

器內培養 人蔘細胞株의 Anthocyanin 形成과 生長反應

安仁玉 · 朴芝昶 · 崔光泰

韓國人蔘煙草研究所 遺傳生理部

(1989년 3월 11일 접수)

The Formation of Anthocyanin and Growth Response of Ginseng Cell Lin *in vitro*

In-Ok Ahn, Ji-Chang Park and Kwang-Tae Choi

Division of Genetics and Physiology, Korea Ginseng & Tobacco

Research Institute, Science Town, Taejon 302-345, Korea

(Received March 11, 1989)

Abstract □ In order to clarify the characteristics of anthocyanin-producing cell line selected by *in vitro* grown cultures of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer), the calli of anthocyanin-producing strain were cultured on media supplemented with different concentrations of 2,4-D and sucrose under light or dark condition. The light was found to be essential for anthocyanin synthesis. Anthocyanin synthesis of ginseng cell line was inhibited by the increase of 2,4-D in the medium. On the other hand, sucrose promoted the anthocyanin-production and the optimum concentration of sucrose for the highest production of anthocyanin was 5%. The growth of anthocyanin-producing cell line was best on the medium supplemented with 0.5 mg/l 2,4-D and 5% sucrose.

Keywords □ Anthocyanin, 2,4-D, light, sucrose.

서 론

식물의 세포 및 조직배양기술이 개발되어 모든 식물에 적용될 수만 있다면 식물체 내에 함유되어 있는 특수성분을 器內培養을 통하여 二次代謝產物로 손쉽게 얻을 수가 있을 것이다. 그래서 최근에는 식물의 조직을 器內培養하여 alkaloid,^{4,19)} steroid,¹²⁾ phenol,⁵⁾ saponin^{2,3,9,10,13)} 등의 유용한 二次代謝產物를 생산하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 특히 의약품 및 색소로 이용되는 shikonin⁶⁾의 경우에는 *Lithospermum erythrorhizon*의 세포배양을 통하여 대량생산 단계에 있는 실정이다.

인삼은 옛날부터 내려오는 우리나라 고유의 영약으로서, 지금까지 알려진 인삼 유효성분 중의 하나인 saponin을 器內培養을 통하여 생산하는 연구를

遂行하여 그 가능성을 보고한 바 있는데,^{2,3,13)} 연구 중에 우연히 anthocyanin 색소를 형성하는 세포주를 선발할 수 있었다. 본 연구는 선발한 人蔘細胞株의 특성을 구명하기 위한 연구의 일환으로서, 우선 선발한 細胞株의 anthocyanin 형성과 생장에 대한 光, 2,4-D, sucrose의 효과를 조사하였던 바, 그 결과를 이에 보고코자 한다.

재료 및 방법

인삼의 選拔細胞株의 생장 및 anthocyanin 색소형성에 미치는 光의 영향을 구명하기 위해서 Murashing-Skoog (MS) 기본배지에 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)를 0.1 ppm, sucrose를 3% 첨가한 0.8% agar media에 선발된 細胞株

의 callus와 정상 callus를 접종하여 光 및 暗培養하였으며, 광도는 1000 lux로 하였다. 2,4-D와 sucrose의 영향을 구명하기 위하여 MS 기본배지에 2,4-D를 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 ppm씩, 그리고 sucrose를 1, 3, 5, 7%씩 각각 첨가한 0.8% agar media에 選拔細胞株의 callus와 정상 callus를 접종하여 光培養하였으며, 배양 40일 후에 성장량과 색소함량을 조사하였다. 성장량은 flask 당 乾物重으로 하였고, 색소추출은 0.1g(乾物重)의 callus를 5ml의 0.1% HCl/methanol 용액에 24시간 용출시켰다. 추출된 색소액을 530 nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같은 식에 의하여 anthocyanin 함량을 구하였다.

$$\text{mg anthocyanin/100g} = \frac{A}{E_{1\%}^{1\text{cm}}} \times \text{dilution factor} \times \frac{100}{W}$$

(A : Absorbance, W : 시료무게)

人蔘選拔細胞株의 anthocyanin 主色素는 peonidin-3-glucoside¹⁾로서 확인되었는 바 Somers에 의하면 peonidin-3-glucoside의 분자 흡광계수는 1.13×10^4 이므로,¹⁶⁾ Fuleki⁷⁾의 계산식에 의하여 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 를 218.78로 산출하였다.

결과 및 고찰

1. 人蔘細胞株의 anthocyanin 형성 및 성장에 미치는 光의 영향

선발된 人蔘細胞株의 anthocyanin 색소형성과 성장에 미치는 光의 영향을 구명하고자 光 및 暗培養하였던 바, 그 결과는 Table 1과 같다.

