

# 뽕나무 조직배양에 의한 생체 활성 물질의 효율적 생산 가능성

## I. 서론

## II. 뽕나무 조직 배양 기술의 이용

- 1) 뽕나무 조직 배양의 역사
- 2) 뽕나무 조직배양의 기술
  - (1) 생물학적 요인
  - (2) 배양 용기의 선택
  - (3) 식물생장조절물질
  - (4) 세포의 고정화
  - (5) Elicitation

## III. 앞으로의 전망

## References

김 명 원

연세대학교 문리대학 생명과학과

kmwnbip@dragon.yonsei.ac.kr

# 뽕나무 조직배양에 의한 생체 활성 물질의 효율적 생산 가능성

김명원

연세대학교 문리대학 생명과학과

## I. 서론

식물에서 생성한 천연물은 염료, 의약품, 향료, 살충제, 향미료, 화장품, 가공식품 등 상업적 용도로 널리 이용되고 있다(Funk, 1987). 이러한 식물의 이차대사산물은 식물의 성장단계에서 특수한 조직 또는 세포의 특정시기에 나타나거나(Tabata et al., 1974) 한정된 종에서만 생성되며 기후 조건과 토양, 병충해 등에 크게 영향을 받으므로 공급이 불안정한 경우가 많다(Buiteloar et al., 1992). 그러나 식물 조직 배양기술을 이용하여 인위적으로 환경을 조절함으로써(Heike & Dietrich, 1995) 식물의 이차대사산물 생성을 증가시킬 수 있다.

이미 1950년대 *Atropa belladonna*의 뿌리에서 유도된 칼러스를 이용하여 atropine을 생산하면서(West & Mika, 1957) 식물조직배양 기술을 이용하여 이차대사산물을 대량 생산하여 상업적으로 이용하려는 노력이 시작되었다. 특히 shikonin이나 berberine 생산 기술의 발달은 상업적 이용 가능성을 한층 확고하게 하였다(Fujita et al., 1984 ; Nakagawa et al., 1984). 그러나 식물 이차대사산물의 합성 과정이 확실하게 밝혀지지 않은 경우가 많고 이차대사에 영향을 주는 요인과 효율적 생산을 위한 연구와 응용이 충분히 연구되지 않았기 때문에(Buitelaar et al., 1992) 아직 실용성이 부족하다. 또한 식물 세포는 미생물에 비해 성장속도가 느리고 생산력이 높은 세포주를 지속적으로 유지하는 것이 어렵고, 수압의 불안정, 이차대사산물의 생성량 감소 등의 문제점이 있어 이를 해결할 수 있는 이상적인 방법과 적절한 기술 개발을 하기 위하여 배양 세포의 물질대사에 영향을 주는 물리적인 요인으로 온도, 빛, 배양 상태, 진동, 삼투압 등과 화학적인 요인인 pH, 무기염, 탄소원, 식물 성장조절물질, 비타민류, 아미노산, 전구물질을 첨가하는 방법(Chun, 1984 ; Dixon, 1989), 또 생물학적인 방법으로 *Agrobacterium*을 이용

하여 식물세포의 형질을 전환시키거나 이차대사 과정에 자극을 주는 fungal elicitor, insect particle 등을 이용하는 방법 등이 있다(Thomasl, 1996). 우리나라 기능성 식물로 알려져 있는 뽕나무는 단백질이 20-40%로 다량 함유되어 있고 숙취제거에 효능이 있는 asparagine이 3% 정도 들어 있다. 그리고 콜레스테롤 제거 및 노인성 치매를 예방해주는 serine과 tyrosine이 각각 1.2%와 0.8% 함유되어 있고 각종 미네랄 또한 다른 식물보다 월등히 많이 함유하고 있어 칼슘은 양배추의 60배가 들어 있고 철분은 무의 160배, 인은 무의 10배나 들어 있다. 식이 섬유질은 마른 뽕잎 무게의 반 이상이나 되며 그밖에도 비타민 A, B, C, D등이 풍부하게 들어 있다. 동물을 이용한 *in vivo* 실험을 통해 혈당과 혈압강하, 콜레스테롤 저하, 항산화 작용, 항균 작용, 항암 등의 성분이 있는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 뽕나무는 기능성 식품으로 또는 약용 식물로 그 수요는 경제 성장에 따른 국민 생활 수준의 향상과 함께 최근에 급증하기 시작하는데 비해 공급은 노동력의 감소 또는 노령화로 감소하는 추세에 있다. 또한 계절, 토양, 재배조건, 뽕나무의 부위에 따라 생산성이 다르고 품질의 우수성과 균일성이 보장되지 못하는 문제가 있다. 이에 뽕나무 기능성분을 안정적으로 공급하기 위하여 기내 배양을 통하여 우량하고 균일한 세포주를 선발하여 환경제어가 가능한 시설 내에서 장기적으로 대량 생산해 낼 수 있는 생산기술을 개발하여야 한다.

