

최 종
연구보고서

형질전환 참깨모상근을 이용한 유용단백질
(fungal phytase)의 생산기술 개발

Development of sesame hairy root system for
extra-cellular production of recombinant fungal phytase

연구기관

동아대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “형질전환 참깨모상근을 이용한 유용단백질(fungal phytase)의 생산기술 개발” 과제 (세부과제 I “곰팡이 phytase유전자의 발현벡터 제작과 phytase의 분리 정제”, 세부과제 II “참깨 모상근의 형질전환, 고발현 형질전환체의 확보 및 보존기술 개발” 및 세부과제 III “형질전환 참깨 모상근의 배양기술 개발”)의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 11월 14일

주관연구기관명 : 동아대학교

총괄연구책임자 : 정정한

세부연구책임자 : 이영병

연 구 원 : 진언호

연 구 원 : 천재안

협동연구기관명 : 진주산업대학교

협동연구책임자 : 이신우

요 약 문

I. 제 목

형질전환 참깨모상근을 이용한 유용단백질(fungal phytase)의
생산기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

피타아제의 세계시장은 연간 약 5억불 정도로 추산되고 있으나(한국은 약 120-150억원/년), 피타아제에 의해서 부수적으로 생산되는 인의 이용율을 합치면 그보다 훨씬 높은 경제적 가치를 가지고 있는 것으로 믿어진다. 특히 단위가축이나 양식 어류의 분뇨에 의하여 생기는 환경오염을 감소 시키기 위해서 피타아제의 효용성이 중요시 될 뿐 아니라, 가축과 양식 어류의 사료성분에서 다량 요구되는 인의 활용 측면에서도 피타아제의 가치는 중요하다고 생각된다. 특히 hairy root system의 경우, 유전적 및 생화학적 변화가 거의 없이 지속적인 배양이 가능하여 단위시간 당 생산량이 상대적으로 높으며, 생성물의 분리정제가 비교적 수월하고, 상대적으로 저렴한 가격의 배지 사용이 가능하여 생산비 절감효과가 있을 뿐 아니라, 배양조건이 비교적 간단하여 상대적으로 적은 투자비용으로 생산시설이 가능하고, 형질전환 hairy root로부터 재분화가 가능하기 때문에 식물의 hairy root system은 재조합 단백질의 생산을 위한 산업화의 응용연구 분야 뿐 아니라 관련 분야의 기초연구를 위해서도 기술 개발 필요성이 있는 중요한 연구개발 분야이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 곰팡이 phytase유전자의 효율적 발현벡터 제작과 phytase의 분리정제
 - 곰팡이 피타아제의 유전자 분리 및 효율적 발현벡터의 제조
 - 형질전환체의 확인실험 및 형질전환체의 유전자 도입 확인실험
 - 분비된 phytase의 분리 정제 및 활성측정 실험
 - 생산된 피타아제의 생화학적 특성분석

2. 참깨 모상근의 형질전환, 고발현 형질전환체의 확보 및 보존기술 개발
 - *Agrobacterium rhizogenes* DC-AR2 균주를 사용하여 형질전환 실험 수행
 - 피타아제 유전자 효율적 도입방법의 확보 및 형질전환된 참깨 모상근 선발
 - 형질전환조건의 효율성 검증 및 형질전환 참깨 모상근의 확보
 - 최상의 고발현이 가능한 모상근 hairy root cell line을 지속적으로 보존시킬 수 있는 효율적 cell line 저장방법 확립
3. 참깨 모상근의 효율적 배양기술 개발
 - 배양온도(20-30℃), 배양 pH(5-8)조건 및 배지의 조성에 따른 형질전환 참깨 모상근 biomass의 성장과 재조합 피타아제의 생산을 위한 최적 배양조건 확립
 - 모상근의 성장과 재조합 곰팡이 피타아제 생산에 미치는 당농도(2-9 %)의 영향
 - 모상근의 배양 조건 및 피타아제 생산에 미치는 빛과 암의 영향을 검증하는 연구와 관련된 실험

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발의 결과

가. 곰팡이 phytase유전자의 발현벡터 제작과 phytase의 분리 정제기술 개발

- 곰팡이 phytase유전자의 효율적 발현벡터:
 곰팡이 *Aspergillus*의 phytase유전자를 클로닝하여 이 유전자의 발현산물인 phytase 단백질이 배양액 속으로 분비될 수 있는 phytase발현 cassette I(PR-signal peptide를 가진 발현 벡터)를 확보하였다.
- *Agrobacterium rhizogenes* DC-AR2 균의 형질전환을 위한 전기융합:
 이 발현 cassette를 이용하여 *Agrobacterium rhizogenes* DC-AR2 균을 형질전환 시킬경우, 12.kV/cm에서 25μF (Bio-Rad회사의 electro-pulsor로 이용할 경우)로 하는 것이 가장 효율적으로 형질전환 된다는 사실을 확인함으로써 이 균의 전기융합 방법을 제시하였다.

▪ Genomic DNA 분석:

Agrobacterium rhizogenes DC-AR2 균에 의해서 형질전환된 참깨 모상근의 형질전환 여부를 검정하기 위한 모상근의 genomic DNA를 분석한 결과를 Southern hybridization 실험을 수행하여 재조합 곰팡이 피타아제 유전자의 존재를 확인하였다.

▪ SDS-PAGE 분석:

형질전환 모상근 조직과 배양액으로부터 이 발현 cassette에 의해서 재조합 곰팡이 phytase 단백질의 생산이 가능하다는 SDS-PAGE 검증 자료를 확보하였다.

▪ 재조합 곰팡이 피타아제의 분리 정제:

배양액 속으로 분비된 재조합 곰팡이 피타아제 단백질을 효율성을 검정하기 위한 실험을 수행한 결과 네 단계의 분리 정제 방법이 가장 효율적이었다는 사실이 확인되었다. 첫 번째 단계는 centrifugation, 두 번째는 dialysis and desalting by ultrafiltration, 세 번째는 DEA-Sepharose chromatography, 네 번째는 Sepharose column chromatography의 단계를 거쳐 재조합 피타아제를 분리 정제하는 방법에 관한 실험분석 자료를 확보함으로써 생산된 곰팡이 피타아제의 생산을 확인한 결과 요약은 다음과 같다.

- 피타아제의 total activity는 첫 단계의 32 Units에서 시작하여 마지막 단계에서는 21 Units까지 감소되었으며,
- Specific activity는 36 Units/mg protein에서 시작하여 마지막 단계에서는 97 Units/mg protein까지 증가하였음을 보여주었다.
- 분리 정제된 피타아제의 순도는 2.7배까지 증가 하였지만 피타아제의 회수율은 66 배로 감소하였음을 보여주었다.
- 분리 정제된 재조합 곰팡이의 SDS-PAGE의 분석 결과로 볼 때, 본 분리정제 방법은 피타아제의 분리 정제에 아주 타당한 기술임이 검증되었다.

▪ 재조합 곰팡이 피타아제의 발현양상 분석:

재조합 곰팡이 피타아제에 의하여 형질전환된 모상근의 배양 발현양상을 측정 한 결과 배양 2주째부터 발현이 시작되어 점차 발현양이 증가되다가 6주째에 가장 높은 발현양이 측정되었으며, 7주 이후에는 발현양이 점차 감소하는 경향을 보여주었다. 이러한 결과로 볼 때, 참깨의 모상근 배양은 5-6주 배양이 가장 적합한 배양기간임을 보여주는 결과로 해석되었다.

▪ Immunodetection 분석:

합성된 재조합 곰팡이 피타아제 발현벡터에 의해서 분리된 단백질 산물로부터 피타아제를 확인하기 위하여 western blotting 방법으로 분석한 결과 피타아제 단백질이 형질전환 모상근의 배양액 속으로 분리되었음을 확인하였다.

▪ 분리 정제된 곰팡이 피타아제의 생화학적 특성분석:

곰팡이 피타아제의 당화반응(glycosylation)과 피타아제의 활성여를 확인하기 위하여 zymogram staining과 PAS (period-acid Schiff) staining 및 SDS-PAGE 분석실험을 수행한 결과, 모상근 배양에 의해서 생산된 재조합 곰팡이 피타아제는 곰팡이에서 생산되는 피타아제와 동일한 생화학적 특성을 가진 것으로 확인되었다.

▪ 분리 정제된 곰팡이 피타아제의 생화학적 반응분석:

- 분리 정제된 곰팡이 피타아제의 활성에 미치는 반응온도의 분석 하기위하여 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C의 온도 반응을 통하여 활성반응을 측정 한 결과에 의하면 50-60 °C의 반응온도에서 가장 높은 활성이 측정되었으며, 이 반응온도는 상업적으로 판매되는 곰팡이 피타아제의 반응온도와 유사하다는 실험적 결과를 보여주었다.
- 분리 정제된 곰팡이 피타아제의 온도 안정성 (thermal stability)에 관한 실험을 수행한 결과 20°C-50°C까지는 온도 안정성이 보존되어 있었으며, 이 온도범위에서는 피타아제의 활성 안정성이 유지된다는 결과를 얻었으며, 이 결과 역시 판매되고 있는 곰팡이 피타아제의 열 안정성 범위와 유사하다는 사실을 결론을 얻을 수 있었다.
- 분리 정제된 곰팡이 피타아제의 활성반응에 미치는 pH의 영향을 분석한 결과 약 pH 4-5사이의 범위에서 가장 높은 피타아제 활성을 보여주었으며, 이 pH범위의 피타아제 활성은 곰팡이의 배양에서 얻어진 피타아제 pH활성 범위와 유사한 결과를 보여주었다.
- 분리 정제된 곰팡이 피타아제의 활성반응에 미치는 11종의 반응 첨가제의 영향을 분석한 결과에 의하면 76%-106%의 활성 변화를 보여주었지만, 본 실험의 수행과정에서 사용된 첨가제의 경우에는 피타아제의 활성이 100%-105%였다.

나. 참깨 모상근의 형질전환, 고발현 형질전환체의 확보 및 보존기술 개발

- 참깨조직별 형질전환 효율성 검증:

참깨조직을 형질전환 시키는 효율적 방법을 모색하기 위한 여러 종류의 실험을 수행한 결과 wild type *Agrobacterium rhizogenes* 균을 사용하여 참깨의 배(hypocotyl) 조직 으로부터 형질전환 참깨 모상근을 획득하여 이들을 성공적으로 배양시킬 수 있는 방법을 확립하였다.

- 형질전환 모상근의 선발:

참깨 모상근의 형질전환체들을 선발하기 위한 kanamycin 저항성을 실험한 결과, kanamycin 50 µg/mL 이상의 농도에서는 wild type 형질전환 모상근이 모두 고사되는 반면에 kanamycin 저항성 유전자가 함유된 모상근은 고사되지 않고 모상근의 생장이 지속된다는 실험적 증거가 확보됨에 따라서 100 µg/mL의 kanamycin 농도가 참깨 모상근의 형질전환체 선발에 사용되었다.

- 참깨 모상근 형질전환체의 분석:

- 재조합 곰팡이 피타아제의 발현카셋트를 가지고 있는 pMOG413 plasmid를 전기충격 시스템 방법으로 *A. rhizogenes* 균에 옮긴 결과의 확인 실험을 위해 PCR 방법이 이용되었고, 그 결과 pMOG413 plasmid가 *A. rhizogenes* 균에 확실히 전이되었다는 실험적 결과를 확보하였다.
- 형질전환된 참깨 모상근의 확인을 위해 각각의 형질전환체를 수확하여 original fungal phytase 유전자를 probe로 하여 Southern hybridization 실험을 실시한 결과, pMOG413 plasmid의 재조합 곰팡이 피타아제 발현카셋트가 참깨 모상근에 성공적으로 전이되었다는 결과를 얻었다.

- 재조합 곰팡이 피타아제 고발현 모상근 cell line 선발:

피타아제를 고발현시킬 뿐 아니라 모상근의 생장이 우수한 모상근 cell line을 선발하기 위해서 형질전환된 모든 참깨 모상근을 배양하여 생산된 피타아제의 활성을 측정 한 결과, 피타아제의 활성이 가장 높게 나타나는 참깨 모상근의 형질전환체의 cell line을 선발하여 배양실험에 사용하였다.

- 선발된 모상근 cell line의 보존방법 개발:

- A) 초 냉동(cryopreservation) 방법에 의한 cell line 보존

B) 화학적 방법에 의한 hairy root cell line 보존

1) DMSO 처리효과 분석;

선발된 우수 모상근 cell line의 장기 보존기술을 개발하기 위한 기초실험을 수행한 결과, DMSO의 처리를 위해서는 sucrose의 처리가 필수적이라는 사실과 DMSO의 처리 시간이 길수록 모상근의 생장이 감소되는 추세를 보여주었다.

2) 혼합처리 효과 분석:

초 냉동 처리와 화학적 처리를 동시에 처리하였을 경우에는 형질전환 형질전환된 참깨 모상근의 cell line이 다양한 성장 반응을 보여 주었으며, 그 중에서도 4%의 DMSO에 30% 및 40%의 glycerol농도를 처리 한 처리 구에서 가장 활발한 biomass생장을 보여 주었다.

다. 형질전환 참깨 모상근의 배양기술 개발

▪ 형질전환 참깨 모상근의 플라스크 배양:

모상근의 배양에 필수적인 기초 배양조건에 관한 연구를 수행하기 첫 번째 단계인 플라스크에서 배양할 수 있는 배양기술을 확립하였다.

▪ 모상근 성장과 피타아제의 발현에 미치는 빛의 영향:

빛의 조건이 형질전환 참깨 모상근의 성장에 미치는 영향을 조사한 결과 지속적인 암의 조건이 형질전환 참깨 모상근의 성장과 재조합 곰팡이 피타아제의 발현에 가장 적합하다는 사실이 얻어졌다.

▪ 모상근 성장과 피타아제의 발현에 미치는 배양온도의 영향:

세 배양온도 (20℃, 26℃ 및 30℃) 조건에서 배양한 결과 형질전환 참깨 모상근의 성장에는 30℃의 배양온도가 가장 적합하다는 결과를 얻었으며, 재조합 곰팡이 피타아제의 발현은 26℃ 및 30℃에서 거의 유사한 발현을 보였다.

▪ 모상근 성장과 피타아제의 발현에 미치는 당 농도의 영향:

5 종의 당의 농도 (1%, 3%, 5%, 7% 및 9%) 중에서는 3%의 농도가 형질전환 참깨 모상근의 성장에 가장 적합하다는 사실이 입증되었지만, 모상근의 초기 생장은 7%와 9% 당의 농도가 오히려 모상근의 성장을 촉진시킨다는 사실도 밝혀졌다. 그러나 재조합 곰팡이 피타아제의 발현은 3%와 5%에서 가장 높은 발현율이 측정되었다.

▪ 형질전환 참깨 모상근의 성장과 피타아제의 발현에 미치는 배양배지의 영향:

4 종 (full-strength MS, half-strength MS, full-strength Gamborg B5, half-strength Gamborg B5)의 배지를 사용하여 참깨의 모상근을 배양한 결과는

형질전환 참깨 모상근의 생장을 위한 적정 배양배지는 full-strength MS 배지가 참깨 모상근의 배양에 가장 적합한 배지라는 실험적 결과를 이 실험으로부터 얻어졌다. 반면에, 재조합 곰팡이 피타아제의 발현은 full-strength MS 배지 이외의 배지에서는 피타아제의 발현이 거의 되지 않는다는 사실이 밝혀졌다. 따라서 재조합 곰팡이 피타아제에 의해서 형질전환된 참깨의 모상근의 배양으로 이 단백질 효소를 생산할 경우에는 full-strength MS 배지를 사용하여야 하며, 배양온도는 30 °C, sucrose 농도는 3-5% 그리고 암 조건에서 배양하는 곳이 가장 효율적 배양 방법이라는 결론이 얻어졌다.

- 형질전환 참깨 모상근의 생장과 재조합 곰팡이 피타아제의 발현에 미치는 유도 물질의 영향

1) Jasmonic acid 처리효과;

Jasmonic acid를 0.01 mM, 0.03 mM 및 0.05 mM 농도로 각각 처리한 결과 무처리 구와 약간의 차이만 보였으며, 재조합 곰팡이 피타아제의 발현에 별 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

2) PEG (polyethylene glycol 6000) 처리효과;

0.5 g/L, 1 g/L 및 1.5 g/L의 PEG 농도를 처리한 경우, 재조합 곰팡이 피타아제의 발현은 무 처리와 유사한 발현율을 보임으로서 PEG의 처리효과는 나타나지 않았다.

3) Silver nitrate 처리효과;

1 mM, 2 mM 및 3 mM silver nitrate를 처리한 경우에 배양초기의 발현율은 jasmonic acid와 PEG에 비해서 거의 두 배 정도로 발현율이 높았으나, 배양기간이 경과함에 따라서 발현율의 증가는 무 처리구와 유사한 발현 증가 속도를 보여 주었다.

4) KH₂PO₄ 처리효과;

인산을 21.25 mg/L, 42.5 mg/L, 85.0 mg/L, 170 mg/L 및 340 mg/L의 농도 별로 배지 용액을 만들어 배양한 결과, 85.0 mg/L 이상의 인산 농도에서 형질전환 참깨의 biomass 생장과 재조합 피타아제의 활성이 높았다.

5) SNP (sodium nitroprusside) 처리효과;

0.1 mM, 0.3 mM 0.6 mM의 SNP (sodium nitroprusside) 농도를 처리한 경우, 재조합 곰팡이 피타아제의 발현은 무 처리와 유사한 발현율을 보임으로서 SNP (sodium nitroprusside)의 처리효과는 크게 나타나지 않았다.

라. 본 연구의 결과물 중 일부 자료는 아래의 두 국제학술지에 발표

1. Expression and characterization of extracellular fungal phytase in transformed sesame hairy root cultures. 2004.
Protein Expression and Purification, 37: 486-492.
2. Sesame hairy root cultures for extra-cellular production of a recombinant fungal phytase. 2005. **Process Biochemistry, 40: 3754-3762.**

2. 활용에 대한 건의

본 연구과제에서 얻고자 한 연구개발은 크게 두 가지로 요약된다. 첫째는 재조합 곰팡이 피타아제를 곰팡이 배양으로 생산되는 시스템보다 효율적으로 피타아제를 생산할 수 있는 방법을 개발하기 위한 기초 자료를 제시하는 것이고, 둘째는 형질전환 모상근 배양시스템으로 재조합 단백질을 효율적으로 생산할 수 있는 모델시스템의 기술을 개발하고자 한 것이다. 따라서 본 연구 결과에 나타난 바와 같이 이 두 가지 연구 목적에 대한 기술 개발은 도출되었다고 사료되며, 도출된 자료들 중에서 활용할 수 있는 분야와 그에 대한 건의 사항은 다음과 같이 요약된다.

- 본 연구과제에서 수행된 재조합 곰팡이 피타아제의 생산시스템은 참깨 모상근의 플라스크 배양에서 도출된 기초자료에 불과한 연구 결과이다. 따라서 피타아제의 산업적 생산을 위해서는 대량배양이 가능한 배양 시스템의 연구개발이 요망된다.
- 본 과제에서 개발된 참깨 hairy root system은 다른 재조합 단백질의 산업적 생산을 위한 실용화에 활용 가능할 것이므로 고가의 재조합 단백질의 생산이 가능한 다양한 생산시스템을 가지는 모상근 배양시스템 특허가 가능할 수 있는 연구의 장려책이 요망된다.
- 본 연구 자료들이 관련된 기초학문 연구에 활용될 수 있도록 연구결과들을 유명 국제학술지에 투고하게 함으로서 이 분야의 학문에 대한 사회·문화적 중요성을 재인식시킬 수 있는 계기가 될 수 있도록 장려책이 요망된다.
- 끝으로, 본 연구과제에서 얻어진 연구 결과물들이 실용화가 되기 위해서는 대량 배양 시스템의 시설이 필요한 실정이지만 이러한 시설에 필요한 자금이 반영되는 연구비의 운영정책이 요망된다.

SUMMARY

I. Project title

"Development of sesame hairy root system for extra-cellular production of recombinant fungal phytase"

II. Research background

The hairy root system may be used as a potential system for both the characterization of recombinant proteins produced and the practical application to efficient production of valuable foreign proteins such as antibodies or other human proteins. In recent, a number of recombinant proteins have been produced in plant organs such as leaves, fruits, seeds, tubers or roots transformed with *Agrobacterium* harboring various useful protein sequences. However, because of relatively low yields of their products and laborious extraction and purification processes, their production systems are not cost-effective. To overcome these problems, some researchers have suggested a successful root system called rhizo-secretion to facilitate the release of recombinant proteins synthesized in the root tissues into liquid medium using ER (endoplasmic reticulum) signal sequence fused to the protein sequence. As a result, they have obtained much higher amounts of the recombinant proteins in the medium than in the root tissues. Our study is focused on production of fungal phytase, which is commercially important as a feed-supplement, using an expression construct

containing its sequences with a signal sequence leading to the secretion pathway. In this study, we have examined; 1) effects of some culture conditions on the expression of a recombinant fungal phytase and the biomass growth during the cultures of sesame hairy roots transformed with an *Agrobacterium rhizogenes* strain containing the phytase expression construct, whose products are assumed to be secreted into the medium, 2) biochemical characterization, isolation and purification of the recombinant phytase, and finally preservation of the selected hairy root cell lines and effect of elicitors on production of the phytase.

III. Research contents and scope of the project

Part I. Expression and characterization of recombinant fungal phytase in hairy root cultures

- Isolation and construction of the fungal phytase
- Identification of the fungal phytase insertion and expression
- Isolation and purification of the fungal phytase produced
- Biochemical characterization of the fungal phytase produced

Part II. Transformation of sesame tissues and preservation of the selected hairy root cell lines with higher phytase expression

- Transformation of sesame tissues with *Agrobacterium rhizogenes*
- Efficient transfer of the expression vector and selection of the

hairy root cell lines with higher phytase expression

- Identification of transformation efficiency and
- Preservation of hairy root cell lines

Part III. Development of a culture system for efficient production of recombinant fungal phytase

- Optimization for higher production of the recombinant fungal phytase in the transformed sesame hairy root cultures
- Effect of sucrose concentrations on sesame hairy root growth and the recombinant fungal phytase
- Effect of light conditions on sesame hairy root growth and the recombinant fungal phytase

IV. Summary of research results and propositions for their applications

1. Result summaries

1-1. Expression and characterization of recombinant fungal phytase in hairy root cultures

- Establishment of the recombinant fungal phytase expression cassette:

The phytase expression vector pMOG413, which contains a phytase expression cassette consisting of 35S promoter, RNA4 leader sequence,

tobacco PR-S signal peptide, phytase and Nos terminator, and the strain of *Agrobacterium rhizogenes* DC-AR2 were successfully established according to the general cloning methods.

- Pulsor-electroporation for transfer of the phytase expression vector into the *Agrobacterium* strain:

A fulsor-electroporation method for transfer of the phytase expression cassette into the *Agrobacterium* strain was established with a device by applying a pulse of 12.5 kV/cm with 25 μ F capacitor (Bio-Rad, USA).

- Analysis of genomic DNA:

Southern hybridization reveals that the insertion of the fungal phytase sequence into sesame hairy roots was successful. The primary results have provided us with two possibilities. One is that the strain of *Agrobacterium rhizogenes* DC-AR2 is useful as a mediator for transformation of sesame hairy roots and another is that heterologous recombinant phytase protein could be produced by cultures of the transformed sesame hairy roots.

- SDS-PAGE analysis:

To investigate molecular properties of the recombinant phytase, SDS-PAGE was performed. SDS-PAGE analysis revealed that not only the recombinant phytase protein was present in the liquid culture medium of the transformed sesame hairy roots but also one single band signal corresponding to approximately 90 kDa was observed in the gel after the

last purification step, indicating that the purified protein was homogeneous.

- Isolation and purification of the fungal phytase secreted into the culture medium:

The phytase enzyme secreted was purified by three steps of ultrafiltration, DEAE-Sepharose ion exchange chromatography and Sephadex G-100 size-exclusion chromatography. As a result, one single band signal was observed with SDS-PAGE, indicating that the purification step was reasonable.

- Analysis of production and expression pattern of the fungal phytase:

The phytase production was abruptly increased between 4- and 5-week culture periods and after 6 weeks of the cultures, the yield was decreased, indicating that the optimal culture period of the hairy roots for phytase production may be between 5- and 6-week cultures. The highest yield (0.51 U/ml) of the phytase was observed in 6-week cultures. This level of the phytase production was higher than those or comparable to those from other cultures including microbial production. No phytase transcript was found in control hairy roots, while different transcription levels were detected in the transformed hairy roots according to their culture periods. The transcription level of the phytase was rapidly increased after 4-week cultures, displaying that the expression pattern of the phytase coincided with its yield.

- Western blot analysis:

For identification of the phytase protein excreted into the cultured liquid medium, western blotting analysis was performed. This analysis exhibited the immunodetection result confirming the secretion of the fungal phytase protein into the culture medium. One interesting feature is that three signal bands were observed.

- Biochemical analysis of the fungal phytase produced:

For biochemical analysis of the fungal phytase secreted into the culture medium, periodic acid-Schiff (PAS) and zymogram staining were performed. The phosphatase activity of the purified phytase protein was positively determined in the gel with zymogram staining, implying that the enzyme was functional. The zymogram staining also displays a positive PAS staining in the gel, illustrating that the purified phytase protein was extensively glycosylated.

- Analysis of biochemical reaction kinetics of the fungal phytase:

The optimal temperature of reaction activity of the phytase was 50-60 °C, while 50 °C was optimal for native phytase (BASF). To verify thermostability of the recombinant phytase, both the purified phytase and native fungal phytase were pre-incubated at various temperatures from 20 °C to 90 °C at intervals of 10 °C. The activity responses of both phytases to the temperatures pre-exposed before the phytase reaction were nearly similar. When both the recombinant phytase and native phytase were pre-incubated at the temperatures higher than 50 °C, their catalytic activities

were gradually lost and at 90 °C almost completely inactivated.. At 60 °C of pre-incubation, however, the activity of native fungal phytase was decreased by 20% of the maximal activity. In contrast, the recombinant phytase activity revealed 30% reduction.

Various pH conditions were applied at a range of pH between 2.0 and 9.0 at interval of one pH unit to detect the activity of the recombinant phytase. As a result, two pH peaks were shown; one is at pH value of 2.0 with 65% of relative activity and another would be at 4.5 with approximately 98-100% activity and thus the optimal pH was between 4-5 pH values for the recombinant fungal phytase, while for native phytase it was at pH 5.0.

Various cations and reagents can stimulate or inhibit phytase activity. Accordingly, 8 cations, a reducing reagent DTT, a chelating reagent EDTA and a protease inhibitor PMSF were used to examine their effects on the recombinant fungal phytase. In general, there was no significant inhibitory effects on the recombinant phytase activity and no difference between the recombinant phytase and native phytase activity with the exception of Fe³⁺ cation. In contrast, some effectors such as Mg²⁺, DTT, EDTA and PMSF slightly stimulated the phytase activity, suggesting that these effectors may play a positive role in the enzymatic structure and activity.

1-2. Transformation of sesame tissues and preservation of the selected hairy root cell lines with higher phytase expression

- Sensitivity test for selection of transformed sesame hairy roots:

Kanamycin resistance was first tested with four different concentrations of 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 150 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for selection of transformed sesame hairy roots. At higher levels than 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$, any growth indication of sesame hairy roots transformed with no kanamycin resistance gene was not found, but at 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ the growth of the roots with the resistance gene was observed. These observations suggested that relatively lower levels of kanamycin are needed for selection of the transformed sesame hairy roots in comparison with other plant tissues. As a result, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of kanamycin was used for the selection of sesame hairy root transformants.

- Selection of sesame hairy roots with higher expression of the recombinant fungal phytase and analysis of transformants:

The hairy roots were initiated on the sites wounded with the needles immersed in the *Agrobacterium* cultures after 15-20 days of inoculation and the percent transformation reached 50-60% on the average. Southern hybridization revealed that the insertion of the fungal phytase sequence into sesame hairy roots was successful. A line of the hairy roots with the highest phytase expression was selected through a preliminary experiment and this line of the hairy roots was used in the subsequent experiments.

- Preservation of the hairy root cell lines:
 - A) Preservation by cryopreservation
 - B) Preservation by chemical treatment
 - 1) Effect of DMSO treatment
 - 2) Effect of glycerol treatment
 - C) Preservation by mixed treatments

1-3. Development of a culture system for efficient production of recombinant fungal phytase

- Effect of light condition on hairy root growth and phytase production:

Continuous light illumination had adverse influence on both the root biomass growth and phytase expression regardless of sugar levels. Furthermore, after about 10 days cultures, the continuous light resulted in no more root growth and thus no more increase in the phytase activity. These findings clearly indicated that the dark condition is highly favorable for both the growth of the transformed sesame hairy roots and production of the recombinant phytase protein, although it has been generally known that light illumination is more effective for hairy root cultures. The suppressive response of light during the cultures of the transgenic sesame hairy roots to their biomass growth may be due to a light-triggered inhibitory factor which blocks the hairy root growth, leading to low overall phytase accumulation in the cultures.

- Effect of culture temperature on hairy root growth and phytase production:

Our results demonstrated that culture temperatures had great influence on the transgenic sesame hairy root growth and the recombinant phytase expression. At 20 °C, any indications of the root growth and phytase expression were not determined. In contrast, the culture temperatures of 26 °C and 30 °C were effective for both the root biomass growth and phytase expression. Consequently, the results from 20 °C were omitted.

- Effect of sucrose concentrations on hairy root growth and phytase production:

To examine the optimal sucrose levels for sesame hairy root cultures and expression of the phytase sequence, 5 different sucrose concentrations (1%, 3%, 5%, 7% and 9%) were applied. Our results exhibited that different sucrose levels differently affected the root growth and phytase expression. At 26 °C, 5% sucrose was most optimal for both the ultimate root growth (18.7 g fresh weight/flask) and phytase expression (581.9 units/mL liquid medium), whereas at 30 °C, 3% and 5% sucrose levels were most optimal for the ultimate root growth (24.9 g fresh weight/flask) and for the ultimate phytase expression (510.1 units/mL liquid medium), respectively. Some other characteristic results were also found. One is that for the first 5-week cultures, the initial root growth and phytase expression were relatively faster in the cultures held at 30 °C than 26 °C on the whole, although there was little difference between the two cultures in the

final root growth and phytase production (Fig. 2 and Fig. 3). In particular, during the first 4-5 weeks cultures, the initial root growth and phytase expression were very low in the cultures held at 26 °C, whereas at 30 °C relatively greater growth and expression were found in the cultures supplemented with higher sucrose levels (7% and 9%). After 5-week cultures, relatively higher root growth and phytase expression were obtained at 30 °C than 26 °C on the whole. Another interesting finding is that 1% sucrose levels showed nearly no growth at both temperatures.

