

## 人蔘 毛狀根 培養에 의한 Anthocyanin의 生産과 同定

高 庚 珉 · 崔 洋 洵<sup>1</sup> · 黃 昶<sup>2</sup>

全南大學校 自然科學大學 生物學科, <sup>1</sup>瑞江專門大學 臨床病理學科

*Agrobacterium rhizogenes*에 의하여 형질전환된 인삼 모상근을 배양하여 빛, 탄소원의 종류, 여러 가지 호르몬의 첨가가 모상근의 성장과 수용성 색소인 anthocyanin의 생산에 미치는 영향을 조사하였으며, 배양된 모상근으로부터 색소를 추출, 분리하여 anthocyanin을 동정하였다. 모상근을 광조건에서 배양하면 배양 5일 후부터 색소를 합성하였으며 배양 30일에 0.36 mg/g(fr wt)의 색소를 생산하였다. 모상근의 배양시 총질소농도 60 mM, 탄소원으로 sucrose가 모상근의 성장과 색소의 생산에 적합하였으며, 0.5 mg/L IAA를 첨가하였을 때 모상근이 가장 빠르게 성장하였고 1 mg/L IAA를 첨가하였을 때 가장 높은 색소함량(0.41 mg/g, fr wt)을 나타내었다. 그러나 2,4-D의 경우 모상근의 성장과 색소합성이 억제되는 경향을 보여주었다. 아울러 anthocyanin 색소를 분리, 동정한 결과 pelargonidin-glucoside로 확인되었다.

주요어: *Agrobacterium rhizogenes*, 인삼 모상근, 안토시아닌, IAA, pelargonidin glucoside

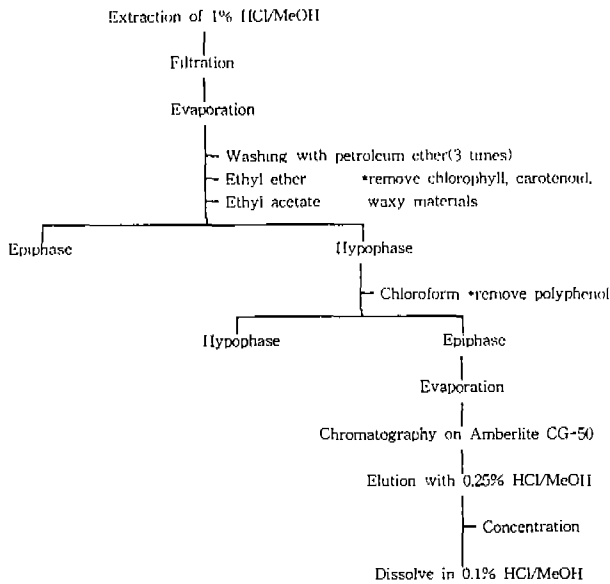
Anthocyanin은 식물에서 가장 널리 분포된 수용성 색소성 분이며 꽃, 잎 및 과일에서 볼 수 있는 담홍색, 주홍색, 적색, 자주색, 보라색 및 청색을 나타내는 물질로서 식품산업에 주로 사용되어지는 천연색소이다(Fuleki, 1969; Yoon *et al.*, 1978). 식물체에서 얻어지는 이러한 천연색소는 일반적으로 환경적 제약에 의한 공급의 불안정, 노동 집약적 등의 문제점이 있어서 대부분의 식품산업에서는 화학적으로 합성된 인공색소를 이용하고 있다(Do and Cormier, 1991; Ahn *et al.*, 1992).

그러나 합성색소의 일종인 tar계 색소는 암과 엘러지증상을 유발하며(Ahn *et al.*, 1989), 화학적 영역에서 최근의 관심은 미국의 FD & C(1960 Color Additive Amendment, Food Drug and Cosmetic Act of 1938)에서 식품 중에 합성된 red No 3 색소의 사용을 규제하고 있는 점이다(Do and Cormier, 1991). 이러한 유해성 문제는 식품산업에 있어서 천연색소의 이용 가능성에 대한 관심을 급증시키고 있으며, 동시에 식물의 세포 또는 조직 배양기술을 이용한 관련 생명공학기술의 발달로 식물의 2차대사산물의 일종인 천연색소(anthocyanin, shikonin, betacyanin 등)를 생산하려는 연구가 많이 이루어지고 있다(Ozeki and Komamine, 1981; Fujita *et al.*, 1987; Ahn *et al.*, 1989; Girod and Zyrd, 1991; Kim and Yu, 1991; Ahn *et al.*, 1992; Paek *et al.*, 1993).

