

물오리나무 켈러스로부터 Anthocyanin 生産

金 旼 柱 · Hajime Mizukami¹ · 安 正 善^{*}

서울대학교 自然科學大學 生物學科, ¹日本 長崎大學校 藥學部

원형질체로부터 유래된 물오리나무 켈러스는 빛에 반응하여 붉은 색소를 축적하였고 색소 생성능이 높은 세포주 R4를 분리하였다. 이 세포주로부터 색소를 추출하여 분광분석, 셀룰로오스 TLC 및 GLC로 분석한 결과 glucose, galactose를 당으로 가지며 aglycone이 cyanidin인 안토시아닌으로 밝혀졌다. R4 세포주를 재료로 식물 호르몬 및 무기염류가 안토시아닌 생산에 미치는 효과를 조사하였다. 켈러스 성장과 안토시아닌 생산에 2,4-D가 가장 탁월한 효과를 보였으며 BAP 첨가가 안토시아닌의 생산을 증가시키는 것으로 나타났으며, 안토시아닌 생산에 가장 효과적인 호르몬 조성은 1 μ M 2,4-D, 0.1 μ M BAP였다. 무기염류의 경우, 인산염 농도를 5.0 mM에서 2.5 mM로 낮추었을 때와 NO₃⁻를 80%로 증가하였을 때 색소생산이 증가되는 것으로 나타났다.

주요어: 물오리나무 켈러스, 안토시아닌, 2,4-D, BAP, 무기염류

고등 식물체는 다양한 이차 대사산물을 합성하는 특성을 가진다. 많은 종류의 약제나 산업 물질들이 이러한 이차 대사산물에 기본을 두고 있어서 식물 세포 배양을 통한 대량 생산의 연구를 계속하고 있다(Tabata, 1977; Berlin, 1984; Balandrin *et al.*, 1985). 더욱이 최근들어 합성 착색료의 붉은 색소의 사용이 제한되면서 이를 대체하는 것으로 식물 세포 배양을 통한 천연 색소의 생산에 주목하고 있으며, 이에 대한 연구가 가속화되고 있다. 식물의 주요 색소원인 anthocyanin의 세포 배양을 통한 생산에 대한 연구는 당근(*Daucus carota*)(Kinnersly and Dougall, 1980), 페튜니아(*Petunia hybrida*)(Colijn *et al.*, 1981), 포도(*Vitis vinifera*)(Yamakawa *et al.*, 1983), 그리고 roselle(*Hibiscus sabdariffa*)(Mizukami *et al.*, 1988) 등에서 이루어지고 있다.

Anthocyanin 생산을 증대시키기 위해서 우수한 세포주를 선별하는 일이 우선되어야 하고, 이러한 고생산주의 성장에 적합한 조건을 찾는 일이 병행되어야 한다. 고생산주 선별에 있어서 대부분의 연구는 현탁 배양을 통한 클론을 선별하는 수준에서 이루어지고 있고, 고구마에서 원형질체를 분리하여 배양하였다는 보고가 있는 정도이다(Nishimaki and Nozue, 1985). 배지 조성에 있어서는 식물 호르몬, 무기염류, 그리고 sucrose의 농도 효과에 대한 조사가 이루어지고 있다. Ozeki와 Komamine(1981)은 당근 세포 배양에서 배지의 2,4-D를 제거해야 anthocyanin의 합성이 유도된다고 보고하였다. 그러나, 대부분의 anthocyanin 생성은 낮은 옥신 농도에서 이루어

지고 있으며(Colijn *et al.*, 1981), roselle의 경우 2,4-D가 강한 촉진 효과를 보였다(Mizukami *et al.*, 1988). 시토키닌의 효과에 대해서도 옥신과 마찬가지로 다양하게 나타나며 옥신이 포함된 배지에 시토키닌을 첨가했을 때 페튜니아 조직 배양에서는 영향을 끼치지 않으며(Colijn *et al.*, 1981), 당근에서는 저해 효과를 보이고(Kinersley and Dougall, 1980) 고구마와 roselle에서는 증대 효과를 보인다고(Nishimaki and Nozue, 1985; Mizukami *et al.*, 1988) 각각 보고하였다. 종에 따른 다양한 효과는 식물 내부에 이미 존재하는 호르몬의 농도의 상이함에 따른 결과로 추정하고 있으며 따라서 사용하는 재료에 따라 각기 조사되어야 함을 시사하였다.

무기염류의 경우 최근에 질소와 인을 중심으로 연구를 진행하여 그 결과를 이차 대사물의 생산성을 증대시키는 배지 조성에 반영하고 있다. 질소의 경우 배지에 사용되는 질소의 농도 뿐 아니라 질소원의 형태가 영향을 끼친다고 알려져 있으며(Fujita *et al.*, 1981). 최근에 anthocyanin 색소 생산에 있어서도 유사한 결과를 Mizukami 등(1991)이 roselle 조직 배양 연구에서 보고하였다. 인의 경우에는 높은 농도에서 anthocyanin 생산이 감소하였다고 보고하였으나(Yamakawa *et al.*, 1983), 농도를 낮추었을 때 anthocyanin 생성이 증가하였다는 보고도 있다(Mizukami *et al.*, 1988).

