

## 쪽懸濁培養에서 Indole이 세포 성장과 Indirubin 생성에 미치는 영향\*

鄭恩淑. 蔡永岩\*\*

### Effect of Indole on the Cell Growth and Synthesis of Indirubin in Suspension Culture of *Polygonum tinctorium* LOUR\*

Eun-Suk Chung and Young-Am Chae\*\*

**ABSTRACT** : This experiment was carried out to analyze the effect of indole on the synthesis of indirubin in suspension culture of *Polygonum tinctorium*. Adding indole and L-tryptophan into culture media was revealed that indirubin was synthesized in callus grown on solid medium containing indole and proper concentration of indole for indirubin production was decided as 200mg/l. Indirubin content in suspension culture was higher than in solid medium with considerable amount of indirubin seceded into media in suspension culture and highest quantity of indirubin was obtained when indole was added into medium after 20 days suspension culture.

**Key words** : 쪽, 현탁배양, 전구물질, Indole, Indirubin

쪽(*Polygonum tinctorium*)은 식물 전체에 indican(indoxyl-3- $\gamma$ -D-glucoside)을 갖고 있으며 이 물질이 가수분해되면 indoxyl과 glucose가 떨어지면서 2개의 indoxyl기가 자발적인 산화반응을 거쳐 indigo(청색)와 indirubin(분홍색)이 생성된다고 한다<sup>5,6</sup>. 이들 물질은 천연염료로 사용되며 또한 해독, 강장, 해열 작용이 있어 민간에서 약용으로도 이용되어 왔다<sup>5</sup>. 그리고 indirubin이 항암효과를 갖고 있다는 보고가 있어 더욱 주목된다<sup>6</sup>. 정과 채<sup>2)</sup>는 쪽 세포의 현탁배양에 관여하는 요인 중 배지와 배지의 조성인 탄소원과 질소원의 종류와 농도, 성장조절제 및 교반속도의 영향을 분석하여 세포 생장이 최대가 되는 배양조건을 밝힌 바 있다.

본 연구는 indirubin 천연 색소의 기내 대량 생산을 위하여 쪽 캘러스 현탁배양에서 indole 첨가량 색소 형성에 미치는 영향과 그 적정 처리 시기와 처리 기간 및 첨가량을 결정하고자 수행하였다.

### 재료 및 방법

조선쪽 잎을 재료로 하여 2,4-D 1mg/ℓ를 함유한 B5 고체배지 (2% sucrose)에서 4주 동안 배양하여 소와 채<sup>7)</sup>의 방법으로 캘러스를 유도했다. 접종 재료는 유도된 캘러스의 흰색을 띄는 부위를 2,4-D 2mg/ℓ를 포함한 B5 고체배지에 3주 간격으로 계대배양한 후 흰색 캘러스를 사용하였다.

\* 본 논문은 1991년도 한국과학재단 연구비에(91-0500-09-01-3) 의해 수행되었음.  
\*\* 서울대학교 농학과(Dept. of Agronomy, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea)

현탁배양시 켈러스 증식을 위한 접종량은 250ml Erlenmeyer flask일 때에는 B5 액체배지(pH 5.7, 2% sucrose, 2mg/ℓ 2,4-D) 50ml 당 켈러스 1~1.2g 씩 그리고 100ml Erlenmeyer flask에서는 25ml B5 액체 배지당 0.5~0.7g의 켈러스를 60mesh 체에 쳐서 접종하였다. 현탁배양 조건은 16/8시간(광/암) 주기로 1,400Lux, 26°C, 130rpm이었다. 세포 성장량은 배양된 현탁배지를 스포이드로 10ml를 취하여 10분간 원심분리한(2,000rpm) 후 눈금을 읽어 세포 성장량(ml)을 Packed Cell Volume으로 측정하였다. 고체배지에서 생육시킨 켈러스에 Indigo와 indirubin의 전구물질이라고 생각되는 indole과 L-tryptophan을 각각 농도별로 처리하였다. Indole 처리 농도는 50, 100, 150, 200 및 250 mg/ℓ로 하고 tryptophan은 10, 50, 100, 150 및 200mg/ℓ로 처리하여 배양 4주 후 생체중(g), 건물중(mg)과 indirubin 함량을 비교분석하였다. 생산배지는 B5(2,4-D 2mg/ℓ, yeast extract 1g/ℓ)를 사용하였으며 액체배지에서 색소 분석은 액체배지(B5: 2,4-D 2mg/ℓ, yeast extract 1g/ℓ)에 indole (200mg/ℓ)을 시기를 달리하여 처리하고 건물중과 indirubin 생산량을 비교분석하였다. 현탁액을 여과한 후 배지와 세포를 따로 분리하여 세포는 dry oven에서 건조시킨 후 건물중을 측정하였다. 색소는 Hart 등<sup>3)</sup>의 방법으로 분석하였다.

