

자리공(*Phytolacca esculenta* van Houtte) 모상근의 생장과 Betalain 생산에 미치는 항산화제의 효과

양덕조* · 김용해 · 최혜연 · 최철희¹ · 양덕춘²

충북대학교 자연과학대학 생물학과, ¹두산기술원, ²한국인삼연초연구원

Effects of Antioxidants on Growth and Betalain Production in Hairy Root Cultures of *Phytolacca esculenta* van Houtte

Deok Cho YANG*, Yong Hae KIM, Hye Yeon CHOI, Chul Hi CHOI¹, and Deok Chun YANG²

Department of Biology, College of Natural Science, Chungbuk National University, Cheongju, 360-763; ¹Doosan Technical Center, Yongin, 449-840; and

²Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon, 305-345. *Corresponding author.

The synthesis of betalain in hairy root cultures of *Phytolacca esculenta* van Houtte required the light, but the growth of hairy roots was inhibited 5 times under light condition (1,500 lx) compared to dark condition. To investigate the growth inhibition of hairy roots under light condition, we surveyed the effects of several antioxidants on growth and betalain production in suspension cultures of hairy roots. The growth of hairy roots was increased 1.2-1.4 times under dark condition and 1.3-1.9 times under light condition by the treatment of ascorbic acid, glutathione, α -tocopherol, sodium pyrosulfate and propylgallic acid. The betalain production was increased 1.2-2.1 times by antioxidants under light condition. The combination treatment of antioxidants didn't have any significant effect on the growth of hairy roots and betalain synthesis. The antioxidants on the betalain production were more effect under blue light than others. It was discussed that the endogenous oxidants may be produced under blue light.

Key words: ascorbic acid, glutathione, propylgallic acid, sodium pyrosulfate, α -tocopherol

자리공의 천연색소인 betalain의 합성은 캘러스 및 모상근에서 광(光)이 절대적으로 요구되지만 광상태에서는 모상근의 생장이 억제된다(Yang et al., 1993a, b). 광피해 현상의 한 요인으로써 생체내 photooxidation과 관련된 물질로 superoxide (O_2^-), singlet oxygen (1O_2), hydrogen peroxide (H_2O_2), 그리고 hydroxyl anion (OH^-) 등이 있다. 산화력이 강한 O_2^- 와 H_2O_2 그리고 OH^- 은 생체막의 지질성분을 peroxidation시키며, 유전정보 물질인 DNA, RNA의 구조적 변화를 일으키고, enzyme과 chlorophyll 등을 파괴시킨다(Fridovich, 1976; Kono et al., 1976; Yost and Fridovich, 1976; Asami and Akazawa 1978; Lesco et al., 1980). 1O_2 은 chemical, enzymatic, physical method에 의해서 생성될 수 있으며(Aubry and Rigaudy, 1981; Krinsky, 1977; KoryckaDahl and Richardson, 1978), 생성된 singlet oxygen은 pigment

bleaching과 membrane의 lipid peroxidation을 유발시킨다(Knox and Dodge, 1985; Gorsch and Laskawy, 1979; Yang, 1990).

Lipid peroxidation이 식물체에 미치는 영향은 lipid peroxide가 pigment bleaching을 포함한 생체물질의 산화를 촉진하고, membrane lipid가 peroxidation 됨으로서 membrane permeability 및 fluidity가 변화되는데, 그 결과 세포 또는 소기관에 존재하는 solute의 누출(leakage) 및 정상적인 membrane 기능을 저하시킨다(Pauls and Thompson, 1984; Fukozawa et al., 1981; Weenen and Porter, 1982). 이와 같이 고등식물체에서 광피해 현상은 여러 가지 요인에 의해 유발될 수 있으나 정상식물체의 경우 생리적 산화로부터 자신을 보호할 수 있는 항산화물질을 생성하는 시스템을 가지고 있다.

