

면역증강성 다당 생산을 위한 참당귀 세포배양의 최적조건

안경섭 · 서원택¹ · 심웅섭² · 김익환^{3*}

생명공학연구소, ¹진주산업대 식품가공학과, ²고려대학교 생물학과, ³고려대학교 생명공학원

Optimal Conditions for the Production of Immunostimulating Polysaccharides from the Suspension Culture of *Angelica gigas* Cells. Ahn, Kyung-Seop, Weon Taek Seo¹, Woong Seop Sim², and Ik-Hwan Kim^{3*}. Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Yusong P.O., Box 115, Taejon 305-600, ¹Department of Food Science & Technology, Chinju National Univ. Chinju, Kyeongnam 660-758, ²Department of Biology, ³Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea – An immunostimulating polysaccharide was produced from the suspension culture of *Angelica gigas* H4 plant cells. In order to enhance the polysaccharide production by the *A. gigas* cell culture, medium composition and physical conditions were optimized. Schenk and Hildebrandt (SH) medium was selected as an optimal basal medium for the growth of *A. gigas*. The maximum cell and polysaccharide concentration obtained in SH medium were 15.8 g DCW/l and 0.85 g polysaccharide/l, respectively, at 25°C under dark condition. For the enhanced polysaccharide production, a polysaccharide production medium (PPM) was established by modifying Gamborg B5 medium with optimized carbon sources, growth regulators, organic and inorganic elements. Optimal initial pH and temperature were 6.0-6.6 and 20°C, respectively, and the dark condition was better than the light condition. The maximum polysaccharide concentration of 1.5 g/l could be obtained through the optimization of the medium composition and physical conditions.

Key words: *Angelica gigas* Nakai, immunostimulating polysaccharides, suspension culture, polysaccharide production medium (PPM)

식물 세포배양을 통해 유용물질을 생산하고자 하는 연구는 1970년대 이후 활발히 진행되었으며, 1980년대에 와서 자초(*Lithospermum erythrorhizon*) 세포배양을 통한 shikonin[22]과 황련(*Coptis japonica*) 세포배양에 의한 berberine[10]이 상업적으로 생산된 바 있고 sanguinarine[5], taxol[8] 등도 조만간 상업적으로 생산될 전망이다. 또한 *Catharanthus roseus* 암화세포(tumorous cell) 배양에 의한 alkaloid 생산[9]이 보고된 바 있다. 식물세포 배양조건을 최적화하여 2차 대사산물 생산을 극대화하려는 많은 연구가 있었는데 *Thalictrum minus* 세포배양에 의한 berberine 생산[14], *L. erythrorhizon* 세포배양에 의한 shikonin 생산[16], *Panax ginseng* 세포배양에 의한 ginsenoside 생산[27], 그리고 *C. roseus* 세포배양에 의한 alkaloid 생산[6, 7] 등이 있다.

당귀는 보혈강장, 진통 작용을 목적으로 부인과 질환(냉증, 빈혈, 혈행장애, 및 정신증상)에 주로 쓰인다. 한방에서는 주로 血虛不足, 血症, 行血, 活血, 養血, 產前產後, 頭痛 등에 이용된다[26]. 당귀는 산형과(Umbelliferae)에 속하는 식물로서 한국에서는 주로 참당귀

(*Angelica gigas* Nakai)를 사용하고 있다[20]. 지금까지 알려져 있는 참당귀의 성분은 coumarine계 물질인 decursin, decursinol, nodakenetin, umbelliferon, nodakenin, β-sitosterol 등이다[12]. 지금까지 이들 물질의 약리학적 연구는 거의 없는 실정이었는데, 최근 본 연구팀에 의해 decursin과 decursinol angelate가 세포독성을 나타낼 뿐 아니라 protein kinase C(PKC) 활성화에 관여하는 것으로 밝혀졌다[1, 2]. 또한 참당귀로부터 면역 증강활성을 갖는 2종의 다당성분이 분리되었고[3], 동물실험 결과 일부의 다당성분에서 면역증강과 연관된 항암활성이 있음이 밝혀졌다(unpublished).

참당귀 세포배양을 통해 유용성분을 생산하고자 하는 시도는 아직 없었다. 본 저자들은 참당귀의 유식물체로부터 면역증강성 다당을 생산·분비하는 세포주를 확립한 바 있는데[4], 본 연구에서는 세포현탁배양을 통하여 면역증강성 다당의 효율적 생산을 위한 최적배지와 최적 배양조건을 확립하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 시약

참당귀 종자는 서울 종로 6가 한국약초(주)에서 구입

*Corresponding author
Tel. 82-2-3290-3447, Fax. 82-2-927-9028
E-mail: ihkkim@kuccnx.korea.ac.kr

하여 사용하였다. 종자를 70% ethanol(EtOH)로 1분, 20% 락스(NaOCl 함유량 4%)로 20분 동안 표면 살균한 다음, 멸균 중류수로 3회 세척하고 여과지 위에서 건조시켰다. 건조된 종자는 Murashige and Skoog(MS) 배지(IAA 0.5 mg/l 포함)에 치상하고 25°C 항온기에서 발아시켰다. 발아 후 1개월 이상 계속 무균적으로 생육시킨 다음 유식물체를 뿌리, 하배축, 떡잎, 줄기, 그리고 잎의 부위별로 0.3-0.5 cm 크기의 절편을 만들어 캘러스 유도를 위한 재료로 사용하였다.

