

참당귀 현탁세포배양에 의한 면역증강성 다당 생산

¹김영화 · ²김익환 · †¹김동일

¹인하대학교 공과대학 생물공학과, ²고려대학교 생명공학원

(접수 : 2006. 4. 25., 게재승인 : 2006. 10. 19.)

Production of Immunostimulating Polysaccharide in *Angelica gigas* Nakai Suspension Cell Cultures

Young-Hwa Kim¹, Ik-Hwan Kim², and Dong-Il Kim^{1†}

¹Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

²School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

(Received : 2006. 4. 25., Accepted : 2006. 10. 19.)

Suspension cells of *Angelica gigas* Nakai were cultivated to produce extracellular polysaccharide (ECP) as immunostimulating agents. Effects of environmental conditions such as sucrose and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) concentrations on the growth and production of ECP were studied using suspension cultures of *A. gigas* Nakai. Final dry cell weight was increased with an increase of initial sucrose concentration from 30 to 60 g/L. The maximum production of ECP (1.2 g/L) was achieved at an initial sucrose concentration of 50 g/L on day 8. High 2,4-D concentration was effective for ECP production but not for cell growth. In addition, various fungal elicitors were investigated for the enhanced production of ECP in *A. gigas* suspension cultures. Among the tested fungal elicitors, *Verticillium dahliae* was the most effective for the production of ECP in *A. gigas* suspension culture.

Key Words : *Angelica gigas*, extracellular polysaccharide, elicitor, plant cells

서론

당귀는 생약명으로서 참당귀 (*Angelica gigas* Nakai)의 뿌리를 건조한 것이다. 조선당귀라고도 불리는 다년초인 참당귀 뿌리의 주성분은 pyranocoumarin계의 물질인 decursin이며, 기타 decursinol, umbelliferon, b-sitosterol 등이 포함되어 있다(1).

이차대사물질 이외에 당귀의 다당 분획성분은 여러 면역조절활성을 갖는다고 알려져 있는데, 예를 들어 항보체활성, B-lymphocyte 증식활성, interferon 생산활성 등이 보고되어 있다. 당귀의 다당류는 cetyltrim-ethylammonium bromide 분획에 의해 나눌 수 있으며, 면역증강성 분획의 구성성분으로는 당 함량이 90%로서 주성분이고, 단백질이 소량 함유되어 있지만 면역증강성과는 무관한 것으로 알려져 있다(1). 참당귀에서 얻어진 면역활성이 있는 다당은 angelan이라 칭하며 다른 다당류들과는 다른 고유의 면역

증강 기작을 보인다고 한다(2).

식물의 세포벽은 다당류, 단백질, phenolics 등으로 구성된 거대 고분자의 복합체이며 그 중 pectin, cellulose, hemicellulose 같은 다당류가 90%를 차지하고 있다. 이러한 다당류가 세포벽 내의 구조적 재배열이 일어나며 배출되는데, 이것을 세포외 다당 (extracellular polysaccharide, ECP) 이라 하며 그 기작은 수동적 확산이나 능동 수송이라고 알려져 있다(3). 천연물질 유래 다당류에는 담자균류, 진균류와 고등식물에서 많이 연구되고 있으며, 버섯의 krestin, lentinan과 인삼의 다당이 잘 알려져 있다.

식물세포배양에서 탄수화물, 특히 sucrose는 중요한 탄소원이자 에너지원이며, 초기 당 농도는 많은 종류의 세포주를 이용한 이차대사산물 생산에 영향을 미친다(4). 보통의 식물세포배양용 배지에서 sucrose는 2~3% 수준이 최적 농도이다. 높은 sucrose 농도는 식물세포의 생장과 이차대사산물의 생산을 증대시킨다(5). Kim 등(6)은 *Taxus brevifolia* 세포배양에서 배지에 평균적으로 쓰이는 2~3% 수준보다 높게 당농도를 증가시켰더니 taxol과 그와 관련된 taxanes의 생산이 증진되었다고 보고하였고, Akalezi 등(7)은 *Panax ginseng*의 배양에서 초기 접종농도를 증가시키며 함께 당농도를 증가시켰더니 saponin의 생합성이 증대되었다

† Corresponding Author : Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

Tel : +82-32-860-7515, Fax : +82-32-872-4046

E-mail : kimdi@inha.ac.kr

고 보고하였다.