고등식물체의 대표적인 내생 항산화물질로는 α -tocopherol, ascorbic acid, glutathione (GSH), β -carotene 등이 있다 (Alscher and Hess, 1993; Tappel, 1980). 이 중에서 lipophilic 한 α -tocopherol은 주로 핵, 미토콘드리아 그리고 microsome 과 같은 subcellular membranes에 존재하며, lipid oxidation에 대한 생물학적 방어기작의 하나로 singlet oxygen (Kaiser et al., 1990), hydroxyl radical (Fukuzawa and Gebicki, 1983), superoxide (Nishikimi, 1980)를 scavenging하는 능력을 지니고 있다. 뿐만 아니라 α -tocopherol은 lipid peroxidation에 의해 유도된 membrane viscosity의 변화를 억제시킨다(Kenji et al., 1981). 수용성인 ascorbic acid와 GSH는 식물체의 매우 중요한 항산화 물질로써 여러 외부환경 스트레스에 의한 산화작용 메커니즘이 잘 알려져 있다(Padh, 1990; Willson, 1983). Ascorbate는 ascorbate/ascorbate peroxidase system을 통하여 phytotoxic한 H_2O_2 를 제거하는데 필수적이다(Foyer, 1991; Halliwell and John, 1983). 또한 antioxidative role은 두 비타민의 상호작용에 의해서도 이루어지는데 vitamines E는 primary antioxidant이고 vitamines C는 산화된 vitamines E의 환원에 작용한다(Packer et al., 1979). GSH는 protein reductant, chloroplasts에서 H_2O_2 의 파괴, 제초제 등에 포함된 xenobiotic의 detoxification에 관여한다(Edward, 1986; Rennenberg, 1982). 무엇보다도 GSH는 irradiation heat, heavy metal 그리고 drought stress에 노출될 때 나타나는 스트레스로부터 야기되는 산화적 폐해에 대한 주요 방어 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Grill et al., 1985; Meister and Anderson, 1983). 따라서 본 연구에서는 광상태에서 자리공 모상근의 성장이 억제되는 현상이 유해산소의 생성에 따른 영향으로 생각되어, 수종의 항산화제를 첨가하여 자리공 모상근의 성장과 betalain 합성에 미치는 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험의 식물재료는 자리공(*Phytolacca esculenta* van Houtte) 모상근 S8 세포주(Yang et al., 1993a)를 사용하였으며, 모상근의 계대배양과 배양조건은 Yang 등(1995)의 방법과 동일하게 수행하였다.

모상근의 성장률과 betalain 함량

모상근의 성장률 및 betalain 함량은 Yang 등(1995)의 방법과 동일하게 수행하였다.

항산화제의 단독처리 효과

Ascorbic acid (0.001-0.5 mM), sodium pyrosulfate (0.05-2.0 mM), propylgallic acid (0.1-50 μ M), glutathione (GSH, 0.0005-0.1 mM), α -tocopherol (0.005-30 mM)를 계대배양시 첨가하여 25일간 배양한 후, 모상근의 성장률과 betalain 함량을 측정하였다. 본 실험에 사용된 항산화제는 sigma사로부터 구입하였다.

항산화제의 복합처리 효과

Ascorbic acid (0.005 mM), sodium pyrosulfate (0.05 mM), propylgallic acid (0.5 μ M), GSH (0.01 mM) 및 α -tocopherol (5 mM), GSH (0.01 mM), ascorbic acid(0.005 mM)를 복합 처리하여 25일간 배양한 후, 모상근의 성장률과 betalain의 함량을 구하였다.

광과장에 따른 항산화제의 효과

광과장에 따른 항산화제의 효과에서 사용된 filter는 Yang 등(1995)이 사용한 것과 동일한 것을 사용하였으며, 광량은 형광등 및 수은등으로 4,500 lx의 광이 filter를 통과한 후의 광량이 450 lx 되게 조절하였으며, 25일간 배양한 후 성장률 betalain 함량을 구하였다.