특정 산물의 생산이 우수한 고생산주의 선별과 최적 배지 조성을 찾는 방법은 복합적으로 이루어져야 하며, 덧붙여 세포 성장과 이차대사물 생성의 상관관계에 대한 분석이 필요하다. Anthocyanin의 경우 대부분이 세포 성장과 색소 생산이 역관계로 알려져 있으나(Ozeki and Komamine, 1981), roselle의

*교신저자: Fax (02) 872-6881

경우에는 호르몬 효과에 대해 세포 성장과 색소 생산이 동시에 일어나는 비례관계를 보였다(Mizukami *et al.*, 1988). 그러나 무기염류에 대한 분석 결과 완전한 비례관계만이 아님이 밝혀져 2단계 배양 방법(two-stage culture system)을 제안하였다(Mizukami *et al.*, 1991).

물오리나무(*Alnus hirsuta*)는 오리나무속에 속하며 방선균의 일종인 *Frankia*와 질소고정 공생관계를 이루는 것으로 알려진 목본식물이다. 최근에는 오리나무류를 이용한 조직 배양이 유용형질 도입에 이용되고 있으며(Perinet and Lalonde, 1983), 물오리나무의 경우 식물체의 여러 조직으로부터 캘러스가 유도되었으며 자엽 유래 캘러스로부터 원형질체를 배양하여 캘러스를 형성하였고, 이를 광조건에서 배양하였을 때 anthocyanin을 생산하고 계대배양 후에도 유지되는 세포주가 분리되었다(Kim and An, 1990). 이에 본 연구에서는 물오리나무의 배양 세포에서 생산되는 붉은 색소를 분석하고 배지 구성에 있어서 색소 생성에 대한 식물 호르몬과 무기염류의 효과를 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

식물 재료

물오리나무(*Alnus hirsuta*)의 원형질체로부터 유래된 세포주 중에서 anthocyanin 생산이 우수한 4개의 세포주를 선별한 후 NT 고형배지에서 계대배양하였으며(Kim and An, 1990), 이 중 R4 세포주를 본 실험에서 사용하였다.

배양 조건

R4 세포주는 물오리나무 캘러스 유도배지(Kim and An, 1990)에서 배양하였으며, 이 배지는 NT(Nagata and Takebe, 1971) 배지의 무기염류에 MS 수정배지(Murashige and Skoog, 1962)의 유기물질 조성에 따른 vitamin mixture, 3% sucrose, 100 mg/L myo-inositol을 첨가하고 호르몬으로 2.5 μ M 2,4-D를 처리하고 0.65% Difco agar를 첨가한 후 pH는 5.6으로 맞추었다. 플라스크당 약 0.2 g의 캘러스를 4개로 나누어 심은 다음 온도 28°C, 광도 43 μ E/m²/sec의 연속 광조건에서 배양하였으며, 4주에 한 번씩 계대배양했다.

Anthocyanin의 분리 및 동정

동결건조시킨 시료를 1% methanolic HCl로 4°C에서 12시간 색소를 추출한 후(Mizukami *et al.*, 1988) 35°C 이하에서 감압농축하여 *n*BuOH:AcOH:H₂O=8:2:3(BAW), AcOH:

cHCl:H₂O=15:3:82(AHW) 순으로 cellulose plate에서 2차 원으로 전개하여 anthocyanin 색소를 분리하였다.

Aglycone 분석을 위해 동결건조시킨 시료를 2M HCl에서 45분 동안 100°C 중탕하여 가수분해하였고 이를 ethyl acetate, isoamyl alcohol 순으로 추출한 후 농축하여 aglycone을 얻었다. 분광학적 분석으로는 분리된 aglycone을 0.01% methanolic HCl에 녹여 UV-visible 흡수 스펙트럼과 5% AlCl₃ 첨가에 의한 최대흡수파장의 이동양상을 조사하였으며, aglycone을 1% methanolic HCl에 녹여 cellulose plate로 TLC분석을 수행하였다. 용매로는 AcOH:cHCl:H₂O=30:3:10(Forestal), HCOOH:cHCl:H₂O=5:2:3(Formic), *n*BuOH:AcOH:H₂O=4:1:5(BAW), *n*BuOH:2M HCl=1:1을 사용하였고 rose-lle에서 추출한 cyanidin을 standard로 사용하였다.

당 분석을 위해서는 색소 추출액을 Dowex 50W-X2 cation exchange column에 주입하여 폴리페놀을 제거한 후 1M HCl로 95°C에서 60분간 가수분해한 후 당분획을 cellulose TLC(용매; *n*BuOH:toluene:Pyridine:H₂O=8:1:1:3, 발색; Alilne phthalate)와 TMS-PZ으로 TMS 유도체로 전환한 후 GLC(1.5% silicone SE-30 glass column, 140-160°C; 4°C/min, N₂ 유동속도; 50 mL/min) 분석(Yamakawa *et al.*, 1983)으로 동정하였다. 당 표준품으로는 rhamnose, xylose, galactose, glucose를 사용하였다.