## II. 뽕나무 조직 배양 기술의 이용

### 1) 뽕나무 조직 배양의 역사

목본류는 초본류나 단기성 식물에 비하여 캘러스를 유도하여 증식시키는 것이 쉽지 않고 변이가 심하기 때문에 목본류는 소수만이 조직배양기술을 이용하고 있는 실정이다. 특히 뽕나무는 줄기나 잎에서 캘러스를 유도하는 일이 쉽지 않고 증식속도가 상당히 느리기 때문에 아직 세포 배양을 이용한 이차대사산물의 생성에 대한 연구는 거의 없고 최근에 와서 뽕나무 증식을 위한 기관분화에 대한 실험이 조금씩 이루어지고 있을 뿐이다.

연도	식물명	실험 재료	실험 내용	조건
1985	Morus indica L.	axillary bud	regeneration	BA 2.0 mg/l
		leaf		BA 2.0 mg/l
		stem		2,4-D 2.0 mg/l coconut milk 10%
1987	Morus indica L.	bud	encapsulation	Na-alginate 4% sisco agar 2%
			germination	BAP 2mg/l
1988	Morus bombycis Koidz	meristem	shoot	BA 1.0 mg/l
			root	NAA 0.1 mg/l
1996	Morus spp. (25 genotypes)	leaf	callus	2,4-D 2.0mg/l, casein acid hydrolysate 100 mg/l, coconut water 150ml/l
			shoot bud	BAP 1mg/l, coconut water 50ml/l, GA <sub>3</sub> 0.5mg/l
			plantlet	BAP 0.5 mg/l, NAA 1 mg/l, riboflavin 0.1 mg/l, scorbic acid 0.1 mg/l, coconut water 50ml/l
1996	Morus australia Poir. syn. M. Acidos. Griff.	nodal explant	shoot	BAP 1.0mg/l GA3 0.3mg/l
			root	IAA 1.0 mg/l IBA 1.0 mg/l, IPA 1.0 mg/l

## 2) 뽕나무 조직배양의 기술

식물조직배양을 이용하여 상업적으로 유용한 물질을 생산할 수 있다는 사실은 이미 널리 알려져 있다. 그러나 식물세포배양을 함으로써 식물에서 생성되는 이차대사산물을 일정량이상 생산해 낸다는 것은 쉬운 일이 아니다. 경우에 따라서는 식물에서 생성되는 물질이 배양한 세포에서는 전혀 생성되지 않거나 아주 적은 양이 생성되어 상업적 이용이 용이하지 않다. 식물세포배양의 환경조건을 조절함으로써 유용한 물질을 대량 생산하려는 노력을 하기에 앞서 식물세포배양의 기본 성질을 이해하여야만 한다. 특히 물질 생산과 세포 증식과의 관계를 비롯하여 이차대사산물의 합성을 증진시킬 수 있는 방법을 찾아야 한다.

배양세포에 의한 물질 생산에 영향을 주는 요인으로 물리적 요인, 화학적 요인, 생물학적 요인 등이 있는데, 그중 배양기의 조성파 성장조절물질, 온

