



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0119014
(43) 공개일자 2010년11월09일

(51) Int. Cl.

C12N 5/04 (2006.01) *C12N 5/02* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0037910

(22) 출원일자 2009년04월30일

심사청구일자 2009년04월30일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자

김동일

인천광역시 남구 용현3동 인하대학교 2남119호

전수환

인천광역시 부평구 십정2동 동암신동아아파트 10
7동 2207호

권준영

인천광역시 남구 용현3동 인하대학교 2남135호 세
포배양공학연구소

(74) 대리인

김순웅

전체 청구항 수 : 총 14 항

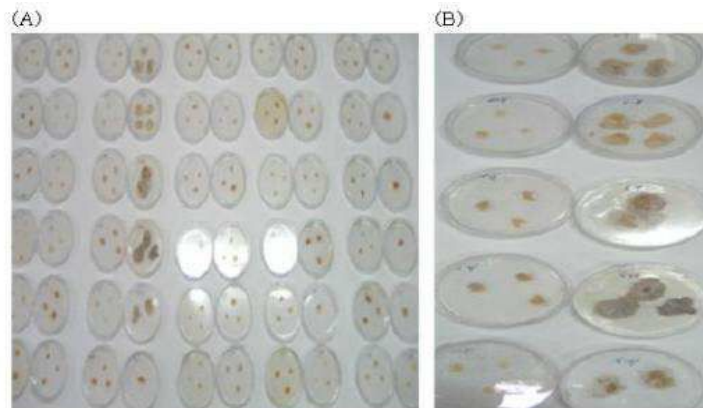
(54) 푸에라리아 미르피카 켈러스 배양 배지 및 이를 이용한 배양 방법

(57) 요약

본 발명은 켈러스로 유도된 푸에라리아 미르피카를 대량증식하고 효율적으로 현탁세포화 할 수 있는 배양배지 및 배양방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 기본배지에 옥신 또는 사이토키닌을 포함하는 식물생장조절물질, 단백질 가수분해물(protein hydrolysates), 또는 계면활성제를 포함하는 푸에라리아 미르피카의 켈러스 배양 배지 및 상기 배양배지를 사용하여 푸에라리아 미르피카의 켈러스를 배양하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 푸에라리아 미르피카의 켈러스 배양 배지를 사용하여 세포대량증식 및 세포증식속도를 증가시킬 수 있기 때문에, 대량배양된 켈러스나 현탁세포로부터 신속하고 저렴하게 식물성 에스트로겐을 포함한 푸에라리아 미르피카의 유용성분을 대량으로 생산하여 산업화 할 수 있다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

하기 (a)에서 선택된 기본배지에 하기 (b)의 옥신 또는 (c)의 사이토키닌에서 선택된 하나 이상의 식물생장조절 물질을 포함하는 푸에라리아 미르피카의 캘러스 배양 배지.

(a) MS, SH, AA, N6, B5 또는 White 배지

(b) 2,4-D, IAA, IBA 또는 NAA

(c) BA 또는 kinetin

청구항 2

제1항에 있어서, 상기(a)의 기본배지는 MS배지인 것을 특징으로 하는 푸에라리아 미르피카의 캘러스 배양 배지.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 (b)의 옥신 또는 (c)의 사이토키닌에서 선택된 식물생장조절물질은 IAA 및 kinetin인 것을 특징으로 하는 푸에라리아 미르피카의 캘러스 배양 배지.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 IAA 및 kinetin은 0.0002 ~ 20 mg/L 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 푸에라리아 미르피카의 캘러스 배양 배지.

청구항 5

제3항에 있어서, 카세인 가수분해물(casein enzymatic hydrolysate) 또는 동식물 및 미생물 유래 단백질 가수분해물(protein hydrolysates)를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 푸에라리아 미르피카의 캘러스 배양 배지.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 카세인 가수분해물(casein enzymatic hydrolysate)는 0.1 내지 30 g/L의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 푸에라리아 미르피카의 캘러스 배양 배지.

청구항 7

제5항에 있어서, Pluronic F-127, Pluronic F-68, PEG 1,000, PEG 8,000 또는 PEG 20,000로부터 선택된 하나 이상의 계면활성제를 0.1 ~ 10 g/L의 농도로 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 푸에라리아 미르피카의 캘러스 배양 배지.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 선택된 계면활성제는 Pluronic F-68 또는 PEG 8,000 인 것을 특징으로 하는 푸에라리아 미르피카의 캘러스 배양 배지.

청구항 9

하기의 단계를 포함하는 푸에라리아 미르피카의 캘러스 배양 방법에 있어서, (b)단계의 캘러스 배양 배지는 제3항에 따른 배지인 것을 특징으로 하는 배양 방법.

(a) 푸에라리아 미르피카로부터 캘러스를 유도하는 단계; 및

(b) 상기 캘러스를 캘러스 배양 배지에서 배양하는 단계

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 (b)단계의 배양된 캘러스를 현탁세포화하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 배양 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 현탁세포화는 초음파 및 셀룰라아제, 펙티나아제 또는 마세로자임(macerozyme)으로 이루어지는 효소 군에서 선택된 1이상의 효소들을 병행처리하는 것을 특징으로 하는 배양 방법.