호르몬의 효과

Anthocyanin 생산에 미치는 옥신의 효과를 조사하기 위해서 우선 IAA, NAA, IBA, 2,4-D를 각각 1 μ M씩 배지에 첨가한 후 동일 배양조건으로 배양하였다. 시토키닌으로 BAP를 사용하여 실험결과 가장 효과적으로 나타난 옥신인 2,4-D가 각각 0.1, 1, 10 μ M, BAP가 각각 0.1, 1, 10 μ M로 구성된 12개의 호르몬 조합에서 옥신과 시토키닌의 농도에 따른 효과를 조사하였다.

무기염류의 효과

호르몬을 뺀 캘러스 유도배지에 본 실험에서 anthocyanin 생산에 효과적인 것으로 밝혀진 호르몬의 농도인 1 μ M 2,4-D, 0.1 μ M BAP를 첨가한 배지에서 인의 농도에 따른 효과와 질소원의 형태에 따른 효과를 각각 조사하였다. 인산염으로 KH₂PO₄를 사용하여 0.5, 1.25, 2.5, 5, 10 mM의 농도에서 각각 조사하였으며, 캘러스 유도배지에서 사용된 5 mM 처리구를 대조구로 사용하였다. 캘러스 유도배지에서 사용된 질소원의 총 농도인 30 mM은 변화시키지 않고 NH₄⁺와 NO₃⁻의 비율을 달리하여 anthocyanin 생성시 선호하는 질소원의 형태를 조

사하였으며, NH_4^+ 의 재료로는 NH_4Cl 을 NO_3^- 의 재료로는 KNO_3 를 각각 사용하고 질소원에 대한 NO_3^- 의 백분율이 각각 0, 20, 40, 60, 80, 100% 및 대조구로서 캘러스 유도배지에서 66%가 되도록 처리하여 조사하였다.

수정배지의 효과

캘러스 유도배지는 호르몬으로 2.5 μM 의 2,4-D를 함유하며 인산염의 농도는 5 mM이고 질소원 중 NO_3^- 의 비율은 66%이다. 그러나, 안토시아닌 생성 수정배지는 NT 기본배지에 호르몬으로 1 μM 의 2,4-D, 0.1 μM BAP를 함유하며, 인산염의 농도는 2.5 mM이고 질소원 중 NO_3^- 의 비율은 80%로 변형한 것이다.

Anthocyanin 함량의 계산

색소 추출액을 4°C, 5000 g에서 7분간 원심분리하여 세포 찌꺼기를 제거한 다음 상정액을 취하여 530 nm에서 흡광도를 측정하여 단위 생체량당 색소 함량(O.D./g fw), 총 색소 생산량(total O.D.)을 산출하였으며 각 처리구당 5-10개의 플라스크를 준비하여 통계처리하였다.

결 과

물오리나무 캘러스에서 생산되는 anthocyanin

원형질체로부터 유래된 물오리나무 캘러스는 빛에 반응하여 붉은 색소를 생성하며(Fig. 1), 색소 생성능이 우수한 세포주인 R4가 분리되었다(Kim and An, 1990). 광조건에서 배양한 물오리나무 캘러스는 색소를 생성하는 것 외에는 물기가 많고 부드러우며 잘 부서지는 점에서 암소에서 배양한 것과 유사한 외형적 특성을 보였다(Fig. 1). 광조건에서 배양한 캘러스는 3-4주 사이에 급격한 생체량의 증가를 보이면서 4주까지 계속 성장하여 한 플라스크당 생체량이 평균 5 g에 달했다. Anthocyanin 생산면에서는 단위 생체량당 색소 함량이 3주까지 계속 증가 양상을 보이다가 4주에 이르면서 현저한 감소를 나타내었고, 이로 인해 총 색소 생산량이 정체하였다(자료 미제시).

1% Methanolic HCl로 추출한 색소의 분광학적 분석 결과 280 nm, 530 nm부근에서 peak를 보이는 전형적인 anthocyanin의 흡수 스펙트럼(Markham, 1982)과 일치하였다(자료 미제시). 분리된 색소를 2차원 TLC(1차원; BuOH:AcOH:H₂O=8:2:3, 2차원; AcOH:conc.HCl:H₂O=15:3:82)로 분석한 결과 cellulose plate상에서 아주 소량으로 발견되는 색소와 함께 하나의 주된 spot이 나타났다. 추출한 색소를 2M HCl로

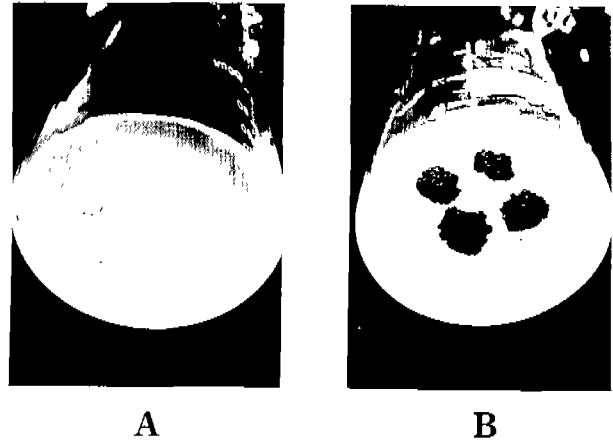


Fig. 1. Representative growth patterns of dark-grown white callus (A) and red callus (B) grown under continuous light on NT medium at 28°C.

