

## 기포 생물반응기에서 페퍼민트 세포의 생육 및 정유 생산 특성

송은범·이형주

서울대학교 식품공학과, 농업생물신소재연구센터

### Characteristics of Growth and Oil Production of Peppermint Cells in an Air-bubble Bioreactor

Eun Bum Song and Hyong Joo Lee\*

Department of Food Science and Technology, Research Center for New-Biomaterials in Agriculture, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

#### ABSTRACT

To investigate the characteristics of growth and oil production of peppermint cells during a batch culture, cells derived from peppermint callus was cultivated in an air bubble reactor. During the batch culture, effects of inoculum size, abiotic stress, yeast elicitor, and two stage culture on the cell growth, the productivity of oleolesin, and the formation of flavor components were determined and also the sugar concentrations and kinetics of cell growth were analyzed. Among the various sizes of inoculum, the culture with 2.0% packed cell volume inoculum showed the optimum condition for cell growth in the proposed bioreactor, and the cell yield and essential oil production reached to 5.8g/ℓ and 0.109g/ℓ, respectively. When the abiotic stress of daily 8hr dark and 10°C cold treatments were given to the culture, cell growth decreased but essential oil production increased to 0.546g/ℓ. In a modified Lin-Staba medium in which 100mg/ℓ yeast extract as an elicitor was added to the culture, the cell growth and oil production increased, and menthol content was 22.5% of oil. In the two stage culture, in which the basic culture conditions of 27°C, light, and without elicitor were employed during the first six days followed by the second stage with daily 8hr treatment of cold and dark condition, and also with yeast extract as an elicitor, cell growth decreased after eight days, essential oil production was not increased, and menthol was not detected. Dry cell yield was 0.38 g dry cell/g sugar and specific growth rate was 0.25 day<sup>-1</sup>. The major terpenoid in the oil was not the menthol but pulegone and piperitone, precursors of menthol were accumulated. However, when yeast elicitor was added, menthol was produced to the level of 22.5% which was the highest value in the peppermint cell culture reported so far.

#### 서론

식물은 식품의 주요 공급원으로서 뿐만 아니라 의약품, 풍미료, 농약, 색소, 향료 등 중요한 유용물질을 생산하기 위한 원료로서 이용되어왔다(1). 식물에서 유래된 이들 유용물질은 대부분 2차 대사산물

로 특정 성분을 많이 함유하는 식물을 농업적으로 재배한 다음 식물체로부터 특정물질을 추출하여 생산해 왔으나, 최근 생물공학적인 기술이 발전함에 따라 이들 2차 대사산물을 식물세포 배양에 의해 생산하려는 시도가 여러모로 이루어지고 있다.

유용물질의 생산을 위한 식물세포의 대량배양 방

법은 1950년대 말, Carboy system(2) 등으로 운용된 이래 여러 가지 형태의 회분배양, 반연속식 또는 연속식 현탁배양, 연속 유동배양 및 고정화배양 방법 등으로 발전되어왔다. 생물반응기를 이용하는 세포의 회분배양은 플라스크를 사용하는 현탁배양과는 달리 생육에 대한 통기량, 용존 산소량, 그리고 2차 대사산물 생성 kinetics 형태와 같은 조건에 영향을 많이 받으며 식물세포는 미생물과 다른 독특한 특징을 가지고 있기 때문에 미생물의 배양 특성과도 상당한 차이를 나타내는 것으로 알려져 있다(3-5).

식물세포의 대량배양에 의하여 2차 대사산물을 생산한 경우는 그다지 많지 않은데, *Canthranthus roseus*를 회분배양하여 indole alkaloids를 생산한 보고들이 비교적 많았으며(6-8) *Digitalis lanta*의 회분배양에 의해  $\beta$ -methyl digitoxin을  $\beta$ -methyl digitoxin으로 변환시키려고 시도한 경우와(9, 10) *Nicotiana tabacum*의 연속배양에 의한 phenolics 생산(11), 그리고 *Dioscorea deltoidea*의 연속배양에 의하여 diosgenin 생산에 관한 보고가 있었다(12).

식물에 의해 생산되는 여러 풍미료 중 박하에서 생산되는 방향정유는 향료, 식품이나 음료에서의 풍미료, 의약품 등에 널리 이용되고 있는데 이것의 주요 구성성분인 monoterpenoids를 세포배양 방법에 의하여 생산하려는 시도는 많이 있었다(13). Lin과 Staba(14), Becker(15)는 *Mentha sp.*의 캘러스를 배양하였으나 monoterpenoids를 생산하지 못하였고 Bricout와 Paupardin(16)는 *Mentha piperita*의 캘러스 배양에서 박하정유를 생산하였으나 식물체로부터 얻은 monoterpenoids 성분과는 조성이 달랐다. 또한 Bricout 등(17)은 여러종의 박하캘러스를 배양한 결과 monoterpenoids가 소량 생산됨을 보고하였고 Kireeva 등(18)은 *M. piperita*의 캘러스를 배양하여 monoterpenoids를 생산하였는데 미량이나마 식물체의 정유 주성분과 같은 조성을 얻었다. 또한 김(19)은 페퍼민트 세포를 플라스크 내에서 현탁배양하였을 때 1ℓ 당 최고 528 mg의 정유가 생성됨을 보고하였으며 monoterpenoids의 주성분인 menthol의 함량은 19.6%로써 Kireeva 등(18)의 10%에 비해 크게 증가하였다고 보고한 바 있다. 식물세포 배양에 의해 박하정유를 생산하려는 연구는 이상과 같이 대부분 캘러스 배양과 플라스크에 의한 현탁배양 단계에 머물러 있었고 dual carboy system으로 스피어미트 세포를 배양하였으나 박하정유를 생산하지 못하였다는 보고(20) 이외에는 생물반응기를 이용하여 박하정유를 생산한 예는 거의 없었다.

