

## Red Beet의 모상근 배양을 이용한 천연색소인 Betacyanin 생산의 최적화

김선희 · 김성훈 · 이주노 · 안상욱 · 김광수<sup>1</sup> · 황 백<sup>1</sup> · 이현용\*  
강원대학교 식품생명공학부, <sup>1</sup>전남대학교 생물학과

**Optimization of Betacyanin Production by Red Beet (*Beta vulgaris* L.) Hairy Root Cultures.** Kim, Sun-Hee, Sung-Hoon Kim, Ju-No Lee, Sang-Wook An, Kwang-Soo Kim<sup>1</sup>, Baik Hwang<sup>1</sup>, and Hyeon-Yong Lee\*. Division of Food and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea, <sup>1</sup>Department of Biology, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea - Optimal conditions for the production of natural color, betacyanin were investigated by varying light intensity, C/N ratio, concentrations of phosphate and kinds of elicitors. Batch cultivation was employed to characterize cell growth and betacyanin production of 32 days. The maximum specific growth rate,  $\mu_{max}$ , was 0.3 (1/day) for batch cultivation. The maximum specific production rate,  $q_p^{max}$ , was enhanced 0.11 (mg/g-cell/day) at 3 klux. A light intensity of 3 klux was shown to the best for both cell growth and betacyanin production. The maximum specific production rate was 0.125 (mg/g-cell/day) at 0.242 (1/day), the maximum specific growth rate. The dependence of specific growth rate on the light intensity is fit to the photoinhibition model. The correlation between  $\mu$  and  $q_p$  showed that the product formation parameters,  $\alpha$  and  $\beta$ , were 0.3756 (mg/cell) and 0.001 (mg/g-cell/day), respectively. The betacyanin production was partially cell growth related process, which is different from the production of a typical product in plant cell cultures. In C/N ratio experiment, high carbon concentration, 42.1 (w/w) improved cell growth rate while lower concentration, 31.6 (w/w) increased the betacyanin production rate. The  $\mu_{max}$  and  $q_p^{max}$  were 0.26 (1/day) and 0.075 (mg/g-cell/day), respectively. *Beta vulgaris* L. cells under 1.25 mM phosphate concentration produced 10.15 mg/L betacyanin with 13.46 (g-dry wt./L) of maximum cell density. The production of betacyanin was elongated by adding 0.1  $\mu$ M of kinetin. This also increased the cell growth. Optimum culture conditions of light intensity, C/N, phosphate concentration were obtained as 5.5 klux, 27 (w/w), 1.25 mM, respectively by the response surface methodology. The maximum cell density,  $X_{max}$ , and maximum production,  $P_{max}$ , in optimized conditions were 16 (g-dry wt./L), 12.5 (mg/L) which were higher than 8 (g-dry wt./L), 4.48 (mg/L) in normal conditions. The  $\mu_{max}$  and  $q_p^{max}$  were 0.376 (1/day) and 0.134 (mg/g-cell/day) at the optimal condition. The overall results may be useful in scaling up hairy root cell culture system for commercial production of betacyanin.

**Key words:** Red Beet (*Beta vulgaris* L.), hairy root, betacyanin

최근 소비자의 질적인 면의 추구 및 안전성 때문에 합성색소보다는 천연색소의 수요가 증가하고 있다. 이것에 의해 미생물 뿐만 아니라 동·식물세포배양을 대상으로 한 연구가 활발히 진행되고 있다[11, 19]. 지치에서 시코닌의 생산과 포도에서 안토시아닌의 생산 및 현재 많은 종류의 식물세포배양에 의한 색소생산이 성공적으로 이루어졌으며 일부는 상업화되었거나 상업화 단계에 있는 것도 있다[8, 16, 28]. 반면에 천연색소의 사용이 실용화 되지 못하는 경우가 많은데 그 주된 원인은 낮은 생산성에 따른 높은 생산비 때문이다. 이에 생산성을 향상시키기 위해 배양조건의 검토, 고정화세포의 이용, 고생산주

의 선발, 생물적 물질전환, 분화유도에 의한 생산능의 향상, 형질 전환된 변이체 세포의 이용, elicitation과 같은 특수배양기법 등이 연구되고 있다[7, 12, 3].

이러한 연구의 일환으로 clone의 확립이 가능하며 배양세포보다 성장이 훨씬 빠르고 정상조직과 동일한 성분의 색소를 함유하는 모상근을 이용하게 되면 단위 시간당 얻을 수 있는 색소량이 많기 때문에 최근에는 *Agrobacterium rhizogenes*를 이용하여 모상근을 유도, 배양함으로써 천연색소를 대량, 효과적으로 얻으려는 시도가 이루어지고 있다[6, 3]. 한 예로 본 연구의 대상인 red beet(*Beta vulgaris* L.)의 칼루스배양과 모상근배양의 비교 결과 모상근의 배양이 2년 이상의 지속적인 배양에도 불구하고 안정된 성장과 배지 리터당 mg 단위의 색소생산을 보여준다고 한다[29]. 또한 색소생산능의 비교 실

\*Corresponding author  
Tel. 82-361-250-6455, Fax. 82-361-56-4819  
E-mail: hyeonl@kangwon.ac.kr