가수분해하여 얻은 aglycone을 동일한 용매로 2차원 cellulose TLC를 수행한 결과 1개의 spot이 나타나 물오리나무 배양세포에서 생산되는 anthocyanin이 한 종류의 aglycone을 가지는 것으로 밝혀졌다. Aglycone의 동정을 위해 cellulose plate로 4가지 용매(Forestal, Formic, BAW, and *n*BuOH:2M HCl=1:1)에서 cyanidin standard와 함께 전개한 결과 동일한 R_f치를 보였다.

또한 aglycone을 0.01% methanolic HCl로 용해시켜 흡수 spectrum을 조사한 결과 547.5 nm에서의 최고값을 나타내는 점과 5% AlCl₃ 첨가에 의한 최대 흡수파장의 이동(26.5 nm) 양상이 cyanidin standard와 동일하였다. 따라서 물오리나무에서 생산되는 anthocyanin의 aglycone은 cyanidin임을 확인하였다.

한편 가수분해하여 얻은 색소의 당분해를 cellulose plate상에서 당 표준품과 함께 전개한 결과 glucose, galactose와 R_f치가 일치하였고, GLC 분석에서 α -, β -glucose(retention time: 5.9 min, 7.8 min), α -galactose(5.5 min)가 peak로 나타났다.

위 결과들을 토대로 물오리나무 캘러스에서 생산되는 anthocyanin의 주색소는 cyanidin-glycoside 형태임이 밝혀졌으나 정확한 구조식을 밝히기 위해서는 지속적인 연구가 필요하다. 따라서 몰흡광계수에 의한 정확한 anthocyanin 함량의 계산이 불가능하여 본 실험시에 계산한 색소량은 530 nm에서 측정된 O.D.값으로 산출하였으며, 수행된 실험 조건에 따른 각 처리구 사이의 상대적인 비교치로 사용하였다.

호르몬의 효과

오옥신이 캘러스의 성장과 안토시아닌 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해서 NAA, IBA, IAA, 2,4-D가 각 1 μM 씩 첨가된

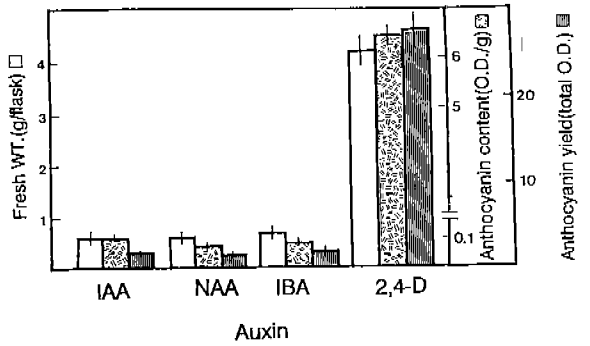


Fig. 2. Effects of various auxins on cell growth and anthocyanin synthesis in callus cultures of *Alnus hirsuta*. Each value represents the mean with standard error from 8 replicate cultures on NT medium with 1 μM of different auxins.

배지에 옮겨 심고 4주 후에 수확하여 생체량과 단위 생체량당 색소함량, 총 색소생산량을 측정한 결과, 2,4-D가 다른 옥신 처리구에 비해서 모든 면에서 효과가 월등하였으며, 나머지 옥신의 경우 생장이 거의 이루어지지 않았고 색소가 생성되지 않았다. 2,4-D 처리구는 생체량의 경우 약 60배, 단위 생체량당 색소함량에 있어서도 약 60배의 증가 효과를 나타내었다(Fig. 2).

가장 효과적으로 판명된 옥신인 2,4-D와 시토키닌으로 BAP를 사용하여 농도에 따른 효과를 조사한 결과 생장과 anthocyanin 생산 모든 면에서 1 μM의 2,4-D가 가장 효과적이며 특히 색소 생산에 있어서 농도에 따른 변이폭이 컸다. BAP 첨가에 따른 영향으로는 0.1 μM의 2,4-D 처리구에서는 0.1 μM의 BAP첨가시 약간의 생체량의 감소가 있었으나, 1-10 μM 처리구에서는 증가하였으며 1 μM의 2,4-D 처리구에서는 8-23%의 감소 경향을 나타내었고, 10 μM 처리구에서는 BAP의 농도가 증가함에 따라 생체량이 감소하였다. 그러나 BAP가 첨가되지 않은 1 μM의 2,4-D 처리구가 최고치를 나타냄으로써 생체량의 증가 효과를 갖지는 않는 것으로 추론되었다. 0.1-1 μM의 BAP의 첨가가 단위 생체량당 색소 함량 증대에 효과적으로 나타났으며 생체량과 단위 생체량당 색소 함량을 반영하는 총 색소 생산량의 경우, 2,4-D의 농도에 상관없이 2,4-D와 함께 0.1 μM의 BAP를 첨가하였을 때 증대 효과를 나타내었으며, 1 μM의 2,4-D와 0.1 μM의 BAP의 호르몬 조성에서 가장 왕성한 색소 생성능을 보여 생체량이 최대 5.5 g/flask, 색소 함량은 9.24(O.D./g fw), 총 색소 생산량은 35.33(O.D.)로 나타났다(Fig. 3).

