

가시오갈피 생물반응기 배양에서 질소급원이 세포생장과 이차대사 생산에 미치는 영향

안진권*, 이위영, 박소영

임업연구원 산림유전자원부 생물공학과 세포대량배양연구실

Effect of Nitrogen Source on the Cell Growth and Production of Secondary Metabolites in Bioreactor Cultures of *Eleutherococcus senticosus*

Jin-Kwon Ahn*, Wi-Young Lee, So-Young Park

Plant Biotechnology Division, Forest Genetic Resources Department, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-350, Korea

ABSTRACT The effects of inorganic nitrogen sources such as KNO_3 and NH_4NO_3 on cell growth and production of chlorogenic acid and eleutheroside E derivative were investigated in 5L bioreactor cultures of *Eleutherococcus senticosus*. The cell growth in the 1/2MS medium containing 15 mM KNO_3 reached a maximum (38.6 g fresh wt/L) which was 3.2 times higher compare to 0 mM KNO_3 . The fresh weight of cells harvested from bioreactor was affected by the concentration ratio of NO_3^- and NH_4^+ in culture medium. At the viewpoint of secondary metabolite production, the production of chlorogenic acid was affected by the concentration of NH_4^+ in the culture medium, but not by the total concentration of nitrogen sources in the culture medium. Furthermore, eleutheroside E derivative production was also affected by the concentration ratio of NO_3^- and NH_4^+ in the culture medium. Base on those results, it is suggested that cell growth and production of secondary metabolite (chlorogenic acid and eleutheroside E derivative) could be manipulated by controlling the total concentration of nitrogen sources and the concentration ratio of NO_3^- and NH_4^+ in the culture medium.

Key words: Chlorogenic acid, eleutheroside E, NO_3^- , NH_4^+ , siberian ginseng

서 론

가시오갈피 (*Eleutherococcus senticosus*)는 러시아, 중국 북부 (만주), 한국, 일본 등지에 자생하는 두릅나무과 관목으로 약효가 인삼에 비금간다고 하여 'Siberian ginseng'으로 더 잘 알려져 있는 약용식물이다 (Slacanin et al. 1991). 가시오갈피의 뿌리, 줄기 등에는 eleutheroside A (daucosterol), eleutheroside B (syringin), eleutheroside C (methyl α -D-galactoside), eleutheroside E (liriodendrin, syringaresinol di-o- β -D-glucoside), chlorogenic acid (5-caffeoylquinic acid), caffeic acid, β -

sitosterol 등과 함께 여러 종류의 약용성분이 함유되어 있다. 이 중 eleutheroside E는 흥분완화, 스트레스 억제 및 면역활성에 매우 뛰어난 물질로, chlorogenic acid는 eleutheroside E의 효과를 상승시키는 주요물질로 알려져 있다 (Ahn et al. 2000; Fujikawa et al. 1996; Slacanin et al. 1991). 가시오갈피의 종자는 극도의 미숙종자로 자연상태에서는 발아에 3년 이상이 소요되어 유전자원으로서 유용한 개체의 급속대량증식에 초점을 맞춘 연구가 수행되어 왔다 (Choi et al. 1999; Han and Choi 2003).

식물 배양체로부터 유용한 2차 대사산물을 생산하기 위한 연구는 최근까지 꾸준히 진행되고 있다 (Hulst et al. 1989; Shi and Kintzios 2003; Verpoorte et al. 1999). 근래 대용량 생물반응기를 이용해 식물세포나 조직에서 2차 대사산물을 대량으로 생산하고자 하는 연구가 보고되어 주목나무 (Son et al.

*Corresponding author Tel 031-290-1166 Fax 031-290-1020
E-mail AHNJK@foa.go.kr

1999), 인삼 (Liu and Zhong 1997; Yu et al. 2002; Zhong et al. 1999) 등의 약용식물에서 그 결과가 긍정적으로 보고된 바 있다. 그리고 배지내 무기염류 (Liu and Zhong 1997; 1998), 배양 방법 (Zhong et al. 1999), 성장조절물질 (Yu et al. 2002) 및 당 농도 (Akalezi et al. 1999) 등을 조절하여 배양체로부터 목적하는 유용물질의 생산량을 높이기 위한 연구 또한 진행되었다. 그러나 가시오갈피에 있어 기내 배양체 생육과 2차대사산물의 생산과의 관계에 관한 연구는 거의 보고된 바 없다. 이에 본 연구에서는 생물반응기를 이용한 가시오갈피의 세포배양시 KNO_3 와 NH_4NO_3 의 농도와 비가 현탁배양 세포 생육 및 chlorogenic acid와 eleutheroside E 유도체 함량에 미치는 영향을 구명하여 가시오갈피내 유용물질 생산을 위한 기초 자료로 삼고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

