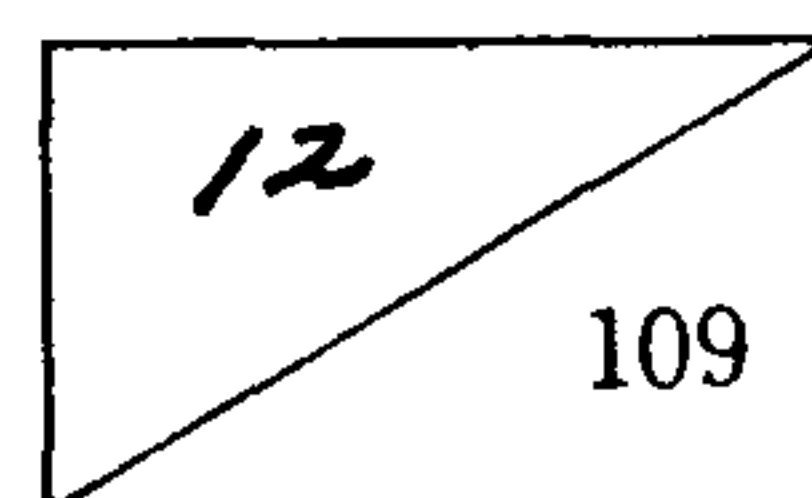


GOVP1199204526



植物細胞培養에 의한 二次代謝產物

生産技術開發

Development of Secondary Metabolite Production Systems

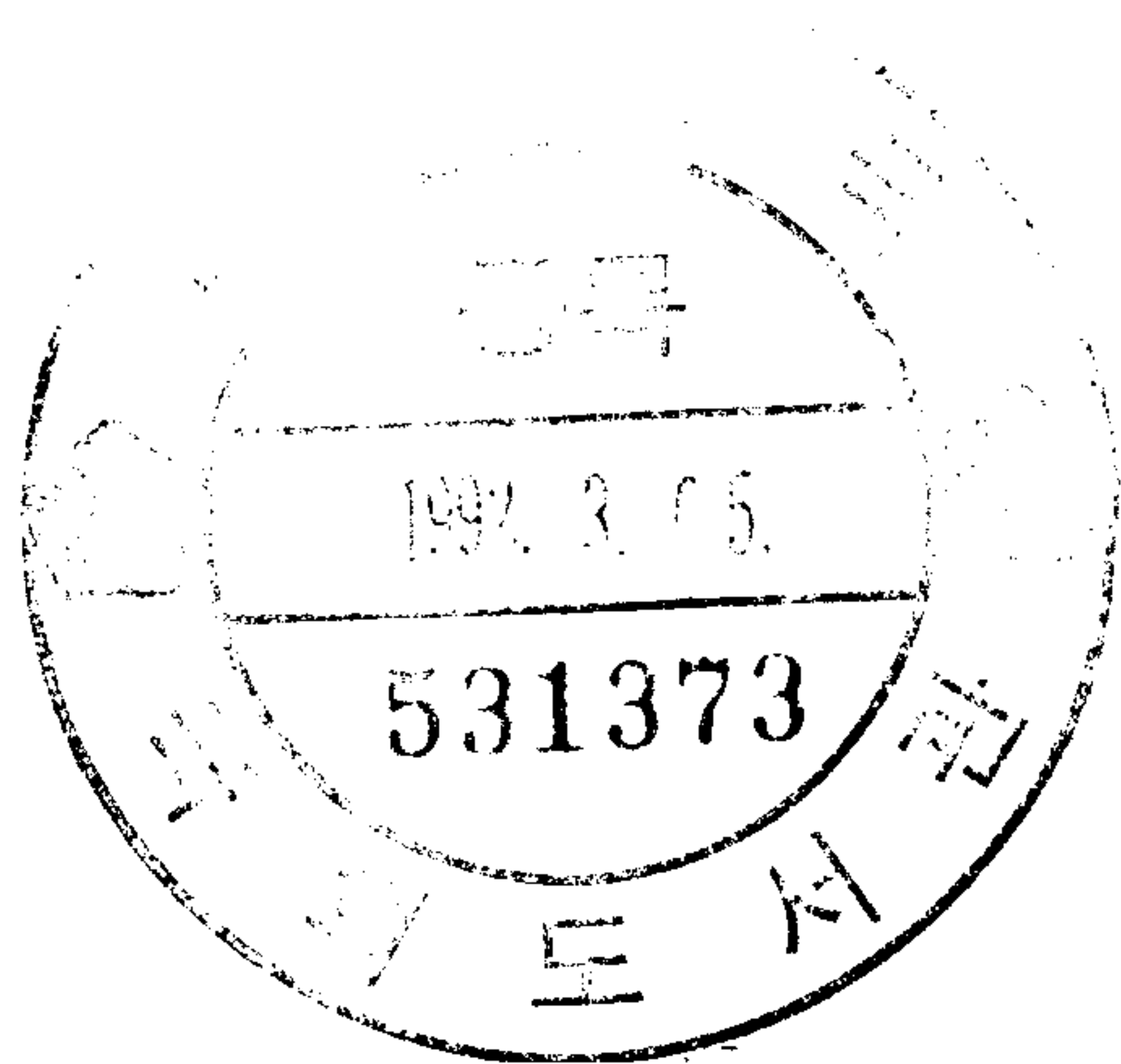
by Plant Cell Cultures

研究機關

韓國科學技術研究院

附設遺傳工學研究所

科學技術處



제출문

科學技術處長官 貴下

본 보고서를 "植物細胞培養에 의한 二次代謝産物 生産技術 開發"
사업의 2차년도 최종보고서로 제출합니다.

1991. 7.

主管研究機關 : 韓國科學技術研究院 遺傳工學研究所
總括研究責任者 : 劉長烈 (遺傳工學研究所 責任研究員)
研究責任者 : 劉長烈 (遺傳工學研究所 責任研究員)
研究員 : 郭尚洙 (遺傳工學研究所 先任研究員)
鄭卿熙 (遺傳工學研究所 研究員)
金錫源 (遺傳工學研究所 研究員)
委囑研究員 洪原熹(韓國科學技術院)
委囑研究員 李 혼(韓國科學技術院)

여 백

요약문

I. 제 목

식물세포배양에 의한 이차대사산물 생산기술개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

협죽도과 식물인 일일초(*Catharanthus roseus*)가 생산하는 ajmalicine, vinblastine, vincristine 등의 indole alkaloid는 혈압강하, 항암작용 등의 약리적 가치가 높은 이차대사산물이다. 특히 이량체 indole alkaloid인 vinblastine과 vincristine은 그램당 미화 5,000불에 상당하는 고가의 약품으로 세계시장규모는 연간 5 - 7.5억불에 달하고 있다. 식물체내의 이들의 함량은 극 미량(수 ppm 정도)이어서 식물체로부터 직접 대량 추출하는 것은 비용이 많이 들며, 또한 이들은 복잡한 화학구조로 인하여 화학적으로 합성하는 것은 용이하지 않다. 따라서 식물조직배양에 의한 일일초의 유용 indole alkaloid 생산에 관한 연구가 많이 시도되어 왔으나 아직 산업화단계까지는 이르지 못하고 있다.

Vinblastine과 vincristine의 생산을 위한 합리적인 방법은 일차적으로 이들의 전구물질인 catharanthine과 vindoline을 각각 대량생산하는 방법을 확립한 후 효소학적 또는 화학적반응으로 이량체 indole alkaloid를 생산하는 방법이다. 전구물질중에서 vindoline은 식물체내에 함량이 건물중의 0.12 %로 비교적 높아 분리공정의 최적화로 필요량을 확보할 수

있을 것이나 catharanthine의 함량은 0.003 %로 식물체내의 함량이 낮으므로 세포배양에 의한 catharanthine 생산세포주를 선발하는 방법을 택하고 있다. 일일초 배양세포로부터 고생산세포주를 선발하는 방법으로는 세포괴를 분할하여 선발하는 방법이 주로 사용하여 왔으나 이 방법은 오랜 시간이 소요되거나 기술상의 번거로움 때문에 효율적인 선발법이 되지 못하고 있다.

따라서, 본 연구과제는 이랑체 indole alkaloid의 중요 전구물질인 catharanthine과 vindoline의 생산체제를 확립하기 위하여 일일초 현탁배양세포로부터 원형질체배양에 의한 protoclone과 모상근(hairy root)에 의한 catharanthine 고생산세포주의 선발연구, 생산성향상을 위한 배양조건의 적정화연구, 생산성향상을 위한 분자생물학적 접근의 기초연구로써 indole alkaloid 생산 관련 단백질에 관한 연구 및 식물체로부터 vindoline를 경제적으로 추출하기 위한 분리공정연구에 역점을 두어 수행되었다.

III. 1990년도 연구개발의 내용 및 범위

제2차 년도에서는

1. 일일초(*Catharanthus roseus*) 현탁배양으로부터 원형질체유래 indole alkaloid 고생산성세포주 선발
2. 일일초현탁배양에서 alkaloid 생산성 향상을 위한 적정 배양조건 규명

3. 일일초배양세포의 indole alkaloid 생합성 관련 단백질의 이차원 겔 전기영동분석
4. 일일초 모상근(hairy root) 배양에 의한 indole alkaloid 생산
5. 일일초로부터 indole alkaloid 초임계추출공정의 기본연구에 주력하였다

IV. 연구개발 결과

1. 일일초(*Catharanthus roseus*) 현탁배양으로부터 원형질체유래 indole alkaloid 고생산성세포주 선발
 - (1) 일일초의 현탁배양에서 유리한 원형질체를 배양하여 얻어진 각 세포주(protoclone)를 alkaloid 생산배지에서 10일간 배양한 후 생산된 indole alkaloid를 HPLC로 정량분석한 결과, 40개의 protoclone중 20개에서만 alkaloid의 생산이 이루어졌으며, alkaloid를 생산하는 세포주 중에서도 ajmalicine 과 catharanthine 생산량은 각 세포주마다 큰 차이를 보였다.
 - (2) 특히 생장률이 높았던 VPC-6은 다른 protoclone에 비해 ajmalicine과 catharanthine의 생산량이 비교적 높았다. Catharanthine의 생산에 있어서는 VPC-10가 세포 생중량 그램당 5.9 μg 으로 가장 높았으며 이는 본래의 현탁배양세포가 catharanthine을 거의 생산하지 못한 것과 비교할 때 주목할만한 결과이다. Ajmalicine의 생산에 있어서는 VPC-15에서 133.6 μg 으로 가장 높았는데 이것은 모세포보다 생산성이 약 3배 향상된 것이다.
 - (3) HPLC에서 분석된 catharanthine과 ajmalicine은 최종적으로 LC/MS에 의해 표준화합물의 mass spectrum 과 비교하여 정성분석되었다.

2. 일일초현탁배양에서 indole alkaloid생산성 향상을 위한 적정배양조건 규명

(1) 세포접종량을 50 ml 배지당 0.5 g, 1 g, 2 g으로 변화하여 세포의 성장과 indole alkaloid 생산에 미치는 영향을 조사한 결과, 세포접종량을 증가 시킴에 따라 세포의 생장은 증가되나 indole alkaloid생산은 감소하였다.

(2) 무기염농도 1/2 MS와 접종량 1 g으로 하였을 때 catharantine의 생산이 최대치 (70 µg / 0.66 g 세포건중량 / 50 ml배지 / 13일 배양)를, 무기염 농도 1/4 MS와 접종량 1 g으로 하였을때 ajmalicine생산의 최대치(700 µg / 0.85 g 세포건중량 / 50 ml배지 / 13일 배양)를 보였다.

(3) Sucrose 농도가 indole alkaloid생산에 미치는 영향을 조사한 결과, 7.5% 농도에서 catharantine의 함량이 최대치를 보였으나, ajmalicine의 경우에는 낮은 농도에서 생산의 최대치를 보였다. 적정배양조건을 토대로 생물 배양기에 의한 scale-up실험을 수행할 계획이다.

3. 일일초 배양세포로부터 indole alkaloid 생합성관련 단백질의 이차원 겔 전기영동분석

(1) Indole alkaloid고생산성세포주인 VPC-10을 사용하여 alkaloid 생산직전 시료로서 7일 배양된 세포를 그리고 alkaloid 생산직후의 시료로서 11일 배양된 세포로부터 단백질을 추출하여 이차원 겔 전기영동으로 단백질을 분리하였다.

(2) Alkaloid 생산직전단계에서 alkaloid 생산단계로 전환되면서 2개(pI 8.2, M.W. 23 kD ; pI 7.0, M.W. 28 kD)의 polypeptide가 새롭게 나타났으며 3개 (pI 6.0, M.W. 22 kD ; pI 6.2, M.W. 23 kD ; pI 7.2, M.W. 24 kD)의 polypeptide가 alkaloid 생산단계로 전환될 때 사라졌다.

(3) 새로이 나타나는 단백질들은 indole alkaloid 생산 후기단계에서도 계속 존재하거나 양적인 증가가 이루어졌다. Indole alkaloid 생산과 더불어 새로이 나타나는 단백질이 indole alkaloid 생합성에 관여하는 것인지를 규명하여 indole alkaloid 생산성 향상을 위한 연구를 수행 할 계획이다.

4. 일일초 모상근(hairy root) 배양에 의한 indole alkaloid 생산

(1) 일일초의 중요 indole alkaloid를 hairy root 배양시스템을 이용하여 생산하기 위하여 일일초에 *Agrobacterium rhizogenes* 을 감염시켜 hairy root 를 얻었으며, opine test로 *A. rhizogenes*의 T-DNA가 도입되었음이 확인되었다.

(2) 유기된 hairy root를 1/3 SH 배지에 배양하여 indole alkaloid 생산성을 분석한 결과, LB1 에서 catharanthine이 고생산(ca. 3.5 mg/g dry wt) 되었다. LB1 clone을 사용하여 적정배양조건과 생물반응기에 의한 대량배양에 관한 실험을 진행중에 있다.

5. 일일초로부터 indole alkaloid의 초임계추출공정의 기본연구

(1) 무독성 이산화탄소 용매를 사용한 초임계유체추출법으로 일일초잎으로부터 vindoline과 catharanthine을 효율적으로 추출할 수 있었다.

(2) 추출물중 vindoline과 catharanthine의 정량분석은 HPLC로 하였으며 화합물의 최종확인은 LC/MS로 하였다. 실험조건에서 추출물중 vindoline 함량은 40°C, 150 bar에서 67%, catharanthine 함량은 40°C, 400 bar 에서 8%로 가장 높았다.

(3) 현재 최적 추출조건 규명과 일일초배양세포로부터 indole alkaloid 추출을 위한 실험이 진행중이다.

Summary

I. Title

Development of Secondary Metabolite Production Systems by Plant Cell Cultures.

II. Objectives and Needs of the Project

Vinca (Catharanthus roseus) produces pharmaceutically important indole alkaloids such as ajmalicine, vinblastine, and vincristine. Ajmalicine, a monomeric indole alkaloid, is used as an antihypertensive agent. Vinblastine and vincristine, dimeric indole alkaloids, are used for the treatment of leukemia and malignant lymphoma. Because of their extremely low concentrations in the plant, the cost to extract them from cultivated plants is high. Furthermore, their complicated chemical structures discourage chemical synthesis on a commercial scale. Therefore, many researchers have tried to develop methods to produce the compounds by plant cell cultures. Vinblastine and vincristine are produced by coupling two different monomeric indole alkaloids, vindoline and catharanthine. The former is not detected in cultured cells, whereas the latter is. In contrast, the former is contained in the plant at a relatively high level, whereas the latter is at a much lower level. Therefore, it has been considered rational to produce the dimers by coupling

catharanthine obtained from cell cultures with vindoline obtained from cultivated plants.

Two methods are generally adopted to select cell lines for high yields of secondary metabolites : plating small cell aggregates and repeatedly subculturing calli after division into smaller ones on solid medium. However, cell lines selected by these methods are not guaranteed to be of single-cell-origins. Alternatively, protoplast-derived clones (protoclones) may be employed to avoid chimerism of selected cell lines. Such is the case with *Lithospermum erythrorhizon* cell lines for shikonin production.

In this context, we have aimed to establish systems for the production of economically important indole alkaloids by vinca cell cultures.

III. Content and Scope of the Project

In the second year (1990), the project has aimed at the followings :

1. Selection of protoclones for high yields of indole alkaloids from suspension cultures of vinca;
2. Establishment of optimum culture conditions for improving the productivity of indole alkaloids;
3. Analysis of specific-proteins related to the indole alkaloid production by two-dimensional gel electrophoresis;

4. Production of indole alkaloids by hairy root cultures; and
5. Extraction of indole alkaloids by supercritical carbon dioxide.

1. Selection of protoclones for high yields of indole alkaloids from suspension cultures of vinca.

- 1) After 10 days of culture in production medium, indole alkaloids were extracted from the cells and analyzed by HPLC. Among 40 isolated protoclones, only half of them produced indole alkaloids such as ajmalicine and catharanthine and they showed a wide range range of productivity.
- 2) Although the original cell line did not produce catharanthine at a detectable level by HPLC, protoclone VPV-10 produced it at a level of 5.9 $\mu\text{g/g}$ fresh weight of cells. Protoclone VPC-15 produced ajmalicine at a level of 133.6 $\mu\text{g/g}$, which was about 3 times higher than the productivity of the original cell line.
- 3) Catharanthine and ajmalicine were qualitatively identified by LC/MS.

2. Establishment of optimum culture conditions for improving the productivity of indole alkaloids.

- 1) When 0.5 g fr wt / 50 was inoculated to MS medium of which basal salts were serially diluted from 1/2 to 1/16, the catharanthine content reached the highest (114 $\mu\text{g/g}$ dry wt), which is about 3

times higher than that of the intact vinca leaf.

- 2) Growth rate of cell and final cell mass in production medium were ruled by inoculum size and not affected by the concentration of basal salts.
- 3) With the increment of inoculum cells, the productivity of catharanthine was sharply decreased, but the addition of basal salts and sucrose restored it and enhance the volumetric yield of catharanthine.

3. Analysis of specific-proteins related to the indole alkaloid production by two-dimensional gel electrophoresis.

- 1) Proteins were extracted from suspension-cultured VPC-10 cells and analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. When the protein electrophorogram of cells in the trophophase was compared with that of cells in the idiophase in suspension culture, it was detected that two polypeptides were newly synthesized and three polypeptides disappeared at the idiophase.
- 2) The newly synthesized proteins (pI 8.2, M.W. 24 kD ; pI 7.0, M.W 29 kD) were retained or even magnified at the later stage. These results putatively suggest that the newly synthesized and disappeared proteins play promotive and inhibitory roles, respectively, in the production of alkaloids in vinca cell suspension cultures.

4. Production of indole alkaloids by hairy root culture.

- 1) Hairy roots of vinca were induced by infection with *Agrobacterium rhizogenesis* A4 and 15834 strains. Production of opines was detected in the extracts of hairy roots by paper electrophoresis.
- 2) The production of indole alkaloids showed a wide variation among the hairy root clones. All clones produced ajmalicine, but LBI produced a high level (ca. 3.5 mg/g dry wt) of catharanthine.

5. Extraction of indole alkaloids by supercritical carbon dioxide.

- 1) Indole alkaloids such as vindoline and catharanthine were effectively extracted from vinca leaves by supercritical fluid extraction method using nontoxic carbon dioxide as a supercritical solvent.
- 2) The contents of vindoline and catharanthine in the extract were determined by HPLC. The final confirmation of the compounds was done by LC/MS. Sixty-seven % of the extract obtained under condition of 40 °C and 150 bar was vindoline, whereas 8% of that at 40 °C and 400 bar was catharanthine.

Contents

Chapter I. Introduction-----	21
Chapter II. Selection of Protoclones for High Yields of Indole Alkaloids from Suspension Cultures of Vinca-----	26
1. Introduction-----	26
2. Material and Methods-----	28
1) Callus induction and suspension cultures-----	28
2) Isolation and culture of protoplasts-----	28
3) Indole alkaloid production by cell cultures-----	29
4) Extraction and quantitative analysis of indole alkaloids-----	30
5) Qualitative analysis of indole alkaloids by LC/MS-----	31
3. Results-----	32
1) Protoplast culture-----	32
2) Variation of indole alkaloid production among protoclones-----	32
3) Qualitative analysis of indole alkaloids by LC/MS-----	34
4. Discussion-----	37
5. Literature Cited-----	41

Chapter III. Establishment of Optimum Culture Conditions for Improving the Productivity of Indole Alkaloids-----	45
1. Introduction-----	45
2. Materials and Methods-----	46
1) Plant material and cell culture conditions-----	46
2) Analysis of productivity of indole alkaloids-----	47
3. Results-----	48
1) Effects of the concentration of the basal salts--	48
2) Effects of the concentration of the basal salts and the inoculum size on the production of indole alkaloids-----	49
3) Effects of sucrose concentration on cell growth--	53
4) Effects of sucrose concentration on the production of indole alkaloids-----	55
4. Discussion-----	58
5. Literature cited-----	60
 Chapter IV. Analysis of specific-proteins in relation to the Alkaloid Production by Two-dimensional Gel Electrophoresis-----	62
1. Introduction-----	62
2. Materials and Methods-----	64
1) Cell culture-----	64
2) Extraction of proteins and two-dimensional gel electrophoresis-----	64
3. Results-----	65

1) Production of indole alkaloids during cultures---	65
2) Differences of protein patterns-----	65
4. Discussion-----	68
5. Literature cited-----	71
Chapter V. Production of Indole Alkaloids by Hairy Root Cultures---	73
1. Introduction-----	73
2. Materials and Methods-----	75
1) Plant materials-----	75
2) Induction and culture of hairy roots-----	75
3) Opine test-----	76
3. Results-----	77
1) Induction and culture of hairy roots-----	77
2) Analysis of indole alkaloids in hairy roots-----	77
3) Opine test-----	79
4. Discussion-----	80
5. Literature cited-----	81
Chapter VI. Extraction of Indole Alkaloids by Supercritical Carbon Dioxide-----	82
1. Introduction-----	82
2. Materials and Methods-----	83
1) Plant material-----	83
2) Experimental apparatus-----	83

3) Experimental methods-----	86
4) Quantitative and qualitative analysis of indole alkaloids-----	88
3. Results and Discussion-----	89
1) Effects of temperature and pressure on extraction of indole alkaloids-----	89
2) Qualitative analysis of extracts by LC/MS-----	92
4. Conclusions-----	94
5. Literature cited-----	95

목 차

제 1 장	총 론	-----21
제 2 장	일일초현탁배양으로부터 원형질체유래 indole alkaloid 고생산성세포주 선발	-----26
	제 1 절 서 론	-----26
	제 2 절 재료 및 방법	-----28
	1. 캘러스 유도 및 현탁배양	-----28
	2. 원형질체 유리 및 배양	-----28
	3. 세포배양에 의한 indole alkaloid 생산	-----29
	4. Indole alkaloid 추출 및 정량분석	-----30
	5. LC/MS에 의한 indole alkaloid의 정성분석	-----31
	제 3 절 결과	-----32
	1. 원형질체 배양	-----32
	2. Protoplast간의 indole alkaloid 생산성 변이	-----32
	3. LC/MS에 의한 indole alkaloid의 정성분석	-----34
	제 4 절 고 찰	-----37
	제 5 절 인용문헌	-----41
제 3 장	일일초현탁배양에서 indole alkaloid 생산성향상을 위한 적정배양조건 규명	-----45

