

## 구기자 현탁 세포배양으로부터 이단계 배양과 Elicitor에 의한 Betaine 생산

김 병 원 · 노 광 수

<sup>1</sup>김천대학 임상병리과, <sup>†</sup>계명대학교 생물학과  
(접수 : 1998. 6. 29., 게재승인 : 1998. 10. 20.)

### Betaine Production by Two Stage Culture and Elicitor in the Cell Cultures of *Lycium chinense* Mill

Byung-Weon Kim<sup>1</sup> and Kwang-Soo Roh<sup>†</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Clinical Pathology, Kimcheon College, Kimcheon, Kyungbuk 740-200, Korea  
Dept. of Biology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

(Received : 1998. 6. 29., Accepted : 1998. 10. 20.)

The effects of carbohydrates, hormones and elicitors on both cell growth and betaine production were investigated in the cell cultures of *Lycium chinense* Mill. The maximum effect of glucose and sucrose was observed in cells cultured in the presence of 3% and 7% for cell growth and betaine production, respectively. The effect of hormones on cell growth and betaine production was prominent in the presence of 10  $\mu$ M 2, 4-D, 10  $\mu$ M NAA and 2.5  $\mu$ M IAA, whereas cell growth and betaine production were excellent at 2.5  $\mu$ M BA and 10  $\mu$ M BA, respectively. Abiotic elicitors such as KCl, MnCl<sub>2</sub> and NaCl exhibited an inhibitory role on cell growth in all treatment groups. Betaine production was increased according to increase of concentration of abiotic elicitors. Methanol-soluble and insoluble components as biotic elicitor remarkably inhibited cell growth from 2 mg and 6 mg, respectively. Betaine production was increased maximally at 2 mg of biotic elicitors. When growth medium was switched to production medium at two stage culture, it resulted that cell fresh weight and dry weight decreased but betaine content increased about 2.2-fold.

Key Words : betaine, two stage culture, elicitor, *Lycium chinense* Mill.

### 서 론

식물세포는 간단한 배지에서도 생장이 가능하며, 탄수화물, 질소원, 인산염, 성장 조절물질은 식물 세포배양에 필수적이다(1). 식물세포배양에 의한 유용물질 생산은 배양배지와 배양 환경의 조절에 의해 향상시킬 수 있다.

유용물질 생산을 위한 식물세포 배양배지의 주성분은 질산염, 인산염, 마그네슘과 같은 염, sucrose, glucose, fructose 등과 같은 당이 있으며, 2,4-D, NAA, IAA, IBA 등과 같은 auxin류, kinetin, Zip, zeatin 등과 같은 cytokinin류 등도 물질생산 및 세포의 생장에 큰 영향을 주는 것으로 알려져 있다(2). 이러한 영양분의 결핍은 초기의 세포성장을 억제하므로 세포에 스트레스로 작용하여 물질의 생산성이 향상될 수 있다(3)

이차 대사산물의 생합성은 식물체의 대부분 조직에서 일어나

지만, 탈분화된 조직에서 보다 왕성히 이루어지는 것으로 보고되어 있다(4). 현재까지 조직배양을 통하여 생산된 유용한 이차 대사물질들에는 quinine(5), morphine과 codein(6), berberine (7), digitalis glycoside(8) 등이 있는 것으로 알려져 있다. 고등식물에 의해 생산되는 유용한 이차 대사산물들은 환경 스트레스에 반응하여 특이한 발달단계에서 특정 형태의 세포에 축적되는 경향이 있다. 따라서 고등식물의 배양세포도 어떤 화학적 스트레스를 받거나 특이한 세포배양 조건하에 노출될 때 많은 양의 이차 대사산물을 축적하게 된다(9).

식물세포를 현탁배양할 경우 세포 성장율을 높일 수 있으며, 다양한 조건하에서 세포를 배양하므로 이차 대사물질의 생산성을 높일 수 있는 잇점이 있다(10). 그러나 식물세포배양을 통한 이차 대사물질의 생산에 있어서 가장 큰 문제점은 모식물체에 비하여 그 생산량이 낮다는 점과, 물질생산과 biomass의 최고 시기가 일치하지 않다는 점이다. 이것을 극복하는 방법으로는 고생산성 세포주를 선발하는 방법과 배양배지 및 배양조건을 통한 이단계 배양이 있다(11)

식물체에서 생산되는 많은 이차 대사물질들은 대체적으로 항균활성을 가지고 있기 때문에 이들이 의학적인 효과를 보이는

<sup>†</sup> Corresponding Author : 1000 Sindangdong, Dalseogu, Taegu 704-701, Korea  
Tel : (053)580-5207, Fax : (053)580-5164  
e-mail : rks@kmucc.keimyung.ac.kr

경우가 많은 것으로 알려져 있다(10). 그리고 식물체가 미생물에 노출될 경우 식물체에 의해서 저분자량의 phytoalexin이 합성되거나 축적된다(12). 또한 세포배양 조건하에서 phytopathogenic microorganism의 추출물을 배지에 첨가해 줄 경우 식물세포들은 대사물질을 합성, 축적하는 반응을 보이는데, 이러한 elicitation은 식물의 이차대사 조절기작을 연구할 뿐만 아니라 목적하는 성분의 생산성을 향상시키기 위한 한가지의 방법이 될 수 있다(13).

