

꽃기린 (*Euphorbia splendens* Bojer) 배양세포로부터 화청소의 대량생산 및 동정

선정훈* · 정재동¹

태평양 중앙연구소, ¹경북대학교 농과대학 원예학과

Mass Production and Identification of Anthocyanin in Cell Cultures of *Euphorbia splendens* Bojer

Jeong Hoon SEON* and Jae Dong CHUNG¹

Lab. of Biotechnology, Pacific R&D Center, Yongin-Kun, 449-900; and

¹Department of Horticulture, Kyungpook National University, Taegu, 702-701. *Corresponding author.

To assess the feasibility of anthocyanin production in cell cultures of *Euphorbia splendens* Bojer, the role of sucrose in pigment production was investigated and pilot scale cultures were attempted to establish mass production system. And also, several instrumental analyses were conducted to identify the pigment extracted from cultured cells. Anthocyanin production was promoted prominently with concentrations of sucrose ranging from 3% to 9% while cell growth was maximized at 3% of sucrose. This suggested that high osmolarity of sucrose enhance pigment production. When cells were cultured in two types of bioreactor, better cell growth was achieved with draft-type air lift bioreactor than impeller type bioreactor and the pigment productivity was reached to 2.2 mg/L/day. The major pigment extracted from cultured cells was characterized as cyanidin-3-glucoside.

Key words : bioreactor, pigment

화청소는 식물의 꽃과 과실에 분포하며 성숙 또는 stress의 지표가 되는 색소로서 pelargonidin을 기본 aglucone으로 하여 B환의 3'번과 5'번 위치의 hydroxylation과 methylation에 따라 크게 6가지 형으로 구분되며 A환의 당 결합위치에 따라 약 200여종 이상의 화청소 유도체가 존재한다. 현재까지 조직배양을 통해 화청소의 형성을 보고한 사례는 약 30여종의 식물체에 이르고 있는데 *Vitis vinifera* (Yamakawa et al., 1985), *Daucus carota* (Kinnersley and Dougall, 1980; Ozeki and Komamine, 1985), *Zea may* (Straus, 1959), *Compositae* (Cojin et al., 1981), *Populus* (Ball et al., 1972) 및 *Malus* (Yuta, 1991) 등에서 이의 생성을 보고하였다. 조직배양을 통해 부가가치성이 높은 이차대사산물을 대량으로 생산할 수 있다면 노지재배에 비해 극히 짧은 생육주기, 계획

적인 생산 및 노동, 기술, 자본이 집중된다는 점에서 기업화의 가능성이 대단히 크다.

그러나 이의 생합성과정이 까다롭고 세포주간의 함량차 및 고함량주의 선발, 배양조건의 설정, 물질추출 및 정제과정 등에 관한 포괄적인 연구가 수행되어야 하는 어려움이 있다. 더우기 단계별로 배양조건과 세포주가 개발되면 배양조건의 확대에 의한 대량배양이 시도되어야 하는데 현재까지는 주로 미생물발효조를 응용하는 단계에 머물러 있다. 1959년 Tulecke와 Nickell이 *Ginkgo* 등의 배양에 carboy배양기를 사용한 이래 많은 식물체에서 생물반응기를 이용한 배양사례가 보고되고 있다(Kato et al., 1976; Wilson 1978; Curtis 1983; Taya et al., 1992). 그러나 지치와 담배(Kuchi, 1984)의 경우와 같은 극소수의 사례를 제외하고는 기업화

에 어려움을 겪고 있는데 이는 식물세포의 경우 미생물세포에 비해 그 크기가 10-100배 정도 크고, 생장에 따라 쉽게 세포괴를 형성하여 기계적인 손상을 받기 쉬운 점, 세포 배가시간도 미생물이 수 시간 이내에 이루어 짐에 반해 식물세포는 수 일이 경과되어야 하는점 및 장기간 배양에 의한 오염의 우려와 경제성의 문제 등을 안고 있다(Scragg and Fowler, 1985). 한편 본 실험에 사용된 꽃기린의 꽃에서 추출할 수 있는 색소의 함량이 극히 낮고 계절적으로 수확할 수 있는 시기가 한정되어 있어 대량생산이 불가능하다. 따라서 본 실험에서는 Seon 등(1990 a, b)에 의해 개발된 배양조건 및 세포주를 2.5 L 교반형 및 기포발생형 생물반응기에 적용하여 대량배양의 가능성을 검토하고자 하였고, 이들 세포로부터 생산된 색소의 추출, 정제 및 이의 동정을 목적으로 수행하였다.

