

사리풀 (*Hyoscyamus niger* L.) 모상근의 Tropane Alkaloid 생성에 미치는 배지, 배양주기, Sucrose 및 Dextrose의 영향

최철희 · 김용해 · 양덕조*

충북대학교 자연과학대학 생명과학부

Effects of Media, Culture Peroids, Sucrose and Dextrose on Tropane Alkaloid Production in Hairy Root Cultures of *Hyoscyamus niger* L.

CHOI, Chul Hi · KIM, Yong Hae · YANG, Deok Cho*

School of Life Sciences, College of Natural Sciences, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea

ABSTRACT We have investigated the effect of culture conditions on tropane alkaloids (scopolamine, hyoscyamine) production in hairy root cultures of *Hyoscyamus niger* L. induced by *Agrobacterium tumefaciens* A₄T. SH medium was the best for tropane alkaloids production from the hairy root clones, HN18 and HN57. The optimum culture peroid was 5 weeks for HN18 clone and 6 weeks for HN57 clone, respectively. The optimum sucrose and dextrose concentrations in tropane alkaloids productivity were 3% and 2%, respectively. The growth of both HN18 and HN57 clones increased with as sucrose concentration increase up to 7% sucrose, but tropane alkaloid contents was significantly decreased. In the HN18 clone, the optimum concentration of sucrose for alkaloids productivity was 5% and those of dextrose was 2%. The productivity of tropane alkaloids for HN57 clone under dextrose treatments was quite a low level compared to sucrose treatments.

Key words: *Hyoscyamus niger* L. tropane alkaloids, hairy roots

서 론

Agrobacterium spp.에 의하여 형질전환된 모상근은 오랜 기간 동안의 계대배양 과정에서도 안정된 표현형을 유지하며, 호르몬 무첨가 배지에서 세포분열과 생장이 지속되는 특성을 지니고 있다 (Manners and Way 1989). 또한 여러 유용식물에서 유기된 모상근은 정상 식물체보다 많은 이차대사산물을 생합성하는 장점을 지니고 있어 산업적 large scale production에 관한 기초연구가 활발히 진행되고 있다 (Ionkova et al. 1994; Merkli et al. 1997; Wyslouzil et al. 1997). 식물체에서 생합성되는 이차대사산물 중 tropane alkaloids (hyoscyamine, scopolamine)는 진통, 진경, 가스해독 및 부교감

신경의 마비 등의 효능을 지니고 있으며, 독특한 분자구조 때문에 인위적 합성이 어려워 기내배양을 통하여 생산하고자 하는 연구가 진행되고 있는 천연물 중의 하나이다 (Aoki et al. 1997; Hilton and Rhodes 1990; Yang 1997a b). 이러한 tropane alkaloids는 *Datura*, *Hyoscyamus*, *Atropa*, *Duboisia* 속의 식물에서 많이 합성되는 성분으로 아직까지 산업적인 수준에서 tropane alkaloids의 생산이 되고 있지 않다. 산업적 생산이 어려운 이유로는 생산성이 매우 낮기 때문으로 최근에 생산성 향상을 위한 연구가 진행되고 있다. 모상근 배양을 통한 이차대사산물 생산을 향상하기 위해서는 세포주의 생장을 및 tropane alkaloids의 생합성능이 우수한 세포주를 먼저 선발하여야 하며, 최적의 배지 및 배양기간과 주요 탄소원 및 적정농도가 가장 중요한 요소이다. 아직까지 이러한 요소들이 조화를 이룰 수 있는 환경이 정립되지 않아 모상근의 대량배양을 통한 tropane alkaloids의 대량 생산이 많은 어려움을 지니고 있는 실정이다. Yang 등 (1997a)은 독말풀 (*Datura*

*Corresponding author. Tel 0431-261-2293
E-mail doyang@tct.chungbuk.ac.kr

stramonium var. *tatula* Torr.)의 모상근으로부터 모상근의 생장 및 tropane alkaloids의 생성의 최적배지가 SH배지임을 구명한 바 있다. 그러나 동일한 배지에서도 탄수화물 농도에 따른 모상근의 생장률과 tropane alkaloids의 함량이 다르게 나타났다 (Christen et al. 1992; Dupraz et al. 1993). 본 연구는 사리풀 (*Hyoscyamus niger*)로부터 높은 생장률과 tropane alkaloids 생합성능을 지니고 있는 세포주를 선발하고, 모상근의 대량배양과 tropane alkaloids의 생산성 향상을 위한 적절한 배양배지의 선발과 배양기간 및 탄소원의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 사용균주