임업연구원 생물공학과 배양실에서 배양중인 체세포 배를 1.0 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS (Murashige and Skoog 1962)배지에서 2개월간 암배양하여 배발생 캘러스를 얻었다. 배발생

캘러스는 다시 2.0 mg/L 2,4-D와 sucrose 3% (w/v)가 첨가된 1/2MS 배지에서 15일 간격으로 계대배양하면서 생육이 왕성하고 부서지기 쉬운 캘러스를 선발하여 동종의 액체배지에서 현탁배양하였고, 증식된 현탁배양 세포를 생물반응기 배양시 실험재료로 이용하였다.

현탁배양시 배지는 멸균 전 pH를 5.7로 조정한 후 500 mL 삼각플라스크에 200 mL씩 분주하여 121°C, 1.2기압 하에서 고압증기멸균 하였다. 배양은 100 rpm 속도로, 23±1°C가 유지되는 암배양실에서 이루어졌다.

생물반응기 배양

삼각플라스크에서 현탁배양된 세포는 생물반응기 배양을 위해 11호 Watman지로 여과하여 15 g의 세포 (5 g fresh wt/L)를 3 L의 배지가 분주된 5 L 풍선형 공기부양식 생물반응기 (Balloon type air lift bioreactor)에 접종하여 0.1 vvm의 공기를 주입하면서 4주간 배양하였다 (Figure 1). 배지는 질소 원이 제거된 1/2MS 배지에 2.0 mg/L 2,4-D와 sucrose 3%를 첨가하고, KNO_3 를 0, 5, 10, 15, 20 mM로, NH_4NO_3 를 0, 5, 10, 15, 20 mM 농도로 조절하여 첨가하였다. 배양환경은 삼각플라스크 배양시와 동일하게 유지되었고, 배양 4주 후 수확된 배양세포는 생중을 측정하고 음건하여 건중을 측정한 다음