光배양한 人蔘細胞株의 anthocyanin 함량을 보면 건물중당 3.18 mg/g이었으며, 暗배양에서는 색소가 생성되지 아니하였다(Table 1). Haplopappus callus에서는¹⁸⁾ 색소함량이 3.9 mg/g, populus callus에서¹⁴⁾ 0.76 mg/g으로서 식물에 따라 색소함량이 차이가 있는 바, 본 실험에서 이용한 人蔘細胞株는 anthocyanin 高含有細胞株로서 생각되어今後 그 특성을 계속 구명하여야 할 것으로 料想된다. 그리고 anthocyanin 색소의 형성이 光의 有無에 따라 차이가 큰 이유는 anthocyanin의 합성

Table 1. Effect of light on the growth and anthocyanin synthesis of ginseng callus

	Anthocyanin content (mg/g)	Dry weight of callus (g/flask)
Light	3.18	0.369
Dark	-	0.375

반응에 관여하는 key enzyme인 phenylalanine ammonia-lyase(PAL)가 photoinducible enzyme^{11,17)}으로서 光의 有無, 光의 강도에 따라 enzyme activity가 달라지기 때문인 것으로 생각된다. 한편, 선발된 人蔘細胞株의 성장을 보면 光 및 暗 상태에서 배양된 callus의 건물중이 flask 당 각각 0.396g, 0.375g으로서 광에 의해 callus의 생육이 약간 촉진되었는데(Table 1) 이는 정상세포의 성장과 같은 경향이였다.

2. 人蔘細胞株의 anthocyanin 형성 및 성장에 미치는 2,4-D의 영향

식물세포의 器內培養時 一次代謝產物은 2,4-D에 의해 생성이 촉진되며, alkaloid와 phenol 등의 二次代謝產物은 일반적으로 억제되는데,⁵⁾ 선발된 人蔘細胞株의 2,4-D에 대한 반응은 아직 구명된 바 없는 실정이다. 그래서 선발된 人蔘細胞株의 anthocyanin 색소형성과 성장에 미치는 2,4-D의 영향을 알아보하고자 MS 배양기에 2,4-D를 농도별로 첨가하여 callus를 접종, 배양하였던 바, 그 결과는 Fig.1과 같다.

배양 callus의 anthocyanin 함량의 변화를 보면, 대조구로 배양한 정상 callus는 첨가된 2,4-D의 농도와 관계없이 anthocyanin 함량은 매우 낮은 형성이 되지 않았고, 반면에 선발된 細胞株는 배양기에 첨가된 2,4-D의 농도가 낮아 짐에 따라 anthocyanin 색소함량이 증가하였으며, 특히 0.1 ppm의 2,4-D 첨가배양기에서 최대치를 나타내었다(Fig.1). 당근¹⁵⁾이나 포플러¹⁴⁾의 세포배양에서도 anthocyanin 생성은 2,4-D에 의하여 억제되었으며, 담배와 인삼의 二次代謝產物인 nicotine⁸⁾과 saponin¹³⁾의 생성도 2,4-D에 의하여 변화된다고 보고된 바 있다. 이와 같은 억제 및 변화현상은 二次代謝產物의 합성에 필수적인 前驅物質의 생성이 2,4-D에 의해 감소 또는 변화되기 때문인 것⁵⁾으로 생

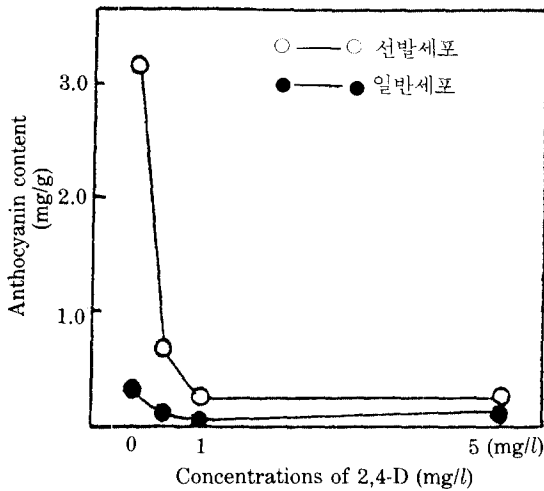


Fig. 1. Effect of 2,4-D on the formation of anthocyanin in ginseng cell lines.