제 1 절 서론-----	45
제 2 절 재료 및 방법-----	46
1. 식물재료 및 세포배양조건-----	46
2. Indole alkaloid생산성 분석-----	47
제 3 절 결과-----	48
1. 무기염의 농도의 영향-----	48
2. 무기염농도와 세포접종량의 영향-----	49
3. Sucrose의 세포생장에 미치는 영향-----	54
4. Sucrose의 indole alkaloid생산에 미치는 영향-----	55
제 4 절 고찰-----	58
제 5 절 인용문헌-----	60

제 4 장 일일초배양세포의 indole alkaloid 생합성 관련 단백질의 이차원 겔 전기영동분석-----	62
제 1 절 서론-----	62
제 2 절 재료 및 방법-----	64
1. 세포배양-----	64
2. 단백질의 추출 및 이차원 겔 전기영동-----	64
제 3 절 결과-----	65
1. 배양시기별 indole alkaloid 생산-----	65
2. 단백질 패턴의 변화-----	65
제 4 절 고찰-----	68

	제 5 절 인용문헌-----	71
제 5 장	일일초 hairy root 배양에 의한 indole alkaloid 생산-----	73
	제 1 절 서론-----	73
	제 2 절 재료 및 방법-----	75
	1. 식물재료-----	75
	2. Hairy root의 유도 및 배양-----	75
	3. Opine 분석-----	76
	제 3 절 결과-----	77
	1. Hairy root의 유도 및 배양-----	77
	2. Hairy root의 indole alkaloid 분석-----	77
	3. Opine 분석-----	79
	제 4 절 고찰-----	80
	제 5 절 인용문헌-----	81
제 6 장	일일초로부터 indole alkaloid의 초임계추출 공정의 기본연구	
	제 1 절 서론-----	82
	제 2 절 재료 및 방법-----	82
	1. 실험재료-----	83
	2. 실험장치-----	83
	3. 실험방법-----	86
	4. Indole alkaloid의 정량 및 정성분석-----	88

제 3 절 결과-----	89
1. 온도 및 압력변화가 indole alkaloid 추출에 미치는 영향-----	89
2. LC/MS에 의한 추출물의 정성분석-----	92
제 4 절 결론-----	94
제 5 절 인용문헌-----	95

제 1 장 총 론

식물세포를 배양하여 유용이차대사산물을 대량생산함으로써 이를 상업화하고자하는 본격적인 시도는 1950년대에 미국의 Luis Nickell에 의해 처음으로 이루어졌다. Pfizer제약회사를 설득할 수 있었던 그의 선구적인 노력은 1960년대초까지 계속되었으나 당시의 빈약한 이차대사에 관한 생리학, 생화학적인 이해로 상업화로 연결짓는데는 역부족이었다. 이분야는 이후 상당기간 동안 연구자들의 관심의 대상에서 벗어나 있다가 1970년대에 일기 시작한 생명공학 붐에 힘 입어 새로운 조명을 받게되었다. 지난 20년 가까운 기간 동안의 노력의 결과 자초세포배양에 의한 shikonin 생산을 위시한 몇몇 상업화의 모델을 제시하게 되었다. 미생물의 고생산세포주 선발법을 답습한 식물세포주선발 및 배양조건의 적정화로 요약되는 기존의 방법은 empirical한 접근을 근간으로 하고 있으며 이러한 방식은 이분야의 성격상 대체할 수 없는 절대적인 것이기는 하나 최근에 급속도로 발전하고 있는 재조합 (r)DNA 기술에 힘입어 보다 rational한 접근방식이 제시되고 있다.

식물세포를 배양하여 유용이차대사산물을 생산할 수 있으리라는 이론적 근거는 단일식물체가 완전개체로 발달할 수 있는 능력 즉 전체형성능 (totipotency)을 갖는 것과 마찬가지로 각각의 세포는 그 식물체 전체가 합성하는 모든 화합물을 생산할 수 있는 능력 즉 화학적 전체형성능 (chemical totipotency)을 갖는다는 도그마(완전히 실험적으로 증명된 것이 아니므로)에 있다. 식물세포는 배양조건에서 세포수준에서의 분화

(cytodifferentiation)현상을 보이므로 비록 세포수준이라 할지라도 분화된 특정기관에서만 합성되는 화합물이 배양세포에서 만들어 질 수 있을 것이다. 더우기 이러한 현상은 형태적 분화에 선행하여 형태적 분화를 위한 화학적 메신저 역할을 하는 예가 많으므로 오히려 화학적 전체형성능이야 말로 형태 적 전체형성능을 설명할 수 있는 근거가 될 수 있다. 뿐만아니라 최근의 분자생물학은 기관 특이 유전자 발현을 조절하는 promoter 부분에 대한 이해를 증진시키고 있어서 유전자 조작에 의해 특정한 기관에만 생성되는 이차대사산물을 탈분화된 캘러스나 다른 기관에서 생성되도록 하거나 오히려 기존의 특정기관에서는 만들어지지 못하도록 하는 유전자 조작이 가능하게 되어 이 분야의 연구에 있어서도 분자생물학적인 이해의 수준을 더해가고 있다. 고생산세포주를 선발하기 위한 방법으로는 세포괴분할법이 널리쓰이고 있다. 이것은 세포괴를 이루고 있는 세포중 고생산성을 가진 세포가 세포괴 분할, 계대배양 선발등을 거듭하면 전체가 해당 고생산 세포로 이루어진 세포괴의 선발이 가능하게 된다. 이방법은 계대배양에 따른 소요시간이 지나치게 많이 걸린다는 단점을 안고있다. 이러한 단점은 세포괴에서 유래한 현탁배양으로부터 원형질체를 유리하여 얻어진 콜로니 수준에서 고생산세포주를 선발하면 해결될 수 있다. 그러나 식물의 종류에 따라서는 유리된 원형질체가 콜로니로 배양하는데 기술적인 어려움을 갖는 경우도 적지않다. 일반적으로 이차대사산물의 생산은 배양세포의 biomass 증가와 시간적 간격을 두고 증가한다. Biomass 증가와 완전히 연계되어 증가하는 이차대사산물이 없지않으나 연계되어 있을때는 이차대사산물의 생산성 증대는 biomass 증가에 의해 결정되므로 단순히 후자의 현상을 보다 적극적으로 수용하는 배양조건의 적정화하는 전략이 2단계 배양법이다.

이것은 첫번째단계에서는 NH_4^+ PO_3^- 등의 무기염의 농도를 높이고 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 와 같은 합성 auxin을 넣은 배지에서 biomass 증가를 가속화하면 세포는 탈분화된 상태를 유지하며 이차대사산물의 생산성은 낮다. 이들 세포를 무기염의 농도가 낮고 indole-3-acetic acid (IAA) 와 같은 천연 auxin을 넣은 배지에 옮겨주면 biomass의 증가 속도는 낮아지고 세포는 형태적 혹은 생화학적으로 분화되면서 이차대사산물의 생산성이 증가하게 되었다.

그러나 최근에는 무기염의 농도를 첫번째와 두번째단계의 중간정도로하고 α -naphthalaneacetic acid(NAA)와 같이 2,4-D와 IAA의 중간정도의 생리학적 효능을 가진 성장조절제를 첨가한 단일단계 배양후기에 elicitor를 넣어주거나 혹은 무생물적 스트레스(abiotic stress)를 가하여 biomass가 최대치에 이르렀을때 동일 batch에서 이차대사산물의 최대치를 얻는 방식이 개발되고있다. 이는 이차 대사산물의 생산이 식물의 방어 메카니즘 이나 환경 stress를 극복하는데 관련되어 있다는 연구성과를 이용한 것으로서 식물 혹은 곰팡이의 세포벽을 이루는 polysaccharide 혹은 멸균한 균사등이 전자에 속하고 고온, 저온, blue light, UV light, cadmium 등이 후자에 속한다.

본 연구과제에서는 이상의 세포배양에 의한 유용이차대사산물 생산에 관한 이론적 배경으로 일일초(*Catharanthus roseus*)세포배양에 의한 indole alkaloid생산에 관한 실험을 수행하였다. 이량체 indole alkaloid인 vinblastine과 vincristine의 중요 전구물질인 catharanthine과 vindoline의 생산체계를 확립하기 위하여 일일초 현탁배양세포로부터 원형질체를 유리, 배양하여 얻은 protoclone과 모상근(hairy root) 배양으로부터

catharanthine 고생산성세포주의 선발연구, 생산성향상을 위한 배양조건의 적정화연구와 분자생물학적 기초연구로써 indole alkaloid 생합성관련 단백질의 관한 연구 및 식물체로부터 vindoline를 경제적으로 추출하기 위한 분리공정연구에 역점을 두어 수행하였다.

약어

BA	6-Benzylaminopurine
p-CPA	4-Chlorophenoxyacetic acid
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
DTT	Dithiothreitol
HPLC	High performance liquid chromatography
IAA	Indole-3-acetic acid
IEF	Isoelectric focusing
LC/MS	Liquid chromatography/Mass spectrometer
MS	Murashige and Skoog
PMSF	Phenylmethyl sulfonyl fluoride
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SH	Schenk and Hildebrandt

제 2 장 일일초현탁배양으로부터 원형질체유래 Indole Alkaloid

고생산성세포주 선발

제 1 절 서 론

협죽도과 식물인 일일초(*Catharanthus roseus*)가 생산하는 ajmalicine, vinblastine, vincristine 등의 indole alkaloid는 혈압강하, 항암작용 등의 약리적 가치가 높은 이차대사산물이다. 특히 이량체 indole alkaloid인 vinblastine과 vincristine은 그램당 미화 5,000불에 상당하는 고가 의약품으로 세계시장규모는 연간 5-7.5억불에 달하고 있다. 식물체중의 이들의 함량은 극미량(수 ppm 정도)이어서 식물체로부터 직접 대량추출하기에는 비용이 많이 들며 복잡한 화학구조를 하고 있으므로 화학합성적인 방법으로 대량생산하기에도 어려움이 있다. 따라서 식물조직배양에 의한 일일초의 유용 indole alkaloid 생산에 관한 연구가 오랫동안 수행되어져 왔다(Parr, 1989 ; Lounasmae and Galambos, 1989 ; Deluta and Kurz, 1989).

Vinblastine과 vincristine의 생산을 위한 합리적인 방법은 Fig. 1에서와 같이 일차적으로 이들의 전구물질인 catharanthine과 vindoline을 대량생산하는 시스템을 확립한 후, 이들 전구물질로부터 효소학적인 반응으로 이량체 alkaloid를 생산하는 것이다(Fig. 1)(Fujita et al., 1990; Endo et al., 1988 ; Misawa et al., 1988). 전구물질 중에서 vindoline의

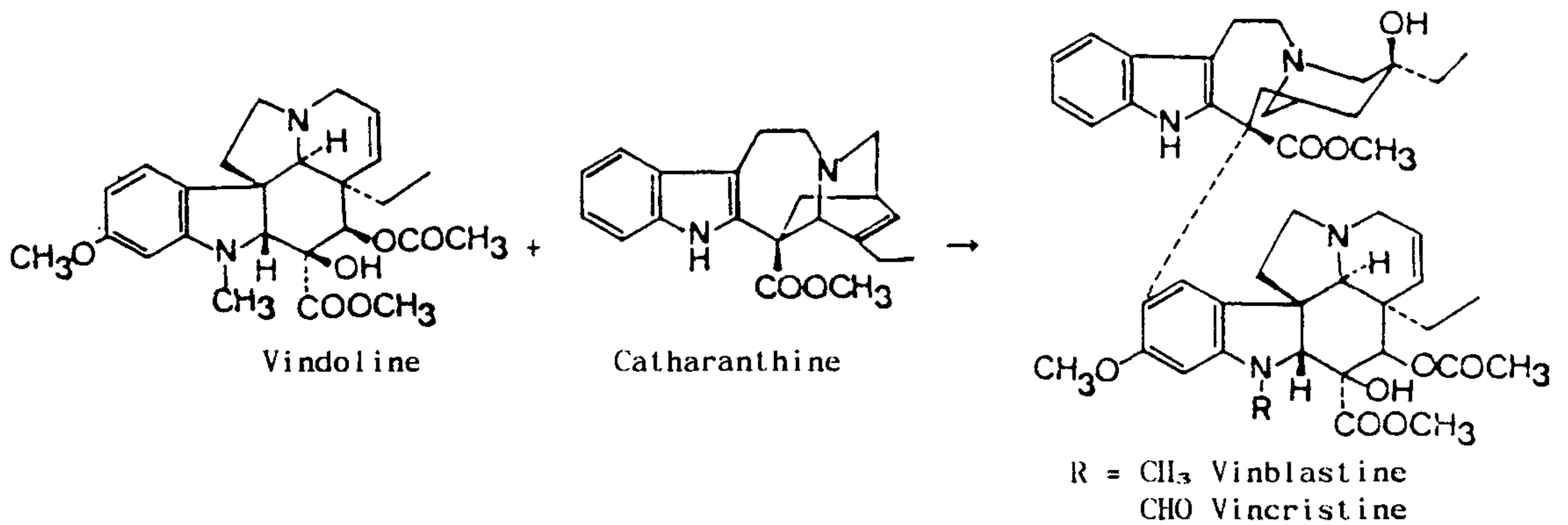


Figure 1. Synthesis of vinblastine and vincristine by enzymatic or/and chemical reaction of vindoline and catharanthine.

식물체중의 함량은 건물중의 0.12%로 비교적 높아 분리공정의 최적화로 필요한 양을 확보할 수 있을 것이나 catharanthine의 함량은 0.003%로 매우 낮으므로 세포배양에 의한 catharanthine 생산세포주를 선발하는 방법을 택하고 있다. 주로 세포괴를 분할하여 고생산성 세포주를 선발하고 있는데 현탁배양된 단세포나 수개의 세포로 구성된 세포군 (cell aggregate)을 유리하여 catharanthine을 식물체내의 함량보다 3배 이상 생산할 수 있는 세포주를 개발할 수 있다(Kurz et al., 1981). 그러나 이러한 방법은 오랜기간이 소요되거나 기술상의 번거로움 때문에 효율적인 세포주 선발법이 되지 못한다. 한편 자초의 경우 원형질체 유래 세포주로부터 shikonin 생산성이 기존 세포주보다 향상된 세포주를 단시일에 비교적 용이하게 선발할 수 있다(Fujita et al., 1984).

따라서, 본 연구에서는 이랑체 indole alkaloid의 중요 전구물질인 catharanthine의 생산체계를 확립하기 위하여 일일초 현탁배양세포로부터 원형질체를 유리, 배양하여 얻은 protoclone으로부터 indole alkaloid 고생산성 세포주를 선발하고자 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 캘러스 유도 및 현탁배양

일일초(*Catharanthus roseus* (L.) G. Don ; cv. Little Delicata)의 무균발아한 유식물체의 하배축을 1 cm씩 잘라서 2.0 mg/l p-CPA, 0.5 mg/l 2,4-D, 0.1 mg/l kinetin을 첨가한 SH 고체배지 (1972)에 치상한 후 6주간 배양하여 캘러스를 얻었다. 유도된 캘러스는 동일조성의 SH 액체 배지를 첨가한 250 ml Erlenmeyer flask에 넣은 후 100 rpm의 항온 shaker에서 현탁배양하였으며 약 10일 간격으로 계대배양하였다. 본 연구에서 특별한 언급이 없는 모든 배양은 25°C의 암소에서 행하였다.

2. 원형질체 유리 및 배양

현탁배양세포로부터 원형질체의 분리 및 배양은 Frearson등(1973)의 방법에 준하였다. 계대배양후 5일 경과된 세포현탁액을 10 ml tube에 넣고 100 X g로 10 분간 원심분리하였다. Packed volume이 약 1 cm³인 세포들을 수거하여 20 ml의 13%의 mannitol을 첨가한 CPW(10)용액이 담긴 페트리디쉬(90 X 15 mm)에 분산시켜 1시간 동안 전처리하였다. Mannitol용액을 제거한 후 10 ml의 효소액으로 수거한 세포를 분산시켰다. 효소액은 2% Cellulase R-10 (Yakult), 0.5% Macerozyme R-10 (Yakult), 3 mM MES, 9% mannitol, CPW 무기염으로 조성하였다. 세포와 효소액을 섞은 페트리디쉬는 Parafilm으로 봉한 후 30 rpm의 gyratory shaker위에 놓고 27°C의 암소에서 5시간 동안 배양하였다. 유리된 원형질체를 분리하기 위하여 잔사를 구경 100 µm의 stainless steel mesh로 걸러낸 후

효소액을 100 X g로 3분간 원심분리하여 제거하였으며 가라앉은 원형질체는 9% mannitol에 CPW 무기염을 넣은 용액에 분산시킨 후 원심분리하여 용액을 제거하고 회수하는 과정을 2회 반복함으로써 잔류 효소액이 남지 않도록 하였다. 최종 원심분리는 21% sucrose에 CPW 무기염을 넣은 용액으로 원형질체를 분산시킨 후 행하였다. 남은 잔사는 가라앉히고 원형질체는 용액의 상층에 떠올랐다. 이 원형질체를 피펫으로 수거하여 MS기본배지 (1962)에 9% mannitol, 2 mg/l NAA, 0.5 mg/l BA 를 첨가한 배지(원형질체 배양배지)에 분산시킨 다음 hemacytometer로 ml당 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 개의 원형질체가 되도록 희석하였다. 이것을 페트리디쉬(60 X 15 mm)에 가능한한 얇게 담아서 (thin layer plating method) 배양하면서 24시간마다 위상차 도립 현미경으로 관찰하였다. 그리고 여러 gelling agent가 원형질체 배양에 미치는 효과를 조사하기 위해 각각 0.4%의 Bacto-agar, Sigma agarose (type VII), Scaplaque agarose를 원형질체 배양에 이용하였다. 원형질체 배양 6주후 발달한 microcallus는 SH 고체배지에 옮겨서 배양하였다.

3. 세포배양에 의한 indole alkaloid 생산

원형질체를 배양하여 얻은 microcallus를 SH 액체 배지에서 증식시킨 후 3-5회 계대배양하였다. Indole alkaloid의 생산을 위하여 계대배양 후 1주일 경과된 배양세포를 수거하여 생중량 0.5 g을 기본 무기염 농도를 1/2로 감소시킨 MS배지에 50 g/l sucrose, 1.13 mg/l BA, 0.18 mg/l IAA를 첨가한 indole alkaloid 생산배지 15 ml을 100 ml Erlenmeyer flask에

옮겨서 배양하였다. 이때 대조구는 본래의 현탁배양세포(모세포주)를 사용하였다.

4. Indole alkaloid 추출 및 정량분석

Indole alkaloid 생산배지에서 10일간 배양하여 세포를 감압여과로 수거한 후 보고된 방법들에 준하여 crude alkaloid extract를 추출하였다(Renaudin, 1984 ; Hirata et al., 1987). 수거한 배양세포 생중량 1 g에 methanol 10 ml를 첨가한 후, 40°C 온수에서 10분간 sonication을 시켜서 (이 과정을 3회 반복) 얻어진 methanol 추출액을 감압농축 하였다. 농축액을 1 N HCl 과 ethyl acetate의 혼합용액(각 20 ml)으로 분배한 후, 수용액부분을 5 N NaOH를 사용하여 pH 10으로 조정하고 수용액과 동량의 ethyl acetate로 3회 추출한 후 감압 농축하여 crude alkaloid extract를 얻었다.

각 protoclone이 생산하는 indole alkaloid는 HPLC를 사용하여 분석하였다. 이때 역상 chromatography인 ODS column (μ -Bondapack C₁₈ column, 30 x 0.39 cm)를 이용하여 표준 indole alkaloid와 비교하여 정량분석을 하였다. 용출액 (methanol: acetonitrile: 5 mM diammonium hydrogen phosphate, pH 7.3, 3:4:3)의 유속은 1 ml/min였으며 UV 298 nm에서 각 화합물을 검출하였다. 본 실험에 이용된 표준 catharanthine은 캐나다 British Columbia 대학의 J. P. Kutney 교수로부터 기증 받았으며, ajmalicine은 Fluka사로부터 구입하여 사용하였다.

5. LC/MS에 의한 indole alkaloid의 정성분석

일일초 현탁배양세포가 생산하는 indole alkaloid의 최종적인 구조확인에는 LC/MS를 사용하여 행하였다. Particle-beam interface가 연결되어 있는 Hewlett-Packard 5988A 질량분석계를 사용하였다. LC/MS 측정을 위한 HPLC의 분석조건은 정량분석조건을 약간 변형하여, 혼합 용출액중에서 5 mM diammonium hydrogen phosphate을 5 mM ammonium acetate로 치환하고 유속을 0.5 ml/min로 낮추었다. 기타의 LC 분석조건은 앞에서의 정량분석과 같다. LC로부터 용출된 각 화합물의 질량분석은 전자충격이온화(Electron impact ionization)법을 사용하였는데 이때의 분석조건은 다음과 같다. Ion source 온도는 300 °C, 전자전압은 70 eV, 전자전류는 278 μ A, 질량스캔의 범위는 70-500 amu에서 측정하였다. 화합물의 정성분석은 VPC-10의 crude alkaloid extract를 LC/MS에 charge한 후 얻어진 indole alkaloid의 mass spectrum을 표준물질의 mass spectrum과 비교하여 행하였다.

제 3 절 결 과

1. 원형질체 배양

원형질체(Fig. 1A)는 배양 3일 후 세포벽 재생과 함께 세포분열이 일어났으며 1주일 경과 후 2차 세포분열이 일어났다. 배양 3주 후 colony가 형성되었으며, 6주 후 육안으로 식별할 수 있는 microcallus가 형성되었다 (Kim et al., 1991).

2. Protophone간의 indole alkaloid 생산성 변이

각 protopone이 생산배지에서 10일간 배양한 후 생산된 주요 indole alkaloid를 정량분석한 결과 40개의 protopone중 20개에서는 indole alkaloid 생산이 이루어지지 않았으며, alkaloid를 생산하는 protopone중에서도 ajmalicine과 catharanthine 생산량은 각 protopone마다 매우 큰 차이를 보였다(Table 1). 특히 생장률이 높았던 VPC-6은 다른 protopone에 비해 ajmalicine과 catharanthine 생산량이 비교적 높았다. Catharanthine의 생산에 있어서는 VPC-10이 세포 생중량 그램당 5.9 μg 으로 가장 높았는데 이는 본래의 현탁배양세포가 catharanthine을 거의 생산하지 못한 것과 비교할 때 주목할 만한 결과이다. Ajmalicine의 생산에 있어서는 VPC-15에서 133.6 μg 으로 가장 높았는데 이것은 모세포주보다 생산성이 약 3배 향상된 것이다. Catharanthine과 ajmalicine를 생산하는 protopone에서 vindoline, vinblastine, vincristine 등의 indole alkaloid는 검출 되지않았다.

Table 1. Production of indole alkaloids in cell suspension cultures of 40 protoclones of vinca. After 10 days of culture in the production medium, indole alkaloids were extracted from the cells and analyzed by HPLC.