재료 및 방법

탄소원과 색소형성

실험재료는 꽃기린(*Euphorbia splendens* Bojor)의 엽육조직에서 유도한 캘러스를 약 3,000 lux로 연속조명하면서 0.2 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L 2iP를 함유한 변형 MS배지에서 현탁배양중인 세포를 사용하였다(Seon et al., 1990a). 배양은 배양세포를 함유한 배양액 5 ml(약 0.5 g)을 sucrose 농도를 달리한 배지 15 ml에 현탁하여 배양하였다. 또한, 배양일수가 경과함에 따라 배지내 공급된 sucrose의 변화 및 잔존당 함량을 측정하기 위하여 Carbopac PA1 컬럼을 이용한 HPLC분석(Dionex IC, analogue range: 10 μ C, flow rate: 0.7 ml/min)을 행하였다.

생물반응기 배양

생물반응기 배양은 교반형(impeller) 및 기포발생형(air lift) 생물반응기를 사용하여 대량세포배양의 가능성을 검토하였다. 교반형 반응기는 2.5 L의 유리배양기 내부(ϕ 12.5 \times 18 cm, 한국발효기)에 6개의 impeller(2 \times 1.5 cm)가 부착되어 배지를 교반하고 배양기간 동안 pH, 용존산소요구도, 소포제(antifoamer)의 첨가 등의 자동조절이 가능한 회분식(batch type) 반응기이다(Fig. 1). 배양은 2.5 L 배양기에 배지 1,200 ml를 넣고 멸균 후, 배양 12-14일된 현탁배양세포 200 ml를 옮겨 총 배지량이 1,400 ml가 되게한 다음, 배지의 교반 속도가 세포의 생장에 미치는 영향을 검토하기 위해 impeller의 회전속도를 25 rpm과 100 rpm으로 하여 실험하였다. 공기의 유입량은 0.5 vvm으로 하였고 배지의 조성은 전보에서 얻은 조건으로 하였다. 한편 impeller의 회전시 발생

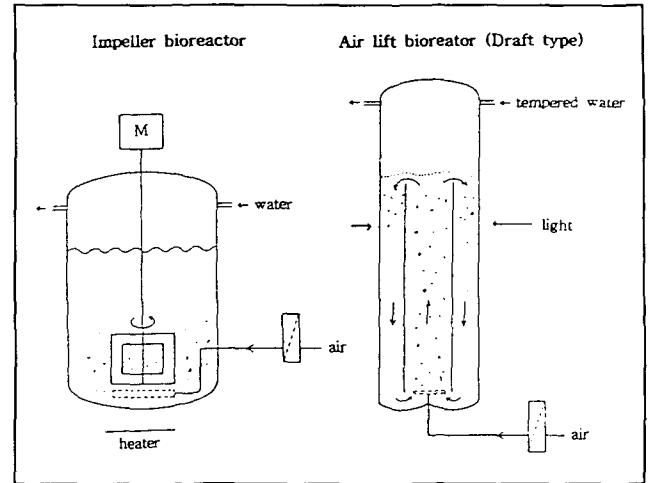


Figure 1. Schematic representation of bioreactor.

되는 shear에 의한 세포의 손상을 방지하고자 6개의 날개가 부착된 impeller를 제거하고 15°로 경사지게 조립된 2개의 날개(3 \times 1.5 cm)를 설치하였으며, 반응조 내부의 baffle을 제거하여 세포의 기벽생장을 방지코자 하였다. 배지는 MS배지의 CaCl₂ 농도를 1/4로 낮춘 110 mg/L로 첨가하여 거품을 방지코자 하였으며 sucrose 농도 역시 7%에서 3%로 낮추어 삼투압차에 의한 세포의 손상 및 기벽생장을 방지하였다. 기포발생형 생물반응기(2.5 L, LH Fermentation Co. 500 series, United Kingdom)는 원통형 유리배양기(ϕ 12 \times 52 cm)의 내부에 draft tube(ϕ 3.7 \times 37 cm)가 들어있고 draft tube의 기부에 기포발생장치(air sparger)를 설비한 것으로 기포발생장치에서 발생하는 기포에 의해 배양기의 기벽과 draft tube사이를 배지 및 세포가 상하로 순환되도록 되어 있다. 광은 배양기의 둘레에 약 3,000 lux의 조도로 배양의 전기간에 걸쳐 조사되도록 하였다. 배양은 배지 1,800 ml를 반응기와 별도로 멸균한 다음 무균적으로 배양기에 부은 후 현탁배양세포액 400 ml를 접종하였으며 특히 세포의 접종량을 달리하였을때의 색소생산성을 조사하였다. 색소 함량의 측정에는 배양세포를 생체중당 10 ml의 1% HCl-MeOH로 냉장추출하여 자외선 분광광도계로서 흡광도를 측정하고 cyanidin-3-glucoside의 분자량 445.2와 분자흡광계수 4.47 \times 10⁴(Hirasuna et al., 1991)을 사용하여 Fuleki와 Francis(1968)의 계산 방식에 의해 색소함량을 계산하였다.

