

## 생물반응기를 이용한 오미자의 현탁배양세포로부터 Gomisin J의 생산

황성진<sup>\*†</sup> · 표병식<sup>\*</sup> · 황 백<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup>동신대 식품생물공학과, <sup>\*\*</sup>전남대 생물학과

### Production of Gomisin J from Suspension Cultured Cells of *Schisandra chinensis* Baillon in Airlift-type Bioreactor

Sung Jin Hwang<sup>\*†</sup>, Byoung Sik Pyo<sup>\*</sup>, and Baik Hwang<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup>Dept. of Food & Biotechnology, Dongshin Univ., Naju 520-714, Korea.

<sup>\*\*</sup>Dept. of Biology, Chonnam Natl. Univ. Gwangju 530-757, Korea.

**ABSTRACT :** Suspension culture of *Schisandra chinensis* for production of gomisin J was performed in bioreactor. The inoculum size and initial sucrose concentration had significant effect on the cell growth and gomisin J accumulation. The maximum dry cell weight (DCW; 43.5 g/l) and gomisin J content ( $0.71 \times 10^{-3} \mu\text{g/g}$  DCW) were obtained at inoculum size of 100 g fresh cell weight (FCW) per liter and MB5 medium containing 6% sucrose after 8 weeks of culture. The effect of oxygen supply on the cell growth and gomisin J accumulation was also investigated in an airlift-type bioreactor. The optimal cell growth and gomisin J content was obtained under 0.5 vvm. The productivity of gomisin J was 0.7 fold in bioreactor culture lower than that obtained in a flask cultivation.

**Key words :** *Schisandra chinensis*, suspension cell cultures, gomisin J, airlift-type bioreactor

## 서 언

생물반응기를 이용하여 식물세포 유래 유용물질을 생산하는 방식은 기존의 노지재배를 통해 얻는 것보다 매력적임엔 틀림없다. 1959년 처음으로 식물세포의 대량배양이 이루어진 이래 scale-up 요령과 생물반응기 개발에 있어서 많은 진전이 있었다 (Dorenenburg & Knorr, 1995). 단지 미생물에 비해 배가시간 (25~110시간)이 매우 늦고 물질생산을 위한 성장기 후반까지의 시간이 많이 소요된다는 점과 장기간 배양에 따른 오염 가능성과 배양 과정에서 나타나는 세포들의 응집으로 인한 교반 (mixing)의 어려움, shear에 대한 민감성 그리고, 배양하는 동안 유전적인 안정성의 상실등이 문제점이 되고 있다. 이를 해결하기 위해서는 우량세포주의 선별이나 최적 배양조건 탐색, 그리고 효율적인 생물반응기 시스템의 개발과 운용기법등

의 확보가 무엇보다도 필요하다.

현탁배양에 사용되는 탈분화된 세포는 대부분 모식물체에 비해 유용물질의 생산성이 비교적 낮기 때문에 (Endress, 1994; Dornenburg & Knorr, 1995) 플라스크배양 단계에서부터 배지성분의 변화, 다양한 식물성장조절물질의 처리, pH의 변화, 온도조건의 변화, 교반속도, 산소분압, 그리고 광조건과 같은 물리화학적 조건들을 최적화 한 다음 scale-up을 시도하는게 바람직하다 (Zhong, 2000; Matsubara *et al.*, 1989; DiCosmo & Towers, 1984).

