

당근의 모상근 배양에서 Fungal Elicitor에 의한 Anthocyanin 생산의 향상

김창현 · 이승우¹ · 황백² · 정인식

경희대학교 자연과학대학 유전공학과, ¹경희대학교 산업대학 원예학과
²전남대학교 자연과학대학 생물학과

Improved Anthocyanin Production in Hairy Root Culture of *Daucus carota* by Fungal Elicitor

Kim, Chang-Heon, Seong-Woo Lee¹, Baik Whang² and In-Sik Chung*

Department of Genetic Engineering, Kyung Hee University, Suwon, 449-701, Korea

¹Department of Horticulture, Kyung Hee University, Suwon, 449-701, Korea

²Department of Biology, Chonnam National University, Kwang-Ju, 500-757, Korea

Abstract — In order to improve anthocyanin production, effects of fungal elicitation in hairy root culture were investigated. Fungal elicitor prepared from *Fusarium moniliforme* was the best in enhancement of anthocyanin production among the eight fungal elicitors tested. The optimum treatment time and concentration of treated elicitor for anthocyanin production were 12 hours and 3.28 mg carbohydrates per liter medium. Also, fungal elicitor was treated to hairy root culture in flat-bottomed fluidized-bed bioreactor. The anthocyanin production of elicited culture was enhanced 227% than non-treated.

식물로부터 얻어지는 유용 2차 대사산물은 의약품, 식품첨가물, 천연색소, 향료, 농약, 특수화학제품 등 다양한 용도로 이용되어지고 있으며, 최근 그 수요는 계속 증가하고 있는 반면에 식물자원은 감소하고 있는 추세이어서 식물세포 조직배양기술을 이용하여 유용 2차 대사산물을 공업적으로 생산하려고 하는 연구가 많은 관심을 끌고 있다. 하지만 조직배양된 식물세포는 본 식물체에 비하여 2차 대사산물의 수율이 매우 낮은 것으로 보고되고 있으며 따라서 산업화를 위한 대량생산에 한계를 가지고 있다.

이러한 문제점을 극복하기 위하여 다양한 연구들이 진행되고 있는데, 그 중 토양미생물인 *Agrobacterium rhizogenes*에 의해 형질전환되어진 식물의 모상근 배양은 매우 높은 가능성을 보여주고 있다. 모상근은 *Agrobacterium rhizogenes*의 Ri plasmid의 일부인 T-DNA가 식물 유전자내로 삽입되어져 발현되어짐으로써 만들어지며(1), 식물 성장호르몬의 공급이 없이도 매우 빠른 성장속도를 보이며, 세포배양에 비하여 2차 대사산물의 생산성이 매우 높을 뿐 아니라 유전적으

로도 안정하여 2차 대사산물의 대량생산을 위한 좋은 재료로 여겨지고 있다(2-6).

이와 함께 2차 대사산물의 수율을 향상시키기 위한 방안으로 고려되어지고 있는 것은 외부 인자에 의한 식물세포의 대사과정을 변화시키는 것이다. 일반적으로 2차대사과정에 참여하는 특정 효소들은 병원성 미생물의 감염 후에 더 높게 유도되어진다. 이러한 host-pathogen 관계를 세포배양에 적용하면 병원성 미생물의 세포벽이나 균사의 추출물을 배양세포에 처리하여 식물세포의 phytoalexin 합성을 유도할 수 있으며 이와 함께 2차 대사과정의 효소를 활성화시킬 수 있다(7, 8). *Botrytis* sp., *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., yeast 등의 미생물로부터 추출한 fungal elicitor에 대한 연구는 비교적 많이 되어 있지만(9) fungal elicitor의 실체와 그 작용과정은 아직 명확하게 밝혀진 것은 아니다. 다만 fungal elicitation 효과가 주로 곰팡이의 glycoprotein, polysaccharide 등 세포벽 구성물질에서 발견되어지고 있으며 곰팡이 세포벽의 어떤 물질이 식물세포막의 특정 receptor에 결합하여 식물세포의 2차대사과정을 유도하도록 자극하는 것으로 추정하고 있다(10). Fungal elicitor는 식물세포와 병원균 간의 종특이성이 존재하며 적정

Key words: Hairy root culture, fungal elicitor, anthocyanin, fluidized-bed bioreactor
*Corresponding author

처리시간과 처리량 등이 식물의 종에 따라 변화가 많다.

본 연구에서는 식물세포 조직배양을 이용한 2차 대사산물 생산의 향상 연구로서 당근의 형질전환된 세포인 모상근을 이용하여 anthocyanin 수율의 향상과 fungal elicitor의 효율적인 사용을 위한 기초 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

당근세포의 모상근 유기 및 배양

모상근의 유기에 사용된 균주는 *Agrobacterium rhizogenes* 15834와 A4T 두 종류이었으며 각 균주는 YEB(0.01 g/l yeast extract, 0.05 g/l beef extract, 0.05 g/l peptone, 2 mM MgSO₄, 0.05 g/l sucrose) 배지에서 28°C의 온도로 배양하였다. 배양된 균주는 7일 간격으로 새로운 배지로 옮겨 계대배양하였다. 당근은 원예시험장에서 얻은 다봉 5촌을 사용하였다.

당근의 표면을 깨끗이 씻은 후 70% ethanol에서 1분, 2% sodium hypochloride 용액에서 20분간 표면 살균을 한 후 멸균된 증류수로 3회 세척하였다. 표면 살균된 당근은 뿌리 단면에서 형성층이 포함되도록 지름 10 mm, 두께 2~3 mm의 절편으로 만들어 준비한다. 준비된 당근 disk에 YEB 배지에서 이틀간 배양된 *Agrobacterium rhizogenes* 15834와 A4T를 접종하여 phytohormone이 포함되지 않은 MS 기본배지(30 g/l sucrose, 8 g/l agar) 위에 치상하였다. 접종된 당근절편은 27±1°C에서 배양하였다. 배양 4주일 후 유기된 root tip을 잘라 500 mg/l의 carbenicillin이 함유된 MS 액체배지에서 계속 계대배양하면서 *Agrobacterium*을 제거하였다. 완전하게 *Agrobacterium*을 제거한 후 당근의 모상근은 진탕배양기에서 27±1°C, 100 rpm으로 암조건에서 2주 간격으로 계대배양하였다.