Protoclone VPC-	Fresh weight of cells (g/15 ml medium)	Ajmalicine ($\mu\text{g/g}$ fresh weight of cells)	Catharanthine	Protoclone VPC-	Fresh weight of cells (g/15 ml medium)	Ajmalicine ($\mu\text{g/g}$ fresh weight of cells)	Catharanthine
1	1.2	19.0	1.5	15	2.1	133.6	0
4	1.7	33.0	0	16	1.7	77.5	2.2
5	1.0	10.7	0	19	2.5	2.5	0.5
6	2.9	64.9	3.9	22	2.3	43.8	0
7	1.7	34.0	0	25	2.0	78.5	0
8	0.6	5.0	0	26	1.9	0	2.9
9	2.2	12.5	0	32	1.7	46.0	1.8
10	1.9	30.9	5.9	39	1.8	18.1	0
11	2.0	1.0	0	40	1.3	73.5	1.1
13	2.3	10.8	0	The original cell line	2.3	42.2	Trace*
14	1.0	35.5	1.8				

* Trace indicates an undetectable level by HPLC.

3. LC/MS에 의한 indole alkaloid의 정성분석

Indole alkaloid 고생산세포주 VPC-10이 생산하는 alkaloid의 최종적인 구조확인에는 LC/MS를 사용하여 수행하였다. Fig. 2는 LC/MS에서 얻어진 LC chromatogram으로 표준물질 ajmalicine과 catharanthine의 용출시간과 일치하는 peak가 18.1분, 24.4분에서 각각 검출되었다. Fig. 3은 MS의 total ion chromatogram 과 VPC-10이 생산하는 ajmalicine과 catharanthine에 해당하는 성분의 mass spectrum을 나타낸 것이다. VPC-10이 생산하는 ajmalicine과 catharanthine의 mass spectrum을 표준물질의 그것과 비교한 결과 완전히 일치하였다.

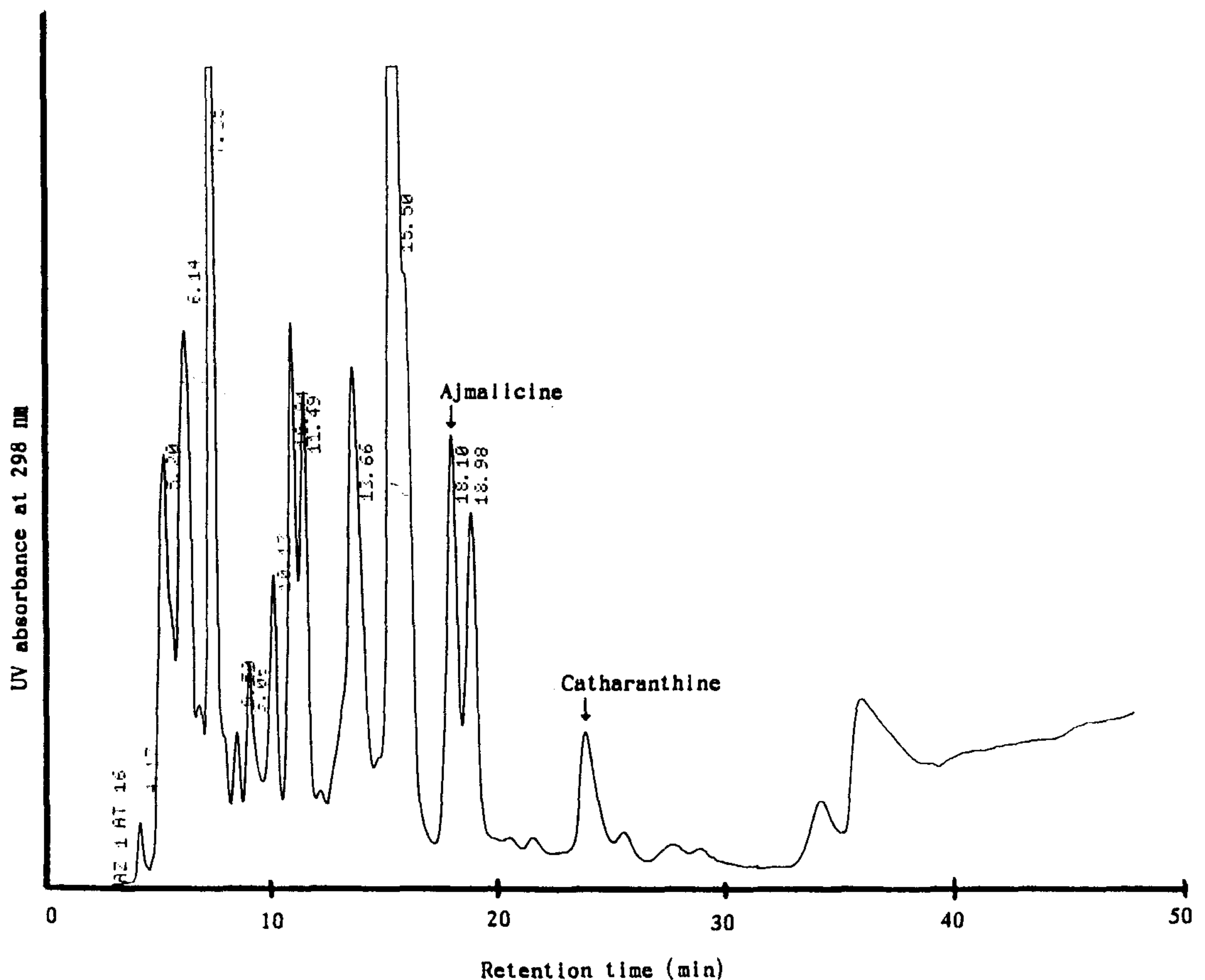
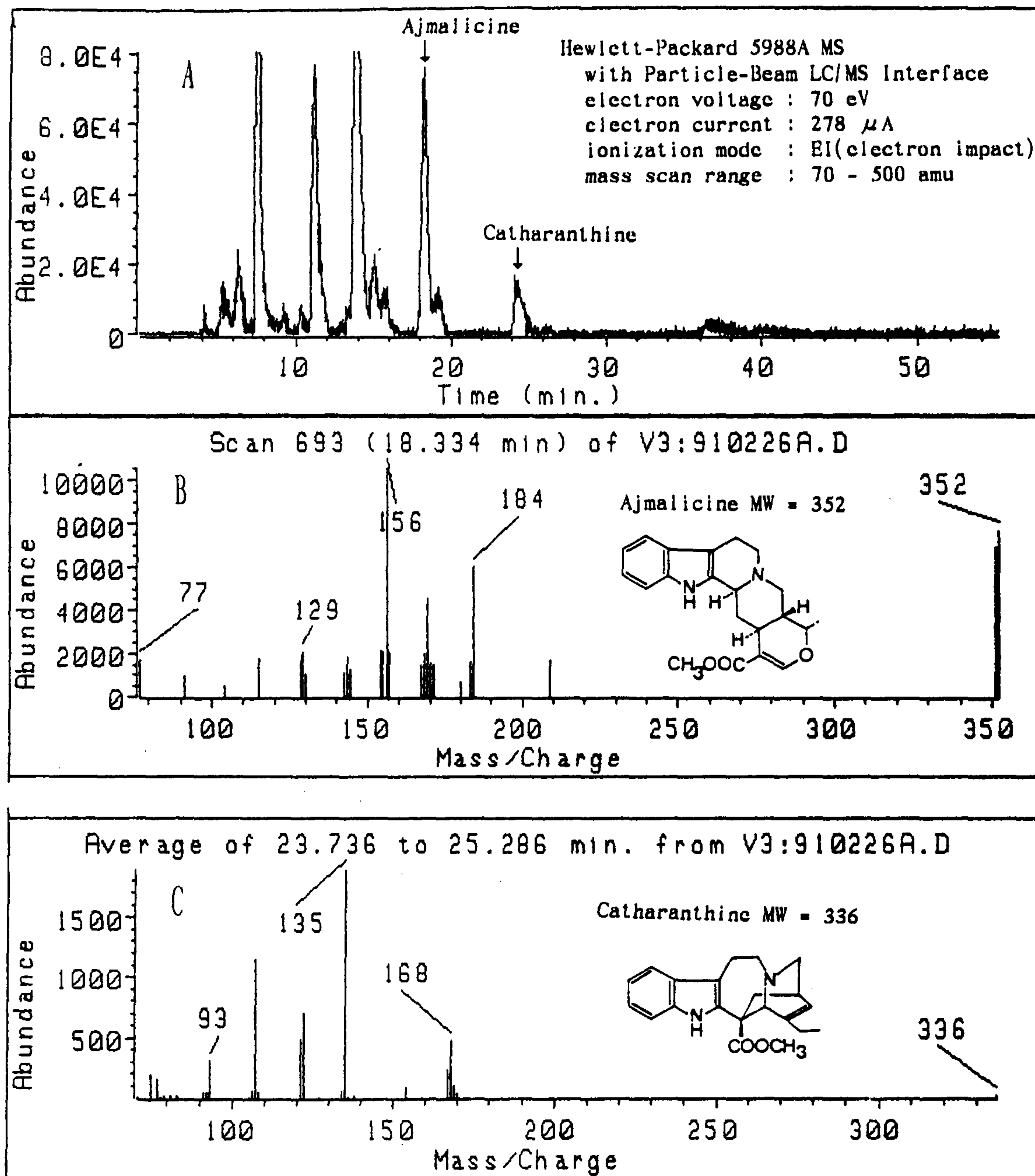


Figure 2. HPLC analysis of crude alkaloids produced by VPC-10.



TIC of V3:910226A.D

Figure 3. LC/MS analysis of ajmalicine and catharanthine produced by VPC-10.
 A. Total ion chromatogram of crude alkaloids.
 B. Mass spectrum of ajmalicine identified.
 C. Mass spectrum of catharanthine identified.

Table 2는 VPC-10이 생산하는 crude alkaloid 추출액속에 함유되어 있는 각 성분들의 mass spectrum을 각 fragment로 정리한 것으로 미확인 화합물들의 구조결정에 대해서는 현재 해석이 진행중에 있다.

Table 2. Mass spectra of crude alkaloids analyzed by LC/MS.

Retention time (LC)	Molecular ion (m/z)	Base peak ions					Identification
5.2 min	180	149	137	119	105		
6.2	199	180	167	137	135	105	
7.4	265	235	206	169	167	128	
11.2	369	337	221	184	169	144	
13.0	279	263	235	206	169	128	
15.0	263	235	169	160	130	103	
15.5	279	263	221	169	130	115	
<u>18.3</u>	<u>352</u>	351	208	184	169	156	Ajmalicine
19.3	352	214	184	169	138	108	
<u>24.4</u>	<u>336</u>	168	135	122			Catharanthine
36.5	169	121	107				

제 4 절 고 찰

본 연구에서 일일초 현탁배양세포로부터 원형질체를 유리, 배양하여 얻은 protoclone으로부터 indole alkaloid 고생산성 세포주를 선발할 수 있음이 확인되었다. Constabel 등(1981)은 일일초의 엽육세포 유래 원형질체 배양시 화학적 조성이 밝혀져 있지 않은 배지(conditioned medium)를 첨가하여 배양함으로써 유전적으로 균일한 세포주를 선발할 수 있었다. 그러나 본 실험에 이용된 일일초 현탁배양세포 유래 원형질체는 화학적 조성이 밝혀진 배지조건에서 세포분열이 이루어짐으로써 protoclone의 확보가 가능하였다.

원형질체 배양밀도와 gelling agent가 세포분열 및 colony형성에 미치는 영향을 조사하였던 바 Bacto-agar를 이용하여 원형질체를 배양한 처리구에서는 세포분열이나 colony 형성이 관찰되지 않았으나 Sigma agarose (type VII)를 이용하여 원형질체를 배양한 처리구에서는 배양밀도가 낮은 조건에서도 세포분열이 이루어졌다. 이 결과는 Shillito 등(1983)에 의한 agarose plating이나 agarose bead culture가 원형질체의 plating efficiency를 증가시킨다는 보고와 일치한다. 그러나 본 연구에서는 액체배양을 통해 얻어진 protoclone만을 alkaloid 생산분석에 이용하였으므로 추후 agarose bead culture등을 통해 더욱 많은 수의 protoclone을 확보한 다음 이들로부터 고생산성 세포주 선발 가능성도 조사되어야 하겠다. 그리고 선발된 고생산 세포주로부터 원형질체를 재차 유리, 배양하여 얻어지는 subclone에서는 보다 생산성이 높은 세포주의 선발 가능성이 제시된 바 있으므로(Tremouillaux-guiller et al., 1987) 본

실험을 통해 선발된 고생산성 세포주에서도 이에 대해 조사중이다.

Proclone의 초기 생장률은 proclone마다 커다란 차이를 보였다. 그러나 일정 배양기간이 경과한 후 proclone의 일부를 동일조성의 SH 고체배지에 이식하여 7주간 암배양 한 결과 생장률의 변이폭이 적어지면서 정상적인 이항분포를 나타냈다. 따라서 proclone 간의 생장률 변이는 세포자체의 분열능력의 차이와 원형질체 배양배지의 수분 스트레스 조건에서 배양과정동안 습득한 수분 스트레스에 대한 저항성 차이 때문인 것 같다.

40개의 proclone중 20개에서는 indole alkaloid 생산이 이루어지지 않았다. 그리고 indole alkaloid를 생산하는 proclone에서도 ajmalicine과 catharanthine의 생산성에 큰 차이를 보였다. 특히 VPC-6, VPC-10, VPC-15에서는 다른 proclone에 비하여 상대적으로 높은 indole alkaloid 생산이 이루어졌다. 세포괴 분할 및 세포균이나 단세포 분리법에 의한 고생산성 세포주 선발에는 장시간이 소요되거나 효율이 낮다. 그러나 proclone을 사용함으로써 모세포주에서는 HPLC에서 측정되지 않을 정도의 낮은 catharanthine의 생산성을 나타내었으나 VPC-6와 VPC-10의 경우와 같이 상당한 정도의 생산성을 가진 세포주를 비교적 용이하게 선발할 수 있었다. 또한 VPC-15의 경우는 모세포주보다 약 3배의 ajmalicine 생산성을 가지고 있었다. Catharanthine의 경우 VPC-10의 10일 배양후의 생산량은 건물중비로는 식물체로부터 추출되는 정도이나 이의 생산성은 배지조성과 배양조건의 개선에 따라 훨씬더 증가될 수 있을 것으로 생각된다.

한편 이량체 indole alkaloid로서 부가가치가 높은 vinblastine과

vincristine은 식물체내에 존재량이 극미량(수 ppm)일 뿐만아니라 세포배양을 통한 고생산성 세포주의 선발에 관한 보고가 거의 없는 상태이다. 따라서 vinblastine과 vincristine을 효율적으로 생산하는 수단으로서는 이들의 주요 전구체인 catharanthine과 vindoline을 효소학적으로 결합시켜 생산하는 방법이 활발히 연구되고 있다(Fujita et al., 1990 ; Endo et al., 1988 ; Misawa et al., 1988). Vinblastine과 vincristine을 효소학적 결합을 이용하여 대량생산하기 위해서는 vindoline과 catharanthine의 대량생산이 선결되어야 한다. Vindoline은 식물체의 잎에서 비교적 다량 생산되므로 식물체로부터 비교적 쉽게 충분한 양을 추출할 수 있으리라 기대된다. 그러나 catharanthine의 경우는 식물체내의 함량이 매우 낮으므로 catharanthine은 배양세포로부터 고생산성 세포주를 선발하여 대량생산하는 방법을 택할 수 있다. 이러한 측면에서 볼 때 본 연구에서 선발된 VPC-10은 비교적 많은 양의 catharanthine을 생산하고 있으므로 vinblastine과 vincristine의 효율적인 생산에 이용될 수 있을 것이다.

Protoplast간의 생장률, alkaloid생산량(Deluca et al., 1986), 생산되는 alkaloid의 종류 (Shillito et al., 1983)의 차이가 나타나는 것은 배양과정중에서 일어나는 체세포변이의 결과로 생각된다. 본 실험에서는 이러한 점을 이용하여 현탁배양세포 유래 원형질체로부터 indole alkaloid 생산성이 높은 세포주를 선발할 수 있었다. 본 실험에서 얻어진 VPC-6, VPC-10과 같이 다른 protoplast에 비하여 상대적으로 ajmalicine과 catharanthine 생산성이 높으며 생장률이 높은 세포주를 이용하여 모세포주보다 indole alkaloid 생산성이 높은 subclone을 재차

선발함으로써 보다 안정성이 있는 고생산성 세포주의 선발이 가능할 것으로 기대된다. 그리고 선발된 세포주의 indole alkaloid 생합성에 관련된 rate-limiting enzyme 이나 regulatory gene을 cloning하여 고생산성 세포주에 도입하는 등 여러 분자생물학적인 기술을 이용함으로써 indole alkaloid 고생산성의 안정적인 유지 및 생산성의 증가가 가능할 것으로 사료된다 (Hashimoto et al., 1990).

일일초 현탁배양세포가 생산하는 ajmalicine과 catharanthine의 최종적인 정성분석은 LC/MS에 의해 수행되었다. 지금까지 식물체 및 배양세포가 생산하는 indole alkaloid의 정성분석은 GC 또는 MS를 사용하여 행하여 졌으나, 이들 방법은 대상 화합물이 기화성이 있어야 하거나, 정제된 시료만이 적용가능 하였기 때문에 사용에는 제한이 있었다. 이에비해 본 실험에서 알수 있듯이 HPLC에서 분석가능한 시료는 완전한 정제를 하지 않고도 원리적으로 모두 LC/MS에 적용할수 있다. 기지의 화합물일 경우는 표준물질과의 용출시간과 mass spectrum으로부터 용이하게 구조확인이 가능하며, 미지의 화합물일 경우는 mass spectrum으로부터 구조결정에 도움이 될수 있는 정보를 얻을수 있다. 따라서 LC/MS 분석법은 이차대사산물의 구조 결정에는 대단히 유용한 분석방법이라 여겨진다. 금후, HPLC의 이용과 더불어 LC/MS의 사용이 증대될 것으로 기대된다.

제 5 절 인용문헌

- Constabel, F., S. Rambold, K. B. Chatson, W. G. W. Kurz and J. P. Kutney. 1981. Alkaloid production in *Catharanthus roseus* (L) G. Don. VI. Variation in alkaloid spectra of cell lines derived from one single leaf. *Plant Cell Rep.* 1: 3-5.
- Deluca, V., J. Balsevich, R. T. Tyler, U. Eilert, B. D. Panchuk, and W. G. W. Kurz. 1986. Biosynthesis of indole alkaloids: developmental regulation of the biosynthetic pathway from tabersonine to vindoline in *Catharanthus roseus*. *J. Plant Physiol.* 125: 147-156.
- Deluca, V. and W.G.W. Kurz. 1988. Monoterpene indole alkaloids (*C. roseus*). In, *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. F. Constabel and I.K. Vasil (eds.). Vol.5. *Phytochemicals in Plant and Cell Cultures*, Academic Press, San Diego. pp. 385-401.
- Endo, T., A. Goodbody, J. Vukovic and M. Misawa. 1988. Enzymes from *Catharanthus roseus* cell suspension cultures that couple vindoline and catharanthine to form 3',4'-anhydrovinblastine. *Phytochemistry* 27: 2147-2149.
- Frearson, M. Y., J. B. Power and E. C. Cocking. 1973. The isolation and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Dev. Biol.* 33: 130-137
- Fujita, Y., Y. Hara, T. Morimoto and M. Misawa. 1990. Semisynthetic production of Vinblastine involving cell cultures of

- Catharanthus roseus* and chemical reaction. In: Current plant science and biotechnology in agriculture, Nijkamp, H.J.J., L.H.W. Vanderplas, J. Vanaartrijk. eds. Vol. 9. pp. 783-743. Kluwer Academic Publishers Dordrecht.
- Fujita, Y., S. Takahashi and Y. Yamada. 1984. Selection of cell lines with high productivity of shikonin derivatives through protoplasts of *Lithospermum erythrorhizon*. In, Third European congress on biotechnology. Verlag Chemie. pp. 1-161-166.
- Hashimoto, T., J. Matsuda, S. Okabe, Y. Amano, D. J. Yun, A. Hayashi and Y. Yamada. 1990. Molecular cloning and tissue and cell specific expression of hyscyamine 6 β -hydroxylase. In: Current plant science and biotechnology in agriculture, Nijkamp, H.J.J., L. H. W. Vanderplas, J. Vanaartrijk. eds. Vol. 9. pp. 775-780. Kluwer Academic Publishers Dordrecht.
- Hirata, K., A. Yamanaka, N. Kurano, k. Miyamoto and Y. Miura. 1987. Production of indole alkaloids in multiple shoot culture of *Catharanthus roseus* (L).G.Don. Agric. Biol. Chem. 51 : 1311-1317.
- Kim, S.W., K.H. Jung, S.S. Kwak, H.S. Choi, C.H. Choi and J.R. Liu 1991. Selection of Protoplasts-derived cell lines for high yields of indole alkaloids from suspension cultures of vinca (*Catharanthus roseus*). Korean J. Biotechnol. Bioeng. 6:1-7.
- Kurz, W.G.W., K.B. Chatson, F. Constabel, J.P. Kutney, L.S.L. Choi, P. Kolodziejczyk, S.K. Sleigh, K.L. stuart and B.R. Worth. 1981.

- Alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures VIII. Characterisation of the PRL/200 cell line. *Planta Med.* 42:22-
- Lounasmaa, M. and J. Galambos. 1989. Indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Forsch. Chem. Org. Naturst.* 55:89-115.
- Misawa, M., T. Endo, A. Goodbody, J. Vukovic, C. Chapple, L. Choi and J. P. Kutney. 1988. Synthesis of dimeric indole alkaloids by cell free extraction from cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry* 27:1355-1359.
- Murashige, T and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
- Parr, A.J. 1989. The production of secondary metabolites by plant cell cultures. *J. of Biotechnology* 10:1-26.
- Renaudin, J.P. 1984. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic characteristics of indole alkaloids from cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *J. of Chromatography* 291:165-174.
- Schenk, F. V. and A. C. Hilderbrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell culture. *Can. J. Bot.* 50: 199-204.
- Shillito, R. D., J. Paszkowski and I. Potrykus. 1983. Agarose plating and a bead culture technique enable and stimulate development of protoplast derived colonies in number of plant species. *Plant Cell Rep.* 2: 244-247.

Tremouillaux-Guiller, J., F. Andreu, J. Creche, J. C. Chenieux,
and M. Rideau. 1987. Variability in tissue cultures of *Choisya*
ternata. Alkaloid accumulation in protoclonal and aggregate clones
obtained from established strains. *Plant Cell Rep.* 6:375-378.