험결과 칼루스배양에 비해 색소생산이 2~6배가 증가한다는 보고가 있다[27]. 결국 색소의 질적인 면과 양적인 면을 모두를 고려할 때 red beet의 칼루스 배양 보다는 모상근 배양이 요구된다. 더구나 red beet 모상근은 빨간색 색소의 좋은 공급원이다[10]. Red beet 모상근은 진한 빨간색과 자주색을 띠는 betacyanins과 노란색을 띠는 betaxanthins를 함유한다. 빨간색 색소인 betacyanin은 FDA에서 승인한 색소 첨가제로서 식품공업에 중요하게 쓰이고 있다[21, 22]. 게다가 betacyanin은 간암의 전위나 발현을 하지 않는 실험적 증거들이 있기 때문에 천연색소로서 소세지, 요거트, 아이스크림, 샤페트 등에 쓰일 수 있다[20, 24, 26]. 이렇게 이용이 용이한 betacyanin 생산에 대한 여러 가지 배양방법이 연구되어 왔다[2, 5, 14]. 그러나 아직까지 활용가능성이 높은 모상근에 대한 연구는 적은 편이며, 이들의 배양을 위한 생물 공학적 접근은 매우 미흡한 실정이다[23]. 또한 모상근은 장기 배양시 뿌리의 다량 증식에 따른 대량 배양의 어려움이 있다. 더구나 높은 생산성과 낮은 생산비로 경제성이 높은 대량생산에 대한 연구는 매우 부족한 실정이다.

따라서 본 연구는 천연 색소와 기능성 물질로의 활용이 가능한 betacyanin을 생산하는 Red beet(*Beta vulgaris L.*)의 모상근의 배양 최적화를 통해 betacyanin의 경제적 생산이 가능한 대량 배양에 관한 자료를 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양조건

본 실험에 사용된 균주는 betacyanin 고생산 모상근 세포인 *Beta vulgaris L.*이다. 이 균주는 전형적인 모상근의 성장특징을 나타내어 branch가 형성되어 유도된 모상근을 절취하여 항생제가 첨가되어 있지 않은 동일한 배지로 옮겨 30~60일간 배양한 후 외부형태의 차이에 의해 빠른 성장속도와 분지능이 활발하며 적색을 띠어 선별된 모상근이다[18]. 3% sucrose가 함유된 호르몬이 없는 MS(Murashige and Skoog)배지를 가압살균된 0.5N NaOH로 pH를 5.7로 조정하였다. 30 ml 배지가 함유된 100 ml Erlenmeyer flask에 모상근을 0.1 g(fresh cell weight)되게 접종하였다. 접종된 모상근은 25°C에서 60 rpm으로 shaking incubator에서 0.8 klux( $1.82 \times 10^{-3}$  kcal/cm<sup>2</sup> hr)의 광도로 18:6시간(light:dark)의 광주기로 배양해 본 실험에 사용하였다. 그리고 세포의 생육과 색소생산의 최적배양조건을 결정하기 위한 유도변수들은 광도, C/N ratio, 인산의 농도 그리고 kinetin을 적용했다. 광질(20W White cool fluorescence lamp)의 동일 조건하에 광도는 Lux meter(Takemura Electric Works Ltd. Japan)를 이용하여 0, 1.82, 2.43, 9.12, 18.24, 42.56

( $\times 10^{-3}$  kcal/cm<sup>2</sup>·hr)와 C/N ratio는 7.4, 15.8, 22.2, 31.6, 42.1(w/w)로 각각 조건을 달리하여 배양하였다. Kinetin첨가배양은 1/2 MS배지에 0.1 μM농도로 첨가하여 배양하였다. 위의 유도변수들에 의한 모상근의 생장률과 색소생산을 비교하였다.

### 균체량 및 색소함량 조사

균체량은 배양된 모상근을 증류수에 3회 세척후 생중량을 측정된 뒤, 105°C에서 24시간 동안 건조하여 정량하였다. Betacyanin 함량 측정을 위해서는 배양된 모상근을 4°C에서 sonicator(Vibratech, USA)를 이용해 세포를 파괴했다. 파괴된 세포에 증류수를 넣어 교반 후 15,000 rpm으로 원심 분리하여 상등액만을 취해 증류수로 희석하여 UV-Vis Spectrophotometer를 이용하여 535 nm의 파장에서 흡광도를 측정했다. 그리고 배양된 모상근에서 추출한 betacyanin(standard product)으로 측정된 검량선을 이용해 측정된 흡광도를 가지고 색소양을 측정했다.

최적생육광도를 구하기 위해 아래와 같은 Photo-inhibition식을 적용해 균체생육과 광도와의 관계를 규명하였다[1].

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \times I}{K_1 + I + K_1 I^2} \quad (1)$$

여기서, I는 광도(klux)

$K_1$ 는 최적광도(klux)

$K_2$ 는 제한광도(klux)

$\mu$ 는 비생육속도(1/day)

$\mu_{\max}$ 는 최대 비 생육속도(1/day)

### 세포생육 및 betacyanin 생산에 관한 동력학적 분석방법

세포배양을 통한 자료의 동력학적 비교를 위하여 비생육속도( $\mu$ )와 betacyanin 비생산속도( $q_p$ )는 다음 관계식을 이용하였다.

