식물생명공학회지 제31권 제2호
Korean J. Plant Biotechnol.
Vol. 31, No. 2, 127~132 (2004)

산마늘 다신초 증식과 인경형성에 효율적인 생물반응기 배양방식

박소영*, 이위영, 안진권, 권영진, 박혜진
국립산림과학원 생물공학과

High Efficiency Bioreactor Culture System for Mass Proliferation and Bulblet Formation of *Allium victorialis* var. *platyphyllum* Makino

So-Young Park*, Wi-Young Lee, Jin-Kwon Ahn, Young-Jin Kwon, Hae-Chin Park
Biotechnology Division, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-350, Korea

ABSTRACT A suitable bioreactor culture system for shoot proliferation and bulblet formation of *Allium victorialis* var. *platyphyllum* Makino was established. Uptake of soluble carbohydrates in different bioreactor culture systems was also analyzed during the entire culture period. Optimal conditions for multiple shoot formation were determined in raft culture (RC) and modified raft culture system (MRC) (13-15 per explant) in which the explants were placed on a net contacting liquid medium. For bulblet formation and enlargement, 93.4% of shoot clumps formed bulblets at the basal part. Furthermore, they were uniform in size when cultured with ebb & flood system (E&FS). Bulblets harvested from RC and MRC showed vigorous rooting, however, their growth was not uniform. Whereas soluble carbohydrate contents in the bulblets cultured in E&FS were low, starch content was high. Sucrose, glucose and fructose concentrations in the medium of E&FS culture system decreased as bulblet formation and enlargement proceeded, suggesting that external sucrose is taken up to by the cells before it is hydrolyzed.

Key words: Ebb & flood system, shoot clump, soluble carbohydrates, starch

서 론

산마늘 (*Allium victorialis* var. *platyphyllum* Makino)은 한국, 일본, 중국 등지의 산야에 분포하는 백합과의 다년초로서 한약재 명은 각총(茖葱), 산총(山葱)이고 산채로는 맹이나물 또는 신선초라고 불리 운다. *Allium*속에 속하는 식물들이 대부분 항생, 항종양, 항혈전 등의 효과가 있듯이 (Sata et al. 2001) 산채(山菜)로 이용되어 오던 산마늘 역시 최근 약리적 효능이 인정되면서 점차 기능성 식품으로서 그 중요성이 높아가고 있다 (Choi et al. 2003; Park et al. 1998). 그러나 마늘 (Ayabe and Sumi 2001; Jang et al 2001), 양파 (Karim and Adachi 1997) 등과 같은 *Allium*속 식물들이 오래전부터 그 식품적 가치와 약리적 성분으로 인해 다양한 연구가 진행되어 온 것과는 달리 산마늘은 주로 물질분석 (Andersen and Fossen 1995; Choi et al. 2003; Lim et al. 1996)과 식물학적 분류 (Kim et al. 1997; Seo et al. 1996)에 대한 연구가 일부 되어있을 뿐 증식과 관련하여서는 거의 보고 된 바 없다 (Kim et al. 1996).

최근 생물반응기는 다양한 목적으로 식물의 세포배양 (Son et al. 1999)과 기관배양 (Park et al. 2000)에 이용되고 있는데, 그 종류는 교반식 (stirred jar), 막형 (membrane), 회전원반식 (rotating disc), 공기부양식 (air lift), 또 운용방식에 따라 회분식 (batch), 연속식 (continuous), 유가배양식 (fed-batch) 등으로 나뉜다. 그러나 대부분 미생물 배양 및 식물 세포배양에 적용되며 식물의 기관배양에는 그 목적에 적합한 별도의 운용방식이 요구된다. 근래 들어 식물 기관배양에 생물반응기가 이용된 사례는 백합 종구 (Lian et al. 2002), *Phalaenopsis*의 체세포 배 (Park et al. 2000), 인삼 부정근 (Yu

*Corresponding author Tel 031-290-1167 Fax 031-290-1020
E-mail soypark7@foa.go.kr

et al. 2002) 배양 등에서 보고된바 되었으나 배양방식에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구는 산마늘의 단축경으로부터 유도된 다신초 덩어리의 증식과 인경형성에 효율적인 생물반응기의 배양방식을 구명하고, 이때 배지와 인경내 유리당과 전분 함량을 조사하여 생물반응기를 이용한 구근식물 생산의 기초자료로 삼고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

