

## 유동층 생물반응기에서 anthocyanin 생산을 위한 당근의 모상근 배양

김창현 · 이승우<sup>1</sup> · 정인식\*

경희대학교 자연과학대학 유전공학과, <sup>1</sup>경희대학교 산업대학 원예학과

**초록 :** 유동층 생물반응기에서의 anthocyanin 생산을 위하여 당근의 모상근배양을 검토하여 보았다. 이 생물반응기에서의 모상근의 성장은 2.5배 증가되었지만 anthocyanin 생산은 낮았다. 그러나 유동층 생물반응기에서의 anthocyanin 생산은 fungal elicitor의 처리에 의해 2.3배 향상되었다.

### 서 론

식물 세포조직배양을 통한 유용 2차대사산물의 생산에 관한 연구는 최근 모상근 배양을 통하여 2차대사산물의 생산성을 향상시킬 수 있게 되어 보다 활기를 띠고 있다. *Agrobacterium rhizogenes*의 Ri plasmid의 일부인 T-DNA가 식물 유전자 내로 삽입되어 형질전환되어진 뿌리조직인 모상근은 식물 성장 호르몬의 공급이 없이도 매우 빠른 성장속도를 보이며, 세포배양에 비하여 2차 대사산물의 수율이 높을 뿐 아니라 유전적으로도 안정하여 2차 대사산물의 대량생산을 위한 좋은 재료로 여겨지고 있다.<sup>1,5)</sup> 반면 모상근은 뿌리의 형태를 유지하며 자라기 때문에 교반방식의 생물반응기의 이용에 어려운 점이 있어 모상근을 이용한 유용 2차 대사산물의 대량생산을 위해서는 모상근의 배양에 적합한 생물반응기의 개발과 함께 운영방법 및 배양조건과 2차 대사산물 생산의 최적화를 위한 폭넓은 연구가 요구되어진다.<sup>6,8)</sup>

Anthocyanin은 flavonoid계 화합물에 속하는 색소로서 주로 과실이나 꽃으로 부터의 추출에 의해 얻어지고 있는 천연색소이다. 최근 천연색소에 대한 산업적 이용이 광범위하게 이루어지고 그 수요가 계속 증가함에 따라 식물조직배양기술을 이용하여 anthocyanin을 대량생산하고자 하는 노력이 진행되고 있다. 당근의 세포배양에서는 cyanidin과 nalvidin의 두 종류의 anthocyanin이 생산된다고 보고된 바 있으며 주로 cyanidine계통이 많이 보고되어지고 있다.<sup>9)</sup>

본 연구에서는 식물세포 조직배양을 이용한 2차 대사산물의 효율적인 생산 연구로서 당근의 모상근 배양을

이용하여 anthocyanin 생산을 시도하고 모상근 배양에 유동층 생물반응기(fluidized-bed bioreactor)의 사용을 검토하였다. 또한 anthocyanin의 수율을 향상시키기 위한 연구로서 fungal elicitor 처리를 생물반응기 시스템에 적용하여 보았다.

### 재료 및 방법

#### 당근의 모상근 유기

당근의 모상근 유기에 사용한 균주는 *Agrobacterium rhizogenes* 15834와 A4T 두 종류이었으며 각 균주는 YEB 배지(0.01 g/l yeast extract, 0.05 g/l beef extract, 0.05 g/l peptone, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.05 g/l sucrose)에서 28°C의 온도로 배양하였다. 배양된 균주는 7일 간격으로 새로운 배지로 옮겨 계대배양하였다. 당근은 원예시험장에서 제공받은 다봉 5촌을 사용하였다.

