

## 生物反應器에서 地黃의 新梢 형성에 關여하는 要因

박주현\*·채영암\*\*

### Factors Affecting on Shoot Formation in Bioreactor Culture of *Rehmannia glutinosa* Lib.

Ju Hyun Park\* and Young Am Chae\*\*

**ABSTRACT** : This study was carried out to determine factors affecting on the mass propagation of *Rehmannia glutinosa* seedlings in bioreactor culture. Air-lift type bioreactor was more compatible to shoot formation than stirrer type. Fifty grams (90 stem explants) of inoculum in 1.5L medium was placed into 2.5L bioreactor with aeration rate of 0.5 v. v. m., which was proper for effective shoot formation. Adding MES as pH buffer to culture medium increased the numbers of shoot formation. Adding 5g/l of anti-vitrifying agent into culture medium was highly effective for diminishing the rate of vitrification in shoots formed.

**Key words** : *Rehmannia glutinosa*, Bioreactor, Shoot formation, Antivitrification, Dissolved oxygen, Inoculum density, Aeration, pH

## 서 언

地黃은 種根으로 번식하기 때문에 증식률이 낮을 뿐만 아니라 번식용 뿌리를 저장하는 동안 병원균에 의한 감염과 발병률이 높아져 재배에 어려움이 많다. 기내 육묘법을 이용하면 곰팡이균에 의한 병을 막거나 회피할 수 있는 것으로 알려지고 있다. 한편 증근을 이용한 영양번식의 반복은 바이러스에 심하게 감염되어 있는 것으로 조사되어 조직 배양 기술을 이용한 無病株 생산이 필요하다고 하였다(박, 1998).

무병주의 증식에 있어 기내 배양은 비록 우수한

방법이기는 하지만 아직까지는 증식 속도가 늦고 비용이 많이 드는 단점이 있다. 지황의 경우에도 현재까지 이루어진 연구 결과의 대부분은 한천 배지와 소규모의 배양 용기를 이용하여 왔기 때문에 種苗의 器內 대량생산이라는 전제를 만족시키지 못하고 있는 실정이다. 이러한 단점을 극복하기 위한 방법의 하나로 생물반응기를 이용한 대규모의 배양은 작업에 필요한 노동력을 감소시키고 동시에 側芽의 증식률을 높일 수 있는 장점이 있는 것으로 보고되어 (Styer, 1985), 이를 지황의 種苗 생산에 적용 가능성을 검토하고자 하였다. 따라서 본 연구에서는 신초 형성에 관여하는 요인으로 적정 생물반응기의 형과 배양밀도, 생물반응기 내 용존

\* 동양물산 연구소 (Tong Yang Moolsan Co., Ltd. R&D Institute, Yong In 449-870, Korea)

\*\* 서울대학교 식물생산과학부 (School of Plant Science, Seoul National University, Suwon, 441-744, Korea)

< 2000. 3. 9 접수 >

산소와 aeration 및 유리화 억제제의 효과 등을 조사, 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 不定芽의 유도

생물반응기 배양용 재료를 대량 확보 및 유지하기 위하여 BA 2mg/l와 NAA 0.5mg/l가 첨가된 MS 기본배지 (0.8% 한천, 3% 자당)가 든 petri-dish에 지황 무균 식물체의 줄기 조직을 약 1cm 크기로 잘라 10개씩 치상하여 부정아를 유도하였다. 배양은 25±2°C, 16시간 일장 하에서 수행하였다.

### 2. 생물반응기 배양

新梢 생산에 적합한 생물반응기의 종류와 배양 밀도를 결정하고자 앞서 부정아를 유도시켰던 무균 식물체의 줄기 절편 30g (약 50개 줄기 절편)과 50g (약 90개 줄기 절편)을 배지 1.2 L를 채운 2.5L 용량의 교반형 (stirrer type)과 空氣浮揚型 (air-lift type) 생물반응기에 접종하여 배양하였다.