청구항 12

하기의 단계를 포함하는 푸에라리아 미르피카의 캘러스 배양 방법에 있어서, (b)단계의 캘러스 배양 배지는 제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 배지인 것을 특징으로 하는 배양 방법.

(a) 푸에라리아 미르피카로부터 캘러스를 유도하는 단계; 및

(b) 상기 캘러스를 캘러스 배양 배지에서 배양하는 단계

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 (b)단계의 배양된 캘러스를 현탁세포화하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 배양 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 현탁세포화는 초음파 및 셀룰라아제, 펙티나아제 또는 마세로자임(macerozyme)으로 이루어지는 효소 군에서 선택된 1이상의 효소들을 병행처리하는 것을 특징으로 하는 배양 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 기본배지에 옥신 및/또는 사이토키닌을 포함하는 식물생장조절물질, 단백질 가수분해물(protein hydrolysates), 또는 계면활성제를 포함하는 푸에라리아 미르피카의 캘러스 배양 배지 및 상기 배양배지를 사용하여 푸에라리아 미르피카의 캘러스를 배양하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 식물은 오랫동안 인류에게 중요한 물질들의 공급원이 되어왔다. 이들 물질들은 대부분이 2차대사산물로서 의약품, 화장품, 식물, 향신료, 색소 및 살충제 등으로 사용되고 있다. 식물세포 배양기술은 이러한 유용물질들을 식물체로부터 직접적으로 추출하여 생산하는 것보다 경제성이나 균일한 품질의 유지 등에 있어 많은 장점을 지니고 있어, 식물유래 의약품, 화장품이나 기타 phytochemicals들의 생산에 이용되고 있다.

[0003] 이러한 식물 유래의 대표적인 유용물질로 ‘파이토 에스트로젠(Phyto estrogen)’ 이라고도 불리우는 식물성 에스트로젠을 들 수 있다. 식물성 에스트로젠으로 대표적인 것이 콩을 포함하는 대두, 칩이나 알파파 등의 콩과 식물에 많이 들어 있는 것으로 알려진 이소플라본(isoflavone)이며, 식물계에는 약 1000종 이상의 다양한 이소플라본이 존재하는 것으로 알려져 있고, 최근 이소플라본이 암, 폐경기 증후군, 심혈관계질환과 골다공증을 포함하는 호르몬 의존성 질병에 대하여 잠재적인 대체요법을 제공할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 식물성 에스트로젠은 화학 구조가 여성 호르몬 에스트로겐과 비슷해 체내에서 에스트로겐과 유사한 작용을 나타낸다. 여성들은 노화에 대해 민감하여 45~50세가 되면, 여성 호르몬 분비의 감소와 함께 생리가 멈추고 심리적으로 많은 변화를 갖는다. 이러한 갱년기 여성에게 식물성 에스트로젠을 처리하면, 폐경 후 여성의 정신적 기민함과 기분을 향상시키며, 골다공증예방 등 여성의 아름다움을 유지할 수 있다.

[0004] 푸에라리아 미르피카(pueraria mirifica)는 콩과식물로서 회춘의 약으로 알려져 한약으로 쓰이고 있다. 이 식물은 태국의 북부 산간지방에서 자생하며, 이소플라본을 포함한 식물성 에스트로겐등의 여러 유용물질들을 생산하는 식물이다. 이 식물은 미로에스테롤 (miroesterol), 다이드진 (daidzin), 다이드제인 (daidzein), 제니스틴 (genistin), 제니스테인 (genistein), 베타-시토스테롤 (berta-sitosterol), 스티그마스테롤 (stigmasterol), 쿠메스트롤 (coumestrol), 푸에라린 (puerarin), 캄페스테롤 (campesterol), 미리피쿠메스탄 (mirificoumestan), 콕후린 (kwakhurin), 미리피신 (mirificin), 장쇄 알코올, 5-디옥시이소플라본 등의 25가

지 이상의 화합물로 구성되어 있다.

표 1

푸에라리아 미르피카 유용성분

크로멘	이소플라본스	이소플라본 글리코사이드	쿠메스탄	테로카판
미로에스트롤 디옥시미로에스트롤 이소미로에스트롤	다이드자인 게니스타인 카와후린 수산화카와후린	다이드자인 게니스틴 미리피신 퓨라린 퓨라린-6'-mono 모노아세트산	쿠메스트롤 미리피쿠메스탄 미리피쿠메스탄글리콜 수산화미리피쿠메스탄	튜베로신 퓨미리카핀

[0006] 푸에라리아 미르피카는 다른 콩과식물에 비해 상대적으로 많은 양의 피토에스트로젠을 함유하고 있으며, 일반적으로 콩과식물의 피토에스트로젠 함량은 약 1/20,000~1/50 I.U. (*1 I.U.= 0.1 mg of estradiol)의 범위가 대부분인데 반하여, 푸에라리아 미르피카의 피토에스트로젠 함량은 약 0.5 I.U.로서 다른 콩과식물에 비해 40~100배의 에스트라디올 함량을 지니고 있다. 또한 푸에라리아 미르피카 뿌리 추출물을 포함하여 근경, 줄기, 잎에서 추출한 유용성분들은 항암효과, 피부탄력 및 윤택 증강에 도움을 주는 것으로 알려져 있고, 따라서, 푸에라리아 미르피카로부터 피토에스트로젠등의 유용물질 생산을 위한 연구들이 이루어졌으며, 일례로 한국공개특허 제2001-0025178호에서는 이소플라본 류를 고농도로 함유하는 푸에라리아 미르피카 유래의 추출물 및 그 추출방법, 상기 추출물을 유효성분으로 함유하는 식품, 음료, 약 및/또는 화장품 및 그 제조방법을 개시하고 있다.

