg/g dr wt)에 비하여 저조하였다(Fig. 6).

Pyridoxine 처리의 경우, 모상근의 성장률은 0.001-0.003 mM의 전체 처리구에서 대조구(vitamin-free구)에 비하여 높게 나타났다. 특히 모상근의 가장 높은 성장률은 0.002 mM 처리구(91.7 mg dr wt/flask)에서 나타났으며, 대조구(38.6 mg dr wt/flask)에 비하여 약 2.4배 높게 나타났다(Fig. 5). 성장률이 가장 좋았던 0.002 mM 처리구에서는 tropene alkaloids가 검출되지 않았지만 대조구에서는 0.478 mg/g dr wt의

tropene alkaloids가 검출되었다(Fig. 6).

Riboflavin 처리의 경우, 모상근의 성장률은 0.01-0.03 mM riboflavin의 전체 처리구에서 대조구(vitamin-free구)에 비하여 높게 나타났다. 특히, 모상근의 가장 높은 성장률은 0.025 mM 처리구(222.8 mg dr wt/flask)에서 나타나, 대조구(38.6 mg dr wt/flask)에 비하여 약 5.8배 정도 높게 나타났으며(Fig. 5), 이 처리구에서 tropene alkaloids의 총함량(0.256 mg/g dr wt)은 대조구(0.478 mg/g dr wt)에 비하여 낮게 나타났다(Fig. 6).

Thiamine 처리의 경우, 모상근의 성장률은 0.005-0.02 mM thiamine의 전체 처리구에서 대조구(vitamin-free구)에 비하여 높게 나타났으며, 고농도의 처리구(0.0025 mM)에서는 감소되었다. 특히 모상근의 가장 높은 성장률은 0.01 mM 처리구(75.4 mg dr wt/flask)에서 나타나, 대조구(38.6 mg dr wt/flask)에 비하여 약 2배 정도 높게 나타났으며(Fig. 5), 이 처리구에서 tropene alkaloids의 총함량은 0.05 mg/g dr wt로 대조구(0.478 mg/g dr wt)에 비하여 현저히 낮게 나타났다(Fig. 6).

고 찰

독말풀 모상근의 성장률은 약산성인 SH기본배지(pH 5.9)에서 보다 pH 6.1-6.3 처리구 배지에서 가장 높았다. 그러나 수소이온의 농도가 다소 더 높은 pH 6.5 처리구에서는 모상근의 성장률이 현저히 낮은 반면, tropene alkaloids의 함량은 오히려 pH 6.3 처리구보다 높게 나타났다. 이러한 결과는 모상근의 성장과 tropene alkaloids의 함량간에 부의 상관관계(negative correlation)가 있음을 시사하는데(Lindsey and Yeoman, 1983; Yang et al., 1997), pH가 5.0일 때 모상근 성장률과 tropene alkaloids의 함량이 가장 양호하였던 *Datura stramonium* 모상근과는 상이한 결과이다(Payne et al., 1987). 이러한 차이는 모상근의 종류와 사용된 균주(*Agrobacterium* spp.) 그리고 Ri-plasmid의 무작위적인 삽입에 따른 특성차이로 나타날 수 있다고 생각된다(Payne et al., 1987; Taya et al., 1992).

한편, 암처리구에서 배양한 모상근의 성장률은 서당을 3% 처리한 경우에 가장 높게 나타난 반면, 3%보다 조금 높은 처리구(3.2% 서당처리구)에서는 모상근의 성장이 아주 저조하여, 모상근의 성장에 있어 서당에 의한 삼투압 등이 민감하게 영향을 미치는 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 *Hyoscyamus albus* 모상근에서 서당농도는 성장에 영향을 주지 않는 경우(Christen et al., 1992)와는 상이한 것을 알 수 있다. 또한 인삼모상근 배양을 통한 연구에서 Yang 등(1996)은 모상근의 성장이 광(light)의 유무에 따라 서당의 최적농도가 다르게 나타나는 것을 확인 하였다. 즉, 엽록체가 존재한 모상근은 광처리하에서 현저히 낮은 농도의 서

