

## 바이오리액터 배양기에 의한 감자소괴경 대량 생산

김재훈 · 최은경 · 오승철 · 주선아 · 유동민 · 김순갑 · 김정국

## Mass production of potato microtubers by bioreactor culture

Jae Whune Kim · Eun Gyung Choi · Seung Cheol Oh · Sun Ah Joo · Dong Min You · Soon Kap Kim · Jeong-Kook Kim

Received: 8 March 2010 / Accepted: 20 March 2010  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** Highest increase of biomass was observed when tissue-cultured potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Chubaek) shoots were cultured in a liquid medium containing 1/3 MS solution in a 18 L bioreactor, as compared to 1/4 and 1/2 MS solution. The medium containing 1/4 MS solution showed higher increase of shoot biomass than one containing 1/2 MS solution. Potato microtubers were formed when the medium was exchanged with the medium for microtuber formation and incubated under dark condition. The microtubers were observed first at some axillary buds one week after incubation under dark condition and then at most of the axillary buds by the end of 3 weeks. The 1.5 MS liquid medium and 20°C were optimal conditions. By the end of 6 weeks, more 1,000 microtubers were formed in the 18 L bioreactor. Then, greened microtubers were harvested after one week culture under light condition.

### 서론

감자재배는 바이러스 피해가 가장 큰 문제점으로 최초의 무바이러스 씨감자 (virus free seed potatoes)인 소괴경은 조직배양에 의해 생산되며 수십 년 전부터 조직배양

한 감자줄기로부터 소괴경을 생산하는 연구가 수행되었다 (Barker 1953; Palmer 1970; Wang and Hu 1982; McCown and Joyce 1991; Jeon et al. 1992). 조직배양 감자 소괴경은 agar나 gelrite로 경화시킨 고체배지 (solid medium)가 들어 있는 페트리디쉬 배양용기에서 감자줄기를 배양한 후, 소괴경 형성조건인 배지로 바꿔 주면 소괴경이 형성된다 (Kim et al. 1992; Choi et al. 1998; Hwang and Lee 2008). 배양용기가 작은 고체배지에서 감자줄기를 배양하여 소괴경을 생산하면 소괴경의 크기가 작고 단가가 비싼 단점이 있어 이들을 바로 하우스나 밭에서 재배하는데도 여러 가지 문제점이 있다 (Kim and Joung 1994; Park et al. 1996).

조직배양에 의한 감자 소괴경 형성은 일장과 온도와 같은 환경요인과 배지농도, 당, 식물생장조절 물질 등의 배양용기내의 조건에 의해 큰 영향을 받는 것으로 알려져 있다 (Hussey and Stacey 1984; Menzel 1985; Bennett 1991). 감자의 소괴경 형성은 단일 (8시간 정도)과 17°C 전후의 낮은 밤 온도는 유리한 조건으로 알려져 있고, 반면 16시간 정도의 장일과 25°C 이상의 높은 밤 온도는 저해하는 것으로 알려져 있다 (Tibbitts and Wheeler 1987; Kim et al. 1992; Hwang and Lee 2008). 조직배양 감자 소괴경은 감자줄기를 어떻게 배양했느냐에 따라 크기, 품질, 개수 등에 많은 차이가 있다. 즉 조직배양 감자 줄기와 잎이 크고 굵으면 이들로부터 크고 튼실한 많은 수의 소괴경을 얻을 수 있다 (Park et al. 1992; Hwang and Lee 2008). 김 등은 (Kim et al. 2009) 액체배지가 들어 있는 소형 유리바이오리액터 배양기에서 감자줄기를 대량으로 생산하는 방법을 보고하였다. 액체배지가 들어있는 바이오리액터 배양기에서 감자 소괴경을 생산하는 방법은 기본적으로 고체배지와 같다. 즉 1) 바이오리액터 내에서 감자줄기가 충분히 성장하면 배지를 소괴경 형성용 배지

J. W. Kim (✉) · E. G. Choi · S. C. Oh · S. A. Joo  
(주)마이크로프랜츠 중앙연구소  
(Microplants, #501, SBC Factory B/D Pallbokdong, Jeonju,  
Jeonbuk 561-203, Korea)  
e-mail: kimsabsil@hanmail.net

D. M. You · S. K. Kim · J.-K. Kim  
고려대학교 생명과학대학  
(School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University,  
Seoul 136-701, Korea)

로 교환해 주는 단계와 2) 감자 소괴경이 생기도록 배지 조건 및 배양환경을 설정해 주는 단계로 구분할 수 있다.