[0007] 그러나, 식물에서의 유용성분 분리에 있어서, 식물재배로 추출할 수 있는 생산량이 매우 적고, 대부분의 식물유래 유용물질들은 여러 단계의 생합성경로를 거쳐 복잡한 구조로 생성되기 때문에 직접 추출이나, 화학적인 합성방법을 이용하기 힘들어 식물 세포배양 기술을 통한 유용 이차대사산물의 대량생산이 계속 시도되어 왔다.

[0008] 식물세포배양기술이 내재하고 있는 수많은 장점에도 불구하고 이 기술을 이용한 산업화가 활성화되지 못한 원인은 주로 낮은 생산성과 불안정성에 기인한다고 할 수 있다. 식물의 조직으로부터 탈분화된 캘러스 조직을 유도하는 것은 비교적 용이한 일이나, 이러한 캘러스 조직 자체를 산업적으로 활용하는 것은 어려우며 캘러스 배양에서 세포의 대량증식과 대량증식되어 세포응집성이 강한 캘러스를 효율적으로 현탁세포화 시킬 수 있는 방법의 개발은 현재까지 이루어지고 있지 않은 실정이다

[0009] 또한, 푸에라리아 미르피카는 생장이 느리고, 수가 제한되어 있으며, 분포지역도 한정되어 있는 등 식물세포배양 기술에 의한 생산이 우선 고려될 수 있는 특징을 지니고 있다. 따라서, 푸에라리아 미르피카에서 유용물질을 직접 추출하는 것보다 식물세포배양기술을 이용하여, 기후조건, 지리적, 정책적 조건과 무관하게 균일한 품질이 유지되는 유용성분을 신속하고 경제적으로 생산할 수 있는 시스템의 확립이 필요로 되었다.

[0010] 이에 본 발명자들은 푸에라리아 미르피카에서 유용물질의 대량확보를 위하여 푸에라리아 미르피카의 대량증식방법을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 캘러스 배양에서 식물체에 비해 빠르고 경제적으로 푸에라리아 미르피카를 대량 증식할 수 있는 최적화 배지를 발견하였으며, 이를 바탕으로 푸에라리아 미르피카의 생산성을 증가시킬 수 있는 배양 방법을 확립함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0011] 따라서 본 발명의 목적은 캘러스로 유도된 푸에라리아 미르피카를 대량증식하고 효율적으로 현탁세포화 할 수 있는 배양배지를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기배양배지를 사용하여 푸에라리아 미르피카의 캘러스를 대량으로 배양하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 캘러스로 유도된 푸에라리아 미르피카의 배양배지를 제공한다.