또한, 식물생장조절제도 생장 및 분화에 영향을 주는 중요한 인자 중 하나이며, 식물세포배양에 의한 유용물질 생산에도 큰 영향을 미친다(8). Ikeda 등(9)은 담배세포배양에서 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)를 높은 농도로 처리하였더니 효과적으로 ubiquinone의 생산이 증진되었다고 하며, Zhong 등(10)은 *Panax quinquefolium* 세포배양에서 식물생장조절제가 ginsenoside saponin 생산에 미치는 영향을 제시하였다.

Elicitation은 배양중의 세포에 다양한 stress를 부여하여 유용물질의 생산을 증대시키는 것을 의미한다. Elicitation을 위해 첨가하는 물질을 elicitor라고 하며, 이는 생체유래의 biotic elicitor와 비생체유래의 abiotic elicitor로 구분된다. Biotic elicitor로는 glucan, glycoprotein, 저분자량의 유기산, 그리고 곰팡이의 세포벽의 물질 등을 들 수 있다. Elicitor 처리에 의한 유용물질 생산 증진의 예로는 *Arnebia euchroma* 세포배양에서 shikonin의 생산을 증진시킨 보고가 있으며(11), taxane, indole alkaloid, rosmarinic acid 등의 생산 증진도 알려져 있다(5, 12, 13).

본 연구에서는 우리나라 전통 의약식물인 참당귀의 세포배양에서 면역증강 활성을 나타낸다고 알려진 ECP의 생산을 증진시키기 위해 초기 sucrose와 2,4-D 농도의 영향을 조사하였다. 또한 biotic elicitor인 fungal elicitor를 배양 중에 첨가하여 ECP의 생산을 증진시키고자 하였다.

재료 및 방법

세포주 및 배양

참당귀 (*Angelica gigas* Nakai) 현탁세포 배양을 위한 배지로는 SH 기본배지에 30 g/L의 sucrose, 1 mg/L 2,4-D를 첨가하여 사용하였으며, 1 N NaOH로 pH를 5.8로 조절한 후 121 °C에서 가압증기 멸균하여 사용하였다. 계대배양은 6~7일 간격으로 수행하였으며, 암조건 회전식 진탕배양기에서 110 rpm, 25 °C를 유지하였다.

세포량 측정

세포의 양을 확인하기 위해서는 세포건조량 (dry cell weight, DCW)을 측정하였다. 세포를 감압 깔대기와 Toyo No. 1 거름종이를 이용하여 배지와 분리하고, 동량의 증류수로 2회 세척한 후 무게를 사전에 측정된 접시에 담아 세포생체량 (fresh cell weight, FCW)을 측정하고, 60 °C로 유지되는 건조기에서 항량이 될 때까지 수분을 제거하여 DCW를 측정하였다.

Fungal elicitor의 제조

Fusarium solani (Fs), *Verticillium dahliae* (Vd), *Rhizopus oryzae* (Ro), *Fusarium oxysporum* (Fo), *Aspergillus niger* (An) 그리고 *Trichoderma reesei* (Tr)은 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection for Type Culture, KCTC)와 한국미생물보존센터 (Korea Culture Center of Microorganism, KCCM)에서 분양받았다. 모든 fungi는 potato-dextrose broth

(Difco, USA)를 사용해 암조건 회전식 진탕배양기에서 30 °C, 200 rpm 조건으로 배양하였다. 그 후 균사체를 waring blender로 10분간 균질화한 후에 Toyo No. 1 거름종이를 사용하여 용액만을 분리한 후, 당의 농도를 glucose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid 방법으로 측정된 뒤 멸균하여 배양액에 첨가하였다.

ECP의 정량

ECP의 정량을 위해서는 분자량 1,000 짜리의 투석막 (Spectrum Medical Industries, USA)을 사용하여 탄소원을 제거한 뒤 glucose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid 방법을 사용하였다.