당처리구에서 왕성한 성장을 하는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서는 암처리구에서 성장률을 조사하였으므로, 앞으로 모상근 성장에 있어 광처리와 서당의 농도관계를 구명할 필요가 있다고 생각된다. 본 연구에서 tropane alkaloids 함량은 2.8%의 서당처리구에서 높게 나타나, 모상근의 성장과 tropane alkaloids의 생성간에 역시 부의 상관관계가 있음을 알 수 있다. 모상근 성장률과 tropane alkaloids 함량에 있어 본 연구결과의 최적 서당농도는 *Datura stramonium* 모상근에서의 5%와 10%인 경우(Payne et al., 1987)에 비하여 낮음을 알 수 있다. 또한 *Datura quercifolia* 모상근의 경우에는 공히 5%이었으므로(Dupraz et al., 1993), 본 연구에서 사용한 독말풀(*D. stramonium* var. *tatula*)에서 얻은 결과와 최적농도가 다를 수 있다. 또한 *Lithospermum erythrorhizon*의 배양세포에서도 세포의 생장은 6%의 sucrose 처리구에서, shikonin의 생성은 3%의 서당처리구에서 각각 양호하였다는 보고가 있으므로(Fujita et al., 1981), 2차대사산물의 생성을 높이기 위해서는 모상근 세포주에 따른 최적 서당농도의 구명이 필수적인 것으로 생각된다.

6종류의 비타민을 각각 농도별로 vitamin-free의 SH 기본배지(대조구)에 첨가하여 모상근을 배양한 결과, 모상근의 성장률은 SH 기본배지 > 6종류의 비타민을 각각 처리한 모든 경우 > 대조구의 순으로 높게 나타나 모상근의 성장에 비타민이 요구됨을 알 수 있었다. Tropane alkaloids의 함량은 0.1 mM의 ascorbic acid 단독 처리구 > 대조구 > 0.07 mM의 nicotinic acid 단독 처리구 > SH기본배지의 순으로 나타났으며, 특히 0.1 mM의 ascorbic acid 단독 처리구에서 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 White배지에서 *Lithospermum erythrorhizon*의 배양세포로부터 shikonin의 생성시 비타민이 억제효과를 나타낸 경우와는 대조적인 현상이다(Fujita et al., 1981). SH기본배지는 높은 양의 비타민이 첨가되는 배지이므로, 본 연구 결과로 미루어 볼때 0.1 mM의 ascorbic acid 및 0.07 mM의 nicotinic acid를 단독처리하거나, 또는 비타민을 전혀 첨가하지 않았을 경우가 SH기본배지 보다 더 tropane alkaloids 생성에 효과적(경제적)임을 알 수 있다.

본 연구결과를 종합하여 보면, 모상근의 성장률은 SH기본배지에서 서당은 3.0%, pH는 6.3으로 조정하여 배양하면 높일 수 있으며, 반면에 tropane alkaloids의 함량은 서당이 2.8%, pH는 6.5로 조정하여 배양하면 높일 수 있고, 특히 vitamin-free의 SH기본배지에 0.1 mM의 ascorbic acid를 단독처리하여 배양하는 것이 효과적임을 확인 하였다.

한편, 본 연구에서 hyoscyamine과 scopolamine 두 종류의 tropane alkaloids가 모상근세포에서 방출되어 배지에서도 검출되었다. 이러한 2차 대사산물의 세포 밖으로의 방출에 관한 연구가 *Duboisia leichhardtii*의 모상근(Muranaka et al., 1993) 및 red beet의 모상근(Taya et al., 1992)에서 수행되었다. 앞으로 독말풀의 모상근 배양으로부터 tropane alkaloids

를 효율적으로 생산하기 위해서는 tropane alkaloids 방출세포주의 선발 및 방출기작에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