- Effect of culture medium on hairy root growth and phytase production:

Our results show that full-strength MS medium was most effective both for sesame hairy root growth and phytase expression but there was little difference between two sucrose levels of 3% and 5% under the same conditions. The final biomass growth was two-fold greater in full-strength MS (24.3 g fresh weight/flask on average) than other media (12.4 g/flask on average) irrespective of sucrose levels. In particular, the phytase expression was found almost exclusively in full-strength MS compared with that of other media.

- Comparison of increase rates in hairy root growth and phytase production:

The relative increase rates in the root biomass growth and phytase expression were compared at one-week intervals (except 0-2 weeks culture periods) using histograms. The highest rapid increase in the root biomass

growth (12.4 g fresh weight) occurred at the fourth week of the culture periods in the medium supplemented with 5% sucrose. After 4 weeks of the cultures, the increasing rates abruptly slowed down from approximately 70% to over 90%, indicating that the optimal culture periods for sesame hairy root growth are between the culture periods of 4 and 5 weeks. On the other hand, the most active expression rates of the phytase sequence (196 units/mL liquid medium) were examined at the same week of the culture periods as the root biomass growth but thereafter the increase rates began to decrease slowly, suggesting that the culture periods optimal for the recombinant phytase production in the flask cultures of the transgenic sesame hairy roots may be between 5- and 6-week culture periods. Two important features were observed. One thing is that the initial increase rates for 3-week cultures in both cases were relatively higher in MS medium with 5% than 3% sucrose. Another suggests that 5-6 week culture periods are optimal for the phytase production.

- Effect of elicitors on hairy root growth and phytase production:

At the concentrations of 0.01 mM, 0.03 mM or 0.05 mM jasmonic acid, there are no difference in the hairy root growth and the phytase production. Little effect of PEG (polyethylene glycol) treatment on both the hairy root growth and phytase expression was also observed. When silver nitrate (1, 2 or 3 mM) was added to the culture medium, the hairy root growth and the phytase activity were not affected by their treatments. Addition of SNP (sodium nitroprusside) into the culture medium showed a very sensitive response in the initial hairy root growth, but as the culture

period elapses no remarkable difference was found. In contrast, potassium phosphate (KH_2PO_4) had great influence on the hairy root growth. The optimum concentration of potassium phosphate for adequate root biomass growth was between 50 mg/L and 60 mg/L.

2. Propositions for applications of the research results

The purpose of this research project is based on two targets. One is to provide a basic principle for developing a cost-effective production system of the recombinant fungal phytase using sesame hairy root culture system. Another is to develop a model system of sesame hairy root cultures for production of high-value recombinant proteins. From this research project, we successfully obtained our research purpose and for further applications of the data acquired some propositions are requested as follows.

- Our production system is based on the flask culture system. Accordingly, further studies on a practical system for industrial-scale production of the recombinant phytase are requested.
- The sesame hairy root culture system developed in this research project is a unique technology for producing recombinant proteins. So, the further financial support are necessary not only for international patent but also for further development of this system.
- The results obtained from this research project are encouraged to be published for expansion of information about this production system.
- Finally, the end purpose of this research project is dependent on the development of mass production system of recombinant proteins. Accordingly, to accomplish this purpose, not only progressive developments of further advanced technology involved with the system are needed but also more research fund is requested for application to its practical uses.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	33
Section 1. Research background and objectives	33
1. Background of research	33
2. Objectives of research	34
Section 2. Contents and scope of research	35
1. The research goals	35
2. Experimental plan	37
Chapter 2. Current status of domestic and overseas technical information on the research	38
1. Current status of domestic technical information	38
2. Current status of overseas technical information	38
3. Problems and prospects	39
Chapter 3. Contents of the research and results	40
Section 1. Expression and characterization of extra-cellular recombinant fungal phytase	40
1. Constructs of the phytase expression cassette and pulsor- electroporation experiment	40
1) Contents and methods of experiment	40

2) Results	42
2. Analysis of the phytase expression	48
1) Contents and methods of experiment	48
2) Results	50
3. Biochemical analysis of the phytase	56
1) Contents and methods of experiment	56
2) Results	58
4. Analysis of biochemical reaction kinetics of the phytase	63
1) Contents and methods of experiment	63
2) Results	64
5. Summary	72
Section 2. Transformation of sesame tissues and preservation of the selected hairy root lines	73
1. Transformation of sesame tissues and sensitivity test for selection	73
1) Contents and methods of experiment	73
2) Results	75
2. Preservation of the selected hairy root lines	79
1) Contents and methods of experiment	79
2) Results	82
Section 3. Technical development of optimal conditions for sesame hairy root cultures	89

1. Effects of light on hairy root growth and phytase expression	89
1) Contents and methods of experiment	89
2) Results	90
2. Effects of culture temperature and sucrose concentration on hairy root growth and phytase expression	91
1) Contents and methods of experiment	91
2) Results	92
3. Effects of culture medium on hairy root growth and phytase expression	97
1) Contents and methods of experiment	97
2) Results	98
4. Effects of culture period on hairy root growth and phytase expression	101
1) Contents and methods of experiment	101
2) Results	102
5. Effects of elicitors on hairy root growth and phytase expression	106
1) Contents and methods of experiment	106
2) Results	107

Chapter 4. Research achievements and contribution · 122

Section 1. Research achievements	122
--	-----

Section 2. Contribution to the related studies	123
1. Expected impacts on technical development	123
2. Economical and industrial contribution	124
Chapter 5. Technical application	125
Chapter 6. Overseas technical information acquired in the course of the research	126
Chapter 7. Related references	127

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	33
제1절	연구개발의 목적과 필요성	33
1.	연구개발의 필요성	33
2.	연구개발의 목적	34
제2절	연구개발의 내용 및 범위	35
1.	연구개발의 최종 목표	35
2.	연차별 연구개발의 내용 및 범위	37
제 2 장	국내외 기술개발 현황	38
1.	국내의 기술개발 현황	38
2.	국외의 기술개발 현황	38
3.	문제점과 전망	39
제 3 장	연구개발 수행내용 및 결과	40
제1절	모상근 배양에 의하여 생산된 재조합 피타아제의 발현과 특성 분석	40
1.	피타아제의 발현카세트 구성 및 전기융합	40
가.	연구수행 내용 및 방법	40
나.	연구결과	42
2.	피타아제의 발현분석	48
가.	연구수행 내용 및 방법	48
나.	연구결과	50

3. 발현산물의 분리 정제 기술	56
가. 연구수행 내용 및 방법	56
나. 연구결과	58
4. 발현산물의 생화학적 반응 분석	63
가. 연구수행 내용 및 방법	63
나. 연구결과	64
5. 결과 요약	72
제2절 참깨조직의 형질전환과 형질전환 참깨 모상근의 장기보존 기술개발	73
1. 참깨 모상근의 형질전환과 선발	73
가. 연구수행 내용 및 방법	73
나. 연구결과	75
2. 형질전환 참깨 모상근 cell line의 장기보존	79
가. 연구수행 내용 및 방법	79
나. 연구결과	82
제3절 형질전환 참깨 모상근의 효율적 배양기술의 개발	89
1. 형질전환 참깨 모상근의 biomass생장과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산에 미치는 빛의 영향	89
가. 연구수행 내용 및 방법	89
나. 연구결과	90
2. 형질전환 참깨 모상근의 biomass생장과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산에 미치는 배양온도와 sucrose농도의 영향	91

가. 연구수행 내용 및 방법	91
나. 연구결과	92
3. 형질전환 참깨 모상근의 biomass생장과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산에 미치는 배지의 영향	97
가. 연구수행 내용 및 방법	97
나. 연구결과	98
4. 형질전환 참깨 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아 제 단백질의 생산에 미치는 배양기간의 영향	101
가. 연구수행 내용 및 방법	101
나. 연구결과	102
5. 형질전환 참깨 모상근의 biomass생장과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산에 미치는 유도제의 영향	106
가. 연구수행 내용 및 방법	106
나. 연구결과	107
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	122
제1절 목표 달성도	122
제2절 관련분야에의 기여도	123
1. 기술개발에의 기대효과	123
2. 경제 산업적 기대효과	124
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	125
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ...	126
제 7 장 참고문헌	127

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 목적과 필요성

1. 연구개발의 필요성

최근에 들어 단백질의 효율 가치가 높아짐에 따라서 단백질의 생산 효율성을 증진시킬 수 있는 단백질 생산시스템의 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 생명공학 기술의 발달로 인하여 부가 가치가 높은 재조합 단백질을 보다 경제적으로 생산하기 위한 재조합 단백질의 다양한 생산 시스템들이 보고되고 있지만 각각 장단점이 있기 때문에 생산된 재조합 단백질의 특성이나 생산물의 목적 및 경제성에 따라서 목적에 적합한 생산시스템이 개발되고 있다. 현재까지 가장 많이 개발된 생산시스템은 주로 미생물을 이용한 생산 시스템이지만, 근래에 들어 식물의 형질전환 hairy root system을 이용하여 재조합 단백질을 보다 효율적으로 생산하고자 하는 연구도 경쟁적으로 진행되고 있으며, 그 이유는 식물의 hairy root system은 다른 배양시스템 보다 여러 가지 장점을 가지고 있기 때문이다. 특히 hairy root system의 경우, 유전적 및 생화학적 변화가 거의 없이 지속적인 배양이 가능하여 단위시간 당 생산량이 상대적으로 높으며, 생성물의 분리정제가 비교적 수월하고, 상대적으로 저렴한 가격의 배지 사용이 가능하여 생산비 절감효과가 있을 뿐 아니라, 배양조건이 비교적 간단하여 상대적으로 적은 투자비용으로 생산시설이 가능하고, 형질전환 hairy root로부터 재분화가 가능하기 때문에 식물의 hairy root system은 재조합 단백질의 생산을 위한 응용연구 뿐 아니라 관련 분야의 기초연구를 위해서도 상당히 중요하다고 사료된다. 그러나 hairy root system에 의한 재조합 단백질의 생산기술에 관한 실용화 연구는 아직 초기 단계에 불과하지만 실험적으로는 실용화 가능성이 높은 것으로 증명되고 있으므로 본 연구 과제에서 이에 관한 연구를 수행하고자 한다. 식물의 hairy root system에 의한 재조합 단백질의 효율적 생산시스템의 개발을 위해서는 크게 여섯 가지의 기초기술이 요구되고 있다. 첫째는 재조합 단백질을 hairy root system에서 overexpression시킬 수 있는 promoter의 개발이고, 둘째는 발현 산물이 배양액 속으로 분비되는 분비시스템의 개발이 필요하며, 셋째는 생산된 재조합 단백질이 원래의 단백질과 동등하거나 그 이상의 활성과 기능이 유지되는 hairy root system의 개발이 요구된다. 넷째는 재조합 단백질의 생산과 분비를 촉진시키는 hairy roots의 배양기술이 개발되어야 할 것이며, 다섯째는 우수 hairy root cell line의 선발과 이들을 장기간 보존할 수 있는 효율적 보존기술의 개발이 요구되며, 마지막 여섯째는 생산된 재조

합 단백질을 효율적으로 분리 정제시키는 기술개발이 요구되므로 이에 관한 연구들이 본 과제에서 수행될 것이다.

본 연구계획에서 생산될 재조합 단백질은 *Aspergillus niger* 곰팡이 균에서 생산되는 피타아제 효소로서 이 효소의 유전자인 *phyA*를 hairy root의 발현시스템에 응용하여 이 재조합 단백질 효소를 효율적으로 생산하기 위한 원천기술을 얻고 자 하는 것이 이 과제의 주요 연구 목표이다. 피타아제는 6개의 인이 결합된 피틴염 (phytate)으로부터 인을 유리시키는 효소이며, 크게 두 가지 목적에서 사료첨가제로 사용되고 있다. 첫째는 축산 및 양식 어류의 분뇨에 많이 함유된 불용성 피틴태 인의 함량을 저하시켜서 이들의 분뇨배출로 인해서 생기는 환경오염을 예방할 수 있다는 이점이 있고, 둘째는 동물체내에서 피틴태 인을 가수분해시킴으로써 사료에 첨가되는 무기태 인의 첨가량을 낮출 수 있는 이점이 있을 뿐 아니라, 유기태 인의 이용성을 증가시키는 장점이 있기 때문에 산업적으로 아주 중요한 효소이다. 따라서 피타아제의 효율적 생산을 위한 다양한 연구가 계속 수행되어 왔으며, 현재 곰팡이나 세균으로부터 이 효소가 생산되어 시판되고 있지만 보다 생산효율이 높고 기능이 강화된 피타아제의 생산을 위해 많은 연구가 여전히 계속되고 있다. 최근에는 유전자 재조합 기술을 이용하여 피타아제를 생산하고자하는 기술이 선진국에서는 경쟁적으로 개발되고 있지만 hairy root system을 이용하여 피타아제를 생산하는 기술은 아직 보고된 적이 없다.

2. 연구개발의 목적

피타아제의 세계시장은 연간 약 5억불 정도로 추산되고 있으나(한국은 약 120-150억원/년), 피타아제에 의해서 부수적으로 생산되는 인의 이용율을 합치면 그보다 훨씬 높은 경제적 가치를 가지고 있는 것으로 믿어진다. 특히 단위가축이나 양식 어류의 분뇨에 의하여 생기는 환경오염을 감소 시키기 위해서 피타아제의 효용성이 중요시 될 뿐 아니라, 가축과 양식 어류의 사료성분에서 다량 요구되는 인의 활용 측면에서도 피타아제의 가치는 중요하다고 생각된다. 현재 가축 및 양식 어류의 사료에 피타아제를 첨가하는 경우 사료비가 약간 증가한다고 우려하고 있지만 최근의 연구결과들에 의하면 피타아제가 첨가된 사료에는 무기태 인을 첨가하지 않아도 가축의 발육에 전혀 지장을 받지 않는다는 사실이 확인되고 있기 때문에 오히려 사료비의 절감효과가 예상되고 있다. 현재 세계적인 기업에서는 기능이 강화된 피타아제의 개발과 더불어 생산비를 절감할 수 있는 생산 system의 기술개발을 경쟁적으로 서두르고 있는 실정이다. 앞으로 우리나라에서도 축산 및 양식 어류의 분뇨로 인하여 일어나는 환경오염을 예방하기 위하여 동물사료에 피타아제의 첨가를 법적으로 의무화한다면 피타아제의 수요는 급격히 증가할 것으로 예상되므로 국내 수요 뿐 아니라 국제경쟁

력을 확보하는 차원에서 피타아제의 생산기술의 개발은 중요하다고 판단된다. 앞에서 언급된 바와 같이 hairy root system을 통하여 곰팡이 피타아제의 생산이 가능해진다면 기존의 미생물 피타아제 생산비보다는 낮은 비용이 소요될 수 있을 것으로 추측된다. 그 이유로는 첫째, hairy root system은 지속적인 배양이 가능하여 단위시간당 생산량이 상대적으로 높을 것으로 예상되고, 둘째는 생성물의 분리정제가 비교적 수월하다는 점이고, 셋째는 배지의 성분으로 볼 때 상대적으로 저렴한 가격의 배지사용이 가능하여 생산비의 절감효과가 예상될 뿐 아니라, 배양조건이 비교적 간단하므로 적은 투자비용으로 생산시설을 설치할 수 있는 이점이 있다. 그러므로 여기서 얻어진 연구결과는 경쟁력 있는 피타아제의 생산을 위한 기초자료로 활용할 수 있을 뿐 아니라, 산업화가 가능할 수 있다는 점에서 산업적 파급효과가 높은 연구 과제라 여겨진다.

위에서도 언급된 바와 같이 유전자 재조합 단백질의 생산을 위한 식물의 hairy root system은 다른 생산 시스템에 비해서 여러 이점이 있기 때문에 피타아제의 생산뿐 아니라, 다른 재조합 단백질의 효율적 생산을 위해서도 이 시스템의 응용이 가능할 것이다. 특히 미생물 배양 시스템에서 생산이 불가능하거나 값비싼 동물 세포배양에 의한 재조합 단백질 생산시스템의 대체 시스템으로 활용 가능할 것으로 기대되는 중요한 연구 과제라 사료된다. 따라서 본 과제에서 제시된 hairy root system은 재조합 피타아제의 효율적 생산방법을 제시함으로써 경쟁력 있는 피타아제의 산업적 응용을 위한 기반기술로도 중요할 뿐 아니라, 다른 재조합 단백질의 효율적 생산에도 이 system이 크게 기여할 것으로 생각된다.

제2절 연구개발의 내용 및 범위

1. 연구개발의 최종 목표

앞에서도 언급된 바와 같이 phytase는 사료첨가제와 식품첨가제로서 현재 이용되고 있으며, 상품화되어 시판되고 있는 phytase도 있지만 phytase의 상품화가 경쟁력을 유지하기 위해서는 기능이 보강된 phytase의 개발과 더불어 보다 저렴한 가격의 phytase 생산 system의 개발이 중요한 관건이므로 본 연구과제에서 이러한 기술들을 개발하고자 한다. 이러한 개발목표를 달성하기 위하여, a) 곰팡이 phytase 유전자를 이용하여 모상균에서 이 유전자의 발현이 가능한 벡터의 합성을 시도하게 될 것이고, b) 참깨 모상균의 형질전환 기술을 확립할 뿐 아니라, c) 이 phytase유전자를 통하여 형질전환된 참깨 모상균의 배양조건을 확립함으로써 형질전환 참깨 모상균의 배양을

통하여 유용 단백질을 효율적으로 생산할 수 있는 모상근 배양system의 모델을 제시하게 될 것이다.

2. 연차별 연구개발 내용 및 범위

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2002- 2003)	<ul style="list-style-type: none"> · 곰팡이 phytase유전자의 발현 벡터의 제조 · 참깨모상근의 효율적 형질전환 기술확보 · 참깨모상근의 배양조건 기초자료 확보 	<ul style="list-style-type: none"> - 실험재료의 확보 - 벡터합성에 관한 실험수행 - Agrobacterium rhizogenes의 배양조건을 검토 - 모상근의 획득을 위한 기초실험실시 - 모상근 배양조건을 분석하여 모상근의 최적배양조건을 확립
2차년도 (2003- 2004)	<ul style="list-style-type: none"> · 발현 벡터에 의한 참깨 모상근의 형질전환체 확보 · 발현산물의 생산검증 시스템 확보 · 형질전환된 참깨 모상근의 배양조건 확립 	<ul style="list-style-type: none"> - phytase 유전자를 지닌 벡터를 사용하여 형질전환된 모상근을 유도하기 위한 형질전환체 배양방법의 모색 - 형질 전환된 모상근의 우수 cell line의 선발방법을 탐색한다. - 형질전환 모상근의 다양한 배양조건을 검토하여 최적배양조건을 확립한다. - phytase의 발현여부를 확인하기 위한 발현산물의 분석을 수행
3차년도 (2004- 2005)	<ul style="list-style-type: none"> · Phytase의 분리 정제 · 곰팡이 phytase 유전자의 고발현 모상근의 최적 배양기술 확립 · 고발현 형질전환 모상근의 보존 기술 개발 · 2차년도의 연구성과에 따라 대량배양 기술의 확보 	<ul style="list-style-type: none"> - 최종 생산된 phytase 효소의 분리, 정제 기술 확립 - 고발현 line의 확보 및 보존 방법 확립 - 고발현 배양기술의 확립 - 곰팡이 phytase의 대량 생산기술확보 - 대량 생물반응기의 기초 배양조건 확립

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내의 기술개발 현황

phytase의 생화학적 기능이 밝혀진 이래 이 효소의 상업적 이용을 위한 연구는 상당히 오래 전부터 진행되어 왔으며, 현재는 사료첨가제와 식품첨가제로서 허가되어 시판이 허용되고 있다. phytase가 상품으로서 명명되어 처음 시판된 상표명은 “Natuphos”로서 네델란드에서 개발되었으며 최근에는 보다 기능이 강화된 phytase를 개발하고자하는 연구와 더불어 그 효소를 효율적으로 생산하기 위한 연구가 활발히 전개되고 있는 실정이다. 따라서 phytase의 생산기술을 효율적으로 개발하기 위해서는 새로운 phytase의 개발과 생산 system의 개발이 동시에 고려되어야 할 것이다. 우리나라의 경우, 생명공학 연구소와 서울대학교, 중앙대학교 및 포항공대에서 피타아제에 관한 연구를 수행하고 있으며, 특히 생명공학 연구소에서는 토양세균인 *bacillus amyloliquefaciens*세균으로부터 강력한 피타아제 효과를 지닌 세균을 분리하는 데 성공한 바 있을 뿐 아니라, 이 균의 배양을 통하여 상업적 생산을 시도하여 현재 피타아제를 생산하고 있다.

2. 국외의 기술개발 현황

세계적인 화학회사인 BASF사와 Novo사에서 피타아제의 상업적 생산을 주도하고 있으며, 동물사료의 첨가되는 피타아제의 특성이 우수하거나 내열성이 강한 피타아제, 인산의 분해 능력이 우수한 피타아제 및 피타아제의 활성이 강한 균주의 개발, 그리고 피타아제의 생산가격을 절감시킬 수 있는 피타아제의 생산 공정 등에 관한 기술개발 연구가 경쟁적으로 수행되고 있다. 현재 동물사료의 효율성을 높이기 위해서 사료용 작물인 콩과 옥수수과 같은 사료작물에 직접 피타아제 유전자를 발현시켜서 피타아제의 이용 효율성을 증대시키기 위한 연구도 경쟁적으로 진행되고 있다. 식물 세포를 이용하여 피타아제를 생산하기 위한 연구도 콩과 옥수수 및 몇몇 사료작물에서 이미 보고된 적이 있으나, 식물의 모상근 배양을 통하여 피타아제를 생산하기 위한 연구는 국내외적으로 아직 발표된 바가 없으며 본 연구과제에서 처음으로 시도되고 있다.

3. 문제점과 전망

현재 Phytase 생산하는 시스템의 문제점으로는;

- 가능한 phytase의 가격을 낮추고 동시에 고효율의 phytase를 생산하기 위한 배양기술에 관한 기술 개발은 주로 곰팡이와 박테리아에 집중되어있으며,
- 특히 가격 경쟁력을 극복하기 위한 생산 system의 개발경쟁이 현재 한창이므로, 이러한 가격경쟁을 극복하기 위하여 다양한 배양 system이 개발되고 있으며, 그 한 가지 방법으로 형질전환된 효모의 배양을 통하여 phytase를 생산하고자하는 연구가 최근에 시도되고 있지만 아직 실용화에는 미치지 못하고 있다.
- 따라서, 보다 가격 경쟁력 있는 피타제의 효율적 생산시스템에 관한 기술개발이 요구되고 있다.

앞에서도 언급된 바와 같이 축산 및 양식어류의 분뇨에 의해서 일어나는 환경오염문제를 예방하기 위해서는 phytase를 사료에 첨가하는 것이 가장 효율적인 방법이라는 사실이 증명됨에 따라 우리나라에서도 phytase의 수요가 계속 증가 될 것으로 예상되지만 국내 생산 phytase는 수입 phytase에 비해 판매가격이 높기 때문에 가격 경쟁 면에서 불리한 위치에 있다. 현재 정확한 통계는 알 수 없으나 phytase의 국내 생산량은 연간 50 M/T정도이고, 수입 phytase는 연간 1400 M/T정도에 불과하지만 앞으로 수년 내에 국내소비량은 7000 M/T정도로 급속히 증가될 것으로 추정된다. 따라서 경쟁력 있는 phytase 생산기술을 개발하여 phytase의 국내수요증가에 대비해야 될 필요성이 제기 될 뿐 아니라 더 나아가서는 국내생산 phytase의 해외수출도 예상될 수 있다고 사료된다.

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제1절 모상근 배양에 의하여 생산된 재조합 피타아제의 발현과 특성 분석

1. 피타아제의 발현카세트 구성 및 전기융합

가. 연구수행 내용 및 방법

1) 연구내용:

크게 두 가지 실험내용으로 수행되었다. 첫째는 곰팡이 *Aspergillus*의 phytase 유전자를 클로닝하여 이 유전자의 발현 산물인 phytase 단백질이 배양액 속으로 분비될 수 있는 phytase 발현 cassette 를 합성하는 유전자 조작실험에 관한 실험내용이고, 둘째는 발현백터의 효율적 전이를 위한 관련 기초 실험들이 주로 수행되었다.

2) 연구방법:

수행된 실험방법들은 주로 분자생물학 및 관련 생화학적 연구방법들이 사용되었으며, 개략적인 실험 방법들은 다음과 같이 수행되었다.

가) 재조합 피타아제의 발현카세트 합성방법

Aspergillus phytase 유전자의 coding sequence를 얻기 위하여 PCR실험이 일반적인 방법으로 수행되었으며, 94 °C에서 2분간 사전 변성시킨 후, 95 °C 30초, 그리고 50 °C 에서 1분, 68 °C에서 2분간씩 45회 작동시킨 다음에 마지막으로 69 °C에서 10분간 방치하였다.

(1) 발현 백터 I의 합성:

발현 백터 I의 합성을 위해 우선 35S promoter에 AMV sequence를 연결하기 위하여 SphI과 BamHI 자리에 삽입한 후, XhoI 과 PstI 자리를 만들어서 이 자리에 곰팡이 phytase를 삽입하였으며, 합성에 관한 자세한 cassette 지도는 연구 수행내용 및 결과에 잘 설명되어 있다 (그림 1-1 참조). 그리고 전사종결은 Nos Terminator 에 연결하였으며, 그리고 곰팡이 phytase가 배양액 속으로 분비되는 것을 촉진시키기 위하여 알파파 모자이크 바이러스(AMV)의 RNA4 leader sequence와 phytase분비를 촉진하는 PR-S sequence가 35S promoter를 연결하여 발현cassette I이 제조되었다.

(2) 발현벡터 II 합성:

발현벡터 II의 합성을 위해서 먼저 pMOG413에서 합성되어있는 CaMV promoter-AMV RNA4 leader의 단편을 식물 벡터인 pCAMBIA1302에 연결하였으며, 이어서 legumin signal peptide sequence를 바로 연결하였다(그림 1-2 참조). 여기에 Aspergillus 피타아제 유전자의 signal peptide sequence를 제거한 피아제 coding region을 클로닝하여 pCAMBIA1302-I의 합성을 완성하였다.

(3) 발현벡터 III 합성:

발현벡터 III 역시 위와 동일한 방법으로 합성하였으나 발현벡터 II와 다른 점은 Aspergillus 피타아제 유전자의 signal peptide sequence를 제거하지 않고 피아제 coding region을 클로닝하여 pCAMBIA1302의 벡터에 연결하였다(그림 1-3 참조).

(4) 참깨 형질전환체의 효율적 선발을 위한 marker삽입:

형질전환된 참깨 모상근을 효율적으로 선발하기 위해서는 박테리아 neomycin phosphotransferaseIII 유전자를 삽입하였으며, 선발 농도에 적정 실험은 제2 세부과제에서 수행하였다.

나) Pulsor-electroporation 및 DNA 분리 방법

다른 세부과제와 협동과제에서 얻어진 모상근을 수확하여 DNA를 분리한 후 phytase유전자의 존재를 확인하기 위하여 Southern hybridization 실험들을 수행하여 이 발현 cassette가 참깨의 형질전환 모상근의 염색체내에 삽입되어 있다는 실험적 증거를 제시하였다.

(1) Electroporation을 이용한 Agrobacterium DC-AR2 transformation:

1. agrobacterium DC-AR2을 접종하여 OD₆₀₀에서 0.5-0.8정도의 농도로 배양한다.
2. 얼음에 20분 꽂아둔 후 5000rpm 4℃에서 10분간 원심 분리하여 집균 한 후 상등 액을 버린다.
3. 집균된 DC-AR2에 미리 차갑게 만든 10% glycerol 10ml를 넣어 균을 완전히 현탁 시킨 후 얼음에 10분간 꽂아둔다.
4. 5000rpm 4℃에서 10분간 원심분리하여 집균한 후 상등액을 버리고 다시 10% glycerol 10ml를 넣어 균을 완전히 현탁시킨 뒤 얼음에 10분간 꽂아둔다.
5. 위의 4번 과정을 두번 더 반복한 후 마지막에 10% glycerol 200ul에 녹인다.
6. 준비된 cell (DC-AR2) 100 ul와 DNA 3ul (1ug)을 Eletroporation cuvette(0.2cm)에 넣은 후 2.5 kV에서 3.8초 동안 전기충격을 가하여 DC-AR2를 형질전환 시킨다.

7. 전기충격을 가한 DC-AR2에 LB배지 200ul를 넣은 후 28℃ 교반 배양기에서 3 시간 동안 pre-culture한다.
8. 항생제 kanamycin(50ug/ml)을 함유한 LB 고체 배지에 도말한 후 28℃에서 2일간 배양한다.
9. LB 고체 배지에 나온 콜로니를 따서 LB액체배지에서 균을 배양한다.
10. 배양된 균에서 플라스미드를 분리하여 PCR을 이용하여 agrobacterium의 형질 전환 유무를 판단한다.

(2) 게놈 DNA 분리:

1. hairy root 100mg을 완전히 마쇄한다.
2. 200 μ l의 cell lysis solution을 넣고 다시 마쇄한다.
3. 200 μ l의 cell lysis solution을 다시 넣어준다.
4. 6M NaCl 300 μ l을 넣은 후 30초 동안 vortex한다.
5. 13000 rpm에서 20분 동안 원심분리 한다.
6. 상등 액을 취해서 새 튜브로 옮긴다.
7. Iso-propanol 700 μ l을 넣은 후 -20 °C에서 20분간 반응시킨다.
8. 13000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리 한다.
9. 70% ethaol로 washing한 후 dry-oven에서 건조시킨다.
10. 적당량의 3차 멸균수에 녹인 후 원심분리하고 상등 액을 취하여 사용한다.

(3) Southern 분석:

분리된 12 μ g의 게놈 DNA를 HindIII와 EcoRI의 제한효소로 반응시킨 후에 7% agarose 겔로 전기영동 한 다음, 분리된 DNA를 nylon membrane에 capillary transfer 방법으로 옮긴다. 이어서 이 DNA를 가진 nylon membrane을 UV로 cross-linking 시켜 DNA를 고정하여 건조시킨 후에 5 x SSC, 50% formaldehyde, 0.1% (w/v), N-lauroylsarcosine, 0.02% SDS 및 2% blocking reagent의 반응 액에서 42 °C에서 약 18 시간동안 반응시킨다. 이어서 1 x SSC와 0.1% SDS의 혼합 용액으로 세척한 후에, 다시 0.1% x SSC와 0.1% SDS의 혼합 용액으로 65 °C에서 세 번 세척하고 건조시킨 다음 X-ray 필름에 노출시킨다.

