

## 베트남 인삼세포 현탁 배양에서 잔류 독성 식물호르몬 제거

<sup>1</sup>이 승 호 · 김 남 혁 · 김 기 현 · <sup>2</sup>Le Bach Quang · <sup>2</sup>Hoang Van Luong · † 변 상 요  
<sup>1</sup>풀무원건강생활(주), <sup>2</sup>베트남 국방의과대학, 아주대학교 대학원 분자과학기술학과  
(접수 : 2008. 3. 20., 게재승인 : 2008. 4. 13.)

## Removal of Residual Toxic Phytohormone in Suspension Cultures of *Panax vietnamensis*

Seung Ho Lee<sup>1</sup>, Nam Hyuck Kim, Ki Hyun Kim, Le Bach Quang<sup>2</sup>, Hoang Van Luong<sup>2</sup>, and Sang Yo Byun†  
<sup>1</sup>Pulmuone Health & Living Co., Ltd., <sup>2</sup>Vietnamese Military Medical University,  
Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon 443-749, Korea,  
(Received : 2008. 3. 20., Accepted : 2008. 4. 13.)

Studies were made to remove the toxic phytohormone, 2,4-D, in suspension cultures of *Panax vietnamensis*. Cells grown in normal MS medium with 2,4-D were inoculated and grown in the MS medium without hormone. Not a big difference was observed in growth characteristics between media with and without 2,4-D. The 2,4-D in the culture, however, was completely removed. During the culture, the residual 2,4-D was consumed rapidly at the early growth stage. The intra-cellular 2,4-D was consumed first and the 2,4-D in the medium was used afterward.

**Key Words** : *Panax vietnamensis*, 2,4-D, toxic phytohormone, suspension culture

### 서 론

식물세포배양은 여러 장점을 가지고 있어 1980년대 초부터 상업화를 위한 많은 노력이 지속되고 있다(1-3). 상업화를 위하여 극복해야 할 요소가 많이 있었지만, 그 중 배양 후 잔류하는 독성 식물호르몬이 의약품 또는 식품 개발 등과 같은 상업적 활용에 항상 장애 요인이었다. 일반적으로 식물세포배양에서 가장 많이 적용되는 식물호르몬은 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)와 kinetin 이다. 이 중 2,4-D는 최초 유기성 제초제로 개발되어 1940년대 후반부터 수중이나 육상, 전 범위에서 다양한 제초제로 널리 활용되어 오고 있다. 그것은 잎이 넓은 담배식물에 매우 효과적이고 잔디, 정원, 농작물, 임업과 전쟁의 고엽제에서 목초지의 잡초제거 등 여러 분야에서 두루 적용되어 왔다. 또한 2,4-D는 성장호르몬인 auxin의 한 종류로서 지난 수십 년간 농업분야에서 사용되어 왔다. 이 화합물은 월남전에서 고엽제인 Agent Orange로써 대량으로 살포되어 사용되었다. 그 이후 2,4-D 자체가 지닌 독성 뿐 아니라 지속성으

로 암과 돌연변이의 원인물질로 인체에 직접적인 피해를 미치는 것으로 밝혀지면서 미국 및 여러 나라에서 이 화합물의 사용에 제한을 가하고 있다(4).

2,4-D는 염소계 방향족 화합물로서 비염소계 화합물들에 비해 화학적으로나 미생물학적으로 분해가 쉽지 않다. 또한 그 화학적 독성이 강할 뿐 아니라 이 화합물의 무분별한 사용은 생태계에 환경오염원으로 작용할 수 있다. 2,4-D는 수중 환경에서도 연속적으로 방출됨으로서 환경에 누적되고 오염을 발생시켜 고유의 생물체에 위협을 주며, 생태의 먹이 사슬에 의해 최종 포식자인 인체에 고농도로 축적되어 각종 암, 기형출산, 만성기관지염, 자궁내막증, 면역체계교란 등을 유발시킨다. 2,4-D가 인간에 노출되면 모든 기관의 급성 출혈을 일으키고 신경절에서 중심신경계의 세포를 변질시키며 Hodkins disease의 원인이 되며, 또한 2,4-D는 인간의 부드러운 조직에 육종 (sarcoma)을 일으키고 악성 임파종 (lymphoma)을 일으키는 발암물질로 알려져 있다(5).