자연상태에서 상당수의 식물들은 화학적, 미생물적 공격에 반응하여 phytoalexin을 합성하는데(12), 이의 유도원을 elicitor라 한다. Elicitor는 곰팡이, 박테리아 등과 같은 biotic elicitor와 염, 자외선, RNase, 중금속 등과 같은 abiotic elicitor로 구분된다(3). 최근 물질생산의 효율을 높이기 위한 방법으로 세포배양 배지에 elicitor를 처리하는 방법이 활발히 연구되고 있다(13)

따라서 세포배양에 의해 유용 이차 대사산물을 효율적으로 생산하기 위해서는 식물세포에 해를 주지 않으면서도 조제가 용이하고 물질생산을 높일 수 있는 적절한 elicitor의 개발이 매우 중요하다 이에 본 연구에서는 구기자로부터 약리활성을 보이는 betaine의 생산성을 높일수 있는 elicitor의 효과에 대하여 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 캘러스의 유기 및 배양

구기자(*Lycium chinense* Mill.) 잎을 소독된 침으로 자극한 후, 잎후면이 0.001  $\mu$ M의 BA, 5  $\mu$ M의 2,4-D, 3% sucrose 0.75% agar가 함유된 3/2 MS배지(14)에 접하도록 치상하여 25 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C의 암처에서 배양하였다. 3 주 후 잎표면에 유기된 캘러스 중 유연한 캘러스만을 선별하여 캘러스 유기시와 같은 배지에 옮겨 주었으며, 3 주 간격으로 계대배양하였다.

유연한 캘러스 1~2 g을 메스로 잘 균질화한 다음 3% (w/v) sucrose, 5  $\mu$ M 2,4-D와 0.001  $\mu$ M BA가 함유된 3/2 MS 액체 배지 20 mL이 든 삼각플라스크에 옮긴 후, 7 일간 80 rpm속도로 현탁배양하였다. 20 mL의 배지가 함유된 삼각플라스크에 배양액을 제거한 세포를 넣어 현탁배양을 하였고, 4 주마다 계대배양을 하면서 실험에 사용하였다.

### Betaine의 추출과 HPLC 분석

Betaine의 추출과 HPLC 분석은 Kim 등(15)의 방법에 의해 행하였다. 추출과정에서의 농축된 시료는 HPLC용 MeOH 1 mL에 녹인 후, 0.45  $\mu$ m의 필터로 여과하여 HPLC분석에 사용하였으며, 시료의 함량 측정을 위한 검량곡선은 표준 betaine(Sigma)을 사용하여 작성하였다.

### 세포생장과 betaine의 생산에 미치는 당의 영향

0, 1, 3, 5, 7, 9%의 sucrose와 glucose를 첨가시킨 3/2 MS 액체배지(0.001  $\mu$ M BA, 5  $\mu$ M 2,4-D) 20 mL에 1 g의 캘러스를 첨가한 후, 3 주간 현탁배양하였다.

### 세포생장과 betaine의 생산에 미치는 hormone의 영향

0, 2.5, 5, 10, 20  $\mu$ M의 2,4-D, NAA, IAA, BA가 각각 첨가된 3/2 MS 액체배지에 1 g의 캘러스를 첨가한 후, 3 주간 현탁배양하였다.

### 세포생장과 betaine의 생산에 미치는 abiotic elicitor의 영향

Abiotic elicitor로서 0, 50, 100, 200 mM의 MnCl<sub>2</sub>, NaCl과 KCl이 첨가된 20 mL의 3/2 MS배지(0.001  $\mu$ M BA, 5  $\mu$ M 2,4-D)에 1 g의 캘러스를 첨가한 후 3 주간 현탁배양하였다.

### 배양시기별 세포생장과 betaine 생산에 미치는 biotic elicitor의 영향

소나무 뿌리에 공생하는 외생 균근(ectomycorrhizae) 10 g을 채취하여 80% 메탄올로 추출한 후, 여과지를 이용하여 가용성 성분과 불용성 성분으로 분리하였다. 상정액을 10,000 g에서 원심분리하여 수확된 불용성 성분은 40 $^{\circ}$ C의 건조기에서 건조시킨 후, 4 $^{\circ}$ C에 저장하면서 실험에 사용하였다

배양시기에 따른 세포생장과 betaine 생산에 미치는 biotic elicitor의 영향을 조사하기 위하여 2 mg의 80% 메탄올 추출 가용성 성분과 불용성 성분이 첨가된 20 mL의 3/2 MS배지(0.001  $\mu$ M BA, 5  $\mu$ M 2,4-D)에 현탁배양된 세포 1 g을 첨가하여 0, 1, 2, 4, 5일간 배양하였다.

### 세포생장과 betaine의 생산에 미치는 biotic elicitor의 영향

현탁 배양된 세포를 여과하여 세포만을 분리한 후, 세포 1 g을 20 mL의 3/2 MS배지(0.001  $\mu$ M BA, 5  $\mu$ M 2,4-D)가 든 삼각플라스크에 넣었다. 80% 메탄올 추출 불용성 성분과 가용성 성분을 100 mL 증류수에 녹인 후, 0, 2, 4, 6, 8 ppm을 세포배양배지에 첨가하여 7일 동안 배양하였다.

### 이단계 배양에 의한 betaine 생산

조사된 여러 가지 각 factor의 배양조건 중에서 세포생장과 betaine 생산에 가장 양호한 factor와 이의 농도들을 이용하여 Table 1과 같은 이단계 배양매지를 조성하였다. 세포 1 g을 20 mL의 생장배지(growth medium, GM)에 넣은 다음, 10 일간 배양하고 배양매지와 세포를 분리한 후, 곧바로 생산배지(production medium, PM)로 교체하여 5 일간 배양하였다

대조구는 세포 1 g을 생장매지에서 10 일간 배양하고, 배양매

Table 1 Composition of growth and production medium for betaine production. Other components exception macronutrients were the same with MS medium

| Factors                         | Growth medium | Production medium |
|---------------------------------|---------------|-------------------|
| <u>Macro-salts</u>              |               |                   |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> | 206 mM        | 412 mM            |
| KNO <sub>3</sub>                | 753 mM        | 376 mM            |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 12.5 mM       | 12.5 mM           |
| <u>Carbon source</u>            |               |                   |
| Glucose                         | 70 g/L        | 70 g/L            |
| <u>Hormones</u>                 |               |                   |
| 2,4-D                           | 10 $\mu$ M    | -                 |
| BA                              | -             | 10 $\mu$ M        |
| <u>Abiotic elicitor</u>         |               |                   |
| MnCl <sub>2</sub>               | -             | 400 mM            |
| <u>Biotic elicitor</u>          |               |                   |
|                                 | -             | 2 mg              |
| <u>Culture period</u>           |               |                   |
|                                 | 10 day        | 5 day             |

- : No treatment

\* Data summarized from Kim *et al* (15).