Fungal elicitor의 제조

Elicitor의 제조에 사용되어진 균주는 모두 8종으로 그 중 *Alternaria mali*(KCTC 1936), *Alternaria alternata*(KCTC 6005), *Rhodotorura rubra*(KCTC 7117), *Rhodotorura rubra* K.(KCTC 1209)의 4종은 KCTC로부터 분양받았으며, *Aspergillus niger*(KCCM 11885), *Chaetomium globosum*(KCCM 31212), *Fusarium moniliforme*(KCCM 11403), *Rhizopus arrhizus*(KCCM 35224)의 4종은 KCCM으로부터 분양받아 YEB 배지에서 26°C, 100 rpm의 조건에서 배양하였다. 배양 6일 후 균사를 모두 걸러낸 후 동일한 부피

의 증류수에 다시 현탁하여 waring blender를 이용하여 10분간 homogenization 하고 연속적으로 121°C, 15 psi에서 30분간 고압멸균한 후 균사찌꺼기를 여과 과정을 통하여 걸러내어 여과액만을 -5°C에서 보관하였다. 이 여과액들은 더 이상의 정제과정이 없이 바로 elicitor로 사용하였다. 실험에 사용된 elicitor의 total carbohydrate의 농도는 명시된 경우를 제외하고는 liter 배지 당 3 mg이었다.

분석방법

세포생육도는 fresh weight(F.W.)를 측정하여 결정하였다. 수확한 모상근을 멸균된 Wattman No. 2 여과지로 충분히 수분을 제거한 후 살균된 petri-dish를 이용하여 무균적으로 무게를 측정하였다.

Fungal elicitor의 정량은 elicitor가 함유하고 있는 total carbohydrate의 양으로 결정하였으며 orcinol-sulphuric acid법(11)을 사용하여 carbohydrate 양을 측정하였다.

Sucrose, glucose, fructose는 HPLC를 이용하여 분석하였다. Column은 Merck 사의 NH₂ column을 사용하였고 mobile phase는 80/20 acetonitrile-water(v/v)를 사용하여 0.9 ml/min의 flow rate로 검출하였다.

Anthocyanin은 1 g F.W.의 모상근을 0.1% HCl-Methanol에 침지하여 24시간 동안 냉암소에서 보관한 뒤 1500×g로 원심분리하여 상층액을 530 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Phenylalanine ammonia lyase(PAL)의 활성도는 1 g F.W.의 모상근을 포함한 0.1 M sodium borate buffer(pH 8.8)에서 waring blender로 10분간 homogenization하고 얼음 속에서 10분간 잘 저어준 후 20000×g로 20분간 원심분리하여 상층액 100 µl에 0.1 M sodium borate buffer(pH 8.8)로 0.5 ml가 되게 희석한 후 0.02 M L-phenylalanine을 함유한 동량의 같은 buffer를 더하여 30°C의 조건으로 290 nm에서의 흡광도를 60분간 측정하였다(12). 생성된 산물의 양은 cinnamate의 extinction coefficient를 이용하여 흡광도의 증가치로부터 계산하였으며, PAL의 활성도 1 unit는 주어진 분석조건에서 분당 1 µmole의 cinnamate를 생산할 수 있는 효소의 양으로 정의하였다.

결과 및 고찰

곰팡이로부터 추출한 fungal elicitor를 이용하여 당근으로부터 유기되어진 모상근의 anthocyanin 생산성을 향상시키기 위한 실험으로서 8종의 fungal eli-