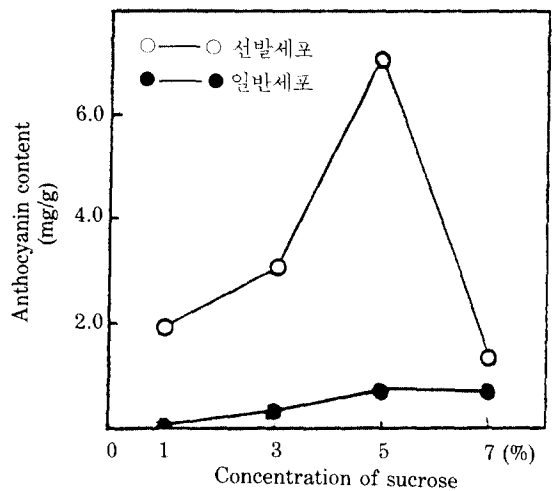


Fig. 3. Effect of sucrose on the formation of anthocyanin in ginseng cell lines.

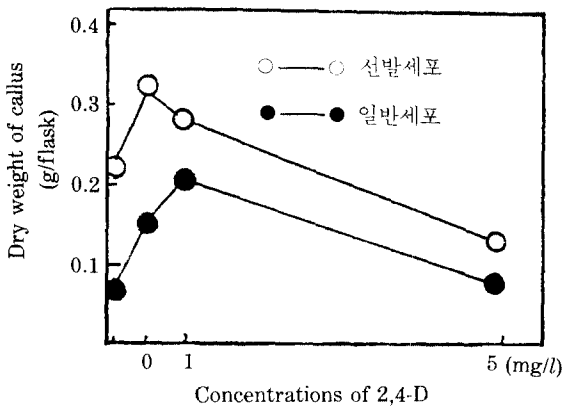


Fig. 2. Effect of 2,4-D on the growth of ginseng cell lines.

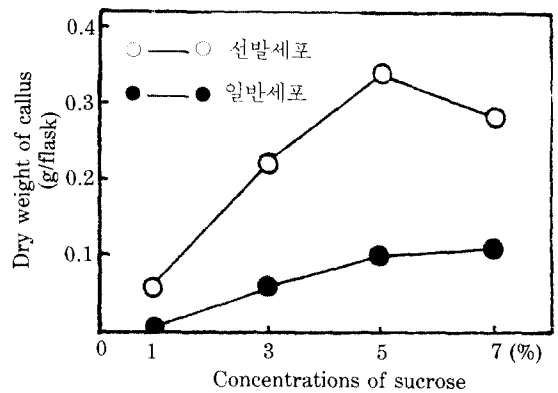


Fig. 4. Effect of sucrose on the growth of ginseng cell lines.

각된다. 한편, 선발된 細胞株의 생육을 보면, 2, 4-D 0.5 ppm 첨가기의 건물중이 0.32g/flask 으로서 최대치를 나타내었으며, 이보다 낮거나 높은 2, 4-D 농도에서는 callus의 생육이 저조하였다(Fig. 2). Anthocyanin이 가장 많이 형성되었던 배양기에서의 선발細胞株 callus의 건물중을 보면, 0.22g/flask 으로서 최대 성장량에는 미달되지만 비교적 양호한 성장을 나타내었다. 한편 대조구인 정상 callus는 전반적으로 모든 처리구 공히 선발細胞株보다 생장이 불량하였으며, 선발細胞株와는 달리 2,4-D가 1.0 ppm 첨가된 배양기에서 건물중이 0.21g/flask 으로서 최대의 성장을 보였다(Fig. 2) 이상의 결과에서 보면 선발된 人蔘細胞株가 정상

callus보다 2,4-D의 요구도가 적었으며, 생육도 훨씬 양호하였는 바, 이런 점으로 보아 본 실험에 공시한 細胞株는 今後 內容成分의 정량분석 등을 거쳐서 특수한 人蔘細胞株로 육성되어야 할 것이며, 또한 그 특성이 오랜 계대배양 중에도 계속해서 유지될 것인지 與否를 조사하여야 할 것으로 思料된다.

3. 人蔘細胞株의 anthocyanin 형성 및 생장에 미치는 sucrose의 영향

선발된 人蔘細胞株의 anthocyanin 색소형성과 생장에 미치는 sucrose의 영향을 구명하고자 sucrose를 농도별로 첨가한 배양기에 callus를 접종하여 배양하였던 바, 그 결과는 Fig. 3, 4와 같다.

