

흰독말풀 (*Datura metel* L.) 종양 캘러스의 현탁배양으로부터 Scopolamine 생성

이수경 · 윤길영 · 김용해 · 양덕조*
충북대학교 자연과학대학 생명과학부

Scopolamine Production in Suspension Cultures of Tumor Calli from *Datura metel* L.

LEE, Su Kyung · YUN, Kil Young · KIM, Yong Hae · YANG, Deok Cho*

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

ABSTRACT In this study, to produce large-scale scopolamine we were examined in the tumor calli of *Datura metel* L. induced by *Agrobacterium tumefaciens* Ery₁₀₁. The growth and scopolamine contents of tumor calli were higher under light condition than in dark. The optimum condition of growth and scopolamine production were fluence rate of 16 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, spectra of red light region and 16 hour light periods on 50 mL SH liquid medium in 4 weeks culture. To increase of the scopolamine contents in tumor calli, the optimum concentration of nitrogen source were 1.8 mM NH_4^+ and 40 mM NO_3^- . The optimum elicitor concentration for production of scopolamine were 10 mg/L chitosan and 15 mg/L yeast extract. The effect of precursors were good at the concentration of 0.2 mM tropine and 0.3 mM tropic acid, respectively. In order to increase of growth and scopolamine contents, we induced mutant from *Datura metel* L. tumor callus. Mutants of tumor calli were obtained by 3 Krad, 4 Krad and 6 Krad of ⁶⁰Co- γ -ray. Among them, 3 Krad tumor callus was excellent on the growth and teratoma induction. The 4 Krad tumor callus was negligible for both growth and teratoma induction. But the 6 Krad tumor callus was the best in growth and teratoma induction. The formation of the mutant calli can be enhanced through hormonal combination of 1 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 0.5 mg/L benzyladenine. We carry out selection mutant tumor calli for high content tropane alkaloid and suspension cultures for scopolamine production.

Key words : elicitor, hormone, light, nitrogen, γ -ray, precursor

서 론

흰독말풀 (*Datura metel* L.)에서 생합성되는 tropane alkaloid 계열인 hyoscyamine, scopolamine 은 천식, 만성기 관지염, 치통, 류마티즘, 가스해독, 부교감신경 마비제, 마취제로 쓰이는 중요한 천연 의약품이었다 (Dhoot and Henshaw

1977; Yamada and Hashimoto 1982; Mano et al. 1986; Jaziri et al. 1988). 당시에는 hyoscyamine이 주로 이용되어 왔으나, 중추신경계에 부작용을 초래하기 때문에 scopolamine을 더 선호하게 되어 약용식물에서 scopolamine의 함량을 증가시키려는 연구가 계속되고 있다 (Yamada et al. 1994). 하지만 자생식물로부터 scopolamine의 추출 및 활용은 함량 등이 환경요인에 의해 영향을 받기 때문에 안정적인 공급이 어려운 실정이다. 이러한 문제점을 극복하기 위한 연구의 일환으로 환경 조절이 용이한 기내 배양 세포로부터 활성 물질을 생산하려는 연구가 제안되었다 (Montoya et al.

*Corresponding author. Tel 043-261-2293
E-mail dcyang@pct.chungbuk.ac.kr

1977; Garley et al. 1979). 또한 2차 대사산물의 생산성을 높이기 위한 방법으로 *Agrobacterium spp.*를 이용한 식물세포의 형질전환기법이 이용되고 있다 (Christen et al. 1989; Granicher et al. 1992; Yang et al. 1998). 모상근이나 tumor 조직은 호르몬이 없는 배지에서도 무한세포 배양이 가능하지만 (Einset 1980; Weiler and Spanier 1981), tumor 조직이 너무 딱딱하고 견고한 조직으로 구성되어 있어 현탁배양시 영양공급의 불균형으로 생장이 지연된다. 따라서 이와 관련된 연구는 국내외에서 전혀 수행된 바 없다. 그밖에 모상근 배양에서는 영양생장을 증가시키기 위한 방법으로 배양 도중에 조직을 절단해야 하는 등의 문제점을 가지고 있다. 그래서 현탁배양을 통한 유용 2차 대사산물의 생산을 위해서는 배양에 적합한 새로운 재료와 식물세포공학적인 접근이 요구되고 있다. 본 연구에서는 흰독말풀에서 tumor 조직을 유도하고 그 조직 세포로부터 유리 tumor callus를 유도하여 scopolamine의 생산을 위한 대량배양을 수행하였다. Tumor callus의 성장 특성을 구명하고자 배지조성, 배양주기, 배지교체 시기를 알아보았다. 또한 tumor callus의 광생리적 특성을 이해하고자 광도, 광질 및 광주기에 따른 성장과 scopolamine 함량의 변화를 확인하였다. Tumor callus로부터 scopolamine의 생산을 증가시키기 위해서 그 밖에 무기이온, elicitor와 전구물질을 조합처리하여 그에 따른 성장과 함량의 변화 양상을 조사하였다. 또한 현탁배양시 나타나는 tumor callus의 견고한 aggregation 현상을 이해하고자 γ -ray를 조사하여 tumor callus 세포의 돌연변이 유발가능성과 고정된 세포주를 선별하였다.

재료 및 방법

식물 재료

흰독말풀 (*Datura metel* L.)의 tumor callus는 종자를 4°C에서 20일간 저온 처리한 다음 발아시켜 잎이 6~7장 되었을 때 잎과 줄기에 *Agrobacterium tumefaciens* Ery₁₀₁ (Yang et al. 1988)을 접종하여 유도된 tumor 조직으로부터 재분화시켜 (Yang et al. 1997) 사용하였다.

Tumor callus 배양 및 생장률 측정

Tumor callus는 SH (Schenk and Hildebrandt 1972) 기본 배지 (3% sucrose)에서 광상태 ($16 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 25°C로 3주 배양한 다음 실험재료로 사용하였다. Tumor callus의 생장률은 배양 후 증류수로 2회 세척한 다음 동결 건조 (DPR-FOUM-105 Operon Eng., Korea)하여 건조량으로 측정하였다.

