

미치광이풀 모상근 배양에서 적정 sucrose 농도 및 hydroxyapatite 첨가에 의한 tropane alkaloid 생산성 향상

안준철^{1*} · 양선주² · 표병식³ · 최지원 · 황백

전남대학교 생물학과 및 호르몬 연구센터, ¹서남대학교 생물학과,
²전남대학교 의과대학 내과교실, ³동신대학교 식품생물공학과

Improvement of Tropane Alkaloid Productivity by Optimization of Sucrose Concentration and Addition of Hydroxyapatite in Hairy root Cultures of *Scopolia parviflora*

AHN, Jun Cheul^{*1} · YANG, Sun Joo² · PYO, Byung Sik³ · CHOI, Ji Weon · HWANG, Baik

Department of Biology and Hormone Research Center, Chonnam National University, Kwangju, 500-757, Korea:

¹Department of Biology, Seonam University, Namwon, 590-170, Korea: ²Department of Internal Medicine, Medicinal College, Chonnam National University, Kwangju, 500-757, Korea: and ³Department of Food and Biotechnology, College of Engineering, Dongsin University, Naju, 500-714, Korea: *Corresponding author.

The effects of sucrose concentration and some absorbents on growth and tropane alkaloid production in hairy root cultures of *Scopolia parviflora* were investigated. The maximum effect on growth and tropane alkaloid production in hairy root clone SP11 was obtained for 1/2 B5 medium containing 5% sucrose. The production pattern of tropane alkaloid in hairy roots was some different from that of rhizome of mother plant, particularly showing high littorine contents, which was not found in ordinary roots. Among absorbents examined, charcoal 0.01% and XAD-II 1% made a slight growth promotion effect, whereas the other concentration of charcoal, XAD-II and absorbents (amberlite and chitosan) showed inhibition or no significant effect. The addition of hydroxyapatite enhanced the production of tropane alkaloids significantly than control cultures.

Key words: absorbents, charcoal, XAD-II, amberlite, chitosan

식물에 존재하는 alkaloid는 매우 많은데 현재 약 30 종이 상업적으로 이용되고 있다(Verpoorte et al., 1993). 그 중 scopolamine과 hyoscyamine은 진통과 진정효과 등이 있는 의학적으로 중요한 약용성분으로 가지과 식물인 *Atropa*, *Datura*, *Duboisia*, *Hyoscyamus* 및 *Scopolia* 등에 많이 함유되어 있다. Tropane alkaloid는 탈분화된 세포배양을 통해서 생산이 용이하지 않으며(Staba and Jindra, 1968: Street et al., 1969: Yamada and Hashimoto, 1982), 뿌리에서 합성되어 있으므로 수송되는 특성이 확인되었다(Endo and Yamada, 1984). 또한 기내에서 배양되는 뿌리에서도 이들 tropane alkaloid의 생합성이 활발하여 부정근 또는 모상근 배양을 통하여 원식물의 뿌리에 비교되는 수준 또는 그 이

상의 생산이 보고되었다(Flores and Filner, 1985: Knopp et al., 1988: Christen et al., 1989: Shimomura et al., 1992). 특히 최근에는 hyoscyamine 6 β -hydroxylase 유전자를 클로닝하여 hyoscyamine를 보다 부가가치가 높은 scopolamine로의 전환에 이용하는 등(Yun et al., 1992: Hashimoto et al., 1993) tropane alkaloid 생합성의 이해와 그 응용이 굉장히 빠르게 진행되고 있다(Dräger et al., 1991: Sauerwein et al., 1993: Chesters et al., 1995).

한편 저자 등은 미치광이풀속 식물 중 *Scopolia japonica*와 *S. tanctica* 등에 비교하여 tropane alkaloid 함량이 높은(Konoshima et al., 1972) 한국특산식물인 미치광이풀(*S. parviflora*)을 재료로 모상근 배양을 확립하고 클론간의 생