지와 세포를 분리하여 세포만을 모은 후, 새로운 생장배지로 교체하여 5 일간 배양하였다. 또 다른 대조구는 생산배지로 10 일간 배양하고 위의 방법과 동일한 방법으로 새로운 생산배지로 교체하여 5 일간 배양하였다.

모든 과정에서의 세포의 생장률 측정은 배양배지로부터 세포만을 분리한 다음, 생체중량을 측정하였으며, 40°C 건조기에서 1 일간 건조한 후, 건조중량을 측정하였다.

### 결 과

#### 세포생장과 betaine 생산에 미치는 당의 영향

배지에 첨가된 0, 1, 3, 5, 7, 9%의 sucrose와 glucose의 영향을 조사한 결과, sucrose는 3% 처리구에서 가장 높은 세포 생장률을 보였으나 그 이상의 농도에서는 감소하였으며(Figure 1A, B), betaine 함량은 3% 처리에서 급격히 증가하기 시작하여 7% 처리구에서 가장 함량이 높았다(Figure 1C).

Glucose는 3% 처리구에서 생체중량이 가장 높았으며(Figure 1A), 7% 처리구에서 건조중량이 가장 높았다(Figure 1B). 따라서 이단계 배양에서 세포생장을 위하여 건조중량이 높았던 7% glucose를 첨가하여 주었다. Betaine 함량은 glucose 농도가 증가할 수록 증가하는 경향을 보였으며 7% 처리구에서 가장 높은 함량을 보였다(Figure 1C).

#### 세포생장과 betaine 생산에 미치는 hormone의 영향

배지에 첨가된 0, 2.5, 5, 10, 20  $\mu$ M의 2,4-D, NAA, IAA와 BA의 영향을 조사한 결과, 2,4-D 처리구의 경우 0.25  $\mu$ M 농도부터 급속히 증가하기 시작하여 10  $\mu$ M에서 가장 양호한 세포 생장률과 betaine 함량이 가장 높았으며, NAA에서는 0.25  $\mu$ M 처리구에서부터 세포 생장률이 증가하기 시작하여 10  $\mu$ M에서 가장 높은 세포 생장률과 betaine 함량을 보였다. IAA의 경우 25  $\mu$ M 처리구에서 세포 생장률과 betaine 함량이 가장 높았으며, 그 이상의 농도에서는 감소하였다. 그러나 cytokinin인 BA의 경우 세포 생장률은 2.5  $\mu$ M 처리구에서 가장 좋았으며, betaine 함량은 10  $\mu$ M 처리구에서 가장 높았다(Figure 2)

#### 세포생장과 betaine 생산에 미치는 abiotic elicitor의 영향

Abiotic elicitor인 KCl,  $MnCl_2$  및 NaCl의 영향을 조사한 결과, 세포생장의 경우 생체중량은 모든 처리구에서 감소하는 경향을 보였으나(Figure 3A), 건조중량은 KCl과  $MnCl_2$  처리구에서는 농도가 증가할 수록 감소하였으며, NaCl의 농도가 증가할 수록 증가하는 경향을 보였다(Figure 3B).

Betaine 함량의 경우 NaCl과 KCl은 처리 농도가 증가할 수록 완만한 함량 증가를 보였으나,  $MnCl_2$ 는 200 mM 처리구에서 급격한 함량 증가를 보였으며, 다른 처리구에 비해 betaine 함량이 2 배이상 높은 것으로 관찰되었다(Figure 3C).

#### 배양시기별 세포생장과 betaine 생산에 미치는 biotic elicitor의 영향

배양시기에 따른 세포생장과 betaine 생산에 미치는 biotic elicitor의 영향을 조사한 결과, 80% 메탄올 추출물의 가용성 성분과 불용성 성분을 첨가하였을 때 배양 4일까지는 세포생

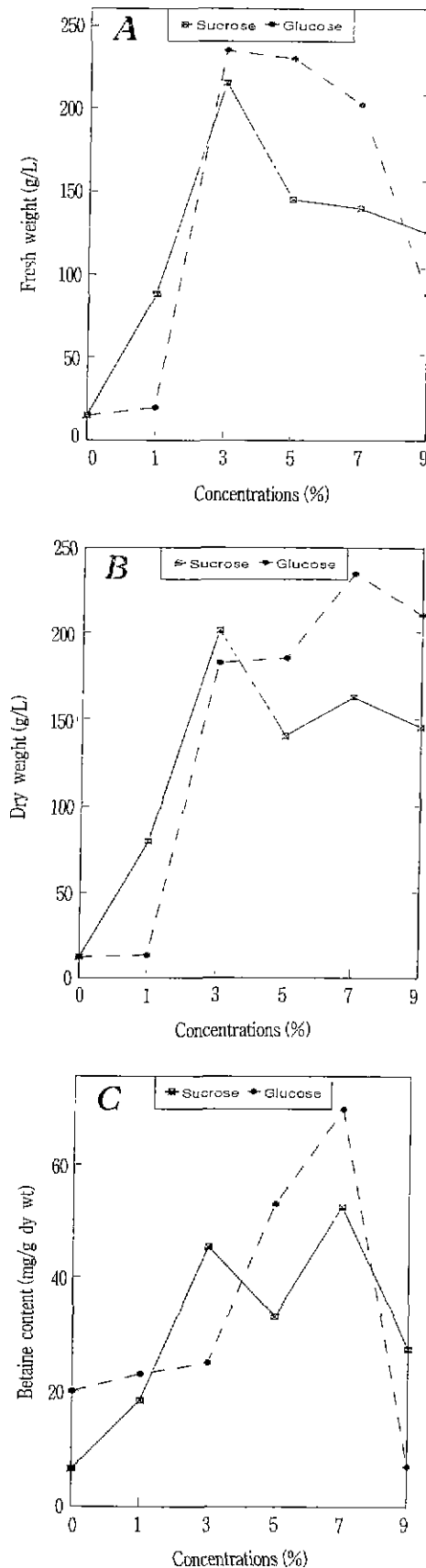


Figure 1. Effect of sucrose and glucose on the cell growth (A and B) and betaine production (C).