2차대사산물 중에서 식물의 주요 색소원인 anthocyanin은 포도 또는 당근의 조직에서 유도된 캘러스 배양을 통하여 생산하려는 시도가 1950년 이후 계속되고 있으며 배양환경의 조절에 따라 색소의 생성능을 촉진시키기도 하였다(Do *et al.*, 1989; Takeda, 1990; Do and Cormier, 1991; Cormier *et al.*, 1992; Rajendran *et al.*, 1992). 또한 고려인삼에서는 자경종(紫莖種) 인삼으로부터 유도한 캘러스를 배양하여 anthocyanin 색소를 다량 생산하는 세포주로부터 색소를 추출 분리하여 peonidin-3-glucoside임을 확인하였다(Ahn *et al.*, 1989). 하지만 세포배양의 경우 계대배양이 진행될 수록 세포의 유전적, 생화학적 변화 때문에 2차대사산물의 함량이 안정되어 있지 않아 연구에 많은 어려움을 갖고 있다. 이러한 단점을 극복할 수 있는 방법으로 *Agrobacterium rhizogenes*가 지니고 있는 Ri-plasmid 중 전이 유전자(T-DNA)의 발현에 의하여 유도된 모상근(hairy root)을 배양하여 약용, 방향성 물질, 살충제, 색소 등의 산물을 생산하려는 연구가 활발히 진행되고 있다(Ishimaru *et al.*, 1991; Shimomura *et al.*, 1991; Taya *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1993; Paek *et al.*, 1993; Ahn *et al.*, 1993; Ko *et al.*, 1993a).

본 연구에서는 이와 같은 모상근 배양을 통하여 유전적인 안정성이 입증되고(Ko *et al.*, 1993b) 2차대사산물 중의 하나인 saponin의 생산이 확인된(Hwang *et al.*, 1991; Ko *et al.*, 1993a) 인삼 모상근을 이용하여 특정 유용산물의 다량생산에 관한 연구의 일환으로 빛에 의한 anthocyanin 색소의 합성, 합성된

\*교신저자: Fax (062) 524-2022



**Fig. 1.** Flow diagram for the extraction of ginseng anthocyanins.

색소의 규명, 배양 조건에 따른 색소 생산성 등을 조사하여 그 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 모상근 clone의 선발 및 배양

Anthocyanin 생산에 사용한 모상근 clone은 Hwang 등(1991)과 Ko 등(1993a)의 방법에 의하여 유도, 배양하여 확보된 HB3 clone으로써 본 실험에서는 HB3 clone의 모상근 각각으로부터 새로운 clone을 2차로 선발하였다. 즉 성장 중인 모상근을 근단으로부터 2cm의 크기로 잘라서 하나의 플라스크에 하나씩 접종한 후 분지능, 성장속도, 외부형태에 의해 10개의 clone을 선발하여 clone을 동결화하였으며 이중 HB3-6 clone을 250 mL의 플라스크로 옮겨 회전식 진탕배양기에서 호르몬 무첨가 MS 액체배지로 계대배양하였다.

### 광조건 및 배양조건

회전식 진탕배양 중인 모상근 0.5g(건물 중)을 air-in, out 설비가 되어 있는 500 mL의 플라스크(배지량 300 mL, pH 5.8, sucrose 3%)로 전이한 후 외부로부터 여과된 공기(공기유출속도 0.25 L/min)를 공급하고 16/8 광주기(1500 Lux, F36W cool white 133, sylvania GTE)에서 30일 동안 배양하여 모상근의 성장과 색소 함량을 조사하였다. 모상근의 생장은 30일 동안

위의 조건에서 배양한 각각의 모상근을 회수하여 증류수로 3회 세척한 다음 여과지(Whatman filter paper, No 2)로 물기를 제거하고 이를 5회 반복하여 여분의 물기를 제거한 다음 동결 건조기로 시료를 건조시킨 후 건조량으로 측정하였으며, anthocyanin 색소의 함량은 Francis(1982)의 방법에 따라 cranberry anthocyanin의 extinction coefficient( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 98.2$  at 535 nm)를 이용하여 계산하였다.