나. 연구결과

1) 3종의 발현백터 합성 완료 및 발현 검증:

곰팡이 Aspergillus phytase 유전자의 발현산물인 phytase 효소가 참깨의 형질전환 모상근의 배양에 의해서 배양액 속으로 분비가 가능할 것으로 추측되는 아래 3종의 발현 cassette의 합성을 성공적으로 마무리 하였다. 이 그림들에서 보여주는 바와 같이

이 발현카세트의 특징은 저장 단백질인 legumin 합성 유전자의 signal peptide가 연결되어 있다는 것이다. 이 signal peptide는 생산된 단백질을 세포 밖으로 분비하도록 유도하는 signal peptide로 추측되고 있지만 아직 실험적으로 검증된 바가 없기 때문에 이들 발현카세트의 발현 효율성을 서로 비교 검토한 결과에 의하면 legumin 합성 유전자의 signal peptide의 역할에 대한 효율성이 높게 나타나지 않았기 때문에 발현 카세트 I을 사용하여 곰팡이 재조합 발현 실험에 사용하였다.

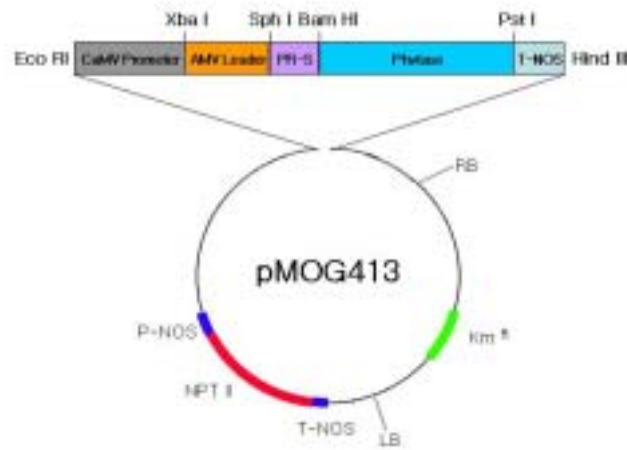


Fig. 1-1. Construct of phytase expression cassette I

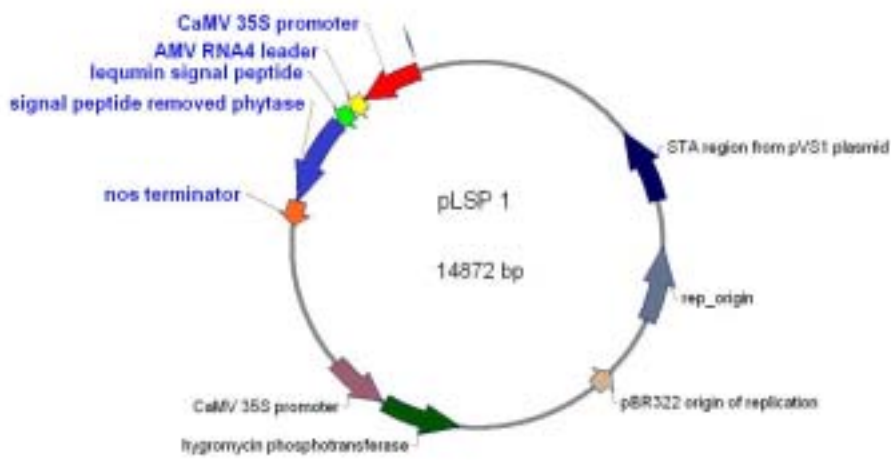


Fig. 1-2. Construct of phytase expression cassette II: Signal peptide is removed and mature fungal phytase is present.

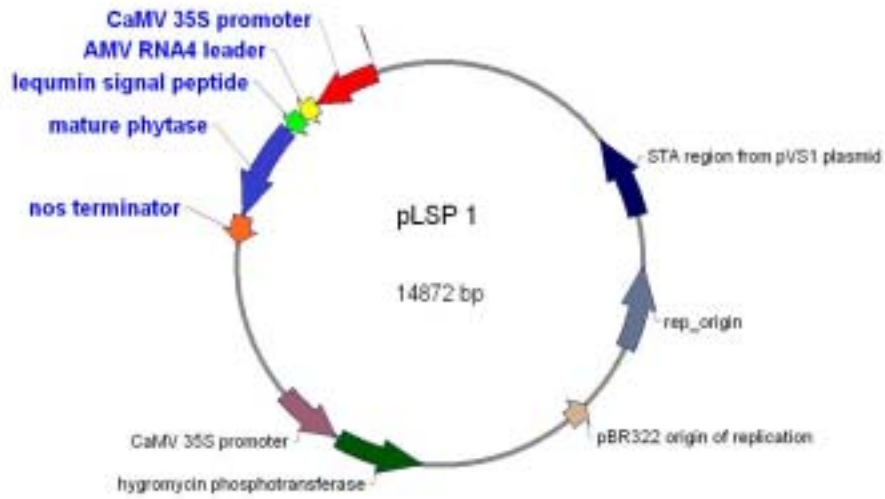
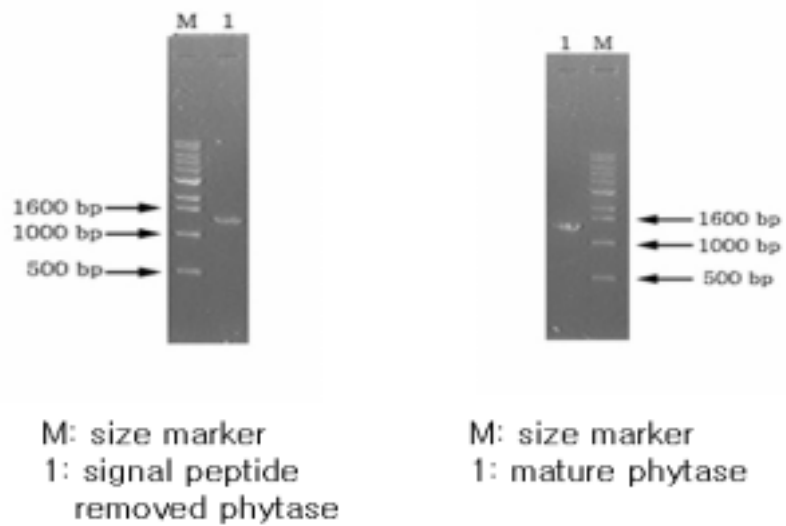


Fig. 1-3. Construct of phytase expression cassette II:
The full-length fungal phytase is present.



2) Pulsor-electroporation 결과:

합성된 피타아제 발현 cassette를 *Agrobacterium rhizogenes* DC-AR2 균에 형질전환시키는 전기융합 방법을 시도하여 이 균의 세포내로 이 발현 카세트가 성공적으로 전이된 실험적 증거를 확보하였다 (아래 그림 1-4 참조).



Fig. 1-4. Analysis of colony lift hybridization for identifying the presence of the fungal phytase expression cassette by transformation of *Agrobacterium*

3) 선발된 모상근 cell line의 확인실험 결과:

형질전환된 참깨 모상근의 확인을 위해 각각의 형질전환체를 수확하여 original fungal phytase 유전자를 probe로 하여 Southern hybridization 실험을 실시한 결과, 그림 1-5에서와 같이 pMOG413 plasmid의 재조합 곱팡이 피타아제 발현카세트가 참깨 모상근에 성공적으로 전이되었다는 결과를 얻었다.

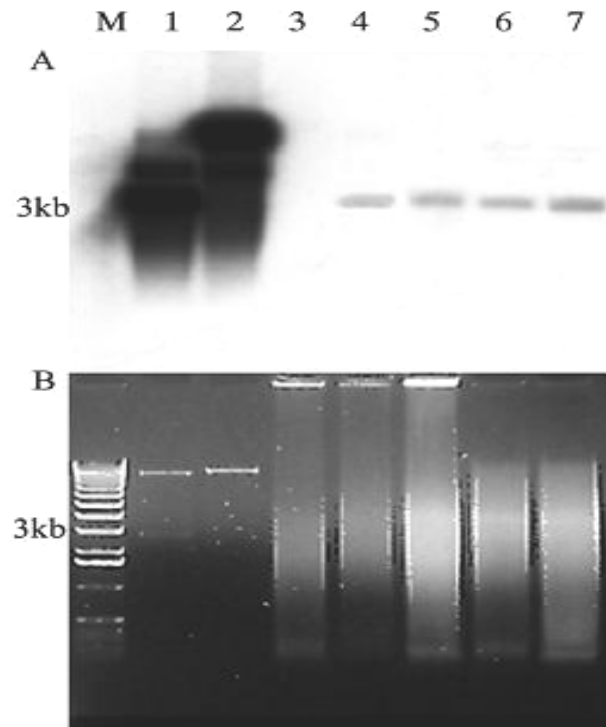


Fig. 1-5. Southern hybridization (A) and gel analysis (B) of genomic DNA from transformed sesame hairy roots. M, marker DNA; lane 1, *Hind*III/*Eco*RI double-digested vector DNA (a very faint phytase DNA band is seen around 3 kb); lane 2, *Eco*RI digested linear vector DNA containing phytase gene; lane 3, sesame hairy root genome DNA transformed with no phytase; lanes 4-7, sesame hairy root genomic DNA transformed with phytase gene.

2. 피타아제의 발현분석

가. 연구수행 내용 및 방법

1) 연구내용:

제조함 곰팡이 피타아제로 형질전환된 참깨 모상근이 효율적으로 발현하는 과정을 검정하기 위하여 배양액 속의 단백질과 모상근에서 발현되는 피타아제를 비교 검토하였으며, 이와 관련된 연구가 수행되었다. 이를 위해서 피타아제의 발현이 가장 활발한 발현카세트 I을 사용하여 생산된 단백질의 분석에 필요한 실험, 그리고 제조함 피타아제의 발현 양상을 검정하기 위한 실험, 그 외에 피타아제의 발현을 실험적으로 확인하기 위한 연구가 수행되었으며, 구체적인 수행 방법은 다음과 같다.

2) 연구방법:

가) 단백질 분리 및 SDS-PAGE 방법

배양액에 분비된 단백질을 분리하기 위하여 배양액 10 ml를 3980 x g의 속도로 42 °C에서 30분간의 원심분리를 한 후에 상등 액을 세 겹의 나일론 망에 여과시킨다. 여과된 액을 탈염과정을 거쳐서 ultrafiltration device system으로 단백질을 농축하여 Bradford dye-binding 방법으로 단백질의 양을 측정하였으며, 피타아제의 분리 정제를 위한 시료로 이용하였다.

참깨 모상근의 체내에 함유된 단백질을 분석하기 위하여 4 g의 모상근을 사용하였으며, 먼저 모상근을 액체질소에 담아서 분말로 빻은 후에 단백질 추출액 [100 mM sodium acetate (pH 5.5), 20 mM calcium chloride, 1 mM dithiothreitol (DTT) 및 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)]을 사용하여 단백질을 추출한 다음, 위에서와 동일한 방법으로 단백질을 농축하여 단백질의 분석에 사용하였다.

분리된 단백질의 SDS-PAGE 겔 분석을 위하여 3 µg의 분리된 단백질을 Bio-Rad mini-gel system에 loading하였으며, 4%와 10%의 acrylamide의 stacking 겔에서 단백질을 분리한 후에 Coomassie brilliant blue G-20를 사용하여 단백질의 존재를 확인하였다.

나) Western blot 방법

각 3 µg의 단백질을 10% acrylamid gel에서 SDS-PAGE 후 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (Boehringer Mannheim GmbH, Germany)에 transfer 시켰다. 그런 후 membrane을 0.5% Tween-20, 5% nonfat milk를 함유한 PBS (phosphate buffered saline)로 1시간동안 blocking시킨다. 부경대학교 000로부터 제공받은 fungal phytase에 대한 항체, rabbit IgG를 위의 blocking solution에 1:200배 희석하여 2시간동안 membrane에 반응시킨다. 0.5% Tween-20을 함유한 PBS로

membrane을 20분 간 2번 washing한 후 secondary antibody로써 goat에서 생산된 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG를 위의 blocking solution에 1:10000배 희석하여 2시간 반응시킨다. 0.5% Tween-20을 함유한 PBS로 membrane을 20분 간 2번 washing한 후 ECL (enhanced chemiluminescence) reagent (Amersham Biosciences, UK)를 이용하여 X-ray film 상에서 signal band를 검출하였다.

다) 피타아제의 발현양상을 분석하기 위한 northern blot 방법

배양 2-8주 지난 각각의 hairy root조직을 2 g씩 액체질소에 급냉한 후에, mortar에서 마쇄한다. 이어서 Concert Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen, USA)를 이용하여 manufacturers manual대로 RNA를 분리한 다음, 정량하여 모상근의 배양시기 별로 각각 20 ug의 RNA를 전기영동 하였다. 전기영동 후 Hybond-N nylon membrane (Amersham Bioscience, UK)에 transfer 하였으며, UV cross-linking 후 사용하였다. Northern blotting에 사용한 모든 용기와 시약은 고온건조 멸균 및 DEPC처리 후 사용하였다. probe는 pMOG413 vector에 삽입되어 있는 phytase gene ORF 부분을 PCR로 증폭하여 정제 후 사용하였으며, hybridization buffer는 PIPES buffer (2X PIPES buffer (pH 6.5), 50% formamide, 1% SDS, 2X blocking reagent)를 사용하였다. 준비된 membrane을 42 °C에서 2시간 prehybridization 시킨 후에 Rediprime II Random Prime Labelling System (Amersham Bioscience, UK)을 이용하여 ³²P-dCTP로 labelling된 probe를 동일 buffer에 섞어 42 °C에서 18시간 hybridization 시켰다. Hybridization 후 membrane을 2 x SSC와 0.1% SDS의 혼합 용액에 실온에서 20분간 washing한 후, 0.2 x SSC와 0.1% SDS 혼합 용액에 65 °C에서 30분간 추가로 washing하였다. washing한 membrane은 X-ray film을 이용하여 band signal이 검출되었다.

라) 피타아제의 활성 측정방법

효소 액 50 ul와 0.1 M citrate buffer (pH 5.5)에 녹인 5 mM sodium phytate 450 ul를 섞은 후에 37 °C에서 30분 간 반응시킨다. 반응 후 15% trichloroacetic acid 500 ul를 넣어 반응을 종결시킨다. 6 N H₂SO₄, 2.5% ammonium molybdate, 10% ascorbic acid, H₂O를 각각 1:1:1:2의 부피 비율로 혼합한 발색시약 4 ml를 넣고 섞은 다음, 50 °C에서 20분 간 발색시킨다. 20분 후 실온에서 식힌 후 820 nm에서 흡광도를 측정한다.

나. 연구결과

1) 재조합 피타아제 단백질 분석결과

재조합 피타아제 발현 cassette I이 함께 모상근에 전이된 후에 선발과정을 통하여 수집된 형질전환 모상근을 배양하여 재조합 피타아제 단백질이 생산된 사실을 확인하기 위하여 배양액과 모상근으로부터 분리된 단백질을 SDS-PAGE 분석을 통하여 재조합 곰팡이 피타아제의 발현이 가능하다는 사실을 아래 그림 1-6에서 확인하게 되었다. 그림에서 나타난 바와 같이 함께 모상근의 체내에서 발현된 곰팡이 재조합 피타아제는 모상근 체내 뿐 아니라 배양액 속에서도 존재하고 있다는 사실을 보여주고 있다. 따라서 이 실험적 결과에 의하면 발현벡터에 존재하는 단백질의 분비유도 signal sequence는 피타아제를 배양액 속으로 완전히 분비시키지 못한다는 사실을 말해주고 있으며, 이러한 이유에 대한 합리적인 설명을 위해서는 보다 깊은 연구가 필요하다고 사료된다.

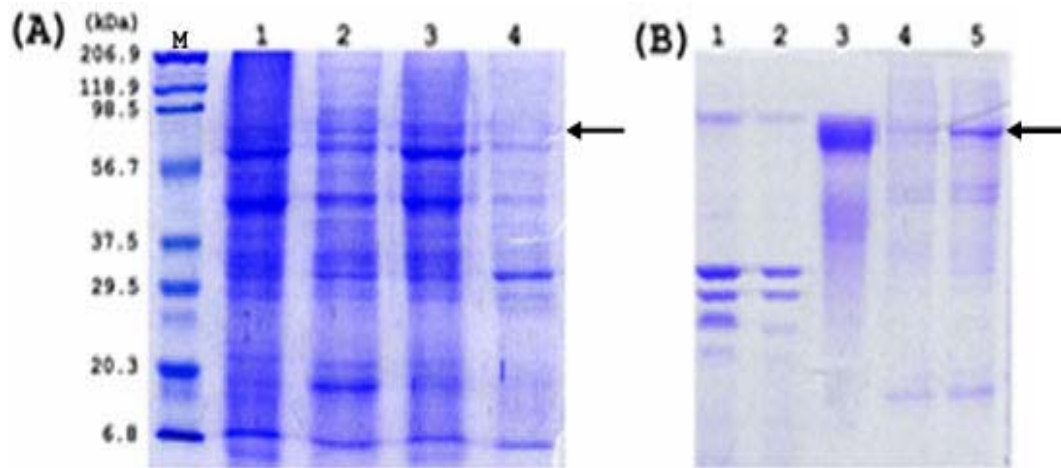


Fig. 1-6. Analysis of SDS-PAGE of proteins secreted into the culture medium by the transformed and untransformed hairy roots:
 (A); Untransformed hairy roots, B; The presence of the recombinant fungal phytase protein secreted into the culture medium of transformed hairy roots.

2) 재조합 피타아제의 발현양상 분석결과

재조합 곰팡이 피타아제가 효율적으로 발현함과 동시에 배양액 속으로 분비가 잘 되는 피타아제 발현카세트 I을 사용하여 생산된 재조합 곰팡이 피타아제가 어떻게 발현되고 있는지를 분석하기 위하여 각 배양기간 별로 RNA를 분리하여 northern hybridization 실험으로 이 발현카세트의 발현양상을 분석하였으며, 그 결과는 그림 1-7A와 1-7B에서 잘 설명된다. 이 그림 1-7A에 의하면 control hairy root에서는 피타아제의 발현물이 측정되지 않았다는 사실을 보여주고 있으며, 형질전환된 hairy root에서는 배양 2주째부터 피타아제의 발현이 이루어지고 있다는 사실이 증명되었으며, 특이한 것은 배양 4주째 이후부터 피타아제의 발현이 강하게 나타나고 있다는 실험 결과를 얻을 수 있었다. 그러나 배양 6주 이후에는 발현량이 상당히 감소되었으며 이러한 실험결과를 토대로 하여 볼 때 형질전환 hairy root의 효율적 배양을 위해서는 6주의 배양 이후부터는 배양액의 교환이 이루어져야 할 것으로 사료되었다.

그림 1-7B는 피타아제의 형질전환 hairy root의 발현산물인 피타아제의 생산양상을 보여주고 있다. 이 그림에 의하면 control hairy root에는 전혀 발현산물이 측정되지 않았음을 보여주었다. 그러나 형질전환된 hairy root에서는 배양 2주째부터 발현산물인 피타아제의 활성이 아주 약하게 나타나기 시작하여 배양 6주에서 가장 높은 피타아제의 활성이 강하게 측정되었다. 이러한 사실은 그림 1-7A에서의 발현물의 발현양상과 발현산물의 생산양상과 거의 유사한 경향을 보여주고 있는 것으로 보아 이 발현시스템은 상당히 효율적인 생산시스템으로 판단되었으며, 앞으로 재조합 단백질의 생산시스템으로 상당히 활용성이 있을 것으로 추정되었다.

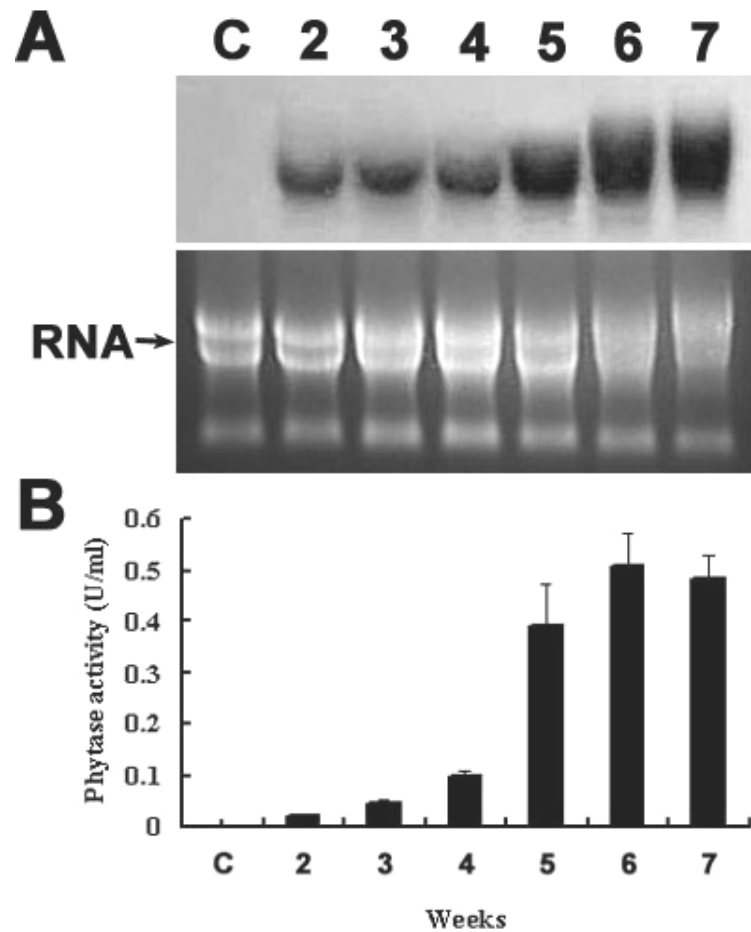


Fig. 1-7. Southern hybridization (A) and gel analysis (B) of genomic DNA from transformed sesame hairy roots. M, marker DNA; lane 1, *Hind*III/*Eco*RI double-digested vector DNA (a very faint phytase DNA band is seen around 3 kb) lane 2, *Eco*RI digested linear vector DNA containing phytase gene lane 3, sesame hairy root genome DNA transformed with no phytase lanes 4-7, sesame hairy root genomic DNA transformed with phytase gene.

3) Western blot 분석결과

재조합 곰팡이 피타아제에 의하여 형질전환된 hairy root에서 생산된 피타아제가 배양액 속으로 분비된 단백질 내에 존재하는지를 확인하기 위하여 immunodetection 분석이 수행되었으며, 그 결과는 그림 1-8의 (A)와 (B)에서 잘 보여주고 있다. 이 그림에서 보여주고 있는 바와 같이 재조합 곰팡이 피타아제는 충분히 발현되어 그 생산물인 피타아제가 배양액 속으로 분비되었다는 실험적 증거가 이 그림에 잘 나타나 있다. 그러나 발현된 곰팡이 피타아제가 완전히 배양액 속으로 분되지 않고 hairy root의 체내에 일부분 남아 있다는 사실도 이 그림 1-8의 (B)에서 보여주고 있다. 그림 상에는 한 종류의 크기가 아닌 세 종류의 크기 (80 kD, 60 kD, 47 kD)를 가진 밴드가 나타나 있으며, 이 중 80 kD의 단백질이 원래의 native fungal 피타아제인 것으로 추정되고, 60 kD 단백질은 아마도 glycosylation이 되지 않은 피타아제로 추정되었으며, 나머지 47 kD의 단백질 밴드는 발현 도중에 부분적으로 합성된 불완전한 피타아제로 추측되었으며, 이러한 실험적 결과는 다른 실험자들의 실험결과에서도 흔히 보고되는 연구결과와 일치하였다.

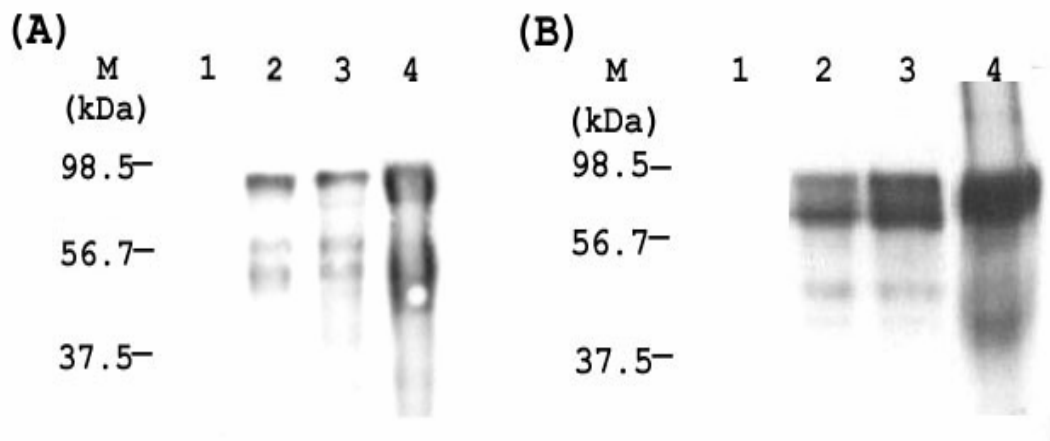


Fig. 1-8. Western blot analysis of the recombinant phytase secreted into liquid MS medium and retained in the root tissues. M, molecular weight marker; lane 1, control with no phytase gene; lanes 2 and 3, 5- and 6-week cultured liquid medium (A) and root tissues (B), respectively; lane 4, the commercial *Aspergillus* phytase (BASF Corporation). Ten L of the cultured liquid medium and 3 g of total protein from the root tissues were applied to electrophoresis and transferred to a membrane. The membrane was then washed and antibody binding detected as described in materials and methods.

3. 발현산물의 분리 정제 기술

가. 연구수행 내용 및 방법

1) 연구내용:

제조합 곰팡이 피타아제로 형질전환된 참깨 모상근의 배양으로 생산된 피타아제 효소를 배양액 속에 분비된 단백질로부터 효율적으로 분리 정제하는 방법을 탐색하기 위하여 다양한 단백질 분리 정제 기술들이 이용되었다. 이용된 주요 분리 정제 기술들은 ultrafiltration, DEAE-sepharose chromatography, sephadex G-100 chromatography 방법 등의 단백질의 분리 정제에 관련된 실험 뿐 아니라, 피타아제의 활성 측정을 위한 기초 기술에 관한 실험들이 수행되었다. 그리고 분리 정제된 피타아제를 SDS-PAGE분석, activity staining and Periodic-Acid-Schiff (PAS) staining 방법을 통하여 생산된 피타아제의 단백질 특성을 분석한 실험들이 주요 연구내용들이며 연구 방법은 다음과 같다.

2) 연구방법:

가) 피타아제 분리 정제 방법

Hairy root 배양액 150 ml을 원심분리하여 불용성 물질을 제거 한 후 ultrafiltration system (YM-10 membrane, Millipore)을 이용하여 농축하였다. 최종 3 ml로 농축한 배양액을 PD-10 desalting column (Amersham Bioscience, UK)을 이용해 탈염하였다. 탈염한 단백질을 시료를 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer로 preequilibration 시킨 3 ml DEAE-Sepharose (AB)로 packed된 column (2 cm x 15 cm)에 통과시킨 후 5 ml 동일 buffer로 세 번 세척하였다. Sepharose에 결합되어 있는 단백질을 분리시키기 위하여 분당 0.5 ml의 속도로 10 ml elution buffer (20 mM Tris-HCl)를 사용하여 NaCl을 0-0.5 M 농도의 기울기로 첨가하여 전개 (elution) 하여 500 ul씩 20개의 eppendorf tube에 elution시켜다. 이 중에서 phytase activity가 나타나는 분획 (약 0.15-0.20 M NaCl)을 모아서 다음 단계의 정제에 사용하였다. 이어서 분획된 시료를 모아서 Amicon Ultra-4 centrifugal filter devices (10 kD cutoff, Millipore)로 탈염시킨 다음 농축한 샘플을 0.1 M citrate buffer (pH. 5.5)로 미리 준비된 7 ml Sephadex G-100 resin으로 packed된 column (0.7 cm x 30 cm)에 loading 한 후에 분당 0.5 ml 속도로 8 ml 0.1 M citrate buffer (pH. 5.5)를 사용하여 분자량 크기별로 단백질을 분리하였다. 각 tube 당 500 ul 씩 10개의 eppendorf tube에 각각 모아 각 tube의 단백질 농도와 phytase activity를 측정하여 activity가 높게 나타나는 분획을 모아서 다음단계의 실험에 사용하였다.

나) 단백질 측정 및 SDS-PAGE

분리된 단백질의 양을 측정하기 위하여 protein-dye binding 방법이 사용되었고, 시중에서 판매되는 Bio-Rad 회사의 protein assay kit를 구입하여 단백질을 측정하였다.

분리된 단백질의 겔 분석을 위하여 total protein 3 μg 을 Bio-Rad mini-gel system으로 분리하였으며, 4% stacking과 10% acrylamide로 준비된 겔로 전기영동한 후에 Coomassie brilliant blue G-250으로 염색하여 SDS-PAGE 분석실험이 수행되었다.

다) Zymogram staining 실험

정제된 피타아제를 SDS-PAGE gel 상에서 phytase activity를 확인하기 위하여 zymogram staining 실험 방법을 이용하였다. 먼저 전기영동은 위에서 언급된 standard procedure 방법으로 수행한 후에, 전기영동된 gel을 25% isopropanol가 첨가된 0.1 M citrate (pH 5.5) buffer에서 30분 간 담가 천천히 흔드는 과정을 두 번 반복하여 겔을 세척한다. 그런 후 isopropanol을 넣지 않은 0.1 M citrate (pH 5.5) buffer에서 30분 간 천천히 흔들면서 두 번 세척한 다음, gel을 staining solution [0.2% α -naphthylphosphate, 0.1% Fast Garnet GBC salts, 1 mM Na-phytate, 0.1 M citrate buffer (pH 5.5)]에 담가 37도에서 30분 간 반응시킨다. 진한 갈색의 밴드가 생기면 water로 washing한다.

라) Periodic acid-Schiff (PAS) staining 실험

겔 상에서 생산된 phytase의 glycosylation 유무를 확인하기 위하여 PAS (periodic acid-schiff) staining을 실시하였다. 먼저 정제된 phytase 단백질을 SDS-PAGE로 전기영동을 수행한 후 전기영동된 겔을 50% (v/v) methanol에서 약간의 진동을 유지하면서 overnight으로 겔을 고정시킨다. 겔 고정이 끝난 후에 증류수에 겔을 20분 간 세척한 후에 2분 간씩 두 번 더 증류수로 겔을 세척한다. 세척된 겔을 2% periodic acid (w/v) 용액에 15분 간 담근 다음 증류수로 2분 간 세척을 2회 반복한 후에 Schiff reagent (Sigma)에 담가 약한 진동을 유지하여 겔의 색깔이 선홍색으로 염색될 때까지 반응시킨다. 겔이 염색된 다음 증류수로 2분 간 2회 세척하고, 이어서 2% (w/v) sodium metabisulfite에 6시간-overnight 동안 담가 염색된 겔이 충분히 환원될 때까지 담가둔다.