제 3 장 일일초현탁배양에서 Indole Alkaloid 생산성

향상을 위한 적정배양조건 규명

제 1 절 서론

일일초(*Catharanthus roseus*)가 생산하는 vinblastine, vincristine, ajmalicine 등의 indole alkaloid는 항암, 혈압강하 등의 약리작용이 있는 고가의 이차대사산물이다. 생체내 이들 indole alkaloid 함량은 매우 낮아서 식물체로부터 직접 추출하여 이용하는 것은 경제성이 낮다. 또한 복잡한 화학구조로 인하여 유기합성적인 방법으로 대량생산하는 것도 용이하지 않다. 항암제로 사용되고있는 vinblastine은 전구체인 vindoline과 catharanthine의 결합으로 생성되는데, 생체내에 vindoline은 비교적 다량이 함유되어 있지만, catharanthine은 극히 소량으로 존재하므로 후자를 세포배양에 의해 생산하기 위한 연구가 진행되어 왔다. 이를 위해 Zenk 등(1977)은 2 단계 배양법을 개발하였는데, 2,4-D를 첨가한 MS(1962)나 B5(Gamborg et al., 1968) 배지에서 일차적으로 세포량을 증가시킨 후 이를 이차대사산물의 생산에 억제작용을 하는 2,4-D 대신 IAA와 BA을 사용하고, sucrose의 농도를 높이며, 무기염의 농도를 낮춘 배지로 옮겨서 이차 배양을 하였다.

본 연구에서는 catharanthine과 ajmalicine 고생산세포주 VPC-10(Kim et al., 1991)을 사용하여 indole alkaloid를 생산하고자 할때 MS 기본배지의 무기염 농도와 초기 세포접종량 및 탄소원인 sucrose의 농도가 세포의 생장과 indole alkaloid 생산성에 대해 매우 중요한 인자로 작용한다고 판단되어 이에대한 실험을 수행하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 식물재료 및 세포배양조건

일일초(*C. roseus* (L.) G. Don; cv Little Delicata)의 현탁배양세포로부터 원형질체배양에 의하여 선발된 indole alkaloid 고생산세포주 VPC-10 (Kim et al., 1991)을 사용하였다. 세포의 증식배지로는 2.0 mg/L p-CPA, 0.5 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L kinetin을 첨가한 SH (1972) 배지를 사용하였으며 세포는 10 일 간격으로 계대배양하였다. Indole alkaloid 생산배지로는 1.13 mg/L BA, 0.18 mg/L IAA, 50 g/L sucrose를 첨가한 MS배지를 사용하였다. Indole alkaloid의 생산을 위해 증식배지에서 7 일간 배양한 세포를 450 μ m stainless steel mesh로 수거하여 생산배지로 옮겨주었다. MS 무기염의 농도를 달리하여 실험할 경우 무기염을 1/2, 1/4, 1/6, 1/8, 1/10, 1/16 MS로 희석하여 각 flask에 생중량 0.5 g을 접종하였다. 접종량의 영향을 본 실험에서는 무기염의 농도를 1/2, 1/4, 1/6 MS로 하고 각각에 생중량 0.5, 1, 2 g의 세포를 접종하였다. Sucrose의 영향에 관한 실험은 MS 무기염의 농도를 1/2 MS로 하고 sucrose의 농도를 3, 5, 7.5, 10%로 하여 각각에 1 g의 세포를 접종하였다. 수거된 세포는 생산배지로 3 회 세척한 후 생산배지 50 mL가 들어있는 300 mL Erlenmeyer flask에 접종하여 100 rpm의 25 °C 항온 gyratory shaker에 빛을 차단한 상태에서 현탁배양하였다. 세포의 무게는 감압여과에 의해 수거하여 생중량을 측정하고 이를 50 °C에서 24시간 동안 건조한 후 건조량을 측정하였다.

2. Indole alkaloid의 생산성 분석

Alkaloid 생산배지에서 배양 7일부터 21일까지 3 일 간격으로 배양 세포를 수거한 후 보고된 방법(Kurz et al., 1980)들에 준하여 alkaloid를 추출하여 정량분석하였다. 수거한 배양세포 1 g을 사용하여 제2장에서와 동일한 방법으로 crude alkaloid extract을 추출한 후 ODS 칼럼을 사용한 HPLC로 정량분석하였다. HPLC에서 정량분석한 ajmalicine과 catharanthine의 최종적인 정성분석은 liquid chromatography mass spectrometer(LC-MS)에 의하여 표준물질의 mass spectrum과 비교하여 확인하였다(Jung et al., 1991).

제 3 절 결 과

1. 무기염의 농도의 영향

MS 무기염의 농도를 여러 단계로 희석한 생산배지에 세포의 생중량 0.5 g을 접종하여 배양 시간별로 세포의 농도와 alkaloid생산을 조사한 바, 무기염의 농도가 낮아짐에 따라 세포의 생장속도가 늦어지며 또한 최종세포의 농도도 감소하였으나, alkaloid의 생산은 증가하여 최대 생산을 보인 13 일 짜의 ajmalicine과 catharanthine의 단위세포중량당 생산성은 1/6 MS에서 각각 최고치를 나타내었다. 그러나, 무기염의 농도가 더 낮아지면 생산성이 다시 감소하였다(Fig. 1).

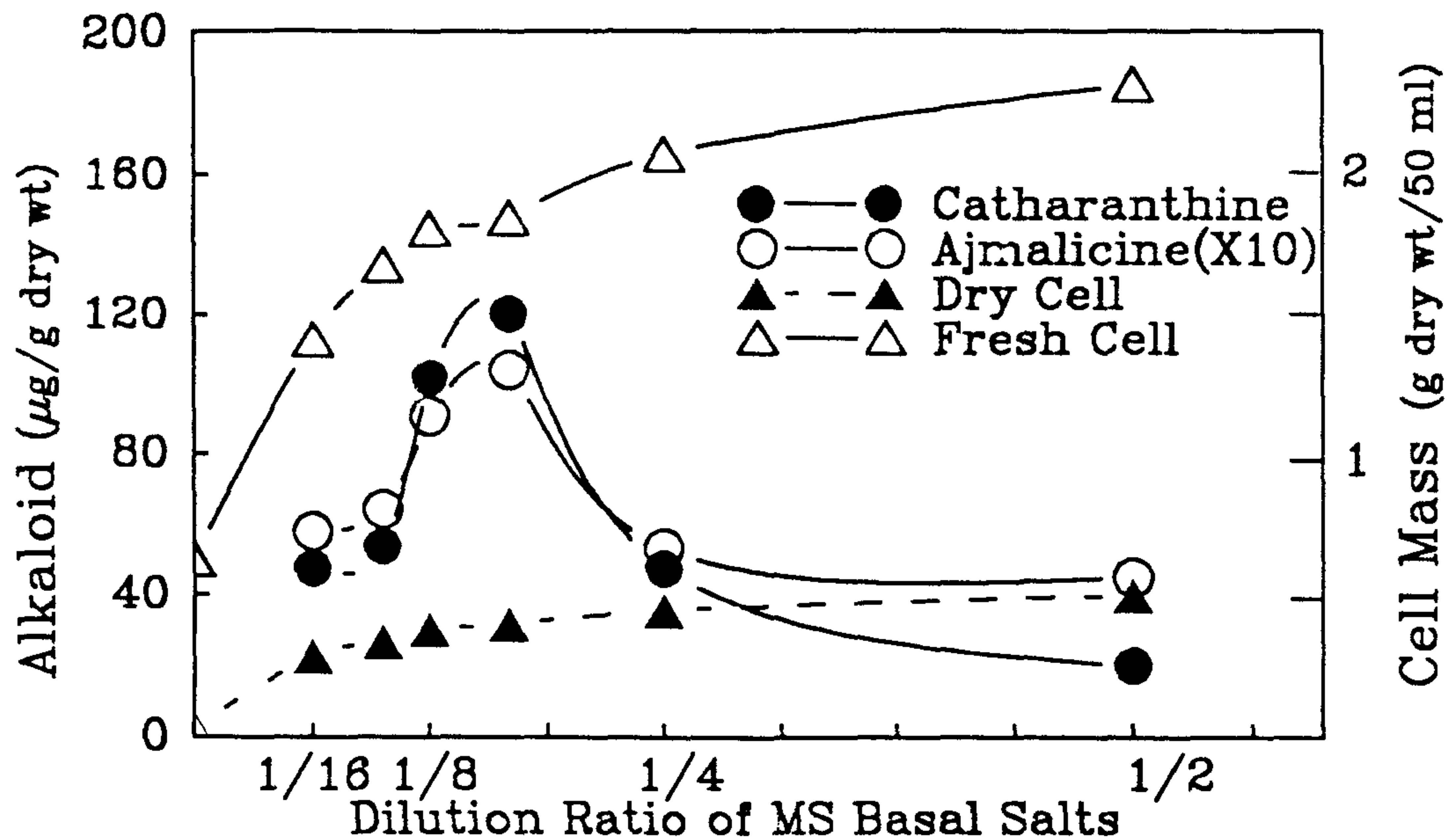


Figure 1. Effect of dilution ratio of MS basal salts on cell growth and alkaloid production of VPC-10. The basal salts were serially diluted. Cells were harvested after 13 days of culture.

2. 무기염농도와 세포접종량의 영향

세포의 농도를 증가시키고 이에 따른 생산성의 변화를 조사하기 위해 1/6 MS 기본배지에 세포접종량을 0.5, 1, 2 g으로 한 경우 접종량이

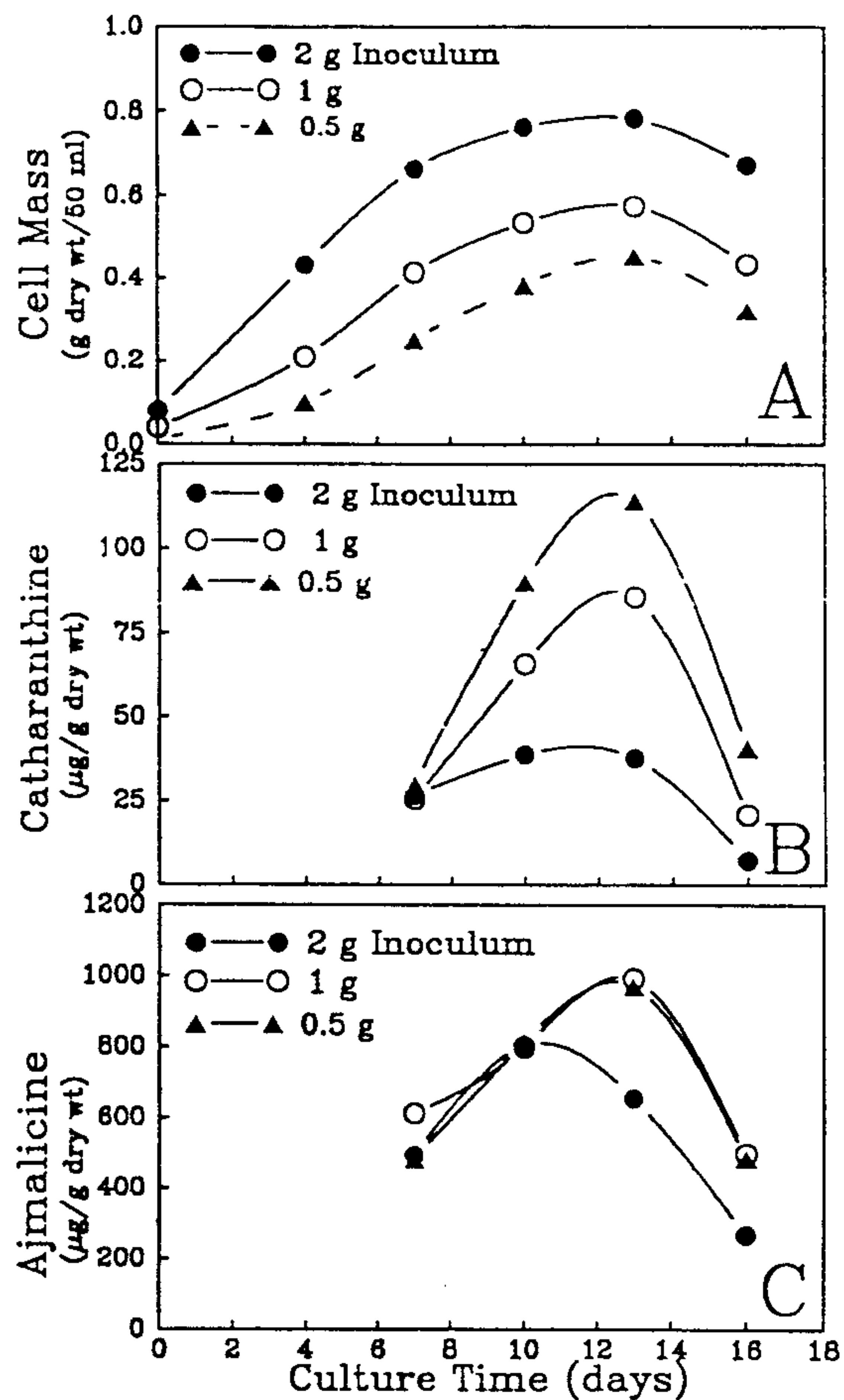


Figure 2. Effect of cell inoculum size on cell growth and alkaloid production of VPC-10. The MS basal salts in production medium was diluted to 1/6. One-half, 1, or 2 g (fr wt) of cells were inoculated to each flask, respectively. A : Time course of cell growth ; B : Time course of catharanthine production ; C : Time course of ajmalicine production.

증가함에 따라 증식속도가 빨라지며 2 g 접종시가 0.5 g 접종시 보다 최종 세포농도가 약 2 배 높아졌다(Fig. 2-A). 그러나 접종량이 증가됨에 따라 catharanthine의 단위세포당 생산성은 급격하게 감소하여 2 g 접종시 0.5 g 접종하였을 때의 생산량의 20%가 생산되었다(Fig. 2-B). Ajmalicine의 경우는 0.5 g과 1 g 접종시에는 큰 차이가 없으나 2 g 접종 시에는 단위세포당 생산성이 10 일까지는 비슷하게 유지되지만 그후는 더 이상 계속되지 않아 0.5 g 접종시 보다 생산량이 30% 가량 감소하였다 (Fig. 2-C).

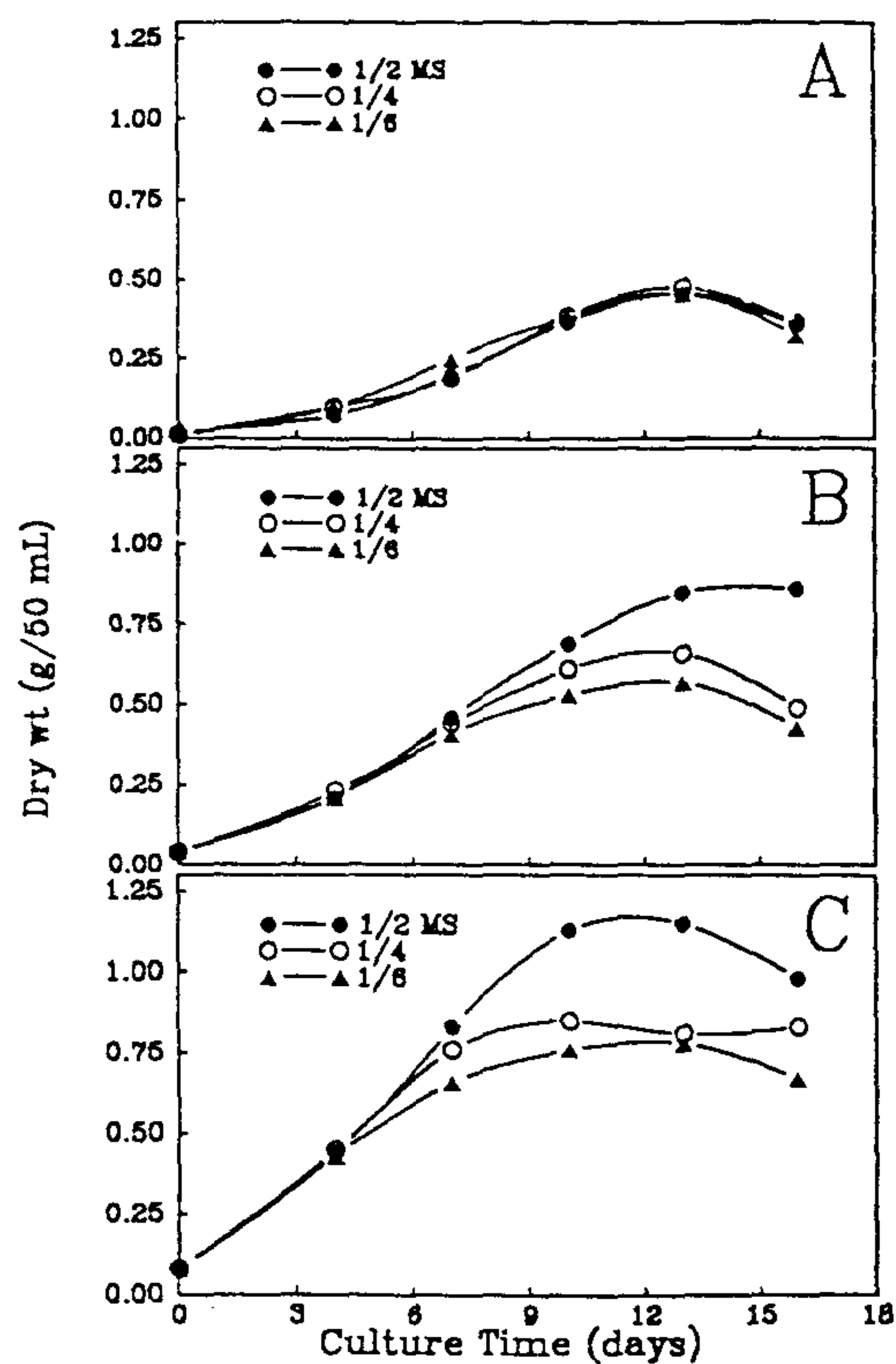


Figure 3. Effect of concentration of MS basal salts and cell inoculum size on cell growth of VPC-10. One-half (A), 1.0 (B), or 2.0 g (C) fresh weight of cells were inoculated, respectively

접종량을 높이면 최종세포농도를 증가시킬 수는 있었으나 단위세포당 생산성이 감소하여 alkaloid의 총생산성이 낮아졌다. 1/6 MS에서와 마찬가지로 1/4 MS와 1/2 MS에서도 세포의 성장속도는 초기세포접종량이 증가함에 따라 빨라지며(Fig. 3), 최종세포농도는 접종량이 적을 경우는 무기염농도의 영향이 크지 않았지만(Fig. 3-A) 접종량이 많아지면 무기염농도가 높아짐에 따라 최종세포농도가 증가하였다(Fig. 3-B, C). Catharanthine의 단위세포당 생산성은 0.5 g 접종시 1/6 MS에서 최대치를(Fig. 4-A1), 1 g 접종시는 1/2, 1/4, 1/6 MS에서 모두

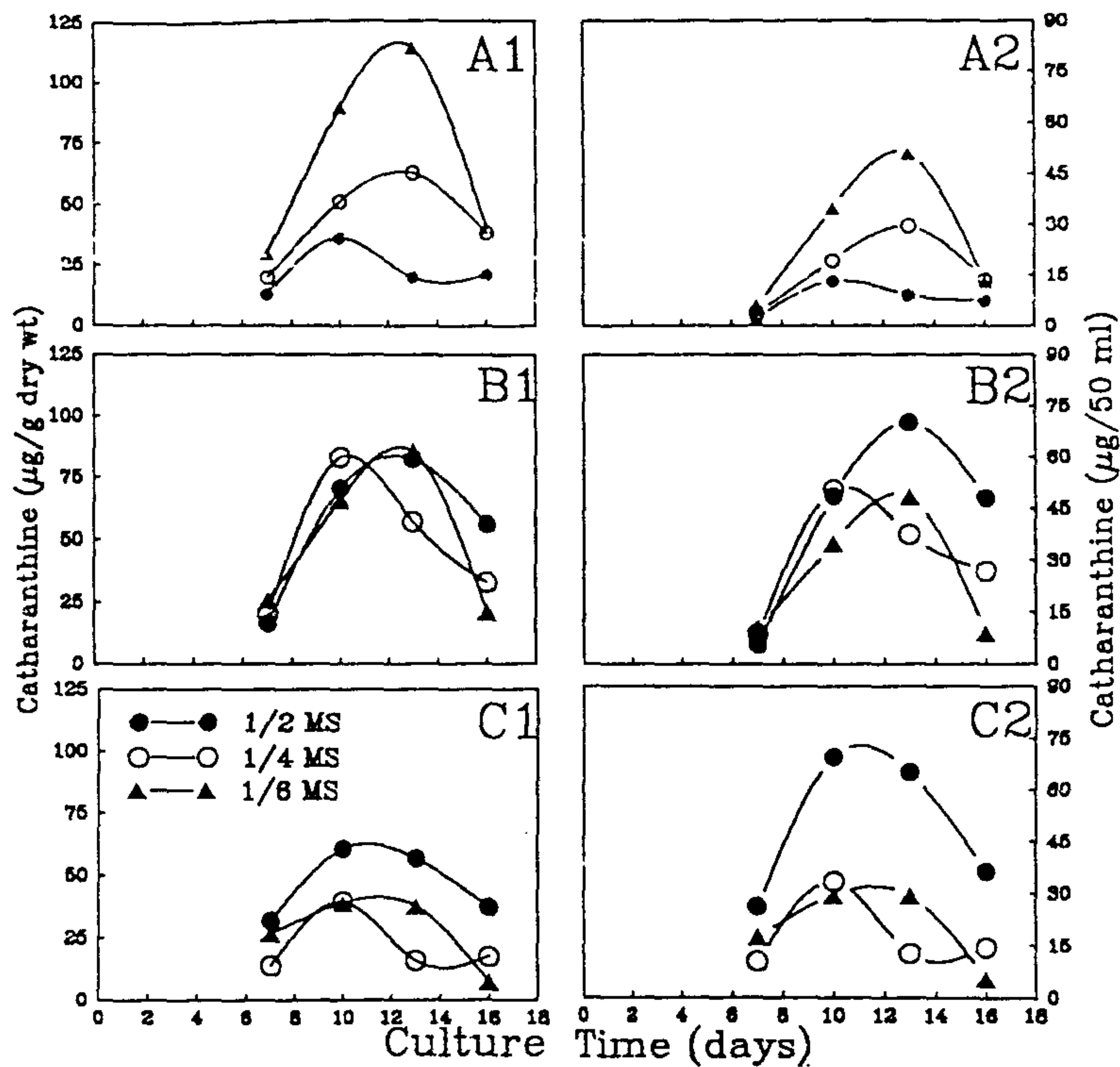


Figure 4. Effect of inoculum size on the catharanthine production of VPC-10. One-half (A1,2), 1.0 (B1,2), or 2.0 g (C1,2) fresh weight of cells were inoculated, respectively. A1, B1 and C1 are profiles of catharanthine contents ($\mu\text{g/g}$ dry wt). A2, B2, and C2 are profiles of volumetric yields ($\mu\text{g}/50$ ml) of catharanthine.

비슷하였고(Fig. 4-B1), 2 g 접종시에는 1/2 MS에서 가장 높았다(Fig. 4-C1). 세포의 생장을 고려한 총생산성에 있어서는 접종량을 증가시키면 단위세포당 생산성은 감소하지만 세포농도가 증가하기 때문에 무기염 농도가 1/2 MS에서 1 g과 2 g 접종시 비슷한 생산량(1.4 mg/L)을 보였다(Fig. 4-A2, B2, C2). Ajmalicine의 경우는 catharanthine 처럼 현저한 차이를 보이지는 않았지만 접종량을 증가시키면 단위세포당 생산성이 감소하였으며, 총생산성은 1/4 MS, 1 g 접종시 최대(14 mg/L)였다(데이터는 제시되지 않음).