결과 및 고찰

당 농도의 영향

먼저 참당귀의 세포 배양에 미치는 당의 영향을 알아보기 위해 sucrose의 농도를 30, 40, 50, 60 g/L로 변화시켜 배양하였다. 세포생장의 경우 모두 6일째가 최대값을 보였는데, 60 g/L sucrose를 첨가한 경우 대조군 (14.1 g/L)에 비해 1.6배 (23.2 g/L) 증가하였다(Fig. 1). ECP의 생산은 역시 6일째 가장 높았으며, 30 g/L sucrose를 첨가한 대조군 (1.1 g/L)에 비해 50 g/L인 경우가 1.1배 (1.2 g/L) 증가하였다(Fig. 2). 따라서 당농도를 증가시킬수록 세포의 생장과 ECP 생산은 증가하는 경향을 보였는데, 이것은 고농도의 sucrose로 인한 삼투압의 증대와 배지성분 소비속도의 감소가 원인이라고 생각된다. 또한 세포의 크기를 간접적으로 비교할 수 있는 FCW/DCW (F/D ratio)를 보면, 세포의 크기가 현저히 감소하는 것을 관찰할 수 있었는데, 이것도 역시 높은 삼투압의 영향이며, 세포의 크기를 감소시켜 고농도 배양도 가능하리라 여겨진다.

2,4-D 농도의 영향

참당귀의 세포생장과 다당 생산에 미치는 2,4-D의 영향을 살펴보기 위하여 초기농도를 0, 0.1, 1, 2 mg/L로 다르게 하여 배양하였다. Fig. 3에 나타난 것과 같이 배양 6일째에 얻어지는 최대 세포농도는 2,4-D를 첨가하지 않은 경우 16.6 g/L로 1 mg/L 2,4-D를 첨가한 대조군의 14.3 g/L에 1.7배 높았다. 그러나 ECP의 생산은 2 mg/L 2,4-D를 첨가한 경우 1.0 g/L로 1 mg/L 2,4-D를 첨가한 대조군의 0.9 g/L에 비해 더 많이 생산되었다(Fig. 4). 따라서 2,4-D 농도가 높아질수록 세포의 생장은 저해되지만 ECP의 생산은 증가하는 결과를 보였다.

Fungal elicitor의 영향

대부분의 곰팡이 유래의 elicitor들은 다당류, 당단백 그리고 peptide와 함께 세포벽의 구성성분이며, 이차대사산물의 생산을 증진시키는데 사용된다. Fu 등(11)은 *Arnebia euchroma* 식물세포배양에서 *Aspergillus niger*와 *Rhizopus oryzae*를 fungal elicitor로 처리하여 shikonin의 급속한 생성과 생산량의 증가가 가능하였다고 하며, Kim 등(14)은 6

종류의 fungal elicitor를 첨가하였는데, 그 중 *Trichoderma longibrachiatum*을 처리했을 때 flavonol glycosides의 생산에 가장 효과적이었다고 한다. 이와 같은 이차대사산물 뿐만 아니라 ECP의 경우에는 세포벽을 구성하는 물질로서 식물 세포의 방어기작과 관련이 있기 때문에 elicitor의 처리에 의한 생산성 증대를 기대할 수 있다.

참당귀의 세포배양에서 ECP의 생산을 증가시키기 위하여 본 연구에서는 *Fusarium solani* (Fs), *Verticillium dahliae* (Vd), *Rhizopus oryzae* (Ro), *Fusarium oxysporum* (Fo), *Aspergillus niger* (An) 그리고 *Trichoderma reesei* (Tr)를 사용하였는데, 첨가 농도는 phenol-sulfuric method로 총당량을 측정하여 일정하게 결정하였다. 참당귀 현탁세포 8 mL을 22 mL의 배지가 들어있는 100 mL 삼각 플라스크에 접종하고 배양 4일째에 30 mg/L의 fungal elicitor를 첨가하여 배양하였다. Fig. 5에서 볼 수 있는 것과 같이 6일째의 최대값을 보이는 세포의 성장에는 큰 영향을 미치지 않았다. ECP 생산의 경우 대조군은 6일째에 0.68 g/L가 생산되었으나, elicitor를 첨가한 것은 8일째에 대부분 최대값에 도달하였으며, *Verticillium dahliae* (Vd), *Rhizopus oryzae* (Ro)와 *Aspergillus niger* (An)가 긍정적인 영향을 보였다. 그 중 *Verticillium dahliae* (Vd)를 처리했을 때가 가장 효과적이었

으며, 6일째의 대조군 (0.69 g/L)에 비해 10일째에 1.2배 (0.85 g/L)로 증가하였다(Fig. 6). 따라서 이 세 종류 elicitor들의 최적첨가 농도를 결정한다면, ECP의 생산을 더 증진시킬 수 있을 것으로 생각된다.