당근의 표면을 깨끗히 씻은 후 70% 에탄올에서 1분, 2% sodium hypochloride 용액에 20분간 침지하여 표면 살균을 한 후 멸균된 증류수로 3회 세척하였다. 표면 살균된 당근은 뿌리 단면에서 형성층이 포함되도록 지름 10 mm, 두께 2~3 mm의 절편으로 만들어 YEB 배지에서 이틀간 배양한 *Agrobacterium rhizogenes* 15834와 A4T를 접종한 후 30 g/l sucrose, 7 g/l agar를 첨가한 MS 기본 배지 위에 치상하여 27±1°C에서 배양하였다. 배양 후 약 2주일 후 유기된 root tip을 잘라 500 mg/l의 carbenicillin이 함유된 MS 액체배지에서 계속 계대배양하면서 *Agrobacterium*을 제거하였다. 이때 각각의 root tip은 형질전환된 단세포로부터 유래한 것으로 간주하여 개별

Key words : anthocyanin, hairy root culture, *Daucus carota*, bioreactor, fungal elicitor

\*Corresponding author : I.-S. Chung

적으로 배양되었으며, 이후 성장이 빠른 모상근을 선발하였다. 완전하게 *Agrobacterium*이 제거된 모상근은 진탕배양기에서  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , 100 rpm의 암조건에서 2주 간격으로 계대배양하였다.

#### 생물반응기에서의 모상근의 배양

본 연구에서는 working volume 50 mL의 200 mL shake flask, 300 mL의 flat-bottomed fluidized-bed bioreactor(FFB), 1 L의 round-bottomed fluidized-bed bioreactor(RFB)를 사용하여 모상근을 배양하였으며, shake flask 반응기에서의 배양은 100 rpm, 유동층 생물반응기에서의 배양은 0.5 VVM(volume of air/(volume of medium) (minute))의 통기조건으로 조업하였다. 아울러 모든 조업은  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , 암조건에서 수행되었다.

#### Fungal elicitor의 제조

Elicitor의 제조에 사용되어진 균주는 *Fusarium moniliforme*(KCCM 11403)로서 YEB 배지에서  $26^\circ\text{C}$ , 100 rpm의 조건에서 배양하였다. 배양 6일 후 균사를 모두 걸러낸 후 동일한 부피의 증류수에다 다시 현탁하여 Waring blender를 이용하여 10분간 균질화하고 연속적으로  $121^\circ\text{C}$ , 15 psi에서 30분간 고압멸균한 후 균사찌꺼기를 여과과정을 통하여 걸러내어 여과액을  $-5^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다. 이 여과액은 더 이상의 정제과정이 없이 바로 elicitor로 사용되었다.<sup>10)</sup>

#### 분석방법

모상근의 성장율은 fresh weight(F. W.)를 이용하여 결정하였다. 수확한 모상근을 멸균된 Wattman No. 2 여과지로 충분히 수분을 제거한 후 살균된 petri-dish를 이용하여 무균적으로 무게를 측정하였다. Growth index는 (final F. W. - initial F. W.)/(initial F. W.)와 같은 식에 의해 계산되었다.

Sucrose, glucose, fructose는 RI detector를 장착한 HPLC를 이용하여 분석하였다. Column은 Merck사의  $\text{NH}_2$  column을 사용하였고 이동상은 80/20 acetonitrile-water(v/v)를 사용하여 0.9 ml/min의 유속으로 검출하였다.

Anthocyanin은 1 g F. W.의 모상근을 0.1% HCl-methanol에 침지하여 24시간 동안 냉암소에서 보관한 뒤  $1500 \times \text{g}$ 로 원심분리하여 상층액을 530 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Fungal elicitor의 정량은 elicitor가 함유하고 있는 total carbohydrate의 양으로 결정하였으며 orcinol-sulphuric

acid<sup>11)</sup>법을 사용하여 측정하였다.

## 결과 및 고찰

*Agrobacterium rhizogenes*의 감염을 통하여 유기되어진 당근의 모상근은 매우 빠른 성장속도를 보이며 lateral

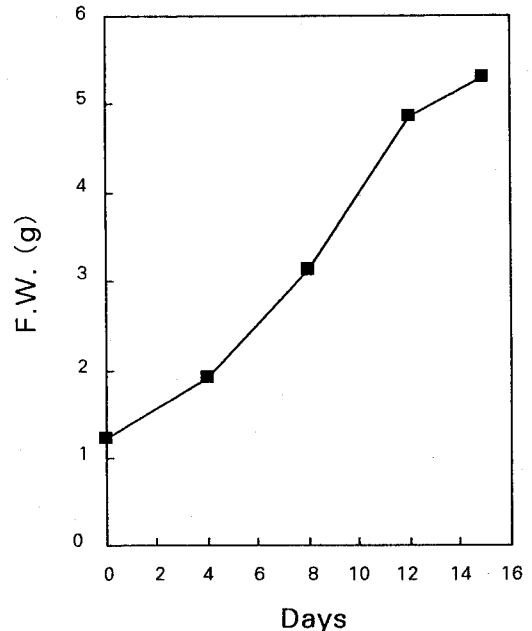


Fig. 1. Time course changes of hairy root growth in a shake flask.