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (2)$$

$$q_p = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt} \quad (3)$$

여기서, X는 세포의 농도(g-dry wt./L)

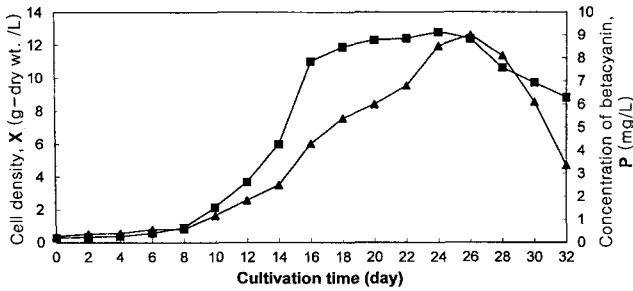
t는 배양시간(day)

P는 betacyanin의 농도(mg/L)

$\mu$ 는 비생육속도(1/day)

$q_p$ 는 비생산속도(mg/g-dry cells/day)

또한 세포생육과 그에 따른 생산물의 생성속도와의 관계



**Fig. 1.** The cell growth and betacyanin production according to cultivation time at 18L/6D light cycle of 0.8 Klux of light intensity.  
 —■— Cell density, —▲— Betacyanin conc.

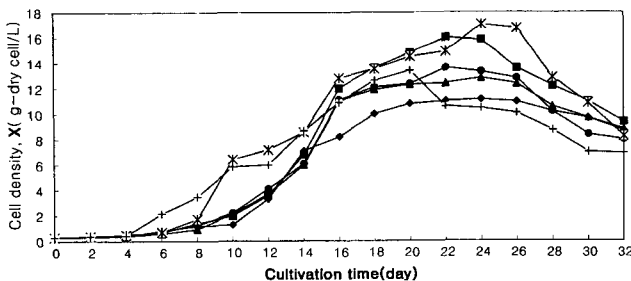
를 알기 위하여 다음의 모델 식이 이용되었다.

$$q_p = \alpha \cdot \mu + \beta \tag{4}$$

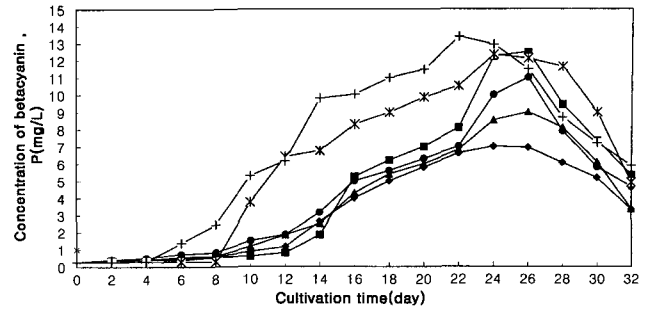
여기서,  $\alpha$ 는 단위세포당 betacyanin의 생산량  
 $\beta$ 는 betacyanin의 생산속도이다.

**결과 및 고찰**

Fig. 1은 *Beta vulgaris L.*의 모상근 세포를 회분 배양하여 배양시간에 따른 세포생육과 betacyanin 생산에 대한 결과다. 균체량은 배양 24일에 12.8 g-dry wt./L의 최대균체량을 나타냈고, 색소생산은 배양 26일에 9 mg/L의 최대농도를 보였다. 색소생산능이 균체량의 증가와 직선적으로 비례하여 증가하지 않고, 어느 정도의 균체량을 나타내면서부터 색소가 증가하는 현상을 나타냈다. 이는 색소생산이 세포의 생육이 어느 정도 이루어진 후에 실행되는 반응임을 알 수 있다. 또한 배양 후반부에 사멸기에 따른 균체량의 감소와 함께 색소생성이 감소함을 볼 때 색소생성은 세포생육과 관련이 있는 partially growth related process로 보여진다. *Phytolacca americana*의 세포성장시 생산되는 anthocyanin의 생성과 비슷한 양상을 보였다[23]. 이는 식물세포배양에서의 전형적인 목적물질생산 양상(non-growth related)과 상이



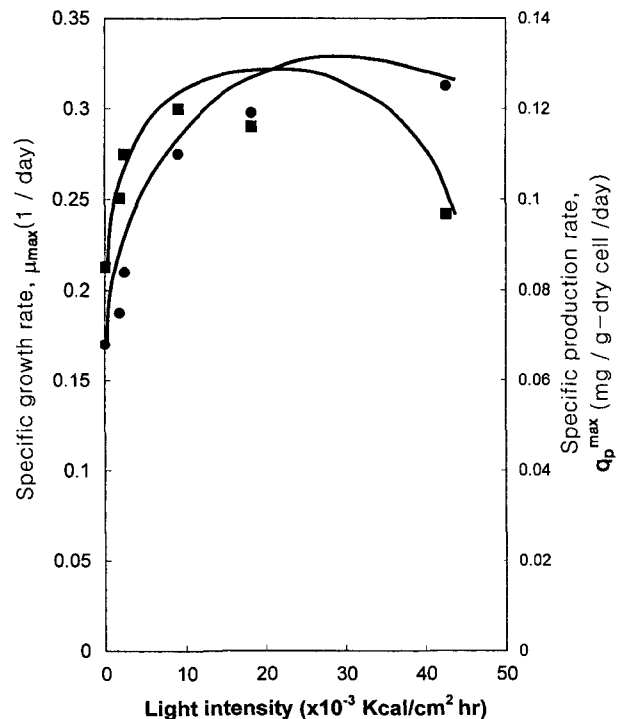
**Fig. 2.** The effect of light intensity on the cell growth in 1/2MS basal medium.  
 —◆— Dark, —▲— 0.8 Klux (18L : 6D), —●— 0.8 Klux, —■— 3 Klux, —\*— 6 Klux, —+— 14 Klux.