모상근 유도를 위한 식물재료는 2년생 초본인 사리풀 (*Hyoscyamus niger* L.)의 유식물체를 사용하였다. 사리풀 종자를 2% sodium hypochlorite 용액으로 표면 소독한 후 멸균 증류수로 3회 수세하여 1/2MS 고체배지 (1% agar, 3% sucrose)에서 무균 발아시켰으며, 약 3개월 경과 후 6~7장의 본엽이 형성된 유식물체의 잎, 줄기, 뿌리를 1~2 cm 크기로 절단하여 *Agrobacterium* spp.의 접종 재료로 사용하였다. 사리풀 종자는 미국 Pennsylvania State University의 Dr. Flores로부터 제공받았다. 모상근 유도를 위해 사용된 균주는 *Agrobacterium tumefaciens* A₄T로 YEB배지에서 25°C, 암 (dark) 조건에서 110 rpm의 회전 진탕기로 24시간 배양하였으며 균체 농도를 10⁸/ml로 조정된 다음, 유식물체의 절편을 *Agrobacterium* 배양액에 침지하여 *Agrobacterium*이 감염되도록 하였다.

모상근 유도 및 선발

A. tumefaciens A₄T가 접종된 유식물체 절편은 White (1963) 고체배지에 치상하여 상온에서 3일간 정치시킨 후, 1,000 mg/L carbenicillin이 첨가된 White배지에서 유식물체 절편의 표면에 잔류해 있는 균주를 제거하였다. 잔류 균주를 제거한 유식물체 절편은 3% sucrose와 1,000 mg/L carbenicillin이 첨가된 White 고체배지에 옮겨 25°C, 암상태 조건에서 4주간 배양하였다. 균을 접종하고 14일 경과 후, 유도되는 모상근은 선단 부위를 1~1.5 cm 크기로 절단하여 동일한 White 고체배지에서 2주 간격으로 3~4회 계대배양하면서 고생장 세포주를 선발하였으며, 모상근의 형질전환 여부는 Petit 등 (1983)의 mannopine 검정 방법을 사용하였다.

선발된 모상근은 SH 고체배지와 액체배지에서 25°C, 암상태로 각각 3~4주 간격으로 계대배양하였다. 모상근 세포주 선발은 120 ml의 SH 액체배지를 넣은 250 ml 삼각 flask에

모상근 생체중 0.2 g (13 mg dry wt)을 접종하여 계대배양과 동일한 조건에서 4주간 배양하였다. 배양이 완료된 모상근은 수거하여 동결건조하였으며, 건조시료는 건조중량 (dry weight)을 측정된 다음 10°C로 유지되는 냉장고에 보관하면서 분석용 시료로 이용하였다. 모상근의 생장, tropane alkaloids 함량 및 생산성 (productivity) 결과는 건조중량 (dry weight)을 기준으로 계산하였다.

모상근 배양

선발한 모상근 세포주 HN18과 HN57은 SH액체배지에서 25°C, 암상태로 각각 3~4주 간격으로 gyratory shaker에서 100 rpm 조건으로 배양하면서, 배양 후 3~4주된 모상근을 실험재료로 사용하였다. 모든 실험에서 모상근 배양은 120 ml의 액체배지를 넣은 250 ml 삼각 flask에 모상근 생체중 0.2 g (13 mg dry wt)을 접종하여, 암상태로 4주간 배양하였으며, 배양기간에 의한 모상근의 생장률 및 tropane alkaloids 생산에 미치는 실험에서는 8주간 배양하였다. 생산배지 선발 실험에서는 5 종류의 기본배지인 White (White 1963), MS (Murashige and Skoog 1962), B₅ (Gamborg et al. 1968), SH (Schenk and Hildebrandt 1972), Heller (Heller 1953) 배지와 B₅배지의 농도를 반으로 줄인 1/2 × B₅ 및 Heller배지의 농도를 2배로 한 2 × Heller배지를 사용하였다. Sucrose 및 dextrose의 최적 농도를 조사하기 위하여 sucrose (1~9%)는 배지성분과 혼합하여 멸균하였으며, dextrose (1~5%)는 고압 멸균시 금속 이온 및 salts와 반응하여 dextrose의 효과가 저하될 우려가 있어 별도로 3차 증류수에 고농도로 녹여 고압 멸균하여 첨가하였다.

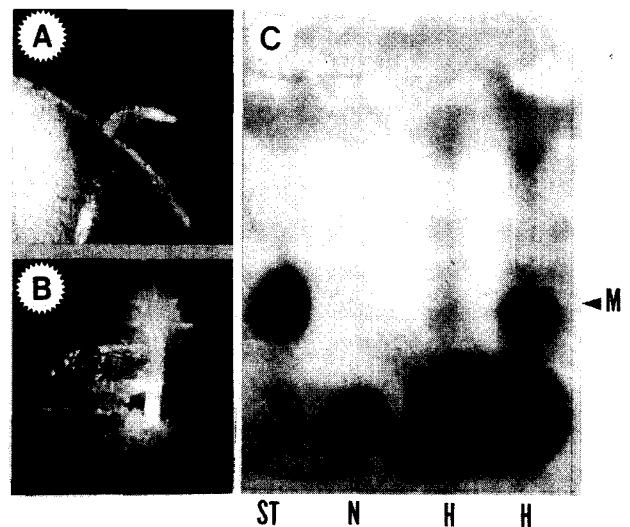


Figure 1. Hairy roots induced from leaf segment (A,B) of *H. niger* L. by *Agrobacterium tumefaciens* A₄T. Paper electrophoretic analysis (C) was performed with extracts from hairy root and normal root. ST: standard mannopine (M), N; normal roots, H: hairy roots.