따라서 본 실험에서는 페퍼민트 세포의 회분배양 특성을 구명하기 위하여 반응기를 설계 제작하고 대량생산 가능성을 살펴보기 위하여 배양조건을 달리 해 주었을 경우 세포의 생육과 kinetics 그리고 박하정유의 생성량 및 그 조성을 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 현탁배양

박하세포는 서울대학교 식품공학과에서 계대 보관 중인 서양종 페퍼민트(*Mentha Piperita*)의 캘러스를 재료로 사용하였다. 현탁배양을 위해서는 생육이 빠르고 연두색을 띤 반투명한 캘러스를 1~2g 취해 부순 다음 Lin-Staba(14) 액체배지 50ml가 든 200ml 진탕 삼각 플라스크에 접종하여 진탕 배양기(130rpm)에서 16시간 명(1600lux)조건으로, 8시간 암조건으로 유지하며 12일 간격으로 계대 유지하였다. 식물 성장 호르몬으로는 2,4-D를 2ppm 농도로 사용하였고 살균전 배지의 초기 pH는 5.7이었다.

### 생물 반응기의 구조

반응기는 Wilson(21), Sahai와 Shuler(22)의 반응기를 기초로 하여 기포 생물반응기 형태로 설계, 제작하였다(Fig. 1). 2개의 3ℓ pyrex conical 플라스크를 이중으로 붙이고 그 사이로 항온 순환기에서

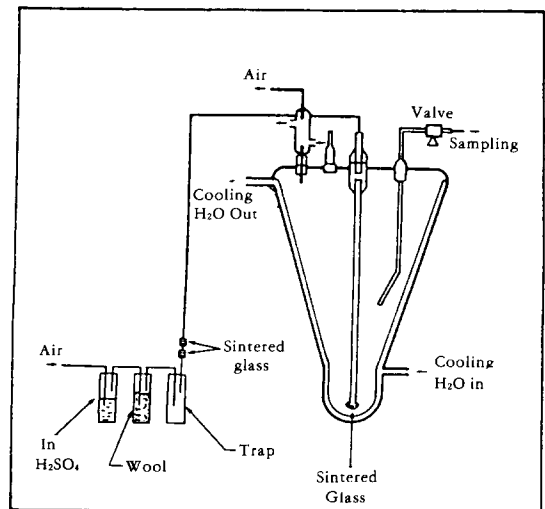


Fig. 1. Schematic diagram of the air bubble bioreactor for batch culture of peppermint cells.

공급되는 물을 순환시켜 온도를 조절하였으며 이중으로 붙인 플라스크를 거꾸로 하여 밑부분을 둥글게 하였고 윗부분은 중앙에 공기를 공급할 수 있는 공기 주입구와 그 둘레로 공기가 나갈 수 있고 접종과 시료를 채취할 수 있도록 4개의 구멍을 각각 24/40joint로 만들었다. 반응기 안으로 유입되는 공기는 황산과 glass wool을 통과시켜 제균하였으며 공기 주입구 끝부분에 sintered glass를 부착하여 공기를 분산시킬 수 있도록 하였고 공기 출구에는 증발 손실을 줄이기 위해 응축기를 연결하였다.

### 회분배양

기본 배양조건으로 새로운 배지 10를 반응기에 넣고 30분간 멸균한 다음 세포 농도가 각기 다른 모 배양액 300ml를 접종하여 최종 접종농도가 packed cell volume(PCV)으로 1.0, 2.0, 4.0%가 되도록 조절하였고 2일 간격으로 시료를 채취하였다. 배지는 Lin-Staba 배지를 사용하였으며 살균전 배지의 초기 pH를 5.7로 맞추었고 식물 생장 호르몬인 2,4-D의 농도를 2ppm으로 하였다. 배양중의 온도는 27°C로 조절하였으며 항생제로서 ampicillin 50ppm과 소포제로서 Silicon KM-72 0.02%를 각각 접종 후에 첨가하였다. 통기량은 air pump를 이용하여 1.0VVM, 1.5VVM으로 조정하였으며 반응기 중간 부분에 둥근 형광등을 설치하여 24시간 명조건으로 10일간 배양하였다.

### 세포 생육 및 정유 생성에 미치는 배양조건의 영향

Abiotic stress의 영향을 알아보기 위하여 16시간은 27°C, 명조건으로 배양하였고 8시간은 10°C, 암상태로 반복 유지하면서 배양하였다. Elicitor 첨가의 영향을 알아보기 위하여 배지에 yeast extract (DIFCO, BACTO) 100mg/l를 첨가한 modified Lin-Staba 배지를 사용하였고 27°C에서 24시간 명조건으로 배양하였다. 또한 세포 생육과 정유 생성 단계를 분리하기 위하여 예비실험에서 과도한 탄소원(20g/l)으로 나타난 sucrose 농도를 1/2로 줄인 Lin-Staba 배지를 사용하여 27°C에서 24시간 명조건으로 6일간 배양한 후 7일부터 10일까지는 배지에 yeast extract를 10mg 첨가하고 하루 중 8시간은 암상태에서 배양온도를 10°C로 낮추어 2단 배양을 실시하였다. 항생제로서 Ampicillin 50ppm과 소포제로서 Silicon KM-72 0.02%를 각각 접종 후에 첨가하였으며 air pump를 이용하여 통기량은 1.5 VVM으로 하였다.