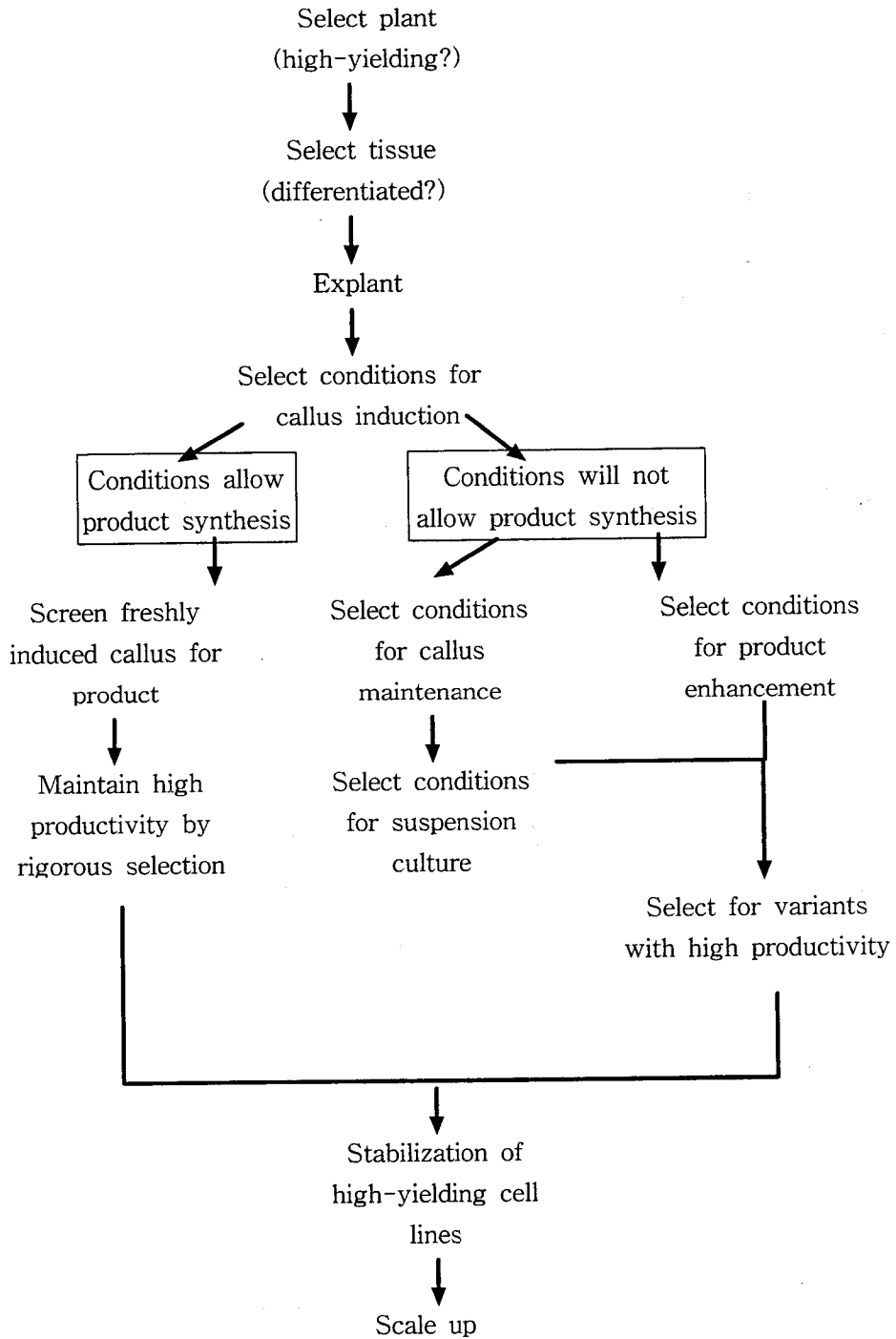
도, 빛, 기체의 농도 및 구성비, pH 등의 요인을 들 수 있으며 이들 변화에 따라 물질 생산량에 큰 차이가 있다. 그러므로 이들 여러 조건이 복합적으로 잘 조절이 될 때 물질의 생산성을 최대로 할 수 있으나 아직 조절인자의 작용 기작이 알려진 예가 많지 않다. 특히 뽕나무와 같은 목본류의 경우 변이가 심하여 적절한 조건을 찾는다는 어려움이 많다.

### (1) 생물학적 요인

배양세포의 증식이나 이차대사산물 생산능은 계절, 세포조직의 연령, 식물의 부위, 세포의 형상에 따라 달라지는 경우가 있다. 알카로이드의 생산능은 세포덩어리의 크기에 따라 달라지며 세포피의 크기가 적어짐에 따라 생산능이 떨어져서 단세포에서는 생산능이 훨씬 떨어진다(Franke ets., 1982). 포플라의 기관분화 경우에는 성숙한 잎에 비하여 어린 잎에서 유묘 분화가 잘 되었으며 뽕나무 잎의 경우도 성숙한 잎에서보다 어린 잎에서 캘러스 형성이 잘되었을 뿐만 아니라 증식도 양호하였고 Rutin이나 GABA의 함량도 성숙한 잎에서보다 새로 나온 잎에서 더 많아 조직배양의 재료는 위에서부터 2~3번째 잎을 주로 사용하였다.

### (2) 배양 용기의 선택

배양 세포의 증식과 이차대사산물 생산을 증가시키기 위하여 화학적, 물리적, 생물학적 요인의 적절한 조합이 필요하다. 일반적으로 많은 식물조직배양에 기본 배양기로 사용되는 배양기 중 Murashige & Skoog 배지와 WPM (Woody Plant Medium : McGown)에 뽕나무 잎 증능을 접종하여 Murashige & Skoog 배지에서 캘러스 증식이 양호하였고 Rutin이나 GABA의 함량도 뽕나무 잎보다 많았다. 이후 기본 배양기로는 MS 배지를 사용하였다.



