

## 자생식물 미치광이풀의 모상근배양에 의한 Tropane alkaloids 생산

정희영, 강민정, 강영민, 강승미, 박우진, 윤대진\*, 박정동\*, 최명석

경상대학교 산림과학부, 경상대학교 응용생물공학부\*

전화 (055)751-5493, FAX (055)753-6015

### Abstract

Growth and tropane alkaloids(hyoscyamine and scopolamine) contents were studied in root cultures from *Scopolia parviflora*. All excised roots grew well, even without an addition of a growth regulators. *Scopolia* roots could be divided scopolamine-rich species. Among the culture media, SH medium was the best for tropane alkaloids production from the hairy roots, whereas the growth increased in SH medium. In precursor experiments, feeding of hyoscyamine was promotive for scopolamine formation. Abiotic elicitors made a slightly production promotion effect.

### 서론

Scopolamine과 hyoscyamine과 같은 tropane alkaloid는 감기약, 안연고, 비경구 마취제, 멀리방지용 팻취 등으로 매우 광범위하게 이용되고 있지만 국내 자원의 빈곤으로 호주 스위스 등지에서 전량 수입에 의존하고 있다. 이들 물질은 *Atropa*, *Datura*, *Duboisia*, *Hyoscyamus* 및 *Scopolia* 등과 같은 가지과 식물에 국한되어 있다. 그러나 이 물질을 생산하는 가지과 식물은 대부분이 외래종이며, 미치광이풀만이 국내 종이나 현재 멸종위기에 처해 있어(산림청, 회귀 및 멸종위기식물도감, 1997) 이들 물질의 국내 생산은 매우 힘든 실정이다.

Tropane alkaloid는 대량생산하기 위해서는 고생산성 세포추출 선발하여 대량배양하는 것이 효율적이거나, 이들 물질은 탈분화된 세포배양을 통해서도 생산이 용이하지 않다(Yamada and Hashimoto, 1982). 이 물질은 뿌리에서 합성되어 잎으로 수송되는 특성을 가지고 있어(Endo and Yamada, 1984) 모상근 배양을 통하여 대량생산할 수 있다.(Shimomura et al, 1992).

본 연구의 대상인 미치광이풀은 다년생 속근류로서 경기북부, 강원도 일대, 지리산 등에 야생하는 멸종위기식물로 생육적온 등 재배가 매우 곤란하다. 본 연구는 자생식물인 미치광이풀의 뿌리배양을 통한 대량생산을 위한 전단계로 배양조건을 구명하기 위해 행하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 시료 수집 및 모상근 배양

본 연구에 사용된 미치광이풀은 2000년 9월 국립 수목원으로 분양 받은 재료로 이용해 모상근을 유도하였다.(그림 1) 미치광이풀 지하경을 2-3 cm 절취하여 표면살균한 후 3% sucrose, IBA 1.0 mg/l, 0.3% gelite가 첨가된 B5에 치상하여 모상근을 유도하였다. 유도된 모상근은 유도시와 같은 배지에 계대배양하

였으며 25℃, 암상태로 배양하였다.

## 2. 배양 조건 확립

미치광이풀 모상근을 8종의 배양배지, 성장조절물질 등의 배양조건과 elicitor, 진구체 등 물질 생산성을 증진시킬 수 있는 조건을 확립하였다. 각 처리구의 성장량 측정은 4주간 배양한 모상근에 배양배지를 완전히 제거한 후 신선중량(fresh weight)을 측정하였다. 건중량(dry weight)은 배양된 모상근을 50℃ 건조기에 넣고 24시간 동안 둔 뒤 무게를 측정하였다.

