

형질전환된 모상근(*Panax ginseng*)의 성장 특성

정근택, 이종일, 황 백*, 박돈희

전남대학교 화학공학부, 생명과학부*

전화 (062)530-0232, FAX (062)530-1849

서론

세포배양에서와는 별도로 뿌리 배양계에서의 성장과 이차대사산물의 생성은 조직 특이성과 물질의 공급, 수송, 호르몬의 작용, 뿌리조직에 대한 산소의 반응, 그리고 이차대사산물의 생합성, 수송, 축적, 변경 등의 이해가 있어야 하나 현재 밝혀진 바는 매우 미흡한 실정이다. 일반적으로 배양된 뿌리는 온전한 식물체의 어린 뿌리와 매우 유사함을 보여주고 있다.¹⁾ 또한 이차대사산물의 생산에 있어서 모상근의 배양은 현탁세포 배양에 비하여 유전적, 생화학적인 안정성을 가지고 있다. 식물 기관 배양은 미생물이나 식물 현탁배양과는 달리 성장에 대한 특성이 잘 알려져 있지 않다. 이에 본 연구에서는 250mL 플라스크 배양에서 *P. ginseng* 모상근의 성장과 이차대사산물 생산 특성을 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. 모상근 세포내 탄수화물 측정은 시료 분말을 증류수로 현탁하여 초음파 분쇄하여 세포내 탄수화물을 방출하여 페놀-황산법을 사용하여 정량하였다. Crude saponin 함량은 분말시료에 수포화-butanol을 첨가하여 24시간 동안 냉장보관 후 초음파 분쇄하고 상등액을 건조증발하여 중량을 측정하였다.

결과 및 고찰

Flask에서의 모상근의 성장 특성

형질전환된 인삼 모상근의 성장 특성을 알아보기 위하여 250mL flask에서 50일 동안 관찰한 결과 Fig. 1과 같은 plot을 얻었다. 모상근은 배양 후 약 5일까지는 느린 성장(유도기)을 보이다가, 5일 이후 급속히 성장하여 약 36일 까지 증식기를 거치는 것으로 나타났다. 40일 이후에는 기질의 고갈로 그 성장이 미진하였다.

배양기간 중 pH는 배양 초기부터 10일까지는 감소하다가 그 이후에는 증가하는 것으로 나타났다. 이는 배양초기에는 질소원(NH_4^+ , NO_3^-) 중 NH_4^+ 이온이 먼저 소모되면서 배지에 수소 이온이 방출되면서 pH를 낮추는 것으로 알려져 있으며, 그 이후에는 NO_3^- 이온이 소모됨으로서 질산기를 암모늄기로 환원하기 위해 수소이온이 배지로부터 제거되며 동시에 pH가 증가한다고 알려져 있다. 환원당(단당)은 배양초기부터 증식기의 중반인 22일까지 증가하다가 그 이후에는 감소하여 45일 정도에서는 검출되지 않았다. 한편 총당은 배양기간 내내 감소(29.47→3.01 g/L)함을 보이고 있었다. 전기전도도 또한 배지가 소모됨에 따라 감소(3.10→0.034 ms/cm)함을 알 수 있었다.

Fig. 2는 시간의 경과에 따른 모상근의 비증식속도(μ)의 변화를 나타낸 것이다. 배양 7일까지는 비증식속도가 증가하다가 그 이후에는 감소함을 보이고 있으며, 20일까지는 증식이 왕성함을 알 수 있었다.

Fig. 3은 배양기간에 따른 세포생체중량 대 세포건조중량의 비(FW/DW ratio) 즉, 세포 크기지수(Cell Size Index, CSI)를 나타낸 것이다. 시간이 증가함에 따라 모상근 생체 중의 수분 함량(CSI)이 증가함을 나타내고 있다. 이는 배지의 삼투압 때문이다. 배지의 삼투압이 높으면 세포의 수분함량이 낮아지면서 세포가 작아지고, 삼투압이 낮으면 수분 함량이 높아지면서 상대적으로 세포의 크기가 커지게 된다. 일반적인 회분식 배양시에는 초기 당농도가 높은 상태에서 CSI는 낮은 값을 나타내며, 후반부에 당이 고갈되면 급격히 증가하게 된다. 배지 내의 삼투압에 가장 큰 영향을 미치는 성분은 당이며 무기염류의 농도도 삼투압과 관련이 있다. 세포의 농도가 높아질 경우 공간상의 제약을 받게 되므로, 부작용이 없는 한도 내에서 삼투압을 높이면 이론적으로 볼 때 절대 세포량은 늘게 된다. 삼투압의 증가를 위해 당을 사용할 경우에는 catabolite repression에 의한 세포 증식에 방해가 있을 수 있으므로 mannitol이나 sorbitol과 같은 당이 아닌 삼투압 증진제를 첨가하거나 무기염류의 농도를 높이는 것을 고려할 수 있다.

Fig. 4는 250mL flask와 500mL flask에서의 인삼 모상근의 성장 동특성을 나타낸 것이다. 동특성 모델은 Nonlinear Curve-Fitting Technique (Sigma Plot Program)을 사용하여 유도하였다. 본 모델링에 사용한 Logistic law (1) (Edwards and Wilke, 1968)는 미생물 성장을 해석하는 데 사용되어 온 것이나, 모상근 배양에서도 적절히 묘사되었다.

$$X = \frac{X_m}{1 + \exp(b - kt)} \quad (1)$$

여기에서 X는 생체량 (g/flask), X_m 은 최대 생체량 (g/flask),

t는 시간 (Day), b와 k는 모델 상수.