배양 식물세포를 상업적으로 활용하기 위해서는 이 유해한 식물호르몬인 2,4-D가 배제되어야 한다. 하지만 2,4-D는 세포 배양 과정상 켈러스 세포를 유지하고 기관으로 분화를 억제하는 역할을 하기 때문에 처음부터 이 호르몬을 배제한 상태로 배양하기 힘들다. 또한 수확한 세포에서 물리적 또는 화학적 방법으로 잔존하는 2,4-D를 완전히 제거하기도 쉽지 않다.

본 연구에서는 세포배양 과정 상 2,4-D는 필수적이지만,

† Corresponding Author : Department of Molecular Science & Technology, Ajou University, Suwon, Gyunggi 443-749, Korea  
Tel : +82-31-219-2451, Fax : +82-31-219-1610  
E-mail : sybyun@ajou.ac.kr

세포 성장 과정에서 exponential growth phase를 지난 stationary phase에서는 2,4-D가 대사과정에서 큰 역할을 하지 않는다는 점에 착안하여 이를 제거하고자 한다. Exponential growth phase를 지난 배양 세포를 2,4-D가 존재하지 않는 배지에 한두 차례 계대 배양을 하면서 이전 배양 환경에 남아있던 2,4-D를 대사과정 중에 자체적으로 소모하도록 하여 자연적으로 완전히 제거되도록 하는 연구를 수행하였다. 연구에 적용한 식물세포는 베트남 Ngoc Linh 산에 자연 서식하는 베트남 인삼 (*Panax vietnamensis*) 현탁 배양 세포를 이용하였다. 베트남의 경우 2,4-D 고엽제에 대한 피해의식이 크기 때문에 2,4-D를 세포배양에 적용하는 것조차 부정적이기에 베트남 인삼을 대상으로 식물세포배양 후 잔존하는 2,4-D 제거 연구를 수행하게 되었다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 캘러스 (Callus) 유도

본 연구에 사용된 *Panax vietnamensis* 세포는 베트남 Ngoc Linh 산에서 채취된 15년 내외로 추정되는 인삼이며 이를 이용하여 캘러스를 유도한 뒤 현탁 배양하여 사용하였다. 캘러스 유도를 위한 기본 배양 조건은 다음과 같다. MS 기본배지(6)에 탄소원으로서 sucrose 3%, pH 5.8, agar 0.7%의 고체배지에 표면 살균된 인삼 시료를 무균상태로 치상하였다. 이때 식물생장조절제로서 2,4-D와 kinetin을 사용하였고, 이들을 각각 1-5 ppm, 0.1-1 ppm의 농도 범위 내에서 다양한 농도 조합으로 캘러스 유도를 시도하였다. 이때 캘러스 유도 효율이 가장 우수하였던 식물생장 호르몬 농도는 2,4-D와 kinetin을 각각 1 ppm, 0.1 ppm이었다. 그리고 25°C, 암 조건에서 배양하였다.

### 현탁배양 (Suspension Culture) 조건

유도된 인삼 캘러스를 MS 기본배지의 탄소원은 sucrose 3%, pH 5.8, 2,4-D 1 ppm, kinetin 0.1 ppm인 액체배지에 접종하여 현탁 배양을 유도하였다. 유도된 현탁 배양세포는 500 mL 삼각플라스크에서 200 mL 배양부피를 유지하며 10일 간격으로 25°C, 암 조건하에서 계대 배양하였고, 회분배양 실험에 사용하였다.