- [0014] 상기 푸에라리아 미르피카의 배양배지는 하기 (a)에서 선택된 기본배지에 하기 (b)의 옥신 또는 (c)의 사이토키닌에서 선택된 하나 이상의 식물생장조절물질을 포함한다.
- [0015] (a) MS, SH, AA, N6, B5 또는 White 배지
- [0016] (b) 2,4-D, IAA, IBA 또는 NAA
- [0017] (c) BA 또는 kinetin
- [0018] 푸에라리아 미르피카의 배양배지는 바람직하게는 기본배지로서 MS배지, 식물생장조절물질로서 IAA 또는 kinetin을 포함하며, 보다 바람직하게는 IAA 및 kinetin을 각각 0.0002 ~ 20 mg/L, 바람직하게는 IAA 2.0 mg/L, Kinetin 0.0002~2 mg/L 가장 바람직하게는 IAA 2.0 mg/L, Kinetin 0.02 mg/L 농도로 포함한다.
- [0019] 본 명세서에서 “식물생장조절물질”은 영양물질이 아닌 유기화합물로서 적은 양으로 식물생리과정을 억제, 촉진 또는 조절하는 물질을 의미한다. 생장조절물질은 크게 옥신(auxin), 사이토키닌(cytokinin), 지브렐린(giberellin), 에틸렌(ethylene), 낙엽산(abscisic acid) 등 크게 5 종류로 분류할 수 있다. 옥신은 주로 뿌리형성에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 대표적으로 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), NAA (-naphthaleneacetic acid), IAA (indolacetic acid) 등이 있다. 2,4-D의 경우, 일반적으로 옥신 중 세포생장에 크게 영향을 미친다. 사이토키닌은 옥신과 함께 식물세포배양에서 필수적인 생장조절제인데, 대표적으로 kinetin (6-furfurylamino purine) 6-BAP (6-benzylamino purine), zeatin, 2-ip 등이 있다. 그 중 kinetin은 1955년 Skoog와 strong이 고압멸균한 정어리의 정자 DNA에서 분리한 물질로서 담배 캘러스 조직 배양시 유사분열과 세포분열을 촉진하는데 매우 효과적인 것으로 알려져 있다. 지브렐린의 식물성장효과와 관련하여 일본공개특허 제1988-245668호 등에 잘 개시되어 있다.
- [0020] 본 발명의 푸에라리아 미르피카의 배양배지는 동식물 및 미생물 유래 단백질 가수분해물(protein hydrolysates)을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 카세인 가수분해물(casein enzymatic hydrolysate)를 추가로 포함할 수 있다. 본 명세서에서 “카세인 가수분해물(casein enzymatic hydrolysate)”은 단백질인 카세인의 부분 가수분해물로서, 아미노산 혼합물이 주성분인 것을 의미하여, 단백질 분해효소로 가수분해하여 얻을 수 있는 동식물 및 미생물 유래 단백질 가수분해물을 통하여 수득되거나, 상업적으로 구매할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서 카세인 가수분해물(casein enzymatic hydrolysate)은 바람직하게는 0.1 내지 30 g/L의 농도로 포함된다.
- [0021] 또한, 본 발명의 푸에라리아 미르피카의 배양배지는 계면활성제를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 계면활성제는 바람직하게는 Pluronic F-68, PEG, PVA, PPG, 보다 바람직하게는 Pluronic F-68, PEG 1,000 또는 PEG 8,000이며, 0.1~10g/L농도로 포함될 수 있다. 본 명세서에서 “계면활성제”는 다양한 세포배양에서 생장촉진제, 전단응력보호제 등으로 사용되어 온 것으로 Pluronic F-68, PEG, PVA, PPG 등이 포함될 수 있다. 계면활성제는 크게 세포의 표면성질이나 배지내 물리적 특성을 변화시킬 수 있는 특성 때문에 세포배양에서 사용되며, 배지의 표면장력, 대사물질의 전달 증대에 기인한 세포생장을 촉진한다고 보고되었다. 특히, Pluronic F68은 비온계 계면활성제로서 생물체 유래의 유용한 물질을 상업적으로 생산하기 위해 동물세포와 곤충세포배양 등에서 많이 이용되고 있다. Pluronic F-68은 배지내의 물리·화학적 변화를 야기하며, 세포에 첫째, 세포내로 물질전달(nutrient uptake) 증대를 통한 세포생장 촉진, 둘째, 세포표면을 둘러싸아 전단력(shear)로부터 세포 보호, 셋째, 동결보존시, 해동 후 회복배지에서 세포의 regrowth 향상, 넷째, 세포표면의 막 관통 pore 형성을 통한 투과성 증진, 다섯째, 물질전달계수 증대 등의 영향을 미칠 수 있다.
- [0022] 또한 본 발명은 최적화된 푸에라리아 미르피카 캘러스 배양배지를 사용하여 푸에라리아 미르피카의 캘러스를 대량으로 배양하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0023] 본 발명의 푸에라리아 미르피카의 캘러스 배양 방법은 하기의 단계를 포함할 수 있다.
- [0024] (a) 푸에라리아 미르피카로부터 캘러스를 유도하는 단계; 및
- [0025] (b) 상기 캘러스를 캘러스 배양 배지에서 배양하는 단계
- [0026] 상기 배양방법에서 (b)단계의 캘러스 배양 배지는 바람직하게는 기본배지로서 MS배지, 식물생장조절물질로서 IAA 또는 kinetin을 포함하며, 보다 바람직하게는 IAA 및 kinetin을 각각 0.0002 ~ 20 mg/L, 바람직하게는 IAA 2.0 mg/L, Kinetin 0.0002~2 mg/L 가장 바람직하게는 IAA 2.0 mg/L, Kinetin 0.02 mg/L 농도로 포함한다. 또한, 상기 배양배지에 추가적으로 카세인 가수분해물(casein enzymatic hydrolysate)을 바람직하게는 0.1 내지 30 g/L의 농도로 포함할 수 있으며, Pluronic F-68, PEG, PVA, PPG에서 선택되는 계면활성제를 추가로 포함할

수 있으며, 상기 계면활성제는 바람직하게는 Pluronic F-68이며, 0.1~10g/L농도로 포함될 수 있다.

[0027] 또한 본 발명은 푸에라리아 미르피카 캘러스 배양배지를 사용하여 푸에라리아 미르피카의 캘러스를 대량으로 배양한 후 대량증식된 캘러스를 현탁세포화 하는 단계를 추가 할 수 있다. 대량증식된 캘러스는 세포응집성이 강하기 때문에, 물리적 방법인 초음파처리와 효소적 방법인 셀룰라아제, 펙티나아제(pectolyase) 또는 마세로자임(macerozyme) 로 이루어지는 효소 군에서 1이상의 효소를 선택하여 병행 처리할 경우, 효율적으로 현탁세포화할 수 있음을 확인하였다.