식물세포 배양배지인 MS[17], Gamborg B5[11], Schenk and Hildebrandt(SH, 21), White 배지[24], 2,4-D와 kinetin, 무기영양원, 유기영양원, 및 탄소원은 Sigma사(USA)로부터 구입하여 사용하였다.

배지조성 및 캘러스 유도

본 연구에서 사용한 배지는 탄소원으로서 30 g/l sucrose, 식물생장 조절물질로 2 mg/l 2,4-D와 1 mg/l kinetin을 함유하는 상기 배지를 사용하였다. 배지의 pH는 2N NaOH를 가지고 5.8로 조정하였으며, 고체배지인 경우 agar를 0.9%가 되도록 첨가하여 조제하였다.

캘러스 유도를 위해서는 무균적으로 발아시킨 유식물체의 여러 부위별 절편을 SH 또는 MS agar 배지에 치상하였는데 이때 식물생장 조절물질을 2 mg/l 2,4-D와 1 mg/l kinetin 농도로 첨가하였고 25°C 항온기에서 암조건으로 캘러스를 유도하였다.

면역 증강활성 다당 고생산 세포주 선발

발아된 지 1개월이 지난 유식물체를 각각의 부위별로 상기의 방법으로 절편을 만들어 식물생장 조절물질을 2 mg/l 2,4-D와 1 mg/l kinetin 농도로 제한한 SH agar 배지에 치상하여 25°C 항온기에서 암조건으로 1개월간 유지시키며 캘러스를 유도하였다. 유도된 캘러스는 각각 습윤세포중량(fresh cell weight, FCW)을 측정한 후 말려서 곱게 세포를 분쇄하였다. 중류수에 혼탁한 다음 Whatman filter paper(No. 2)에 거른 후 물로 1회 세척하였다. 이 여과액에 70% 에탄올을 부가하여 생긴 침전물을 상등액을 따로 분리해 내어 각각 다당의 양을 측정하였다.

현탁배양

선발된 세포주는 SH 배지에서 혼탁배양을 유도하였다. 40 ml의 배지가 들어 있는 250 ml 삼각 flask에 캘러스를 약 1 g 접종하고 25°C, 100 rpm, 암조건하의 회전진탕배양기에서 배양하였는데 2주 간격으로 10%(v/v)의 접종량으로 계대배양을 하였다. 고체배지에서 증식시키던 캘러스로부터 새로이 혼탁배양을 유도하는 경우에는 액체배지에서 3회 이상 계대배양하여 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 광조건에서 배양하는 경우에는 2,500

lux의 백색 형광을 50 cm 거리에서 조사하면서 진탕배양하였다.

배양세포와 배양액으로부터 다당류 분리

배양이 끝난 당귀세포는 Whatman filter paper(No. 2)에 거른 후 물로 1회 세척하였다. 세척한 당귀 세포는 동결건조한 후 곰게 마쇄하여 물에 녹여낸 다음 같은 filter paper로 다시 여과하였다. 이 여과액과 배양액에 각각 3배의 EtOH을 부가하여 생긴 침전물을 원심분리를 통해 수획한 후 다시 한번 물에 녹인 다음 EtOH 침전시켰다. EtOH 침전물은 감압증류기에서 농축한 후 투석막 (MWCO 10,000 dal)에 넣어 흐르는 물에 투석한 다음 냉동건조하여 보관하였다.

분석방법

세포증식량 측정 세포증식량은 Whatman filter paper(No.2)를 사용하여 세포를 배양액으로부터 분리한 후 습윤세포중량(FCW)을 측정하고, 다시 90°C의 열풍건조기에서 1일간 건조한 다음 건조세포중량(dry cell weight, DCW)을 측정하였다.

탄소원으로 사용된 당의 정량 탄소원으로 사용되는 당의 정량은 ion exclusion HPLC를 이용하였는데 column은 Bio-Rad사의 Aminex HPX-87H ion exclusion column을, 이동상은 0.02 N sulfuric acid, 유속은 0.5 ml/min, 그리고 검출은 RI detector를 사용하였으며 주입량은 300 μl이었다. 탄소원이 sucrose인 경우 배양 초기에 가수분해되어 생기는 glucose와 fructose의 농도는 HPLC 검량선을 이용하여 정량하였다.