Tropane alkaloids 추출 및 분석

Tropane alkaloids 추출은 Mano 등 (1986)의 방법에 준하였다. Hyoscyamine과 scopolamine의 정량분석은 UV detector가 장착된 Perkin-Elmer Series 3B HPLC (Perkin-Elmer Corp. USA)를 이용하였다. Column은 TSK gel ODS-120T (Toyo Soda Co.)로써 5 μ m, 4.6 mm ID*15 cm long의 것을 사용하였고, eluents는 methanol : 10 mM sodium-1-heptanesulfonate를 48 : 52 (v/v)로 혼합하여 acetic acid로 pH를 4로 조정하여 사용하였다. Flow rate는 분당 1 ml, absorbance는 215 nm, column 온도는 25°C, injection량은 20 μ l로 하였으며, hyoscyamine과 scopolamine 정량은 표준품과 대비하여 chromatogram의 peak height로 계산하였다.

결과 및 고찰

모상근의 유도 및 세포주 선발

사리풀 절편에 *Agrobacterium*을 접종하고 약 2주가 지나서부터 모상근이 유도되었으며 (Figure 1A, 1B), 유도된 모상근을 항생제가 첨가된 White 고체배지 (sucrose 무첨가)에 옮겨 3~4일 배양한 후, 3% sucrose가 포함된 White 고체배지에 항생제를 첨가하여 계대배양하면서 뿌리 선단부를 절단하여 3~4회 계대배양을 통하여 접종 균주가 제거된 모상근을 선발하였다. 무균의 모상근은 White 고체배지 (3% sucrose)에서 3~4회 계대배양하면서 성장이 양호하다고 판단되는 세포주 40 clone을 선발하였으며, clone 번호는 line 번호와 동일하게 부여하였다. 선발된 모상근의 형질전환 여부를 확인하기 위해서 paper electrophoresis를 이용하여 분석한 결과 정상배양근에서는 합성하지 않은 mannopine이 검출되어 *Agrobacterium*에 의해 형질전환된 모상근임을 확인하였다 (Figure 1C).

고생산 세포주 선발

선발된 모상근 clone 중에서 tropane alkaloids의 함량 및 생산성이 상대적으로 양호하게 나타난 8개 clone을 선발하였으며, clone의 생산률은 HN32 clone이 가장 높았다 (Figure 2). 건조중량당 tropane alkaloids 함량은 HN57 clone이 0.45% dry wt로 가장 높았으며, HN18번 clone이 0.40% dry wt로 높은 함량을 나타내었다 (Figure 2). HN57 clone의 0.47% dry wt scopolamine 함량은 지금까지 보고된 *Hyoscyamus* spp. 모상근 중에서 가장 높은 것으로 우수한 세포주이다. 1 L당 tropane alkaloids 생산성은 HN18 clone이 1.36 mg/L day로 가장 높았으며, HN57 clone은 1.28 mg/L

day로 높은 수준이었다 (Figure 2). Figure 2에서와 같이 선발된 모든 사리풀 모상근의 tropane alkaloids 생성은 hyoscyamine보다는 주로 scopolamine을 생성함을 확인하였으며, HN18과 HN57 clone에서 scopolamine/hyoscyamine의 비율은 각각 약 8.8 및 28 정도로서 높은 비율을 나타내었다. 이러한 높은 scopolamine/hyoscyamine의 비율은 scopolamine의 생산성을 높일 수 있는 우수한 세포주라고 판단된다.

