

연초(*Nicotiana tabacum* cv Xanthi) 세포배양에 의한 Ubiquinone 10의 생산

양덕춘* · 박지창 · 최광태
한국인삼연초연구원 유전생리부

Production of Ubiquinone 10 from the Callus Culture of Tobacco(*Nicotiana tabacum* cv Xanthi)

Deok Chun YANG, Ji Chang PARK, and Kwang Tae CHOI

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taedok Science Town, Taejeon, 305-345. *Corresponding author.

The effect of phytohormones on *in vitro* production of ubiquinone 10 from the callus cultures of *Nicotiana tabacum* cv Xanthi was investigated. The growth of callus cultures of Xanthi was improved by addition of NAA and 2,4-D, especially NAA 0.5 mg/L alone, at the light condition. Ubiquinone 10 was detected by HPLC, and confirmed from Xanthi callus cultured on the all of upper media. The ubiquinone 10 content in Xanthi tobacco callus cultured on the medium with NAA 0.5 mg/L only was higher than that of other mixed medium with NAA and 2,4-D. However, addition of IBA 1 mg/L and NAA 0.5 mg/L to the medium was more effective in promoting ubiquinone 10 formation than that of NAA 0.5 mg/L only. As the callus growth of Xanthi was considerably restrained at concentration of kinetin, Content and production of ubiquinone 10 was the highest at kinetin 0.5 mg/L and 2,4-D 0.5 mg/L in the light.

Key words: cell culture, phytohormone

식물자원으로부터 기내에서 이차대사산물을 생산하려고 하는 많은 연구가 시도되고 있는 바(Furuya et al., 1970; Hagimori et al., 1982; Ikeda et al., 1976; Mono et al., 1986), 이는 배양세포를 이용할 경우 일정한 환경하에서 안정된 원료생산이 가능하며, 노지식물에 비해서 생육주기뿐만 아니라 생육속도가 대단히 빨라 생산을 증가시킬 수 있고, 노동 및 기술이 집약화되어 생산성이 향상됨으로써 대량생산으로 산업화의 가능성이 크기 때문이다. 이차대사산물 생산 연구는 주로 정삼식물조직을 탈분화시켜 캘러스상태에서 배지조성 및 환경조건의 변화 등에 따른 세포증식과 유용생리물질생산에 주력하여 왔으며, 이미 *Lithospermum erythrorhizon*의 배양세포에서 shikonin (Yamada and Hashimoto, 1990), 인삼배양세포에서 사포닌(Furuya et al., 1973; Yoshikawa and Furuya, 1987), *Digitalis*의 배양세포로부터 강심배당체의 생산(Hagimori et al., 1982) 등이 보고되어 있으며, 연초 BY2 배양세포에서 ubiquinone 10의 생산연구 등(Ikeda et al., 1976; Ikeda et al., 1978; Ikeda et al., 1980; Ikeda et al., 1981)이 보고되어 있다.

Ubiquinone은 미생물에서부터 고등 동식물에 이르기까지

광범위하게 발견되고 있으며 생물체의 세포질에 있는 미토콘드리아에서 호흡할때 Krebs회로에서 산화적 인산화 반응에 관여하는 지용성 benzoquinone류로써 cytochrome system을 거쳐서 succinate가 되는 NADH를 산화시키는 역할을 하며, 심장병에 화학치료제로 사용되는 부가가치가 매우 높은 고가의 화합물이다(Ikeda et al., 1980). 본 실험은 연초 품종 중 *Nicotiana tabacum* cv Xanthi을 이용하여 기내배양에 의해서 ubiquinone 10를 생산하고자 우선 연초배양세포에서 ubiquinone 10의 분석방법 및 생산가능성을 진단하고, 또한 각종 식물호르몬의 종류와 농도의 조건에 따른 생산량을 조사하였던 바, 그 결과를 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

