

Angelica gigas Nakai 뿌리배양에 의한 decursin 유도체 생산 증진을 위한 연구

조지수, 김명환, 김지연, 이경선, 전수환, 김익환¹⁾, 김동일*

인하대학교 공과대학 생물공학과 세포배양공학실험실

¹⁾고려대학교 생명공학원

전화 (032) 860-7515, FAX (032) 875-0827

Abstract

Production of decursinol angelate, a new potential anticancer agent, in *Angelica gigas* Nakai root culture was increased by treatment of H₂O₂, and various polysaccharides such as CM- β -cyclodextrin, glucan, CM- β -chitin, yeast extract and pectin. One mmole H₂O₂ enhanced the production of decursinol angelate. However, higher concentrations of H₂O₂ were founded to be toxic for root growth whereas specific productivity of decursinol angelate was increased at high concentrations of H₂O₂. In the case of polysaccharide elicitors, CM- β -chitin was the most effective for enhanced production of secondary metabolite in *A. gigas* Nakai root culture.

서론

천연물로부터 유래된 의약품의 이용이 전 세계적으로 증대하고 있으며 한국을 비롯한 중국과 일본에서도 전통적으로 동양에서 사용되고 있는 생약재로부터 항암제 등의 유용 물질을 찾는 연구가 많이 이루어지고 있는데 이런 시도는 수천년동안 경험적 처방과 임상실험을 통해 효능과 안정성이 입증되었다는 사실로 미루어 화학합성에 의한 접근보다 기술적인 장점이 크다고 하겠다. 당귀(*Angelica gigas* Nakai)는 coumarin계의 decursin, decursinol angelate와 nodakentin, umbelliferon, β -sitosterol 등의 성분이 함유됨이 알려져 있으며 decursin과 decursinol angelate는 항미생물 활성과 항암 활성을 갖는 것으로 알려져 있다¹⁾. 특히 기존의 항암물질이 지나치게 독성이 강하고 비특이적인 반면 decursin과 decursinol angelate는 강력한 항암활성을 가지면서 부작용이 적어 새로운 항암제로의 개발이 기대되고 있다. 한편, 식물체로부터 생산되는 유용한 이차대사산물을 얻기 위해 탈분화된 캘러스나 현탁세포를 이용하는 방법이 사용되어 왔다. 하지만, 탈분화된 캘러스나 현탁세포를 이용하는 배양방법은 일반적으로 식물 분화와 관련되어 생산되는 이차대사산물의 경우에는 종종 필요성분의 함량이 낮고 생산성이 불안정하여 매우 제한적인 단점을 갖는다. 특히, 기관 특이적으로 생산되는 물질의 경우에는 식물의 분화와 물질의 생산이 연관되어 있을 수 있는데, 이런 경우에는 탈분화된 캘러스나 현탁세포의 배양

으로는 분화와 관련된 특정 효소가 발현되지 않기 때문에 목적하는 이차대사산물이 생산되지 않는 문제점이 있다. 따라서, 식물체로부터 이차대사산물의 보다 안정적인 생산을 위해서는 뿌리와 같은 조직배양이 유리할 수 있다. Decursinol angelate는 coumarin계 물질로서 phenylalanine ammonia lyase(PAL) enzyme이 이 물질의 초기 단계의 합성에 관여하므로 배양 시 elicitor를 첨가함으로써 이차대사산물의 생산성 증진을 도모하리라 사료된다. 따라서 본 연구에서는 *Angelica gigas* Nakai 뿌리 배양 시 다양한 elicitor 물질들을 처리하여 각각의 물질이 decursinol angelate 생산에 미치는 영향을 조사하였으며, decursinol angelate 생산을 위한 최적의 물질을 선별하여 생산성 증진을 도모하였다.

재료 및 방법

본 연구에서는 한국산 참당귀인 *Angelica gigas* Nakai의 뿌리를 배양하였으며, 생장배지로는 SH 기본배지에 30 g/L sucrose, 1 mg/L NAA, 0.6 g/L casein hydrolysis을 첨가하여 25°C, 120 rpm 암조건에서 배양하였다. Elicitor로 사용한 물질들 중에서 hydrogen peroxide(30%, v/v), pectin, CM- β -cyclodextrin(CD) 등은 각각 Sigma 사에서 구입하였으며 glucan, CM- β -chitin은 (주)태평양에서 제공받았으며, chitosan과 yeast extract는 정제하여 사용하였다³⁾. 각각의 elicitor는 배양 14일째 첨가하였으며, 첨가농도는 50 μ M, 100 μ M, 1 mM, 10 mM, 100 mM H₂O₂, 10 mg/L glucan, 10 mg/L CM- β -chitin, 10 mg/L CM- β -CD, 10 mg/L pectin, 10 mg/L chitosan 이었으며, yeast extract는 phenolsulfuric acid법으로 160 mg/L의 glucose농도로 첨가하였다. Decursinol angelate의 분석은 세포에서 추출 후 HPLC 분석을 적용하였으며, S5-100-ODS column을 사용하여 330 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

