

## *Aloe vera* L. Callus의 현탁배양에 의한 세포외 다당생산 및 최적화

김명욱<sup>1</sup> · 조영제<sup>2</sup> · 이신영\*

<sup>1</sup>(재)경북해양바이오산업연구원, <sup>2</sup>경북대학교 식품공학부, 강원대학교 생물공학과

### Production and Optimization of Extracellular Polysaccharide by Suspension Cultivation of *Aloe vera* L. Callus

Myung-Uk Kim<sup>1</sup>, Young-Je Cho<sup>2</sup>, and Shin-Young Lee\*

<sup>1</sup>Gyeongbuk Institute for Marine Bioindustry

<sup>2</sup>School of Food Science, Kyungpook National University

Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University

#### Abstract

The extracellular polysaccharide production from suspension culture of *Aloe vera* L. was analyzed, and the optimization for suspension cultivation was investigated. From specific polysaccharide assay of glucomannan, FT-IR and <sup>1</sup>H NMR spectrum, the extracellular polysaccharide from suspension culture was found to be similar to  $\beta$ -1,4-glucomannan originated from *Aloe vera* fresh leaf. The polysaccharide existed in an acetylated form and its molecular weight by gel permeation chromatography was estimated to be 490 kD (Mn = 440 kD; polydispersity = 1.115). From medium optimization by simplex-centroid design using MINITAB<sup>®</sup>, the callus growth on the 2,4-D of 11.82  $\mu$ M, kinetin of 13.84  $\mu$ M and  $\alpha$ -naphthalene acetic acid of 4.34  $\mu$ M was turned out to be significantly superior than the growth on the other culture media combinations. Under this optimal culture media, other conditions such as the suspension culture's temperature, pH and the growth terms were determined. These results showed that the callus growth was optimum at 25°C, pH 5.5 and in 2 weeks. The maximum levels of growth and extracellular polysaccharide production of callus by optimal conditions were about 20.4 and 2.5 g/L, respectively, showing the profile of extracellular polysaccharide production was closely related to the callus growth.

**Key words:** *Aloe vera* L., suspension culture, extracellular polysaccharide, optimization, mixture experiment

## 서 론

Callus와 같은 식물배양세포를 현탁배양하면 식물세포벽의 구성다당 성분과 구조적으로 유사한 다당성분이 배지 중에 분비된다(Burke et al., 1974; Otsuji et al., 1995).

이는 세포성장중 다당류가 세포벽내에서 구조적 재배열을 일으키고, 세포외 다당으로서 능동 및 수동 확산 기작에 의해 배지 밖으로 분비되기 때문이다. 이러한 세포외 다당은 배지로부터 쉽게 회수될 수 있고 scale-up이 용이하여 세포내 다당에 비해 산업적 응용에서 매우 유리하다.

그동안 식물세포 현탁 배양액으로부터 많은 세포외 다당이 검출되었는데, 산성의 펙틴 다당은 단풍나무, bush

bean, 담배 및 당근 등의 현탁배양에 의해 얻어졌다. Maruyama et al.(1996)은 박하(Mentha)의 현탁배양에 의해 O-acetylated xyloglucan의 세포외 다당에 대해 보고하였고, Reid et al.(1999)은 사과(*Malus domestica*)의 현탁배양에 의한 세포외 다당에 대하여 보고하였다.

알로에의 다당은 *Aloe vera* 잎의 유조직에 널리 존재하며, 기본적으로  $\beta$ -1,4-glucomannan, galactose base polysaccharides 및 acidic polysaccharide의 3 가지 형태이다. 이중 glucomannan은 만노오스와 글루코오스 당 분자가 서로 연결되어 구성된 긴 사슬의 당분자로, 대표적인 생의학적 활성성분이다(Reynolds & Dweck, 1999).

광범위한 분자크기로 존재하여, 가장 작은 것은 잎의 중앙에서 발견되며, 외피주변에 가까워질수록 더 큰 분자량을 갖는 것으로 알려지고 있다(Pugh et al., 2001).

하지만 생의학적 활성성분인 알로에 다당류의 함량은 650 mg/L로 매우 낮고, 특히, *Aloe vera*의 겔은 glucomannan을 포함한 불안정한 화합물을 함유하므로 glucomannan이 알로에 내재성 가수분해 효소에 대해 안정화되지 않으면

\*Corresponding author: Shin-Young Lee, Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Tel: +82-33-250-6273; Fax: +82-33-243-6350

E-mail: sylee@kangwon.ac.kr

Received July 23, 2012; revised August 22, 2012; accepted August 23, 2012

빠른 분해를 일으킨다. 또 glucomannan은 pH 변화, 고온, 및 미생물 오염에 의해서도 분해되기 때문에 만약, 부적절한 가공을 하게 되면 표식 화합물인 glucomannan은 분해되며, 다시 평균 분자크기의 감소 및 다당의 탈아세틸화를 일으키고 용해도 및 점도의 소실을 초래한다(Yaron, 1993; Femenia et al., 2003). 이에 따라 점질 다당류와 같은 활성 성분을 거의 함유하지 않게 됨은 물론, aloin을 다량 함유하는 경우도 있으므로 반드시 유효성분인 다당류의 양과 질을 최대화할 수 있는 안정화 및 경제적 취급법을 확립하는 것이 필수 요소이다.

만약, 알로에 callus의 현탁배양에 의해 알로에 겔 유사 세포의 다당을 다량 생산할 수 있다면 지금까지 언급한 알로에의 재배, 생산 및 가공상의 각종 문제점들을 극복할 수 있을 것으로 판단된다.

저자 등은 *Aloe vera*로부터 callus의 유도 및 배양을 성공적으로 수행한 바 있으며, callus는 glucomannan 다당을 함유하였다. 하지만 고체배양하에서 callus 배양은 성장속도가 매우 느리며, scale-up 상의 난점이 있으므로 callus의 단세포를 분리하여 액체배지에서 배양하는 현탁배양의 검토가 필요하다.

