

연초(*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) 배양세포로부터 Ubiquinone-10 생산을 위한 현탁배양

양덕춘* · 최광태 · 박지창 · 강신웅 · 이정명¹
한국인삼연초연구원 유전생리부, 경희대학교 원예학과¹
(1999년 6월 7일 접수)

Suspension Culture of Tobacco(*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) Cells for Production of Ubiquinone-10

Deok Chun Yang*, Kwang-Tae Choi, Ji Chang Park, Shin Woong Kang and Jung Myung Lee¹
Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

¹Department of Horticulture, Kyung Hee University, Yongin, Kyunggi-do 449-701, Korea
(Received June 7, 1999)

ABSTRACT : The effect of phytohormones, light and phosphate on *in vitro* production of ubiquinone 10 from the suspension cultures of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi callus was investigated. The inoculum size and cultured time in the suspension culture had to be at least over 2% of medium volume at 15 days for the excellent growth of Xanthi callus. The growth of Xanthi callus in the suspension culture was improved by addition of NAA and 2,4-D, especially NAA 1.0mg/l alone, at the light condition. The optimal concentration of phytohormone was 0.1 mg/l 2,4-D and 1.0 mg/l NAA for productivity of ubiquinone 10 in the suspenseion of Xanthi callus. Addition of 3mM KH₂PO₄ to the medium was more effective in promoting ubiquinone-10 formation than other concentration in the light condition. Content and production of ubiquinone-10 in the suspension cultures of Xanthi callus were the highest at the MS media containing 0.5mg/L kinetin, 0.5mg/L 2,4-D, 1.0mg/l NAA, 3mM phosphate and 2% inoculum in the light.

Key words : suspension culture, ubiquinone-10, Xanthi callus

인류의 건강에 대한 관심이 고조되고 또한 식물 유전공학 기술의 발전으로 각종 질병을 예방 및 치료하고자 여러 식물자원으로부터 유용한 생리활성물질을 대량으로 생산하려고 하는 많은 연구가 시도되고 있다(Furuya 등, 1973; Hagimori 등, 1982; Mono 등, 1986). 이는 기내배양기술을 이용하여 일정한 환경 하에서 안정된

원료생산을 할 수 있고, 노지식물에 비하여 배양 세포는 생육주기뿐만 아니라, 모식물체와 동일한 유용산물합성능력이 있고, 또한 생육속도가 대단히 빠른 점을 이용하여 생산을 증가시킬 수 있을뿐더러, 노동 및 기술이 집약화 되어 생산성이 향상됨으로써 대량생산으로 산업화의 가능성이 크기 때문이다(Ahkam과 Doran, 1994; Downs 등,

*연락처 : 305-345, 대전 광역시 유성구 신성동 302, 한국인삼연초연구원 유전생리부

*Corresponding author : Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, 302 Shinsong-dong, Yusong-ku, Taejon 305-345, Korea

1994; Jung 등, 1994; Granicher 등, 1995). Ubiquinone-10은 심장병에 화학치료제로 사용되는 부가가치가 매우 높은 고가의 화합물로서(Diplock 등, 1967; Ikeda 등, 1980), 주로 동물세포에서 연구가 많이 되어 왔으며, *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Allium parvum*, *Capsicum annuum*과 *Brassica oleracea*, *Nicotiana tabacum* 등의 배양세포에서 검출됨을 보고한 바 있다(Threlfall과 Whistance, 1970). 그러나 사용한 배양세포마다 함유하고 있는 ubiquinone-10의 함량은 매우 차이가 있었으며 특히 식물호르몬의 종류와 농도, 그리고 배양조건에 따라 차이가 있음을 시사하였다(Ikeda 등, 1976; Ikeda 등, 1978). 연초에서는 BY2 품종에서 ubiquinone-10이 검출되는 것으로 보고되었고(Ikeda 등, 1981), 또한 Xanthi 품종을 조직배양 하여 유기된 callus에서 ubiquinone이 합성되고 있음을 고체배양을 통해서 확인하였으며, 각종 식물호르몬에 의해서 ubiquinone-10의 함량을 증가시킬 수 있는 방법을 보고하였다(Yang 등, 1994). 그러나 대량배양을 위해서는 고체배양보다 액체배양에 의해서 수행되어야 효과적이므로, Xanthi callus를 이용하여 현탁배양조건을 확립하고 고체배지에서 나타난 최적의 성장 및 ubiquinone-10의 생산조건을 현탁배양에서도 동일하게 작용하는지 재확인하고, 또한 KH_2PO_4 의 영향을 조사하였던 바, 그 결과를 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료 : *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi의 잎을 2,4-D 0.5mg/l가 함유된 MS 고체배지에서 유도하여 성장한 callus를 사용하였으며, 배양조건은 25°C 배양실에서 약광($3 \mu \text{ moles/m}^2/\text{s}$), 16시간 일장조건으로 하였다.

