

3장. 배양배지의 성분

1절. 배지 성분

배지는 배양하는 조직을 지탱하고 양분을 공급해주는 역할을 하는 곳으로, 항상 무균상태로 유지되어야한다. 용기 내에서 배양체를 종속 영양성으로 키우는데 필요한 영양분과 식물생장 조절물질을 포함하고 있다.

1-1. 물

95%가 물이며 물은 증류수나 탈 염수를 사용한다. 물에 있는 불순물은 배지의 pH에 영향을 미칠 수 있기 때문에 보관은 폴리에틸렌 병이나 pyrex 유리용기에 하는 것이 좋다.

1-2. 무기영양소

▪ 대량원소 (Macronutrient)

· 질소 (Nitrogen, N)

- 식물의 성장속도에 관여하는 원소로써 시약은 NH_4NO_3 이다. chloropyll, alkaloids, nucleic acids와 일부 hormone, amino acid의 구성원소이다. 결핍 시에 잎이 황화되고 생육장애 혹은 지연이 일어나고 과다할 경우 죽게 된다.

· 인산 (Phosphorous, P)

- Meristem이나 생육이 왕성한 조직에 다량 함유되어 있지만 아직 그 정확한 역할은 밝혀지지 않았다. 주로 생체 내에서 에너지 변환, 단백질과 핵산의 합성에 관여하며 효소의 활성화에 관여하는 것으로 생각된다. Potassium phosphate(KH_2PO_4)나 Sodium phosphate (NaH_2PO_4)로 공급되며 결핍 시 식물체가 비정상 또는 병든 것 같은 증상을 나타낸다.

· 칼륨 (Potassium,K)

- 세포분열, 탄수화물, 단백질합성, chloropyll 합성, nitrate 감소에 관여하며 Potassium nitrate(KNO_3), Potassium phosphate(KH_2PO_4) 그리고 Potassium chloride(KCl) 으로 공급된다. 결핍 시 세포의 팽압이 없어져서 식물체가 연약하고 비정상적으로 되어 세균감염에 약해진다.

· 황 (Sulfur, S)

- SO_4^- 상태로 배지에 공급되며 일부 단백질의 구성요소로써 잎을 푸르게 하고 뿌리의 발달을 촉진하는 역할을 한다. 또한 부족할 경우 단백질 합성이 결핍되는 증상이 나타난다.

· 칼슘 (Calcium, Ca)

- Calcium chloride (CaCl_2)이나 Calcium nitrate($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)의 상태로 공급되며 Calcium pectate 세포막의 구성요소이다. 세포막의 permeability와 관계가 있고 탄수화물과 아미노산의 이동을 용이하게 한다. 또한 뿌리의 발육을 촉진하는 작용을 한다. 따라서 부족 시에는 뿌리의 발육이 빈약하여 정단부의 잎 주변이 검은색이 되고

생장이 정지되면서 심할 경우 그 부분이 괴사할 수 있다.

· 마그네슘 (Magnesium, Mg)

- chlorophyll의 주요구성요소이며 효소 활성화물질로써도 중요하다. phosphorylation에 필요하고 식물체 내에서 자유로이 확산된다. 공급되는 시약은 Magnesium sulfate ($MgSO_4$) 이다.

· 철 (Iron, Fe)

- Ferrous sulfate ($FeSO_4$) 으로 공급되며 엽록소의 전구물질 형성에 필요하다. 광합성과 호흡작용의 에너지 전환에 관여하며 식물 체내에 흡수, 용이하도록 하기 위하여 Ethylene-diamine tetraacetic acid(EDTA) 첨가한다. 결핍 시에는 잎에 심한 황갈색 증상이 나타난다.