연초 Xanthi 캘러스로부터 Ubiquinone 10의 추출 및 함량조사

배양된 연초(*Nicotiana tabacum* L.: cv Xanthi) 캘러스로부터

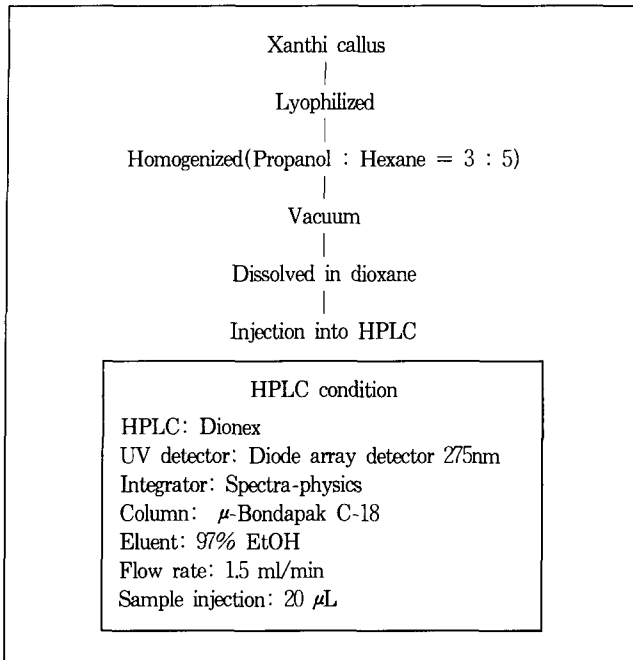


Figure 1. The extraction procedure of ubiquinone 10 from the callus cultures of Xanthi cultured cells and the condition of HPLC analysis.

터 ubiquinone의 추출 및 함량 측정시 HPLC조건은 Figure 1과 같이 하였다. 표준품으로 사용한 ubiquinone 7과 10은 sigma 제품을 사용하였다.

식물호르몬 혼합처리에 의한 Ubiquinone 10의 생산

2,4-D 0.5 mg/L가 함유된 배지에서 성장한 Xanthi 캘러스 약 1.5 g/flask를 2,4-D의 농도가 0, 0.05, 0.1, 0.5 mg/L 처리된 MS배지에 NAA의 농도를 0.5, 1.0, 2.0 mg/L 추가처리하여 광 및 암상태에서 30일간 배양한 후 성장량을 조사하였다. IBA와 NAA의 혼합영향을 조사하기 위해서는 IBA의 농도를 0, 1, 3, 5 mg/L 첨가된 MS배지에 NAA를 0, 0.5 mg/L 혼합 첨가하였으며, kinetin의 영향을 조사하기 위해서는 2,4-D 0.5 mg/L 첨가된 MS배지에 kinetin의 농도를 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mg/L 혼합 처리하여 25°C의 배양실에서 30일간 배양후 캘러스의 생체중과 ubiquinone 10의 함량을 조사하였다. Ubiquinone 10의 함량측정은 배양된 Xanthi 캘러스를 이용하였으며 측정은 HPLC를 사용하였다(Figure 1). 생산성은 Xanthi 캘러스의 성장량에 단위 생체중당 ubiquinone 10의 함량을 곱하여 플라스크당 생산할 수 있는 ubiquinone 10의 함량을 환산하였다.

결과 및 고찰

Table 1. Effects of 2,4-D and NAA on the growth of callus induced from *N. tabacum* cv Xanthi leaf for 30 days in the light and dark condition.

Phytohormone(mg/L)		Fresh weight of callus (g/flask)	
2,4-D	NAA	Light	Dark
0	0.5	15.79 ± 0.55	11.52 ± 0.41
	1.0	15.44 ± 0.72	10.25 ± 0.12
	2.0	14.01 ± 0.93	11.00 ± 0.61
0.05	0.5	14.70 ± 0.32	10.40 ± 0.85
	1.0	14.90 ± 0.88	10.43 ± 0.68
	2.0	15.81 ± 0.66	11.13 ± 0.22
0.1	0.5	13.38 ± 0.56	13.32 ± 0.31
	1.0	15.15 ± 0.63	9.45 ± 0.66
	2.0	15.17 ± 0.30	13.16 ± 0.21
0.5	0.5	14.99 ± 0.74	11.90 ± 0.27
	1.0	14.17 ± 0.53	10.93 ± 0.42
	2.0	14.58 ± 0.96	11.40 ± 0.29