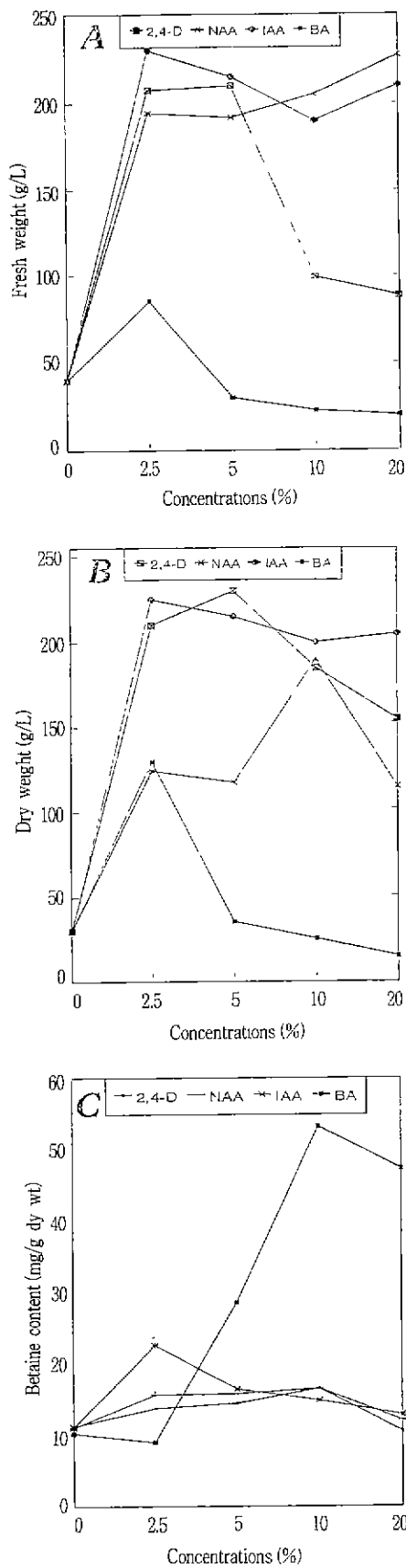


Figure 2. Effect of hormones on the cell growth (A and B) and betaine production(C)

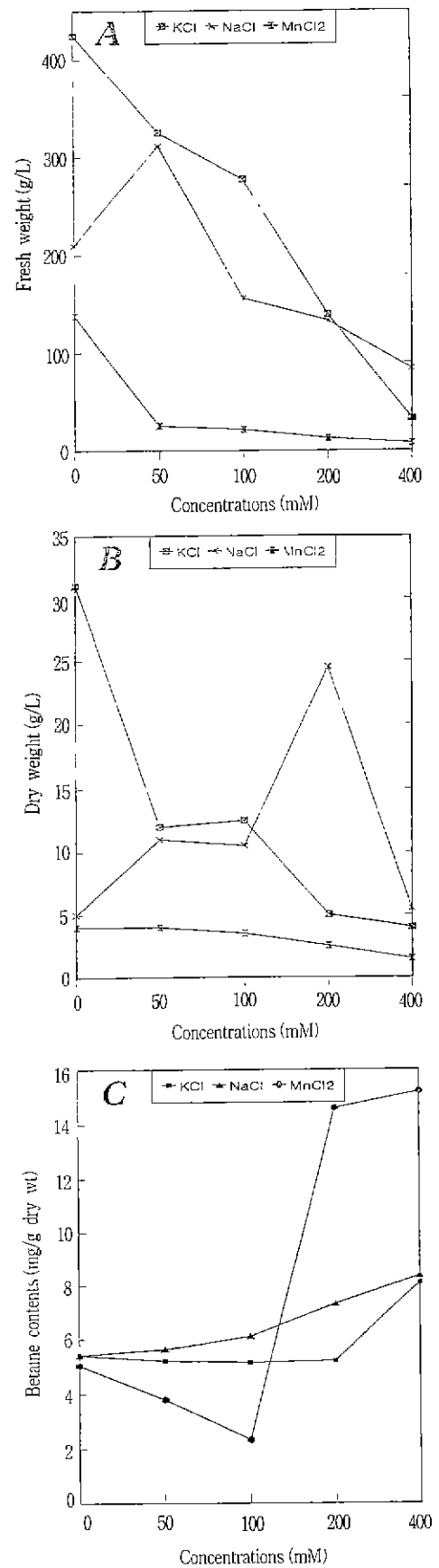


Figure 3. Effect of abiotic elicitor on the cell growth (A and B) and betaine production (C)