장 및 tropane alkaloid 생산에의 차이를 보고한 바 있다 (Ahn et al., 1993). 미치광이풀에서 유도, 선발된 모상근 각 클론은 몇 년 동안 성장속도나 주요성분의 생산능에 있어서 그 특성이 안정적으로 유지되고 있으며, tropane alkaloid 함량에서 건중량비 0.2 ~ 0.6%인 *Datura* 종의 모상근과 0.1 ~ 0.7%인 *Hyoscyamus* 종 모상근(Knopp et al., 1988)에 비교하여 약 0.5%의 함량을 보이고 있다. 특히 모식물체에서는 극히 적은 양을 생성하거나 검출이 용이하지 않은 littorine이 다량 생산되는 점(미발표 자료) 등을 고려할 때 tropane alkaloid 대사와 tropane alkaloid 생산에 관한 연구에 좋은 자료가 될 수 있을 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 선발, 유지되고 있는 미치광이풀에서 유도한 모상근 클론 SP 11 (Ahn et al., 1993)을 사용하여 모상근의 성장과 6 β -hydroxyhyoscyamine, 7 β -hydroxyhyoscyamine, scopolamine, hyoscyamine, littorine 등 주요 tropane alkaloid의 생성패턴에서의 변화와 총생산에 최적의 배양조건의 탐색을 목적으로 몇가지 기본배지와 sucrose 농도변화에 따른 효과를 조사하였다. 아울러 배지에 charcoal, chitosan, amberlite, XAD-II 및 hydroxyapatite 등의 흡착제를 첨가하였을 때 미치광이풀 모상근의 성장과 tropane alkaloid 생산 등에 미치는 영향을 조사하여 이후의 연구에 기초자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

광릉 수목원에서 분양받은 미치광이풀(*Scopolia parviflora* Nakai)의 지하경을 재료로 *Agrobacterium rhizogenes* A4 strain의 접종에 의해 유도·배양되고 있는 모상근 클론 SP 11 (Ahn et al., 1993)을 본 실험의 재료로 사용하였다.

모상근의 최적배양

모상근의 성장에 가장 적합한 배지를 선정하기 위하여 MS (Murashige and Skoog, 1962), B5 (Gamborg et al, 1968), WPM (Lloyd and McCown, 1981), RCM (White and Nester, 1980) 배지의 macro element를 1/2, 1/4로 각각 희석한 액체배지(30 mL)를 100 mL Erlenmeyer flask에 넣고 생장이 양호한 모상근을 뿌리끝으로부터 약 1 cm 가량 절취하여 3개씩을 이식한 후 4주 간격으로 동일 조성의 액체배지에서 암배양(25°C, 100 rpm)하였다. 배지내 sucrose 농도에 따른 모상근의 성장을 알아보기 위하여 1/2 B5 기본배지에 sucrose 농도를 3%에서 8%까지 변화시킨 다음 뿌리끝 3개씩을 이식한 후 4주간 배양하였다. 각 모상근은 여과지로 수분을 충분히 제거한 다음 생중량을 측정하였으며, 동

일시료를 48시간 동결건조하여 건중량을 각각 측정하였다. 건조시료 중 일부는 tropane alkaloid의 분석에 사용하였다.

몇가지 흡착제가 tropane alkaloid의 생산에 미치는 효과

배지내에 charcoal, chitosan, amberlite, XAD-II 및 hydroxyapatite 등의 흡착제 첨가가 모상근의 성장효과를 알아보기 위하여 1/2 B5 배지(sucrose 5%)에 각 흡착제를 0.01, 0.1, 1% 농도로 첨가(hydroxyapatite의 경우는 약 0.485 g의 tablet 처리)하고 약 1 cm의 근단 3개씩을 이식한 후 4주간 배양(25°C, 100 rpm)하여 생중량과 건중량을 측정하였으며, 필요에 따라서는 tropane alkaloid의 함량을 조사하였다. Hydroxyapatite의 최적 처리 량 및 구성원소의 영향여부를 확인하기 위하여 calcium-bis(dihydrogenphosphate)monohydrate를 10, 50, 100, 1000 μ M의 농도로 처리하고 근단 3개씩을 이식한 후 3주간 배양하여 모상근의 성장에 미치는 영향을 조사하였다.