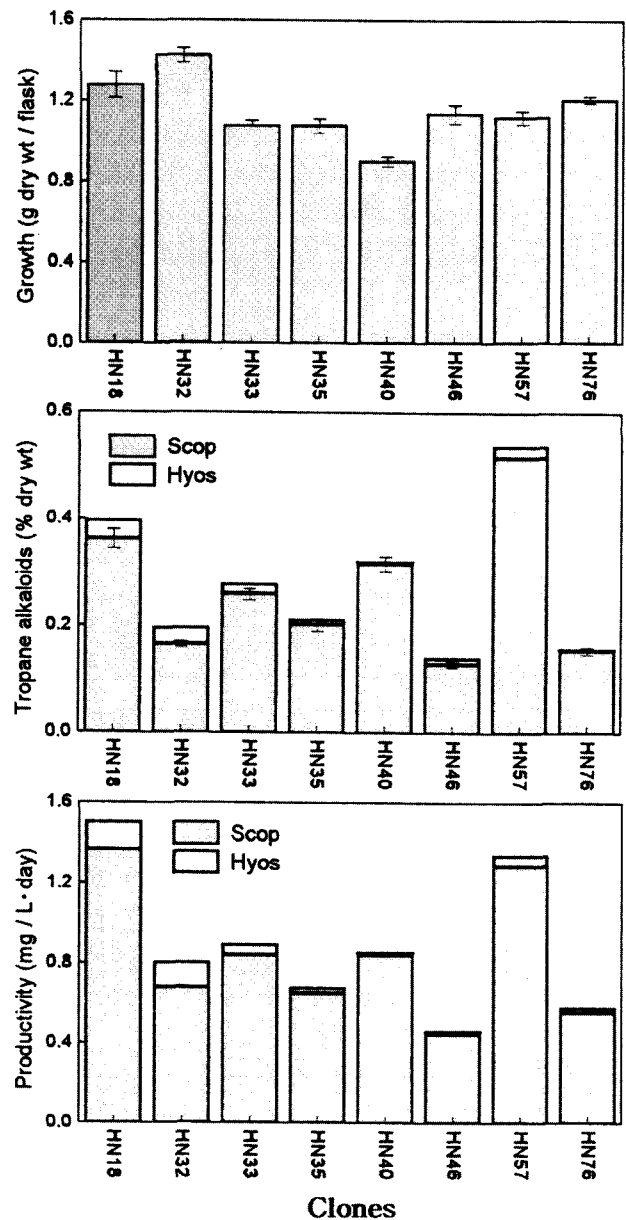


Figure 2. Growth, tropane alkaloid contents, and productivity of the hairy root clones selected from *H. niger* L. The hairy root clones were cultured for 4 weeks at 25°C in the dark in 120 ml SH liquid medium. The data represent the mean \pm SE of triplicates measured after 4 weeks of culture. The initial inoculum was 0.2 g fresh wt (0.13 mg dry wt) per treatment.

생산 배지 선발

모상근 세포주 중에서 scopolamine의 생산성과 표현형질이 안정적으로 발현되는 HN18과 HN57 clone의 최적배지를 조사하였다. 식물 조직배양에서 기본배지로 널리 이용되고 있는 5가지의 기본배지와 2가지의 변형배지를 포함하여 총 7가지 배지에 대한 HN18과 HN57 clone의 성장 및 tropane alkaloids 함량을 조사한 결과 figure 3과 같다. HN18 clone의 성장률은 SH배지에서 0.999 g dry wt/flask로서 0.338 g dry wt/flask의 성장률을 나타낸 Gamborg's B₅ 배지보다도 3배 정도 높았다. 건조 중량당 tropane alkaloids 함량은 SH배지에서 0.43% dry wt로 가장 높아 HN18 clone의 증식 및 생산배지로는 SH배지가 적합함을 알 수 있었다. HN57 clone은 SH 배지에서 0.626 g dry wt/flask로 가장 양호한 성장률을 나타내었고 HN18 clone보다는 낮았다 (Figure 3). 건조 중량당 tropane alkaloids 함량은 SH배지에서 0.32% dry wt, Heller배지에서 0.31% dry wt로 나타나 tropane alkaloids 함량면에서도 역시 SH배지가 가장 우수한 것으로 나타났다 (Figure 3).

Tropane alkaloids 생산성에 있어서 HN18 clone의 경우 B₅배지의 0.385 mg/L day보다 SH배지에서 1.191 mg/L day로 3.1배 높은 생산성을 보였다. HN57 clone의 경우도 마찬가지로 SH배지가 가장 높은 생산성을 보였다 (Figure 3). 그

리고 SH배지에서 HN18과 HN57 clone을 비교해 볼 때 HN57 clone의 0.528 mg/L day보다 HN18 clone이 2.3배 높은 tropane alkaloid 생산성을 보여 tropane alkaloids 대량생산을 위한 세포주는 HN18 clone이 가장 적절할 것으로 생각된다. 배지내로 유출되는 tropane alkaloids의 함량은 배지에 따라 큰 차이를 나타내지 않았으며, 오히려 시료내의 alkaloids 함량이 높을수록 배지내로 유출되는 alkaloids의 양도 많은 것으로 나타났다 (결과 미제시). 그러나 전체적으로 배지내로 유출되는 alkaloids의 양은 매우 소량에 불과하였다. 따라서 tropane alkaloids의 대량생산을 위한 최적배지는 성장률, tropane alkaloids 함량 및 생산성이 모두 우수한 SH배지가 적절한 배지로 확인되었다.