Angelica gigas Nakai 뿌리에서 decursinol angelate 생산을 증진시키기 위한 최적의 elicitor를 선별하기 위하여 기초실험으로 여러 가지 elicitor를 첨가하였다. 이 때 사용한 elicitor로는 jasmonic acid, salicylic acid, CuCl₂, CuSO₄, vanadyl sulfate, alginic acid, HgCl₂, UV, H₂O₂ 등을 사용하였으며, 이들은 모두 대조구에 비해 생장이 크게 저해되었으며, decursinol angelate의 생산량 또한 대조구에 비해 감소하였다. 그러나 hydrogen peroxide을 첨가한 경우, 생장은 대조구에 비해 저해되었으나 g당 생산되는 decursinol angelate의 양은 대조구에 비해서 월등히 증가하였다. 이상의 기초실험 결과를 토대로 decursinol angelate 생산량을 증진시키기 위한 최적의 hydrogen peroxide을 첨가농도를 결정하기 위한 실험을 수행하였다. Hydrogen peroxide는 접종 후 14일째에 첨가하였으며, 이는 뿌리의 생장이 지수생장기에 접어

른 시기이다. 그 결과 *Angelica gigas* Nakai 뿌리의 생장은 1 mM hydrogen peroxide를 첨가했을 경우 대조구와 비슷한 생장을 나타내었으나 더 높은 농도인 10 mM H₂O₂, 100 mM H₂O₂을 첨가하였을 경우에는 뿌리의 생장이 저해되었다 (Figure 1). 이것은 높은 농도로 첨가했을 경우 H₂O₂가 세포 내로 들어가 free radical을 형성하여 뿌리에 toxic한 영향을 주었기 때문이라 사료된다.

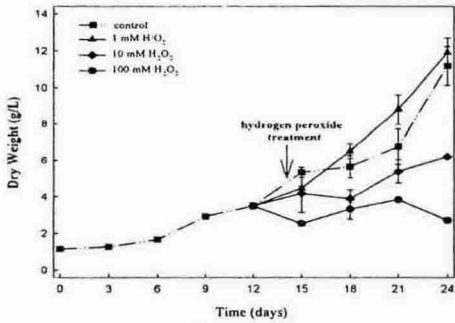


Figure 1. Time course change of cell growth. Hydrogen peroxide was treated with various concentration on 14-day-old root.

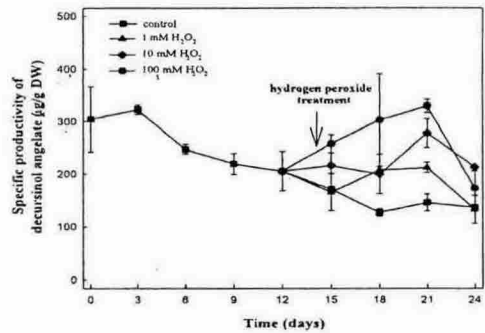


Figure 2. Time course change of specific productivity of decursinol angelate in *A. gigas* Nakai root

반면에 decursinol angelate의 생산량은 가장 높은 농도인 100 mM을 처리하였을 경우 g당 생산되는 decursinol angelate 양이 가장 많았는데, 18일째에 g당 생산되는 decursinol angelate 양은 대조구에 비해 2.12배 증가하였다(Figure 2). 이는 H₂O₂에 의해 세포내에 생성된 free radical이 이차대사산물 생산을 위한 대사에 신호물질로 작용하여 decursinol angelate 생산을 촉진했기 때문으로 여겨진다^{2,4}.