## 결과 및 고찰

Indigo와 indirubin의 전구체라고 추정되는 indole을 농도별로 달리 첨가하여 고체배지에서 한 달 동안 배양한 후 켈러스 생체중과 건물중, 그리고 indirubin의 상대적 농도값을 계산한 결과는 Table 1과 같다. Indole 첨가량이 많을 경우 배양 4주 후에 fresh wt나 건물중이 감소되어 생육이 저해받는 것으로 해석되었다. 이 결과는 B5 배지에 indole을 1mM로 처리하였을 때 internal loop bioreactor에서 배양 14일 후 건물량은 대조구에 비하여 50% 감소되었고 external loop bioreactor에서는 20%가 감소되었다고 한 것과 같은 경향이다<sup>4)</sup>. 고체배지에서 indole 농도가 증가함에 따라서

indirubin양이 증가하는 경향을 보였는데 indole 100, 150mg/ℓ에 비해 indole 200, 250mg/ℓ 에서 indirubin의 양이 두 배 이상 증가했으나 indole 200, 250mg/ℓ에서는 indirubin 함량이 큰 차이를 보이지 않았다. Indole 저농도보다 고농도에서 켈러스 생장이 억제되는 경향이 있으므로 indirubin 생산에 적합한 indole 첨가 농도를 200mg/ℓ로 정하였다. 따라서 이후의 액체배지 실험은 모두 indole 200mg/ℓ를 첨가하였다.

Table 1. The effect of indole as a indirubin precursor on cell growth and indirubin productivity after 4 weeks in *Polygonum tinctorium* callus culture. Modified B5 solid medium containing 2,4-D 2mg/ℓ and yeast extract 1g/ℓ were used.

Indole conc.(mg/ℓ)	Fresh Weight (g)	Dry Weight (mg)	Peak Area <sup>1)</sup> (/1μℓ)	Relative Conc <sup>2)</sup> (/mg/cell dr.wt)
50	2.075	74	0.337	3.0
100	1.500	61	0.601	6.0
150	1.718	73	0.671	5.4
200	1.558	68	1.501	13.2
250	1.560	72	1.761	14.4

<sup>1)</sup> : Peak Area of indirubin in HPLC <sup>2)</sup> : Peak Area × total sample volume(μℓ)

정<sup>1)</sup>은 배양 세포에 indole을 첨가하였을 때 indirubin이 생성되는 것을 Prep.TLC와 HPLC로 분리 동정하였다. 김<sup>4)</sup>은 배양 세포에 indole을 25mM로 첨가시 배양 30일까지 다른 농도(5-20mM)에서 보다 증가되었으나 배양 30일 후 indirubin 생성은 15mM에서 상대적으로 높았다고 하였다. 한편 25 M 농도로 많은 양을 첨가하는 indole이 결정으로 석출되는 문제점이 있다고 지적하였다. 고체배양에서 켈러스에 L-tryptophan 첨가했을 때 indigo나 indirubin 모두 생산되지 못하였으며 L-tryptophan 농도가 150mg/ℓ 까지 증가할수록 세포 성장율은 지속적으로 증가하였으나 이후는 감소되었다(Table 2). Internal loop bioreactor에서는 tryptophan을 1mM 첨가시 건물량이 1.3% 증가하였

으나 external loop bioreactor 에서는 13% 증가하였다고 하였다<sup>1)</sup>.

Table 2. The effect of L-tryptophan on cell growth after 4 weeks. B5 solid medium contained 2,4-D 2mg/ℓ and yeast extract 1 g/ℓ.

Tryptophan (mg/ℓ)	Fresh weight/inoculum weight (mg/mg)
10	18.3
50	23.2
100	25.8
150	25.4
200	22.2

B5 배지에 indole을 200mg/ℓ로 첨가한 현탁배양에서 indole 첨가 시기와 처리 기간별로 세포 성장량과 indirubin 색소 생성량을 조사한 결과는 표 3과 같다. Indole 처리 시기가 짧을수록 세포 건물중은 급격히 감소되었다. 배양 초기에 indole을 첨가하였을 경우 건물중은 4-9mg이었으나 배양 10일 후 처리시는 146-181mg, 배양 16일 후 처리시는 244mg 그리고 배양 20일 후 처리시는 285mg으로 처리 시기가 짧을수록 세포 성장량은 크게 저하되었다. 처리 기간에 따른 세포 성장량은 배양 초기에 처리하여 5일 후에 수확하였을 경우 건물중이 5mg이었고 15일 후에는 6mg 그리고 20일 후에는 9mg이었으나 배양 10일 후에 처리하고 5일 후에 수확했을 때 건물중은 6mg에 비하여 25배 정도가 증가된 146mg이었다. 그러나 세포 성장에 미치는 indole의 처리 기간은 처리 시기만큼 영향을 주는 것은 아니라고 생각되었다. Indirubin 생성량은 indole 처리 시기가 매우 중요한 것으로 나타났다. 배양 초기에 처리하여 15일 후 수확했을 때 indirubin은 peak area로 0.51이었으나 배양 10일 후 4일간 처리하였을 때는 17.64 그리고 배양 16일이나 20일 후는 35.58과 43.32로 나타나서 처리 시기가 늦을수록 색소 생성량이 급격히 증가되었음을 알 수 있었다.