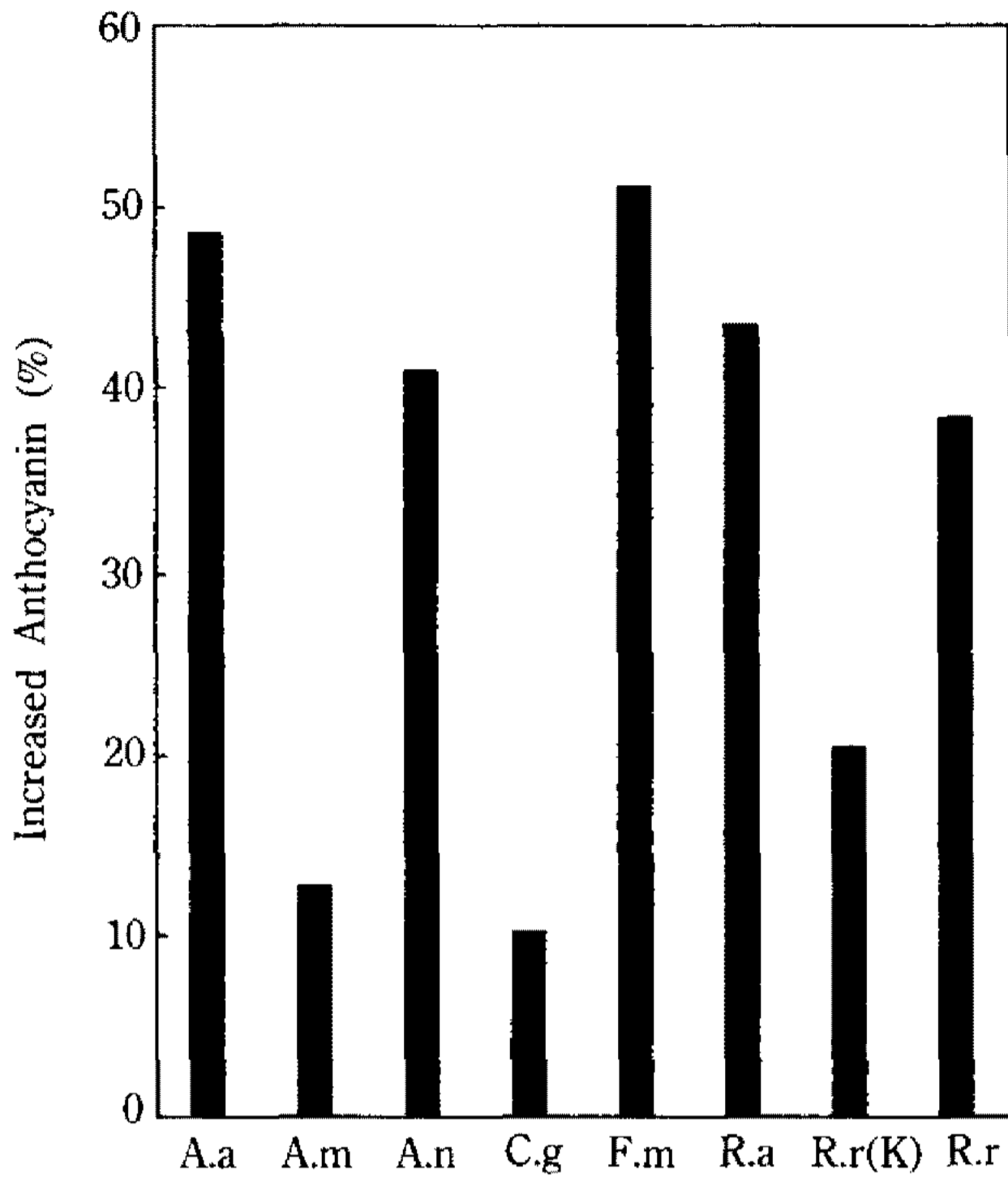


Fig. 1. Effect of different fungal elicitors on anthocyanin production.

A.a: *Alternaria alternata*, A.m: *Alternaria mali*, A.n: *Aspergillus niger*, C.g: *Chaetomium globosum*, F.m: *Fusarium moniliforme*, R.a: *Rhizopus arrhizus*, R.r(K): *Rhodotorura rubra* K., R.r: *Rhodotorura rubra*

elicitor를 MS 기본 배지를 함유한 shake flask에서 15일간 배양된 모상근에 각각 2 ml 씩 접종한 후 18시간 후 anthocyanin의 생산을 조사하였다. Fig. 1은 각각의 fungal elicitor를 처리한 후 증가된 % anthocyanin 생산량을 나타내었다. 그림에서처럼 대부분의 fungal elicitor가 elicitation 능력을 가지고 있음을 알 수 있다. 가장 높은 생산성 향상을 보인 것은 *Fusarium moniliforme*로부터 추출한 fungal elicitor였으므로 이후의 실험에는 *Fusarium moniliforme*로부터 추출한 elicitor를 사용하였다.

Anthocyanin의 생산과정은 완전히 규명되지는 않았지만 대부분의 phenolic compound에서처럼 phenylalanine ammonia lyase(PAL)가 anthocyanin의 생산에 관여한다고 여겨진다(12). Fungal elicitor에 의한 anthocyanin 생산의 유도를 조사하기 위하여 fungal elicitor 처리시 시간에 따른 PAL 활성도의 변화와 anthocyanin 생산의 변화를 조사하였다(Fig. 2). PAL의 활성도는 fungal elicitor 처리 후 6시간 만에 가장 높은 값을 보이고 그 후에는 처리 전의 상태로 접근하였다. Anthocyanin의 생산 역시 PAL 활성도의 증가와 함께 증가하기 시작하여 처리 후 12시간만에 최대치를 나타내고 서서히 감소하기 시작하였다. 이를

