

## 자색고구마 캘러스배양에서 안토시아닌 생합성에 미치는 광의 영향

박혜정, 김정숙, 박현용\*  
조선대학교 생물학과

### Effect of Light on Anthocyanin Biosynthesis in Callus Culture of Purple Sweetpotato

Hyaee-Jeong Park, Jung-Suk Kim, Hyeon-Yong Park\*  
Department of Biology, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

**ABSTRACT** The anthocyanin biosynthesis in callus culture of purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L. cv. Borami) was investigated under growth in different light intensity and light emitting diodes (LED) treatment. Pigmented calli were induced from leaf explants cultured on MS agar medium supplemented with 0.5  $\mu$ M 2,4-D under light condition. The color value of these calli extracted after 2~4 weeks of cultures was 0.4~0.5 mg/mL. Irradiation intensity is an important factor for anthocyanin biosynthesis. The optimal anthocyanin accumulation occurred on light intensity of 3000 lux. Light irradiation of 3000 lux and blue light treatment for 2 h resulted in a significant enhancement of anthocyanin accumulation. This value was 1.4 fold that the control.

**Key words:** Anthocyanin, *in vitro* culture, light intensity

#### 서 론

안토시아닌은 식물계에 널리 분포하는 수용성 색소성분으로서, 식품 첨가물로 널리 사용되어 왔다 (Francis 1989; Jackman et al. 1993). 또한 항균, 항고혈압, 간 보호, 암세포 성장 억제, 관상동맥 심혈관 파열 방지 기능 등이 보고되면서 (Ghiselli et al. 1998; Kamei et al. 1998; Kang et al. 2003), well being 시대에 적합한 천연색소로 부각되고 있다. 분자 구조에 따라 안토시아닌은 그 안정성에 차이를 보이는데, 메틸기가 붙은 malvidin glycoside로 구성된 포도의 안토시아닌안정성이 널리 알려져 있고 (Bridle and Timberlake 1997), acylated anthocyanin으로 구성된 유색고구마가 열과 pH에 안정하여 장기 보존에 유리함이 보고되고 있다 (Odake et al. 1994; Cevallos and Cisneros 2004).

천연색소 안토시아닌의 생산은 경작지 재배방식에서 벗어나 조직배양을 통한 기내 대량생산 연구가 진행되고 있는데 (Madhavi et al. 1995; Callebaut et al. 1997; Konczak

et al. 2002), 배양 환경 및 광의 영향이 안토시아닌 생합성에 큰 영향을 미치는 것으로 조사되고 있다 (Zhong et al. 1993; Stapleton and Walbot 1994; Glaebbggen et al. 1998).

국내의 경우 자색고구마 연구는 목포무안시험장에서 육종연구가 주로 이루어지고 있으며, 색소 추출 성분 분석은 이미 보고된 바 있다 (Kim et al. 1996; Rhim et al. 2001). 그러나, 자색고구마를 이용한 기내 색소 생산에 관한 연구는 아직까지 보고된바 없으며, 이에 본 연구실에서는 자색고구마 조직배양을 통해 자색 고함유 세포주의 선발과 안토시아닌 생합성의 효율을 높이기 위한 배양 조건의 확립의 일환으로 광의 종류와 광의 세기 및 조사시간에 따른 배양캘러스의 자색 생합성률을 조사하고자 하였다.

#### 재료 및 방법

##### 재료식물

자색고구마 보라미 (작물과학원 목포시험장) 식물체를 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지에 3% sucrose,

\*Corresponding author Tel 062-230-6652 Fax 062-230-6652

E-mail: hypark@chosun.ac.kr

0.3% phytagel을 첨가한 culture dish (100 × 40 mm)에 외마디 무균배양하여 생장한 식물체의 잎조직을 실험에 이용하였다.