화청소의 동정

배양 3-4주된 캘러스 또는 2-3주간 액체배양한 세포군의 적색부위를 1% HCl-MeOH 용액으로 4°C의 냉장상태에서 하룻밤 이상 추출한 후 여과하였다. 추출액의 정제를 위하여 1 N 염산용액을 통과시켜 H⁺형으로 재생 시킨 양이온

교환수지 (Diaion SK-IB), 또는 methanol로 재생시킨 다공성 흡착수지 (Amberite, XAD-7)에 흡착시킨 후 1% HCl-MeOH 용액으로 수지에 흡착된 색소를 용출하였으며 용출액은 40°C 이하로 감압농축하고 건고한 색소를 0.1% HCl-MeOH 용액으로 용해하여 색소의 분리 및 동정의 시료로 사용하였다. 한편 이와는 별도로 수지로서 정제되지 않은 불순물을 제거하기 위하여 수지처리액을 Matsumoto 등 (1970)이 사용한 색소침전방법에 의해 색소를 분리하였다. 추출된 색소액은 BAW, AHW, Forestal, PW, BH 및 HW (Lim et al., 1988) 전개용매를 사용하여 1차적으로 20매 정도의 silicagel plate(Silicagel 60F254, Merck, 20×20 cm, 0.1 mm)에 대상으로 전착하여 12-14 시간 7°C 의 저온실에서 상승전개 시켰다. 전개된 색소의 분획을 취하여 2차로 cellulose plate(DC-Fertigplatten PEI-Cellulose F, Merck, 20×20 cm, 0.1 mm) 상에 전착시키고 AHW 용매로 7°C의 저온실에서 13시간 동안 전개 시켰다. 전개된 plate를 말린 다음 60% 초산용액으로 4시간동안 실온에서 재차 분리함으로써 순수한 단일색소를 취하였다. 시료 aglycone의 분리 및 동정은 Akuta 등(1976)이 사용한 방법을 다소 변형하여 사용하였다. Silicagel plate 상에서 분리한 조색소액을 5 ml 정도로 농축하고 2 N HCl 10 ml를 가하여 환류냉각기가 부착된 수목조에서 2시간 동안 가열에 의해 가수분해 하였다. 가수분해물을 냉각 후 분액깔대기로 옮겨 동량의 iso-amylalcohol을 첨가하여 진탕한 다음 iso-amylalcohol 층과 수층부로 분리하였다. Amylalcohol 층으로 전용된 색소액은 -80°C의 초저온냉동기(Revco ILT 1790-A-N-M)에서 냉각시켜 -50°C, 100 μgHg의 압력으로 냉동건조(ISE FD 5510, freeze dryer, 일신엔지니어링)에 의해 amylalcohol 층을 제거하고 건고된 색소는 0.1% HCl-MeOH 용액으로 용해 하였다. 용해액은 cellulose plate에 몇 가지 anthocyanidin과 co-chromatography하여 이들과의 Rf치를 비교함과 아울러 HPLC(Hitachi L-5000 controller, L-6000 pump, L-4200 UV-vis detector)에 의해 aglycone을 동정하였다(Table 1).

Table 1. HPLC conditions for anthocyanidin identification.

Factor	Analysis condition
Column	μBondapak C18 (Waters, 4mm ID×30 cm)
Solvent	MeOH : CH ₃ COOH : H ₂ O (19 : 10 : 71)
Detection	530 nm
Flow rate	1.0 ml/min

TLC에 의해 분리한 aglycone을 0.1% HCl-MeOH 용액으로 용출하고 자외선 분광광도계로서 자외선 및 가시광선 부

위에서의 최대흡수파장과 가수분해 전후의 파장의 이동을 조사하고 5% 염화알루미늄용액(5% AlCl₃. 6H₂O/MeOH)을 2-3 방울 적하하고 파장의 이동여부를 조사 하였다. 또 배당체의 종류를 확인키 위해 색소액을 cellulose plate에 spotting한 후 0.5% citric acid로 4시간 동안 암상태로 전개 하여 spot의 상승과 UV 조사에 의한 형광발현을 조사하였다. Aglycone에 결합된 당을 동정하기 위하여 가수분해 과정에서 얻은 수층부를 3 N NaOH로 중화 시킨 후 감압농축하고 농축액에 pyridine을 소량 가하여 당을 용해하였으며, 재차 감압농축하여 pyridine을 휘발시켰다. 농축액을 물로써 용해한 다음 GFC 여과(φ1 μm, Whatmann)하여 비용해성 물질을 제거하고 0.5% 표준당액(glucose, fructose, rhamnose, maltose, lactose, mannose, xylose)과 함께 silicagel plate에 전착하여 PW 및 BAW 용매로서 5-6 시간 실온에서 상승 전개시켰다. 전개된 plate를 건고시키고 Patridge's reagent(0.93 g aniline과 1.66 g의 phthalic acid를 수포화시킨 n-butanol에 용해)를 분무하여 105-110°C dry oven에서 10분간 가열발색시킨 후 표준당과 Rf치를 비교하였다. 이와 함께 아미노산 자동분석기로서 당의 동정을 행하였는데 분석 방법은 제조회사인 Hitachi 사의 당분석방법중 자외선분석 방법에 준하였다 (Table 2).