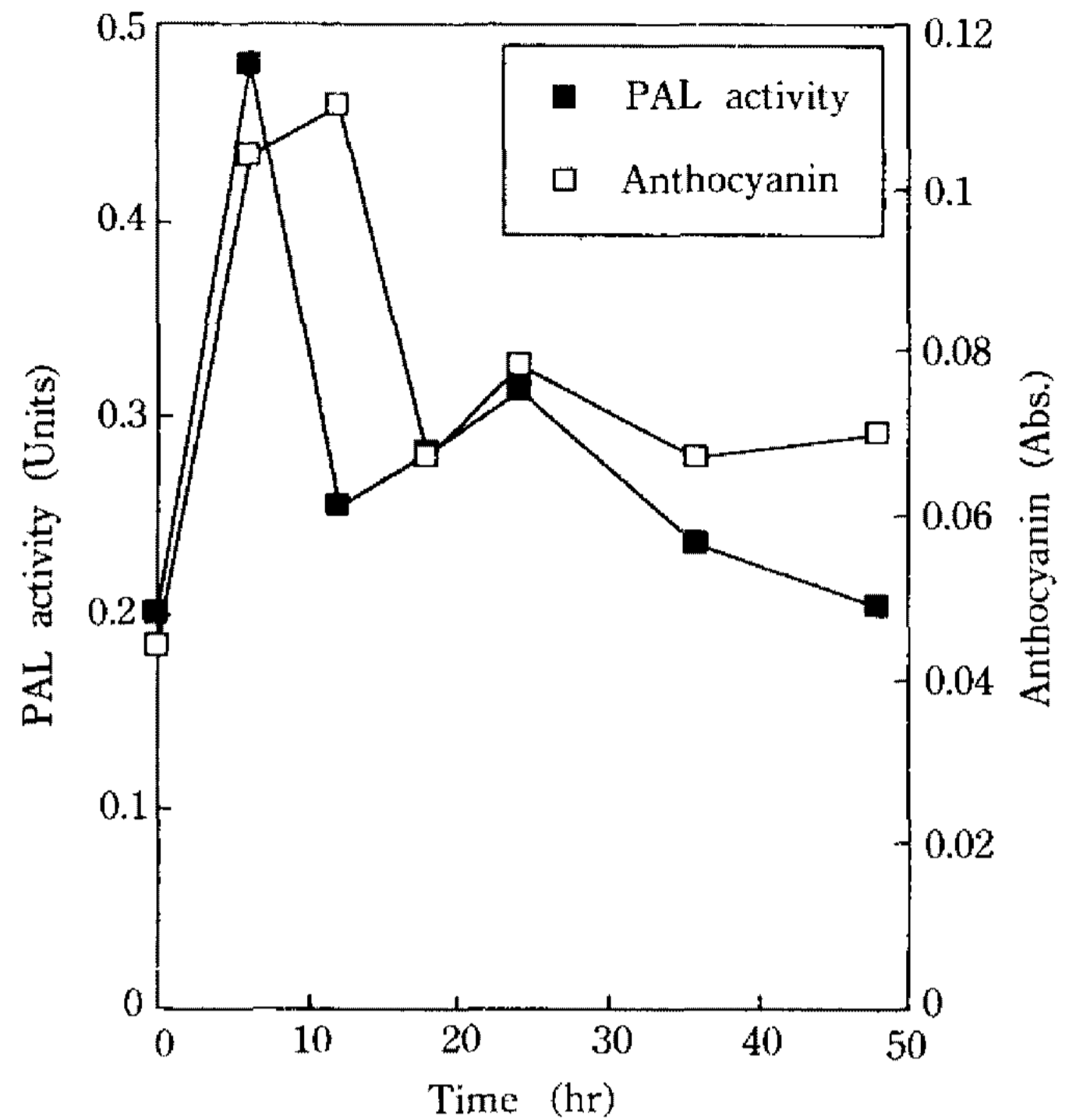


Fig. 2. Effect of incubation time on PAL activity and anthocyanin production.

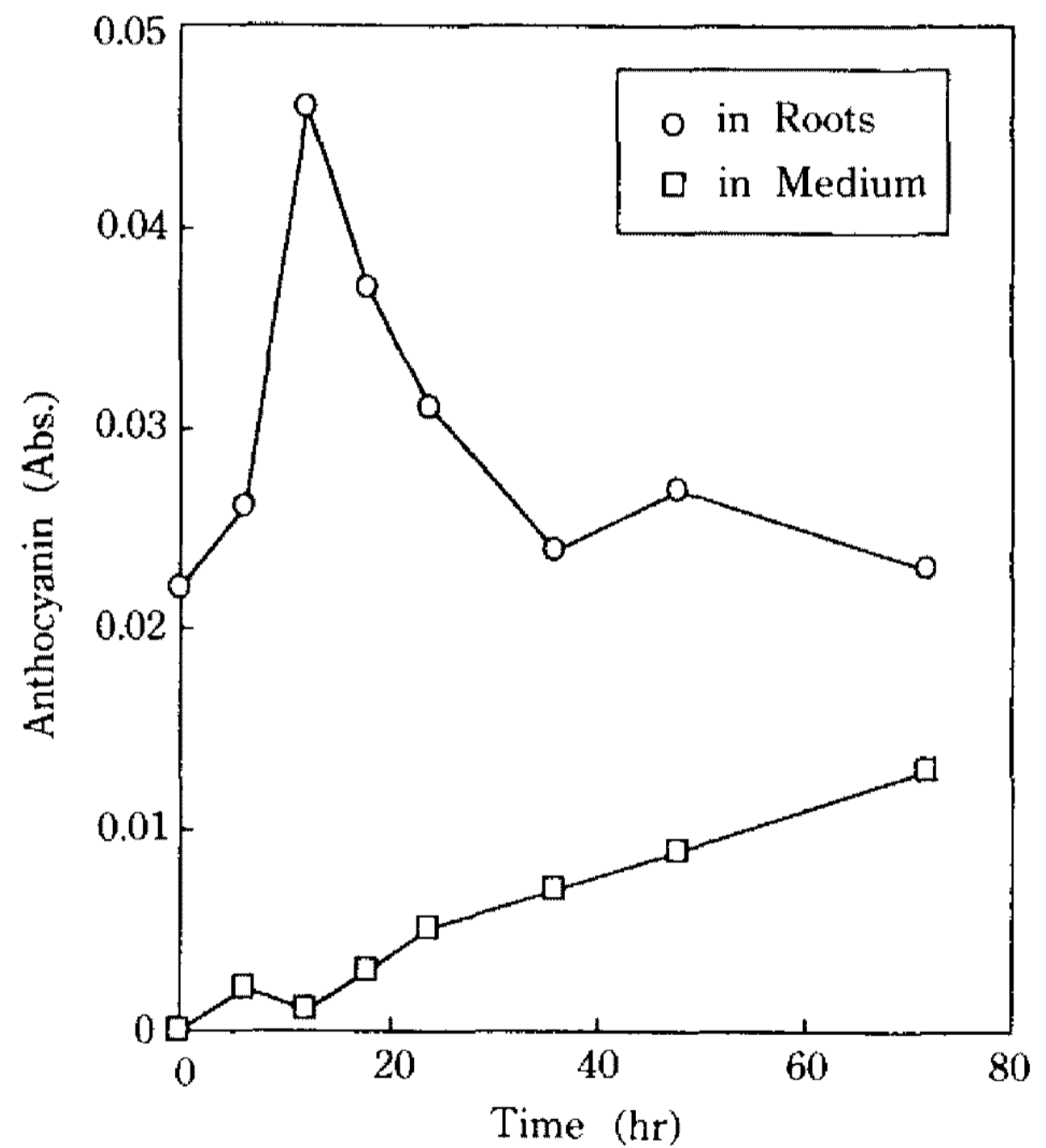


Fig. 3. Time course profiles of anthocyanin secretion in the fungal elicitor treated media.