### 캘러스 유도

자색 캘러스 유도 배지는 MS 기본배지에 3% sucrose, 0.3% phytagel, 0.01% myo-inositol과 성장조절제를 첨가하고 pH 5.8로 조정하여, 조건에 따른 고압증기 멸균 시킨 후 사용하였다. 성장조절제는 0, 1, 10, 100  $\mu\text{M}$  2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)와 0, 0.5, 5, 50  $\mu\text{M}$  benzylaminopurine (BA)을 조합 처리하였다. 무균 조건에서 성장하고 있는 자색고구마로부터 2~3 cm 크기의 잎 절편체를 채취하여 주맥을 제거하고 5×5 mm 크기로 잘라 petri dish (60 mm)의 캘러스 유도 배지에 4개씩 치상하여 5반복 실시하였다. 배양 조건은 26°C, 6000 lux의 24시간 광 조건으로 하였으며, 배양 4주 후에 캘러스 형성을 조사하였고, 이후 4주 간격으로 계대 배양하였다.

### 광 조건에 따른 안토시아닌 함량 변화

자색 캘러스 유도배지 (0.5  $\mu\text{M}$  2,4-D)에 잎 절편체를 치상하여 광의 세기를 0 lux, 3000 lux (약광), 6000 lux (강광)로 조정하여, 광 조건에 따른 안토시아닌 색소의 생합성량 변화를 2주 간격으로 8주간 spectrophotometer를 이용하여 조사하였다. 빛의 파장에 따른 색소생합성에 미치는 효과를 위한 실험은 LED (light emitting diode, 좋은인상)를 이용하여 LED의 광원에 따른 안토시아닌 생합성량을 조사하였다. 3000 lux에서 2주간 배양하여 형성된 자색캘러스를 이용하여 blue, red, far-red의 분광특성이 470, 654, 738 nm의 파장영역에서 유효광량자 유입밀도 (PPFD)가 최대치를 나타내는 단색 LED를 이용하였다. 형광등 3000 lux를 대조구로 사용하였다. LED의 각 광원의 조사시간에 따른 안토시아닌 생합성 효과에 대한 실험은 각 파장의 빛을 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 시간씩 처리하고 대조구와 함께 1주 후에 안토시아닌 함량의 변화를 정량 조사하였다.

안토시아닌의 함량분석을 위한 검량선은 목포시험장에서 공급받은 안토시아닌 분말을 이용하여 0.1% citric acid를 함유하는 20% ethanol (추출 용매) 용액에 녹인 후 530 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다. 안토시아닌의 추출은 1×1 mm 크기로 세절한 캘러스 0.3 g에 추출 용매를 6 mL 첨가한 후, 30°C에서 24시간 동안 색소를 추출한 후, 800 rpm으로 5분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 분광광도계를 사용하여 530 nm에서 측정하여 색소의 함량을 결정하였다.

