

참당귀(*Angelica gigas* Nakai) 현탁세포배양에서 면역증강성 다당의 생산 증진

조윤정¹, 김익환², 김동일¹

인하대학교 생물공학과 세포배양공학실험실¹, 고려대학교 생명공학원²

전화 (032) 863-5946, FAX (032) 872-4046

Abstract

Suspension cells of *Angelica gigas* Nakai was cultivated to produce extracellular polysaccharide(ECP) as immunostimulating agents. In this study, effects of pectinolytic enzymes such as pectinase, Pectinex on cell growth and ECPs production were investigated in suspension cultures. Optimum concentration of pectinase for ECP production was found to be 0.1 U/L, at which ECP production was increased 1.39 fold (0.97 g/L) compared to control culture.

서론

식물세포배양은 천연물질의 생산을 위한 잠재적 재료로서 광범위하게 연구되어져 왔다. 약용식물로부터 유래된 캘러스 및 현탁배양은 *in vitro*에서 약학적으로 중요한 물질의 생산에 사용이 가능하다. 우리나라 전통 의약식물인 참당귀의 현탁세포 배양을 통하여 배지로 분비되는 면역증강성 다당은 주성분이 pectin질의 다당이며, 이 다당과 무기물(Ca, Mg 등)에 의해 면역증강활성이 나타나는 것으로 알려져 있다.¹⁾ Pectin질의 다당은 식품 첨가제로서 상업적으로 중요하며 생리 활성이 있고 임상적 응용이 가능하나 광대한 복잡성 때문에 구조, 작용, 배치의 분석을 규명할 수 있는 방법이 여전히 필요하다. 한편 식물세포배양시 세포벽을 가수분해하는 효소를 배양액에 첨가하면 세포벽의 fragment가 방출되어 그 자체가 endogenous elicitor의 역할을 한다고 알려져 있다.²⁾ 따라서 본 연구에서는 참당귀 현탁세포배양에 세포벽 가수 분해 효소를 처리하여 세포의 성장 및 ECP 생산에 미치는 영향을 조사하였으며, 최적 효소 농도를 결정하여 ECP 생산성 증진을 도모하였다.

재료 및 방법

세포주 및 배양

본 연구에 사용된 참당귀 캘러스는 고려대학교 생명공학원으로부터 분양 받은 *A. gigas* Nakai 세포주였으며, 이 캘러스로부터 액체배지에서 현탁세포를 유도하였다. 성장배지로는 SH 기본배지에 성장조절제로 2,4-D를 사용하였고, 탄소원으로 3%의 sucrose를 첨가하였으며, 1 N NaOH를 사용하여 pH를 5.8로 조절한 뒤 121°C, 1.2

기압에서 가압증기 멸균하여 사용하였다. 현탁배양은 회전식 진탕배양기에서 25℃, 120 rpm, 암조건으로 유지하였고 7일 간격으로 계대배양을 하였다.

세포량 측정

배양된 세포의 생체량(fresh cell weight, FCW)과 건조량(dry cell weight, DCW)을 측정하여 세포 성장을 알아보았다. 생체량은 배양 세포를 진공펌프를 이용하여 Toyo No.1 여과지로 여과하여 배지와 세포를 분리하고 증류수로 세포를 여러 번 세척한 후 수분을 충분히 제거한 다음 미리 무게를 측정한 weighing dish에 담아 화학저울로 측정하였다. 건조량은 생체량을 측정한 후 60℃ dry oven에서 24 시간 건조하여 측정하였다.

Elicitor의 제조

Elicitor로서 pectinase를 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였고, Pectinex는 Novozymes Biotech, Inc.(Bagsvaerd, Denmark)에서 제공받아 사용하였다. Pectinex는 pectintranseliminase, polygalacturonase, pectinesterase를 포함하는 Novozymes의 제품명이며 활성은 FDU(fermented depectinization unit)로 정의한다.

Polysaccharide의 정량 분석

세포 내에 존재하는 다당(intracellular polysaccharide)을 정량 분석하기 위해서는 건조된 세포를 막자사발을 이용하여 곱게 빻은 후 0.1 g을 취하여 5 mL의 물을 첨가하여 100℃에서 1 시간 동안 증탕하였다. 이를 8,000 rpm에서 10 분간 원심분리한 뒤 상등액을 취하여 phenol-sulfuric acid 방법으로 정량하였다.³¹⁾ 배지에 존재하는 다당(extracellular polysaccharide, ECP)은 투석막(MWCO 1,000, Spectrum Medical Industries, USA)을 사용하여 carbon source를 제거한 후 같은 방법으로 정량하였다.

결과 및 고찰

참당귀의 현탁세포배양을 통하여 생산되는 ECP 생산을 증진시키기 위하여 세포벽 가수분해 효소인 pectinase와 Pectinex를 첨가하였다. Pectinase를 0.1, 1, 10, 100 U/L로 첨가한 결과, 100 U/L의 경우만 제외하고 생장이 증가하였다. ECP의 생산도 성장과 유사한 경향성을 나타내었다. 세포의 생장은 0.1 U/L pectinase를 첨가하였을 경우 DCW가 13.0 g/L로 최대였고 이는 대조군에 비해 1.05 배 증가한 것이다 (Figure 1). 또한 ECP 생산에 있어서도 0.1 U/L pectinase 첨가시 0.97 g/L로 대조군에 비해 1.39 배 증가하였다(Figure 2).