배지 내 溶存酸素量이 신초 형성에 어떻게 영향을 미치는지 알고자 배양을 시작하기 전에 용존산소를 100%로 포화시킨 후, 교반형 생물반응기에 DO meter (Metler Toledo, Swiss)를 부착하여 배양 기간 중 3일 간격으로 30일 동안 측정하여 용존산소의 변화를 조사하였다.

배지의 pH가 생물반응기 배양에서 신초 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해 배지를 멸균하기 전 pH를 5.7로 조정된 경우와 pH buffer 역할을 하는 MES [2-(N-Morpholino) ethane sulfonic acid]를 첨가하여 pH를 5.7로 조정된 후 멸균한 배지를 이용하여 각각 3주간 배양한 후 생성된 신초의 수를 조사하였다. 이와 동시에 aeration의 양을 각각 1.0 vvm, 0.5 vvm으로 조정된 후 배양하여 생물반응기 배양 시 신초 생성에 적절한 aeration의 양을 결정하고자 하였다.

기내 배양시 발생할 수 있는 신초의 유리화 (vitrification)를 억제 내지 경감시킬 수 있는 지를 알기 위하여 琉璃化 억제제인 anti-vitrifying agent (Sigma, Cat. No. A0807)를 3~7 g/l의 농도로 각

각 처리하여 4주간 배양 후 발생된 신초의 수와 生體重을 조사하여 유리화 억제 효과를 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 배양밀도 및 생물반응기 종류가 신초의 생산에 미치는 영향

지황 줄기 절편을 생물반응기에서 배양할 때 적절한 배양 밀도를 알아보기 위하여 MS 기본배지에 BA 2.0 mg/l와 NAA 0.5 mg/l가 포함된 MS 고체 배지 (agar 0.8%)에서 3주간 前培養을 하여 부정아 발생을 유도한 후, 1.5L 배지에 재료가 각각 30g과 50g이 되도록 배양 밀도를 조절하여 2.5L 용량의 교반형과 공기부양형 생물반응기에서 3주간 배양한 결과는 표 1과 같다.

교반형 생물반응기에서는 배양 밀도를 30g에서 50g으로 높였을 때 조직이 성장하면서 impeller에 상처를 입거나 조각이 나는 등의 이유로 발생된 신초의 수는 급격히 줄었다. 공기부양형 생물반응기에서는 배양 밀도가 높아지더라도 큰 영향은 받지 않았지만 50g 이상으로 밀도를 높였을 경우에는 신초들이 형성되어감에 따라 서로 심하게 뒤엉키게 되어 수확에 문제가 되었다. 따라서 적정 배양 밀도는 50g 정도가 적합한 것으로 판단되었다. 그러나, 이와 같은 결과는 배양 절편으로부터 유도된 부정아만을 분리해서 사용한 것이 아니었기 때문에 원래의 절편의 무게도 포함되어 있어 배양 밀도를 결정하기 위한 정확한 시료의 양이라고 보기는 어렵다. 따라서 시료의 무게보다는 배양에 이용되는 절편의 개수로 배양 밀도를 결정하는 것이 증식률을 산정하는데 더욱 정확할 것으로 판단되어, 이

Table 1. Effect of culture density on shoot formation in bioreactor culture of *R. glutinosa* after 4 weeks

Inoculum volume (g)	Number of shoots	
	Stirrer type	Air-lift type
30	235	418
5	< 50	572

후 실험은 고체배지에서 前培養된 시료 90절편을 이용하였다.

## 2. 생물반응기 배양 기간 중 배지 내 용존산소량과 pH의 변화

적정 용존산소량을 결정하기에 앞서 배양 기간 중에 공급되는 공기와 성장하고 있는 조직이 어떤 양상으로 반응하는가를 아는 것이 중요하다. 이는 생물반응기에서 배양 시 산소를 요구하는 정도는 종에 따라 차이가 있기 때문에 우선 지황이 어느 정도 수준의 산소에 좋은 반응을 보이는지 아니면 해를 입는지를 알아보고자 하였다. 따라서 생물반응기에서 배양을 시작하기 전에 용존산소의 농도를 100%로 포화시킨 후 배양 기간이 경과함에 따라 용존산소의 변화를 측정할 결과는 그림 1과 같다.

