

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0053787
(43) 공개일자 2022년05월02일(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 4/00 (2006.01) A01C 1/08 (2006.01)
C12N 5/04 (2006.01)(52) CPC특허분류
A01H 4/001 (2021.01)
A01C 1/08 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0137928

(22) 출원일자 2020년10월23일

심사청구일자 2020년10월23일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

박상언

대전광역시 유성구 어은로 57, 109동 1302호(어은동, 한빛아파트)

박창하

대전광역시 유성구 신성로84번길 43-17, 102호(신성동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

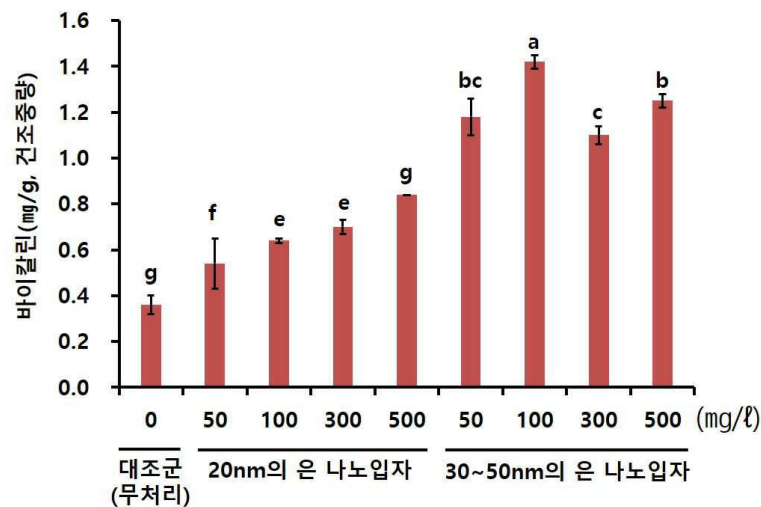
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 황금 배양 세포에 은나노 입자를 처리하여 바이칼린의 함량을 증가시키는 방법

(57) 요약

본 발명은 황금 배양 세포에 은나노 입자를 처리하여 바이칼린의 함량을 증가시키는 방법에 관한 것으로, 본 발명의 방법에 따라 생산된 황금 내 바이칼린의 함량은 은나노 입자를 처리하지 않은 대조군에 비해 통계적으로 유의미하게 증가하였다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 5/04 (2013.01)

C12N 2500/10 (2013.01)

(72) 발명자

여현지

대구광역시 달서구 호산로 125, 205동 1503호(파호동, 성서삼성명가타운)

박예은

강원도 동해시 평원로 110, 102동 504호(평릉동, 동해해안사랑으로부영)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395059954

과제번호 PJ01332801

부처명 농촌진흥청

과제관리(전문)기관명 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21(R&D)