배양기간의 영향

HN18과 HN57 clone의 증식 및 tropane alkaloids 생산배지로 선발된 SH배지에서 8주간 배양하면서 성장률의 변화 및 건조 중량당 alkaloids 함량을 조사하였다. HN18 clone은 배양 초기에 높은 성장률을 나타내었고 4주 이후부터 성장률이 둔화되기 시작하여 5~6주 사이에는 성장률에 거의 변화가 없다가 6주 이후에 다시 성장률이 증가하는 특성을 나타내었다 (Figure 4). HN57 clone은 HN18 clone보다는 성장률이 현저히 낮게 나타났고 4~6주 사이에 다소 느린 성장률을 보

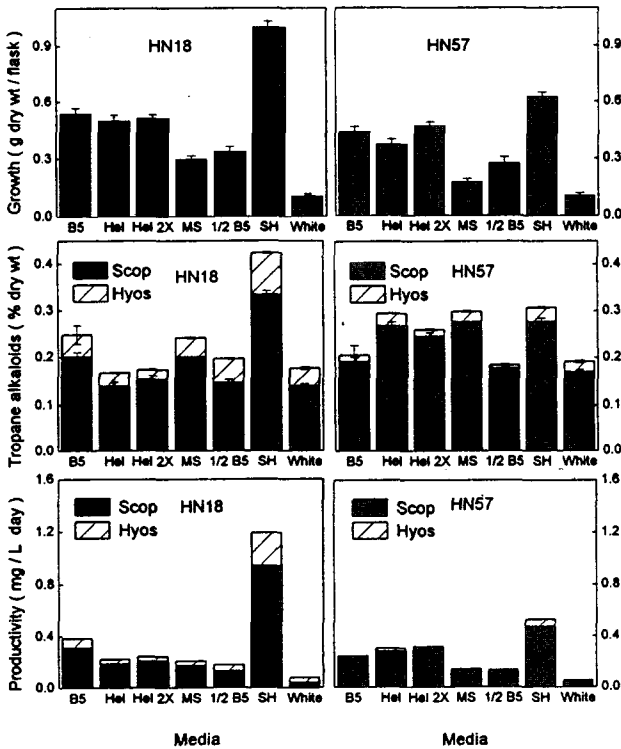


Figure 3 Effects of media on the growth, tropane alkaloid contents and productivity of hairy root clones, HN18 and HN57. The culture conditions were the same as figure 2.

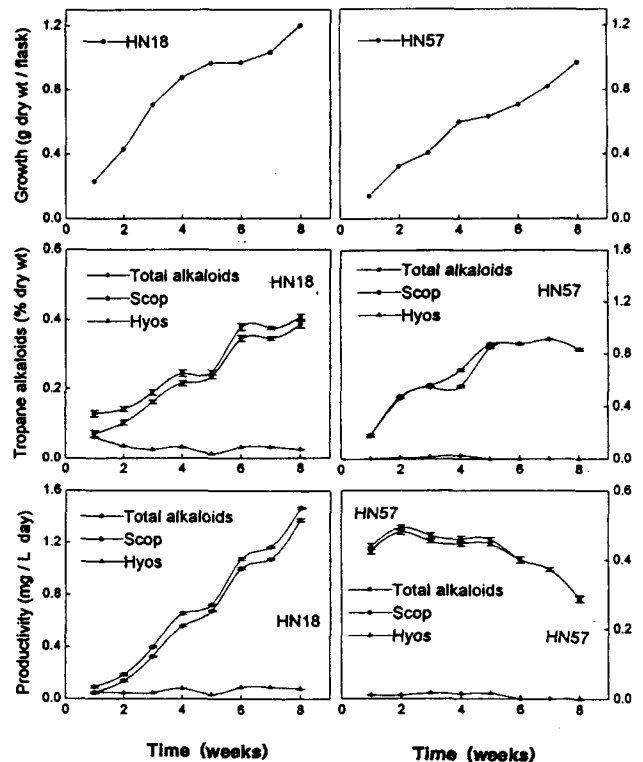


Figure 4. Effects of culture periods on the growth, tropane alkaloid contents and productivity from hairy root clones, HN18 and HN57. The culture conditions were the same as figure 2.

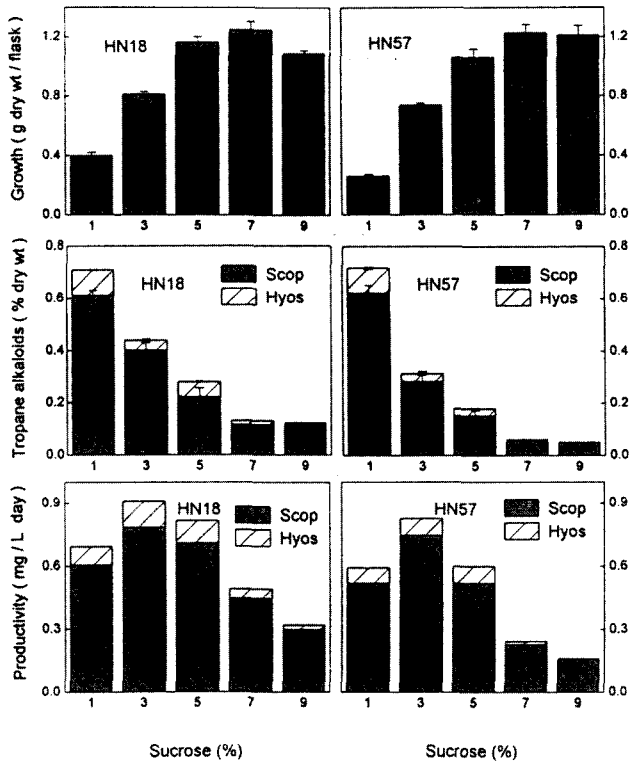


Figure 5. Effects of sucrose on the growth, tropane alkaloid contents and productivity from hairy root clones, HN18 and HN57. The culture conditions were the same as figure 2.