다당류 정량 배양액의 다당류 정량은 3배 용량의 EtOH을 부가하여 생긴 EtOH 침전물을 원심분리하여 수획한 후, 중류수로 1회 세척하고 다시 EtOH 침전시켜서 얻은 침전물을 90°C 열풍건조기에서 1일간 말린 후 무게를 측정하였다.

결과 및 고찰

선발된 세포주의 혼탁배양 특성

면역증강성 다당을 생산하기 위한 당귀세포주는 유식물체의 하배축에서 유도된 캘러스로부터 생육속도가 빠르고 다당의 생산성이 가장 높은 H4 세포주가 최종 선발되었는데[4], 이렇게 수립된 세포주의 혼탁배양 특성을 살펴보았다. 선발된 세포주 H4의 캘러스 형태는 무르고 백색을 띠고 있었으며 2개월 이상 방치하면 황갈색으로 변색되며 죽었다. 이는 배지내 탄소원의 고갈과 점성의 증가로 인한 산소공급의 제한, 독성 phenolic compounds의 생성 등이 주원인일 것으로 추정된다. 캘러스를 SH 액체배지에 접종하고 2주 간격으로 3회 계대배양하여 세

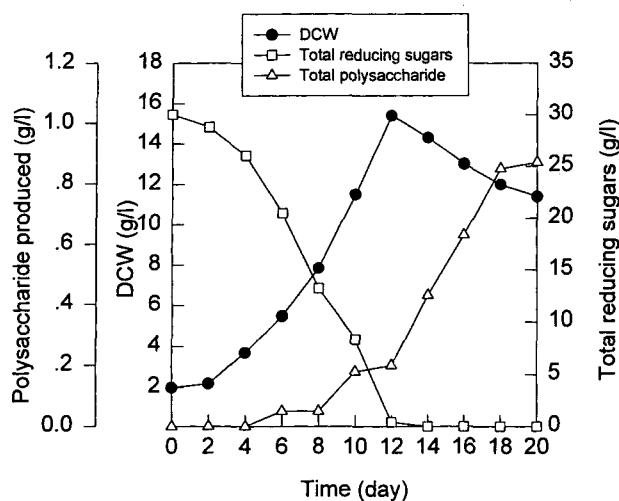


Fig. 1. Time course of the cell growth and the polysaccharide production by H4 cell line cultured in B5 medium.

포주를 액체배지에서 적응시킨 세포형태는 여러가지 형태를 취하고 있지만 비교적 길쭉한 모양이 많았다. SH 액체배지에 순화된 세포주를 같은 액체배지에 20 g FCW/l가 되도록 접종하여 세포증식과 다당 생산을 검토한 결과는 Fig. 1과 같다. 세포증식은 2일간의 유도기를 거친 다음 6일 이후부터 12일까지는 급격히 성장하여 16 g DCW/l 정도로 증식하였는데 그 이후에는 오히려 세포가 죽는 것으로 나타났다. 배양시간에 따른 다당의 생산은 세포증식에 따라 서서히 증가하다가 세포증식이 정점에 이른 12일부터는 급격히 증가하면서 배양액의 점도도 증가하였다. 이러한 배양후기의 다당 생산성 증가는 배양환경의 악화에 따른 stress가 다당생산과 연관이 있기 때문인 것으로 추정된다.

면역증강성 다당의 효율적 생산을 위한 배지조건 검토

본 연구에서는 당귀 세포증식 및 생리활성 다당류의 생산을 위한 최적배지를 선발하기 위하여 먼저 배지를 구성하는 무기영양원의 종류와 농도를 고려하여 선정한 MS, SH, B5, 그리고 White 배지가 세포증식 및 생리활성 다당류의 생산에 미치는 영향을 살펴보았다.

SH 배지에서 12일에 한번씩 계대배양한 세포를 각각의 배지에 10% V/V(약 20 g FCW/l)로 접종하고 10일간 배양한 결과는 Table 1과 같다. NH₄-N이 결여된 White 배지에서는 세포증식이 매우 낮았으며, SH, B5, MS 배지에서의 세포성장은 비슷하였다. 그러나 다당류 생산은 B5 배지에서 가장 높았으며, NH₄-N의 농도가 가장 높은 MS 배지에서는 다당류의 생산이 낮았다. 따라서 세포증식량과 다당류의 생산량이 가장 높은 B5 배지를 선정하여 배지조성 최적화 연구를 계속하였다.