Anthocyanin 형성을 보면, 정상 callus는 그 양

이 微微하거나 거의 형성되지 않았는데 反하여, 선발細胞株는 sucrose 농도가 증가함에 따라 증가하여 5% sucrose 첨가배양기에서 7.12 mg/g의 anthocyanin 함량을 보여 최대치를 나타내었으며, 그 이상의 농도에서는 anthocyanin 함량이 급격히 감소하였다(Fig.3). 선발된 細胞株의 생육을 보면, 배양기 내의 sucrose 농도가 증가함에 따라 생장도 증가하여 anthocyanin 형성과 같은 현상으로, 5%의 sucrose 처리구에서 건물중이 0.34g/flask 으로서 최대치를 나타내었으며, 대조구인 정상 細胞株는 sucrose 농도증가와 비례하여 건물중도 증가하는 경향을 보였다(Fig.4). 이와 같이 선발한 人蔘細胞株의 sucrose에 대한 반응 또한 정상 細胞株와 달리 나타나는 것으로 보아 선발한 細胞株는 變異體임이 틀림없는 것으로 思料되어진다.

요 약

선발된 人蔘細胞株의 anthocyanin 형성과 생장에 미치는 光, 2,4-D 및 sucrose의 영향을 구명하고자 각각 처리를 달리하여 선발細胞株를 배양하였던 바, 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 선발細胞株의 anthocyanin 형성에는 光이 필수적이었으며, anthocyanin 함량은 3.18 mg/g로서 비교적 많이 형성되었다.
2. 선발細胞株의 anthocyanin 형성은 2,4-D의 농도가 증가함에 따라 억제되었고, 특히 2,4-D 0.1 ppm 첨가구에서 최대치를 보였으며, 반면에 정상細胞株는 2,4-D의 농도에 관계없이 anthocyanin 형성이 微微하였다.
3. 선발細胞株의 생장은 정상 細胞株보다 양호하였으며, 선발細胞株는 2,4-D 0.5 ppm 첨가배양기에서, 그리고 정상 細胞株는 2,4-D 1 ppm 첨가배양기에서 최대의 생장을 보였다.
4. 선발細胞株의 sucrose에 대한 반응을 보면, sucrose 농도 5% 첨가배양기에서 anthocyanin 함량과 생장이 최대를 나타내었다.
5. 이상의 결과를 종합하면, 선발한 人蔘細胞株는 anthocyanin을 형성하는 특징을 가진 변이체로 인

정할 수 있었다.

인용문헌

1. Ahn, I.O., Choi, K.T. and Kim, B.D.: Korea Society of Plant Tissue Culture **16**(2), 123 (1989).
2. Choi, K.T., Park, J.C., Ahn, I.O. and Yang, D.C. Proc. Korea-China Plant Tissue Culture Symposium, Korean Society of Plant Tissue Culture **89** (1987).
3. Choi, K.T., *Korean J. Plant Tissue Culture* **12**(1), 77 (1985).
4. Constabel, F., Gaudet-La Prairie, P., Kurz, W.G.W. and Kutney, J.P. *Plant, M.E. Planta (Berl.)* **104**, 50 (1972).
5. Davies, M.E. *Planta (Berl.)* **104**, 50 (1972).
6. Fujita, Y., Hara, Y., Sugar, C. and Morimoto, T. *Plant Cell Reports* **1**, 61 (1981).
7. Fuleki, T. and Francis, F.J. *J. Food Sci.*, **33**, 72 (1968).
8. Furuya, T., Kojima, H. and Syono, K., *Phytochem.*, **10**, 1529 (1971).
9. Furuya, T., Yoshikawa, T., Ishii, T., and Kajii, K., *Planta Medica* **47**, 183 (1983).
10. Furuya, T., Yoshikawa, T., Ishii, T., and Kajii, K., *Planta Medica* **47**, 200 (1983).
11. Geza Hrazdina and Creasy, Leroy L., *Phytochem.*, **18**, 581 (1979).
12. Heble, M.R., Narayanaswami, S. and Chadha, M.S. *Phytochem.*, **10**, 2393 (1971).
13. Ki, M.W., Choi, K.T., Bae, H.W. and Kang, Y.E. *Korea, J. Bot.*, **23**(3,4), 91 (1980).
14. Matsumoto, T., Nishida, K., Noguchi, M. and Tamaki, E., *Agri. Biol. Chem.* **37**(3), 561 (1973).
15. Ozeki, Y. and Atsuushi, K., *Plant Cell Physiol.*, **27**(7), 1361 (1986).
16. Somers, T.C., *J. Sci. Food Agri.*, **17**, 215 (1966).
17. Soon, C.T., *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **104**(5), 581 (1979).
18. Stickland, R.G. and Suderland, N., *Ann. Bot.*, **36**, 443 (1972).
19. Yamada, Y. and Hashimoto, T. *Plant Cell Reports* **1**, 101 (1982).