배양기간 및 접종량에 따른 callus 성장량 및 ubiquinone-10의 생산 : 현탁배양에 의한 *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi callus의 성장량과 ubiquinone 10의 함량을 조사하기 위해서 100ml 삼각플라스크에 40ml의 MS기본배지를 넣고 121°C에서 15분

간 멸균 후에 사용하였다. 최적 접종량을 조사하기 위해서 Xanthi callus를 배양액의 1, 2, 3%로 하고 5, 10, 15, 20일간 암상태의 shaker에서 시기별로 배양하였다. Ubiquinone-10의 함량측정은 배양된 Xanthi callus를 propanol과 hexane를 3대 5로 혼합된 용매에 추출하여 농축된 시료를 다시 dioxan에 녹여 이용하였으며, 측정은 μ -Bondapak C-18컬럼을 이용한 HPLC를 사용하였고(Yang 등, 1994), 생산성은 Xanthi callus의 성장량에 단위 생체중당 ubiquinone-10의 함량을 곱하여 flask당 생산할 수 있는 ubiquinone-10의 함량을 환산하였다.

Callus성장 및 ubiquinone-10 생산에 미치는 2,4-D 및 NAA의 영향 : 현탁배양에 의한 2,4-D와 NAA의 혼합효과를 조사하기 위해서 2,4-D 농도를 0, 0.05, 0.1, 0.5mg/l, NAA의 농도를 0.5, 1.0, 2.0mg/l로 혼합처리한 후 20일간 배양하여 생체중 및 ubiquinone-10의 함량을 조사하여 생산성을 환산하였다.

Callus성장 및 ubiquinone-10 생산에 미치는 광 및 KH_2PO_4 의 영향 : 2,4-D 0.5mg/L가 함유된 배지에서 성장한 *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi callus 1.5g/flask를 KH_2PO_4 (0.8, 1.3, 3, 5, 10mM)가 농도별로 첨가된 MS배지에 넣고 25°C의 배양실에서 16시간 일장으로, 30일간 광($9 \mu \text{ moles/m}^2/\text{s}$) 및 암조건에서 배양후 callus의 생체중과 ubiquinone-10의 함량을 조사하였다.

현탁배양 최적조건의 구명 : Xanthi callus의 성장량과 ubiquinone-10의 생산성이 가장 높았던 조건을 종합하여 최적조건을 구명하기 위해서 KH_2PO_4 의 농도를 3mM, 2,4-D의 농도를 0.1mg/l, 그리고 kinetin의 농도를 0.5mg/l첨가된 MS배지에 NAA의 농도를 0, 0.5, 1.0, 2.0mg/l 혼합하여 배양액의 2% Xanthi callus를 첨가한 후에 성장량 및 ubiquinone-10의 함량을 조사하였다.

