

*Eschscholtzia californica*의 현탁 세포배양에서 질소원 조절에 의한 세포 성장 및 Benzo[c]phenanthridine Alkaloids 생산량 향상

이송은¹ · 이흥순¹ · 손석영¹ · 박종문^{1,2*}

¹포항공과대학교 화학공학과, ²포항공과대학교 환경공학부

Improvement of Growth and Benzo[c]phenanthridine Alkaloids Production by Modifying Nitrogen Source in Suspension Cell Culture of *Eschscholtzia californica*

Song-Eun Lee¹, Hong Soon Rhee¹, Seok-Young SON¹, and Jong Moon Park^{1,2*}

¹Department of Chemical Engineering, POSTECH, ²School of Environmental Science and Engineering, POSTECH.

Abstract The effect of nitrogen source on cell growth and benzo[c]phenanthridine alkaloids production by modifying $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ ratio in cell suspension culture of *Eschscholtzia californica* was investigated. When total nitrogen concentration is maintained (60 mM), maximum benzo[c]phenanthridine alkaloids production is about 60.72 mg/L at 50:10 (mol/mol). This productivity was 3.8 times higher than that obtained when cells were grown in standard MS medium. The decrease of $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ ratio at 60 mM of total nitrogen caused the decline of both growth and benzo[c]phenanthridine alkaloids production. Under the same concentration of NO_3^- (50 mM), higher concentration of NH_4^+ inhibited cell growth strongly but induced alkaloids production slightly. Also, under the same concentration of NH_4^+ (25 mM), higher concentration of NO_3^- induced alkaloids production strongly but high concentration of NO_3^- (≥ 100 mM) interfered alkaloids instead. Maximum benzo[c]phenanthridine alkaloids production is about 62.71 mg/L at 50:25 (mol/mol). These results suggest that higher biomass and higher alkaloids production could be obtained by optimizing each nitrogen concentration as well as $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ ratio in the culture medium. Nitrate and ammonium in culture medium have distinct role in the regulation of growth and alkaloids production; ammonium had a strong influence on growth while nitrate had an influence on alkaloids production.

Keywords: *Eschscholtzia californica*, benzo[c]phenanthridine alkaloids, growth, nitrate, ammonium

서 론

식물이 이차대사작용으로 생산하는 많은 유용 물질들은 의약품, 향신료, 식품 첨가제 등으로 이용되어 인류 생활에 많은 이점을 주고 있다(1). Benzo[c]phenanthridine alkaloids는 California poppy (*Eschscholtzia californica*) 중 식물에서 유래한 이차대사산물로서, 항균적 속성을 가진 sanguinarine은 플라크와 치주염 제거를 위한 구강 치료제

로, chelerythrine은 protein kinase C의 억제제로 항종양성 의약품으로 많이 이용되고 있다(2, 3). 최근 식물세포를 미생물과 같은 방법으로 배양하여 이차대사산물 생산량을 향상시키기 위한 연구가 많이 진행되고 있으나, 세포주의 불안정성과 느린 성장속도로 인해 여전히 대량 생산이 어려운 실정이다. 따라서, 이와 같은 한계를 극복하고 이차대사산물 생산을 향상시키기 위해 온도와 pH 등의 주변 환경 요소를 조절하고, 배지의 주요 영양성분을 조절하는 등의 일반적인 세포 배양기술이 많이 이용되고 있다. 식물 세포배양에 사용되는 필수 영양성분으로 탄소원은 식물의 성장을 위한 에너지 원으로서, 질소원은 식물체를 구성하는 필수적인 원소로 DNA, RNA, 단백질 합성을 위한 주요