Table 3. The effect of indole addition at different times on indirubin content in *Polygonum tinctorium* cell suspension culture.

B5 liquid medium contained 2,4-D 2mg/ℓ and yeast extract 1g/ℓ and the indole concentration added into B5 media was 200mg/ℓ.

Sample	Dry weight (mg)	PCV (%)	Peak area <sup>1)/μℓ</sup>	Relative conc. <sup>2)</sup> mg(cell dr.wt)
A-1	4	1.0	0.20	29.4
A-2	6	1.0	0.51	51.0
A-3	9	2.3	0.39	25.8
A-media			1.27	75.9
B-1	146	16.0	17.64	72.6
B-2	181	18.2	17.40	57.6
C	244	24.5	35.68	87.6
D	285	26.5	43.32	91.2
D-media			2.13	127.5

<sup>1)</sup>: Peak Area of indirubin in HPLC

<sup>2)</sup>: Peak Area × total sample volume(μℓ)

A: Add indole at beginning of culture

A-1: Harvest cells at 5 days after add of indole

A-2: " at 15 days "

A-3: " at 20 days "

B: Add indole at 10 days after culture

B-1: Harvest cells at 4 days after add of indole

B-2: " at 12 days "

C: Add indole at 16 days after culture and harvest cells 4 days after add of indole

D: Add indole at 20 days after culture and harvest cells at 6 days after add of indole

A- and D-media mean the secreted out of indirubin into media

세포 성장량과 마찬가지로 처리 기간은 처리 시기보다 큰 영향이 없는 것으로 생각되었다. 고체 배지에서보다 액체배지에서 indirubin양이 많았으며(Table 1, Table 3) 세포내에 있던 indirubin이 배지내로 유출되었다(Table 3). 세포내에 존재하는 indirubin양은 indole 첨가 시기가 늦어질수록 약간씩 증가했으며 세포배양 20일 후 indole을 첨가한 경우 배지(D-media)내로 나온 indirubin 양이 127.5로 켈러스 세포(D)내에 존재하는 indirubin

양인 91.2보다 많았다. 따라서 쪽 세포배양으로 indirubin 생산을 목적으로 할 때는 indole 첨가 시기는 배양 20일 후 200mg/ℓ로 처리하고 6일 동안 처리한 다음에 수확하는 것이 적합하다고 생각되었다.

## 적 요

본 실험은 쪽 세포의 현탁배양에서 indirubin 생산을 위한 indole의 처리 시기와 처리 기간 및 첨가량을 찾기 위하여 수행하였으며 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. Indole 첨가시 세포 성장량은 억제되었다.
2. Tryptophan 첨가시 세포 성장량의 증가는 크지 않았다.
3. Indole과 L-tryptophan을 고체배지에 첨가한 경우 indole을 첨가한 배지에서 만 indirubin이 검출되었다.
4. Indirubin 생산에 적절한 indole 첨가 농도는 고체배지에서 200mg/ℓ으로 나타났다.
5. 현탁배양 중 indole 첨가시기를 달리한 결과 배양 20일 후 indole을 첨가한 배지에서 세포와 배지내 indirubin 농도가 높았다.
6. 고체배양보다 현탁배양에서 세포내에 축적된 indirubin이 많았으며 배지 내 로 상당량의 indi-

ru-bin이 유출되었다.

## 인 용 문 헌

1. 정대순,1994. *Polygonum tinctorium*의 줄기와 잎 조직배양에서 indigoid 색소의 생합성. 서울대 석사학위 논문 1994.
2. 정은숙. 채영암,1994. 쪽 현탁배양에서 세포 성장에 관여하는 요인. 한육지 26(2) : 172-176.
3. Hart,S. K.R.Koch and D.R.Woods.1992. Identification of indigo-related pigments produced by E. coli containing a cloned Rhodococcus gene. J. of Gen. Microbiol. 138 : 211-216.
4. 김주환, 1994. 쪽의 현탁배양 중 엘리시테이션이 인디루빈 색소 생산에 미치는 영향. 서울대 석사학위 논문 1994.
5. 李春寧, 金友政. 1988. 天然香辛料와 食用色素. 郷文社
6. 천연물 과학 소식. 1993. 서울대학교 천연물 과학 연구소. 1(2) : 16.
7. 소은희. 채영암,1993. 쪽(*Persicaria tinctoria* Lour.)의 청색색소 생산을 위한 캘러스 유도과 배양. 한육지 25(2) : 133-138.
8. 육창수. 원색한국약용식물도감. 아카데미서적 3rd ed.