Tropane alkaloid의 추출 및 분석

Tropane alkaloid의 추출은 마쇄된 모상근 건조량 약 50 mg을 추출액(CHCl₃ : methanol : NH₄OH, 15:5:7)의 혼합액 5 mL에서 20분간 sonification 시킨다음 여과지로 여과한 후 여과액을 40°C에서 감압 농축하였다. 농축액 2 mL에 1N H₂SO₄ 5 mL와 CHCl₃ 1 mL 넣어 pH 3 이하로 조정하고 충분히 섞어 주었다. 하층의 CHCl₃ 층을 제거한 다음 4°C 하에서 암모니아수로 pH를 약 12로 조정하고 1 mL의 CHCl₃로 3회 분리하고 혼합한 용액을 여과지로 여과한 다음 N₂ gas 하에서 농축건조시켰다. 농축된 시료는 냉동실에 완전 밀폐 보관하면서 HPLC와 TLC 분석시 150-300 μ L의 MeOH에 용해시켜 사용하였다. HPLC 분석은 Waters사 (U.S.A)의 600 pump 및 486 tunable absorbance detector와 PC 800 integrator를 이용하였으며, column은 TSK gel ODS-120A (4.6 mm ID \times 25 cm, Toyo Soda Manufacturing Co., Ltd. Japan)을 이용하였다. 분리용매는(acetonitrile-10 mM SDS, pH 3.3)을 1.1 mL/min의 속도로(Kamada et al., 1986) 화합물을 용출하였다. 검출은 250 nm에서의 흡광도로 측정하였다. 표준품은 7 β -hydroxyhyoscyamine, 6 β -hydroxyhyoscyamine, scopolamine 및 hyoscyamine은 Sigma 사 (U.S.A)에서 구입하였고 littorine은 일본 쓰꾸바 약용작물연구소의 Dr. Shimomura로부터 공급받아 사용하였다.

결과 및 고찰

유도된 모상근의 배양에 적합한 기본배지를 찾기 위하여 MS, WP, B5 등의 배지와 이들 배지의 macro element를 1/2

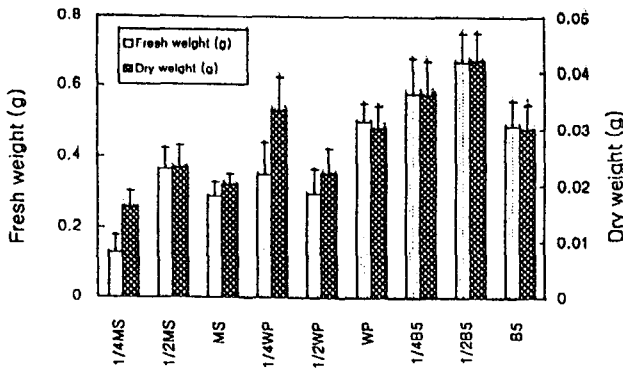


Figure 1. The effect of various culture media containing 3% sucrose on the growth of hairy roots of *S. parviflora* for 4 weeks at 25°C in the dark. Bars represent standard errors.