연구과제명 황금의 phenylpropanoid 생합성 네트워크 조절 및 대사공학 연구

기 여 율 1/1

과제수행기관명 충남대학교

연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (1) 황금 종자를 표면 살균하는 단계;
- (2) 상기 단계 (1) 이후에, 황금 종자를 세척하고 고체배지에 치상하여 발아 및 성장시키는 단계;
- (3) 상기 단계 (2) 이후에, 성장한 황금 유식물체의 잎 조직을 잘라 절편화하고 캘러스 유도배지에서 계대배양하여 캘러스를 유도하는 단계; 및
- (4) 상기 단계 (3)에서 유도한 캘러스를 은나노 입자가 처리된 액체배지에서 계대배양하여 황금 배양 세포를 획득하는 단계;를 포함하는 황금 배양 세포에 은나노 입자를 처리하여 바이칼린의 함량을 증가시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단계 (4) 이후에, 획득한 황금 배양 세포로부터 바이칼린을 분리 및 정제하는 단계;를 더 포함하는 황금 배양 세포에 은나노 입자를 처리하여 바이칼린의 함량을 증가시키는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 단계 (1)에서 표면 살균은 황금 종자를 에탄올 용액에 침지한 후, 트윈 20이 첨가된 차아염소산나트륨 용액으로 표면 살균하는 것을 특징으로 하는 황금 배양 세포에 은나노 입자를 처리하여 바이칼린의 함량을 증가시키는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 단계 (2)의 고체배지는 MS(Murashige & Skoog) 배지이며, 내부 온도가 23~27℃이고, 광도가 4000~6000 lux인 조건으로 14~18시간 동안 발아 및 성장시키는 것을 특징으로 하는 황금 배양 세포에 은나노 입자를 처리하여 바이칼린의 함량을 증가시키는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 단계 (3)의 캘러스 유도배지는 2,4-D(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) 및 BAP(6-benzylaminopurine)가 포함된 Gamborg B5 배지인 것을 특징으로 하는 황금 배양 세포에 은나노 입자를 처리하여 바이칼린의 함량을 증가시키는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 2,4-D(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) 및 BAP(6-benzylaminopurine)는 1.0~3.0mg/ℓ의 2,4-D(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) 및 0.05~0.2mg/ℓ의 BAP(6-benzylaminopurine)의 농도로 Gamborg B5 배지에 혼합된 것을 특징으로 하는 황금 배양 세포에 은나노 입자를 처리하여 바이칼린의 함량을 증가시키는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 단계 (4)의 은나노 입자는 20~50nm의 은나노 입자인 것을 특징으로 하는 황금 배양 세포에 은나노 입자를 처리하여 바이칼린의 함량을 증가시키는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 단계 (3) 및 (4)는 암(dark) 상태에서 수행하는 것을 특징으로 하는 황금 배양 세포에 은나노 입자를 처리하여 바이칼린의 함량을 증가시키는 방법.

청구항 9

황금 배양 세포에 은나노 입자를 처리하여 바이칼린 함량이 증가된 황금 배양 세포의 제조 방법.

청구항 10

제9항의 방법에 의해 제조된 바이칼린 함량이 증가된 황금 배양 세포.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 황금 배양 세포에 은나노 입자를 처리하여 바이칼린의 함량을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 황금(*Scutellaria baicalensis* Georgi)은 순형과(Labiatae)에 속하는 다년생 초본으로 한방 처방전에 가장 많이 쓰이는 약초 중 하나이다. 약재로 쓰이는 뿌리는 재배 후 3~4년 경과된 것을 가을이나 봄에 수집하여 주피를 제거하고 건조하여 약용으로 이용하는데, 색은 황색이다. 뿌리에는 플라본(flavone) 계통의 바이칼린(baicalin), 바이칼레인(baicalein), 우고닌(wogonin) 및 우고노사이드(wogonoside, wogonin-n-glucuronide) 등에 유용 약리물질이 들어있다. 황금은 오래 전부터 민간요법에 이용이 되어 왔으며, 최근에는 동물실험이나 임상시험을 통해 그 약리물질의 효능 연구가 활발히 진행 중에 있다. 주로 항염(anti-inflammation)에 쓰여져 왔으며 특히 항알레르기 효과(antiallergic effect)가 탁월하며, 그 외 항 HIV, 항산화, 항암 효과도 보고가 되었다. 유용 약리 물질 중에서 바이칼린(baicalin, 5,6-dihydroxy-7-O-glucuronide flavone)은 황금의 주요 성분으로, 항산화, 항바이러스, 항염, 항 HIV 및 항암 효과 등 다양한 생리활성 및 약리효과가 보고되어 기능성 식품의 원료 또는 의약품으로 개발될 가능성이 큰 천연물이다.

[0003] 한편, 은나노 입자는 은을 전기분해 또는 화학적 방법을 통해 나노 크기로 미세하게 쪼갠 것을 의미한다. 은(silver)은 귀금속으로 비교적 비싸지만 10^{-9} m 크기의 미세한 나노입자로 만들어서 접촉할 수 있는 표면적을 넓힘으로써 소량으로도 은의 탁월한 항균, 살균 효과를 충분히 누릴 수 있어서 이러한 특징 덕분에 우리는 은나노 제품을 웰빙과 건강을 중시하는 우리 주변에서 쉽게 접할 수 있는 물질이다.