### 회분배양 (Batch Culture) 실험 조건

삼각플라스크에서의 회분배양 실험에 사용된 현탁세포는 대수성장기 상태에 있는 것을 사용하였다. 무균대에서 Whatman No. 1의 여과지가 들어있는 멸균된 funnel을 사용하여 진공펌프에 의해 현탁세포의 배지가 제거되었고, 여과되고 남은 세포들을 고르게 섞어 준 후 40 mL 배지가 들어있는 125 mL 삼각플라스크에 15% (w/v)의 접종량으로 접종하였다. 회분배양 온도 조건은 25°C, 진탕기의 회전속도는 120 rpm, 암 조건으로 유지하며, 모든 실험은 2 반복으로 수행하였다.

### 세포성장 측정

배양된 세포의 세포량은 fresh cell weight (FCW)와 dry

cell weight (DCW)로 측정되었다. FCW는 배양된 세포를 Whatman No. 1의 여과지를 사용하여 수분을 제거한 후, 남은 세포의 무게를 저울로 측정하여 얻었고, DCW는 용기의 무게가 미리 측정된 falcone tube에 fresh cell을 넣고, deep freezer에서 -70°C로 얼린 후, 동결건조기에서 건조하여 세포내 수분을 완전히 제거한 후, 세포의 건조량을 측정하여 얻었다. 그리고 모든 세포량의 단위는 g/L로 환산하여 나타내었다.

### 2,4-D 분석

인삼 세포 내 2,4-D 분석을 위하여 건조 세포를 0.5 g을 취하여 70% 에탄올을 15 ml 가하여 2 시간 동안 60°C에서 환류 추출하고, 추출액을 Whatman No. 1 filter paper로 여과시켰다. 여과액을 다시 모아 부피를 측정하고 이것을 다시 0.2 µm membrane filter로 여과한 뒤 HPLC로 분석하였다. 배양 배지의 2,4-D 농도는 배양액을 Whatman No. 1 filter로 여과한 후 다시 0.2 µm membrane filter로 여과하여 HPLC로 분석하였다.

2,4-D는 Oh & Tuovinen의 방법 (7)에 의해 HPLC로 분석하였다. 분석용 칼럼은 C-18 (Vydac ODS 250×4.6 mm)을 사용하였다. Flow rate 1.8 ml/min 이었고, UV detector 229 nm에서 검출하였다. Mobile phase는 isocratic 조건으로, phosphate buffer와 acetonitrile을 3:2 비율로 혼합하여 0.45 µm membrane filter로 여과 후 사용하였다. Phosphate buffer는 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6g을 진한 인산 3 ml에 녹인 후 3차 증류수로 1 리터 되게 만들어 사용하였다.

## 결과 및 고찰

2,4-D 제거를 위한 현탁 세포배양은 정상적으로 배양된 exponential growth phase 말기 세포를 이용하였다. 멸균된 Whatman No. 1 filter paper를 이용하여 여과된 세포를 멸균수로 3회 세척하여 세포 외부의 잔류 2,4-D를 최대한 제거하였다. 세척된 세포는 10% (w/v) 농도로 무호르몬 액체배지에 접종하여 현탁 배양하였다. 여기에 사용된 무호르몬 액체 배지는 2,4-D와 kinetin을 첨가하지 않은 MS 배지에 sucrose 3%만 첨가되었다.