오미자 (*Schisandra chinensis*)는 한국, 일본, 사할린, 만주, 중국에 분포하며 민가와 한방에서는 오미자의 열매를 수렴제, 자양제, 강장제, 진해, 구갈 (口渴)이나 주독 (酒毒)을 푸는데 주로 이용하여 왔다. 오미자에서 확인된 주요 성분으로는 citrol, schizandrin, schizandrol, r-schizandrin, gomisin A-H, gomisin J, gomisin K,

† Corresponding author : (Phone) +82-61-330-3225 (E-mail) jimhwang@naver.com

Received October 7, 2004 / Accepted November 6, 2004

gomisin O, angeoylgomisin Q, pregomisin 등이 있으며, 이들의 약리효과로는 항산화작용, 간장해 억제작용, 항암작용, 항균작용, 그리고 중추신경계에 작용하는 것으로 알려지고 있다 (Hancke *et al.*, 1999). 특히, 오미자를 비롯한 많은 자원수종의 수피나 종자등에서 발견되어지는 리그난계 화합물은 항암작용을 비롯한 다양한 생리활성을 갖는 것으로 알려지고 있다 (Hancke *et al.*, 1999; Kvasnickova *et al.*, 2001; Sladkovsky *et al.*, 2001). 세포배양을 통하여 리그난 화합물을 생산하려는 연구는 *Ipomoea cairrica* (Paska *et al.*, 1999), *Linum album* (Smolny *et al.*, 1998; Seidel *et al.*, 2002; Empt *et al.*, 2000), *Callitris drummondii* (van Uden *et al.*, 1990c), *Podophyllum hexandrum* (van Uden *et al.*, 1989), 그리고 *Podophyllum peltatum* (Petersen & Alfermann, 2001) 등에서 이루어진 바 있다. 본 연구에서는 오미자로부터 고부가가치의 약리물질을 생산하기 위하여 플라스크 배양단계에서 최적 조건을 규명하였으며, 이와같은 기초 자료를 바탕으로 소규모 반응기를 이용하여 scale-up을 통한 리그난계 화합물질인 gomisin J의 대량생산 가능성을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 현탁배양

오미자의 현탁배양은 1 mg/l NAA가 첨가된 MB5 액체 배지 (5% sucrose, pH 5.8)가 들어있는 100 ml Erlenmyer flask에 0.5 g (FCW)을 접종한 후 120 rpm 속도로 진탕 배양기 (26±1°C) 내에서 수행하였으며, 2주 간격으로 1/3 가량을 새로운 배지로 교환해 주었다 (Hwang *et al.*, 2004).

### 2. 생물반응기 배양

4주 동안 현탁배양 후 무균작업대에서 30분간 정치시켜 세포를 가라앉힌 다음 무균적으로 수집한 시료를 50, 100, 그리고 150 g (FCW)/l 씩 액체배지가 들어있는 1.5 l 용량의 공기주입형 생물반응기 (MBRP-181J, Eyla, Japan)에 접종 하였다. 초기 탄소원의 농도에 의한 영향을 확인하기 위하여 기본배지에 sucrose를 3, 6, 9% 농도로 각각 첨가하였으며, 반응기내 산소 공급량은 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 vvm으로 각각 달리한 후 세포증식과 물질의 생산성을 비교하였다. 모든 실험에서 시료 접종 후 생물반응기는 광주기가 16:8로 조사되는 배양실 (26±1°C)에서 배양하였다.

### 3. 배지내 당농도 측정

배지내에 sucrose의 잔류 농도는 dinitrosalicylic acid

(DNS) 처리 방법을 사용하여 조사하였다. 시료 1 ml에 20 µl 2N HCl을 첨가한 후 100°C에서 30분간 가수분해 시켜 환원당으로 전환 시켰다. 여기에 2N NaOH를 20 µl 첨가하여 중화 시킨 후 DNS를 1 ml 처리하고, 100°C에서 10분간 발색시킨 다음 550 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선과 비교하여 sucrose 농도를 구하였다.

### 4. 세포 성장율의 측정

세포의 성장율은 8주 동안 배양된 현탁배양세포를 24시간 탈수 시킨 뒤 측정된 생중량 (FCW)과 냉동건조기에서 48 시간 건조한 후 측정된 건중량 (DCW)으로 나타내었다.