[0004] 기내 세포배양을 통해 식물체 내에 함유되어 있는 유용물질(천연물)을 대량으로 생산할 수 있는 기술의 개발은 지역적, 계절적인 제약 및 기후의 영향을 전혀 받지 않고, 일정한 환경에서 안정되게 연중 생산이 가능하므로, 원료 공급을 원활하게 할 수 있게 된다. 배양세포의 생육속도는 일반적으로 토양에 심어 재배하는 것에 비해 빨라서 생산효율이 높아 생산 기간이 단축될 뿐만 아니라, 환경의 조절이 용이하므로, 인위적인 대사 조절을 통해 특정 천연물을 더 많이 축적하게 하는 것이 가능하게 할 수 있다는 등의 큰 이점이 있기 때문에 이 분야에 대한 관심이 증대되고 있다.

[0005] 천연물의 기내 배양하는 기술은 다양하게 개발되고 있는데, 그 중에서 한국등록특허 특1995-0004011호에 황금 세포 현탁배양에 의한 푸라보노이드의 생산방법이 개시되어 있고, 은나노 입자를 이용한 배양 기술로, 한국등록특허 제0835024호에 은나노 입자를 이용한 식물조직배양과 변이식물체 생산방법이 개시되어 있으나, 아직까지 본 발명의 황금 배양 세포에 은나노 입자를 처리하여 바이칼린의 함량을 증가시키는 방법에 대해 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 황금 배양 세포에 은나노 입자를 처리하여 바이칼린의 함량을 증가시키는 방법을 제공하고, 본 발명의 방법에 따라 생산된 황금 내 바이칼린의 함량이 증가하였다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (1) 황금 종자를 표면 살균하는 단계;

[0008] (2) 상기 단계 (1) 이후에, 황금 종자를 세척하고 고체배지에 치상하여 발아 및 성장시키는 단계;

[0009] (3) 상기 단계 (2) 이후에, 성장한 황금 유식물체의 잎 조직을 잘라 절편화하고 캘러스 유도배지에서 계대배양

하여 캘러스를 유도하는 단계; 및

[0010] (4) 상기 단계 (3)에서 유도한 캘러스를 은나노 입자가 처리된 액체배지에서 계대배양하여 황금 배양 세포를 획득하는 단계;를 포함하는 황금 배양 세포에 은나노 입자를 처리하여 바이칼린의 함량을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 황금 배양 세포에 은나노 입자를 처리하여 바이칼린 함량이 증가된 황금 배양 세포의 제조 방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 바이칼린 함량이 증가된 황금 배양 세포를 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명은 황금 배양 세포에 은나노 입자를 처리하여 바이칼린의 함량을 증가시키는 방법에 관한 것으로, 본 발명의 방법에 따라 생산된 황금 내 바이칼린의 함량은 은나노 입자를 처리하지 않은 대조군에 비해 통계적으로 유의미하게 증가하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명에 방법에 따라 생산된 황금 내 바이칼린의 함량을 확인한 결과이다. a~g는 통계적으로 유의미한 차이가 있다는 것을 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명은 (1) 황금 종자를 표면 살균하는 단계;

[0016] (2) 상기 단계 (1) 이후에, 황금 종자를 세척하고 고체배지에 치상하여 발아 및 성장시키는 단계;

[0017] (3) 상기 단계 (2) 이후에, 성장한 황금 유식물체의 잎 조직을 잘라 절편화하고 캘러스 유도배지에서 계대배양하여 캘러스를 유도하는 단계; 및

[0018] (4) 상기 단계 (3)에서 유도한 캘러스를 은나노 입자가 처리된 액체배지에서 계대배양하여 황금 배양 세포를 획득하는 단계;를 포함하는 황금 배양 세포에 은나노 입자를 처리하여 바이칼린의 함량을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

[0019] 상기 단계 (4) 이후에, 획득한 황금 배양 세포로부터 바이칼린을 분리 및 정제하는 단계;를 더 포함할 수 있다.

[0020] 상기 단계 (1)에서 표면 살균은 황금 종자를 에탄올 용액에 침지한 후, 트윈 20이 첨가된 차아염소산나트륨 용액으로 표면 살균하는 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 황금 종자를 70%(v/v) 에탄올 용액에 침지한 후, 트윈 20이 0.1ml 첨가된 4%의 차아염소산나트륨 용액으로 10분 동안 표면 살균하는 것이지만 이에 한정하는 것은 아니다.