공시재료로 이용된 산마늘은 2001년 국립산림과학원 산림종자연구소에서 채취된 종자를 2% NaOCl에 20분간 표면살균 후 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지에 파종하여 유식물체를 얻었고, 9% (w/v) sucrose가 첨가된 MS 배지에서 2개월간 배양하여 인경을 비대 시켰다. 비대된 인경의 단축경 부위를 0.5×0.5 cm (1 mm 두께) 크기로 절단하여 BA 3.0 mg/L, NAA 0.1 mg/L와 sucrose 3%가 첨가된 MS 배지에서 8주간 배양하여 다신초 덩어리 (shoot clump)를 유도하였다.

생물반응기 배양

BA와 NAA가 첨가된 배지에서 증식된 다신초 덩어리를 0.1 g 크기로 잘라 5 L 풍선형 공기부양식 생물반응기 (balloon type air-lift bioreactor)에서 8주간 배양하였다. 다신초 증식과 인경비대에 적합한 생물반응기 배양 시스템을 구명하기 위해 각각 4가지로 배양 방식을 달리하였다 (Figure 1). 생물반응기 중간에 망을 걸어 절편체가 배지면에 접하도록 배양하는 ① raft culture (RC), 그리고 RC와 유사한 방법이나 500 ml의 신선한 배지를 생물반응기에 연결하여 배지가 줄어들 때마다 보충시켜주는 ② 수정 raft culture (MRC), 타이머를 연결하여 2시간마다 15분씩 간헐적으로 배지를 공급시키는 ③ ebb & flood 시스템 (E&FS), 배지에 침지된 상태로 배양하는 ④ immersion culture (IMA) 등 4가지로 달리하였다. 이때 E&FS를 제외한 모든 처리에는 0.1 vvm의 공기를 스파자를 통해 배양기간 동안 생물반응기 아래로부터 연속적으로 주입하였고, 배양밀도는 배지 1.5 L 당 100개의 절편체가 포함되도록 하였다.

증식실험에는 BA 3.0 mg/L, NAA 1.0 mg/L와 sucrose 3% (w/v)가 첨가된 MS 배지를, 인경 비대실험에는 sucrose 9%가 첨가된 MS 배지를 사용하였고 5 L 생물반응기에 2 L의 배지를 첨가하였다. 배지는 멸균전 pH를 5.7-5.8로 조정한 후 121 ℃, 1.2기압 하에서 고압증기 멸균하여 사용하였다. 배양 8주 후 증식실험에는 생물반응기에서 수확된 다신초의 총 무게, 신초 수 등을 조사하였고, 인경 비대실험에서는 인경 형성율, 절편체당 형성된 인경무게, 인경 건물율 등을 조사하였다. 이때 인경 형성율은 직경이 3 mm 이상인 인경이 다신초 덩어리의 신초 중 50% 이상일 때 인경형성으로 하였다.

유리당과 전분 분석

위의 인경비대 실험에서 배양기간중 배지내 유리당의 변화를 조사하기위해 배양 초기부터 1주 간격으로 생물반응기로부터 배지 10 mL씩을 채취하였다. 또한 비대된 인경내 유리당과 전분의 함량을 분석하기 위해 배양 8주 후 생물반응기 배양방식별로 생중 5 g의 인경을 채취하여 액체질소로 마쇄한 후 3배의 에탄올을 넣고 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 유리당을 추출하였으며 얻어진 침전물은 전분 분석에