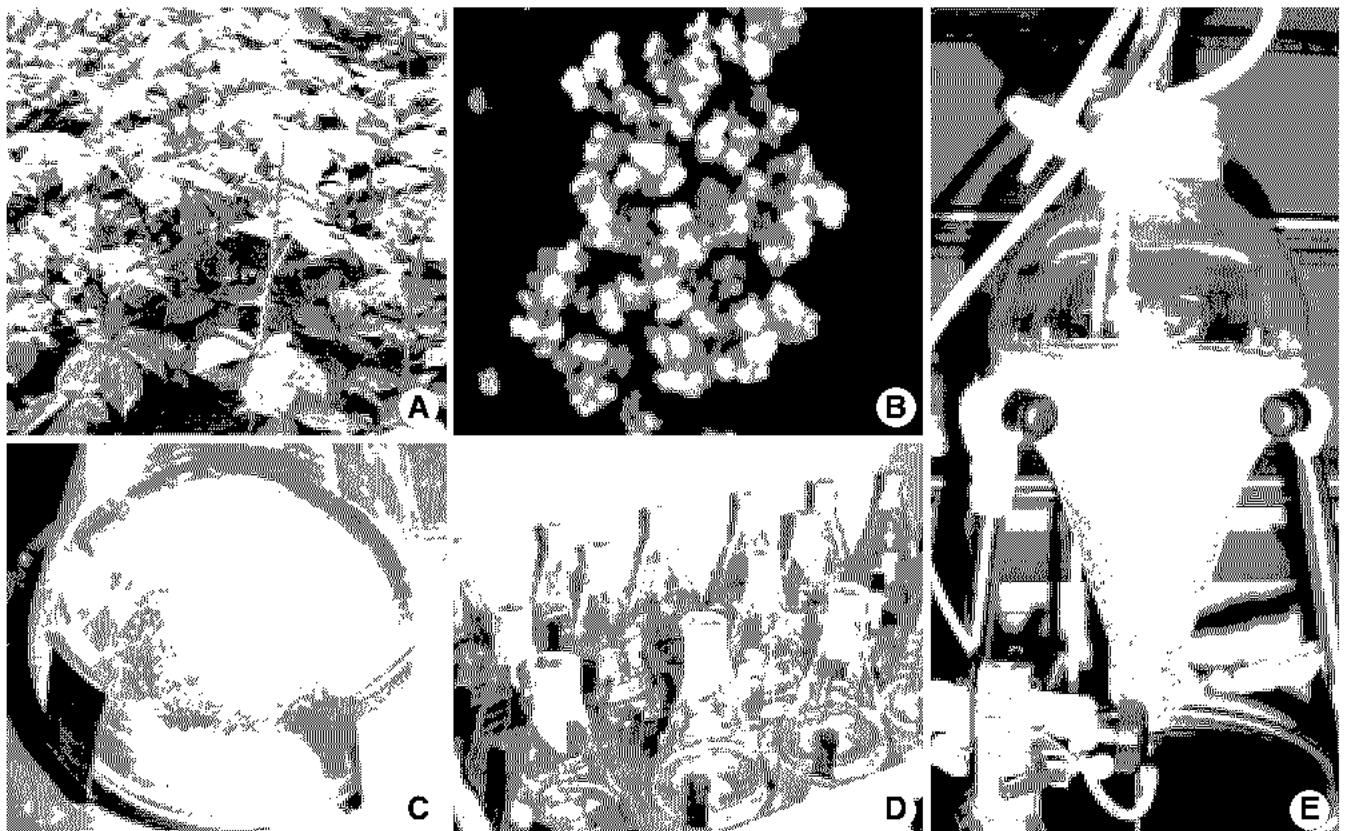


Figure 1. Cell suspension culture of *Eleutherococcus senticosus* through bioreactor. A, *Eleutherococcus senticosus* grown in field; B, Embryogenic callus cultures on MS medium containing 1.0 mg/L 2,4-D; C and D, Suspension cultures of embryogenic cells; E, Bioreactor cultures of *Eleutherococcus senticosus* cells for production of chlorogenic acid and eleutheroside E derivative.

HPLC 분석에 이용하였다.

Chlorogenic acid와 eleutheroside E 유도체 분석

분석은 Ahn 등 (2000)의 방법에 따라 시료 각 1 g씩을 가열 추출장치 (Hana Precision system, Korea)에 넣고, 40% (v/v) 메탄올 30 mL을 가한 후 80°C에서 1시간 동안 추출하였다. 추출액은 cellulose filter로 여과한 다음 냉동 건조하였다. 냉동건조된 시료분말을 메탄올과 물의 혼합용액에 녹인 후 0.2 μm membrane nylon filter로 여과한 후 냉동실에 보관, 분석에 사용하였다. 함량 분석은 HPLC (TSP operating system)에 이동상으로 acetonitrile : water (1% H₃PO₄) = 15 : 85 혼합용매, 분석용 column은 Spherisorb ODS (0.5 μm, 4.6 × 250 mm), 유속은 0.6 mL/min, injection volume은 20 μL, UV 검출기 (TSP 3000HR) 220 nm에서 분석을 시행하였다. 분석된 물질의 확인은 peak의 retention time과 PDA를 이용한 UV spectrum을 chlorogenic acid (Nakarai, Japan)와 eleutheroside E (Sigma, USA)의 표준물질과 비교하여 이루어졌고, 배양세포내 물질과 비교를 위해 산지에서 채취된 가시오갈피 나무의 뿌리와 잎도 같이 분석되었다.

결과 및 고찰

가시오갈피의 현탁배양된 세포 15 g을 KNO₃와 NH₄NO₃가

Table 1. Effect of KNO₃ concentration and the concentration ratio of NO₃⁻ and NH₄⁺ on cell growth after 4 weeks bioreactor cultures in *Eleutherococcus senticosus*.

KNO ₃ conc. (mM)	Total conc. (mM)		Cell growth		
	Total-N	NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	Inoculation (g fr. wt/L)	Fresh cells (g fr. wt/L)	Growth index
0	20	10/10 (1:1)	5	12.3	2.5
5	25	15/10 (1.5:1)	5	15.0	3.0
10	30	20/10 (2:1)	5	30.1	6.0
15	35	25/10 (2.5:1)	5	38.6	7.7
20	40	30/10 (3:1)	5	22.0	4.4

Table 2. Effect of NH₄NO₃ concentration and the concentration ratio of NO₃⁻ and NH₄⁺ on cell growth after 4 weeks bioreactor cultures in *Eleutherococcus senticosus*.