일반적으로 세포배양에서 사용되는 식물생장 조절물

Table 1. Cell growth and total polysaccharide production from different media in suspension culture of *A. gigas* cells

Medium	Cell growth (g/l)	Total polysaccharide (g/l)
MS	11.7	0.2
total nitrogen: 60 mM (NO ₃ ⁻ 40 mM, NH ₄ ⁺ 20 mM) phosphate: 1.25 mM		
SH	12.1	0.35
total nitrogen: 26.5 mM (NO ₃ ⁻ 24.5 mM, NH ₄ ⁺ 2 mM) phosphate: 2.6 mM		
B5	11.7	0.7
total nitrogen: 27.4 mM (NO ₃ ⁻ 25.4 mM, NH ₄ ⁺ 2 mM) phosphate: 1.1 mM		
White	6.7	0.3
total nitrogen: 3.3 mM (NO ₃ ⁻ 3.3 mM) phosphate: 0.125 mM		

질은 2,4-D와 kinetin으로서 세포증식 및 2차 대사산물 생산에 큰 영향을 미친다. 당귀 배양세포의 증식과 다당의 생산에 미치는 이들 식물생장조절물질의 영향을 살펴본 결과는 Table 2와 같다. 대체적으로 당귀세포는 식물생장조절물질의 영향을 크게 받지는 않았으나 2,4-D와 kinetin이 각각 2 mg/l, 1 mg/l의 농도에서 비교적 다당생산성이 높았으며 2,4-D만을 처리했을 경우에도 다당생산이 높았다. 그러나 kinetin만을 단독 처리했을 경우에는 세포증식은 양호하였지만 다당생산은 저조하였다.

당귀 세포배양에서 세포증식 및 다당 생산에 미치는

Table 2. Effect of growth regulators on cell growth and total polysaccharide production in B5 medium

Growth regulator (mg/l)	Cell growth (g/l)	Total polysaccharide production (g/l)
Growth regulator-free	14.9	0.98
2,4-D, 0.1	14.7	1.13
	14.7	1.05
	13.9	1.10
Kinetin 1.0	16.2	0.93
	11.9	0.58
2,4-D, 0.1/Kinetin, 1.0	15.5	1.04
2,4-D, 0.1/Kinetin, 2.0	13.4	0.77
2,4-D, 1.0/Kinetin, 1.0	14.6	1.03
2,4-D, 1.0/Kinetin, 2.0	12.2	0.89
2,4-D, 2.0/Kinetin, 1.0	14.9	1.17
2,4-D, 2.0/Kinetin, 2.0	12.0	0.85

Table 3. Effect of carbon sources on the cell growth and polysaccharide production

Carbon source	Cell growth (g/l)	Total polysaccharide (g/l)
Sucrose	9.85	0.78
Fructose	3.93	0.13
Glucose	10.20	0.84
Lactose	3.60	n.d.*
Galactose	12.60	0.80

*n.d.: not able to detect.

탄소원의 영향을 살펴보기 위해 식물생장 조절물질을 2,4-D 2 mg/l, kinetin 1 mg/l로 제한한 B5 배지에서 sucrose를 비롯한 여러 탄소원을 첨가하여 12일간 배양한 결과는 Table 3과 같다. 세포증식 및 다당 생산을 위한 탄소원으로는 galactose, glucose, 그리고 sucrose 순으로 우수하였으나 fructose나 lactose는 탄소원으로 잘 이용하지 못하는 것으로 나타났다. 한편 glucose 농도별로 세포증식과 다당 생산능을 검토한 결과, glucose 농도가 높을수록 오히려 세포증식과 다당생산은 저해되었고 적정 glucose 농도는 20 g/l로 나타났다(Fig. 2). 이는 glucose의 농도가 높아질수록 배지의 삼투압이 급격하게 증가하여 세포증식이 억제된 때문으로 사료된다.

세포증식과 polysaccharide 생산에 미치는 유기영양원 농도의 영향을 살펴 보기 위해 B5 배지를 구성하는 각각의 유기영양원의 농도를 변화시킨 배지를 이용하여 당귀 세포를 12일간 배양하였다. B5 배지는 1 g/l myo-inositol과 미량 유기영양원으로 5 mg/l thiamine HCl, 5 mg/l nicotinic acid, 그리고 0.5 mg/l pyridoxine HCl을 함유한다. 일반적으로 유기영양원에 의한 세포증식과 다당 생산능은 크게 영향을 받지 않고 있음을 알 수 있었지만

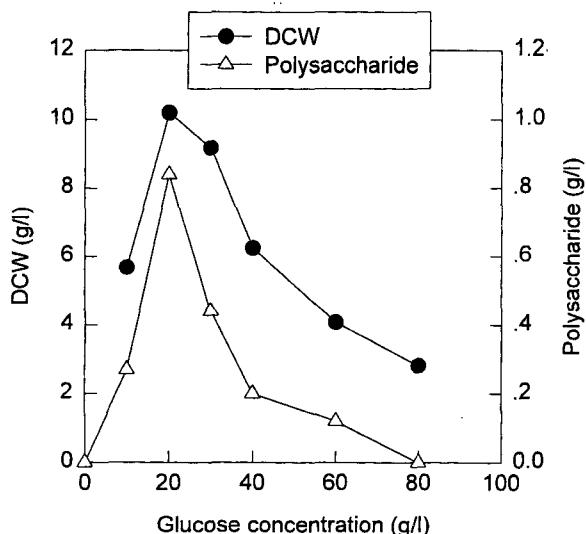


Fig. 2. Effect of glucose concentration on the cell growth and polysaccharide production.

