

## Alfalfa 식물 세포 배양계에서 Cyclodextrin과 휘발성 향기성분의 포접형성

조지녀, 조규현\*

강원대학교 화학공학과

전화 (033) 250-6335 FAX (033) 251-3658

### Abstract

The productivity of natural flavors in alfalfa suspension cultures is low partially due to their low solubility. Thus, by formation inclusion complex of cyclodextrin(CD) with flavor compounds enhancement of the productivity of flavor was attempted in this research. we observed that CD formed inclusion complex with flavor compounds by GC/MS analysis. Also, there was indication that CD played a role as an elicitor in alfalfa suspension cultures.

### 서론

최근 수년동안, 식품산업이나 제약산업등에서는 의약품을 비롯한 식품첨가물의 천연적 생산에 관심이 증대되고 있다(1). 식품첨가제로서 flavor등의 휘발성 향기성분은 식품내에서 독특한 향을 발현하여 식품의 맛을 향상시켜주는 역할을 하므로 그 가치가 크다. 물론, flavor의 기본적인 물질들은 화학적으로 합성이 가능하나, 소비자의 생활수준이 높아짐에 따라 점차 천연향료를 선호하는 추세에 이르게 되었다. 따라서, 이러한 수요를 만족시키기 위해 특별한 대안이 필요하게 되었고 그 해답이 바로 식물세포 배양을 통해 천연적인 flavor를 대량생산 하는 것이다. 그러나 flavor는 매우 방향성이 크고 불안정하여 식물세포 배양시 농도가 매우 낮은 상태로 세포내에 축적되거나 세포 밖으로 배출되므로 생산수율이 현저히 낮고, 또한 휘발성이 강하여 쉽게 날아가 버린다는 문제점이 있다. 그러므로 식물세포 배양시 생산물의 불안정성으로 인한 저생산성의 문제점에 대한 개선이 필요하다.

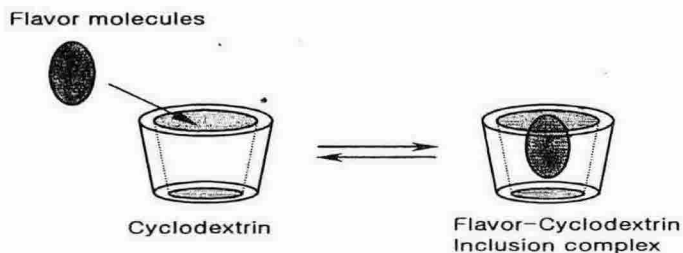


Fig. 1. Schematic representation of complex formation of cyclodextrin with flavor molecule.

Cyclodextrin(CD)은 6, 7, 8개의 포도당이  $\alpha$ -1,4 결합으로 이루어진 환상구조로 되어 있다. CD는 Glucose unit의 수가 6, 7, 8에 따라 각각  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD로 나누며 환상구조의 내부는 공동을 형성하고, 공동은 수소원자들과 glycoside의 산소원자들이 가교를 형성하고 있으며 가교의 비결합성 전자쌍은 공동내부로 향하여 있어 공동내부의 전자밀도를 상승시켜 Lewis 염기성을 부여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 구조적 특성을 갖는 CD의 공동내부는 비교적 소수성을 갖는 반면 극성이 강한 OH기는 외부로 노출되어 친수성을 띠므로써 다양한 물질들을 공동내에 포접하는 능력을 갖고 있다. 공업적으로 대량 생산되고 있는 CD중 특히  $\beta$ -CD는 가격도 비교적 저렴하며 소수성 물질을 포접하는 능력이 높아 식품 및 의약품 산업에 다양하게 이용되어 왔다(2).

본 연구에서는 이러한 CD의 구조적 특징을 이용하여 Figure. 1과 같이 소수성인 휘발성 flavor 성분을 CD의 공동내부로 신속히 포획하여, 수용액상의 용해도를 높임과 동시에 생산수율을 높여 식물세포배양시 나타나는 불안정성으로 인한 저생산성의 문제점을 극복하고자 하였다.