**Fig. 3.** The effect of light intensity on betacyanin production in 1/2 MS basal medium.  
 —◆— Dark, —▲— 0.8 Klux (18L : 6D), —●— 0.8 Klux, —■— 3 Klux, —\*— 6 Klux, —+— 14 Klux.

한 결과이다[16].

Fig. 2와 3은 모상근의 생육 및 색소생산성에 대한 광도의 영향을 알아보려고 0~14 klux의 광도하에서 배양했다. Fig. 2는 광도의 변화에 따라 배양시간에 따른 균체량을 측정된 것이다. 광도가 증가함에 따라 균체 생육이 증가함을 알 수 있으며 6 klux일 때 배양 24일에 17 (g-dry wt./L) 최대균체량을 나타냈다. 그보다 높은 광도에서는 균체량이 감소하는 현상을 보였다. 따라서 적정 광도보다 낮거나 높을 경우에 균체의 생육이 억제됨을 알 수 있다. 이로써 균체의 생육에 광도는 중요한 요소임을 확인할 수 있었다. 또한 Fig. 3은 여러 광도 조건



**Fig. 4.** The correlation between specific growth rates and specific production rates on varying light intensity.  
 —■—  $\mu_{max}$  (1/day), —●—  $q_p^{max}$  (mg/g-dry cell/day)

하에서 배양시간에 따른 색소생산량을 측정하였다. 배양초기에는 비슷한 양상을 보이다 배양중반기부터는 광도의 변화에 따라 색소 생산량의 확연한 차이를 볼 수 있었다. 광도가 증가함에 따라 색소의 생산이 증가하였다. Fig. 2에서 높은 광도에서 세포생육이 억제됨과 달리 색소의 경우는 높은 광도에서 색소의 양이 증가하였다. 이는 고휘도에서 shading 효과에 의해 betacyanin의 양이 증가되는 것으로 예상된다.

Fig. 4는 광도의 변화에 따른 비 생육속도와 비 생산속도를 비교한 것이다. 그 결과 3 klux의 경우에 0.3(1/day)의 최대 비 생육속도와 0.11(mg/g-dry cell/day)의 비생산속도를 나타냈으며, 14 klux에서 0.242(1/day)의 비생육속도와 0.125(mg/g-dry cell/day)의 최대비생산속도를 나타냈다. 이 결과로부터 광포화상태가 될 때까지 광도의 증가에 따라 비생육속도는 증가함을 알 수 있다. 이러한 결과로 볼 때 균체의 생육에 있어 광도는 중요한 제한 요소임을 알 수 있다. 또한 높은 광도에서 생육이 저하되므로 광도에 대한 비생육도의 의존성은 photoinhibition model을 따른다. 이 model을 이용해 최대 세포 비생육 속도인  $\mu_{max}$ 와 포화 광도,  $K_i$  및 생육 저해 광도,  $K_d$ 가 각각 0.3(1/day), 5.5(klux), 11.6(klux)로 계산된다. Fig. 5는 균체 생육과 물질 생산과의 관계를 검토하기 위해 균체의 비 생육속도와 물질 생산 속도와의 관계를 나타낸 그림이다. 균체의 비 생육속도( $\mu$ )와 비 생산속도( $q_p$ )를 직선회귀분석한 결과 상관계수( $\rho$ )가 약

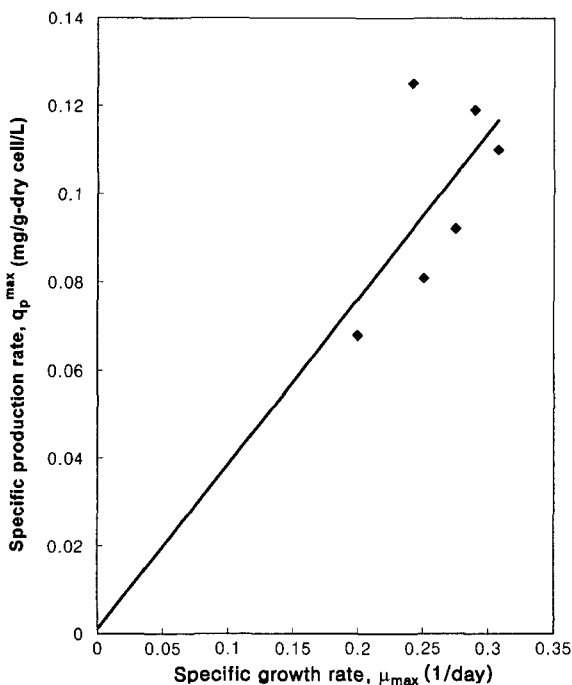


Fig. 5. The linearity of specific growth rates and specific production rates for the production of betacyanin by the growth of *Beta vulgaris L.* cells.