결과 및 고찰

내생 항산화제인 ascorbic acid를 자리공 모상근에 농도별로 처리하였을 때 암상태에서 성장률은 무처리의 flask당 건조중량 0.346 g보다 0.005 mM 처리에서 0.431 g으로 1.2배, 광상태에서는 무처리 0.090 g보다 0.005 mM 처리에서 0.119 g으로 1.3배 높았으며, betalain 함량은 무처리 0.031(A537.3nm)보다 0.01 mM 처리구에서 1.7배 높은 betalain 함량을 나타내었다. 모상근의 성장률은 0.005 mM, betalain은 0.01 mM 까지 증가하다가 그 이상 농도에서는 광상태 및 암상태에서 모두 감소하였다(Fig. 1). GSH 처리에서는 암상태의 모상근의 성장률은 무처리보다 0.01 mM 처리에서 1.2배 높았다. 광상태는 무처리보다 0.01 mM 처리에서 약 1.3배 높았으며, betalain 함량은 0.01 mM 처리구에서 무처리보다 2.1배 높았다. 모상근의 성장률 및 betalain 함량은 모두 0.01 mM 이상에서는 감소하였다(Fig. 1). α -Tocopherol 처리에서 모상근의 성장률은 암상태에서 무처리보다 0.05 mM에서 1.2배 더 높았다. 광상태에서도 마찬가지로, 모상근의 성장률은 무처리보다 5 mM α -tocopherol 처리구에서 1.9배가 더 높았으며, betalain 함량도 비슷하게 무처리보다 5 mM α -tocopherol에서 1.3배 더 높았다. 이상의 사용한 항산화제는 자리공 모상근의 성장을 촉진하며, betalain 합성에도 효과적인 것으로 나타났다. 그러나 항산화제는 광상태에서 억제

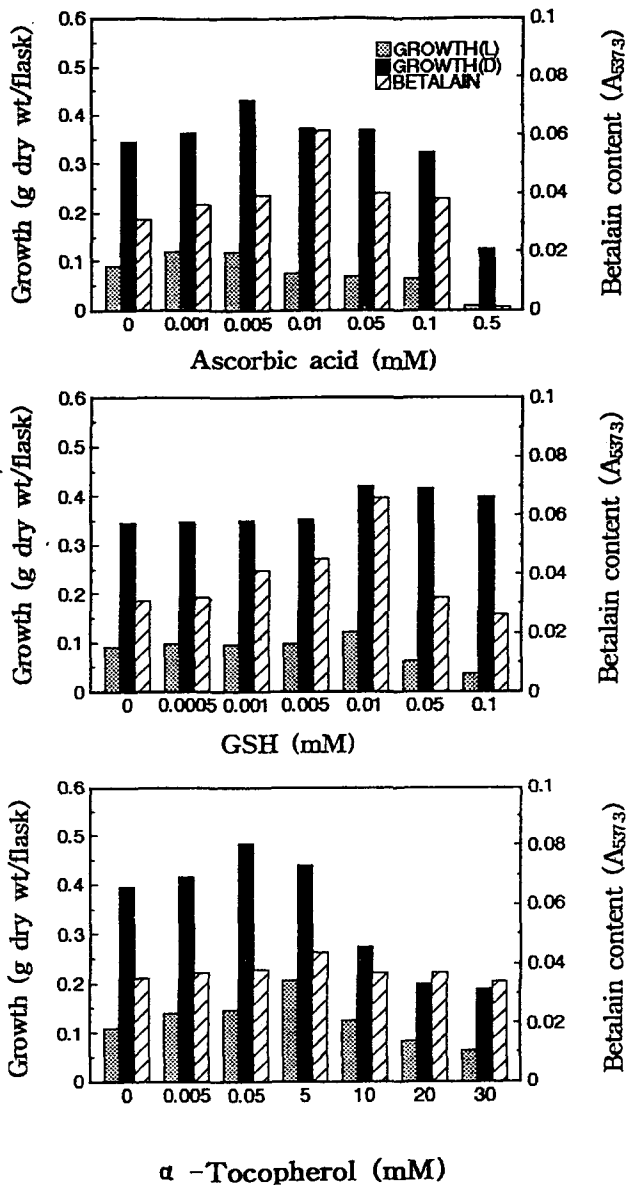


Figure 1. Effects of ascorbic acid, GSH and α -tocopherol on growth and betalain production in hairy root cultures of *Phytolacca esculenta* van Houtte. The data was measured at 25 days after subculture and the initial inoculum was 20 hairy root tips (tip size: 1.5 cm), L: Light condition, D: Dark condition.

되는 성장을 암상태처럼 회복하지는 못하였다.