### 5. 물질분석

오미자의 현탁배양세포로부터 리그난 성분의 분석은 8주 배양된 세포를 수집하여 냉동건조 후 막자사발에서 마쇄한 다음 분말시료 0.5 g에 메탄올 70 ml을 가하여 수욕상에서 3회 가열하여 추출하였다. 3회 연속 같은 방법으로 얻은 메탄올 추출물을 3,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상정액을 HPLC (Shimazu, Tyokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다 (Hwang *et al.*, 2004). Gomisin J의 정량 분석을 위한 표준시료는 임업연구원에서 단리한 것을 사용하였다.

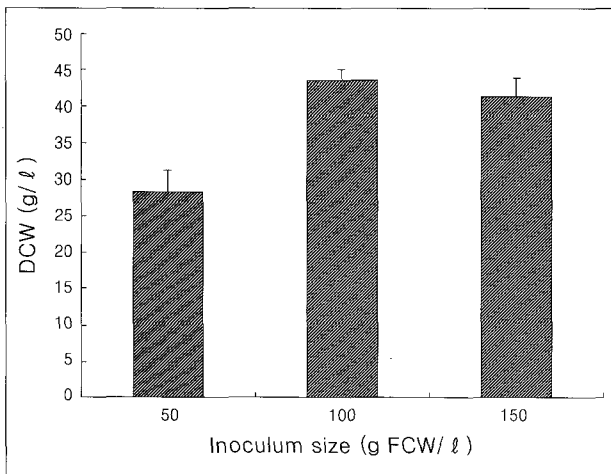
### 6. 통계처리

통계처리는 SAS (Statistical analysis system) package를 이용하여 ANOVA test를 시행한 후 유의수준 p<0.05 범위에서 결과들의 평균에 대한 표준편차로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

매년 전세계적으로 고등식물로부터 생리활성을 갖는 물질이 500여가지 이상 분리되고 있다. 이와같은 천연물질들 대부분은 화학합성이 불가능하기 때문에 세포내 생합성에 의존할 수밖에 없다. 따라서, 물질생산을 위한 생체시스템의 효율적인 가동을 위해서는 물리화학적인 최적조건을 확보해야 함은 물론 실용화 가능한 대량배양기술이 필요하다. 공기주입형 (airlift-type) 생물반응기는 여러 형태의 생물반응기들중 식물세포나 부정근과 같은 식물조직의 대량배양에 있어서 가장 적합한 형태라고 할 수 있다. 산소 공급이나 shear stress를 최소화 할 수 있는 교반 (mixing) 방식으로 진행되며 오염 위험성이 매우 낮고 단순한 구조로 인한 운용 경비의 최소화 등이 장점으로 간주되고 있다. 단지 배양기 내부에 세포의 사멸지대 (dead zone)가 만들어 질 수 있다는 것과 고밀도의 세포배양에는 적합지 않은 단점도 있다 (Panda *et al.*, 1989).