## 3. Tropane alkaloids 함량분석

Tropane alkaloids 함량분석은 건중량 0.5g의 모상근을 파쇄하여 추출용매(EtOH : NH<sub>4</sub>OH = 19 : 1) 5 ml에 넣고 1시간 동안 sonicator에서 추출한 후 HPLC급 메탄올 300 $\mu$ l를 넣어 용해한 후 pri-filter(0.2 $\mu$ m, Supelco)를 사용하여 여과한 후 HPLC(high performance liquid chromatography)함량분석에 사용하였다. HPLC분석은 TSK gel ODS(15cm x 4.6mm, 5  $\mu$ m, Tosho), 0.8 ml/min의 유속, 215 nm UV detector로 행하였다. Hyoscyamine과 scopolamine의 확인은 chromatography의 retention time 및 표준물질과의 co-chromatography로 행하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 모상근 배양 및 성장 및 물질생산조건 확립

미치광이풀 지하경으로부터 유도된 모상근은 B5배지에서 왕성한 성장을 보였으며 새로운 측근이 계속 발생되었다. 모상근을 추출하여 HPLC 분석을 행한 결과 hyoscyamine의 함량은 g 건물중 당 200 ~ 800 $\mu$ g이었으며, scopolamine의 함량은 500 ~ 2500 $\mu$ g으로 scopolamine형 식물로 분류되었다.

11종의 배양배지에 모상근을 배양하였을 때 성장에 가장 양호한 배지는 SH배지로 나타났으며 B5, 2B5, 4B5, MS배지 순으로 나타났다 (그림 3A). 미치광이풀 모상근의 tropane alkaloids 생산 양상은 scopolamine이 hyoscyamine 보다 월등히 많았다. Hyoscyamine 함량이 가장 높은 배지로는 1/2B5, 1/4B5, MS배지 순이었으며, 반면 LP, 4B5, SH 등은 함량이 매우 낮았다. Scopolamine의 함량이 가장 높았던 처리구로는 1/2B5 배지, White 배지, 1/4B5 배지 등으로 나타났으며, SH, LP, WPM 배지에서는 함량이 매우 낮았다.

여러 가지 성장조절물질이 미치광이풀 모상근의 성장에 미치는 영향을 살펴본 결과 가장 생장이 좋은 처리구는 NAA로 나타났으며, IBA 처리구가 가장 생장이 좋지 않았다. 가장 생장이 좋았던 처리구는 NAA 1.0 mg/l로 나타났다. 알칼로이드 함량은 성장조절물질을 처리하지 않은데서 높았으며, 농도가 증가할수록 다소 감소하는 경향을 보였다.

## 2. 전구체 feeding 효과

Tropane alkaloids 생합성에 관여하는 전구체의 feeding은 모상근의 성장에는 영향을 주지 않았고, tropane alkaloids 함량은 phenylalanine의 경우 hyoscyamine과 scopolamine 모두 증가되었으나 putrescine과 tropine의 경우에는 무처리구에 비해 그다지 큰 영향을 주지 못했다. 1.0 mM의 hyoscyamine의 첨가는 scopolamine의 함량은 처리하기 전에 비해 6배가 향상되었다.

## 3. Elicitor의 영향

7종류의 abiotic elicitor를 미치광이풀의 모상근에 처리하여 tropane alkaloids 생산에 효과적인 elicitor를 구명하였다. 그 중 Chitosan 처리는 Chitosan 처리구는 무처리구에 비해 Scopolamine의 함량이 급격히 증가하였으며, 특히 30mg 처리구에서 4배의 생산증대 효과가 있었다. 이상의 연구 결과를 종합해보면 멸종 위기에 의한 미치광이풀로부터 유도된 모상근은 자생식물의 알칼로이드 함량 보다는 비교적 낮지만, 고생산세포주 등을 선발하지 않은 것을 감안하면 Tropane alkaloid 생산 산업화에 기여할 것으로 보인다.

## 사사

본 연구는 21세기 프론티어연구개발사업인 자생식물이용기술개발사업단의 연구비지원(과제번호# PF003103-00)에 의해 수행되었습니다

## 참고문헌

1. Endo T, Yanada Y (1984) Tropane alkaloid production in cultured cells of *Duboisia*. *Phytochemistry* 24:1233-1236
2. Shimomura K, Aoki T, Christen P (1992) Characteristics of growth and tropane alkaloid production in *Hyoscyamus albus* hairy roots transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A4. *Plant Cell Rep* 11:597-600
3. Yamada Y Hashimoto T(1982) Production of tropane alkaloids in cultured cells of *Hyoscyamus niger*. *Plant Cell Rep* 1:101-103