[0021] 상기 단계 (2)의 고체배지는 MS(Murashige & Skoog) 배지이며, 내부 온도가 23~27℃이고, 광도가 4000~6000lux인 조건으로 14~18시간 동안 발아 및 성장시키는 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 내부 온도가 25℃이고, 광도가 5000lux인 조건으로 16시간 동안 발아 및 성장시키는 것이지만 이에 한정하는 것은 아니다.

[0022] 상기 단계 (3)의 캘러스 유도배지는 2,4-D(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) 및 BAP(6-benzylaminopurine)가 포함된 Gamborg B5 배지인 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 1.0~3.0mg/ℓ의 2,4-D(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) 및 0.05~0.2mg/ℓ의 BAP(6-benzylaminopurine)의 농도로 혼합된 Gamborg B5 배지이지만 이에 제한하는 것은 아니다.

[0023] 상기 단계 (4)의 은나노 입자는 20~50nm의 은나노 입자인 것이 바람직하고, 더 바람직하게는 30~50nm의 은나노 입자이지만 이에 제한하는 것은 아니며, 상기 단계 (3) 및 (4)는 암(dark) 상태에서 수행하는 것이 특징이다.

[0024] 또한, 본 발명은 황금 배양 세포에 은나노 입자를 처리하여 바이칼린 함량이 증가된 황금 배양 세포의 제조 방법을 제공한다. 상기 제조 방법에서, 황금 배양 세포의 제조 방법 및 은나노 입자 처리 방법은 전술한 바와 같다.

[0025] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 바이칼린 함량이 증가된 황금 배양 세포를 제공한다.

[0026] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구

체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

1. 은나노 입자

본 발명에서는 20nm 및 30~50nm의 길이를 가진 은나노 입자 분말(Ag 99.99%, metal basis)를 (주)알앤디코리아(경기도 광명시 하안로 60, 광명테크노파크 B동 309호)에서 구입하여 사용하였다.

실시예 1. 황금 종자 소독과 발아

황금(*Scutellaria baicalensis* Georgi) 종자를 아시아종묘에서 구입하여 70% (v/v) 에탄올 용액에 1분동안 침지한 후, 4%(v/v) 차아염소산나트륨(sodium hypochlorite) 용액에 트윈 20을 0.1ml 첨가 후 10 분간 표면살균 하였다. 이후 멸균수에서 3회 세척한 다음 30ml의 MS(Murashige & Skoog, 1962) 고형 배지가 든 배양용기(magenta box; Sigma-Aldrich)에 황금 종자를 치상하였다. 배양은 내부 온도 25℃, 5000lux의 광도로 16 시간 동안 조사되는 배양기 내에서 이루어졌다.

실시예 2. 황금 캘러스 유도

상기 실시예 1에서 황금 종자로부터 발아하여, 한달 동안 자란 유식물체의 잎 조직을 0.5cm×1cm 길이로 잘라서 7개 절편을 캘러스 유도 배지가 첨가된 페트리디쉬에서 배양하였다.

캘러스유도 배지는 Gamborg B5 배지에 2,4-D(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) 2.0mg/ℓ 와 BAP(6-benzylaminopurine) 0.1mg/ℓ 혼합 처리하여 사용하였다. 황금 잎 절편은 캘러스 유도 배지에서 6주 동안 배양하였다. 이후 2주마다 새로운 배지로 계대 배양을 하였다. 배양 6주 후 캘러스가 형성되었으며, 배양은 25℃의 온도 조건으로 성장챔버(growth chamber)에서 암(dark) 상태로 실시하였다.

실시예 3. 황금 세포배양 및 은나노 입자 처리

고체배지에서 형성된 캘러스 생체중 3g에 대하여, 2.0mg/ℓ 의 2,4-D와 0.1mg/ℓ 의 BAP가 혼합 처리된 Gamborg B5 액체 배지 30ml가 처리된 100ml 용량의 삼각플라스크에서 계대배양하였다.