[0028] 본 발명의 푸에라리아 미르피카 캘러스 배양배지의 성분은 상기에 개시된 성분 외에도 식물의 생장에 직·간접적으로 영향을 주는 물질들을 포함할 수 있음은 당업자에게 자명한 사실이며, 일례로 고농도 세포 배양 및 이차 대사산물의 최종 용적생산성을 증가시키기 위해서 배지 내 고농도 탄소원을 첨가할 수 있다. 고농도 탄소원은 고삼투 처리 효과를 얻을 수 있게 하며, 배양 세포가 이용 가능한 탄소 원을 제공할 수 있고, 자당, 유당, 과당, 포도당을 포함하며 본 발명의 기술분야에 종사하는 자들에게 널리 공지된 탄소원이 적절하게 사용될 수 있다.

[0029] 또한, 상기에서 개시된 푸에라리아 미르피카 캘러스 배양배지 성분 외에 식물 세포 현탁 배양에 있어서 이차대사산물의 생산성을 증가시키기 위하여 β -cyclodextrin, chitosan 등 biotic 및 abiotic을 포함하여 공지된 유도제(elicitor)를 다양한 농도로, 1종 이상의 유도제를 함께 사용할 수 있음은 당업자에게 자명하며, 본 발명의 범주에 포함된다.

효 과

[0030] 본 발명의 푸에라리아 미르피카의 캘러스 배양 배지를 사용하여 세포대량증식 및 세포증식속도를 증가시킬 수 있기 때문에, 대량배양된 캘러스나 현탁세포로부터 신속하고 저렴하게 식물성 에스트로겐을 포함한 푸에라리아 미르피카의 유용성분을 대량으로 생산하여 산업화할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0031] 본 발명은 캘러스로 유도된 푸에라리아 미르피카를 대량증식하고 효율적으로 현탁세포화 할 수 있는 배양배지를 제공한다.

[0032] 본 발명의 일 실시예에서, 푸에라리아 미르피카의 캘러스배양용 기본배지를 선정하기 위해 MS, SH, AA, N6, B5, White 배지 등을 대상으로 실험하였으며, 여기에 탄소원으로 30 g/L sucrose, 생장조절제로는 0.2 mg/L 2,4-D와 0.2 mg/L kinetin, pH 5.8을 사용하여 기본배지 선별실험을 실시하였다. 실험결과, MS배지, SH배지, N6배지 순으로 높은 세포 성장률을 보였다.(도 1)

[0033] 상기에서 가장 높은 세포 성장률을 보인 MS 기본 배지에 식물생장조절물질로서 옥신과 사이토키닌을 사용하였다. 옥신(auxin)의 종류로는 2,4-D, IAA, IBA, NAA를 0.0002~2 mg/L 농도로 처리하였고, 사이토키닌(cytokinin)은 BA, kinetin을 0.0002~2 mg/L 농도로 사용하였다. 실험결과, IAA 및 kinetin을 함께 처리한 경우, 타 실험군에 비하여 현저하게 높은 세포 성장률을 보였으며(도 2A), 이를 확대하여 도 2B에 나타내었다.

[0034] IAA 및 kinetin을 포함하는 MS 기본 배지에 카세인 가수분해물을 농도별로 첨가하여 세포성장률을 알아볼 결과, 실험된 모든 농도군에서 높은 세포 성장률을 확인함으로써 0.1 ~ 30 g/L농도의 카세인 가수분해물 처리시 캘러스의 효율적 대량배양이 가능함을 알 수 있었다. (도 3)

[0035] IAA, kinetin 및 카세인 가수분해물을 포함하는 MS 기본 배지에 Pluronic F-127, Pluronic F-68, PEG 1,000, PEG 8,000 및 PEG 20,000을 3g/L 로 처리한 결과, 모든 실험군에서 대조군에 비하여 증가된 세포 성장률을 확인할 수 있었으며, Pluronic F-68에서 그 증가율이 가장 큰 것으로 확인되었다.(도 4)

[0036] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0037] <실시예 1> 캘러스배양용 기본배지 선별

[0038] 푸에라리아 미르피카의 캘러스배양용 기본배지를 선정하기 위해 표 2의 MS, SH, AA, N6, B5, White 배지(SIGMA사) 등을 대상으로 실험하였으며, 여기에 탄소원으로 30 g/L sucrose, 생장조절제로는 0.2 mg/L 2,4-D와 0.2 mg/L kinetin, pH 5.8(SIGMA사)을 사용하였고, 각 배지마다, 제조사에서 제공하는 salt mixture를 사용하여 기본배지 선별실험을 실시하였다.