KNO ₃ conc. (mM)	Total conc. (mM)		Cell growth		
	Total-N	NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	Inoculation (g fr. wt/L)	Fresh cells (g fr. wt/L)	Growth index
0	10	10/0 (∞:0)	5	18.6	3.7
5	20	15/5 (3:1)	5	37.0	7.4
10	30	20/10 (2:1)	5	30.1	6.0
15	40	25/15 (1.7:1)	5	17.7	3.5
20	50	30/20 (1.5:1)	5	13.4	2.7

조절된 배지에서 4주간 암배양하였다. 배양 4주 후 세포 생장은 KNO₃가 15 mM 농도로 첨가된 처리구에서 최대에 이르러 KNO₃ 무첨가구에 비해서는 3.2배, MS 배지에 기본적으로 첨가되는 양인 20 mM에 비해서 1.8배, 초기 접종량 대비 7.7배 증식되었다 (Table 1). 배지내 NO₃⁻와 NH₄⁺ 비율이 1:1인 KNO₃ 무첨가구는 세포 증식률이 초기 접종량의 2.5배로 가장 낮았으나 NO₃⁻와 NH₄⁺가 MS 배지의 비율인 2:1 이상으로 KNO₃를 첨가한 처리구에서 세포 생육이 가장 활발하였다.

KNO₃ 농도를 10 mM (1/2MS 배지 수준)로 고정하고 NH₄NO₃를 농도별로 첨가한 처리구에서 세포 증식은 NH₄NO₃ 5 mM 처리구에서 초기 접종량 대비 7.4배로 최대의 생장을 보였다 (Table 2). 세포 증식률이 가장 높았던 NH₄NO₃ 5 mM 첨가구 역시 배지내 NO₃⁻와 NH₄⁺의 비율이 3:1로 MS 배지의 비율 (2:1)보다 높은 것을 알 수 있었다. 수확한 세포의 생중은 비슷했으나 건중비는 KNO₃ 15 mM 첨가구보다 총 질소농도가 낮은 NH₄NO₃ 5 mM 첨가구에서 14.9%로 높았다 (Figure 2, 3). Liu와 Zhong (1997)은 인삼 세포배양시 배지내 초기 NH₄⁺ 농도가 20 mM 이상인 경우 세포 증식이 억제되고 NO₃⁻와 NH₄⁺ 비율이 높을수록 세포 생육이 활발하다고 하였다. 이는 배지내 높은 NH₄⁺ 농도가 NH₄⁺ 대사작용과 관련 있는 glutamate 생합성 효소의 활성화에 영향을 미치고, 배지의 pH를 낮추기 때문에 세포 생장에 필수적인 특정 효소의 활성을 억제시키기 때문일 것이라고 하였다. 본 실험에서 가시오갈피 세포의 생장 역시 배지내 NO₃⁻ 농도가 NH₄⁺의 2.5~3.0배였을 때 가장 좋았으며, 건중은 NO₃⁻와 NH₄⁺가 생육에 적합한 적정비율을 유지하면서 총 질소농도를 낮추었을 때 높게 나타났다.

KNO₃와 NH₄NO₃ 농도에 따른 세포 증식과 함께 가시오갈피

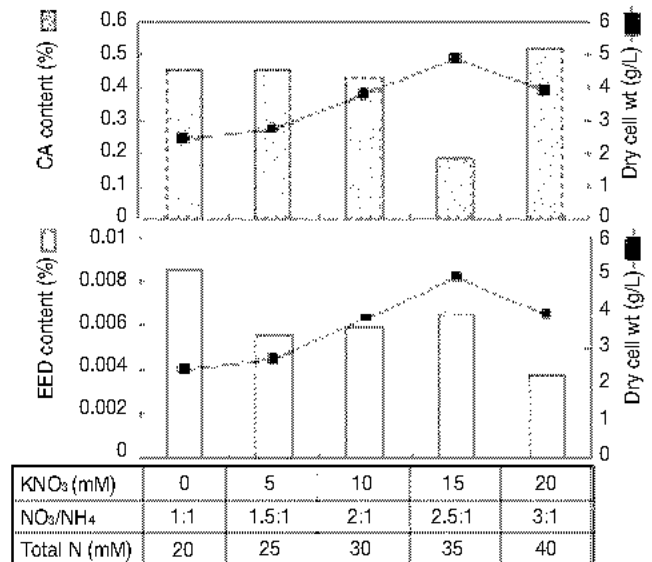


Figure 2. Effect of KNO₃ on cell growth and production of chlorogenic acid (CA) and eleutheroside E derivative (EED) after 4 weeks bioreactor cultures in *Eleutherococcus senticosus*.