본 연구는 조직배양 감자 소괴경을 바이오리액터에서 생산하기 위해 감자줄기를 대량으로 증식시킨 후 소괴경 형성용 배지로 교환하여 어두운 곳에서 배양하면서 감자 소괴경이 많이 생길 수 있는 최적의 배지 및 온도 조건을 조사하였다. 또한, 조직배양 감자 소괴경이 튼실하게 잘 성장하여 우량 씨감자 생산용으로 사용할 수 있도록 배양환경을 설정할 수 있도록 하였다.

### 재료 및 방법

#### 바이오리액터 배양기에서 감자줄기 대량 증식

감자 2기작 품종인 추백 (*Solanum tuberosum* L. cv. Chuback)의 경정배양을 통해 얻어진 감자줄기를 30 mL MS 배지 (Murashige and Skoog 1962)가 들어 있는 배양용기 (직경 10 cm, 두께 3 cm 내외, 배지용량 20 mL 내외)에 넣어 3주간 배양하여 약 5 cm 정도로 키웠다(Kim et al. 2009). 이 감자줄기를 측아 (axillary bud)가 1~2개 정도 함유하는 마디절편 약 100개를 10 L 액체배지가 들어 있는 18 L 크기의 바이오리액터(bioreactor) 배양기에 넣어 배양하였다. 바이오리액터 내의 MS 액체배지 (2% 설탕)의 농도가 1/2, 1/3, 1/4(1/2 MS, 1/3 MS, 1/4 MS)로 약하게 된 배지에서 감자줄기 성장률을 조사하였다. 감자줄기의 생중량은 각각의 배양조건 마다 10개의 바이오리액터 배양기에서 배양하여 자란 줄기의 평균치로 하였다.

폴리카보네이트 (PC) 재질로 된 바이오리액터 배양기 안으로 무균공기의 주입은 시판되는 수족관용 에어펌프 (LP-60 air-pump)를 사용하여 구멍크기 0.2  $\mu$ m 필터 (Midisart 2000, Sartorius사, 독일)를 통과하도록 하였다. 바이오리액터 배양환경은 25 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C의 온도와 직사광선이 드는 창이 있는 밝은 장소로 하였다.

#### 바이오리액터 배양기에서 감자 소괴경 대량 생산

감자줄기와 잎이 충분히 성장하면 바이오리액터내의 줄기성장용 배지를 따라내고 5% 설탕이 첨가된 MS 액체배지의 농도가 높은 소괴경 형성용 배지로 교환해 준다. 소괴경 형성용 배지로 갈아 준 바이오리액터 배양기는 배양실이 어두운 암실과 같은 곳으로 옮겨 소괴경이 생기도록 배양환경을 바꾸어 주었다. 바이오리액터의 소괴경 형성용 배지는 MS 액체배지의 농도를 1배, 1.5배, 2배 (1 MS, 1.5 MS, 2 MS)로 하였다. 배양온도는 18, 20, 22, 24 $^{\circ}$ C 조건으로 배양하면서 감자 소괴경의 생산량을 조사하였다. 각 각의 조건에서 만들어진 소괴경 개수는 10개

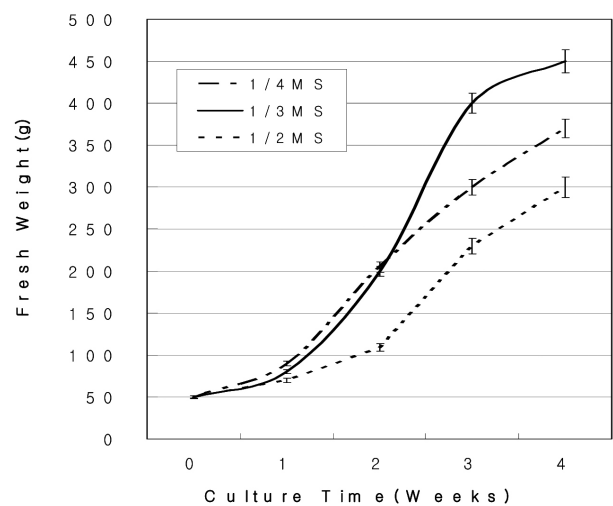
의 바이오리액터 배양기에서 배양하여 만들어진 소괴경의 평균치를 조사하였다.