▪ 미량원소 (Micronutrient)

· Boron, B

- 페놀산 대산, 리그닌의 생합성 분열조직에 연관되어 있으며 RNA합성에 필요한 N-염기의 합성과 식물 체내의 당의 이동에 관여하는 것으로 추정된다. 결핍 시에는 뿌리 생장이 정지되며 H_2PO_4 및 기타이온의 흡수량이 감소된다. 또한 결핍하면 시토키닌합성이 떨어지고 세포분열이 억제되어 핵에서 RNA합성이 감소된다. 시약은 Boric acid (H_3BO_3) 형태로 배지에 첨가한다.

· Molybdenum (Mo)

- 질소대사에 관여하며 nitrogen → ammonia 전환에 관계한다. 효소의 구성성분으로 철분의 보조효소로 작용하기도 하며 Sodium molybdate ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) 형태로 공급되고 결핍되면 NO_3 가 독성을 나타낸다.

· Manganese (Mn)

- Chloroplast membrane의 필수 구성 요소로써 호흡과 광합성에 관여하며 IAA산화효소의 활동이 증가하여 내생옥신의 수준이 감소하고 EDTA와 결합한 Mn은 자연산 옥신의 산화를 촉진시킨다. Manganese sulfate ($MnSO_4$) 형태로 공급 된다.

· Cobalt (Co)

- Vitamin B₁₂ ($C_{63}H_{90}N_{14}O_{14}$ PCo)의 구성요소이며 질소고정에 필수원소로서 착염 독성으로부터 조직을 보호하고 구리와 철분이온이 축매 하여 일어나는 산화반응을 억제하는 간접효과가 있다. Cobalt chloride ($CoCl_2$)에서 공급되며 에틸렌합성을 억제한다.

· Zinc (Zn)

- 일부 enzyme의 필수원소로 Chlorophyll 형성, auxin(IAA) 생산에 관여하며 결핍 시에는 단백질, 핵산, 엽록소의 합성이 감소되며 증상은 절간이 짧고 잎이 작아진다. Zinc sulfate ($ZnSO_4$) 의 시약으로 공급된다.

· Copper (Cu)

- Energy conversion에 관여하는 것으로 추측되며 리그닌과 같은 식물의 중용한 중합체를 구성하는 페놀화합물과 수산화 반응에 관여한다. 결핍 시 생육지연, 기형, 뒤틀리고 얼룩진 잎, tip die-back이 일어난다. Cupric sulfate ($CuSO_4$)의 상태로 공급된다.

- Chlorine (Cl)
 - Calcium chloride (CaCl_2) 의 형태로 공급되며 광합성 촉진에 필수요소이다. 팽압을 유지하고 유리된 원형질체는 Mn^{+2} 과 함께 광합성의 광 시스템에서 산소방출에 필요하다. 결핍 시 잎이 시들고 황화, 갈변하여 고사한다.
- Iodine (I)
 - Potassium Iodide (KI) 의 형태로 공급되지만 일부 아미노산의 구성요소이나 배지의 필수요소로 생각되지는 않는다.

