간행물 등록번호
NNIBR-2024-0000354-10

조직배양기술을 이용한 유용 담수식물 증식 연구

Research on Propagation of Useful Freshwater Plants using Tissue Culture Technology

생물소재연구부

국립낙동강생물자원관

발간등록번호: NNIBR-2024-0000354-10

조직배양기술을 이용한 유용 담수식물 증식 연구

담수생물연구본부 이용기술개발실 생물소재연구부

신수영, 김태진, 최지수, 김의진,
서민정, 박상언, 여현지, 김근호

Research on Propagation of Useful Freshwater Plants using Tissue Culture Technology

Su Young Shin, Tae Jin Kim, Ji Su Choi,
Eui-Jin Kim, Min Jeong Seo, Sang Un Park,
Hyeon Ji Yeo, Guen Ho Kim

Bio-resources Research Division
Using Technology Development Department
Nakdonggang National Institute of Biological Resources

2024

목 차

표 목차

그림 목차

초 록

천연물 시장이 지속적으로 확대되면서 국내 생물자원(식물)을 이용한 화장품, 식·의약분야 소재 개발 및 활용이 증대되고 있으며 산업화 적용을 위해 품질이 동일하고 안정된 원료나 소재의 생산이 끊임없이 요구되어지고 있다. 이에 대한 해결법으로 식물조직배양기술이 주목받고 있으며 모식물체로부터 완전한 식물체로 재생 할 수 있는 식물의 전형성능을 활용하여 천연 소재 안정적 확보, 유용물질 생산 연구 등을 통해 다양한 생물산업 분야에 적용되고 있다.

본 연구과제는 자원관에서 연구개발 되고 있는 유용 담수식물(생리활성 특허소재 및 기술이전 소재)의 생물산업 활용 증대를 위하여 조직배양기술을 이용하여 환경에 제약을 받지 않는 안정적인 소재 확보 및 생리활성 연구로 산업화 활용 가치를 창출하고자 연구를 수행하였다.

당해연도 조직배양 후보소재로 선정된 담수식물 3종의 종자발아실험, 기내식물체 확보 및 조직배양 연구를 수행하였다. 조직배양 증식소재의 활용범위 확대를 위해 항염 및 항암 등의 생리활성 연구를 수행하였다.

그 결과, 후보소재 3종의 종자 발아 및 기내식물체를 확보하였고 조직배양기술을 통해 후보소재 1종의 캘러스 및 부정근을 유도하여 복합호르몬 조건 내에서 배양조건을 최적화하여 증식기술을 2건을 개발하였다. 또한, 캘러스 증식 소재의 항염, 항암 활성 연구결과, 염증 유발인자인 LPS 처리 후 NO 생성 억제 효과를 확인하여 항염 효과를 발견하였으며, 대장암세포 증식 억제 효과를 확인하여 항암효과를 발견하였다.

본 연구를 통해 조직배양 기술을 활용한 증식 기술의 토대를 마련하여 소재 확보의 기반을 구축하였다. 또한, 연구 결과를 바탕으로 논문 발표 및 특허 출원과 같은 성과를 도출하였으며, 보도자료 등 언론 홍보를 통해 생물 산업에서 담수식물 소재 가치를 제고하는데 기여하였다.

I. 서론

1. 연구목적

○ 자원관에서 기초·심화연구를 통해서 발굴되고 있는 유용 담수식물(생리활성 특허 소재 및 기술이전 소재)의 생물산업 활용 증대를 위한 담수식물 증식 연구

○ 조직배양기술을 이용하여 자연을 훼손하지 않고 환경변화에 영향을 받지 않는 안정적인 소재 확보

○ 유용 담수식물 조직배양 캘러스 소재의 생리활성 증진 연구 및 대량배양 연구를 통해 천연물 소재 바이오산업 활성화 기여

2. 연구의 필요성

가. 정책적 배경

○ “생물자원관의 설립 및 운영에 관한 법률(20.02.)”에 따라 생물자원의 지속가능한 이용에 기여하고자 담수생물분야의 생물자원 보전·이용 기술 개발 및 실용화·산업화지원 사업 추진 필요

○ “제1차 생물자원관 기본계획(2021～2025년)”에 따라 (1)생물자원 발굴 및 주권확보 강화를 위해 생물자원 가치탐색을 통한 원천소재 발굴 강화, 생물소재화 융합연구 추진, (2)생물자원의 지속가능한 활용 기반 조성을 위해 우수 생물소재 대량증식 및 실용화 연구 필요

○ “제4차 국가생물다양성전략(2019~2023년)”에 따라 생물다양성 보전 및 증진 및 생물다양성 이익고유 및 지속가능한 이용을 위해 생물자원의 보존·증식기술 개발 고도화와 지속가능한 생태자원 활용 활성화 필요

나. 산업적·기술적 배경

○ 조직배양기술은 식물세포·조직이 생육조건에 따라 독립된 개체로 분화할 수 있는 식물의 전형성능*을 이용하여 기내 환경 내에서 영양분이 포함된 멸균 배지에 증식시키는 기술로 모개체와 동일한 특성을 갖는 식물개체를 생산할 수 있음

○ 조직배양기술은 몸체가(바이오매스)가 작은 초본식물, 성장이 더딘 목본식물, 종자확보나 발아가 어려운 소재, 재배 시에 유효성분이 달라지는 경우, 활성은 뛰어나나 체내 함량이 매우 적은 경우에 원활한 소재확보 및 유용물질 생산을 위해서 활용되고 있는 기술임

○ 조직배양기술은 다양한 분야(농업, 환경, 생명자원 보존, 생명공학, 식·의약 분야)에서 적용하여 신품종육종, 무병 우량묘의 대량생산, 식물종의 보존 및 증식, 생명공학 기술과 융합한 GM(Genetically Modified)작물의 개발, 식물유래 기능성 2차 대사산물의 생산 및 바이오의약품 생산 등에 활용이 가능

○ 조직배양기술 기반 유용 활성물질 생산 연구는 유용 대사체 생산에 요구되는 내·외부 환경 요인을 최적화 할 수 있어 유용 활성물질 생산성의 안정성 향상은 물론 재현성 및 수급성 조절에 매우 유리한 연구 수단임

○ 우수한 천연활성 소재를 발굴하여 기업화로 넘어가는 과정에서 소재의 대량 확보가 가장 중요한 관건인 경우가 많으며, 근본적인 해결방법으로 식물조직배양기술이 활용되고 있음. 자연에 서식하는 식물자원을 직접 채취 및 활용하는 것이 아니라 생물반응기내 세포배양을 통해 증식 및 생산하기 때문에 환경파괴로부터 자유롭고 적극적인 자연환경 보존 수단으로도 활용이 가능

3. 연구동향

가. 국내·외 연구동향

○ 농촌진흥청은 토종 인진쑥의 캘러스를 배양 후 뿌리조직을 유도하여 말라리아 치료제의 원료로 이용되는 물질인 ‘아르테미시닌“을 식물 체외로 배출하게 함으로써 유효물질의 순도를 높이고 생산량도 3배 이상 향상시킴(농업경제신문 2021.04)

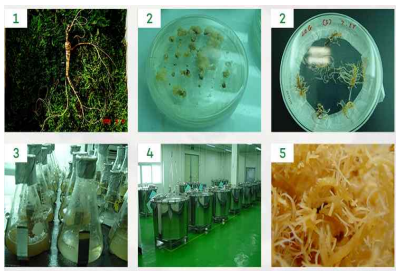
○ 한국생명공학연구원은 높은 효능을 가진 자생식물 고삼과 헐떡이풀로부터 캘러스 유도 및 증식과정을 거쳐 가장 최적의 배양 조건을 구명하였으며 대사체 생합성 관련 전사체 발현연구 및 항염 활성을 갖는 ‘티아렐릭산’이 4배 증대된 캘러스 세포주를 선발하여 유효성분 함량증진 기술개발에 성공함(과학기술정보통신부 2020.10.)