## 결과 및 고찰

### 캘러스 유도

잎 절편체를 0~100  $\mu\text{M}$  2,4-D와 0~50  $\mu\text{M}$  BA를 혼합 처리한 MS 배지 상에서 4주간 배양한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 배양 5일 후부터 캘러스의 형성이 시작되어 배양 4주 후에 밀집형 캘러스와 배발생 형태 캘러스로 뚜렷히 구별되어 성장하였다. 밀집형 캘러스는 1  $\mu\text{M}$  2,4-D와 5  $\mu\text{M}$  BA를 혼합 처리시 95%로 가장 높게 나타났으며, 배발생 캘러스는 1  $\mu\text{M}$  2,4-D 단독 처리구와 1  $\mu\text{M}$  2,4-D와 0.5  $\mu\text{M}$  BA 혼합 처리구에서 간헐적으로 관찰되어 BA 처리가 배발생에 부정적인 것으로 나타난 Park 등 (2003)의 보고와 유사한 결과를 나타냈다. 100  $\mu\text{M}$  2,4-D 처리구에서는 배양 5일 이내에 잎 절편체가 물러지며 괴사하였다. 한편, 1  $\mu\text{M}$  2,4-D 처리구에서 형성된 배발생 캘러스 중 일부가 Figure 1의 A, B, C와 같이 자색을 형성하며 성장하였는데, 1  $\mu\text{M}$  2,4-D와 0.5  $\mu\text{M}$  BA 혼합 처리구에서는 자색캘러스 형성이 50% 이상 감소하고, 1  $\mu\text{M}$  2,4-D와 5~50  $\mu\text{M}$  BA 처리구에서는 전혀 형성되지 않아 BA가 안토시아닌 생합성에 효과적인 것으로 나타난 당근배양과는 다른 결과를 나타냈다 (Narayan et al. 2005). 이러한 자색캘러스 형성에 미치는 성장조절제의 영향은 0.5  $\mu\text{M}$  2,4-D 단독 처리구에서 자색캘러스 형성률이 가장 높은 것으로 나타났다. 따라서 이어지는 광조사에 의한 안토시아닌 생합성에 관한 실험은 0.5  $\mu\text{M}$  2,4-D를 첨가한 조건에서 실행하였다. 자색캘러스를 포함하여 모든 처리구에서 배양 6주 이후부터 배양 캘러스의 약 50%가 갈변되기 시작하였으며 (Figure 1D, E), 8주 이후에는 80% 이상 갈변 후 괴사하는 것으로 나타나 (Figure 1F), 계대배양은 4주 간격으로 실행하였다. 1차 계대배양 7일 이내에 자색캘러스는 자색을 잃고 성장하여 자색캘러스 유지를 위한 별도의 배양 조건 확립이 요구되었다.

**Table 1.** Effect of 2,4-D and BA on callus formation (%±SE) from leaf disk of *Ipomoea batatas* L. (cv. Borami) after 4 weeks of culture

2,4-D( $\mu\text{M}$ ) \ BA( $\mu\text{M}$ )	0	1	10	100
0	0±0	30±10	0±0	0±0
0.5	35±5	90±5	40±15	0±0
5	93±5	95±2	60±15	0±0
50	35±5	90±5	0±0	0±0

광 조건에 따른 안토시아닌 함량 변화

기내 안토시아닌의 대량생산을 위해서는 우수한 세포주의 선발과 함께, 안토시아닌 생합성능을 최대로 증가시킬 수 있는 배양 조건 확립이 요구된다. 본 연구에서 0.5 μM 2,4-D를 처리함으로써 자색캘러스를 유도했으며, 그 형성은 Figure 1에서 보는 바와 같이 육안으로 구별되어, 자색캘러스 선발에 매우 용이하였다.

이러한 자색캘러스의 초기 형성에 미치는 광의 영향을 조사하고자, 0.5 μM 2,4-D 처리구에 광의 세기만을 달리하여 8주간 배양하였다. Figure 2는 광의 세기에 따른 자색캘러스 (Figure 1A, B, C) 형성률을 나타낸 결과로, 각 조건에서 전체 절편체 수에 자색캘러스 형성률을 백분율로 나타냈으며, Figure 3은 자색 생합성률을 spectrophotometer를 이용한 흡광도를 측정하여 나타낸 결과이다.

0.5 μM 2,4-D를 첨가하여 암, 약광, 강광에서 배양한 결과, 약광과 강광 조건에서 배양 2주 후 잎맥이 자색으로 변화하며 (Figure 1A) 조직 절편의 가장자리부터 캘러스의 형성이 시작되었다. 배양 3주 후에 배발생 캘러스가 형성되었