본 논문은 이와같은 연구의 초기단계로서, alfalfa(*Medicago sativa L.*)세포로부터 발현되는 향기성분의 profile을 분석하고 alfalfa 현탁배양내로 CD를 첨가하여 향기 성분과 CD간의 포접형성을 관찰해 보았다. 또한 CD의 식물세포 배양에의 역할에 대해 규명해 보았다.

## 재료 및 방법

본 연구에서 사용된 세포주는 alfalfa(*Medicago sativa L.*)으로 미국 Rutgers대학 및 축산기술연구소로부터 callus 상태로 분양받았다.

세포주는 현탁배양으로 유도한 세포를 사용하였으며, 배양조건은 탄소원인 sucrose를 3%(w/v) 첨가하고 hormone으로 2,4-D를  $9\mu\text{M}$  첨가한 M&S(Murashige Skoog) 배지에서 pH를 5.8로 조정하여  $25\pm 2^\circ\text{C}$  암실에서 10일마다 계대 배양하였다.

GC/MS(Gas chromatography/Mass spectrometry)를 이용하여 Alfalfa 세포로부터 생산되는 휘발성 향기성분을 분석하였다. 이때 기기는 Hewlett-Packard 5890/Quadrupole(JMS-AM 150, JEOL)모델을 사용하였고, column으로는 HP-5(Crosslinked-Methyl Silicone Gum,  $30\text{m}\times 0.2\text{mm}$ , 막두께  $0.25\mu\text{m}$ )을 사용하였다. Column 온도는  $50^\circ\text{C}$ 에서 2분간 유지후  $280^\circ\text{C}$ 까지  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ 으로 상온 시켜 1분간 유지하였다. Injector의 온도는  $280^\circ\text{C}$ , ionizing voltage  $70\text{eV}$ 로 하였고, He 유량은  $1.5\text{ml}/\text{min}$ 으로 하였다. 시료의 주입량은  $2\mu\text{l}$ 를 split ratio 1:100으로 주입하였다.

## 결과 및 고찰

세포배양된 alfalfa 현탁액으로부터 휘발성 향기성분을 분석하기 위해서 시료전처리 과정으로 용매추출법을 선택하고 GC/MS에 의해 향기성분을 확인하였다. Intracellular로부터 분석된 향기성분은 Figure. 2에서와 같이 ester, aldehyde류등 약 12종이었다. 다음으로 CD와 alfalfa 대사물질간의 포접형성을 보기위해 세포배양내

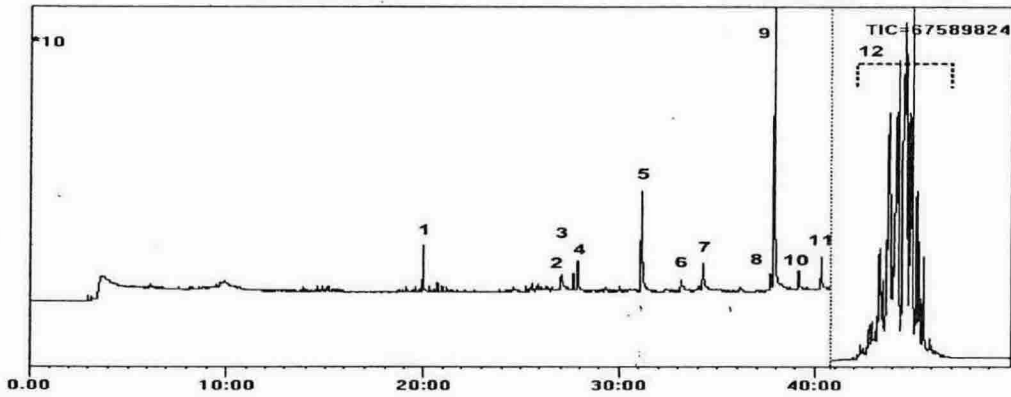


Fig. 2. Total ion chromatogram(TIC) of solvent extracts from alfalfa cultures. 1. Butylate hydroxytoluene 2. Tetradecanal 3. Tri-tert-butylphenol 4. unknown 5. Octadecanal 6. Octadecanoic acid, methyl ester 7. Butyl hexadecanoate 8. Octadecanoic acid, butyl ester 9. Hexanedioic acid, dioctyl ester 10. unknown 11. DEHP 12. diisononyl phthalate