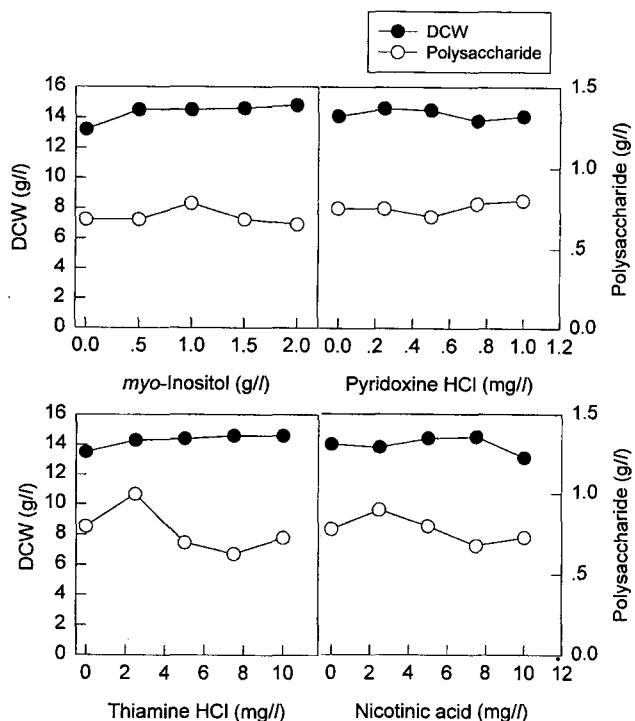


Fig. 3. Effect of the concentrations of organic components on the cell growth and polysaccharide production.

최적 유기영양원 농도는 1 g/l myo-inositol과 미량 유기영양원으로 2 mg/l thiamine HCl, 2 mg/l nicotinic acid, 그리고 0.2 mg/l pyridoxine HCl로 나타났다(Fig. 3).

B5 배지는 다량 무기영양원으로 KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 그리고 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 를 함유하며, 미량 무기영양원으로 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, KI , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 그리고 EDTA Na ferric salt를 함유한다. 우선 다량 무기영양원이 세포증식 및 다당 생산에 미치는 영향을 살펴보았는데, 탄소원과 식물생장 호르몬을 각각 30 g/l sucrose와 2 mg/l 2,4-D, 1 mg/l kinetin으로 제한하고 각각 다량 무기영양원의 농도를 변화시킨 배지에서 세포를 증식시킨 결과는 Fig. 4와 같다. KNO_3 의 경우 세포증식은 5 g/l의 농도에서 가장 높았으나 다당 생산은 2.5 g/l의 농도에서 가장 높았다. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 와 MgSO_4 의 농도는 세포증식에는 큰 영향을 미치지 않았지만 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 는 농도가 높을수록 다당의 생산은 감소되었고, MgSO_4 의 경우에도 0.125 g/l 이상에서는 농도의 증가에 따라 다당의 생산이 감소되었다. CaCl_2 는 0.07 g/l의 농도에서 세포증식 및 다당의 생산이 가장 높았으며, 그리고 NaH_2PO_4 는 0.15 g/l가 최적농도임을 알 수 있었다.

미량 무기영양원의 농도 변화는 전반적으로 세포증식이나 다당생산에 큰 영향을 미치지 않았다(data not shown). 그러나 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 가 없는 배지에서는 세포증

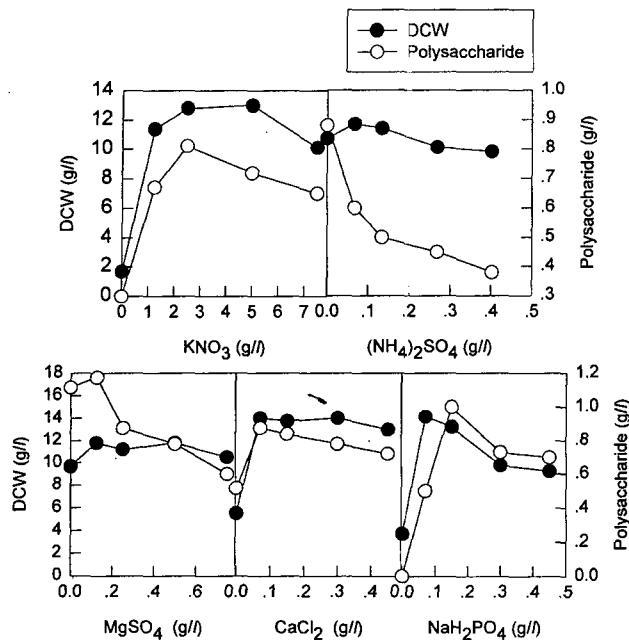


Fig. 4. Effect of the concentrations of major inorganic components on the cell growth and polysaccharide production.

