

## 형질전환된 당근 모상근의 Carotenoid 생산과 생물반응기에서의 배양

高 庚 珉 · 黃 景 花 · 安 俊 撤 · 黃 聲 振  
康 榮 燾\* · 黃 柏

(전남대학교 생물학과, \*연세대학교 생물학과)

## Carotenoid Production of Transformed Carrot Hairy Root and Its Culture in Bioreactor

Ko, Kyeong Min, Kyeong Hwa Hwang, Jun Cheul Ahn,  
Sung Jin Hwang, Young Hee Kang\* and Baik Hwang

(Department of Biology, Chonnam National University, Kwangju and

\*Department of Biology, Yonsei University, Seoul)

### ABSTRACT

Growth and carotenoid contents of carrot hairy root were investigated in various culture conditions, and then these conditions applied for the mass cultures of hairy root in airlift type bioreactor. In solid medium culture, illumination with cool white light increased carotenoid contents approximately 10-fold compared with that of the dark-grown culture. However, the growth rate of hairy root was relatively lower level. The growth of hairy root in air flow cultures showed the efficient level both in dark and light conditions. Effect of light on hairy root growth and carotenoid contents was not significant for the final cell mass but increased carotenoid production at the later growth stage about 10-fold (11 µg/g) compared with that of the dark-grown culture. When these hairy root were cultivated in airlift type bioreactor, the hairy root showed rapid growth and final cell mass was 11-fold higher than initial cell mass for 25 days. The pH was dropped from initial 5.5 to 4.9 after 5 days, but remained stable (pH 4.8) after that time, and the same clone cultured in uncontrolled light condition produced only 2 µg/g of carotenoid.

### 서 론

식물 조직에 그람 음성 세균인 *Agrobacterium rhizogenes*를 감염시켜 유도한 식물 모상근은 호르몬이 없는 배지에서 활발히 성장하며 유용 물질의 생산 능력에 있어서도 모식물체보다 높거나 동일하다는 보고(Christen *et al.*, 1989)가 있어서, 식물 조직배양을 이용한 유용 물질의 생산에 모상근이 많이 이용되고 있다(Taya *et al.*, 1989; Ishimaru and Shimomura, 1991). 이러한 모상근은 분화되어 있는 식물 조직으로서 이를 배양하여 모식물체 뿌리의 성장 속도보다 빠른 클론을 선발할 수 있으며, 장기간 배양하여도 유전적 안정성이 계속 유지된다(Aird *et al.*, 1988;

Webb *et al.*, 1990).

당근 모상근의 경우는 국내에서 Hwang 등(1986, 1988, 1989)과 Kang 등(1989)에 의하여 생리학적 연구가 수행되었고, 이로부터 유용 물질인 anthocyanin 색소의 생산을 보고하였다. 또한 약용 식물로 널리 쓰이고 있는 고려인삼과 도라지의 뿌리 절편을 형질전환시켜 모상근을 유도, 배양한 후 각각 인삼 saponin(Hwang and Ko, 1989; Hwang *et al.*, 1991)과 도라지 saponin(Kim *et al.*, 1990)의 생산이 보고 되었으며, 청피 홍심무우의 모상근 배양으로부터 anthocyanin 색소의 생산(Ahn *et al.*, 1992)이 보고되어, 모상근의 활용에 의한 유용 물질 생산성을 확인한 바 있다.

C<sub>40</sub> tetraterpenoids인 carotenoids도 이와같은 유용 물

질의 하나이며, 자연에 400종류 이상 알려져 있는 지질 용해성 색소로서 단순한 박테리아로부터 노란 꽃이 피는 합성물까지 모든 종류의 식물과 많은 동물에서 발견된다. 동물의 경우에는 이 중에서  $\beta$ -carotene을 필수적으로 흡수하여야 하며 소장 점막에서 vitamin A로 전환하여 간에 저장하고 mucopolysaccharides 등의 합성 등에 사용하며, 식물에서는 주로 광합성의 보조 색소와 꽃과 열매의 색을 나타내는 물질로 사용된다. 또한 인간은 매일 1.5-2 mg의 vitamin A를 섭취해야 하며, 당근의 주색소로 알려져 있는  $\beta$ -carotene의 경우 연간 수요량이 약 100톤으로 일차적으로 식품 색소 첨가제로 사용되지만 이의 공급이 매우 낮은 실정이다(Crueger and Crueger, 1990; Harborne, 1984).