표 2

[0039] 기본배지

배지명	특징
MS	Murashige 와 Skoog (1962) 담배조직배양을 위해 개발, 다른 배지에 비해 NO ₃ -N, NH ₄ -N 및 K의 함량이 매우 높음
SH	Schenk 와 Hildebrandt(1972) 단자엽과 쌍자엽식물을 위해 개발, 양쪽에서 캘러스를 유도하고 배양기 위해 개발
AA	아미노산 첨가된 배지
N6	벼 캘러스증식배지
B5	Gamborg(1968) 콩의 세포현탁배양에서 개발, 식물세포배양에 많이 이용(무기영양소가 MS배지보다 낮다) 질소 25-60mM에서 효과적임
White	White(1963). 전에는 널리 사용되었으나 현재는 특수한 경우(배, 배주, 생장점 배양 등)에 사용되고 있다

[0040] 보다 상세하게는, 3차 증류수 900 mL에 상기 배지들 및 salts 와 비타민들을 제조사(SIGMA사)의 지시대로 정해진 용량을 첨가하였으며, 30 g sucrose, 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid 0.2 mg/L를 첨가한 후, 3차 증류수를 첨가하여 1 L 가 되도록 맞춘 후, 1N NaOH를 가하여 pH를 5.8로 맞추었다. 이를 1 L 삼각 flask 2개에 500 mL씩 분주한 후, 각각의 flask에 Gelrite (SIGMA사) 1.25g 씩 첨가하여 잘 흔들어준 후, autoclave (121℃, 15 분)를 수행하였다. Autoclave가 끝난 후, 50~60℃까지 식으면 clean bench에서 petri dish에 적당량 (배지 500 mL 당 dish 20개 정도)을 분주하고 뚜껑을 열어놓은 채로 30분간 건조시키도록 한다. 각 배지의 경우, autoclave 후, 필요한 경우에는 hygromycin B 항생제 stock을 첨가한 후 배지를 분주한다. 배지가 굳은 후, petri dish 뚜껑을 닫고 랩으로 단단히 싸서 냉장보관하였다.

[0041] 초기 캘러스세포는 0.2~0.6 g, 직경 0.5~1 cm, 높이 2~4 mm크기의 캘러스를 gelrite 농도 2.5 g/L, pH 5.5에서 5.8, 온도 25~8℃에서 접종한다.

[0042] 푸에라리아 미르피카 캘러스는 상기에서 준비한 각 배지에 dish마다 적당량을 계대한 후, Autoclave 또는 화염 멸균한 핀셋 및 스파출라를 이용하여 캘러스를 배지로 옮겨준다. 28℃에서 암조건으로 3 주 또는 4주 정도 배양하여 생장물을 살펴보았다.

[0043] 각 기본 배지에 따른 캘러스 생장물을 표 3에 나타내었으며, 실험결과 각 기본 배지에 따른 캘러스 생장물이 최대 4.5 배이상 차이가 나타남을 확인하였으며, MS배지, SH배지, N6배지 순으로 높은 세포 성장물을 보였다, 따라서, MS배지가 푸에라리아 미르피카의 캘러스배양용 기본배지로 가장 적합함을 확인하였다.(도 1)

표 3

[0044] 기본배지에 따른 캘러스 성장정도

구분	캘러스 생장(g)
MS	3.7
SH	2.8
AA	1.1
N6	2.4
B5	0.8
White	1.9

[0045] <실시예 2> 식물생장조절물질의 선별

[0046] 실시예 1에서 기본배지로 선정된 MS 배지에 식물생장조절물질로서 옥신과 사이토키닌의 효과를 실험하였다. 옥신(auxin)의 종류로는 2,4-D, IAA, IBA, NAA(SIGMA사)를 0.0002-2 mg/L 농도로 처리하였고, 사이토키닌(cytokinin)은 BA, kinetin(SIGMA사)을 0.0002-2 mg/L 농도로 사용하였다.

표 4

[0047] 식물생장조절물질 조합(auxin, cytokinin) (단위: mg/L)

2,4-D		IAA		IBA		NAA		Picloram	
BA	kinetin	BA	kinetin	BA	kinetin	BA	kinetin	BA	kinetin
(2, 2)	(2, 2)	(2, 2)	(2, 2)	(2, 2)	(2, 2)	(2, 2)	(2, 2)	(2, 2)	(2, 2)
(2, 1)	(2, 1)	(2, 1)	(2, 1)	(2, 1)	(2, 1)	(2, 1)	(2, 1)	(2, 1)	(2, 1)
(2, 0.2)	(2, 0.2)	(2, 0.2)	(2, 0.2)	(2, 0.2)	(2, 0.2)	(2, 0.2)	(2, 0.2)	(2, 0.2)	(2, 0.2)
(2, 0.02)	(2, 0.02)	(2, 0.02)	(2, 0.02)	(2, 0.02)	(2, 0.02)	(2, 0.02)	(2, 0.02)	(2, 0.02)	(2, 0.02)
(2, 0.002)	(2, 0.002)	(2, 0.002)	(2, 0.002)	(2, 0.002)	(2, 0.002)	(2, 0.002)	(2, 0.002)	(2, 0.002)	(2, 0.002)
(2, 0.0002)	(2, 0.0002)	(2, 0.0002)	(2, 0.0002)	(2, 0.0002)	(2, 0.0002)	(2, 0.0002)	(2, 0.0002)	(2, 0.0002)	(2, 0.0002)

[0048] 실험결과, IAA 및 kinetin을 함께 처리한 경우, 타 실험군에 비하여 현저하게 높은 세포 성장률을 보였으며(도 2a), 이를 확대하여 도 2b에 나타내었다. 가장 높은 성장률을 보인 IAA 및 kinetin처리 시, 각 성분의 농도에 따른 캘러스 성장정도는 표 5에 나타난 바와 같으며, IAA 2.0 mg/L, Kinetin 0.02 mg/L 농도의 경우 캘러스 성장률이 타 실험군에 비하여 현저히 높음을 확인할 수 있다.