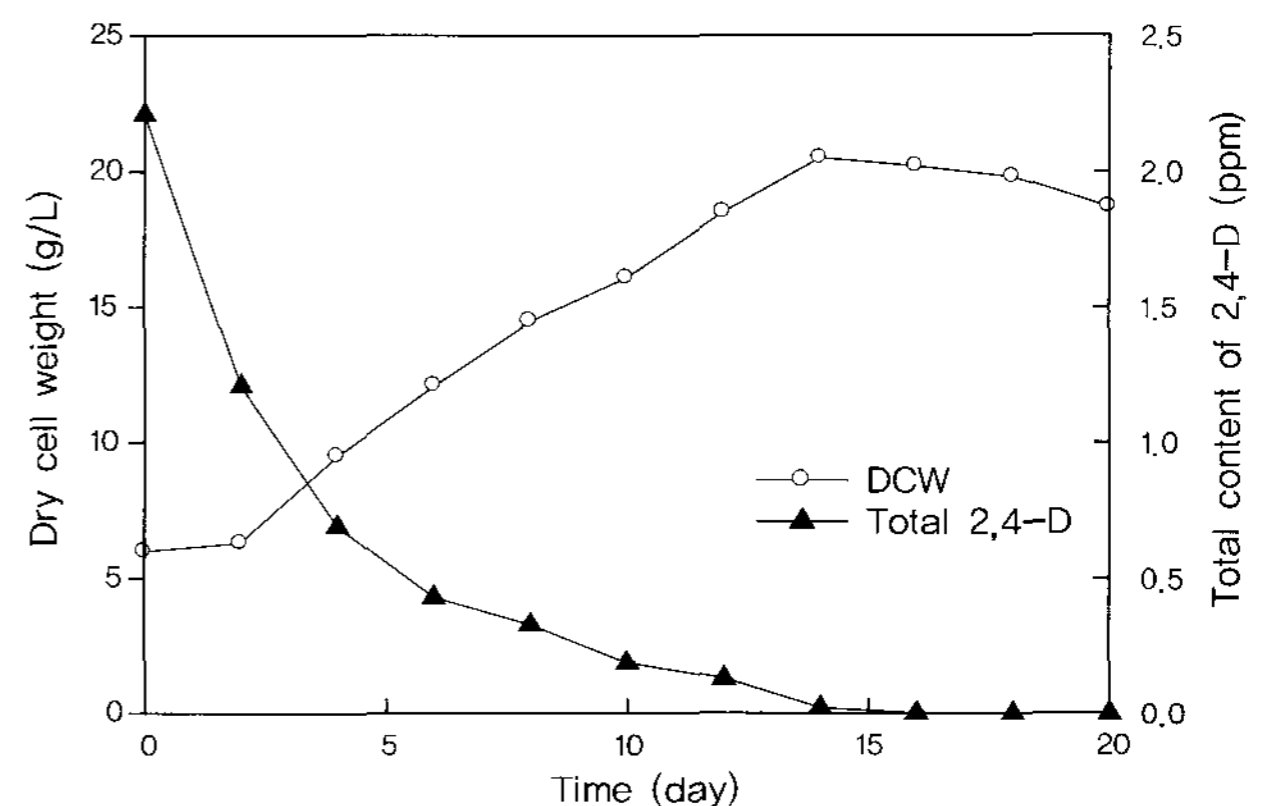
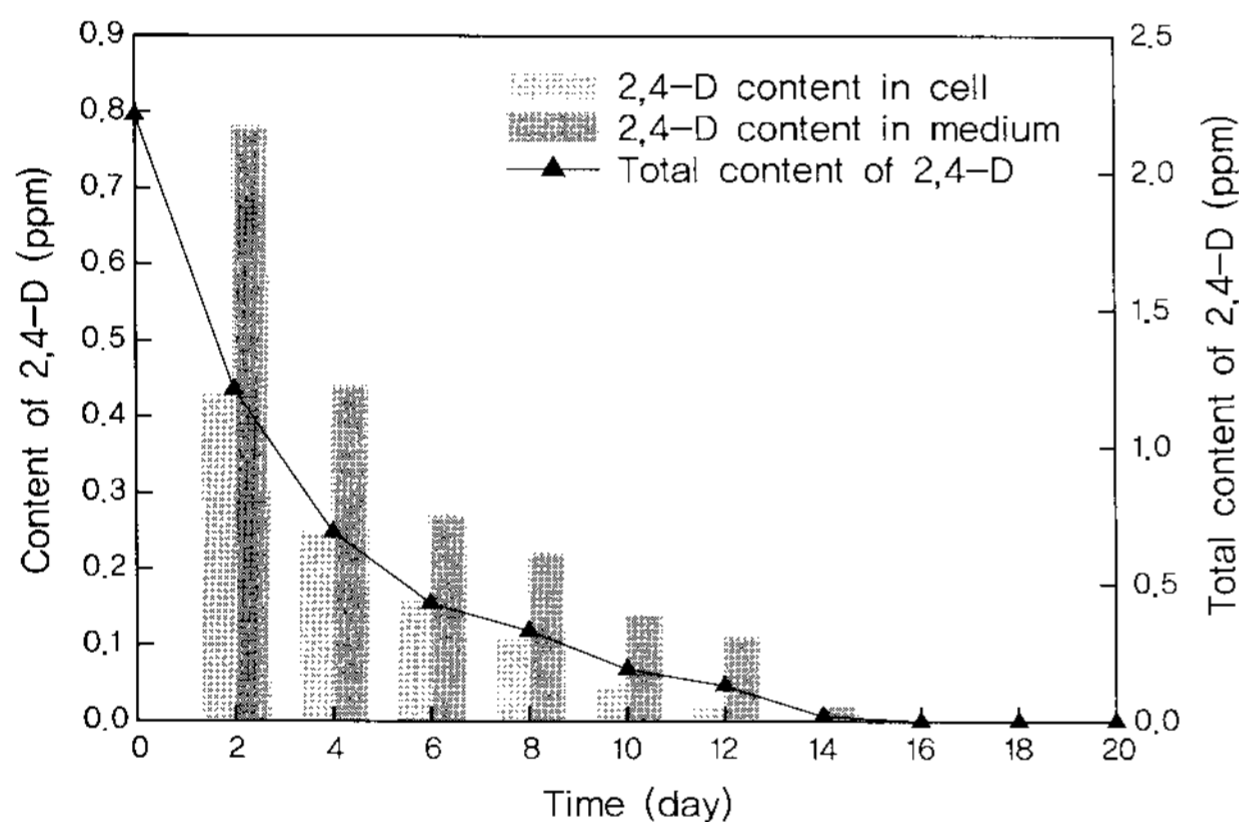