1-3. 유기영양소

- 탄수화물 (Carbohydrate)
 - 식물체의 구성성분 중에 95%를 차지하며 Sugar, Starch, Cellulose 형태이다. 이들은 Carbon (C), hydrogen (H), oxygen (O)이다. 역할은 배양체의 영양원으로서 작용하고 또한 삼투물질을 조절하는데 사용한다. 식물체는 주요 Sucrose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) 를 사용하며 이는 광합성의 간접생산물, 식물조직에 많이 함유된다.
- Vitamin B
 - Nositol ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)
 - 일종의 Vitamin B complex로서 탄수화물의 보조제로 취급되며 Chloroplast membrane의 구성요소이다. 이는 Pectine과 Hemicellulose의 생합성과정에 관여하여 생장을 촉진 시킨다.
 - Thiamine (Vitamin B1, $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{O}_4\text{S}$)
 - 탄수화물대사의 필수 보조효소로서 아미노산의 생합성에 직접 관여하여 특히 Citric acid cycle 내의 유기산회로에서 도움을 주는 보조효소로 작용한다. 어느 비타민보다 가장 많이 사용하여 왔으며 계대배양을 계속하면서 필요성이 더하다.
 - Nicotinic acid (niacin, $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_2\text{N}$)
 - 식물체의 모든 부분에 분포되어 있으며 두개의 NAD와 NADP의 보조효소의 구성원으로 발견되었다. 보조효소는 수소의 전이과정과 관계가 있다. Niacin은 전구물질인 트립토판에서 합성되며 트립토판은 Auxin 중에 IAA의 전구물질이기도하다.
 - Pyridoxine (Vitamin B6, $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N}$)
 - 피리독신은 피리독살로 나타나서 인산화작용으로 활성인 피리독신인산이 되며 피리독신 인산은 decarboxylation과 아미노산기의 전달반응에서 보조효소로 작용한다.
 - Pantothenic acid ($\text{C}_9\text{H}_{17}\text{O}_5\text{N}$)
 - 지방대사에서 coenzyme이다.
 - Folic acid ($\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_6$) :
 - vitamin B coenzyme으로 활동한다.
 - Choline ($\text{C}_5\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N}$)
 - vitamin B complex 안의 alkaloid이다.
 - Riboflavin ($\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{N}_4$)
 - Vitamin B12 이다.
- Vitamin H (Biotin, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{N}_2\text{S}$) - 지방대사에서 coenzyme으로 활동한다.
- 생장조절물질

미량으로 식물 생리활성을 조절하는 물질로 배양식물 내에서 합성되기도 하지만 그 능력이 떨어지기 때문에 인공적으로 합성된 것을 넣어줘야 한다. Auxin, Cytokinins, Gibberellin, ABAs, Ethylene이 주로 사용되며 비율에 따라 식물체의 유도성장이 가능하므로 굉장히 중요하다. 특히, Auxin과 Cytokinin의 비율이 조직배양에서 굉장히 중요하다.

· Auxins

- 세포분열 없이 세포를 증대시키고 뿌리 형성과 정단우열 현상 그리고 줄기에서 부정아 형성에 영향을 미친다. 대부분 cytokinins과 함께 다양한 식물의 성장단계에 관여하며 뿌리형성 시에는 cytokinins의 농도가 낮고 줄기 형성 시에는 auxin의 농도가 낮다. 천연 hormone을 쓰기도 하지만 인공적으로 합성해서 쓰기도 한다. 종류는 다음과 같다. IAA (indoleacetic acid) IBA (indolebutyric acid), 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), NAA (naphthaleneacetic acid), pCPA (para-chlorophenoxyacetic acid), NOA (α -naphthoxyacetic acid), BTOA (2-benzothiazole acetic acid), PIC (picloram), 2,4,5-T (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid).

· Cytokinin

- 휴면 종자 및 눈의 발상을 촉진하고 측아 성장, 잎의 확대 성장, 세포 분열 촉진, 분화 및 형태 형성을 촉진 시키므로 조직 배양에 이용된다. 또한 줄기 절편 신장, 뿌리 성장, 부정근 형성과 노화를 저해한다. cytokinin 역시 자연적인 것과 인공적으로 합성된 hormone 두 가지를 사용한다. BA(6-benzyladenine, benzylaminopurine), Kinetin (6-furfurylaminopurine), Zeatin, ZiP (2-isopentyladenine), Thidiazuron (a cytokinin-like substance)

· Gibberellins

- 휴면 종자 및 눈의 발아 촉진, 줄기 신장 및 잎의 확대 성장 촉진, 기관 분화와 노화 억제에 연관이 있으며 과일 성장, 화아 형성에 관계가 있다. 또한 α -amylase 합성을 촉진시켜 종자의 발아를 촉진 시킨다.

· Ethylene

- 휴면종자 및 눈의 발아 촉진, 측아 성장 억제, 부정근 형성 촉진, 과일 성숙 촉진, 노화 촉진, 기관 탈리 유도와 관계가 있다.