생장률 증가를 위한 액체배양

최적 배지량을 확인하기 위하여 SH 기본 배지를 100 mL 삼각플라스크에 각각 20, 30, 40, 50 및 60 mL로 배지량을 조절하여 생체량 1 g을 접종해 2주와 4주간 배양하였다. 또한 주기별 생장을 알아보기 위하여 SH 배지 50 mL이 들어 있는 100 mL 삼각플라스크에 생체량 1 g을 접종하여 각각 1 주, 2 주, 3 주, 4 주 및 5 주 별로 성장률을 측정하였다. 이단계배양을 위한 액체배지 교체의 최적 시기를 구명하기 위하여 SH 기본 배지 50 mL이 들어 있는 100 mL 삼각플라스크에 생체량 1 g을 접종하여 1 주, 2 주 및 3 주 후에 동일배지로 각각 교체하여 배양하였다.

광의 영향

광도에 따른 흰독말풀 tumor callus의 성장과 tropane alkaloid 함량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 암상태와 광량을 4, 8, 12, 16 그리고 $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 로 조절하여 SH 기본 배지가 40 mL 들어 있는 100 mL 삼각플라스크에 생체량 1 g씩을 접종하여 30 일간 진탕 (rotary shaker 110 rpm) 배양하였다. 온도는 25°C로 고정하였으며, 4주간 배양한 후 생장률, tropane alkaloid 및 색소 함량을 조사하였다. 광질은 청색광 (400~500 nm, XGB-400T filter; Giriffin Co., England +blue cellophane), 녹색광 (500~600 nm, R₁SR-60 filter; Kenko, Japan), 적색광 (600~700 nm, IF550 filter; Olympus, Japan) 및 백색광 (fluorescent light)으로 분광하여 처리하였으며 필터를 투과한 광량이 $4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 가 되게 조절하였다. 광주기의 영향을 조사하기 위해서 SH 교체배지에 생체량 1 g을 접종하여 25°C에서 0/24, 8/16, 12/12, 16/8 그리고 24/0 (light/dark)의 주기로 배양하였다.

산화/환원 질소원의 영향

질소의 공급원인 KNO₃의 최적 농도를 구명하고자 SH 기본 배지에 KNO₃의 농도를 각각 0, 1, 2, 2.5, 3, 4 및 5 g/L로 하여 생체량 1 g을 접종하여 배양하였다. 또 다른 환원질소의 공급원인 NH₄의 최적 농도를 구명하기 위하여 SH 기본 배지에 NH₄H₂PO₄의 농도를 각각 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 및 0.5 g/L로 하여 생체량 1 g을 접종하여 배양하였다.

Scopolamine 함량 증가를 위한 elicitor와 전구물질의 영향

Tumor callus의 scopolamine 생성에 미치는 elicitor의 효과를 조사하고자 agar (30 $\mu\text{g/mL}$), chitosan (30 $\mu\text{g/mL}$), cyclohexamide (2×10^{-5} M), 밤버섯 추출물 (10 $\mu\text{g/mL}$), NaF (1 mM), yeast extract (10 $\mu\text{g/mL}$)를 처리하였다. Yeast 추출은 Hahn and Albersheim (1976)의 방법에 의한 ethanol 침

전법을 사용하였으며, 밤버섯의 배양 및 elicitor 추출은 Yun 등 (1993)의 방법에 준하였다. 그 중 대표적으로 쓰이는 elicitor인 chitosan과 yeast의 농도를 각각 0, 5, 10, 15 및 20 mg/L로 처리하였다. Tumor callus 생체량 1 g을 접종하여 SH 기본 배지에서 3주 동안 배양한 후 elicitor를 처리하여 1주간 연속 배양하였다. 전구물질 처리에 의한 tropane alkaloid의 함량 변화를 조사하기 위하여 tumor callus를 SH 기본 배지에서 3주간 배양한 후 tropane alkaloid의 전구물질인 L-phenylalanine, tropine, tropinone, tropic acid를 각각 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 및 0.3 mM의 농도로 조절하여 배양하였다.

γ -Ray 처리

Tumor callus에 ^{60}Co γ -rays 처리는 한국 원자력 연구소의 원자로를 사용하여 1, 3, 4, 6, 8 및 10 Krad의 저준위 방사선을 처리하였다. ^{60}Co γ -rays로 처리할 tumor callus는 petridish에 3 mm \times 3 mm의 크기로 접종한 후 방사선을 처리하였다. 그리고 형질전환체 확인을 위하여 ^{60}Co γ -ray를 처리한 tumor callus를 MS (Murashige and Skoog 1962) 고체 배지에 연속적으로 계대배양하였다. 이것을 처리된 방사선의 세기 (Krad)에 따라 구분하여 3K callus, 4K callus 및 6K callus로 가칭하였다. 이들 각각의 방사선 세기로부터 유도된 캘러스를 NAA (1-naphthaleneacetic acid), BA (benzyladenine)를 조합하여 teratoma 형성을 조사하였다. 돌연변이 3K와 6K callus의 teratoma를 절단하여 돌연변이체의 증식을 위한 최적조건을 구명하기 위하여 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)와 kinetin을 조합하여 25°C, 광상태하에서 30일간 배양하였다.

Tropane alkaloid 추출

Tropane alkaloid 추출은 Mano 등 (1986)의 방법에 준하여 수행하였다. 동결 건조시킨 tumor callus를 마쇄한 후 건조량 50 mg을 취하여 ethyl alcohol : 28% ammonia water를 19:1 (v/v)로 혼합한 용매 10 mL에 넣고 4°C의 온도 조건에서 18시간 정치시켰다. 추출된 용액을 4,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 취하고 침전물은 같은 용매로 한번 더 추출하였다. 상등액을 모아서 40°C에서 용매를 증발시킨 후 증발 잔사를 2.5 mL 0.1 N HCl로 용해시킨 후 3,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상등액을 취하고, 상등액에 0.3 mL 1 M Na_2CO_3 - Na_2HCO_3 완충용액 (pH 10)을 첨가하였다. 5 cm ExtrelutR 20 column (Merck, Germany)에 용액을 흡착시킨 다음 15 mL chloroform으로 용출시켰다. 용출액을 취하여 40°C에서 회전 증류시킨 후 증발 잔사를 1 mL 70% (v/v) methanol에 녹여 hyoscyamine과 scopolamine 분석 시료로 사용하였다.

Tropane alkaloid 분석

UV detector가 장착된 HPLC (Pharmacia LKB, Sweden)를 이용하여 hyoscyamine과 scopolamine을 정량 분석하였다. Column은 Shimpack CLC-ODS (5 μm , 4.6 \times 250 nm, Shimadzu Co., Japan)를 사용하였고 eluents는 methanol과 10 mM sodium-1-heptane sulfonate를 48 : 52 (v/v)로 혼합한 다음 acetic acid를 이용하여 pH 4.0으로 조정한 후 사용하였다. Flow rate는 1 mL/min으로 하였고 λ 215 nm에서 hyoscyamine과 scopolamine의 표준품과 비교하여 계산하였다.