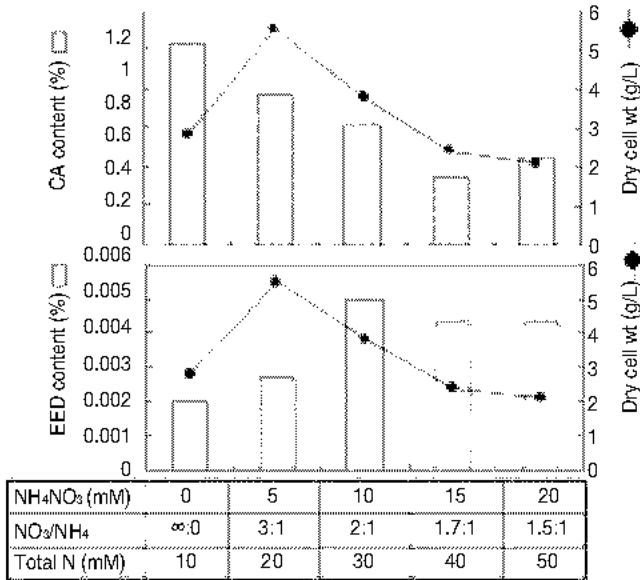


Figure 3. Effect of NH_4NO_3 on cell growth and production of chlorogenic acid (CA) and eleutheroside E derivative (EED) after 4 weeks bioreactor cultures in *Eleutherococcus senticosus*.

피의 2차대사산물인 chlorogenic acid와 eleutheroside E 유도체의 함량도 조사되었다. 세포내 chlorogenic acid의 함량은 총 질소농도와는 상관관계를 보이지 않았고, NO_3^- 의 농도에도 크게 영향을 받지 않았으나 (Figure 2) NH_4^+ 의 농도가 증가할수록 세포내 chlorogenic acid의 함량은 감소하는 경향이였다 (Figure 3).

이와 달리 eleutheroside E 유도체의 함량은 세포생장과는 크게 관계가 없었으나 배지내 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 비율이 낮은 처리구에서 비교적 높게 나타나 KNO_3 처리구 중 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 비가 1:1일 때 eleutheroside E 유도체의 함량이 높았다가 3:1인 처리구에서는 현저히 저하되었다 (Figure 2). 그리고 NH_4NO_3 처리구에서도 NH_4NO_3 를 첨가하지 않은 처리구와 NO_3^- 와 NH_4^+ 비율이 3:1인 처리구에서 낮게 나타났다가 2:1~1.5:1인 처리구에서는 다소 높게 나타났다 (Figure 3). 이와 같은 결과는 인삼 세포배양시 (Liu and Zhong 1997)에도 유사하게 나타났는데, 인삼의 2차 대사산물인 ginseng saponin 함량 역시 배지내 총 질소농도가 5~20 mM로 낮을 때 높았고 5 mM의 NO_3^- 첨가구에서 최대의 saponin 생산을 보여 NO_3^- 농도를 낮추는 것이 saponin 생산에 효과적이라 하였다. 본 실험의 가시오갈피 세포에서 eleutheroside E 유도체 함량은 총 질소농도보다는 NO_3^- 와 NH_4^+ 의 비율에 의해 더 영향을 받는 것으로 나타났다.