식이나 다당 생산이 크게 감소되었다. $MnSO_4 \cdot H_2O$ 는 10 mg/l, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 는 2~6 mg/l, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 는 0.025 mg/l, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 는 0.5 mg/l, EDTA Na ferric salt는 43 mg/l, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 는 0.013 mg/l의 농도에서 가장 다당의 생산이 높았으며 KI의 경우에는 농도가 증가

Table 4. Composition of B5 medium and a modified medium for polysaccharide production (PPM)

Constituents	Concentration in culture medium (mg/l)	
	B5	PPM
KNO_3	2500	2500
$(NH_4)_2SO_4$	134	67
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	250	125
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2	4
$MnSO_4 \cdot H_2O$	10	10
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025	0.025
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	150	150
KI	0.75	-
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	150	75
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025	0.013
H_3BO_3	3	1.5
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25	0.5
EDTA Na ferric salt	43	43
Thiamine · HCl	10	2
Pyridoxine · HCl	1	1
Nicotinic acid	1	2
myo-Inositol	100	100
Sucrose	30,000	-
Glucose	-	30,000

할수록 다당의 생산이 감소되었다. H_3BO_3 의 경우에는 3 mg/l에서 세포증식은 높았으나 다당 생산은 오히려 줄었다.

이상 결과를 종합하여 참당귀(*Angelica gigas*) 세포의 혼탁배양에서 면역증강성 다당을 생산하기 위한 최적배지 조성(a modified medium for polysaccharide production, PPM)을 결정하였으며, 초기 B5 배지와 비교하여 정리하면 Table 4와 같다. PPM 배지는 B5 배지에 비해서 $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 그리고 H_3BO_3 은 1/2의 농도이고, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, 그리고 nicotinic acid는 2배의 농도를 나타내었다.

세포증식 및 면역증강성 다당생산에 미치는 기타 인자의 영향

일반적으로 식물세포 배양에서 세포증식을 위한 초기 pH는 5~6 정도로 알려져 있다. 당귀세포 배양에서의 최적 초기 pH를 알아보기 위해 B5 배지에서 초기 pH를 변화시켜서 12일간 배양한 결과는 Fig. 5와 같았다. 초기 pH가 낮을 경우(pH 4) 세포증식은 약간 저해를 받고 있는데 반해 다당은 거의 생산되지 못하였다. 초기 pH가 6.0~6.5에서 가장 세포증식과 다당생산이 높았는데 이는 참당귀의 세포가 다른 식물세포 배양의 경우에 비해 약간 높은 pH에서 안정성을 나타낸다고 할 수 있다. *Populus* sp. 세포배양에 의한 anthocyanin 생산에서도 비교적 높은 pH인 6.3이 최적 pH로 보고된 바 있다[15].

식물세포 배양에서 배양온도는 세포증식 속도와 수율에 영향을 미친다고 알려져 있다. 당귀세포 배양에서의 온도의 영향을 검토한 결과는 Fig. 6과 같았다. 대체로

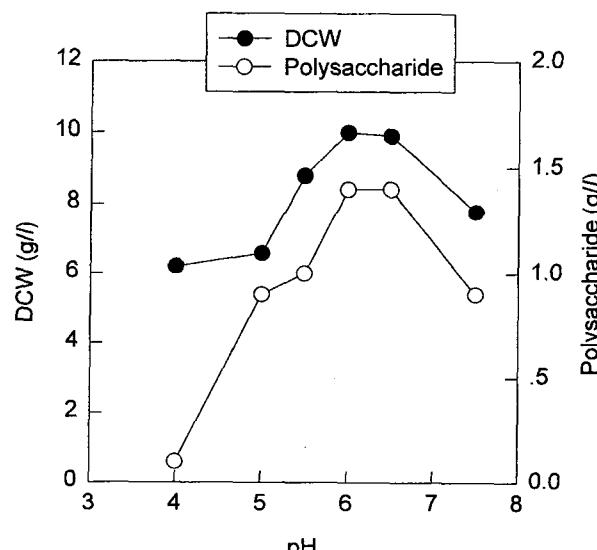


Fig. 5. Effect of initial pH on the cell growth and polysaccharide production in B5 medium.