결과 및 고찰

배양기간 및 접종량에 따른 callus 성장량 및 ubiquinone-10의 생산 : 고체배양은 대량생산에 한계가 있으므로 현탁배양에 의한 *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi callus의 성장량과 ubiquinone-10의 함량을 조사하기 위해서 우선 Xanthi callus의 접종량과 배양기간별 성장량을 조사하였으며, 이에 따른 ubiquinone-10의 함량과 생산성을 함께 조사하였다. Xanthi callus의 성장량은 접종량이 많을수록, 그리고 배양기간이 길수록 증가하였으나 배양 15일째에 가장 증가폭이 높은 경향을 보였다(Table 1). 그러나 ubiquinone-10의 함량은 배양 10일경에 높은 경향을 보였으며 15일부터는 오히려 감소하는 경향을 보였다(Table 1). 따라서 플라스크당 생산할 수 있는 생체중과 단위 그램당 생산할 수 있는 ubiquinone의 함량을 곱하여 생산성을 조사한 결과(Table 1), 성장 속도의 폭이 큰 2%에서 15일간 배양하여 수확하였을 때 실용화와 경제성을 감안한다면 가장 효율적인 것으로 생각되었다. Ikeda 등(1981)은 담배 BY2 배양세포의 현탁배양에서 배양 8일째 ubiquinone-10의 함량이 가장 증가하

였음을 보고하여 본 실험과 다소 차이가 있음을 시사하였으나 비교적 다른 이차대사산물에 비해 ubiquinone은 배양초기에 그 함량이 증가하는 경향을 보였다. 그러나 *Datura tatula* 배양세포에서는 배양 14일째 ubiquinone-10의 함량이 가장 많았음을 보고하여 본 실험과 유사한 경향을 나타냈으며, (Yamada 와 Hashimoto, 1990), 식물체에 따라서도 함량과 배양시기별 ubiquinone의 함량이 차이가 있음을 보고한바 있다(Ikeda 등, 1976).

Callus성장 및 ubiquinone-10 생산에 미치는 2,4-D 및 NAA의 영향 : 상기 결과에서 접종량 2%에서 15-20일간 배양한 것이 가장 효율적인 것으로 나타났으므로 동조건에 의해 식물호르몬이 첨가된 배지에서 Xanthi callus를 배양하였다. 식물호르몬의 농도는 2,4-D를 0-0.5mg/l로 처리하였으며, NAA의 농도는 0.5-2.0mg/l 조합 처리하였던바, Xanthi callus의 성장량은 고체배양과 마찬가지로(Yang 등, 1994), 2,4-D 혼합처리구보다 NAA 단독처리구에서 생장이 다소 양호하였으며 NAA 단독처리구에서는 NAA의 농도가 1.0mg/l 일 때 가장 높았다(Table 2). 그러나 ubiquinone-10 함량은 고체배지에서와는 달리 NAA 단독처리구에서 보다 2,4-D 혼합처리구에서 다소 높은 경향을 보였고, 2,4-D 0.1mg/l에 NAA 0.5mg/l 첨가시 2.057 μ g/g.f.w. 로 가장 양호하였으며, 생산성은 2,4-D 0.1mg/l에 NAA 1.0 mg/l 혼합첨가시 20.318 μ g/flask로 다소 양호한 경향을 보였다(Table 2). 따라서 Xanthi callus의 현탁배양에 의한 ubiquinone의 생산을 위해서는 2,4-D 0.1mg/l에 NAA 1.0 mg/l 혼합첨가 하는 것이 가장 좋을 것으로 사료된다. 고체배양에서는 2,4-D 첨가에 의해서 ubiquinone 함량이 감소되었지만(Yang 등, 1994) 본 실험결과 현탁배양에 의해서는 오히려 2,4-D 혼합배지에서 ubiquinone 함량이 증가되어 서로 상반된 결과를 초래하였다. 일반적으로 2,4-D 첨가에 의해서 이차대사산물의 생성이 억제되는 것으로 보고되어 있는 바, 본 실험에서와 같이 현탁배양에서 ubiquinone의 생산이 증가되는 것은 약간 특이한 현상으로 생각된다. 그러나 Ikeda 등(1978)도 연초 BY2 품종에서 2,4-D와

Table 1. Effects of cell density on the production of ubiquinone-10(UQ10) and growth of callus induced from *N. tabacum* cv. Xanthi leaf by suspension culture according to time course in the dark