### 질소원의 농도, 탄소원의 종류, 호르몬 첨가에 의한 anthocyanin 함량

MS배지의 총질소농도인 60 mM(20.6 mM  $\text{NH}_4^+$ , 39.4 mM  $\text{NO}_3^-$ )과 총질소농도를 39.4 mM(10.3 mM  $\text{NH}_4^+$ , 29.1 mM  $\text{NO}_3^-$ )로 감소시켜 위의 조건과 동일하게 배양한 후 질소원의 감소가 모상근의 성장과 색소 형성에 미치는 영향을 조사하였으며, 탄소원은 glucose, sucrose, fructose의 농도를 각각 3%로 사용하여 위의 조건과 동일하게 배양하여 탄소원의 종류가 모상근의 성장과 색소 형성에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 2,4-D, IAA, IBA를 각각 0.5, 1 mg/L씩 첨가하여 위의 조건과 동일하게 배양한 후 호르몬에 의한 모상근의 성장과 색소 형성에 미치는 영향을 조사하였다.

### Anthocyanin의 추출 및 정제

동결 건조한 시료는 막자사발로 마쇄하여 1% HCl/MeOH 용액에 침적한 후 4°C에서 24시간 압소에 보관하였다. 냉암소에서 추출한 색소액은 여과한 후  $30 \pm 5^\circ\text{C}$ 에서 감압농축하여 Yoon 등(1978)의 방법(Fig. 1)에 따라 ethyl ether, ethyl acetate 순으로 세척하여 anthocyanin을 분리하였다. 분리한 색소는 chloroform을 처리하여 polyphenol을 제거하였으며, 색소층을 다시 감압농축한 후 Amberlite CG-50 column에 주입하여 증류수로 수용성 당류, 유기산, 아미노산 등을 제거하였다. 다음에 0.25% HCl/MeOH로 흡착된 색소를 용출하여 감압농축하였다. 색소의 분석은 UV-Vis spectrophotometer(Gilford Model Response)를 통한 200-600 nm의 scanning과 5%  $\text{AlCl}_3$ 의 첨가 후 최대흡수파장( $\lambda_{\text{max}}$ )의 이동 등의 색소의 광학적 특성으로 조사하였다.

### Anthocyanin의 동정

정제된 색소 10 mg에 2 mL의 2 N HCl을 가하여 100°C의 수욕조에서 45분 동안 가수분해한 후 1 mL의 isoamyl alcohol을 첨가하여 aglycone을 isoamyl alcohol층으로 분리하였다. 분리한 색소는 cellulose plate와 silica gel plate에 spot하여

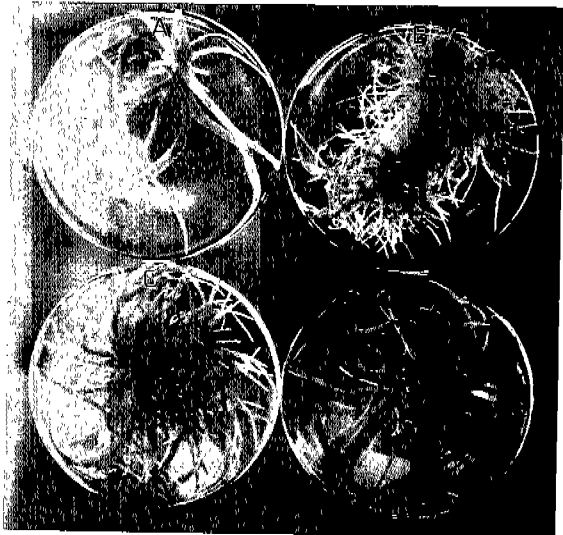


Fig. 2. Morphological differences of hairy root clones cultured in MS medium. A, HB3-1 clone; B, HB3-10 clone; C, HB3-6 clone; D, HB3-2 clone.