결과 및 고찰

Tumor callus의 성장과 현탁배양

흰독말풀 tumor callus는 암상태에서 보다 광상태의 현탁배양에서 생장이 촉진되고 세포의 염색도가 유도된다 (Figure 1). 이에 tumor callus의 성장을 위한 최적 배지량을 확인하였다. 2주동안 배양한 경우에는 배지량이 30~40 mL일때 callus의 생장률이 가장 양호하였으며 (Figure 2), 4주 배양의 경우에는 40~50 mL가 최적 배지량인 것으로 확인되었다. 또한 배양주기를 알아보고자, SH 배지량을 50 mL로 하여 6주간 callus를 배양한 결과, 2~3주까지는 급격한 logarithm 성장을 나타냈다. 4~5 주사이에는 완만한 성장을 보이다가, 5주 이후에는 callus의 생장이 감소하기 시작하는 전형적인 sigmoid 성장 양상을 나타내었다 (Figure 2). 따라서 stationary phase에서 일반적으로 이차대사산물의 생성이 촉진되는 것으로 미루어 볼 때, 최적배양시기는 4~5주가 가장 효과적인 것으로 판단된다. 또한 조직배양에서 이차대사산물의 함량을 높이기 위한 방안으로 일차적으로 배양세포의 영양생장률을 월등히 증가시킨 후 환경조건을 조절하여 이차대사산물의 함량을 높이는 다단계 배양을 시행하고 있다. 이

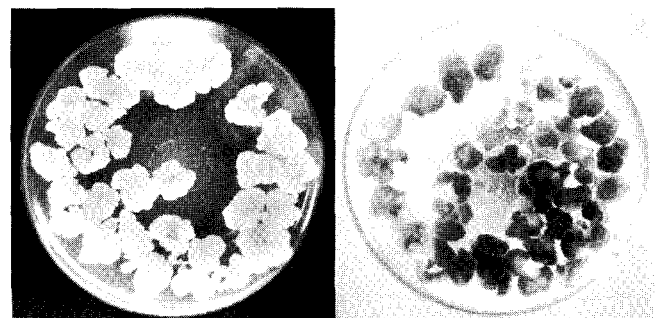


Figure 1. Effects of light ($16 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) on growth and pigments synthesis from tumor callus cultures of *Datura metel* L. The tumor callus cultured on SH liquid medium for 4 weeks at 25°C in shaking incubator (110 rpm).

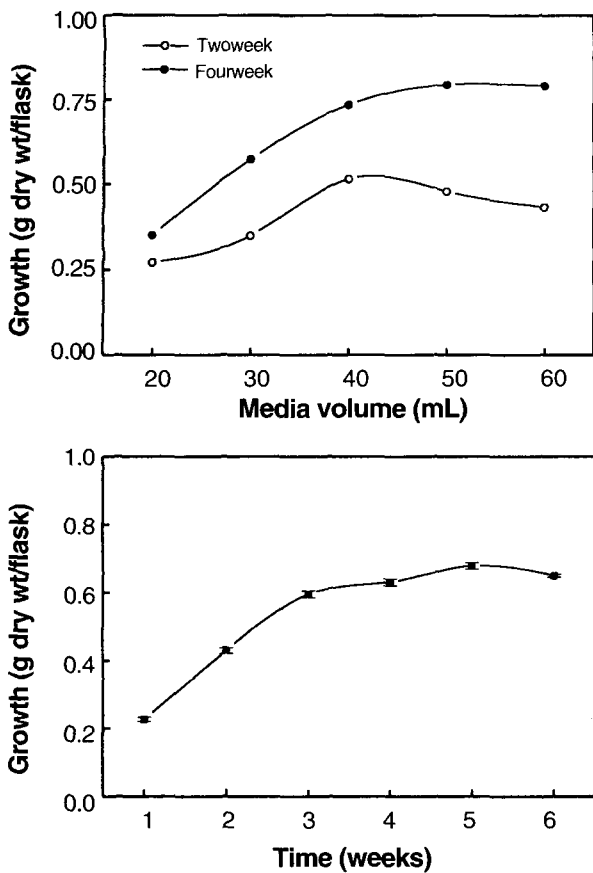


Figure 2. Effects of media volume on growth and generation curve of *Datura metel* L. tumor callus. The tumor callus cultured on SH liquid media at 25°C, 16 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in shaking incubator (110 rpm).

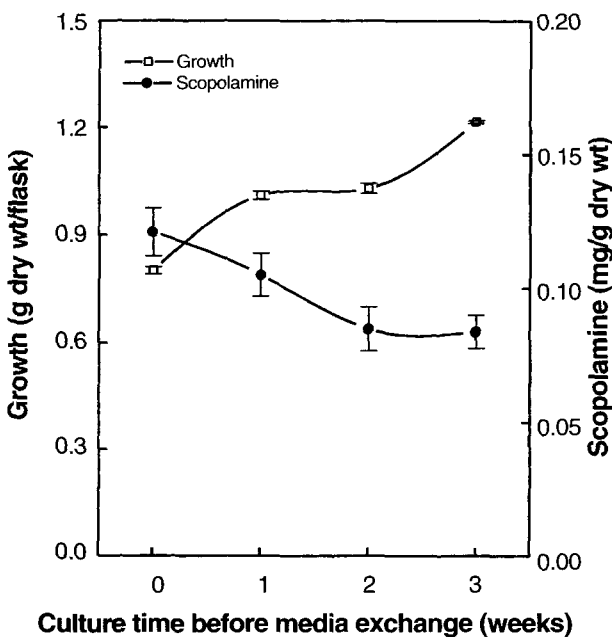


Figure 3. Effects of media exchange on growth and scopolamine contents in tumor callus cultures of *Datura metel* L. The tumor callus cultured on SH liquid medium for 4 weeks at 25°C, 16 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in shaking incubator (110rpm).