Table 2. Analytical conditions for sugar analysis using amino acid analyzer.

Factor	Analytical condition
Solvent System	Time gradient(100 min.)
Column	Hitachi gel No. 3014-N, 55°C
Reaction temp.	110°C
Flow rate	0.5 ml/min.
Detection	UV 276 nm

표준색소는 야생 월귤나무(*Vaccinium myrtillus* L.)의 과실에서 추출한 색소로 그 조성 및 색소분리방법이 알려져 있으며(Nakayama and Kusano, 1990) 시판되고 있는 제품(Bilberry dry hydroalcoholic extract, Indena Co.)으로부터 delphinidin, cyanidin 및 malvidin의 3종의 색소를 분리하여 사용하였다. Pelargonidin은 시판되고 있는 표준품(Sigma Co.)을 0.1% HCl-MeOH 용액에 녹여 사용하였다.

결과 및 고찰

탄소원과 색소형성

Seon 등(1990a)은 색소의 생산에 7% sucrose가 가장 적합하다고 하였는데 본 실험에서도 이와 같은 경향을 나타내었다. 그러나 배양세포로부터의 총색소합량은 7%에서 가장 높았으나 단위세포무게당 색소합량은 sucrose 농도가 9%까지 증가함에 따라 촉진되었다. 반면, 세포생육은 3% 농도에서 최적생장을 나타내어 색소합량과 상반되는 결과를 나타내었다(Fig. 2). 한편, 배양일수의 경과에 따라 배지내 당 분석을 행한 결과(Fig. 3), 배양 1일 후부터 sucrose는 glucose와 fructose로 분해되기 시작하였고 배양기간이 경과함에 따라 glucose가 감소하여 세포의 생육에 이용됨을 알 수 있었다. 특히 세포가 성장정지기에 달한 시점에서도 세포의 생육에 이용되지 않은 상당량의 당이 배지내에 존재함을 알 수 있었는데 이러한 사실은 탄소원이 세포의 성장에 이용되는 한편, 색소형성에 필요한 PAL(phenylalanin ammonia-lyase)의 활력을 증가시키고(Matsumoto et al., 1970), 또 배지의 삼투압으로 작용하여 세포벽에서 이루어지는 대사과정의 변화를 초래하여 색소의 생산을 유도하는 것으로 생각된다(Yamada et al., 1983).

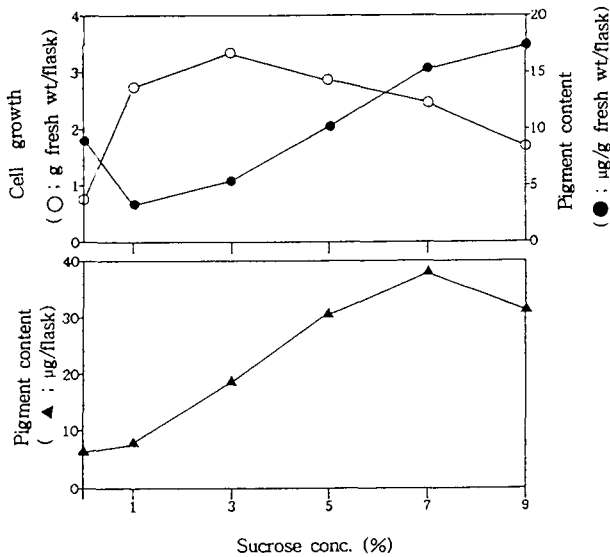


Figure 2. Changes of cell growth and pigment content according to sucrose concentration. Cells were cultured on modified MS medium containing 1:3 molar ratio of NH_4NO_3/KNO_3 and 0.06 M of total nitrogen source.

대량배양

교반형 생물반응기에 부착된 impeller의 교반속도가 세포의 성장에 미치는 영향을 보면, 25 rpm으로 교반할 때는 완전한 생육상을 나타내었으나 100 rpm에서는 세포의 생육이 일어나지 않아 배양 9일차에 배양을 종료하였다. 배양이 진

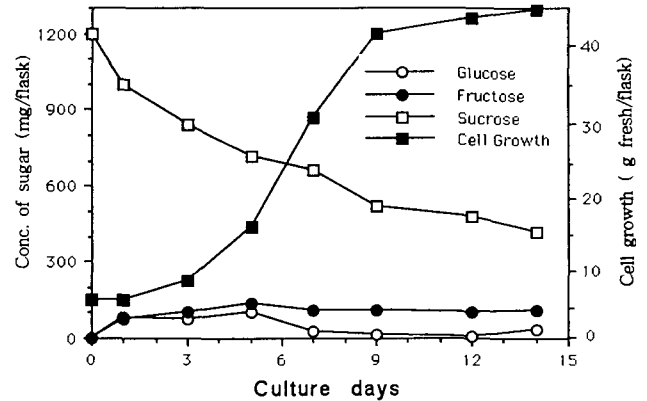


Figure 3. Profile of the sugar consumption and cell growth during culture period in modified MS medium containing 7% sucrose. Concentrations of sugars in cultured medium were analyzed by CarbpacPAL column using Dionex IC.