### 세포의 생육도 측정

세포의 생육도는 PCV 및 dry cell weight(DW)로 측정하였다. PCV는 10ml 원뿔형 원심관(conical centrifuge cell)에 배양액 5ml를 취하고 2000xg에서 20분 동안 원심분리하여 배양액 부피에 대한 침전된 세포의 부피를 퍼센트로 나타내었다. DW는 15ml의 배양액을 미리 무게를 잰 여과지(Whatman No. 1)에 취하고 증류수로 씻어준 다음 5분 동안 감압하에서 여과한 후 80°C의 건조기에서 24시간 건조한 후에 무게를 측정하여 결정하였다.

### 당 농도 분석

PCV를 측정하고 남은 여액을 0.45µm membrane 여과지로 여과한 후 HPLC(Pye Unicam PU4010)를 이용하여 당 농도를 분석하였다. 분석용 column으로는 Nucleosil 10-NH<sub>2</sub> column을 사용하였고 용매는 acetonitrile/H<sub>2</sub>O(80/20)를 1.0ml/min의 속도로 흘려 보냈으며 refractive index detector를 사용하여 당 농도를 측정하였다.

### Oleoresin의 추출

생물 반응기로부터 회수한 배양액을 감압하에서 여과하여 세포를 거른 다음 여액을 액체-액체 연속 추출장치(23)에서 pentane: dichloromethane이 2:1로 혼합된 유기용매로 24시간 추출하였다. 추출액을 charcoal로 탈색하고 무수 황산 나트륨으로 수분을 제거한 다음 진공 회전 증발기로 농축하였다.

### 박하정유의 조성 분석

정유의 성분은 Gas Chromatography(Hewlett-Packard 5880A)를 사용하여 분석을 행하였다. 분석용 column으로는 0.25mm(ID)×30m의 SPB-1 fused silica capillary column을 사용하였고, column 온도는 초기 80°C에서 3분간 지체한 후 200°C까지 4°C/min로 증가하도록 하였다. Carrier 가스로 질소를 사용하여 1.0ml/min의 속도로 흘려 보냈으며 정유의 성분은 flame ionization detector로 분석하고 표준성분과의 머무름 시간을 비교하여 결정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 배양조건이 세포 생육에 미치는 영향

기포 생물반응기의 접종량을 1.0, 2.0, 4.0%로 달리하여 회분배양을 실시하고 생육도를 분석하였는데

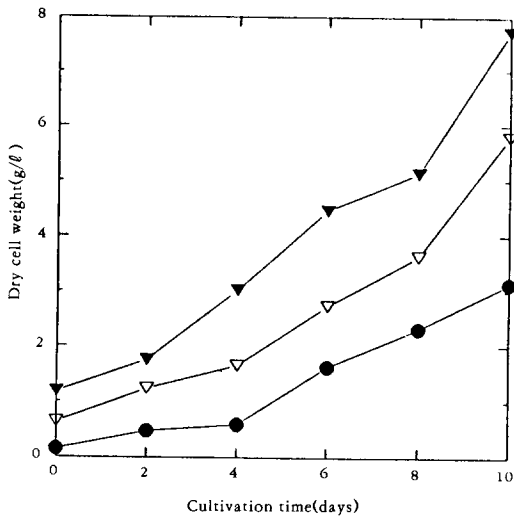


Fig. 2. Growth of peppermint cells in a batch culture with different sizes of inoculum.

1.0% PCV —●—; 2.0% PCV, —△—; 4.0% PCV, —▶—

그 결과는 Fig. 2와 같다. 접종량을 1.0%로 하고 통기량을 1.0VVM으로 하여 10일간 배양하였을 때 세포 생육은 3.14g/l (DW)이었으며 2.0%로 하고 통기량을 1.5VVM으로 한 경우에는 5.8g/l이었다. 4.0%를 접종하고 1.5VVM의 통기량으로 배양한 경우는 7.73g/l의 세포 수율을 얻었는데 이 경우에는 세포밀도가 너무 높아 응집되는 경향이 있어 8일 이후에는 배양이 어려웠다. 배양 8~10일까지는 통기와 교반이 반응기 안에서 효율적으로 이루어졌으나 10일 이후에는 세포들이 반응기 밑부분의 sintered glass 주위에 뭉치게 되어 통기와 교반에 영향을 주었고 시료 채취에도 어려움이 있었다. 일반적으로 식물세포 배양에서는 세포의 생육도를 높이기 위하여 5~20%의 높은 농도로 접종하지만 제작한 반응기에서는 접종량 2.0%, 1.5VVM의 통기량으로 10일간 배양한 경우가 혼합과 통기에 있어 적절한 운전조건이었다.