러한 다단계 배양에서 해결해야 하는 필수적인 문제점은 최적 시기에 배지를 교체해 주는 것이다. 따라서 tumor callus 배양시 배지 교체의 최적 시기를 구명하기 위하여 4주 동안 배지를 교체하지 않은 처리구, 1주, 2주, 3주 후에 각각 배지를 교체하여 실험한 결과, 성장률은 3주 후에 배지를 교체한 처리구가 1.21 g dry wt · flask⁻¹로 4주 배양한 0.80 g dry wt · flask⁻¹보다 1.5배 증가하였다. 그러나 scopolamine의 함량은 4주 동안 배지를 교체하지 않고 배양한 처리구가 0.12 mg · g dry wt⁻¹로 가장 높았으며, 3주 후에 배지를 교체한 처리구는 0.08 mg · g dry wt⁻¹로 가장 낮았다 (Figure 3). 따라서 scopolamine 생산을 증가시키기 위해서는 급격한 생장이 이루어지는 logarithmic phase인 3주 후에 배지를 교체하여, logarithmic phase를 좀 더 연장한 다음 4주간 배양하는 것이 효과적인 것으로 판단된다.

Tumor callus 성장 및 scopolamine 생성에 미치는 광의 영향

Tumor callus의 생장은 16 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 까지 광량이 증가함에 따라 점진적으로 증가하다가 16 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 이상의 광량에서는 감소하였다. Scopolamine의 함량은 16 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 까지는 광량의 증가와 비례하여 함량도 증가하여 16 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 0.13 mg · g dry wt⁻¹로 암상태 처리구의 0.06 mg · g dry wt⁻¹보다 2.2배 높게 나타났다 (Figure 4). 이러한 결과로 미루어 볼 때, 흰독말풀 tumor callus는 광에너지에 의해 성장과 scopolamine 생합성이 촉진되는 것을 알 수 있다. 일반적으로 현탁배양의 경우 광도가 증가함에 따라 세포의 생장은 공히 억제되고, 2차 대사산물의 함량이 증가하는 인삼 (*P. ginseng*), 자리공 (*P. esculenta*), 독말풀 (*D. stramonium*) 모상근의 광에 대한 반응과는 상반되는 생리적 특성이다 (Yang et al. 1995b; 1996; 1997). 반면에 Tabata 등 (1972)이 *D. innoxia*의 켈러스 배양시 광처리구에서 tropane alkaloid의 함량이 증가한다는 보고와 Dung 등 (1972)이 꽃잎에서 유래된 켈러스의 세포생장과 tropane alkaloid의 함량이 광처리시 촉진된다는 결과와 일치한다. 따라서 본 흰독말풀의 tumor callus는 광에 의해 형성되는 광합성 색소와 성장 그리고 scopolamine 함량 증가 사이에 밀접한 상호관계가 있음을 시사하고 있다. 또한 tumor callus 배양에서 광과장의 효과를 알아본 결과, 적색광 처리구에서 0.82 g dry wt · flask⁻¹로 가장 높은 성장을 나타냈다. Scopolamine 함량은 암상태보다 광상태에서 현저히 증가하였다. 그러나 빛을 분광하여 조사한 경우 적색광이 0.17 mg · g dry wt⁻¹로 청색광 (0.08 mg · g dry wt⁻¹)보다 scopolamine 생성을 촉진하였다. 그러므로 tumor callus의 성장과 scopolamine의 함량에 가장 효과적인 광은 적색광임이 확인되었다. 이러한 결과는 자리공 모상근의 성장과 betalain 및 phytolaccoside의 생성이 청색광에 의해 증가된다는 보고 (Yang et al. 1995a)와 상반되는 결과이다. 이는 식물세포의 광인식 및 신호전이에 관여하는 수용체 분자의

second messenger가 특정 파장의 빛에 의해 활성화되고, 활성화된 분자는 세포내 물질대사를 조절하는 일련의 연속과정에서 종특이적으로 생리적 특성이 나타나기 (Yang et al. 1993) 때문으로 이해된다. 흰독말풀의 tumor callus 경우는 광신호전이 과정에서 세포생장과 scopolamine의 생합성에 관련된 효소가 적색광에 의해 활성화되어 생장과 scopolamine의 합성이 촉진되는 것으로 밝혀졌다. 광주기 (photoperiod)에 따른 tumor callus의 생장은 단일조건 (8/16)과 장일조건 (16/8) 사이에서는 큰 유의차가 없었으나, scopolamine 함량은 장일조건에서 $0.15 \text{ mg} \cdot \text{g dry wt}^{-1}$ 로 단일 또는 암처리구보다 각각 1.8배와 2.4배로 현저히 높게 나타났다. 이러한 결과는 흰독말풀이 장일식물에 속하는 생리적 특성을 고려해

볼 때, 흰독말풀의 tumor callus도 모식물과 같은 생체리듬을 갖는 것으로 생각된다. 한편, 연속광 상태에서 callus 생장과 scopolamine의 함량이 낮은 이유는 Yang 등 (1995b)이 보고한 광에너지에 의한 활성화 산소의 생성, 즉 연속적인 광처리에 의해 과다하게 생성되는 oxygen radicals ($\text{O}^{\cdot -}_2$, $^1\text{O}_2$)에 의한 효소활성의 저해 메카니즘에서 유추해 볼 수 있겠다. 또한 tumor callus의 특이한 현상으로 고체배지에서 보다 현탁배양에서 생장이 우수한 점을 미루어 볼 때 tumor callus세포의 현탁배양을 통한 large-scale-up 배양도 가능할 것으로 판단된다.

산화환원 질소원의 영향

질소원의 효과에서 질산태 질소 (KNO_3)의 경우 tumor callus의 생장률은 2 g/L 일 때 $0.90 \text{ g dry wt} \cdot \text{flask}^{-1}$ 로 무처리구의 $0.43 \text{ g dry wt} \cdot \text{flask}^{-1}$ 보다 2.1배 증가하였다. 그러나 scopolamine 함량은 4 g/L KNO_3 처리구에서 $0.15 \text{ mg} \cdot \text{g dry wt}^{-1}$ 로 가장 높았으며 무처리구의 $0.07 \text{ mg} \cdot \text{g dry wt}^{-1}$ 보다 2.1배 증가한 것으로 나타났다 (Figure 5). 무기질소의 공급원인 암모니아태 질소 ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)의 경우 tumor callus의