통하여 fungal elicitor에 의해 PAL의 활성을 유도하고 anthocyanin이 생산이 향상된다는 것을 알 수 있다. 또한 fungal elicitor에 의한 anthocyanin의 생산의 증가가 지속적이 아님을 알 수 있었다.

Fungal elicitor에 의해 유도되어진 anthocyanin의

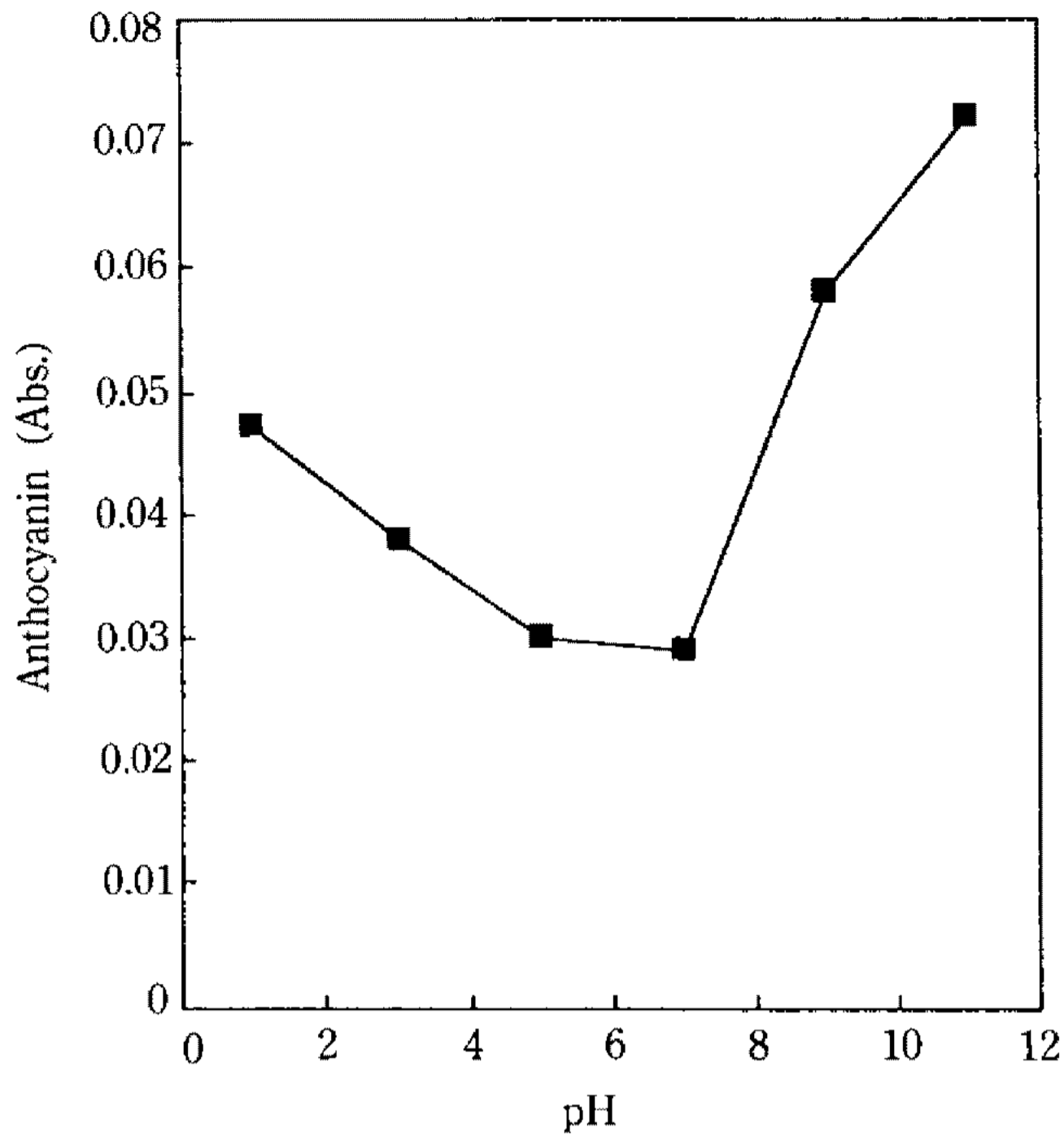


Fig. 4. Effect of pH on anthocyanin stability.