*Corresponding author

Tel: +82-54-279-2275, Fax: +82-54-279-2699

e-mail: jmpark@postech.ac.kr

성분으로 작용한다. 특히, 질소원으로 사용되는 질산과 암모늄 이온은 식물 세포 성장뿐만 아니라 이차대사산물 생산량을 향상시키는데 매우 중요한 역할을 하는 성분으로 알려져 있으며, 두 이온의 농도 비율은 배양 효율을 개선하고 이차대사산물 생산량을 향상시키기 위해 매우 강력한 수단으로 알려져 있다. 예를 들어, *Lithospermum erythrorhizon*의 shikonin 생산(4)과 *Artemisia annua*의 Artemisinin 생산(5), *Panax ginseng*의 ginseng saponin(6)의 생산에서 질산과 암모늄 이온의 농도처리에 따른 성장과 이차대사산물 생산량 변화를 나타낸 바 있으나, 식물의 종에 따라 나타나는 현상이 매우 다양하므로, *Eschscholtzia californica*의 성장 및 benzo[c]phenanthridine alkaloids 생산에서 질소원 농도 비율의 영향에 대한 연구가 수행될 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 *Eschscholtzia californica*의 현탁 세포배양에서 Murashige & Skoog (MS) 배지의 주요 질소원인 질산과 암모늄 이온의 농도 처리 비율을 조절하고 질산과 암모늄 이온의 초기 농도를 다르게 함으로써 세포 성장과 benzo[c]phenanthridine alkaloids 생산량 변화를 측정하고, 효율적으로 생산량을 증대할 수 있는 질소원을 선정하고자 하였다.

재료 및 방법

세포 배양 및 배지 조건

*Eschscholtzia californica*의 세포주는 seed germination에 의해 유도되었다. *Eschscholtzia californica*의 현탁 세포 배양은 0.14 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 0.47 mg/L 1-naphthalenacetic acid (NAA)와 30 g/L sucrose를 포함한 Murashige & Skoog (MS)배지를 이용하여 배양하였으며, 총 배양 부피를 400 mL로 하여 1 L 플라스크에서 유지하였다. 배양 조건은 16/8 h (명/암 주기), 25°C, 120 rpm으로 멸균 전 pH를 5.5로 조절하였으며, 세포는 2주마다 계대 배양하였다.

질산과 암모늄 이온의 초기 농도 비율 영향

질산과 암모늄 이온의 초기 농도 비율의 영향을 알아보기 위해, 질소원을 포함하지 않은 modified MS 배지에 질산칼륨 (KNO_3)과 염화암모늄 (NH_4Cl)를 다양한 농도로 첨가하였다. 첫 번째로, 총 질소 농도를 60 mM로 유지하고 질산과 암모늄 이온을 60 : 0, 50 : 10, 40 : 20, 10 : 50, 0 : 60 (mol/mol)의 비율로 첨가하였다. 두 번째로, 암모늄 이온의 영향을 측정하기 위해 50 mM의 질산 이온이 첨가되어 있는 modified MS 배지에 암모늄 이온을 10, 25, 50 mM로 첨가하였으며, 질산 이온의 영향력은 25 mM의 암모늄 이온이 첨가되어 있는 modified MS 배지에 질산 이온을 25, 50, 100, 125 mM로 첨가하며 측정하였다. 모든 실험

은 두 번 반복하여 진행하였으며, 세포는 25°C, 120 rpm에서 14일 동안 배양하였다.

세포 성장 측정 및 benzo(c)phenanthridine alkaloids 분석

세포의 생체 중량 (FCW; Fresh Cell Weight)은 1 L 플라스크에서 배양하고 있는 세포를 10 mL씩 추출한 후, 진공 흡인기를 이용하여 세포와 배양액을 분리하여 측정하였으며, 건조 중량 (DCW; Dry Cell Weight)은 Refrigeration vacuum dryer (Operon, USA)를 이용하여 세포를 건조한 후 측정하였다. 세포 속 alkaloids를 추출하기 위해, 건조된 세포 0.01 g에 2% (v/v) 염산이 포함된 메탄올 (1 mL)을 첨가한 후, 1시간 동안 초음파 분쇄기 (Branson, USA)로 분쇄하였다. 다음, 30 분간 vortexing, 20분간 원심분리를 한 후 상등액 (200 μL)을 취하여 photodiode array detector (996, Waters, Milford, MA, USA)가 장착된 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC; high-performance liquid chromatography, Waters, USA)로 분석하였다. 분석용 컬럼으로는 C_{18} 역상 컬럼 (3.9 x 300 mm; $\mu\text{Bondapack}$, Waters, USA)을 사용하였으며, 전개액 (eluent)으로는 메탄올, 물, 아세트나이트릴을 gradient 모드로 하여 흡광도 283 nm 파장에서 분석하였다.

세포 생존력 측정

생체 중량 0.2 g의 세포에 0.25% Evans blue dye를 첨가하여 15분 동안 배양하고, 진공 흡인기를 이용하여 세포를 염료와 분리시킨 후, 증류수로 세척하였다. 세포에 결합되어 있는 염료를 용해하기 위해 0.1 g 세포에 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS)를 넣고 3분 동안 끓인 후, 10분 동안 원심분리를 하고 상등액만을 취하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 가장 건강한 상태의 세포를 100%, 죽은 세포를 0%로 하여 퍼센트 단위로 나타내었으며, 죽은 세포는 조직 분쇄기 (homogenizer)로 파쇄하여 사용하였다.