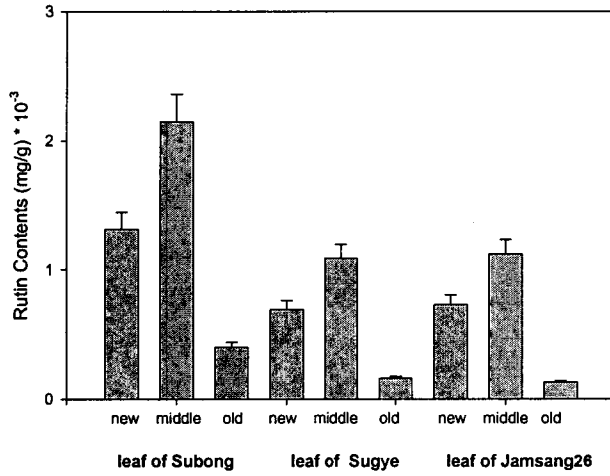


Fig. 1. Rutin contents in various ages of intact plant leaf

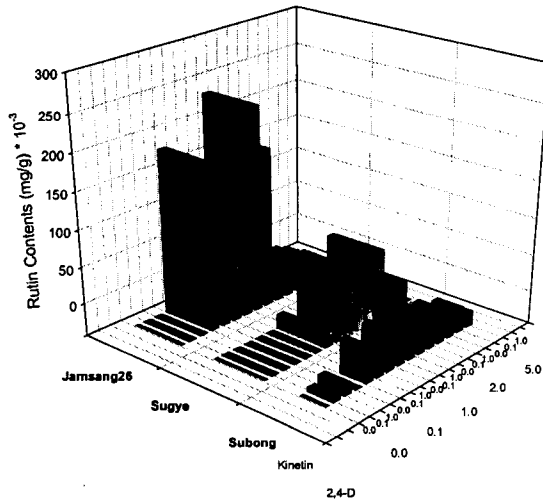


Fig. 2. Rutin contents in mulberry cultured in MS medium with 2,4-D and Kinetin for 70 days  
 2D : 2,4-D, K : Kinetin (mg/l)

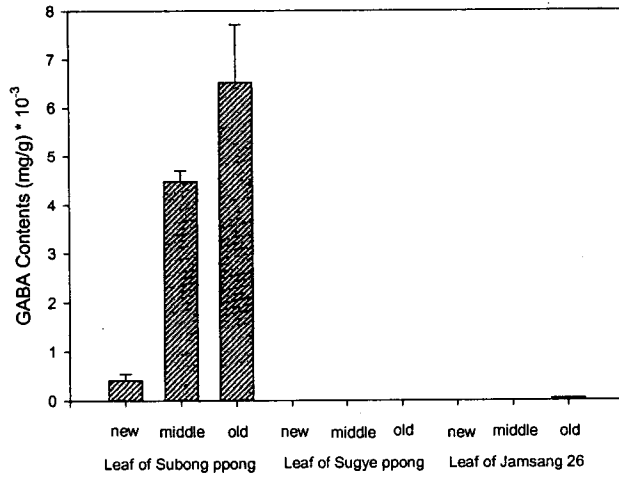


Fig. 3. GABA contents in various ages of intact plant leaf

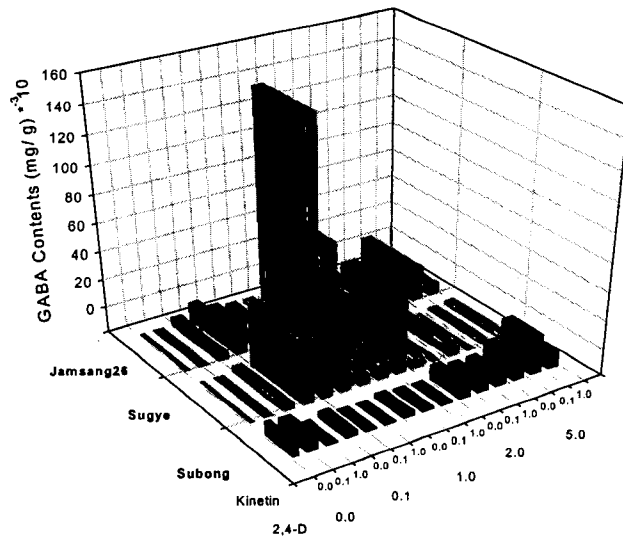


Fig. 4. GABA Contents in mulberry cultured in MS medium with 2,4-D and Kinetin for 70 days  
2D : 2,4-D, K : Kinetin (mg/l)



### (3) 식물생장조절물질

식물을 재배할 때 뿐 만 아니라 세포를 배양 할 경우에도 세포 성장과 이차대사산물 생성에 중요 역할을 한다. 특히 오옥신과 씨토키닌은 세포 증식을 촉진하거나 캘러스에서 기관을 재분화 하기도 한다.