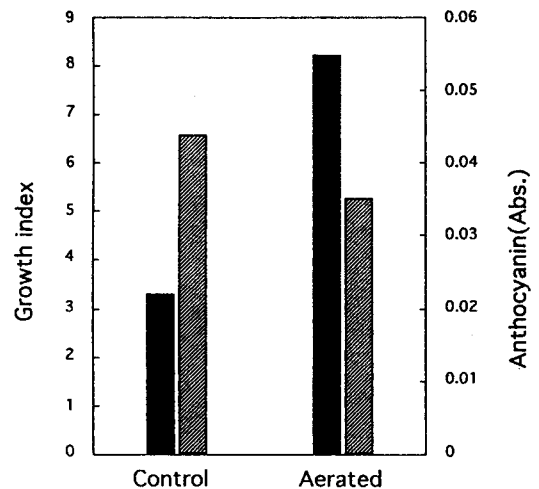


Fig. 2. Effect of aeration on hairy root growth and anthocyanin production.

■, Growth index; ▨, Anthocyanin.

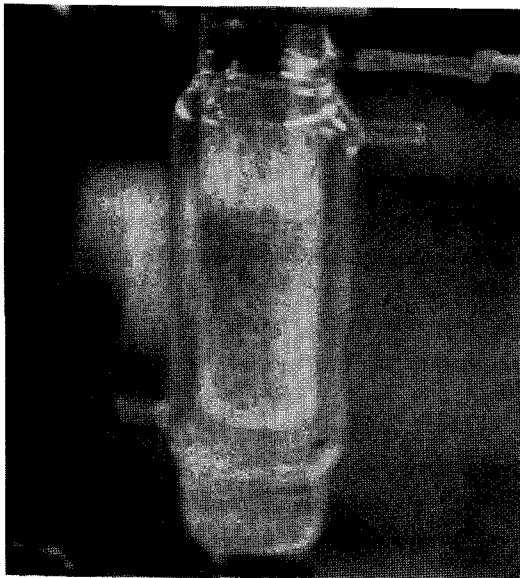
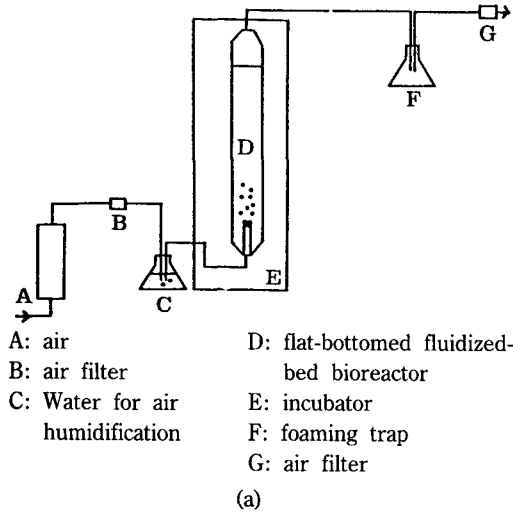


Fig. 3. (a) Schematic diagram of a flat-bottomed fluidized-bed bioreactor. (b) Hairy roots cultured in a flat-bottomed fluidized-bed bioreactor.

branching이 활발하게 일어나는 특징을 가지고 있다. Fig. 1은 shaker flask에서 15일간 배양한 모상근의 성장곡선이다.