Propylgallic acid를 처리하였을 때 암상태의 모상근의 생장률은 무처리보다 5 μ M 처리에서 1.4배, 광상태는 무처리보다 0.5 μ M 처리구서 1.8배 높았다. 그리고 betalain 함량은 0.1 μ M 처리에서 가장 높았으며, 무처리보다 1.3배 높은 betalain 함량을 나타내었다(Fig. 2). Sodium pyrosulfate 처리 시 암상태의 생장률은 무처리보다 0.1 mM 처리에서 1.4배, 광상태는 무처리보다 0.1 mM 처리에서 1.8배 높았다. Betalain 함량은 0.05 mM 처리구에서 무처리보다 1.4배 높

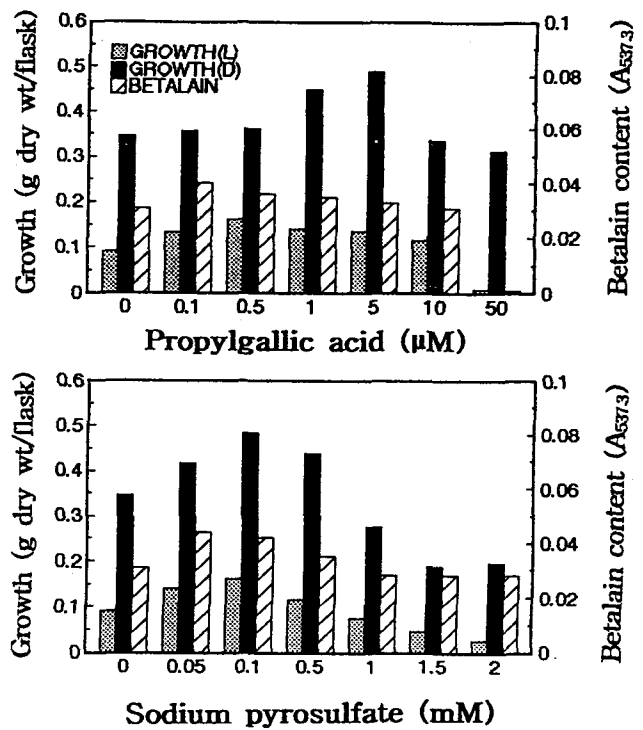


Figure 2. Effects of propylgallic acid and sodium pyrosulfate on growth and betalain production in hairy root cultures of *Phytolacca esculenta* van Houtte. The data was measured at 25 days after subculture and the initial inoculum was 20 hairy root tips (tip size: 1.5 cm), L: Light condition, D: Dark condition.

은 betalain 함량을 나타내었다. 모상근의 생장률은 0.005 mM, betalain 함량은 0.1 mM까지 증가하다가 그 이상 농도에서는 감소하는 경향을 나타내었다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 항산화제 처리에 따른 모상근의 생장률이 암상태 1.2-1.4배에서, 광상태 1.3-1.9배에서 보다 향상되는 것으로 보아 암상태보다 광상태에서 항산화 효과가 높은 것으로 추론된다. 이러한 결과는 암상태보다 광상태에서 더 많은 유해산소가 생성됨을 나타내는 결과로 생각된다. 그리고 betalain 함량 역시 1.2-2.1배까지 증가되어 모상근에서 생성된 산화제는 모상근의 생장을 뿐만 아니라 betalain 합성도 억제함을 확인하였다.

자리공 모상근의 성장 및 betalain 합성에서 최적 농도로 확인된 ascorbic acid (0.005 mM), sodium pyrosulfate (0.1 mM), propylgallic acid (5 μ M), glutathione (0.01 mM)의 단독 및 복합처리에 따른 생장률과 betalain 함량에 미치는 영향을 알아 보았다(Fig. 3). 모상근의 생장률은 모든 항산화제 처리구에서 무처리보다 높게 나타났다. 광상태의 생장률은 flask당 0.108 g 건조중량인 반면 ascorbic acid와 propylgallic acid의 복합 처리구는 flask당 0.265 g 건조중량으로 2.4배 더 높게 나타났다. 그러나 암상태에서는 항산화제가 모상근의 성장을 다소 촉진하였으나, 광상태에서처럼 현