3. Sucrose의 세포생장에 미치는 영향

초기 sucrose 농도가 증가함에 따른 세포의 성장을 생중량과 건중량으로 측정된 결과, 생중량에 있어서는 sucrose의 농도가 증가함에 따라 생장이 억제되는 현상을 보였으나(Fig. 5-A), 건중량은 sucrose의 농도가

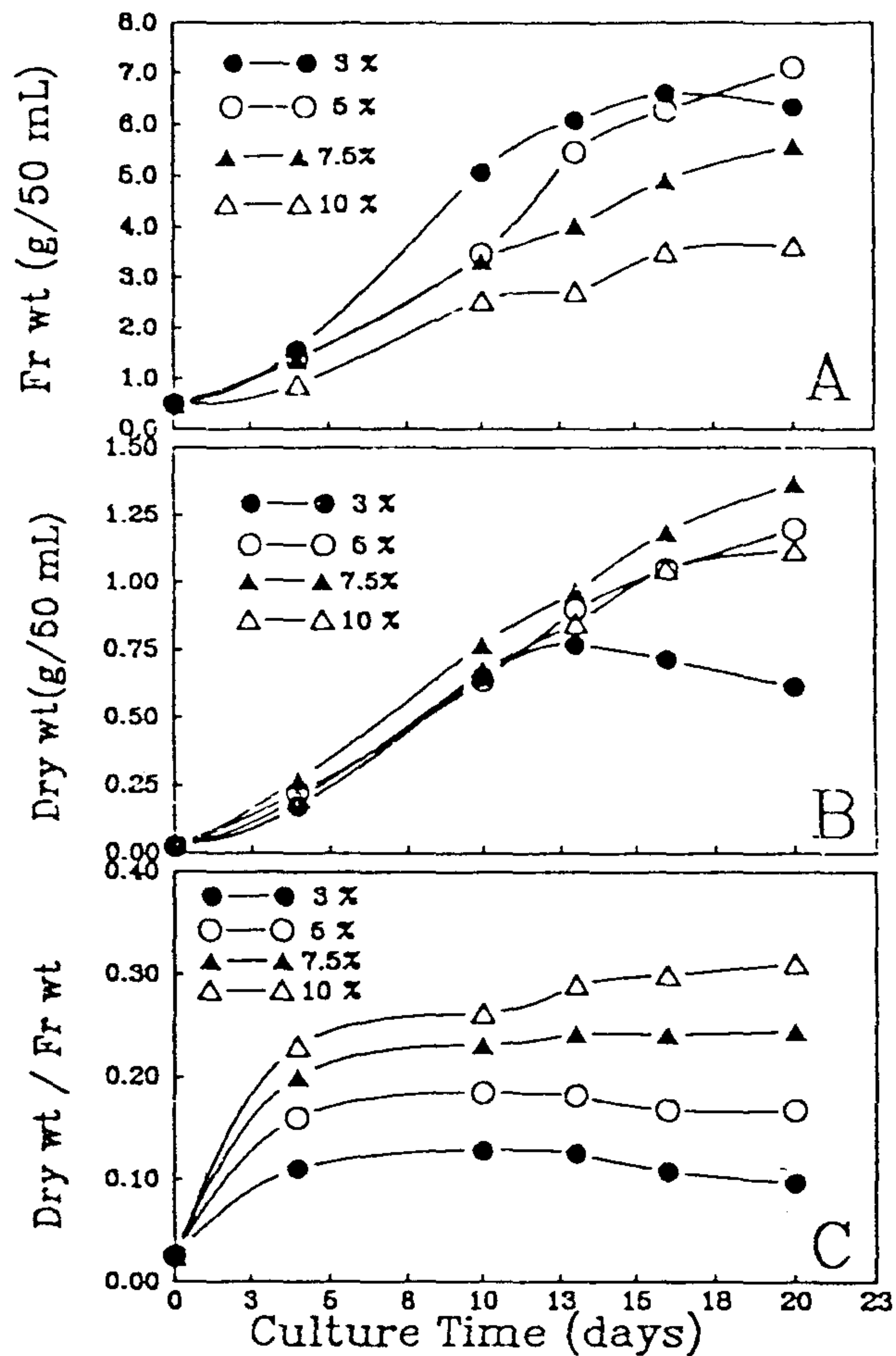


Figure 5. Effect of sucrose level on growth of VPC-10 in production medium. One g of cells was inoculated into 50 ml. production medium in 300 ml flask. A : Profile of cell growth as a fresh fresh weight base; B : Profile of cell growth as a dry weight base; C : Profile of ratios of dry to fresh weight.

증가하면 성장속도가 약간씩 증가하는데 7.5% 이상이 되면 세포의 성장속도가 저해되었다(Fig. 5-B). 그러나 이들의 건중량은 생중량과 비례하지 않았는데, sucrose의 농도가 증가함에 따라 건중량 / 생중량의 비가 0.13에서 0.3까지 증가하였다(Fig. 5-C).

4. Sucrose의 indole alkaloid 생산에 미치는 영향

시간에 따른 단위세포당 catharanthine은 sucrose의 농도를 높임에 따라 생산성이 증가하였는데(Fig. 6-A), 7.5% 이상에서도 더 이상 생산성을 높이지 못하였으며, 3% 보다 7.5% 사용시 생산성은 2 배 이상 높았다. Ajmalicine의 경우는 sucrose의 농도를 높임에 따라 점차적으로 단위세포당 생산성이 감소하였다(Fig. 6-B). 이와 같이 catharanthine과

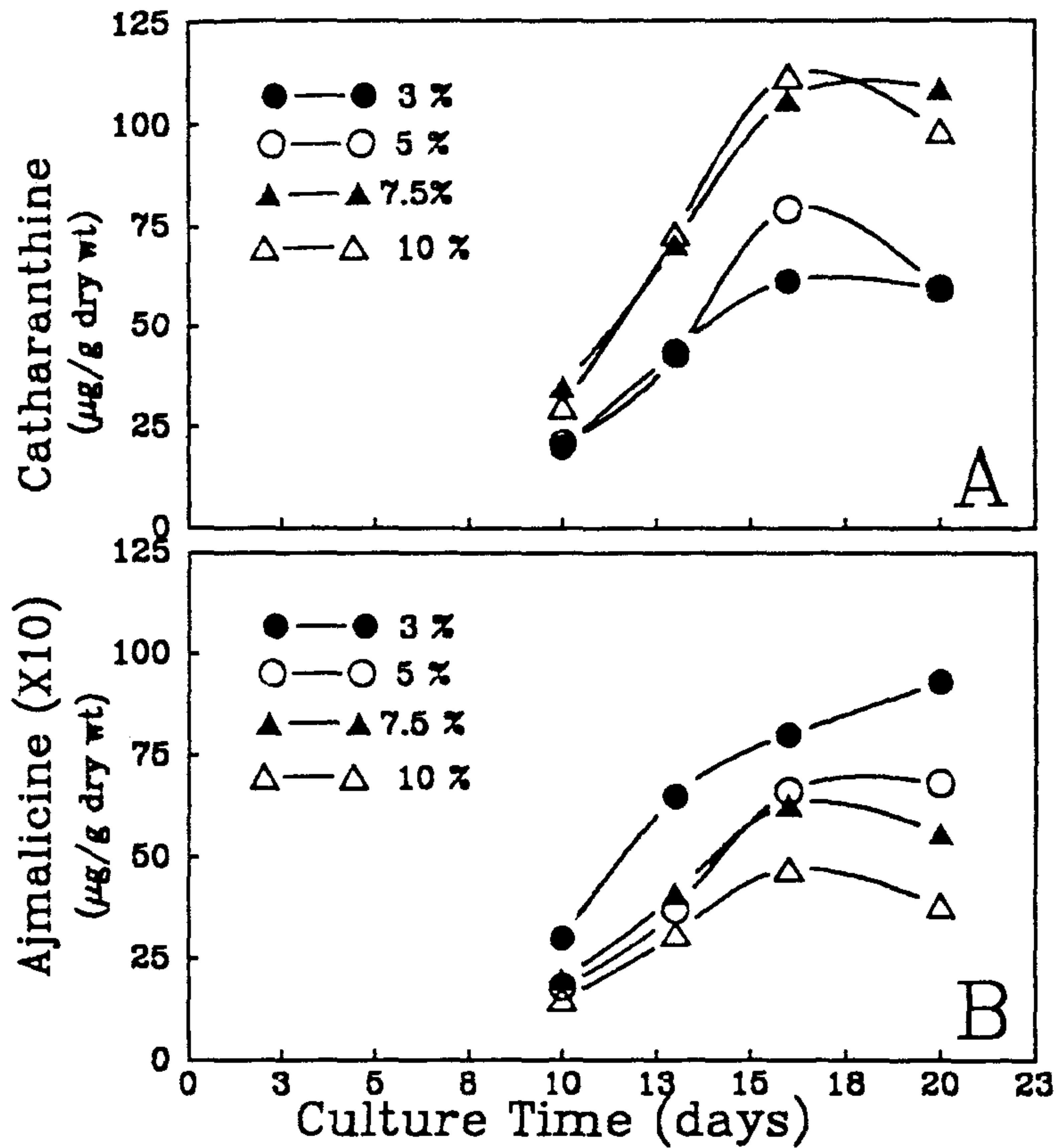


Figure 6. Profiles of alkaloid production by VPC-10 cultured in various levels of sucrose.
A : Catharanthine ; B : Ajmalicine.

ajmalicine의 생산성은 sucrose농도에 대해 각기 상반된 현상을 보였다(Fig. 7-A). 세포의 생장을 고려한 총생산량을 단위세포당 생산성에 세포의 농도를 곱하여 Figure 7-B에 나타냈는데, sucrose의 농도가 7.5%에서 catharanthine ($126 \mu\text{g}/50 \text{ mL}$)과 ajmalicine ($0.75 \text{ mg}/50 \text{ mL}$)이 최대치를 보였다.

본 연구에서의 indole alkaloids의 생산성 향상을 단계별로 정리하여 Table 1에 나타내었다. Zenk등의 배지와 유사한 1/2 MS, 5% sucrose, 0.5 g 접종시 생산량을 기준으로 하였을 때, catharanthine의 단위세포당생산성은 1/6 MS, 0.5 g 접종시 최대(3.1배)였으며, 총생산성은 세포의 접종량과 sucrose의 최적조건 설정에 의해 7.2 배까지, ajmalicine의 경우는 단위 세포당 생산성과 총생산성에 있어 각각 2.6과 4.4배 까지 향상시킬 수 있었다.

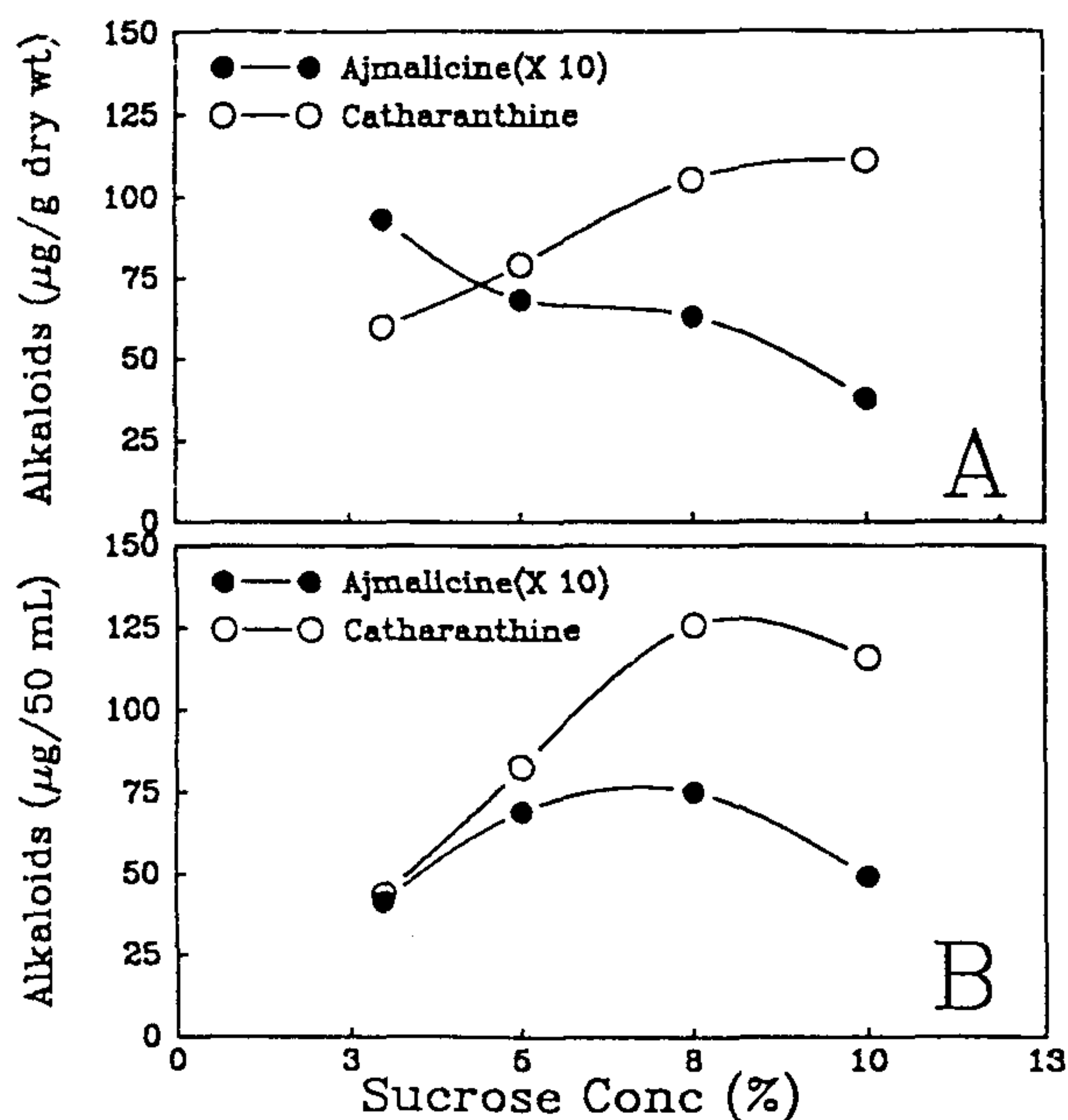


Figure 7. Effect of sucrose level on contents and volumetric yields of ajmalicine and catharanthine after 16 days of culture.
 A : Contents of indole alkaloids (per unit dry cell mass);
 B : Volumetric yields of indole alkaloids (per unit volume)

Table 1. Enhanced yields of catharanthine and ajmalicine by optimization of culture conditions.

Culture conditions			Cell mass	Catharanthine		Ajmalicine	
Conc of MS	Inoculum (g/50 ml.)	Sucrose (%)	Dry wt (g/50ml.)	Content ^a (μ g/g dry wt)	Volumetric yield ^a (μ g/50mL)	Content ^a (mg/g dry wt)	Volumetric yield ^a (mg/50ml.)
1/2	0.5	5	0.47	37 (1)	17.4 (1)	0.38(1)	0.17(1)
1/6	0.5	5	0.45	114 (3.1)	40.7 (2.3)	0.97(2.6)	0.44(2.6)
1/2	1.0	5	0.85	70 (1.9)	82.4 (4.7)	0.69(1.8)	0.59(3.3)
1/2	1.0	7.5	1.19	106 (2.9)	126.0 (7.2)	0.63(1.7)	0.75(4.4)

^a Values in parantheses are proportional to a value of the first row in each column.

제 4 절 고 찰

원형질체배양에 의해 선발된 VPC-10은 혈압강하제로 사용되는 ajmalicine과 항암제로 사용되고 있는 이량체 indole alkaloid인 vinblastine의 전구체인 catharanthine을 생산하는 세포주이다. 이들 indole alkaloid의 생산성 향상을 위해 무기염의 농도와 sucrose의 농도 및 세포접종량이 세포의 성장과 생산에 미치는 영향에 관하여 조사하였다. 0.5 g 접종시 생산배지로 사용된 MS 배지의 무기염농도를 희석하였을 때 세포의 성장속도는 감소하지만 ajmalicine과 catharanthine의 단위세포당생산성은 증가하여 1/6 MS에서 최대치를 보였는데(일일초의 앞에 존재하는 catharanthine 함량(30 μ g/g 건물중)의 3 배에 달하는 것임), 이는 일일초의 세포배양에서 배지내의 질소원이나 인산의 농도를 제한하면 indole alkaloid의 생산이 증가한다는 점(Stafford et al., 1983 ; Knobloch et al., 1982)으로 미루어보아 무기염 중에 indole alkaloid의 생산을 저해하는 성분이 존재하여 농도를 감소시킬 경우 생산이 증가하는 것으로 여겨진다. 그러나, 무기염의 농도를 계속 희석할 경우 단위세포당 생산성이 떨어졌는 이는 배지 내의 무기염이 부족하여 세포의 대사작용이 원활하게 유지되지 못하였기 때문으로 생각된다. 1/6 MS에서 접종농도를 높였을 때 세포의 성장속도나 최종세포농도는 증가하였으나 indole alkaloid 특히 catharanthine의 생산성은 급격하게 감소하였다. 접종량이 많아지면 무기염의 농도를 높여주어야 생산성이 회복되었지만, 1/2 MS 배지에 1 g 접종시 얻은 단위세포당 최대생산성은 catharanthine의 경우 1/6 MS, 0.5 g 접종시 얻은 생산성의 70% 정도였다.

배지에 sucrose를 첨가한 경우 각각의 sucrose 농도에서 13 일 간 배양된 세포의 현미경으로 관찰하였을 때 3%의 경우는 세포가

lysis되었으나, sucrose의 농도가 높아짐에 따라 세포의 lysis 현상이 현격히 감소하였다 (data는 제시되지 않았음). 또한 세포의 내부는 starch granule로 충전되어 있는 것을 관찰할 수 있었는데, 이것은 세포의 건중량/생중량의 비가 증가되었던 세포의 성장 현상을 뒷받침하는 것이라 할 수 있겠다. 이와같이 배지에 sucrose를 증가시켰을 때 catharanthine의 단위세포당 생산성(106 $\mu\text{g/g}$ dry wt)이 1/6 MS에서 얻은 수치(114 $\mu\text{g/g}$ dry wt)까지 회복시킬 수 있었다.

Sucrose의 농도가 증가함에 따라 catharanthine의 단위세포당 생산성은 향상되나 ajmalicine의 생산성은 감소하였는데, 이는 osmolarity의 증가에 기인하며 ajmalicine의 생합성경로에 높은 osmolarity에 의해 rate-limiting될 수 있는 메카니즘이 존재함을 시사한다. 일일초에서는 indole alkaloid의 주요전구체인 strictosidine으로부터 여러단계의 독립된 반응을 거쳐 각기 다른 구조적 특성을 갖는 ajmalicine, catharanthine, vindoline 등이 합성된다. 배양세포에서는 ajmalicine과 catharanthine은 생산되지만 생합성의 몇 단계에서 엽록체의 thylakoid에 존재하는 효소를 필요로 하는 vindoline은 생산되지 않는다(De Luca et. al., 1988). 따라서 배양세포에서 catharanthine의 생산성 증대를 위해서 strictosidine으로부터 ajmalicine으로의 생산경로를 차단시킬 필요가 있다(Liu et al., 1991). Catharanthine보다 10 배 가량 생산성이 높은 ajmalicine으로의 생합성 흐름을 catharanthine으로 진행되도록 osmoticum으로 조절할 수 있다면 catharanthine의 생산성을 효과적으로 증가시킬 수 있을 것이다. 따라서 향후의 연구에서는 배지의 각 성분이나 osmolarity등의 요인에 의해 indole alkaloid의 생합성에 미치는 영향을 조사하고자 한다.

제 5 절 인용문헌

- De Luca V, Fernandez JA, Campbell D, Kurz WGW (1988) Developmental regulation of enzyme of indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol* 86 : 447-450
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 151-158
- Jung KH, Kwak SS, Kim SW, Choi CY, Hco GS, Liu JR (1991). Selection of protoplasts-derived cell lines for high yields of indole alkaloids from suspension cultures of vinca (*Catharanthus roseus*) and the qualitative analysis of the compounds by LC/MS. *Biotechnology Letters*. (submitted)
- Kim SW, Jung KH, Kwak SS, Choi HS, Choi CY, Liu JR (1991) Selection of protoplast-derived cell lines for high yield of indole alkaloids from suspension cultures of vinca(*Catharanthus roseus*). *Korea J Biotechnol Bioeng* 6 : 1-7
- Knobloch KH, Bast T, Berlin J (1983) Influence of phosphate on the formation of the indole alkaloids and phenolic compounds in the cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2 : 333-340
- Kurz WGW, Chatson KB, Constabel F, Kutney JP, Choi LSL, Kolodziejczyk P, Sleigh SK, Stuart KL, Worth BR (1980) Alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures. IV. Characterization of the 953 cell line. *Helv Chim Acta* 63 : 1891-1896

- Liu JR, Kwak SS, Jung KH (1991) Empirical and rational approaches for improving yields of secondary metabolites in plant cell cultures. Proceedings of International Symposium on Genetic Engineering in commemoration of the 40th anniversary of Chungbuk National University Research Institute for Genetic Engineering, Chungbuk National University, Korea, pp 29-45
- Murashige T, Skoog F (1962) A derived medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 : 473-497
- Shenk R, Hildebrandt A (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledones and dicotyledones cell cultures. *Can J Bot* 50 : 100-204
- Stafford A, Fowler MW (1983) Effect of carbon and nitrogen on nutrient uptake and metabolism in batch cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2 : 239-251
- Zenk MH, El-Shagi H, Arens H, Stockigt J, Weiler EW, Deus B (1977) Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. In W Barz, E Reinhard, MH Zenk, eds, *Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application*, Springer Verlag, Berlin, pp 27-44

제 4 장 일일초배양세포로부터 Indole Alkaloid 생합성관련

단백질의 이차원 겔 전기영동

제 1 절 서론

세포배양과정을 통하여 이루어지는 돌연변이 (spontaneous mutation) 의 결과로 나타나는 체세포변이 (somaclonal variation) (Evans and Sharp, 1986) 를 이용하여 배양중인 캘러스나 현탁배양 세포로부터 cloning 과정을 통해 특정한 2차대사산물의 생산성이 높은 고생산 세포주를 선별 (Yamada, 1984; Dougall, 1987) 하여 생산성을 높인 연구로서는 담배 캘러스로부터 nicotine 생산 (Ogino et al., 1978), *Euphorbia millii*의 캘러스로부터 anthocyanin 생산 (Yamamoto et al., 1982) 과 *Coptis japonica*의 배양세포로부터 berberine 생산 (Sato and Yamada, 1984) 등의 연구가 있다. 그러나 선별과정을 통해 얻어진 고생산 세포주의 2차대사산물 생산 능력은 매우 불안정하여, 계속적인 계대배양 과정에서 합성능력이 감소하거나 소실될 수 있다는 연구로서 *Nicotiana rustica*의 캘러스로부터 alkaloid 생산 (Tabata and Hiraoka, 1976), *Catharanthus roseus* 에서 serpentine 생산 (Deus-Neumann and Zenk, 1984), *Coptis japonica*에서 isoquinoline alkaloid 생산 (Fukui et al., 1982) 의 경우는 생산성의 큰 변이가 나타남을 보고하였다. 그러므로 배양과정에서 이루어지는 체세포변이는 고생산 세포주를 선별하는 측면에서는 효과적인 수단으로

이용될 수 있으나, 선발된 고생산 세포주로부터 생산성을 장기간 안정적으로 유지하고자 하는 측면에서는 오히려 저해적 효과를 나타낸다. 따라서 최근에는 유용한 2차대사산물을 배양세포로부터 안정적으로 대량생산하기 위해서 2차대사산물의 생합성에 관련된 regulatory gene을 cloning하여 식물체에 도입하는등의 여러가지 분자생물학적 수단을 이용하여 생산성을 증가시키고자 하는 시도가 이루어지고 있는데 scopolamine 생산성을 높이기위해 hyoscyamine 6 β -hydroxylase의 cloning (Hashimoto et al., 1990)은 대표적인 연구라 할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 일일초배양세포에서 indole alkaloid 생산성 향상을 위한 분자생물학적 접근의 기초 연구로서 고생산성 세포주 VPC-10을 사용하여 indole alkaloid 생합성에 관련된 gene product(특히 단백질)를 2차원 겔 전기영동을 이용하여 단백질 수준에서 규명하고자 하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 세포배양

Catharanthine 고생산성세포주 VPC-10 현탁배양세포를 alkaloid 생산배지로 이식한 후 alkaloid 생산 이전단계의 세포와 alkaloid 생산단계의 세포로써 배양 7일과 11일의 세포를 수거하여 단백질 분리를 위한 재료로 이용하였다.