고, 형성된 배발생 캘러스의 형태는 매우 밀집된 구상형의 육안식별이 가능한 선명한 자색을 나타냈다 (Figure 1B, C). 이러한 배발생 캘러스는 배양 6주가 경과되면 원추형 (Figure 1D)으로 변화되고, 캘러스 전체 부위에서 자색은 점점 사라지고 갈색을 띠는 (Figure 1E, F) 형태로 괴사했다. Figure 1의 B, C형의 자색캘러스는 2~4주 사이 암의 4~6배를 형성하는 것으로 육안관찰시 나타났으며 (Figure 2), 이의 생합성량은 spectrophotometer로 측정된 결과 Figure 3에서 나타나는 바와 같이 2~4주 째에 암 조건에 비교하여 1.5배 이상 형성되었다. 본 실험과 유사하게 세포배양에서 광 조건이 안토시아닌 생합성을 촉진한다는 보고와 (Blando 등 (2005), Sato 등 (1996), Zhang 등 (2002), Zhong 등 (1993)) 일치하였다. 이와 같이 안토시아닌 생합성 세포의 색소축적의 상승은 안토시아닌 생합성에 가장 중요한 역할을 나타내는 효소로 알려진 phenylalanin ammonia-lyase를 비롯한 flavonoid, phenylpropanoid 경로에 관련된 많은 효소의 활성도가 광조사를 통해 상승하는 것으로 보고 있다 (Takeda

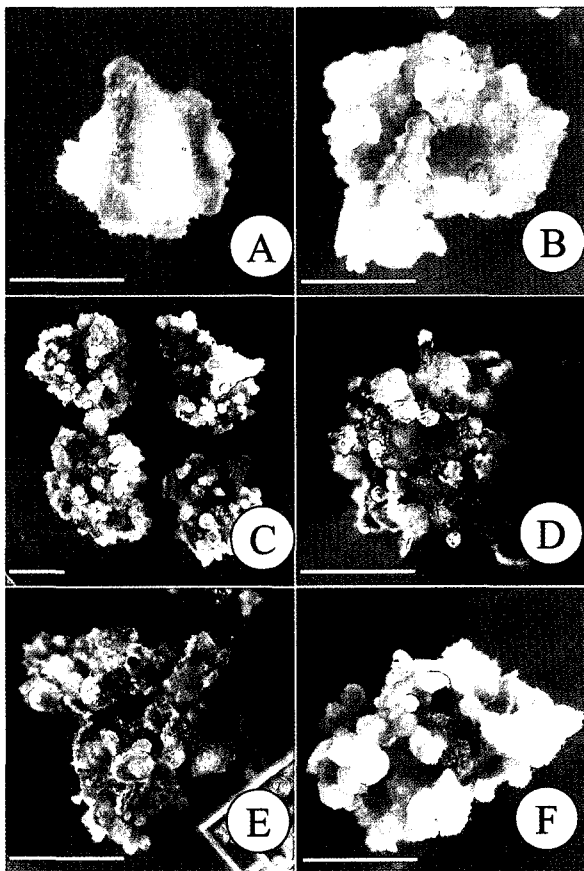


Figure 1. Morphological patterns of embryogenic callus from purple sweetpotato cv. Borami. Cultures were carried out on MS medium supplemented with 0.5 μM 2,4-D. A, 2 weeks after culture; B, C, 3~5 weeks after culture; D, E, 5~8 weeks after culture; F, 10 weeks after culture. (Bar = 0.5 cm).

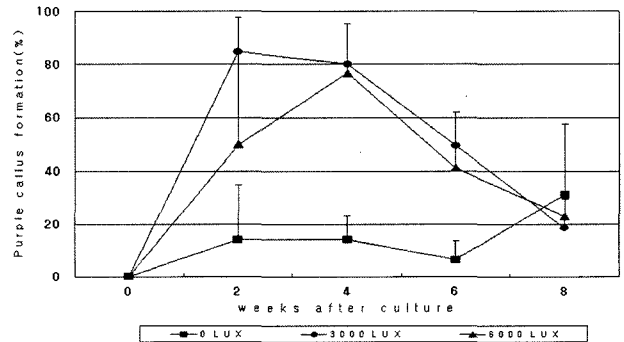


Figure 2. Effect of light intensity on the purple callus formation in tissue culture of purple sweet potato. Each value represents the average of 4 petri-dishes.