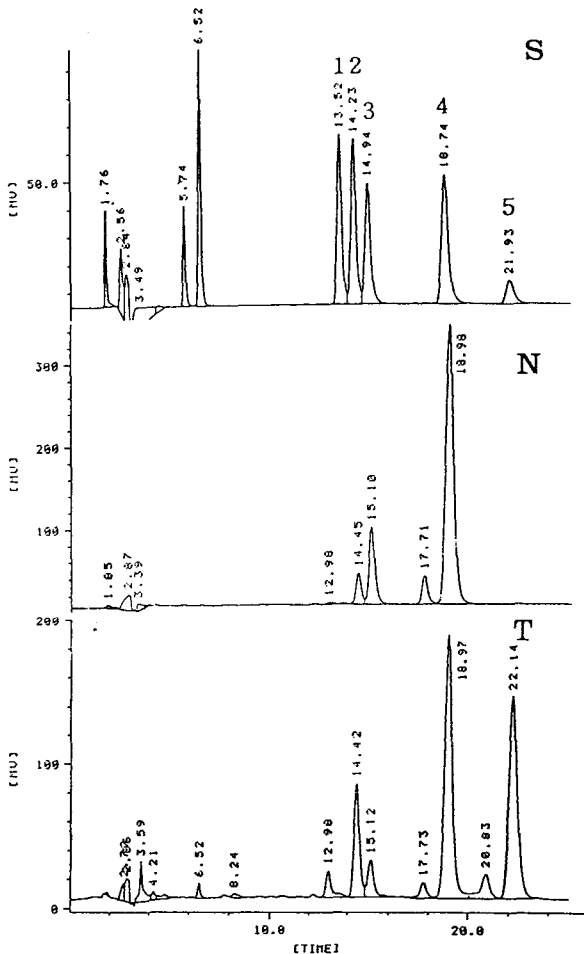


Figure 2. High performance liquid chromatogram of tropane alkaloids extracted from rhizome (1 year old) and *S. parviflora* hairy root clone SP 11 cultured in 1/2 B5 liquid media containing 5% sucrose for 4 weeks at 25°C in the dark. S: standard chemicals, N: rhizome of mother plant, T: hairy roots: 1: 6 β -hydroxyhyoscyamine, 2: 7 β -hydroxyhyoscyamine, 3: scopolamine, 4: hyoscyamine 5: littorine

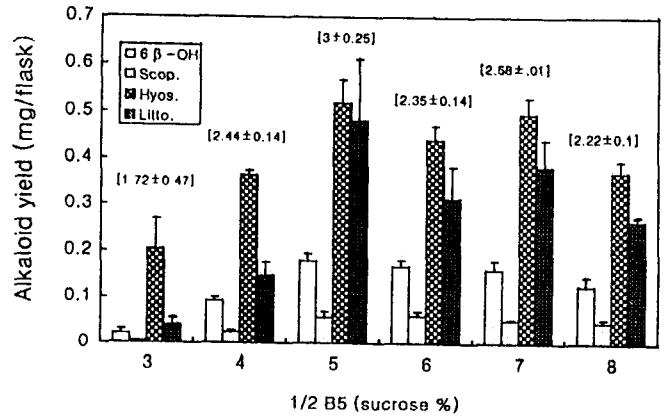


Figure 3. Growth (fresh wt) and tropane alkaloid yields of *S. parviflora* hairy root clone SP 11 cultured in 1/2 B5 liquid media containing various sucrose concentration for 4 weeks at 25°C in the dark. Values in brackets show fresh wt (g per 100ml flask \pm standard error). Bars represent standard errors. 6 β -OH: 6 β -hydroxyhyoscyamine, Scop.: scopolamine, Hyos.: hyoscyamine, Litto.: littorine.

과 1/4로 각각 희석한 배지에서 4주간 배양하여 모상근의 성장률을 조사한 결과, 1/2 B5 배지에서 생중량(0.67 \pm 0.3 g)과 건중량(0.04 \pm 0.03 g) 모두 최고치를 보였다(Fig. 1).

1/2 B5 배지(5% sucrose)를 기본배지로 배양된 모상근과 1년생 재배근경의 tropane alkaloid 생성양상을 비교해본 결과, 7 β -hydroxyhyoscyamine은 두 경우 모두 검출되지 않았으나 모상근에서는 hyoscyamine에 비해 scopolamine의 함량이 상대적으로 낮고 재배근에서는 전혀 검출되지 않는 littorine의 생성이 두드러졌다(Fig. 2).

1/2 B5 배지에 sucrose를 3%~8%까지 변화시켜 모상근의 성장과 tropane alkaloid 생성을 조사한 결과, 5%의 농도에서 성장(3 \pm 0.25 g)과 tropane alkaloid 생산(6 β -hydroxyhyoscyamine, 0.18 \pm 0.02 mg/ 100 mL flask: scopolamine, 0.06 \pm 0.01 mg: hyoscyamine, 0.52 \pm 0.05 mg: littorine, 0.48 \pm 0.13 mg)에서 가장 높았으며, littorine/hyoscyamine 비에 있어 다른 조건(3%, 0.16: 4%, 0.45: 6%, 0.65)에서와 비교하여 매우 높은 수치인 0.92를 보였다(Fig. 3).

