

Effects of Initial Inoculum Size, Liquid Volume and Medium Feeding Strategy on *Panax ginseng* Hairy Roots Growth

정귀택, 박돈희, 황 백*

전남대학교 화학공학부, 생명과학부*

전화 (062)530-0232, FAX (062)530-1849

초록

We researched effects of growth on initial inoculum size, liquid volume, and medium feeding rate etc. Cell suspension inoculated at low cell concentrations showed a typical growth reduction, whereas root cultures showed an improvement in growth. In this paper, Hairy roots showed high growth rate at 0.4 % inoculum size and 100 mL liquid volume in 250 mL flask cultures.

서론

식물세포의 배양에서 공정의 최적화와 scale-up은 세포량과 이차대사산물의 생산을 위한 기질과 접종량의 이해가 필수적이다. 접종량은 모상근의 성장과 이차대사산물의 생성에 중요한 역할을 한다. 일반적으로 임계 최소 접종비 이하로 접종한 경우에는 배양에 실패하게 된다. 모상근 성장에 있어서 산소의 공급은 필수적이다. 일반적으로 미생물의 산소 요구량의 1/10 수준이지만 높은 포화농도를 요구한다. 또한 기질의 농도 등에 의해 성장에 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 접종량과 배지량, 배지염의 비율, 그리고 기질 공급 방법 등에 의한 인삼 모상근의 성장을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

본 실험에 사용한 *P. ginseng* 모상근은 23°C의 진탕배양기에서 1/2 MS 배지(호르몬 무첨가, 3% sucrose)를 사용하여 계대배양하면서 실험에 사용하였고, 모상근의 생체량은 멸균된 티슈를 이용하여 충분히 수분을 제거한 후 생체량을 측정하였고, 건조중량은 60°C로 고정된 dry oven에서 항량이 되도록 충분히 건조하여 건조중량을 측정하였다. 배양 기간 중의 배지 시료는 pH, 환원당, 전당, 전기전도도를 측정하였다.

결과 및 고찰

모상근 접종량에 따른 영향

식물세포 현탁배양에서 낮은 접종량은 성장이 일어나지 않거나 유도기가 길어지게 되고, 접종량이 적당하면 유도기를 짧게하여 최대 비증식속도에 맞출 수 있다고 알려져 있다. 이에 최적 접종량을 알아보기 위하여 1/2 MS 배지에 모상근을 각각 0.2, 0.4, 0.7, 1.0, 2.0, 3.0 %(w/v)를 접종하여 30일 동안 배양하여 inoculum size에 따른 모상근의 성장을 비교하였다. 각 접종량에 따른 모상근의 성장은 Fig. 1(B)에서 보이는 것과 같은 양상을 보이고 있으며, Fig. 1(A)는 각 inoculum size 별로 시간의 증가함에 따른 증가 비율을 도시하였다. 접종량이 0.4%일 때 가장 빠른 증식속도를 보이고 있으며, 20일 이후부터는 0.2%에서 활발한 증식을 보이고 있다. 그 외에는 0.7, 1.0, 2.0, 3.0 %의 순으로 증식률을 나타내고 있다. 접종량이 증가함에 따라 접종량과 최종 생체량의 비는 비례하지 않음을 보여주고 있는데, 이는 제한된 기질과 용존산소, 그리고 flask라는 공간적인 제한 때문이라 사료된다.

배지량에 따른 영향

250, 500 mL flask 하에서 배지량과 공기량에 따른 모상근의 성장을 비교한 결과는 Fig. 2과 같았다. 250 mL flask에서 50, 100, 150 mL의 배지가 함유되어 있을 경우 100 mL가 함유된 배지에서 12.83g으로 최대 성장률을 보였으며, 다음으로는 50mL(100mL의 약 0.6배), 150mL(100mL의 약 0.48배)순으로 성장하였으며, 150mL 배지에 솜마개를 한 경우에는 솜마개 대신 알루미늄 호일로 마개를 한 경우보다 약 1.4배 증가한 것으로 나타났다. 500mL flask의 경우에는 배지량이 100mL의 경우 13.03g, 200mL는 13.53g으로 250mL flask에서 배지량 100mL의 배지와 비교해 큰 차이를 나타내지 않았다. 이는 배양기간 26일 동안 접종량이 (1g 생체량)/(100mL 배지량/250mL flask)이하인 경우에는 영양물질과 산소의 저해를 적게 받는 것으로 사료된다.

배양배지 중 1/2 MS 배지염(당 제외)의 비율에 따른 영향

식물세포배양에 있어서 높은 염의 농도는 높은 삼투압을 유발하기 때문에 세포의 성장에 저해를 가져오게 된다. 이러한 저해를 억제하기 위하여 1/2 MS 배지의 염 농도를 다르게 하여 모상근의 성장에 미치는 영향을 알아보았다. Fig. 3는 3% sucrose를 함유하는 1/2 MS 배지 중의 총염 농도의 비율이 모상근의 성장에 미치는 영향을 비교한 결과이다. 결과에 의하면 17일까지는 염농도에 영향을 받지 않았지만, 시간이 지남에 따라 배지 중의 염 농도가 적을수록 그 성장이 저해되었다. 배양 35일 후에 염의 농도가 50%와 100%인 경우를 비교해 보면, 각각 10.263g,

15.54g으로 0.66배를 보였으며, 100%와 150%를 비교한 경우에는 1.18배의 성장을 나타내었다.