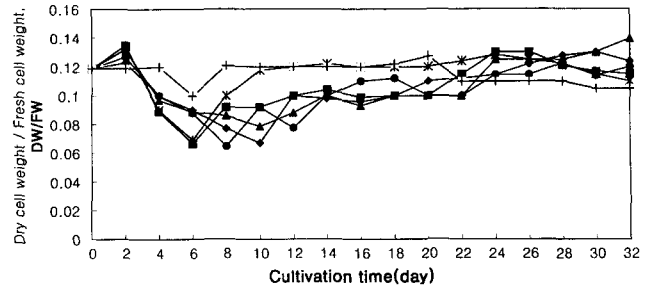


Fig. 6. The changes of ratio of fresh weight to dry weight in growth of the cells by various light intensity.  $\blacklozenge$  Dark,  $\blacktriangle$  0.8 Klux (18L/6D),  $\bullet$  0.8 Klux,  $\blacksquare$  3 Klux,  $*$  6 Klux,  $+$  14 Klux.

0.8493서 밀접한 관련이 있는 것으로 예측된다. 따라서 *Beta vulgaris L.* 모상근으로부터 betacyanin생산은 partially growth related process임을 확인할 수 있다. 이의 lineary 결과 세포당 최대 betacyanin 생산을 나타내는  $\alpha$ 는 0.3756(mg/cell), 최대 생산속도를 나타내는  $\beta$ 는 0.001(mg/g-cell/day)로 추정됐다. 비생육속도( $\mu$ )에 따른 betacyanin 생산속도를 예측할 수 있었으며 betacyanin 합성에 광도가 민감한 인자로 작용함을 알 수 있다.

Fig. 6은 배양에 따른 세포의 수분의 변화를 나타내는 것으로 이는 식물 세포 배양시 배양에 따른 생물학적 변화의 중요한 척도이다. 배양초기보다 배양후반기에 걸쳐 수분이 함유된 무게에 비해 건조 무게비가 증가하는 것으로 나타났다. 또한 광도가 증가함에 따라 건조 무게비가 더 증가하는 것으로 나타났다. 이는 배양이 지속됨에 따라 그리고 광도가 증가됨에 따라 영양분의 축적과 대사의 증진에 따라 수분의 감소가 크기 때문인 것으로 유추된다. 또한 배양말기에는 생중량에 대한 건조중량의 비가 감소하는 것은 균체의 생육이 사멸기에 접어들었기 때문인 것으로 예측된다. 또한 적정 광도 이상인 14 klux에서도 건조중량의 비가 급격히 감소함을 알 수 있다. 이는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 배양말기에 균체의 사멸이 급속히 일어났기 때문인 것으로 판단된다.

또한 세포의 생육에 중요한 영향을 미치는 요소의 하나인 탄소원과 질소원의 비에 따른 세포생육 및 물질 생산과의 관계를 검토한 결과가 Fig. 7이다. C/N ratio가 42.1(w/w)에서 0.26(1/day) 최대 비 생육속도를 나타냈으나 betacyanin의 생산은 31.6(w/w)에서 0.075(mg/g-cell/day)의 최대 비 생산속도를 나타냈다. 탄소원과 질소원이 주영양원으로 특히 탄소원으로 쓰인 sucrose가 세포내 탄수화물의 축적을 가능하게 하여 세포생육을 촉진하는 것으로 예상된다. Sucrose농도는 세포성장 뿐 아니라 이차산물 생산에도 영향을 미친다고 한다. 지치의 callus배양에서 1~5%농도 범위에서 sucrose농도를 증가시켰을 때 shikonin 유도체 합성이 증가되었다는 보고와 함께 *Nicotiana tabacum*배양에서 ubiquinone 합성은

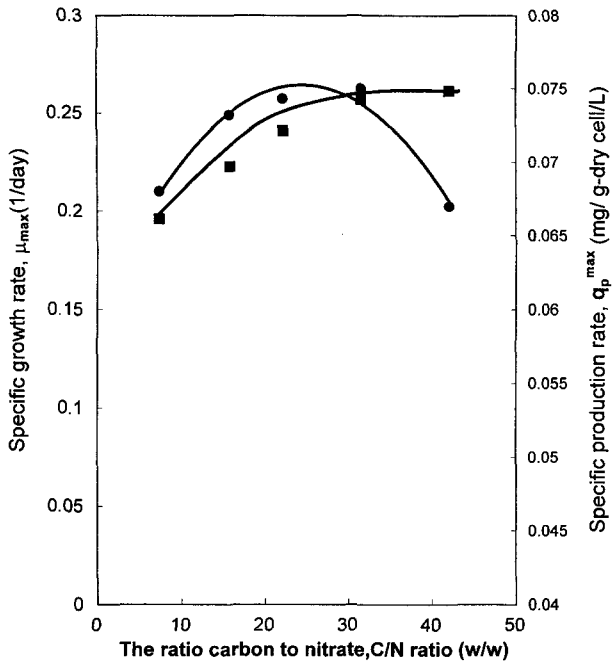


Fig. 7. The correlation between specific growth rates and specific production rates on C/N ratio.  
 -■-  $\mu_{max}$  (1/day), -●-  $q_p^{max}$  (mg/g-dry cell/day)