Figure 1. Time course behaviors of cell growth and 2,4-D consumption in suspension cultures of *Panax vietnamensis*.

2,4-D를 첨가하지 않은 무호르몬 배지에서 베트남 인삼 세포를 배양한 결과, 세포의 성장성은 기존 호르몬이 첨가된 배지에서 배양한 결과와 비교해 볼 때, 유의적인 차이는 없었다. 이는 무호르몬 배지에서 배양하였지만 이미 세포 속에 존재하던 호르몬의 영향으로 성장성에는 큰 영향을 미치지 않은 것으로 판단된다. 하지만 배양 중 호르몬 2,4-D의 농도는 배양 초기에 급격한 감소를 보였으며, 시간이 지나면서 점차적으로 감소하면서 stationary phase에서 완전히 없어지는 결과를 보였다(Fig. 1). 또한 베트남 인삼의 회분식 현탁 배양 결과 세포의 성장 특성은 고려인삼과 유사한 결과를 보였다(8).

2,4-D 농도를 세포와 배지, 즉 세포 내부와 외부로 구분하여 배양 중 분석한 결과, 세포와 배지에서 각각 2,4-D가 검출되었다. 배양 초기에는 배지의 2,4-D가 전체 함량의 60% 정도로 존재하였지만, 시간이 경과함에 따라 이 비율은 증가함을 알 수 있었다(Fig. 2). 배양 12일 이후 이 비율은 80% 까지 증가하였고, 배양 14일에는 세포 내부의 2,4-D는 더 이상 검출되지 않았다. 하지만 배지에는 소량 남아 있어 상기 배양에서 2,4-D는 세포에 의하여 소비됨을 알 수 있었다. 배양 16일 쯤은 2,4-D가 검출되지 않아 완전히 제거됨을 알 수 있었다.