2. 단백질 추출 및 2차원 겔 전기영동

생산배지에서 7일, 11일간 배양한 세포를 감압으로 여과한 후 배양세포를 막자사발에 넣고 액체 질소를 첨가하면서 충분히 마쇄한 후 extraction buffer(50 mM Tris-HCl, pH 8.1, 0.04% SDS, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM PMSF)를 첨가하였으며 buffer와 재료의 비율이 0.5:1 (W/V) 이 되게하였다. 추출액을 13,000 rpm, 5분 동안 원심분리한 후 상등액을 단백질 분석시료로 사용하였다. 분리한 단백질을 100°C, 3분 동안 가열하여 변성시킨 다음 IEF 겔을 이용하여 1차원 분리를 하였다. IEF 겔은 직경이 1.5 mm, 길이 12 cm의 유리관에서 제조된 것을 사용하였다. Cathode buffer로 0.1 M NaOH 용액을 사용하였으며, anode buffer로 phosphoric acid를 사용하여 400 V에서 15시간, 800 V에서 2시간 전기영동 하였다. 2차원 분리를 위해 SDS-PAGE 는 20 cm의 유리판에 1.5 mm 두께의 겔을 만든 다음 유리관에서 꺼낸 IEF겔을 유리판 사이에 끼워 넣고, tracking dye (bromophenol blue) 가 separating 겔에 도달할 때까지는 25 mA로 그 이후에는 35 mA로 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 겔을 silver 염색 (Bio-Rad) 한 다음 두 재료사이의 단백질 spot 차이를 비교하였다.

제 3 절 결 과

1. 배양시기별 indole alkaloid 생산

Indole alkaloid 생합성에 관여하는 유전자산물을 단백질 수준에서 조사하기 위한 재료로 catharanthine 생산성이 높은 세포주인 VPC-10을 이용하였다. VPC-10 현탁배양 세포를 세포증식배지에서 alkaloid 생산배지로 이식한 후 배양시간 경과에 따른 alkaloid 생산 유무를 먼저 HPLC로 분석하였다. 배양 7일째에서는 alkaloid 생산이 이루어지지 않았으나 배양 9일째부터 소량의 ajmalicine과 catharanthine 생산이 이루어지기 시작하면서 배양 11일째에는 alkaloid 생산량이 증가하였다(Fig. 1). 따라서 alkaloid 생산이전 단계의 시료로서 7일 배양된 세포를 그리고 alkaloid 생산단계의 시료로서 11일 배양된 세포를 수거하여 단백질 분석을 수행하였다.

2. 단백질 패턴의 변화

Silver 염색을 통하여 약 200 여개의 spot를 식별할 수 있었다. alkaloid 생산 이전 단계에서 alkaloid 생산 단계로 전환되면서 (pI 7.0, M.W. 23 kD) 와 (pI 8.2, M.W. 29 kD)의 polypeptide가 새롭게 나타났으며 (pI 6.0, M.W. 22 kD), (pI 6.2, M.W. 23 kD) 그리고 (pI 7.2, M.W. 24 kD) 의 polypeptide가 alkaloid 생산 단계로 전환될때 사라지는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2).

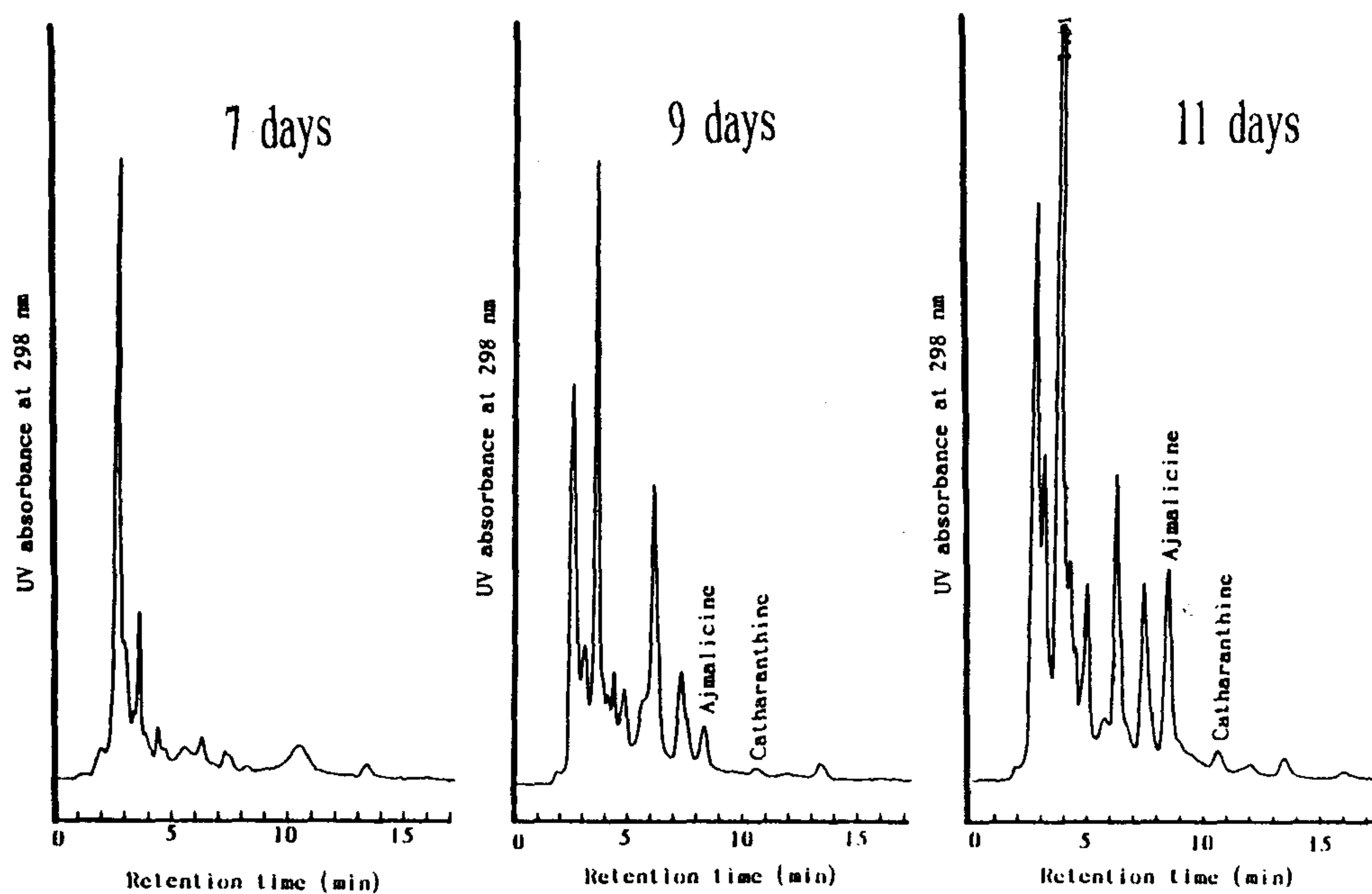


Figure 1. HPLC chromatograms of indole alkaloids produced by VPC-10 after 7, 9 and 11 days of cultures in production medium.

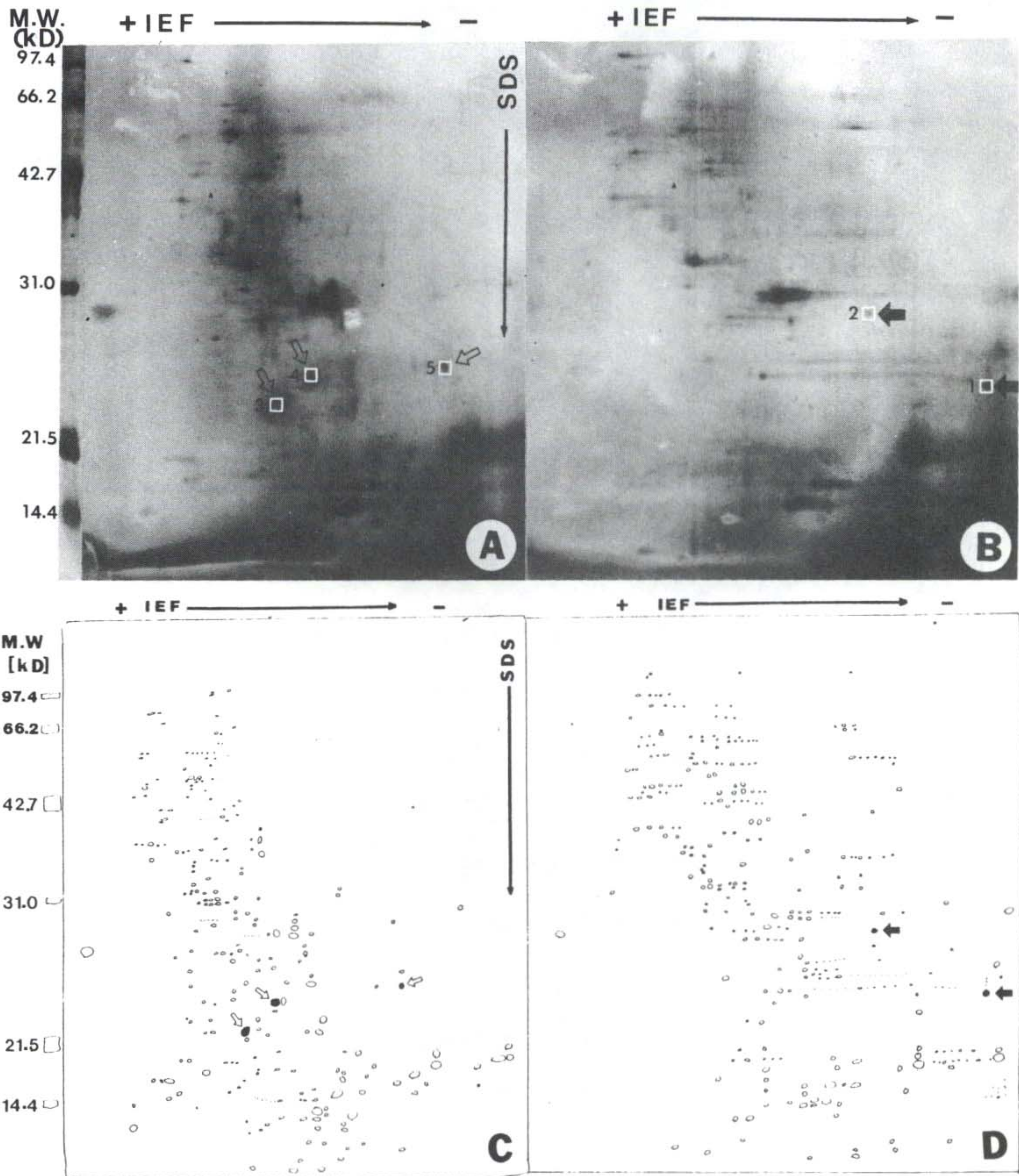


Figure 2. Silver-stained two-dimensional gels of proteins extracted from cells in the trophophase and idiophase of indole alkaloid production. Cells were harvested after 7 days (A) and 11 days (B) of culture in production medium. The electrophorograms of A and B are drawn in C and D, respectively, to clarify the differences. The locations of polypeptides specific to trophophase are marked with open arrows, whereas those of specific to idiophase with closed arrows. Molecular mass markers are indicated on the left.

제 4 절 고 찰

Alkaloid 생산 이전단계의 세포와 alkaloid 생산 단계의 세포의 단백질 패턴차이를 silver염색을 통해 비교한 결과 약 200여개의 spot을 확인할 수 있었다. Alkaloid 생산 이전 단계에서 alkaloid 생산 단계로 전환되면서 23 kD와 29 kD의 polypeptide가 새롭게 나타났으며 22 kD, 23 kD, 24 kD의 polypeptide가 alkaloid 생산시기와 일치하여 사라지는 것을 볼 수 있었다. 일반적으로 silver 염색을 통해서 400~500개의 단백질을 식별할 수 있으며 분리된 단백질은 세포의 현재 단백질 조성 상태를 반영하기 때문에 이들 단백질의 발달적 혹은 기능적인 상태를 예측할 수 있다고 제시한 바 있다 (Choi and Sung, 1984). 그런데 본 실험에서는 절반 수준인 약 200 여개의 spot를 식별할 수 밖에 없었으며 200 여개의 spot 중에서 indole alkaloid 생산시기에 따라 변동된 단백질은 5개로서 총단백질의 2.5%에相当하였다.

2차대사산물의 생합성 과정은 세포의 기본적인 대사과정에 비교하여 볼 때 극히 일부의 제한된 대사과정일 것이다. 따라서 생합성에 관련된 효소 및 단백질 수준에서의 변화도 크지 않을 것으로 생각되며 silver 염색을 통해 추적할 수 없을 정도로 미묘한 단백질패턴 변화가 생합성 과정에서 결정적인 요인으로 작용할 가능성도 생각하여 볼 수 있다. 그러므로 indole alkaloid 생산시기와 병행하여 나타난 단백질패턴의 차이만으로 새로이 나타나거나 사라지는 단백질들의 기능을 단정할 수는 없으나, 다만 alkaloid 생산이전단계에서 alkaloid 생산단계로 전환되면서 새로이 나타난 단백질은 alkaloid 생산에 있어서 "생산촉진인자" 로써, 그리고 alkaloid 생산이전단계에서는 존재하지만 alkaloid 생산단계에서는 사라지는 단백질은

alkaloid 생산에 있어서 "생산억제인자" 로써 작용하는 유전자 산물일 것으로 그 기능을 예측할 수 는 있다. 그러나 이들 단백질이 alkaloid 생산과는 무관한 VPC-10 세포주의 특이한 유전자 발현의 결과로 나타나는 단백질일 가능성도 배제할 수 없다. 따라서 indole alkaloid 생산시기와 일치하여 이들 23 kD, 29 kD polypeptide가 새로이 나타나고 22 kD, 23 kD, 24 kD polypeptide가 사라지는 유전자 산물인지의 명확한 규명이 선행되어야 하겠다. 즉 이들 단백질의 양적인 변화가 indole alkaloid 생합성과 직접적인 관련이 있으며 그리고 VPC-10 세포주에만 특이적으로 발현되는 단백질이 아님을 다른 세포주를 이용하여 동일 조성의 배지 및 동일 증식단계에서 단백질패턴을 비교함으로써 확인된 후에야 이들 단백질상의 변화가 indole alkaloid 생합성과 직접적으로 관련하고 있음을 단정할 수 있을 것이다. 이를 토대로해서 indole alkaloid 생합성에 관여하는 유전자 산물의 명확한 기능 규명과 cloning을 통한 분자생물학적인 접근이 가능해질 것으로 사료된다.

따라서 일일초 현탁배양 세포로부터 indole alkaloid를 대량생산 하기 위한 방법으로 Tremouillaux-Guiller (1987) 등이 *Choisya ternata* 의 protoclone에서 alkaloid 생산 분석 결과 고생산 세포주로부터 recloning을 통하여 얻어지는 subclone에서는 모세포주보다 생산성이 더 높은 세포주를 얻을 수 있다는 가능성을 제시한 바 있듯이, 다른 protoclone에 비하여 상대적으로 ajmalicine, catharanthine 생산성이 높으며, 생장률이 높은 VPC-6 세포주를 이용하여 recloning을 통해 얻어지는 subclone 으로부터 모세포주보다 alkaloid 생산성이 높은 subclone을 재차 선발함으로써 보다 확실한 고생산성 세포주를 선발한 후 이들 세포주로부터 생산성의 변이를

줄이기 위한 수단으로 alkaloid 생합성에 관련된 rate-limiting enzyme
이나 regulatory gene을 cloning 하여 선발된 고생산성 세포주에 도입하는
등 여러 분자생물학적인 수단을 선발된 고생산성 세포주에 이용함으로써
alkaloid 생산성의 안정적인 유지 및 생산성의 증가가 가능할 것으로 사료
되며 이를 통해 indole alkaloid의 대량생산이 가능할 것으로 기대된다.

제 5 절 인용문헌

- Choi, J.H. and Z.R. Sung. 1984. Two-dimensional gel analysis of carrot somatic embryonic proteins. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2: 19-25
- Deus-Neumann, B. and M.H. Zenk. 1984. Instability of indole alkaloid production in *catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Planta Med.* 50: 427-431.
- Dougall, O. K. 1987. Cell cloning and selection of high yielding strains. In: Vasil, I.K. and F. Constabel (Eds). *Cell culture and somatic cell Genetics of plants*, Vol. 4, Cell culture in phytochemistry. pp. 117-124. Academic press, orlando, FL
- Evans. D. A. and W. R. Sharp. 1986. Applications of somaclonal variation. *Biotechnology* 4: 528-532.
- Fukui, H., K. Nakagawa, S. Tsuda and M. Tabata. 1982. Production of isoquinoline alkaloids by cell suspension culture. In: *Plant Tissue culture 1982*, Fujiwara, A. ed. pp. 313-314. Maruzen, Tokyo.
- Hashimoto, T., J. Matsuda, S. Okabe, Y. Amano, D.J. Yun, A. Hayashi and Y. Yamada. 1990. Molecular cloning and tissue and cell specific expression of hyscyamine 6 β -hydroxylase. In: Nijkamp, H.J.J., L.H.W. Vanderplas, J. Vanaartrijk. (eds). *Progress in plant cellular and molecular biology*. pp. 775-780. Kluwer Academic Publishers Dordrecht

- Ogino, T., N. Hiraoka and M. Tabata. 1978. Selection of high nicotine producing cell lines of tobacco callus by single cell cloning. *Phytochemistry* 17:1907-1910.
- Sato, F. and Y. Yamada. 1984. High berberine-producing cultures of *Coptis japonica* cells. *Phytochemistry* 23:281-285.
- Tabata, M. and N. Hiraoka. 1976. Variation of alkaloid production in *Nicotiana rustica* callus. *Physiol. Plant.* 38:19-23.
- Tremouillaux-Guiller, J., F. Andreu, J. Creche, J.C. Chenieux, and M. Rideau. 1987. Variability in tissue cultures of *Choisya ternata*. Alkaloid accumulation in protoclonal and aggregate clones obtained from established strains. *Plant Cell Rep.* 6:375-378.
- Yamada, Y. 1984. Selection of cell lines for high yields of secondary metabolites. In: Vasil, I.K (Ed). *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, vol. 1, Laboratory procedures and their applications. pp. 629- 636. Academic Press, Orlando, FL
- Yamamoto, Y., R. Mizuguchi and Y. Yamada. 1982. Selection for a high and stable pigment producing strain in cultured *Euphorbia millii* cells. *Theor. Appl. Genet.* 61:113-116.

제 5 장 일일초 모상근(Hairy root) 배양에 의한 Indole Alkaloid 생산

제 1 절 서 론

Gram 음성토양세균인 *Agrobacterium*균은 식물에 감염하여 여러가지 종양을 유발하는 식물병원균으로 *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. rubi*, *A. radiobacter* 등 많은 종류가 알려져 있다. *Agrobacterium*은 plasmid에 따라 Ri(root inducing)와, Ti(tumor inducing)의 특성으로 구별된다. 이 중에서 *A. rhizogenes*는 Ri 플라스미드를 보유하고 있어 모상근이라 불리는 부정근을 유기한다. 이와같은 부정근 유기과정에는 Ri 플라스미드 상에 존재하는 T-DNA라 불리는 영역이 세균내에서 절단된 후 T-DNA 상에 존재하는 각종 유전자가 식물세포의 핵 DNA 중으로 들어가 식물세포중에서 발현함에 따라 모상근(hairy root)으로 발달한다. 따라서 모상근은 항생물질등에 의해 균을 제거 한 후에도 특징적인 형태를 계속 유지할 수 있는 것이다. Ri 플라스미드의 특징은 모상근 생성에 있으며 형질전환된 것을 형태적으로 확인할 수 있을 뿐 아니라 Ti 플라스미드에 비해서 식물체로의 재분화도 용이하다. 또한 모상근은 분화되어 있는 식물조직이므로 모식물의 뿌리에서 생산하는 이차대사산물을 생산할 수 있는 확률이 캘러스나 세포배양보다는 높다고 생각된다. 모상근 배양은 식물체 뿌리의 성장속도보다 빠른 고생산성의 clone을 선발할 수 있으며 세포배양보다 유전적으로 안정하다고 보고되어 있다(Hamill et al., 1987).

이러한 모상근의 특징을 이용한 유용물질생산에 관한 많은 연구가 보고되고(Mano et al. and Kamana et al., 1986) 있으며, 일일초의 indole alkaloid 생산을 위한 연구도 시도되고 있다 (Parr et al., 1988 ; Toivonen et al., 1989). 본 연구에서는 indole alkaloid 고생산 크론을 확보하기 위해 식물체로부터 모상근을 유도하여, catharanthine등을 생산하는 모상근을 선발하고, 선발된 모상근의 형질전환여부를 확인하는 실험을 수행하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 식물재료

Hairy root의 유도에 사용된 식물재료는 일일초 (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don ; cv. Little Delicata(LD), Little Linda(LL), Little Bright Eye(LB))가 사용되었다. 70 % ethanol에 2 분 , 10 % Chlorox에 15 분간 침적하여 표면 살균된 종자를 MS 기본배지에서 발아시켜 25 °C, 16 시간 광상태에 배양하여 형질전환의 재료로 사용하였다.