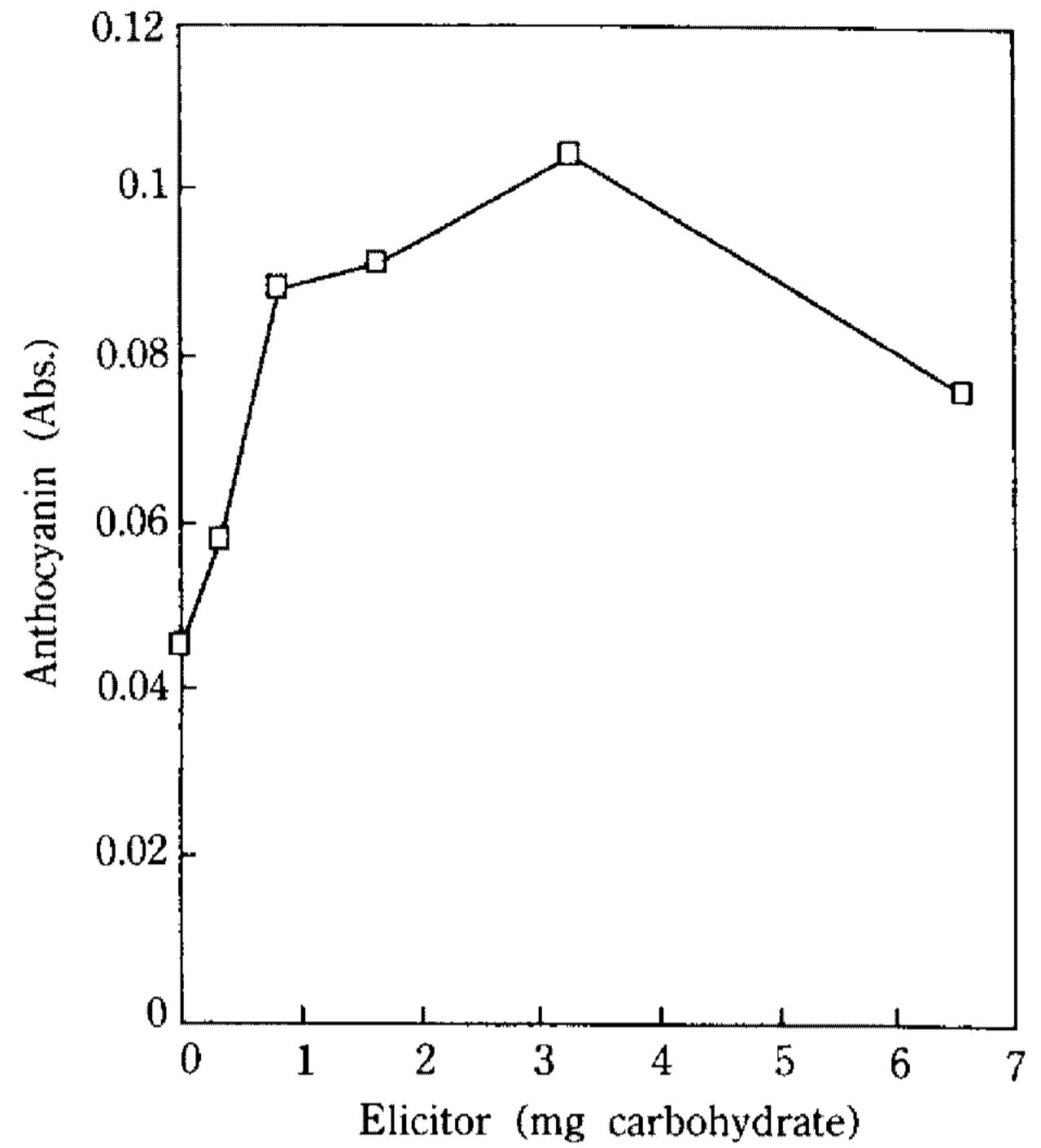


Fig. 5. Effect of different elicitor concentration on anthocyanin production.

배지내로의 분비 가능성을 확인하여 보기 위하여 fungal elicitor 처리 후 모상근 조직내의 anthocyanin의 양과 배지내의 anthocyanin의 양을 조사하여 보았다. Fig. 3에서와 같이 fungal elicitor에 의해 유도되어진 anthocyanin은 12시간 후부터 급속히 배지내로 분비 되어졌다.

배지내로 분비되어진 anthocyanin의 안정성을 검토하여 보았다. 다량의 hairy root로부터 anthocyanin을 추출한 후 pH를 변화시키면서 anthocyanin의 안정성을 조사한 결과는 Fig. 4와 같았다. Anthocyanin은 pH 4~6의 범위에서 불안정한 상태를 보이는 것으로 확인되었다. 본 실험에 사용된 배지의 초기 pH는 5.7이며 배양 중의 pH는 약 5이다. 따라서 fungal elicitor에 의해 배지내로 분비되어진 anthocyanin은 상당히 불안정한 상태로 존재하는 것이므로 이의 효율적인 회수 방안의 검토가 요구되어진다.

Fungal elicitor의 적정 처리량을 조사하기 위하여 fungal elicitor의 처리량을 변화시켜 가면서 anthocyanin의 생산을 측정하여 보았다(Fig. 5). 처리된 fungal elicitor의 양이 증가함에 따라 0.82 mg carbohydrate까지의 농도에서는 anthocyanin의 생산이 급격히 증가하였으며 3.28 mg carbohydrate 이상의 농도에서는 anthocyanin의 생산이 더 이상 증가하지 않았다. 이러한 현상은 fungal elicitor가 모상근의 2차 대사 과정을 유도하는 것이 모상근의 세포막에 존재하는 한정된 수용체를 통하여 이루어지며 elicitor와 모상