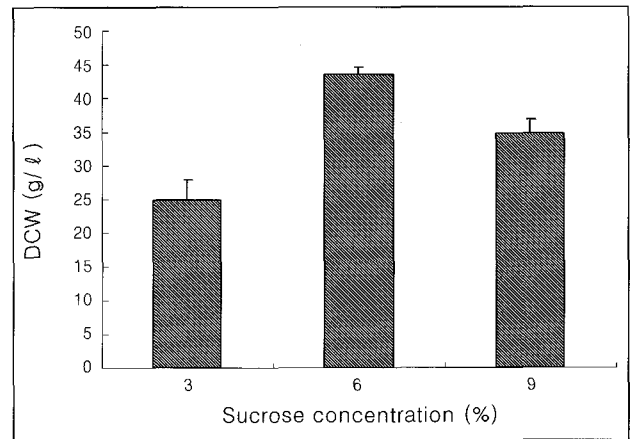
본 실험에 사용된 생물반응기는 작업용량에서는 1 l로 소규모이나 공기주입량의 조절이 가능하고 pH와 내부온도의 자동조절이 가능한 형태이다. 플라스크에서 배양된 오미자의 현탁배양세포를 30분 정도 정치시킨 후 가라앉은 세포를 무균적으로 수집하여 50, 100, 그리고 150 g (FCW)씩을 1 l 배지가 들어있는 생물반응기에 넣고 6주 동안 16시간 광이 조사되는 항온실에서 배양 하였다. 플라스크배양과 생물반응기 배양 모두에 있어서 초기접종 농도는 매우 중요하다. 배양세포의 배가시간과 물질의 생합성에 모두 영향을 주게됨은 물론 한계 농도 이하에서는 세포의 증식이 이루어지지 않을 수도 있기 때문이다 (Martin, 1980; Roken, 1987; Wang *et al.*, 1997; Akalezi *et al.*, 1999). Fig. 1은 식물생장조절물질이 첨가된 기본배지에서 초기 접종농도에 따른 세포중량의 차이를 나타낸 것으로 100 g과 150 g을 접종한 실험구에서는 큰 차이를 나타내지 않았으나, 50 g을 접종한 실험구에서는 세포의 증식이 매우 낮음을 알 수 있다. 한편, 플라스크배양에 비해 생물반응기배양에서는 초기 세포증식율은 낮았으나 최종 세포중량에 있어서는 큰 차이를 보여주지 않았다 (data not shown).



**Fig. 1.** Effects of inoculum size on dry biomass accumulation in airlift bioreactor cultures of *S. chinensis*.

배지에 첨가하는 탄소원은 타가영양적 성장 특성을 갖는 배양세포에 있어서 매우 중요한 에너지원으로 쓰이며, 세포의 삼투조절에 관여한다는 점에서 배지내 적정 농도의 탄소원의 공급이 필요하다 (Do & Cormier, 1990; Mukherjee *et al.*, 1991). 또한 유용물질의 대부분이 이차 대사물질인 점을 고려할 때 물질 생합성경로에 있어서 출발점이 된다는 점에서 중요한 의미를 갖는다 (Zhong, 2000). 오미자의 경우 생물반응기배양에서 세포의 성장

과 물질의 생산성에 있어서 초기 sucrose 농도를 비교적 고농도라 할 수 있는 6%로 하였을 때 8주 후 세포중량은 43.5 g DCW/l을 얻었고, Gomisin J의 함량은  $0.71 \times 10^{-3} \mu\text{g/g}$  (DCW)로 3% 농도로 처리한 실험구에 비해 각각 2.1배와 1.8배의 효율 증가를 보여주었다 (Fig. 2, 4). 생물반응기배양에서 세포의 성장이나 물질의 생산성을 최대로 할 수 있는 초기 탄소원의 농도는 배양세포에 따라 2% 수준의 저농도에서 10% 이상 고농도 처리까지 매우 다양하다. 이와 같이 큰 차이를 보여주는 이유는 세포의 유전적인 특성이나 생리적인 상태 등에 의한 영향으로 보인다. 물질의 생산성을 극대화시키기 위해서 배지내 탄소원의 농도를 7% 이상 높이는 경우도 있으나 (Misawa, 1985; Knobloch & Berlin, 1980; Berlin *et al.*, 1983; Martinez & Park, 1993) 5% 이상에서 오히려 물질의 생합성이 떨어지는 경우도 있다 (Sakamoto *et al.*, 1993).



**Fig. 2.** Effects of initial sucrose concentration on dry biomass in airlift bioreactor cultures of *S. chinensis*.

기본배지에 초기 탄소원의 농도를 6%로 맞춘 다음 오미자의 현탁배양세포를 8주 동안 배양하면서 2주 간격으로 배지내 sucrose의 잔류량을 측정해 보았을 때 sucrose의 소모량은 2주 후부터 급속히 증가하였다 (Fig. 3). Fig. 3과 Fig. 4에서 나타난 3% sucrose 처리구에서의 세포중량 감소와 물질 생산성의 저하현상은 장기간 배양에 따른 배지내 sucrose의 고갈과 관련성이 있을 것으로 생각되었다.