예를 들면 *Beta vulgaris*를 현탁 배양할 경우 세포 증식과 함께 betalain 생성이 계속 증가하나(Jaafar, 1992) 오옥신의 양을 증가시키면 오히려 betalain의 생성이 감소하기도 한다. 그 외에 성장조절 물질의 양을 조절함으로써 의약품 alkaloid 생성을 증가시킨다는 것이 많은 식물에서 증명되었다(Catharanthus roseus ; Deus-Neumann & Zeuk, 1984 ; *Thalictrum minus* ; Nakagawa, Fukui & Talata, 1986 ; *Ranwolfa serpentina* ; Yamamoto &

Yamada, 1987). 뽕나무 잎에서 캘러스를 유도하여 성장조절 물질에 의하여 세포 증식율과 이차대사산물 생성량이 어떻게 영향을 받는지를 조사함으로써 이차대사산물이 최대로 축적되는 조건을 찾기 위하여 오옥신으로 NAA와 2,4-D를 사용하였고 씨토키닌으로 키네티프와 BA를 각각 농도별로 조합하여 MS 배지에 첨가하여 배양한 결과 2,4-D와 키네티프를 농도별로 조합하여 첨가한 배지에서 세포의 증식이 양호하고 이차대사산물 중 Rutin과 GABA의 함량이 비교적 많았다.

2,4-D와 키네티프를 첨가한 배양기에서 배양된 배양세포에서 Rutin이나 GABA 모두 뽕나무 잎의 함량보다 많았는데 Rutin은 배양한 세포에 5배 이상 많았으며 특히 GABA를 정량분석한 결과 잠상 26호나 수계뽕은 잎에서는 거의 검출되지 않았으나 배양한 세포에는  $64.5 \times 10^{-3} \text{mg/g wt}$ 과  $147.8 \times 10^{-3} \text{mg/g}$ 이 각각 검출되었으며 탈분화된 세포에서 GABA 생성이 증가되었다.

이러한 결과는 세포배양기술을 이용하여 Rutin이나 GABA의 생산 가능성에 대한 전망을 밝게 해준다. 그러나 한천 고형 배지에서 장기간 배양할 경우 세포의 변이가 많이 생기고 균질화시키는데 어려움이 있을 뿐만 아니라 이차대사산물을 장기간 대량으로 생산하기 위한 방법으로 이용하기에는 어려움이 많다.

### (4) 세포의 고정화

세포의 기관분화, 성장과 이차대사산물 생성과의 관계는 식물에 따라 특이하다. 그러나 캘러스 배양에서 세포 성장률은 이차대사산물 생성에 결정적인 역할을 하며 세포 성장률이 감소되면 분화율이 증가하고 이차대사산물 생성이 증가되는 경우가 많다(Yeoman, etc., 1980 ; Lindsey, 1983). 대량 생산하

여 상업적으로 이용하기 위해서는 세포 증식률은 최대로 증가하면서 이차대사산물 합성이 증가되던지 세포 분화가 먼저 일어난 후 대량으로 배양하여 이차대사산물을 얻을 수 있다.

분화된 식물체는 세포의 역할이 분담되어 고정되어 있는 상태로 인접해 있는 세포 사이에서 정보의 교환, 영양분, 대사 중간 산물, 성장조절물질 등을 교환하면서 생리적 대사가 활발해 진다. 이러한 특징을 이용한 것이 식물 세포의 고정화 기술이며 식물체의 분화된 상태를 모방한 것이다. 이와같이 물리적 환경을 조절함으로써 이차대사를 활발하게 해 주고 식물의 유용물질 생산을 연속적으로 할 수 있다. 또한 고정화된 배양세포를 사용하는 경우 배양세포를 연속적으로 사용할 수 있고 생산물을 쉽게 분리, 정제할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

뽕나무 잎에서 유도된 캘러스를 현탁배양하면서 Ca-alginate를 사용하여 배양세포를 고정화하여 2주간 배양한 결과 세포를 고정하였을 경우 대조구에 비하여 Rutin 생산량이 34% 더 증가하였으며 특히 배지로 총 생산량의 84% 정도가 배출되어 대조구에 비하여 Rutin 생산에 효율적이었다. GABA는 Rutin보다 고정화된 세포에서의 생산성이 훨씬 증가하여 거의 5배 가량 많았으며 총 생산량의 72%가 배지로 배출되어 Rutin의 경우보다는 적었으나 세포 내보다 배출량이 많았다.

뽕나무 배양세포를 고정화 방법을 이용하여 배양세포를 연속적으로 사용할 수 있다는 이점 외에 생산성을 높이고 배지로 산물을 배출시킴으로써 분리·정제가 쉬워 비용을 절감할 수 있다.