이 현탁배양은 균질 cell line의 획득, 유전적 변이체 구축, 형질전환, 냉동보존의 시발재료 및 2차 대사산물의 생성수단으로 널리 이용되는데, 유전적인 특성, 배지조성 및 배양환경의 세 가지 요인이 조화를 이룰 때 성장능률이 최대화되는 것으로 잘 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 callus의 효율적 생산연구의 일환으로, callus의 현탁배양을 시도하였고, 현탁배양 생성물의 분석을 통해 알로에 유래 활성성분인 glucomannan의 세포의 생산을 확인하였으며, 이의 최적화 연구를 수행함으로써 현행 알로에 제품의 유효성분 생산을 위한 대체화 방안 자료를 마련하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 연구의 callus 유도배양에 사용된 알로에는 (주)김정문 알로에의 제주농장에서 재배한 3년생의 알로에 베라 (*Aloe vera* Linne)로 농장으로부터 직접 제공받아 4°C의 저온실에 보존하면서 실험에 사용하였다.

또, callus는 2,4-D 30 µM(또는 NAA(α-naphthalene acetic acid) 30 µM), kinetin 5 µM 및 sucrose 3%를 첨가한 MS 기본 배양액(pH 5.5) 40 mL를 함유한 100 mL의 플라스크에 접종하고, 25°C의 암소에서 100 rpm으로 진탕하면서 2주간 배양한 것을 직접 배양하여 사용하였다.

### 알로에 callus의 현탁배양

현탁배양은 알로에의 callus 배양으로부터 유도한 callus

를 무균적으로 파쇄한 후, 이를 callus 배양의 최적배지로 선정된 2,4-D 30 µM(또는 NAA 30 µM), kinetin 5 µM 및 sucrose 3%를 첨가한 MS 기본 배양액(pH 5.5) 40 mL를 함유한 100 mL의 플라스크에 접종하고, 25°C의 암소에서 100 rpm으로 진탕하면서 2주간 배양하였다. 이 때, callus의 생장율 측정은 현탁배양 세포의 건조중량(dry cell weight)으로 측정하였다. 즉, fresh cell을 여지(Whatman No.1 paper)로 여과한 후 70°C의 건조오븐에서 24시간 건조후 건조세포무게로 측정하였다.

한편, 세포의 다당은 callus를 최적 현탁배양 조건으로 2주 배양한 후, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 즉 원심분리한 상등액에 4°C에서 보관한 에탄올의 4배량을 서서히 첨가하고 실온에서 24시간 방치하여 침전물을 얻었으며, 이를 동결건조 후 세포의 조다당으로 하였다.

### Aloe callus의 현탁배양을 위한 배지조성의 최적화

현탁배양 배지조성의 최적화는 2,4-D, kinetin 및 NAA의 3요인으로 혼합물 성분에 대한 6-수준(0, 1/6, 1/3, 1/2, 2/3, 1)의 10개 처리조합에 의한 simplex-centroid design의 혼합물실험법(Scheffe, 1963)으로 실시하였다(Table 1). 즉, 100 mL 플라스크에 상기 조성의 배지용량을 40 mL로 하여 접종비 5%, 암소에서 25°C, 100 rpm 조건하에서 2주간 배양하면서 반응변수인 최대 callus 생장 및 세포의 다당생성을 만족시키는 최적 혼합비를 탐색하였다. 이 때, 혼합물실험의 자료분석 및 최적화는 MINITAB® 15 software (Minitab Inc.)를 이용하였다.

### Callus 추출물 시료의 조제

Aloe callus의 추출은 다음과 같이 용매(냉수 및 에탄올) 추출하였다. 즉, callus의 건조분말 시료 20 g을 cold water 및 60% ethanol 용액 200 mL에서 각각 2시간동안 2회 반복 추출하였다. 추출액을 10,000 rpm에서 10분간 원심분리(Super 25 K, Hanil Science Co., Ltd., Incheon, Korea)하

Table 1. Level and composition of 2,4-D, kinetin and NAA.

Design point	Simplex-centroid design with three axial points ( $\Delta = 1/3$ )			Experimental value (µM)		
	Coded value			2,4-D	Kinetin	NAA
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>			
1	1	0	0	30	0	0
2	0	1	0	0	30	0
3	0	0	1	0	0	30
4	1/2	1/2	0	15	15	0
5	0	1/2	1/2	0	15	15
6	1/2	0	1/2	15	0	15
7	2/3	1/6	1/6	20	5	5
8	1/6	2/3	1/6	5	20	5
9	1/6	1/6	2/3	5	5	20
10	1/3	1/3	1/3	10	10	10

였으며, 상등액을 회전진공농축기(N-N Series, Eyela Co., Tokyo, Japan)로 70°C에서 1/3 정도로 농축하였다. 이를 동결건조(Ilshin Lab. Co. Yangju, Korea; 0.5 torr, 72 시간)하고 밀봉하여 desiccator에 보관하였고 실험 시 증류수에 녹여서 사용하였다.

### Glucomannan 함량의 측정

Glucomannan의 함량은 Ebarandu et al.(2005)의 비색법에 따라 측정하였다. 즉, 400  $\mu$ L의 시료를 1 회용 유리 배양관에 옮기고, 각 관에 4 mL Congo red[sodium 4,4'-diphenyl-2,2'-diazo-bis-1-naphthalamino-4-sulfonate(Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)] 시약을 첨가한 후 vortexing하여 혼합하였다. 이 혼합물을 실온에서 20분간 방치한 후, 이의 흡광도를 540 nm에서 측정하였다. 이때, glucomannan의 함량은 별도로 조제한 알로에 표준다당(aloe standard polysaccharide)을 사용한 표준곡선으로부터 구하였다.

### 분자량 및 분자량 분포 측정

분자량 분포는 GPC system(Breeze, Waters, USA)을 사용하여 수행하였다. Column은 Waters ultrahydrogel linear을 사용하였고 온도는 25°C, flow rate는 0.8 mL/min이었으며, 용매는 0.02 N NaNO<sub>3</sub>(Merck Ltd. Korea, Seoul, Korea)를 사용하였다. Detection은 25°C에서 RI detector를 사용하였다. Column calibration은 고분자량 측정시는 pullulan(Shodex standard P-82), 그리고 저분자량 측정시는 PEG(Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)의 각종 분자량 표준품을 사용하여 수행하였다.

### FT-IR 분석

FT-IR(Fourier transformed infra red) spectra는 동결건조한 UF 전후 시료 2 mg을 함유한 KBr disc를 조제하고 3 cm<sup>-1</sup>의 해상도로 Bio-Rad Model EXCALIBER(Cambridge, USA) 기기를 사용하여 얻었다.