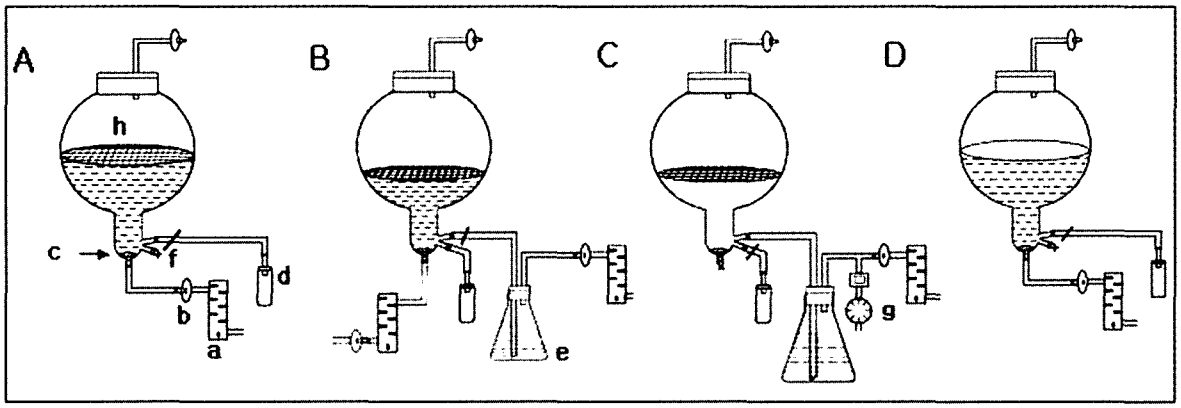

Figure 1. Scheme of 5 L balloon type air-lift bioreactors using for this study. A, Raft culture (RC); B, Modified raft culture with medium reservoir (MRC); C, Ebb&flood system (E&FS); D, Immersion culture with air supply (IMA). (a. air flow meter, b. membrane filter, c. glass sparger, d. sampling port, e. medium reservoir, f. connector for medium exchange and sampling, g. timer, h. net).

사용하였다. 당 분석에는 HPLC (TSP operating system)를 이용하였으며, 이때 분석조건은 이동상으로 acetonitrile 혼합용매 (acetonitrile:water = 72:280), 칼럼은 Prevail™ Carbohydrate ES (Alltech, 5 μm, 4.6×250 mm), 유속은 0.7 mL/min, injection volume은 20 μL, 검출기는 ELSD (Alltech 2000)을 사용하여 분석을 하였다. ELSD 검출기의 tube 온도는 85℃, gas flow은 2.2 L/min으로 조절하였다. 전분 함량은 침전물을 40% 에탄올로 2-3회 세척하고 3배의 8 M HCl과 0.5배의 DMSO를 넣어 60℃ 진탕기에서 1시간 전처리하고 여기에 같은 양의 5 U amyloglucosidase를 포함하는 0.2 M acetate buffer를 넣어 60℃에서 2시간 동안 전분을 분해시킨 후 얻어진 여액의 환원당을 Modified DNS 방법 (Miller 1959)으로 분석하였다. 모든 분석은 3반복으로 하여 표준편차를 구하였다.

배양환경 및 통계처리

모든 배양은 형광등 하에서 25-30 μmol · m^{-2} · s^{-1}의 광량자속밀도와 23±1℃ 온도가 유지되는 배양실에서 16시간 일장으로 8주간 진행되었다. 결과는 통계분석용 프로그램 (SAS Institute, Cary, N. C.)을 이용하여 분석하였고 평균은 Duncan의 다중검정으로 유의성을 비교하였다.

결과 및 고찰

산마늘 인경의 단축경 배양을 통해 얻은 다신초 덩어리를 4가지 배양방식에 따라 생물반응기에서 8주간 배양하였다. 다신초 증식에는 절편체가 배지면에 접하도록한 RC와 배지가 줄어들 때마다 신선한 배지를 공급하여 일정한 배지량을 유지하도록한 MRC가 신초 증식에 가장 양호하였다 (Table 1). 배지를 간헐적으로 공급해준 E&FS과 계속 배지에 침지된 상태로 배양하는 IMA 방식은 증식된 신초 수가 RC (절편체당 15개)의 63%와 55%에 그쳤다. RC와 MRC 방식으로 배양한 절편체에서는 다수의 신초가 치밀하게 형성된 반면 (Figure 2A, B) E&FS 처리구에서는 인편엽이 길게 형성되었으며 (Figure 2C), IMA에서는 부풀은 듯한 형태의 다소 비정상적인 신초가 형성되었다 (Figure 2D). 식물체를 계속 액체배지에 침지한 상태로 배양하면 식물체는 산소결핍과 통기스트레스 하에 놓이게 되는데, Ziv (1991)는 이러한 특수한 액체배양 환경에 의해 과다한 양의 에틸렌이 형성되고, 식물체내 효소 활성에 변화가 생겨 결과적으로 형태적 변화를 야기한다고 하였다. 그러나 동종의 생물반응기에서 백합의 종구 배양에는 액체배지에 침지 배양하는 IMA 방식이 효과적으로 이용되었음을 볼 때 (Lian et al. 2002), 유사한 구근류라 해도 종에 따라 구근의 형태나 증식 및 비대 생리가 달라 다른 결과를 가져온 것이라 생각된다.