암 배양실에서 6주 정도 배양한 후 감자소괴경이 대부분 성장을 완료하면 바이오리액터 배양기를 줄기배양 조건인 명 배양실로 옮겨서 소괴경이 바이오리액터내에서 녹화되도록 하였다. 녹화된 소괴경은 바이오리액터에서 꺼내 잘 세척한 후 바람이 잘 통하는 곳에서 보관하여 싹이 트면 파종하는데 사용하였다.

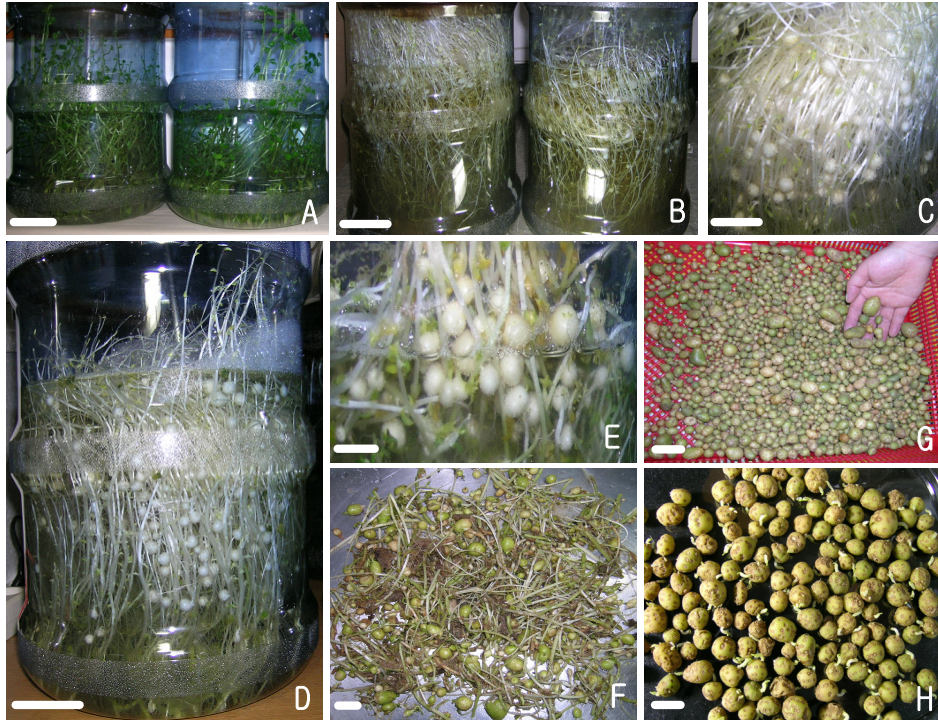
### 결과 및 고찰

#### 바이오리액터 배양기에서 감자줄기 대량 증식

감자줄기 마디절편의 측아에서 새로운 줄기의 생장은 1/3 MS 액체배지가 첨가된 바이오리액터에서 가장 양호하였고, 1/4 MS 액체배지, 1/2 MS 액체배지 순으로 감자줄기의 생중량이 증가하였다 (Fig. 1). 1/3 MS 액체배지에서 감자줄기 절편을 배양하였을 때 1주 후부터 측아로부터 새로운 감자줄기가 성장하고 2주 후부터는 광합성작용이 왕성하여 감자줄기의 성장과 함께 잎도 크게 자라며 생중량이 급격히 증가하였다 (Fig. 1). 저농도인 1/4 MS 액체배지의 경우에는 배양 초기에 감자줄기의 생장이 양호하였지만 지속적인 성장을 하기에는 영양분이 부족하였다. 반면에 1/2 MS 액체배지에서 초기에 생장이 느린 이유는 배지농도가 감자줄기의 성장에 지장을 줄 정도로 다소 높았기 때문으로 생각된다. 바이오리액터 배양기에서 감자 줄기의 성장에 해가 없는 액체배지의 농도는 1/3 MS배지이고 이 조건에서는 감자줄기 마디절편의 측아로부터 튼실한 새로운 줄기와 잎이 생성되었다 (Fig. 2A).