**Figure 2.** Time course behaviors of intra and extra-cellular 2,4-D consumption in suspension cultures of *Panax vietnamensis*.

상기 배양에서 2,4-D의 기능을 정확하게 알 수는 없지만, 배양 세포에 의하여 2,4-D가 소모됨을 확인할 수는 있었다. 일반적으로 2,4-D는 식물호르몬 오옥신으로서 세포의 성장을 촉진하는 물질로 알려져 있다. 매우 적은 농도로 세포 성장에 중요한 역할을 하는 호르몬의 특성은 이미 인지되고 있었지만 세포에 의하여 소비되는 특성은 잘 알려져 있지 않았었다. 하지만 본 연구를 통하여 무호르몬 배지에서도 세포 내부에 잔류하던 2,4-D의 존재만으로 세포 성장이 정상배지와 유사하게 이루어짐을 알 수 있었고, 잔류 2,4-D는 세포 성장과 함께 세포에 의하여 소비되어 완전히 제거될 수 있음을 알 수 있었다. 이러한 연구 결과는 2,4-D를 포함하는 배지에서 정상 세포 배양 후, 간단하게 무호르몬 배지를 이용하여 잔류 2,4-D도 충분히 제거되는 결과를 제시함으로써, 그간 잔류 독성 식물호르몬이 장애 요인으로 작용하였던 식물세포배양의 산업적 활용에 크게 기여할 것으로 여겨진다.

## 요 약

베트남 인삼 세포를 이용하여 독성 식물호르몬인 2,4-D를 제거하는 연구를 수행하였다. 2,4-D를 함유하는 정상 MS 배지에서 배양된 세포를 세척한 후, 2,4-D가 없는 무호르몬 배지에서 배양한 결과 세포의 성장성은 유지되었지만 2,4-D는 완전히 제거되었다. 잔류 2,4-D는 세포 내 외부에 존재하면서 배양과 함께 세포에 의하여 소비되었는데, 배양 초기에 급격하게 소비됨을 알 수 있었다. 또한 배양 중 배지의 2,4-D 보다 세포 내 2,4-D가 먼저 소비됨을 알 수 있었다.

## 감 사

본 연구는 국제과학기술협력재단의 한-베트남협력기반조성사업에 의해 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Curtin, M. E. (1983), Harvesting Profitable Products from Plant Tissue Culture, *Bio/Technology* **1**, 649-657.
2. Yoo, B. S., W. J. Moon, J. Kim, D. I. Kim, and S. Y. Byun (1998), Studies on the Production of (10-Deacetyl) Baccatin III in Cell Cultures of *Taxus baccata* Pendula, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **13**(2), 174-180.
3. Jianyong, W and J. J. Zhong (1999), Production of Ginseng and its Bioactive Components in Plant Cell Culture: Current Technological and Applied Aspects, *Journal of Biotechnology* **68**, 89-99.
4. Ghosal, D., I. S. You, D. K. Chatterjee, and A. M. Chakrabarty (1985), Microbial Degradation of Halogenated Compounds, *Science* **228**, 135-138.
5. Paulino, C. A., J. L. Guerra, G. H. Oliveira, and P. J. Acute (1996), Subchronic and Chronic 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) Intoxication in Rats, *Vet Hum Toxicol.* **38**(5), 348-352.
6. Murashige, T. and F. Skoog (1962), A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures, *Physiol. Plant* **15**, 473-497.
7. Oh, K. H. and O. H. Touvinen (1991), Detection and Identification of Substituted Phenol as Intermediates of Cocurrent Bacterial Degradation of the Phenoxy Herbicides MCPP and 2,4-D, *FEMS Microbiol. Lett.* **79**, 141-146.
8. Yoo, B. S. and S. Y. Byun (2001), Characteristics of Batch Cultures and Effects of Various Elicitors on Ginsenoside Production in Suspension Cultures of *Panax ginseng* C.A. Meyer, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**(6), 620-625.