세포 내외 배지의 주요 영양 성분 측정

세포 무게 측정 시 분리한 세포와 배양액을 이용하여 시간에 따른 세포 내외 배지의 주요 영양성분 (탄소원, 질소원) 농도를 측정하였다. 세포 내 영양성분 분석을 위한 세포 추출물은 생체 중량 1 g의 세포에 4 mL의 증류수를 첨가하여 조직 분쇄기 (homogenizer)로 파쇄한 후, 4°C, 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 이용하였다. 이온 분석 전 상등액과 배양액은 0.2 μm syringe filter로 여과하였다. 탄소원 (sucrose, glucose, fructose)은 refractive index detector (RID)가 장착된 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC, Agilent 1100 series, USA)를 이용하여 측정하였으며, 이 때 분석용 컬럼으로는 Aminex resin-based column

(300 x 7.8 mm, Bio-rad)을, 전개액 (eluent)으로는 0.004 M의 황산을 0.5 mL/min의 유속으로 지정하여 이용 하였다. 질산 이온은 conductivity detector가 장착된 음이온 크로마토그래피 (DX-120, Dionex, USA)를 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

질산과 암모늄 이온의 농도처리 비에 따른 성장 영향 측정

질산과 암모늄 이온의 초기 농도를 다양한 비율에 따라 조절하여 세포 성장 변화를 측정하고, 세포 성장에 적합한 질소원 농도를 선정하였다. 질산과 암모늄 이온은 60 : 0, 50 : 10, 40 : 20, 10 : 50, 0 : 60 (mol/mol) 비율로 처리 하였으며, 총 질소 농도는 standard MS 배지의 총 질소 농도에 근거하여 60 mM로 유지하였다. Fig. 1은 세포 성장을 나타낸 결과로, 최대 성장은 건조 중량 기준으로 50:10 비율에서 9.84 g/L로, 암모늄 이온만을 질소원을 이용하였을때의 세포 성장 (6.31 g/L)에 비해 약 1.6배 높은 성장을 보여주었다. 세포 성장은 질산과 암모늄 농도 비율이 감소할수록 억제되는 경향을 보였으며, 이는 평균 성장률과 세포 크기지수 (FCW/DCW)를 통해 확인하였다(Table. 1). 또한, 본 결과를 통해 질산과 암모늄 이온의 동시 사용은 각각의 질소원을 단독으로 사용할 때에 비해 세포 성장에 효과적임을 알 수 있었다. 많은 문헌을 통해서도 암모늄 이온의 단독 사용은 식물 세포성장을 억제하며, 질산과 암모늄 이온의 동시 사용은 두 이온의 synergic effect로 인해 세포 성장과 이차대사산물 생산량이 증대되는 것을 볼 수 있다. Wang(5)의 문헌에 따르면, *Artemisia annua* 세포 배양에서 질산과 암모늄 이온을 함께 사용할 때, 암모늄 이온만을 사용할 때에 비해 성장이 3배 증가하였으며, Filner(7)의 문헌에서도 역시 tobacco 세포가 암모늄 이온만으로는 성장할 수 없음을 보여주었다. 본 연구에서는 20 mM 이하의 암모늄 이온이 첨가될 경우 질산과 암모늄 이온의 동시 사용은 세포 성장을 저해하지 않으나, 50 mM 이상 고농도 암모늄 이온을 첨가하였을 때 세포 성장이 감소하는 것을 통해 50 mM 이상의 암모늄 이온의 첨가는 세포 성장을 저해함을 확인하였다(Table. 1). 암모늄 이온의 성장 억제에 관한 원인 중 하나로 Chen(8)은 암모늄 이온이 세포에 흡수되면서 방출된 수소이온으로 인해 낮은 pH가 세포 성장과 관련된 효소 활성을 저해시켰을 것이라 가정하였으며, Kaul(9)은 고농도의 암모늄 이온이 세포에 미치는 독성을 제안하였다. 농도처리 비율에 따른 배지의 pH를 통해 이를 확인한 결과(Fig. 2), 50 mM 이상의 고농도 암모늄을 첨가하였을 경우, 배양 초기부터 pH가 급격히 감소함을 확인 할 수 있었다. 하지만, 일반적으로 식물 세포성장에 적합한 pH가 4.0~8.0이며, 이 범위에서 세포 성장이 저해되는 경우가 적다는 점을 고려했을 때, pH 감소가 성장 저해에 미치는 영향력이 크지 않을 것

라 판단하였다.