생물반응기에서 인경 형성과 비대에 적합한 배양 시스템을 구명하고자 sucrose 9%가 첨가된 MS 배지에서 위와 동일한 4가지 방식으로 다신초 절편을 배양하였다. 인경 형성율은 E&FS 처리구에서 93.4%로 가장 높았고 (Table 2) 비대된 인경도 형태적으로 가장 균일하였다 (Figure 2G). RC와 MRC에서 배양된 인경은 다수의 뿌리가 10 cm 이상 길게 자라 오히려 순화시 단점이 될 수 있고 형성된 인경도 크기나 형태에 있어 불균일 하였다 (Figure 2E, F). 액체배지에 침지시킨 상태에서 공기를 연속적으로 공급한 IMA 처리구에서 뿌리는 전혀 형성되지 않았고 인경의 형성율도 46.7%로 가장 낮았으며, 다신초 증식시와 마찬가지로 형태적으로는 비정상이었고 크기도 불균일하였다 (Table 2, Figure 2H).

배양 시스템별로 수확한 인경내 유리당 함량은 IMA 방식으로 배양된 인경에서 가장 높았고 전분함량은 MRC, E&FS, IMA 처리구에서 높았다 (Figure 3, 4). 배양기간별 배지내 유리당중 sucrose 함량은 RC, MRC, IMA에서 크게 변동이 없었고 비정상적으로 인경이 비대 된 IMA와 인경 형성이 좋았던 E&FS에서 배양말기에 glucose와 fructose 함량이 낮았다 (Figure 5). 배지에 첨가된 sucrose는 식물 세포벽에 분포하는 acid invertase (INV, EC 3.2.1.26)에 의해 glucose와 fructose로 가수분해 되어 식물체로 다시 이용되며, 인경 비대 시기에 전분 생합성 효소인 ADP-glucose pyrophosphorylase (EC 2.7.7.27)의 활성이 증가하면서 전분 집적이 이루어진다 (Vishnevetsky et al. 2000). IMA 처리구에서 배양말기 sucrose 농도는 RC나

Table 1. Effects of bioreactor culture system on shoot proliferation in *Allium victorialis* after 8 weeks of culture.

Bioreactor system	Total fresh wt (g)	Plantlet wt (g)	No of shoots per explant
Raft culture (RC)	90.8	1.5a[z]	15.0a
Modified raft culture (MRC)	68.8	0.8b	13.1a
Ebb&flood system (E&FS)	110.6	1.6a	9.4b
Immersion culture with air (IMA)	122.7	1.6a	8.3b

[z] Mean separation within columns by Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$).