나. 연구결과

1) 생산된 재조합 피타아제 단백질의 분리 정제 분석결과

재조합 피타아제 발현 cassette I이 함께 모상근에 전이된 후에 선발과정을 통하여 얻어진 형질전환 hairy root의 배양액으로 분리된 total 단백질로부터 곰팡이 피타아제 단백질을 네 단계의 분리 정제과정을 거쳐서 재조합 피타아제를 분리 정제하였으며, 전체적인 분석결과의 요약은 Table 1에 잘 나타나 있다.

Table 1-1

Purification of the recombinant phytase secreted into liquid culture medium of sesame hairy roots

Step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Culture supernatant	150	0.9	32	36	1	100
Ultrafiltration	5	0.69	50	72	2	156
DEAE-Sepharose	3	0.45	38	85	2.4	118
Sephadex G-100	1	0.22	21	97	2.7	66

위의 Table 1-1에서 보여주는 바와 같이 첫 번째 단계에서는 배양액 150 ml을 원심 분리 과정을 거쳐서 얻어진 crude protein 150 ml에 존재하는 피타아제의 total activity는 32 units, specific activity는 36 U/mg protein으로 측정되었다. 두 번째 단계인 dialysis, desalting 및 ultrafiltration과정을 거쳐서 얻어진 단백질에서 측정된 피타아제의 total activity는 50 units 였고, specific activity는 72 U/mg protein으로 측정되었으며, 단백질의 회수율은 156%였다. 세 번째 정제 단계에서는 DEAE-Sepharose ion exchange chromatography정제 과정을 거쳐서 얻어진 피아아제의 total activity 는 38 units, specific activity는 85 U/mg protein이었고, 단백질의 회수율은 118% 이었다. 마지막 단계인 Sephadex G-100 gel filtration chromatography 과정을 거쳐 얻어진 단백질에서는 피타아제의 total activity는 21 units, specific activity는 97 U/mg protein으로 측정되었으며, 단백질의 회수율은 118%로 나타났다. 따라서 분리 정제된 재조합 곰팡이 피타아제에 대한 이러한 양적 분석결과에서 얻어진 결론은 크게 두 가지로 요약된다. 첫 번째는 culture supernatant (첫 번째 정제과

정)에서 측정된 피타아제의 total activity가 ultrafiltration (두 번째 정제) 단계에서 보다 높게 나타났다는 점이다. 일반적인 단백질 정제과정에서는 정제과정이 거듭 될수록 total activity의 수치가 감소되는 경향이 지배적인 데 반하여 본 실험결과에서는 반대의 측정치가 측정되었다는 점이 특이하였다. 이러한 결과는 아마도 피타아제의 경우, 측정할 때 배양액 속에 어떤 저해제가 존재하거나 아니면 배양액 속에 함유된 inorganic orthophosphate와 같은 물질로 인하여 측정에 방해요인으로 작용했을 가능성이 때문인 것으로 추정되었다. 또 다른 특이한 사실은 각 정제단계의 단백질의 회수율을 비교해 볼 때 회수율의 절대적 수치가 비교적 낮게 측정되었다는 사실이며, 이러한 측정 결과는 상대적으로 소량의 단백질이 배양액 속으로 분비되고 있다는 간접적인 실험 증거로서 제시되었으며, 이 결과는 형질전환 시스템에서 재조합 피타아제 단백질을 효소를 분리 정제할 경우에는 상당히 효율적일 것이라는 사실을 암시해주고 있는 것으로 사료되었다.

분리 정제된 재조합 피타아제의 확인을 위해 먼저 SDS-PAGE 분석을 수행하여 피타아제의 크기를 확인하였다 (그림 1-9). 이어서 전기영동된 acrylamide gel을 이용하여 얻어진 단백질 분석 자료를 이용하여 western blotting 실험과정의 immunodetection을 통하여 이 단백질이 재조합 곰팡이 피타아제임이 확인되었다. 이 실험결과에 의해서 이 피타아제 효소 단백질은 hairy root체내에서 합성된 단백질이 hairy root체외로 분비되고 있다는 사실도 위의 실험에서와 같이 증명되었다.

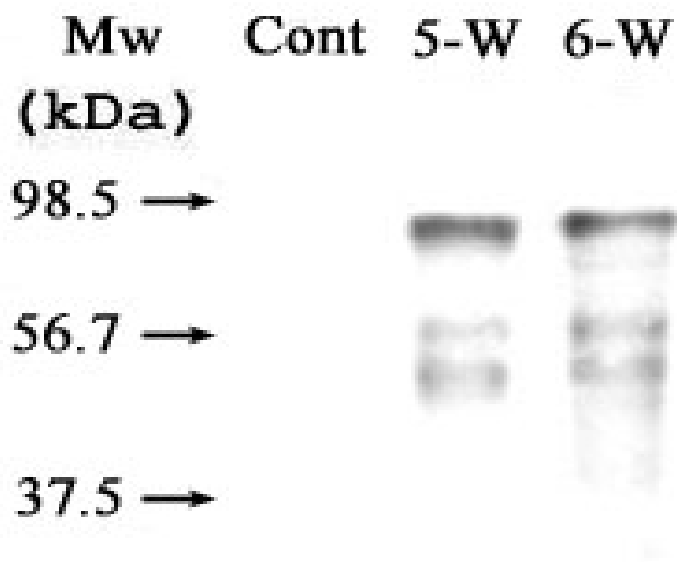


Fig. 1-9. Western blot analysis of the recombinant phytase secreted into liquid MS medium. Mw molecular weight marker, cont; control with no phytase gene, 5-W and 6-W the secreted phytase protein cultured for 5 and 6 weeks, respectively.

2) Zymogram 및 PAS (periodic-acid Schiff staining) 실험결과

분리 정제된 분비 재조합 곰팡이 피타아제의 분자 및 생화학적 특성을 조사하기 위하여 각 단계별로 분리 정제된 재조합 단백질 피타아제를 분석하였으며 그 결과는 그림 1-10에 잘 설명되어 있다. 먼저 각 단계별 정제된 단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과에 의하면 (그림 1-10A) 배양액 속의 crude extract에 함유된 피타아제의 존재가 분명히 보였으며 (90 kD), DEAE-Sepharose에 의한 정제단계에서도 피타아제의 존재가 확인되었으나 band의 선명도가 훨씬 감소하였고, Sephadex gel filtration의 정제 단계 후에는 band의 선명도는 아주 감소하였음을 보여주었지만 단 하나의 band만이 겔상에 보여주었다. 이 결과로 판단하여 볼 때 분리 정제된 재조합 곰팡이 피타아제는 상당히 homogeneous하다는 사실을 증명해 주었다.

따라서 이렇게 분리 정제된 재조합 곰팡이 피타아제의 활성을 검증하기 위하여 SDS-PAGE로 전기영동된 겔을 이용하여 zymogram staining 실험을 수행하였으며, 그 결과 90 kD의 단백질 부분에서 상당한 피타아제 활성이 측정되었고 (그림 1-10B), 이 결과로 볼 때 분리 정제된 재조합 곰팡이 피타아제 효소는 그 활성이 아주 강하다는 실험적 결과를 얻을 수 있었다.

Native 곰팡이 피타아제는 glycosylation이 일어나기 때문에 재조합 곰팡이의 피타아제에 대한 glycosylation 여부를 확인하기 위하여 PAS (periodic-acid Schiff staining) 실험을 수행 하였으며, 그 결과는 그림 1-10 C에서 보여주고 있다. 이 그림에 의하면 분리 정제된 재조합 곰팡이 피타아제는 native 곰팡이 피타아제와 마찬가지로 glycosylation 반응이 잘 일어나고 있다는 사실을 증명해 주고 있다.

따라서 이러한 실험 결과를 바탕으로 하여 종합적으로 판단하여 볼 때 본 실험에서 수행된 재조합 곰팡이 피타아제 효소의 분리 정제 방법은 상당히 효율적 이라는 결론을 이끌어 낼 수 있었을 뿐 아니라, 참깨의 형질전환 hairy root의 배양기술에 의해서도 산업적 가치가 있는 재조합 단백질을 생산할 수 있는 시스템이 가능할 것이라는 실험적 뒷받침을 제시하였다.

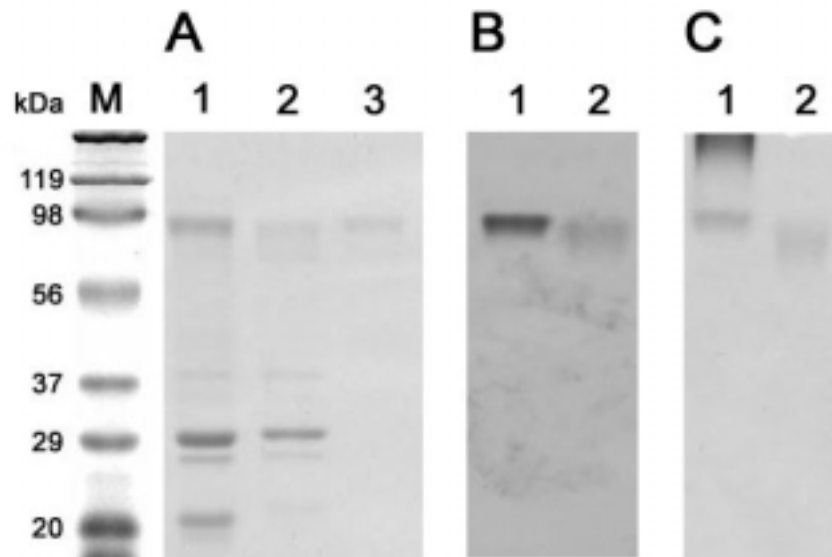


Fig. 1-10. SDS-PAGE analysis (A), zymogram staining (B) for phosphatase activity of the purified phytase protein, and periodic acid-Schiff (PAS) staining (C) for glycosylation of the purified recombinant phytase. A: lane 1; total protein from the culture media, lane 2; the purified phytase protein by DEAE-Sepharose, lane 3 the purified phytase protein by Sephadex G-100. B and C: lane 1; the purified recombinant phytase, lane 2 commercial phytase (BASF Corporation).

4. 발현산물의 생화학적 반응 분석

가. 연구수행 내용 및 방법

1) 연구내용:

재조합 곰팡이 피타아제의 상업적 생산을 위해서는 참깨 형질전환 hairy root 배양에 의해서 생산된 피타아제의 생화학적 활성 반응이 native fungal 피타아제의 활성반응과 동등한 수준이어야 한다. 따라서 형질전환 hairy root배양으로부터 최종적으로 분리 정제된 재조합 곰팡이 피타아제의 생화학적 활성 반응을 검정하기 위하여 효소 반응에 미치는 중요한 요인인 반응 온도, 피타아제 효소의 열에 대한 화학적 안정성, pH의 영향 및 생학적 반응에 미치는 반응 요소들 (effectors)의 영향 등에 관한 생화학적 반응 실험과 관련된 연구가 아래의 방법으로 수행되었다.

2) 연구방법:

재조합 곰팡이 피타아제의 활성에 미치는 반응 온도의 영향을 알아 보기위하여 두 group의 반응 온도가 처리되었다. 먼저 피타아제의 반응에 미치는 온도의 영향에 대한 온도처리를 위하여 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C 및 90 °C의 8종의 반응온도를 기질인 sodium phytate와 정제된 재조합 곰팡이 피타아제가 함유된 반응 액에 각각 30분 간 처리한 다음에 재조합 피타아제의 반응활성을 측정함으로써 분리 정제된 재조합 피타아제의 활성반응에 적합한 반응온도를 검정하였다. 또한 group은 분리 정제된 재조합 곰팡이 피타아제의 내열성을 검정하기 위한 온도처리로서 분리 정제된 피타아제 효소 단백질만 함유된 반응 액에 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C 및 90 °C의 온도를 각각 10분간 incubation한 후에 기질을 (sodium phytate)을 첨가하여 피타아제의 반응을 각 온도별로 30분 간 incubation 한 후 유리된 인산이온의 농도를 측정함으로써 분리 정제된 재조합 곰팡이 피타아제의 thermal stability에 대한 검정결과를 얻었다.

pH 별 phytase activity 변화를 알아보기 위해 pH 2-9까지의 4 group의 reaction buffer를 만들었다. 첫 번째 pH group은 pH가 2-3사이를 유지하는 buffer로서 glycine-HCl이 사용되었고, 두 번째 pH group은 pH가 4-5사이를 유지하는 buffer로서 sodium acetate가 사용되었다. 세 번째 pH group은 pH가 6-7사이를 유지하는 buffer로서 MES (2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid) buffer를 사용하였고, 네 번째 pH group은 pH가 8-9사이를 유지하는 buffer로서 Tris-HCl buffer를 이용하여 준비하였으며, 각각의 반응buffer에 기질을 녹인 후 분리 정제된 재조합 피타아제 단백질 효소의 활성을 측정하였다.

재조합 곰팡이 피타아제의 활성에 미치는 다양한 effector의 영향을 검정하기 위하여 8조의 cation chloride salts과 3조의 반응 첨가제가 사용되었다. 사용된 cation

chloride들은; manganese chloride ($MnCl_2$), lithium chloride ($LiCl$), calcium chloride ($CaCl_2$), magnesium chloride ($MgCl_2$), Ferric chloride ($FeCl_3$), zinc chloride ($ZnCl_2$), cobalt chloride ($CoCl_2$) 및 potassium chloride (KCl)의 8종의 cation chloride가 사용되었고, 세 종류의 반응 첨가물로는 PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), DTT (dithiothreitol) 및 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)가 사용되었다. 사용된 effector들의 농도는 PMSF만 1 mM로 사용된 반면에 다른 effector들은 반응 액 속의 최종 농도가 전부 5 mM의 농도로 피타아제의 반응 액에 첨가되었으며, 피타아제의 활성 반응의 측정은 기질과 정제된 피타아제 효소가 반응 액에 첨가한 후에 재조합 곰팡이 피타아제의 효소활성을 측정하였다.

나. 연구결과

1) 생산된 재조합 피타아제 효소의 활성에 미치는 반응 온도의 영향

분리 정제된 재조합 피타아제 효소의 활성 반응에 미치는 반응 온도의 영향을 검정하기 위하여 20-90 °C의 온도가 피타아제의 반응 액에 처리되었으며, 그 결과는 그림 1-11에 나타나 있다. 그림 1-11에서 보여주는 바와 같이 분리 정제된 재조합 곰팡이 피타아제 효소의 활성에 가장 적합한 활성 반응온도는 50-60 °C로 증명되었다. 반응 온도가 20 °C에서는 피타아제의 활성이 상대적으로 약 40%정도로 피타아제의 활성을 보여 주었고, 30 °C에서는 약 65%, 40 °C에서는 약 90%의 활성 반응이 나타났다. 반면에 60 °C를 넘어서부터는 피타아제의 활성이 현저히 감소하기 시작하였으며, 70 °C에서는 약 20%까지 피타아제의 활성이 감소하였다. 따라서 이러한 실험 결과로 볼 때 형질전환 참깨 hairy root의 배양으로 생산된 재조합 곰팡이 피타아제 효소의 활성 반응에 가장 적합한 온도는 50-60 °C임을 이 결과에서 검정되었으며, 특히 현재 상업적으로 판매되고 있는 BASF회사에서 생산하는 native fungal 피타아제의 반응온도와 비교해 본 결과에서도 유사한 실험 결과를 얻었으며, 이러한 결과는 재조합 곰팡이 피타아제도 상업적으로 생산이 가능할 것으로 사료되었다.

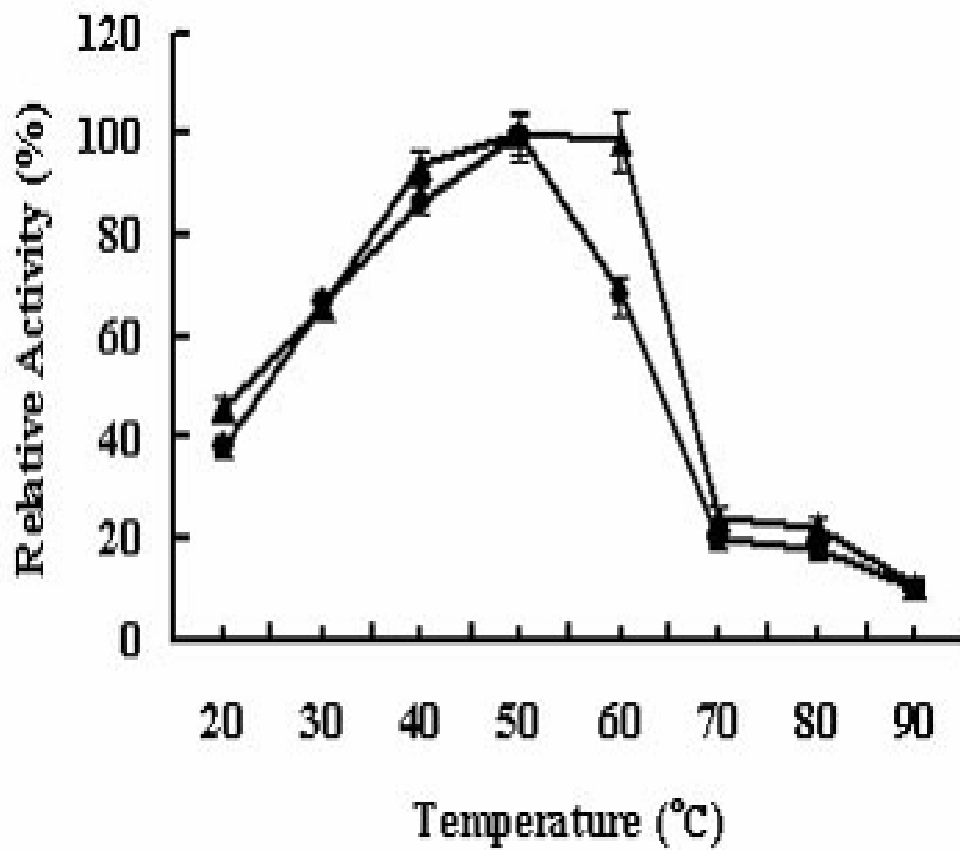


Fig. 1-11. Effects of temperature on activity of the purified recombinant phytase (▲) and the commercial phytase (BASF Corporation) (●).

1) 생산된 재조합 곰팡이 피타아제 효소의 thermal stability

형질전환된 참깨의 배양 액 속으로 분비된 재조합 곰팡이 피타아제 단백질을 분리 정제한 후에 이 효소의 내열성 (thermostability)을 검정하기 위하여 기질이 첨가되지 않은 피타아제의 활성 측정 반응 액을 20-90 °C의 범위에서 10 °C간격으로 온도를 처리하였으며, 그 결과는 그림 1-12에서 잘 보여주고 있다. 이 그림에서 나타난 바와 같이 20-50 °C까지의 온도가 처리된 피타아제의 경우에는 재조합 곰팡이 피타아제 효소의 활성에는 거의 변화가 없었으나, 60 °C로 처리된 경우에는 피타아제의 효소 활성이 약 20%까지 감소하였고, 70 °C에서는 약 60%까지 피타아제의 활성 감소를 보여주었으며, 80-90 °C의 온도 처리에서는 피타아제의 효소 활성이 거의 나타나지 않았다. 특이한 현상은 재조합 곰팡이 피타아제 효소의 활성 감소가 BASF회사의 native fungal 피타아제 효소의 활성에 비해 감소폭이 약간 높았다는 것이다. 이러한 실험결과로 볼 때 재조합 곰팡이 피타아제의 내열성에 대한 온도범위는 50-60 °C이라는 사실이 실험적으로 증명되었다. 일반적으로 볼 때 대부분의 효소 활성의 내열성 범위는 40-50 °C이지만 피타아제의 경우에는 내열성에 대한 온도범위가 다른 효소들의 내열성 범위보다 약 10 °C정도 높다는 사실이 이 실험에서 얻어졌으며, 피타아제의 내열성 범위가 다른 효소들에 비해 높은 특별한 이유는 정확히 밝혀진 게 없지만 한 가지 이유는 피타아제 효소는 다른 효소들에 비해 active center에 disulfide 결합이 많이 존재하기 때문에 결합력이 훨씬 크기 때문에 내열성이 다른 효소들에 비해 높은 것으로 추측되었다.

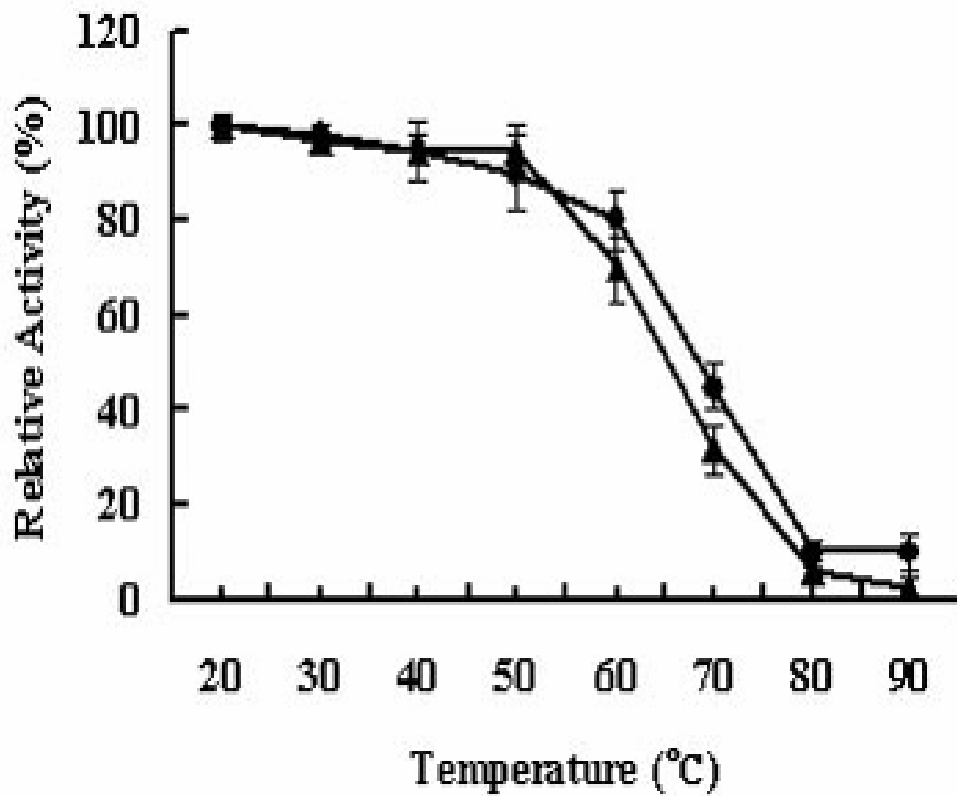


Fig. 1-12. Thermal stability of the recombinant phytase. To determine temperature stability, the purified recombinant phytase (▲) and the commercial phytase (BASF Corporation) (●) were preincubated at the given temperatures for 10 min and then their activities were measured as described in Materials and methods.

3) 재조합 곰팡이 피타아제의 활성화에 미치는 pH의 영향

일반적으로 효소의 활성 반응은 반응 pH에 의하여 상당한 영향을 미치기 때문에 효소의 반응 액속의 pH는 활성 반응에 아주 중요한 요인으로 작용한다. 따라서 본 실험에서 분리 정제된 재조합 곰팡이 피타아제 효소의 활성화에 미치는 pH의 영향을 알아보기 위하여 pH 2.0-9.0의 범위에서 피타아제 효소반응에 미치는 pH의 활성 변화에 대한 피타아제 활성 반응 분석을 수행하였으며, 그 결과는 그림 1-13에서 잘 보여주고 있다. 이 그림에서 보여주는 바와 같이 두 개의 pH 반응 peak가 측정되었다. 하나는 pH 2.0 부근에서 나타났으며, 또 한 개의 pH peak는 약 pH 4.5 부근에서 측정되었다. pH 2.0에서는 재조합 피타아제 효소의 상대적인 활성은 약 65%인 반면에 pH 4.5에서는 약 98-100%의 피타아제의 활성이 나타났으며, BASF회사의 native fungal 피타아제의 pH peak와 유사한 결과를 얻었다. 일반적으로 다른 피타아제에서도 이 결과에서와 유사한 pH반응이 나타나고 있다는 사실이 알려져 있기 때문에 본 실험에서 분리 정제된 재조합 곰팡이 피타아제는 native fungal 피타아제와 pH반응에는 아무런 차이가 없다는 사실이 증명되었다. 효소 반응에서 일반적으로 일어나는 생화학적 반응에서 pH는 그 효소 단백질의 입체구조의 골격을 유지하거나 촉매반응에 중요한 요인으로 작용하기 때문에 pH의 변화에 대한 반응 양상은 그 효소의 기능을 측정하는 데 있어 상당한 중요한 요인이다. 따라서 본 실험결과에서 나타나 바와 같이 참깨의 형질전환 hairy root의 배양액에 분비된 재조합 곰팡이 피타아제는 native fungal 피타아제의 기능과 같거나 아주 유사하다는 결론을 얻을 수 있었다.

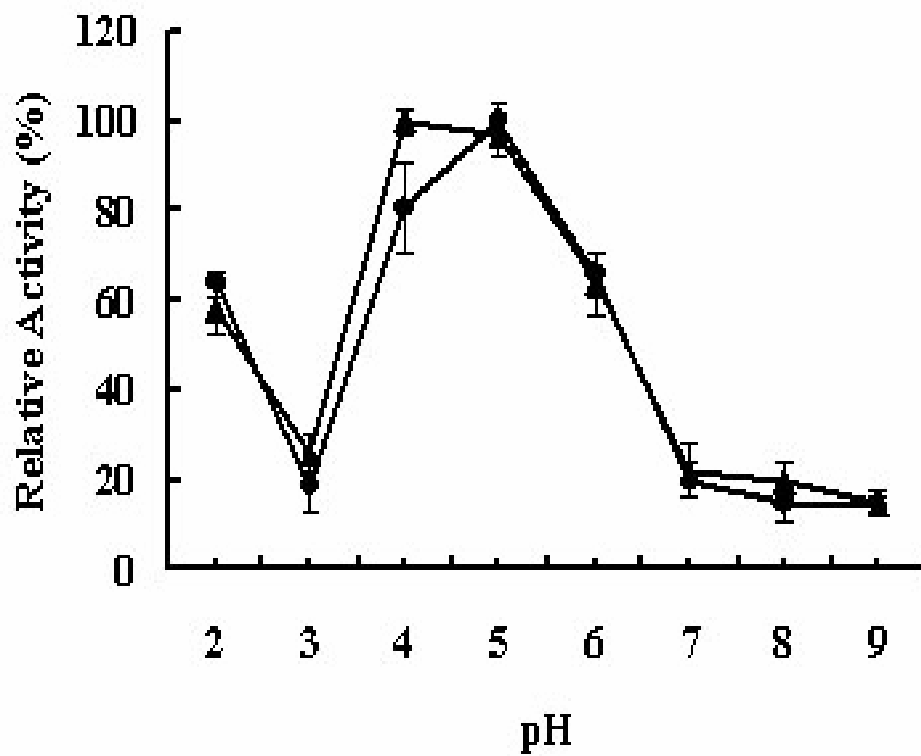


Fig. 1-13. Effect of pH on activity of the purified recombinant phytase (▲) and the commercial phytase (BASF Corporation) (●).The pH was adjusted to the given pH before phytase activity was measured

4) 재조합 곰팡이 피타아제의 활성화에 미치는 effectors의 영향

일반적인 효소반응을 측정하는 반응 액 속에는 다양한 반응 첨가물이 첨가되며, 이 경우에 어떤 특정 반응물에 대해서 효소의 활성화에 저해제로 작용하거나 혹은 촉진제로 작용하기도 한다. 따라서 어떤 효소의 반응에서 가장 적합한 반응 조건을 찾아내기 위해서는 효소의 반응 액에 첨가되는 첨가제에 대한 검정이 요구된다. 따라서 본 실험에서는 분리 정제된 재조합 곰팡이 피타아제의 활성화 반응에 주로 사용되는 반응 첨가제에 대한 피타아제의 활성화반응을 검정하였으며, 그 결과는 표 1-2에 잘 나타나 있다. 11종류의 첨가물 중에서 8종류는 cation chloride salts들이고, 나머지 3종류는 환원제인 DTT, 그리고 chelating agent인 EDTA, 다른 하나는 단백질 분해효소 저해제로 작용하는 PMSF가 사용되었으며, native fungal 피타아제 효소와 비교하기 위하여 BASF회사에서 상업적으로 판매되는 피타아제를 동시에 사용하여 첨가제의 영향을 분석하였다. 표 1-2에서 보여주는 바와 같이 전체적으로 볼 때 두 피타아제는 $FeCl_3$ 를 제외한 모든 첨가제에 대한 피타아제의 효소활성은 크게 감소하지 않았다. 이 실험결과에서 한 가지 특이한 점은 $FeCl_3$ 를 첨가했을 경우에 다른 첨가제에 비해 재조합 곰팡이 피타아제의 활성이 34%정도로 상당히 감소되었음을 보여주었다. 이러한 결과대한 분명한 실험적 보고는 아직 없으나 피타아제의 기질인 soluble phytic acid의 체내 농도와 상당한 연관이 있을 것으로 추측되고 있다. 그 이유로는 체내의 soluble phytic acid가 철과 결합함으로써 피타아제가 촉매 할 수 있는 농도 이하로 감소되어 결과적으로 기질 부족 현상이 일어나서 피타아제가 이용할 수 있는 활성이 감소되어 측정되기 때문에 이 피타아제 효소의 활성화 반응에 저해제로 반영된다는 것이다.

Table 1-2

Effect of various cations as chloride salts and other additives on recombinant fungal phytase. Relative enzyme activities are shown as compared to that of a reaction in 100 mM citric acid buffer (pH 5.5). Assay solutions were supplemented with the additives at a concentration of 5 mM except PMSF (1mM).