○ 미국 MIT 연구진은 백일홍의 캘러스 배양을 통해 나무와 같은 목질화 세포로 분화시키는 기술을 개발하여 연구결과를 국제 학술지(Journal of Cleaner Production, 20.12.)에 게재하였으며 식물을 기반으로 한 건축자재 등 산업용, 가정용 목재를 생산하는 과정에 드는 시간과 비용을 크게 줄일 수 있을 것으로 기대(사이언스타임지 2021.01)

○ 최근 5년간(2017년~2021년) 국내 식물 조직배양 R&D 투자는 621.8억원으로 평균 124.4억원으로 조사되었으며(NTIS R&D 투자현황분석), 천연물, 기능성 물질, 의약 관련 조직배양연구는 식물 대량생산 및 형진전환 연구와 더불어 생명과학 및 보건의료 분야에서 많은 비중을 차지함

○ 국내 조직배양기술 활용 대표적인 사례는 표 1과 같음

표 1. 조직배양기술 활용 사례

업체명	업체현황	업체 정보
농업회사법인 호트팜		- 경기도 화성시 소재 조직배양 묘생산 판매업체 - 조직배양 생산시설에서 딸기, 고구마, 샤인머스켓 조직배양 무병묘 생산판매
마고플랜츠		- 본사는 서울 강남에 소재하며 전북 전주시 소재 연구소와 순창군 사업장 운영 - 2014년에 씨감자 사업법인으로 설립, 조직배양 씨감자 생산업체
㈜ 바이오밸류		- 제주특별자치도 서귀포시 소재 산삼배양근 생산 및 판매업체 - 2005년부터 농약성분 및 유해중금속이 검출되지 않는 산삼배양근 개발 및 제품 출시

4. 연구추진체계 및 추진일정

가. 연구추진체계

(1) 연구단계별 추진내용

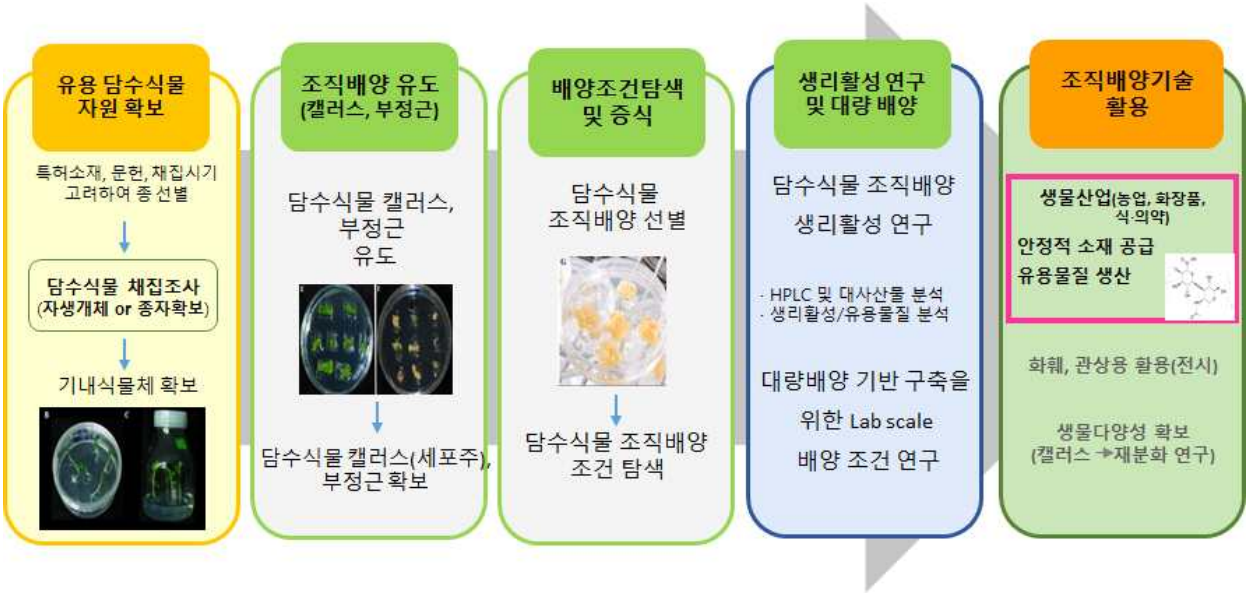


그림 1. 연구 추진체계

(2) 연차별 추진내용

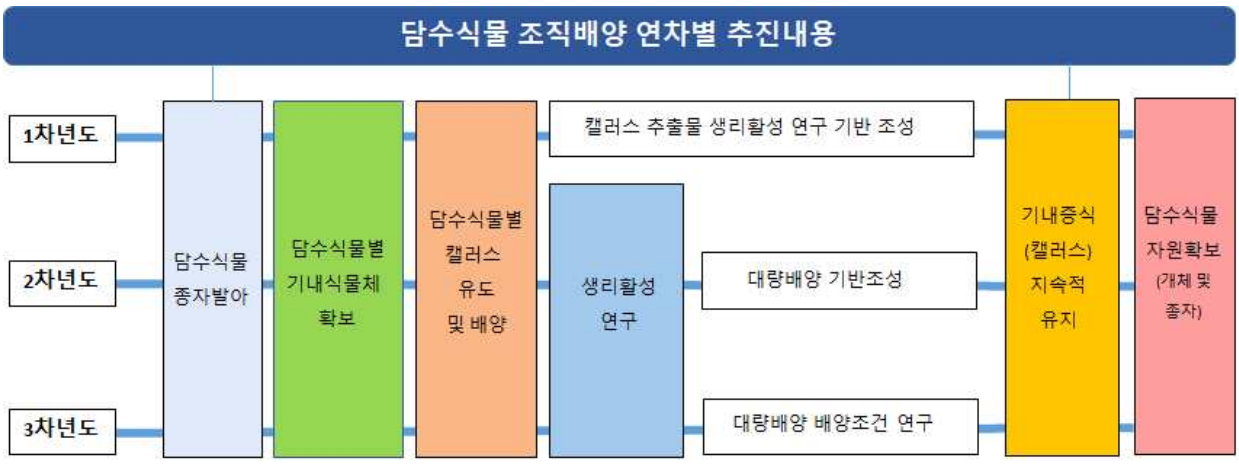


그림 2. 연차별 연구추진내용

나. 추진일정

표 2. 연구추진일정

추진일정 / 연구 내용	1/4			2/4			3/4			4/4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. 캘러스 유도 및 증식	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
				담수식물 배양 유도 및 증식								
2. 캘러스 추출물의 생리활성 연구		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
				생리활성 연구								
3. 3차년도 후보소재 자원 확보			■	■	■	■	■	■	■	■	■	
				개체 및 종자 채집								
과제진도(%)	15%			30%			30%			25%		

II. 연구내용 및 방법

1. 조직배양기술 활용 유용 담수식물의 배양(캘러스, 부정근 등) 유도

가. 종자 발아 및 기내식물체 확보

○ 종자소독은 70% 에탄올에 5분간 교반하고 2회 수세한 후, 0.2%에서 2%사이 NaOCl 및 0.2% tween 20을 처리하고 20분~30분 동안 교반한 후 멸균수로 3회 수세하여 소독하였다. 발아를 촉진하기 위해 지베렐린(GA_3) 200ppm에 침지한 뒤 저온(4℃) 환경에서 24시간 동안 처리하였다. 이후 멸균수로 1회 세척한 후 MS, SH, B5 배지에 종자를 파종하였다. 배양온도를 다양하게 설정하고 장일(16h Light/8h Dark) 조건의 배양기에서 발아를 유도하였다.

○ 종자 파종 후 종자 발아율을 관찰하고 발아된 개체는 4~6주 동안 무균배양실 내에서 계속 배양한 후 어린 유묘 1개체씩 사각 페트리디쉬(72x72x100cm, incu tissue, SPL)에 각각 이식하였다.

- 발아율(%): (발아한 총 종자수/치상한 종자수)×100

나. 조직절편을 이용한 배양(캘러스, 부정근) 유도

○ 유묘를 이식한 후 6-8주 정도 배양한 개체를 캘러스 및 부정근 유도에 활용하였으며. 각 식물의 잎 조직을 1cm 크기로 절단하여 식물생장조절물질인 옥신계열 및 사이토카인 계열 9종류를 농도별로 첨가한 MS배지에 치상하여 24 ℃, 암조건의 배양실에서 캘러스 및 부정근을 유도하였다.

2. 유용 담수식물 배양조건 탐색 및 증식

가. 캘러스 배양조건 탐색 및 증식

○ 유도된 캘러스는 0.6% plant agar가 첨가된 1/2MS with vitamin and MES(3% sucrose, pH 5.8 조정) 배지를 제조하여 멸균한 뒤 식물생장호르몬 종류와 농도조건을 다르게 첨가하여 100x20 mm petri dish(SPL)에 30 ml 씩 부은 후 건조시킨 고체 배지에 이식하였고 4주 동안 암 조건에서 배양하였다. 캘러스가 잘 자라는 배지조건을 확인하여 새로운 배지에 이식하고 5-6주 간격으로 계대배양을 실시하였다.

