

## 현삼에서 탄소원과 질소원의 종류와 농도가 기내 식물체 분화에 미치는 영향

임완상 · 채영암

### Effects of Carbon and Nitrogen Sources on the Shoot Formation in bioreactor culture of *Scrophularia buergeriana* Miquel

Wan Sang Lim and Young Am Chae

**ABSTRACT** : To determine the proper carbon and nitrogen sources and their proper levels for mass micropropagation of *Scrophularia buergeriana* Miquel, tonic and curing cough experiment were applied and a method for mass cultivation by using bioreactors (2.5 L) was expinined. Proper ratio of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  :  $\text{KNO}_3$  was 413 mg/L : 1900 mg/L for multiple shoot production. Sucrose was more effective than glucose or fructose as carbon source and 3% concentration was good for shoot formation. Total nitrogen was not detected after six weeks both in 500 ml flask and bioreactor culture. Sucrose was decreased sharply after two weeks and there was no sucrose left after three weeks both in 500 ml flask and bioreactor culture. The stirrer in bioreactor caused shear stress to shoots severely. The sphere type bioreactor was better than the cylinder type and removal of inner loop in sphere type was more effective to avoid shear stress.

**Key words** : *Scrophularia buergeriana*, medicinal crop, mutiple shoots, bioreactor, carbon and nitrogen sources.

## 서 언

현삼 (*Scrophularia buergeriana* Miquel) 은 현삼과에 속하는 다년생 초본으로 주요 성분은 p-methoxycinnamic acid, harpagide, phytosterol 등이며, 건조된 뿌리는 玄蓼이라 하여 소염, 인후염, 비염, 혈압강하, 강심작용에 쓰인다 (육, 1989). 현삼의 재분화는 고체배지에서 이루어진 바 있으나 (채, 1993), 액체배지에서의 재분화는 보고된 바가 없다. 기내에서 형성된 현삼의 다신초는 물리

적인 스트레스에 민감한 단점이 있으나 dense clump 형태로 뭉치지 않는 장점이 있다. Akita (1994) 는 신초 원기를 이용하면 대용량 생물 반응기를 이용할 때 많은 절편을 별도로 치상하지 않아도 되는 장점이 있다고 하였다.

본 연구의 목적은 현삼 종묘를 생물 반응기에서 대량 생산하는데 필요한 기초자료를 얻고자 하는데 있으며 2.5L 생물 반응기에서 직접 실험하기에는 많은 재료와 시간이 필요하기 때문에 이번 실험에서는 생물 반응기의 운영에 필요한 재원을 얻기 위하여 먼저 500 ml 플라스크에서 탄소원과 질소

· 서울대학교 농업생명과학대학 식물생산과학부 (Division of Plant Science, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea) < '99. 3. 20 접수 >

원의 종류 및 농도를 결정하고, 이들 조건이 배양 기간 중 어떠한 변화를 나타내는지 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료 유지와 배양

현삼 종자를 0.25% sodium hypochlorite 용액에 15분간 표면 살균한 후 멸균수로 4~5회 세척하여 3% 자당, 0.8% agar의 MS (Murashige and Skoog, 1962) 기본 배지에서 발아시켰다. 발아된 식물체는 측아가 포함된 마디를 잘라 agar의 농도가 12g/L인 MS 배지에 치상하여 무균 식물체를 기내에서 유지하였다.

줄기는 BA 1.0 mg/L와 IAA 0.1 mg/L를 조합한 MS 액체배지에 배양하여 다신초를 유도하였으며 (Song et al., 1998), 접종 밀도는 MS 기본배지에 BA 1.0 mg/L와 IAA 0.1 mg/L가 첨가된 액체배지를 500 ml 삼각 플라스크에 150 ml 씩 분주후 절편 30 개를 넣어 배양하였다.

### 2. 탄소원 종류

자당, 포도당 및 과당을 각각 3%로 처리하여 6주간 배양한 후, 치상조직의 생체중과 생성된 신초 수를 조사, 비교하였다.