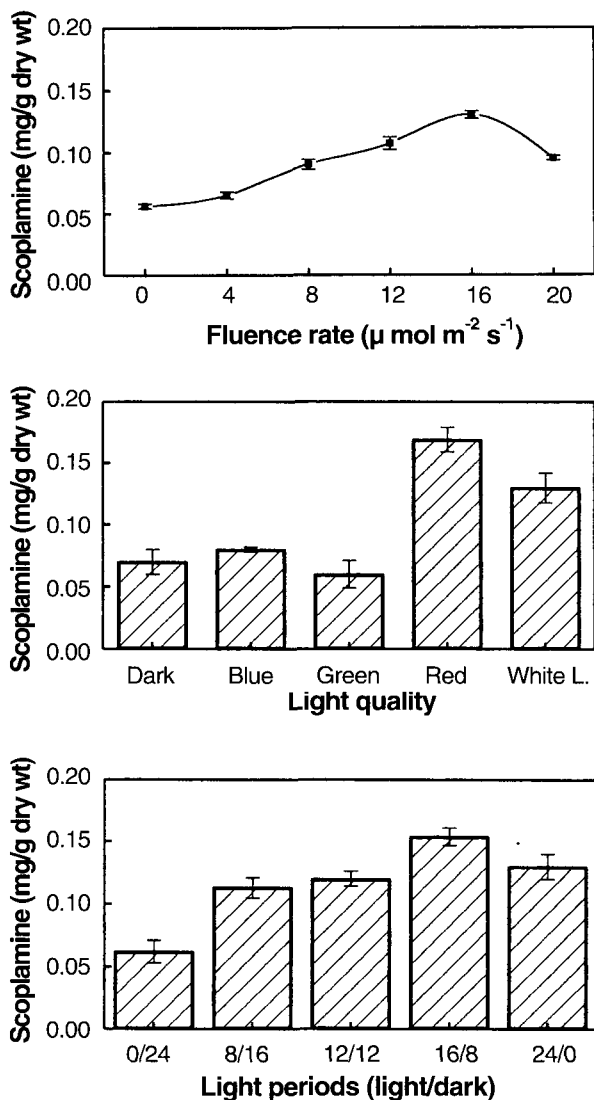


Figure 4. Effects of light (fluence rate, quality and periods) on scopolamine contents in tumor callus cultures of *Datura metel* L. The tumor callus cultured on SH liquid media for 4 weeks at 25°C , $16 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in shaking incubator (110rpm) for light intensity and quality experiment and SH 1% agar media for 4 weeks at 25°C incubator for light periods experiment.

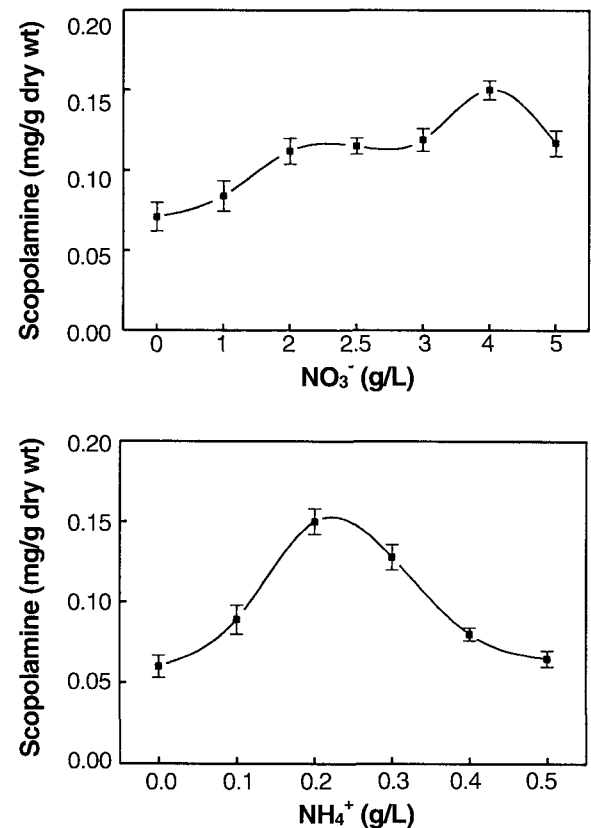


Figure 5. Effects of nitrogen source (NO_3^- , NH_4^+) on scopolamine contents in tumor callus cultures of *Datura metel* L. The tumor callus cultured on SH liquid medium for 4 weeks at 25°C , $16 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in shaking incubator (110rpm).

성장은 0.3 g/L NH₄H₂PO₄ 처리구에서 가장 높게 나타났다. 반면 scopolamine의 함량은 0.2 g/L 처리구에서 0.15 mg · g dry wt⁻¹로 가장 높았으며, 이는 가장 낮은 0.5 g/L 처리구의 0.07 mg · g dry wt⁻¹보다 2.1배 더 높은 결과이다 (Figure 5). NH₄⁺의 경우 농도가 0.2 g/L 이상 증가하면 scopolamine의 함량은 급격히 감소하는 반면, NO₃⁻는 농도가 4 g/L 까지 증가할수록 scopolamine의 함량이 계속 증가함을 볼 수 있다. 따라서 tumor callus의 성장과 scopolamine 함량 증가에 효과적인 질소원은 산화형인 NO₃⁻로 확인되었다.

Elicitor와 전구물질의 영향

Tumor callus에서 scopolamine의 함량을 높이기 위한 최적 조건을 구명하고자 agar, chitosan, cyclohexamide, 밤버섯 추출물, NaF, yeast 추출물 등을 농도별로 처리한 결과, tumor callus의 성장은 모든 처리구에서 대조구와 비슷하게