나. 부정근 배양조건 탐색 및 증식

○ 유도된 부정근은 0.6% plant agar가 첨가된 1/2MS with vitamin and MES(3% sucrose, pH 5.8 조정) 배지를 제조하여 멸균한 뒤 식물생장호르몬 종류와 농도조건을 다르게 첨가하여 100x20 mm petri dish(SPL)에 30 ml 씩 부은 후 건조시킨 고체 배지에 이식하였고 4주 동안 암 조건에서 배양하였다. 증식된 부정근은 새로운 배지에 이식하여 2-3주 간격으로 계대배양을 실시하였다

3. 유용 담수식물 생리활성 연구

가. 마우스 대식세포 RAW264.7에 대한 항염증 활성

○ 마우스 대식세포 RAW264.7을 96-well plate에 seeding하고 24시간 동안 37℃, 5% CO_2 환경에서 배양하였다. 24시간 이후 96-well plate에 각 well 당 Lipopolysaccharide (LPS)를 2 ㎍/ml의 농도로 1시간 동안 처리하고 시료 및 DMSO를 설정한 농도로 처리하였다. 24시간 이후, 상등액 100 ㎕을 새로운 96-well plate에 옮기고 Griess assay를 이용한 Nitric oxide (NO) 생산량 확인하였다. 남아있는 100 ㎕의 cell에 MTS reagent 20 ㎕씩 각 well에 분주하여 2시간 이후 cell viability를 측정하였다.

나. 인간 대장암 세포주 HCT116에 대한 항암 활성

○ 인간 대장암 세포주 HCT116를 96-well plate에 seeding하고 24시간 동안 37℃, 5% CO_2 환경에서 24시간 배양하였다. 각 well 당 -FBS를 이용해 시료를 설정한 농도로 희석하여 처리하고 24시간 배양한 후 MTS reagent 20 ㎕씩 각 well에 분주하여 2시간 이후 cell viability를 측정하였다.

○ 인간 대장암 세포주 HCT116를 6-well plate에 seeding하고 24시간 동안 37℃, 5% CO_2 환경에서 24시간 배양하였다. 각 well에 존재하는 +FBS 배지를 제거 후, -FBS로 배지로 변경하고 시료를 설정한 농도로 처리하였다. 24시간 배양한 후, cell scrapper를 이용하여 cell을 E-tube에 수확(암세포의 경우, 상등액에 존재하는 cell도 모두 수확)하였다. 각 샘플 별 cell을 sonicator를 이용하여 파쇄하고 4℃, 3000rpm, 15min 동안 원심분리 후, 상등액을 새로운 E-tube로 옮겨 냉동 보관하였다. 단백질 정량 후, 설정된 단백질 농도로 로딩 하여 western bolt을 수행하고 항암단백질 발현여부를 확인하였다.

○ 대사체분석을 위해 각 조직배양 추출물을 제조하고 HPLC, LC-MS, UV 분석을 수행하여 HPLC 프로파일링 및 2차 대사산물을 분석하였다(표 3).

표 3. 액체크로마트그래피(LC) 조건

액체크로마토그래피(LC) 조건:
- 유속: 0.25 mL/min
- 컬럼온도: 상온
- 용매 조건
- 시료 주입량: 1 μL

시간(분)	유속(mL/분)	A 용매(%)	B 용매(%)
0.00	0.25	90	10
1.00	0.25	90	10
16.00	0.25	5	95
19.00	0.25	5	95
19.10	0.25	90	10
20.00	0.25	90	10

4. 유용 담수식물 Lab-scale 대량배양 연구기반 조성

가. 대량배양 연구기반 조성을 위한 자료조사

○ 차년도 대량배양 연구를 수행하기 위해 실험실 내에서 구축 가능한 배양수준 및 바이오리액터 활용 등을 조사하였다.

나. Lab-scale 대량배양 연구 기반 구축

○ 실험실 내에서 Lab-scale 대량배양 연구를 수행하기 위해서는 용량별로 액체배양을 할 수 있는 교반기가 필수적이다. 장비도입 심의를 거쳐 50 ml에서 2000 ml까지 배양 할 수 있는 장비를 구축하였다.

5. 유용 담수식물 조직배양 후보소재의 자원 확보

가. 유용 담수식물 조직배양 후보소재 선정 및 자원 확보

○ 자원관에서 보유하고 있는 특허출원 소재 중에서 식물 35종을 선별하여 문헌조사, 기술이전 및 소재확보 용이성을 고려하여 후보소재를 선별하였고 기술이전 등의 우선순위를 고려하여 당해연도 후보소재 3종 및 25년 후보소재 3종을 조직배양 연구소재로 선정하였다(표 4).

표 4. 유용 담수식물 조직배양 후보소재 선정(당해연도 및 차년도)

우선순위	담수식물증식 후보소재	조직배양 연구	생리활성 (특허)	문헌조사 (특허, 논문)	기술이전	소재확보 용이성 (구매, 대량채집)	자원 확보
1	콩제비꽃	2023년	발모	X	2021, 2022	X	기 확보
2	여뀌바늘		항균	X	2020	X	기 확보
3	큰고랭이	2024년 (당해연도)	항염	X	2022	X	23년 확보
4	삿갓사초		발모	X	2022	X	23년 확보
5	뚜껑덩굴		항진균	X	-	X	23년 확보
6	나도미꾸리낚시	2025년 (차년도)	항당뇨	X	-	X	종자확보
7	곱슬사초		항염	X	-	X	개체확보
8	큰도꼬마리		미백	X	-	X	종자확보

나. 유용 담수식물 조직배양 후보소재 자원 확보

○ 당해연도 후보소재는 야생에서 확보한 종자와 개체채집으로 기내에서 증식하여 종자를 채종한 후 종자를 정선하여 저온에서 보관하면서 연구수행 시 사용하였다. 차년도 후보소재 중 나도미꾸리낚시는 함안에서 개체와 종자를 채집하였고, 곱슬사초는 경북 상주시에서 개체를 채집하였으며 큰도꼬마리는 경남 창녕에서 종자를 확보하였다.

III. 연구결과 및 고찰

1. 조직배양기술 활용 유용 담수식물 배양(캘러스, 부정근) 유도

가. 종자발아 및 기내식물체 확보

○ 큰고랭이 종자는 수과에 부착된 상태로 채종하여 실온에서 건조 한 후 입선법과 풍선법을 활용하여 종자를 정선하였으며, 정선된 종자는 저온 상태에서 보관하였다. 종자발아를 확인하기 위해 먼저 종자소독을 수행하였다. 70% 에탄올을 처리하고 5분간 교반한 후 멸균수로 2회 수세하였다. 2% NaOCl과 0.2% tween 20을 혼합 처리하여 20분 동안 교반한 후 멸균수로 3회 수세하였다. 발아 촉진을 위해서 종자를 지베렐린 200ppm 용액에 담가 4 ℃에서 24시간동안 침지 한 후에 멸균수로 종자를 1회 세척하였다. 준비한 세 종류의 배지(1/2 MS, 1/2 SH, 1/2 B5)에 종자를 치상하였다. 발아는 치상 후 4주째에 관찰되었으며, 발아온도는 30℃에서 가장 적정하였으며 발아율은 1/2 MS 53.8%, 1/2 SH 57.1%로 확인하였다. 조직배양용 기내식물체를 확보를 위해 발아 후 3~4주 동안 자란 큰고랭이 유묘를 1개체씩 Incu tissue(72x72x100cm, SPL)에 각각 이식하여 무균배양실에서 증식하였다. 배양 후 7~8주 사이에 줄기의 길이가 15cm이상 생장 한 것을 확인하였다(그림 3).