### 3. 질소원 종류와 농도

MS 배지에 첨가되는 질소원  $NH_4NO_3$ 와  $KNO_3$ 의 양을 증감시켜 조합한 9개 처리를 MS 배지에서 각각 6주간 배양 후 발생된 다신초 수를 조사하였다.

### 4. 배지내 성분 변화

줄기절편을 500 ml 플라스크와 2.5 L 생물 반응기에 접종하여 배양하였다. 배양 중 7일 간격으로 배지를 추출하여 pH를 측정 한 후, HPLC를 이용하여 자당, 포도당 및 과당의 농도 변화를 측정하였다. 배지를 추출하여 20,000rpm으로 원심분리 후 상등액을 취하여 Sepak 처리하고, 이를 HPLC에 주입하여 분석하였다. Khjeldal 분석기 (Kjeltec Auto 1035 Analyzer, Tecator, Sweden)로 전 질소 함량을 분석하였다.

### 5. 생물반응기의 vessel 종류 및 배지 순환 방식

Vessel의 형태가 sphere형과 cylinder형인 2.5 L air-lift type 생물 반응기, inner loop가 없는 동형의 sphere형 생물 반응기 그리고 stirrer type 생물 반응기에서 줄기절편을 각각 300개씩 치상하여 6주간 배양 후 다신초 발생을 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 탄소원 종류

자당, 과당 및 포도당이 처리된 배지에서 배양 기간 중 7일 간격으로 접종 절편체에서 직접 체세포배의 출현 수와 생체중의 변화를 조사한 결과는 Fig. 1과 Fig. 2에서와 같다.

자당이 처리된 경우 신초 수는 3주와 4주 사이에 급격하게 증가하였으나, 4주 이후에는 변화를 보이지 않는 것으로 보아, 신초의 발생 수는 배양 후 3주 - 4주 사이에 결정되는 것으로 확인되었다 (Fig. 1). 생체중은 배양 4주까지는 완만한 증가를 보이다가, 배양 4주 이후에서는 급속히 증가되는 경향을 보였다 (Fig. 2).

포도당 처리구에서 신초의 발생은 자당의 경우와 비슷하게 증가하였으나, 생체중은 3주 이후 자당의 경우보다 증가되는 경향을 보였다. 과당의 경우 신초의 수는 3주 이후 자당이나 포도당 처리구에 비해 많았으며, 생체중도 가장 크게 증가하였다.

신초 발생이 계속적으로 이루어 질 경우, 이로부터 발달된 신초는 발달 단계가 일정하지 못하여, 절편체 당 얻을 수 있는 동일한 단계의 신초 수는 감소하게 된다. 그림으로 나타내지는 않았으나 과당 처리구에서 잎이 부정형으로 크게 자란 개체가 많았으며 조직의 과산화 현상이 나타났다. 그림 1과 2를 종합하여 보면, 탄소원으로는 자당이 효과적이며, 건전한 직접체세포배를 얻기 위해서는 자당이 분해되어 과당의 축적이 이루어지기 전까지 배양하는 것이 효과적임을 확인하였다.

동부 (Cowpea)에서는 포도당, 과당, 자당 중에서 자당이 재분화에 가장 효과적이었고 (Pellegrineschi, 1997), *Prunus mume*에서는 신초 발생에 포도당, 과당, 자당, sorbitol 중에서

sorbitol, 자당이 효과적이어서 (Harada, 1996.) 현삼과 다른 결과를 나타내었다. Hazelnut에서는 포도당, 과당, 자당, lactose, galactose 중에서 포도당이 가장 효과적이었고, 형태적으로는 포도당, 과당, 자당에서 비슷한 양상을 나타내었으나, lactose에서는 다른 탄소원에 비해 더 짧고 진한 녹색의 형태를 나타내었고, galactose에서는 60%의 개체가 갈변화 되어 고사하였다 (Yu and Reed, 1993).