따라서 앞의 실험에서 가장 결과가 좋았던 *Verticillium dahliae* (Vd), *Rhizopus oryzae* (Ro)와 *Aspergillus niger* (An)를 고농도로 처리해보았다. 위와 같은 방법으로 배양을 수행하였고, 4일째에 세 종류의 fungal elicitor를 60 및 90 mg/L로 처리하였고, 첨가량이 많았던 *Verticillium dahliae* (Vd)의 대조군은 첨가량과 동량의 증류수를 멸균하여 넣어 주었으며 control 2, control 3으로 표기하였다. 배양 후 6일째 세포의 생장은 아무것도 첨가하지 않은 것에 비해 다소 저조하였다(Fig. 7). 그러나 ECP의 생산은 전체적으로 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였으며, 8일째 대조군의 0.75 g/L에 비해 *Verticillium dahliae* (Vd)를 90 mg/L 처리한 경우의 10일째 ECP 생산량이 1.19 g/L로 1.59배나 증가하였다(Fig. 8). 이와 같은 결과로, fungal elicitor의 처리는 참당귀 현탁세포배양에서 세포의 성장에는 다소 저해를 주지만, 반대로 ECP의 생산에는 상당히 효과적이라고 판단된다.

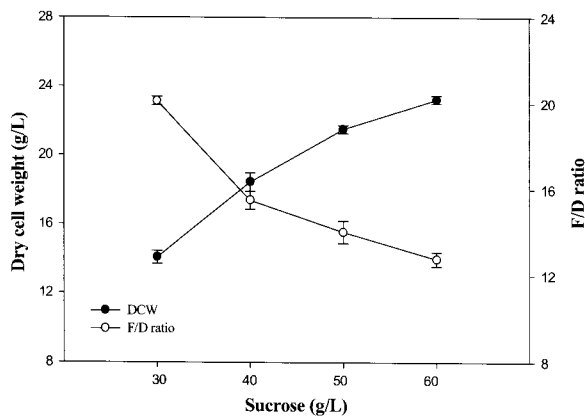


Figure 1. Effect of initial sucrose concentration on cell growth and cell size index (F/D ratio) in *A. gigas* cell suspension cultures.

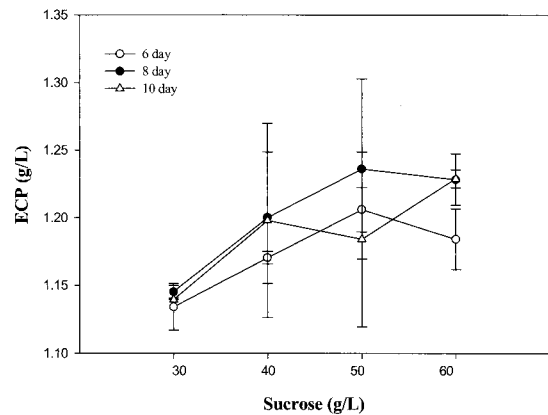


Figure 2. Effect of initial sucrose concentration on ECP production.

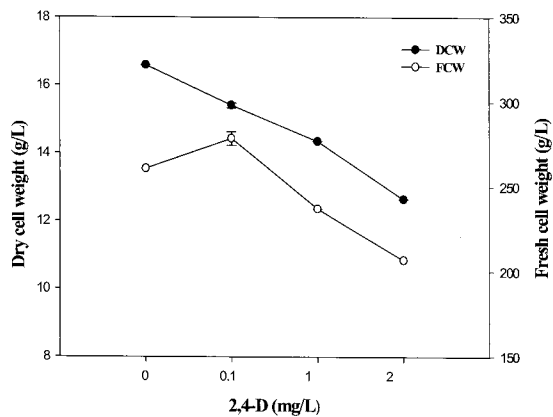


Figure 3. Effect of initial 2,4-D concentration on *A. gigas* cell growth.

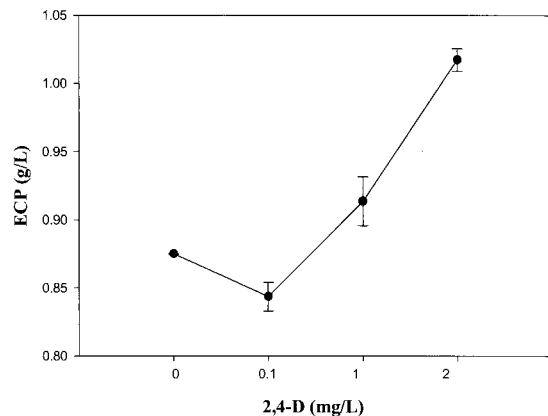


Figure 4. Effect of initial 2,4-D concentration on ECP production.