2. Hairy root의 유도 및 배양

Hairy root의 유도에 사용된 bacterial strain은 *Agrobacterium rhizogenes* A 4와 15834(agropine-type)로서 LB agar(Yeast Extract 5 g/L, Trypton 10 g/L, NaCl 10 g/L)배지에 계대배양하였다. Petri dish에서 무균상태로 3 주간 자란 식물체의 stem 부위에 액체배지에서 2 일간 배양된 A 4, 15834를 감염시켜, 2 일 동안 coculture 한 후, 2-3 회 멸균증류수로 표면의 균들을 제거하고 carbenicillin이 500 mg/L가 들어 있는 1/3 SH 기본배지에 치상하여 25 °C 암소에 배양하였다. 유도된 root tip 부분이 1 -2 cm 정도 자란 후 explant에서 잘라내어 각각의 root tip을 1/3 SIIBM 고체배지에 배양하였다. 2-3 주 간 배양한 root를 1/3 SIIBM 액체배지에 접종하여 25 °C, 100 rpm의 gyratory shaker에 진탕배양하였다.

3. Opine 분석

Hairy root 100 mg을 lysis buffer(50 mM sodium phosphate pH 7.0, 10 mM β -mercaptoethanol, 10 mM EDTA, 0.1 % Triton X-100, 0.1 % Sacrosyl, 25 μ g/ml PMSF) 500 μ l와 함께 막자사발에서 갈아 , 12,000 rpm 에서 5 분간 원심분리하여 상등액을 전기영동의 시료로 사용하였다. 시료 5- 10 μ l를 Whatman No. 3 paper에 점적하여, 완충액(formic acid : acetic acid : water, 1:3:16)이 들어 있는 전기영동장치에서 300 V 의 전압으로 2 시간동안 전기영동하였다. 여지를 건조시킨 후 염색(0.25 % AgNO_3)과 발색(2 % NaOH + 90 % methanol)시킨 후 5 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 용액을 사용하여 고정하였다. 이때 agropine, mannopine 표준시료를 같이 전개시켜 비교확인하였다.

제 3 절 결 과

1. Hairy root의 유도 및 배양

Hairy root의 유도는 일일초 품종과 bacterial strain의 차이에 영향을 받았는데, LL, LB, LD의 3품종중에서 LD에서는 hairy root 유도가 잘 되지 않았으나 LB, LL에서는 유도가 용이하였다. Bacterial strain에 의한 차이는 A4 보다는 15834에 의해서 비교적 유도가 잘 되었다. 유도된 root tip 부분이 1 -2 cm 정도 자란 후 explant에서 잘라내어 각각의 root tip을 clone으로 설정하여 1/3 SHBM 고체배지에 배양하였다. 2-3 주 간 배양한 root를 1/3 SHBM 액체배지에 접종하여 25 °C , 100 rpm의 gyratory shaker에 진탕배양하였다.

2. Hairy root의 alkaloid생산성 분석

1/3 SHBM 액체배지에서 3 주간 배양한 root에서 생산된 ajmalicine과 catharanthine를 정량분석하였다. 이들의 결과를 Fig. 1 에 나타내었는데, LL에서 유도된 hairy root에서는 ajmalicine 만이 생산(ca. 0.5 - 1.7 mg /g dry wt)되었으나, LB에서 유도된 LB1의 경우는 catharanthine이 고생산(ca. 3.5 mg/ g dry wt)되었다. 각각의 hairy root는 형태적으로 다른 모양을 하였는데, 같은 식물체에서 유도된 LB1과 LB2의 경우에서도 alkaloid의 생산 뿐 만 아니라 형태적으로 뚜렷하게 구별되었다(Fig. 2). 즉 catharanthine 고생산 clone인 LB1에서는 두터운 뿌리(thick root)의 발달을 보였으며, catharanthine 비생산 clone인 LB2에서는 가는뿌리(thin root)가 발달하였으며 생장도 양호하였다.

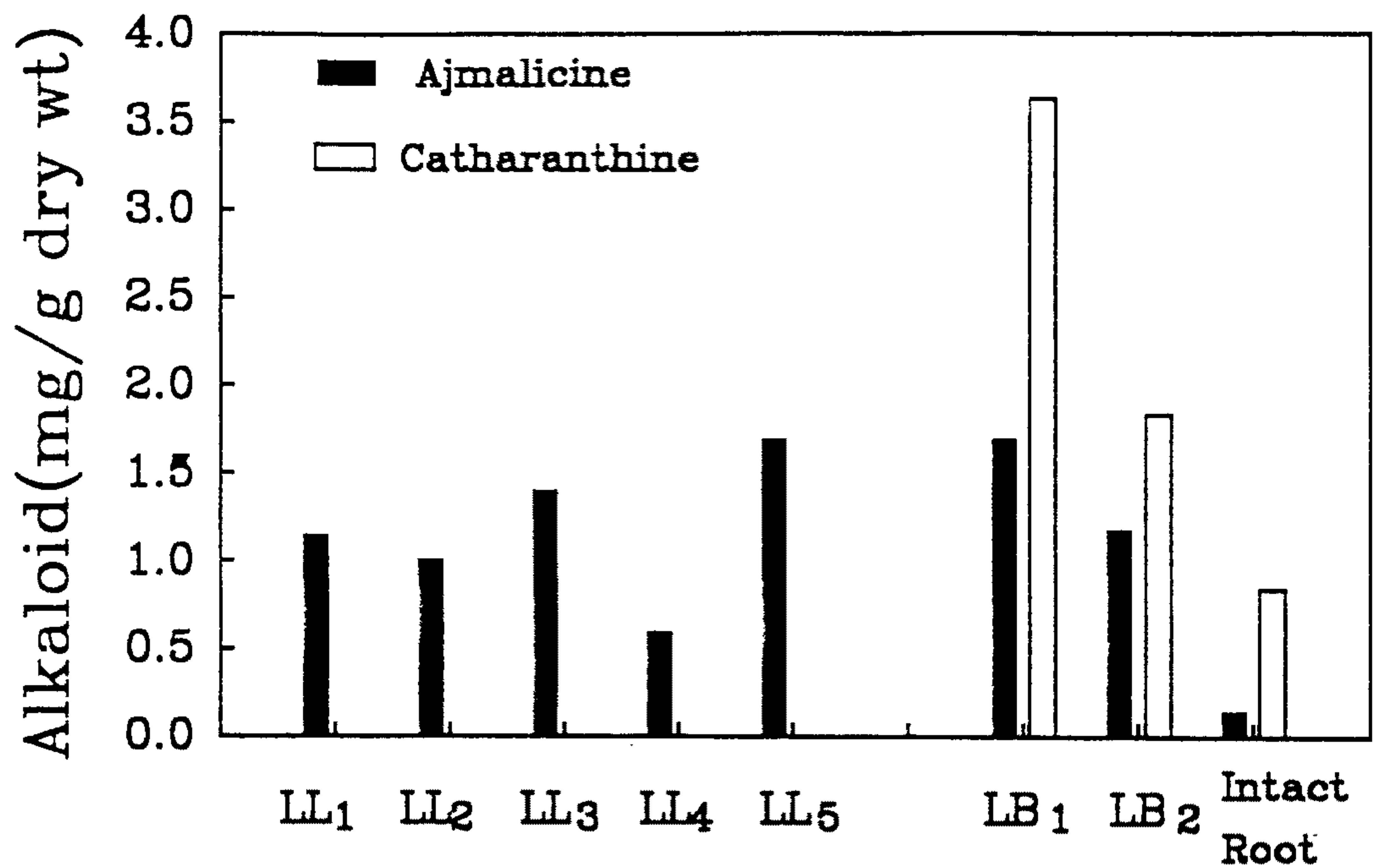


Figure 1. Productivity of ajmalicine and catharanthine of hairy root. Hairy roots LL1,2,3,4,5 were induced from Little Linda and LB1,2 were from Little Bright Eye. They were cultured in 1/3 SHBM for 3 weeks.

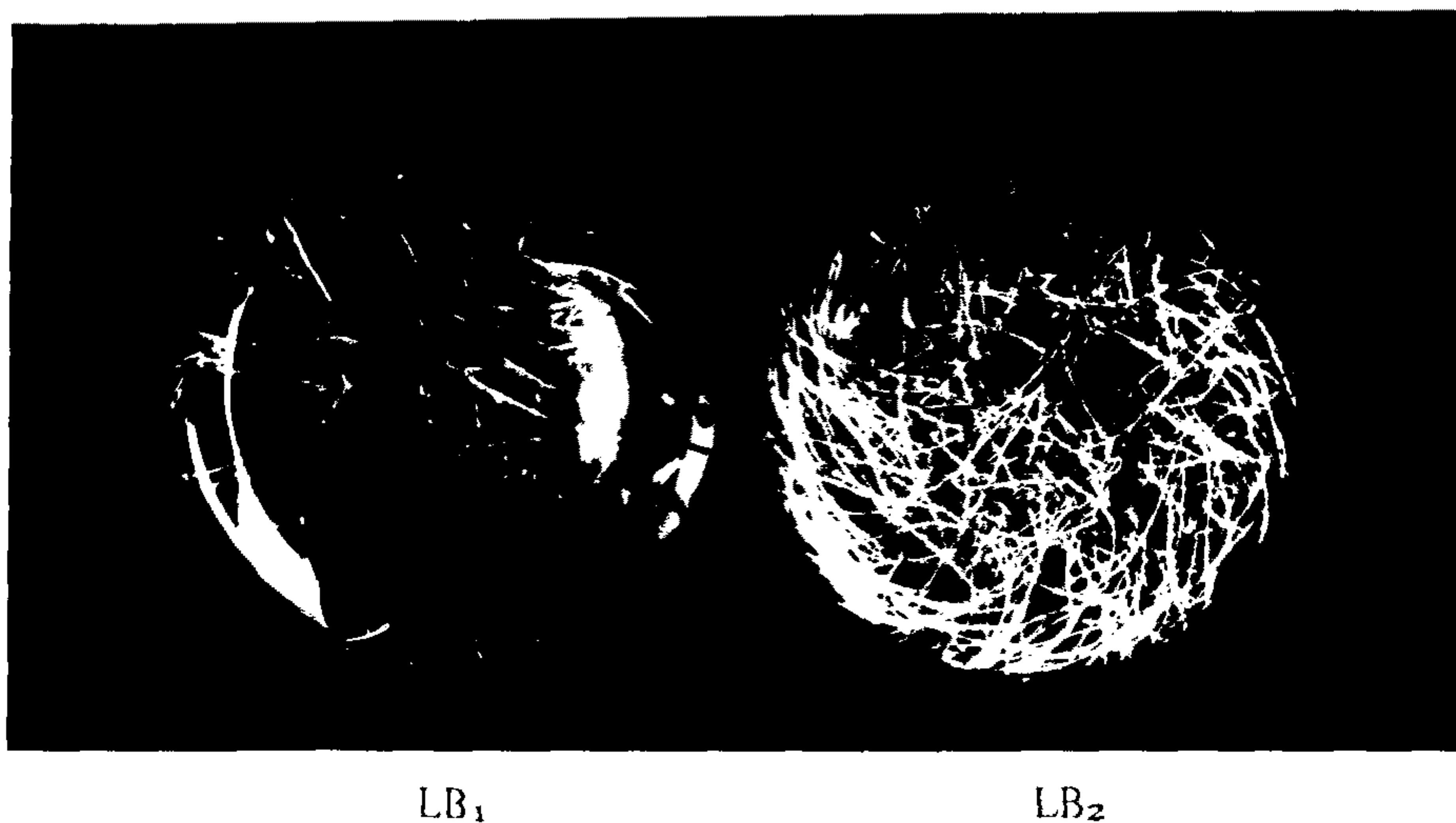


Figure 1. Morphological difference of hairy roots LB₁ and LB₂.

3. Opine 분석에 의한 형질전환 확인

유도된 hairy root의 형질전환을 확인하기 위해 LB1, LB2, LL4의 hairy root를 수거하여 opine 분석을 수행한 결과, 전기영동에 의한 분석에서 agropine 및 mannopine의 생산이 확인되었는데(Fig. 3), 이는 agropine-type의 균주인 15834에 의해 형질전환되었음을 보여주는 것이다.

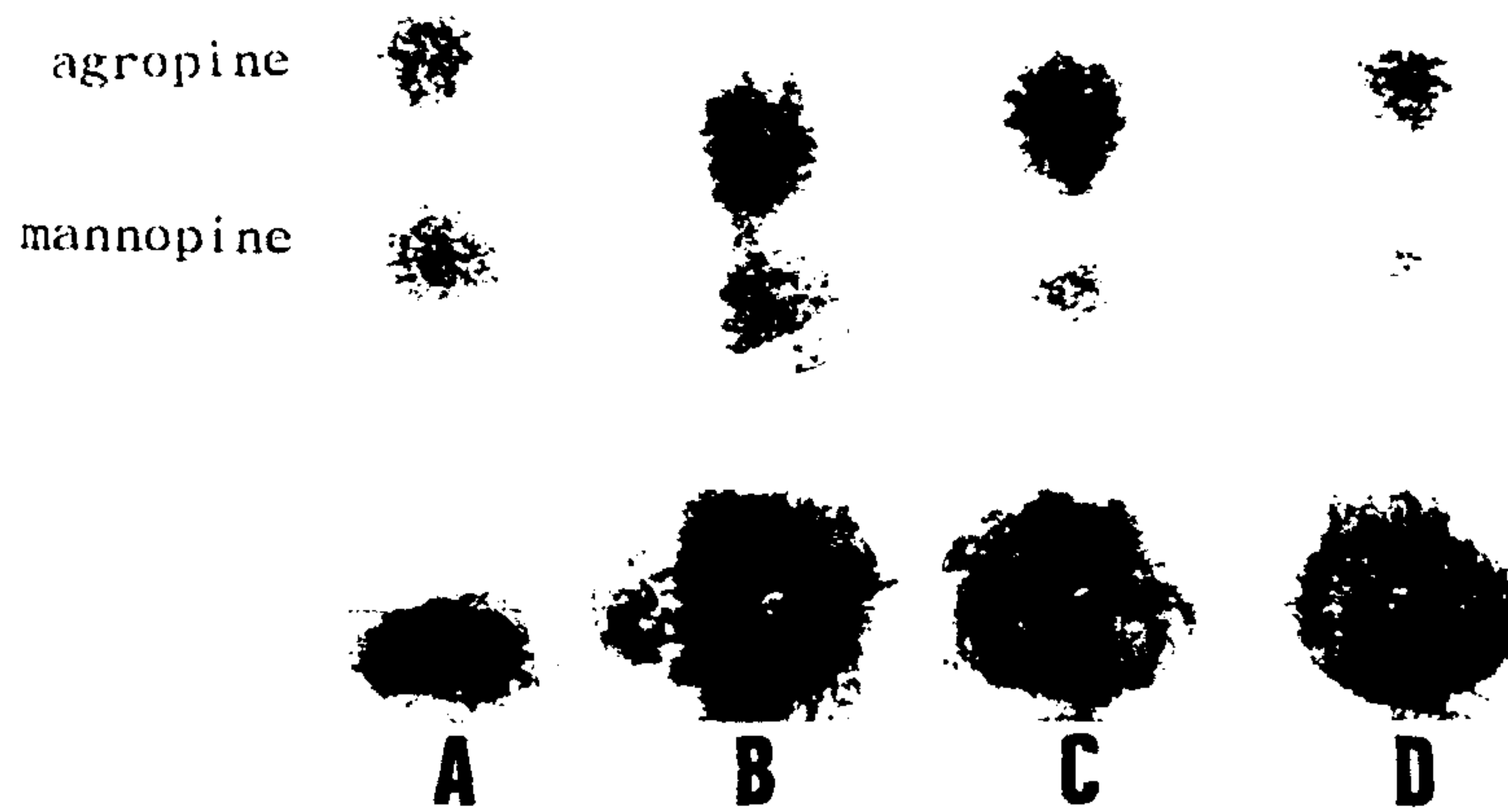


Figure 3. Electrophoretic analysis of opine in hairy roots.
Lane A : Standard agropine and mannopine
Lane B, C, D : Hairy roots LB₁, LL₁, and LB₂

제 4 절 고 찰

본 연구에서는 indole alkaloid 고생산 모상근 크론을 확보하기 위한 실험을 수행하여 식물체로부터 모상근을 유도하였다. *Agrobacterium* 인 A4와 15834를 사용하여 형질전환을 시도하였는데 A4보다는 15834가 모상근 유도에 있어 효과적이었다. LD, LL, LB 각 품종으로부터 모상근을 유도하였으나 LD의 경우는 A4, 15834에 의한 모상근의 유도가 되지 않았다. LL과 LB에서 유도된 모상근에서의 alkaloid생산을 조사한 바, LL에서유도된 모상근에서는 ajmalicine 만이 검출되었고, LB에서 유도된 모상근 중 catharanthine (ca. 3.5 mg/g dry root wt)을 생산하는 LBI 크론을 얻을 수 있었다. 각각의 모상근은 opine 분석에 의해 agropine, mannopine의 생산이 확인되어 *Agrobacterium*에 의해 형질전환이 되었음을 확인하였다. 이와같이 얻어진 LBI이 생산하는 catharanthine의 함량은 식물체의 생산량보다 약 100배 높은 것으로 금후 배양조건의 적정화와 대량생산시스템의 확립으로 이량체 indole alkaloid의 주요 전구물질인 catharanthine 생산이 가능하리라 기대된다.

제 5 절 인용문헌

- Hamill, J.D., A.J. Parr, M.J.C. Rhodes, R.J. Robins and N.J. Walton. 1987.
New routes to plant secondary products. *Bio/Technology*. 5 : 800-804.
- Kamada, H., N. Okamura, M. Sadake, H. Harada, K. Shimomura. 1986.
Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*.
Plant Cell Report. 5 : 239-242.
- Mano, Y., S. Nabeshima, C. Ohkawa. 1986. Production of tropane
alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia japonica*. *Agric. Biol.
Chem.* 50: 2715-2722.
- Parr, A.J., A.C.J. Peerless, J.D. Hamill, N.J. Walton, R.J. Robins
and M.J.C. Rhodes. 1988. Alkaloid production by transformed root
cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Reports*. 7 : 309-312.
- Toivonen, L., J. Balsevich and W.G.W. Kurz. 1989. Indole alkaloid
production by hairy root cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant
Cell, Tissue and Organ Culture*. 18 : 79-93.

제 6 장 일일초로부터 Indole Alkaloid

초임계추출공정의 기본연구

제 1 절 서 론

인류가 응용하고 있는 의약품, 식품, 향신료 등의 대부분 물질들은 화학적 방법으로 생산하기는 불가능하거나 매우 어렵기 때문에 천연식물로부터 추출하여 사용하고 있다. 백혈병과 악성임파육종양의 치료제로 널리 쓰이고 있는 vinblastine과 vincristine도 천연식물로부터 추출하여 사용되고 있으며 유효성분을 추출하는 방법에는 압착법, 수증기 증류법 및 용매 추출법 등을 들 수 있다. 그러나 압착법이나 수증기 증류법에 의하면 고온의 발생에 의한 유효성분의 파괴 또는 변질의 위험이 있으며 용매추출법에는 추출물의 잔존용매가 문제점으로 지적된다. 반면에 초임계 유체 추출법은 낮은 온도와 적용 가능한 경우에 높은 선택성을 보이므로 유효성분을 물리적, 화학적 손상없이 추출할 수 있어 많은 관심을 끌고 있다.

본 연구에서는 실험용 초임계 유체 추출장치를 사용하여 인체에 무해하며 안정된 구조를 갖는 이산화탄소를 초임계 유체로 이용하여 일일초로부터 유효 성분의 추출가능성을 검토하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 실험재료

일일초(*Catharanthus roseus*, 품종: Little Delicata)를 온실에서 약 2개월간 재배한 후 잎을 채취하여 실험재료로 하였다. 채취한 잎을 60 °C 건조기에서 12시간동안 건조시킨 후 막자사발에서 분말을 만든 후 추출에 사용하였다.

2. 실험장치

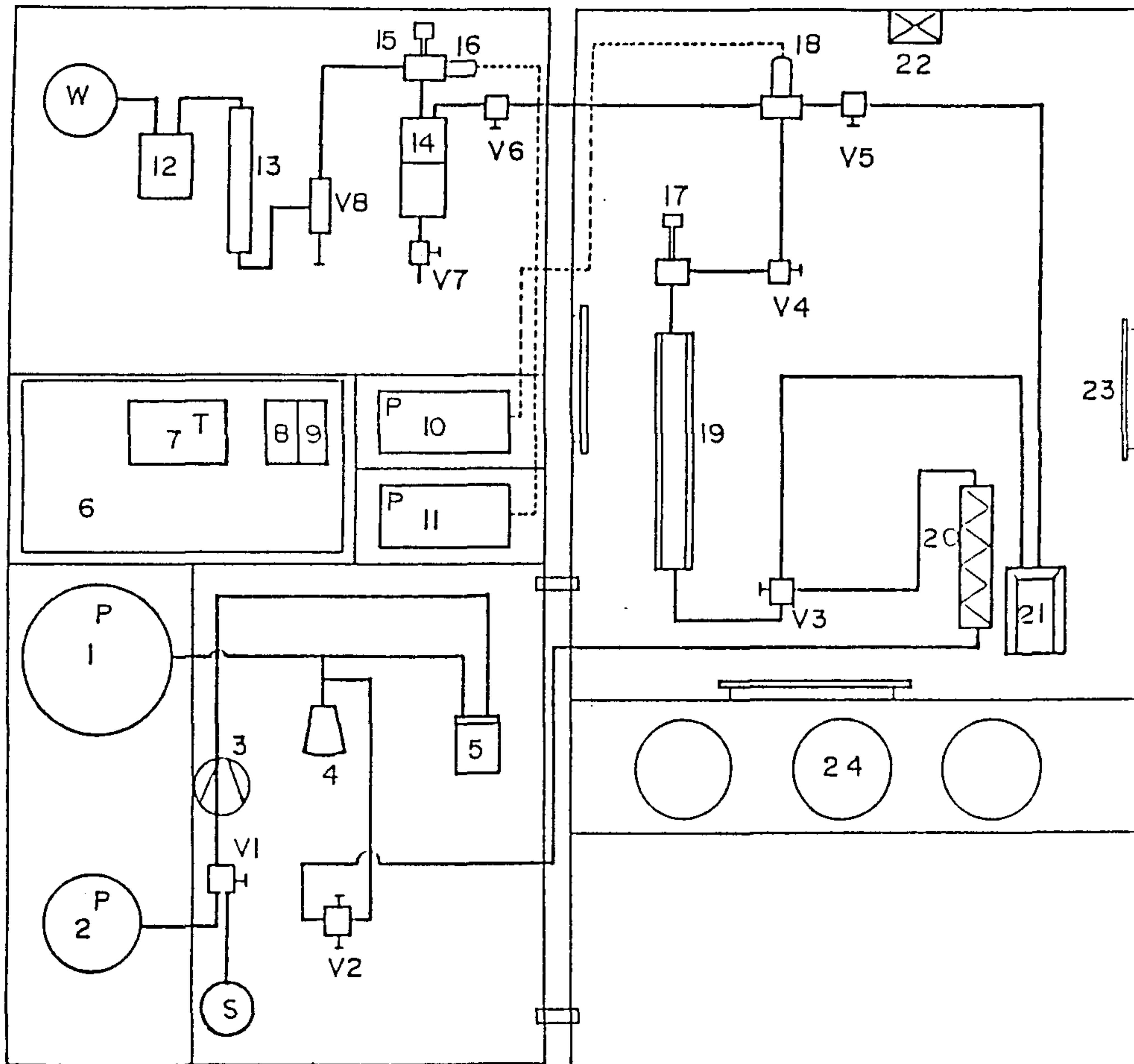
초임계 이산화탄소를 이용하여 일일초로부터 유효성분을 추출한 장치의 개략도는 Fig. 1 과 같다. 추출장치는 최대 700기압까지 견딜 수 있으며 compressor 다음 부분에 안전을 위하여 rupture disk를 장치하였다. 모든 장치와 연결관의 재질은 고압용 stainless steel을 사용하였으며 연결 방법은 high pressure connection법을 이용하였다.