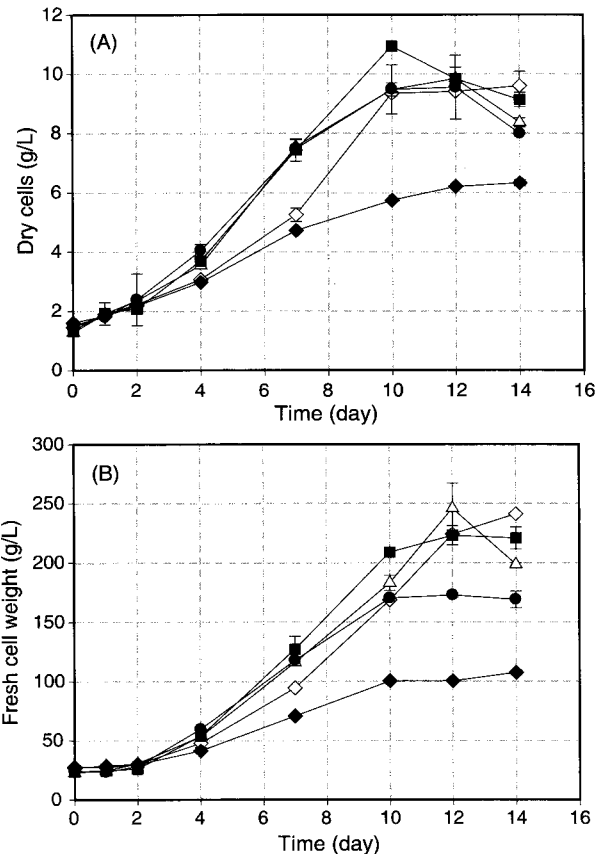


Fig. 1. Effect of different ratios of NO₃⁻:NH₄⁺ on cell growth at a total N of 60 mM in suspension cultures of *E.californica*. (A) Dry cell weight (B) Fresh cell weight. Symbols: NO₃⁻:NH₄⁺ 60:0 (◇); 50:10 (△); 40:20 (■); 10:50 (●); 0:60 (◆). Data present means ± standard deviations from duplicate samples.

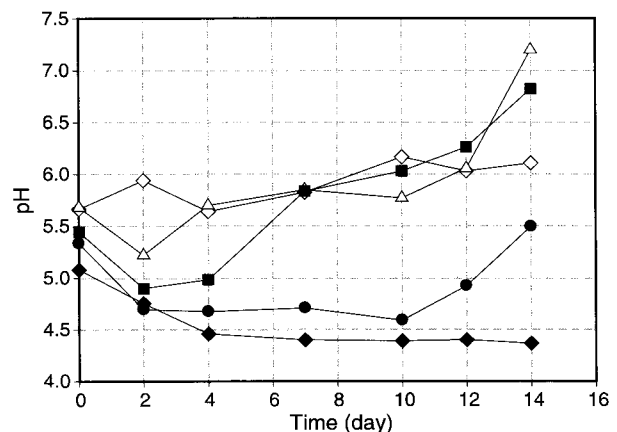


Fig. 2. Change of pH at different ratio with the total N of 60 mM in suspension cultures of *E.californica*. Symbols: NO₃⁻:NH₄⁺ 60:0 (◇); 50:10 (△); 40:20 (■); 10:50 (●); 0:60 (◆).

Table 1. Effect of $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ ratio at total N of 60 mM on Fresh Cell Weight/Dry Cell Weight (FCW/DCW), Growth Rate (GR)

$\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (mol/mol)	GR (d^{-1}) ^{a)}	FCW/DCW ^{b)}
60 : 0	0.399	25.13
50 : 10	0.558	24.98
40 : 20	0.521	22.68
10 : 50	0.438	18.11
0 : 60	0.209	17.03

^{a)} GR (Growth Rate) = (maximum cell mass-initial cell mass)/(initial cell mass)/(time).

^{b)} FCW/DCW means cell size.