표 5

[0049] IAA:Kinetin의 조합에 따른 캘러스 성장 정도 (단위: mg/L)

IAA:Kinetin (mg/L)	캘러스 성장 (g)
2:2	2.1
2:1	4.3
2:0.2	9.6
2:0.02	11.7
2:0.002	3.5
2:0.0002	1.5

[0050] <실시예 3> 카세인 가수분해물의 효과

[0051] 실시예 2에서 최적화된 IAA 및 kinetin을 각각 2 mg/L, 0.02 mg/L 의 농도로 기본 MS 배지에 카세인 가수분해물(SIGMA사)을 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0g/L로 처리한 결과, 카세인 가수분해물 처리 실험군은 모두 대조군(미처리군)에 비하여 세포성장률이 증가함을 알 수 있으며, 카세인 가수분해물 2.0~4.0g/L 농도에서 캘러스 생장이 현저하게 증가함을 확인하였다. (도 3)

표 6

[0052] 카세인 가수분해물 농도에 따른 캘러스 성장 정도 (단위: g/L)

카세인 가수분해물	캘러스 성장 (g)
0(대조군)	1.0
0.2	10.6
0.4	12.1
0.6	12.7

0.8	13.2
1.0	15.7
2.0	18.9
4.0	19.1
6.0	13.7

[0053] <실시예 4> 계면활성제의 효과

[0054] 2 mg/L IAA, 0.02 mg/L kinetin 및 2 g/L의 카세인 가수분해물을 포함하는 MS 기본 배지에 Pluronic F-127, Pluronic F-68, PEG 1,000, PEG 8,000 및 PEG 20,000(SIGMA사)을 각각 3g/L로 처리한 결과, 모든 실험군에서 대조군에 비하여 증가된 세포 성장률을 확인할 수 있었으며, Pluronic F-68, PEG 1,000, PEG 8,000에서 그 증가율이 큰 것으로 확인되었다.(도 4)

표 7

[0055] 계면활성제 종류에 따른 캘러스 생장 정도 (단위: g/L)

계면활성제	캘러스 생장 (g)
Control	1.0
PF 127	21.5
PF 68	28.7
PEG 1,000	30.9
PEG 8,000	31.2
PEG 20,000	26.2

[0056] <실시예 5> 캘러스의 현탁세포화

[0057] 대량증식된 캘러스는 세포응집성이 강하기 때문에, 이를 현탁세포화하기 위하여 물리적 방법인 초음파처리와 효소적 방법인 셀룰라아제, 펙티나아제(pectolyase) 또는 마세로자임(macerozyme) 로 이루어지는 효소 군에서 1이상의 효소를 선택하여 각각 또는 혼합하여 사용하였다.

[0058] 초기 캘러스세포농도 0.2~0.6 g, 직경 0.5~1 cm, 높이 2 ~ 4 mm크기의 캘러스를 gelrite 농도 2.5 g/L, pH 5.5에서 5.8, 온도 25~8℃에서 초음파 및 펙티나아제/셀룰라아제를 처리하였다. 대량배양된 캘러스를 SH 기본배지에 현탁세포화하였다. SH 기본배지에 물리·화학적 조건을 처리하지 않은 경우, 5개월이 경과여도 현탁세포화되지 않았다. 그러나, 최적화된 조건 즉, 40 MHz, 5분-15초 pulse on, 15초 pulse off의 조건으로 초음파처리 후, 1시간 이내에 25℃, 60 rpm으로 0.02 - 0.2%의 pectolyase와 마세로자임(macerozyme), 0.2 - 2% 셀룰라아제의 병행처리한 경우, 응집된 캘러스를 효율적으로 현탁세포화 할 수 있었다. 실험결과는 도 5에 도시되었으며, 초음파 및 펙티나아제/셀룰라아제를 처리를 통하여 효율적으로 캘러스를 현탁세포화 할 수 있음을 확인하여, 식물체에서 유용성분을 직접 추출하는 것보다 대량배양된 캘러스나 현탁세포에서 신속하고 저렴하게 생산할 수 있는 방법을 확립하였다.