인산염의 농도에 따른 효과

인산염의 농도가 anthocyanin 함량에 미치는 영향을 조사한

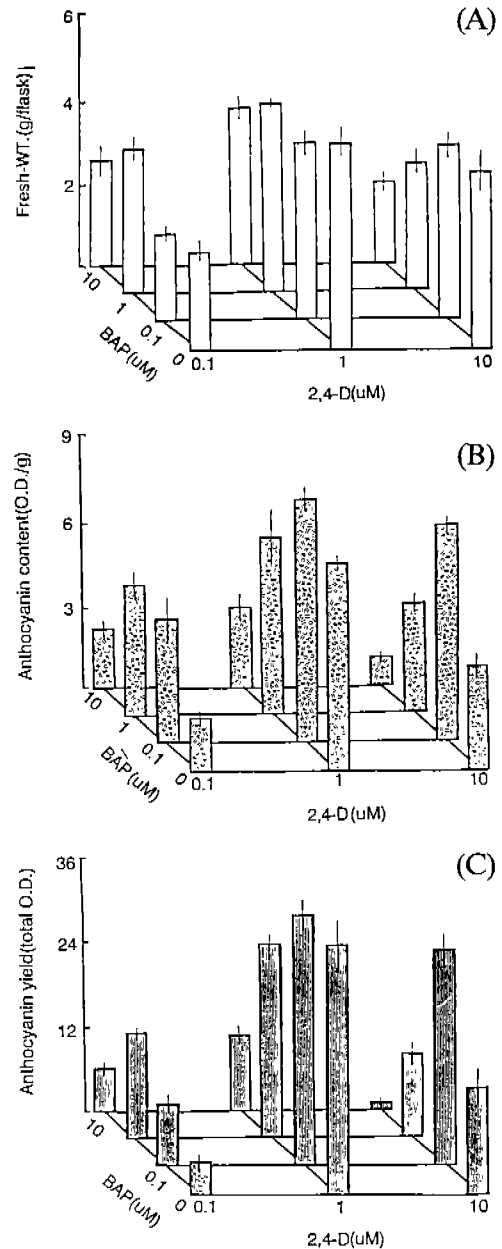


Fig. 3. Effects of 2,4-D and BAP concentration on cell growth (A), and content (B) and yield (C) of anthocyanin in callus cultures of *Alnus hirsuta*. Each value represents the mean with standard error from 5 replicate cultures.

결과 캘러스 유도배지의 5 mM보다 인산염의 농도를 낮게 처리했을 때는 생체량이 2-8% 감소하였으나 2배 높은 농도인 10 mM의 처리구에서는 생체량이 12% 증가하였다. 단위 생체량당 색소 함량은 농도를 반으로 낮추어 준 2.5 mM에서 20% 증가하였고, 그 이하의 농도에서는 대조구보다 적은 값을 나타내었다. 이러한 결과는 인산염의 농도를 대조구의 2배로

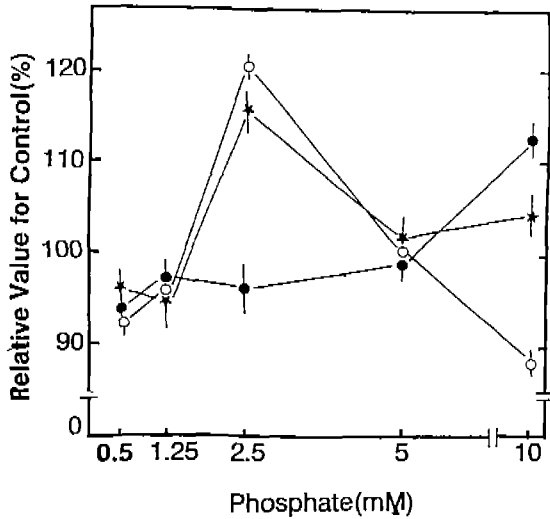


Fig. 4. Effects of phosphate concentration on cell growth (—●—), anthocyanin content per g fresh weight (—○—), anthocyanin yield (—★—) on callus cultures of *Alnus hirsuta*. Each data is relative value to that of control with 5 mM phosphate.

높이면 생체량이 10% 이상 증가하는 반면 색소 생성이 저하되었고 인산염의 농도를 반으로 낮추면 약간의 생체량 감소와 더불어 색소 생성능이 크게 신장됨을 보여주었다(Fig. 4).