Abiotic stress의 영향을 알아보기 위하여 모배양액 접종량을 2.0%(PCV)로 하고 하루 중 8시간은 암조건에서 10°C로 저온처리하여 배양하였는데 그때의 생육곡선은 Fig. 3에 나타나 있다. 접종 후 4일까지는 거의 생육이 일어나지 않다가 그 이후부터 세포가 생육하기 시작하여 배양 10일 후 세포의 생

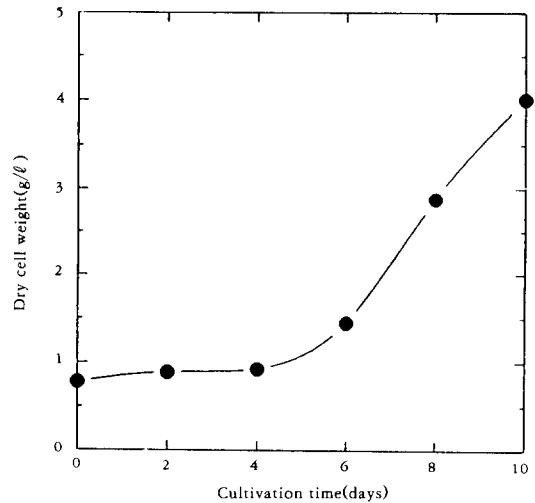


Fig. 3. Growth of peppermint cells in a batch culture with daily 8hr dark and cold treatment at 10°C.

육은 4.01g/l로 27°C, 명조건으로 10일간 배양하였 때의 5.8g/l의 생육도에 비해 낮은 결과였다. 이 결과는 현탁배양시 하루 6시간 동안 암조건에서 10°C로 저온처리를 하였을 때 세포의 생육은 별로 차이가 없었다는 보고(19)와는 차이를 보이는 것이었다.

박하세포의 회분배양시 elicitor로서의 yeast extract 첨가가 세포의 생육에 미치는 영향을 알아보기 위하여 살균된 Lin-Staba 배지에 yeast extract를 100mg/l의 농도로 첨가하고 모배양액 2.0%(PCV)를 접종하여 배양하였는데 세포의 생육곡선은 Fig. 4와 같다. 배양 10일만에 10.5g/l의 세포 수율을 얻었는데 이것은 본 실험의 결과 중에 가장 높은 것이었다. 박하세포 현탁배양시 yeast extract를 첨가하여 배양한 결과 세포의 생육이 거의 일어나지 않았다(19)는 결과가 보고된 바 있었는데 본 실험에서는 오히려 세포의 생육이 증가한 결과를 가져왔다. Elicitor 첨가는 일반적으로 세포의 생육보다는 2차 대사산물의 생성을 촉진하기 위하여 실시되는데 식물세포의 종류나 배양조건에 따라 세포의 생육 자체에도 영향을 미치는 것으로 나타나고 있으므로 박하세포 배양에서도 여러 elicitor가 세포 생육도에 미치는 영향을 보다 광범위하게 연구해 볼 필요가 있을 것으로 보인다.

식물세포 배양의 경우 세포생육과 2차 대사산물 생성을 위한 배양조건이 일치하지 않는 경우가 많으

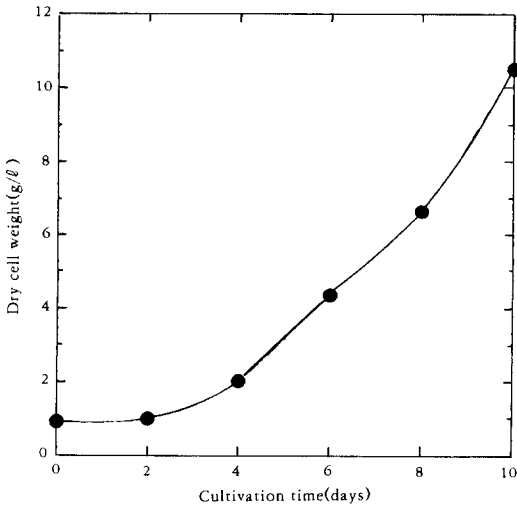


Fig. 4. Growth of peppermint cells treated with yeast extract as an elicitor in a batch culture.

므로 본 실험에서는 최초 6일간 세포생육을 위해 기본 배양조건에서, 그 이후에는 정유생성을 위해 암 상태에서 저온처리를 하여 배양하는 2단배양을 실시하였는데 그 생육 결과는 Fig. 5와 같다. 세포의 생육은 배양 8일까지 증가하여 7.55g/l의 생육을 나타내었고 그 이후에는 감소하여 배양 10일에 5.06g/l의 생육도를 나타내었다. 이때 세포들은 8일부터 약간 검게 변하기 시작하여 10일 이후에는 갈색으로 변하였는데 세포가 퇴화하는 경향을 보였기 때문에 배양 8일 이후부터 세포의 생육이 떨어졌다고 생각된다.

**배양 중 배지 성분인 당 성분의 변화**

식물세포 배양에서 배지에 사용되어온 탄소원으로는 sucrose의 농도를 2~3%로 하여 가장 많이 사용되어왔는데 탄소원의 조성은 세포생육뿐만 아니라 2차 대사산물 생산에도 영향을 미친다고 알려져 있다(24). Lin-Staba 배지에서 유일한 탄소원인 sucrose는 Fig. 6에서 볼 수 있듯이 빠르게 glucose와 fructose로 분해되었으며 이것은 sucrose를 가수분해하는 invertase가 대부분의 식물체에 존재한다(25)는 사실에서 예상할 수 있는 결과였다. sucrose는 4일만에 대부분 가수분해 되었으며 생성된 glucose 농도는 fructose보다 낮았으나 세포의 glucose의 이용속도가 fructose보다 빨랐다.