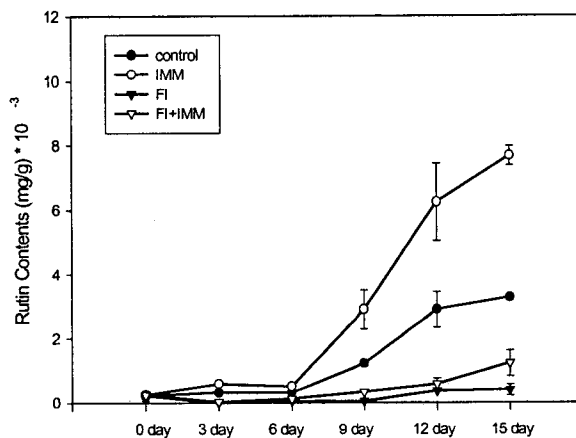


Fig. 5. Total of Rutin contents in cells and medium of Subong pppong cultured with Far-Infrared and Immobilization  
 control : free cells, IMM : Immobilized cells,  
 FI : Far-Infrared, FI+IMM : Immobilized cells + Far-Infrared

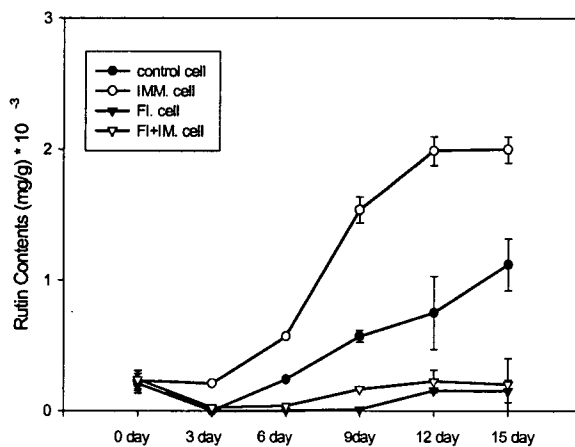


Fig. 6. Rutin contents in cells of Subong ppong cultured with Far-Infrared and Immobilization  
 control : free cells, IMM : Immobilized cells,  
 FI : Far-Infrared, FI+IMM : Immobilized cells + Far-Infrared

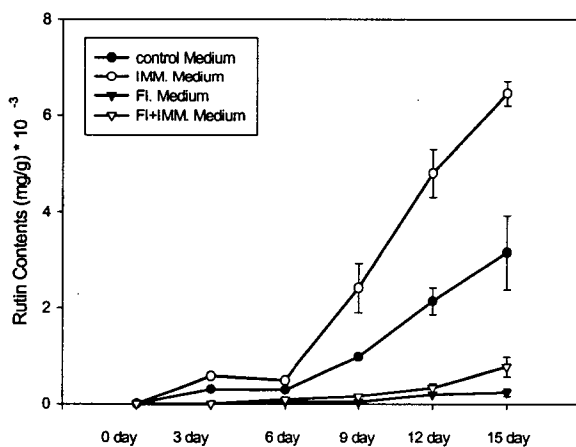
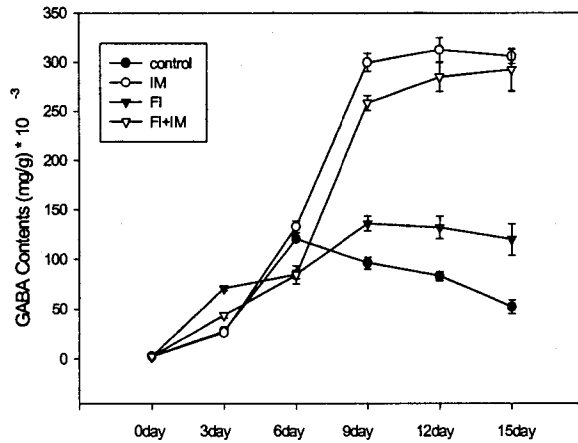
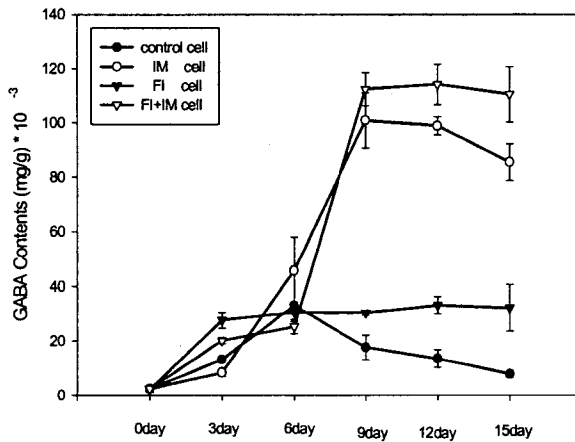