sucrose가 증가됨에 따라 감소되었다는 상반된 보고가 있다[10, 14]. 42.1(w/w)에서 최대비생육속도를 나타낸 반면 색소생산속도는 감소하는 현상으로 볼 때 적정 C/N ratio가 *Vitris* 배양에서 anthocyanin의 합성과, *Discorea deltoidea* 배양에서 diosgenin의 합성에서처럼 세포의 생육속도 뿐만 아니라 2차대사산물 축적에 중요한 요인으로 작용함을 알 수 있다[25, 28]. 또한 산업적 관점에서 비생육속도도 중요하지만 비생산속도도 중요하므로 배지의 조성은 세포성장과 색소생산 두 관점에서 최적화 되어야 한다. Fig. 8은 인산(phosphate) 농도에 관

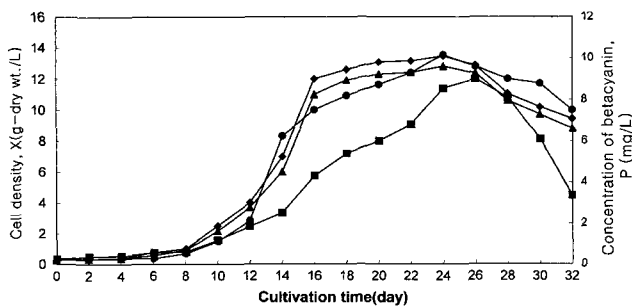


Fig. 8. The effect of phosphate concentration on the cell growth and betacyanin production according to cultivation time.  
 -▲- 6.25 mM  $KH_2PO_4$  (1/2MS basal medium)  
 -◆- 1.25 mM  $KH_2PO_4$ , X  
 -■- 0.625 mM  $KH_2PO_4$  (1/2MS basal medium), P  
 -●- 1.25 mM  $KH_2PO_4$ , P

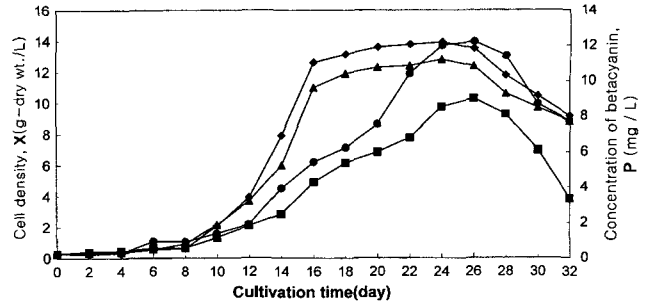


Fig. 9. The effect of kinetin on the cell growth and betacyanin production according to cultivation time.  
 -▲- Control, X  
 -◆- Kinetin (0.1 mg/L), X  
 -■- Control, P  
 -●- Kinetin (0.1 mg/L), P

한 균체의 생육 및 물질생산성의 관계를 검토한 결과이다. 1/2MS basal medium의 2배 농도인 1.25 mM에서 0.31(1/day) 비생육 속도를 나타냈으며 이어서 betacyanin생산도 0.134(mg/g-dry cell/day) 비 생산속도를 보였다. 기본배지일 때 보다 세포생육 및 색소생산능이 높은 것으로 나타났다. 이는 *Catharanthus roseus* 배양시 인산의 증가는 세포성장의 대수기를 증가시켰다는 보고와 일치하였다[13]. 이는 인산이 핵산 대사와 에너지 대사 효소인 UDP, ADP, ATP 등의 구성원소로 필요하기 때문인 것으로 예상된다. 또한 *Digitalis purpurea* 배양시 digitoxin의 생성도 인산농도가 증가되었을 때 배가되었다고 한다[9].

Fig. 9는 물질 생산성 향상을 위한 생육촉진제 첨가에 따른 영향을 보고자 2차 산물 생성에 관여하는 호르몬의 하나인 kinetin의 세포생육 및 물질생산에 미치는 영향을 나타내는 결과이다. kinetin의 0.1  $\mu$ M첨가시 첨가지 않은 경우보다 균체 생육이 증가하며 비생산속도가 0.085(mg/g-dry cell/day)로 증가하였다. 이는 *Stizobolium hassjoo* 배양에서 kinetin첨가시 L-DOPA합성을 촉진시킨 결과와 같음을 알 수 있었다[17]. 이로써 kinetin이 생육촉진제로서 세포생육 및 betacyanin의 생산성에 직접적인 영향을 미치는 것이 확인되었다.