도면의 간단한 설명

[0059] 도 1은 캘러스배양에서 배지종류에 따른 세포증식 비교도이며, 가로축은 왼쪽부터 MS, SH, AA, N6, B5 및 White 배지를 나타내고, 세로축은 위쪽부터 각각 0.5배, 1배 및 2배의 salt 농도를 나타내며,

[0060] 도 2a는 캘러스배양에서 식물생장호르몬의 종류별 및 농도별에 따른 세포증식 그래프로서, R각 페트리 디쉬는 표 3의 조합과 대응하며, 도 2b는 IAA 및 BA와 kinetin의 조합결과의 확대도이고,

[0061] 도 3은 캘러스배양에서 카세인 가수분해물을 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0g/L로 처리한 세포증식 결과를 왼쪽 상단부터 나타낸 것이며,

[0062] 도 4는 캘러스배양에서 MS기본배지, IAA 및 kinetin, 카세인 가수분해물에 계면활성제를 처리한 결과를 나타낸 도로서, 좌측부터 각각 대조군, Pluronic F-127, Pluronic F-68, PEG 1,000, PEG 8,000 및 PEG 20,000을 처리

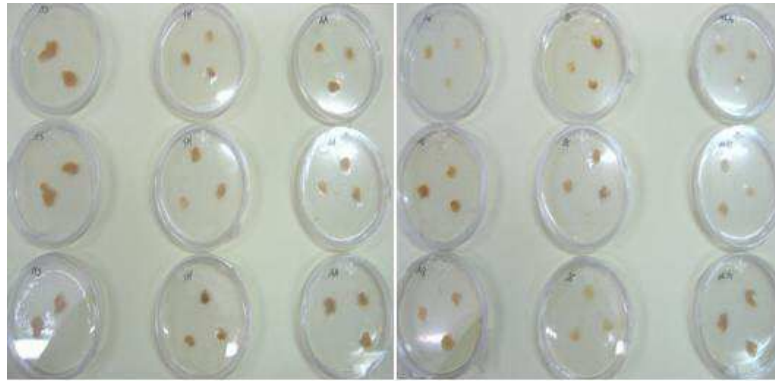
한 실험군을 나타내고,

[0063]

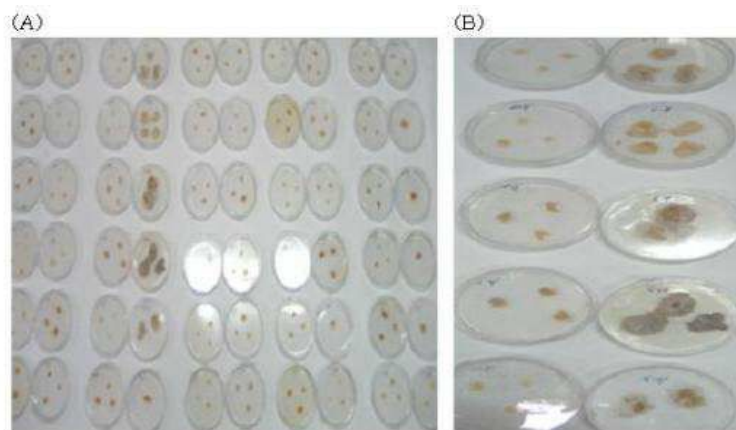
도 5는 대량 배양된 켈러스의 현탁세포유도를 위한 초음파 및 펙티나아제/셀룰라아제의 효과를 확인한 도로서, 도 5a는 대조군을, 도 5b는 처리실험군의 7일째 현탁세포화 된 사진을 나타낸다.

도면

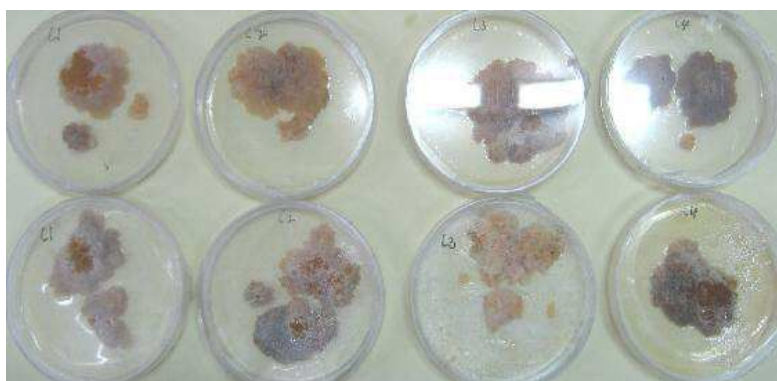
도면1



도면2



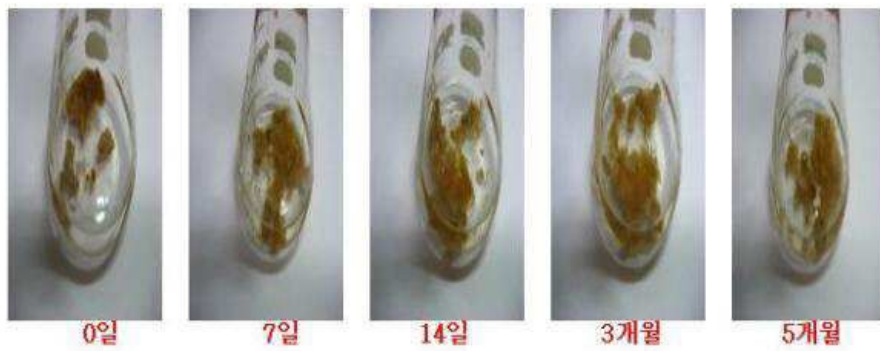
도면3



도면4



도면5a



도면5b