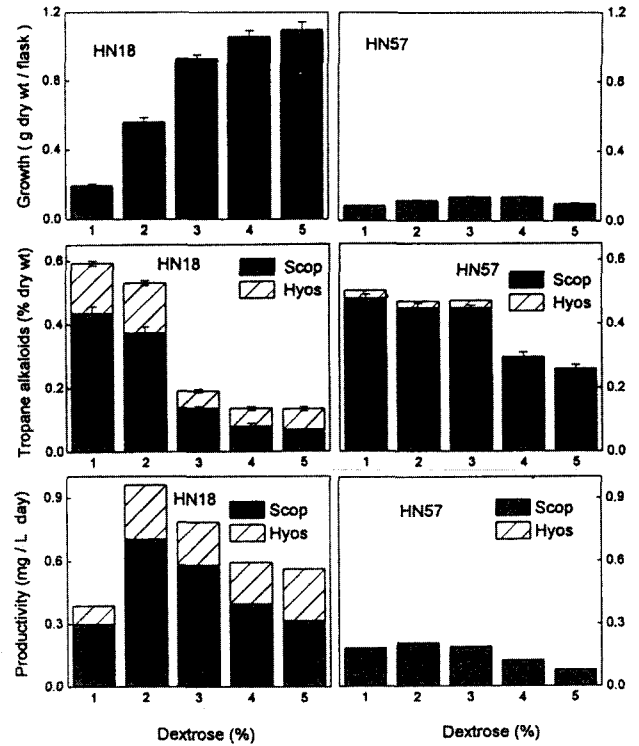


Figure 6. Effects of dextrose on the growth, tropane alkaloid contents and productivity from hairy root clones, HN18 and HN57. The culture conditions were the same as figure 2.

이는 것으로 나타났으나 뚜렷한 lag phase는 나타나지 않았다 (Figure 4). 배양기간에 따른 건조 중량당 tropane alkaloids 함량은 HN18 clone의 경우 figure 4와 같이 배양기간이 경과할수록 tropane alkaloids의 함량도 계속적으로 증가하는 경향이었으며 성장 정체기 이후인 특히 5~6주 사이에 뚜렷한 함량 증가가 나타났는데, 이러한 현상은 *H. albus* (Shimomura et al. 1991; Christen et al. 1992), *Scopolia* spp. (Mano et al. 1986), *Datura* spp. (Payne et al. 1987; Maldonado-Mendoza et al. 1993) 등의 결과와 일치하였다. Tropane alkaloids 중에서 scopolamine의 함량은 계속적으로 증가하는데 비하여 hyoscyamine의 함량은 거의 일정한 수준을 유지하고 있는 것으로 나타났다. HN57 clone의 경우는 figure 4와 같이 배양 초기에는 tropane alkaloids 함량이 증가하였으나 배양기간이 경과함에 따라 다소 감소하는 경향 (배양 2, 3주 쯤 0.50% dry wt, 8주 쯤 0.27% dry wt)을 보여 HN18 clone과는 대조적이었다. HN57 clone은 20회 이상 다양한 조건하에서 반복 배양하는 동안에도 4주 배양시에는 scopolamine/hyoscyamine가 최소 74.2%에서 96%를 유지하고 있으며, 6주 이상 배양시에는 hyoscyamine은 검출되지 않고, 100% scopolamine만 검출되었다. 1 L당 생산성은 HN18 clone이 5~6주, HN57 clone 4~5주 사이에 가장 높은 증가를 보여 각각 6주 및 5주 배양 후 모상근을 수확하는 것이 바람직한 것으로 판단된다. HN18 clone은 6주 이후에도

함량 및 건물 중량 증가에 따른 생산성 증가가 예상되나, 대량생산시 8주 이상 장기배양의 배양은 미생물 오염 등의 생산 공정 관리와 고가의 대형설비 활용 측면에서 비효율적이므로 4주 이내에 최대 생산성을 실현하는 방안이 요구된다. 이상의 결과를 고려해 볼 때, HN18 clone이 HN57 clone보다 생장을 및 1 L당 생산성이 다소 양호한 특성을 가진 clone이며 선발된 두 clone은 생리적 차이가 있는 clone임을 알 수 있었다.

