

지치 (紫草 : *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.)

세포 배양에 의한 시코닌계 색소생산

박수남, 이현태, 한기태

(태평양기술연구소)

적 요

식물 조직 배양에 의한 유용 2차 대사 산물 생산의 일환으로 최근 Bio 화장품 원료로 각광받고 있는 나프토퀴논계의 시코닌 색소에 관하여 연구하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

지치 세포배양시 식물 성장 조절 물질의 최적 농도는 2,4-D 0.2 ppm, Kinetin 0.1 ppm 이었다.

색소생산시 산화알루미늄을 색소생산배지에 첨가하였을 때 색소 생산량이 급격히 증가하였으며 이때의 최적 농도는 배지 70 ml에 1.5 g을 첨가하였을 때 였다.

또한 색소생산에 미치는 IAA의 최적농도는 0.5 ppm이었으며 Kinetin의 농도변화는 색소생산에 영향이 없었다.

I. 서 론

시코닌계 색소는 나프토퀴논계 색소로서 지치과(Boraginaceae)식물인 지치(紫草: *Lithospermum erythrorhizon*)의 뿌리에서 얻어지는 적자색의 색소이다. 시코닌계색소는 10여종의 유도체로 구성되어 있으며(Fig.1) 약리작용으로 항균(1), 항염 및 조직재생효과(2)가 있어 예로부터 각종 피부병, 화상, 절상, 동상 및 치질의 치료에 이용되어 왔고, 최근 고급의류의 염색염료 및 화장품 원료로도 이용되고 있다. 그러나, 지치식물의 뿌리에서 추출할 수 있는 색소의 양은 식물체 건량의 1%이하로 제한되어 있으며, 지리적, 시기적, 기후적인 제약조건으로 인한 공급의 불안정등이 문제로 대두되었다.

이런 문제들을 극복하기 위한 방법으로 지치식물 세포의 인공배양에 의한 시코닌계 색소의 대량생산에 관하여 관심을 갖게 되었으며 많은 연구가 행해져 왔다.

칼루스 배양에 의한 색소의 생성이 최초로 보고된 이래 (3) 광 및 오옥신류의 색소 생성에의 영향(3), Ca^{2+} , Fe^{2+} 이온농도의 영향(4), 질소원의 종류 및 농도의 영향(5), PO_4^{3-} , Cu^{2+} , SO_4^{2-} 이온의 영향(6)등 배지성분의 색소생성에의 영향이 보고 되었으며, 2 단계 배양법에 의해 색소 생산량의 급격한 증가를 이룩하게 되었다(7). 또한 시코닌 생합성에 관

Table 1. Composition of MS and M-9 media

Component	MS (mg/l)	M-9 (mg/l)
NH_4NO_3	1650	0
KNO_3	1900	80
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0	694
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	750
KH_2PO_4	170	0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8	0
Na_2EDTA	37.3	0
NaFeEDTA	0	1.8
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	3
H_3BO_3	6.2	4.5
KI	0.83	0
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.3
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0	19
KCl	0	65
Na_2SO_4	0	1480
Sucrose	30000	30000
Inositol	100	0
Thiamine HCl	0.1	0
Nicotinic acid	0.5	0
Pyridoxine HCl	0.5	0

칼루스 계대배양

4주간 유도한 칼루스를 칼루스 유도시와 동일한 조건에서 4주 간격으로 계대배양 하였다.

액체배양

계대배양중인 칼루스를 동일조건 액체배지에서 액체배양 하였다. 배양시 진탕 속도는 100 rpm으로 하였으며, 2주간격으로 계대배양 하였다.

전처리 배양

액체배양중인 세포를 70 μ m mesh 로 여과하여 세포를 모아 IAA 0.2 ppm, Kinetin 0.1 ppm을 함유한 MS 배지에서 3주간 배양하여 색소생산 실험재료로 사용하였다.