용매 forestal(acetic acid:water:conc HCl=30:10:3)로 전개 하였으며, 비교 표준물질은 제라늄(*Pelargonium inquinans* AIT)의 꽃에서 추출한 색소의 aglycone인 pelargonidin를 사용하여 R값을 비교하였다. 한편 aglycone을 추출하고 남아 있는 수층부의 glycosides는 다시 감압농축하여 cellulose plate와 silica gel plate에 spot한 후 용매(isopropanol:water=4:1)를 사용하여 당표준품(fructose, glucose, rhamnose, xylose)과 함께 전개시켰다. 전개된 plate는 완전히 건조하여 aniline-hydrogen phthalate sugar reagent(Francis, 1982)를 분무한 다음 105°C의 건조기에서 3-5분간 가열발색시켜 당의 종류를 조사하였다.

결과 및 고찰

모상근 clone의 선발 및 배양

Fig 2는 HB3 clone의 모상근을 근단으로부터 2cm의 크기로 잘라서 하나의 플라스크에 하나씩 접종한 후 분지능, 성장속도, 외부형태에 의해 10개의 clone을 선발하여 clone을 동결화한 다음 2개월간 배양한 결과로서 70%가 HB3-10의 표현형을 보여주었으며 나머지 3개의 clone은 다소 다른 형태를 나타내었다. 이 중에서 높은 분지형 성능이 2차대사산물의 생산과 일치하지 않아(Ko et al., 1993a) HB3-10에 비하여 다소 분지형성능이 떨어지는 HB3-6 clone을 6개월간 호르몬 부침가 MS배지에서 암배양하여 색소의 형성을 유도하였다. 그러나 암상태에서는 색소형성이 유도되지 않았으며, 이를 air-in, out 설비가 되어있는 500 mL의 플라스크로 옮겨 광량이 1500

Table 1. Time course of the growth and anthocyanin synthesis for ginseng hairy root cultures in the light condition (1500 Lux, 16/8 photoperiod). Values are means of 5 replication

Culture time (day)	Growth (g. dry wt)	Anthocyanin content (mg/g. fr wt)
0	0.5	No anthocyanin synthesis
10	0.9±0.2	0.11±0.03
20	1.7±0.1	0.18±0.02
30	2.1±0.1	0.36±0.03
40	2.3±0.2	0.32±0.03

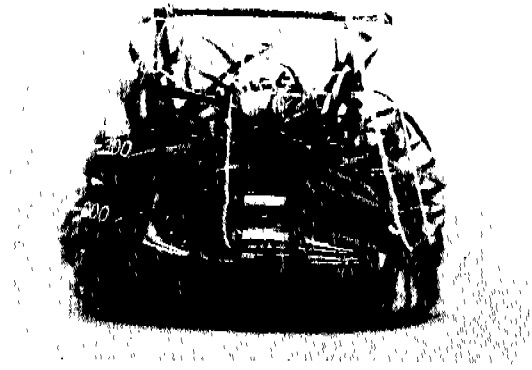


Fig. 3. Hairy root cultured in the light condition (1500 Lux, 16/8 photoperiod) for 30 days in MS medium.

Lux로 조절되는 배양실에서 배양하면 모상근의 생장은 감소하는 반면 배양 5일 후부터 근단에서 1-1.5cm를 제외하고 서서히 색소를 합성하기 시작하여 배양 30일에 최대의 색소 함량(0.36 mg/g. fr wt)을 나타내었다(Table 1). Fig.3은 광조건에서 30일 동안 배양한 모상근으로 근단부위를 제외하고 모든 부위에서 색소형성을 관찰할 수 있다. 그러나 장류(*Phytolacca esculenta* V. Houtte)에서는 색소형성이 광조건하에서만 유도되며 합성부위가 정단분열조직에서 시작되어 세포의 분화가 성장하는 방향으로 회색되는 경향을 나타내고(Yang et al.,1993), red radish(*Raphanus sativus* cv. Chungpiphongsim)에서는 암상태에서도 clone에 따라 소량의 색소 형성이 유도되며 합성부위가 전체적으로 나타나(Ahn et al., 1992) 식물종의 선택과 모상근 clone에 따라 색소의 합성조건과 합성부위가 다름을 알 수 있다.