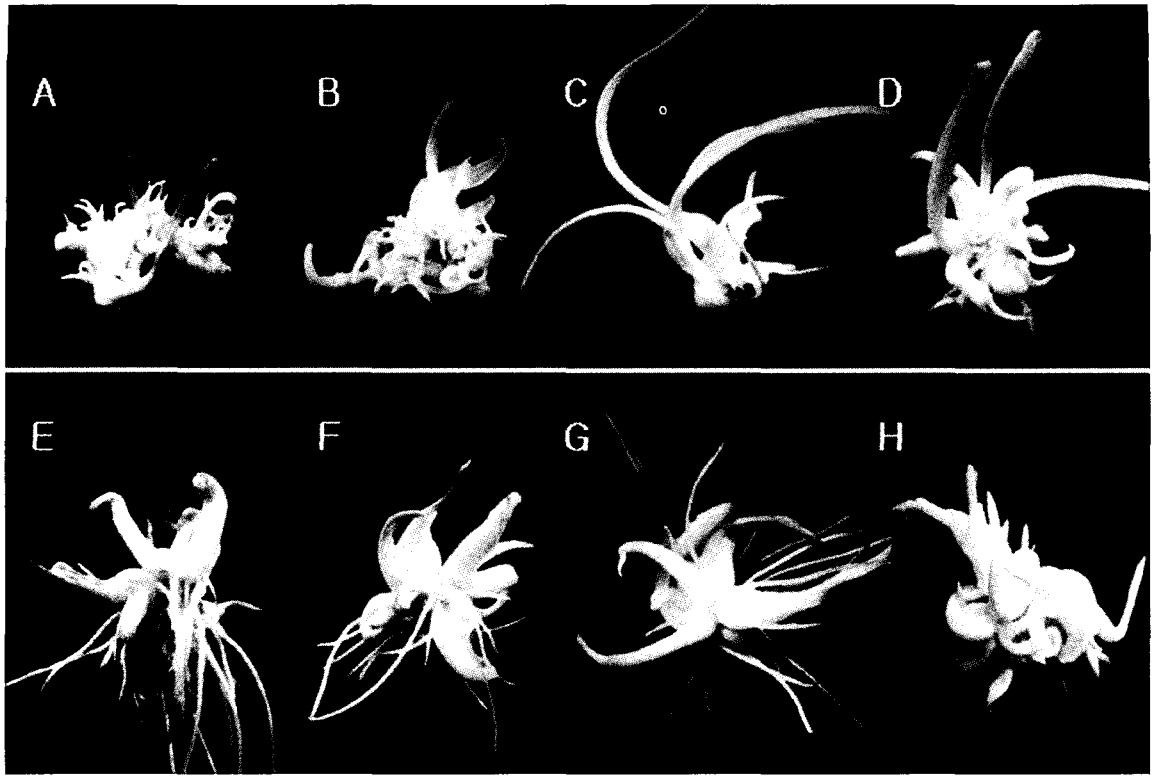

Figure 2. Shoot (A-D) and bulblet clumps (E-H) of *Allium victorialis* harvested from 5 L balloon type air-lift bioreactors after 8 weeks of culture. A-D, Shoot clumps cultured in MS medium containing 3.0 mg/L BA, 0.1 mg/L NAA and 3% sucrose by 4 types of culture system; RC (A), MRC (B), E&FS (C) and IMA (D); E-H, Bulblet clumps cultured in MS medium containing 9% sucrose by 4 types of culture system; RC (E), MRC (F), E&FS (G) and IMA (H).

Table 2. Effects of bioreactor culture system on bulblet formation and enlargement in *Allium victorialis* after 8 weeks of culture.

Bioreactor system	Total fresh wt (g)	Bulblet formation (%)	Fresh wt of bulblets (g)	Dry matter of bulblets (%)
Raft culture (RC)	69.3	59.6bc[z]	0.61c	32.7ab
Modified raft culture (MRC)	82.2	77.0b	0.99b	35.7a
Ebb&flood system (E&FS)	72.1	93.4a	0.74c	27.2b
Immersion culture with air (IMA)	137.5	46.7c	1.34a	33.1ab

[z] Mean separation within columns by Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$).

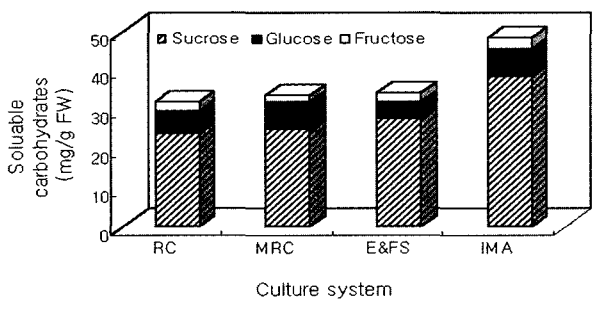

Figure 3. Contents of soluble carbohydrates in the bulblets of *Allium victorialis* harvested from 4 types of bioreactor culture systems after 8 weeks of culture.

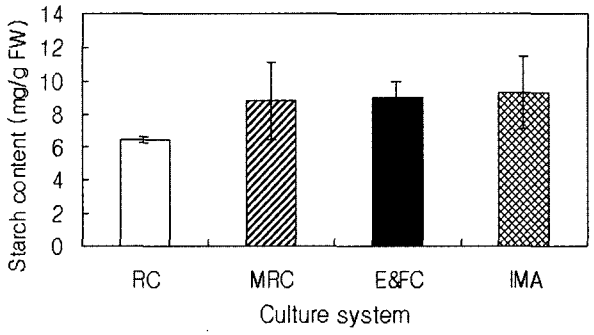

Figure 4. Contents of starch in the bulblets of *Allium victorialis* harvested from 4 types of bioreactor culture systems after 8 weeks of culture.