Additive	Relative activity (%)	
	Recombinant phytase	Commercial phytase
None	100	100
Mn ²⁺	100	102
Li ⁺	97	100
Ca ²⁺	94	103
Mg ²⁺	106	105
K ⁺	100	105
Fe ³⁺	76	101
Zn ²⁺	100	102
Co ²⁺	101	102
DTT	103	104
EDTA	105	102
PMSF	105	104

Each value is the means of 3 replications

5. 결과요약

제1절에서 수행된 연구에서는 *Agrobacterium rhizogenes*에 의해서 형질전환 시킨 참깨의 hairy root의 배양액 속으로 가능한 많은 양의 재조합 곰팡이 피타아제가 분비되는 효율적 발현백터를 합성함과 동시에, 배양액 속으로 분비된 재조합 곰팡이 피타아제의 생화학적 반응과 기능을 분석하여 생산된 재조합 곰팡이 피타아제와 native fungal 피타아제를 서로 비교 분석한 자료를 제공함으로써 재조합 곰팡이의 활용 가능성을 제시하고 자하는 것이 주 연구 목적이다. 따라서 이러한 연구 목적에 따라서 수행된 연구결과를 토대로 하여 볼 때 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

- 합성된 곰팡이 피타아제 발현 카세트는 참깨의 형질전환 hairy root에서 아주 효율적으로 발현하였다.
- 생산된 재조합 곰팡이 피타아제의 생화학적 기능은 native fungal 피타아제와 아주 유사 하였다.
- 생산된 재조합 곰팡이 피타아제의 효율적인 분리 정제기술이 확보되었을 뿐 아니라,
- 이 시스템에 의해서 생산된 재조합 곰팡이 피타아제의 생화학적 특성과 반응 속도 및 반응 첨가제의 영향에 대한 기초 분석 자료를 확보하였다.
- 따라서 이 시스템은 다른 재조합 단백질의 모델 생산 시스템뿐 아니라, 산업적 생산을 위한 hairy root발현 시스템으로 활용 가능 할 것으로 사료되었다.

제2절 참깨조직의 형질전환과 형질전환 참깨 모상근의 장기보존 기술개발

1. 참깨 모상근의 형질전환과 선발

가. 연구수행 내용 및 방법

1) 연구내용:

본 연구 분야에서는 참깨조직을 형질전환 시키는 효율적 방법을 모색하기 위한 실험을 수행하였으며, 본 실험 분야에서는 크게 두 종류의 실험이 수행되었다. 첫째는 재조합 곰팡이 피타아제의 발현 cassette를 함유하지 않은 wild type *Agrobacterium rhizogenes* 균을 사용하여 참깨의 배측 조직으로부터 형질전환 참깨 모상근을 효율적으로 유도하는 기술을 확립하여 형질전환된 참깨 모상근을 성공적으로 배양시킬 수 있는 방법에 관한 기초자료를 확보함으로써 다음 단계의 실험에 필수적으로 요구되는 실험 자료를 확보하기 위한 실험들을 수행하였고, 두 번째는 wild type *Agrobacterium rhizogenes* 균으로 형질전환된 참깨의 모상근을 효율적으로 선발하기 위한 항생제 저항성에 관련된 실험들이 수행되었다.

2) 연구방법:

가) 참깨 형질전환 모상근의 유도 및 확보방법

먼저 *Agrobacterium rhizogenes* DC-AR2 균을 overnight 배양시킨 다음에 이 균을 다시 배양하여 OD₆₀₀에서 0.5-0.8사이의 균농도로 배양시킨 균을 사용한다. 참깨 종자를 소독 한 후에 무균배지에서 7-10일 발아시킨 후에 싹이 난 어린 식물의 배측에 *Agrobacterium rhizogenes* 균을 다음과 같은 방법으로 전이하였다. 배양된 *Agrobacterium rhizogenes* 균 배양액에 주사바늘을 침윤시킨 다음에 어린 참깨 배측의 2-3곳에 침윤된 주사바늘을 사용하여 상처를 내어 이 균을 참깨의 배측으로 침투시킨 후에 22 °C의 생장 상에서 16의 빛 조건과 8 시간의 암 조건하에서 co-culture 시킨다. 공동 배양된 어린 식물체를 cefotaxime (100 ug/ml)이 함유된 MS배지에 옮겨 26 °C에서 동일 배양조건으로 2 주일 동안 배양한다. 상처가 생긴 지역에서 약 1.5-2.0 cm정도 자란 모상근을 동일 조건의 배지에 옮겨서 4 주 동안 암 조건에서 배양하여 *Agrobacterium rhizogenes* DC-AR2 균으로 형질전환된 참깨의 모상근을 확보하였으며, 방법에 관한 요약은 다음 그림 2-1에 잘 설명되어 있다..

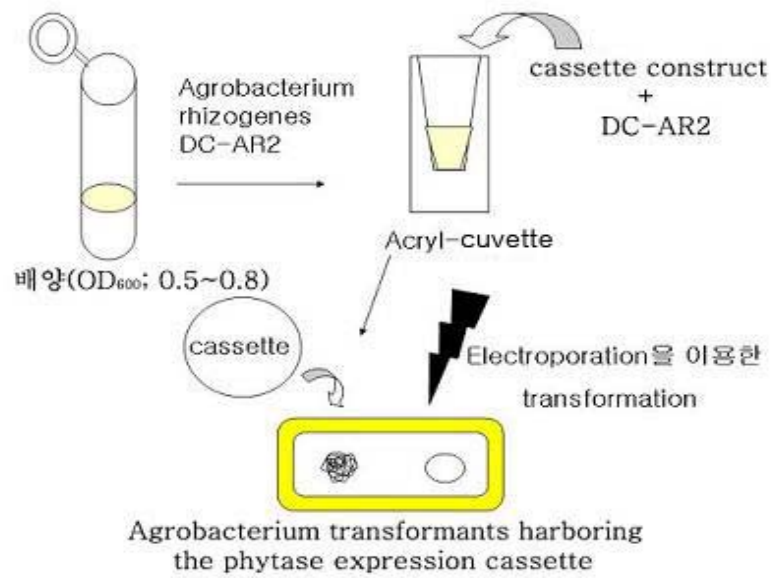


Fig. 2-1. Transformation procedure of *Agrobacterium rhizogenes* with the recombinant fungal phytase construct

나) 항생제 저항성 실험방법

Agrobacterium rhizogenes DC-AR2균으로 형질전환된 참깨의 모상근의 효율적 항생제 저항성 선발을 위하여 두 종류의 항생제 즉, kanamycin과 hygromycin이 이용되었다. 이 두 항생제의 농도별 저항성을 테스트하기 위하여 kanamycin의 경우 0, 50 ug/ml, 100 ug/ml, 150 ug/ml, 및 200 ug/ml (그림 2-4)의 농도를 배양배지에 첨가하였고, hygromycin의 경우에는 0, 10 ug/ml, 20 ug/ml, 30 ug/ml, 40 ug/ml, 및 50 ug/ml (그림 2-5)를 배지에 첨가하여 이들의 항생제에 대한 저항성을 테스트 하였다. 사용된 참깨의 모상근은 wild type *Agrobacterium rhizogenes* DC-AR2균으로 형질전환된 모상근이 사용되었으며, 참깨의 배축에서 생성된 모상근을 약 2 cm크기로 잘라서 각 항생제의 해당 농도가 함유된 배지에 배양함으로써 항생제에 대한 저항성을 테스트 하였다.

나. 연구결과

1) 참깨 형질전환 모상근의 유도실험 결과

*Agrobacterium rhizogenes*균에 의해서 참깨의 조직을 형질전환 시키는 방법에 대한 연구 보고는 아직 발표된 바가 없기 때문에 본 연구에서 처음으로 이에 관한 연구가 시도되었다. 따라서 다양한 예비 실험과정을 거친 결과 참깨의 배축 조직에서 형질전환 hairy root의 형성율이 다른 조직에 비해서 훨씬 높게 나타났기 때문에 배양된 wild type *Agrobacterium rhizogenes*균을 참깨의 배축에 주사바늘로 상처를 내어서 형질전환 참깨의 hairy root를 획득 하였다 (그림 2-2). 그림 2-2에서 보여주고 있는 바와 같이 주사바늘로 상처가 난 부위에서 hairy root가 형성되었으며, 모상근의 길이가 약 2 cm이상 성장하였을 때 잘라내어 사용하였다. 그림 2-3은 잘라낸 모상근을 다른 배지에 옮겨서 배양한 결과로서 한 개의 모상근 으로부터 한 묶음의 모상근 덩어리가 형성되었고, 이 모상근 덩어리를 적당한 크기로 잘라내어 액체 배양액에 옮겨서 배양을 수행하였다.

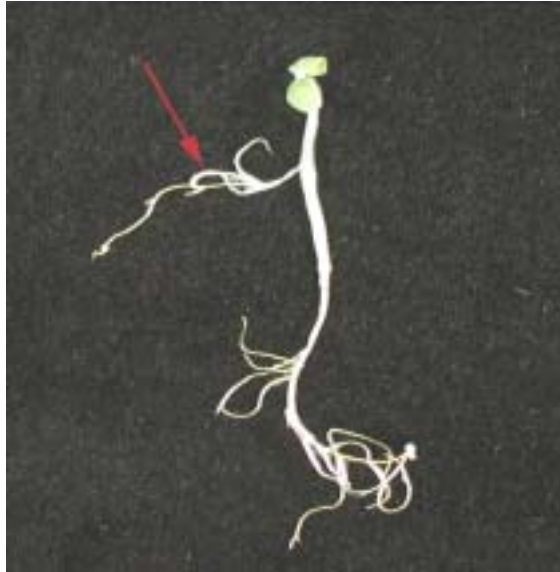


Fig. 2-2. The sesame hairy roots formed on the sesame hypocotyl transformed with wild type *Agrobacterium rhizogenes* DC-AR2 strain.



Fig. 2-3. The sesame hairy roots cultured on MS agar medium, showing a cluster of the hairy roots

2) 항생제 저항성 테스트 결과

참깨 모상근의 형질전환체를 선별하기 위한 kanamycin과 hygromycin 저항성을 실험한 결과, kanamycin 100 µg/ml의 농도에서, 그리고 hygromycin은 30 µg/ml 이상의 농도에서 wild type 형질전환 모상근이 모두 고사되는 반면에, 두 항생제에 대해서 저항성 유전자가 함유된 모상근은 고사되지 않고 모상근의 생장이 지속된다는 실험적 증거가 확보되었다 (아래 그림 2-4와 그림 2-5 참조). Table 2-1의 결과에서는 참깨의 캘러스 형성율에 미치는 kanamycin과 hygromycin의 저항성을 테스트 한 실험 결과를 나타낸 표로서 kanamycin이 배지에 첨가 하였을 경우, 배양 조건과는 상관 없이 100 µg/ml의 농도 이상에서는 캘러스 형성이 전혀 이루어 지지 않았다. Hygromycin이 배지에 첨가 할 경우에는 30 µg/ml의 농도에서 캘러스 형성이 되지 않았다. 따라서 이러한 실험결과에서 보여주는 바와 같이 참깨 조직을 사용하여 형질 전환체를 효율적으로 선별하기 위해서는 kanamycin이 사용되는 경우에는 선별 농도는 100 µg/ml가 적절하는 것으로 나타났으며, hygromycin 항생제를 사용하는 경우에는 30 µg/ml의 농도가 참깨 모상근 뿐 아니라 다른 조직의 형질전환체 선별에 효과가 있다는 사실이 본 연구 분야에서 증명되었다.

Table 2-1. Effects of antibiotics on callus formaion in sesame.

Light Condition	Control ^a	Kanamycin (ng/L)			Hygromycin (ng/L)		
		50	100	150	15	30	50
No. of callus formed/total segments							
Dark ^b	55/57	5/60	0/60	0/60	4/60	0/60	0/60
Light ^c	36/60	3/60	0/60	0/60	2/60	0/60	0/60

^a No. of calli induced was counted after 12-week culture.

^b No. of antibiotics.

^c Continuous dark

^d 16-h light (2,500 lx) and 8-h dark photoperiod.

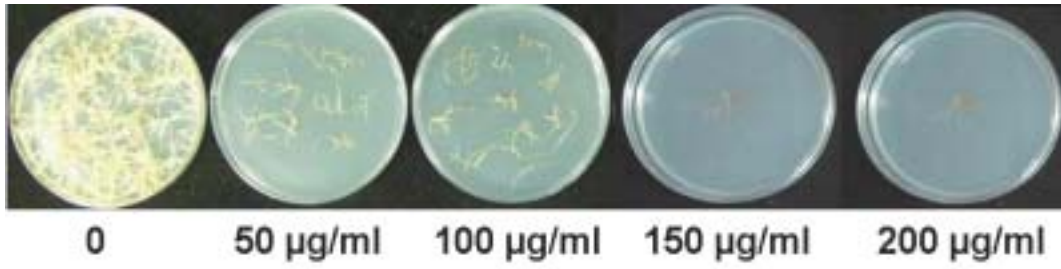


Fig. 2-4. Kanamycin resistance test for selecting sesame hairy root transformants

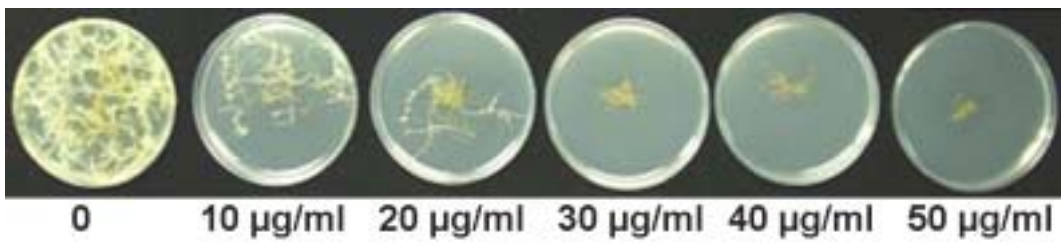


Fig. 2-5. Hygromycin resistance test for selecting sesame hairy root transformants

2. 형질전환 참깨 모상근 cell line의 장기보존

가. 연구수행 내용 및 방법

1) 연구내용:

본 세부과제에서는 크게 네 가지의 실험 내용으로 실험들이 수행되었다; 1) 제1 세부과제에서 합성된 재조합 곰팡이 피타아제 발현 카셋트를 가진 pMOG413를 *A. rhizogenes*으로 전이시키는 실험 및 재조합 곰팡이 피타아제를 발현시키는 형질전환 참깨 모상근을 획득하는 실험들이 수행되었고, 2) 참깨 모상근 형질전환체의 확인과 관련된 실험, 3) 확인된 형질전환 모상근의 배양을 통하여 모상근의 성장과 피타아제의 발현이 아주 우수한 모상근의 cell line의 선발에 관련된 실험들이 본 연구 분야의 주요 연구내용이다. 특히 cell line의 장기보존을 위한 실험내용으로는; 초 냉동(cryopreservation)방법에 의한 형질전환 hairy root cell line 장기보존 기술, 화학적 냉동 방법에 의한 형질전환 hairy root cell line 장기 보존기술, Encapsulation방법에 의한 형질전환 hairy root cell line 장기 보존기술, 건조에 의한 형질전환 hairy root cell line 장기 보존기술 및 혼합적 처리 방법에 관한 실험들이 수행되었다.

2) 연구방법

가) 피타아제 발현 카셋트에 의한 *Agrobacterium rhizogenes*의 형질전환 실험

합성된 재조합 곰팡이 피타아제의 발현 카셋트를 *Agrobacterium rhizogenes* DC-AR2균의 Ti-plasmid속으로 전이시키기 위하여 electroporation system을 사용하였으며, 구체적인 전이 방법은 앞의 절에서 언급된 동일한 방법으로 발현 카셋트 전이 실험이 수행되었다(39 페이지 참조). 형질전환된 *Agrobacterium rhizogenes* DC-AR2균의 Ti-plasmid를 압반적인 방법으로 분리하여 곰팡이 발현 카셋트가 이 플라스미드 내에 존재한다는 사실을 PCR방법으로 확인하였다. 이를 위하여 먼저 형질전환된 *Agrobacterium rhizogenes* DC-AR2(pMOG413)을 10 ml LB배지에서 overnight 배양을 하여 6000 rpm 으로 집균한후 상등액을 버린 다음 플라스미드 분리용 buffer solution으로 Ti-plasmid를 원심 분리하여 상등액을 plasmid 분리용 column에 걸어 Plasmid DNA를 80% ethanol로 washing한 후 40 ul의 dH₂O에 녹인 후에 column을 통해 빠져나온 플라스미드 DNA를 PCR을 이용하여 형질전환유무를 확인하였다. 그리고 PCR 반응 조건으로는 다음과 같이 수행하였다. 먼저 분리된 plasmid DNA 3 ul (50 ng) 과 Taq polymerase 1 ul (5 unit), sense primer 1 ul (100 pmol), anti-sense primer 1 ul (100 pmol) 및 dNTP 2.5 ul (25 mM)를 10 x buffer 10 ul dH₂O 81.5 ul를 혼합하여 전체 반응 액을 100 ul로 만든 다음에 95 °C에서 2분 동안 먼저 반응 시킨 후에 95 °C에서 30초, 60 °C에서 30초, 72 °C에서 1분 동안 30회 반복한 반응 액을 다시 72 °C에서

10분 동안 PCR 반응을 수행하여 재조합 곰팡이 피타아제 발현 카셋트를 DNA를 증폭시켰다.

나) 형질전환 참깨 모상근의 cell line선발 실험

pMOG413 plasmid를 가진 Agrobacterium균을 참깨의 모상근으로 전이시키기 위해 이 균을 배양하여 (OD₆₀₀에서 0.5-0.8까지 배양된 균) 어린 참깨의 배축의 3-4곳에 이 균을 묻힌 주사바늘로 상처를 입힌 다음에 MS agar 배지에서 22 °C의 배양 온도조건으로 3-4일 동안 16-시간 light조건과 8시간 암 조건에서 공동 배양하였다. 배양된 배축을 kanamycin 100 ug/ml 과 cefotaxime 200 ug/ml 농도가 함유된 MS agar배지에 옮겨 26 °C에서 배양하여 형질전환된 참깨의 모상근을 획득하였다.

Kanamycin에 대하여 저항성을 가진 30여 개의 모상근 형질전환체 cell line들을 선발하여 subculture를 통하여 분리한 다음, 약 4-5 cm씩 잘라내어 200 ml의 flask에서 배양하였다. 충분히 배양된 (5-6주 배양) 형질전환 모상근을 수확하여 액체 질소에서 급속 냉동하여 -80 °C에 보관하여 단백질을 분리하여 피타아제의 발현 정도와 활성을 측정하였고, 배양액도 즉시 원심분리 한 후에 200 mesh의 세 겹의 nylon filter로 여과시켜서 피타아제의 분리와 활성측정에 사용하였으며, 이러한 분석을 통하여 피타아제의 발현이 가장 왕성하고 형질전환 모상근의 생장이 아주 빠른 우수 형질전환 모상근이 선발되었다.

다) 형질전환 모상근 cell line장기보존 실험

선발된 우수 모상근 cell line을 장기적으로 보존하는 방법을 개발하기 위해서 다양한 방법이 이용되고 있지만 재조합 피타아제를 발현시키는 참깨의 모상근의 장기 보존 방법에 관하여 전혀 보고가 되어있지 않기 때문에 본 실험에서 이에 관한 실험이 수행되었다. 일반적으로 어떤 cell이나 기관을 아무 손상 없이 장기적으로 보존하는 방법은 초 냉동 방법이 이용되고 있지만, 급속 냉동시킬 때 보존 대상 세포나 기관에 손상이 일어나기 때문에 이러한 손상을 최대한 방지하기 위한 다양한 방법이 이용되고 있다. 일반적으로 크게 5-6 가지 처리 방법 즉, 초 냉동 처리 방법, 화학적 냉동법, 건조에 의한 초 냉동법, 피포(encapsulation)와 건조에 의한 초 냉동법, 유리화 켈(vitrification)에 의한 초 냉동법 및 단계적 냉동법 등의 여러 가지 방법이 있지만 보존 대상에 따라서 각기 장단점이 있으므로 보존 대상에 따라서 각각의 보존 방법이 제시되어 있어야 한다. 따라서 본 과제에서는 선발된 우수 참깨 형질전환 모상근의 cell line을 장기적으로 보존하기 위한 실험을 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

(1) 초 냉동방법(cryopreservation)

재조합 곰팡이 피타아제를 다량 생산하는 형질전환 참깨 모상근을 MS 액체 배양액에서 3-4주 동안 성장 시킨다. 이 모상근 으로부터 100 mg, 300 mg 및 600 mg을 채취하여 sucrose가 0 %, 3 %, 5% 및 7 %가 함유된 MS 배지에서 배양한 후에 액체질소에서 급속 냉동시켰다. 급속 냉동된 모상근을 -80 °C의 냉동 저장실에 옮겨서 1주일, 3주일, 5주일 및 10주일 동안 저장한 후에 모상근의 재 성장율과 재조합 곰팡이의 활성을 측정하였다. 또 한편으로는 1-5일 동안의 pre-culture 없이 바로 액체질소에 급 냉동 시켜서 모상근의 성장과 피타아제의 발현 여부를 조사하여 형질전환 참깨 모상근의 장기 보존을 위한 초 냉동법의 처리를 수행하였다.

(2) 화학적 냉동처리 방법

이 실험을 위해 먼저 가장 보편적으로 사용되는 dimethylsulfide(DMSO)와 sucrose의 영향을 검토하기 위해서 5% DMSO와 sucrose 1-5%가 혼합된 MS 배지에 약 100 mg, 300 mg 및 600 mg의 모상근을 1-5일 간격으로 침적시킨 후에 액체질소에 놓은 다음 30 °C에서 해동시킨다. 이어서 배양배지에 세척한 다음에 50 ml의 배양배지가 담긴 100 ml의 플라스크에 옮겨서 모상근의 성장을 조사하였다.

(3) 혼합처리에 의한 방법

형질전환 참깨의 모상근 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산이 가장 높은 모상근 cell line을 효율적으로 장기 보존하기 위하여 초 냉동 방법과 화학적 처리를 혼합하여 수행하였으며, 주요 방법은 다음과 같다.

이 처리를 위하여 먼저 선발된 cell line 300 mg을 각 처리액이 15 ml씩 들어있는 초 냉동용 50 ml centrifuge tube에 넣어서 액체 질소로 급속 냉동시킨 다음에 -80 °C의 냉동 저장고에 넣어 보관하였다. 처리된 화학 물질은 글리세롤 단독으로 10%, 20%, 30%, 40%, 50% 및 60%의 농도로 하였고, DMSO는 4%의 단일 농도로 처리하였다. 그리고 혼합 처리는 글리세롤10-60%와 4% DMSO를 혼합하여 처리하였으며, 보관된 cell line들을 녹이기 위하여 4 °C (약 2시간), 15 °C (약 40분), 30 °C (약 30 분), 50 °C (약 20분) 및 100 °C (약 3분)에서 각각 녹인 후에 무균 처리된 MS 액상 배지로 세 번 세척하였으며, 세척된 cell line들은 100 ml의 MS 배양 배지 (MS plus 5% sucrose)가 들어 있는 250 ml 플라스크에서 3주 동안 배양하였다.

나. 연구결과

1) *Agrobacterium rhizogenes*의 형질전환 결과

재조합 곰팡이 피타아제의 발현 카셋트를 가지고 있는 pMOG413 plasmid를 전기충격 시스템 방법으로 *Agrobacterium rhizogenes*균에 옮긴 결과의 확인 실험을 위해 PCR 방법이 이용되었고, 그 결과 pMOG413 plasmid가 *Agrobacterium rhizogenes*균에 확실히 전이되었다는 실험적 결과가 그림 2-6에서와 같이 확인되었다. 이 그림에서 보여주는 바와 같이 단 한 개의 single band signal이 gel 분석에서 관찰되었으며, 이 band가 재조합 곰팡이 피타아제의 발현 카셋트를 포함하고 있는 발현 벡터로 확인됨에 따라서 이 균을 사용하여 재조합 곰팡이 피타아제 생산하는 참깨의 형질전환 모상균을 유도하는 데 이용되었다.

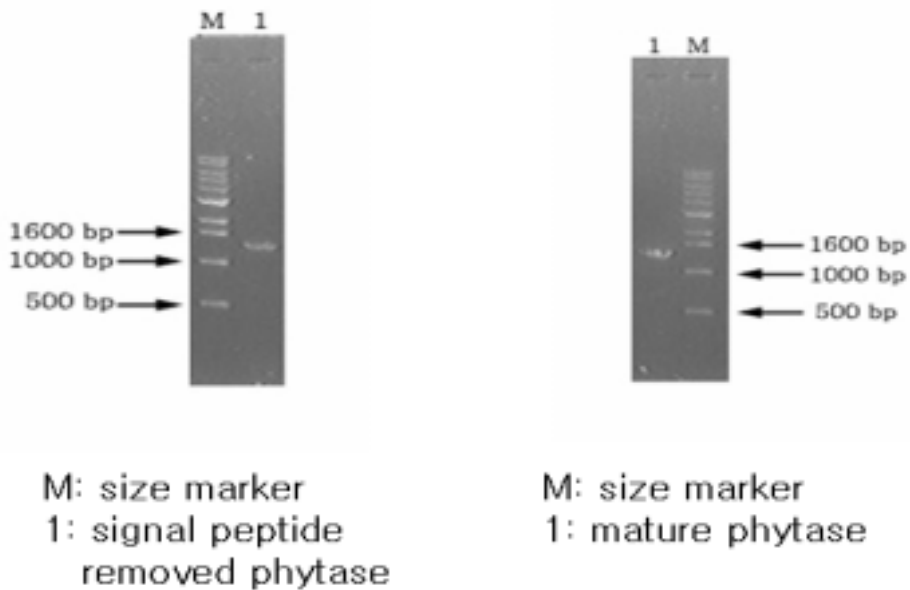


Fig. 2-6. The PCR evidence for the presence of recombinant fungal phytase expression cassette.

2) 곰팡이 피타아제를 고발현 하는 형질전환 모상근의 cell line선발 실험결과

피타아제를 고발현 시킬 뿐 아니라 모상근의 생장이 우수한 모상근 cell line을 효율적으로 선발하기 위해서 형질전환된 모든 참깨 모상근을 배양하여 생산된 재조합 곰팡이 피타아제의 활성을 측정한 결과는 아래의 표 2-2에 잘 나타나 있다. 이 표에 의하면 형질전환 hairy root line 중에서 root biomass 성장과 phytase 활성이 가장 높게 발현되는 cell line 3을 선발하였다. 따라서 이 결과로부터 피타아제의 활성이 가장 높게 나타나는 참깨 모상근의 형질전환체의 cell line (line 3)을 지속적으로 배양하기 위하여 1-2주 간격의 subculture를 통하여 세 반복으로 배양하였다.

Table 2-2. Expression of recombinant phytase in some sesame hairy root transformants

line	phytase activity (unit/ml)
control	0
1	43.21
2	55.37
3	275.33
4	16.16
5	112.89

3) 형질전환 모상근 cell line장기보존 실험결과

(가) Sucrose와 DMSO처리 결과

선발된 우수 참깨 형질전환 모상근 cell line의 장기 보존기술을 개발하기 위한 기초실험을 수행한 결과는 아래의 표 2-3에서 나타나 있다. 이 실험결과에서 보여주는 바와 같이 DMSO (dimethylsulfoxide)를 단독으로 처리 하는 것 보다는 sucrose와 혼용으로 처리 하는 것이 hairy root의 냉동 처리에 상당히 효과적 이라는 사실이 입증되었다. 뿐 만 아니라 DMSO의 처리 시간이 길수록 모상근의 생장이 감소되는 추세를 보여주었다. 그리고 sucrose의 적정 농도는 DMSO의 처리 기간과 상당히 연관성이 있을 것으로 추측되었으며, 5%의 DMSO의 농도에서 1-2일 간 처리될 경우에는 5%의 sucrose 농도가 가장 효과적이라는 사실도 이 표에서 보여주고 있다. 이 표에서 나타난 결과는 여러 가지 실험방법 중에서 가장 기초적인 실험으로서 다음 단계의 실험을 위한 data로서 아주 중요한 실험 자료로 활용성 있다고 사료된다. 참깨 모상근을

이용하여 재조합 유용 단백질의 생산을 위한 bioreactor로서 그 효율성을 높이기 위해서는 유전적인 변이가 거의 생기지 않는 모상근의 cell line의 장기적 보존 기술의 개발은 필수적이다. 따라서 이 실험결과는 형질전환 참깨 모상근 뿐 아니라, 다른 유사 hairy root의 장기저장 기술을 개발하는 데 있어 중요한 기초자료로서 활용성이 높을 것으로 사료된다.

Table 2-3. Effects of DMSO and sucrose treatments on growth of transformed hairy roots

DMSO treatment (day)	Sucrose (%)			
	0	3	5	6
	(survival %)			
1	0 (0)	1.73 (50)	1.71 (100)	1.77 (100)
2	0 (0)	1.64 (100)	1.75 (100)	1.78 (100)
3	0 (0)	1.57 (100)	1.48 (100)	1.24 (100)
4	0 (0)	1.06 (50)	1.26 (100)	1.29 (100)
5	0 (0)	0.41 (33)	0.61 (100)	0.58 (50)

*: Value indicates fresh weight in grams and the number in parenthesis is the percentage of survival.

(나) 화학적 처리와 초 냉동 처리결과

혼합 처리에 의하여 얻어진 결과는 그림 2-7, 그림 2-8, 그림 2-9 및 표 2-4에서 잘 보여주고 있다. 그림 2-7에 나타난 바와 같이 4 °C의 해동 온도에서는 7종류의 처리 중에서 30%의 글리세롤과 4% DMSO 혼합 처리 구에서 가장 높은 모상근의 biomass 성장 율을 보여주었고, 소생 율도 75%로서 처리 구중에서 가장 높았다 (Table 2-4 참조). 반면에 50 °C와 100 °C에서 해동시켰을 경우에는 저장된 모상근 cell line들이 모두 소생하지 않았다 (Table 2-4 참조). 따라서 본 실험의 결과에서 보여 주고 있는 바와 같이 형질전환 참깨 모상근 cell line의 장기 보존 방법의 한 가지 방법은 30%의 글리세롤과 4% DMSO 혼합한 용액에 모상근을 넣어서 액체 질

소로 초 냉동으로 급속 냉동시키면 효과적으로 보존할 수 있다는 사실이 본 실험을 통하여 입증되었다. 그러나 글리세롤의 단독 처리 구와 DMSO의 단독 다. 처리 구에서는 모든 해동 온도에서 형질전환 캄개의 모싱근의 생장이 소생되지 않았으며, 아마도 이러한 결과에 대한 이론적 근거는 보다 더 심도 있는 실험을 통하여 설명되어야 할 것으로 사료되었다.

Table 2-4. Effects of mixed treatment of DMSO and glycerol on growth of transformed hairy roots

Melting temp. (°C)	Glycerol(%) + 4%DMSO						
	0	10	20	30	40	50	60
	(survival %)						
4	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1.98 (75)	1.74 (50)	0 (0)	0 (0)
15	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1.54 (25)	1.36 (25)	0 (0)	0 (0)
30	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.72 (25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
50	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
100	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

*: Value indicates fresh weight in grams and the number in parenthesis is the percentage of survival.