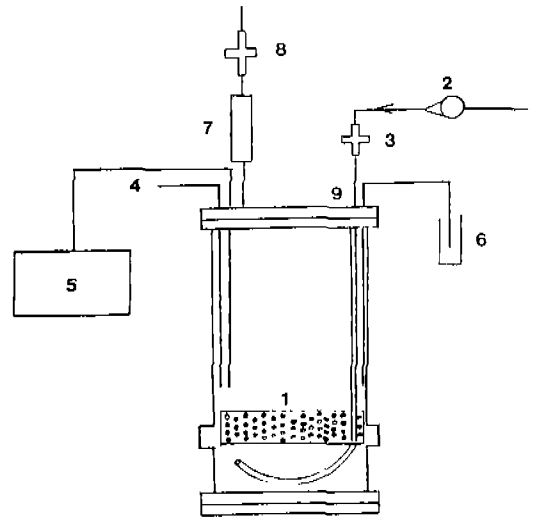
따라서 필요 성분의 수요에 대한 공급 조절 역할을 할 수 있는 수단으로 식물 조직배양에 의한 유용 물질 생산은 매우 가치있는 일이며, 이를 위해서는 필요 성분의 생산량을 생물 공학적 방법을 통해 증대시키는 기술이 필요하게 된다. 보편적인 의미로서 “효소나 미생물, 혹은 동물, 식물세포 및 조직을 이용하여 유용물질을 생산하는 것”이라는 뜻을 내포하는 생물 반응기는 이러한 목적에 부합하여 사용되고 있으며, 현재는 고생산성을 위한 고농도 연속배양이 생물 반응기의 개발 목적이 되고있다(Chang, 1989).

아울러 식물세포 배양용 생물 반응기의 개발에 있어서는 식물세포의 shear에 대한 약한 저항성 때문에 주로 기계적 shear stress를 최소화 하는 것이 주요 핵심 부분이며, 따라서 상대적으로 매우 낮은 shear 특성을 갖는 airlift형이 shear에 약한 세포배양에 많이 쓰여져 왔다. Airlift형 반응기에서는 유체 혼합이 gas flow에 의해서만 행하여 지므로 작은 shear를 낼 수 밖에 없고, 에너지 소모량이 작다. 그러나 shake flask 배양시 보다는 CO<sub>2</sub> 및 ethylene과 같은 가스 대사물이 strip out될 가능성이 많아서 낮은 유용 물질 생산성이 단점으로 지적되고 있다(Cho, 1991).

본 연구에서는 Hwang 등(1989)의 방법으로 유도, 배양한 당근 모상근을 이용하여, 여러가지 배양조건에 의한 모상근의 성장과 주색소 성분인 carotenoids 함량과의 관계를 비교하였으며, 이를 세포 배양공학(cell culture engineering)에 적용하는 기초 단계로서, 5l의 생물 반응기에 모상근을 배양하여 이러한 기술을 통한 유용 물질 생산 가능성을 연구하였다.

### 재료 및 방법

**고형배지 배양.** Hwang 등(1989)의 방법으로 유도한 당근 모상근을 대상으로 분지 형성율과 비후 정도가 비슷한 모상근 strain을 선별하여 30일 동안 MSO 고형배지(호르몬이 없는 MS 배지)에서 암 배양한 후 동일한 생중량을 측정하여 20개의 1회용 petri dish(Green Cross M. D. Co.,



- |                          |                      |
|--------------------------|----------------------|
| 1. Stainless sieve       | 6. Sample port       |
| 2. Flow meter            | 7. Exhaust condenser |
| 3. Air filter            | 8. Exhaust filter    |
| 4. pH meter              | 9. Ring sparger      |
| 5. DO meter and recorder |                      |

Fig. 1. Schematic diagram of airlift type bioreactor system.

87×15 mm)로 전이하였다. 이 중에서 10개는 16/8 광주기 (2,000 Lux, F36W Cool White 133, Sylvania GTE) 하에서 배양하고 나머지는 암조건(26°C)에서 배양하여 10일 간격으로 생중량과 carotenoid 함량을 측정하였다.