몇가지 흡착제가 미치광이풀 모상근의 성장과 tropane alkaloid 생산에 미치는 효과를 조사한 결과, charcoal 0.01%와 XAD-II 1%에서 약간의 성장촉진효과를 제외하고는 charcoal과 amberlite는 0.1%와 1% 농도에서 오히려 성장을 저해하는 효과를 보였으며, chitosan과 XAD-II의 다른 농도의 처리구에서는 유의적인 변화를 보이지 않았다(data 미제시). 반면에 hydroxyapatite의 경우(1 tablet 처리)는 대조구(1/2 B5, 5% sucrose)의 성장 (0.25 \pm 0.02 g)과 생산(6 β -hydroxyhyoscyamine, 0.02 \pm 0.02 mg/ 100 mL flask: scopolamine, 0.01 \pm 0.01 mg: hyoscyamine, 0.50 \pm 0.05 mg: littorine, 0.48 \pm 0.04 mg)에 비교하여 성장(0.58 \pm 0.04 g)에

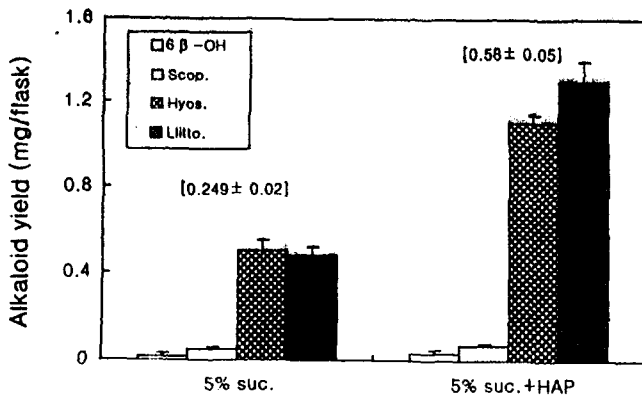


Figure 4. Growth (dry wt) and tropane alkaloid yields of *S. parviflora* hairy root clone SP 11 cultured in 1/2 B5 liquid media containing 5% sucrose concentration for 4 weeks at 25°C in the dark. Values in brackets show dry wt (g per 100ml flask=standard error). Bars represent standard errors. HAP: hydroxyapatite (0.485 g tablet), 6β-OH, 6β-hydroxyhyoscyamine, Scop.: scopolamine, Hyos.: hyoscyamine, Litto.: littorine.

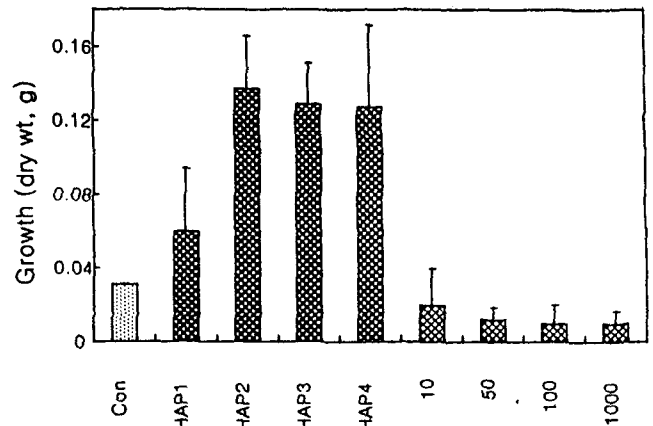


Figure 5. Growth (dry wt) of *S. parviflora* hairy root clone SP 11 cultured in 1/2 B5 liquid media (5% sucrose) containing hydroxyapatite (1~4 tablets) and calcium-bis (dihydrogenphosphate) monohydrate for 3 weeks at 25°C in the dark. Bars represent standard errors. Con: control

서 2.4 배의 촉진효과와 각 tropane alkaloids 생산(6β-hydroxyhyoscyamine, 0.03 ± 0.02 mg/ 100 mL flask, scopolamine, 0.07 ± 0.01 mg; hyoscyamine, 1.10 ± 0.08 mg; littorine, 1.3 ± 0.1 mg)에 있어서 약 2.5 배의 촉진효과를 나타내었으며, littorine/hyoscyamine 비에 있어 1.16를 나타내었다(Fig. 4). 이러한 결과와 함께 hydroxyapatite의 적정량 및 hydroxyapatite의 구성 성분인 Ca²⁺과 phosphate 자유 이온의 모상근 성장에 대한 영향의 유무를 확인하였던 바, hydroxyapatite는 2 tablet(1 tablet: 약 0.5 g) 처리에서 최대 효과(0.137 ± 0.03 g)를 나타냈으며 3개(0.1287 ± 0.02 g), 4개(0.1275 ± 0.04 g)로 증가하였을 경우 2개 처리구에 비교하여 유의적인 증가를 보이지 않았으며 calcium-bis(dihydrogenphosphate) monohydrate는 모든 처리구에서 오히려 억제효과를 나타내었다(Fig. 5).