### <sup>1</sup>H NMR

시료의 NMR 스펙트럼은 실온에서 Bruker Model Avance 600(Rheinstetten, Germany) spectrometer를 사용하여 얻었다. 이때 시료는 내부 표준 없이 10 mg을 0.7 mL D<sub>2</sub>O로 용해하였다.

## 결과 및 고찰

### 알로에 현탁배양 생성물의 성분 및 이화학적 특성

Aloe vera로부터 callus의 고체배양은 성장속도가 매우 느리고, scale-up이 어려워므로 callus의 효율적 배양연구의 일환으로, callus의 단세포를 분리하여 액체배지에서 배양하는 현탁배양을 검토하고 최적화하고자 하였다.

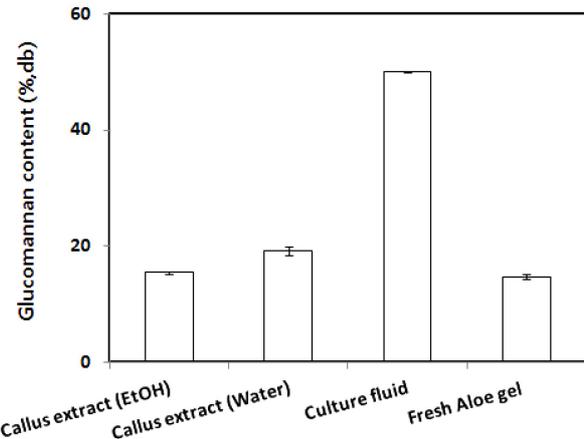


Fig. 1. Glucomannan contents of the suspension cultured products from *Aloe vera* callus.

하지만 알로에 callus 현탁배양의 최적화에 앞서 기본배지에서 배양한 알로에 callus 현탁배양 생성물(callus와 배양여액)로부터 알로에 유래 유효다당 성분 및 이화학적 특성을 먼저 조사하였다.

즉, *Aloe vera* 생잎 겔의 유효다당은 glucomannan으로 Congo red에 의해 특이적으로 비색정량되므로(Ebarandu et al., 2005) callus의 용매추출물(water 및 EtOH) 및 배양여액의 세포의 다당으로부터 *Aloe vera* 잎의 주 활성성분이 되는 glucomannan의 성분을 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 1과 같다.

알로에 생잎 겔의 glucomannan 함량은 14.7%이었으나 동일 고형분 농도(0.5%)의 callus 용매 추출물의 glucomannan 함량은 15.4-19.2%(w/v)로 다소 높았다. 반면, 세포의 다당은 50%로 매우 높았으며, 이는 현탁배양 중 배지로 *Aloe vera*의 유효 활성성분인 glucomannan이 분비 및 생성된 것으로 보인다.  $\beta$ -1,4-glucomannan은 알로에의 생의학적 활성성분이며, 광범위한 분자크기로 존재하는데, 생잎 겔에서의 총다당 함량의 약 1/3이며, 650 mg/L로 매우 낮다.

따라서 세포의 다당의 50%가 glucomannan인 것은 알로에 겔 유사 세포의 다당이 생성된 것을 의미하며, 그 생산량은 생잎보다 약 1.7 배나 높은 함량이므로 앞으로 알로에 callus의 현탁배양이 알로에 유효 다당의 신규 취득방법으로서의 가능성을 갖는 것으로 생각되었다.

### FT-IR 특성

현저하게 함량이 높았던 Aloe callus 현탁배양의 세포의 다당에 대한 특성을 보기 위해 FT-IR 스펙트럼을 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 2와 같다.

4000-400 cm<sup>-1</sup>로 주사되었을 때, 스펙트럼으로부터 수소 결합의 O-H stretching frequency에 기인한 3600-3200 cm<sup>-1</sup> 및 관련 bending vibration의 1100-1050 cm<sup>-1</sup>, 2950-2800 cm<sup>-1</sup>에서의 stretching vibration 및 대응하는 bending frequency

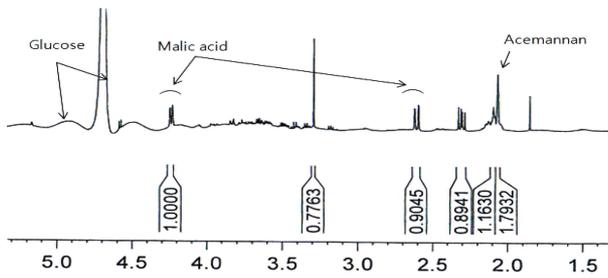


Fig. 2. 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR spectrum of extracellular polysaccharide from suspension culture of *Aloe vera* callus.

1470-1460  $\text{cm}^{-1}$ 은 C-H기의 기능기로 전형적인 다당의 특성을 나타냄을 알 수 있었다. 또, FT-IR 스펙트럼은 약 1160, 1040 및 899  $\text{cm}^{-1}$ 에서의  $\beta$ -결합 다당류의 특징적인 band를 잘 나타내었다(Blafkova et al., 2004).

특히, FT-IR spectrum은 acetyl기의 C=O 및 C-O-C stretching에 대응하는 1740 및 1250  $\text{cm}^{-1}$  band가 관찰되어 아세틸화되었음을 보여주었다. 이는 McAnalley(1993)이 알로에의 아세틸화 다당인 acemanana에 대해 보고한 사실과 잘 일치하며, 따라서 아세틸화 다당의 특성을 잘 유지되는 것으로 판단되었다.

알로에의 glucomannan은 알로에 내재성 가수분해 효소에 대해 안정화되지 않으면 빠른 분해를 일으키며, pH 변화, 고온, 및 미생물 오염에 의해서도 분해되므로(Yaron, 1993), 아세틸화된 다당의 특성을 유지하는 본 시료는 bioactive acemannan에 기인하는 각종의 생리적 성질에 중요한 영향을 미칠 수 있다고 판단되었다.

### $^1\text{H}$ NMR 스펙트럼 특성

Diehl & Teichmuller(1998)은  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼이 *Aloe vera* 겔 제조의 동질성과 품질을 평가하는 필수임을 보고하였고, 3 개의 주요 천연 성분인 포도당, malic acid 및 다당 acemannan에 대응하는 signal이 NMR 스펙트럼에서 명확히 존재한다고 하였다.

따라서 *aloe callus* 현탁배양의 세포의 다당의  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼을 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 3과 같다.