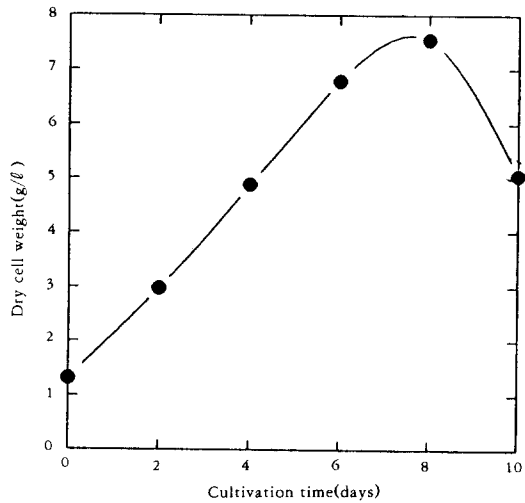


Fig. 5. Growth of peppermint cells in a two-stage culture. In the first stage, the culture conditions were 27°C, light, and without elicitor were given during the first six days after inoculation. In the second stage, daily 8hr cold and dark treatments were given to the culture containing yeast extract as an elicitor.

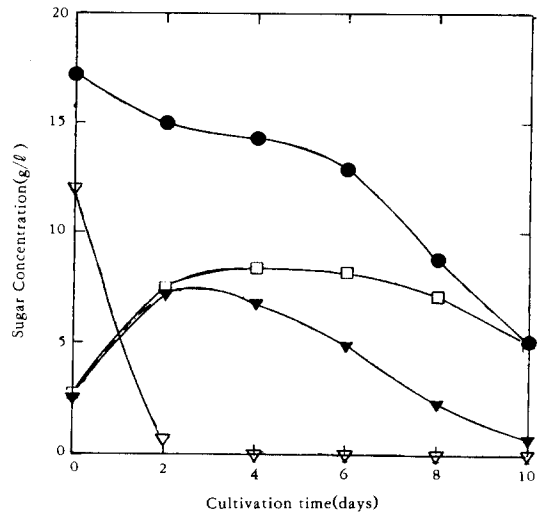


Fig. 6. Concentration of sucrose and its hydrolysis products during the batch culture of peppermint cells with 2.0%(PCV) inoculum. Total sugar, —●—; Sucrose, —▽—; Glucose, —▼—; Fructose, —□—

**회분배양 중 생육 kinetics 분석**

생육 kinetics는 Fig. 2의 생육도(2.0% PCV)와 Fig. 6의 당 성분 변화에서 산출하였는데 Fig. 7은 소비되는 당 농도와 DW의 관계를 나타낸 것으로 이때의 dry cell yield( $Y_{x/s}$ )는 0.38(g dry cell/g sugar)로 나타났다. Fig. 8은 배양시간에 따른 세포농도의 변화를 보여주고 있는데 dry cell 농도의 specific growth rate은  $0.25\text{day}^{-1}$ 로써 미생물에 비해 20배 정도 낮았다. 이렇게 낮은 specific growth rate는 식물세포의 낮은 대사능력을 보여주는 것이며 이것은 배양기간이 길어져야 함을 의미하므로 미생물에 의한 오염의 가능성이 그만큼 커지는 것을 뜻한다. 그러므로 세포의 대사능력을 향상시키기 위해서는 환경조건을 최적화하거나 세포를 고정화하여 재사용하는 등의 방법을 통하여 낮은 specific growth rate를 극복하는 방안이 필요하다고 여겨진다.

**배양조건이 정유생성 및 조성에 미치는 영향**

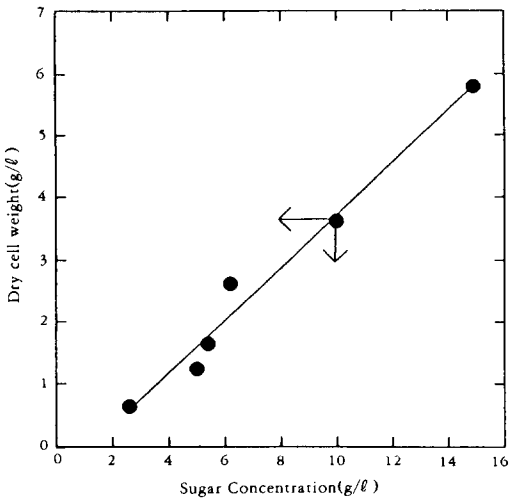
접종량을 1.0, 2.0, 4.0% (PCV)의 3가지 경우로 하여 각각 10일 배양 후 생성된 박하정유의 생성량과 그 주요 성분의 함량은 Table 1에 나타나 있다. 접종량이 4.0%인 경우에 박하정유의 생성량이 높았고 1.0%와 2.0%인 경우에는 정유 생성량에 큰 차이가 없었다. 박하정유의 조성에 있어서 세 경우 모두 menthol은 생성되지 않았고 접종량 1.0%와 4.0%

에서는 전구체인 pulegone과 piperitone이 생성물의 대부분을 차지하였으나 2.0%에서는 머무름 시간이 짧은 고휘발성 성분들이 많이 생성되어 pulegone과 piperitone의 함량이 상대적으로 적었다. 이와 같은 결과는 접종량 자체가 정유의 조성에 영향을 미쳤다고 보다는 통기와 교반이 달라짐에 따라 세포의 생리적 조건이 변하였기 때문이라 생각된다.