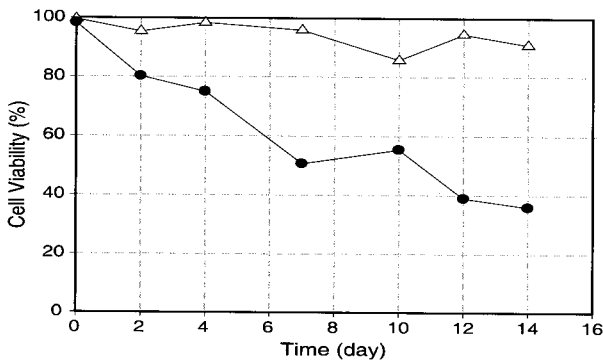


Fig. 3. Effect of different ratios of $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ on cell viability at a total N of 60 mM in suspension cultures of *E. californica*. Symbols: $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ 50:10 (△); 10:50 (●).

Fig. 3은 Evans blue dye를 이용하여 고농도 암모늄에 의한 세포 생존율을 측정된 결과를 나타낸다. 50 mM의 고농도 암모늄 이온을 첨가할 경우 배양 2일째부터 세포 생존율이 급격히 감소하였으며, 10일 이후로는 세포 생존율이 50% 이하로 떨어져 세포가 정상적으로 성장이 진행되지 않음을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 고농도의 암모늄 이온이 세포 생존에 상당한 영향을 미치는 요소임을 의미한다.

질산과 암모늄 이온의 농도처리 비율에 따른 benzo(c)phenanthridine alkaloids 생산량 측정

질산과 암모늄 이온 농도처리 비율은 세포 성장뿐만 아니라 이차대사산물 생산량에도 많은 차이를 보여주었다. Fig. 4는 질산과 암모늄 이온 농도 처리비율에 따른 benzo(c)phenanthridine alkaloids 생산량을 나타낸 결과로, 최대 생산량은 50 : 10 비율에서 60.72 mg/L (7.23 mg/g DCW)로 나타났으며, 질산과 암모늄 농도 비가 낮아질수록 생산량이 감소하였다. 암모늄 이온을 유일한 질소원으로 이용하였을 때, alkaloids 생산량은 3.34 mg/L (0.52 mg/g DCW)로 최대 생산량과 비교했을 때 약 18배 (배양액 단위 부피 기준), 14배 (단위 세포 건조중량 기준) 감소한 수치를 보여주었다. 하지만 50 mM 이상의 고농도 암모늄 이온이 첨가되어 있더라도 소량의 질산 이온을 첨가할 경우

alkaloids 생산량은 19.2 mg/L로 급격히 상승되었으며, 이를 통해 질산과 암모늄 이온의 동시 사용은 성장뿐만 아니라 alkaloids 생산에도 효과적임을 확인하였다. 고농도 암모늄 이온이 대사과정을 저해하는 원인 중 하나로 Crawford(10)은 고농도의 암모늄이 첨가 될 때 암모늄 이온 농도의 일부만이 대사산물 합성에 관여하고 나머지는 세포 내에 축적되어 성장과 대사산물 합성과 같은 전체 대사과정을 저해할 것이라고 제안하고 있으나, 아직까지 고농도 암모늄의 대사산물 생산 저해영향에 대한 원인은 밝혀지지 않았다. 본 실험에서 실제로 세포 내 암모늄 농도를 측정된 결과, 초기 암모늄 농도의 증가에 따른 세포 내 암모늄 축적 정도를 확인할 수 없었다(data not shown).

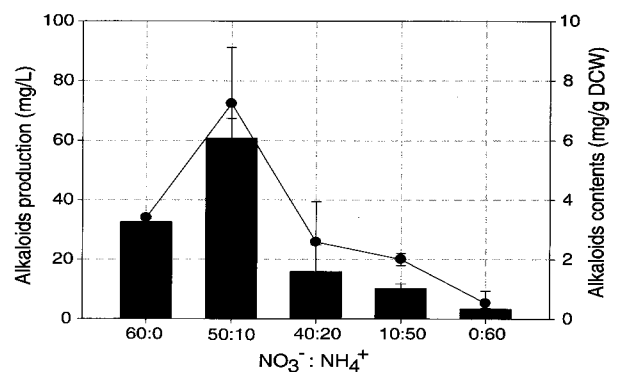


Fig. 4. Production of benzo(c)phenanthridine alkaloids at different $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ ratio with the total N of 60 mM. Symbols: rectangle: BAs production (mg/L); solid line: BAs content (mg/g DCW). Data present means \pm standard deviations from duplicate samples.