이상의 결과, 미치광이풀 모상근 클론 SP 11 역시 다른 모상근 배양(Gränicher et al., 1992a)에서와 마찬가지로 기본 배지, 탄소원의 농도 및 흡착제 처리 등 배양 환경의 변화에 따라서는 tropane alkaloid의 생산성을 높일 수 있는 것으로 확인되었다. 특히 탄소원의 농도변화나 hydroxyapatite의 처리에 의한 성장촉진효과와 tropane alkaloid의 함량 증가가 비례하고있어 배양세포에서의 세포증식속도와 2차대사물질의 생성이 반비례하는 예(Gränicher et al., 1992b)와는 대조되었다. 1/2 B5 배지, sucrose 5% 및 hydroxyapatite 1 tablet 처리 조건에서 root tip 3개(약 0.005 g)를 30 mL/ 100 mL Δflask에 이식하여 3주간 배양한 결과 주요 성분인 hyoscyamine이 1L 당 47 mg 생산되므로써 *Datura stramonium* 모상근 0.2 g를 B5 배지와 3% sucrose 조건의 50 mL/ 250 100 mL Δflask에 이식하고 4주간 배양하여 hyoscyamine이 1L 당 50~100 mg 얻어진 결과(Payne et al., 1987)에 비교되는 비교적 높은 생산을 나타냈다. 따라서 지

금까지 얻어진 결과에 추가하여 미치광이풀 모상근 배양에 적합한 배양조건의 규명여하에 따라서는 모상근의 성장과 tropane alkaloid 생산성을 충분히 개선시킬 수 있다고 생각된다. 한편 모상근과 모식물 근경에서의 tropane alkaloid 생성양상에서의 차이, 즉 모식물에서는 검출되지 않는 littorine이 모상근에서는 높게 생산되는 점과 sucrose 농도별 배양 및 hydroxyapatite 처리로 hyoscyamine/littorine의 함량비에 변화를 보인 점 등은 littorine의 hyoscyamine 전구체로서의 역할의 논란에 대한 최근의 연구(Chesters et al., 1995)를 보다 체계적으로 할 수 있는 좋은 연구재료가 될 수 있을 것으로 사료된다. 또한 hydroxyapatite [Ca₅(PO₄)(OH)]가 보이는 모상근의 성장촉진효과는 다공성과 hydroxy기에 의한 배양세포에서 분비되는 특정한 성장 저해물질의 선택적 흡착에 따른 효과로 추정되며 이 후 이러한 물질의 분리 동정이 있어야 할 것으로 보인다.

적 요

미치광이풀(*Scopolia parviflora* Nakai) 모상근 배양에서 모상근 성장과 tropane alkaloid 생산에 대한 sucrose 농도와 일부 흡착제의 효과를 조사하였다. 모상근 클론 SP 11은 5% sucrose 농도를 함유한 1/2 B5 배지에서 최적인 성장과 tropane alkaloid 생산을 보였다. 모상근에서 tropane alkaloids 생성양상은 모식물에서와 약간의 차이를 보였고 그 중 식물체에서 검출되지 않는 littorine의 생성이 모상근에서 두드러졌다. 조사된 흡착제(0.01% 1%) 중에서, charcoal 0.01%와 XAD-II 1%에서 약간의 성장촉진효과를 보인 것을 제외하고는 그 외 농도나 흡착제(amberlite, chitosan)에서는 억제효과 또는 유의적인 변화를 보이지 않았다. 반면에

hydroxyapatite는 미치광이풀 모상근의 성장과 tropane alkaloid 생산에 있어 촉진효과가 있음이 확인되었다.

사시-본 연구는 교육부 기초과학연구소 학술연구조성비(BSRI-96-4424) 및 호르몬연구센터의 연구비(96K3-0408-02-02)지원에 의하여 수행되었으며, Hydroxyapatite 합성과 관련된 조언을 해주신 전남대 무기재료공학과 임용무 박사에게 감사드립니다.