**액체배지 회전식 배양.** 고형배지 배양에서 선별된 모상근 strain을 MSO 액체배지가 들어 있는 250 ml의 삼각 플라스크에 옮겨서 60일 동안 20일 간격으로 새로운 배지를 첨가하여 3회 계대배양 한 후 10 g(생중량)을 200 ml의 배지가 들어 있는 500 ml 삼각 플라스크로 각각 전이하였다. 이렇게 전이된 모상근은 배지 성분 감소에 따르는 생중량 변화를 조사하기 위해 회전식 진탕 배양기(50 rpm)에서 두개의 실험군으로 나누어 배양하였다.[1] 배양 30일 동안 새로운 배지의 공급이 없는 one-step culture, 2) 배양 30일중 15일째에 새로운 배지를 공급한 two-step culture.]

**공기 유출기 배양.** 회전식 배양중인 모상근 10 g(생중량)을 air-in, out 설비가 되어 있는 500 ml의 플라스크 (400 ml의 배지)로 전이하여 외부로부터 여과된 공기를 공급하고 16/8 광주기(1500 Lux) 조건과 암조건으로 나누어 30일 동안 배양하였으며 10일 간격으로 모상근의 생중량과 carotenoid 함량을 측정하였다.

**생물 반응기 배양.** 생물 반응기는 Bioflo IIC Model (New Brunswick Scientific Co. USA)의 5 l 용량이며 pH와

DO를 자동으로 측정할 수 있는 장치로서 본 실험에 이용하기 위해 개조 후 사용하였다(Fig. 1). 즉 반응기 내의 밑바닥을 ring sparger로 통기시키고 바닥에서 3 cm 높이로 구멍 직경 0.7 mm의 스테인레스 망을 부착하였다. 또한 반응기의 통기속도는 1 l/min, 사용한 배지의 양은 3.2 l (MSO 배지, sucrose 30 g/l, 배양 온도 27°C, pH 5.5(멸균 후)로 설정하였으며, 공기 유출기 배양으로부터 10 g(생중량)의 모상근을 사용하여 25일 동안 배양 후 생중량과 carotenoid 함량을 측정하였다.

**모상근의 생중량 측정.** 배양기간별로 모상근을 회수하여 증류수로 3회 세척한 다음 여과지(Whatman filter paper, No.2)로 물기를 제거하고, 이를 5회 반복하여 여분의 물기를 제거한 후 무게를 측정하였다.

**Carotenoid의 추출 및 함량 계산.** Carotenoid의 추출과 함량 계산은 Jensen과 Jensen(1971)의 방법에 따랐다. 색소를 추출하기 위해 각각의 시료 무게를 측정 후 액체 질소에서 마쇄하였으며, 마쇄된 세포액에 acetone을 첨가하여 4°C에서 2시간 냉침하였다. 냉침 후 상등액만을 별도로 분리하는 과정을 3회 반복하여 모아진 추출액은 15분간 원심분리(3,000×g)하고 이렇게 하여 얻어진 acetone 추출액에 1/2 volume의 petroleum ether를 넣어 잘 혼합한 다음, 염색소와 다른 비누화 물질들을 제거하기 위하여 saponification을 수행하였다. 즉 색소층을 동결 감압 증발시켜서 10% methanol이 들어 있는 KOH 용액을 첨가하였으며, 이후 5% NaCl 용액으로 층 분리하여 ether로 재 추출하였다. 이러한 과정을 마친 색소는 무수황산 나트륨(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)을 이용하여 여분의 물을 완전히 제거하였으며, 474 nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같은 공식에 의하여 총 carotenoid 함량을 계산하였다.

$$c = D \times v \times f \times 10 / E_{cm}^{1\%} \times \text{gram of sample}$$

c: total carotenoid in mg

D: optical density at  $\lambda_{max}$

$E_{cm}^{1\%}$ : extinction coefficient (petroleum ether = 2100)

v: total volume in ml

f: dilution factor

### 결과 및 고찰

**고형배지 배양시 모상근의 성장과 carotenoid 함량.** 비슷한 성장 특성을 갖는 당근 모상근을 선별하여 광조건과 암조건하에서 30일 동안 배양하여 생중량과 carotenoid 함량과의 관계를 Fig. 2에 나타내었다. 그 결과 암조건에서 배양한 모상근이 광조건에서 배양한 모상근보다 약 2배 정도 빠르게 성장하여 초기무게 0.5 g(생중량)에서 최종무게 3.4 g(생중량)으로 6.8배의 무게증가를 보여주었다. 그러나