나 다소 억제되었으나, scopolamine의 함량은 대조구에 비해 증가하였다 (Figure 6A). 조직배양에서 일반적으로 많이 이용되고 있는 chitosan의 농도별 효과에서는 scopolamine 함량이 10 mg/L 처리구에서 0.23 mg · g dry wt⁻¹로 대조구의 0.12 mg · g dry wt⁻¹보다 1.9 배 증가하였다. Yeast 추출물 처리구에서도 역시 scopolamine 함량이 대조구의 0.11 mg · g dry wt⁻¹에 비해 15 mg/L 처리구에서 0.22 mg · g dry wt⁻¹로 현저히 높게 나타났다 (Figure 6B). Marques와 Brodelius (1988)는 캘리포니아 양귀비의 현탁배양 세포에 yeast 추출물을 처리하여 L-tyrosine decarboxylase (TDC) 활성을 유도하였다. 또한 자리공 모상근에 여러 종류의 elicitor를 처리하여 phytolaccoside G, D₂의 생성을 증가시켰다 (Yang et al. 1997). 본 연구에서도 흰독말풀 tumor callus의 현탁배양에서 elicitor에 의해 scopolamine의 생합성과 관련된 hyoscyamine 6-β-hydroxylase 등과 같은 효소의 활성이 증가되어 scopolamine의 생성이 높아진 것으로 유추해 볼 수 있다. 또한 scopolamine의 starter precursor 인 L-Phenylalanine을 농도별로 처리한 결과, scopolamine 함량이 대조구 (0.12 mg · g dry wt⁻¹)보다 0.05 mM 처리구에서 0.17 mg · g dry wt⁻¹로 1.42배 증가하였다. Tropinone의 경우에도 마찬가지로 scopolamine의 함량은 0.05 mM 농도까지 현저히 증가하여 (0.19 mg · g dry wt⁻¹) 대조구 (0.12 mg · g dry wt⁻¹)보다 1.6 배가 증가하였으며, 그 이상의 농도에서는 뚜렷한 경향이 보이지 않았다. Tropic acid도 처리 농도가 증가할수록 scopolamine 함량이 증가하여 0.2 mM 처리구는 0.20 mg · g dry wt⁻¹로 대조구의 0.10 mg · g dry wt⁻¹ 보다 2배 증가하였다. Tropine 처리 역시 0.2 mM 처리구까지 scopolamine의 함량이 계속 증가하여 0.21 mg · g dry wt⁻¹로 대조구 0.11 mg · g dry wt⁻¹에 비해 1.9배 증가하였다 (Figure 6C). 이상의 결과를 종합해 볼 때, 전구물질인 tropic acid와 tropine의 첨가는 scopolamine의 함량을 현저하게 증가시켰다. 그러나 phenylalanine과 tropinone 첨가는 scopolamine의 합성에 큰 영향을 미치지 않았다. Young 등 (1993)은 *Eschscholitzia californica*의 현탁배양에서 전구물질인 dopamine과 tryamine을 투여한 결과 대조구에 비해 benzophenanthridine alkaloid 수율을 향상시킬 수 있었다. 따라서 본 실험에 이용된 흰독말풀의 tumor callus 세포에서도 scopolamine의 biotransformation (생물공학적 형질전환)을 위하여 전구물질의 사용을 검토해 볼 필요가 있다고 판단된다. 그러나 모든 전구물질은 단독으로 첨가하는 것보다는 대사사슬의 말단 전구물질들을 elicitor와 조합처리 하는 것이 효과적임이 밝혀졌다. 따라서 scopolamine 생산을 향상시키기 위해서는 실용 가능성이 있는 전구물질을 탐색하고 좀 더 구체적인 활용방안이 정립되어야 할 것이다.

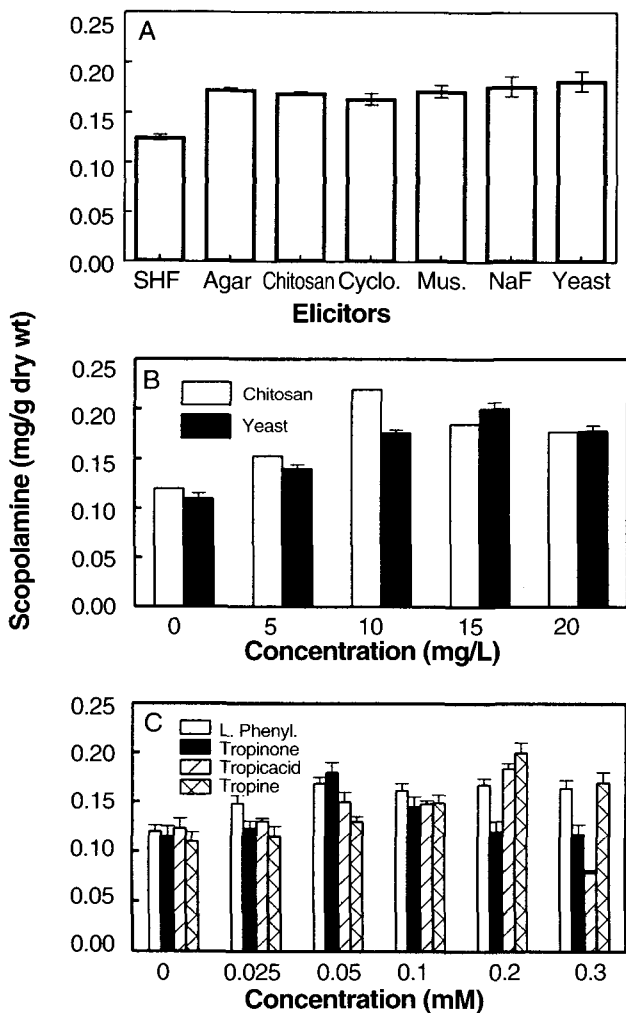


Figure 6. Effects of elicitors and precursors on scopolamine contents in tumor callus cultures of *Datura metel* L. The tumor callus cultured on SH liquid medium for 4 weeks at 25°C, 16 μmol m⁻² s⁻¹ in shaking incubator (110rpm).

⁶⁰Co γ -Ray 처리에 의한 돌연변이 tumor callus 선발

⁶⁰Co γ -Ray 처리에 의한 돌연변이 tumor callus를 선발하기 위하여 tumor callus에 ⁶⁰Co γ -ray를 처리한 결과, 3, 4 및 6 Krad 까지는 비교적 성장이 양호하였으나, 그 이상인 8과 10 Krad 처리구는 tumor callus가 모두 고사되었다. ⁶⁰Co γ -Ray를 처리한 tumor callus중 3, 4 및 6 Krad의 callus를 연속적으로 계대배양한 결과, 3 Krad를 처리한 tumor callus의

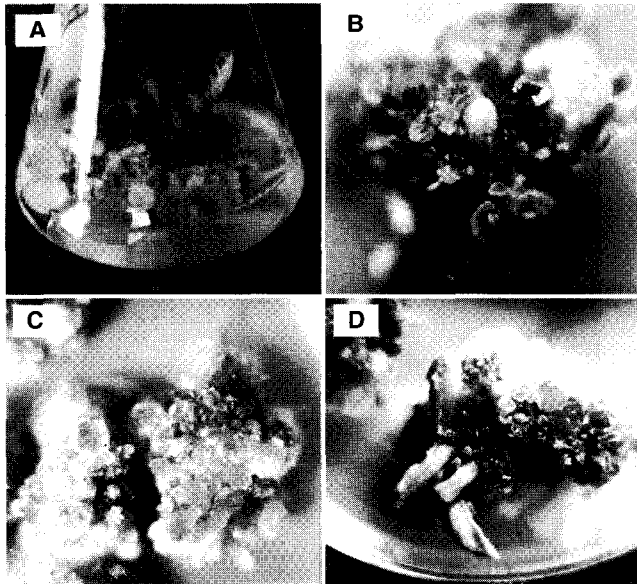


Figure 7. Morphological characteristics of teratoma induced from tumor callus exposed to ⁶⁰Co γ -ray. A: Control, B: 3K callus, C: 4K callus, D: 6K callus.