행됨에 따라 세포가 응집되고 많은 세포괴를 형성하여 생육하였으며 기벽생장이 많아 원활한 세포의 순환이 일어나지 않음을 알 수 있었다. 이러한 기벽생장은 세포에서 방출되는 다당류와 고농도의 탄소원에 의해 촉진되는데(Scragg and Fowler, 1985) 본 실험의 경우, sucrose 농도가 7%로서 일반적으로 사용되는 2-3%에 비해 2배 이상의 고농도임을 볼 때 이러한 현상이 유발되는 것으로 생각되었다. 100 rpm 처리구에서는 외관상 거의 모든 세포가 손상을 받아 파괴되었는데, 본 실험에서 행한 100 rpm이 상대적으로 저속이지만 식물 세포의 크기가 미생물에 비해 크고 세포벽이 단단하여 회전시 세포의 손상이 일어나는 것으로 보인다(Wagner and Vogelmann, 1977; Wilson 1978). 한편 배양기간 동안의 pH의 변화를 조사한 바(결과 미수록), 100 rpm 처리구에서 배양이 경과함에 따라 pH가 6.8까지 상승하였는데, 이는 교반에 의해 세포가 파괴되고 이로 인해 세포내 물질이 배지로 유출되어 pH가 상승한 것으로 판단된다. 따라서 배지교반 속도와 배양조건을 변경하여 실험한 결과(Fig. 4), 변경 전에 비해 훨씬 양호한 세포의 생육이 관찰되었다. 배양기간이 경과함에 따라 pH는 다소 상승하였으나 비교적 안정적으로 세포의 손상이 적게 일어남을 알 수 있었다. 한편 기벽생장 역시 현저히 감소하였는데 배지조건의 변경과 불필요한 구조의 제거가 이의 방지에 효과적인 것으로 생각되었다. 그러나, 이와같이 배양조건 특히 impeller의 구조를 변경하므로써 비록 양호한 세포의 생육상을 나타내었으나 색소생산의 주요인으로 작용한 sucrose의 농도를 낮춰야하는 점에 교반형반응기의 사용에 큰 문제점을 제시하였는데 개선된 반응기에서 sucrose농도를 높혀 세포의 성장에 미치는 영향을 검토할 필요가 있다. 반면 기포 발생형 생물반응기의 경우 특별한 배양조건의 변경없이 양

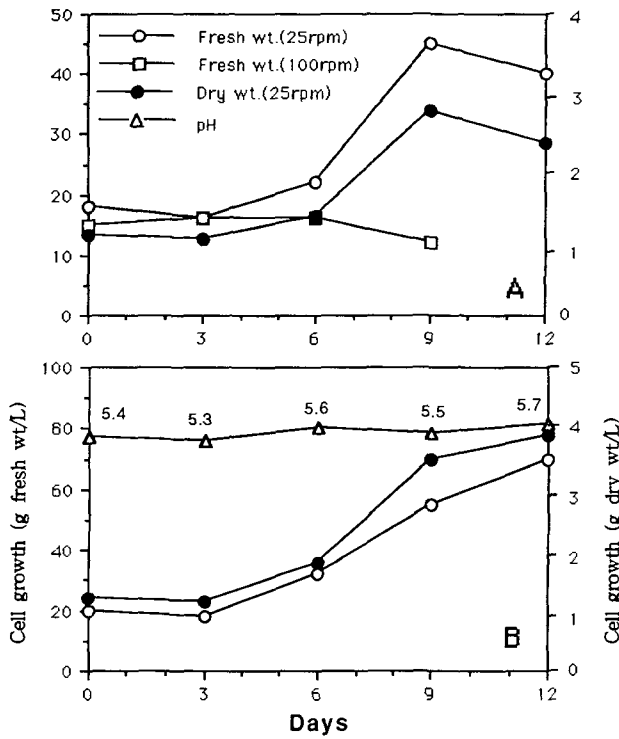


Figure 4. Time course of cell growth at different agitation speeds (A) and modified culture condition (B). Two blades were used instead of six blades impeller and concentration of sucrose was reduced from 7% to 3% in modified culture condition.

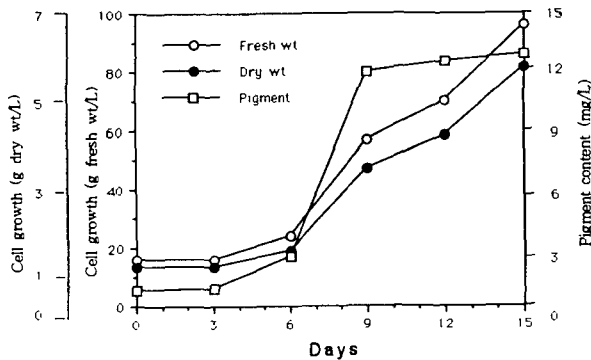


Figure 5. Cell growth and pigment content of *E. splendens* cells cultured in 2.5 L draft type-air lift bioreactor (light intensity, 3,000 lux; air flow rate, 0.5 vvm).