인용문헌

- Ahn JC, Jung BG, Paek YW, Kim YJ, Ko KM, Hwang SJ, Hwang B (1993) Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia parviflora*. J Plant Biol 36: 225-231
- Chesters Nicola CJE, O'Hagan D, Robins RJ (1995) The biosynthesis of tropic acid: the (R)-D-phenylacetate moiety is processed by the mutase involved in hyoscyamine biosynthesis in *Datura stramonium*. J Chem Soc Commun 129-130
- Christen P, Roberts MF, Phillipson JD, Evans WC (1989) High-yield production of alkaloids by hairy root cultures of a *Datura candida* hybrid. Plant Cell Rep 8: 75-77
- Dräger B, Schaal A (1991) Isolation of pseudotropine-forming tropinone reductase from *Atropa belladonna* root cultures. Planta Med 57: supplement issue 2, A9
- Endo T, Yamada Y (1984) Tropane alkaloid production in cultured cells of *Duboisia*. Phytochemistry 24: 1233-1236
- Flores HE, Filner P (1985) Hairy root of Solanaceae as source of alkaloids. Plant Physiol 77: 4 supplement 12
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res 50: 151-158
- Gränicher F, Christen P, Kapetanidis I (1992a) High-yield production of valepotriates by hairy root cultures of *Valeriana officinalis* L. var. *sambucifolia* Mikan. Plant Cell Rep 11: 339-342
- Gränicher F, Christen P, Kapetanidis I (1992b) Production of valepotriates by hairy root cultures of *Valeriana officinalis* var. *sambucifolia*. Planta Med 58: supplement issue 1
- Hashimoto T, Yun DJ, Yamada Y (1993) Production of tropane alkaloids in genetically engineered root cultures. Phytochemistry 32: 713-718
- Kamada H, Okamura N, Satake M, Harada H, Shimomura K (1986) Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. Plant Cell Rep 5: 239-242
- Knopp E, Strauss A, Wehrli W (1988) Root induction on several Solanaceae species by *Agrobacterium rhizogenes* and the determination of root tropane alkaloid content. Plant Cell Rep 7: 590-593
- Konoshima M, Tabata, Yamamoto M, Hiraoka N (1972) Organization and alkaloid production in tissue cultures of *Scopolia parviflora*. Phytochemistry 11: 949-955
- Lloyd G, McCown B (1981) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Int Plant Prop Soc Proc 30: 421-427
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497
- Payne J, Hamill JD, Robins RJ, Rhodes MJC (1987) Production of hyoscyamine by hairy root cultures of *Datura stramonium*. Planta Med: 474-478
- Sauerwein M, Shimomura K, Wink M (1993) Incorporation of 1-¹³C-acetate into tropane alkaloids by hairy root cultures of *Hyoscyamus albus*. Phytochemistry 32: 905-909
- Shimomura K, Aoki T, Christen P (1992) Characteristics of growth and tropane alkaloid production in *Hyoscyamus albus* hairy roots transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A4. Plant Cell Rep 11: 597-600
- Staba EJ, Jindra A (1968) *Datura* tissue cultures; production of minor alkaloids from chlorophyllous and nonchlorophyllous strains. J Pharm Sci 57: 701-704
- Street HE, Raj Bhandary SB, Collin HA, Thomas E (1969) Root, callus, and cell suspension cultures from *Atropa belladonna* L. and *Atropa belladonna* cv. *lutea* doll. Ann Bot 33: 647-656
- Yamada Y, Hashimoto T (1982) Production of tropane alkaloids in cultured cells of *Hyoscyamus niger*. Plant Cell Rep 1: 101-103
- Yun DJ, Hashimoto T, Yamada Y (1992) Metabolic engineering of medicinal plants: transgenic *Atropa belladonna* with an improved alkaloid composition. Proc Natl Acad Sci 89: 11799-11803
- Verpoorte, R, R. van der Heijden, Schripsema J (1993) Plant cell biotechnology for the production of alkaloids: present status and prospects. J Nat Prod 56: 186-207
- White FF, Nester EW (1980) Hairy root; plasmid encodes virulence traits in *A. rhizogenes*. J Bac 141: 1134-1141

(1997년 8월 14일 접수)