NAA 및 2,4-D 혼합처리에 의한 Ubiquinone 10의 생산

연초 Xanthi 품종의 기내배양에 의한 캘러스의 성장과 ubiquinone 10의 함량을 조사 하기 위해서 2,4-D와 NAA를 농도별로 혼합처리하여 30일간 고체배양하여 우선 생체중을 조사한 결과(Table 1), NAA를 0.5, 1.0, 2.0 mg/L 단독으로 처리하거나 2,4-D와 혼합처리시 캘러스의 생장은 매우 양호하였다. 그러나 광상태에 비해 암상태에서는 각처리 공히 Xanthi 캘러스의 생장이 떨어지는 경향을 보였다. 이런 결과는 이차대사산물의 생성에 억제작용을 나타내는 2,4-D를 대체해서 NAA를 사용하여도 정상적으로 캘러스 성장을 유도할 수 있음을 시사하며, 특히 NAA의 사용시에도 저농도인 0.5 mg/L를 사용하여도 캘러스의 성장과 대등하였다 (Table 1).

연초 Xanthi 캘러스로부터 ubiquinone 10의 함량을 조사하기 위해서 표준품으로서 ubiquinone 7과 10를 사용하여 HPLC로 분석한 후 retention time을 조사한 결과 10.25-10.70분에 peak가 나타났다(Figure 2-A and B). 또한 배양세포를 propanol과 hexane를 3대 5로 혼합된 용매에 추출하여 농축된 시료를 dioxane에 녹여 HPLC로 측정할 결과 역시 retention time 10.28분에 peak가 나타났으며(Figure 2-C), 동 peak가 ubiquinone 10인 것을 확인하기 위해서 동시료에 표준품인 ubiquinone 10을 첨가하여 HPLC로 측정하였던 바, 동일 위치에 시료가 함유하고 있는 ubiquinone 10과 표준품의 함량이 추가되어 peak가 나타나는것을 관찰할 수 있어 연초 Xanthi 품종의 배양세포에서도 ubiquinone이 생성됨을 확인할 수 있었다(Figure 2-D). 이것은 Ikeda 등(1976; 1978)도 연초 BY2 품종에서 동일 추출방법에 의해서 HPLC에 나타나는 single peak는 본 실험과 같은 ubiquinone 10인 것으로 이미 보고한 바와 동일한 결과이다.