경우 세대를 거듭할수록 teratoma형성의 빈도가 증가하였으며, teratoma 앞의 모양이 대조구의 타원형 (elliptical)과 다른 난형 (ovate)으로 나타났다. 그러나 4 Krad를 처리한 tumor callus에서는 teratoma 형성이 전혀 이루어지지 않았으며, 특히하게도 callus 조직이 부드럽고 물렁물렁하게 형성되었다. 6 Krad를 처리한 tumor callus는 teratoma 형성률이 가장 높았으며, 앞의 모양은 두껍고 길쭉한 도피침형 (oblanceolate)으로 나타났다 (Figure 7). 이와 같이 teratoma 앞 모양의 표현형적 차이는 ⁶⁰Co γ -ray 처리에 따른 유전형의 변이에서 기인된 것으로 판단된다. 또한 tumor callus의 경우 일반적인 callus 보다 auxin과 cytokinin의 자가 합성능이 촉진됨을 감안할 때, 방사선 처리는 auxin과 cytokinin 비율에 영향을 주고 있음이 암시된다. 일반적으로 teratoma의 형성은 과다한 cytokinin에 의해 유도 (Richard and Miller 1982)되기 때문에 호르몬이 teratoma 형성에 미치는 영향을 구명하기 위하여 방사선을 조사한 callus에 호르몬을 복합 처리한 결과, 3 Krad를 조사한 tumor callus의 경우 0.2 μ M NAA + 2 μ M BA를 처리한 처리구에서 성장과 teratoma 형성이 가장 우수하였다. 4 Krad를 조사한 tumor callus 경우에는 0.4 μ M NAA + 4 μ M BA 처리구와 0.4 μ M NAA + 6 μ M BA 처리구에서 성장 및 teratoma 형성이 호르몬 무첨가 배지보다 다소 높게 나타났다. 6 Krad를 처리한 tumor callus의 경우에는 0.6 μ M NAA + 3 μ M BA 처리구에서 성장과 teratoma가 형성이 왕성하였다 (Table 1).

이상의 결과를 종합해 볼 때, tumor callus에서 teratoma 유도는 ⁶⁰Co γ -ray 3 Krad ~6 Krad를 조사함으로써 가능하며, cytokinin의 함량이 auxin보다 상대적으로 높을 때 성장과

Table 1. Effects of hormonal combination (NAA/BA) on growth and teratoma induction in the tumor callus exposed to ⁶⁰Co γ -ray. The callus cultured on 1% SH agar medium for 4 weeks at 25°C, 16 μ mol m⁻² s⁻¹.

Hormone	NAA (μ M)	0.0	0.2	0.2	0.2	0.4	0.4	0.4	0.6	0.6
	BA (μ M)	0.0	1.0	2.0	3.0	2.0	4.0	6.0	3.0	6.0
Growth & Teratoma Induction Rate	3K callus	++	++	+++	++	++	+	+	+	++
	4K callus	++	-	-	-	-	++	+++	-	-
	6K callus	++	++	+	++	++	+	+++	++	-

+: low ++: good +++: excellent

Table 2. Effect of hormone combination (2,4-D/kinetin) on dedifferentiation rate of teratoma tissue. The teratoma tissue cultured on 1% MS agar medium for 4 weeks at 25°C, 16 μ mol m⁻² s⁻¹.

Hormone	2,4-D (mg/L)	0.0	0.5	0.0	0.5	1.0	1.5
	kinetin (mg/L)	0.0	0.0	0.5	0.5	0.5	1.0
Dedifferentiation Rate	3K teratoma	+	+	+	++	+++	++
	6K teratoma	+	+	+	++	+++	++

+: low ++: good +++: excellent

teratoma 형성이 더욱 촉진됨을 확인하였다. 이제, 3K와 6K tumor callus의 teratoma 조직으로부터 새로운 callus 세포주를 선발하고 증식코저 teratoma 조직을 2,4-D와 kinetin 농도를 서로 달리 조성하여 배양한 결과는 table 2 와 같다.

3과 6 Krad를 조사한 tumor callus에서 유래된 teratoma 조직의 경우 호르몬 무첨가 배지에서 가장 높은 teratoma 형성률을 나타냈다. 반면에 2,4-D의 농도가 증가할수록 teratoma 형성은 감소하고 callus 형성이 촉진되었다. 특히, 1.0 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L kinetin을 복합처리한 배지에서 유도된 teratoma callus는 3 Krad와 6 Krad 공히 세포가 매우 부드럽고 느슨하게 형성되었다. 이는 차제에 tropane alkaloid 생산을 위한 현탁배양시 우수한 tumor callus 세포주로 활용할 수 있을 것으로 기대된다. Tumor callus를 현탁배양하면 세포가 유리화되지 않고 딱딱하게 응집생장을 한다. 이러한 켈러스의 견고한 응집생장은 유리세포 생장과 비교할 때 산소공급과 양분흡수가 억제되어 켈러스 생장이 둔화되는 주 요인이 되고 있다. 앞으로의 연구는 방사선을 처리하여 얻은 teratoma 조직에서 유도한 켈러스를 계대배양하면서 새로운 형질을 갖는 우수한 세포주를 선발, 고정하여 현탁배양을 통해 scopolamine을 large-scale-up 생산하는 기술의 개발이 요구된다.