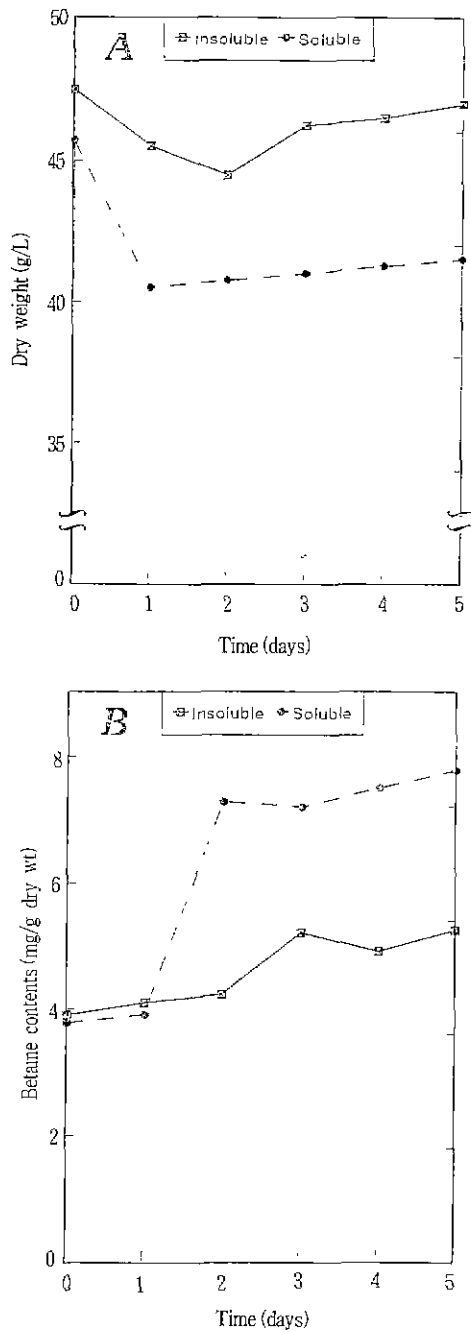


Figure 4. Effect of culture time on the cell growth (A) and betaine production (B) in medium containing biotic elicitor.

장이 억제되었으나(Figure 4A), betaine 함량은 배양 2일째 부터 급격히 증가하기 시작하여 배양일 수가 증가할 수록 함량이 증가하는 경향을 보였다. 특히 가용성 성분 처리구가 불용성 성분 처리구에 비하여 betaine 함량이 2 배 이상 높았다(Figure 4B)

**세포생장과 betaine 생산에 미치는 biotic elicitor의 영향**

세포생장과 betaine 생산에 미치는 80% 메탄올 추출물의 가용성 성분과 불용성 성분의 영향을 조사한 결과, 불용성 성분의 경우 세포생장은 4 mg까지는 억제되지 않았으나 6 mg 이후부

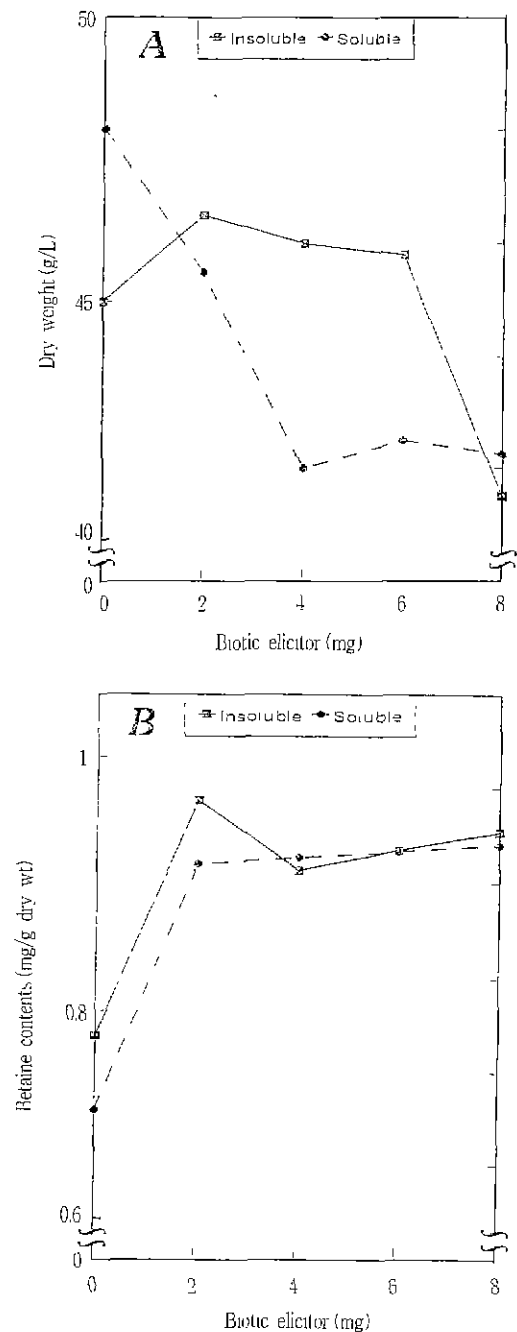


Figure 5. Effect of biotic elicitor on the cell growth (A) and betaine production (B).

리는 크게 억제되는 것으로 나타났으며(Figure 5A), betaine 함량은 2 mg에서 가장 높았으나 그 이상에서는 감소하였다(Figure 5B) 그리고 가용성 성분의 경우 세포생장은 4 mg까지 크게 억제되었으며 그 이상에서는 일정하게 억제되었다(Figure 5A) Betaine 함량은 2 mg에서 최고치를 보였으며 그 이상에서는 거의 일정하였다(Figure 5B).

**이단계 배양의 영향**

Table 1과 같은 배지조건에서의 일단계 배양과 생장배지에서 생산배지로 옮겨 배양한 이단계 배양에서의 세포 성장률과

Table 2. Cell growth and betaine content at culture stages

| Culture stages   | Cell fresh wt. (mg/ flask) | Cell dry wt. (mg/ flask) | Betaine content (mg/g dry wt.) |
|------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| <u>One stage</u> |                            |                          |                                |
| GM               | 2,410                      | 225                      | 3.45                           |
| <u>Two stage</u> |                            |                          |                                |
| GM → GM          | 2,010                      | 190                      | 3.67                           |
| PM → PM          | 220                        | 20                       | 5.54                           |
| GM → PM          | 590                        | 59                       | 7.65                           |

GM and PM indicate growth medium and production medium, respectively.

betaine 함량을 비교한 결과를 Table 2에 나타내었다.