상기 실험방법으로 처리된 Xanthi 캘러스의 2,4-D 및 NAA처리에 의한 ubiquinone 10의 함량과 생산성을 조사한

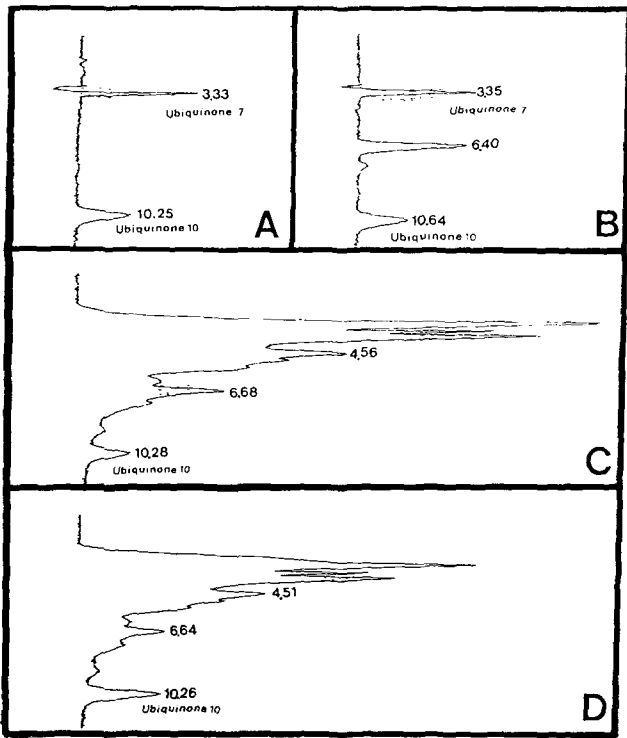


Figure 2. The HPLC Chromatogram of ubiquinone 10 from Xanthi cultured cells and condition of HPLC. A and B are standards of ubiquinone 7 and 10, C is chromatogram for Xanthi cultured cells, D is for Xanthi cultured cells mixed with standard (5 µg/mL) of ubiquinone 10.

결과(Table 2), 비교적 암상태에서 배양했을때 보다 광상태에서 배양했을 경우 ubiquinone 10의 함량이 높은 경향을 보였으며, NAA 단독처리구가 2,4-D와 혼합처리구에 비해 ubiquinone 10의 함량이 높았다(Table 2). 특히 NAA 단독처리구에서는 NAA의 농도가 증가할수록 ubiquinone 10의 함량이 현저히 감소하는 경향을 보였으며 NAA 0.5 mg/L에서 1.858 µg/gfr wt로 ubiquinone 10의 함량이 가장 높았다(Table 2). 또한 캘러스의 성장량과 단위 성장량당 함유한 ubiquinone 10의 함량을 곱하여 표시한 생산성도 NAA 0.5 mg/L 처리구에서 광상태에서 배양했을때 성장량이 높아 (Table 1) 이에 따라 생산성도 가장 높은 경향을 보였다. 이로써 Xanthi 배양세포를 이용하여 ubiquinone 10을 생산하기 위해서는 2,4-D를 첨가하지 않고도 NAA단독처리구를 광상태에서 배양하는 것이 더 효과적인 것으로 사료되었다.

IBA 및 NAA의 혼합처리에 의한 Ubiquinone 10의 생산

IBA와 NAA 혼합 및 단독 처리에 의한 Xanthi 캘러스 성장과 ubiquinone 10 생산을 더욱 증대시키기 위해서 IBA 농도를 0, 1, 3, 5 mg/L 그리고 NAA를 상기 실험에서 ubiquinone 10의 함량이 가장 많았던 0.5 mg/L를 선택하여 (Table 2) 배지에 각각 첨가 및 무첨가한 후 30일간 광배양

Table 2. Effects of 2,4-D and NAA on the production of ubiquinone 10 (UQ10) of callus induced from *N. tabacum* cv Xanthi leaf for 30days in the light and dark.

Phytohormone (mg/L)		Content of UQ10 (µg/g fr wt)		Productivity of UQ10 (µg/flask)	
2,4-D	NAA	Light	Dark	Light	Dark
0	0.5	1.86	1.49	29.34	17.16
	1.0	1.54	0.89	23.70	9.14
	2.0	0.89	0.98	12.44	10.79
0.05	0.5	1.65	1.06	24.20	11.05
	1.0	1.39	1.16	20.71	12.11
	2.0	1.19	0.99	18.88	11.01
0.1	0.5	0.96	0.99	12.87	13.12
	1.0	1.08	0.65	16.35	6.11
	2.0	0.73	0.84	11.01	11.08
0.5	0.5	0.86	0.62	12.82	7.33
	1.0	0.78	0.90	11.05	9.79
	2.0	0.64	0.80	9.26	9.06

Table 3. Effects of IBA and NAA on the production of ubiquinone 10(UQ 10) and the growth of callus induced from *N. tabacum* cv Xanthi leaf for 30 days in the light.