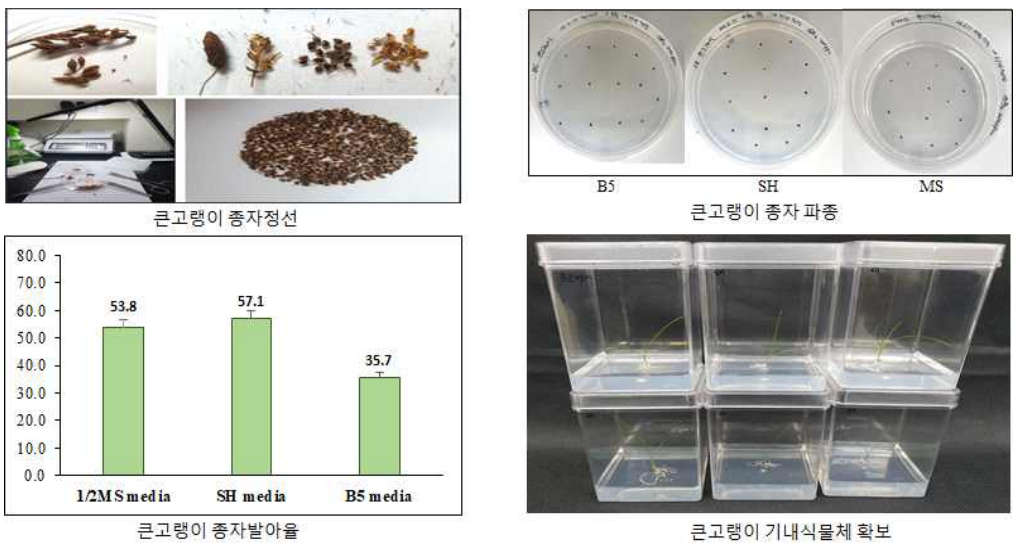


그림 3. 큰고랭이 종자발아 및 기내식물체 확보

○ 삿갓사초 종자는 수과에 달린 상태로 채종하여 실온에서 건조한 후 수과 내에 종자를 털어내고 실온에서 한번 더 건조하였다. 종자를 감싼 얇은 종피를 제거하여 입선법과 풍선법을 활용하여 종자를 정선을 하고 저온상태에서 보관하였다. 종자발아를 확인하기 위해 먼저 종자소독을 수행하였다. 70% 에탄올을 처리하고 5분간 교반한 후 멸균수로 2회 수세하였다. 2% NaOCl과 0.2% tween 20을 혼합 처리하여 20분 동안 교반한 후 멸균수로 3회 수세하였다. 발아 촉진을 위해서 종자를 지베렐린 200ppm의 용액에 담가 4℃에서 24시간동안 침지한 후에 멸균수로 종자를 1회 세척하고 준비한 세 종류의 배지(1/2 MS, 1/2 SH, 1/2 B5)에 종자를 치상하였다. 발아는 4주 이후부터 관찰되었고 5주차에 발아율이 최대였으며, 발아온도는 28℃가 가장 적정하였다. 발아율은 1/2 B5 95%, 1/2MS 80%로 확인하였다. 조직배양에 사용할 기내식물체 확보를 위해 3~4주 후에 1개체씩 Incu tissue(72x72x100cm, SPL)에 각각 이식하여 무균배양실에서 증식하였다. 배양 후 8~10주 사이에 잎의 길이가 10cm이상 생장 한 것을 확인하였다(그림 4).

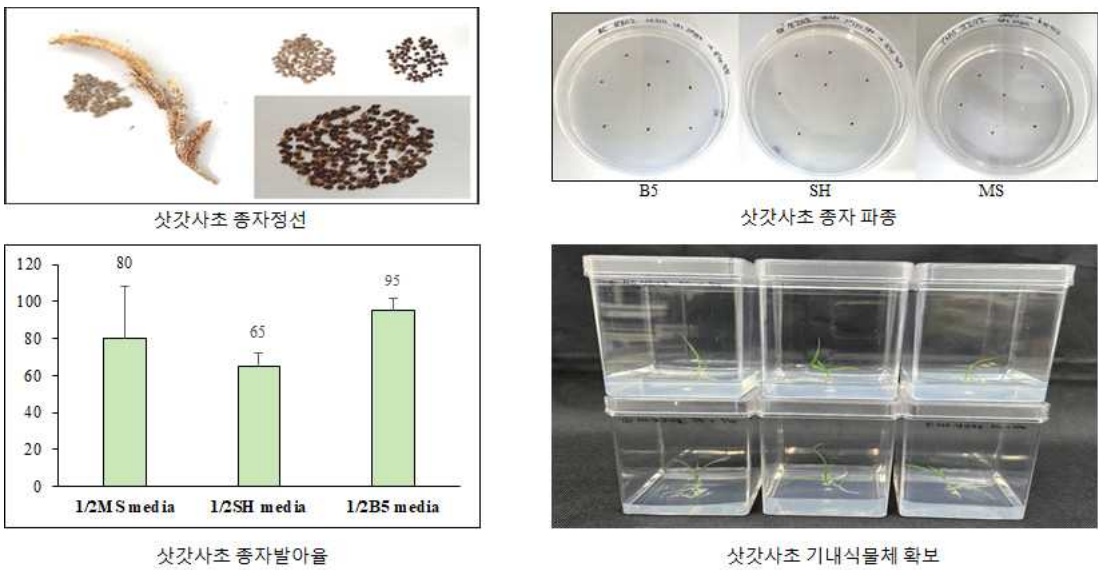


그림 4. 삿갓사초 종자발아 및 기내식물체 확보

○ 뚜껑덩굴 종자는 삭과(삭과 1개당 종자 1개~4개) 그대로 채집 후 실온에서 건조시킨 후 입선법을 활용하여 종자정선을 하고 저온 상태에서 보관하였다. 종자발아를 확인하기 위해 3~5시간 정도 멸균수에 종자를 침지시킨 후 핀셋으로 종자의 두꺼운 종피를 제거한 후 종자소독을 수행하였다. 70% 에탄올을 처리하고 5분간 교반한 후 멸균수로 2회 수세하고 2% NaOCl과 0.2%

tween 20을 혼합 처리하여 30분 동안 교반한 후 멸균수로 3회 수세하였다. 발아 촉진을 위해서 종자를 지베렐린 200ppm 용액에 담가 4℃에서 24시간동안 침지하였다. 24시간 후에 멸균수로 종자를 1회 세척하고 준비한 1/2 SH배지에 종자를 치상하였다. 종자발아는 3~4주 이후부터 관찰되었고 발아온도는 24℃가 가장 적정하였으며 발아율은 1/2 SH 배지에서 30%로 확인하였다. 조직배양에 사용할 기내식물체 확보를 위해 발아 3주 후에 1개체씩 배양병에 각각 이식하여 무균배양실에서 증식하였다. 배양 후 4~5주 사이에 줄기의 길이가 10cm이상 생장 한 것을 확인하였다(그림 5).

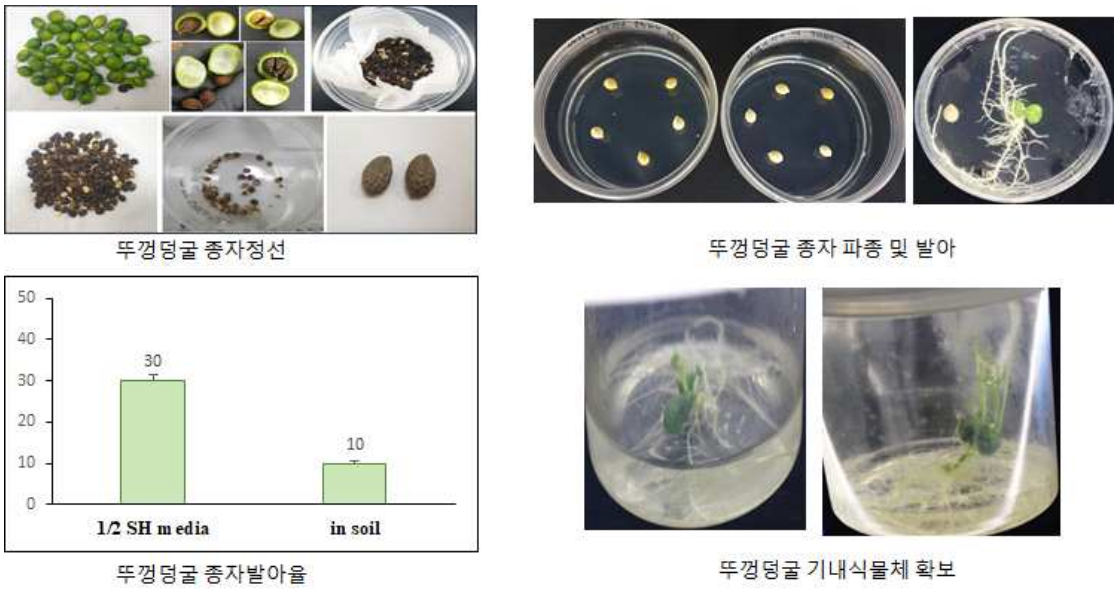


그림 5. 뚜껑덩굴 종자발아 및 기내식물체 확보

나. 기내식물체 조직을 이용한 조직배양(캘러스, 부정근) 유도

○ 큰고랭이와 삿갓사초의 캘러스 및 부정근 유도를 위해서 종자발아를 통해 확보한 기내식물체 줄기와 잎의 크기를 1cm로 절단하여 식물생장호르몬 8종류(2,4-D, IAA, IBA, NAA, Picloram, zeatin, kinetin, TDZ)를 1.0mg/L로 첨가한 3종류(1/2 MS, 1/2 SH, 1/2 B5)의 배지에 순차적으로 조직절편을 치상하였다. 조직배양 유도를 여러 차례 수행하였으나, 세 종류의 배지에서는 캘러스나 부정근이 유도되지 않았다. 현재는 난과나 벼과에서 조직배양 유도 시 사용하고 있는 2종류(N6, 1/2 BM1)의 배지에 식물생장호르몬을 첨가하여 큰고랭이 줄기 조직과 삿갓사초 잎 조직을 활용해 조직배양을 유도 중에 있다.