색소생산 조건 실험

전 처리 배양된 세포를 1 g 취하여 각종의 색소생산 배지를 70 ml 함유한 250 ml 삼각 플라스크에 넣어 2주간 배양한 후 색소 생산량을 조사하였다.

색소정량

색소 생산이 끝난 세포를 Toyo #1 filter paper 로 여과하여 세포를 모은 후 알칼리성 에탄올로 색소를 추출한 후 산성조건에서 ether 분획을 취하여 감압 농축하였다. 소량의 에탄올에 녹인 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 색소 함량을 계산하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

칼루스 유도시 식물성장 조절제의 최적조건은 MS 배지에 2,4-D 0.2 ppm, Kinetin 0.1 ppm을 첨가하였을 때 었으며, IAA를 사용하였을 때는 색소를 함유하는 칼루스가 소량 유도되었다(Fig.2). 또한 계대배양시의 식물성장 조절제의 최적농도는 칼루스 유도시와 동일하였다.

세포의 성장에는 2,4-D의 사용이 적절하나 2,4-D는 시코닌 생합성 과정을 저해하여 (8) 색소생성이 저해되므로 세포성장 기간과 색소생성단계를 분리시키는 2단 배양이 필요 하리라 생각된다.

색소생산 실험에 있어서 색소생산 배지는 이미 발표된 M9 배지를 사용하여 본 결과 (Table 2) 색소 생산량이 미약하였다. 이는 Fujita 등 (6)에 의한 결과의 2.4%에 해당 한다. 이와 같이 낮은 색소의 생산성을 보이는 원인은 첫째, 배지 성분중에 색소생산 저해물질이 존재하여 색소 생합성을 저해하며 둘째, Embryogenic callus가 형성되지 못하 여 색소의 생산성이 낮다고 생각된다.

Table 2. Effect of aluminum oxide on the production of shikonin derivatives

Media (g/flask)	Contents of shikonin derivatives (mg/l)
MS	0
M9	3.57
M9 + 0.5g Al ₂ O ₃	23.00

이에 본 연구실에서는 최적 색소생산 조건을 규명하기 위한 방법으로 각종 흡착제를 처리하여 본 결과 M9 배지에 산화알루미늄을 첨가한 배지에서 색소의 생성량이 급격히 증가함을 볼 수 있었다. (Table 2, Fig. 3)

산화 알루미늄의 작용 기작은 흡착제 처리에 의해 배지내의 색소생산 저해물질이 제거되어 색소 생산량이 증가 되었다고 생각되어지며 저해물질 제거에 의해 더 높은 수율의 증대를 기대할 수 있으리라 생각된다.

산화 알루미늄의 최적처리 농도는 플라스크당 1.5 g이었으며 (Table 3) 이 때 최적 식물성장 조절제의 농도는 IAA의 경우 0.5 ppm이었고 (Table 4) Kinetin의 농도 변화와는 무관하였다. (Table 5)

Table 3. Effect of aluminum oxide concentration on the production of shikonin derivatives

Concentration of aluminum oxide (g/flask)	Contents of shikonin derivatives (mg/l)
0.5	13.36 ± 0.00
1.0	17.86 ± 4.21
1.5	24.29 ± 1.79
2.0	15.14 ± 0.86
3.0	12.79 ± 0.29
4.0	9.00 ± 0.57

Table 4. Effect of IAA concentration on the production of shikonin derivatives

Concentration of IAA (ppm)	Contents of shikonin derivatives (mg/l)
0.2	26.14
0.5	28.86
1.0	27.43
3.0	7.29
5.0	8.00
10.0	2.43

Table 5. Effect of kinetin concentration on the production of shikonin derivatives

Concentration of kinetin (ppm)	Contents of shikonin derivatives (mg/l)
0.2	26.14
0.5	26.00
1.0	26.14
3.0	24.71
5.0	34.43

또한 Embryogenic callus 형성에 의해 보다 높은 색소생산이 기대되며 고생산주 선별등에 의한 수율증대에 관하여 계속적인 연구수행이 필요하리라 생각된다.