Sucrose 와 dextrose의 영향

SH배지내의 초기 sucrose 농도를 1%, 3%, 5%, 7%, 9%로 하여 HN18과 HN57 clone을 4주간 배양하여 생장률을 조사한 결과는 figure 5와 같다. 두 clone 공히 SH배지의 초기 sucrose 농도가 7%일 때 모상근의 생장이 가장 양호하였으며, HN18 clone은 1.249 g dry wt/flask로 1.229 g dry wt/flask의 HN57보다 다소 양호하였다. 건조 중량당 tropane alkaloids 함량은 배지내 sucrose의 농도가 낮을수록 증가하여 1% sucrose에서 0.71% dry wt의 높은 tropane alkaloids 함량을 나타내었다 (Figure 5). 그러나 sucrose 농도가 증가할수록 tropane alkaloids 함량이 급격히 감소하여 9% sucrose 처리구에서는 HN18 세포주가 0.124% dry wt, HN57은 0.048% dry wt를 나타냈다. Sucrose 농도에 따른 1 L당

생산성은 두 clone 모두 3% sucrose 처리구에서 가장 우수하였는데, HN57의 0.60 mg/L day보다 HN18는 0.91 mg/L · day로 높은 생산성을 나타내었다 (Figure 5). SH배지에서 초기 dextrose 농도가 두 clone의 성장률에 미치는 영향은 figure 6과 같다. HN18 clone은 dextrose의 함량이 높을수록 성장률이 증가하여 5% dextrose에서 1.098 g dry wt/flask의 성장률을 나타내었다. HN57의 경우는 3% dextrose에서 양호한 성장률 0.139 g dry wt/flask를 나타냈으나 sucrose배지에 비해 dextrose배지에서는 성장률이 매우 저조하였고, sucrose배지에서의 성장률이 dextrose배지에서보다 약 7배 정도 높게 나타났다 (Figure 6). 이는 HN57 clone이 dextrose 배지보다는 sucrose 배지에서 증식하는 것이 바람직하다는 것을 제시해 주고 있다. HN18 clone의 건조 중량당 tropane alkaloids 함량은 배지내 초기 dextrose의 농도가 낮을수록 높게 나타나 1% dextrose에서 0.593% dry wt의 높은 tropane alkaloids 함량을 나타내었다 (Figure 6). HN18 clone의 1 L당 생산성은 2% dextrose 배지에서 가장 높은 경향을 보여 주었으며 (Figure 6), HN57 clone은 낮은 성장률로 인하여 매우 낮은 tropane alkaloids 생산성을 나타내었다.

이상의 결과에서 HN18과 HN57 clone은 배지의 당 농도에 따라 성장률 및 tropane alkaloids 함량이 크게 달라지는 것으로 나타났다. 3% sucrose가 첨가된 SH배지에서 성장률도 양호하고 alkaloids 함량도 일반적으로 사용되는 다른 기본배지 (배지별 실험에 사용된 6개 배지)에 비해 높게 나타났다. 그 이유는 왕성한 모상근의 성장으로 인하여 배지내의 당 농도가 더욱 감소하게 되어 결과적으로 tropane alkaloids 함량이 높게 나타난 것으로 생각된다. 고농도 sucrose 배지에서 배양된 clone의 모상근은 저농도에서 배양된 모상근보다 근경이 굵으며 배지내에 casein hydrolysate를 첨가하였을 경우 뿌리가 현저히 비대되는 것으로 나타났다 (결과 미제시). 따라서 생리적 당 농도가 높아지면 뿌리 조직내에 저장 물질의 축적 현상이 촉진되며, 이같은 현상이 tropane alkaloids의 생합성 과정과는 역행되는 과정이어서 tropane alkaloids 함량이 저조하게 나타난 것이 아닌가 생각된다. 그 이유는 figure 4에서 나타난 것처럼 HN18 clone이 5~6주 사이에 lag phase로 나타났는데 이 시기에 tropane alkaloids의 함량이 현저하게 증가하였다는 점이다. 결국 모상근 조직내에 축적되어 있던 저장 물질이 배지내 당의 결핍으로 자가증식을 위하여 분해되어 대사작용에 이용될 때 tropane alkaloids의 함량도 증가하는 것이 아닌가 사료된다.

이상의 결과를 종합하면, 선발한 사리풀 모상근 clone은 hyoscyamine보다 scopolamine을 주로 생산하며, 대량생산을 위한 최적 기본배지는 모상근의 성장, tropane alkaloids의 함량 및 생산성이 모두 우수한 SH배지임을 확인하였다. 이러한 특성은 대량 생산시 1단계 배양으로도 scopolamine생산이 가능하여 성장과 함량이 각각 전혀 다른 조성의 배지에서 발현되는 경우에 비하여 유리한 장점이 있다. 또한, sucrose

농도에 따라 성장과 생합성 능력에 현저한 차이가 있어 공정 설계에 따라서는 반연속배양 형태로 성장률과 함량을 조절할 최적 생산조건을 설계할 수 있을 것으로 생각된다.