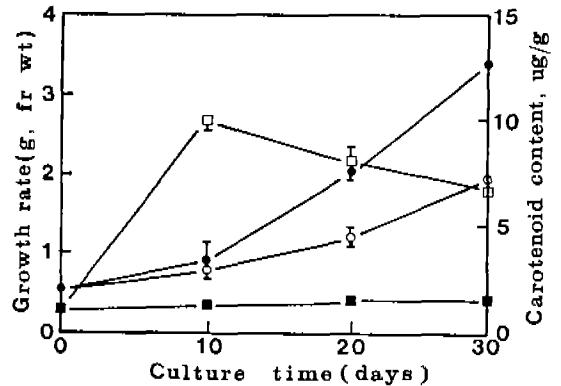


Fig. 2. Growth and carotenoid contents of carrot hairy root cultured in MSO solid medium. —●—, growth rate cultured in dark condition; —○—, growth rate cultured in light condition; —■—, carotenoid contents cultured in dark condition; —□—, carotenoid contents cultured in light condition.

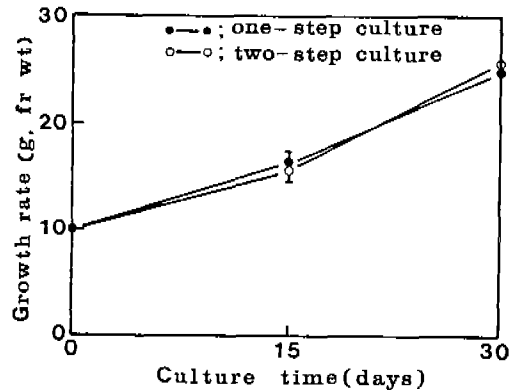


Fig. 3. Comparison of one step and two step cultures on growth of carrot hairy root in MSO liquid medium.

암조건에서의 carotenoid 함량은 배양 30일 동안 초기함량 (1 µg/g)과 유사한 수준(1.5 µg/g)을 나타내어 배양기간이 carotenoid 함량 증가에 영향을 미치지 못하였으며, 오히려 생장이 느린 광조건에서 배양한 모상근의 carotenoid 함량이 배양 10일째에 10 µg/g으로 크게 증가하였다. Carotenoid의 합성 양상은 일반적으로 탄소원과 질소원의 종류와 농도, 산소의 농도, 온도, pH 등에 의하여 조절되며, 빛이 carotenoid의 합성을 촉진한다고 하였는데(Goodwin, 1976), 본 실험 결과 당근 모상근의 경우에도 빛에 의하여 carotenoid의 합성이 촉진되었다.

**액체배지 회전식 배양에 의한 모상근의 성장 특성.** 배양 배지 농도의 변화와 모상근의 생장은 서로 밀접하게 연관되어 있어서(Hwang *et al.*, 1989) 필요로 하는 모상근을

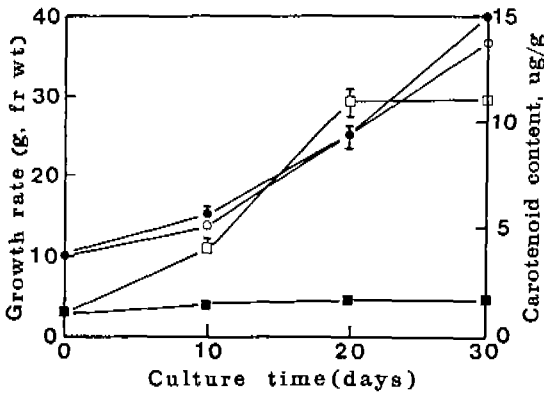


Fig. 4. Growth and carotenoid contents of carrot hairy root cultured in MSO liquid medium by air flow cultures. -●-, growth rate cultured in dark condition; -○-, growth rate cultured in light condition; -■-, carotenoid contents cultured in dark condition; -□-, carotenoid contents cultured in light condition.