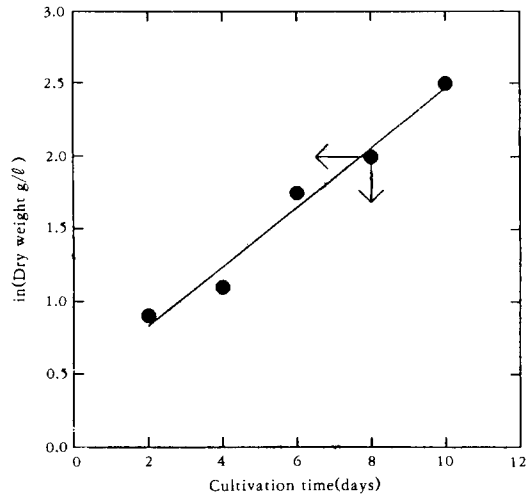
Abiotic stress, yeast elicitor 첨가, 2단 배양 등으로 배양조건에 변화를 주어 배양하였을 때 박하정유의 생성량과 그 주요 성분의 함량은 Table 2에 나타나 있다. 모 배양액 접종량을 2.0% (PCV)로 하고 하루중 8시간은 암 조건에서  $10^\circ\text{C}$ 로 저온처리하여 배양하였는데 배양 10일 후 세포의 생육은  $4.01\text{g}/\ell$

**Table 1. Contents of essential oil and major components of oleoresin obtained from three batch cultures of peppermint cells for 10 days.**

Inoculum size (% PCV)	Amount of oleoresin (g/ℓ)	menthol	content of	
			pulegone	piperitone
			(%, w/w)	
1.0	0.118	0	3.1	94.55
2.0	0.109	0	0.58	4.80
4.0	0.279	0	14.2	75.17



**Fig. 7. Relationship between the dry cell weight and consumed sugar concentration during the batch culture of peppermint cells.**



**Fig. 8. Specific growth rate with regard to the dry cell weight of the peppermint cells during the batch culture with 2.0% (PCV) inoculum.**

**Table 2. Contents of essential oil and major components of oleoresin obtained from three batch cultures of peppermint cells with different culture conditions.**

Culture condition	Amount of oleoresin (g/ℓ)	content of		
		menthol	pulegone	piperitone
		(% w/w)		
Abiotic stress	0.546	0	1.02	11.1
Yeast elicitor	0.257	22.5	4.28	27.2
Two stage culture	0.143	0	2.20	21.5

로 27℃, 명조건으로 10일간 배양하였을 때의 5.8g/ℓ의 생육도에 비해 낮았음에도 불구하고 박하정유는 0.546g/ℓ로 많이 생성되었다. 정유의 조성을 분석한 결과 menthol은 생성되지 않았고 pulegone과 piperitone이 각각 1.02%와 11.1%로 생성되었는데 머무름 시간이 짧은 고휘발성 성분들이 많이 생성되었기 때문에 상대적으로 terpenoid 성분들의 함량이 적게 나타났다. 이 결과로부터 명, 암 반복 조건과 저온처리를 함으로써 세포의 생육은 떨어지나 박하정유의 생성량은 증가됨을 알 수 있었고 정유의 주성분인 menthol 함량은 증가되지 않았는데 이것은 저온처리가 현탁배양과 재배된 박하에서 박하정유의 생성량은 증가시키나 menthol 함량은 증가시키지 않았다는 보고(19, 26)와 일치하는 것이었다.

살균된 Lin-Staba 배지에 yeast extract를 100mg/ℓ의 농도로 첨가하고 모 배양액을 2.0% (PCV)로 접종하여 배양한 결과 배양 10일만에 박하정유는 0.257g/ℓ (Table 2)가 생성되었는데 이것은 같은 접종량에서 yeast extract를 첨가하지 않은 경우 (Table 1, 2.0% PCV)의 0.109g/ℓ 보다 2배 정도 증가한 양이었으나 세포의 생육도도 2배 정도 되므로 단위세포당 생성량으로 볼 때 yeast extract가 대사산물의 elicitation보다는 세포의 성장만을 향상시킨 것으로 판단된다. 그러나 정유의 조성을 분석한 결과 주성분인 menthol이 22.5%가 생성되었고 전구체인 pulegone과 piperitone도 각각 4.28%와 27.2%가 생성되었다. 이것은 yeast extract가 정유의 조성면에 있어서는 elicitor로서 효율적으로 작용하였고 pulegone에서 menthone을 거쳐 menthol로 가는 생합성 단계의 관련효소들이 유도되었기 때문이라 생각된다. 식물세포 배양에 의해 공업적으로 유용물질을 생산하기 위해서는 생산성이 높은 우수 세포주를 선발하여야 하나 우수 세포주가 선발되었다 하더라도 시간경과에 의해 생산성이 떨어지게

되어 계속적인 선발이 필요하게 되므로 생산성을 높이기 위해서는 abiotic stress나 elicitation 등에 의해 세포의 대사능을 효율적으로 증대시키는 것이 필요하다. 따라서 앞으로 첨가량 및 첨가시기 등을 조절하여 박하정유의 생성량을 늘릴 수 있도록 yeast extract에 대한 좀더 포괄적인 연구가 수행되어야 할 것이며 yeast extract 이외의 더 효율적인 elicitor를 탐색할 필요성이 있다.