질소원의 형태에 따른 효과

캘러스 유도배지의 질소 농도인 30 mM을 일정하게 유지 하면서 질소원의 비율을 달리하여 색소 생산을 조사한 결과 NH₄⁺와 NO₃⁻의 비율이 1:4일 때 가장 왕성한 생성능을 나타내었다. 환원형 질소원(NH₄⁺)만을 사용하거나, 산화형 질소(NO₃⁻)만을 사용한 경우에는 생장이 거의 이루어지지 않았으며, NO₃⁻의 비율이 높아질수록 생장은 물론 색소 생산이 증가하였다. 생체량 및 색소 생산은 80%의 NO₃⁻을 첨가한

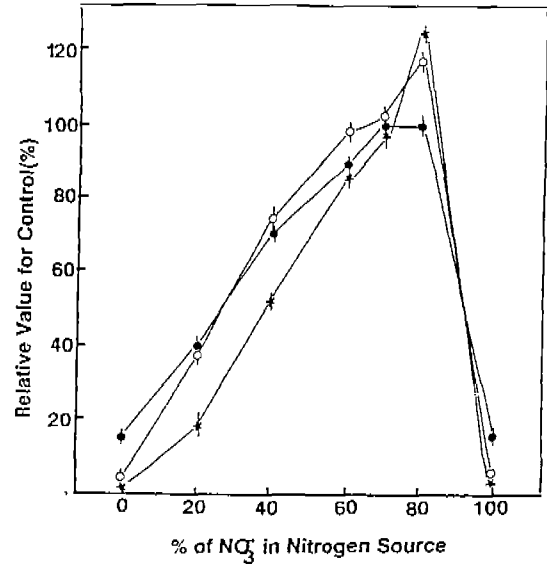


Fig. 5. Effects of the type of nitrogen source on cell growth (—●—), anthocyanin content per g fresh weight (—○—), anthocyanin yield (—★—) on callus cultures of *Alnus hirsuta*. Each data is relative value to that of control with 66% NO₃⁻.

배지에서 최대치를 나타내었으며 캘러스 유도배지의 66%의 NO₃⁻(NH₄⁺:NO₃⁻=1:2)를 포함하는 대조구와 비교했을 때, 생체량은 거의 유사하나 단위 생체량당 색소 함량이 약 18%, 총 색소 생산량이 약 21% 증대되는 효과를 보였다(Fig. 5).

수정배지의 효과

캘러스 유도배지와 실험을 통해 얻은 수정된 색소 생성 배지에서 각각 캘러스를 배양하여 색소 생성배지의 효과를 조사하였다(Table 1). 두 배지에서 총 색소 생산량은 거의 유사하나 수정배지에서 생체량은 약 22%의 감소를 보인 반면 단위 생체량당 색소 함량은 30% 증가되었다.

Table 1. Compositional effects of callus induction medium and modified anthocyanin producing medium on anthocyanin production

Medium	Composition				Results		
	2,4-D/BAP (μM)	Phosphate (mM)	NO ₃ ⁻ in N source (%)	Other compounds	Fresh weight (g/flask)	Anthocyanin content (O.D./g)	Anthocyanin yield (total O.D.)
Callus induction medium	2.5/0	5.0	66	MS ^a , NT ^b	5.30	6.52	34.56
Modified anthocyanin producing medium	1.0/0.1	2.5	80	MS ^a , NT ^b	4.16	8.49	35.32

^aMS, Modified Murashige and Skoog's medium (1962); ^bNT, Nagata and Takebe's medium(1971)

고 찰

물오리나무의 단세포 유래 켈러스인 R4 세포주를 연속광하에서 계대 배양한 결과 색소생산이 계속적으로 유지되었으며, 암소에서 4주 동안 배양한 켈러스가 약 3 g(Kim and An, 1990)인 것과 비교했을 때 약 1.5배 이상의 생장을 나타내어 색소 생산에 효과적인 것으로 나타났다. 이로부터 추출한 색소를 분석한 결과 aglycone은 cyanidin이며 당성분은 glucose와 galactose로 cyanidin-O-glucose-galactose, cyanidin-O-galactose-glucose, galactose-O-cyanidin-O-glucose의 가능성이 있으나 정확한 구조 규명을 위한 연구가 계속되어야 할 것이다.

연속 광조건으로 NT 고휘배지에서 배양하면서 물오리나무 켈러스의 색소생산에 미치는 식물 호르몬의 효과를 조사한 결과 옥신의 경우 2,4-D가 생장 및 색소 생산에서 다른 옥신류에 비해 약 60배의 현저한 효과를 나타내었으며, Roselle(*H. sabdariffa*), 현탁배양의 빙카(*Catharanthus roseus*), 포도(*Vitis* sp.) 등에서도 유사한 2,4-D의 효과를 보고하였다(Mizukami et al., 1988; Hall and Yeoman, 1986; Yamakawa et al., 1983). 그러나 당근 현탁배양(Ozeki and Komamine, 1986)과 *Callistephus chinensis* 켈러스 배양에서는 2,4-D가 anthocyanin 합성에 저해효과를 보였다고 보고하였다. 2,4-D와 색소생산의 상호관계가 명확하게 이루어져 있지 않은 상태이나 Roselle(*H. sabdariffa*) 경우, chalcone synthase의 활성에 영향을 미침으로써 anthocyanin 합성을 조절한다는 것이 밝혀졌다(Mizukami et al., 1989).