알로에 세포의 다당은 알로에 생잎의 유효 다당인 acemannan의 peak(2.1 ppm)가 관찰되어 알로에 생잎의 표준다당과 유사한 다당임을 보였다. 아울러, glucose와 malic acid의 peak를 보여 신선한 겔의 특징을 잘 나타내었다. 따라서 *aloe callus*의 현탁배양으로 얻은 세포의 다당은 glucomannan으로 알로에의 유효 생리활성 성분인 acemannan을 함유하는 것으로 판단되었다.

### GPC에 의한 분자량 분포 및 분자량

*Aloe callus* 현탁배양의 조 세포의 다당 시료의 분자량 특성을 알아보기 위하여 HPGPC system에 의한 분자량 분

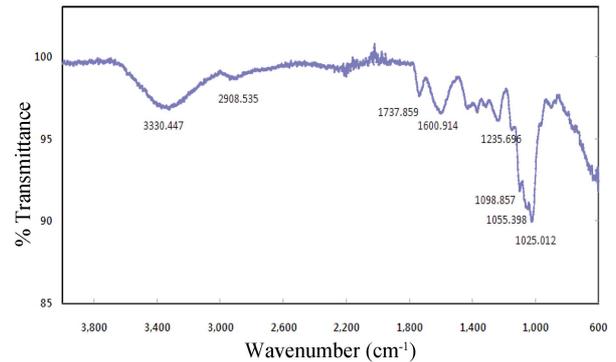


Fig. 3. FT-IR spectrum of exopolysaccharide from suspension culture of *Aloe vera* callus.

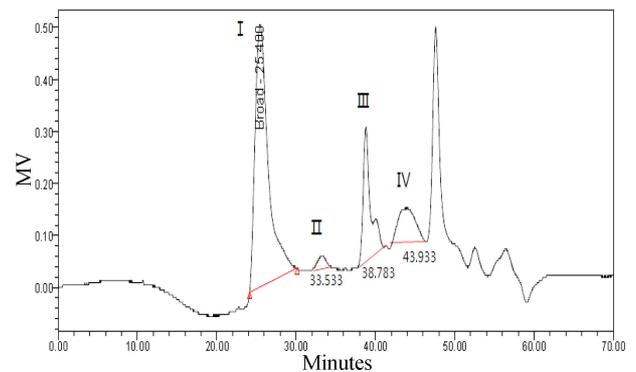


Fig. 4. Gel permeation chromatogram of exo-polysaccharide from suspension culture of *Aloe vera* callus.

포를 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 4와 같다.

*Aloe callus* 조세포의 다당의 크로마토그램은 2 개로 대별되는 영역이 존재하였다. 즉, retention time(RT)=25.400 및 33.533 min에서의 고분자 영역(peak I 및 II)과 RT=38.783 및 43.733 min의 저분자 영역(peak III 및 IV)이었다. 이는 Baek(2008)이 보고한 알로에 겔(UF 보유액)의 GPC 분포와 매우 유사하여 *aloe callus* 현탁배양의 세포의 다당이 알로에 생잎의 다당과 유사함을 알 수 있었다.

분자량을 조사한 결과, Fig. 4의 Peak I에서  $M_w = 490$  kD( $M_n = 440$  kD; polydispersity = 1.115), peak II에서는  $M_w = 47.1$  kD( $M_n = 46.0$  kD; polydispersity = 1.02)가 얻어졌다. 반면, 저분자영역(peak III 및 peak IV)에서는 각각  $M_w 2597$ ( $M_n = 2459$ ) 및  $M_w = 456$ ( $M_n = 423$ )이 얻어졌고, 이의 다분산성은 1.002 및 1.077이었다. 이는 Baek(2008)의 *Aloe vera* 겔(UF 보유액 분획)과 거의 유사하였으나 고분자 영역의 분자량이 다소 높았고( $M_n = 348$  kD,  $M_w = 432$  kD, polydispersity = 1.24), 저분자 영역에서도 Baek(2008)이 보고한 830-838 D(polydispersity = 1.01)보다 높았다. 따라서 *aloe callus* 현탁배양액의 세포의 다당은 *Aloe vera* 생잎 겔과 분자량 특성이 서로 비슷한 것으로 판단하였다.

**Aloe callus 현탁배양의 최적화**

알로에 베라 callus의 현탁배양에 의해 알로에 베라 유래의 유효다당인 아세틸화된 glucomannan을 세포외로 생성됨을 확인하였으므로 이 현탁배양의 최적화 실험을 진행하였다. 통상, 현탁배양에서는 유전적 특성, 배지 조성 및 배양환경의 세 가지 요인이 조화를 이룰 때 성장능률이 최대화되는 것으로 잘 알려져 있으므로 먼저, 혼합물 실험계획법에 의해 배지 조성의 최적화를 실시하도록 하였다.

이미 보고한 바와 같이, callus의 고체배양에서 callus 형성은 cytokinin(kinetin)과 auxin(2,4-D, NAA)의 모두를 요구하여 최적 배지 조성으로 5 µM의 kinetin과 30 µM의 2,4-D를 혼합하였을 때, 최대의 callus를 유도하였다.

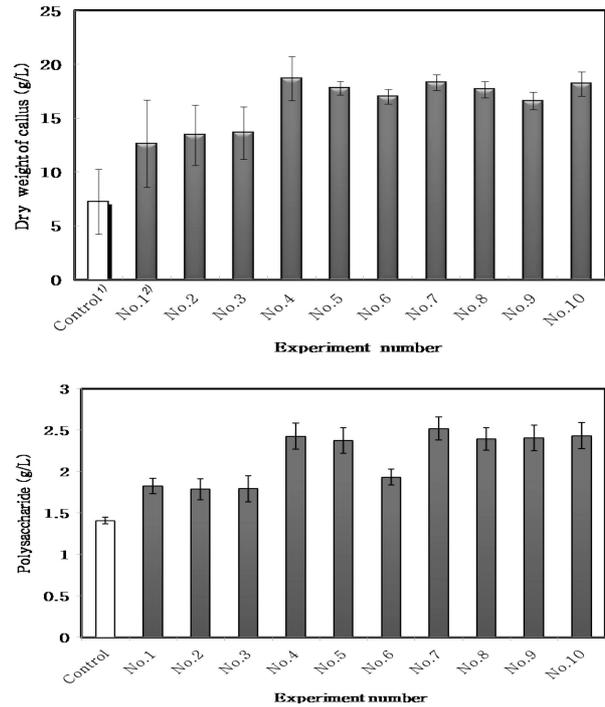
이는 여러 개 성분(kinetin, 2,4-D, NAA)의 혼합으로 이루어진 배지 제조에서 각 성분의 혼합양만이 아니고, 각 성분의 혼합비율(mixture ratio)이 중요함을 의미한다.