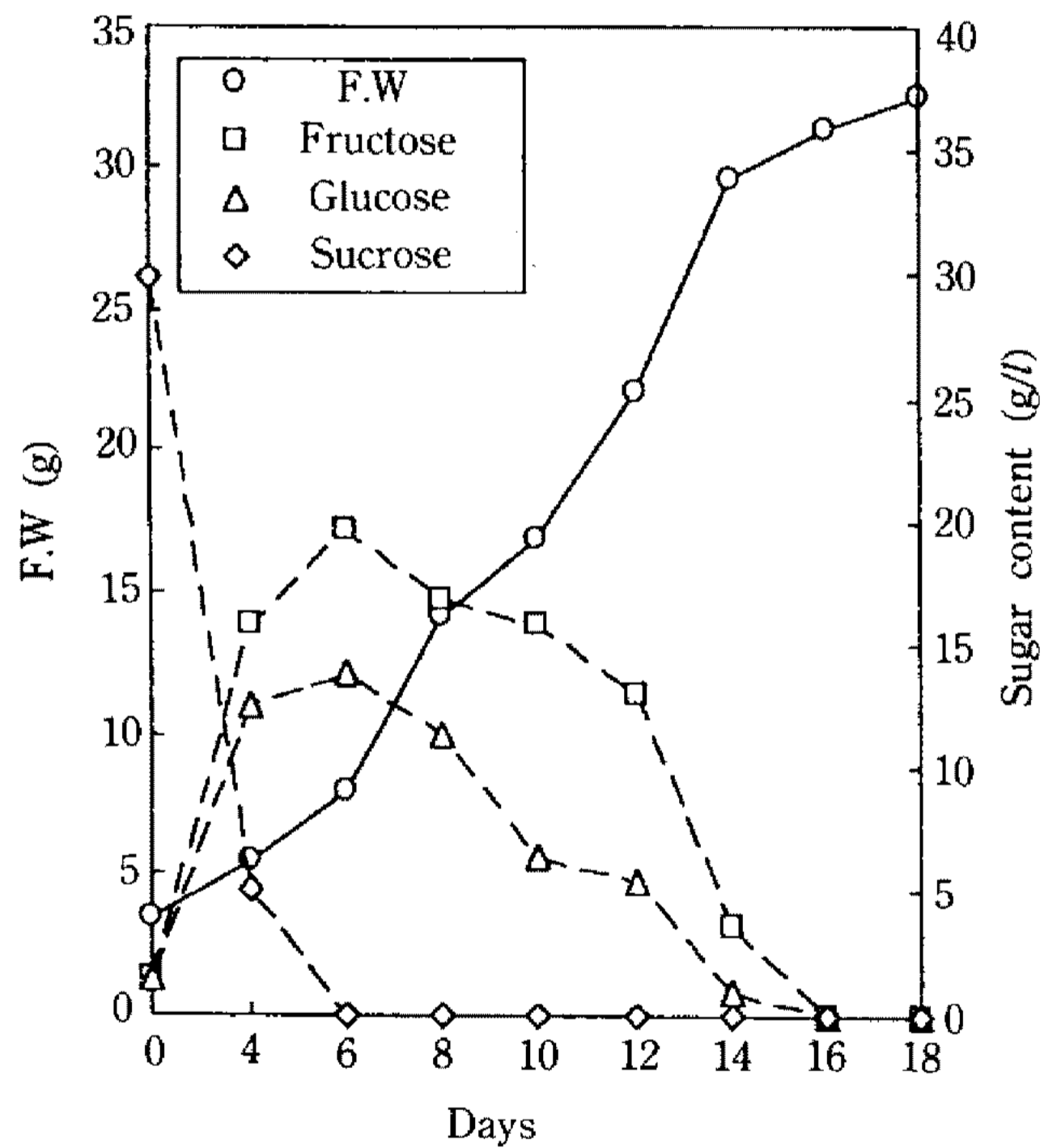


Fig. 6. Time course changes of sugar concentration and cell growth in a flat-bottomed fluidized-bed bioreactor.

근 세포막의 수용체의 결합이 비가역적으로 일어나기 때문에 과량의 fungal elicitor를 처리하여도 anthocyanin의 생산이 더 이상 증가하지 않는 것으로 추측된다. 가장 높은 anthocyanin의 생산성을 보인 것은 3.28 mg carbohydrate의 elicitor를 처리하였을

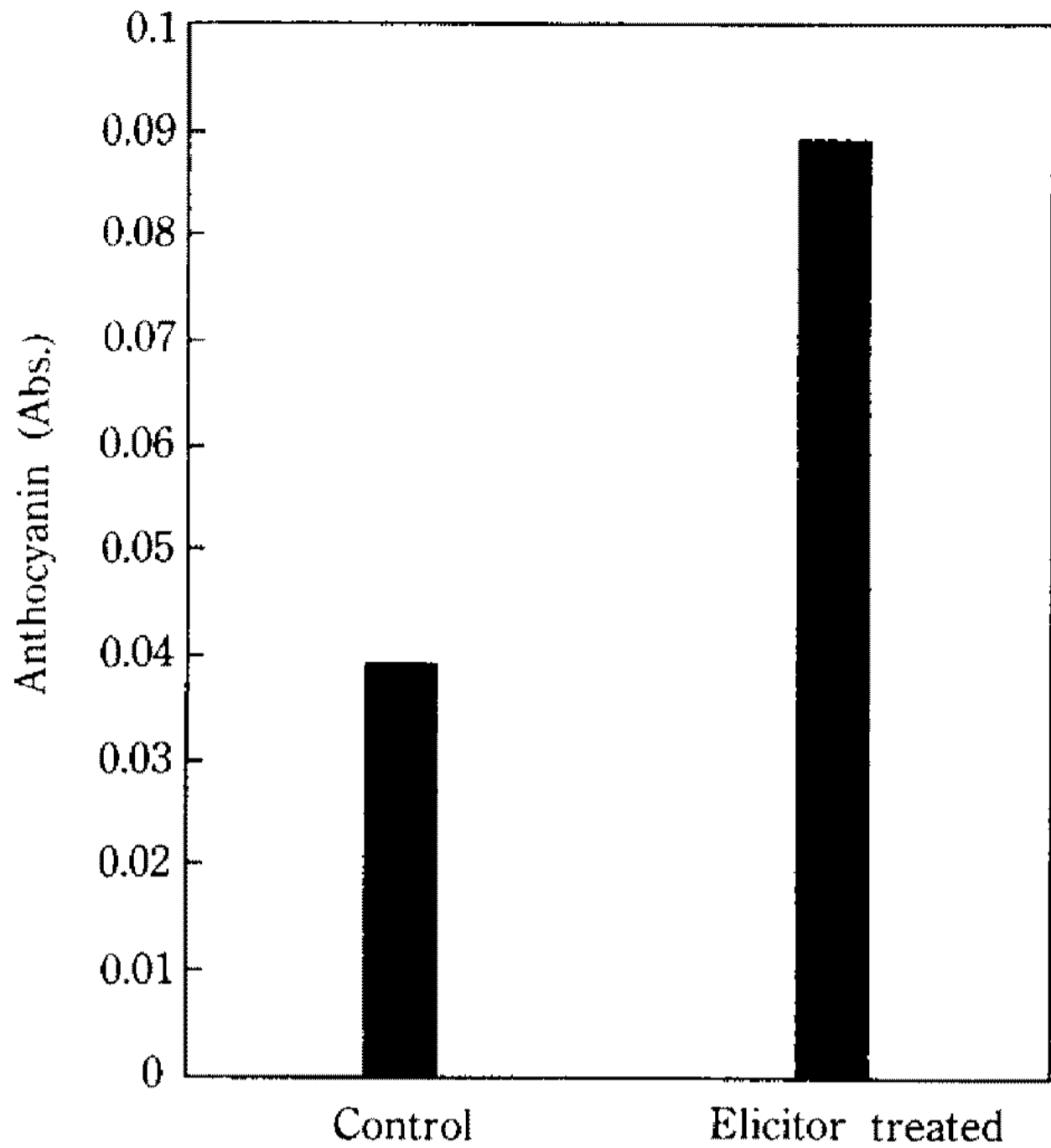


Fig. 7. Effect of fungal elicitor on anthocyanin production in a fluidized-bed bioreactor.