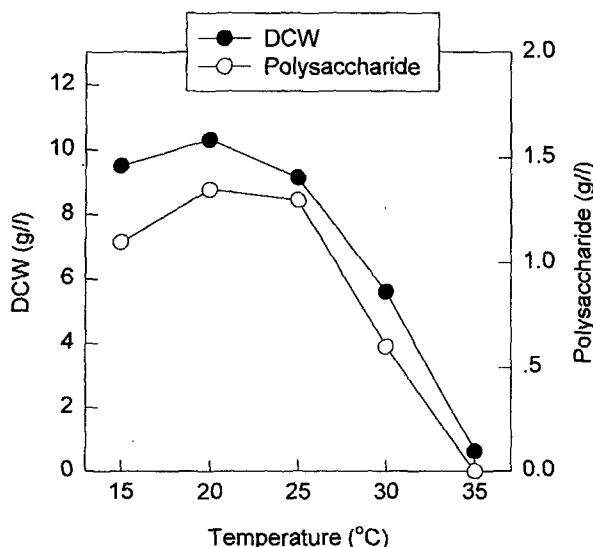


Fig. 6. Effect of temperature on the cell growth and polysaccharide production in B5 medium.

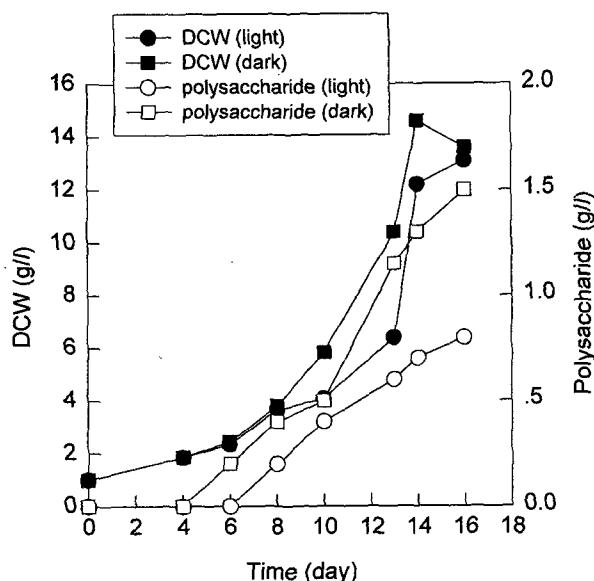


Fig. 7. Effect of light on the cell growth and polysaccharide production from the suspension culture of *A. gigas* cells.

당귀세포는 *Silum* sp. 세포[23]에서와 마찬가지로 20°C의 비교적 낮은 온도에서 세포증식과 다당생산이 가장 높았으며 온도가 올라갈수록 급격하게 세포증식과 다당생산이 저해되어 35°C에서는 거의 세포증식이 이루어지지 않았다.

광은 식물세포 2차 대사산물의 생합성에 관여하는 효소의 유도에 영향을 주어 대사산물의 생합성을 촉진하기도 하지만[13, 18, 25], *L. erythrorhizon* 세포배양에 의한 shikonin 생산[22]에서는 청색광이 오히려 저해하는 역할을 하였고, 담배 세포배양에 의한 nicotine 생산의 경우에도 광에 의하여 그 생합성이 저해되는 것으로 알려

져 있다[19]. 본 연구에서의 당귀 세포증식과 다당 생산 역시 광에 의해 저해되는 결과를 얻었다(Fig. 7).

요약

참당귀 세포(*Angelica gigas* H4)를 혼탁배양하여 면역증강성 다당을 생산하기 위한 최적배지 설계 및 생산조건 최적화 연구를 수행하였다. 우선 세포의 성장에 가장 좋은 배지로서 Schenk and Hildebrandt(SH) 배지를 선택하여 배양한 결과 25°C, 암배양조건에서 각각 15.8 g DCW/l와 0.85 g/l의 세포 및 다당을 얻을 수 있었다. 한편 다당 생산용 배지의 개발을 위하여 여러 가지 식물세포배양용 배지중에서 다당생산능이 가장 높은 배지로서 Gamborg B5 배지를 선정하였으며 B5 배지를 변형하여 면역증강성 다당생산을 위한 최적배지(PPM)를 개발하였다. 그리고 최적배지를 이용한 당귀 세포증식과 다당생산을 위한 최적 pH는 6.0-6.5, 배양온도는 20°C, 그리고 광조건보다는 암조건이 좋은 것으로 밝혀졌다. 상기 최적조건에서의 최대 세포증식과 다당생산은 각각 14.8 g/l, 1.5 g/l였다.