1단계에서 Lin-Staba 배지의 sucrose양(20g/ℓ)을 1/2(10g/ℓ)로 줄이고 27℃, 명상태로 6일간 배양하여 세포의 생육을 충분히 높인 다음, 2단계에서는 yeast extract를 100mg/ℓ로 첨가하고 명, 암 반복과 10℃로 저온처리를 실시하여 2단 배양을 실시한 결과, 정유 생성량은 0.143g/ℓ (Table 2)로 저온처리를 하지 않고 yeast extract를 첨가하여 생성된 0.257g/ℓ나 yeast extract를 첨가하지 않고 저온처리를 하였을 때 생성된 0.546g/ℓ의 양보다 훨씬 낮았으며 정유의 조성을 분석한 결과 menthol은 나타나지 않았고 pulegone과 piperitone만이 각각 2.2%와 21.5%가 생성되었다. 본 실험의 결과 명, 암 반복 조건과 저온처리를 하게 되면 세포의 생육속도가 떨어지면서 정유 생성량은 증가하였고 배양전에 yeast extract를 첨가하였을 때는 세포의 생육이 증가하면서 menthol이 생성되었는데 본 2단 배양 실험에서는 예상과는 달리 정유 생성량이 감소하고 menthol도 생성되지 않았다.

*Thalictrum rugosum* 배양에 의한 berberine 생산에 있어서 yeast extract에서 분리한 탄수화물 분획을 높은 농도로 첨가한 경우 대부분의 세포들이 갈색으로 변하여 사멸되었기 때문에 berberine 생산이 감소되었다고 보고된 예(27)가 있었는데 본 실험에서도 세포의 생육이 8일 이후에 떨어지고 퇴화하는 경향을 보였기 때문에 정유 생성량과 menthol 함량이 떨어진 것으로 생각된다.

## 결 론

본 실험에서는 페퍼민트 세포를 Ampicillin이 함유된 Lin-Staba 배지에 접종하여 기포 반응기 형태의 생물반응기에서 배양조건을 변화시켜 회분배양하였을 때 배양 10일만에 최대 10.5g/ℓ의 세포 수율을 얻었으며 박하정유는 명, 암 반복 조건과 저온처리를 실시하여 1ℓ당 최고 546mg까지 생성되었다. 대부분의 경우 정유의 주요 구성성분인 menthol은 생성되지 않고 전구체인 pulegone과 piperitone

이 주로 생성되었으나 특이하게도 yeast extract를 배양전에 첨가하였을 경우에는 22.5%의 menthol이 생성되어 이제까지 보고된 menthol 함량에 비해 높았는데, 이 결과는 yeast extract가 menthol을 생성시킬 수 있는 elicitor로 이용될 수 있는 가능성을 보여 준 것으로 생각된다.

이와 같이 yeast extract의 첨가에 따라 특이적으로 menthol이 생성된 것은 흥미있는 일로써 높은 정유 생산성을 가지는 우수 세포주를 선발하고 yeast extract를 최적 조건으로 처리함으로써 정유의 높은 생산 수율과 좋은 조성을 기대할 수 있을 것이다. 본 실험에 사용한 기포 생물반응기에서는 세포의 생육이 왕성하여 10일 이후에는 교반과 통기가 어려워지며 여러 조건에 따라 반응기 내에서 세포가 뭉치는 등의 현상이 나타났다. 따라서 이러한 점을 해결할 수 있도록 운영조건을 최적화시킬 필요가 있다. 또한 생물학적 변환 등을 통하여 생성된 전구체를 menthol로 전환시킬 수 있는 방법이 모색되어야 하겠고 연속배양과 고정화배양 등을 통하여 박하정유의 생성량을 증가시킬 수 있는 연구들이 진행되어야 하리라고 생각된다.

## 요 약

페퍼민트 세포의 회분배양에 의한 monoterpeneoid 품미성분의 생산 가능성과 세포의 생육 및 정유생산 특성을 알아보기 위해 캘러스로부터 얻은 모배양액을 기포반응기 형태의 생물반응기에 접종하여 배양하였다. 회분배양 중 접종량, abiotic stress, yeast elicitor, 그리고 2단 배양 등의 배양조건이 세포생육과 박하정유 생성 및 조성에 미치는 영향을 조사하였으며 배지의 sucrose 농도와 세포생육의 kinetics를 분석하였다. 접종량을 달리하여 배양한 결과 2.0% (PCV)를 접종한 경우가 반응기에서 배양이 가장 적당하였는데 배양 10일 만에 5.8g/ℓ의 세포생육을 얻었으며 0.109g/ℓ의 박하정유가 생성되었다. Abiotic stress의 영향을 보기 위해 16시간은 27℃에서 명상태로, 8시간은 암상태로 하고 10℃로 온도를 낮추어 배양한 결과 세포의 생육은 떨어졌으나 박하정유 생성량은 0.546g/ℓ로 높은 수율을 보여 주었다. 사용한 Lin-Staba 배지에 100mg/ℓ의 yeast extract를 elicitor로 첨가했을 때 세포의 생육과 정유의 생성량이 높았으며 유일하게 menthol이 정유 중 22.5%의 높은 농도로 생성되었다. 배지의 당농도를 1/2로 줄이고 27℃, 명조건으로 6일간 배양한 후