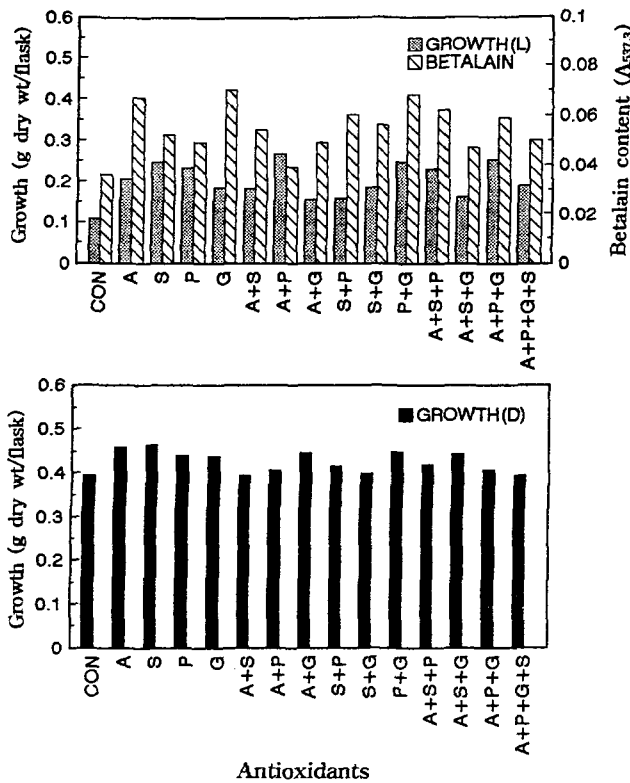


Figure 3. Effects of various combination of ascorbic acid, GSH propylgallic acid and sodium pyrosulfate on growth and betalain production in hairy root cultures of *Phytolacca esculenta* van Houtte. The data was measured at 25 days after subculture and the initial inoculum was 20 hairy root tips (tip size: 1.5 cm), L: Light condition, D: Dark condition, A: ascorbic acid, S: sodium pyrosulfate, P: propylgallic acid, G: glutathione.

저한 효과는 나타나지 않았다. Betalain의 함량 역시 모든 항산화제 처리에서 무처리보다 높게 나타났다. 무처리의 betalain 함량이 0.036 (A_{537.3nm})인 반면 GSH 단독 처리구에서는 0.070 (A_{537.3nm})으로 1.9배 더 높게 나타났다. 이는 복합 처리에 존재하는 각 항산화제간의 화학적 반응에 의한 억제 효과로 생각된다. Betalain 함량은 단독 처리에서 무처리에 대한 betalain 합성율이 1.8-2.4배, 복합 처리구에 대한 합성율이 1.7-2.3배로서 복합처리에 대한 효과가 나타나지 않은 것은 생성된 유해산소가 항산화제의 단독처리 조건에서 대부분 제거되었기 때문인 것으로 생각된다.

일반적으로 식물세포는 활성화 산소(1O₂, O⁻², H₂O₂)에 의한 장해로부터 보호하기 위한 내생 항산화계(endogenous antioxidative system)을 가지고 있다. 그래서 본 실험에서는 자리공 모상근의 성장과 betalain 합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 GSH, ascorbic acid 그리고 α-tocopherol의 최적농도를 단독 및 복합처리하였다(Fig. 4). 암상태에서 모상근의 성장률은 모든 처리에서 무처리보다 높은 성장률을 나타내었는데, 무처리의 flask당 0.350 g 건조중량 보다