1) 이산화탄소 주입부

이산화탄소는 실험에 차질이 없도록 두개의 cylinder를 이용하여 공급된다. 이산화탄소의 누출방지를 위하여 두개의 cylinder의 금속 부분간 접촉면은 teflon을 이용하여 봉했으며 cylinder와 process의 연결은 탄력성 있도록 flexible hose를 이용했다.

2) 이산화탄소 가압부

이산화탄소를 가압하는 compressor의 작동은 pressure gauge의 최대압력점과 최소압력점을 설정하여 이 값들 사이에서 수행된다. 즉 pressure gauge가 최소압력점 보다 낮은 압력을 나타내면 compressor는



- | | | | |
|------|--|--------|--------------------|
| 1. | Compressor Pressure Gauge | 14. | Separator |
| 2. | Solvent Pressure Gauge | 15.17. | Thermocouple |
| 3. | Compressor | 16.18. | Pressure Indicator |
| 4. | Pressure Regulator | 19. | Extractor |
| 5. | Solvent Reservoir | 20. | Solvent Preheater |
| 6. | Control Box | 21. | Extractor (Liquid) |
| 7. | Temperature Indicator (Air Bath) | 22. | Fan |
| 8.9. | Temperature Controller (Air Bath) | 23. | Plate heater |
| 10. | Temp. & Pressure Indicator (Extractor) | 24. | Voltage Controller |
| 11. | Temp. & Pressure Indicator (Separator) | V1~V8 | Valve |
| 12. | Gas flow meter | W | Wet test meter |
| 13. | Rotameter | | |

Figure 1. The schematic diagrams of the experimental apparatus.

최대압력점에 도달할 때까지 작동을 하며 최대압력점에 도달한 후 pressure gauge가 최소압력점까지 내려가지 전까지 작동을 멈춘 상태로 있게 된다. 이 control part의 고장으로 인한 위험성은 rupture disk로 보완되며 추출기로부터 이산화탄소의 역류로 인한 위험성은 check valve로 보완이 된다. 실제로 compressor에 달린 pressure gauge를 가지로 추출조의 압력을 조절할 수 없으므로 이산화탄소 가압부에서 추출조간에 pressure regulator를 달아 원하는 압력을 얻을 수 있게 했다.

3) 추출조

추출조는 고압용 autoclave를 사용하여 내경 40 mm, 외경 60 mm, 길이 272 mm이고 부피가 200 ml로 Fig. 2와 같다. 추출조의 상하에는 filter가 설치되어 시료로부터 유효 성분의 분리를 효과적으로 할 수 있도록 하였다. 추출조의 온도와 압력은 K type의 thermocouple과 pressure transducer를 이용하여 각각 추출기 내부 중간부분과 상층부분을 측정하였다. 추출조로 들어가는 이산화탄소의 preheating은 코일형 이중관을 이용했으며 추출조의 항온 유지는 외부에 jacket을 설치하여 모두 circulator로 부터 열원을 공급받도록 하였다.

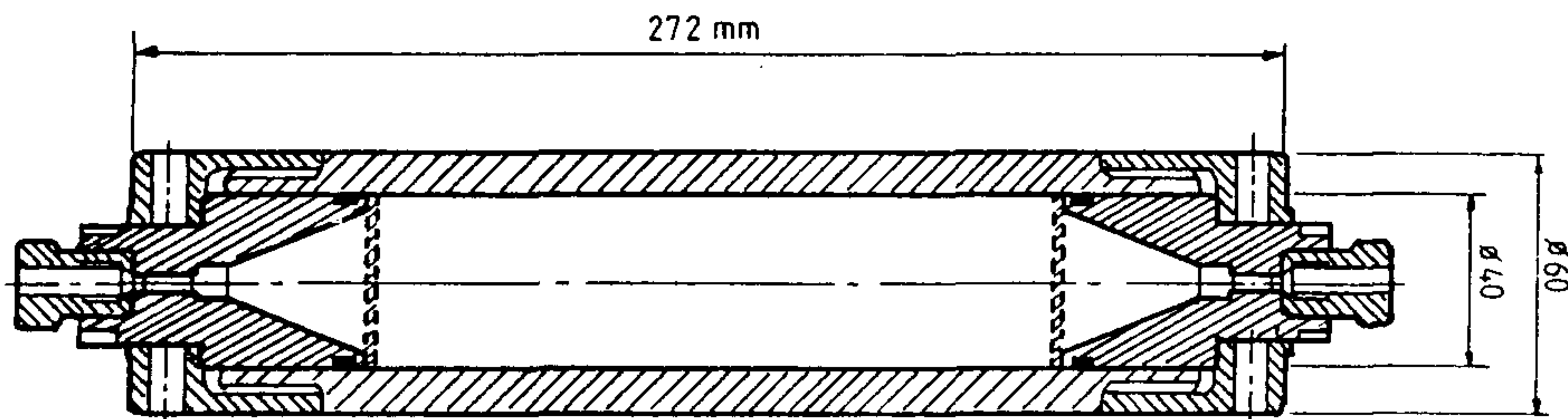


Figure 2. The details of the extractor.

4) 분리기와 유출부

추출조로부터 나온 고압의 이산화탄소는 분리기로 들어가면서 단열팽창으로 Joule-Thomson 효과로 인한 추출물의 냉각에 의해 valve가 막힐 위험이 있으며 이것을 방지하기 위하여 추출조 출구의 valve 부분에 보온장치를 달았다. 분리는 초임계 상태에서 기체상태로 환원된 이산화탄소는 상층부로, 고/액체의 유효성분은 하층부로 포집될 수 있도록 되어 있다. 실제 추출에 관여된 이산화탄소의 양은 rotameter와 유량계를 통과하며 측정되며 hose를 통하여 대기로 방출된다.

5) Cabinet

항온과 방풍이 요구되는 추출조와 preheating 부분은 cabinet 내부에 설치하였다. cabinet 내부의 벽면에 설치된 열판과 cabinet 상층에 설치된 fan은 항온에 관여하며 cabinet의 철재질은 방폭에 관여한다.

3. 실험방법

본 연구에서는 초임계 이산화탄소를 이용하여 일일초로부터 indole alkaloid를 추출하였다. 각 실험에 사용된 일일초는 약 7 g이었으며 건조된 분말 상태이거나 건조되지 않은 상태였다.

추출조의 온도는 30°C, 40°C, 45°C 그리고 70°C로 변화시켰으며 추출압력은 150 bar, 300 bar, 350 bar 그리고 400 bar로 변화시켰다. 매 실험은 8시간 정도 시행했으며 이산화탄소의 유속은 0.2 l/min 정도였다. 분리기에 포집된 추출물의 무게를 측정하여 수율을 계산하였다.

다음은 초임계 유체 추출법을 이용하여 일일초로부터 유효성분을 추출한 실험방법이다.

- 1) 일일초 일부분을 건조시킨 상태에서 분쇄하여 분말로 만든 후 약 7g을 정량하여 고체시료용 추출조에 넣는다. 이때 bead를 먼저 추출조 하중부에 넣고 그 위에 시료와 bead를 번갈아 넣었으며 filter와 닿는 추출조 최상부는 bead가 오도록 하였다.
- 2) 추출조 출구와 분리기 출구의 valve가 잠겨 있는가를 확인한다.
- 3) Circulator 및 cabinet의 heater와 fan을 작동시켜 추출온도를 유지하도록 조정한다. 분리기 부분도 circulator를 작동하여 -15°C 를 유지하도록 조정한다.
- 4) 모든 부분의 온도가 일정하게 유지되면 이산화탄소 cylinder의 main valve를 열고 이산화탄소를 compressor로 보낸다.
- 5) Pressure gauge의 최대압력점과 최소압력점을 맞춘 후 compressor를 작동시키며 pressure regulator를 이용하여 압력을 조정한다.
- 6) 추출조 출구의 valve의 보온을 위하여 heater를 작동시킨다.
- 7) 충분한 압력에 도달하면 추출조의 inlet valve를 조심스럽게 열어 추출조 내부로 고압의 이산화탄소가 서서히 공급되도록 한다.
- 8) 추출조 출구의 valve를 열어 유체를 분리기로 보낸다.
- 9) 분리기를 통과한 이산화탄소는 유량계를 거쳐 방출시키고 그 유량을 측정한다.
- 10) 충분한 시간 동안 추출한 후 실험을 종결하고 분리기에 포집된 추출물의 무게를 측정하고 정량된 methanol로 녹여 보관한다.
- 11) 추출조를 실험장치로부터 분리하여 남은 시료를 제거하고 다음 실험을 준비한다.
- 12) 추출조건을 변화시켜 위와 같은 방법으로 다음 실험을 수행한다.

4. Indole alkaloid의 정량 및 정성분석

초임계추출에 의해 추출된 indole alkaloid의 정량 및 정성분석은 제2장에서 사용한 방법과 동일하게 하였다. 정량분석은 ODS칼럼을 사용한 역상크로마토그래피로 하였으며 추출물의 최종적인 정성분석은 LC/MS를 사용하여 수행하였다.

제 3 절 결 과

천연물에서 유효성분을 추출하는 경우에는 천연물에 포함된 유효성분의 양을 정확히 측정하기가 어려울 뿐 아니라 주어진 온도와 압력하에서 평형농도를 알기가 쉽지 않다. 실험장치가 순환장치인 경우 충분히 많은 유효성분이 포함된 시료에 대해 일정량의 농축 이산화탄소를 순환시키므로써 농축 이산화탄소에 대한 용해도를 측정할 수 있고 flow-type에서는 장시간 추출하면서 포집된 양을 시간에 따라 측정하면서 포화값을 알고 이를 천연물에 포함된 전체 유효성분양으로 잡을 수 있다.

1. 온도 및 압력변화가 indole alkaloid 추출에 미치는 영향

본 실험에서는 유출되는 유효성분이 점성이 큰데다 추출양이 미세한 까닭에 시간마다 정량하는데 어려움이 많아 실험종료 후의 추출물의 양을 정량하였으며 유효성분의 정성분석은 Liquid chromatography와 Mass spectrometer를 이용하였다.

Fig. 3는 일일초 잎조직을 건조하여 분말상태로 만들어 70°C, 400 bar에서 얻은 추출물의 Liquid chromatography의 spectrum으로 retention time이 6.49분에서 검출된 vindoline의 수율이 좋으며 선택성도 좋음을 보여주고 있다. 따라서 vinblastine과 vincristine의 합성을 위한 전구물질 중의 하나로 관심을 끌고있는 vindoline에 대한 성분 분석을 중심으로 연구하였다.

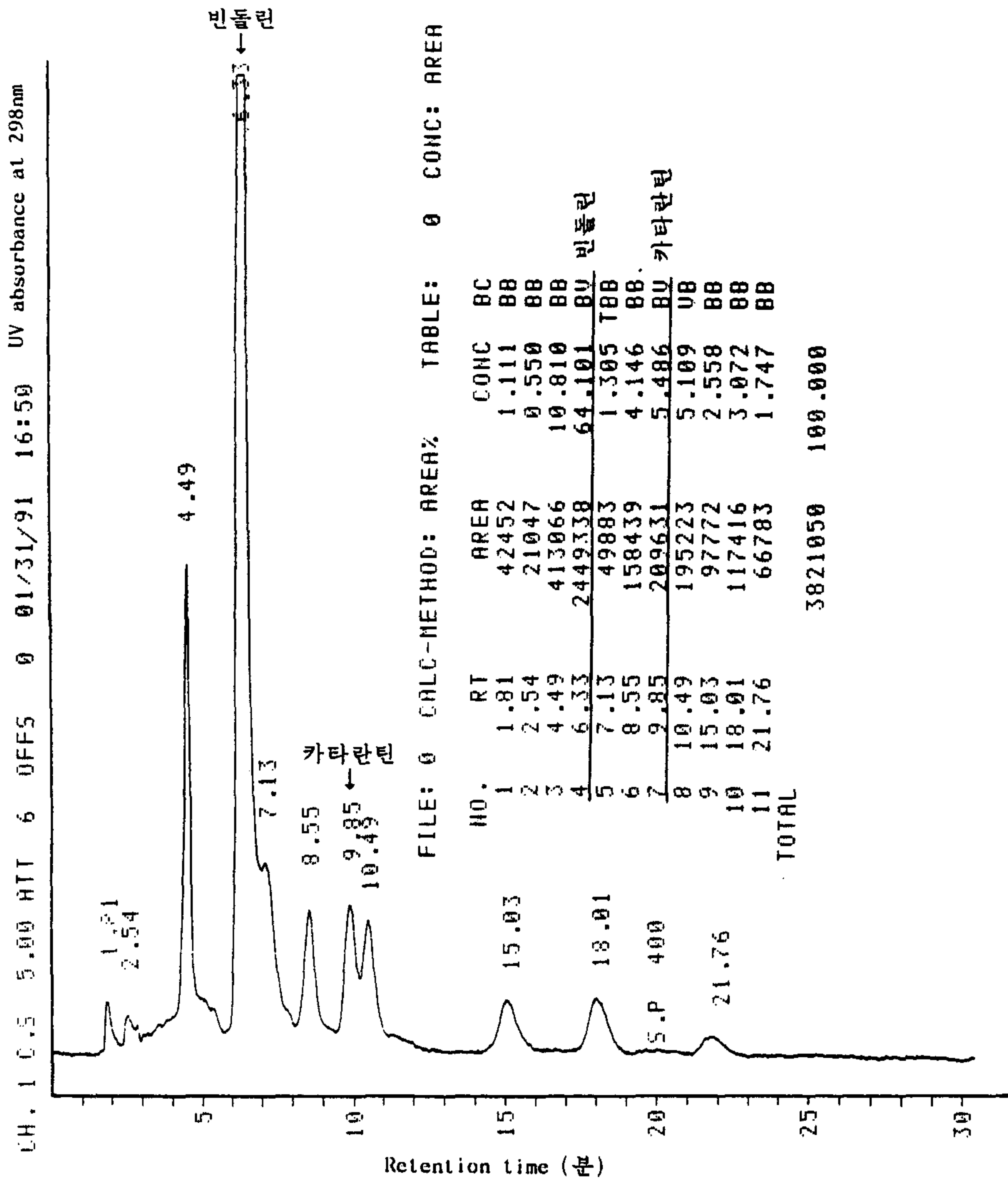


Figure 3. HPLC analysis of indole alkaloids extracted by supercritical carbon dioxide.

Table 1은 각 실험의 조건과 결과의 일부를 보여주고 있다. 여기에 사용된 vindoline ratio는 liquid chromatography에서 얻은 값이며, vindoline concentration은 methanol용액을 포함하여 vindoline ratio로부터 산출한 값이다. 실험 1부터 3까지는 건조시키지 않은 일일초 그대로를 사용하였으며 실험 6에서는 일일초의 줄기 부분만을 건조시킨 상태로 사용하였다. 그 밖의 실험은 모두 건조된 일일초의 일부분을 분말 상태로 만들어 사용하였다.

Table 1. Extraction of vindoline at different experimental conditions by supercritical carbon dioxide.

Exp. #	Temp. (°C)	Press. (bar.)	Vindoline		CO ₂ flow rate (l/min)	Sampling time (min)	Weight (g)		Condition
			Conc.	Ratio			Product	MeOH	
1	45	300	0.36	27.3	0.1154	240	0.047	3.67	raw
2	45	400	0.92	24.3	0.2232	190	0.056	3.54	raw
3	35	300	1.52	32.2	0.1213	150	0.075	3.99	raw
4	45	400	3.66	53.1	0.2095	210	0.130	3.89	dried
5	40	350	0.93	61.3	0.1643	255	0.059	3.53	dried
6	40	300	*	41.0	0.1924	210	0.038	3.32	dried(stem)
7	40	400	0.14	43.1	0.2123	65	0.031	3.47	dried
8	40	400	1.08	38.1	0.2533	90	0.063	3.45	dried
9	40	400	1.51	47.1	0.2733	105	0.076	3.80	dried
10	40	150	1.42	67.2	0.2489	305	0.061	3.59	dried
11	70	400	0.99	46.8	0.1124	145	0.460	2.79	dried

* mixed peak

2. LC/MS에 의한 추출물의 정성분석

Fig. 4는 초임계추출에 의해 추출된 vindoline, catharanthine을 LC/MS 를 사용하여 정성분석한 결과이다. 측정된 분석조건에서는 vindoline의 mass spectrum에서는 분자량 peak(M^+ , 456)가 검출되지 않았으나 얻어진 기타의 각 fragment들은 표준물질 vindoline의 fragment와 완전히 일치하였으므로 최종적으로 분석한 화합물(용출시간: 15분)이 vindoline임을 확인할 수 있었다. 같은 방법으로 추출물의 catharanthine을 확인할 수 있었다.

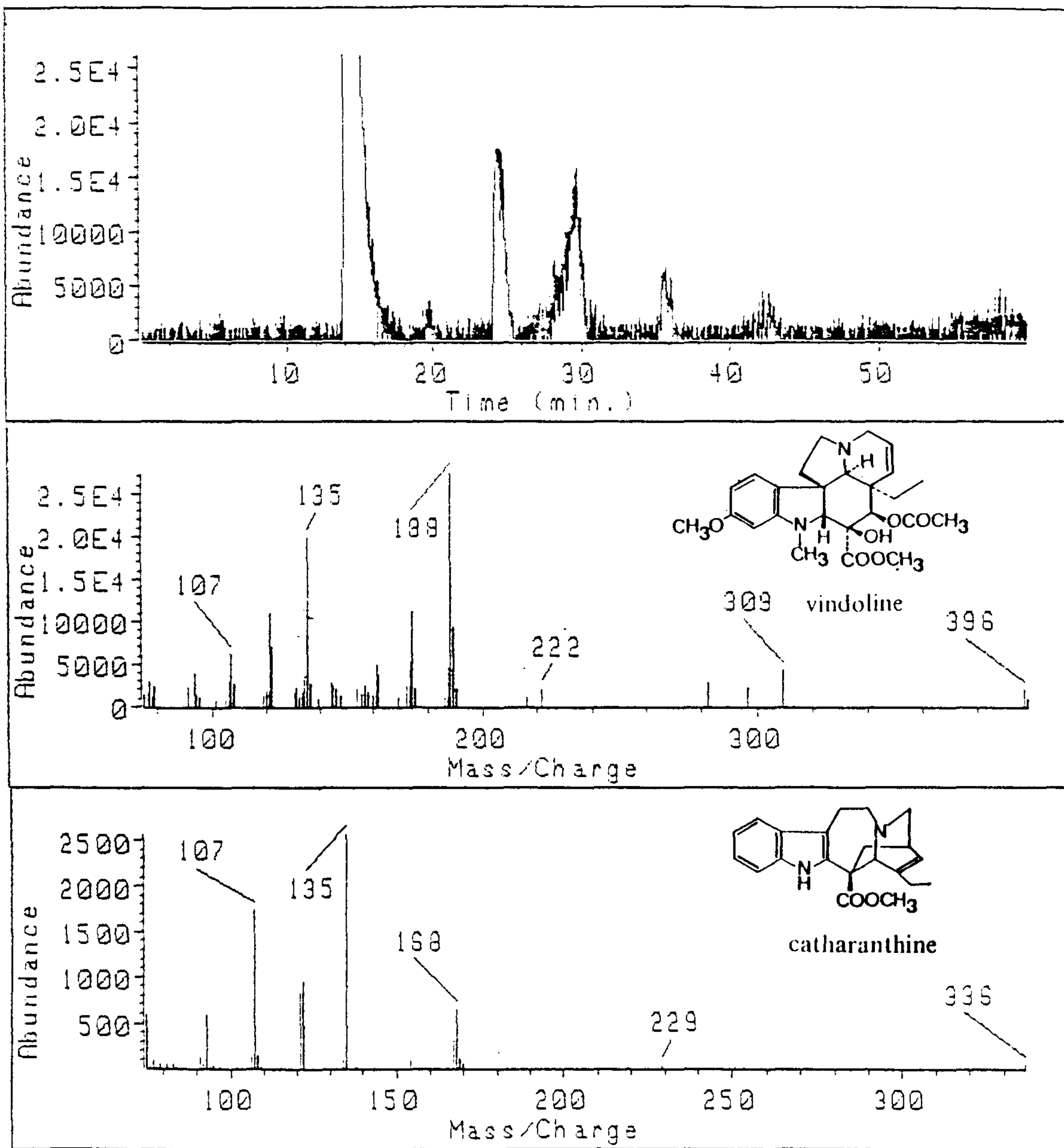


Figure 4. LC/MS analysis of vindoline and catharanthine extracted by Supercritical carbon dioxide.

- A. Total ion chromatogram of crude extracts.
- B. Mass spectrum of vindoline identified.
- C. Mass spectrum of catharanthine identified.

제 4 절 결론 및 건의사항

초임계 이산화탄소를 이용하여 일일초로부터 유효성분을 추출하였으며 성분분석결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 종래 천연식물체로부터 alkaloid를 추출하려면 유기용매를 사용하였으나 초임계 이산화탄소는 인체 무해하며 이를 이용하면 일일초로부터 유효성분을 추출하는데 효과적이다.
- 초임계 이산화탄소는 일일초에 함유된 vindoline에 대하여 선택성이 있음을 보여주었다.
- 일일초로부터 vindoline의 초임계추출은 이산화탄소가 초임계상태로 존재할 수 있는 범위내의 150-400 bar의 압력과 40-70°C의 온도가 적당하다.
- 일일초로부터 vindoline의 초임계추출은 건조된 분말상태에서 선택성이 좋으며 건조되지 않은 경우 선택성이 떨어짐을 알 수 있다.
- 일일초 줄기조직으로부터의 vindoline 추출은 선택성이 떨어지는 반면 잎 조직으로부터의 vindoline 추출은 선택성이 크다.
- LC/MS를 사용하여 추출한 vindoline과 catharanthine을 정성적으로 확인하였다.

제5절 인용문헌

- Boder, G.B., Gorman, M., Johnson, I.S., and Simpson, P.J. (1964). *Llodia* 27, 328-333.
- Drapeau, D., Blanch, H.W., and Wilke, C.R. (1987). *Planta Med.* 53, 373-376
- Lee, H., Hong, W.H., Yoon, J.H., Song, K.M., Kwak, S.S., and Liu, J.R. (1991). (*submitted*).
- Miura, Y., Hirata, K., Kurando, N., Miyamoto, K., and Uchida, K. (1988). *Planta Med.* 54, 18-20.
- Smith, J.I., Smart, N.J., Kurz, W.G.W., and Misawa, M. (1987). *Planta Med* 53, 470-474.
- Svoboda, G.H., Neuss, N., and Gorman, M. (1959). *J. Am. Pharm. Asson.* 48, 659-666.
- Tallevi, S.G. and DiCosmo, F. (1988). *Planta Med.* 54, 149-152.