호한 생육상을 나타내었는데 세포의 생육은 배양기간이 경과함에 따라 증가되어 배양말기에 최대의 수량을 나타내었으며 색소의 함량은 배양 9일차에 최대에 달한 후 일정한 수준을 나타내었다(Fig. 5). 공기의 유입량이 많을수록(1 vvm 이상) 배지와 세포의 순환이 너무 급속하여 세포의 손상 및 거품의 과다발생이 우려되었는데, 본 실험에서

한 0.5 vvm 정도가 적절한 것으로 보인다.

한편 배지내 접종량을 달리하였을때 세포의 생육과 색소의 형성관계를 보면 (Table 3), 총 세포생산량은 30 g/L 접종구가 20 g/L 접종구에 비해 2배의 생산량을 나타내었고 색소의 총생산량은 20 g/L 접종구에서 양호하여 상반된 결과를 나타내었다.

Table 3. Effects of inoculum size on cell growth and pigment content of *E. splendens* cells cultured in 2.5 L air lift bioreactor.

	Inoculum size	
	20 g/L	30 g/L
Culture days	15	7
Total cell yield (g)	200	460
Total pigment content (mg)	33	30.8
Cell growth (g/L)	100	230
Pigment productivity(mg/L/day)	1.1	2.2

배양에 소요된 일수는 20 g/L 접종구에서는 15일이 소요되었으나 30 g/L 접종구에서는 7일경에 최대의 세포생산량을 나타내어 배양기간이 1/2로 단축되는 효과를 나타내었다. 1일 색소생산성의 경우 30 g/L 접종구가 20 g/L 접종구에 비해 2배의 생성율을 나타내었는데 이는 배양기간의 단축과 세포량의 증가에 의한 생산성의 증가를 의미하였다. 그러나 배지내 세포밀도가 지나치게 높음에 따라 광의 조사가 균일하게 이루어지지 않고 배지의 순환이 불충분하여 색소의 총 생산량은 감소되었다. 접종밀도를 높게해 줌으로써 배양기간을 대폭 단축시키고 색소의 생산성을 향상시키는 면에서 볼 때 대규모 배양을 시도할 경우, 운영 비용의 경제성을 도모하는 방안으로서 이의 검토가 행해져야 할 것이다. 이상 두 종류 생물반응기를 이용하여 대량배양의 가능성을 검토해 본 결과, 교반형의 경우 식물체의 종류에 따라 배지의 교반속도, 삼투압 및 impeller의 형태에 따라 세포의 생장이 크게 좌우되므로 세포의 손상을 방지하는 면에서 기포발생형 생물반응기가 효율적이었다. 그러나 기포발생형의 경우 배양 밀도가 높아짐에 따라 배지의 순환이 원활하지 못하고 배지의 상부에서 세포가 무리지어 성장하는 현상(bunch growth)이 유발되는 등의 문제가 발생하였는데 이의 대책이 모색되어야 할 것으로 사료된다.

색소의 추출 및 동정

메탄올 추출액을 양이온교환수지 및 다공성 흡착수지에 처리하여 정제한 색소액을 TLC분리에 의해 Rf 0.41의 주색

Table 4. Rf values and color characteristics of anthocyanidins.

Pigment	BAW	AHW	Color
Callus pigment	0.41	0.56	Pink
Cyanidin	0.41	0.56	Pink
Delphinidin	0.17	0.45	Blue
Malvidin	0.50	0.63	Red

소를 얻고 이를 2 N HCl로 100°C에서 2시간 동안 완전 가수분해 시킨 후 cellulose plate 상에서 BAW 및 AHW용매를 사용하여 몇 가지 anthocyanidin과 co-chromatography한 결과(Table 4), 캘러스로부터 생성된 주색소 aglycone의 Rf치와 색상이 cyanidin과 일치하였다.

가수분해에서 얻은 aglycone을 HPLC에 의해 분석한 결과, Figure 6과 같이 표준품의 cyanidin과 일치하여 꽃기린 배양세포의 주색소는 cyanidin을 aglycone으로하고 있음을 알 수 있었다. 주 색소를 가수분해 전과 가수분해 후의 spectrum 특성을 조사하여(Table 5), 최대 흡수파장 (λ_{max})의 이동 여부로 당의 결합위치를 조사한 바, 산가수분해 후 약 10 nm 정도의 파장의 이동을 관찰할 수 있었는데 Harborne(1958)에 의하면, cyanidin의 경우 3번 위치에 당이 결합되면 약 10-12 nm 정도의 파장이 이동되며, 5번 위치에 당이 결합되면 7 nm정도 이동한다고 하였는데 캘러스 색소와 cyanidin 표준품이 최대파장 (540, 541 nm) 및 파장이동폭 (10 nm)이 일치하는 점으로 보아 캘러스 색소는 cyanidin을 aglycone으로하고 3번 위치에 당이 결합되어 있는 것으로 추정되었다.