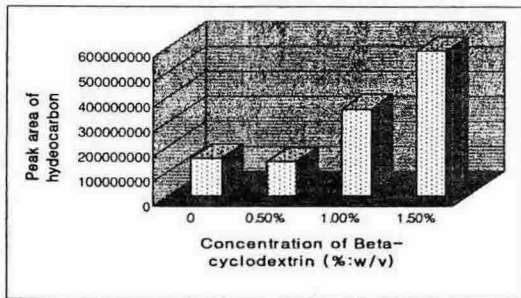


Fig. 3. The eliciting effect of  $\beta$ -cyclodextrin

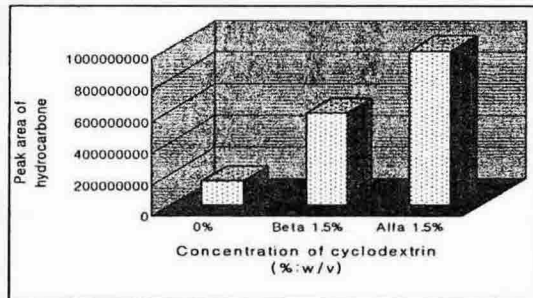


Fig. 4. The eliciting effect of  $\alpha, \beta$ -cyclodextrin

로 CD를 첨가, 배양한 후 flask 전체에서 약 10mL의 세포를 취하여 위와 동일한 방법으로 분석하였다. 분석 결과 탄화수소류가 대부분 검출되었다. 이것은 intracellular만을 분석했을때와는 많은 차이를 보이고 있는데 그것은 extracellular내에 휘발성 향기성분이 미량존재함으로 하여 휘발성 향기성분 이외의 성분들이 분석시 많은 영향을 끼친 것으로 보인다. CD에 의한 영향으로 관찰 할 수 있는 것은  $\beta$ -CD를 첨가하지 않은 대조구에서는 향기성분인 ester성분이 검출되는데 비해  $\beta$ -CD를 첨가 한 비교구에서는 검출되지 않았다는 것으로  $\beta$ -CD와 flavor간의 inclusion complex가 형성되었음을 확인 할 수 있었다. 즉, 용매가  $\beta$ -CD와 flavor간의 inclusion complex를 완전히 깨지 못하여 hydrophilic한 공동 외부에 가지는

CD가 flavor를 포접한 채 수층에 존재함으로써 GC/MS에 의해 분석한 용매층에서는 검출되지 않은 것으로 보인다.

또한  $\beta$ -CD의 첨가량이 증가할수록 탄화수소류의 peak area가 약 2배가량 증대되는 것으로 보아 CD가 세포의 대사산물을 molecule pumping, capturing하여 생산물의 생산성을 증대시키는 것이외에도 elicitor로서 작용한다는 것을 추론할 수 있다 (Fig. 3.). 또한 eliciting effect 측면에서는  $\beta$ -CD보다는  $\alpha$ -CD가 좋음을 알 수 있었다(Fig. 4.).

### 요약

본 연구에서는, 최근 관심의 대상이 되어 다방면에서 그 사용의 예가 늘고 있는 CD와 alfalfa 식물세포 현탁액으로부터 발현되는 휘발성 향기성분을 비롯한 대사물질의 포접형성에 대해 관찰하고, 식물 세포배양계에서의 CD의 역할에 대해 확인해보고자 하였다. 실험결과 CD는 alfalfa로부터 발현되는 향기성분과 inclusion complex을 이룬다는 것을 확인하였고, 또한 CD가 alfalfa 식물 세포로부터 대사물질을 더 많이 이끌어 내는 elicitor로서 작용할 수도 있음을 알 수 있었다.

### 감사

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(1999-1-21100-001-3)지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

- (1) B.J.Cass, F.Schade, C.W.Robinson, J.E.Thompson, R.L.Lagge, *Biotech and Bioeng.*, Vol. 67, No. 3, (2000)
- (2) J.Szejtli, *Cyclodextrin technology*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, (1988)