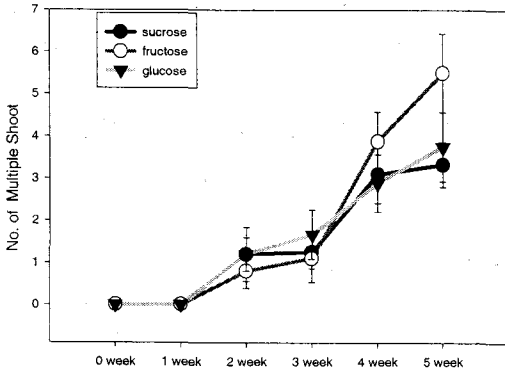


Fig. 1. Effect of carbon source on the shoot formation in *Scrophularia buergeriana*.

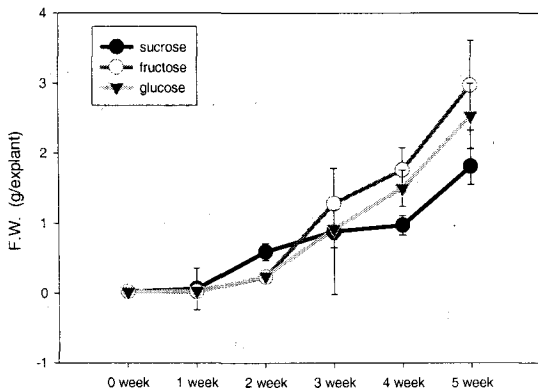


Fig. 2. Effect of carbon source on the fresh weight of *Scrophularia buergeriana* explants.

## 2. 질소원의 종류와 농도

500 ml 플라스크 배양시 배지 내 질산태 질소와 암모니아태 질소의 농도 변화가 신초 발생에 미치

는 영향을 검토하기 위하여 MS 배지에 포함되는  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 와  $\text{KNO}_3$ 의 농도를 달리하여 처리하였다. 암모니아태 질소 함량의 증가에 따라 신초 발생이 감소되었으며, 질산태 질소 함량이 증가됨에 따라 신초 발생이 증가되었다 (Table 1). 질산태 질소가 없는 경우 신초 수는 3.34개 였으나, 암모니아태 질소가 없는 경우 12.32개로 나타나, 현삼의 신초 발생에 있어서 질산태 질소가 주요 영양원으로 이용되고 있음을 보여주고 있다. 그러나 암모니아태 질소가 없는 경우보다는 낮은 농도로 조합처리하는 것이 더 효과적이었다. 따라서 적정 질소원의 농도는  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  413 mg/L와  $\text{KNO}_3$  1900 mg/L를 혼합 처리하는 것이 가장 효과적임이 확인되었다. Choi 등 (1998)에 의하면 MS 배지에서  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 와  $\text{KNO}_3$ 가 각각 배지의 3배 이상일 때에는 재분화에 악영향을 미치는 것으로 보고하였으며, 감자에서는  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  농도가 50 mg/L인 경우에도 신초의 길이와 마디의 수, 생체중은 큰 차이가 없는 것으로 보고된 바 있다 (Evans, 1993).

Table 1. Effect of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  :  $\text{KNO}_3$  ratio on shoot formation in *Scrophularia buergeriana* after 4 weeks

| $\text{NH}_4\text{NO}_3$ (mg/L) | $\text{KNO}_3$ (mg/L) | Mean No. of shoot /explant |
|---------------------------------|-----------------------|----------------------------|
| 0                               | 1900                  | 12.32 <sup>b</sup>         |
| 413                             | 1900                  | 18.83 <sup>a</sup>         |
| 825                             | 1900                  | 10.69 <sup>b</sup>         |
| 1650                            | 1900                  | 7.83 <sup>c</sup>          |
| 1650                            | 950                   | 6.67 <sup>c</sup>          |
| 1650                            | 475                   | 5.67 <sup>c</sup>          |
| 1650                            | 0                     | 3.34 <sup>d</sup>          |

a, b, c, d : The same letters are not significantly different at the 5% level by DMRC

## 3. 배지내 전 질소 함량의 변화

500ml 플라스크 배양에서 전 질소 함량은 3주째까지는 83%에서 75%로 완만하게 감소하다 이후 46%로 급격히 감소하였는데 (Fig. 3), 이러한 현

상은 신초가 급속히 증가하는 시기와 일치하였다. 배양 종료시인 6주에는 질소가 거의 남아 있지 않았다. 생물 반응기에서는 전 질소 함량은 일정한 속도로 감소하여 6주째에는 고갈되었다.