**Fig. 1** Effects of MS liquid medium strength on the growth of Chuback potato shoots in 18 L bioreactor during 4 weeks of culture. The data represent the mean $\pm$ SE of 10 replicates



**Fig. 2** Shoots and microtubers of potato cv. Chubaek propagated by bioreactor culture containing liquid medium. A) Shoots grown in bioreactor containing 1/3 MS liquid medium. B) Microtubers propagated in bioreactor containing 1.5 MS liquid medium. C and D) Microtubers formed at the axillary bud by culturing for 3 weeks in bioreactor. E) Microtubers after 6 weeks of culture. F) Greening of microtubers by culturing in light condition. G) Harvested microtubers incubated under dark condition at 25°C. H) Germinated microtubers. Scale bars represent 6 cm (A, B and D) and 1 cm (C, E, F, G and H)

1/3 MS 액체배지에서 배양한 감자줄기를 바이오리액터 내에서 절단하여 동일한 배양조건의 바이오리액터로 옮겨 계대배양하면 3주마다 8배 정도의 감자줄기를 증식시킬 수 있다 (Fig. 1).

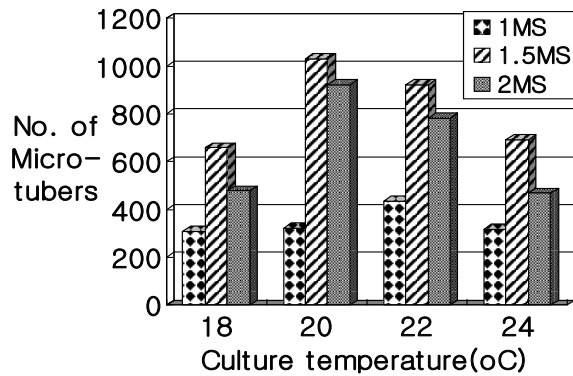
본 연구에서는 액체배지가 들어 있는 5~10 L 풍선형 유리바이오리액터 배양기에서 감자줄기를 배양하여 증식시키는 방법 (Kim et al. 2009)을 더욱 발전시켜 폴리카보네이트 재질로 된 18 L 원통형 (생수통) 바이오리액터 배양기에서 감자줄기를 배양하였다. 폴리카보네이트 바이오리액터 배양기는 기존 유리바이오리액터보다 깨지는 경우가 적고, 배양기의 받침대가 없어서 배양작업이 간편하여 작업효율을 수십배 높일 수 있는 장점이 있다. 또한, 바이오리액터 내의 감자줄기를 절단하여 다시 같은 조건의 바이오리액터 배양기로 계대배양할 수 있어 크고 튼튼한 줄기와 잎을 가진 감자줄기를 대량으로 증식시키기에 유리하다.

조직배양용기내의 감자 줄기와 잎이 크게 자랄수록 이 들로부터 기내 소괴경을 만들 때 소괴경은 크고 개수도 많이 생성되므로 감자줄기와 잎을 되도록 크게 키우는 것이 바람직하다 (Park et al. 1992; Hwang and Lee 2008). 감자 줄기가 다 자란 바이오리액터의 배지를 감자 소괴경 형성용 액체배지로 교체해 주고 어두운 곳에서 배양

하면 감자줄기의 측아에서 다량의 소괴경이 만들어진다 (Fig. 2B). Akita and Takayama (1994)는 액체배지에 감자 줄기가 잠겨 있으면 줄기생장이 늦어지고, 소괴경이 전혀 만들어지지 않는다고 하였지만 본 실험에서는 감자줄기의 생장도 양호하였고, 감자 소괴경도 많이 만들어졌다 (Fig. 2 A and B).

#### 바이오리액터 배양기에서 감자 소괴경 대량 생산

바이오리액터 배양기에서 감자 줄기와 잎이 충분히 성장하면 바이오리액터내의 배지를 소괴경 형성용 배지인 고농도 MS 액체배지로 교체해 주고 소괴경이 생길 수 있도록 배양환경을 바꿔 주어야 한다. 먼저 배지교환은 바이오리액터에서 3주간 배양한 감자줄기 배지를 조심해서 따라내고 소괴경 형성용 액체배지로 교환해 준다. 모든 작업은 clean bench에서 무균적으로 해야 하므로 대량의 액체배지를 따라내고 교환할 때 바이오리액터 배양기가 오염되지 않도록 특히 주의한다. 새 배지로 갈아준 바이오리액터는 배양실이 어두운 암실과 같은 곳으로 옮겨 감자 소괴경이 생길 수 있도록 배양환경을 바꿔 주어야 한다. 증식된 감자줄기에서 소괴경이 만들어지는 조건은 배지 농도, 온도, 빛 등에 영향을 받는 것으로 알려져 있



**Fig. 3** Effects of culture temperature and medium strength on the mass production of Chuback potato microtubers in 18 L bioreactor after 6 weeks of culture. The data represent the mean±SE of 10 replicates measured