이와 같이 몇 개 성분의 혼합물에 관한 실험에서 어떠한 성분이 반응 값에 유의한 영향을 미치는지, 그리고 반응을 최대 또는 최소로 만드는 최적 혼합비율을 찾고자 하는 실험계획으로는 혼합물실험법(Scheffe, 1963)이 매우 유효하다.

그러므로 본 실험에서는 혼합물실험법에 의해 현탁배양시 aloe callus의 최대의 증식과 세포외 다당의 생성을 갖는 배지의 최적 혼합비율을 찾고자 하였다.

혼합물실험법은 Table 1과 같이, 2,4-D( $X_1$ ), kinetin( $X_2$ ), NAA( $X_3$ )를 독립변수로 하고, 이들 성분조성의 비가 callus 생육( $Y_1$ ) 및 세포외 다당 생성( $Y_2$ )에 미치는 영향을 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 5와 같다.

생육조절제가 첨가되지 않은 대조구(control)와 각 성분조성이 다른 10 개 혼합물 실험구에 따른 callus 생육은 각 실험구에 따라 배양 종료일인 2 주 후의 값이 7.20-18.69 g/L로 배지 조성의 차이에 따라 callus 생육의 큰 차이를 보였다. 대체로 성장조절제의 단독 처리(2,4-D, kinetin 및 NAA) 보다는 혼합처리(2,4-D/kinetin, kinetin/NAA, 2,4-D/NAA)에서 우수한 성장률을 나타내었다. 또, 성장조절제의 농도차이 별 복수처리(2,4-D/kinetin/ NAA)에서의 성장률은 2,4-D/kinetin나 NAA/kinetin 처리구보다 다소 높았으나 큰 차이



**Fig. 5. Callus growth and extracellular polysaccharide production during suspension cultivation of *Aloe vera* callus with different medium compositions.**

<sup>1)</sup>Control means the experiment under MS medium including 3% sucrose.

<sup>2)</sup>For symbols of each number, refer to Table 1.

는 없었다.

Callus 성장과 마찬가지로 세포외 다당의 생성에서도 각 실험구에 따라 배양 종료일인 2 주 후의 값이 1.41-2.52 g/L로 배지 조성의 차이에 따라 세포외 다당생산도 큰 차이를 보였다. 아울러, 각 성장조절제의 단독처리 보다는 혼합처리효과가 좋았고, 그 효과도 callus 성장과 비슷한 결과를 보여 세포외 다당의 생성은 증식과 연동되는 것으로 생각되었다.

그러므로 *Aloe vera* callus의 현탁배양을 위한 2,4-D/

**Table 2. Analysis of variance for callus growth.**

Source	Item	Degree of freedom	Sum of square	Mean square	F-value	p-value
Regression	Callus growth	5	708.010	141.602	6.69	0.045
	Polysaccharide	5	6.77662	1.35532	9.44	0.025
Linear	Callus growth	2	23.468	2.213	0.10	0.903
	Polysaccharide	2	0.16973	0.01997	0.14	0.874
Quadratic	Callus growth	3	684.542	228.181	10.78	0.022
	Polysaccharide	3	6.60688	2.20229	15.34	0.012
Residual Error	Callus growth	4	84.697	21.174		
	Polysaccharide	4	0.57442	0.14361		
Total	Callus growth	9	792.707			
	Polysaccharide	9	7.35104			

**Table 3. Estimated regression coefficients for callus growth and extracellular polysaccharide statistical value.**

Term	Item	Coef	SE Coef	T	P	VIF
2,4D	Callus growth <sup>1)</sup>	54.31	4.438	*	*	1.964
	Polysaccharide <sup>2)</sup>	5.548	0.3655	*	*	1.964
Kinetin	Callus growth	51.50	4.438	*	*	1.964
	Polysaccharide	5.281	0.3655	*	*	1.964
NAA	Callus growth	53.23	4.438	*	*	1.964
	Polysaccharide	5.444	0.3655	*	*	1.964
2,4D*Kinetin	Callus growth	86.03	20.454	4.21	0.014	1.982
	Polysaccharide	8.147	1.6844	4.84	0.008	1.982
2,4D*NAA	Callus growth	20.56	20.454	1.01	0.372	1.982
	Polysaccharide	2.474	1.6844	1.47	0.216	1.982
Kinetin*NAA	Callus growth	76.29	20.454	3.73	0.020	1.982
	Polysaccharide	7.699	1.6844	4.57	0.010	1.982

<sup>1)</sup>Callus growth: R-Sq= 89.32%, <sup>2)</sup>Polysaccharide: R-Sq = 92.19%

kinetin/NAA의 최적배지조성을 알기위하여 통계분석하였으며, 그 결과는 Table 2와 같다.

Y<sub>1</sub>의 적합모델은 quadratic model로 유의확률(p-value)이 0.022로 유의성이 있었으며, Table 3과 같이 회귀분석 결과, 결정계수 값은 R<sup>2</sup>= 89.32%로 quadratic model이 적합하였으며, 이 모델에 기초한 회귀식은 다음과 같았다.