계속 생산하려면 배지 농도를 충분히 유지시켜야 한다. Fig. 3은 새로운 배지의 공급시기를 알아보기 위한 1단계와 2단계 배양의 결과로서, 초기무게 10g(생중량)에서 30일 동안 배양하였을 때 1, 2단계 배양 모두 동일한 생중량(26-28g)을 나타내었다. 이러한 결과는 당근 모상근의 경우 액체 배양시 최소한 30일 동안은 생장을 위해 초기 공급한 배지의 농도를 계속 이용할 수 있다는 의미이며, 동일한 배지조성 및 배지량에서 성장중인 인삼 모상근의 계대배양 시기가 10-20일(Hwang *et al.*, 1991) 밖에 근거 하였을 때, 새로운 배지의 공급 빈도를 줄일 수 있어서 생산단가를 절감할 수 있다고 판단된다.

**공기 유출기 배양시 모상근의 성장과 carotenoid 함량.** Fig. 4는 공기 유출기 배양에 의한 모상근의 성장 특성과 carotenoid 함량과의 관계를 나타낸 것으로, 모상근의 성장 측면에서는 암조건과 광조건 모두에서 비슷하였으며 동일 기간의 회전식 배양(Fig.3 참조, 최종무게 26-28g, 생중량)에 비하여 빠른 성장(최종무게 35-40g, 생중량)을 보여주었다. 그러나 암조건에서의 carotenoid 함량은 Fig.2와 마찬가지로 배양기간의 경과에 따라 소량 증가하였으며, 광조건에서는 배양 후기 성장 단계인 20일에 최대의 함량 증가(11 ug/g)를 보여주고 이후 30일에도 이와 동일한 수준을 유지하였다. 모상근 배양을 통해 유용 성분을 다량 합성하기 위한 방법으로 배지조건의 개선, 온도, 광, 무기염 첨가 등 많은 연구가 진행되어(Kato *et al.*, 1991; Sauerwein *et al.*, 1992), *Amsonia elliptica* 모상근의 회전식 배양에서는 암조건 보다 광조건에서 더 빠르게 성장하며, 유용 성분인 indole aldehyde vallesiachotamine의 생산에 있어서도 배

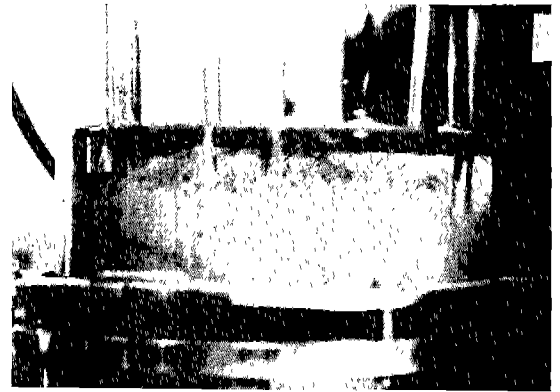


Fig. 5. Photographs of hairy root cultured in airlift type bioreactor equipped with stainless sieve at bottom for 25 days.

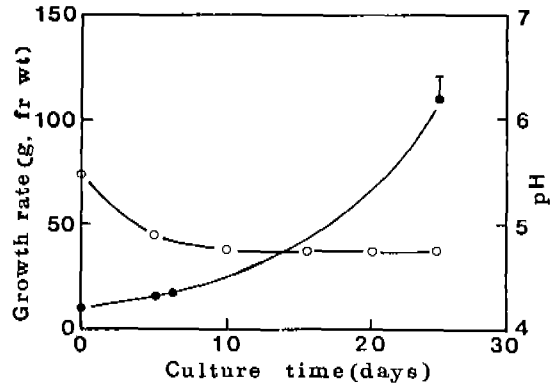


Fig. 6. Growth of carrot hairy root cultured in airlift type bioreactor. -●-, growth rate of hairy root; -○-, pH variation in MSO liquid medium.