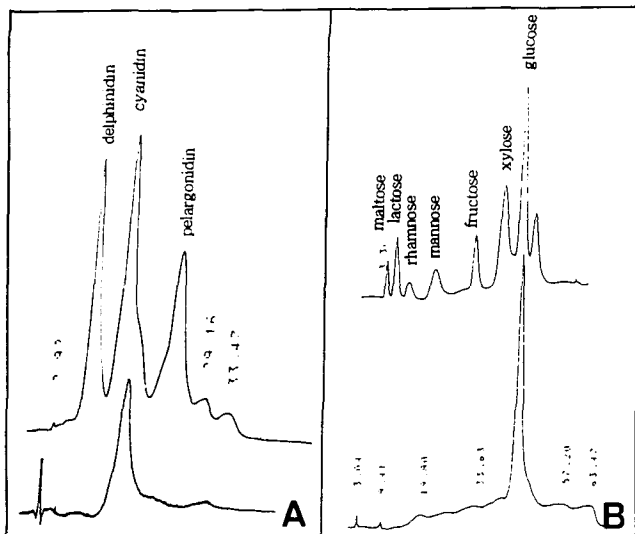


Figure 6. HPLC profiles of aglycone (A) and sugar moiety (B) of anthocyanin from cultured cells of *E. splendens*.

Table 5. Shift of maximum wavelength in the visible region after acid hydrolysis.

Pigment	λ_{max} before hydrolysis(nm)	λ_{max} as aglycon (nm)	Shift of wavelength (nm)
Callus pigment	530	540	10
Delphinidin	540	548	8
Cyanidin	531	541	10
Malvidin	536	543	7

또한 0.5% citric acid로 전개 후 UV광을 조사하면 단당류는 형광을 발하지 않고 이당류는 형광을 발하는데 본 색소를 전개한 결과, 하나의 spot만을 형성하며 상승하고 UV 조사(UV 245, 356 nm)에 의해서 형광의 발색이 없어 단당류인 것으로 판정하였다(Yoon et al., 1978; Ahn et al., 1989). 가수분해 과정에서 aglycone 부위를 제외하고 남은 수층부를 표준당과 함께 TLC 전개하여 당의 종류를 조사한 바, Table 6과 같이 PW 및 BAW 용매에서의 Rf치가 거의 같은 위치에 캘러스 당부위가 출현함으로써 aglycone에 결합된 당이 glucose임을 확인하였다. 이와는 별도로 아미노산 자동분석기를 사용하여 표준당과 함께 당분석을 행한 바, 주 색소로부터 가수분해된 당은 glucose로 확인되었다(Fig. 7). 따라서 꽃기린의 엽육조직으로부터 유도된 캘러스가 발현하는 적색색소는 cyanidin을 aglycone으로하고 한 분자의 glucose가 3번 위치에 결합된 cyanidin-3-glucoside인 것으로 추정되었다.

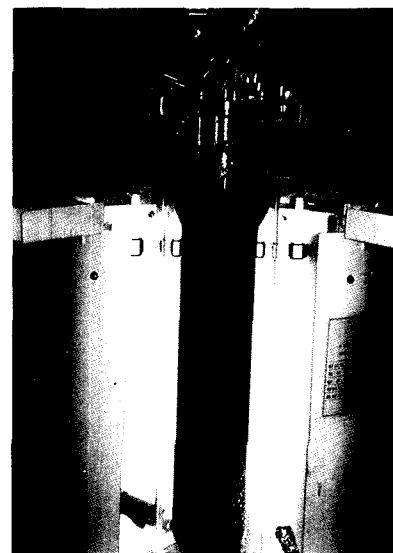


Figure 7. Cultivation of *E. splendens* cells in 2.5 L air lift (draft type) bioreactor.

Table 6. Thin layer chromatographic investigation of sugar moiety of anthocyanidin from cultured cells of *E. splendens*.

Sugar	Rf value		Color ^a
	PW	BAW	
Callus sugar	0.23	0.26	brown
Glucose	0.23	0.26	brown
Rhamnose	0.42	0.49	dark brown
Mannose	0.27	0.34	yellowish brown
Maltose	0.19	0.14	yellow
Xylose	0.32	0.36	brown

^aColors were investigated after treatment with Patridge's reagent.