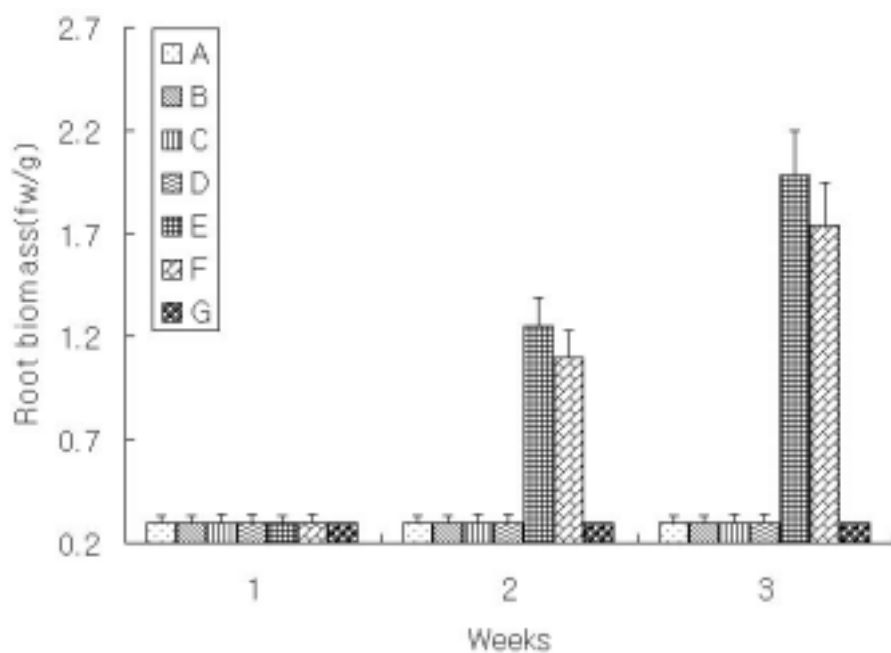


Fig. 2-7. Effects of DMSO, glycerol, and mixture of DMSO and glycerol on growth of transformed sesame hairy root cell lines melted at 4 °C.

A: 4% DMSO, B: 30% glycerol, C: 40 % glycerol

D: glycerol 20% glycerol + 4% DMSO

E: 30% glycerol + 4% DMSO

F: 40% glycerol + 4% DMSO

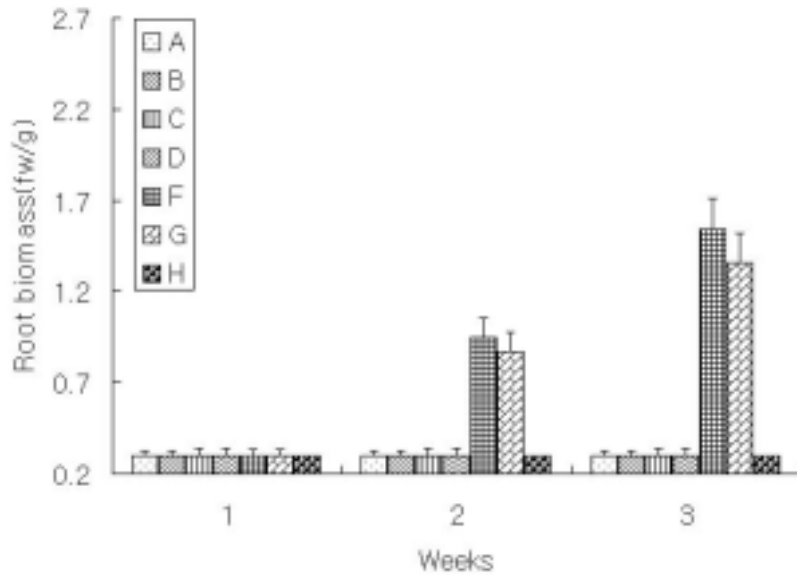


Fig. 2-8. Effects of DMSO, glycerol, and mixture of DMSO and glycerol on growth of transformed sesame hairy root cell lines melted at 15 °C.

A: 4% DMSO, B: 30% glycerol, C: 40 % glycerol

D: glycerol 20% glycerol + 4% DMSO

E: 30% glycerol + 4% DMSO

F: 40% glycerol + 4% DMSO

G: 50% glycerol + 4% DMSO

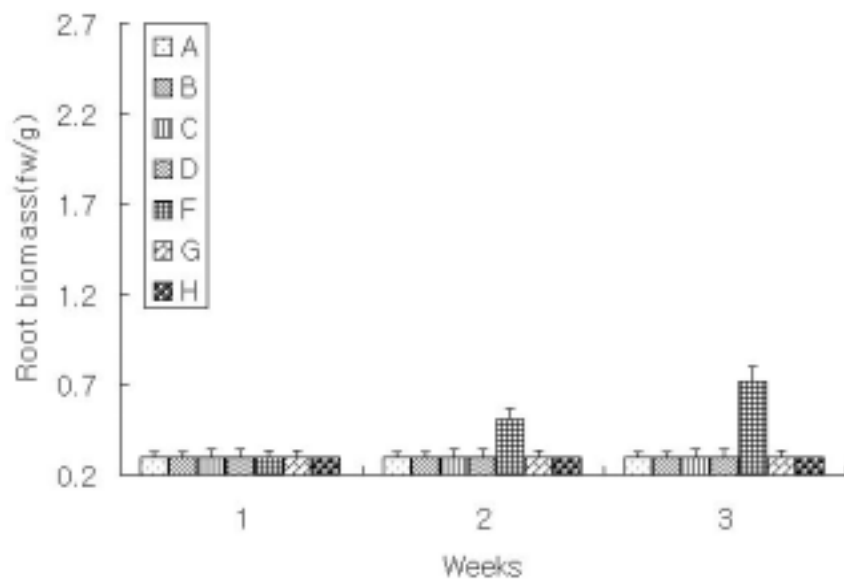


Fig. 2-9. Effects of DMSO, glycerol, and mixture of DMSO and glycerol on growth of transformed sesame hairy root cell lines melted at 30 °C.

A: 4% DMSO, B: 30% glycerol, C: 40 % glycerol

D: glycerol 20% glycerol + 4% DMSO

E: 30% glycerol + 4% DMSO

F: 40% glycerol + 4% DMSO

G: 50% glycerol + 4% DMSO

제3절 형질전환 참깨 모상근의 효율적 배양기술의 개발

1. 형질전환 참깨 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산에 미치는 빛의 영향

가. 연구수행 내용 및 방법

1) 연구내용:

일반적으로 hairy root의 배양조건 중에는 빛에 민감하게 반응하는 식물종이 있기 때문에 본 연구과제에서도 빛의 영향을 검토하기 위하여 두 종류의 빛의 처리를 수행하였다. 이를 위하여 한 처리 구에는 연속적인 빛 조건을 처리하였고, 다른 한 처리 구에서는 연속적인 암 조건을 처리하여 참깨의 모상근을 배양한 후에 모상근의 성장과 재조합 곰팡이의 발현 능력을 조사함으로써 빛의 영향에 관한 실험 결과를 확보하였다.

2) 연구방법:

가) 플라스크 배양과 빛 처리

참깨 종자를 소독한 후에 26 °C의 성장 상에서 발아시켜 어린식물로 배양한다. 이어서 앞에서 언급된 방법으로 *Agrobacterium rhizogenes*을 사용하여 참깨의 배축에 형성된 모상근을 획득한 다음, 항생제 저항성 형질전환체를 MS 배지 상에서 선발하여 4-6 mm 길이로 잘라서 플라스크 배양하였다. 플라스크 배양을 위하여 500 ml 플라스크에 200 ml의 MS 액체 배지를 부어서 플라스크 배양액으로 사용하였다. 플라스크에 옮겨진 모상근을 빛의 조사조건만 다르게 하여 배양하였다. 빛의 조사 방법은 두 처리구로 수행되었으며, 한 처리 구에는 연속적으로 암 조건만으로 처리된 플라스크 배양기에서, 그리고 다른 배양기에는 연속적으로 빛을 조사시키는 플라스크 배양기에서 각각 세 반복으로 하여 배양하였으며, 당의 농도는 sucrose를 3%와 5%로 하여 각각 첨가하였다.

나) Biomass 성장측정과 피타아제의 활성 측정방법

참깨 모상근의 biomass측정은 무균 상에서 paper towel로 물을 제거한 후에 fresh weight base로 측정하여 세 반복에서 얻어진 평균치와 standard error deviation을 통계자료로 제시하였다.

피타아제의 활성 측정을 위하여 배양된 배지를 원심분리한 후에 상층액으로부터 50 μ l를 채취하여 피타아제 활성 반응액 (0.1 M sodium citrate pH 5.5의 buffer 용액에 5 mM sodium phytate를 녹임) 450 μ l에 첨가하여 37 °C에서 30 분 간 반응시킨다음에 500 μ l의 15% trichloroacetic acid를 첨가하여 피타아제의 활성 반응을

을 종결시켰다. 이어서 4 ml의 ammonium molybdate 용액 (증류수로서 6 N 농도로 만들어진 황산 10 ml와 10 ml의 2.5% ammonium molybdate 용액으로 구성)과 10% ascorbic acid를 서로 혼합한 후에 50 °C에서 20분 간 반응한 다음 실온으로 온도를 낮추어서 820 nm의 분광광도계로 피타아제의 활성을 측정한다. 피타아제의 활성 단위는 1 ml의 배양 액을 기준으로 하여 2.5 μmol의 sodium phytate에서 유리되는 inorganic phosphorus가 분당 1 nmol이 유리되어 나오는 효소의 양을 피타아제의 효소 활성 단위로 계산하였다.

나. 연구결과

1) 참깨 모상근의 biomass 성장에 미치는 빛의 영향

참깨 모상근의 biomass 성장에 미치는 빛의 영향을 검토하기 위하여 수행된 실험에 대한 전체적인 결과는 아래 표 3-1에 자세하게 나타나 있다.

3-1. Effect of light condition on biomass growth and phytase production

Sucrose concentration	Biomass growth (g/fw)		Phytase activity (unit ml ⁻¹)	
	Dark	Light	Dark	Light
3%	5.07±0.16	0.06±0.03	35.20±3.97	18.06±2.55
5%	11.72±2.29	1.19±0.28	129.00±37.37	69.70±0.88

Mean values ± S.E. The biomass growth and phytase activity were measured after 5-week cultures.

위 Table 3-1에서 나타난 바와 같이 sucrose 3%의 농도에서는 암 조건의 경우 fresh weight gram 당 5.07±0.16의 성장 속도로 biomass의 생장이 나타났고, 5%의 sucrose를 첨가하는 경우에는 11.72±2.29의 성장을 보여주었으며, 3%의 sucrose첨가에 비해서 약 두 배 이상의 biomass 생장이 나타났다. 반면에 연속적인 빛을 조사하여 배양한 경우에는 3%나 5%의 sucrose처리 구 모두 biomass의 생장이 배양 도중에 고사하거나 거의 생장이 정지되는 경향을 보여주었다. 따라서 이 결과로 볼 때 참깨 모상근의 biomass 성장을 위해서는 연속적인 암 조건이 필수적이라는 사실이 확인되었다.

2) 생산된 재조합 곰팡이 피타아제의 생산에 미치는 빛의 영향

재조합 곰팡이 피타아제에 의해서 형질전환된 참깨의 모상근의 발현으로 모상근의 배양 액속으로 분비되어 나온 곰팡이 피타아제의 생산에 미치는 빛의 영향을 조사한 결과는 위의 Table 3-1에서 잘 나타나 있다. 이 표에서 보여주는 바와 같이 연속적으로 빛을 조사하였을 때 3%의 sucrose첨가의 경우에는 피타아제의 활성이 $18.06 \pm 2.55 \text{ unit ml}^{-1}$ 로서 연속적인 암 조건으로 배양했을 때 보다 약 절반 수준이었다. 반면에 5%의 sucrose를 배지에 첨가하여 연속적으로 빛을 조사하여 배양하였을 경우에는 피타아제의 활성이 $69.70 \pm 0.88 \text{ unit ml}^{-1}$ 를 나타내었으나, 연속적인 암 조건으로 배양하였을 경우에는 피타아제의 활성이 약 두 배 정도 높은 활성 ($129.00 \pm 37.37 \text{ unit ml}^{-1}$)을 보여 주었다. 따라서 이러한 결과를 종합적으로 판단하여 볼 때 재조합 곰팡이를 참깨의 모상근으로 배양하는 경우에는 5%의 sucrose농도를 첨가하여 연속적인 암 조건으로 배양하는 것이 합리적일이라는 잠재적인 결론을 얻을 수 있었다.

2. 형질전환 참깨 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산에 미치는 배양 온도와 sucrose 농도의 영향

가. 연구수행 내용 및 방법

1) 연구내용:

식물 세포의 배양에서 가장 중요한 배양 조건은 배양 온도와 첨가되는 당의 농도이다. 특히 모상근의 배양은 식물재료에 따라서 적정 배양 온도와 첨가되는 적정 당의 농도가 다르게 요구된다. 이 두 배양 조건에 따라서 모상근의 biomass가 성장하는 속도가 상당히 다를 뿐 아니라, 물질의 생산량도 현저한 차이를 보여준다. 이러한 현상은 배양 온도에 따른 모상근의 대사 작용이 영향을 받기 때문이며, 당의 경우에는 생화학적 대사 에너지의 source로서 당이 모상근의 세포 내로 흡수되는 적정 농도가 각기 다르기 때문에 생기는 현상이라고 추측되지만, 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제의 생산은 이 두 조건, 즉 배양 온도와 첨가되는 당의 농도가 서로 밀접한 상호 작용에 의해서 좌우되기 때문에 이 연구에서는 이들 간의 상호 작용을 규명하기 위한 실험이 수행되었다. 따라서 이 연구에서는 재조합 곰팡이 피타아제로 형질전환된 참깨의 모상근을 배양하는 경우에 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제의 생산이 배양 온도와 첨가되는 당의 농도에 따라서 어떤 영향을 받게 되는지를 확인하기 위한 실험이 주요 연구수행 내용이다.

2) 연구방법:

가) 플라스크 배양과 배양 온도 및 sucrose농도 처리

재조합 곰팡이 피타아제로 형질전환된 참깨의 모상근의 배양은 위에서 언급된 방법과 동일한 방법으로 수행되었다. 모상근의 배양 온도를 20 °C, 26 °C 및 30 °C의 배양기에서 각각 세 반복으로 배양하였다. 그리고 각 온도 별로 sucrose의 농도를 1%, 3%, 5%, 7% 및 9%의 농도로 첨가함으로써 sucrose의 온도를 처리하였고, 각각의 처리에 대한 반복수는 세 반복으로 나누어서 처리하였다. 각 처리 구별로 형질전환 모상근을 한 개씩 (약 4-5 cm의 길이) 선별하여 200 ml의 MS 액체 배지가 들어있는 500 ml의 플라스크에 넣어 연속적인 암 조건에서 배양하여 배양 2주째부터 일주일 간격으로 7주 동안 형질전환 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제의 활성을 측정하여 각 처리 구의 평균치와 standard error deviation의 수치로 측정치를 나타내었다.

나) 모상근 biomass 성장측정과 피타아제의 활성 측정방법

형질전환 모상근의 biomass 성장 측정은 위와 같은 방법으로 측정하여 fresh weight로 나타내었으며, 피타아제의 활성 측정도 각 처리 구에서 채취한 배양액을 원심 분리하여 얻어진 상등액을 사용하여 위에서 언급된 방법과 동일한 방법으로 재조합 곰팡이 피타아제의 활성이 측정되었다.

나. 연구결과

곰팡이 재조합 피타아제로 형질전환된 참깨의 모상근을 배양하여 곰팡이에서 생산되는 피타아제의 활성과 동일한 활성을 가지는 재조합 피타아제를 생산하기 위해서는 모상근의 배양 조건이 상당히 중요하다. 이러한 배양 조건 중에서도 모상근의 배양 온도와 에너지 source로 이용되는 당의 농도가 가장 중요한 배양 요인이므로 이들의 적정 배양조건을 본 연구에서 검토하였다.

1) 모상근의 biomass 성장과 피타아제의 생산에 미치는 배양 온도의 영향

본 실험의 결과로 볼 때 배양 온도는 재조합 곰팡이 피타아제로 형질전환된 참깨 모상근 biomass의 성장과 재조합 피타아제의 발현에 상당한 영향을 미친다는 결론을 얻을 수 있었다. 모상근의 플라스크의 배양 온도를 20 °C로 처리한 배양 구에서는 형질전환 참깨의 모상근의 biomass 생장이 거의 일어나지 않았을 뿐 아니라, 재조합 곰팡이 피타아제의 발현도 거의 중단되었다. 그러나 26 °C와 30 °C의 배양 온도를 처리한 배양 구에서는 형질전환 참깨의 모상근 biomass의 성장 뿐 아니라 (그림 3-1의 A와 B를 참조), 모상근의 배양액으로부터 상당한 양의 재조합 곰팡이 피타아제 발현을 측정할 수 있었다 (그림 3-2의 A와 B를 참조). 이 연구 결과를 토대로 하여

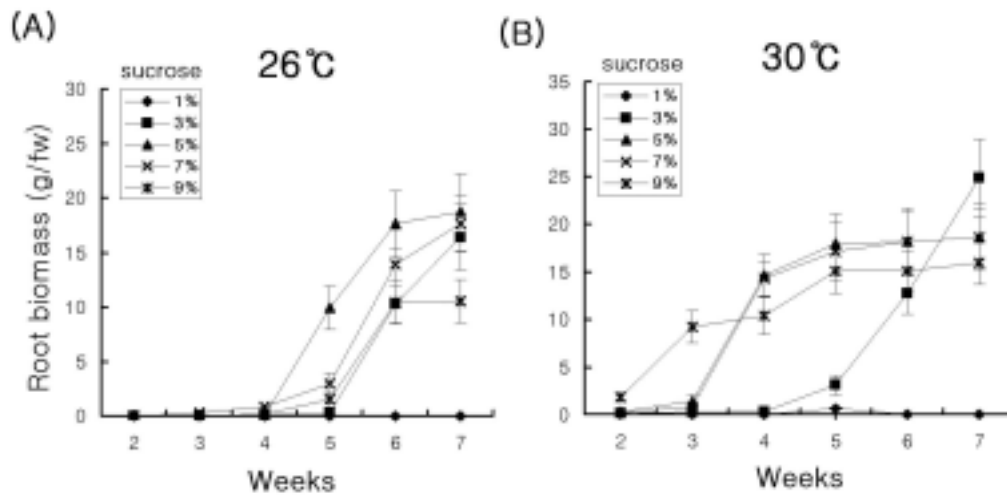


Fig. 3-1. Changes in biomass (grams fresh weight/flask containing 200 mL medium) of sesame hairy roots held at different temperatures in MS media supplemented with various sucrose concentrations during 7 weeks cultures. A; cultures at 26 °C, B; 30 °C. Each value is the mean of three replicates SE.

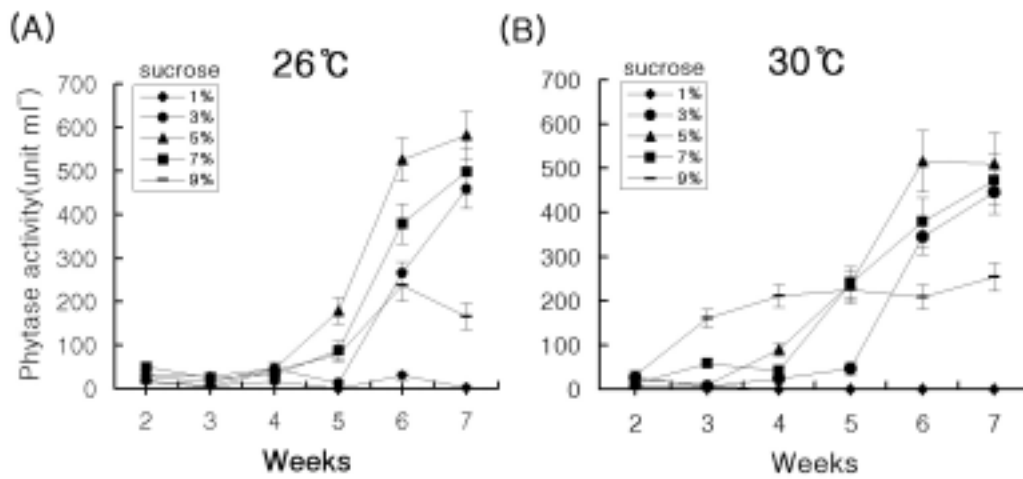


Fig. 3-2. Activity (units/mL liquid medium) changes of phytase protein secreted into liquid MS media supplemented with various sucrose concentrations and held at different temperatures during 7 weeks cultures. A; 26 °C, B; 30 °C. Each value is the mean of three replicates SE.

20 °C의 배양 온도 처리는 배제되었지만 20 °C의 배양 온도에서는 왜 그러한 현상이 나타나는 지에 대한 구체적인 원인에 대해서는 지속적인 연구를 통해서 규명되어야 할 것이다.

모상근의 biomass 배양을 위한 적정 배양 온도는 사용된 식물의 재료에 따라서 상당한 차이를 보여준다는 연구 결과는 몇몇 식물에서 보고되어 있지만 확실한 실험적 증거로서 결정된 바는 아직 없는 실정이다. 특히 모상근 배양을 통한 재조합 단백질의 생산과 관련된 연구 결과는 현재까지 그리 많지 않은 편이지만 일반적으로 식물세포의 배양 온도인 25-26 °C에서 배양하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서 수행된 참깨의 형질전환 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제의 생산과 관련된 모상근의 적정 배양에 관한 연구 결과는 전혀 보고된 바가 없어 본 실험에서 얻어진 실험 결과와 직접적으로 비교하기는 불가능하지만 다른 유사한 실험 결과와 비교해 볼 때 형질전환 참깨의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제의 효율적 생산을 위해서는 적정 배양 온도는 26-30 °C로 추정되었다. 본 실험 과정과는 다소 차이는 있지만 다른 연구 팀에서 수행한 *Datura* 모상근 배양에서는 biomass 성장 효율성과 배양 생산물의 생산량을 측정한 결과 25 °C에 처리된 배양 구 보다는 30 °C에서 처리된 배양 구에서 훨씬 높은 측정치가 보고된 바가 있다. 그러나 본 연구팀의 연구 결과는 이들의 연구 결과와 다소 있음을 보여주고 있다. 본 연구 팀의 실험결과에서는 26 °C의 처리 구와 30 °C 처리 구간의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제의 생산량에는 거의 차이가 없었다는 결과를 비교해 볼 때 식물의 재료에 따라서 모상근의 biomass 성장과 생산물의 적정 배양 온도는 다를 수 있다는 추정을 뒷받침 하고 있다.

일반적인 생화학적 특성으로 볼 때 주위 환경의 온도는 생체의 대사 작용에 직접적인 영향을 미친다. 따라서 모상근의 배양도 배양 온도에 따라서 생체 내의 대사 작용과 밀접한 상관관계를 가지게 될 것이며, 서로 다른 식물 재료에서 얻어진 모상근도 자체의 biomass 성장과 관련된 대사 작용에서 요구되는 적정 배양 온도에 따라서 모상근의 biomass 생장이 조절될 것이고, 모상근의 생산물도 관련 대사 작용에서 요구되는 각각의 배양 온도에 따라서 생산물의 생산량이 결정된다고 사료된다. 따라서 본 연구에서 얻어진 결과로 볼 때 참깨의 형질전환 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제의 효율적 생산을 위해서는 배양 온도는 26 °C와 30 °C 사이가 적합하다는 결론을 얻을 수 있었다.

2) 모상근의 biomass생장과 피타아제의 생산에 미치는 sucrose 농도의 영향

식물의 형질전환 모상근의 배양을 통하여 재조합 단백질이나 이차 대사물질을 생산하는 경우 뿐 아니라, 식물조직이나 식물의 세포를 배양하는 경우에도 당의 배지성분으로 주로 sucrose가 흔히 사용되고 있다. Sucrose는 배지 내에서 쉽게 용해될 뿐 아니라 식물이 용이하게 흡수할 수 있는 당 성분이기 때문에 거의 모든 식물조직의 당 성분으로 첨가되고 있다. 본 실험에서도 형질전환 참깨의 모상근의 배양배지에 sucrose가 사용되었고, 형질전환 참깨의 모상근 biomass의 성장과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 효율적 생산을 위한 적정 sucrose의 농도에 관한 실험을 수행하였다. 이를 위해 5 종류의 sucrose농도 (1%, 3%, 5%, 7%, 9%)를 처리하였으며, 이에 관한 실험 결과는 그림 3-1과 3-2에 잘 나타나 있다. 이들 그림에서 보여주고 있는 바와 같이 sucrose의 농도에 따라서 형질전환 참깨 모상근의 biomass 성장 반응과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산은 sucrose의 농도에 따라 현저하게 차이가 있다는 사실을 나타내고 있다. 26 °C의 배양 온도에서 5%의 sucrose 농도를 첨가하여 배양했을 경우에는 형질전환 참깨 모상근의 biomass생장 (18.9 g fresh weight/flask)과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산 (581.9 units/ml liquid medium)이 가장 높았다. 반면에 30 °C의 배양 온도에서는 3%와 5%의 sucrose 농도의 두 처리 구 모두 비슷한 측정치를 보여주었다 (모상근의 biomass생장은 24.9 g fresh weight/flask; 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산은 510.1 units/ml liquid medium). 이러한 실험 결과로 볼 때 형질전환 참깨의 모상근 배양과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 효율적 생산을 위한 sucrose의 적정 첨가 농도는 3%-5%사이에 있다는 사실을 보여주고 있으며, 이 실험 결과는 다른 연구팀의 실험에서도 비슷한 결과를 발표 한 바 있다.

그림 3-1과 3-2의 도표에 나타난 결과에 의하면 형질전환 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산은 모상근의 배양 기간에 따라서 sucrose 농도 별로 다양한 변화가 있다는 사실을 보여주고 있다. 이 그림들에 의하면 5주까지의 배양에서 볼 때 초기 배양기간 동안에는 모든 sucrose 농도에서 참깨 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질 생산은 26 °C에서 보다는 30 °C의 배양 온도에서 훨씬 높았으나, 배양 기간이 지남에 따라서 모상근의 biomass 성장과 피타아제의 최종 생산량은 1%와 3%의 sucrose농도를 제외 하고는 거의 비슷한 수치로 유지되었다 (그림 3-1과 3-2 참조). 이 그림에서 보여주는 또 하나의 특징은 4-5주 동안의 배양 기간에는 초기 모상근 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산은 26 °C의 경우 모든 sucrose 농도에서 아주 낮은 측정치를 보여주었으나, 30 °C의 배양 구에서는 높은 농도의 sucrose (7%와 9%)의 처리 구에서는 26 °C의 처리 구에 비해서 상대적으로 높은 수치의 측정치가 얻어졌다. 5주 이후의 배양기간 동안에는 30 °C의 처리 구의 모든 sucrose 농도에서 형질전환 참깨의 모상근 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산이 26 °C보다 훨씬 높게 측정

되었다 (그림 3-1과 3-2 참조). 그럼에도 불구하고 1%의 sucrose가 첨가된 처리 구에서는 26 °C와 30 °C의 배양 온도 처리 구 모두 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산이 거의 측정되지 않았으며, 그 이유로는 여러 가지 요인이 있겠지만 아마도 배양액과 모상근의 biomass 조직 간에 낮은 농도의 sucrose 농도로 생기는 물리적인 삼투현상의 차이 때문에 배양 액 속에 존재하는 sucrose가 모상근의 biomass 조직 내로 수송이 잘 되지 않기 때문인 것으로 생각되었다.

일반적인 식물세포의 배양에서는 배양 초기에 sucrose 농도를 높일 경우에는 세포의 성장속도가 높아질 뿐 아니라 biomass 성장 증가에 의한 생산물도 증가한다는 사실이 알려져 있지만, 본 연구에서 얻어진 실험 결과를 토대로 하여 볼 때 형질전환 모상근의 biomass의 성장과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산은 배양 온도와 첨가되는 sucrose의 농도의 상호 작용에 의해서 크게 영향을 받는다는 사실이 입증되었다. 이러한 사실은 최근의 여러 연구자들의 연구 결과에 의해서도 밝혀졌으며, 이들의 결과에 의하면 Atropa 식물속의 형질전환 모상근의 경우, 첨가된 sucrose의 농도 뿐 아니라 관련된 다른 요소들, 이를 테면 첨가되는 식물의 호르몬의 종류와 농도, 배양 온도 및 조사되는 빛의 조건과의 상호 작용에 의해서 형질전환 모상근의 biomass의 성장과 생산물의 생산량이 크게 영향을 받는다고 주장하였다. 다른 그룹의 연구자들에 의하면 sucrose는 식물의 주요 대사에 관여하는 유전자 발현의 조절 인자로 작용하기 때문에 모상근의 biomass 세포 성장에 적정 농도의 sucrose농도가 첨가되면 biomass의 생장이 유도되어 모상근의 biomass 성장 뿐 아니라 biomass의 세포에 의해서 생산되는 생산물의 생산도 유도한다고 해석하였다. 따라서 본 연구에서 얻어진 실험 결과도 이들의 해석에 따라 설명될 수 있을 것이며, 형질전환 참깨의 모상근의 biomass 성장 뿐 아니라 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 발현은 배양 온도와 sucrose 농도의 상호 작용이 아주 중요한 요인이라는 사실이 이 실험을 통하여 입증되었다.

3. 형질전환 참깨 모상근 biomass의 성장과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산에 미치는 배지의 영향

가. 연구수행 내용 및 방법

1) 연구내용:

형질전환 모상근의 배양에 사용되는 배지는 주로 Murashig-Skoog (MS) 배지와 Gamborg B5 (B5)로 알려져 있으나, 식물의 재료에 따라서 다양하게 사용되기도 한다. 참깨 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 효율적 생산을 위한 배양 배지에 대한 연구는 현재 까지 전혀 보고된 것이 없기 때문에 본 연구를 통하여 이와 관련된 실험들이 수행되었다. 따라서 본 실험에서는 네 종류의 배양

배지 즉, full-strength MS, half-strength MS, full-strength B5 및 half-strength B5 배양 배지를 사용하였으며, 이 배지들이 형질전환 참깨 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 발현에 미치는 영향에 관한 실험 수행이 본 연구의 주요 연구 내용이다.

2) 연구방법:

가) 플라스크 배양과 배지 처리

제2 세부과제에서 선발된 재조합 곰팡이 피타아제 단백질 생산하는 형질전환 참깨의 모상근 cell line을 MS 배양액에 배양한 후에 어느 정도 성장한 모상근을 약 170-180 mg을 채취하여 3%와 5%의 sucrose가 각각 첨가된 네 종류 배양 배지 (full-strength MS, half-strength MS, full-strength B5 및 half-strength B5) 200 ml를 함유하고 있는 500 ml 플라스크에 옮겨서 30 °C의 배양 온도에서 플라스크를 배양하였다.