100mg/ℓ의 yeast elicitor를 첨가하여 8시간을 암상태와 10℃로 저온처리를 실시하여 6일간 배양한 결과 8일 이후에는 세포의 생육이 감소하였고 정유 생성량은 증가하지 않았으며 menthol도 생성되지 않았다. Dry cell yield는 0.38g dry cell/g sugar이었으며 specific growth rate은 0.25day<sup>-1</sup>이었다. 회분배양에 의해 박하정유가 생성됨을 알 수 있었으나 menthol이 생성되지 않고 전구체인 pulegone과 piperitone이 축적되었다. 그러나 특이하게도 yeast elicitor를 첨가한 경우 menthol이 22.5%로 생성되었는데 이제까지 박하세포 배양에 의해 생성된 menthol 함량으로는 최대치를 보여주는 결과이었다.

## 참고 문헌

1. L. G. Nickell(1980), *In Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals*, (E. J. Staba, eds), **235**, CRC Press, Florida.
2. W. Tulecke and L. G. Nickell(1959), *Science*, **130**, 863.
3. G. Payne, V. Bringi, C. Prince and M. Shuler (1991), *In Plant Cell and Tissue Culture in Liquid systems*, **147**, Oxford University Press, New York.
4. M. L. Shuler, J. Y. Pyne and G. A. Hallsby (1984), *JAOCs*, **61**, 1724.
5. A. K. Panda, S. Mishra, V. S. Bisaria and S. S. Bhojwani(1989), *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 386.
6. M. H. Zenk, H. Ei-Shagi, H. Arens, J. Stockigt, E. W. Weiler and B. Deus(1977), *In Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application* (W. Barz, E. Reinhard and M. H. Zenk, eds), **27**, Springer-Verlag, Berlin.
7. J. E. Schlatmann, A. M. Nuutila, W. M. van Gulik, H. J. G. ten Hoopen, R. Verpoorte and J. J. Heijnen(1993), *Biotech. Bioeng.*, **41**, 253.
8. J. I. Smith, N. J. Smart, M. Misawa, W. G. W. Kurz, S. G. Tallevi and F. Dicosmo (1987), *Plant Cell Reports*, **6**, 142.
9. A. W. Alfermann, H. M. Boy, P. C. Doller, W. Hagedorn, M. Heins and J. Wahl(1977), *In Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application* (W. Barz, E. Reinhard, and M. H. Zenk, eds), **127**, Springer-Verlag,



- Berlin.
10. A. W. Alfermann, W. Bergmann, C. Figur, U. Helmbold, D. Schwantag, I. Schuller and E. Reinhard(1983), *In Plant Biotechnology* (S. H. Mantell and H. Smith, eds), **67**, Cambridge University Press, Cambridge.
  11. O. P. Sahai and M. L. Shuler(1984), *Biotech. Bioeng.*, **26**, 27.
  12. B. Tai and I. Goldberg(1982), *Plant Med.*, **44**, 107.
  13. G. Lappin, J. Tampion and J. D. Stride (1986), *In Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures* (P. Moris, A. H. Scargg, A. Stafford and M. W. Fowler, eds), **15**, Cambridge University Press, Cambridge.
  14. M. L. Lin and E. J. Staba(1961), *Lloydia*, **24**, 139.
  15. H. Becker(1970), *Biochem. Physiol. Pflanz.*, **161**, 425.
  16. J. Bricout and C. Paupardin(1975), *C. R. Acad. Sci. Paris. Ser. D.*, **281**, 383.
  17. J. Bricout, M. J. Garcia-Rodriguez, C. Paupardin and R. Saussay(1978), *C. R. Acad. Sci. Paris. Ser. D.*, **287**, 611.
  18. S. A. Kireeva, V. N. Melnikov, S. A. Renznikova and N. I. Meshcheryakova(1978), *Soviet Plant Physiol.*, **25**, 438.
  19. J. H. Kim(1989), *M. S. Thesis, Dept. of Food Science and Technol.*, Seoul Nat'l. Univ., Seoul.
  20. C. J. Wang and E. J. Staba(1963) *J. Pharm. Sci.*, **52**, 1058.
  21. G. Wilson(1976), *Ann. Bot.*, **40**, 919.
  22. O. P. Sahai and M. L. Shuler(1981), *Can. J. Bot.*, **60**, 692.
  23. K. C. Lan, G. B. Nickerson and M. L. Deinzer (1986), *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 63.
  24. P. Ozias-Akins and I. K. Vasi(1985), *In Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* (I. D. Vasil, ed), Vol. **2**, 129, Academic Press, California.
  25. M. W. Fowler(1982), *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **52**, 338.
  26. M. J. Burbott, I. J. Calpin and H. A. Collin (1984), *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, **66**, 315.
  27. C. Funk, K. Gugler and P. Brodelius(1987), *Phytochemistry*, **26**, 401.