배지의 주요 영양성분의 변화

시간에 따른 배지의 주요 영양성분 소모 경향을 통해 세포 성장 및 alkaloids 생산량을 제한하는 원인을 찾고자 하였다. Fig. 5는 질소원 농도 처리 비율에 따른 배지의 주요 영양성분 (질산, 암모늄, 탄소원)의 소모 경향을 시간에 추이에 따라 나타낸 결과로, 질산 이온은 배양 초기에는 천천히 소모되다가 2일 이후부터 급격히 소모되는 경향을 보여주었다. 최대 성장속도를 가지는 50 : 10의 비율에서 질산의 감소율이 가장 빨랐으며, 10 mM의 질산 이온에서 성장한 세포의 경우, 7일 이후 질산 이온이 모두 소모되었으며(Fig. 5. (A)), 이 때부터 세포 성장이 감소하기 시작하였다(Fig. 1). 본 결과를 토대로 암모늄 이온에 비해 상대적으로 낮은 질산 이온의 첨가로 인해 세포의 원활한 대사 과정에 방해 요소로 작용할 것이라 판단되었다. 반면, 암모늄 이온의 경우 기존의 세포 배양에서 알려진 바와 같이 배양 초기 단계에 질산 이온보다 먼저 소모되었다. 하지만, 배양 2일 후부터는 암모늄 이온의 소모경향이 질산 이온에 비해 상대적으로 낮았다. 암모늄 이온이 유일한 질소원으로 이용되었을 경우 세포 성장을 위한 다른 질소원이 없었음에

도 불구하고 질산 이온이 유일한 질소원으로 이용되었을 경우와 비교했을 때 상대적으로 낮은 소모율을 보여주었다(Fig. 5. (B)). 또한, 12일 이후 배지의 암모늄 농도가 오히려 약간 상승되는 현상은 세포가 늙어 자기분해를 하였기 때문이라고 생각되며 이는 *Cupressus lusitanica*(11)의 세포 배양에서 보여준 결과와 상응한다. 배지의 탄소원 중 sucrose는 배양 4일 내에 glucose와 fructose로 빠르게 가수분해되었으며, sucrose의 분해산물인 glucose와 fructose 경우도 배양 12일 내에 모두 소모되었다. 이러한 결과는 모든 이온 농도처리에서 동일하게 나타내었다(Fig. 5. (C)).

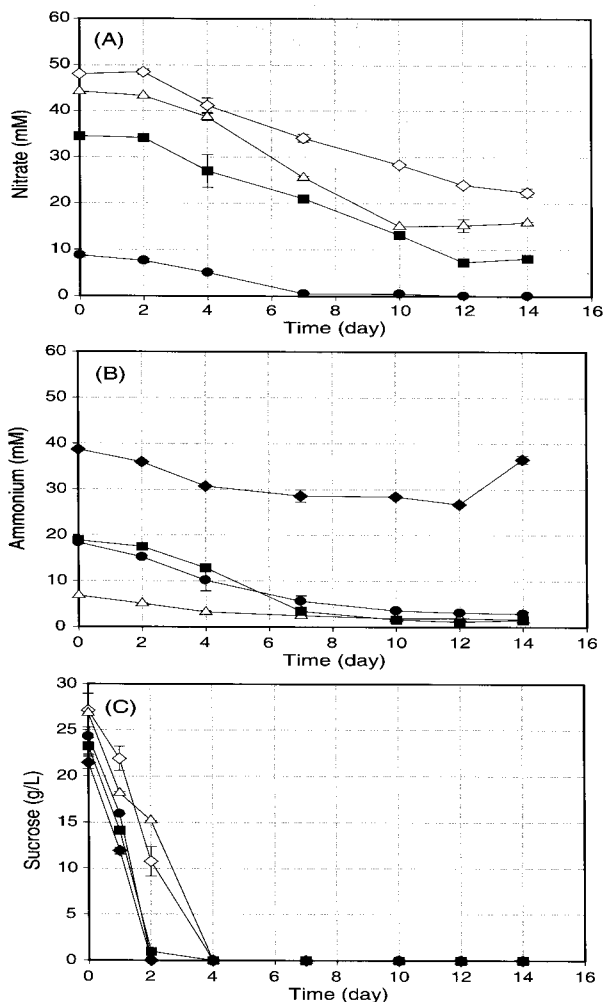


Fig. 5. Time course of major nutrient consumption at different $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ ratio with the total N of 60 mM. (A) Nitrate (B) Ammonium (C) Sucrose. Symbols: $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ 60:0(\blacklozenge); 50:10(\blacktriangle); 40:20(\blacksquare); 10:50(\bullet); 0:60(\blacklozenge). Data present means \pm standard deviations from duplicate samples.