Cultured Time (Days)	Cell density (%)	Fresh weight(A) (g/flask)	Content of UQ10(B) (μ g/g.F.W.)	Productivity (AB) (μ g/flask)
5	1	0.707±0.046	1.275	0.901
	2	1.190±0.031	1.535	1.826
	3	1.726±0.166	2.170	3.745
10	1	2.106±0.143	2.290	4.822
	2	3.798±0.251	2.440	9.267
	3	4.656±0.170	1.995	9.195
15	1	5.042±0.244	1.715	8.616
	2	7.074±0.284	1.610	11.389
	3	7.365±0.218	1.670	12.299
20	1	5.384±0.052	1.830	9.853
	2	7.139±0.117	1.840	13.136
	3	7.943±0.469	1.835	14.575

2,4,5-T의 10^{-4} M 첨가에 의해서 ubiquinone의 함량이 증가됨을 보고하여 본 실험 결과와 일치한 경향을 보고하였다.

Table 2. Effects of 2,4-D and NAA on the production of ubiquinone-10(UQ10) and growth of callus induced from *N. tabacum* cv. Xanthi leaf in suspension culture for 20 days

Phytohormone(mg/l)		Fresh weight(A)	Content of UQ10(B)	Productivity (AB)
2,4-D	NAA	(g/flask)	(μ g/g.f.w.)	(μ g/flask)
0	0.5	8.544 \pm 0.213	0.881	7.527
	1.0	11.997 \pm 0.819	0.878	10.533
	2.0	11.136 \pm 0.466	0.919	10.234
0.05	0.5	6.807 \pm 0.122	1.379	12.145
	1.0	9.840 \pm 0.156	1.328	13.068
	2.0	9.912 \pm 0.295	1.458	14.452
0.1	0.5	9.318 \pm 0.364	2.057	19.167
	1.0	10.164 \pm 0.144	1.999	20.318
	2.0	7.578 \pm 0.104	1.983	15.027
0.5	0.5	6.450 \pm 0.244	1.674	10.793
	1.0	8.217 \pm 0.217	1.675	13.764
	2.0	0.107 \pm 0.348	1.908	19.284

Callus생장 및 ubiquinone-10 생산에 미치는 광 및 KH_2PO_4 의 영향 : 인산의 농도변화 및 배양시 광이 Xanthi callus의 성장과 ubiquinone-10의 함량에 미치는 영향을 조사한 결과, 광조건에서는 MS 기본배지의 인산농도인 1.3mM 보다 농도가 적었을 때는 성장량이 감소되는 경향을 보였으나 1.3mM보다 높은 경우에는 성장량이 증가하는 경향을 보였다(Table 3). 특히 3.0mM 농도에서는 callus의 성장량이 17.977로 0.8mM에 비해서 2배가량 성장량이 많았으나 5.0mM농도이상에서는 점차로 감소하는 경향을 보였다(Table 3). 그러나 암조건에서는 인산의 첨가에 의해서 생장이 감소되는 경향을 보여 매우 대조적인 현상을 나타내었다. Ubiquinone-10의 함성에 대해서는 인산의 농도가 증가할수록 광조건에서는 감소하는 경향을 보였으나 암조건에서는 증가하는 경향을 나타내었다. 이에 생산성을 조사한 결과 광

여부에 관계없이 인산의 농도가 3mM 일 때 각각 광 및 암조건에서 9.509, 5.456 μ g/flask으로 가장 높았다(Table 3). 그러나 암조건에 비해 광조건에서 약 2배 높은 ubiquinone-10을 생산함으로 암조건보다 광조건에서 배양하는 것이 효율적으로 생각된다. 일반적으로 광량이 높은 상태에서 callus의 생장은 감소되는 경향을 보이지만 본 실험에서는 광량이 9μ moles/m²/s 로 낮아서 오히려 광상태에서 더 좋은 성장조건을 보인 것으로 생각되며, 이미 Xanthi callus의 고체배양에서도 암상태보다 동일한 광량의 광상태에서 callus의 생장이 양호함을 보고한 바 있다(Yang 등, 1994).