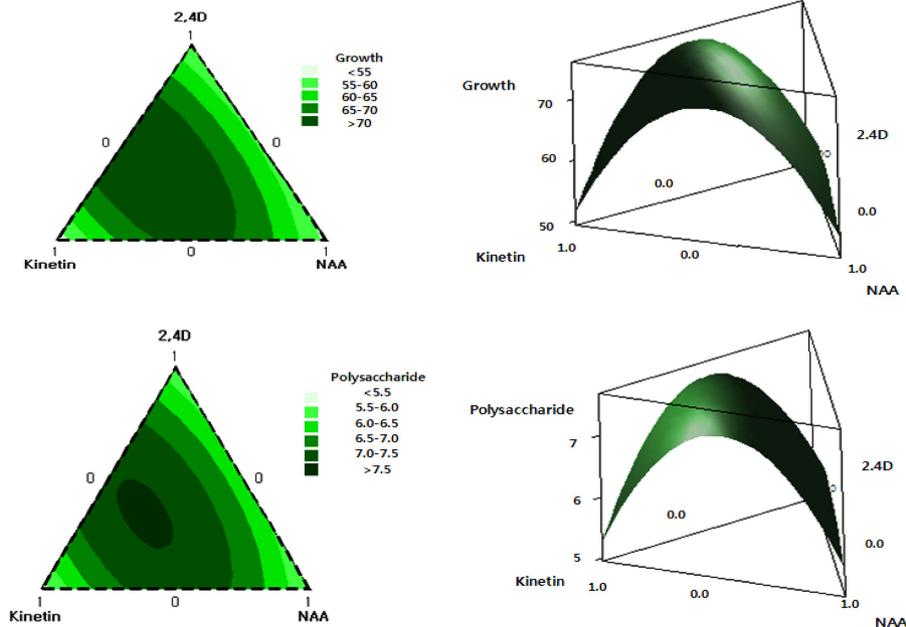
$$Y_1 = 54.31X_1 + 51.50X_2 + 53.23X_3 + 86.03X_1X_2 + 20.56X_1X_3 + 76.29X_2X_3 \quad (R^2=0.8932)$$

모든 인자들은 양(positive)의 효과를 나타내었으며, 회귀계수 값을 보면 X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> 및 X<sub>3</sub>의 각 인자의 효과보다는 X<sub>1</sub>

과 X<sub>2</sub>의 곱 및 X<sub>2</sub>와 X<sub>3</sub>의 곱의 효과(상호작용 효과)가 더 높았다. 특히 X<sub>1</sub>과 X<sub>2</sub> 곱의 회귀계수 값이 가장 높아서 2,4-D와 kinetin이 callus 생육에 가장 큰 영향을 주는 것으로 나타났다.

마찬가지로 Y<sub>2</sub>에 대해서도 X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> 및 X<sub>3</sub>에 대한 분산분석의 결과(Table 2)에서 볼 수 있는 바와 같이, Y<sub>2</sub>의 적합모델은 quadratic model로 유의확률(p-value)이 0.012로 유의성이 있었다. 또, 회귀분석 결과(Table 3), 결정계수 값은 R<sup>2</sup>=92.19%로 quadratic model이 적합하였으며, 이 모델에 기초한 회귀식은 다음과 같았다.

$$Y_2 = 5.548X_1 + 5.281X_2 + 5.444X_3 + 8.147X_1X_2 + 2.474X_1X_3$$



**Fig. 6. 2-D and 3-D response surface plot of 2,4-D, kinetin and NAA for growth and exopolysaccharide production of Aloe vera callus during suspension cultivation.**

$$+ 7.699X_2X_3 \text{ (R}^2=0.9219\text{)}$$

모든 인자들은 callus 성장과 마찬가지로 양(positive)의 효과를 나타내었으며, 회귀계수 값을 보면  $X_1$ ,  $X_2$  및  $X_3$ 의 각 인자의 효과보다는  $X_1$ 과  $X_2$ 의 곱 및  $X_2$ 와  $X_3$ 의 곱의 효과(상호작용효과)가 더 높았다. 특히  $X_1$ 과  $X_2$  곱의 회귀계수 값이 가장 높아서 2,4-D와 kinetin이 callus 생육에 가장 큰 영향을 주는 것으로 나타났다.

혼합물에서의 각 성분들의 조합에 대한 반응값( $Y_1$  및  $Y_2$ )의 변화와 최적점을 가시화하기 위해 이들 혼합물실험 분석을 통하여 구한 각 반응인자에 적합한 모델을 근거로 하여 2-D 등고선도, 3-D 반응표면을 도시하였으며, 그 결과는 Fig. 6과 같다.

$X_1$ ,  $X_2$  및  $X_3$ 의 각 농도가 증가할 수록  $Y_1$  및  $Y_2$ 의 값이 증가하여 최대값을 보인 후 다시 감소하였다. 대체로  $X_1$ ,  $X_2$  및  $X_3$ 의 중심점부근에서  $Y_1$  및  $Y_2$ 의 최대값을 나타내었으나 각  $X_1$ ,  $X_2$  및  $X_3$ 의 최적점 범위는 서로 달랐다.

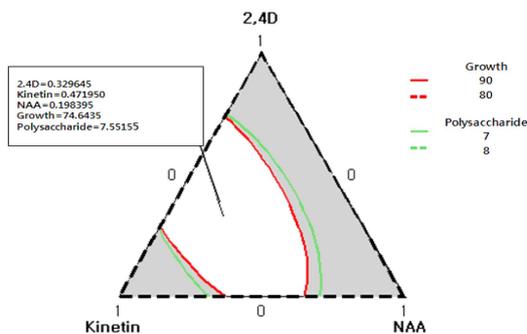
따라서 MINITAB® 15의 overlaid contour plot과 response optimizer를 사용하여  $Y_1$  및  $Y_2$ 의 최대값을 동시에 만족시키는  $X_1$ ,  $X_2$  및  $X_3$ 을 구하였으며, 그 결과는 Fig. 7과 같다.

최대의 callus 생육은 18.69 g/L(74.76 mg/4 mL) 그리고 최대의 세포의 다당 생성은 2.52 g/L(7.55 mg/3 mL)이었다. 이때의 조성은 2,4-D 11.82  $\mu$ M, kinetin 13.84  $\mu$ M, NAA 4.34  $\mu$ M로 이를 최적 배지 조성으로 하였다.