○ 뚜껑덩굴의 캘러스 유도를 위해서 종자발아를 통해 확보한 기내식물체에서 줄기조직을 확보하여 줄기의 크기를 1cm로 절단한 후 식물생장호르몬 3종류(2,4-D, Dicamba, Picloram)를 각 0.1mg/L에서 4.0mg/L까지 농도를 다르게 한 1/2MS 배지에 조직절편을 치상하였다. 4주 후에 캘러스가 생성되는 것을 확인한 결과 Picloram 1.0mg/L 농도가 포함된 1/2MS 배지에서 캘러스 생성비율이 가장 높았다(그림 6-7).

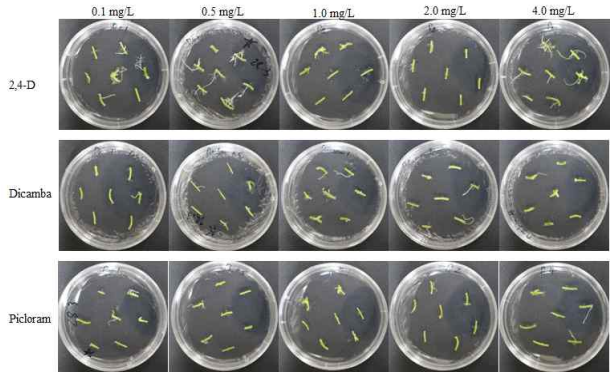


그림 6. 뚜껑덩굴 캘러스 유도

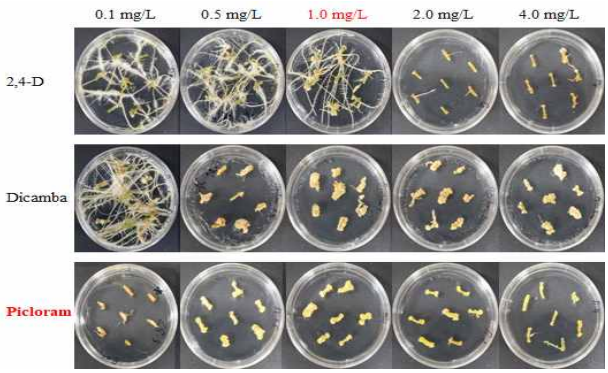


그림 7. 뚜껑덩굴 캘러스 유도 결과

○ 뚜껑덩굴의 부정근(Adventitious Root) 유도를 위해서 종자발아를 통해 확보한 기내식물체 줄기의 크기를 1cm로 절단한 후 식물생장호르몬 3종류(IAA, IBA, NAA)를 각 1.0mg/L 농도로 첨가한 1/2MS 배지에 치상하였다. 3주 후에 부정근이 생성되는 것을 확인한 결과 3종류의 호르몬에서 모두 부정근이 유도되었다(그림 8-9).

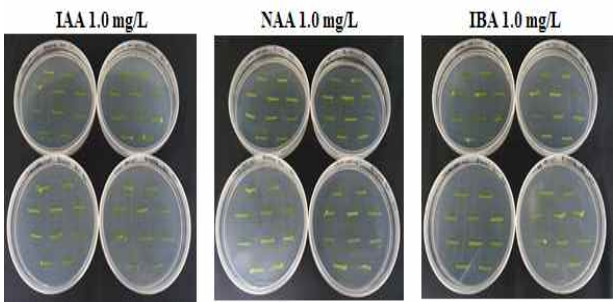


그림 8. 뚜껑덩굴 부정근 유도

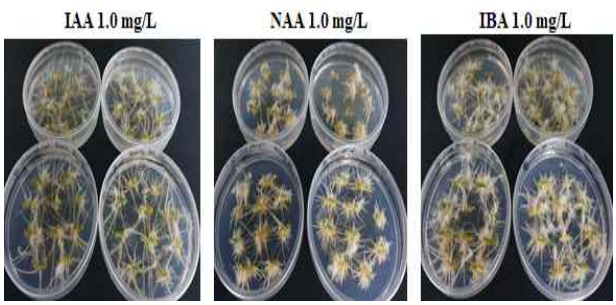


그림 9. 뚜껑덩굴 부정근 유도 결과

2. 유용 담수식물 배양조건 탐색 및 증식

가. 조직배양 캘러스의 배양조건 최적화

○ 유용 담수식물 뚜껑덩굴의 캘러스 유도를 단일호르몬 처리 조건에서 확인하고 생성된 캘러스를 새로운 고체배지에 이식하였다. 캘러스 생성 배양 조건을 최적화하기 위해 복합호르몬 처리를 통해 캘러스 생성이 잘 되는 조건을 찾고자 하였다. 캘러스 형성이 가장 잘 된 옥신류 호르몬 Picloram 1.0mg/L을 기준으로 사이토카인류 호르몬 3종류(kinetin, BAP, TDZ)를 조합하여 캘러스 생성을 확인한 결과, Picloram 1.0 mg/L에 TDZ 0.1 mg/L를 첨가한 복합호르몬 조건에서 캘러스 생성율이 가장 높게 나타났다(그림 10-11).

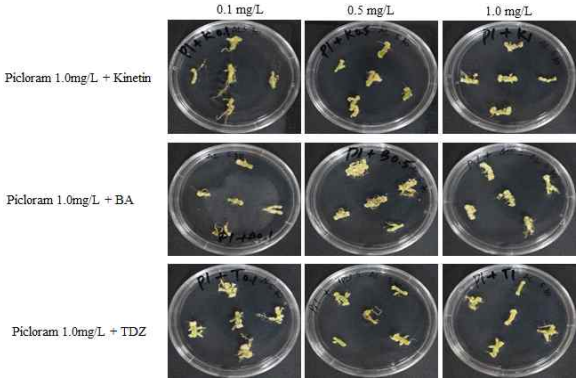


그림 10. 뚜껑덩굴 캘러스 배양조건 탐색

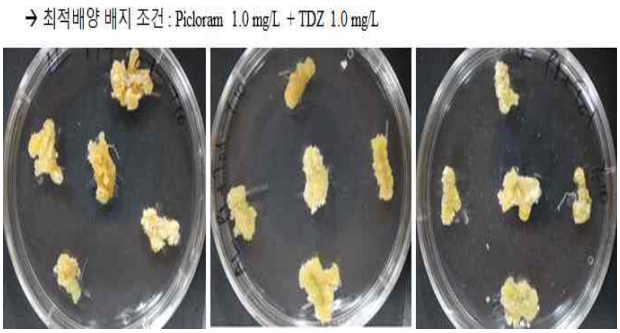


그림 11. 뚜껑덩굴 캘러스 최적 배지조건

나. 조직배양 부정근의 배양조건 최적화

○ 유용 담수식물 뚜껑덩굴의 부정근 유도를 단일호르몬 처리조건에서 확인하고 생성된 부정근을 새로운 고체배지에 이식하였다. 부정근 배양 조건을 최적화하기 위해 복합호르몬 처리를 적용하여 가장 적합한 부정근 배양 조건을 찾고자 하였다. 고체배지 계대배양을 통해 확보한 부정근을 옥신 호르몬 종류별(IAA, IBA, NAA), 농도별로 혼합한 액체배지 50ml에서 배양한 결과 IAA 1.0mg/L, IBA 0.5mg/L, NAA 0.1mg/의 복합호르몬 조건에서 부정근 생성율이 가장 높게 나타났다(그림 12-13).