유가식 배양에 의한 영향

배양 중 영양배지의 첨가가 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 250mL flask(w.v. 100mL)에 배양 기간 중 각각 10, 15, 20, 25일 단위로 50mL의 배지를 교환하여 주면서 50일간 모상근의 성장을 관찰한 결과 Fig. 4와 같았다. 배지를 교환하지 않은 경우에는 약 40일부터 모상근의 성장이 정지되었으나 배지를 교환해준 경우에는 계속 성장함을 알 수 있었다. 또한 배지를 교환하지 않은 것에 비하여 10일에 한번씩 교환해 준 경우에는 배양 50일 후에 1.9배의 성장을 보였으며, 교환 주기가 짧을수록 높은 성장을 보였다.

1L 배양기(working volume 800mL)에서의 유가식 배양을 배양 기간 중 5일 간격으로 200mL의 배지를 교환하여 주면서 실험을 수행한 결과 Fig. 5와 같은 결과를 얻었다. 배양 35일 동안 42.9배의 성장($2 \rightarrow 85.8 \text{ g}$)을 보였으며 성장률은 1.226 day^{-1} 을 나타내었다. 이는 회분식 1L 배양기에서의 성장률(1.042 day^{-1})과 비교해서 1.18배 높은 것이다. 배양기간 중 10일까지는 pH가 감소하다가 이후에는 증가함을 보였다. 환원당은 배양 25일 까지 증가하다가 이후 일정해졌고, 총당과 전도도는 감소하였다.

감사

본 연구는 1998년도 교육부 학술연구조성비(생물화학공학)에 의해 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Kanokwan Kanokwaree et. al., "The extent to which external oxygen transfer limited growth in shake flask culture of hairy roots", *Biotechnology and Bioengineering*(1997), **55**(3), 520-526
2. Kanokwan Kanokwaree and Pauline M. Doran, "Effect of Inoculum Size on Growth of *Aropa beldonna* Hairy Roots in Shake Flasks", *Journal of Fermentation and Bioengineering*(1997) **84**(4), 378-381
3. C.O. Akalezi, S. Liu, Q.S. Li, J.T. Yu, J.J. Zhong, "Combined effect of initial sucrose concentration and inoculum size on cell growth and ginseng saponin production by suspension cultures of *Panax ginseng*", *Process Biochemistry*(1999) **34**, 639-642

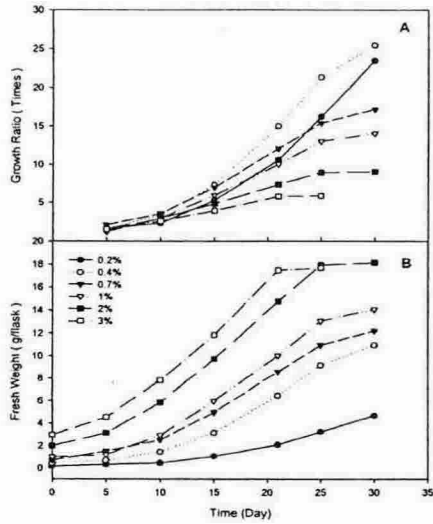


Fig. 1. Effects of Inoculum Size on Growth of Hairy Roots Cultured for 30 Days in 250mL Flask. (A) Growth Ratio Curves, (B) Growth Curves

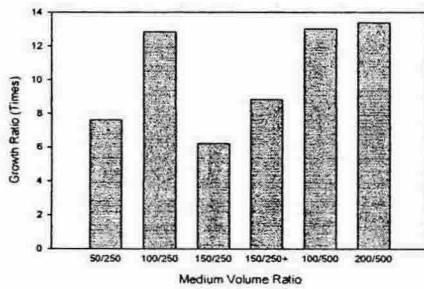


Fig. 2. Effects of Medium Volume Size on Growth of Hairy Roots Cultured for 26days in 250mL flask.

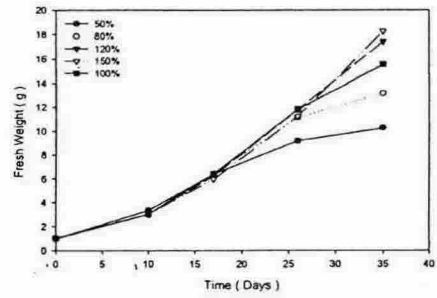


Fig. 3. Effects of Total Inorganic Salts Ratio on Growth of Hairy Roots Cultured for 35days in 250mL flask.

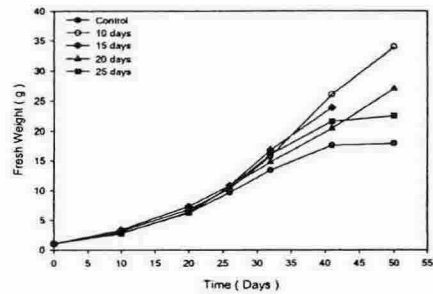


Fig. 4. Effects of Medium Feeding Periods on Fed-Batch Cultures.

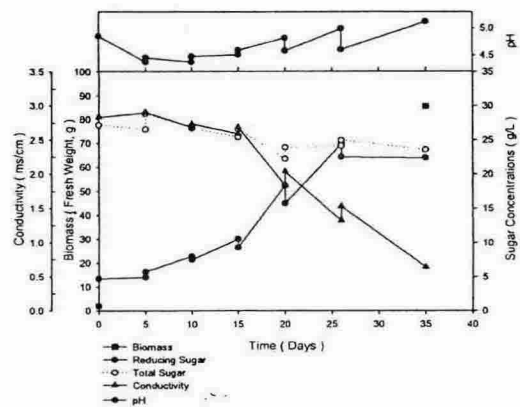


Fig. 5. Growth Properties of Hairy Roots Culture for 35 days in Fed-Batch Culture.