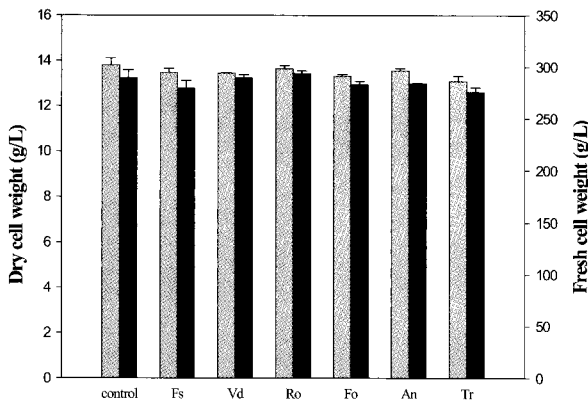


Figure 5. Effect of fungal elicitors on *A. gigas* cell growth: Fs, *Fusarium solani*; Vd, *Verticillium dahliae*; Ro, *Rhizopus oryzae*; Fo, *Fusarium oxysporum*; An, *Aspergillus niger*; Tr, *Trichoderma reesei*. All fungal elicitors at 30 mg/L were added.

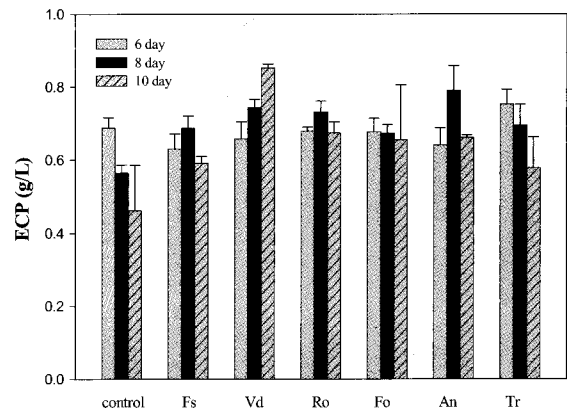


Figure 6. Effect of fungal elicitors on ECP production in *A. gigas* cell suspension culture: Fs, *Fusarium solani*; Vd, *Verticillium dahliae*; Ro, *Rhizopus oryzae*; Fo, *Fusarium oxysporum*; An, *Aspergillus niger*; Tr, *Trichoderma reesei*. All fungal elicitors at 30 mg/L were added.

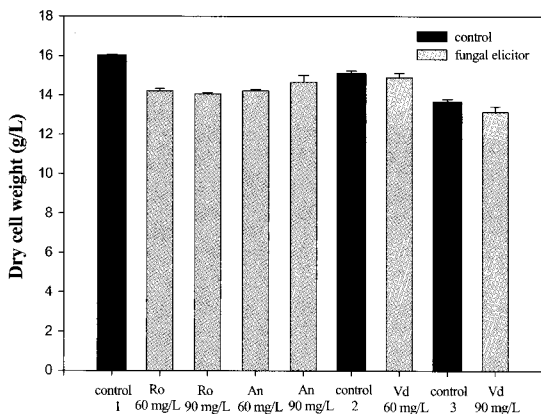


Figure 7. Effect of high concentration of fungal elicitors on *A. gigas* cell growth.

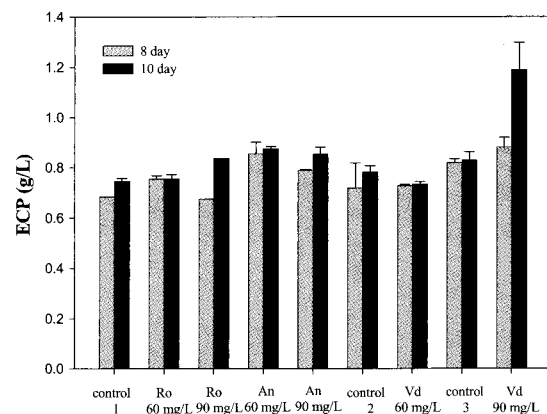


Figure 8. Effect of high concentration of fungal elicitors on ECP production in *A. gigas* cell suspension culture.