모상근은 뿌리의 형태를 유지하며 자라기 때문에 기계적인 교반이 어려우며 이로 인하여 전통적인 생물반응기의 사용이 어렵다. 따라서 본 연구에서는 기계적인 교반을 배제한 형태의 생물반응기의 개발을 시도하였다. 먼저 shake flask에서 air pump를 이용한 aeration 효

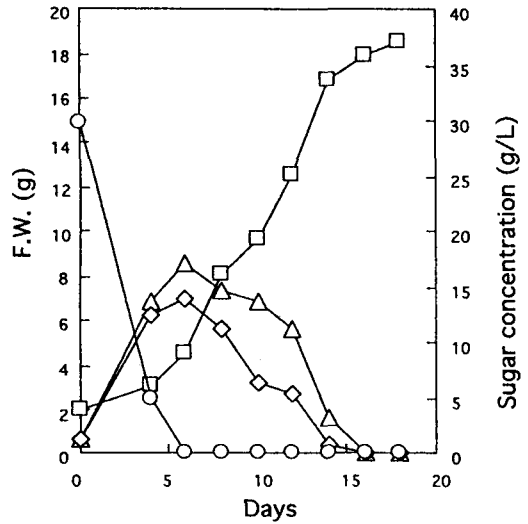


Fig. 4. Time course changes of hairy root growth and sugar concentration in a flat-bottomed fluidized-bed bioreactor.

□, F. W.; ○, Sucrose, △, Fructose, ◇, Glucose.

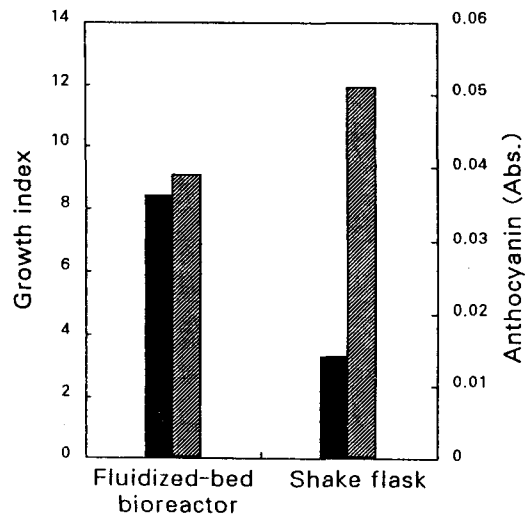


Fig. 5. Hairy root growth and anthocyanin production in different bioreactors.

■, Growth index; ▨, Anthocyanin.

과를 조사하여 보았다(Fig. 2). 200 ml/ shake flask에서 15일간 배양된 모상근의 성장과 anthocyanin의 생산을 비교하여 본 결과 aeration을 시도한 shake flask의 모상근이 공기를 공급해 주지않은 flask의 모상근에 비하여 anthocyanin의 생산성은 낮게 나타났지만 growth index는 2.5배 더 높게 나타났다.

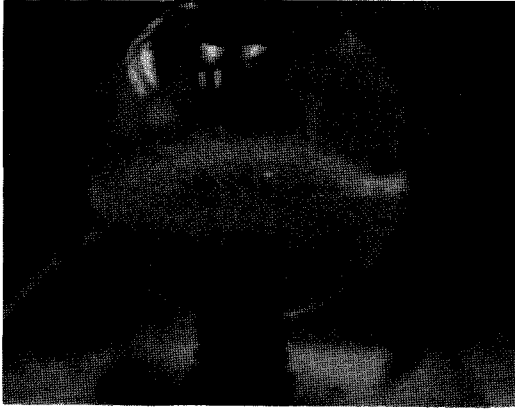


Fig. 6. Hairy roots cultured in a round-bottomed fluidized-bed bioreactor.

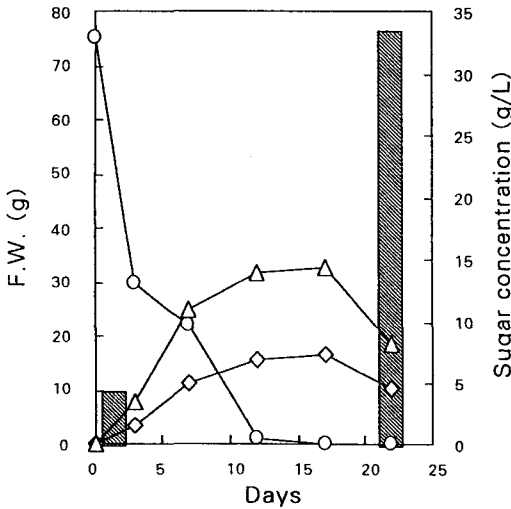


Fig. 7. Time course changes of hairy root growth and sugar concentration in a round-bottomed fluidized-bed bioreactor.