적 요

모상근의 성장 및 tropane alkaloids의 생성에 미치는 pH, 서당, 비타민의 영향을 구명하기 위하여, 독말풀(*Datura stramonium* var. *tatula* Torr.)의 잎에 *Agrobacterium tumefaciens* A4T를 접종하여 모상근을 유도하였다. 유도된 모상근 중 성장률이 양호한 clone (DTLA9)을 선발하고, 이를 pH, 서당, 비타민을 각각 여러 농도로 처리한 SH (Schenk and Hildebrandt, 1972) 기본배지에 배양하였다. 모상근의 성장에 있어 최적 pH는 6.3이었으며, 최적 서당농도는 3.0%이었다. Tropane alkaloids의 함량에 있어 최적 pH는 6.5이었으며, 최적 서당농도는 2.8%이었다. 한편, 비타민이 제거된 SH기본배지에 ascorbic acid, D-pantothenate, nicotinic acid, pyridoxine, riboflavin, 그리고 thiamine을 각각 농도별로 첨가하여 배양한 경우에, 모상근의 성장에 있어 비타민의 최적 농도는 각각 0.1, 0.003, 0.07, 0.002, 0.025, 0.01 mM이었다. Tropane alkaloids의 함량은 0.1 mM의 ascorbic acid 단독처리구에서 대조구(vitamin-free구) 및 SH기본배지에서의 경우에 비하여 가장 높게 나타났다.

사사-본 논문은 한국학술진흥재단의 '96 국내 박사후 연수지원에 의해 수행된 연구결과이며, 연수지원에 감사드립니다.

인 용 문 헌

- Christen P, Roberts MF, Phillipson JD, Evans WC (1989) High-yield production of tropane alkaloids by hairy-root cultures of a *Datura candida* hybrid. *Plant Cell Reports* 8: 75-77
- Christen P, Roberts MF, Phillipson JD, Evans WC (1990) Alkaloids of hairy root cultures of a *Datura candida* hybrid. *Plant Cell Reports* 9: 101-104
- Christen P, Aoki T, Shimomura K (1992) Characteristics of growth and tropane alkaloid production in *Hyoscyamus albus* hairy roots transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A4. *Plant Cell Reports* 11: 597-600
- Dupraz JM, Christen P, Kapetanidis I (1994) Tropane alkaloids in transformed roots of *Datura quercifolia*. *Planta Med* 60: 158-162
- Fujita Y, Hara Y, Suga C, Morimoto T (1981) Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Reports* 1: 61-63
- Granicher F, Christen P, Kapetanidis I (1992) High-yield production of

- valepotriates by hairy root cultures of *Valeriana officinalis* L. var. *sambucifolia* Mikan. Plant Cell Reports **11**: 339-342
- Ionkova I, Witte L, Alfermann A** (1994) Spectrum of tropane alkaloids in transformed roots of *Datura innoxia* and *Hyoscyamus x gyorffyi* cultivated *in vitro*. Planta Med **60**: 382-384
- Lindsey K, Yeoman MM** (1883) The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. Exp Bot **34**: 1055-1065
- Maldonado-Mendoza IE, Ayora-Talavera T, Loyola-Vargas VM** (1993) Establishment of hairy root cultures of *Datura stramonium*. Characterization and stability of tropane alkaloid production during long periods of subculturing. Plant Cell Tissue and Organ Culture. **33**: 321-329
- Mano Y, Nabeshima S, Matsui C, Ohkawa H** (1986) Production of tropane alkaloids by hairy root culture of *Scopolia japonica*. Biol Chem **50**: 2715-2722
- Muranaka T, Kazuoka T, Ohkawa H, Yamada Y** (1993) Characteristics of scopolamine-releasing hairy root clones of *Duboisia leichhardtii*. Biosci Biotech Biochem **57**: 1398-1399
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant **15**: 473-479
- Payne J, Hamill JD, Robins R, Rhodes MJC** (1987) Production of hyoscyamine by hairy root cultures. Planta Med **53**: 474-478
- Schenk RU, Hildebrandt AC** (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can J Bot **50**: 199-204
- Taya M, Mine K, Kino-oka M, Tone S, Ichi T** (1992) Production and release of pigments by culture of transformed hairy root of red beet. J Fermentation and Bioengineering **73**: 31-36
- Yang DC, Choi HY, Kim YH, Yun KY, Yang DC** (1996) Growth and ginsenosides production of hairy root (*Panax ginseng* C. A. meyer) via light energy. Korean J Ginseng Sci **20**: 318-324
- Yang DC, Kang HM, Lee KS, Kim YH, Yang DC** (1997) Growth and tropane alkaloid production of hairy roots of *Datura stramonium* var. *tatula* Torr. transformed by *Agrobacterium* spp. Korean J Plant Tissue Culture **24** (in press)

(1997년 1월 3일 접수)