배지내 무기물 중 인산도 2차 대사산물 생산에 영향을 미치는 중요한 요인으로 Dedaldechamp 등 (1995)은 인산이 고갈된 배지에서 anthocynin 생합성이 증가하였고 dihydroflavonol reductase의 활성이 증가하였다고 하였다. 그러나 인산은 식물 중에 따라 상이한 결과가 보고된 바가 있어 (Badaoui et al. 1996) 가시오갈피 배양세포에 미치는 영향에 대하여는

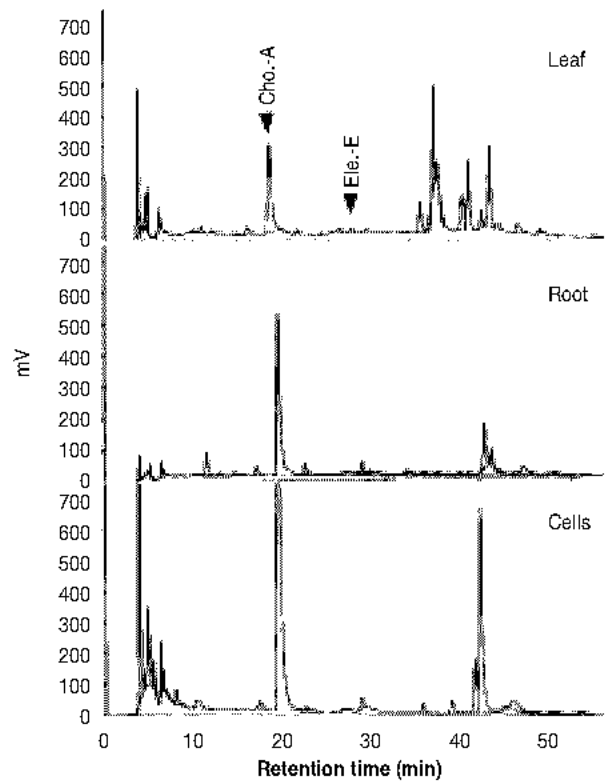


Figure 4. HPLC analysis of chlorogenic acid and eleutheroside E. Each extract from a native root and leaf of field-grown *Eleutherococcus senticosus* tree and bioreactor cultured cells of *Eleutherococcus senticosus* was analyzed by HPLC following Ahn et al. (2000).

세부적인 실험이 요구된다.

Yu 등 (2002)은 jasmonic acid에 의해 인삼 부정근에서 ginsenoside 함량이 증가되었는데 이는 jasmonic acid가 protopanaxadiol ginsenoside의 생합성에 관여하는 효소의 활성을 촉진시켰기 때문일 것이라고 하였다. 가시오갈피 세포 배양시에도 eleutheroside E와 chlorogenic acid 생합성에 관련된 효소의 탐색과 그 효소의 활성을 증가시키는 elicitor의 처리 등은 앞으로의 연구에 있어 고려되어야 할 부분들이다.

산지에서 채취한 가시오갈피 잎과 뿌리를 배양세포의 eleutheroside E와 chlorogenic acid 분석시 함께 분석하였는데 (Figure 4), 이때 주목할 만한 점은 산지에서 채취한 가시오갈피의 뿌리에서는 정확히 eleutheroside E가 분석되었다. 그러나 배양세포에서는 HPLC를 통해서 eleutheroside E와 같은 retention time을 갖는 물질이 검출되었으나 그 물질을 UV spectrum으로 다시 screening한 결과 eleutheroside E와 유사하나 다른 파장을 갖는 유도체로 판단되었다. 이는 기배양이라는 특수한 배양 환경에 의해 세포내 대사과정에 변화가 생겨 대사산물이 자연상태에서 생산되었던 것과는 다소 변형된 형태로 생합성된 듯하다. 배양세포내에서 분석된 eleutheroside E 유도체의 정확한 물질 동정과 이 유도체가 eleutheroside E와 같은 활성을 가지고 있는지에 대해서는 앞으로 좀더 심도

있는 연구가 필요하리라 생각된다.

적 요

생물반응기를 이용해 약용식물인 가시오갈피의 세포배양 시 질소원의 종류와 농도비가 세포 성장 및 chlorogenic acid 와 eleutheroside E 유도체 함량에 미치는 KNO₃와 NH₄NO₃의 영향을 조사하였다. KNO₃가 15 mM 농도로 첨가된 처리구에서 세포 증식은 최대 (38.6 g fresh wt/L)에 이르러 KNO₃ 무첨가구에 비해서는 3.2배, 초기 접종량 (5 g fresh wt/L) 대비 7.7 배 증식되었다. 수확한 세포의 생중은 첨가한 질소원에 따라 KNO₃를 첨가한 경우에는 NO₃⁻/NH₄⁺ 비율이 2.5일 때 가장 높았고, NH₄NO₃를 첨가한 경우에는 NO₃⁻/NH₄⁺ 비율이 3일 때 가장 높았다. 가시오갈피 세포내 chlorogenic acid의 함량은 총 질소농도와는 상관관계를 보이지 않았으나, NH₄⁺의 농도가 증가하면 chlorogenic acid의 세포내 축적이 감소하는 경향을 보였다. 또한 eleutheroside E 유도체의 함량도 총 질소농도 보다는 NO₃⁻와 NH₄⁺의 비율에 의해 더 영향을 받는 것으로 나타났다.