적 요

꽃기린 현탁배양에 의한 화청소의 생산에 미치는 탄소원의 역할을 규명하고 이들 배양세포를 생물반응기를 이용하여 대량배양을 시도하였으며 생성된 색소의 분리 및 동정을 행하였다. 세포의 생장은 3% sucrose 농도에서 양호하였으나 단위세포무게당 색소함량은 sucrose의 농도가 3%에서 9%로 증가함에 따라 증진되었다. Sucrose는 배양 1일 후부터 glucose와 fructose로 분해되기 시작하며, 고농도로 공급된 sucrose는 배지의 삼투압제로 작용하여 색소의 형성을 촉진하였다. 생물반응기 배양의 경우, 기포발생형 생물반응기가 세포의 손상을 방지하 양호한 생육상을 나타내어 적합하였고 집종농도를 증가시킴으로서 총 색소의 함량은 감소하였으나 배양기간이 1/2로 단축되었으며 색소의 1일 생산성도 증가되는 효과를 나타내었다. 기포발생형 생물반응기를 이용한 색소생산량은 2.2 mg/L/day를 나타내었다. 한편, 배양세포로부터 생성된 주된 화청소는 cyanidin-3-glucoside로 추정되었다.

인 용 문 헌

Akuta SR, Matsudomi NT (1976) Studies on anthocyanin pigments in fruits harvested in Japan Part 1. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi 24:101-107

Ann IO, Choi KT, Kim BD (1989) Identification of anthocyanin pigments from the tissue of *Ginseng*. Kor J Plant Tissue Culture 16: 13-128

Ball EA, Harborne JB, Arditti J (1972) Anthocyanidins of *Dimorphothecca* (Compositae). Am J Bot 59: 924-930

Carew DP, Kruger RJ (1976) Anthocyanidins of *Catharanthus roseus*

callus cultures. Phytochemistry 15: 442

Colijin CM, Jonsson LMV, Scharm AW Kppl AJ (1981) Synthesis of malvidin and petunidin in pigmented tissue culture of *Petunia hybrida*. Protoplasma 107: 63-68

Fuleki T, Francis FJ (1968) Quantitative methods for anthocyanidins. J Food Sci 33: 72-77

Harborne JB (1958) Spectral methods of characterizing anthocyanin. J Biochemistry 70: 22-28

Hirasuna TJ, Schuler ML, Lackney VK, Spanswick RM (1991) Enhanced anthocyanin production in graph cell culture. Plant Sci 78: 107-120

Nakayama KS, Kusano S (1990) Physiological function of wildberry glycoside -I-. Food Technol 4: 45-56

Kato A, Kawazoe S, Iizima M, Shimizu F (1976) Continuous cultures of tobacco cells. J Ferment Technol 54: 82-87

KInnersley AM, Dougall DK (1980) Increase in anthocyanin yield from wild carrot cell cultures by a selection system based on cell aggregates size. Planta 149: 200-204

Kuchi SH (1984) Large-scale cultivation of useful compound. In Plant tissue culture and finechemicals. CMC Tokyo, pp 24-37

Matsumoto T, Masso N, Einosuk T (1970) Isolation and identification of anthocyanin from the cell suspension culture of Poplar. Agric Biol Chem 34: 1110-1114

Scragg AH Fowler MW (1985) The mass culture of plant cells. In Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol. 2. Academic Press, pp 107-115

Seon JH, HA SY, O PS (1990a) Factors influencing the production of anthocyanin from cell cultures of *Euphorbia milli*. Kor J Plant Tissue Culture 17: 87-94

Seon JH, Ha SY, O PS (1990b) Selection of high anthocyanin producing cell line from *Euphorbia milli*. Kor J Plant Tissue Culture 17: 129-139

Straus J (1959) Anthocyanin synthesis in corn endosperm tissue cultures. Plant Physiol 3: 536-541

Taya M, Mine K, Oka KM, Tone S, Ichi T (1992) Production and release of pigments by culture. Planta Med 44: 111-115

Wagner F and Vogelman M (1977) Cultivation of plant tissue culture in bioreactors and formation of secondary metabolites. In Plant tissue culture and its biotechnological applications. Springer Verlag, pp 245-252

Wilson G (1978) Growth and product formation in large scale and continuous culture systems. In Frontier of plant tissue culture Univ of Calgary Press, pp 169-177

Yuta SH (1991) Anthocyanin production from cultured apple cells. Biosci. Industry 49: 393-395

Yamada Y, Fujita Y (1983) Production of useful compounds in culture In Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 1. Macmillian, London, pp 717-

728

Yamakawa T, Onomichi K, Kodama T, Minoda Y (1985) Application of feeder layer method for improved colony formation of cells and protoplasts at low cell density. *Agric Biol Chem* 49: 3583-3585

Yamamoto Y, Kinoshita Y, Watanabe S, Yamada Y (1989) Anthocyanin production in suspension of high producing cell of *Euphorbia milli*.

Agric Biol Chem 53: 417-423

Yoon TH, Lee SJ, Kim KS (1978) Studies on the utilization of plant pigments. *Kor J Food Sci Technol* 10: 194-202

(1993년 12월 4일 접수)