질소원과 탄소원에 의한 anthocyanin 함량

배양배지의 성분 중 총질소농도의 감소가 모상근의 성장과 anthocyanin 함량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 총질소

**Table 2.** Effects of carbon source on growth and anthocyanin content in ginseng hairy root cultures for 30 days in MS medium. Values are means of 5 replication

Culture time (day)	Growth (g, dry wt)	Anthocyanin content (mg/g, fr wt)
Glucose	1.4±0.1	0.14±0.01
Fructose	1.5±0.2	0.35±0.03
Sucrose	2.1±0.1	0.36±0.03

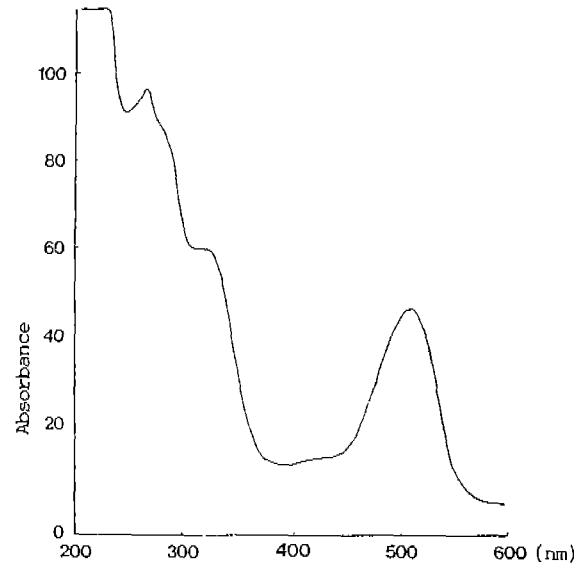
농도를 60 mM에서 39.4 mM(10.3 mM  $\text{NH}_4^+$ , 29.1 mM  $\text{NO}_3^-$ )로 감소시켜 광조건하에서 배양한 결과 모상근의 생장은 2.2 g (dry wt)에서 1.8 g(dry wt)으로, anthocyanin 함량은 0.36 mg/g (fr wt)에서 0.14 mg/g(fr wt)으로 모두 감소하였다. 이러한 결과는 지치(*Lithospermum erythrorhizon*) 모상근의 생장과 shikonin 합성에 낮은 질소농도가 효과적이라는 보고(Shimomura *et al.*, 1991)와는 다르나 red beet 모상근의 생장과 betalain 합성에서는 총질소농도 65 mM에서 빠른 생장과 많은 색소함량을 나타낸다는 보고(Paek *et al.*, 1993)와 유사하였다. 한편 탄소원의 종류가 모상근의 생장과 색소형성에 미치는 영향을 조사한 결과(Table 2) 색소형성에서는 탄소원으로 sucrose와 fructose를 사용하였을 때 색소형성이 가장 높았으며 모상근의 성장에는 sucrose가 가장 적합하였다. Jung 등(1992)은 *Catharanthus roseus*의 모상근 배양에 의한 catharanthine 생산에서 본 실험과 동일 농도의 sucrose, glucose, fructose를 사용하였을 때 sucrose가 가장 빠른 모상근의 성장을 보이며 catharanthine 생산량은 fructose가 sucrose에 비하여 2배 정도 높다고 하였는데, anthocyanin 생산에서는 sucrose가 적합하여 목적하는 산물에 따라 이용하는 탄소원이 다를 수 있었다.

#### 호르몬 첨가에 의한 anthocyanin 함량

Table 3은 2,4-D, IAA, IBA를 각각 0.5, 1 mg/L씩 첨가하여 광조건에서 배양한 후 호르몬에 의한 모상근의 생장과 색소형성에 미치는 영향을 조사한 것이다. 모상근의 생장은 0.5 mg/L의 IAA 첨가시 가장 높게 나타났으며 0.5 mg/L의 IBA

**Table 3.** Effects of auxins on growth and anthocyanin content in ginseng hairy root cultures for 30 days in MS medium. Values are means of 5 replication

Auxins (mg/L)	2,4-D		IBA		IAA	
	Growth (g, dry wt)	Anthocyanin (mg/g, fr wt)	Growth (g, dry wt)	Anthocyanin (mg/g, fr wt)	Growth (g, dry wt)	Anthocyanin (mg/g, fr wt)
None	2.1±0.1	0.36±0.03	2.1±0.1	0.36±0.03	2.1±0.1	0.36±0.03
0.5	1.1±0.3	0.10±0.01	2.4±0.6	0.35±0.02	2.7±0.6	0.38±0.04
1.0	0.8±0.2	0.11±0.01	2.1±0.4	0.38±0.01	2.4±0.5	0.41±0.02