감사의 말

본 연구는 과학기술처 선도기술과제(08-01-53)의 지원으로 수행된 연구의 일부로서 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Ahn, K.-S., W. S. Sim, and I.-H. Kim. 1996. Decursin: A cytotoxic agent and protein kinase C activator from the root of *Angelica gigas*. *Planta Medica* **62**: 7-9.
2. Ahn, K.-S., W. S. Sim, I. K. Lee, Y. B. Seu, and I.-H. Kim. 1997. Decursinol angelate: A cytotoxic and protein kinase C activating agent from the root of *Angelica gigas*. *Planta Medica* **63**: 361-363.
3. Ahn, K.-S., W. S. Sim, H. M. Kim, S. B. Han, and I.-H. Kim. 1996. Immunostimulating components from the root of *Angelica gigas* Nakai. *Kor. J. Pharmacogn.* **27**(3): 254-261.
4. Ahn, K.-S., W. S. Sim, H. M. Kim, S. B. Han, and I.-H. Kim. 1997. Immunostimulating Polysaccharide from Plant and Cell Culture of *Angelica gigas*. *Biotechnol. Lett.* **20**: 5-7.
5. Buitelaar, R. M. and J. Tramper. 1992. Strategies to improve the production of secondary metabolites with plant cell cultures: A literature review. *J. Biotechnol.* **23**: 111-141.
6. Constabel, F. 1985. Morphinan alkaloids from plant cell cultures, pp. 257-264. In J. D. Phillipson, M. F. Roberts, and M. H. Zenk (eds.), *The Chemistry and Biology of*

- Isoquinoline Alkaloids*, Springer-Verlag, Berlin.
7. Constabel, F., P. Gaudet-LaPrairie, W. G. W. Kurz, and J. P. Kutney. 1982. Alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures. XII. Biosynthetic capacity of callus from original explants and regenerated shoots. *Plant Cell Rep.* **1**: 139–142.
 8. Edgington, S. M. 1991. Taxol-out of world. *Bio/technology* **9**: 933–938.
 9. Eilert, U., W. G. Kurz, and F. Constabel. 1985. Stimulation of sanguinarine accumulation in *Papaver somniferum* cell suspension cultures by fungal elicitors. *J. Plant Physiol.* **119**: 65–76.
 10. Fujita, Y. 1988. Industrial production of shikonin and berberine. In E. Broke and J. Marsh (eds.), *Application of Plant Cell and Tissue Culture*. Ciba Foundation Sym. **137**: 228–238.
 11. Gamborg, O. L., R. A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean roots cells. *Exp. Cell Res.* **50**: 151–158.
 12. Han, D. S. 1992. *Pharmacognosy*, 4th ed., Dong-myongsa Press, Seoul.
 13. Kim, D. I., H. Perderson, and C. K. Chin. 1988. Effects of light on berberine production in cell suspension cultures of *Thalictrum rugosa*. *Biotechnol. lett.* **10**: 709–712.
 14. Kobayashi, A. 1989. Production of antibiotics in plant cell culture. *Bioscienc. Bioindust.* **47**: 361–371.
 15. Mastumoto, T., K. Nishida, M. Noguchi, and E. Tamaki. 1973. Some factors affecting the anthocyanin formation by *Populus* cells in suspension culture. *Agric. Biol. Chem.* **37**: 561–567.
 16. Mizukami, H., K. Tomita, H. Ohashi, and N. Hiraoka. 1988. Anthocyanin production in callus cultures of roselle (*H. sabdariffa*). *Plant Cell Rep.* **7**: 553–556.
 17. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473–497.
 18. Obata-Sasamoto, H. and A. Komamine. 1983. Effect of culture conditions on L-dopa accumulation in a callus culture of *Stizolobium hassjoee*. *Planta Med.* **49**: 120–123.
 19. Ohta, S., Y. Kojima, and A. Yatazawa. 1978. Some accounts of nicotine biosynthesis in tobacco callus tissue by the use of effective and ineffective strains. *Agric. Biol. Chem.* **42**: 873–877.
 20. Ryu, K. S. and C. S. Yook. 1967. *J. Pharmaceut. Soc. Korea* **11**: 22–26.
 21. Schenk, R. U. and A. C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* **50**: 199–204.
 22. Tabata, M. and Y. Fujita. 1985. Production of shikonin by plant cell cultures, pp. 207–218. In M. Zaitlin, P. Day and A. Hollaender (eds.), *Plant Biotechnology*. Academic Press, New York.
 23. Tuleck, M. and L. G. Nickell. 1960. Methods, problems, and results growing plant cells under submerged conditions. *Trends N. Y. Acad. Sci.* **22**: 196–204.
 24. White, P. R. 1934. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol.* **9**: 585–600.
 25. Yamakawa, T., S. Kato, I. Ishida, T. Kodama, and Y. Minoda. 1983. Production of anthocyanins by *Vitis* cells in suspension culture. *Agric. Biol. Chem.* **74**: 2185–2191.
 26. Yook, C. S. and D. K. Ahn. 1967. *Modern Pharmacology*. Komunsa, Seoul.
 27. Yoshika, T. and T. Furuya. 1987. Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.* **6**: 449–453.

(Received October 10, 1997)