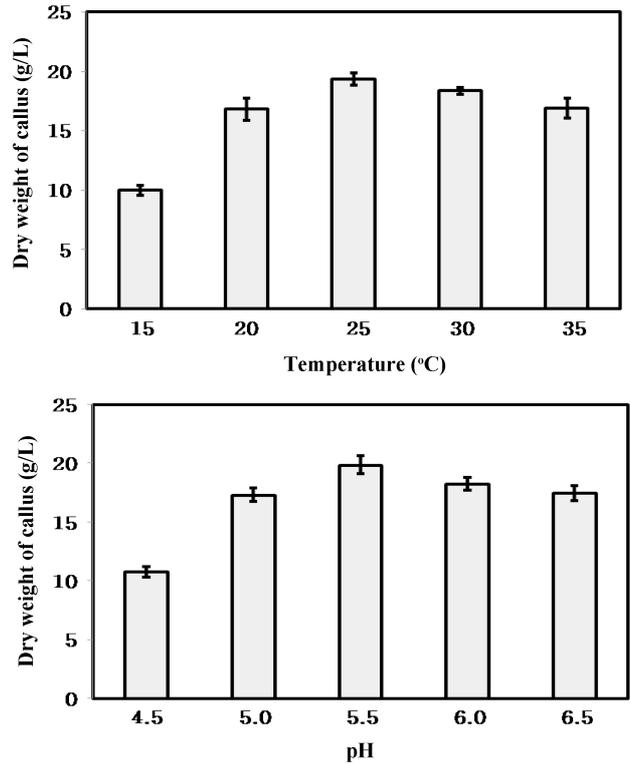
Callus의 생육량은 참당귀의 값과 비슷한 값으로 비교적 식물에 비해 매우 높은 편이었다(Kim et al., 2006). 아울러, 세포의 다당량도 비교적 높은 편이었으며, 특히 이 값을 알로에 생잎(0.65 g/L)과 비교하면 약 3.6 배 높은 값이었다. 따라서 scale-up 및 수출의 향상 등을 통해 aloe callus의 현탁배양이 알로에 유효다당의 새로운 대체법으로 활용될 수 있는 가능성이 충분하다고 판단하였다.

**최적 배양조건의 검토**

현탁배양을 통한 callus 증식 및 세포의 다당의 최대 생



**Fig. 7. Optimization of callus dry weight and extracellular polysaccharide production during suspension cultivation of *Aloe vera* callus using by MINTAB 15.**



**Fig. 8. Effect of temperature and pH on the growth of *Aloe vera* callus during suspension culture.**

성을 위한 최적 배양온도와 pH를 조사하였다. 즉, 3% sucrose를 함유한 MS 기본배지에 2,4-D 11.82  $\mu$ M, kinetin 13.84  $\mu$ M 및 NAA 4.34  $\mu$ M를 첨가한 최적 배지하에서 서로 다른 온도(15-35°C) 및 pH(4.5-6.5)의 일정온도와 pH에서 2주간 배양하여 callus 증식과 세포의 다당의 생성을 조사하였다. 그 결과 현탁배양된 callus의 증식(Fig. 8)은 callus 배양에서의 마찬가지로 모두 25°C, pH 5.5에서 최대이었으며, 그 값은 각각 19.33 g/L, 19.85 g/L로 8주간 callus 배양으로 얻은 값의 약 2 배나 향상되었고, 세포의 다당생산(Fig. 9)도 최적 온도 25°C와 pH 5.5로 callus 배양에서의 동일하였다. 이때의 세포의 다당 생성량은 각각 2.45 g/L 및 2.41 g/L로 최적배지 조성의 혼합물실험법으로 얻은 최대 이론값과 잘 일치하였다.

한편, 이상의 최적배지조성과 배양조건을 이용하여 *Aloe vera* callus의 현탁배양중 경시변화를 조사한 결과는 Fig. 10과 같이 배양기간 중 callus의 생육은 세포 분열기(0-4 일), 신장기(4-12 일) 및 정지기(12 일 이후)의 3 단계로 진행되어 전형적인 세포생육의 형태를 나타내었다. callus 증량은 배양 2 주 후, 약 20.38 g/L를 나타내었다. 세포의 다당 역시 Fig. 10에서 볼 수 있는 바와 같이, 생육과 연동하여 시간경과에 따라 세포의 다당 생성이 증가하였으며, 약 2 주 후, 약 2.51 g/L의 최대값을 나타내었고, 역시 배지 최적화의 결과와 잘 일치하였다.

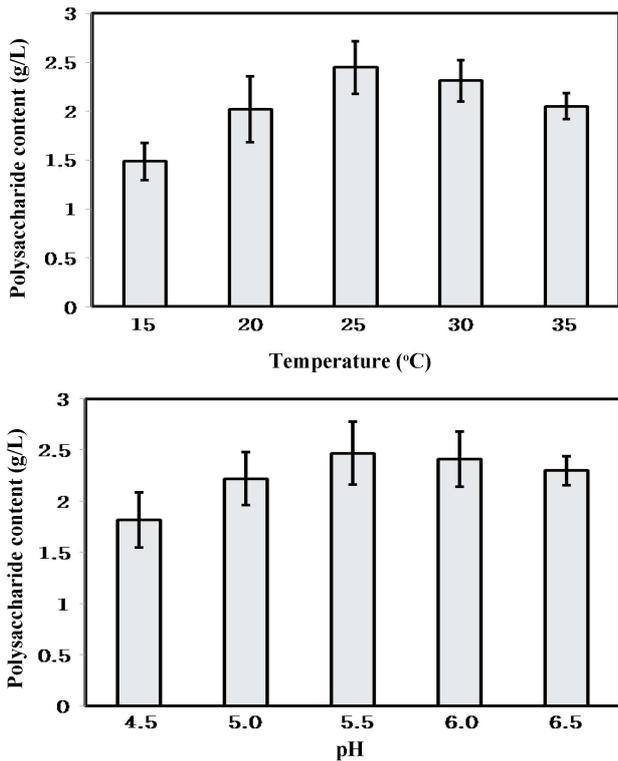


Fig. 9. Effect of temperature and pH on the extracellular polysaccharide production during suspension culture of *Aloe vera* callus.

이러한 증식연동형의 세포의 다당생산은 Becker et al. (1964)에 의해 보고된 바 있는 데, 이에 의하면 *Acer psedoplatanus*의 세포의 다당은 회분배양에서 증식과 함께 생산된다고 하였다. 특히, Glicklis et al.(1998)은 식물현탁 배양에 의한 다당 생산의 실험 및 수학적 모델링 연구에서 세포생육, 신장 및 용균, 다당생성, 배지로의 분비 및 가수분해를 고려한 동력학적 구조모델을 제안하였다. 이에 따르면, 죽은 세포는 생세포로부터 생성되지만 용균되어 사라지므로 다당은 생세포에서만 생성되고, 배지에 분비되며, 부분적으로 가수분해 된다고 하였다.

본 연구의 경우도 다당의 생성속도가 증식속도에 비례하여, 세포의 다당이 증식연동형 대사산물로 생성됨을 알 수 있었다.