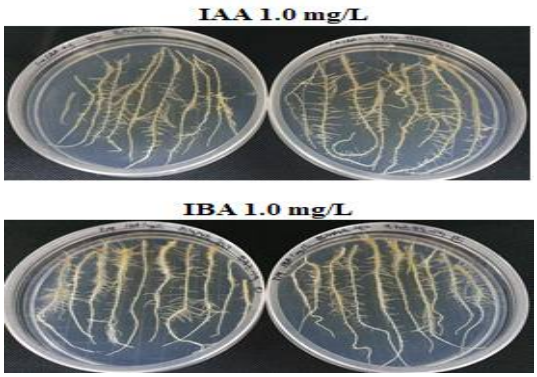


그림 12. 뚜껑덩굴 부정근 계대배양

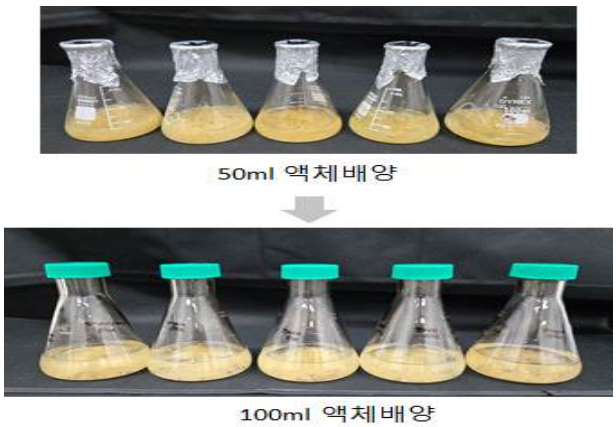


그림 13. 뚜껑덩굴 부정근 최적 배지조건

3. 유용 담수식물의 생리활성 연구

가. 조직배양소재 생리활성 탐색

○ 본 과제는 당해연도 조직배양 소재의 배양유도 뿐만 아니라 전년도 조직배양 소재의 신규 생리활성 연구를 통해 산업화 소재 확대 및 성과확산에서 기여하고자 한다. 이에 따라, 전년도 조직배양 소재 중 여뀌바늘 캘러스의 생리활성을 확인해 보고자 계대배양 한 캘러스의 추출물을 제조하였다. 여뀌바늘 캘러스에 70% 에탄올을 처리하여 24시간 실온에서 추출하여 감압회전농축기로 농축한 후 동결건조를 3일 동안 진행하였다. 완전히 건조된 여뀌바늘 캘러스의 무게를 재고 DMSO 용매에 100mg/ml의 농도로 제조하여 실험에 사용하였다(그림 14).

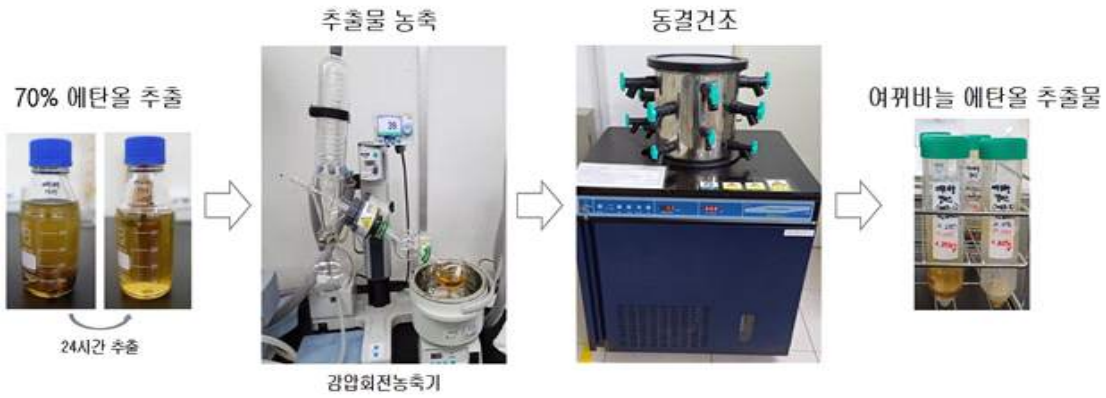


그림 14. 조직배양 추출물 제조

○ 여뀌바늘 캘러스의 추출물을 제조한 후에 대사체분석을 수행한 결과, Epigallocatechin과 Epicatechin과 같은 플라보노이드 물질이 높은 함량으로 확인되었다. 문헌 조사 결과, 여뀌바늘 자생식물에 대한 조직배양 연구는 본 연구과제(‘23년～’24년) 외에 보고된 바 없었으며, 조직배양 추출물의 생리활성 연구도 전무하다.

나. 조직배양소재 항염 활성 연구

○ 본 연구에서는 여뀌바늘 캘러스 추출물의 항염 효과를 평가하기 위해 마우스 대식세포(RAW264.7)를 대상으로 실험을 진행하였다. 먼저 유기용매(DMSO)에 대한 세포 독성을 확인한 뒤, 캘러스 추출물을 처리하여 세포 독성 여부를 평가하였다. 이어서 염증 유발인자인 LPS를 처리한 세포에서 음성대조군, 양성대조군, 그리고 캘러스 추출물의 NO 생성 억제 효과를 비교 분석하였다. 실험 결과, 여뀌바늘 캘러스 추출물은 NO 생성 억제를 통해 항염 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다(그림 15-16).

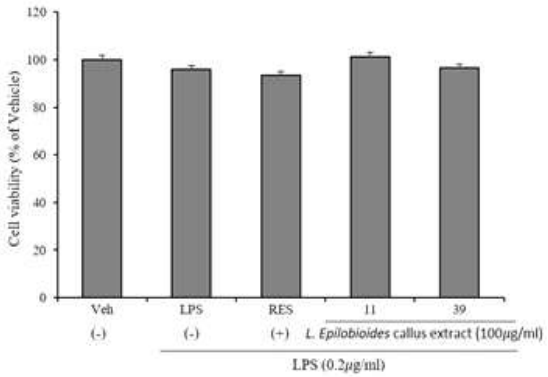


그림 15. 여뀌바늘 캘러스 추출물의 대식세포 생존율

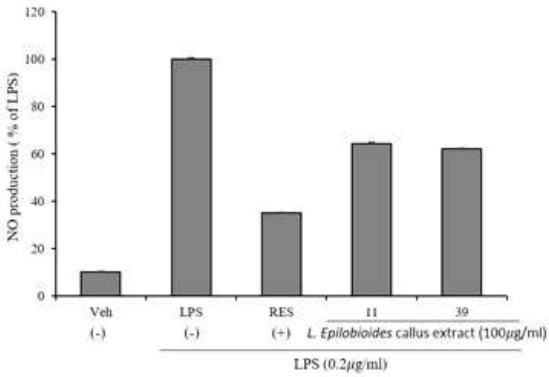


그림 16. 여뀌바늘 캘러스 추출물의 NO 생성 억제

다. 조직배양소재 항암 활성 연구

○ 여뀌바늘 캘러스 추출물의 대장암에 대한 항암 효과를 평가하기 위해 대장암 세포주 HCT116을 대상으로 세포 생존율 실험을 수행하였다. 먼저, 추출물의 용매인 DMSO가 세포에 미치는 독성을 확인하기 위해 대장암 세포주에 농도별로 처리한 결과, DMSO에 의한 세포 독성은 나타나지 않았다. 이어 여뀌바늘 캘러스 추출물의 효과를 비교하기 위해

음성대조군으로 DMSO 용매, 양성대조군으로 대표적인 파이토케미컬인 Resveratrol을 사용하여 세포 생존율을 비교 분석하였다. 실험 결과, 여뀌바늘 캘러스 추출물을 처리한 경우, 무처리군(100%)에 비해 대장암 세포의 생존율이 51.8%와 50.9%로 나타나 대장암세포의 증식을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다(그림 17).

○ 또한, 암세포의 세포사멸을 유도하는 주요 항암 단백질로 알려진 p53과 NAG-1(NSAID-activated gene)의 발현 정도를 확인하기 위해 대장암 세포주에 여뀌바늘 캘러스 추출물을 처리한 결과, 두 항암 단백질의 발현이 증가한 것을 확인하였다. 이를 통해 여뀌바늘 캘러스 추출물이 항암 단백질의 과발현을 유도하여 대장암 세포의 증식을 효과적으로 억제함을 확인하였다(그림 18).