Fig. 2. Effect of plant growth regulators on the induction of callus.

A : IAA 0.2ppm kinetin 0.1ppm
B : 2, 4-D 0.2ppm kinetin 0.1ppm

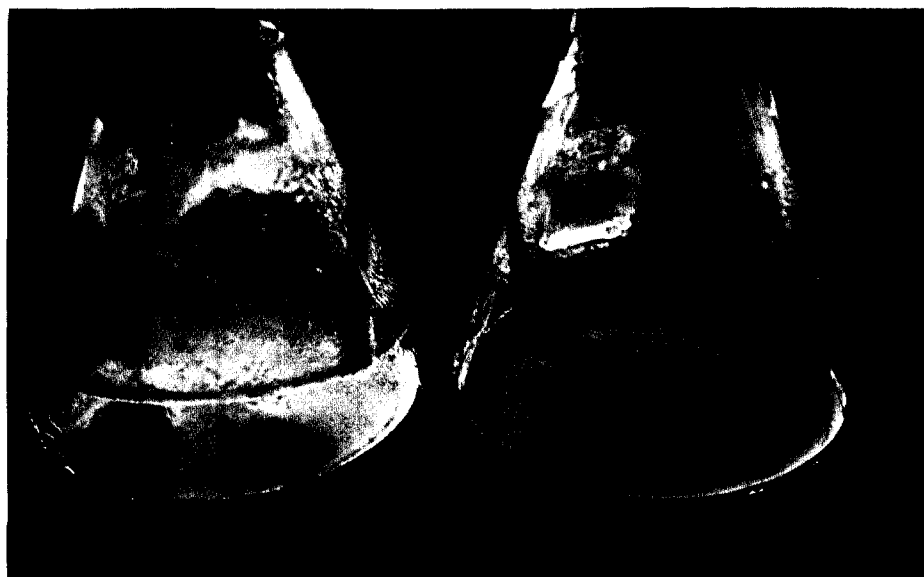


Fig. 3. Effect of aluminum oxide on the production of shikonin derivatives

A : M9 medium
B : M9 medium + 0.5g Al_2O_3

참 고 문 헌

1. Hanaka, H. and Kotani, Y. (1982) Yakugaku Zasshi 92, 525.
2. Hayashi, Tsurumi, S. and Fujimura, H. (1969). Japan J. Pharmacol. 65, 195.
3. Tabata, M., Mizukami, H., Hiraoka, N. and Konoshima, M. (1974). Phytochemistry 13, 927-932.
4. Mizukami, H., Konoshima, M., and Tabata, M. (1977). Phytochemistry chemistry 16, 1183-1186.
5. Fujita, Y., Hara, Y., Ogino, T. and Suga, C. (1981). Plant cell reports 1, 59-60.
6. Fujita, Y., Hara, Y., Suga, C. and Morimoto, T. (1981). Plant cell reports 1, 61-63.
7. Fujita, Y., Tabata, M., Nishi, A. and Yamada Y. (1982). Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture 399-400.
8. Inouye, H., Ueda, S., Inoue, K. and Matsumura, H. (1979). Phytochemistry 18, 1301-1308.
9. Yazaki, K., Fukui, H. and Tabata, M. (1986). Phytochemistry 25, 1627-1632.
10. Heide, L. and Tabata, M. (1987). Phytochemistry 26, 1645-1650.
11. Heide, L. and Tabata, M. (1987). Phytochemistry 26, 1651-1655.

ABSTRACT

Production of shikonin derivatives through cell suspension culture of Lithospermum erythrorhizon was investigated.

Optimal concentrations of IAA and kinetin on the growth of cell suspension were 0.2 and 0.1 ppm respectively.

Pigment content was markedly increased when aluminum oxide was added to the production medium and its optimal concentration was 1.5g/70ml medium.

The most effective concentration of IAA was 0.5 ppm and the production of pigment did not depend on the kinetin concentration.