Fig. 5는 생물반응기로의 산소 공급량을 0.05, 0.1, 0.5, 그리고 1.0 vvm으로 달리하였을 때 세포의 증식과 gomisin J의 생산성을 조사한 것으로 0.5 vvm이 가장 적합하게 나타났다. 한편, 1 vvm 이상에서는 세포의 증식과 물질의 생산성 모두 저하되는 결과를 보여주었다. 식물세포의 현탁배양에서 산소의 공급은 세포의 성장과 물질의 생산에 영향을 미치게 된다 (Zhong *et al.*, 1993b; Lecki *et*

생물반응기를 이용한 오미자의 현탁배양세포로부터 Gomisin J의 생산

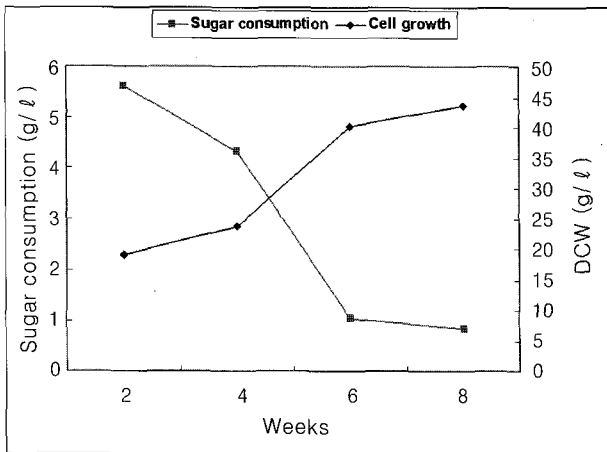


Fig. 3. Time course of dry biomass and sugar consumption in airlift bioreactor cultures of *S. chinensis*.

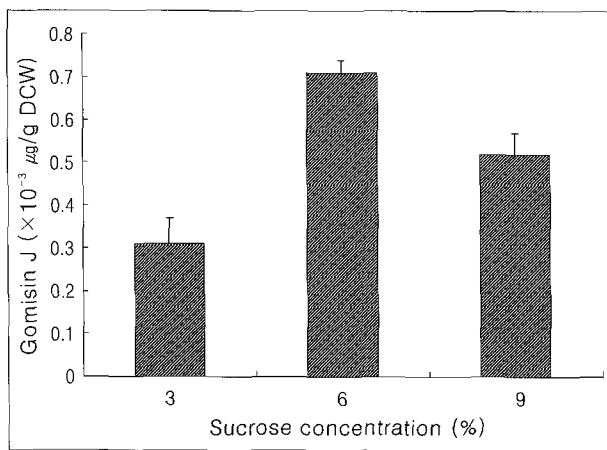


Fig. 4. Effects of initial sucrose concentration on gomisin J contents in airlift bioreactor cultures of *S. chinensis*.

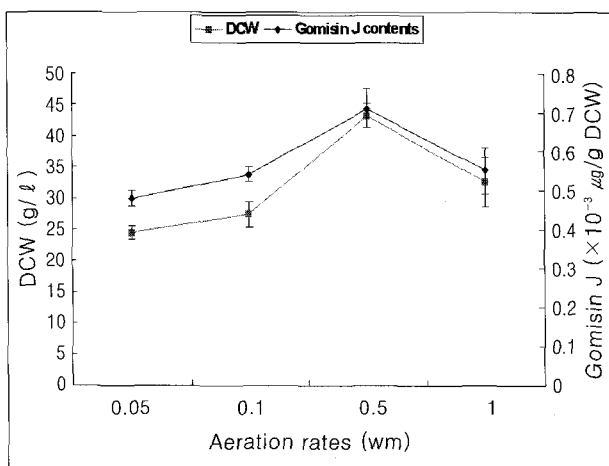


Fig. 5. Effects of aeration rates on dry biomass accumulation and gomisin J contents in airlift bioreactor cultures of *S. chinensis*.