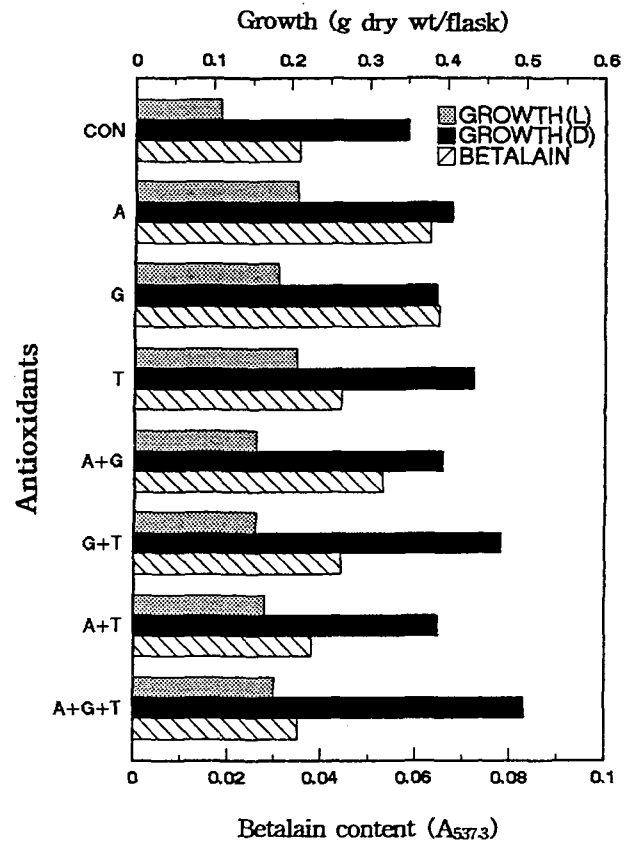


Figure 4. Effects of various combination of ascorbic acid, GSH and α-tocopherol in hairy root cultures of *Phytolacca esculenta* van Houtte. The data was measured at 25 days after subculture and the initial inoculum was 20 hairy root tips (tip size: 1.5 cm), L: Light condition, D: Dark condition, A: ascorbic acid, G: glutathione, T: α-tocopherol.

glutathione + ascorbic acid + α-tocopherol 복합처리에서는 0.499 g으로 1.4배 더 높은 성장률을 나타내었다. 그러나 광상태에서는 α-tocopherol, GSH을 단독처리 하였을 때 가장 높은 모상근의 성장률을 나타내었다. 이때 무처리는 0.109 g인 반면, α-tocopherol 처리는 0.179 g으로 1.9배 더 높았다. Betalain의 함량은 광상태에서 GSH을 단독처리 했을 때 가장 높았는데, 무처리는 0.035 (A_{537.3nm})를 나타낸 반면, 광상태에서 GSH 처리구는 0.065 (A_{537.3nm})로 2.7배나 더 높았다.

이러한 결과는 서론에서 제시한 내생항산화계(α-tocopherol, ascorbic acid)의 상호작용 효과와는 달리 자리공 모상근에서는 광상태에서 생성되는 유해산소에 의해 항산화 효소계가 손상을 받기 때문에 복합처리에 의한 효과가 나타나지 않은 것으로 생각된다.

자리공 모상근의 성장과 betalain 합성에 미치는 광파장과 항산화제의 효과를 알아보았다. 모상근의 생장은 blue 파장에 의해 가장 많이 억제되었으며, betalain 합성은 그와 반대로 blue 파장에서 현저히 촉진되었다(Fig. 5). 이 결과는 양 등(Yang et al., 1993b)의 보문과 일치하였다.

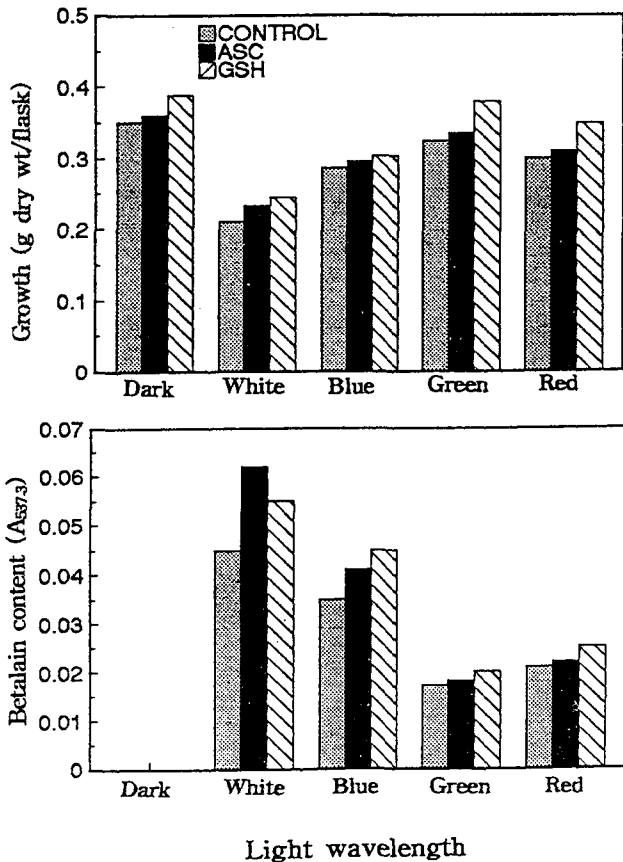


Figure 5. Effects of ascorbic acid, GSH according to light wavelength on growth and betalain production in hairy root cultures of *Phytolacca esculenta* van Houtte. The data was measured at 25 days after subculture and the initial inoculum was 20 hairy root tips (tip size: 1.5 cm).