그림에서 보면 배양 기간 중 배양 용기 내 용존산소는 서서히 감소하다가 배양 3주째부터 급격히 감소하여 배양 4주째에는 40%까지 감소하였다. 이와 같은 결과는 생물반응기에서 지황 조직을 배양할 때, 배양 3주째부터 발생된 신초들이 활발하게 성장하면서 주입되는 공기량 이상의 수준을 요구하기 때문인 것으로 생각되었다. 이 시기에는 이미 수확이 가능한 충분한 생장이 이루어져 있는 상태이기 때문에 배양 3주 후에 수확을 하는 것이 좋지만 만일 충분한 생장이 안되어서 이 기간 이상 배양할 필요가 있는 경우 주입되는 공기의 양을 늘려 주어야 할 것으로 여겨진다. 하지만 3주 이상 생물반응기에서 배양할 경우 생성된 신초들에서는 유

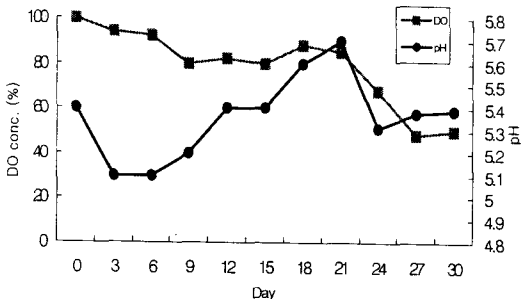


Fig. 1. Changes of dissolved oxygen(DO<sub>2</sub>) and pH measurement during bioreactor culture of *R. glutinosa*

리화 현상이 발생하는 경향을 보여, 이 기간 이상 배양할 경우 이 점을 아울러 고려할 필요가 있는 것으로 생각되었다.

## 3. 생물반응기 배양에 적절한 산도(pH) 및 aeration

많은 배지에서 질소원으로서 산화된 형태의 NO<sub>3</sub>-를 사용하고 있는데 (George, 1996), 식물체가 이용하는 것은 주로 배지의 酸度和 연관되어진다고 알려져 있다 (Asher, 1978). 그림 1에서 보는 것과 같이 배양 중 배지 내 pH는 일정하게 유지되는 것이 아니라 급격하게 떨어지거나 올라가는 등 변화가 심하게 일어나기 때문에 배지 내 pH에 대한 영향을 검토할 필요가 있다. 이러한 이유로 MES [2- (N- Morpholino) ethanesulfonic acid]를 이용하여 배양 기간 중 pH를 어느 정도 일정하게 유지할 수 있는 조건에서 배양하였을 경우와 기존의 방법인 배지 멸균 전에만 조정하여 배양하였을 경우를 비교하여 pH의 영향을 알아보았다. 이와 동시에, 주입되는 공기의 양을 각각 0.5 vvm과 1.0 vvm으로 조절해 주어 공기 循環量의 영향을 알아보기 위해 실험한 결과는 표 2와 같다.

표에서 보면 배지 내에 MES를 처리했을 경우가 그렇지 않은 경우보다 평균 약 30% 이상 더 높은 신초 발생률을 보여, pH가 지황의 신초 발생에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 사과의 줄기 절편으로부터 不定根을 유도하는 실험에서 MES를 이용하여 pH를 5.5로 고정시켰을 때 첨가하지 않은 실험구에 비해 2배 가량 더 많은 不定根이 발생하였다고 보고되었는데 (Harbage and Stimart, 1996), 이러한 결과와 본 실험 결과 등으로 미루어 볼 때 기내 배양에서 MES와 같은 pH buffer의 역할은 큰 것으로 판단되었다.