al., 1991). Gao & Lee (1992)는 담배세포의 현탁배양에서 통기량이 증가할수록 세포의 성장이나 단백질 생합성이 증가하여 1 vvm에서 가장 좋은 결과를 얻은 바 있다. 미생물과 달리 식물세포는 배양과정에서 많은 양의 산소를 필요로 하지 않기 때문에 과다한 산소의 주입은 오히려 세포의 성장을 저해 할 수 있고, 과다한 공기 주입은 배지로부터 이산화탄소와 같은 개스물질의 요출을 가속화시킬 수도 있는 것으로 보고 있다 (Smart & Fowler, 1981).

## 적 요

공기주입형 생물반응기를 이용하여 오미자 현탁배양세포로부터 Gomisin J의 생산 가능성을 확인 하였다. 시료의 초기접종 농도와 탄소원의 농도에 따른 세포증식과 Gomisin J의 생산성은 6% sucrose가 첨가된 MB5배지에 100 g (FCW)의 현탁배양세포를 접종하였을 경우 세포증량 (dry biomass)과 Gomisin J의 함량은 각각 43.5 g DCW/과  $0.71 \times 10^{-3} \mu\text{g/g DCW}$ 을 얻을 수 있었다. 배양기내 산소의 공급량은 0.5로 공급해 주는게 바람직 할 것으로 사료되었다.

## 사 사

본 연구는 2001년도 농림기술개발 기획연구과제와 바이오그린21 사업 연구비의 지원에 의해 수행되었음.

## LITERATURE CITED

- Akalezi CO, Liu S, Li QS, Yu JT, Zhang JJ (1999) Combined effects of initial sucrose concentration and inoculum size on cell growth and ginseng saponin production by suspension cultures of *Panax ginseng*. *Process Biochemistry* 34:639-642.
- Berlin J, Forche E, Wray V, Hammer J, Hosel W (1983) Formation of benzophenanthridine alkaloids by suspension cultures of *Eschscholtzia californica*. *Z. Naturforsch* 38:346-352.
- DiCosmo F, Towers GHN (1984) Stress and secondary metabolism in cultured plant cells. In *Phytochemical adaptations to stress* (Timmermann BN, Steelink C, Loewus FA eds.) Plenum press, NY p. 97-175.
- Do CB, Cormier F (1990) Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions. *Plant Cell Rep.* 9:143-146.
- Dornenberg H, Knorr D (1995) Strategies for the improvement of secondary metabolites production in plant cell cultures. *Enzyme Microbe. Technol.* 17:674-684.
- Endress R (1994) *Plant cell biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg pp.121-242
- Gao J, Lee JM (1992) Effects of oxygen supply on the suspension culture of genetically modified tobacco cells. *Biotechnology*