**Fig. 4.** Spectrometric scanning (200-600 nm) of anthocyanin isolated from ginseng hairy root.

에서도 매우 빠른 성장을 보였지만 0.5 mg/L의 2,4-D 경우 매우 느리게 성장하며 약간의 탈분화 현상이 관찰되었고 색소의 합성이 매우 억제됨을 알 수 있었다. 그러나 auxins 중에서도 식물세포의 종류에 따라 IAA가 세포의 성장을 억제하고 2,4-D가 성장을 촉진하기도 하며 색소의 함량은 이와 반대의 결과를 나타내기도 하기 때문에(Rau and Forkmann, 1986) 모상근의 생장과 색소의 생산을 최적화할 수 있는 배양조건을 세밀히 규명함이 필요하다고 판단된다. 또한 1 mg/L의 IAA가 첨가된 배지에서 성장한 모상근에서 0.41 mg/g(fr wt)의 색소함량을 보여 anthocyanin의 함량이 풍부한 품종인 맨드라미 꽃잎의 1.02 mg/g(fr wt)와 비교하여(Yoon *et al.*, 1978) 40.2% 수준이었다.

#### Anthocyanin의 분리

정제된 색소를 0.01% HCl/MeOH로 용해시켜 200-600 nm의 흡광도 spectrum을 조사한 결과(Fig. 4) 530 nm에서 흡수

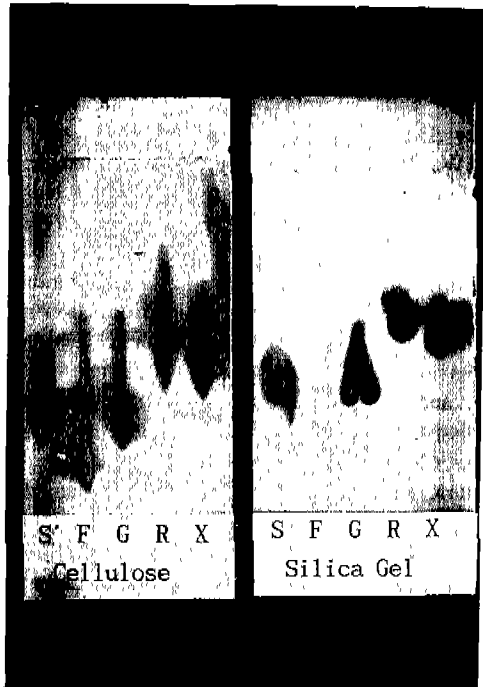


Fig. 6. Thin layer chromatogram of aglycone isolated from anthocyanin in ginseng hairy root. Lane A.P, authentic pelargonidin; Lane S, isolated aglycone.

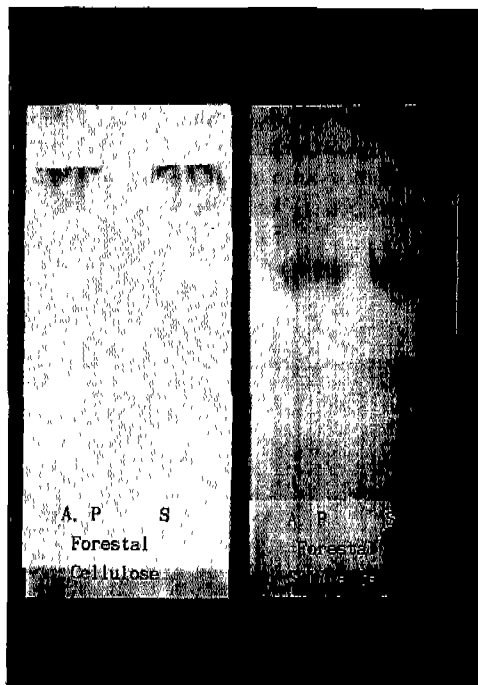


Fig. 5. Thin layer chromatogram of sugar moieties isolated from anthocyanin in ginseng hairy root. Lane S, isolated sugar moiety; Lane F, fructose; Lane G, glucose; Lane R, rhamnose; Lane X, xylose.

peak의 특성을 이루는 anthocyanin임을 확인하였으며, 5% AlCl<sub>3</sub>의 첨가에 따른 최대흡수파장( $\lambda_{max}$ )의 무변화로 anthocyanin 분자내의 B환에 OH기를 한 개만 가지고 있는 pelargonidin, peonidin, malvidin계열의 색소로 추정되었다.