나) 모상근 biomass 성장측정과 피타아제의 활성 측정방법

7주 동안 배양된 플라스크에서 성장한 형질전환 모상근의 biomass 생장은 앞에서 언급된 방법과 동일한 방법으로 측정하였으며, 네 종류의 배양 배지에서 수집된 각각의 배양 배지를 원심 분리하여 각각의 상등 액을 사용하여 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 활성을 측정하는 데 시료로 사용하였고, 피타아제 효소의 활성 측정은 앞에서 언급된 방법과 동일한 방법을 이용하여 피타아제의 효소 활성을 측정하였다.

나. 연구결과

식물의 조직이나 기관배양에서 중요하게 작용하는 배양 요인으로는 사용되는 호르몬의 종류와 농도, 배양 온도, 당의 종류와 농도 및 배지의 종류 등이 상당히 중요하다. 형질전환 모상근의 배양도 식물 조직 기관의 하나이므로 이러한 배양 요인의 의해서 상당한 영향을 받는다. 따라서 본 연구에서는 형질전환된 참깨의 모상근의 배양과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 효율적 생산을 위한 배양 배지의 선별을 위하여 네 종류의 배지를 이용하였으며 연구 결과는 다음과 같다.

아래 그림 3-3과 3-4는 본 실험에서 얻어진 실험 결과를 전체적으로 보여주고 있다. 이 그림에서 보여주는 바와 같이 형질전환 참깨의 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 발현은 full-strength MS의 배양 배지에서 가장 높은 측정치가 얻어졌다. 특히 sucrose의 첨가 농도를 3%와 5%로 하여 서로 다르게 처리하였음에도 불구하고 두 처리 간에는 큰 차이가 나타나지 않고 비슷한 측정치를 보여 주었다.

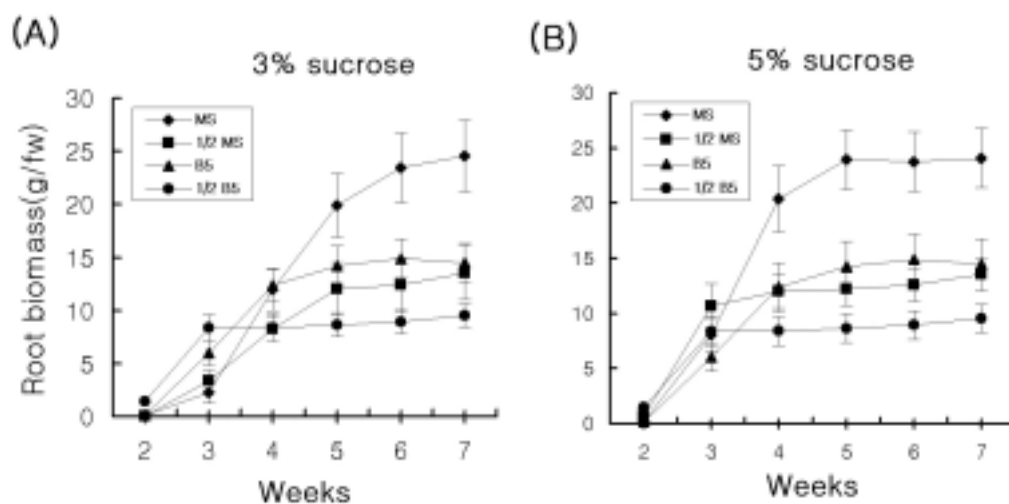


Fig. 3-3. Effect of culture medium on biomass growth (grams fresh weight/flask containing 200 mL medium) of transformed sesame hairy roots cultured in 4 different media supplemented with 3% or 5% sucrose levels and held at 30 °C. A; 3% sucrose level, B 5% sucrose level. . Each value is the mean of three replicates SE.

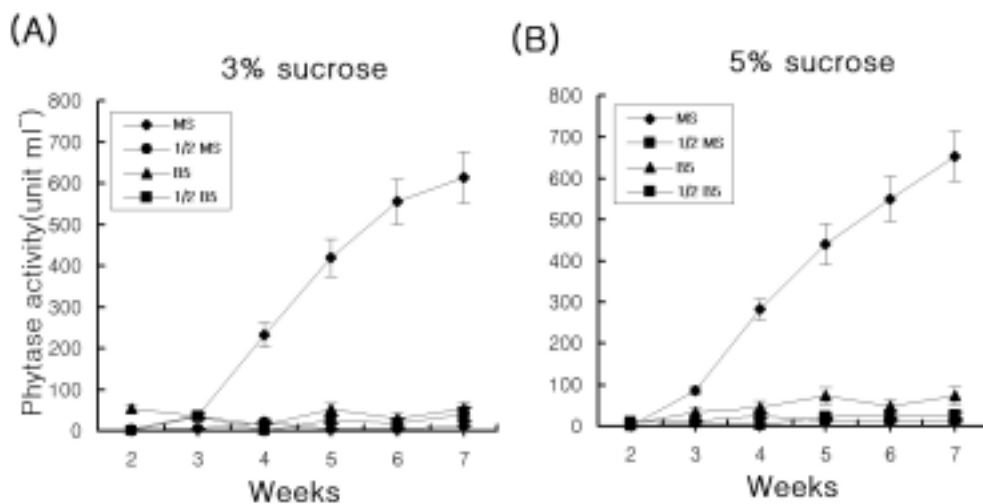


Fig. 3-4. Effect of culture medium on production (units/mL liquid medium) of the recombinant phytase proteins secreted into 4 different media supplemented with 3% or 5% sucrose levels and held at 30 °C. A; 3% sucrose level, B; 5% sucrose level. . Each value is the mean of three replicates SE.

형질전환 참깨 모상근의 경우 full-strength MS의 배양 배지에서 배양된 biomass 성장 (평균 24.3 g/flask)은 다른 세 종류의 배양 배지에서 배양된 biomass 성장 (평균 12.4 g/flask) 보다 약 두 배 정도의 높은 성장 율을 보여 주었다 (그림 3-3A와 B 참조). 이러한 결과는 배지 내에 함유되어 있는 배지 성분들 중에서도 형질전환 참깨 모상근의 biomass 성장 조절에 직접 영향을 끼치는 limiting 성분인 인(phosphorus)의 농도 차이 때문에 이러한 현상이 생긴 것으로 추정되었다. 이 실험의 결과에서 가장 특이한 실험 결과는 full-strength MS의 배양 배지에서 배양된 처리 구에서만 재조합 곰팡이 피타아제 단백질이 생산되었다는 사실이다 (그림 3-4A와 B 참조). 현재까지 알려진 바에 의하면 재조합 곰팡이 피타아제 단백질이 대두세포의 현탁 배양을 통하여 MS 액체 배양배지에서 생산된 적이 있지만, 형질전환 참깨의 모상근을 배양하여 재조합 곰팡이 피타아제 단백질을 생산하는 실험 결과가 보고된 적이 없다. 따라서 본 실험에서 얻어진 결과를 직접적으로 비교하기는 어려우나 재조합 단일 항체 단백질을 생산하기 위한 모상근의 배양 배지는 half-strength MS, full-strength B5 및 half-strength B5 등이 보다 더 효과적이라는 실험결과와 비교하면 본 실험 결과는 매우 특이하다고 생각된다. 형질전환 참깨의 모상근의 biomass가 네 종류의 배지에서는 성장하지만 (비록 네 종류의 배양 배지에서의 biomass 성장 차이는 있지만; 그림 3-3A와 B 참조) 재조합 곰팡이 피타아제 단백질이 full-strength MS의 배양 배지만 독점적으로 생산되는지에 (그림 3-4 A와 B 참조) 대한 이유에 대해선 확실한 실험적 증거를 제시할 수는 없지만 아마도 배지 내의 성분 구성의 차이 때문은 것으로 추종되었다.

4. 형질전환 참깨 모상근 biomass의 성장과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산에 미치는 배양기간의 영향

가. 연구수행 내용 및 방법

1) 연구내용:

모상근의 배양을 통하여 어떤 물질을 상업적으로 생산하고자 하는 경우에 문제되는 여러 요인들 중에서 경제적인 생산 요인이 중요한 요인 중의 하나가 될 것이다. 이러한 경제적인 요인을 위해서 고려해야 될 사항은 배지의 교환 시기 및 생산물의 수확 시기 등을 정확하게 찾아내는 것이 중요한 고려 사항이 된다. 따라서 본 연구에서는 앞에서 얻어진 자료를 종합하여 이러한 고려 사항을 찾아내기 위하여 본 연구 결과를 제시하였다.

2) 연구방법:

형질전환 참깨 모상근 biomass의 상대적인 성장 증가율과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 상대적인 생산 증가율을 측정하기 위하여 일주일 간격으로 측정 수치를 비교하여 막대그림으로 나타내었으며, 구체적인 방법은 그림 3-5A와 B의 그림 설명에 기술되어 있으며, 측정치는 앞에서 제시된 측정치가 이용되었다.

나. 연구결과

형질전환 참깨 모상근의 biomass 상대적인 성장 증가율과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 상대적인 생산 증가율을 비교한 결과는 아래의 막대그림 (그림 3-5A와 B 참조)에서 잘 보여주고 있다. 이 막대 그림에 나타나 있는 바와 같이 형질전환 참깨 모상근 biomass의 상대적인 성장 증가율 면에서 볼 때 5%의 sucrose 첨가된 4주째의 배양 구에서 가장 빠른 성장 증가율이 측정되었으며 (12.4 g fresh weight), 4주 이후부터는 biomass의 성장 증가율이 급격히 감소하기 시작하여 70%에서부터 90% 이상까지 biomass 성장 증가율이 감소하는 경향을 보여 주었으며 (그림 3-5A 참조), 이러한 결과로 볼 때 형질전환 참깨 모상근의 biomass 배양 기간은 4-5주간의 배양기간 적합한 것으로 추정되었다.

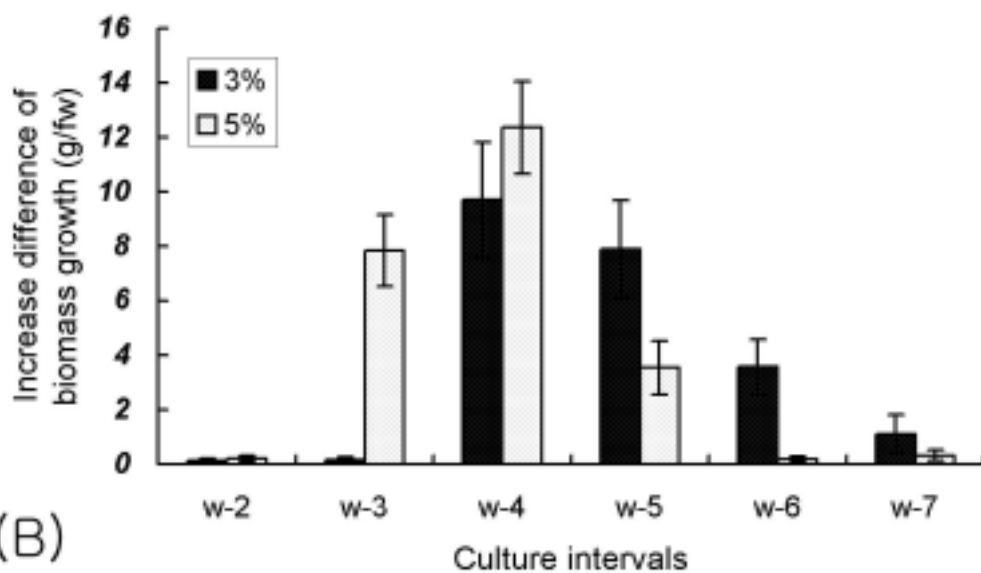
재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산 증가율의 경우에도 형질전환 참깨 모상근의 biomass 성장 속도 증가율과 유사한 경향을 보여 주었으나 5주-6주 사이에서는 피타아제 단백질의 생산 증가율은 아주 완만하게 감소하는 경향을 보여 주었지만 7주부터는 피타아제 단백질의 생산 증가율은 훨씬 높았다 (그림 3-5b 참조). 이 결과로 볼 때 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 최대 생산 시기는 배양 후 5-6주라는 사실이 확인되었다.

이 막대 그림에서 보여 주는 또 다른 특징은 모상근의 biomass 성장 증가율과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산 증가율을 배양 초기 3주 동안 비교한 결과에 의하면 3%의 sucrose에서 보다는 5% sucrose 농도의 처리 구에서 더 높은 증가율을 보여 주었다.

위의 결과를 종합해 볼 때 4주-5주의 모상근 배양 기간 사이에서 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산 증가율이 가장 활발하다는 사실과 그 배양 기간 이후부터 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산 증가율이 감소하기 시작한다는 사실을 알 수 있었다. 그러므로 형질전환 참깨 모상근의 배양을 통하여 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 효율적 생산을 위해서는 5-6주간의 배양 기간이 필요하며, 배양 조건은 5%의 sucrose가 첨가된 full-strength MS를 사용하여 30 °C의 배양 온도에서 연속적인 암 조건을 처리하는 것이 바람직하다는 결론을 얻을 수 있었다. 그러나 이 막대 그림에서 알 수 있는 바와 같이 4주 이후부터의 증가율 감소에 대한 이유는 확실히 알 수는 없으나 아마도

처음에 주입된 배양 배지에 함유된 배지의 영양 성분이 4주 이후부터 고갈되어 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산에 필요한 충분한 영양의 공급이 부족하기 때문에 모상근의 biomass 성장과 재조합 피타아제 단백질의 생산과 관련된 생체 내 대사 작용의 기능이 저해되거나 혹은 지연됨으로서 생기는 현상으로 사료되었다.

(A)



(B)

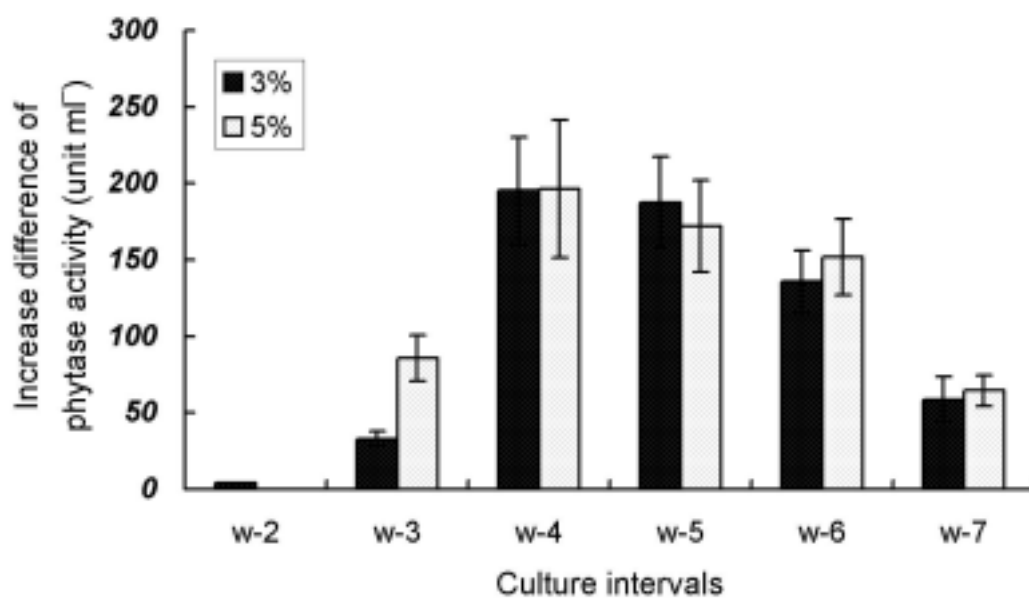


Fig. 3-5. Comparisons of increase rates in biomass growth (grams fresh weight/flask containing 200 mL medium) of sesame hairy roots (A) and production (units/mL liquid medium) of phytase protein (B) at one-week intervals during 7-week culture periods of the transformed sesame hairy roots. Increase difference was calculated using this expression;

Increase differences = mean values measured from the culture periods (weeks) in question - mean values measured from the previous culture periods (weeks).

Each value is the mean of three replicates ± SE.

5. 형질전환 참깨 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산에 미치는 유도제의 영향

가. 연구수행 내용 및 방법

1) 연구내용:

본 연구 분야에서는 참깨 모상근의 biomass 성장에 미치는 여러 종류의 유도제를 처리하여 형질전환 참깨 모상근의 biomass 성장 변화와 재조합 곰팡이 피타아제의 활성 변화에 미치는 영향에 관한 실험을 수행하였으며, 본 실험에서는 다음과 같이 크게 다섯 종류의 실험이 수행되었다. 첫 째는 Jasmonic acid 처리에 의한 참깨 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제의 활성 변화, 둘째는 PEG (polyethylene glycol 6000) 처리를 통한 참깨 모상근의 biomass 성장 변화와 재조합 곰팡이 피타아제의 활성 변화, 세 번째는 Silver nitrate 처리를 통한 참깨 모상근의 biomass 성장 변화와 재조합 곰팡이 피타아제의 활성 변화, 넷째는 KH_2PO_4 처리에 의한 참깨 모상근의 biomass 성장 변화와 재조합 곰팡이 피타아제의 활성 변화, 다섯 째는 SNP(sodium nitroprusside) 처리가 참깨 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제의 활성 변화에 미치는 영향에 관한 실험들을 수행하였다.

2) 연구방법:

(가) Jasmonic acid 처리를 통한 참깨 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제의 활성 측정

액상 배양중인 모상근으로부터 모상근 200 mg을 분리하여 200ml MS 액체배지가 들어있는 500ml의 플라스크에 넣어 연속적인 암 조건에서 배양하여 2주째에 Jasmonic acid 0.01 mM, 0.03 mM, 0.05 mM 농도로 각각 처리하여 5일 간격으로 무 처리구간과 비교하여 모상근의 biomass 성장 변화와 피타아제의 활성 변화를 측정하였다.

(나) PEG (polyethylene glycol 6000) 처리를 통한 참깨 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제의 활성 측정

액상 배양중인 모상근으로부터 모상근 200 mg을 분리하여 200 ml MS 액체배지가 들어있는 500 ml의 플라스크에 넣어 연속적인 암 조건에서 배양하여 2주째에 PEG (polyethylene glycol 6000) 0.5 g/L, 1 g/L, 1.5 g/L 농도로 각각 처리하여 5일 간격으로 무 처리 구간과 비교하여 모상근의 biomass 성장 변화와 피타아제의 활성 변화를 측정하였다.

(다) Silver nitrate처리를 통한 참깨 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제의 활성측정

액상배양중인 모상근으로부터 모상근 200 mg을 분리하여 200 ml MS 액체배지가 들어있는 500 ml의 플라스크에 넣어 연속적인 암 조건에서 배양하여 2주째에 Silver nitrate 1 mM, 2 mM, 3 mM 농도로 각각 처리하여 5일 간격으로 무 처리 구간과 비교하여 모상근의 biomass 성장 변화와 피타아제의 활성 변화를 측정하였다.

(라) KH₂PO₄처리를 통한 참깨 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제의 활성측정

KH₂PO₄의 농도를 각각 21.25 mg/L, 42.5 mg/L, 85 mg/L, 170 mg/L, 340 mg/L로 첨가된 200 ml의 MS 액이 담긴 500 ml의 플라스크에 배양중인 모상근 200 mg를 놓은 다음에 연속적인 암 조건에서 혈질전환 참깨 모상근을 배양하였으며, 모상근의 biomass 성장 변화와 피타아제의 활성 변화를 5일 간격으로 측정하였다.

(마) SNP(sodium nitroprusside)처리를 통한 참깨 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제의 활성측정

액상 배양중인 모상근으로부터 모상근 200 mg을 분리하여 200 ml MS 액체배지가 들어있는 500 ml의 플라스크에 넣어 연속적인 암 조건에서 배양하여 2주째에 SNP(sodium nitroprusside) 1 mM, 5 mM, 10 mM 농도로 각각 처리한 다음, 5일 간격으로 무 처리 구간과 비교하여 모상근의 biomass 성장 변화와 피타아제의 활성 변화를 측정하였다.

나. 연구결과

1) Jasmonic acid 처리를 통한 참깨 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제의 활성 측정결과

Jasmonic acid를 0.01 mM, 0.03 mM 및 0.05 mM 농도로 각각 처리한 결과에 대한 요약은 아래 그림 3-6에 잘 나타나 있다. 그림에서 보여주는 바와 같이 혈질전환 참깨의 모상근의 biomass 성장 (그림 3-6 참조)과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산 (그림 3-7 참조)에 미치는 jasmonic acid 처리는 영향을 미치지 않는 것으로 추정되었다. 표에서 보여주는 바와 같이 jasmonic acid 처리는 오히려 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산에 방해물질로 작용하고 있다는 결과를 보여주었다.

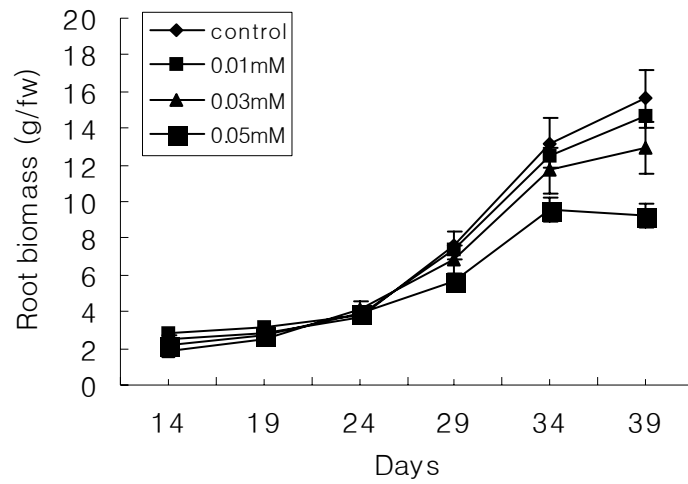


Fig. 3-6. Changes in biomass (grams fresh weight/flask containing 200 mL medium) of sesame hairy roots held at different Jasmonic acid concentrations in MS media during 39 days cultures. Each value is the mean of three replicates \pm SE.

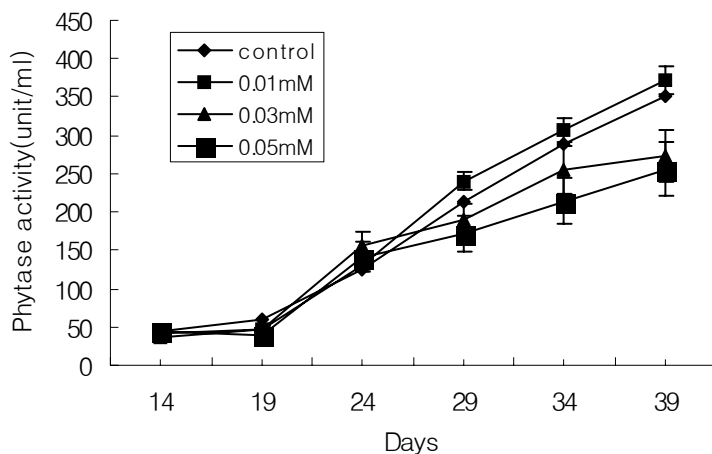


Fig. 3-7. Activity (units/mL liquid medium) changes of the recombinant fungal phytase protein secreted into liquid MS media supplemented with various Jasmonic acid concentrations during 39 days cultures. Each value is the mean of three replicates \pm SE.

2) PEG (polyethylene glycol 6000) 처리를 통한 참깨 모상근의 biomass 생장과 재조합 곰팡이 피타아제의 활성측정결과

그림 3-8과 3-9는 PEG처리를 하였을 경우에 변화되는 형질전환 참깨 모상근의 생장과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산에 대한 변화 양상이며, 이 그림들에서 보여주는 바와 같이 전체적으로 볼 때, 이들의 변화 양상에 미치는 PEG처리 효과는 농도 간에 큰 차이가 없었으나, 모상근 biomass 생장의 경우에는 1.5 g/L의 PEG 농도가 약간의 생장 효과가 있었다 (그림 3-8 참조). 반면에 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산 효과는 0.5 g/L의 PEG 농도에서 약간의 생산 증대 효과가 있었다 (그림 3-9 참조).

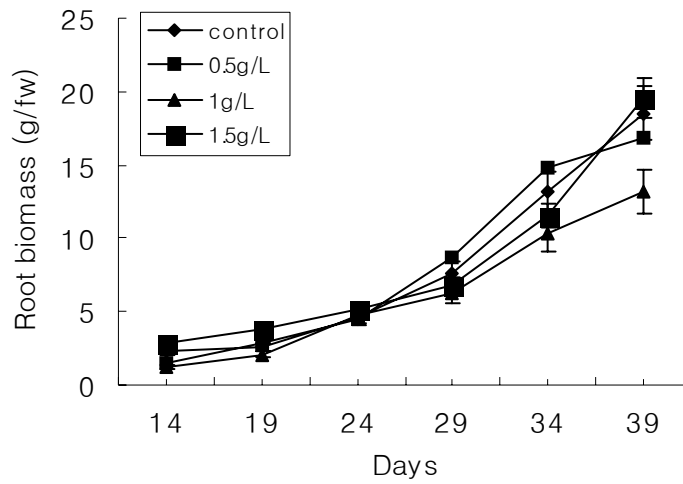


Fig. 3-8. Changes in biomass (grams fresh weight/flask containing 200 mL medium) of sesame hairy roots held at different PEG concentration in MS media during 39 days cultures. Each value is the mean of three replicates \pm SE.

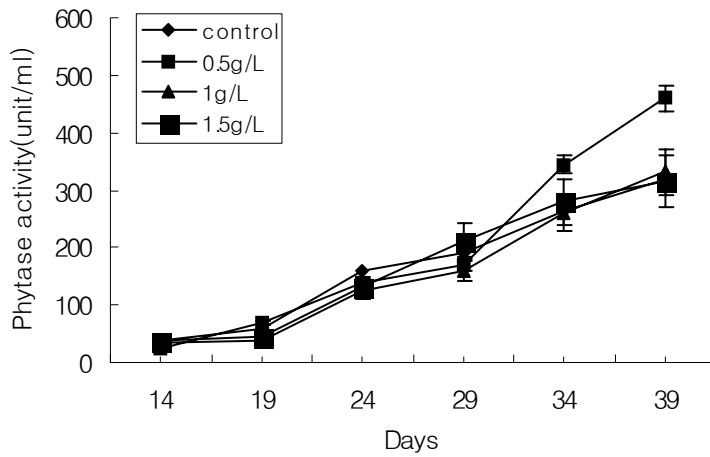


Fig. 3-9. Activity (units/mL liquid medium) changes of phytase protein secreted into liquid MS media supplemented with various PEG concentrations during 39 days cultures. Each value is the mean of three replicates \pm SE.

3) Silver nitrate처리를 통한 참깨 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제의 활성측정결과;

Silver nitrate는 식물세포 배양의 유도제로 상당한 효과가 있다는 사실은 여러 연구 결과에 의해서 입증된 바 있다. 따라서 본 실험에서도 silver nitrate의 농도를 1 mM, 2 mM 및 3 mM 처리하여 형질전환 참깨 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산에 미치는 효과를 검토하였으며, 그 결과는 그림 3-10과 3-11에 잘 나타나 있다. 이 그림에서 보여주는 바와 같이 배양초기에는 형질전환 참깨 모상근의 biomass 성장 율(그림 3-10 참조)과 재조합 곰팡이 피타아제의 발현 율이 비슷한 변화 양상을 보여주었으나 (그림 3-11 참조), 배양기간이 경과함에 따라서 biomass 성장과 재조합 피타아제의 발현 율의 증가는 무 처리구와 유사한 발현 증가 속도를 보여주었다. 그러나 1 mM silver nitrate의 처리 구에서는 모상근의 biomass 성장이 가장 높았으나, 재조합 곰팡이 피타아제의 발현 율은 무 처리구와 1 mM silver nitrate의 처리 구간에는 거의 차이가 없었지만 세 농도 중에서 가장 높은 발현 율을 보여주었다.

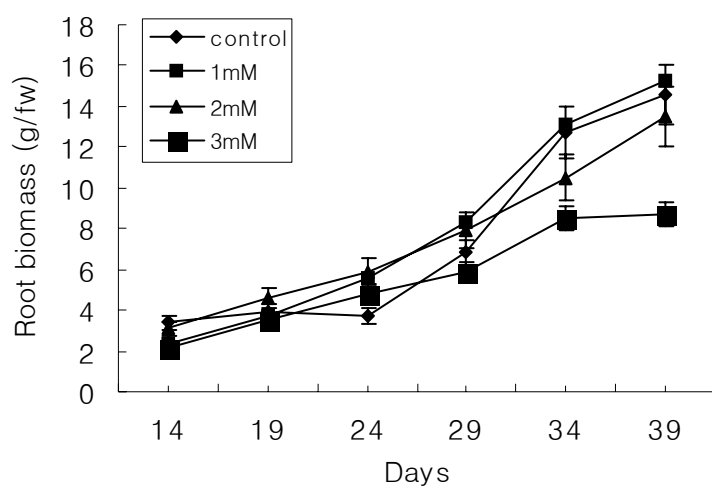


Fig. 3-10. Changes in biomass (grams fresh weight/flask containing 200 mL medium) of sesame hairy roots held at different silver nitrate concentrations in MS media during 39 days cultures. Each value is the mean of three replicates \pm SE.

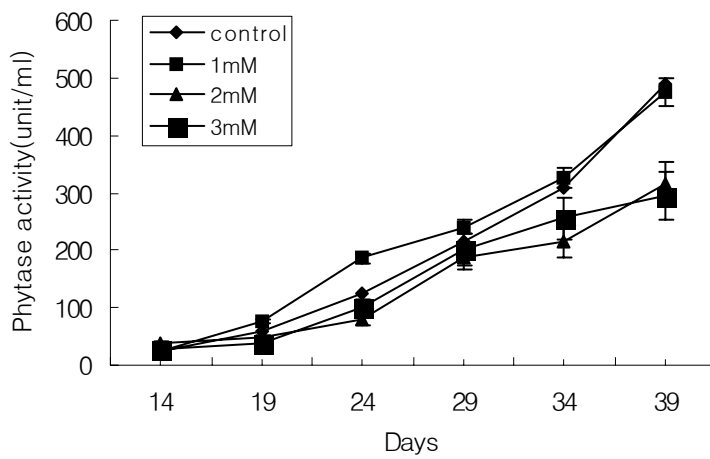


Fig. 3-11. Activity (units/mL liquid medium) changes of phytase protein secreted into liquid MS media supplemented with various silver nitrate concentrations during 39 days cultures. Each value is the mean of three replicates \pm SE.