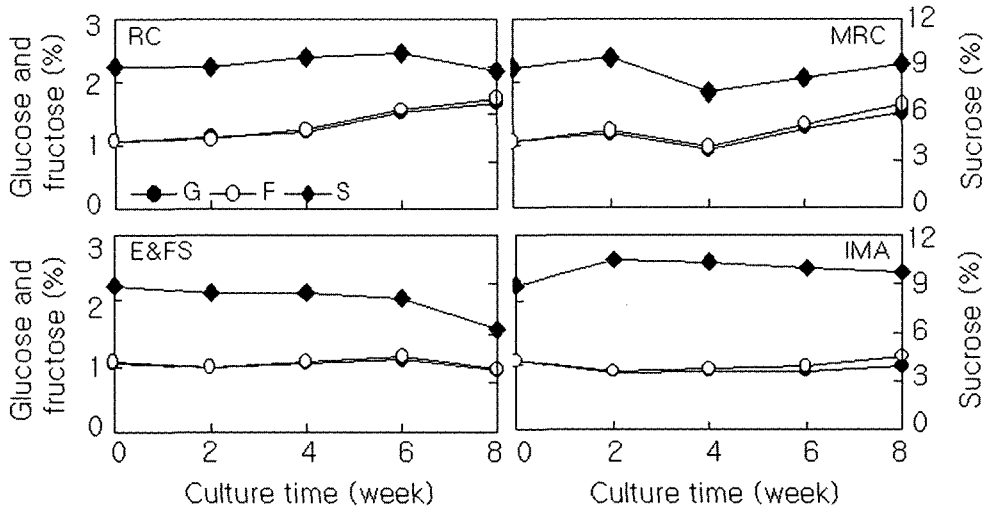

Figure 5. Changes of soluble carbohydrates content in the medium during culture period.

MRC와 크게 다르지 않으나 glucose와 fructose 농도가 낮은 것으로 볼 때 식물체의 생육에 sucrose로부터 가수분해된 glucose와 fructose 정도만을 이용한 것으로 보인다. 이와 비교하여 E&FS 처리구에서는 인경형성 후 비대시기인 6-8주 사이에 배지내 sucrose, glucose와 fructose 모두 감소되었는데 이는 첨가한 sucrose가 가수분해되기 전에 glucose나 fructose와 함께 식물체로 바로 이용됨을 보여주는 것이었다. 이러한 결과는 백합 종구의 생물반응기 배양에도 볼 수 있었는데 Lian 등 (2002)은 모든 유리당이 일시에 감소하는 시기에 새로운 배지를 더 첨가함으로서 구중이 높은 구를 더 많이 생산할 수 있었다고 하였다. 배지내 총 sucrose의 농도는 E&FS의 경우 실험 초기 9%였는데 배양말기까지 6% 정도의 sucrose가 남아있었다. Sucrose 9% 첨가시 많은 양의 sucrose가 이용되지 않고 배지내에 남아있었으나 인경비대에는 저농도의 sucrose 처리보다 좋았는데 (결과 미제시) 이는 첨가해주는 sucrose 중 3% 정도만이 식물생육에 이용되고 6% 정도는 삼투압 조절의 기능을 하는 것으로 생각된다.

위의 실험을 통해 산마늘의 다신초 증식과 인경형성 등 생육단계와 목적에 적합한 생물반응기 배양방식을 구명하였고, 이 과정에서 일어나는 당 대사를 분석함으로서 생물반응기를 이용한 산마늘의 대량생산 기초를 마련할 수 있었다. 그러나 생물반응기로부터 생산된 식물체의 순화와 재배에 관하여는 아직 연구해야 할 과제로 남아있다.