Phytohormone(mg/L)		Fresh weight (g/flask)	Content of UQ10 (µg/gfr wt)	Productivity (µg/flask)
IBA	NAA			
0	0	3.93 ± 0.18	2.91	11.43
	0.5	12.21 ± 1.03	1.93	23.56
1	0	12.45 ± 0.64	1.90	23.66
	0.5	12.26 ± 0.48	2.26	27.69
3	0	12.39 ± 0.35	1.47	18.22
	0.5	13.76 ± 0.59	1.36	18.64
5	0	12.55 ± 0.51	1.79	22.45
	0.5	14.02 ± 0.53	1.15	16.11

하였던 바, 식물호르몬을 전혀 첨가하지 않은 처리구만을 제외하고 모든 처리구에서 생장이 공히 높은 경향을 보였다(Table 3). Ubiquinone 10 함량은 호르몬 무처리구에서 가장 높았으나 생장이 거의 되지 않아 생산성이 매우 낮았고, 생장이 양호한 상태에서는 NAA 0.5 mg/L 단독처리구와 같이 IBA 1.0 mg/L 단독처리구에서 ubiquinone 10의 함량이 비슷한 경향을 보였으며, 오히려 IBA 1.0 mg/L와 NAA 0.5 mg/L 혼합처리에서 2.257 µg/gfr wt로 가장 높았다(Table 3). 이로써 flask당 ubiquinone 10의 생산량도 동처리구에서 27.666 µg/flask로 NAA 0.5 mg/L 단독처리구 23.557 µg/flask 보다 더 높은 경향을 보였다(Table 3).

Kinetin처리에 의한 Ubiquinone 10의 생산

연초 Xanthi 캘러스로부터 ubiquinone 10의 생산에 미치는 kinetin의 영향을 조사하기 위해서 2,4-D가 0.5 mg/L 첨가된 배지에 kinetin를 농도별로 처리하여 광 및 암상태에서 30일간 고체배양하여 Xanthi 캘러스의 성장량과 ubiquinone 10의 함량을 조사한 결과(Table 3), 캘러스의 생장은 암상태에 비해서 광상태가 다소 양호하였으나 NAA, IBA 및 2,4-D

Table 4. Effects of kinetin and light on the production of ubiquinone 10 (UQ10) and the growth of callus induced from *N. tabacum* cv Xanthi leaf.

Conc. of kinetin (mg/L)	Fresh weight (g/flask)		Content of UQ 10 (μ g/g fr wt)		Productivity of UQ 10 (μ g/flask)	
	Light	Dark	Light	Dark	Light	Dark
0.05	5.54	4.02	2.25	3.03	12.49	12.18
0.1	6.39	5.59	2.73	3.68	17.45	20.57
0.5	6.99	5.00	4.97	5.35	34.74	26.75
1.0	6.40	3.46	3.44	6.37	22.02	22.04

혼합처리구(Tables 2, 3)에 비해서 매우 저조한 경향을 보였다. 반면에 ubiquinone 10의 함량은 NAA를 첨가했을 때에는 광상태에서 다소 ubiquinone 10의 함량이 높았던것과는 달리 kinetin의 첨가시에는 광상태보다 암상태에서 더 높은 경향을 보였으며, NAA이 단독처리구(Table 2)나 IBA 및 NAA 혼합처리구(Table 3)에 비해서 훨씬 높은 양의 ubiquinone 10를 함유하고 있었다(Table 4). Kinetin 첨가시 비록 캘러스의 성장량은 적었으나 ubiquinone 10의 함량이 매우 많아 단위 플라스크당 ubiquinone 10의 생산성은 2,4-D 0.5 mg/L와 kinetin 0.5 mg/L에서 광상태일 경우 34.73 μ g/flask, 암상태일 경우 26.75 μ g/flask로 2,4-D 0.5 mg/L와 NAA 0.5 mg/L 혼합첨가한 배지와 IBA 1 mg/L와 NAA 0.5 mg/L 혼합처리된 배지보다 더 높은 경향을 나타내었다(Table 4).

일반적으로 ubiquinone 10은 동물세포에서 연구가 많이 되어 왔으며 식물세포에서도 연초를 제외한 타식물에서도 검출되는 것으로 보고되어 있으나 그 함량은 매우 미미한 것으로 알려져 있다(Threlfall and Whistance, 1970).