일단계 배양인 GM과 이단계 배양 중 GM→GM에서의 세포 성장율과 betaine 생산량을 비교하면, GM→GM이 GM보다 세포성장율은 약간 낮았으나 betaine 함량은 약간 높았다. 이단계 배양에서의 PM→PM이 GM→GM보다 세포생장은 약 10배 정도 낮았으나 betaine 함량은 15배 높았다. GM→PM은 GM→GM과 비교하여 세포생장은 약 3.2-3.5배 낮았고 PM→PM보다는 2.7-3배 높았으며, betaine 함량은 각각 2배와 1.4배 높았다. 한편 GM과 GM→PM으로의 이단계배양을 비교한 결과, GM→PM으로 이단계 배양한 것이 일단계 배양한 것 보다 세포생장은 약 4배 정도 낮았으나, betaine 함량은 약 2.2배 높았다.

그리고 세포의 형태는 생장배지에 배양한 세포가 연노랑색을 띄고 유연한 반면, 생산배지의 세포는 흑갈색을 띄고 있었을 뿐만 아니라 배양배지로 암갈색의 폴리페놀성 물질을 배출하였다.

## 고 찰

고등식물이 건조 또는 해양 조건과 같은 스트레스 환경에 노출될 경우 이에 적응하기 위하여 어떤 발달단계에서 유용한 이차 대사물질을 세포에 축적한다(16). 배양세포도 어떤 화학적 스트레스를 받거나 특이한 세포배양 조건에 노출될 때 많은 양의 이차 대사산물을 축적하게 된다(3). 이러한 이차대사 물질생산과 세포생장에 큰 영향을 미치는 인자로서는 염류, 당류, auxin류 및 cytokinin류 등이 있다(2)

본 연구에서 사용한 구기자는 건조한 환경에 처하게 되면 삼투 조절을 위하여 체내에 betaine을 합성한 다음 축적하게 되는데, 이때 생성되는 betaine은 핵의 지배를 받는 chloroplastic enzyme인 betaine aldehyde dehydrogenase의 촉매에 의해서 합성된다(17)

탄수화물은 세포 건조중량의 40% 이상을 차지하는 매우 중요한 세포 구성 성분으로서, sucrose는 정체를 길게 해주고, 수용성 RNase 활성을 억제시켜준다. Sucrose 분해 산물인 glucose는 내생 auxin 합성을 억제하는 것으로 알려져 있으므로 세포의 성장에는 당의 영향이 매우 크다고 할 수 있다(18). 고농도의 sucrose가 첨가된 배지에서 건조중량의 증가는 세포분화와 세포생장에 기인한 것이 아니라 단당류 형태의 탄소원의 저장력 증가 또는 탄소원의 결합에 기인한 것이므로 최적의 결과를 얻기 위해서는 세포 성장률과 물질 생산률 사이의 균형을

조절해 주어야 한다(19).

당의 첨가는 건조중량과 더불어 이차 대사물질의 양을 증가시키는데, *Lithospermum erythrorhizon*은 5%의 sucrose에서, *Catharanthus roseus*는 7~8%의 saccharose와 glucose 농도에서 가장 양호하였다고 보고된 바 있다(20). 본 연구에서도 가장 보편적으로 세포배양에 응용되는 sucrose는 농도가 증가할수록 세포의 성장을 촉진시키는 것으로 나타났다. 특히 3% 처리구에서 가장 높은 세포성장율을 관찰할 수 있었으며, betaine 함량이 가장 높았던 처리구는 7%로 나타났다. Glucose는 생체중량의 경우 3%, 건조중량의 경우 7%가, betaine 함량은 glucose의 농도가 증가할수록 증가하는 경향을 보였다. 따라서 본 연구에서는 이단계 배양시 세포생장을 위하여 건조중량이 높았던 7% glucose를 사용하였다 이와같이 7% glucose 농도에서 건조중량이 높은 이유는 glucose의 세포내 축적 결과인 것으로 생각된다.

세포생장에 미치는 hormone의 효과를 연구한 결과, 사용한 auxin류에 따라 세포성장율에 차이가 있었으나 2,4-D의 건조중량이 가장 양호하였으며, betaine 함량은 2.5  $\mu$ M IAA 처리구에서 가장 높았다. 이러한 결과는 auxin이 세포의 생장은 촉진시키지만, 물질 생산은 감소시킨다는 보고(18)와는 약간의 차이가 있다. 따라서 세포의 성장에는 2,4-D를, betaine의 생산에는 IAA를 사용하는 것이 바람직하다고 생각된다.

Cytokinin인 BA는 auxin류의 hormone보다 세포의 생장은 매우 좋지 않았으나, betaine 함량은 증가하였다. 그러나 본 연구의 결과로 보아 BA 단독 처리구는 생체중량을 증가시키는데 적합하지 않아 auxin과 적정농도로 혼용해주는 것이 효과적일 것으로 생각된다. Cytokinin은 자유 라디칼을 잡아주거나, 감소시켜 주는 역할을 할 뿐만 아니라 단백질 합성을 증가시켜 주거나, RNase와 proteinase를 억제시켜 주는 작용을 하는 것으로 알려져 있다(20)

무기염과 같은 abiotic elicitor는 biotic elicitor보다 조제가 쉽고 경제적으로 이용할 수 있는 장점이 있다. 일일초 세포배양에서 0.1-0.2 g의 NaCl을 처리하면 48-72 시간 만에 indole alkaloid의 함량이 최대로 증가된다고 보고된 바 있다(21). 또한 *Coffea arabica*(22) 및 *Datura innoxia*(23)의 세포배양에서도 NaCl이 alkaloid의 함량을 증가시켰다는 보고가 있다. 또한 elicitor를 첨가할 경우 세포의 성장, 질산염의 흡수가 중지되면서 즉각적으로 특이한 mRNA의 *de novo* 합성이 시작된다. 그리고  $Ca^{2+}$  첨가 및 미생물 감염에 의해서 유발되는 elicitor의 효과는 세포질로부터 핵으로 인산염의 수송을 유도하는데, 이때 이와 관련된 특이한 mRNA/protein 체계의 활성화에 의한 것으로 보고되어 있다(20)

3종의 abiotic elicitor는 50 mM 이상 처리시 세포의 생장이 매우 억제되었으며, elicitor 간에도 차이를 보여  $MnCl_2$ 이 세포의 성장을 가장 억제하였다. Betaine 함량은 NaCl과 KCl 처리구에서 완만한 함량 증가를 보였으나,  $MnCl_2$ 는 100 mM 이상에서 다른 처리구에 비해 2 배 이상의 betaine이 관찰되었다.