적 요

본 실험은 산마늘의 신초 증식과 인경 형성에 적합한 생물반응기 배양방식과 인경 형성시 배양방식에 따른 당 대사를 구명하고자 실시되었다. 다신초 증식에는 생물반응기에 망을 걸고 배지에 절편체를 접하게 배양한 RC와 MRC (13-15개)에서 가장 좋은 결과를 얻었다. 인경형성과 비대에는 간헐적으로 배지를 공급해준 E&FS에서 93.4%의 인경형성이 이루어졌고 크기에 있어서도 균일하였다. RC와 MRC에서 형성된 인경은 뿌리가 무성하였으며 인경의 크기도 균일하지 않았다. 배양방식별로 수확한 인경내 유리당 함량은 전반적으로 E&FS에서 낮았던데 반해 전분 함량은 높았다. 배지내 sucrose, glucose와 fructose는 인경 비대 시기에 감소되었는데 이는 첨가한 sucrose가 가수분해 되기도 전에 glucose나 fructose와 함께 식물체로 바로 이용됨을 보여주는 것이었다.

인용문헌

Andersen M, Fossen T (1995) Anthocyanins with an unusual acylation pattern from stem of *Allium victorialis*. Phytochemistry 40: 1809-1812

Ayabe M, Sumi S (2001) A novel and efficient tissue culture method – "stem-disc dome culture" – for producing virus-free galic (*Allium sativum* L.). Plant Cell Rep 20: 503-507

Choi JW, Lee KT, Kim WB, Park KG, Jung HJ, Park HJ (2003) Pharmcological effects of the *Allium victorialis* var. *platyphyllum* exracts on the rats induced by Streptozotocin, Poloxamer 407, CCl_4 and D-Galactosamine. Kor J Pharmacogn 34: 250-255

Jang W, Liu D, Hou W (2001) Hyperaccumulation of cadmium by roots, bulblets, and shoots of galic (*Allium sativum* L.). Bioresource Tech 76: 9-13

Karim MA, Adachi T (1997) Cell suspension, isolation and culture of protoplasts of *Allium cepa*. Plant Cell Tiss

Org Cult 51: 43-47

Kim WB, Yoo KO, Ryu SY, Seo JT (1997) Intraspecific variations of the *Allium victorialis* var. *platyphyllum* by polymerase chain reaction. J Kor Soc Hort Sci 38: 129-132

Kim WB, Kim JG, Lee EA, Kim BH, Kim JK, Lim HT (1996) Plant regeneration from bulb explants of *Allium victorialis* var. *platyphyllum* Makino. Korean J Plant Tissue Cult 23: 123-127

Lian M, Chakrabarty D, Paek KY (2002) Growth and uptake of sucrose and mineral ions by bulblets of *Lilium* Oriental Hybrid 'Casablanca' during bioreactor culture. J Hort Sci Biotech 77: 253-257

Lim SC, Park HJ, Yun SY, Lee MS (1996) Structures of flavonoids and furostanol glycosides isolated from the bulbs of *Allium victorialis* L. J Kor Soc Hort Sci 37: 675-679

Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chem 31: 426-428

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497

Park HJ, Kim WB, Yoo KO, Jung WT (1998) Chemical analysis on biologically active substances among habitats of *Allium victorialis* for a high income crop. Korean J Plant Res 11: 51-60

Park SY, Murthy HN, Paek KY (2000) Mass multiplication of protorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. Plant Cell Tiss Org Cult 63: 67-72

Sata SJ, Bagatharia SB, Thaker VS (2001) Induction of direct somatic embryogenesis in garlic (*Allium sativum*). Methods Cell Sci 22: 299-304

Seo BB, Lee SH, Pak JH, Kim IS, Song SD (1996) Karyological variation of callus-derived regenerants in *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. J Plant Biol 39: 231-235

Son SH, Choi SM, Choi KB, Lee YH, Lee DS, Choi MS, Park YG (1999) Selection and proliferation of rapid growing cell lines from embryo derived cell cultures of Yew tree *(Taxux cuspidata* Sieb. et Zucc). Biotechnol Bioprocess Eng 4: 112-118

Vishnevetsky J, Zamski E, Ziv M (2000) Carbohydrate metabolism in *Nerine samiensis* bulbs developing in liquid culture. Physiol Plant 108: 361-369

Yu KW, Gao W, Hahn EJ, Paek KY (2002) Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of *Panax ginseng* C.A. Meyer. Biochem Eng J 11: 211-215

Ziv M (1991) Vitrification: Morphological and physiological disorders of in vitro plants. In: Debergh P. C., Zimmerman R. H. (eds) Micropropagation: technology and application. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands pp 45-69

(접수일자 2004년 1월 27일, 수리일자 2004년 4월 30일)