배양은 25℃의 온도 조건으로 암(dark) 상태가 유지되는 교반기에서 120rpm의 속도로 실시하였다. 배양 5일 후 20nm와 30~50nm 길이의 은나노 입자를 각각 50, 100, 300 및 500mg/ℓ 를 처리하여 24시간 동안 배양 후 황금 배양 세포를 수확하였다.

실시예 4. 바이칼린(baicalin) 함량 분석

은나노 입자 처리한 황금 배양세포에 함유된 기능성 성분인 바이칼린 (baicalin)의 함량을 측정하였다. 시료를 수확하여 72시간 동안 -70℃에서 동결 건조 시켰고 막자와 사발을 이용해 미세한 가루 형태로 분쇄하였다. 곱게 간 분말은 100mg씩 15ml 튜브에 3반복으로 분배하였고 80% 메탄올 2ml를 주입해 30초 씩 볼텍싱(vortexing) 하였다. 그 후 1시간 동안 상온에서 초음파 처리(sonication)를 하였고, 16,000rpm 속력으로 상온에서 20분 동안 원심 분리하였다. 분리된 상층액을 1.5ml 마이크로 튜브로 옮겨주고 0.45μm 주사기 필터(Acrodisc syringe filter, Pall Corp.; Port Washington, NY)를 이용해서 상층액 필터를 실시하였다.

HPLC 분석을 위해 여과한 상층액을 바이알에 넣어주었다. HPLC는 UV-Vis detector, C₁₈ 칼럼(250×4.6mm, 5μm; RStech; Daejeon, Korea) 및 NS-6000 오토샘플러(Futecs Co., Daejeon, South Korea)가 장착된 NS-4000 시스템을 이용하였다.

HPLC 분석은 총 60분 동안 수행하였고, 100μl의 시료를 주입하여 분당 1ml의 유속으로 실시하였다. 분석조건은 표 1에 개시하였다.

한편, 바이칼린의 표준품은 FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.(한국)에서 구입하였고, 5개의 농도(31.25, 62.5, 125, 250, 500 ppm)로 희석한 후 HPLC 분석을 통해 면적 값을 획득하였으며, 이를 이용하여 검정곡선을 작성하였다(표 2). 모든 분석은 3번 반복 수행하여 평균±표준편차로 표기하였다.

[0042]

HPLC 분석조건

HPLC	NS-4000 with a UV-Vis detector, Futecs NS-6000 autosampler, Futecs		
칼럼	optimapak (C18-51002546)		
검출 파장	275nm		
칼럼 온도	30℃		
이동상	Solvent A (0.2% Formic acid water) Solvent B (100% MeOH)		
유속	1.0ml/min		
구배 조건	시간	용매 A(%)	용매 B(%)
	0~39분	55	45
	39~41분	55	45
	41~43분	40	60
	43~44분	20	80
	44~54분	20	80
	54~55분	55	45
	55~60분	55	45

표 2

[0043]

바이칼린 표준품의 검정곡선

성분	머무름 시간	검정곡선	결정계수
바이칼린	17.75분	$Y=45.585X-760.347$	$R^2=0.999$

[0044]

은나노 입자가 바이칼린 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해 무처리구인 대조군, 20nm와 30~50nm 크기의 은나노 입자가 각각 50, 100, 300 및 500mg/ℓ의 농도로 처리된 황금 배양 세포를 대상으로 하여 HPLC 분석을 실시하였다.

[0045]

그 결과, 도 1에 개시한 바와 같이, 20nm의 은나노 입자가 처리된 모상군에서는 은나노 입자의 농도의존적인 증가를 보였고 30~50nm 크기의 은나노 입자가 처리된 모상군에서는 100mg/ℓ의 농도에서 최대값을 보였다. 특히, 최소값을 보이는 대조군에 비하여 모든 실험군에서 바이칼린 함량이 최소 1.5배 이상 증가하였으며, 20nm의 은나노 입자 경우 500mg/ℓ의 농도로 처리 되었을 때 0.84 ± 0.00 mg/g 건조중량으로 최대값을 보였고 30~50nm의 은나노 입자는 100mg/ℓ의 농도로 처리 되었을 때 1.42 ± 0.03 mg/g 건조중량으로 최대값을 나타냈으며 이는 대조군의 3.9배에 해당한다.

도면

도면1