는데 고체배지에서의 소괴경 형성은 MS 배지성분이 고농도이고, 배양온도가 저온 조건이 필요한 것으로 알려져 있다 (Kim et al. 1992; Hwang and Lee 2008). 바이오리액터 배양기의 MS 액체배지의 농도를 1.5배로 높게 한 (5% sucrose) 소괴경 형성을 배지로 교환한 바이오리액터 배양기에서 배양한지 1주일 후부터 감자줄기의 측아 부분에서 흰색의 감자소괴경이 생성되기 시작하여 3주정도 되면 작은 소괴경이 많이 생성된다 (Fig. 2 C and D). 새로 생성된 감자소괴경은 감자 줄기와 잎의 저장물질이 소괴경으로 이동하여 축적되고 일부는 액체배지내의 영양분을 흡수하면서 성장한다. 한천배지에서 소괴경형성은 배지와 접한 아래쪽 뿌리로부터 1~2마디의 측아에서 주로 생기지만 바이오리액터 액체배지에서 소괴경형성은 아래쪽 뿌리로부터 5~6마디의 측아에서도 생성되었다 (Fig. 2D). 녹색의 줄기와 잎을 쪼지 못해 서서히 흰색으로 변하고 줄기는 웃자라지만 소괴경은 성장을 계속하여 6주 후에는 0.5~1.0 g 정도의 무게가 되었다 (Fig. 2E).

고체배지에서의 소괴경 형성은 배지 농도가 높은 2 MS배지가 가장 좋았고, 온도는 17°C 정도가 가장 좋았고 보고되었다 (Park et al. 1992; Kim et al. 1992). 그러나 액체배지를 사용하는 바이오리액터 배양기에서의 소괴경형성은 1.5 MS 액체배지에서 650~1,000개 정도 생성되었다 (Fig. 3). 바이오리액터내의 액체배지에서 감자줄기를 배양할 때 고체배지보다 농도를 현저히 낮춰주었을 때 잘 자랐지만 소괴경형성은 액체배지와 고체배지의 농도가 비슷하였다. 그 이유는 액체배지에서 자란 감자줄기와 잎은 커서 이들을 절단하지 않고 배지만 교환해 줌으로서 고농도의 액체배지에서 감자 줄기와 잎이 충분히 적응할 수 있었기 때문으로 사료된다. 1 MS 액체배지와 2 MS 액체배지는 소괴경형성에 있어서 모든 온도조건에서 1.5 MS 보다 적게 생성되었다 (Fig. 3). 따라서 바이오리액터에서 감자중서를 생산하기 위해서는 1.5 MS

액체배지를 사용하는 것이 좋은 것으로 생각된다. 감자 소괴경형성에 있어서 한천배지에서 최적온도는 17°C 정도이고, 20°C 이상일 경우 소괴경형성이 감소하는 것으로 보고하였다 (Kim et al. 1992; Park et al. 1992). 그러나 본 실험의 바이오리액터 배양기의 액체배지에서 소괴경형성의 최적온도가 20°C였고, 22°C에서도 상당히 높았다 (Fig. 3). 그 이유는 감자 줄기나 소괴경이 액체배지에 잠겨있는 상황이 한천배지의 공기 중에서 배양되는 환경과 상당히 다르기 때문으로 생각된다.

바이오리액터내의 감자 소괴경은 6주 정도 배양하면 충분히 성장하는데 수확하기 전에 바이오리액터를 빛이 있는 곳으로 옮겨 1주 정도 배양하여 소괴경이 녹색을 띠게 한 후 배양용기에서 꺼낸다 (Fig. 2F). 소괴경이 녹색을 띠면 재질이 단단하고, 독성물질이 생겨 해충 및 잡균들로부터 상해 피해를 줄일 수 있다. 감자줄기에서 소괴경을 분리하여 깨끗한 물에 씻은 후 바람이 잘 통하는 곳에서 건조시킨 후 어두운 곳에 보관한다 (Fig. 2G). 바이오리액터에서 생산된 추백 감자소괴경은 크기가 평균 0.5 g 정도이지만 실온에서 2개월 정도의 휴면기간이 지나면 싹이 대부분 나온다 (Fig. 2H). 싹이 튼 소괴경을 온실이나 노지에 파종하여 무바이러스 씨감자인 기본종 (Elite 1)을 생산하는데 사용할 수 있다. 일반적으로 감자 소괴경을 생산하는데 사용하는 한천배지의 배양용기 1개에서 소괴경을 10~15개 정도 생산하는데 본 연구에서는 사용한 18 L 바이오리액터 배양기에서는 1,000개 이상의 소괴경을 대량으로 생산할 수 있었다. 따라서 씨감자 증식을 빨리할 수 있는 장점이 있어 신품종 감자의 농가 공급을 기존 조직배양 방법보다 신속하게 할 수 있을 것이다.