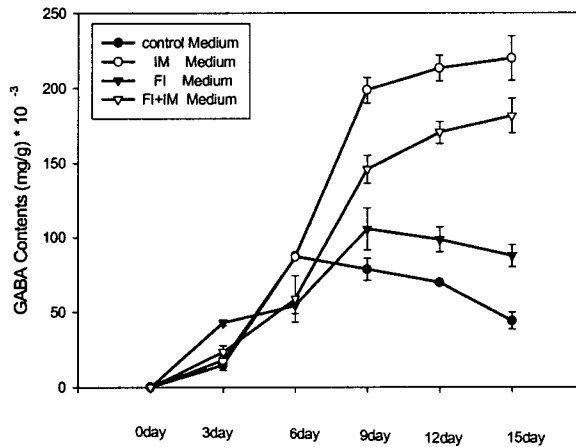
Fig. 7. Rutin contents in medium of Subong ppong cultured with Far-Infrared and immobilization  
 control : free cells, IMM : Immobilized cells,  
 FI : Far-Infrared,  
 FI+IMM : Immobilized cells + Far-Infrared



**Fig. 8.** Total of GABA contents in cells and Medium of Subong ppong cultured with Far-Infrared and Immobilization  
 control : free cells, IMM : Immobilized cells,  
 FI : Far-Infrared,  
 FI+IMM : Immobilized cells + Far-Infrared



**Fig. 9.** GABA contents in cells of Subong ppong cultured with  
 Immobilization  
 control : free cells, IMM : Immobilized cells,  
 FI : Far-Infrared, FI+IMM : Immobilized cells + Far-Infrared



**Fig. 10. GABA contents in medium of Subong ppong cultured with**

**Far-Infrared and Immobilization**

**control : free cells, IMM : Immobilized cells,**

**FI : Far-Infrared,**

**FI+IMM : Immobilized cells + Far-Infrared**

### (5) Elicitation

식물체에 미생물의 침입으로 식물체내에 항생물질과 같은 역할을 하는 이차대사산물인 phytoalexin을 생성한다(Cruick, 1980 ; Dacill & Albersheiw, 1984). 이러한 기작을 이용하여 미생물에서 유래된 것과 같은 화합물 (elicitor)을 이용하여 이차대사산물 축적을 증가시킬 수 있는 방법이다 (elicitation). elicitor에는 biotic elicitor로 식물체 유래 elicitor와 미생물 유래의 elicitor가 있고 abiotic elicitor로 UV, cold, heat, ethylene, fungicide, 항생제, 중금속염, 유기염과 같은 물리적·화학적 요인이 있다(Yoshikawa, 1978 ; Moesta & Grisebach, 1981 ; Tietjen & Martern, ; Tietjen etc., 1983 ; Davis etc., 1986).

원적외선은 상추, 토마토의 발아(Chung et al., 1992)와 오이의 성장(Chung, 1992), 이외에 식물의 성장에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 이 원적외선을 뽕나무 세포배양에 elicitor로 자극을 준 결과 이차대사산물의 생성에는 크게 영향을 주지 않았으며 고정화한 세포나 자유상태의 세포 모두 성장을 오랫동안 지속시킴으로써 세포를 안정화시켰다(그림 참조). 특히 한천 배지에서 배양할 경우 효과가 뚜렷하였다.

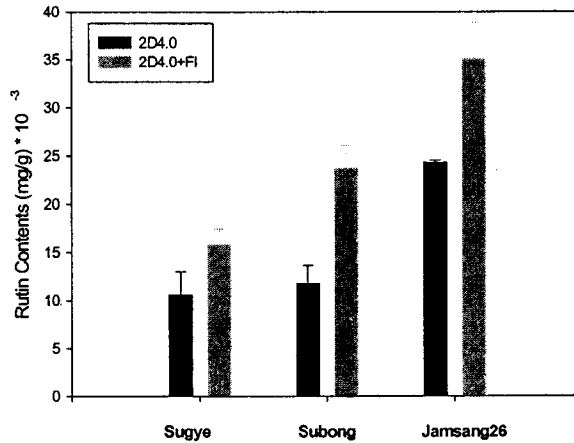


Fig. 11. Rutin contents in MS medium with 2,4-D and Far-Infrared for 60 days  
 2D 4.0 : 2,4-D 4.0mg/l,  
 2D+FI : 2,4-D 4.0mg/l + Far-Infrared

### III. 앞으로의 전망

이제까지 본 연구실에서는 뽕나무 잎 증류에서 캘러스를 유도하고 생장이 좋고 생산성이 높은 캘러스를 재료로 물리적, 화학적 환경을 조절함으로써 식물체에서의 이차대사산물 중 Rutin과 GABA의 생산성을 증가시킬 수 있는 방법을 모색하였다. 세포 고정화 방법을 도입하고 elicitor로 원적외선을 처리한 결과 배양세포를 지속적으로 안정화시켜주었고 Rutin과 GABA의 생산도 증가되어 전망을 밝게 해 주었다. 이러한 조건에서 1) 앞으로 장기간 Rutin과 GABA의 생산을 계속 증가시킬 수 있을 것인지 2) 세포를 계속 안정화시킬 수 있을 것인지 또 3) 세포 내 산물을 최대한 배출시킬 수 있는 방법 등을 강구해야 한다. 특히 4) *Agrobacterium rhizogenes*를 이용하여 모상근을 분화시킴으로써 뽕나무에서 합성하는 활성 물질을 지속적으로 대량 생산할 수 있는 방법, 5) 그외 유기·무기 영양분 첨가에 따른 생산성 증가, 6) elicitor 처리 등의 방법과 상업적으로 이용하기 위한 경제성에 대한 연구도 앞으로 더 이루어져야 할 것으로 생각된다.