Anthocyanin의 동정

농축색소는 0.5%(w/v) citric acid를 용매로하여 cellulose plate에 전개하였을 때 chromatogram상에 하나의 band를 형성하여 상승하였으며 UV광(360 nm)하에서 형광을 발하지 않아 배당체의 종류는 monoglycosides임을 확인하였다. 그리고 2N HCl으로 가수분해하여 얻은 당분획을 표준품과 함께 전개하였던 바 Fig.5와 같이 cellulose와 silica gel plate에서 모두 glucose와 R<sub>f</sub>치가 일치하여 색소의 당분획은 glucose로 확인되었으며, 제라늄의 꽃에서 추출한 색소의 aglycone인 pelargonidin을 표준물질로하여 시료에서 추출한 aglycone과 함께 전개한 결과(Fig.6) R<sub>f</sub>가 동일하여 anthocyanin의 aglycone은 pelargonidin으로 확인되어 인삼 모상근에서 빛에 의하여 유도된 anthocyanin의 주색소는 pelargonidin-glucoside임을 알 수 있었다.

인 용 문 헌

Ahn, I.O., K.T. Choi and B.D. Kim. 1989. Identification of anthocyanin pigments from the tissue of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Kor. J. Plant Tissue Cult.* 16: 115-122.

Ahn, J.C., Y.W. Paek, Y.H. Kang and B. Hwang. 1992. Production of anthocyanin by culture of hairy roots of *Raphanus sativus* cv. Chungpilhongsim. *Kor. J. Bot.* 35: 37-43.

Ahn, J.C., Y.W. Paek, C.K. Sung, G.H. Kang and B. Hwang. 1993. Production of saponin by hairy root culture of *Bupleurum falcatum* L. I. Comparison of saponin content and pattern in callus, adventitious root, hairy root and cultivated root. *Kor. J. Bot.* 36: 43-49.

Cormier, F., C.B. Do and C. Moresoli. 1992. Anthocyanin release from grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. *Biotechnol. Letters* 14: 1029-1034.

Do, C.B., F. Cormier and H.A. Crevier. 1989. Effects of sucrose concentration on the accumulation of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera*) cell suspension. *Can. J. Bot.* 68: 1822-1825.

Do, C.B. and F. Cormier. 1991. Effects of low nitrate and high sugar concentration on anthocyanin content and composition of grape (*Vitis vinifera*) cell suspension. *Plant Cell Reports* 9: 500-504.

Francis, J.F. 1982. Analysis of anthocyanins. In, Anthocyanin as Food Colors, Markakis P. (ed.). Academic