**적 요**

조직배양 감자줄기를 1/3 MS 액체배지가 첨가된 18 L 바이오리액터 배양기에서 배양하였을 때 생중량 증식이 가장 양호하였고, 1/4 MS 액체배지, 1/2 MS 액체배지 순으로 감자줄기의 생중량이 증가하였다. 감자 소괴경형성은 감자줄기를 배양한 바이오리액터에서 배지를 따라내고, 소괴경형성용 배지로 교환하여 어두운 곳에서 암배양하면 소괴경이 형성되었다. 소괴경은 암배양 1주후부터 줄기 마디의 측아에서 생성되기 시작하여 3주 정도에 대부분이 형성되고 1.5 MS 액체배지와 20°C 온도 조건이 최적이었다. 이 조건에서는 6주 정도 배양하면 18 L 바이오리액터 배양기에서 1,000개 이상의 소괴경을 생산할 수 있었다. 어두운 배양조건에서 소괴경이 거의 성장하면 바이오리액터를 빛이 있는 조건으로 옮겨 1주정도 배양한 후 녹화된 소괴경을 수확하였다.

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업 (과제번호: 20080401034013) 연구지원비로 수행되었습니다.

## 인용문헌

- Akita M, Takayama S (1994) Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control. *Plant Cell Rep* 13:184-187
- Barker WG (1953) A method for the in vitro culturing of potato tubers. *Science* 118:384-385
- Bennett SM, Tibbits TW, Cao W (1991) Diurnal temperature fluctuation effects on potatoes grown with 12hr photoperiods. *Am Potato J* 68:81-86
- Choi KH, Yang DC, Jeon JH, Kim HS, Joung YH, Joung H (1998) A comparison of microtuberization efficiency between normal and adenosine deaminase transgenic potato plantlets cultured *in vitro*. *Kor J Plant Res* 11:252-256
- Hussy G, Stacey NJ (1984) Factors affecting the formation of in vitro tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Ann Bot* 53:565-578
- Hwang HY, Lee YB (2008) Influences by position of node and existence of leaf on microtuberization in node culture of potato. *Kor J Plant Biotechnol* 35:63-68
- Jeon JH, Joung H, Park SW, Kim HS, Byun SM (1992) Regulation of in vitro tuberization potato (*Solanum tuberosum* L.) by plant growth regulators. *Kor J Plant Tiss Cult* 19:67-73
- Kim HS, Jeon JH, Park SW, Joung H (1992) Effects of alternating temperature on microtuberization of potato. *J Kor Soc Hort Sci* 33:432-437
- Kim HY, Joung H (1994) Influence of the physiological age of microtubers on field growth and tuber yield in potatoes. *J Kor Soc Hort Sci* 35:330-336
- Kim JW, Choi EG, Kim JK (2009) Mass production of potato shoots by liquid culture. *Kor J Plant Biotechnol* 36:1-6
- McCown BH, Joyce PJ (1991) Automated propagation of microtubers of potato. In *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Academic Press Inc, pp 95-109
- Menzel CM (1985) Tuberization in potato at high temperature and irradiance. *Ann Bot* 55:35-39
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
- Palmer CE (1970) Effect of kinetin on tuber formation on isolated stolons of *Solanum tuberosum* L. culture in vitro. *Plant and Cell Physiol* 11:303-314
- Park SW, Jeon JH, Kim HS, Joung H (1996) Differences in storability and sprouting of potato microtubers. *J Kor Soc Hort Sci* 37:228-231
- Park SW, Jeon JH, Kim HS, Joung H (1992) Effects of paclobutrazol levels on shoot growth and microtuberization in tissue cultures of potato. *Kor J plant Tiss Cult* 19:311-315
- Tibbits TW, Wheeler RW (1987) Utilization of potatoes for life support system in space. *Am Potato J* 64:311-320
- Wang PJ, Hu CY (1982) In vitro mass tuberization and virus-free seed potato production in Taiwan. *Am Potato J* 59:33-39