또한, 주입되는 공기의 양은 1.0 vvm 보다는 0.5 vvm으로 조정하는 것이 효과적이었다. 이는 공기의 양이 많아지면서 배양 용기 내에 많은 양의 foam이 생성되어 조직의 호흡이나 용기 내 통기를 오히려 억제했기 때문으로 여겨진다. 생물반응기에서 배지 양에 대한 배양 용기의 비율은 플라스크 조건보다 매우 높기 때문에 배지 내 산소 공급을 위해 bubble이나 silicon tube에 의한 공기 순환 등 외부에서 공기를 공급해 줄 수 있는 방법들을 필요로

한다 (Preil et al., 1988). 그러나 생물반응기에서 배양할 때 각 작물이 요구하는 공기의 양에는 종에 따라 차이가 있다.

Preil 등 (1988)은 alfalfa, digitalis 등의 실험에서 배지 내 높은 DO<sub>2</sub> 농도는 체세포배 발생이나 기관 발생에 효과적이었다고 보고하였지만, Kessel과 Carr (1972)는 당근을 재료로 실험한 결과 높은 DO<sub>2</sub> 농도가 오히려 생육을 억제하였다고 보고하였다. 그리고 기내에서 adventitious bulblet을 형성시키기 위해서는 비교적 높은 수준의 용존산소가 필요한 것으로 알려져 있는데 *Begonia* × *hiemalis*의 신초를 bubble column 생물반응기에서 배양했을 때 공기 순환이 부족하면 bulblet의 증식률이 낮았다고 Takayama와 Misawa (1981)는 보고한 바 있다.

한편, 대용량의 생물반응기 (8L 생물반응기에 2L배지)에서 감자의 신초를 성장시킬 때 비록 비교적 높은 공기 순환을 필요로 하더라도 어느 정도 신초의 성장을 확보한 후 이들 신초를 신초 성장시보다 좋지 않은 공기 순환 조건을 주었을 때 minituber를 생산할 수 있었고, 배양 초기부터 많은 양의 공기를 주입하여 신초를 배양하였을 경우 tuber가 형성되지 않았다는 보고 (Akita and Takayama, 1988)가 있었다. 이러한 사실로 미루어 차후 지황을 재료로 신초를 대량 증식시키는데 대용량의 생물반응기를 적용시킬 경우 용량의 확대에 따른 공기 주입량의 수준도 반드시 확인할 필요가 있을 것으로 생각되었다.

Table 2. Effects of MES and aeration rate on shoot formation in bioreactor culture of *R. glutinosa* after 3 weeks

Treatment	Total number of shoots harvested	Multiplication rate (%)
A <sup>†</sup>	321	356
B	245	270
C	460	510
D	298	330

<sup>†</sup> : A : without MES and aeration of 0.5 vvm  
 B : without MES and aeration of 1.0 vvm  
 C : with MES and aeration of 0.5 vvm  
 D : with MES and aeration of 1.0 vvm

#### 4. 유리화 억제제 처리에 의한 유리화 경감 효과

여러 조직배양 조건들 중에서 특히 액체배양은 유리화 현상이 심하게 일어나는데 (Ziv, 1986; Ziv et al., 1987), 종에 따라서는 기내 배양된 幼苗의 50% 이상 유리화가 이루어지는 경우도 있다 (Debergh et al., 1981; Leshem, 1983). 지황의 액체배양에서도 마찬가지로 배양 묘의 유리화는 發根 배지로 옮겨 주거나 이식할 경우 수분을 많이 함유하고 있는 조직의 특성상 부서지기 쉽고 빠르게 탈수가 진행되어 문제시되었다. 따라서 유리화 현상을 경감시키기 위해 antivitrifying agent를 농도별로 처리하여 그 효과를 실험한 결과는 표 3과 같다.