지금까지 조사된 배양조건들을 이용해 모상균의 대량 배양시 최적 조건을 결정하기 위해 식물세포의 생육 및 물질 생산에 가장 중요한 변수들인 광도, C/N ratio, 인과의 관계를 response surface methodology(RSM) 방법을 이용해 최적화 시킨 결과가 다음과 같다. 이 결과 세포 생육과 betacyanin의 최대 생산을 위한 최적 광도는 5.5(klux), 최적 C/N ratio와 인의 농도는 27(w/w), 1.25(mM)로 결정된다. 이는 이 모상균 세포주를 이용해 배양을 위해서는 처음으로 산출된 결과로써 기존의 clone 형성을 위한 조건들과는 상당히 차이가 있음을 알 수 있다. 그리고 Table 1은 본 연구의 최적화조건과 기존의 배양조건에 의한 세포생육과 색소생산능을 비교한 것이다

**Table 1. The comparison of maximum cell densities, maximum betacyanin production, specific growth rates and specific production rates in different cultures**

The condition of culture		Maximum cell density, $X_{max}$ (g/dry wt./L)	Maximum betacyanin production, $P_{max}$ (mg/L)	Maximum specific growth rates, $\mu_{max}$ (1/day)	Maximum specific production rates, $q_p^{max}$ (mg/g-dry cell/day)
Normal conditions	Light intensity	0.6 Klux (18L:6D)	8	4.48	-
	Sucrose concentration	3%	8	4.48	-
	Phosphate concentration	1.25 mM	8	5.66	-
Optimized conditions	Light intensity	3 Klux	16	12.5	0.3
	C/N ratio	31.6 (w/w)	12.8	9	0.2568
	Phosphate concentration	1.25 mM	13.46	10.15	0.31
	Kinetin	0.1 $\mu$ M	12.8	12.2	0.376

[29]. 인산농도의 경우 같은 1.25 mM이라 할지라도 기존의 배양조건에 비해 최적화 조건시 세포 성장 속도가 현저히 증가하였다. 이는 기존의 단일 배양조건과는 달리, 최적화 조건에선 동일한 인산 농도라도 세포생육과 색소 생산에 긍정적인 영향을 주는 다른 조건들이 복합적으로 작용했기 때문인 것으로 사료된다. 최적화 조건에서 배양된 cell의 세포성장속도와 betacyanin 생산량이 기존의 배양조건에 의한 것보다 약 2배가 증가됨이 입증되었다. 이로서 천연 색소와 기능성 물질로의 활용이 가능한 betacyanin을 생산하는 Red beet 모상근의 체외 배양 공정의 최적화를 통해 목적 물질의 경제적 생산이 가능한 대량 배양에 관한 기초 자료를 제공하고 있다.

## 요 약

Red beet (*Beta vulgaris* L.) 모상근의 회분배양을 이용한 천연색소인 betacyanin 생산 최적화를 위해 광도, C/N ratio, 인산의 농도를 각각 변화시켜 세포생육과 색소 생산성에 관한 동력학적 분석을 실시했다. 광도변화에 따른 배양 결과 3 klux의 경우 0.3(1/day)의 최대 비 생육 속도와 0.11(mg/g-dry cell/day)의 최대 비 생산속도 그리고 14 klux에서 0.242(1/day)의 최대 비 생육속도와 0.125(mg/g-dry cell/day)의 최대 비 생산속도를 나타냈다. 광도와 균체의 생육 관계를 검토한 결과 광도에 따른 세포 생육은 photoinhibition model이 적용됨이 확인되었다. Red beet 모상근으로부터 betacyanin의 생산은 partially growth related process임이 입증됐다. 이에 따른 세포당 최대 betacyanin 생산을 나타내는  $\alpha$ 는 0.3756 (mg/cell)이며, 최대 생산속도를 나타내는  $\beta$ 는 0.001 (mg/g-cell/day)로 측정됐다. C/N ratio에 따른 실험결과 42.1(w/w)에서 0.26(1/day)의 최대 비생육 속도를 나타내었으나 최대 비 생산속도는 31.6(w/w)에서 0.075

(mg/g-cell/day)를 나타냈다. 인 농도에 대한 균체의 생육 및 물질 생산성의 관계를 검토한 결과 1.25 mM에서 0.31(1/day)의 비생육 속도와 0.134(mg/g-dry cell/day) 비생산 속도를 나타내었다. 최적 조건을 결정하기 위한 response surface methodology(RSM)결과 세포 생육과 betacyanin의 최대 생산을 위한 최적 광도는 5.5 (klux), 최적 C/N ratio와 인의 농도는 27(w/w), 1.25 (mM)로 결정됐다. 그리고 0.1  $\mu$ M kinetin 첨가시 대조구에 비해 비생산성이 0.085(mg/g-dry cell/day)로 증가함이 입증됐다. Normal조건과 optimum조건을 비교결과 세포의 농도인  $X$ (g-dry wt./L)가 8와 16, betacyanin의 생산량인  $P$ (mg/L)가 4.48과 12.5, 그리고 optimum 조건에서 최대비생육속도인  $\mu_{max}$ 가 0.376와 그리고 최대비 생산속도인  $q_p^{max}$ 는 0.134로 약 2배로서 최적화가 되었다.