- press, London. pp. 181-208.
- Fuleki, T.** 1969. The anthocyanins of strawberry, rhubarb, radish and onion. *J. Food Sci.* **34**: 365-369.
- Fujita, Y., Y. Hara and T. Morimoto.** 1987. Production of shikonin derivatives by cell suspension culture of *Lithospermum erythrorhizon*. V. Difference in the production between callus and suspension cultures. *Plant Cell Reports* **6**: 8-11.
- Girod, P.A. and J.P. Zryd.** 1991. Secondary metabolism in cultured red beet (*Beta vulgaris* L.) cells: Differential regulation of betaxanthin and betacyanin biosynthesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* **25**: 1-12.
- Hwang, B., K.M. Ko, K.H. Hwang, S.J. Hwang and Y.H. Kang.** 1991. Production of saponin by hairy root cultures of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Kor. J. Bot.* **34**: 289-296.
- Ishimaru, K., H. Yonemitsu and K. Shimomura.** 1991. Lobetyolin and lobetyol from hairy root culture of *Lobelia inflata*. *Phytochemistry* **30**: 2255-2257.
- Jung, K.H., S.S. Kwak, S.W. Kim, H. Lee, C.Y. Choi and J.R. Liu.** 1992. Improvement of the catharanthine productivity in hairy root cultures of *Catharanthus roseus* by using monosaccharides as a carbon source. *Biotechnol. Letters* **14**: 695-700.
- Kim, S.G. and H.J. Yu.** 1991. Production of shikonin derivatives by cell lines of *Lithospermum erythrorhizon*; selection for high shikonin production in lines of single cell origin. *Kor. J. Plant Tissue Cult.* **18**: 313-321.
- Ko, K.M., J.C. Ahn, S.J. Hwang, Y.H. Kang and B. Hwang.** 1993a. Production of secondary metabolites from hairy root of *Panax ginseng* transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. II. Improvement of saponin contents and mass cultures of ginseng hairy root. *Kor. J. Plant Tissue Cult.* **20**: 41-46.
- Ko, K.M., J.J. Song, B. Hwang and Y.H. Kang.** 1993b. Cytogenetic and histological characteristics of ginseng hairy root transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Kor. J. Bot.* **36**: 75-81.
- Ozeki, Y. and A. Komamine.** 1981. Induction of anthocyanin synthesis in relation to embryogenesis in a carrot suspension culture: Correlation of metabolic differentiation with morphological differentiation. *Physiol. Plant* **53**: 570-577.
- Paek, Y.W., J.C. Ahn, B.G. Jung, S.U. Kim and B. Hwang.** 1993. Betalain production by hairy root cultures of red beet (*Beta vulgaris* L.). *Kor. J. Plant Tissue Cult.* **20**: 159-165.
- Rajendran, L., G.A. Ravishankar, L.V. Venkataraman and K.R. Prathiba.** 1992. Anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* as influenced by nutrient stress and osmoticum. *Biotechnol. Letters* **14**: 707-712.
- Rau, D. and G. Forkmann.** 1986. Anthocyanin synthesis in tissue cultures of *Callistephus chinensis* (*China aster*). *Plant Cell Reports* **5**: 435-438.
- Shimomura, K., H. Sudo, H. Saga and H. Kamada.** 1991. Shikonin production and secretion by hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Reports* **10**: 282-285.
- Takeda, J.** 1990. Light-induced synthesis of anthocyanin in carrot cells in suspension. II. Effects of light and 2,4-D on induction and reduction of enzyme activities related to anthocyanin synthesis. *J. Experiment. Bot.* **41**: 749-755.
- Taya, M., M. Koji, K.O. Masahiro, T. Setsuji and I. Takahito.** 1992. Production and release of pigments by culture of transformed hairy root of red beet. *J. Ferment. and Bioeng.* **73**: 31-36.
- Yang, D.C., S.J. Lee, K.Y. Yun and Q. Chae.** 1993. Blue light-dependent betalain synthesis in hairy root. I. Model system for the study on the photo-signal transduction. *Kor. J. Plant Tissue Cult.* **20**: 35-40.
- Yoon, J.H., S.J. Lee and K.S. Kim.** 1978. Studies on the utilization of plant pigments. I. Isolation and identification of anthocyanin pigments in *Ganges amaranth*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **10**: 194-202.

(1994. 1. 14 接受)

---

## Production and Identification of Anthocyanin in Hairy Root Cultures of Ginseng

Ko, Kyeong Min, Yang Soon Choi<sup>1</sup> and Baik Hwang\*

*Department of Biology, Chonnam National University, Kwangju; and*

*<sup>1</sup>Department of Clinical Pathology, Seokang Junior College, Kwangju*

### ABSTRACT

In hairy root cultures of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) transformed by *Agrobacterium rhizogenes*, the effects of light, carbon source and various hormone on hairy root growth and anthocyanin production were investigated. Anthocyanin synthesis began to first occur 5 days after exposure to light, and then maximum yield of anthocyanin was 0.36 mg/g(fr wt) in MS medium after 30 days. Of the nutritional factors concentration of 60 mM nitrogen and sucrose as a carbon source showed marked effects on the growth and anthocyanin production: MS medium supplemented with 0.5 mg/L IAA was most suitable for the hairy root proliferation, and the best accumulation of anthocyanin was obtained at 1 mg/L IAA treatment (0.41 mg/g, fr wt). Whereas 2,4-D tended to restrain the pigment synthesis. From the isolation and identification of anthocyanin pigments, main anthocyanin in ginseng hairy root was identified as pelargonidin-glucoside.

*Key words*: *Agrobacterium rhizogenes*, ginseng hairy root, anthocyanin, IAA, pelargonidin glucoside

---

\*Corresponding author: Fax 82-62-524-2022