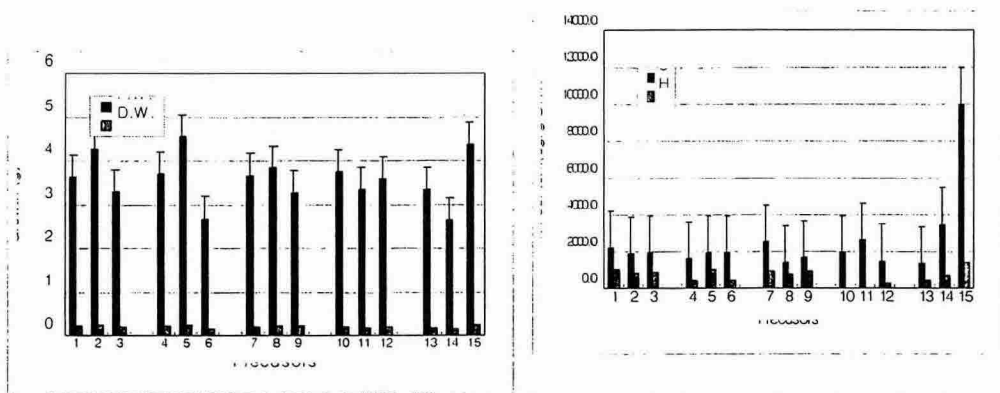


Figure 1. Cell growth and production of tropane alkaloids on hairy root of *Scopolia*. Left : growth of hairy roots, Right : content of tropane alkaloids, 1-3 Ornithin, 4-6 phenylalanine, 7-9 tropine, 10-12 putrescine, 13-15 hyoscyamine

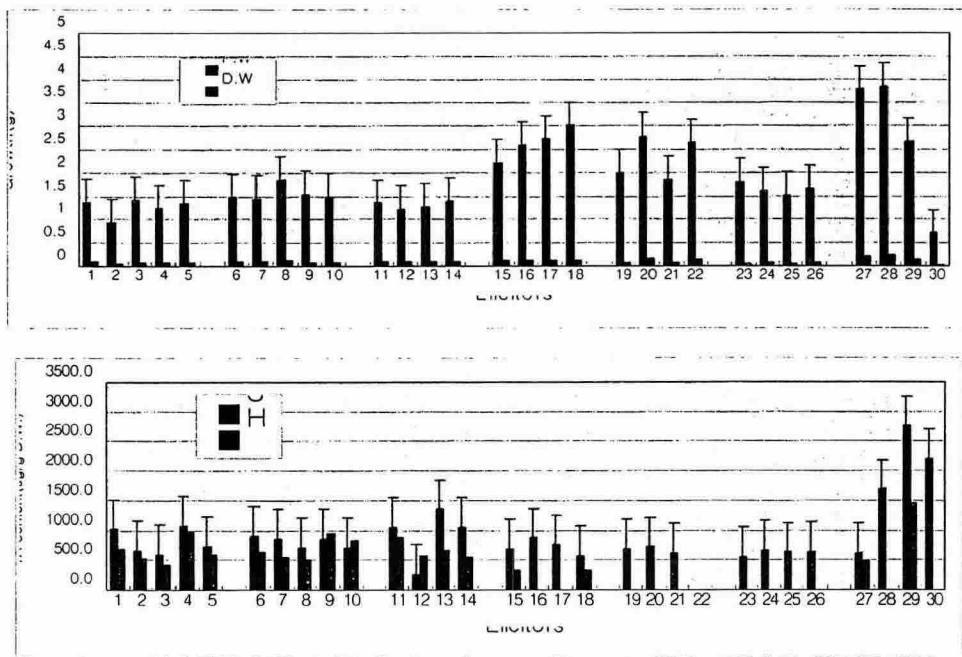


Figure 2. Cell growth and tropane alkaloids production based on abiotic elicitors. Left : growth of hairy roots, Right : content of tropane alkaloids, 1-5 NaCl, 6-10 KCl, 11-14 Sea sand, 15-18 XAD-2, 19-22 XAD-4, 23-26 Diaion, 27-30 Chitosan