■, F. W.; ◇, Fructose; △, Glucose; ○.

모상근의 성장에는 많은 양의 산소 공급이 요구되어 지므로 bubble column 형식과 같이 다량의 공기를 공급하여 줄 수 있는 생물반응기가 모상근의 배양에 유용함을 알 수 있었다. 따라서 본 연구실에서 개발한 fluidized-bed bioreactor(Fig. 3)에서 모상근의 성장과 anthocyanin의 생산을 검토하여 보았다. Fig. 4는 일반적인 fluidized-bed bioreactor인 FFB에서의 모상근의 성장과 당소모도를 나타낸 것이다. Sucrose는 배양 5일 후, fructose와 glucose는 배양 15일 후에 완전히 소모됨을 알 수 있었으며, 배양 18일 후의 모상근의 fresh weight를

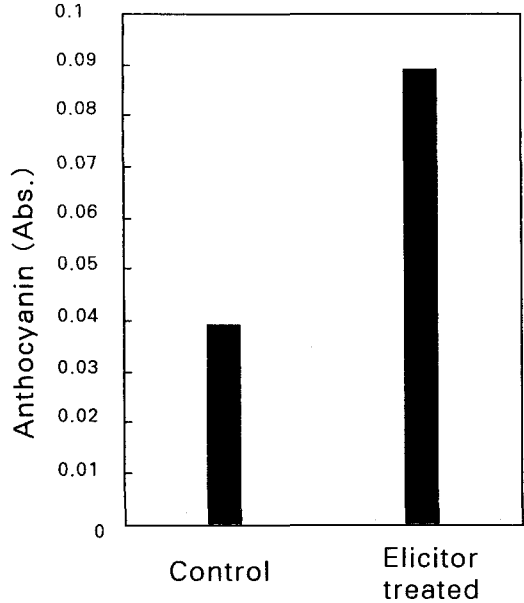


Fig. 8. Effect of fungal elicitor on anthocyanin production in a flat-bottomed fluidized-bed bioreactor.

측정하여 growth index를 계산하고 anthocyanin의 생산량을 조사하여 이것을 shake flask의 경우와 비교해 본 결과 (Fig. 5) anthocyanin의 생산량은 낮게 나타났지만 growth index는 2.5배 증가하였다. 이것은 shake flask에서 수행하였던 aeration 실험의 결과와 일치하였다.

하지만 FFB는 모상근이 배양 중에 반응기 내에서 수직적으로 쌓이게 되어 배지의 원활한 순환이 이루어지지 못해 성장에 지장을 초래함을 확인할 수 있었다(Fig. 3(b)). 따라서 이러한 문제점을 극복하기 위하여 반응기의 형태를 구형으로 제작한 RFB에서 모상근을 배양하여 보았다(Fig. 6). Fig. 7은 RFB에서 22일간 배양된 모상근의 성장과 배양중 배지의 당 농도의 변화를 나타내고 있으며, 배양 22일 후에는 배지 중에 사용 가능한 당이 많이 남아 있음에도 불구하고 Fig. 6에서 보여주는 바와 같이 모상근이 생물반응기안을 가득 채워 더 이상 배양을 계속할 수 없는 정도로 빠른 성장을 확인할 수 있었다. 각 생물반응기에서의 모상근의 growth index를 비교하여 보면 FFB의 growth index는 8.4이고 RFB가 7.2로 RFB가 약간 낮게 나타나지만 이는 모상근이 반응기를 가득 채움으로써 배양 중기에 배양을 중단하였기 때문이다. 그리고 fresh weight의 증가에 비하여 배지의 당소모도가 낮은 것은 이 생물반응기에서의 모상근의 성장이 상대적으로 효율적임을 말해 준다. 아울러 생물반응기에서의 anthocyanin 생산량에 관한 실험결과는