호르몬의 농도에 따른 효과는 생장과 색소생산의 모든 면에서 1 μ M의 2,4-D가 가장 적합하였으며 BAP 첨가가 색소생산을 증대시켰으며 이러한 효과는 당근과 *Haploppappus gracilis*와 유사한 결과였다(Ozeki and Komamine, 1986; Constable et al., 1971). 그러나 BAP를 2,4-D와 함께 처리하였을 때, 단위 생체량당 색소함량에는 별다른 변화없이 생체량 증가만 일어난다는 roselle 켈러스 배양에 있어서의 보고와는 다른 양상을 보였다(Mizukami et al., 1988).

대표적인 무기염류인 인의 농도와 질소원의 형태가 색소생성에 미치는 효과를 분석하였는데 인의 경우, 유도배지의 1/2 수준인 2.5 mM 처리구에서 단위 생체량당 색소 함량의 높은 증대 효과를 보였다. 이 때 생체량에 있어서는 약간의 감소가 있었고, 색소함량에서는 증대 효과를 나타내었다. 인의 농도를 낮춤으로써 2차 대사물의 생성을 증대시킨 예는 빙카(*Catharanthus roseus*)의 현탁배양시 알칼로이드와 플라페놀(Knobloch and Berlin, 1980), 담배 현탁배양시 cinnamoyl putrescine(Knobloch and Berlin, 1981), roselle(*H. sabdariffa*)의 안토시아닌(Mizukami et al., 1991) 등이 있다.

이러한 인의 부족으로 인한 이차 대사물의 증대 효과는 주요 효소의 활성 변화에서 기인한 조절 현상으로 설명되어지고 있으며, 안토시아닌과 같은 phenylpropanoid 대사에서도 유사한 조절이 있다고 보고된 바 있다(Hahlbrock, 1977). 인에 의한 이차 대사의 조절은 항생제를 생성하는 미생물에서 보여지는 일반적인 현상으로 최적 생장에 필요한 정도의 인 농도에서 효소의 활성 억제로 인한 이차 대사물의 합성이 저해된다(Drew and Demain, 1977). 이는 생장 단계와 이차 대사물의 합성 단계가 분리되어 있으며, 인의 부족으로 더 이상의 생존이 억제될 때 이차 대사가 유도된다는 것을 시사한다. 물오리나무 켈러스의 경우 생장과 함께 색소의 축적이 이루어지는 체계이나, 무기염의 부족이 일차 대사로부터 이차 대사 체제로의 전환을 가속화시키는 역할을 하는 것으로 보인다.

일반적으로 세포 배양배지의 질소원으로는 NO_3^- 와 NH_4^+ 가 비율은 서로 다르나 혼합되어 있는 형태로 되어 있다. 최근 연구 보고에 의하면 이차 대사물의 합성이 질소원의 농도 뿐만 아니라 질소원의 종류에도 영향을 받는다는 것이 밝혀져 있는데(Fujita et al., 1981), 물오리나무 켈러스의 경우에도 anthocyanin 생산에 NO_3^- 형태의 질소원을 선호하는 것으로 나타나 Mizukami 등(1991)의 보고와 유사하였다. 그러나 roselle에서는 질소원의 형태에 대한 선호도가 세포의 생장과 색소생산의 경우, 서로 상반되게 나타난 반면 물오리나무에서는 생장 역시 NO_3^- 의 비가 증대됨에 따라 같이 증가하는 양상을 나타내었다.

본 연구의 결과 물오리나무 켈러스에 의한 색소생산은 대체로 세포 생장과 함께 일어나, 배양 기간에 따른 생장 및 색소생산을 측정할 결과 색소 함량이 증대되는 시기와 생체량이 증가되는 시기에 차이를 보였고, 호르몬과 무기염류의 효과가 생체량과 색소 생산에 미치는 영향이 달리 나타남으로써, 최적 생장배지와 색소 생성배지와는 차이가 있을 것으로 추론되었다. 이를 토대로 켈러스 유도배지와 anthocyanin 생성 수정배지에서 켈러스를 배양하여 비교한 결과 수정배지가 단위 생체량당 색소 함량을 증대시키는 것으로 나타나 anthocyanin 생산에 보다 효과적이었다. 그러나 생체량을 감소시켜 총 색소 생산량에서는 거의 유사한 값을 나타내므로 색소 증대를 위해서는 생장과 색소생산 단계를 분리시키는 2단계 배양법이 필요할 것으로 판단되었다.

사 사

이 연구는 서울대학교 발전기금 대우 학술연구비(93-06-2077)의 지원에 의해 수행되었음.