양 후기 성장단계에서 광조건이 암조건보다 10배의 함량 증가를 보여주었다. 또한 *Lippia dulcis* 모상근의 경우는 유용 성분인 hernandulin이 암조건에서 검출되지 않았으나 광조건 배양 3주 이후부터 hernandulin의 생산이 증가되어진다고 하였는데, 당근 모상근의 공기 유출기 배양에서는 광조건과 암조건에서 모두 활발히 성장하여 생중량이 큰 차이를 보이지 않았으며, 단지 carotenoid 함량에 있어서 많은 차이를 나타내었다. 아울러 모상근의 생장이 광조건과 암조건에서 차이를 보이는 고형배지 배양과 상이하게 나타났는데 이러한 원인은 조사중이다.

**생물 반응기 배양시 모상근의 성장 특성.** 식물 세포, 조직배양 기술을 배양공학에 이용하여 목적하는 성분을 생산하기 위해서는 단위시간, 단위부피당 생산물의 농도를 높이는 과정이 우선 선행되어야 한다(Chang, 1989). 본

연구에서는 이러한 과정의 기초적 단계로서 scale up 시 순환속도를 일정하게 유지할 수 있는 airlift형 생물반응기를 이용하여 모상근의 성장 특성을 조사하였다. 5l 용량의 생물 반응기내에 초기무게 10g(생중량)의 모상근을 접이 하여, 배양 25일 동안 성장한 모상근은 Fig. 5에 보여주고 있으며, Fig. 6은 배양기간 동안의 모상근의 성장 특성과 pH 변화를 나타낸 것이다. 생물 반응기에서는 모상근이 지수함수적으로 성장하여 배양 15, 16일부터 생장이 빠르게 증가하였으며 배양 25일 동안에 최종무게 110g(생중량)이 얻어졌는데 이는 초기무게 10g(생중량)의 11배에 해당하였다. 그리고 pH는 초기 5.5에서 배양 5일 후 4.9까지 떨어지다가 그 이후에 안정화되어 4.8을 유지하였는데, 이러한 pH에서 모상근이 빠르게 성장함을 고려할 때 분화되어 있는 식물 조직은 pH의 작은 변화에 민감하게 반응하지 않음을 알 수 있었다. 또한 광주기와 광도를 조절하지 않은 상태에서의 carotenoid 함량은 2 µg/g으로 나타났다. 그러나 공기 유출기 배양으로부터 광조건이 당근 모상근의 성장에 영향을 미치지 않으며 오히려 carotenoid 함량을 크게 증가시켰음을 살펴볼 때, 적절한 광주기와 광도를 생물반응기에 적용한다면 매우 높은 carotenoid 함성을 유도할 수 있으리라 사료된다.

## 적 요

다양한 배양조건을 이용하여 당근 모상근의 성장과 carotenoid 함량을 조사 하였으며, 이러한 배양조건을 airlift형 생물 반응기에 적용하여 모상근의 다량 배양을 시도하였다. 고행배 배양에서의 carotenoid 함량은 광조건에서 배양된 모상근이 암조건에서 배양된 모상근보다 10배 정도 증가하였으며, 모상근의 생장은 광조건이 암조건보다 낮은 수준이었다. 공기 유출기 배양에서는 모상근이 광조건과 암조건 모두에서 매우 빠르게 성장하여 생중량의 차이가 없었으며, 모상근의 성장과 carotenoid 함량에 있어서 빛의 조사는 모상근의 전체적인 생중량을 증가시키기 보다는 배양 후기 성장단계에서 carotenoid 함성을 증가시켜서 암조건에 비하여 10배 정도의 carotenoid(11 µg/g)를 생산하였다. 모상근을 생물 반응기에서 배양하였을 때, 모상근이 지수함수적으로 빠르게 성장하여 배양 25일 동안에 처음 무게의 11배를 나타내었다. 그리고 pH는 처음 5.5에서 5일 후 4.9로 떨어지다가 그 이후에 일정한 수준(pH 4.8)을 보여주었으며, 광주기와 광도를 조절하지 않은 상태에서의 carotenoid 함량은 2 µg/g으로 나타났다.

## 참 고 문 헌

Ahn, J.C., Y.W. Paek, Y.H. Kang and B. Hwang. 1992. Produ-

ction of anthocyanin by culture of hairy roots of *Raphanus sativus* cv. Chungpiphongsim. *Korean J. Bot.* 35: 37-43.

Aird, E.L.H., J.D. Hamill, M.J.C. Rhodes. 1988. Cytogenetic analysis of hairy root cultures from a number of plant species transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 15: 47-57.