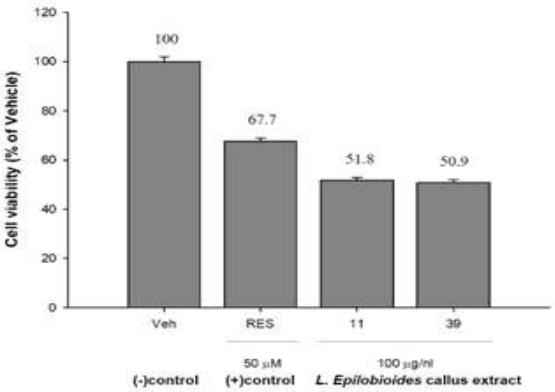


그림 17. 여뀌바늘 캘러스 추출물의 대장암세포 생존율

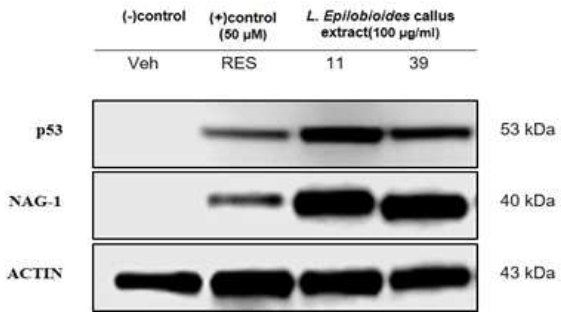


그림 18. 여뀌바늘 캘러스 추출물의 항암단백질 발현

4. 유용 담수식물 Lab-scale 대량배양 연구기반 조성

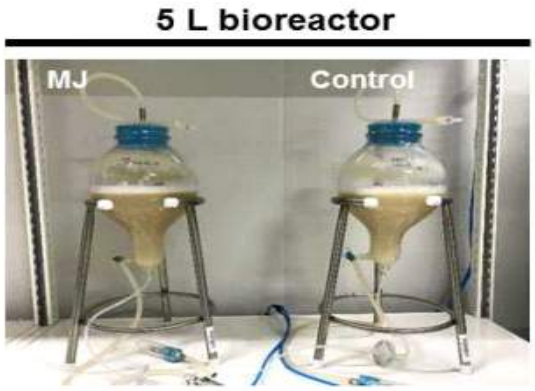
가. Lab-scale 대량배양 연구수행을 위한 문헌조사

○ 차년도 추진할 연구내용 중 Lab-scale 대량배양 연구수행을 위해 문헌조사를 실시하였다. 당해연도에는 문헌조사를 통해 기초자료를 마련하고 차년도에 캘러스, 부정근 등 조직배양 소재의 액체배양 scale-up 과정을 진행하면서 배양 조건을 확립하고자 한다.

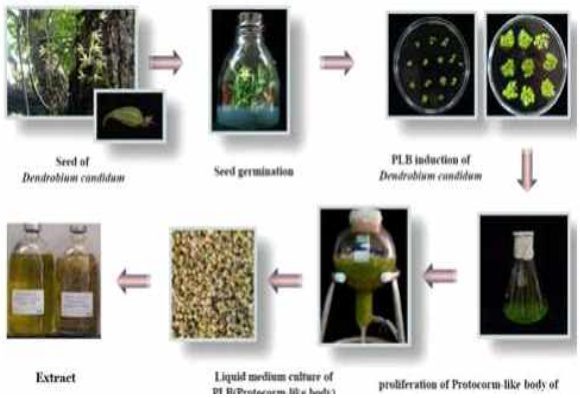
○ 실험실 내에서 조직배양 소재의 액체배양 및 대량배양을 할 수 있는 연구 적정범위 및 연구시설기반 마련이 필요하며, Lab-scale 배양과정은 기존에 확보한 조직배양 소재의 최적 배양조건을 우선으로 용량별 배양조건들을 지속적으로 확립하면서 scale-up을 진행해야 하는 중요한 연구 단계이다(그림 19).

그림 19. 대량배양 연구추진 기술성숙도

○ 식물 조직배양기술은 무균 상태에서 캘러스(세포 덩어리)나 부정근(새로운 뿌리)을 형성하여 효능 성분을 추출하거나 대량 증식에 활용하고 있다. 대량증식은 물리적(온도, 빛, 교반속도 등)조건과 화학적(pH, 영양소, PGR 등) 조건을 고려하면서 액체배양 scale-up을 진행해야 한다. 이후 bioreactor 배양단계 연구가 가능할 것이다. 대량배양 연구기반 조성을 위해 식물 조직배양에서 바이오리액터(bioreactor)를 이용한 대량증식 연구 사례를 조사하였다(그림 20).



연구사례1)
사례1은 자생식물인 고삼과 헐떡이풀을 대상으로 한 연구로 조직배양기술을 통해 유효 성분을 대량 확보하는 방법이 개발되었으며. 특히, 액체배양법과 소규모 바이오리액터를 이용한 연구가 수행되어 생산성을 극대화 할 수 있는 가능성을 입증함.
(출처: 한국생명공학연구원, 2020)



연구사례2)
사례2는 고유 및 희귀한 국내외 식물을 탐색하여, 화장품 소재로 적합한 식물을 선별하고 조직배양을 통해 대량배양 기술을 확립하고 조직배양체의 유용 생리활성 성분을 증대시켜 다기능성을 지닌 화장품 신소재로 개발하여 글로벌 시장 경쟁력을 확보 노력함
(출처: ㈜한국화장품제조, 2014)

연구사례3)
사례3은 천연물을 활용한 산업기술의 경쟁력 강화 및 식물 조직배양 기술을 활용한 산업화 지원을 위하여 조직배양 세포주 은행을 구축하여 기업의 산업화를 지원하고 있음
(출처: 충북테크노파크, 2022)

그림 20. 대량배양 연구사례

나. Lab-scale 대량배양 연구기반 구축

○ Lab-scale 대량배양 연구를 수행하기 위해 액체배양 조건 연구가 필수적이며, 이 연구를 수행하기 위해서 가장 기초가 되는 용량별 액체배양 장비가 필요하다. 현 조직배양연구실은 고체배지 조건의 조직배양 연구가 가능하며 액체배지에 관한 장비부족으로 장비심의신청을 통해 하반기에 액체배양 교반기 2대를 도입하였다. 액체배양 50ml, 100ml, 250ml, 500ml, 1000ml, 2000ml로 단계를 업그레이드 하여 배양 할 수 있도록 교반기의 패널을 교체하면서 사용할 수 있는 교반기를 구축하였다(그림 21).

그림 21. 액체배양 장비 구축

○ 액체배양의 효율적 연구수행을 위해 관련기업의 벤치마킹을 수행하였다. 식물재배를 위한 스마트팜 시스템을 구축하고 있으며 식물 조직배양 연구를 수행하고 있는 기업으로 2000ml 이내 액체배양을 자체적으로 진행하고 scale-up은 대량배양이 가능한 시설을 이용하면서 연구를 수행하고 있다. 본 연구과제에서는 소량 액체배양 시스템을 구축하여 안정화 하는 것이 중요할 것으로 사료된다(그림 22).

그림 22. 바이오기업 벤치마킹

5. 유용 담수식물 조직배양 후보소재 자원 확보

가. 유용 담수식물 조직배양 후보소재 선정

○ 생물산업 지원 가능성을 고려하여 담수식물 조직배양 후보소재를 선정하고자 하였다. 1단계 선정과정으로 기관이 보유한 생리활성 특허소재(2023.12. 기준) 중 식물소재 35종을 대상으로 논문 및 특허 등의 문헌조사를 통해 미연구된 후보소재 20종을 1차로 선정하였다. 그리고 2단계 선정과정으로 기술이전 및 소재확보 용이성을 고려하여 15종을 최종 조직배양후보소재로 선정하였다(표 4).

나. 유용 담수식물 조직배양 후보소재 자원 확보

○ 당해연도 조직배양 후보소재는 삿갓사초, 큰고랭이, 뚜껑덩굴 3종으로 전년도 자원 확보 및 당해연도 종자 추가 확보를 하였으며(표 5), 차년도 후보소재는 선정기준에 따라 나도미꾸리낚시, 큰도꼬마리, 곱슬사초 3종으로 자원을 확보하기 위해 개체 생장시기 및 개화시기 등을 조사하여 식물분류 전문 연구원과 종을 확인 한 후 개체 또는 종자를 확보하였다(그림 23 및 표 6).