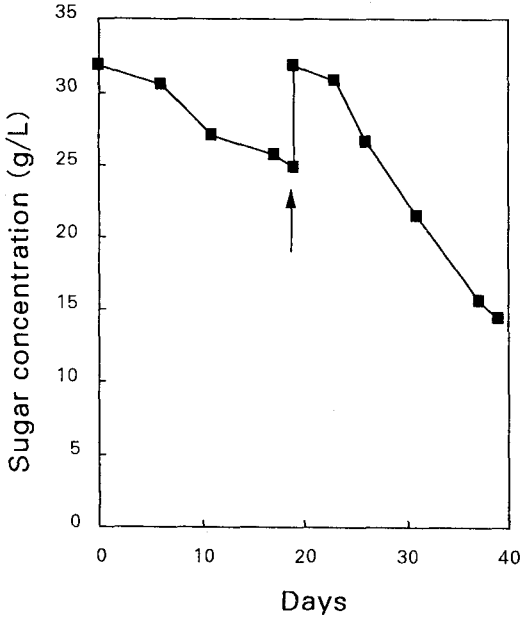


Fig. 9. Time course changes of sugar concentration during fungal elicitor treatment in a fluidized-bed bioreactor. An arrow indicates the point of media exchange.

배양 세포의 성장과 2차 대사과정은 역관계에 있다는 것을 다시 확인하여 주었다. 또한 생물반응기 배양의 경우 anthocyanin의 낮은 생산량은 그 원인을 현재 정확하게 규명할 수는 없지만 박하세포의 현탁배양에서 보고된 바와 같이<sup>12)</sup> 지속적인 공기의 공급으로 배지 내의 CO<sub>2</sub>가 고갈되어지고 이로 인해 2차 대사산물의 생산에 영향을 미치는 때문인 것으로 사료된다.

위에서 살펴본 바와 같이 fluidized-bed bioreactor는 모상근의 대량 배양용 생물반응기로서 우수한 것으로 보여지지만 상대적으로 2차 대사물질인 anthocyanin의 생산성이 감소되기 때문에 fungal elicitor를 이용한 생산성 향상을 검토하여 보았다. FFB에서 17일간 배양되었던 모상근에 65.6 mg carbohydrate/L의 fungal elicitor를 처리하고 24시간 후 모상근의 anthocyanin 생산을 조사한 결과 모상근의 anthocyanin 생산은 처리전에 비하여 2.3배 향상되었다(Fig. 8). 다시 RFB에서 18일간 배양되었던 모상근에 fungal elicitor를 처리하고 48시간 후 반응기 내의 배지를 모두 회수한 후 새로운 배지를 공급하여 다시 15일간 배양한 뒤 fungal elicitor의 2차 처리를 시도하여 보았다(Fig. 9, Fig. 10). 두 차례에 걸친

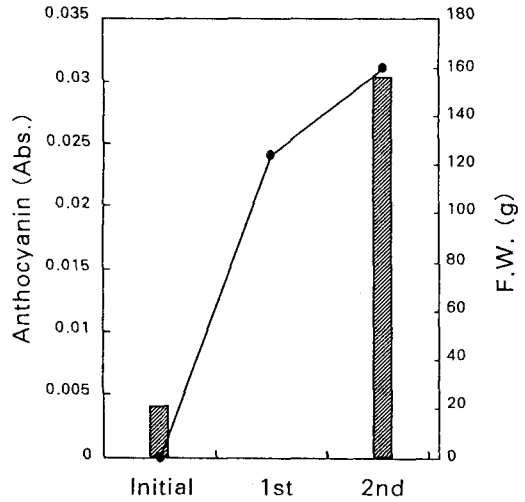


Fig. 10. Effect of fungal elicitor on anthocyanin production in hairy root culture in a fluidized-bed bioreactor.

●, Anthocyanin; ▨, F. W.

fungal elicitor의 처리를 통하여 생산되었던 anthocyanin은 배지내로 유출됨에 따라 배지와 함께 회수가 가능하였으며 fungal elicitor의 연속적인 처리에도 불구하고 모상근의 성장에는 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다.