## 감사의 말

본 연구는 교육부 기초과학 연구 조성비(BSRI-97-4424)에 의한 연구로 연구비 지원에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Aiba, S. 1982. pp. 85-91. In A. Fiechter (ed.), *Advances in Biochemical Engineering*, Vol. 23. Springer-Verlag, N.Y.
2. Berlin J, S. Sieg, D. Strack, M. Borern, and H. Harms. 1986. Production of betalains by suspension cultures of *Chenopodium rubrum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 5: 163-174.
3. Chung, Jae-Dong. 1992. *Plant Biotechnology*, pp. 696-739. Gyeongbuk National University.
4. Constabel F. and H. Nassif-Makki. 1971. Betalainbildung in beta-calluskulturen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 84: 629-636.
5. Endress R. 1976. Betacyanin akkumulation in kallas von *portulaca grandiflora* var. JR unter dem einfluss von phy-

- tohormonen und Cu<sup>2+</sup>-ionen auf unterschiedlichen grundmedien. *BBP*. **169**: 87–98.
6. Flores, H. E. and P. Filner. 1985. *Plant Physiol.* **77**: 4 suppl.12.
  7. Fujita, Y., S. Takahashi, and Y. Yamada. 1985. Selection of cell lines of *Lithospermum erythrorhizon* cells. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 1755–1759.
  8. Fujita, Y., Y. Hara, C. Suga, and R. Morimoto, 1981. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Report* **1**: 61–63.
  9. Hagimory, M., T. Matsumoto, and Y.Obi. 1982. Studies on the production of *Digitalis* carotenolides by plant tissue cultures. III. Effects of nutrients on digitoxin formation by shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. *Plant Cell Physiol.* **23**: 1205–1211.
  10. Han, Daeseok. 1988. Repeated regeneration of degraded *Red beet* juice pigments in the presence of antioxidants. *J. Food Sci.* **63**: 69–72.
  11. Ikeda, T., T. Masumoto, and M. Noguchi. 1976. Formation of ubiquinone by tobacco plant cells in suspension culture. *Phytochem.* **15**: 568.
  12. Ju, J. Y., H. W. Nam, J. C. Yoon, and C. S. Shin. 1994. Extractive fermentation of red pigment using *Monascus* sp. J101. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **22**: 85–91.
  13. Maccarthy, J., D. Ratcliffe, and H. E. Streets. 1980. The effect of nutrient medium composition in the growth cycle of *Catharantinus roseus* G. Don cells grown in batch culture. *J. Exp. Bot.* **31**: 1315–1325.
  14. Masaaki S, T. Takagi, and A. Komamine. 1986. Growth related accumulation of betacyanin in suspension cultures of *Phytolacca americana* L. *J. Plant Physiol.* **125**: 337–343.
  15. Mizukami, H., M. Konoshima, and M. Tabata. 1977. Effect of nutritional factors on shikonin derivative formation in *Lithospermum erythrorhizon* callus cultures. *Phytochem.* **16**: 1183.
  16. Noe, W., C. Langebartels, and H. U. Seitz. 1980. Anthocyanin accumulation and PAL activity in a suspension culture of *Daucus carota* L. *Planta* **149**: 283–287.
  17. Obata-Sasamoto, H. and A. Komamine. 1983. Effect of culture conditions on DOPA accumulation in a callus culture of *Daucus carota* L. *Planta* **149**: 283–287.
  18. Paek, Y. W., J. C. Ahn, B. G. Jung, and B. Hwang. 1993. Betalain production by hairy root cultures of red beet (*Beta vulgaris* L.). *Korean J. Plant Tissue Culture* **3**: 159–165.
  19. Parr, A. J. 1988. Alkaloid production by transformed root cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Reports* **7**: 309–312.
  20. Pasch, J. H., J. H. von Elbe, and R. J. Sell. 1975. Betalains as colorants in dairy products. *J. Milk Food Technol.* **38**: 25.
  21. Philip, V. M. 1978. How will we color soft drinks of the future? *Food Prod. Dev.* **12**: 24–25.
  22. Pierre-Alain Girod and Jean-Pierre Zryd. 1991. Secondary metabolism in cultured red beet (*Beta vulgaris* L.) cells: Differential regulation of betaxanthin and betacyanin biosynthesis. *Plant cell, Tiss. Org. Cult.* **25**: 1–12.
  23. Sakuta, M.,T. Takagi, and A. Komamine, 1986. Growth related accumulation of betacyanin in suspension cultures of *Phytolacca americana* L. *J. Plant Physiol.* **125**.
  24. Schwartz, S. J., J. H. von Elbe, and M. W. Pariza. 1983. Inability of red beet betalain pigments to initiate or promote hepatocarcinogenesis. *Food Chem. Toxicol.* **5**: 531–535.
  25. Tal, B., J. S. Rokem, and I. Goldberg. 1982. Growth and diosgenin production by *Dioscorea deltoidea* cells in batch and continuous culture. *Planta Med.* **44**: 107–110.
  26. von Elbe, J. H., J. T. Klement, C. H. Amumndson, R. G. Cassens, and R. C. Lindsay. 1974. Evaluation of betalain pigments as sausage colorants. *J. Food Sci.* **39**: 128.
  27. Weller, T. A. and L. L. Lasure. 1981. Betalains in beet root tissue culture. *J. Food Sci.* **47**: 162.
  28. Yamkawa, T., S. Kato. K. Ishida, T. Kodama, and Y. Minoda. 1983. Production of anthocyanins by *Vitis* cell in suspension culture. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 2185–2191.
  29. Yoshikawa, T. and T. Furuya. 1987. *Plant Cell Reports* **6**: 449–453.

(Received July 23, 1998)