초기 질산과 암모늄 농도에 따른 성장 및 benzo(c)phenanthridine alkaloids 생산량 측정

암모늄 이온의 세포성장 저해를 보다 명확히 확인하기

위해 초기 질산 농도를 성장에 적합한 농도로 (50 mM) 유지하고 암모늄 이온 농도를 변화 하여 (10, 25, 50 mM) 성장과 alkaloids 생산량을 측정하였다. 또한, 암모늄 농도를 25 mM로 고정하고 질산 이온농도를 변화 하면서 (25, 50, 100, 125 mM) 질산 이온이 alkaloids 생산을 유도하는 요소로 작용함을 확인하였다. 암모늄 이온 영향의 결과로 50 mM의 암모늄 이온을 첨가하였을 경우 성장은 4.5 g DCW/L로 10 mM의 암모늄 이온을 첨가하였을 경우와 (8.22 g DCW/L) 비교했을 때, 약 2배정도 성장이 감소하였음을 확인할 수 있었다. 하지만 alkaloids 생산량의 경우 암모늄 이온 농도가 증가할수록 조금씩 증가하는 경향을 볼 수 있었는데 이는 이차 대사산물이 성장과 무관한 stationary phase 이후로 증가한다는 점을 고려해 볼 때 배양 말기에 식물의 성장이 급격히 감소하면서 증가한 것이라고 판단하였다. 질산 이온의 영향력의 결과, 성장은 건조 중량 기준으로 모든 비율에서 평균 9.24 ± 0.9 g/L의 값을 나타내었으나, alkaloids 생산량은 질산 이온 첨가량이 100 mM일 때 최소 22.08 mg/L로, 최대 생산량은 질산 이온 50 mM 첨가시 62.71 mg/L로 최소 생산량에 비해 약 3배 증가한 생산량을 보여주었다. 총 질소원 농도가 100 mM 이상이 될 경우 세포가 갈변하는 현상이 나타났으며, 세포 성장률 또한 현저하게 감소함을 확인하였다. 이는 고농도에 의한 삼투압으로 인해 세포가 견디지 못했기 때문이라고 생각된다(11). 앞선 결과로부터, 질산과 암모늄 이온이 성장과 alkaloids 생산에 있어 미치는 영향력이 다를 수 있음을 확인 하였다. 즉, 암모늄 이온의 경우 저농도 (10 mM 이하)의 암모늄이 질산 이온과 함께 사용할 경우, alkaloids 생산량 향상에 도움을 주지만, 고농도의 암모늄 이온은 세포 성장 저해에 강력한 영향을 주었다. 질산 이온의 경우 농도에 따라 세포 성장은 비슷하나 alkaloids 생산량에는 큰 차이를 보여줌으로써 암모늄에 비해 alkaloids 생산량 증대에 강한 영향을 주는 이온임을 알 수 있었다.

Table 2. Effect of initial nitrate and ammonium concentration on cell growth and benzo(c)phenanthridine alkaloids production

$[\text{NO}_3^-]$ (mM)	$[\text{NH}_4^+]$ (mM)	Ratio	FCW (g/L)	DCW (g/L)	GR ^{a)} (d ⁻¹)	Alkaloids Production (mg/L)
50	10	5 : 1	198.50 \pm 0.00	8.35 \pm 0.15	0.82	60.72 \pm 6.69
50	25	2 : 1	182.50 \pm 10.50	8.22 \pm 0.45	0.61	62.71 \pm 4.21
50	50	1 : 1	110.00 \pm 10.00	4.45 \pm 0.76	0.59	74.72 \pm 0.05
25	25	1 : 1	223.50 \pm 12.5	10.09 \pm 0.81	0.83	27.25 \pm 1.71
50	25	2 : 1	182.50 \pm 10.5	8.22 \pm 0.45	0.61	62.71 \pm 4.21
100	25	4 : 1	167.75 \pm 6.25	9.23 \pm 0.05	0.49	22.08 \pm 2.07
125	25	5 : 1	182.50 \pm 7.01	9.45 \pm 0.21	0.51	25.44 \pm 3.35

^{a)} GR (Growth Rate) = (maximum cell mass-initial cell mass)/(initial cell mass)/(time).