본 실험에서 사용했던 세포 고정화, 원적외선 처리 방법 등은 생산성을 높힐 뿐만 아니라 배지에서 천연 물질을 용이하게 추출해 낼 수 있는 연속적인 배양의 가능성을 제시해 주었고 날로 요구도가 높아지는 생리활성물질을

식물을 제한된 토양에서 어렵게 재배하지 않고도 대량으로 공급해 줄 수 있을 것으로 생각된다.

## References

- Buitelaar, R. M. and Tramper. 1992. Strategies improve the production of secondary metabolites with plant cell cultures. *Journal of Biotechnology*. 23 : 111 - 141.
- Chung, S. J., Lee, B. S. And J. P. 1992. Germination responses of lettuce and tomato seeds as affected by the treatment of bioceramic powder. *Theses Collection of Chonnam University*. 37 : 59 - 66.
- Chung, S. J., Lee, B. S, Lee, J. P. And Kang, J. G. 1992. Effect of bioceramics in root-zone on the growth and fruit yeild of hydroponically grown cucumber. *Theses Collection of Chonnam University*. 37 : 67 - 76.
- Davis, K.R., A.G. Darvill, and P. Albersheim. 1986. Several biotic and a biotic elicitors act synergistically in the introduction of phytoalexin accumulation in soybean. *Plant Mol. Biol.* 6:23-32.
- Deus-Neumann B. Zenk M.H., 1984. Instability of indole alkaloid production in *Catharanthus Roseus* cell suspension cultures. *Planta Medica* 50:427-431.
- Dixon R.A., Jennings A.C., Davies L.A., Gerrish C., Murphy D.L. 1989. Elicitor-active components from French bean hypocotyls physiological and Molecular Plant Pathology 34:99-115.
- Funk, C., Guegler, K., and Brodelius, P. 1987. Increase secondary product formation in plant cell suspension cultures after treatment with a yeast carbohydrate, *Phytochemistry*. 26:401-404.
- Heike Dornenburg and Dietrich Knorr. 1995. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme and Microbial Technology*. 17:674-684.
- Jaafar M.S., 1992. Studies on the biosynthesis of betalains in cell cultures of *Beta vulgaris*. M. Phil. thesis, University of Edinburgh, UK.
- Linsey, K., Yeoman, M. M., Black, G. M. and Mavituna, F. 1983. A novel method for the immobilization and culture of plant cells. *FEBS*

LETTERS. 155(1):143-149.

- Moesta P. and H. Grisbach. 1981. Investigation of the mechanism of phytoalexin accumulation in soybean induced by glucan or mercuric chloride. Arch. Biochem. Biophys. 211:39-43.
- Nakagawa K., A. Konagai, H. Fukui, and M. Tabata. 1984. Release and crystallization of berberine in the liquid medium of *Thalictrum minus* cell suspension cultures. Plant Cell Rep. 3:254-257.
- Nakagawa K., Fukui H., Tabata M., 1986. Hormonal regulation of berberine production in cell suspension cultures of *Thalictrum minus*. Plant Cell Reports 5:69-71.
- Tabata, M. Mizukami, H., Hiraoka, N. & Konoshima, M. 1974. Pigment formation in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. Phytochemistry. 13:927-932.
- Thomas Harmann. 1996. Diversity variability of plant secondary metabolism. Entomologia Experimentalis et Applicata. 80:177-188.
- Tietjen, K.G. and U. Matern. 1983, Differential response of cultured parsley cells to elicitors from non-pathogenic strains of fungi, 2 effects on enzyme actness. Eur. J. Bio. Chem., 131:409-413.
- West F.R., Mika E.S. 1957. Synthesis of atrophine by isolated roots and root-callus cultures of Belladonna. Botanical Gazette 119:50-54.
- Yamamoto O., Yamada Y., 1987. Selection of reserpine producing cell strains using UV light and optimisation of reserpine production in the selected cell strain. Plant Cell Tissue and Organ Culture 8:125-133.
- Yeoman M.M., Miedzybrodzka M.B., Lindsey K., McLauchlan W.R. 1980. The synthetic potential of cultured plant cells, In: Sala F, Parisi B, Cella R, Ciferri O, eds. Plant Cell Cultures : Results and Perspectives. Amsterdam : Elsevier/North Holland, 327-343.