4) KH_2PO_4 처리를 통한 참깨 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제의 활성측정 결과;

일반적으로 인산은 식물의 생장에 필수 원소이지만 각각의 배양 재료와 배양조건에 따라서 요구되는 인산의 농도는 상이하다. 특히 피타아제의 발현은 인산의 배양 농도에 의해서 상당히 영향을 받고 있기 때문에 본 실험에서 인산의 적정 농도를 검토하였다. 이를 위하여 MS의 기본 배지를 기본으로 하여 인산의 첨가 농도를 21.25 mg/L, 42.5 mg/L, 85.0 mg/L, 170 mg/L 및 340 mg/L의 농도로 서로 달리하여 형질전환 참깨의 모상근을 배양하였고, 아래 그림들은 본 실험의 결과를 잘 나타내주고 있다. 재조합 곰팡이 피타아제의 발현은 KH_2PO_4 농도가 높아질수록 참깨 모상근 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제의 활성이 증가함을 나타내었으나 85.0 mg/L이상에서는 참깨 모상근 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타아제의 활성이 크게 증가하지는 않았다. 이러한 실험 결과로 볼 때 인산의 농도는 형질전환 모상근의 biomass 성장 뿐 아니라 재조합 곰팡이의 발현에 인산의 농도가 상당히 영향을 미치는 것으로 확인되었다.

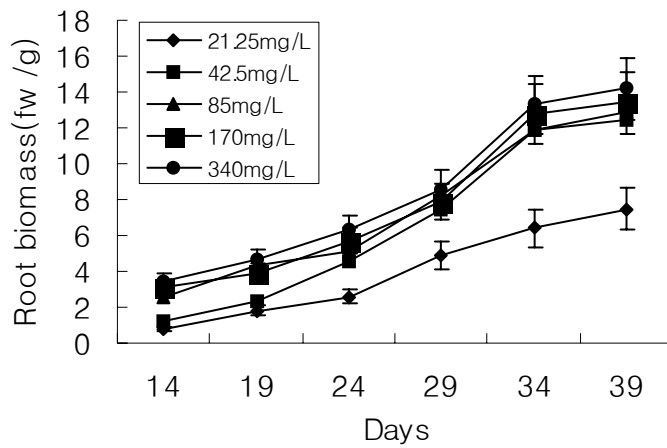


Fig. 3-12. Changes in biomass (grams fresh weight/flask containing 200 mL medium) of sesame hairy roots held at different KH₂PO₄ concentrations in MS media during 39 days cultures. Each value is the mean of three replicates±SE.

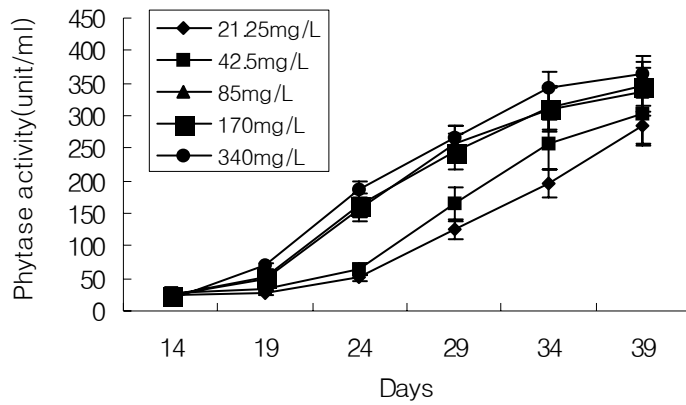


Fig. 3-13. Activity (units/mL liquid medium) changes of phytase protein secreted into liquid MS media supplemented with various KH_2PO_4 concentrations during 39 days cultures. Each value is the mean of three replicates \pm SE.

5) SNP (sodium nitroprusside)처리를 통한 참깨 모상근의 biomass 성장과 재조합 곰팡이 피타제의 활성측정결과;

SNP (sodium nitroprusside)가 식물 세포의 분열을 촉진시키는 신호 전달 물질로 알려진 이후 이 물질을 이용하여 biomass의 성장을 증가시키고 자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 따라서 본 실험에서도 SNP의 농도를 0.1 mM, 0.3 및 mM 0.6 mM의 농도를 처리하여 형질전환 참깨의 모상근 biomass의 성장과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산에 미치는 영향을 조사하였으며, 그 결과는 그림 3-14와 3-15에서 잘 보여주고 있다. 그림 3-14에서 나타나 있는 바와 같이 형질전환 참깨 모상근의 biomass의 성장에 미치는 SNP의 영향은 농도 간에는 큰 차이는 없으나 0.1 mM의 농도에서 성장율이 가장 높았다 (그림 3-15 참조). 반면에 재조합 곰팡이 피타아제의 발현은 호히려 무처리 구에서 가장 높은 발현율을 보여주었다 (그림 3-15 참조). 이러한 결과로 볼 때 형질전환 참깨 모상근의 biomass 성장 뿐 아니라, 재조합 곰팡이 피타아제의 발현은 SNP의 처리에 크게 영향을 받지 않는 것으로 추정되었다.

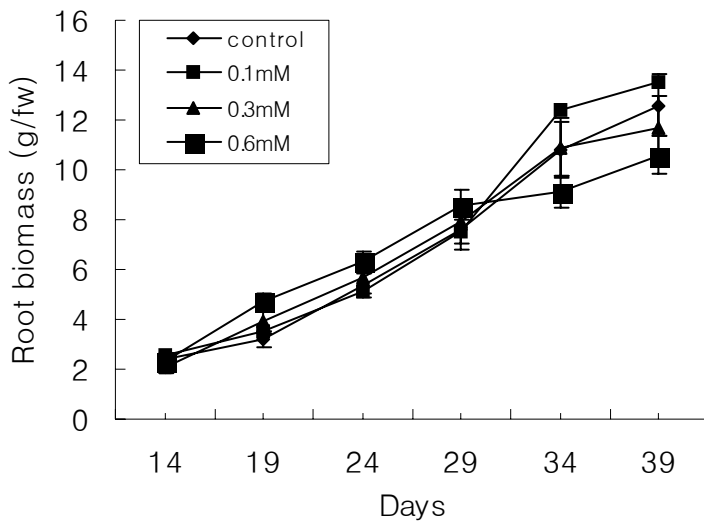


Fig. 3-14. Changes in biomass (grams fresh weight/flask containing 200 mL medium) of sesame hairy roots held at different SNP concentrations in MS media during 39days cultures. Each value is the mean of three replicates \pm SE.

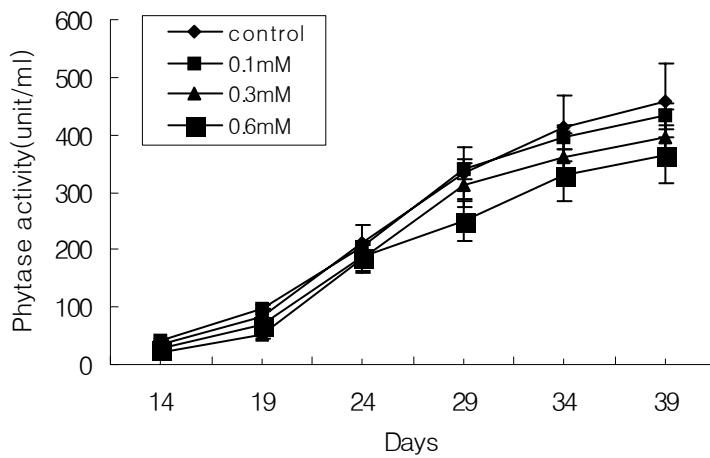


Fig. 3-15. Activity (units/mL liquid medium) changes of phytase protein secreted into liquid MS media supplemented with various SNP concentrations during 39 days cultures. Each value is the mean of three replicates \pm SE.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 목표 달성도

구 분	연구 목표의 달성도	
	연구목표	달성척도 (%)
1차년도 (2002- 2003)	▶ 재조합 곰팡이 피타아제 단백질을 생산하는 발현 벡터의 합성과 발현 분석 목표	100
	▶ <i>Agrobacterium rhizogenes</i> 에 의하여 참깨 배축으로부터 모상근이 형성되어 재조합 곰팡이 피타아제 단백질이 생산되는 참깨 모상근의 선발 목표	100
	▶ 형질전환된 참깨의 모상근의 플라스크 배양에 관한 기초자료의 실험 분석 목표	100
2차년도 (2003- 2004)	▶ 재조합 곰팡이 피타아제 단백질을 분리하여 효소 활성을 측정하는 방법과 정제하는 방법 등의 분석 자료를 확보	100
	▶ 형질전환 참깨 모상근으로부터 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 고발현 모상근의 cell line 선별과 연속배양 기술 확보	100
	▶ 고발현 우수 cell line으로부터 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 생산 효율이 높고 형질전환 참깨 모상근의 biomass 생장이 활발한 우수한 배양조건의 확보	100
3차년도 (2004- 2005)	▶ 형질전환참깨 모상근의 배양을 통하여 배양액 속으로 분비되는 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 기능 분석과 항체분석 자료 확보	100
	▶ 우수 참깨 모상근을 장기적으로 보관할 수 있는 방법에 관한 실험 분석 자료의 확보	100
	▶ 형질전환참깨 모상근의 생장과 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 효율적 생산을 위한 적정 배지와 배양 기간의 자료 확보	100
최종 달성목표	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 재조합 곰팡이 피타아제의 발현 벡터 합성 기술 ▶ 참깨 모상근의 형질전환 기술 ▶ 참깨 모상근의 효율적 배양 기술 ▶ 재조합 곰팡이 피타아제 고발현 우수 cell line 확보 ▶ 고발현 우수 cell line의 장기적 보존 기술의 확보 ▶ 연구 결과의 국내외 저명 학술지 논문 및 특허출원 	<p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>80</p>

제2절 관련분야에의 기여도

1. 기술개발에의 기대효과

본 연구과제에서는 곰팡이 *Aspergillus niger*에서 분리된 피타아제의 유전자를 재조합하여 발현 벡터를 합성한 후에 이 발현 벡터를 *Agrobacterium rhizogenes*에 옮겨서 참깨의 배축조직에 형질전환시켜서 얻어진 참깨 모상근을 배양함으로써 재조합 곰팡이 피타아제 단백질을 보다 효율적으로 생산하기 위한 기술을 개발하는 것이 주 연구 목적이다. 따라서 본 연구과제에서 개발된 주요 기술들은 주로 이와 관련된 실험 방법들이기 때문에 이 실험 기술들은 다음과 같은 분야의 기술 개발에 기여가 높을 것으로 생각된다.

가. 재조합 단백질의 효율적 발현 벡터의 합성 기술

본 과제에서 사용된 재조합 곰팡이 피타아제 단백질의 발현 시스템은 주로 분자생물학적인 발현 원리에 기반을 두고 합성된 것이므로 발현에 필요한 프로모터, enhancer 및 signal peptide 등의 합성에 연관된 발현 벡터의 합성 전략에 관한 기술을 제공함으로써 재조합 단백질을 효율적으로 생산 하고 자 하는 관련 분야에 기초 기술로서 이용성이 높을 것이다.

나. *Agrobacterium rhizigenes*에 의한 참깨의 형질전환과 모상근의 생산기술

현재까지 알려진 바에 의하면 참깨조직의 형질전환과 모상근의 생산에 관한 기술 개발은 본 연구과제에서 처음으로 시도되었다. 따라서 이 기술의 개발은 일종의 원천기술이므로 이와 유사한 기술을 이용하여 연구하고 자하는 연구자나 혹은 이 방법을 이용한 산업화 기술 개발에 기여가 높을 것으로 생각된다.

다. 선발된 우수 모상근 cell line의 보존 기술

재조합 곰팡이 피타아제 단백질을 다량 생산하는 선발된 우수 모상근 cell line을 장기적으로 보존하는 기술을 개발함으로써 이 cell line이 필요한 경우에 언제든지 사용할 수 있다. 따라서 이 기술은 재조합 곰팡이 피타아제 단백질 뿐 만 아니라 다른 재조합 단백질의 경우에도 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

라. 형질전환 참깨 모상근의 효율적 배양 기술

위에서도 언급된 바와 같이 형질전환 참깨의 모상근의 생산은 본 연구과제에서 처음으로 시도되었기 때문에 이 모상근의 배양을 위한 배양 조건도 본 연구과제에서 처음으로 개발한 기술이다. 따라서 이 기술은 참깨 뿐 만 아니라 다른 유사한 기술을 개발하고 자 하는 연구자나 산업체에서 이용이 가능할 것으로 기대된다.

2. 경제 산업적 기대효과

피타아제의 세계시장은 연간 약 5억불 정도로 추산되고 있으나(한국은 약 100-120억원/년), 피타아제에 의해서 부수적으로 생산되는 인의 이용 율을 합치면 그보다 훨씬 높은 경제적 가치를 가지고 있는 것으로 믿어진다. 특히 단위가축이나 양식어류의 분뇨에 의하여 생기는 환경오염을 감소시키기 위해서 피타아제의 효용성이 중요시 될 뿐 아니라, 가축과 양식 어류의 사료성분으로서 인의 활용 측면에서도 피타아제의 가치는 중요하다고 생각된다. 현재 가축 및 양식어류의 사료에 피타아제를 첨가하는 경우 사료비가 약간 증가한다고 우려하고 있지만 최근의 연구결과들에 의하면 피타아제가 첨가된 사료에는 무기태 인을 첨가하지 않아도 가축의 발육에 전혀 지장을 받지 않는다는 사실이 확인되고 있기 때문에 오히려 사료비의 절감효과가 예상되고 있다. 현재 세계적인 기업에서는 기능이 강화된 피타아제의 개발과 더불어 생산비를 절감할 수 있는 생산 system의 기술개발을 경쟁적으로 서두르고 있는 실정이다. 앞으로 우리나라에서도 축산 및 양식 어류의 분뇨로 인하여 일어나는 환경오염을 예방하기 위하여 동물사료에 피타아제의 첨가를 법적으로 의무화한다면 피타아제의 수요는 급격히 증가할 것으로 예상되고 있다. 앞에서 언급된 바와 같이 형질전환된 참깨의 모상공의 배양을 통하여 곰팡이 피타아제의 생산이 가능해진다면 기존의 미생물 피타아제 생산비보다는 낮은 비용이 소요될 것으로 사료된다. 그 이유로는 첫째, 모상공은 지속적인 배양이 가능하여 단위시간당 생산량이 상대적으로 높을 것으로 예상되고, 둘째는 생성물의 분리정제가 비교적 수월하다는 점이고, 셋째는 배지의 성분으로 볼 때 상대적으로 저렴한 가격의 배지사용이 가능하여 생산비의 절감효과가 예상될 뿐 아니라, 배양조건이 비교적 간단하므로 적은 투자비용으로 생산시설을 설치할 수 있는 이점이 있으므로 피타아제의 산업적 생산을 위한 피타아제 대량 생산기술을 개발하는 데에 기여도가 높을 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구과제에서 개발된 기술들은 주로 기초 기술이지만 응용기술도 포함되어 있다. 따라서 기초 기술의 개발은 주로 관련된 전문 학술지에 논문 발표를 목표로 하고 있으며, 응용 기술들은 지적 재산권으로 특허를 출원할 예정이다.

가. 국내외 저명 학술지 발표 및 논문 게재

본 연구과제에서 얻어진 연구 결과물들 중에서 기초 학술에 관련된 기술의 개발 자료는 국내외의 학술 발표회에 발표함으로써 본 연구결과의 우수성을 널리 알리도록 할 것이다. 국외 학술 발표는 2건이 발표되었으며, 국제학술지에 2 편의 논문이 게재 예정으로 있다 (아래 첨부자료 참조).

Expression and characterization of extracellular fungal phytase in transformed sesame hairy root cultures

Un-Ho Jin^a, Jae-An Chun^a, Jin-Woo Lee^a, Young-Byung-Yi^b, Shin-Woo Lee^c,
Chung-Han Chung^{a,*}

^a Department of Biotechnology, Dong-A University, Pusan 604-714, Republic of Korea

^b Department of Plant Genetic Engineering, Dong-A University, Pusan 604-714, Republic of Korea

^c Department of Crop Science and Biotechnology, Jeju National University, Jeju 660-758, Republic of Korea

Received 27 May 2004, and in revised form 17 June 2004

Available online 31 July 2004

Sesame hairy root cultures for extra-cellular production of a recombinant fungal phytase

U.H. Jin^a, J.A. Chun^a, M.O. Han^a, J.W. Lee^a, Y.B. Yi^b, S.W. Lee^c, C.H. Chung^{a,*}

^a Department of Biotechnology, Dong-A University, 840, Ha-Dae-Dong, Se-Ha-Gu, Pusan, Pusan, 604-714 South Korea

^b Department of Plant Genetic Engineering, Dong-A University, Pusan 604-714, South Korea

^c Department of Crop Science & Biotechnology, Jeju National University, Jeju 660-758, South Korea

Received 3 May 2005; received in revised form 6 May 2005; accepted 11 May 2005

나. 특허 출원 및 기술이전 추진

응용 분야의 기술 개발 자료는 가능한 국내외적인 특허를 고려하고 있으며, 현재 1-2건의 자료를 정리 중에 있다. 그리고 본 연구 개발의 결과를 원하는 연구자나 기업에게도 기술을 이전할 수 있도록 할 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구과제와 유사한 실험 과정을 통하여 재조합 항체 단백질의 상업적 생산 기술이 개발되었을 뿐 아니라, 고가의 재조합 인체 단백질도 식물의 모상근 배양 배양기술로 생산하는 시스템 개발에 관한 연구도 현재 선진 각 국에서 활발하게 진행 되고 있다.

제 7 장 참고문헌

- R. J. Wodzinski, A. H. J. Ullah, Phytase, *Advances in Applied Microbiology* 42 (1996) 263-302.
- Pen, T. C. Verwoerd, P. A. van Paridon, R. F. Beudeker, P. J. M. van den Elzen, K. Geerse, J. D. van der Klis, H. A. J. Versteegh, A. J. J. van Ooyen, A. Hoekema, Phytase-containing transgenic seeds as a novel feed additive for improved phosphorus utilization, *Bio/Technology* 11 (1993) 811-814.
- S. P. Golovan, M. A. Hayes, J. P. Phillips, C. W. Forsberg, Transgenic mice expression bacterial phytase as a model for phosphorus pollution control, *Nature Biotechnology* 19 (2001) 429-433.
- W. van Hartingsveldt, C. M. J. van Zeijl, G. M. Harteveld, R. J. Gouka, M. E. G. Suykerbuyk, R. G. M. Luiten, P. A. van Paridon, G. C. M. Selten, A. E. Veenstra, R. F. M. van Gorcom, C. A. M. J. J. van Hondel, Cloning, characterization and overexpression of the phytase-encoding gene (phyA) of *Aspergillus niger*, *Gene* 127 (1993) 87-94.
- B. L. Liu, A. Rafiq, Y. M. Tzeng, A. Rob, The induction and characterization of phytase and beyond, *Enzyme Microb. Technol.* 22 (1998) 415-424.
- T. C. Verwoerd, P. A. van Paridon, A. J. J. van Ooyen, J. W. M. van Lent, A. Hoekema, J. Pen, Stable accumulation of *Aspergillus niger* phytase in transgenic tobacco leaves, *PlantPhysiol.* 109 (1995) 1199-1205.
- J. Li, C. E. Hegeman, R. W. Hanlon, G. H. Lacy, D. M. Denbow, E. A. Grabau, Secretion of active recombinant phytase from soybean cell-suspension culture, *Plant Physiol.* 114 (1997) 1103-1111.

- Y. M. Han, X. G. Lei, Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase (*phyA*) in *Pichia pastoris*, Arch. Biochem. Biophys. 364 (1999) 83-90.
- A. H. J. Ullah, K. Sethumadhavan, E. J. Mullaney, T. Ziegelhoffer, S. Austin-Phillips, Characterization of recombinant fungal phytase (*phyA*) expressed in tobacco leaves, Biochem. Biophys. Res. Commun. 264 (1999) 201-206.
- A. Giri, L. Narasu, Transgenic hairy roots: recent trends and applications, Biotech. Adv. 18 (2000) 1-22.
- R. Wongsamuth, P. M. Doran, Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots, Biotech. Bioeng. 54 (1997) 401-415.
- V. Bonhomme, D. Laurain-Matter, J. Lacoux, M-A. Filiniaux, A. Jacquin-Dubreuil, Tropane alkaloid production by hairy roots of *Astropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium tumefaciens* containing rol A, B, C, genes only, J. of Biotech. 81 (200) 151-158.
- S. R. Rao, G. A. Ravishankar, Plant cell cultures: Chemical factories and secondary metabolites, Biotech. Adv. 20 (2002) 101-153.
- A. H. J. Ullah, D. M. Gibson, Extracellular phytase (E.C. 3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: purification and characterization, Prep. Biochem. 17 (1987) 63-91.
- A. H. J. Ullah, B. J. Cummins, Purification, N-terminal amino acid sequence and characterization of pH 2.5 optimal acid phosphatase (E.C. 3.1.3.2) from *Aspergillus ficuum*, Prep. Biochem. 17 (1987) 397-422.
- A. H. J. Ullah, B. J. Cummins, *Aspergillus ficuum* extracellular pH 6.0 optimum phosphatase: Purification, N-terminal amino acid sequence, and biochemical

- characterization, *Prep. Biochem.* 18 (1988) 37–65.
- A. H. J. Ullah, *Aspergillus ficuum* phytase: Partial primary structure, substrate selectivity, and kinetic characterization, *Prep. Biochem.* 18 (1988) 459–471.
- M. Wyss, L. Pasamontes, A. Friedlein, R. Remy, M. Tessier, A. Kronenberger, A. Middendorf, M. Lehmann, L. Schnoebelen, U. Rothlisberger, E. Kuszniir, G. Wahl, F. Muller, H.-W. Lahm, K. Vogel, A. P. G. M. van Loon, Biophysical characterization of fungal phytase (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): Molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance, *Applied and Environmental Microbiology* 65 (1999) 359–366.
- M. Wyss, R. Brugger, A. Kronenberger, R. Remy, R. Fimbel, G. Oesterheld, M. Lehmann, A. P. G. M. van Loon, Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): Catalytic properties, *Applied and Environmental Microbiology* 65 (1999) 367–373.
- H. J. Cho, J. M. Widholm, N. Tanaka, Y. Nakanishi, Y. Murooka, *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and regeneration of the legume, *Plant Sci.* 138 (1998) 53–65.
- M. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1979) 248–254.
- Y.-O. Kim, H.-K. Kim, K.-S. Bae, J.-H. Yu, T.-K. Oh, Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11, *Enzyme and Microbial Technology* 22 (1998) 2–7.
- D. Jay, D. J. Culp, M. R. Jahnke, Silver staining of extensively glycosylated proteins on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel: enhancement by

- carbohydrate-binding dyes, *Anal. Biochem.* 185 (1990) 324-330.
- S. Al-Asheh, Z. Duvnjak, The effect of phosphate concentration on phytase production and the reduction of phytic acid content in canola meal by *Aspergillus carbonarius* during a solid state fermentation process, *Appl. Microbiol. Biotech.* 43 (1995) 25-30.
- A.H.J. Ullah, E. j. Mullaney, Disulfide bonds are necessary for structure and activity in *Aspergillus ficuum* phytase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227 (1995) 311-317.
- Christey MC. Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants. *In Vitro Cell. Dev Biol- Plant* 2001;37:687-700.
- Hamill JD, Lidgett JD. Hairy roots cultures-opportunities and key protocols for studies in metabolic engineering. In: Doran, PM, editor. *Hairy roots: Culture and applications*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1997. p. 1-29.
- Giri A, Narasu L. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotech Adv* 2000;18:1-22.
- Kim YJ, Wyslouzil BE, Weathers PJ. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 2002;38:1-10.
- Wongsamuth R, Doran PM. Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots. *Biotech Bioeng* 1997; 54: 401-415.
- Bonhomme V, Laurain-Mattar D, Lacoux J, Fliniaux M-A, Jacquin-Dubreuil A. Tropane alkaloid production by hairy roots of *Astropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium tumefaciens* containing *rol A, B, C*, genes only. *J Biotech* 2000;81:151-158.
- Luczkiewicz M, Zarate R, Dembinska-Migas W, Migas, P, Verpoote, R. Production of pulchelin E in hairy roots, callus and suspension cultures of *Rudbeckia*

- hirta* L. Plant Sci 2002;163:91-100.
- Rao SR, Ravishankar G.A. Plant Cell Cultures: Chemical factories and secondary metabolites. Biotech Adv 2002;20:101-153.
- Payne J, Hamill JD, Robins RJ, Rhodes MJC. Production of hyoscyamine by 'Hairy Root' cultures of *Datura atramonium*. Planta Medica 1987;53:474-478.
- Moreno-Valenzuela O, Coello-Coello J, Loyola-Vargas VM, Vazquez-Flota F. Nutrient consumption and alkaloid accumulation in hairy root line of *Catharanthus roseus*. Biotech Letters 1999;21:1017-1021.
- Allan EJ, Eeswara JP, Jarvis AP. Induction of hairy root cultures of *Azadirachta indica* A. Juss. and their production of azadirachtin and other important insect bioactive metabolites. Planta 2002;21:374-379.
- Santos PAG, Figueiredo AC, Lourenco PMI, Barroso JG, Pedro LG, Oliveira MM, Schripsema J, Deans SG, Scheffer JJC. Hairy cultures of *Anethum graveolens*(dill): establishment, growth, time-course study of their essential oil and its comparison with parent plant oils. Biotech Letters 2002;24:1031-1036.
- Shanks JV, Morgan J. Plant 'hairy root culture. Curr Opin Biotech 1999;10:151-155.
- Doran PM. Foreign protein production in plant tissue cultures. Curr Opin Biotech; 2000;11:199-204.
- Giddings G, Allison G, Brooks D, Cater A. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. Nature Biotech 2000;18:1151-1155.
- Scheller J, Guhrs K-H, Grosse F, Conrad U. Production of spider silk proteins in tobacco and potato. Nature Biotech 2001;19:573-577.
- Andersen DC, Krummen L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. Curr Opin Biotech 2002;13:117-123.

- Borisjuk NV, Borisjuk LG, Logendra S, Petersen F, Gleba Y, Raskin I. Production of recombinant proteins in plant root exudates. *Nature Biotech* 1999;17:466-469.
- Pen J, Verwoerd TC, van Paridon PA, Beudeker RF, van den Eizen PJM, Geerse K, van der Klis JD, Versteegh HAJ, van Ooyen AJJ, Hoekema A. Phytase-containing transgenic seeds as a novel feed additive for improved phosphorus utilization. *Bio/Technology* 1993;11:811-814.
- Herbers K, Wilke I, Sennewald U. A thermostable xylanase from *Clostridium thermocellum* expressed at high levels in the apoplast of transgenic tobacco has no detrimental effects and is easily purified. *Bio/technology* 1995;13:63-66.
- Verwoerd TC, van Paridon PA, van Ooyen AJJ, van Lent JWM, Hoekema A, Pen J. Stable accumulation of *Aspergillus niger* phytase in transgenic tobacco leaves. *Plant Physiol* 1995;109:1199-1205.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
- Cho HJ, Widholm JM, Tanaka N, Nakanishi Y, Murooka Y. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and regeneration of the legume. *Plant Sci* 1998;138:53-65.
- Fosket DE. *Plant growth and development A molecular approach*. Academic Press, Inc., San Diego, CA 1994.
- Thum KE, Shasha DE, Lejay LV, Coruzzi GM. Light- and carbon-signaling pathways. Modeling circuits of interactions. *Plant Physiol* 2003;132:440-452.

- Hilton MG, Rhodes MJC. Growth and hyoscyamine production of 'hairy root' cultures of *Datura stramonium* in a modified stirred tank reactor. *Appl Microbiol Biotech* 1990;33:132-138.
- Rothe G, Draeger B. Tropane alkaloids—metabolic response to carbohydrate signal in root cultures of *Atropa belladonna*. *Plant Sci* 2002;163:979-985.
- Suresh B, Rajasekaran T, Rao SR, Raghavarao KSMS, Ravishankar GA. Studies on osmolarity, conductivity and mass transfer for selection of a bioreactor for *Tagetes patula* L. hairy. *Process Biochem* 2001;36:987-993.
- Gibson SI. Plant sugar-responsive pathways. Part of a complex regulatory web. *Plant Physiol* 2000;124:1532-1539.
- [31] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Planta* 1962;15:473-497.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 1968;50:151-158.
- Al-Asheh S, Duvnjak Z. The effect of phosphate concentration on phytase production and the reduction of phytic acid content in canola meal by *Aspergillus carbonarius* during a solid state fermentation process. *Appl Microbiol Biotech* 1995;43:25-30.
- Li J, Hegeman CE, Hanlon RW, Lacy GH, Denbow DM, Grabau EA. Secretion of active recombinant phytase from soybean cell-suspension cultures. *Plant Physiol* 1997;114:1103-1111.
- Wodzinski RJ, Ullah AHJ. Phytase. *Adv Appl Microbiol* 1996;42:263-302.
- Liu B-L, Rafiq A, Tzeng Y-M, Rob A. The induction and characterization of phytase and beyond. *Enz Microbiol Technology* 1998;22:416-424.
- Zhao, J., L. C. Davis and R. Verpoorte. 2005. Elicitor signal transduction leading to

- production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23: 283-333.
- Hu, X., S. J. Neill, W. Cai and Z. Tang. 2003. Nitric oxide mediates elicitor-induced saponin synthesis in cell cultures. *Functional Plant Biology*, 30: 901-907.
- Pitta-Ivalez S. I., T. C. Spollansky and A. M. Giulietti. 2000. The influence of different biotic and abiotic elicitors on production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enz. Microbial Technology*, 26: 252-258.
- Wang, Q. C. O. Batuman, P. Li and M. Bar-Joseph. 2002. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of "Troyer" citrange [*ponirus trifoliata*] (L.) Raf. X *Citrus sinensis* (L.) O'Neil.] by encapsulation-dehydration. *Plant Cell Rep.* 20: 901-906.
- Pennycooke, L.E. and Towill. 2000. Cryopreservation of shoot tips from in vitro plants of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by vitrification. *Plant Cell Rep.* 19: 733-737.
- Wu, Y., Y. Zhao, F. Engelmann, M. Zhou, D. Zhang and S. Chen. 2001. Cryopreservation of apple dormant buds and shoot tips. *CryoLetters*, 22: 375-380.
- Jitsuyama, T. Susuki, T. Harada and S. Fujikawa. 2002. Sucrose incubation increases freezing tolerance of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic cell suspensions. *CryoLetters*, 23: 103-112.
- Decruse, S. W. and S. Seeni. 2002. Ammonium nitrate in the cultures medium influences regeneration potential of cryopreserved shoot tips of *Holostemma annulare*. *CryoLetters*, 23: 55-60.

Moukadiri, O., J. E. O'Connor and M. J. Cornejo. 2002. Effects of the cryopreservation procedure on recovered cell populations. *CryoLetters*, 23: 11-20.

Fuller, B. J. 2003. Gene expression in response to low temperatures in mammalian cells: A review of current ideas. *CryoLetters*, 24: 95-102.