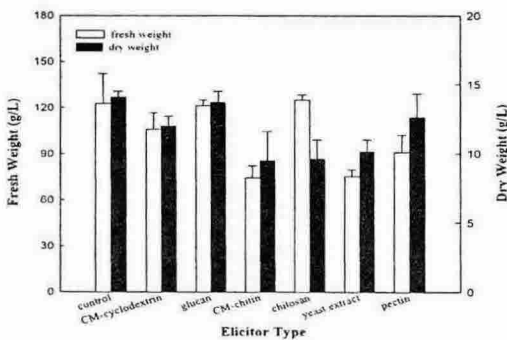


Figure 3. Effect of polysaccharide elicitors on 18 -day-old cell growth. All elicitors were treated at 14 -day-old root with 100 mg/L concentration except yeast extract. Yeast extract was added with 160 mg/L glucose conc. by phenol sulfuric acid method.

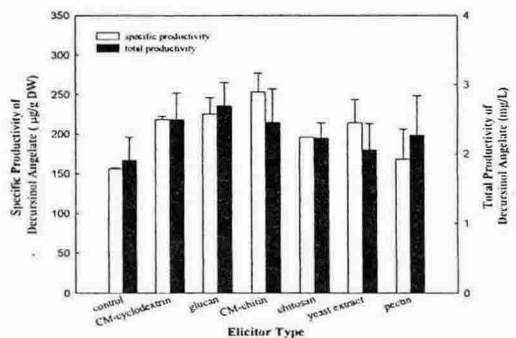


Figure 4. Effect of polysaccharide elicitors on productivity of intracellular decursinol angelate. All elicitors were treated at 14-day-old root with 100 mg/L concentration except yeast extract. Yeast extract was added with 160 mg/L glucose conc. by phenol sulfuric acid method.

다음으로 fungi의 세포벽 성분인 여러 가지 polysaccharide를 elicitor로 처리하였을 때 decursinol angelate 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 뿌리의 생장은

CM- β -CD와 glucan, pectin은 대조구와 비슷하였으나 CM- β -chitin과 chitosan, yeast extract의 경우는 생장을 다소 저해하였다(Figure 3). 또한 이차대사산물의 변화는 모든 polysaccharide elicitor들이 g당 생성되는 decursinol angelate 양을 증대시켰으며 CM- β -chitin의 경우 가장 효과가 좋았는데 이는 대조구에 비해 1.62배 증대된 값이다(Figure 4). 총 생산량을 비교해 보면, chitosan, pectin과 yeast extract의 경우 대조구와 비슷한 것에 비해 CM- β -CD, glucan, CM- β -chitin을 첨가한 경우 대조구에 비해 각각 1.31, 1.41, 1.29 배 증대되었다³⁾. 이는 polysaccharide elicitor의 경우, elicitor 자체가 뿌리에 toxic한 영향을 주지 않으면서 이차대사산물 생산을 증진시켰기 때문으로 판단된다. 이상의 실험으로부터 decursinol angelate 생산에서 가장 효과적인 elicitor로는 1 mM의 hydrogen peroxide 와 10 mg/L의 CM- β -chitin이었으며, 이는 elicitor의 종류에 따라 이차대사산물의 생산이 많은 영향을 받는다는 것을 시사하는 결과이다.

요약

Angelica gigas Nakai 뿌리배양을 통한 decursinol angelate 생산을 증대시키기 위하여 여러 가지 elicitor들을 처리하여 생산 증진을 도모하였다. 가장 효과적인 elicitor로는 hydrogen peroxide와 CM- β -chitin이었으며, 이때의 g당 생산되는 decursinol angelate 양은 각각 대조구에 비해 2.12, 1.62배 증대된 값이다.

감사

본 연구는 과학기술부의 신호전달 조절을 위한 PKC activator 탐색 및 응용연구(과제번호 08-02-A-01)의 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Ahn, K. S., "A Study on the Anticancer and Immunostimulating Agents from the Root of *Angelica gigas* Nakai"(1996), Ph.D. Dissertation, Dep. of Biology, Korea University, Seoul.
2. Bolwell, G. P., "Role of Active Oxygen Species and NO in Plant Defence Responses"(1999), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2, 287-294.
3. Chang, J. H., "Effect of Elicitation on the Production of Peppermint Oil during Suspension Culture of *Mentha piperita* L."(1993), M.D. Dissertation, Dep. of Food Science and Technology, Seoul National University, Seoul.
4. Kairong, C., X. Gengsheng, L. Sinmin, X. Gengmei, W. Yafu, "Effect of Hydrogen Peroxide on Somatic Embryogenesis of *Lycium barum* L."(1999), *Plant Sci.*, 146, 9-16.