항산화제의 효과가 백색광과 청색 파장에서 높게 나타나고 청색 파장에서 생장률이 저조한 것을 감안할 때 많은 산화제가 blue 파장에 의해 생성되는 것으로 사료된다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 항산화제는 자리공의 모상근에서 생성된 유해산소를 효과적으로 제거하여 세포의 생장 및 betalain의 합성을 촉진하는 것으로 생각된다. 따라서 자리공 모상근에서 높은 생장률을 유지하면서 betalain을 합성하기 위해서는 좀 더 효과적인 항산화제의 개발과 항산화 효소에 대한 구체적인 연구가 요구된다.

적 요

자리공 모상근에서 betalain의 합성에는 광(光)이 필수이지만 생장률은 암상태 보다 광상태(1,500 lx)에서 5배 정도 억제된다. 따라서 광상태에서 모상근의 생장이 억제되는 원인을 규명하기 위해서 항산화제 처리에 따른 효과를 조사하였다. 항산화제 (ascorbic acid, glutathione, α -tocopherol,

sodium pyrosulfate, propylgallic acid) 처리에 따른 모상근의 생장은 암상태에서 무처리보다 1.2-1.4배, 광상태에서 약 1.3-1.9배 생장이 증가되었으며, betalain 합성은 무처리보다 1.2-2.1배 향상되었다. 자리공 모상근의 생장 및 betalain 합성에 항산화제 복합 처리에 따른 효과는 나타나지 않았다. Betalain 합성 과정에서 항산화제의 효과는 청색 파장에서 가장 높게 나타났다. 따라서 광상태에서 자리공 모상근의 생장과 betalain 합성을 촉진시키기 위해서는 청색 파장에서 적절한 항산화제의 개발이 요구된다.

사 사-본 연구는 1994년도 한국과학재단 '94핵심전문연구과제 (941-0500-028-2)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인 용 문 헌

- Alscher RG, Hess JL (1993) Antioxidants in Higher plants. CRS edition
- Asami S, Akazawa T (1978) Photooxidation damage in photosynthetic activities of *Chromatium vinosum*. *Plant Physiol* 62: 781-986
- Aubry JM, Rigaudy J (1981) A Search for singlet oxygen in the disproportionation of superoxide anion. *J Am Chem Soc* 103: 4965-4966
- Edward R, Owen WJ (1986) Comparison of glutathione-S-transferases of *Zea mays* responsible for herbicide detoxification in plant and suspension-cultured cells. *Planta* 169: 208-215
- Foyer CH, Lelandais M, Edwaer EA, Mullineaux PM (1991) The role of ascorbate in plants; interactions with photosynthesis and regulatory significance. In Pell E and Steffen K, eds, *Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism*, vol 6, 131
- Fridovich I (1976) Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity. In W.A. Pryor, ed, *Free radicals in biology*. Academic press, New York, 1: 239-277
- Fukusawa K, Chida H, Tokumura A, Tsukatani H (1981) Antioxidative effect of α -tocopherol incorporation lecithin liposomes on ascorbic acid Fe²⁺-induced lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 206: 173-180
- Fukuzawa K, Gebicki JM (1983). Oxidation of α -tocopherol by the hydroxyl, perhydroxyl, and superoxide free radicals. *Arch Biochem Biophys* 226: 242-251
- Gorsch W, Laskawy G (1979) Co-oxidation of carotenoids requires one soybean lipoxigenase isoenzyme. *Biochem Biophys Acta* 75: 439
- Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1985). Phytochelations; the principle heavy metal complexing peptides of higher plant. *Science* 230: 674-676
- Halliwel B (1984) Chloroplast metabolism, The structures and Function of chloroplasts in green leaf cells. Ed 2. Clarendon press. Oxford
- Halliwel B, John MC (1983) Role of Iron in oxygen radical reactions. *Methods in Enzymol* 105: 47-58
- Kaiser S, Mascio PD, Murphy ME, Sies H (1990) Physical and chemical

- scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. Arch Biochem Biophys 277: 101-108
- Kenji F, Hisako C, Akira T, Hiroaki T** (1981) Antioxidative effect of α -tocopherol incorporation into lecithin liposomes on ascorbic acid Fe^{2+} -induced lipid peroxidation. Arch Biochem Biophys 170: 684-689
- Knox JP, Dodge AD** (1985) Singlet oxygen in plants. Phytochemistry 24: 889-896
- Kono Y, Takahashi MA, Asada K** (1976) Oxidation of mangnous pyrophosphate by superoxide radicals and illuminated spinach chloroplast. Arch Biochem Biophys 174: 454-462
- Korycka-Dahl MB, Richardson T** (1978) Activated oxygen species and oxidation of food constituents. CRC Crit Rev Food Sci Nutr 10: 209-241
- Krinsky NI** (1977) Singlet oxygen in biological systems. Trends Biochem Sci 2: 35-38
- Lesco SA, Loren JR** (1980) Role of superoxide in deoxyribonucleic acid strand scission. Biochemistry 19: 3023-3028
- Mabry TJ** (1980) Betalains in Encyclopedia of plant physiology, New series. Bell EA and charwood BV eds, springer Verlag Berlin and New York 8: 513-533
- Meister A, Anderson ME** (1983) Glutathione. Annu Rev Biochem 52: 710-760
- Nishikimi M** (1975) Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the xanthine-xanthine oxidase system. Biochem Biophys Res Commun 63: 463-468
- Nishikimi M, Yamada H, Yagi K** (1980) Oxidation by superoxide of tocopherols dispersed in aqueous media with deoxycholate. Biochem Biophys Acta 627: 101-108
- Packer JE, Slater TE, Willson RL** (1979) Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. Nature 278: 737
- Padh H** (1990) Cellular functions of ascorbic acid. Biochem Cell Biol 68: 1166
- Pauls KP, Thompson JE** (1984) Evidence for the accumulation of peroxidized lipids in membranes of senescing cotyledons. Plant Physiol 75: 1152-1157
- Rennerberg H** (1982) Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. Phytochemistry 21: 2771-2781
- Tappel AL** (1980) Vitamine E as the biological lipid antioxidants. Vit Horm 20: 493-510
- Weenen H, Porter NA** (1982) Antioxidation of model membrane systems, fatty acids and α -tocopherol. J Am Chem Soc 104: 5216-5221
- Willson RL** (1983) Free radical repair mechanisms and the interactions of glutathione and vitamins C and E. In Nygaard OF and Simic MG, eds, Radioprotectors and Anticarcinogens, Academic press, New York, pp 1-22
- Yang DC, Lee SJ, Yun KY, Kang YH** (1993a) Suspension culture of betalain producing cell-line and characteristics of hairy root of *Phytolacca esculenta* v. Houtte. Korean J Biotechnol Bioeng 8(1): 89-94
- Yang DC, Lee SJ, Yun KY, Quae C** (1993b) Blue light-dependent betalain synthesis in hairy root I. Model system for the study on the photo-signal transduction. Korean J Plant Tissue Culture 20(1): 35-40
- Yang DC, Lee SJ, Yun KY, Quae C** (1993c) Blue light-dependent betalain synthesis in hairy root: II. Influences of the activators/inhibitor of signal transduction on the betalain synthesis. Korean J Plant Tissue Culture 20(2): 63-70
- Yang DC** (1990) Lipid peroxidation of ginseng thylakoid membrane. Korean J Ginseng Sci 14: 135-141
- Yang DC, Kim YH, Kwon JN, Choi CH, Yang DC** (1995) Effects of light on activities of antioxidative enzymes in hairy root cultures of *Phytolacca esculenta* Korean J Plant Tissue Culture (in press)
- Yost FJ, Fridovich I** (1976) Superoxide and hydrogen peroxide in oxygen damage. Arch Biochem Biophys 175: 5-9

(1994년 12월 27일 접수)