본 실험에서는 ubiquinone 10생산을 위해서 Xanthi 품종을 조직배양하여 유기된 캘러스에서 ubiquinone이 합성되고 있음을 확인할 수 있었으며(Figure 2). 이는 이미 Ikeda 등(1976: 1978: 1981)도 연초 BY2 품종을 사용하여 확인한 바 있고, Threlfall 등(1970)도 *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Allium parvum*, *Capsicum annuum*과 *Brassica oleracea* 등의 배양세포에서 검출됨을 보고한 바 있다. 그러나 사용한 배양세포마다 함유하고 있는 ubiquinone 10의 함량은 매우 차이가 있었으며 특히 식물호르몬의 종류와 농도 그리고 배양조건에 따라 차이가 있음을 시사하였다(Ikeda et al., 1976: Ikeda et al., 1978: Ikeda et al., 1981). 본 실험에서도 식물호르몬의 조건을 달리 해줌으로써 Xanthi 품종에서 ubiquinone 10의 생산을 증가시킬 수 있었으며, 특히 2,4-D와 NAA 혼합처리구보다는 NAA 0.5 mg/L 단독처리구에서 ubiquinone 10의 함량이 높아 2,4-D의 첨가에 의해서 오히려 ubiquinone 10의 함량이 감소됨을 관찰할 수 있었다(Table 2). 그러나 Ikeda 등(1978)은 연초 BY2의 경우에는 2,4-D 농도가 증가할수록 5 mg/L까지는 ubiquinone 10의 함량이 증가함을 보고하여 연초품종에 따라 2,4-D에 대한 반응이

서로 다름을 나타내었다. 본 실험에서 NAA 0.5 mg/L 단독처리구보다는 IBA 1 mg/L와 NAA 0.5 mg/L를 혼합처리 하였을 때 ubiquinone 10의 함량이 증가되었으며(Table 3), 2,4-D 0.5 mg/L와 kinetin 0.5 mg/L를 혼합처리하였을 때 ubiquinone 10의 함량이 가장 높아 식물호르몬의 농도와 종류에 따라 ubiquinone 10의 함량을 조절할 수 있음을 시사하였다. 또한 배양조건에 따라서 캘러스의 성장에 많은 차이가 있었는데, 연초 Xanthi 배양세포의 성장의 경우에는 암배양보다는 광배양조건에서 훨씬 양호하였지만 ubiquinone 10의 함량은 서로 다르게 나타났다. 즉 식물호르몬의 종류에 따라 광의 영향이 서로 다르게 나타났는데 NAA첨가시에는 광배양상태에서(Table 2), 그리고 kinetin첨가시에는 암배양상태에서 ubiquinone 10의 함량이 많아(Table 4) 광에 의한 ubiquinone 10의 합성은 커다란 영향을 미치지 않은 것으로 사료된다. 그러나 캘러스의 성장량과 관련한 생산성을 조사 하였을 때는 역시 kinetin과 2,4-D을 혼합처리한 배양구에서 광배양하였을 때 다른 처리구보다 더 양호한 경향을 나타내었다(Table 4). 한편 이렇게 식물호르몬의 처리에 의한 ubiquinone 10의 생산량의 증대는 한계가 있을 것으로 사료되며, ubiquinone 10 생산의 극대화를 위해서는 추가적으로 ubiquinone 10의 생산에 관여된 전구물질들을 첨가함으로써 생산성을 높일 수 있을 것으로 판단되고, 또한 elicitor의 이용과 돌연변이에 의한 고품율 세포주의 선발이 함께 수행되어야 할 것으로 생각된다. 또한 본 실험에서는 연초 Xanthi 품종을 사용하였으나 타식물에서도 더 많은양의 ubiquinone을 함유하고 있을 것으로 사료되는 바, 이런 식물체를 계속해서 찾아야 할 것이다. 더욱이 최근에는 식물유전공학기술의 급격한 발달로 유전자 조작이 보편화됨으로써 ubiquinone의 생산에 관여한 효소의 유전자를 cloning하여 재조합한 후 다시 이용함으로써 ubiquinone의 생산의 실용화를 이루워야 할 것으로 생각된다.