적 요

흰독말풀의 tumor 조직에서 유도한 tumor callus로부터 scopolamine의 생산을 극대화하기 위한 연구를 수행하였다. Tumor callus의 성장률을 증가시키기 위해서는 초기접종량을 배지의 2%로 하고 배양기간은 4주가 효과적이다. 그래서 만일 이단계배양을 추진하려면 배지교체의 시기는 3주가 가장 적당한 것으로 확인되었다. Scopolamine의 생성을 위한 광의 효과를 알아본 결과, 암상태보다 광상태가 callus 성장 및 scopolamine 함량 증가에 효과적이었다. Scopolamine 함량 증가의 최적 광량은 $16 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 광질은 적색파장 그리고 연속광보다 장일조건 (16/8)의 광주기에서 tropane alkaloid인 scopolamine 합성이 현저히 촉진되었다. 질소원으로는 산화형 질소인 NO_3^- 를 4 g/L로 증가시키는 것이 가장 효과적인 것으로 확인되었다. Scopolamine의 함량을 증가시키기 위한 elicitor 공급은 10 mg/L chitosan과 15 mg/L yeast 추출물이 가장 효과적이었으며, 전구물질로는 0.2 mM tropine과 0.3 mM tropic acid가 가장 우수한 것으로 확인되었다. 이러한 결과를 종합해 보면, 흰독말풀 tumor callus에서 scopolamine 대량생산을 추진할 경우 3주 동안 광상태와 무기이온 조성을 균형 있게 조절하여 생장을 최대로 증가시킨 후, 1주 동안 scopolamine 생산을 위해 elicitor, precursors 등이 조합된 배지에서 biotransformation 시키는 것이 가장 효과적인 것으로 판단된다. 또한 tumor callus에 ^{60}Co γ -ray를

조사하여 3K, 4K 및 6K tumor callus를 확보하였으며, 이로부터 유도한 teratoma는 형태적 변이를 나타내었다. Teratoma로부터 또 다시 새로운 teratoma-callus 세포주를 유도하여 현탁배양을 수행하였던 바, MS 기본 배지에서 1.0 mg/L 2,4-D 과 0.5 mg/L kinetin을 조합하여 처리한 callus의 액체배양에서 cell aggregation이 일어나지 않고 세포가 유리화 되면서 왕성한 생장을 보였다.

인용문헌

- 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 Rep* 8:75-77
- Dhoot GK, Henshaw GG (1977) Organization and alkaloids production in tissue cultures of *Hyoscyamus niger*. *Ann Bot* 41:943-949
- Dung NN, Szoke E, Verzar-petri G (1972) The growth dynamics of callus tissue of root and leaf origin in *Datura innoxia* M. *Acta Bot Acad Sci* 27(3-4): 325-333
- Einset JW (1980) Cytokinines in tobacco crown gall tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 93:510-515
- Garley WB, Kemp JD, Albert MJ, Sutton DW, Callis J (1979) Transcription of Ti plasmid derived sequences in three octopine type crown gall tumor lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 76(6):2828-2832
- 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 Rep* 11:339-342
- Hahn MG and Albersheim P (1976) Host-pathogen interactions. XIV. Isolation and partial characterization of an elicitor from yeast extract. *Plant Physiol.* 62:107-111
- Jaziri M, Legrros M, Homes J, Vanhaelen M (1988) Tropane alkaloids production by hairy root cultures of *Datura stramonium* and *Hyoscyamus niger*. *Phytochemistry* 27(2):419-420
- Mano Y, Nabeshima S, Matsui C, Ohkawa H (1986) Production of tropane alkaloids by hairy root culture of *Scopolia japonica*. *Biol Chem* 50(11):2715-2722
- Marques IA, Brodelius PE (1988) Elicitor-induced L-tyrosine decarboxylase from plant cell suspension cultures. *Plant Physiol* 88:46-51.
- Montoya L, Chilton MD, Gordon MP, Sciaky D, Nester EW (1977) Octopine and nopaline metabolism in *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall tumor cells: Role of plasmid genes. *J of Bacteriology* 129(1):101-107
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-479

- Richard MA, Miller CO** (1982) Hormonal control of *Tobacco* crown gall tumor morphology. *Plant Physiol* **69**:389-392.
- Schenk RU, Hidebrandt AC** (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* **50**:199-204
- Tabata M, Yamamoto H, Hiraoka N, Konoshima M** (1972) Organization and alkaloid production in tissue culture of *Scopolia parviflor*. *Phytochem* **11**:949-955.
- Weiler EW, Spanier K** (1981) Phytohormones in the formation of crown gall tumors. *Planta* **153**:326-337
- Yamada Y, Hashimoto T** (1982) Production of tropane alkaloids in cultured cells of *Hyoscyamus niger*. *Plant Cell Rep* **1**:101-103
- Yamada Y, Yun DJ, Hashimoto T** (1994) Genetic engineering of medicinal plants for tropane alkaloid production. In : Ryu DDY, Furusaki S, *Advances in Plant Biotechnology*, Elsevier, Amsterdam, pp 83-93
- Yang DC, Kang YH, Back JH, Choi CH, Lee ST, Lee AR** (1988) Investigation for the isolation and identification of *Agrobacterium tumefaciens* Ery₁₀₁ and morpho-physiological development of tumors infected by pTi-Ery₁₀₁. *Chungbuk Nat'l Univ Bulletin Nat Sci* **1**(3):53-84
- Yang DC, Lee SJ, Yun KY, Chae Q** (1993) Blue light-dependent betalain synthesis in hairy root. I. Model system for the study the photo-signal transduction. *Kor J Plant Tiss Cult* **20**(1):35-40
- Yang DC, Kim YH, Kwon JN, Choi CH, Yang DC** (1995a) Effects of antioxidants on growth and betalain production in hairy root cultures of *Phytolacca esculenta* van Houtte. *Kor J Plant Tiss Cult* **22**(2):65-70
- Yang DC, Kim YH, Kwon JN, Choi CH, Yang DC** (1995b) Effects of light on activities of antioxidative enzymes in hairy root cultures of *Phytolacca esculenta* van Houtte. *Kor J Plant Tiss Cult* **22**(2):71-76
- Yang DC, Choi HY, Kim YH, Yun KY, Yang DC** (1996) Growth and Ginsenosides production of hairy root via light energy. *Kor J Ginseng Sci* **20**(3):318-324
- Yang DC, Kang HM, Lee KS, Kim YH, Kim DC** (1997) 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**(3):143-148
- Yang DC, Kim YH, Yun KY** (1998) Effects of media and elicitor on betalain and phytolaccosides production in hairy root cultures of *Phytolacca esculenta* van Houtte. *Kor J Plant Tiss Cult* **25**(6):507-514
- Young WJ, Kim JC, Byun SY** (1993) Precursor feeding effects of alkaloid production suspension culture of *Escholtzia californica*. *Korean J Biotechnol Bioeng* **8**(5):488-494
- Yun JH, Park IS, Kim DI** (1993) Effect of various elicitors on the production of berberine in plant cell suspension cultures of *Thalictrum rugosum*. *Kor J Biotech Bioeng* **8**:390-396

(접수일자 2000년 7월 8일)