### 결 론

효율적인 *Aloe vera* callus의 배양연구 일환으로, 현탁배양을 시도하였다. *Aloe* callus의 현탁배양에 의해 얻어진 배양생성물(callus 및 세포외 다당)의 성분특성을 탐색하고, 최대의 callus 생성 및 세포외 다당생산을 위한 최적화를 수행하였다.

*Aloe vera* callus의 현탁배양 생성물로 얻은 세포외 다당

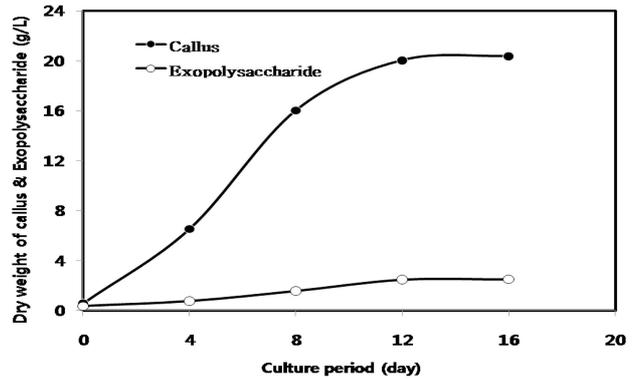


Fig. 10. Time course of callus growth and extracellular polysaccharide production during suspension cultivation of *Aloe vera* callus under the optimized medium and culture conditions.

은 Congo red 비색법에 의한 glucomannan 정량, FT-IR 및 <sup>1</sup>H NMR spectrum 특성 등으로부터 *Aloe vera* 생잎에 존재하는 다당인 β-1,4-glucomannan과 유사함을 확인하였다. 아세틸화 상태로 존재하였으며, GPC에 의한 분자량은 Mw = 490 kD(Mn = 440 kD; polydispersity = 1.115)이었다.

최대의 callus 및 세포외 다당생성을 위한 현탁배양 배지 조성의 최적화는 2,4-D, kinetin 및 NAA의 3 요인으로 6 수준의 혼합물성분에 대한 simplex-centroid design의 혼합물 실험법에 의해 수행하였다.

성분이 다른 10 개 혼합물의 실험구에 따른 callus 성장을 조사하고, 분석한 결과, 2,4-D 11.82 μM, kinetin 13.84 μM 및 NAA 4.34 μM의 조성비에서 callus 성장이 가장 우수하였고, 통계적으로 유의하였다. 이상의 최적 배지하에서 현탁배양의 최적 배양온도, pH 및 배양기간은 각각 25°C, pH 5.5 및 2 주의 배양기간이었다. 최종적으로 최적화된 배지 및 배양조건하에서 callus 및 세포외 다당생성의 경시변화를 조사한 결과, 세포외 다당의 생성은 callus의 생육과 연동되었고, 약 2 주후 callus 및 세포외 다당 생성이 최대값을 보였으며, 그 양은 각각 약 20.4 g/L 및 2.5 g/L이었다. 또 이 실험값은 혼합물실험법으로 얻은 최대 이론값과 잘 일치하였다.

### 참고문헌

Baek JH. 2008. Development of functional materials from *Aloe*

- vera gel fractions with different molecular sizes and their functionality characterization. Ph. D. Thesis, Kangwon National University, Chuncheon, Korea.
- Becker GE, Hui PA, Albersheim P. 1964. Synthesis of extracellular polysaccharides by suspension of *Acer pseudoplatanus* cells. *Plant Physiol.* 39: 913-920.
- Blafkova P, Synytsya A, Copikova J. 2004. Chitin-glucan complex from *Agaricus blazei*, a potential raw material for production of food additives. *Czech J. Food Sci.* 22(special issue): 231-234.
- Burke D, Kaufman M, Mcneil M, Albersheim P. 1974. The structure of plant cell walls. A survey of the walls of suspension cultured monocots. *Plant Physiol.* 54: 109-115.
- Diehl B, Teichmuller EE. 1998. *Aloe vera*, quality inspection and identification. *Agro. Food Industry Hi-Tech.* 9: 14-16.
- Ebarandu AR, Luta G, Edwards JA, McAnalley BH, Davis B. 2005. Quantitative colorimetric analysis of aloe polysaccharides as a measure of *Aloe vera* quality in commercial products. *J. A.O.A.C. Inter.* 88: 684-691.
- Femenia A, Sanchez ES, Simal S, Rossello C. 1999. Compositional features of polysaccharides from *Aloe vera*(*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. *Carbohydr. Polym.* 39: 109-117.
- Kim YH, Kim IH, Kim DI. 2006. Production of immunostimulating polysaccharide in *Angelica gigas* Nakai suspension cell cultures. *KSBB Journal* 21: 331-335.
- Glicklis R, Mills D, Sitton D, Stortelder W, Merchuk JC. 1998. Polysaccharide production by plant cells in suspension: Experiments and mathematical modeling. *Biotech. and Bioeng.* 57: 732-739.
- McAnalley BH. 1993. Process for preparation of aloe products. European Patent WO89/06539.
- Maruyama K, Goto C, Numata M, Suzuki T, Nakagawa Y, Hoshino T, Uchiyama T. 1996. O-Acetylated xyloglucan in extracellular polysaccharides from cell-suspension cultures of *Mentha*. *Phytochemistry* 41: 1309-1312.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantaru* 15: 473-497.
- Otsuji K, Honda Y, Sugimura Y, Takei A, Tejima T. 1995. Production of polysaccharides by plant cell culture and their applications to cosmetics. *Plant Tissue Culture Letters* 12: 8-15.
- Pugh N, Ross SA, ElSohly MA, Pasco DS. 2001. Characterization of aloeride, a new high-molecular-weight polysaccharide from *Aloe vera* with potent immunostimulatory activity. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1030-1034.
- Reid S, Sims IM, Melton LD, and Gane AM. 1999. Characterisation of extracellular polysaccharides from suspension cultures of apple (*Malus domestica*). *Carbohydrate Polymers* 39: 369-376.
- Reynolds T, Dweck AC. 1999. *Aloe vera* leaf gel: A review update. *J. Ethnopharmacol.* 68: 3-37.
- Scheffé H. 1963. The simplex-centroid design for experiments with mixtures. *J. Roy. Statist. Soc. B25*: 235-263.
- Yaron A. 1993. Characterization of *Aloe vera* before and after autodegradation and stabilization of the natural fresh gel. *Phytother. Res.* 7: S11-S13.