인용문헌

Ahn JK, Lee WY, Oh SJ, Park YH (2000) The contents of chlorogenic acid and eleutheroside E in *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harns. *J Kor For Soc* 89: 216-222

Akalezi CO, Liu S, Li QS, Yu JT, Zhong JJ (1999) Combined effects of initial sucrose concentration and inoculum size on cell growth and ginseng saponin production by suspension cultures of *Panax ginseng*. *Process Biochem* 34: 639-642

Badaoui H, Morard P, Henry M (1996) Stimulation of the growth and solamargine production by *Solanum paludosum* multiple shoot cultures using a new culture medium. *Plant Cell Tiss Org Cult* 45: 153-158

Choi YE, Yang DC, Yoon ES (1999) Rapid propagation of *Eleutherococcus senticosus* via direct somatic embryogenesis from explants of seedlings. *Plant Cell Tiss Org Cult* 58: 93-97

Dedaldechamp F, Uhel C, Macheix JJ (1995) Enhancement of anthocyanin synthesis and dihydroflavonol reductase (DFR) activity in response to phosphate deprivation in grape cell suspensions. *Phytochem* 40: 1357-1360

Fujikawa T, Yamaguchi A, Morita I, Takeda H, Nishibe S (1996) Protective effects of *Acanthopanax senticosus* Harns from Hokkaido and its components on gastric ulcer in restrained cold water stressed rats. *Biol Pharm Bull* 19: 1227-1230

Han JY, Choi YE (2003) Mass production of *Eleutherococcus senticosus* plants through in vitro cell culture. *Kor J Plant Biotech* 30: 167-172

Hulst AC, Meyer MMT, Breteler H, Tramper J (1989) Effect of aggregate size in cell cultures of *Tagetes patula* on thiophene production and cell growth. *Appl Microbiol Technol* 24: 308-315

Liu S, Zhong JJ (1997) Simultaneous production of ginseng saponin and polysaccharide by suspension cultures of *Panax ginseng*: Nitrogen effects. *Enzyme Microb Tech* 21: 518-524

Liu S, Zhong JJ (1998) Phosphate effect on production of ginseng saponin and polysaccharide by cell suspension cultures of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium*. *Process Biochem* 33: 69-74

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Planta* 15: 473-497

Shi HP, Kintzios S (2003) Genetic transformation of *Pueraria phaseoloides* with *Agrobacterium rhizogenes* and puerarin production in hairy roots. *Plant Cell Rep* 21: 1103-1107

Slacanin I, Marston A, Hostettmann K (1991) The isolation of *Eleutherococcus senticosus* constituents by centrifugal partition chromatography and their quantitative determination by high performance liquid chromatography. *Phytochem Analysis* 2: 137-142

Son SH, Choi SM, Choi KB, Lee YH, Lee DS, Choi MS, Park YG (1999) Selection and proliferation of rapid growing cell lines from embryo derived cell cultures of Yew tree (*Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc). *Biotechnol Bioprocess Eng* 4: 112-118

Verpoorte R, Van der Heijden R, Ten Hoopen H, Memelink J (1999) Novel approaches to improve plant secondary metabolite production. In: Fu TJ, Singh G, Curtis WR (eds) *Plant cell and tissue culture for the production of food ingredients*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA pp 85-100

Yu KW, Gao W, Hahn EJ, Paek KY (2002) Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Biochem Eng J* 11: 211-215

Zhong JJ, Chen F, Hu WW (1999) High density cultivation of *Panax notoginseng* cells in stirred bioreactors for the production of ginseng biomass and ginseng saponin. *Process Biochem* 35: 491-496

(접수일자 2003년 7월 24일, 수리일자 2003년 9월 19일)