표 5. 당해연도 증식 후보소재

구분	종 명	유용성 정보	원종 개체 정보	자원확보
1	**삿갓사초**	· 특허등록: 삿갓사초 추출물을 이용한 발모 촉진 또는 탈모 억제용 조성물 ('23.3) · 기술이전체결 : 2022년 10월	· 채집지: 경북 안동 · 채집일: '23.6.15-16. · 전 초: 20 개체 · 다년생 담수식물	
2	**큰고랭이**	· 특허출원: 큰고랭이 추출물을 이용한 항염증 조성물 ('18.11.) · 기술이전체결 : 2022년 9월	· 채집지: 경북 예천 · 채집일: '23.6.23. · 전 초: 25 개체 · 다년생 담수식물	
3	**뚜껑덩굴**	· 특허출원: 뚜껑덩굴 추출물을 이용한 식물 감염성 진균에 대한 항진균용 조성물 ('22.9.) · 심화연구 진행 중	· 채집지: 충남 논산 · 채집일: '23.10.19. · 종 자: 200 개 · 다년생 담수식물	

나도미꾸리낚시 큰도꼬마리 곱슬사초

그림 23. 조직배양 후보소재 조사지

표 6 차년도 증식 후보소재 자원 확보

구분	종 명	유용성 정보	원종 개체 정보	개체 또는 종자
1	**나도미꾸리낚시**	· 특허등록: 나도미꾸리낚시 추출물을 이용한 항당뇨 조성물 ('24.6)	· 채집지: 경남 함안 · 채집일: '24.6.20-21. · 전 초: 20 개체 · 일년생 담수식물	
2	**큰도꼬마리**	· 특허등록: 큰도꼬마리 추출물을 이용한 피부 미백용 조성물 ('21.9.)	· 채집지: 경북 창녕 · 채집일: '24.6.20-21. · 전 초: 5 개체 · 일년생 담수식물	
3	**곱슬사초**	· 특허등록: 곱슬사초 추출물을 이용한 항염증용 조성물 ('21.5.)	· 채집지: 경북 상주 · 채집일: '24.10.10. · 전 초: 13 개체 · 일년생 담수식물	

IV. 결론

1. 조직배양기술 활용 유용 담수식물 증식 연구

○ 본 연구과제는 유용 담수식물 소재의 안정적 확보 및 생물산업 활용 가치 증대를 위해 기관이 보유한 특허출원(23년 기준) 소재 중 담수식물 35종에 대해 1단계(논문, 특허조사) 및 2단계(기술이전, 소재확보 용이성)을 기반으로 최종적으로 15종을 선별하였고, 종자확보 및 기술이전 등에 따라 우선순위를 선정하였다.

○ 당해연도 조직배양 후보 소재인 삿갓사초, 큰고랭이 및 뚜껑덩굴의 종자발아 연구를 수행하여 3종에 대한 종자발아 조건(배지, 적정온도 등)을 확보하였으며 기내식물체(유묘)를 확보하였다.

○ 기내식물체를 활용하여 조직(잎, 줄기) 절편을 식물생장조절제 단일호르몬 종류별, 농도별로 포함한 영양배지에 치상한 후 캘러스 및 부정근을 유도한 결과, 뚜껑덩굴 캘러스 및 뚜껑덩굴 부정근 유도에 성공하였다.

○ 뚜껑덩굴 캘러스와 부정근의 배양 효율을 높이기 위해 조직배양으로 유도된 단일호르몬 조건에 혼합호르몬을 종류별로 처리한 결과, 혼합호르몬에서 캘러스 및 부정근의 유도율 및 생장조건이 더 효과적임을 확인하였다.

○ 당해연도 조직배양 소재의 배양유도 뿐만 아니라 전년도 조직배양 소재의 신규 생리활성 연구를 통해 산업화 소재 확대 및 성과확산에 기여하고자 여뀌바늘 캘러스 추출물을 제조하고 대사체분석 및 생리활성 연구를 수행한 결과, 여뀌바늘 캘러스 추출물의 항염 및 항암효과를 확인하였다.

○ 차년도 연구과제 추진을 위해 Lab-scale 대량배양 연구 수행을 위한 자료조사를 수행하고 액체배양 연구를 위한 장비를 구축하였으며, 차년도 조직배양 후보소재 3종의 자원 확보를 위해 조사지 채집을 통해 야생개체 및 종자를 확보하였다.

IV. 연구결과 활용방안

1. 활용방안

○ 조직배양기술을 활용한 연구는 유용한 담수식물의 지속적인 활용을 위한 중요한 기반 기술로 자리 잡고 있습니다. 이를 통해 담수식물의 기내증식 및 최적의 배양 조건을 확립하여 안정적으로 조직배양 소재를 확보하는 체계를 구축하고 있습니다.

○ 특히, 유용 담수식물의 조직배양 유도와 계대배양 기술을 통해 캘러스와 부정근과 같은 조직배양체를 생성하고, 이를 기반으로 추출물의 생리활성을 연구하여 생물산업 소재 발굴의 범위를 지속적으로 확장하고자 합니다.

○ 조직배양 과정을 통해 유도된 담수식물의 캘러스와 부정근은 생리활성 물질의 생산 연구에 있어 중요한 자원이 됩니다. 이를 활용해 항산화, 항염, 항암 등 다양한 생리활성을 평가하고, 이를 바탕으로 생명과학 및 생물산업 분야에서 활용할 수 있는 새로운 소재를 발굴하고 있습니다.

○ 더불어 이러한 연구결과를 통해 안정적이고 지속 가능한 자원을 확보 할 뿐만 아니라 지식재산권 확보 및 관련 학술논문 출판을 통해 연구 성과를 꾸준히 창출하고 있습니다.

2. 연구성과

가. 정량적 연구성과

구분	1. 정책건의		2. 논문게재		3. 산업재산권			4. 홍보		기타
	제정	개정	국내논문	Scopus, SCI-E 이상	출원	등록	기술이전	보도자료	기고	
계획			1		1			1		
실적				2	1	1		2		
달성도(%)			200%		200%			200%		

나. 대내·외 성과

○ 한국식물생명공학회 학술발표(포스터) 2건

○ 기술이전 사후지원(소재확보) 및 지역사회 상생협력(조직배양 강의 및 실습)

V. 참고문헌

1. 환경부, 2018. 11. 제4차 국가생물다양성전략(2019～2023년)
2. 환경부, 2020a. 생물자원관의 설립 및 운영에 관한 법률 제5조 및 제7조
3. 환경부, 2020b. 생물다양성 보전 및 이용에 관한 법률
4. 환경부, 2020. 국립낙동강생물자원관. 담수생물종목록Ⅰ. 국립낙동강생물자원관
5. 환경부, 2021. 05. 제1차 생물자원관 기본계획(2021～2025년)
6. 농림식품기술기획평가원 2022.3. 조직배양을 통한 작물 대량증식 기술개발 및 시사점
7. 바이오인 2021.11. 식물세포 분화조절기술
8. 농업경제신문 2021.04. 토종 인진쑥, 세포배양 통해 대량 생산 할 수 있다
9. 과학기술정보통신부(한국생명공학연구원) 2020.10. 식물세포조직배양기술에 의한 유용 물질의 생합성 원천기술 확보
10. 국립생물자원관 한반도의 생물다양성(https://species.nibr.go.kr)
11. 국립낙동강생물자원관. 2020. 담수생물종목록(Ⅰ. 담수무척추동물, 담수어류, 담수식물)
12. 국가통계포털. 2020. 국내 바이오산업 실태 조사(http:/kosis.kr)
13.. 김선자, 문홍규. 2009. 음나무 배발생 캘러스의 증식 및 체세포배 발달을 위한 액체 현탁 배양조건 확립. J Plant Biotechnol, Vol. 36, No 1, 7-12.
14. 오상임, 박은혜, 길민, 김지은, 임연진, 김상용, & 정지영. 2021. 국내 자생의 유용식물 대량증식종 선정을 위한 관상 및 바이오소재 가치 분석. 한국원예학회 학술발표요지, 115-115.
15. 박소영. 2016. 섬단풍나무의 캘러스 유도 또는 증식용 배지 및 이를 이용한 캘러스 유도 또는 증식방법 10-2018-0064190
16. Li, L., Henry, G. E., & Seeram, N. P. (2009). Identification and bioactivities of resveratrol oligomers and flavonoids from Carex folliculata seeds. Journal of agricultural and food chemistry, 57(16), 7282-7287.
17. Frémont, L. (2000). Biological effects of resveratrol. Life sciences, 66(8), 663-673.
18. López-Lázaro, M. (2009). Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. Mini reviews in medicinal chemistry, 9(1), 31-59.
19. Deepha, V., Praveena, R., Sivakumar, R., & Sadasivam, K. (2014). Experimental and theoretical investigations on the antioxidant activity of isoorientin from Crotalaria globosa. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 121, 737-745.

20. 보건의료기술연구개발사업((주)한국화장품제조음성공장. 2015. 식물세포 및 조직 배양 기술을 응용한 화장품 신소재 개발
21. 브레이크뉴스, 2022.04.06., 충북테크노파크, 차세대 천연물 세포주 은행 구축사업 수혜기업 모집

주 의

1. 이 보고서는 국립낙동강생물자원관에서 시행한 연구과제 결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 국립낙동강생물자원관에서 시행한 연구과제의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.
4. 이 보고서와 관련된 문의사항은 국립낙동강생물자원관 생물소재연구부(전화 054-530-0875, 신수영)으로 문의하시면 됩니다.