Biotic elicitor로는 주로 곰팡이, 박테리아 등을 주로 이용하는데(19). 본 연구에서는 탄수화물을 이용하는 방식으로 소나무 뿌리에 공생하는 외생 균근(ectomycorrhizae)을 이용하였다. 이 균근은  $PO_4^{2-}$ ,  $NH_4^+$ ,  $K^+$  및  $NO_3^-$  등과 같은 필수이온의 흡수를 증가시키는 것으로 알려져 있다(24). Biotic elicitor는 배양 일수

와 처리농도 및 조제방법에 따라 세포의 생장에 영향을 미쳤다. 80% 배탄을 가용성 성분과 불용성 성분을 배양배지에 첨가하였을 경우 배양 4 일까지는 세포생장이 증가하지 않았지만, 5 일 후부터는 다시 생육이 되는 것을 관찰할 수 있었다.

*Botrytis* 종의 추출물을 *Taxus yunnanensis*의 배양 세포에 첨가해 주었을 때 대조구에 비하여 taxol 함량이 35% 정도 증가하였다(10)는 보고와 *Aspergillus* 종의 추출물을 *Onosma paniculatum*의 세포 배양시 첨가하였을 때 shikonin의 양이 2 배로 증가하였으나 세포의 생장은 억제되었다는 보고(13)가 있다. 본 연구에서는 균근의 80% 배탄을 가용성 성분은 4 mg까지는 세포생장이 억제되었으나, 그 이후부터는 세포생장이 일정하였으며, betaine 함량은 2 mg에서 급격히 상승하였으며 그 이상에서는 상승하지 않았다. 불용성 성분은 4 mg까지는 큰 변화없이 세포가 성장되었으나, 6 mg 이후부터는 세포생장을 억제하는 것으로 나타났으며, betaine 함량은 2 mg에서 최고에 달하였으나 그 이후부터는 변화가 없었다.

따라서 본 연구에서 사용한 biotic elicitor는 세포의 생장에는 큰 영향을 미치지 않으면서도 betaine의 생산을 촉진시킬 수 있는 효과적인 elicitor임이 판명되었다. 추후의 연구에서는 elicitor 중 물질 함량을 증가시키는 물질을 구명할 예정이며, 기타 물질 생산에도 응용할 예정이다.

대부분의 식물세포를 배양할 경우 세포 생장이 먼저 일어난 후 물질생산이 일어나므로 세포생장과 물질생산의 불일치에 대한 문제점을 해결하기 위하여 이단계 배양을 통해 세포의 배양 환경 및 배지를 조절하여 줌으로써 세포의 성장율과 대사물질의 축적율을 증가시킬 수 있다(25).

이단계 배양을 하면 세포 성장율은 일단계 배양보다 감소하였으나 betaine 함량은 증가하였다. 이 중 GM과 GM→PM으로의 이단계 배양을 비교하면, GM→PM으로 이단계 배양한 것이 일단계 배양한 것 보다 세포생장은 약 4배 정도 낮았으나, betaine 함량은 약 2.2배 정도 높았다. 이러한 결과는 비생산 세포를 생산배지로 옮겨 줄 경우 건전한 세포들이 물질을 생산하는데 최적의 결과를 가져올 수 있음을 보여주는 것이며(19), 배양배지에서 세포를 대수증식기까지 증식시킨 후 생산배지로 옮겨 주는 이단계 배양이 betaine 생산성을 높일 수 있는 좋은 방법인 것으로 생각된다.

*Gossypium arboreum* 세포배양시 *Verticillium dahliae*의 conidia를 첨가하였을 때 gossypol을 5-10 mg/L에서 500 mg/L로 증가시킬 수 있었다는 보고(6)와 최적생장과 최적 2차 대사물질의 생산은 동시에 성취할 수 없기 때문에 최적화된 독립된 배지에서의 이단계 배양을 실시하여 3개월 동안 *Digitalis lanata* 세포를 배양하여 약 6배정도의  $\beta$ -methyl-digitoxin을 생산하였다는 보고도 있다(20).

이러 가지 바이러스성 질병과 암의 퇴치를 위해서 천연산물에 대한 더 많은 관심과 이차 대사물질에 대한 요구의 팽창과 함께 약용식물의 기내배양과 이차 대사물질의 생산에 대한 연구는 앞으로 생명과학 및 생물공학 분야에서 더욱더 활발하게 지속될 것으로 기대된다

## 요 약

세포생장과 betaine 생산에 미치는 당(glucose, sucrose),

hormone(2,4-D, NAA, IAA, BA) 및 elicitor의 영향을 조사하였다. Glucose와 sucrose 모두 세포생장에는 3%, betaine 생산에는 7%를 첨가해주는 것이 가장 좋았다. Hormone의 경우 세포생장에는 2,4-D 10  $\mu$ M, NAA 10  $\mu$ M, IAA 25  $\mu$ M, BA 2.5  $\mu$ M이 가장 양호하였으며, betaine 생산에는 2,4-D 10  $\mu$ M, NAA 10  $\mu$ M, IAA 2.5  $\mu$ M, BA 10  $\mu$ M이 가장 양호하였다. Abiotic elicitor인 KCl, MnCl<sub>2</sub>, NaCl은 모든 처리구에서 세포생장이 억제되었으나, betaine 함량은 KCl, MnCl<sub>2</sub>, NaCl의 농도가 증가함에 따라 증가하였다. Biotic elicitor로서 소나무 공생 균근의 80% 배탄을 추출 가용성 성분은 2 mg에서부터, 불용성 성분은 6 mg에서부터 세포생장이 억제되었으며, betaine 함량은 2 mg의 가용성 성분과 불용성 성분에서 가장 높았다. 배양배지에서 생산배지로 옮겨서 배양하는 이단계 배양을 실시할 경우, 일단계 배양보다 세포의 생체중량과 건조중량은 감소하였으나 betaine 함량은 약 2.2 배 증가하였다