Table 3. Effect of phosphate and light on the production of ubiquinone-10(UQ10) and growth of callus induced from *N. tabacum* cv. Xanthi leaf

Conc. of KH_2PO_4	Fresh weight of callus(A)		Content of UQ10(B)		Productivity of UQ10(AB)	
	(g/flask)	(μ g/g.f.w)	(μ g/g.f.w)	(μ g/flask)	(μ g/flask)	(μ g/flask)
(mM)	Light	Dark	Light	Dark	Light	Dark
0.8	9.507	7.888	0.561	0.580	5.333	4.575
1.3	11.535	7.275	0.551	0.610	6.356	4.438
3.0	17.977	5.075	0.529	1.075	9.509	5.456
5.0	13.607	3.018	0.491	1.233	6.681	3.721
10.0	12.258	2.848	0.442	1.332	5.418	3.794

Ubiquinone-10의 생산에 미치는 최적조건 구명 : Ubiquinone-10의 생산에 미치는 식물호르몬 및 무기염류의 최적 효과를 구명하기 위해서 고체 실험결과(Yang등, 1994)와 상기 실험에서 가장 좋았던 실험결과를 종합하여 처리하였다. 식물호르몬으로써는 2,4-D 0.1mg/l, kinetin 0.5mg/l를 처리하였으며, 무기염류로써는 phosphate를 3mM 첨가하여 NAA를 0-2.0mg/l 첨가하여 20일간 배양한 후 성장량과 ubiquinone-10의 함량을 조사한 결과(Table 4), 성장량은 광 및 암조건 공히 NAA 0.5mg/l에서 양호하였으나 역시 암조건보다 광조건에서 성장량이 더 높은 경향을 보였다. Ubiquinone 10의 함량은 광조건에서는 NAA 1.0

mg/l 까지 농도가 높을수록 증가하는 양상을 보였으나 2.0mg/l에서는 오히려 감소하였으며 압조건에서는 NAA의 농도가 증가할수록 ubiquinone-10의 함량이 증가하는 경향을 보였다. 생장량과 ubiquinone의 생산능력을 감안한 생산성의 경우에는 NAA 1.0mg/l에서 가장 양호하였으며 압조건의 약 2배정도 높은 경향을 보였다(Table 4). 따라서 현탁배양에 의해서 ubiquinone-10을 생산하기 위해서는 3mM phosphate, 2,4-D 0.1mg/l, kinetin 0.5mg/l, NAA 1.0mg/l를 첨가하는 것이 가장 효율적일 것으로 생각된다.

Table 4. Effect of NAA on the production of ubiquinone-10(UQ10) and growth of callus induced from *N. tabacum* cv. Xanthi leaf

Conc.of NAA (mg/l)	Fresh weight of callus(A) (g/flask)		Content of UQ10(B) (μ g/g.f.w)		Productivity of UQ10(AB) (μ g/flask)	
	Light	Dark	Light	Dark	Light	Dark
0	18.012	6.281	1.623	1.041	29.234	6.539
0.5	20.692	15.555	2.096	1.721	43.370	26.770
1.0	16.562	13.126	3.507	1.862	58.083	24.441
2.0	11.811	7.237	2.508	1.951	29.622	14.119

결 론

유용물질의 생물공학적 생산연구의 일환으로 기내배양에 의한 연초(*N. tabacum* cv. Xanthi) 조직으로부터 ubiquinone을 생산하기 위해 현탁 배양을 통해서 인산과 식물호르몬 그리고 광의 효과를 조사하였다. 현탁배양에 의한 Xanthi callus 생장에 적합한 세포밀도와 배양기간은 배양액의 2%로 15일간 배양하는 것이 가장 효율적인 것으로 나타났다. 현탁배양시 2,4-D와 NAA 처리에 의한 callus의 생장은 NAA 1.0mg/l에서 가장 양호하였으며, ubiquinone-10의 생산성은 2,4-D 0.1mg/l에 NAA 1.0 mg/l 혼합첨가시 양호한 경향을 보였다. Ubiquinone의 생산에 미치는 인산과 광의 효과를 조사하기 위해서 인산의 함량을