요 약

본 연구에서는 *Eschscholtzia californica*의 이차 대사산물인 benzo[c]phenanthridine alkaloids의 생산량을 향상시키기 위해 주요 영양성분인 질소원 농도를 조절하여 배지의 조성을 최적화하였다. 그 결과, 질산과 암모늄 이온의 초기 농도 비율은 세포 성장과 alkaloids 생산량 증대에 중요한 영향을 미치는 인자로서 작용함을 볼 수 있었다. 총 질소 농도를 standard MS배지의 총 질소원 농도와 동일하게 유지하고 (60 mM), 농도 비율 다양하게 조절했을 때, 세포 성장과 alkaloids 생산량은 질산과 암모늄 이온을 각각 단독으로 이용할 때 보다 효율적으로 증대함을 볼 수 있었다. 최대 성장 (9.84 g DCW/L)과 alkaloids 생산량 (60.72 mg/L)은 50 : 10의 비율에서 나타났으며, 농도 비율의 감소는 세포 성장을 억제하고 alkaloids 생산량을 감소시켰다. 또한, 질산과 암모늄 이온이 세포 성장과 alkaloids 생산량에 미치는 영향력을 보다 명확히 확인하기 위해 질산 이온과 암모늄 이온 농도를 각각 조절한 결과, 암모늄 이온이 증가할수록 alkaloids 생산량은 비슷하나, 세포 성장은 감소하였으며, 또한, 질산 이온의 농도를 증가시킬수록 세포 성장은 비슷한 값을 나타내었지만, alkaloids 생산량은 다양한 차이를 나타내었다. 본 실험에서 세포 성장과 alkaloids 생산량에 적합한 농도는 50 : 25 (mol/mol) 비율에서 나타났으며, 본 실험을 통해 *Eschscholtzia californica*의 현탁 세포배양에서 질소원 농도의 조절을 통한 외부 환경 조절은 세포 성장과 alkaloids 향상에 매우 효과적이며, 소량의 암모늄 이온의 첨가 시 질산 이온 농도조절은 세포 성장을 억제하지 않으면서 alkaloids 생산량을 유도하는데 적합한 이온비를 확인하였다.

접수 : 2009년 2월 18일, 게재승인 : 2009년 4월 12일

감 사

본 연구는 한국과학재단(KOSEF)지정 포항공과대학교 차세대바이오환경기술연구센터 (AEBRC)의 연구지원으로

수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Rao, S. R. and G. A. Ravishankar (2002), Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites, *Biotechnol. adv.* **20**, 101-153.
2. Archambault, J., R. D. Williams, C. Bédard, and C. Chavarie (1996), Production of sanguinarine by elicited plant cell culture I. Shake flask suspension cultures, *J. biotechnol.* **46**, 95-105.
3. Zenk, M. H. (1994), The formation of benzophenanthridine alkaloids, *Pure appl. chem.* **66**, 2023-2028.
4. Fujita, Y., Y. Hara, T. Ogino, and C. Suga (1981), Production of Shikonin Derivatives by Cell Suspension Cultures of *Lithospermum erythrorhizon* I. Effects of Nitrogen Sources on the Production of Shikonin Derivatives, *Plant cell rep.* **1**, 59-60.
5. Wang, J. W. and R. X. Tan (2002), Artemisinin production in *Artemisia annua* hairy root cultures with improved growth by altering the nitrogen source in the medium, *Biotechnol. lett.* **24**, 1153-1156.
6. Liu, S. and J. J. Zhong (1997), Simultaneous production of ginseng saponin and polysaccharide by suspension cultures of *Panax ginseng*: Nitrogen effects, *Enzyme and microb. technol.* **21**, 518-524.
7. Filner, P. (1966), Regulation of nitrate reductase in cultured tobacco cells, *Biochim. biophys. acta* **118**, 299-310.
8. Chen, S. J. and C. H. Kao (1997), Ammonium-inhibited growth of suspension-cultured rice cells as affected by medium pH, *Plant growth regul.* **21**, 1-6.
9. Kaul, K. and S. A. Hoffman. (1993), Ammonium ion inhibition of *Pinus strobus* L. callus growth. *Plant sci. (Limerick)* **88**, 169-173.
10. Crawford, N. M. (1995), Nitrate : Nutrient and Signal for Plant Growth, *Plant cell* **7**, 859-868.
11. Yamada, J., K. Fujita, K. Eto, and K. Sakai (2003), Cell growth and nutrient uptake by cell suspensions of *Cupressus lusitanica*, *Journal of wood science* **49**, 5-10.