때였으며 이 때의 anthocyanin 생산량은 처리 전보다 230% 향상된 값이었다.

이상의 실험을 통하여 얻은 fungal elicitor의 효과 연구자료를 바탕으로 anthocyanin 대량생산 시스템을 개발하기 위한 연구의 기초자료로서 본 연구실에서 개발한 air-lift bioreactor의 일종인 fluidized-bed bioreactor에서 모상근을 배양하면서 fungal elicitor의 처리를 통하여 anthocyanin의 생산을 향상시키기 위한 실험을 수행하였다. Fig. 6은 fluidized-bed bioreactor에서의 당 성분의 변화와 모상근의 성장을 나타낸 것이다. 30 g/l의 초기 sucrose 농도에서 모상근의 fresh weight가 33 g까지 증가하였다. 그리고 fungal elicitor를 17일간 배양된 모상근에 12시간 처리하였을 때 anthocyanin의 생산을 227% 가량 향상시킬 수 있었다(Fig. 7).

곰팡이로부터 추출한 fungal elicitor는 식물세포의 2차 대사산물 생산성을 향상시키는 좋은 재료로서 모상근에서도 그 가치를 충분히 입증하였다. 모상근의 높은 성장속도와 안정적인 2차 대사산물의 생산은 산업적 이용에 매우 좋은 재료로 여겨진다. 하지만 산업화를 위해서는 고농도 배양을 위한 모상근 배양용 생물반응기의 개발과 대량생산을 위한 연속식 배양 방법의 개발이 요구되어진다.

본 연구실에서는 모상근의 고농도 배양용 생물반응기의 개발과 생물반응기에서 fungal elicitor를 이

용한 연속식 anthocyanin 생산 시스템을 개발하기 위한 연구를 진행하고 있으며, 이러한 연구의 결과는 식물세포를 이용한 유용 2차 대사산물의 산업적 생산에 좋은 자료를 제공할 것이다.

요 약

Anthocyanin 생산을 향상시키기 위하여 당근의 모상근 배양에서 fungal elicitor의 영향을 조사하였다. 8종의 fungal elicitor 중에서 가장 높은 anthocyanin 생산을 보인 것은 *Fusarium moniliforme*에서 추출한 fungal elicitor였다. Anthocyanin의 생산은 elicitor 처리 후 12시간만에 최고치에 이르렀으며 최적 처리량은 3.28 mg/l carbohydrate였다. Flat-bottomed fluidized-bed bioreactor에서 fungal elicitor를 처리한 결과 anthocyanin의 생산은 227% 향상되었다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단, 생물공정연구센터 및 농업생물신소재연구센터의 지원에 의해 수행된 것이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. White, F.F., B.H. Taylor, G.A. Huffman, M.P. Gordon, and F.W. Nester. 1985. Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Bacteriol.* **164**: 33-34.
2. Jung, G. and D. Tepfer. 1987. Use of genetic transformation by the Ri T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes*, to stimulate biomass and tropane alkaloid production in *Atropa belladonna* and *Calystegia sepium* root cultures. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **17**: 685-698.
3. Christen, P., M.F. Roberts, J.D. Phillipson, and W.C. Evans. 1989. High yield production of tropane alkaloids by hairy-root cultures of a *Datura candida* hybrid. *Plant Cell. Rep.* **8**: 75-77.
4. Flores, H.E. 1987. Use of plant cells and organ culture in the production of biological chemicals. Pp. 66-86. In LeBaron, H.M., R.O. Mumma, R.C. Honeycutt, J.H. Duesting (eds.), *Biotechnology in Agricultural Chemistry*(ACS symposium series, No. 334), American Chemical Society, Washington, D.C.
5. Mano, Y., H. Ohkawa, and Y. Yamada. 1989. Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Duboisia leichhardtii* transformed by

- Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Sci.* **59**: 191-201.
6. Banerjee-Chattopadhyay, S., A.M. Schwemmin, and D.J. Schwemmin. 1985. A study of karyotypes and their alterations in cultured and *Agrobacterium* transformed roots of *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Theor. Appl. Genet.* **71**: 258-262.
 7. Funk, C., K. Gugler, and P. Brodelius. 1987. Increased secondary product formation in plant cell suspension cultures after treatment with a yeast carbohydrate preparation (elicitor). *Phytochem.* **26**: 401-405.
 8. Kutney, J.P., M.D. Samija, G.M. Hewitt, E.C. Bugante, and H. Gu. 1993. Anti-inflammatory oleanane triterpenes from *Tripterygium wilfordii* cell suspension cultures by fungal elicitation. *Plant Cell Rep.* **12**: 356-359.
 9. Eilert, U. 1987. Elicitation: methodology and aspects of application, Pp. 153-196. In Vasil, I.K. and F. Constabel (eds.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 4, Academic Press, San Diego.
 10. DiCosmo, F. and M. Misawa. 1985. Eliciting secondary metabolism in plant cell culture. *Trends in Biotechnol.* **3**: 318-322.
 11. Sturgeon, R.J. 1990. Monosaccharides: III. colorimetric assays, Pp. 4-16. In Dey P.M and J.B. Harborne (eds.), *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 2, Academic Press, San Diego.
 12. Zimmermann, A. and K. Hahlbrock. 1975. Light-induced changes of enzyme activities in parsley cell suspension cultures. *Arch. Biochem. Biophys.* **166**: 54-62.

(Received May 27, 1994)