이러한 조건하에서 250mL flask에서는 $X_m=16.4818$, $b=2.715958$, $k=0.1278$ 를 나타내었으며, 500mL flask에서는 $X_m=37.4479$, $b=3.1757$, $k=0.0684$ 를 나타내었다. 그리고 250mL flask의 경우에는 약 40일 정도에서 최대 성장까지 도달한 반면, 500mL flask에서는 약 90일에서야 최대성장을 도달함을 예상할 수 있었다.

배양기간 중 이차대사산물(Polysaccharides, Crude Saponin)의 함량 변화

모상근의 배양기간 중 이차대사산물의 함량 변화를 Fig. 6에 도시하였다. Polysaccharides는 배양후기에 증가하였으며, crude saponin 함량은 배양기간이 지남에 따라 일정하게 유지됨을 알 수 있었다.

참고문헌

1. 안준철, 이차대사산물 생산을 중심으로 한 모상근 배양체계에 관한 연구, 전남대 박사학위 논문, 1994.2
2. Nobuyuki Uozumi, Katsuhito Kohketsu and Takesh Kobayashi, "Growth and Kinetic parameters of Ajuga Hairry root in Fed-Batch cultures on Monosaccharide Medium", J. Chem. Tech. Biotechnol.(1993) 57, 155-161
3. Osamu Kondo, Hiroyuki Honda, Masahito Taya, and Takeshi Kobayashi, "Comparision of growth properties of carrot hairy root in various bioreactors", Applied Microbiology Biotechnology(1989) 32, 291-294
4. 김지현, 유영제, "당근 모상근의 최적 영양 요구성", 한국생물공학회지(1995) 10(1), 46-54

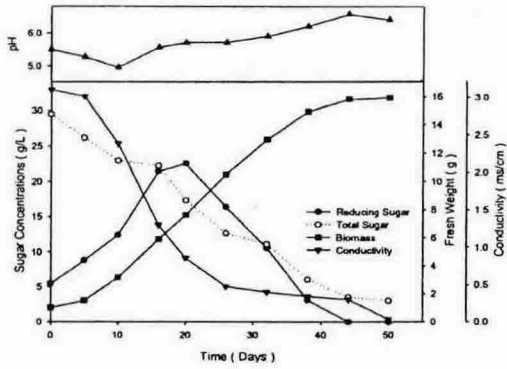


Fig. 1. Growth Properties of Hairy Roots Cultured for 50 Days in 250mL Flask.

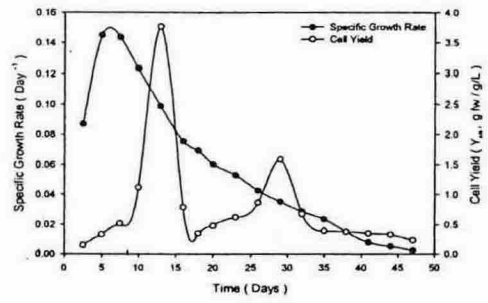


Fig. 2. Changes of Specific Growth Rate of Hairy Roots during the Cultivation.

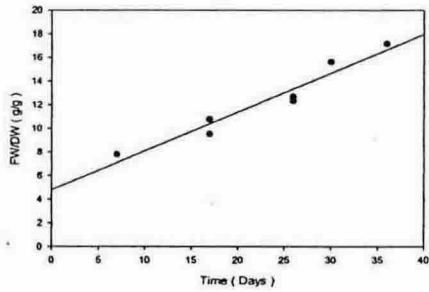


Fig. 3. Changes of FW/DW(CSI) of Hairy Roots during the Cultivation.

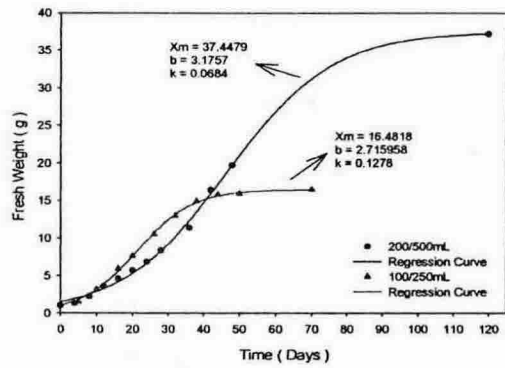


Fig. 4. Growth Kinetics of *P. ginseng* Hairy Roots Culture in 250 and 500 mL Flask.

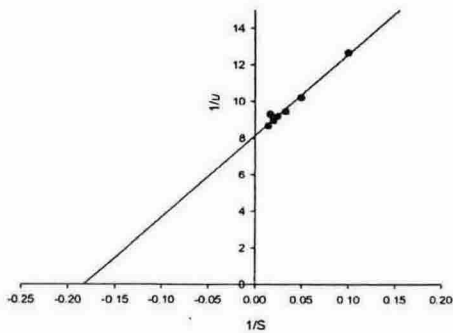


Fig. 5. Lineweaver-Burk Plot for K_m of *P. ginseng* Hairy Roots.

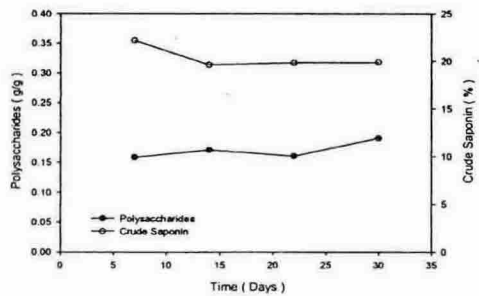


Fig. 6. Changes of Secondary Metabolites Contents of Hairy Roots during the Cultivation in 250mL Flask.