인 용 문 헌

- Balandrin, M.F., J.A. Klocke, E.S. Wurtele and W.H. Bolinger.** 1985. Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. *Science* **228**: 1154-1160.
- Berlin, J.** 1984. Plant cell cultures; a future source of natural products? *Endeavour* **8**: 5-8.
- Colijn, C., L. Jonson, A. Schram and A. Kool.** 1981. Synthesis of malvidin and petunidin in tissue cultures of *Petunia hybrida*. *Protoplasma* **109**: 63-68.
- Constabel, F., J.P. Shyluk and O.L. Gamborg.** 1971. The effect of hormones on anthocyanin accumulation in cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Planta* **96**: 306-316.
- Drew, S. and A. Demain.** 1977. Effects of primary metabolites on secondary metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**: 343-356.
- Fujita, Y., Y. Hara, T. Ogino and C. Suga.** 1981. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* I.: Effects of nitrogen sources on the production of shikonin derivatives. *Plant Cell Reports* **1**: 59-60.
- Hahlbrock, K.** 1977. Regulatory aspects of phenylpropanoid biosynthesis in cell cultures. In, *Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application*. W. Barz, E. Reinhard and M.H. Zenk (eds.). Springer-Verlag, Berlin and New York. pp. 95-111.
- Hall, R.D. and M.M. Yeoman.** 1986. Temporal and spatial heterogeneity in the accumulation of anthocyanin in cell cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *J. Exp. Bot.* **37**: 48-60.
- Kim, H.H. and C.S. An.** 1990. Induction of callus and culture of protoplasts from cotyledon-originated callus in *Alnus hirsuta*. *Korean J. Bot.* **33**: 253-257.
- Kinnersly, A.M. and D.K. Dougall.** 1980. Increase in anthocyanin yield from wild carrot cell cultures by a selection system based on cell-aggregate size. *Planta* **149**: 200-204.
- Knobloch, K.H. and J. Berlin.** 1980. Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Z. Naturforsch.* **35**: 551-556.
- Markham, K.R.** 1982. Isolation and analytical techniques. In, *Techniques of Flavonoid Identification*. J.E. Treherne and P.H. Rubery (eds.). Academic Press, New York. pp. 15-33.
- Mizukami, H., K. Tomita, H. Ohashi and N. Hiraoka.** 1988. Anthocyanin production in callus cultures of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Plant Cell Reports* **7**: 553-556.
- Mizukami, H., K. Tomita and H. Ohashi.** 1989. Anthocyanin accumulation and changes in activities of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) callus cultures. *Plant Cell Reports* **8**: 467-470.
- Mizukami, H., M. Nakamura, K. Tomita, K. Higuchi and H. Ohashi.** 1991. Effect of macronutrients on anthocyanin production in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Plant Tissue Culture Letters* **8**: 14-20.
- Murashige, T. and F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.
- Nagata, T. and I. Takebe.** 1971. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplast under agar medium. *Planta* **99**: 12-20.
- Nishimaki, T. and M. Nozue.** 1985. Isolation and culture of protoplasts from high anthocyanin-producing callus of sweet potato. *Plant Cell Reports* **4**: 248-251.
- Ozeki, Y. and A. Komamine.** 1981. Induction of anthocyanin synthesis in relation to embryogenesis in a carrot suspension culture. *Physiol. Plant* **53**: 570-577.
- Perinet, P. and M. Lalonde.** 1983. *In Vitro* propagation and nodulation of the actinorhizal host plant *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Plant Sci. Lett.* **29**: 9-17.
- Tabata, M.** 1977. Recent advances in the production of medicinal substances by plant cell cultures. In, *Plant Tissue and Its Biotechnological Application*. W. Barz, E. Reinhard and M.H. Zenk (eds.). Springer-Verlag, Berlin and New York. 326 pp.
- Yamagawa, T., S. Kato, K. Ishida, T. Kodama and Y. Minoda.** 1983. Production of anthocyanins by *Vitis* cells in suspension culture. *Agri. Biol. Chem.* **47**: 2185-2191.

(1994. 5. 20 接受)

Anthocyanin Production from Culture of *Alnus hirsuta* Callus

Kim, Minjoo, Hajime Mizukami¹ and Chung Sun An*

Department of Biology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea; and

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University, Nagasaki 852, Japan

ABSTRACT

Callus tissues derived from protoplast of *Alnus hirsuta* were shown to produce red pigments under the continuous light. The R4 cell line with high yield of the pigments was selected. One of the red pigments was identified as anthocyanin; glucose and galactose as sugar moiety and cyanidin as aglycone, by spectroscopic analysis, cellulose TLC and GLC. Both callus growth and anthocyanin accumulation were remarkably stimulated by 2,4-D. The highest anthocyanin yield was observed when 1 μM 2,4-D in combination with 0.1 μM BAP was supplemented to the culture medium. In case of inorganic salts, anthocyanin yield was enhanced by reducing concentration of phosphate from 5.0 mM to 2.5 mM and by increasing the ratio of NO_3^- type to 80% for total nitrogen source.

Key words : *Alnus hirsuta* callus, anthocyanin, 2,4-D, BAP, inorganic salts

*Corresponding author: Fax +82-2-872-6881