농도별로 처리하여 광과 암상태로 배양한 결과 callus의 생장은 암상태보다 광상태가 더 양호하였으며, 광상태에서는 인산의 농도가 3mM에서 가장 양호하였으며 암상태에서는 인산의 농도가 증가할수록 생장은 감소하는 경향을 보였다. 그러나 Ubiquinone의 함량은 광상태보다 암상태에서 훨씬 양호하였으며 생산지수를 조사해본 결과 인산 3mg/l에서 광상태로 배양하였을 때 생산력이 가장 높았다. 따라서 현탁배양에 의해서 ubiquinone-10을 생산하기 위해서는 3mM KH_2PO_4 , 2,4-D 0.1mg/l, kinetin 0.5mg/l, NAA 1.0mg/l를 첨가한 MS배지에 배양액의 2% 접종량을 넣은 것이 가장 효율적일 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Ahkam, S. and Doran, P. (1994) Production of steroidal alkaloids hairy root of *Solanum aviculare* and the effect of gibberellic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 38: 93-102.
- Diplock, A.T. and Harlewood, G.A.D. (1967) The ubiquinone content of animal tissues. *Biochem. J.* 1004-1010.
- Downs, C., Christey, M., Maddocks, D., Seelye, J. and Stevenson, D. (1994) Hairy roots of *Brassica napus*: I. Applied glutamine overcomes the effect of phosphinothricin treatment. *Plant Cell Rep.* 14: 37-40.
- Furuya, T., Kojima, H., Syono, K. and Nishio, M. (1973) Isolation of saponins and sapogenins from callus tissue of *Panax ginseng*. *Chem Pharm Bull* 21: 98-101.
- Granicher, F. Christen, P. and Kapetanidis, I. (1995) Production of valepotriates by hairy root cultures of *Centranthus ruber* DC. *Plant Cell Rep.* 14: 294-298.
- Hagimori, M., Matsumoto, T. and Obi, Y. (1982) Studies on the production of digitalis cardenolides by plant tissue culture. *Plant Physiol* 69: 653-656.

- Ikeda, T., Matsumoto, T., Kisaki, T. and Noguchi, M. (1980) Subcellular distribution of ubiquinone and the content of ubiquinone and other electron carriers in the mitochondria isolated from tobacco cultured cells. *Agric Biol Chem* 44: 135-142.
- Ikeda, T., Matsumoto, T. and Noguchi, M. (1976) Formation of ubiquinone by tobacco plant cell in suspension culture. *Phytochemistry* 15: 58-569.
- Ikeda, T., Matsumoto, T. and Noguchi, M. (1978) Effect of auxins on the formation of ubiquinone by tobacco plant cells in suspension culture. *Phytochemistry* 17: 1879-1883.
- Ikeda, T., Matsumoto, T., Obi, Y., Kisaki, T. and Noguchi, M. (1981) Characteristics of cultured tobacco cell strains producing high levels of ubiquinone 10 selected by a cell cloning technique. *Agric Biol Chem* 45: 2259-2263.
- Jung, K., Kwak, S., Choi, C. and Liu, J. (1994) Development of two stage culture process by optimization of inorganic salts for improving catharanthine production in hairy root cultures of *Catharanthus roseus*. *J. Ferment. Bioeng.* 77: 57-61.
- Mono, Y., Nabeshima, S., Matsui, C. and Ohkawa, H. (1986). Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia japonica*. *Agric Biol Chem* 50: 2715-2722.
- Threlfall, D. and Whistance, G. (1970) Biosynthesis of ubiquinone—a search for polyphenyl phenol and quinone precursors. *Phytochemistry* 9: 355-359.
- Yamada, Y. and Hashimoto, T. (1990). Possibilities for improving yields of secondary metabolites on the cell culture. *In Progress in plant cellular and molecular biology*. Kluwer Academic Publishers pp 547-554.
- Yang, D., Park, J. and Choi, K. (1994) Production of ubiquinone 10 from the callus culture of tobacco(*Nicotiana tabacum* cv. xanthi). *Korean J. Plant tissue Culture* 21: 341-345.