PC-9

들깨(*Perilla frutescens*) 줄기세포를 이용한 기능성 로즈마린산 대량생산 시스템 개발

이선화[1], 이주호[1], 이선경[1], 이경렬[1], 김소연[1], 김미애[1], 박종석[1]*
Seon-Hwa Lee[1], Ju-Ho Lee[1], Seon-Kyeong Lee[1], Kyeong-Ryeol Lee[1], So-Yun Kim[1], Mi-Ae Kim[1], Jong-Sug Park[1]*

[1]농촌진흥청 국립농업과학원 생명자원부 생물소재공학과
[1]Dep. of Agricultural Biotechnology, National Institute of Agricultural Science, RDA, 370, Nongssaengmyeong-ro,Jeonju, 54874, Korea

[서론]
로즈마린산은 노화 방지, 혈관 건강, 스트레스 감소 등에 효과를 보이는 대표적인 항산화물질로 알려진 천연 항산화제이므로 주로 화장품, 화장수, 크림, 비누 등에 많이 사용되고 있다. 특히 본 연구에서 대량생산된 로즈마린산의 기능검정 결과 강력한 항산화 및 항염을 확인하여 항산화 화장품개발 등을 목적으로 바이오소재업체에 기술이전 중이다. 로즈마린산은 유해 물질로부터 피부 저항성을 향상시키며 화장품이 산화되어 변질되는 것을 막는 항균·항염 기능을 가지고 있어 화장품 성분 등 산업적 용도로 사용되고 있다.
국내 산업용 바이오 소재 내수시장은 점점 증가 추세에 있으나 거의 수입에 의존하고 있어 해외의존도가 높은 국내 바이오 소재업체의 채산성 및 경쟁력 제고에 심각한 문제점 발생이 우려되고 있다.
특히 최근 나고야의정서의 본격 발효(‘17. 8)됨에 따라 이러한 문제점은 더욱 심화 추세이며, 국내 고유 농생명자원 유래 줄기세포를 이용한 기능성 바이오 소재 대량생산은 가장 효과적인 대안이 될 수 있다.
지금까지 바이오소재 대량생산 연구는 식물세포 세대 진전을 위한 계대배양시 목표 기능성 성분이 소멸되는 치명적인 문제점으로 인하여 고부가 바이오 소재 대량생산을 통한 산업화의 가장 큰 장애요인이 되어왔다. 본 연구는 식물 cambium세포 유래 줄기세포의 선발 및 배양으로 이러한 문제점을 극복하여 기능성 바이오 소재를 지속적인 생산 가능하고자 로즈마린산의 대량생산용 줄기세포 배양 시스템을 개발, 구축하여 국내 농생명자원 유래 고부가 로즈마린산의 산업화용 소재를 개발하고자 하였다.

[재료 및 방법]
1. 식물재료 : 로즈마린산 함량이 가장 높은 들깨품종(보라 10.33mg/g) 의 잎.
 - 5~7cm 크기의 들깨 잎을 사용.
 - 소독 : 에탄올 70%에 30초간, 락스 25%에 10분간 2번 소독 후 각각 멸균수에 3회씩 세척
2. 줄기세포 선발
 - 고체배양 : 2,4-D 단독, 2, 4-D 및 BA, 2,4-D 및 NAA 조합처리, 배양조건은 25±1℃, 암배양, 12주 배양
 - 줄기세포 확인 : 과산화수소 처리를 통해 peroxidase activity 검정. 확인된 줄기세포를 분리, 계대배양
3. 줄기세포의 대량증식을 위해 현탁 배양
 - 현탁 배양 배지 : MS 배지 및 2, 4-D를 농도별로 120rpm, 25±1℃, 암배양, 12주 배양,
4. 줄기세포 유래 로즈마린산 생합성 정성·정량 분석 : LC-MS/MS 분석
5. 줄기세포 유래 로즈마린산의 항산화성 및 항염증 활성 검정
 - 항산화 활성 검정 : HepG2 cell 내 산화 자극에 대한 항산화 활성을 H_2O_2 처리와 비교 검정
 - 항염 활성 검정 : 염증 관련 효소 억제를 통한 항염증 활성 검정

[결과 및 고찰]
줄기세포 선발용 고체배양 호르몬 처리 조건은 2,4-D 2.0mg/L 및 BA 0.05 mg/L 를 혼합 처리한 MS 배지였다. 줄기세포임을 확인하기 위해 과산화수소(H_2O_2) 처리를 통해 기포 발생을 관찰, 줄기세포임을 확인하였다. 줄기세포만을 분리하여 계대배양을 하였고 대량생산을 위해 액체배양을 한 결과 2,4-D 1.0mg/L 를 첨가한 1/4MS 배지 처리구에서 적합함을 알 수 있었다. LC-MS/MS 분석 결과 이 처리구에서 로즈마린산 생합성량이 40.4g/L로 다른 처리구에 비해 높은 함량임을 확인하였다.
로즈마린산의 항산화 활성 검정 결과 과산화수소 처리시 50, 100, 200㎍/㎖ 농도에서 처리시 p∠ 0.05 수준에서 유의적으로 세포 활성의 우수함을 나타내 산화스트레스로부터 간세포 보호 활성이 있음을 나타내어 로즈마린산이 강력한 항산화물질임을 입증했다. 또한 항염증 활성 검정을 위해 간세포에 대한 시료의 독성 평가 결과 농도에 따라 염증성 사이토카이(1L-1) 생성을 억제하는 것을 볼 수 있어 항염증에 활성을 나타냈다. 항염증 활성 검정을 위해 염증 관련 효소 억제를 통해 항염증 활성을 확인한 결과 염증 관련 효소 iNOS, COX-2의 생성이 억제되게 나타났다.

*Corresponding author: E-mail. jpngsug@korea.kr