적 요

식물세포의 기내배양에 의한 ubiquinone 10의 생산연구의 일환으로 *Nicotiana tabacum* cv Xanthi 품종으로부터 ubiquinone 10의 생성여부를 확인하고, 식물호르몬의 종류와 농도의 조건에 따른 ubiquinone 10의 생산증대를 조사하고자 본 실험을 수행하였다. Xanthi 캘러스 생장은 NAA 및 2,4-D와 혼합처리시 생장이 양호하였으며 NAA 단독처리구에서도 성장량이 증가되었고 암배양보다는 광배양상태에서 더 양호하였다. 또한 HPLC에 의해서 ubiquinone 10의 생성여부를 조사한 결과 어느 조건에서도 모두 ubiquinone 10이 검출되었다. 식물호르몬에 의한 ubiquinone 10의 함량은 2,4-D와 NAA 혼합처리구에서보다 NAA 0.5 mg/L 단독처리구에서 ubiquinone 10의 함량이 증가되었으며, 특히 IBA 1

mg/L와 NAA 0.5 mg/L 혼합처리구에서 더 양호한 경향을 보였고 단위 플라스크당 ubiquinone 10의 생산량도 더 높았다. 그러나 2,4-D 0.5 mg/L와 kinetin 0.5 mg/L 혼합한 처리구에서는 캘러스의 성장량은 비록 적었지만 ubiquinone 10의 함량이 가장 높아 단위 플라스크당 생산량은 제일 높은 경향을 보였다.

인 용 문 헌

- Furuya T, Kojima H, Syono K, Ishill T (1970) Isolation of panaxytriol from *Panax ginseng* callus. *Chem Pharm Bull.* **18**: 2371-2372
- Furuya T, Kojima H, Syono K, Nishio M (1973) Isolation of saponins and sapogenins from callus tissue of *Panax ginseng*. *Chem Pharm Bull* **21**: 98-101
- Hagimori M, Matsumoto T, Obi Y (1982) Studies on the production of digitalis cardenolides by plant tissue culture. *Plant Physiol* **69**: 653-656
- Ikeda T, Matsumoto T, Noguchi M (1976) Formation of ubiquinone by tobacco plant cell in suspension culture. *Phytochemistry* **15**: 58-569
- Ikeda T, Matsumoto T, Noguchi M (1978) Effect of auxins on the formation of ubiquinone by tobacco plant cells in suspension culture. *Phytochemistry* **17**: 1879-1883
- Ikeda T, Matsumoto T, Kisaki T, Noguchi M (1980) Subcellular distribution of ubiquinone and the content of ubiquinone and other electron carriers in the mitochondria isolated from tobacco cultured cells. *Agric Biol Chem* **44**: 135-142
- Ikeda T, Matsumoto T, Obi Y, Kisaki T, Noguchi M (1981) Characteristics of cultured tobacco cell strains producing high levels of ubiquinone 10 selected by a cell cloning technique. *Agric Biol Chem* **45**: 2259-2263
- Masumoto T, Ikeda T, Kisaki T, Noguchi M (1980) Selection of high ubiquinone producing strain of tobacco cultured cells by cell cloning technique. *Agric Biol Chem* **44**: 967-969
- Mono Y, Nabeshima S, Matsui C, Ohkawa H (1986) Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia japonica*. *Agric Biol Chem* **50**: 2715-2722
- Yamada Y, Hashimoto T (1990) Possibilities for improving yields of secondary metabolites on plant cell culture. *In Progress in plant cellular and molecular biology*. Kluwer Academic Publishers pp 547-554
- Yoshikawa T, Furuya T (1987) Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports* **6**: 449-453
- Threlfall DR, Whistance GR (1970) Biosynthesis of ubiquinone - a search for polyprenyl phenol and quinone precursors. *Phytochemistry* **9**: 355-359

(1994년 10월 22일 접수)