- Progress 8:285-290.
- Hancke JL, Burgos RA, Ahumada F** (1999) *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *Fitoterapia* 70:451-471.
- Knobloch KH, Berlin J** (1980) Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* L. *Z. Naturforsch* 35C:551-556.
- Kvasnickova L, Glatz Z, Sterbova H, Kahle V, Slanina J, Musil P** (2001) Application of capillary electrochromatography using macroporous polyacrylamide columns for the analysis of lignans from seeds of *Schisandra chinensis*. *J. Chromatography A*. 916:265-271.
- Leckie F, Scragg AH, Cliffe KC** (1991) Effect of bioreactor design and agitator speed on the growth and alkaloid accumulation by cultures of *Catharanthus roseus* Enzyme and Microbial Technology 13:296-305.
- Martin SM** (1980) Mass culture systems for plant cell suspensions. In *Plant tissue culture as a source of biochemicals*. Staba EJ Eds. CRC press p. 149.
- Matsubara K, Shigekazu K, Yoshioka T, Morimoto T, Fujita Y, Yamada Y** (1989) High density culture of *Coptis japonica* cells increases berberine production. *J. Chem. Tech. Biotech.* 46:61-69.
- Misawa M** (1985) Production of useful plant metabolites. In *Fiechter A eds. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* Berlin, Springer-Verlag p. 59-88.
- Mukherjee SK, Sabapathi RB, Gupta N** (1991) Low sugar and osmotic requirements for shoot regeneration from leaf pieces of *Solanum melongena* L. *Plant Cell Tissue Org Cult* 25:13-16.
- Panda AK, Mishra S, Bisaria VS, Bhojwani SS** (1989) Plant cell reactors-a perspective. *Enzyme Microb. Technol.* 11:386-397.
- Paska C, Innocenti G, Kunvari M, Laszlo M, Szilagyi** (1999) Lignan production by *Ipomoea cairica* callus cultures. *Phytochemistry* 52:879-883.
- Petersen M, Alfermann AW** (2001) The production of cytotoxic lignans by plant cell cultures. *App. Microbiol. Biotechnol.* 55:135-142.
- Roken JS** (1987) Continuous culture of plant cells. In *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Constabel F and Vasil IK Eds. Vol. 4, Academic press, USA.
- Sakamoto K, Iida K, Sawamura K, Hajiro K, Asada Y, Yoshikawa T, Furuya T** (1993) Effects of nutrients on anthocyanin production in cultured cells of *Aralia cordata*. *Phytochemicals* 33:357-360.
- Seidel V, Windhovel J, Eaton G, Alfermann AW, Arroo RRJ, Medarde M, Petersen M, Woolley JG** (2002) Biosynthesis of podophyllotoxin in *Linum album* cell cultures. *Planta* 215: 1031-1039.
- Sladkovsky R, Solich P, Opletal I** (2001) Simultaneous determination of quercetin, kaempferol and (E)-cinamic acid in vegetative organs of *Schisandra chinensis* by HPLC. *J. Pharm. & Biochemical Analysis* 24:1049-1054.
- Smart NJ, Fowler MW** (1981) Effects of aeration on large-scale cultures of plant cells. *Biotechnol. Lett* 3:171-176.
- Smolny T, Wichers H, Kalenberg S, Shahsavari A, Petersen M, Alfermann AW** (1998) Accumulation of podophyllotoxin and related lignans in cell suspension cultures of *Linum album*. *Phytochemistry* 48:975-979.
- Su WW, Lei F** (1993) Rosmarinic acid production in perfused *Anchusa officinalis* cultures: Effects of inoculum size. *Biotechnol. Lett.* 15:1035-1038.
- van Uden W, Pras N, Visser JF, Malingre TM** (1989) Detection and identification of podophyllotoxin produced by cell cultures derived from *Podophyllum hexandrum* Royle. *Plant Cell Rep.* 8:165-168.
- van Uden W, Pras N, Malingre TM** (1990c) The accumulation of podophyllotoxin-beta-D-glucoside by cell suspension cultures derived from the conifer *Callitris drummondii*. *Plant Cell Rep.* 9:257-260.
- Wang HQ, Zhong JJ, Yu JT** (1997) Enhanced production of taxol in suspension cultures of *Taxus chinensis* by controlling inoculum size. *Biotechnol. Lett.* 19:353-355.
- Zhong JJ, Yoshida M, Fujiyama K, Seki T, Yoshida T** (1993b) Enhancement of anthocyanin production by *Perilla frutescens* cells in stirred bioreactor with internal light irradiation. *J. Fermentation Bioengineering* 75:299-303.
- Zhong JJ** (2000) Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 72:1-26.