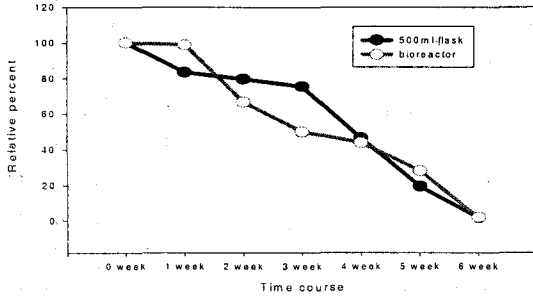


Fig. 3. Change of total nitrogen during shoot formation of *Scrophularia buergeriana* in 500ml flask and bioreactor.

#### 4. 배지내 탄소원 농도의 변화

배양 중에 자당은 포도당과 과당으로 전환되어 탄소원으로 이용되었다 (Fig. 4). 500 ml 플라스틱 배양에서 자당은 3주째에 완전히 고갈되었고, 유리된 과당과 포도당은 절편체의 생체중이 급격히 증가되는 4주와 5주 사이에 감소하였다 (Fig. 4). 생물 반응기 배양의 경우, 자당은 2주째 부터 감소되었고, 포도당은 증가하였다가 차차 감소하였으나, 과당은 5주 이후에 0.3%에서 1.1%로 갑자기 증가하였는데 (Fig. 5), 이에 대한 것은 재검토가 요망된다.

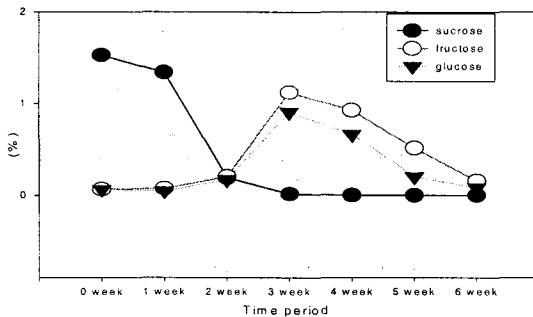


Fig. 4. Change of sucrose during shoot formation of *Scrophularia buergeriana* in 500 ml flask.

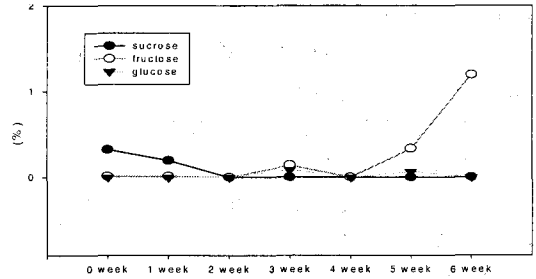


Fig. 5. Change of sucrose during shoot formation of *Scrophularia buergeriana* in bioreactor.

#### 5. 생물반응기의 vessel 종류 및 배지 순환방식

현삼의 다신초 생성에 적합한 생물 반응기 유형은 Air lift type 생물 반응기로 inner loop가 없는 sphere 유형이 가장 효과적이었다. Sphere type에서 g당 신초의 발생 수를 보면 7.4개로 Cylinder 형의 4.5개보다 많아, 현삼 신초 형성에 Sphere type이 더 적합하였다. Vessel type은 Sphere type에서, vessel 내부의 inner loop를 제거하여, inner loop와 생물 반응기 내벽에 절편체가 끼어 생장이 억제되는 현상을 방지할 수 있었는데, 이 경우 신초의 발생 수는 13.1개로 다른 유형에서 보다 더 높게 나타났다. Stirrer type의 생물 반응기에서는 절편체가 모두 Shear stress에 의해 세포의 파괴가 일어났을 뿐만 아니라, shear로 인하여 2~3mm 정도로 작게 갈리어 조직화가 되기보다는 탈분화의 캘러스화가 진행되어 작은 크기의 cell cluster로 성장

Table 2. Comparison of vessel types of bioreactor on shoot formation of *Scrophularia buergeriana* after 6 weeks

|                | Air-lift          |                                |                   | Stirrer type |
|----------------|-------------------|--------------------------------|-------------------|--------------|
|                | Sphere type       | Sphere type without inner loop | Cylinder type     |              |
| No. of shoot/g | 7.47 <sup>b</sup> | 13.08 <sup>a</sup>             | 4.51 <sup>c</sup> | -            |

a, b, c : The same letters are not significantly different at the 5 % level by DMRC

만 이루어졌다. 이 덩어리를 BA 1.0 mg/L와 IAA 0.1 mg/L가 첨가된 MS기본배지에 계대배양 해본 결과 shooting은 진행되었지만 신초의 수는 아주 적었다.