## 참 고 문 헌

1. Choi, K. T. (1986), *Panax ginseng* C. A. Meyer' Micropropagation and the *in vitro* production of saponins, Biotechnology in Agriculture and Forestry-Medicinal and Aromatic Plants I (Y. P. S. Bajaj, ed.), Vol. 4, pp 484-500, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
2. Buitelaar, and Tramper (1992), Strategies to improve the production of secondary metabolites with plant cell culture: a literature review. *J. of Biochem.*, 23, 111-114.
3. DiCosmo, F. and M. Misawa (1985), Eliciting secondary metabolism in plant cell cultures. *Trends Biotechnol.*, 3, 318-322.
4. Wiermann, R. (1981), Secondary plant products and cell and tissue differentiation, The Biochemistry of Plants-Secundary Plant Products (E. E. Conn ed.). Vol. 7, pp 85-116, Academic Press, New York.
5. Anderson, L. A., A. T. Keene, and J. D. Philipson (1982), Alkaloid production by leaf organ, root organ and cell suspension cultures of *Cinchona ledgeriana*, *Plant Med.*, 46, 25-27.
6. Heinstejn, P. F. (1985), Future approaches to the formation of secondary natural products in plant cell cultures. *J. Nat. Prod.*, 48, 1. 1-9.
7. Ikuta, A. and H. Itokawa (1988), Berberine: Production through plant (*Thalictrum* spp.) cell culture. *Biotechnology in Agriculture and Forestry-Medicinal and Aromatic Plants I* (Y. P. S. Bajaj, ed.), Vol. 4, pp 282-293, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
8. Rucker W. (1988), *Digitalis* spp.: *in vitro* culture, regeneration, and the production of cardenolides and other secondary products. *Biotechnology in Agriculture and Forestry -Medicinal and Aromatic Plants I* (Y. P. S. Bajaj, ed.), Vol. 4, pp 388-418, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
9. Collinge, M. (1986), Ways and means to plant secondary

- metabolites. *Trends Biotechnol.*, **4**, 229-301.
10. Chen, X. Y. and Z. H., Xu (1995), Present status and prospects of *in vitro* production of secondary metabolites from plant in china, Progress in the production of useful secondary metabolites from plants, pp 40-56, The Botanical Society of Korea.
  11. Berlin, J., C Mollenschott, and F. DiCosmo (1987). Comparison of various strategies to optimize alkaloid accumulation of a cell suspension culture of *Catharanthus roseus* *Z. Naturforsch.*, **42C**, 1101-1108.
  12. Hans, D. V., J. W. Mansfield, J. A. Bailey, and E. F. Farmer (1994). Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus phytoantipicins, *The Plant Cell*, **6**, 1191-1192.
  13. Ning, W., Q. H. Zhao, Z. H. Xia, and R. Q. Cao (1994). Effects of fungal elicitor on shikonin derivatives formation on *Onosma Paniculatum* cell cultures, *Acta Phytophysiological Sinica*, **20**, 325-331.
  14. Murashige, T. and F. Skoog (1962), A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, **15**, 473-497.
  15. Kim, B. W., M. S. Choi, and K. S. Roh (1997), Effect of nitrate and phosphate on cell growth and betaine production in *Lycium chinense* Mill., *Korean J Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 176-183.
  16. Weretilnyk, E. A. and A. D. Hanson (1990). Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A*, **87**, 2745-2749.
  17. Collinge, M. (1986), Ways and means to plant secondary metabolites. *Trends Biotechnol.*, **4**, 229-301.
  18. De-Eknamkul, and Ellis (1985), Rosmaric acid production in plant cell culture, *Biotechnology in Agriculture and Forestry-Medicinal Aromatic Plants* (Y. P. S. Bajaj, ed.), Vol 4, pp 310-329, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
  19. Berlin, J. (1988), Formation of secondary metabolites in cultured plant cells and its impact on pharmacy, *Biotechnology in Agriculture and Forestry-Medicinal and Aromatic Plants* (Y. P. S. Bajaj, ed.), Vol. 4, pp 37-59, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
  20. Endress, R. (1991), Plant cells as producers of secondary compounds, *Plant Cell Biotechnology* (R. Endress, ed.), pp 121-255, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
  21. Smith, J. L., N. J. Smart, W. G. W. Kurz, and M. Misawa (1987), The use of organic compounds to increase the accumulation of indole alkaloids in *Catharanthus roseus* (L.) G. Cell suspension cultures, *J. Exp. Bot.*, **38**, 1501-1506.
  22. Frischknecht, P. M. and T. W. Baumann (1985), Stress-induced formation of purine alkaloids in plant tissue culture of *Coffea arabica*, *Phytochem.*, **24**, 2255-2257.
  23. Brachet, J. and L. Cosson (1986), Changes in the total alkaloids content of *Datura innoxia* Mill subjected to salt stress, *J. Exp. Bot.*, **37**, 650-656
  24. Wilcox, H. E. (1991), Mycorrhizae, In *Plant roots: the hidden half* (Waisel, Y., A. Eshel and U. Kafkafi, eds.), pp 731-765. Marcel Dekker, New York.
  25. Staba, E. J. (1985), Milestones in plant tissue culture systems for the production of secondary products *J Nat Prod.*, **48**, 203-209