표에서 보면 대체적으로 유리화 억제제를 처리하여 배양하였을 경우, 수분을 다량 함유하여 발생된 신초의 수에 비해 생체중이 지나치게 높게 나타난 대조구와는 달리 생체중이 50% 이상 줄어들어 배양 조직의 수분 함량이 낮게 나타나 효과가 인정되었다. 또한 신초의 수에 있어서도 유리화 억제제를 처리하였을 경우 처리하지 않은 대조구에 비해 플라스크 당 10개 이상 더 많이 생성되었고, 그 형태에 있어서도 건전한 생육을 보여 유리화 억제 효과와 더불어 신초의 형성을 촉진하는 효과도 있는 것으로 나타났다 (Figure 2). 특히 5g/l의 농도로 처리하였을 경우 대조구보다 신초의 수는 플라스크 당 80% 정도 더 많이 발생하면서 생체중도 낮게 나타나, 이 농도가 적절할 것으로 생각되었다.

유리화 현상을 극복하기 위해 광, CO<sub>2</sub>, 온도와 같은 배양 환경의 변화 (Reuther, 1988), 한천과 같은 고형 물질의 조성 및 종류 (Debergh et al., 1981; Pasqualetto et al., 1988), 식물생장조절물질 (Leshem et al., 1988) 또는 배지 내 유기물과 무기물 조성의 변형 (Gaspar and Kervers, 1987; Rugini et al., 1987) 등 여러 방법들이 연구되어 왔다. 그러나 대부분의 경우 이들 처리는 유리화를 완전히 억제하지는 못하고 다소 감소시켰을 뿐이라고 보고되었다 (Chafik and Yves, 1992). 이와 비교하여 Chafik 과 Yves (1992)는 딸기의 신초를 액체배지에서 증식시키는 연구에서 본 실험에서와 동일한 유리화 억제제를 5g/l 처리하였을 경우 처리하지 않았을 경우에 비해 생체중이 현저하게 감

소하였고, 유리화묘가 전혀 발생하지 않았다고 보고하여 본 실험 결과와 일치하였다. 이와 같은 보고들에 비추어 볼 때, 지황 조직의 액체배양시 유리화 억제제의 처리는 다른 방법들에 비해 용이하게 유리화를 현저히 낮출 수 있는 방법인 것으로 본 실험 결과 제시할 수 있었다.

Table 3. Effect of antivitrifying agent on shoot formation in *R. glutinosa* after 4 weeks culture

Conc. (g/l)	No. of shoots / flask (Mean ± S.E)	Fresh weight (g) (Mean ± S.E)
Control	22.0 ± 2.4	10.32 ± 0.44
3	8.0 ± 1.6	1.05 ± 0.18
4	9.0 ± 2.5	1.20 ± 0.14
5	39.3 ± 1.7	5.45 ± 0.33
6	31.3 ± 7.2	3.28 ± 0.61
7	31.8 ± 4.9	3.30 ± 0.54

Control : MS medium supplemented with BA 2.0 mg/l and NAA 0.5 mg/l

S. E : standard error

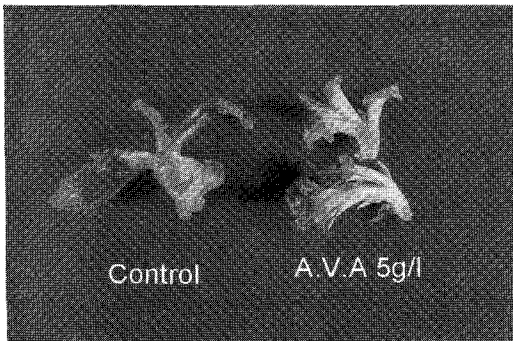


Fig. 2. Effect of anti-vitrifying agent on the diminishing of vitrification in *R. glutinosa*

## 적 요

지황 기내 식물체의 줄기 조직을 재료로 생물반응기에서 부정아 발생 과정을 통하여 기내 종묘를

생산하기 위해 본 실험을 수행하였다. 공기부양형 생물반응기가 교반형에 생물반응기의비해 신초 형성에 유리하였다. 2.5L 규모의 생물반응기에서 적절한 배양 밀도는 배지 1.5L에 시료 50g(줄기절편 90개)이었고, 이 때 공기의 주입량은 0.5 v. v. m으로 조절하는 것이 효과적이었다. 신초의 생산 효율을 높이기 위해 배지에 pH 완충제인 MES를 첨가한 결과, 생성된 신초의 수가 증가하였다. 유리화 억제제를 5g/l의 농도로 배지에 첨가하였을 경우 신초의 유리화 현상이 뚜렷하게 억제됨과 동시에 신초의 형성도 증가되었다.