## 적 요

생물 반응기를 이용한 현삼 종묘의 생산에 있어 적정 탄소원과 질소원의 종류 및 농도와, 생물 반응기 형태에 대한 실험의 결과는 다음과 같다.

탄소원으로서 과당을 사용하였을 때 자당 사용의 경우보다 다신초의 형성은 좋았으나, 비정상적인 개체가 많아 종묘 생산용으로는 부적합하였다.

질소원으로 질산태 질소의 효과적 이었으며, 암모니아태 질소 413 mg/L에 질산태 질소 1,900 mg/L로 조합하는 것이 신초 형성에 가장 적합하였는데, 500 ml 플라스크 배양에서 전 질소 함량은 3주째까지는 83% 에서 75% 로 완만하게 감소하다 이후 46% 로 급격히 감소하였다. 이러한 현상은 신초가 급속히 증가하는 시기와 일치하였고 생물 반응기에서는 일정한 속도로 감소되었으며, 배양 종료시인 6주 째에는 500ml 플라스크에서나 생물 반응기 배양액 내의 질소함량은 거의 남아 있지 않았다.

생물반응기의 배지내 자당은 2주째에 완전히 고갈되었으며 500ml 플라스크 배양에서 자당은 3주째에 완전히 고갈되었고, 자당에서 전환된 과당과 포도당은 절편체의 생체중이 급격히 증가되는 4주와 5주 사이에 감소되었다.

현삼의 배양에 적합한 생물 반응기 형태는 inner loop가 없는 air lift형 sphere type이었다.

## LITERATURE CITED

- Akita, M. and T. Shigeoka. 1994. Mass propagation of shoots of *Stevia rebaudiana* using a large scale bioreactor. *Plant Cell Reports* 13 : 180-183.
- Choi, Y. E., D. C. Yang and K. T. Choi. 1998. Induction of somatic embryo by macrosalt stress from mature zygotic embryos of *Panax ginseng*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 52 : 177-181.
- Evans, N. E. 1993. A Preliminary study on the effect of nitrogen supply on the growth in vitro of nine potato genotypes (*Solanum* spp). *Journal of Experimental Botany*. 44 : 837-841.
- Harada, H. 1996. Micropropagation of *Prunus mume*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 46 : 265-267.
- Holme, I. B. 1998. Growth characteristic and nutrient depletion of *Miscanthus* × *Ogiformis* Honda 'Gianteus' suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53 : 143-151.
- Jay, V. 1992. Bioreactor studies on the effect of dissolved oxygen concentrations on growth and differentiation of carrot (*Daucus carota* L.) cell cultures. *Plant Cell Reports* 11 : 605-608.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 15 : 473-497.
- Pellegrineschi, A. 1997. Cowpea embryo rescue. 1. Influence of culture media composition in plant recovery from isolated immature embryos. *Plant Cell Reports* 17 : 133-138.
- Stuart, D. A. 1985. Bioreactor production of Alfalfa somatic embryos. *HortScience* 22 : 800-803.
- Song, J. S., W. S. Lim and Y. A. Chae, 1998. Effect of explants and growth regulators on direct somatic embryogenesis in liquid culture of *Scrophularia buergeriana*. *Korean J. Medi. Crop Sci* 6 : 294-298.
- Chae, Y. A., S. U. Park and H. H. Kim, 1993. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf tissue in *Scrophularia buergeriana* M. Kor. *J. Plant Tissue Culture* 20 : 125-128.
- 육창수. 1989. 原色韓國藥用植物圖鑑. 아카데미서적