모상근의 높은 성장속도와 안정적인 2차 대사산물의 생산은 식물이 생산하는 일부 주요한 2차 대사산물의 산업적 이용에 매우 좋은 재료로 여겨진다. 하지만 산업화를 위해서는 고농도 배양을 위한 모상근 배양에 적합한 생물반응기의 개발과 anthocyanin 생산성 향상 방안 연구가 계속되어야 할 것이다.

결과적으로, 당근을 실험재료로 한 본 연구를 통하여 모상근의 고농도배양을 위한 생물반응기로서 fluidized-bed bioreactor가 우수함을 확인할 수 있었으며, 고품광이로부터 추출한 fungal elicitor의 연속적인 처리를 통하여 모상근 배양에서의 2차 대사산물 생산의 향상과, 2차 대사산물의 배지내 유출에 따른 2차 대사산물의 효율적인 회수가 가능함을 알 수 있었다.

### 감사의 글

본 연구는 교육부(유전공학 학술조성 연구) 및 농업 생물신소재연구센터의 지원에 의해 수행된 것이며 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Jung, G. and D. Tepper (1987) Use of genetic transformation by the Ri T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes*, *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 17, 685-698
2. 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. Rep.* 8, 75-77
3. Flores, H. E. (1987) In 'Biotechnology in agricultural chemistry (ACS symposium series, No. 334)', LeBaron, H. M., R. O. Mumma, R. C. Honeycutt, J. H. Duesting, (Eds.), p. 66-86, American Chemical Society, Washington, D. C., U.S.A
4. Mano, Y., H. Ohkawa and Y. Yamada (1989) Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Duboisia leichhardtii* transformed by *Agrobacterium rhizogenes*, *Plant Sci.*, 59, 191-201
5. Banerjee-Chattopadhyay, S., A. M. Schwemmin and D. J. Schwemmin (1985) A study of karyotypes and their alterations in cultured and *Agrobacterium* transformed roots of *Lycopersicon peruvianum* Mill., *Theor. Appl. Genet.* 71, 258-262
6. Rhodos, M. J. C, M. G. Hilton, A. J. Parr, J. D. Hamill, and R. J. Robins (1986) Nicotine production by 'hairy root' cultures of *Nicotiana rustica*: Fermentation and product recovery, *Biotechnol. Lett.* 8, 415-420
7. Taya, M., A. Yoyama, O. Kondo, T. Kobayashi and C. Matsui (1989) Growth characteristics of plant hairy roots and their cultures in bioreactors, *J. Chem. Eng. Jpn.* 22, 84-89
8. Kondo, O., H. Honda, M. Taya and T. Kobayashi (1989) Comparison of growth properties of carrot hairy root in various bioreactors, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 291-294
9. Seitz, H. U. and W. Hinderer (1988) In 'Cell culture and somatic cell genetics of plants', Constabel, F. and I. K. Vasil(Eds.), Vol. 5, pp. 49-76, Academic press, London
10. Eliert, U. (1987) In 'Cell culture and somatic cell genetics of plants', Vasil, I. K. and F. Constabel (Eds.), Vol. 4, pp. 153-196, Academic press, San Diego, U.S.A
11. Sturgeon, R. J. (1990) In 'Methods in plant biochemistry', Dey P. M. and J. B. Harborne(Eds.), Vol. 2, Chap. 1, Academic Press, San Diego, U.S.A.
12. 오재현 (1994) 박하 세포 배양용 생물반응기 개발, 경희대학교 석사학위 논문

### Hairy Root Culture of *Daucus carota* for Anthocyanin Production in a Fluidized-bed Bioreactor

C.-H. Kim, S.-W. Lee<sup>1</sup>, and I.-S. Chung\* (Department of Genetic Engineering, Kyung Hee University, Suwon, 449-701, Korea, <sup>1</sup>Department of Horticulture, Kyung Hee University, Suwon, 449-701, Korea)

**Abstract :** Hairy root culture of *Daucus carota* was investigated for anthocyanin production in a fluidized-bed bioreactor. The growth of hairy roots in this bioreactor increased 2.5 fold while anthocyanin production was lower. However, the anthocyanin production of hairy roots in a fluidized-bed bioreactor was enhanced 2.3 fold in response to the treatment of the fungal elicitor.