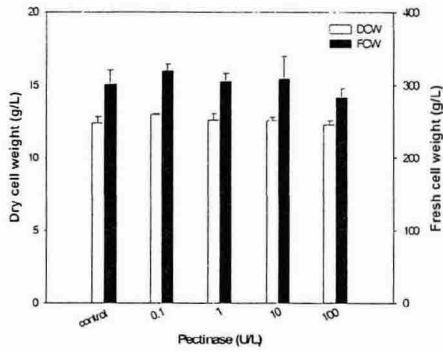


Figure 1. Effects of pectinase on *A. gigas* cell growth. Pectinase was added with various concentrations into 4-day-old suspension cells.

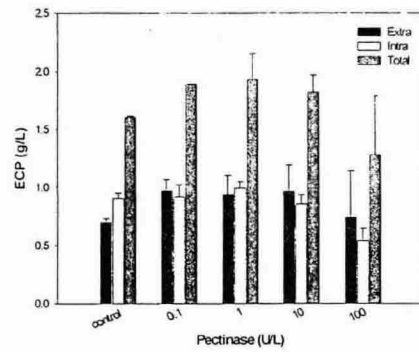


Figure 2. Effects of pectinase on ECPs production. Pectinase was added with various concentrations into 4-day-old suspension cells.

Pectinex를 1, 10, 100 FDU U/L로 첨가한 결과, 세포의 생장은 100 FDU U/L의 농도만 제외하고 모두 생장이 증가하였고 ECP 생산은 모든 경우에 증가하였다. 1 FDU U/L의 농도로 첨가하였을 경우 DCW는 14.9 g/L로 최대였고(Figure 3), 100 FDU U/L의 농도로 첨가하였을 경우 ECP 생산은 1.04 g/L로 최대였다(Figure 4). 이는 대조군에 비해 각각 1.09 배 및 1.35 배 증가한 수치이다.

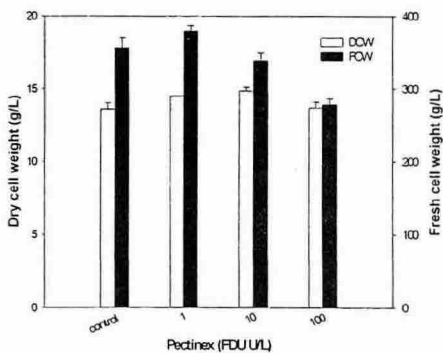


Figure 3. Effects of Pectinex on *A. gigas* cell growth. Pectinase was added with various concentrations into 4-day-old suspension cells.

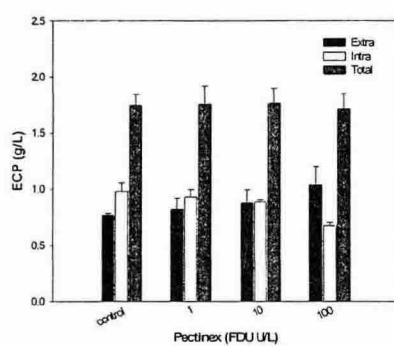


Figure 4. Effects of Pectinex on ECPs production. Pectinase was added with various concentrations into 4-day-old suspension cells.

세포크기의 간접 지수인 F/D ratio는 1, 10, 100 FDU U/L의 농도로 첨가했을 경우 각각 26.18, 22.80, 20.35로 처리농도가 높아질수록 감소하였다. 그리고 총 다당의 생산은 처리한 모든 농도에서 대조군과 비슷하였다. 이는 Pectinex의 첨가가 세포내의 다당을 세포외 환경으로 배출하여 나타나는 결과로 여겨진다.

요약

참당귀 현탁세포배양시 생산되는 ECP는 세포벽을 가수분해하는 효소를 첨가할 경우 그 생산이 증진됨을 확인하였다. Pectinase의 경우 최대 0.97 g/L로 1.39 배, Pectinex의 경우 최대 1.04 g/L로 1.35 배 증진시켰다. Pectinase는 세포벽의 fragment를 방출시켜 세포의 성장과 ECP 생산을 증가시키는 것으로 판단된다. Pectinex는 저농도(1 FDU U/L)로 처리하였을 경우 세포의 성장과 ECP 생산을 증가시켰다. 고농도로 갈수록 성장에 저해될 만큼의 fragment를 방출시켜 세포의 크기가 작아지면서 생산되는 ECP의 양은 증가되는 것으로 여겨진다. 따라서 세포벽을 가수분해하는 효소는 ECP 생산에 긍정적인 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다.

감사

이 연구는 과학기술부의 G7 과제지원(과제번호 08-02-A-01)에 의하여 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. Thesis, Dept. of Biology, Korea University, Seoul.
2. Kurosaki, F., Tsurusawa, Y., and Nishi, A., "Phytoalexin production in cultured carrot cells treated with pectinolytic enzymes"(1985), *Phytochemistry*, 24(7), 1479-1480.
3. Kennedy, J. F. and Chaplin, M. F., "Carbohydrate analysis"(1994), IRL Press, 2-3.