Chang, H.N. 1989. Bioreactor development for biotechnological chemicals production. '89 Agricultural Biotechnology Symposium. pp. 258-283.

Cho, K.H. 1991. Plant cell culture in airlift bioreactor. The Fifth Symposium on Plant Biotechnology. pp. 153-174.

Christen, P., M.F. Roberts, J.D. Phillipson and W.C. Evans. 1989. High-yield production of tropane alkaloids by hairy root cultures of a *Datura candida* hybrid. *Plant Cell Reports* 8: 75-77.

Crueger, W. and A. Crueger. 1990. Biotechnology; A textbook of industrial microbiology. Sinauer Associates Inc. Sunderland. pp. 226-228.

Goodwin, T.W. 1976. Carotenoids. In, The Filamentous Fungi, J.E. Smith, D. Sc., F.I. Biol, D.R. Berry (ed.). Vol. 2, Edward Arnold, London. pp. 423-441.

Harborne, J.B. 1984. Phytochemical methods. Chapman and Hall. New York. pp. 129-139.

Hwang, B., D.Y. Cho and S.S. Hong. 1986. Physiological studies on the formation of hairy root by the *A. rhizogenes*; I. Relationships between IAA content and morphological characteristics in carrot infected by *A. rhizogenes*. *Korean J. Bot.* 29: 275-283.

Hwang, B., S.J. Chung and U.B. Lim. 1988. Physiological studies on the formation of hairy root by the *A. rhizogenes*; III. Adsorption of *A. rhizogenes* cells to carrot tissues. *Korean J. Plant Tissue Culture* 15: 95-102.

Hwang, B., J.C. An and J.H. Lee. 1989. Physiological studies on the formation of hairy root by the *A. rhizogenes*; IV. Culture of hairy root and survey of the culture condition. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 4: 246-252.

Hwang, B. and K.M. Ko. 1989. Induction and culture of hairy roots from ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) roots discs by *A. rhizogenes*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 4: 288-292.

Hwang, B., K.M. Ko, S.J. Hwang and Y.H. Kang. 1991. Production of saponin by hairy root cultures of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) transformed with *A. rhizogenes*. *Korean J. Bot.* 34: 289-296.

Ishimaru, K. and K. Shimomura. 1991. Tannin production in hairy root culture of *Geranium thunbergii*. *Phytochemistry* 30: 825-828.

Jensen, S.L. and A. Jensen. 1971. Quantitative determination of carotenoids in photosynthetic tissues. *Methods Enzymol.* 23: 586-602.

Kang, Y.H., I.S. Wui, U.B. Lim, H.S. Cheong, B.S. Pyo and

- B. Hwang. 1989. Physiological studies on the formation of hairy root by the *A. rhizogenes*; II. The roles of gibberellin on the formation of tumor and hairy root and evidence for transformation. *Korean J. Plant Tissue Cul.* **16**: 25-32.
- Kato, Y., N. Uozumi, T. Kimura, H. Honda and T. Kobayashi. 1991. Enhancement of peroxidase production and excretion from horseradish hairy roots by light, NaCl and peroxidase-adsorption *in situ*. *Plant Tissue Culture Letters* **8**: 158-165.
- Kim, B.R., J.H. Lee and B. Hwang. 1990. Culture of hairy roots induced by *A. rhizogenes* in *Platycodon grandiflorum* DC. *Korean J. Bot.* **33**: 183-188.
- Sauerwein, M., K. Yoshimatsu and K. Shimomura. 1992. Further approaches in the production of secondary metabolites by plant tissue cultures. *Plant Tissue Culture Letters* **9**: 1-9.
- Taya, M., A. Yoyama, R. Nomura, O. Kondo, C. Matsui and T. Kobayashi. 1989. Production of peroxidase with horseradish hairy root cells in a two step culture system. *J. Ferment. and Bioeng.* **67**: 31-34.
- Webb, K.J., S. Jones, M.P. Robbins, F.R. Minchin. 1990. Characterization of transgenic root culture of *Trifolium repens*, *Trifolium pratense* and *Lotus corniculatus* and transgenic plants of *Lotus corniculatus*. *Plant Sci.* **70**: 243-254.

(1992. 8. 31 接受)