적 요

Agrobacterium tumefaciens A₄T에 의해 형질전환된 사리풀 (*Hyoscyamus niger* L.)의 모상근으로부터 tropane alkaloids (scopolamine, hyoscyamine)의 생산성 향상을 위한 최적배지, 배양기간 및 탄수화물의 영향을 조사하였다. Tropane alkaloids의 생산성이 우수한 모상근 (HN18, HN57)의 최적배지는 SH배지이며, 모상근의 성장, tropane alkaloids 함량 및 생산성에서 조사한 6가지 배지보다 높게 나타났다. Tropane alkaloids 생산을 위한 최적 배양기간은 HN18 clone이 6주, HN57 clone은 5주로 나타났으며, 배양기간에 따라 scopolamine의 함량은 계속적으로 증가하는데 반하여 hyoscyamine의 함량은 일정 수준을 유지하는 것으로 나타났다. 두 세포주는 sucrose 농도가 7%까지 증가할수록 성장률이 증가하는 반면, tropane alkaloids 함량은 감소하였으며, tropane alkaloids 생산성은 3% sucrose 처리구에서 가장 높게 나타났다. HN18 clone의 경우 최적 sucrose (3%) 및 dextrose (2%)에서 유사한 tropane alkaloids 생산성을 나타내었다. 하지만 HN57 clone은 sucrose처리구에 비하여 dextrose 처리구에서 매우 낮은 tropane alkaloids 생산성을 나타내었다.

인용문헌

- Aoki T, Matsumoto H, Asako Y, Matsunaga Y, Shimomura K (1997) Variation of alkaloid productivity among several clones of hairy roots regenerated plants of *Atropa belladonna* with *Agrobacterium rhizogenes* 15834. *Plant Cell Rep* 16:282-286
- Christen P, Aoki T, Shimomura K (1992) Characteristics of growth and tropane alkaloids production in *Hyoscyamus albus* hairy roots transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A4. *Plant Cell Rep* 11:597-600
- Dupraz JM, Christen P, Kapetanidis I (1994) Tropane alkaloids in transformed roots of *Datura quercifolia*. *Planta Med* 60:158-162
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151-158
- Heller R (1953) Researches on the mineral nutrition of plant tissues. *Ann Sci Nat Bot et Biol Veg* 11th Ser 14:1-223
- Hilton MG, Rhodes MJC (1990) Growth and hyoscyamine production of hairy root cultures of *Datura stramonium* in a modified stirred tank reactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 33:132-

138

- Ionkova I, Witte L, Alfermann A** (1994) Spectrum of tropane alkaloids in transformed roots of *Datura innoxia* and *Hyoscyamus × gyorffyi* cultivated *in vitro*. *Planta Med* **60**:382-384
- Maldonado-Mendoza IE, Ayora-talavera T, Loyola-Vargas VM** (1993) Establishment of hairy root cultures of *Datura stramonium*. Characterization and stability of tropane alkaloids production during long periods of subculturing. *Plant Cell Tiss Org Cult* **33**:321-329
- Manners JM, Way H** (1989) Efficient transformation with regeneration of the tropical pasture legume *Stylosanthes humilis* using *Agrobacterium rhizogenes* and a Ti plasmid-binary vector system. *Plant Cell Rep* **8**:341-345
- Mano Y, Nabeshima S, Matsui C, Ohkawa H** (1986) Production of Tropane alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia japonica*. *Agric Biol Chem* **50**:2715-2722
- Merkli A, Christen P, Kapetanidis I** (1997) Production of diosgenin by hairy root cultures of *Trigonella foenum-graecum* L. *Plant Cell Rep* **16**:632-636
- 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
- Petit A, David C, Dahl GA, Ellis JG, Guyon P, Casse-Delbart F, Tempe J** (1983) Further extension of the opine concept: Plasmids in the *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Mol Gen Genet* **190**:204-214
- 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
- Shimomura K, Sauerwein M, Ishimaru K** (1991) Tropane alkaloid in adventitious and hairy root cultures of *Solanaceous* plants. *Phytochemistry* **30**:2275-2278
- White PR** (1963) *The Cultivation of Animal and Plant Cells*. 2nd. (ed) Ronald Press New York, pp 199-203
- Wyslouzil BE, Whipple M, Chatterjee C, Walcerz DB, Weathers PJ, Hart DP** (1997) Mist deposition onto hairy root cultures: Aerosol modeling and experiments. *Biotechnol Prog* **13**:185-194
- Yang DC, Kang HM, Lee KS, Kim YH, Yang DC** (1997a) Growth and tropane alkaloids production of hairy roots of *Datura stramonium* var. *tatula* Torr. transformed by *Agrobacterium* spp. *Kor J Plant Tiss Cult* **24**:137-142
- Yang DC, Kang HM, Lee KS, Kim YH, Yang DC** (1997b) Effects of pH, sucrose and vitamins on the growth and tropane alkaloid production of hairy roots of *Datura stramonium* var. *tatula* Torr. *Kor J Plant Tiss Cult* **24**:143-148

(접수일자 1998년 9월 30일)