요 약

참당귀 (*Angelica gigas* Nakai) 현탁세포의 면적 증강성 다당의 생산을 증진시키기 위하여 초기 당농도와 성장조절제인 2,4-D의 농도를 변화시켰다. 당의 농도를 높일수록 세포의 성장과 ECP의 생산은 각각 1.6배, 1.1배 증가하여 효과적이었다. 2,4-D는 첨가하지 않은 것이 세포의 생장이 대조군에 비해 1.2배 높았지만, ECP의 생산의 경우 2 mg/L 2,4-D를 첨가한 경우 대조군에 비해 10% 이상 더 생산되었다. 또한 배양 중 여러 가지의 elicitor를 첨가함으로써 ECP의 생산을 증진시키기 위하여 fungal elicitor들을 처리한 결과 *Verticillium dahliae* 90 mg/L을 배양 4일째에 처리한 경우 세포의 성장을 다소 저해시킨 반면, ECP 생산량이 1.7배나 증가함을 확인하였다.

감 사

본 연구는 인하대학교 초정밀생물분리기술연구센터 (ERC)의 연구비 지원에 의해서 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Ahn, K. S. (1996), A study on the anticancer and immunostimulation agents from the root of *Angelica gigas* Nakai, Ph.D. Dissertation, Dept. of Biology, Korea University, Seoul.
- Han, S. B., Y. H. Kim, C. W. Lee, S. M. Park, H. Y. Lee, K. S. Ahn, I.-H. Kim, and H. M. Kim (1998), Characteristic immunostimulation by angelan isolated from *Angelica gigas* Nakai, *Immunopharmacology* **40**, 39-48.
- Endress, E. (1994), *Plant Cell Biotechnology*, Springer-Verlag, Berlin.
- Zhang, Y.-H., J.-J. Zhong, and J.-T. Yu (1996), Enhancement of ginseng saponin production in suspension cultures of *Panax notoginseng*: Manipulation of medium sucrose, *J. Biotechnol.* **51**, 49-56.
- Dong, H.-D. and J.-J. Zhong (2002), Enhanced taxane productivity in bioreactor cultivation of *Taxus chinensis* cells by combining elicitation, sucrose feeding and ethylene incorporation, *Enzyme Microb. Technol.* **31**, 116-121.
- Kim, J. H., J. H. Yun, Y. S. Hwang, S. Y. Byun, and D.-I. Kim (1995), Production of taxol and related taxanes in *Taxus brevifolia* cell cultures: effect of sugar, *Biotechnol. Lett.* **19**, 101-106.
- Akalezi, C. O., S. Liu, Q. S. Li, J. T. Yu, and J.-J. Zhong (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.
8. El-Sayed, M. and R. Verpoorte (2002), Effect of phytohormone on growth and alkaloid accumulation by a *Catharanthus roseus* cell suspension cultures fed with alkaloid precursors tryptamine and loganin, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **68**, 265-270.
 9. Ikeda, T., T. Matsumoto, and M. Noguchi (1978), Effect of auxins on the formation of ubiquinone by tobacco plant cells in suspension culture, *Phytochemistry* **27**, 1879-1883.
 10. Zhong, J.-J., Y. Bai, and S.-J. Wang (1996), Effects of plant growth regulators on cell growth and ginsenoside saponin production by suspension cultures of *Panax quinquefolium*, *J. Biotechnol.* **45**, 227-234.
 11. Fu, X. Q. and D. W. Lu (1999), Stimulation of shikonin production by combined fungal elicitation and in situ extraction in suspension cultures of *Arnebia euchroma*, *Enzyme Microb. Technol.* **24**, 243-246.
 12. Zhao, J., W.-H. Zhu, and Q. Hu (2001). Selection of fungal elicitors to increase indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* suspension cell cultures, *Enzyme Microb. Technol.* **28**, 666-672.
 13. Szabo, E., A. Thelen, and M. Petersen (1999), Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*, *Plant Cell Rep.* **18**, 485-489.
 14. Kim, M. S., C. Kim, D. H. Jo, and Y. W. Ryu (1999), Effect of fungal elicitor and heavy metals on the production of flavonol glycosides in cell culture of *Ginkgo biloba*, *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 661-667.