## LITERATURE CITED

- Akita M. and M. Takayama. 1988. Mass production of potato tubers using jar fermenter techniques. *Acta Horticulturae* 230 : 55-61.
- Asher C. J. 1978. Natural and synthetic culture media for spermatophytes. In : M. Recheige(ed.). *CRC Handbook Series in Nutrition and Food. Culture Media and Food Supplements. Vol 3.* pp. 575-609.
- Chafik H. and D. Yves. 1992. Prevention of shoot vitrification of strawberry micropropagated shoots proliferated on liquid media by new antivitrifying agents. *Can. J. Plant Sci.* 73 : 231-235.
- Debergh P., Y. Harbaoni and R. Lemeur. 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*) : Evaluation of different hypothesis to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiol. Plant.* 53 : 181-187.
- Gaspar T. and C. Kervers. 1987. Cobalt prevention of vitrification process I carnation. *Plant Physiol.* 77(suppl.) : 13.
- George E. F. 1996. *Plant propagation by tissue culture (2nd edition). part 1. The technology.* pp286-287. Exegetics Limited press.
- Harbage J. F. and D. P. Stimart. 1996. Effect of pH and 1H-indole-3-butyric acid (IBA) on rooting of apple microcuttings. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121 : 1049-1053.
- Kessel, R. H., and A. H. Carr. 1972. The effect of

- dissolved oxygen concentration on growth and differentiation of carrot (*Daucus carota*) tissue. J. Exp. Bot. 23 : 996.
- Leshem B. 1983. Growth of carnation meristems *in vitro* : anatomical structure of abnormal plantlets and the effect of agar concentration in the medium in their formation. Ann. Bot. 52 : 413-415.
- Leshem B., E. Werker and P. D. Shaley. 1988. The effect of cytokinins on vitrification on melon and carnation. Ann. Bot. 62 : 271-276.
- Pasqualetto P. L., R. H. Zimmerman and I. Fordham. 1988. The influence of cation and gelling agent concentration on vitrification of apple cultivars *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 14 : 31-40.
- Preil W., P. Florek, U. Beck and A. Beck. 1988. Toward mass propagation of bioreactor. Acta Horticulturae 226 : 99.
- Reuther G. 1988. Comparative anatomical and physiological studies with ornamental plants under *in vitro* and greenhouse conditions. Acta Horticulturae 226 : 91-98.
- Rugini E., P. Tarini and M. E. Rossodivita. 1987. Control of shoot "vitrification" of almond and olive grown *in vitro*. Acta Horticulturae 212 : 177-183.
- Styer D. J. 1985. Bioreactor technology for plant propagation. In : Henke R. R. et al. (eds.) Tissue culture in Forestry and Agriculture. Plenum Press. New York, London. pp 117-130.
- Takayama S. and M. Misawa. 1981. Mass propagation of *Begonia* × *hiemalis* plantlets by shake culture. Plant and Cell Physiol. 22 : 461-467.
- Ziv M. 1986. *In vitro* hardening and acclimatization of tissue culture plants. In : Withers L. A., Alderson P. G. (eds.) Plant tissue culture and its agricultural applications. Butterworth, London. pp 187-196.
- Ziv M., A. Scharfs and D. Fleminger. 1987. Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated *in vitro*; implications for hardening. Plant Sci. 52 : 127-134.
- Park C. H. 1998. Cytogenetic characteristics and mass propagation of *Rehmania glutinosa*. Ph.D thesis, Chungbuk National University