· Abscisic acid

- 종자와 눈의 발아 억제, 뿌리 성장 억제, 부정근 형성 촉진, 기관 탈피 촉진, 겨울에 휴면유도 (mRNA 생산 억제), 노화 촉진, 기공 개폐의 조절과 연관이 있다.

▪ Amino acids

- 비타민과 유사한 작용을 하는 것으로써 조직의 성장을 최대로 하기 위해서 배지에 첨가하는 것이 좋다. 흔히 L-cystein [$\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$], Glycine ($\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2$) 등이 사용되며 식물체 내에서 1차적인 유기 질소로 이용된다.

▪ 천연추출물

- 천연추출물로는 야자유, 오렌지 주스, 토마토 주스, 포도 주스, 파인애플 주스, 자작나무 즙, 바나나, 맥아추출물 및 옥수수유 등이다. 천연추출물은 혼합물의 성분을 확실히 알 수 없는 뿐만 아니라 품종이나 개체별로 성분의 차이가 같은 결과를 재현하기 어렵다. 또한 과실의 숙기에 따라 차이가 있을 뿐만 아니라 같은 성숙도를 가진 것 사이에

서도 차이가 있다.

1-4. 불활성 지지물

- 식물이 배양되는 고체 혹은 반고체 배지를 만들기 위해서는 불활성 지지물이 필요하다. 불활성 지지물에는 Agar, Agarose, Gelatin, Gellite이 있다.
- Agar - Agarose 전 단계로 해초(으뭇가사리)에서 얻으며 glucose라 영양분으로 사용되고 0.4%~0.8%에서 배지를 반고체로 만들어 배양체를 지지한다.
- Agarose - agar를 더 분리한 것으로 입자가 더 고우며 Agar보다 고급이다.
- Gelatin - 영양분은 없지만 값이 싸고 투명하여 현재 많이 쓰이고 있다.
- Gellite - 고도로 정제된 교질재료로 성형이 빠르고 순도가 높아 정교한 배양에 이용된다.
- 불활성 지지물은 염의 형태에 따라 교질강도를 달리한다. 즉, +2가 염의 첨가가 +1가 염의 첨가 보다 교질강도가 높다.

1-5. 기타물질

- Coconut milk : 난과 식물에서는 필수이다.
- Casein hydrolysate
- Yeast extract : 비타민의 천연 sources이다.
- Activated charcoal(활성탄) : 독성물질을 흡착시켜 정화해 준다.



<활성탄>



<활성탄 배지>

2절. 배지 조성표

배지의 조성은 간단하게 미량원소와 대량원소로 구분된다. 대량원소는 탄소원과 질소원이며 미량원소는 생장조절물질과 비타민 등이다. 다음 표는 조직배양에서 일반적으로 사용되는 배지의 조성표이다.

■ 미량.대량원소 ■ 비타민류 ■ 한천(Agar) ■ pH

성분	MS	White	B5	VW
(NH ₄) ₂ SO ₄			134	500
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	720	250	250
Na ₂ SO ₄		200		
KCl		65		
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440		150	
KNO ₃	1900	80	2500	525
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O		300		
NH ₄ NO ₃	1650			
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O		16.5	150	
KH ₂ PO ₄	170			150
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8			
Na-EDTA	37.3			
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	7	10	7.5
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	3	2	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025		0.025	
Fe ₂ (SO ₄) ₃		2.5		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025		0.025	
KI	0.83	0.75	0.75	
H ₃ BO ₃	6.2	1.5	3	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25		0.25	
Fe-EDTA			40	
Ca ₃ (PO ₄) ₂				200
주석산철				28
Sucrose	30g	2g	20g	20g
myo-Inositol	100		100	
Nicotin Acid	0.5	0.5	1.0	
염산피리독신	0.5	0.1	1.0	
염삼 티아민	0.1~1	0.1	10	
판토텐산칼슘		1		
글리신	2	3		
염산시스틴		1		
한천	10g	5g	9~10g	16g
pH	5.7~5.8	5.5	5.5	5.0~5.2