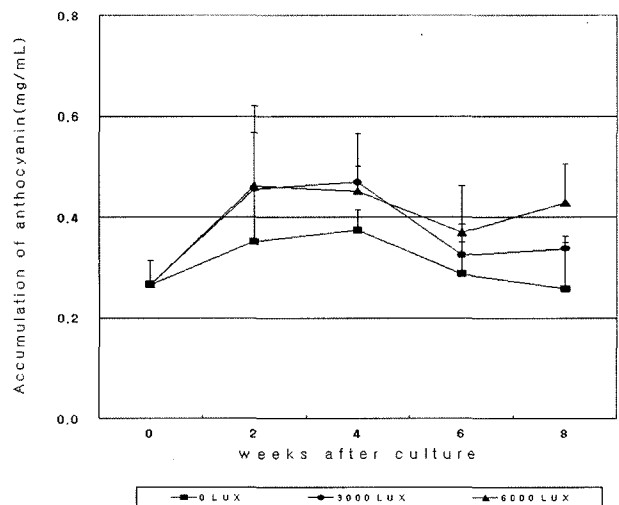
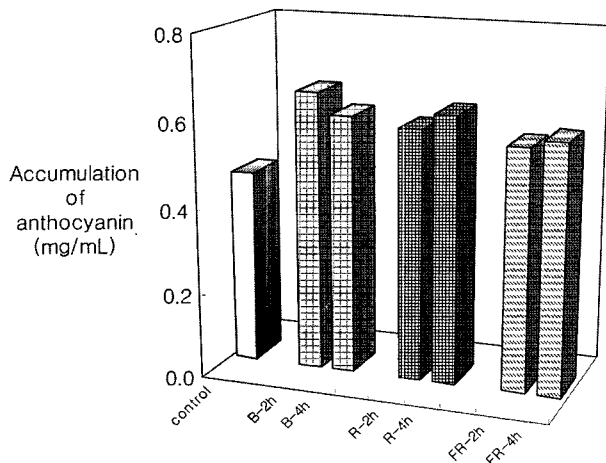


Figure 3. Effect of light on accumulation of anthocyanin in callus culture of purple sweet potato. Each value represents the average of 4 petri-dishes.



**Figure 4.** Anthocyanin accumulation by treatment of blue (B) red (R), far red (FR) light. Callus grown for 2 weeks in the low intense light (3000 lux) were irradiated with B, R, FR up to 4 h: Control; 3 weeks, in low intense light.

1990: Blanco et al. 2005). 그러나, 광의 20% 감소시 안토시아닌 생합성량이 감소한다는 Jeong 등 (2004)의 보고와는 달리 본 실험에서는 약광과 강광에 따른 결과가 유사하게 나타나 광의 세기보다는 광 조사 자체가 커다란 효과를 나타내는 것으로 추측되었다. 한편 Figure 1의 B와 유사한 형태의 캘러스가 배양 8주째 암 조건에서 31%가 형성되어 12주까지 계대배양 없이 생존하였는데, 이 부분에 관한 연구가 더 필요하다고 판단된다.

#### LED 처리 시간에 따른 안토시아닌 함량 변화

자색고구마의 배양에서 광 조사에 의한 안토시아닌 생합성의 촉진효과가 어떤 파장의 광에 의해 나타나는지를 조사하기 위해 LED를 통해 실험한 결과는 Figure 4에서 나타나는 바와 같다. 약광에서 2주 동안 배양한 캘러스를 Blue, Red, Far red를 2~128시간 처리하고, 1주 경과 후 배양하여 안토시아닌 생합성의 변화 결과에서 적색광을 4시간 처리하여 대조구 (3000 lux)의 1.2배를, 청색광을 2시간 처리하여 대조구의 1.4배의 안토시아닌 생합성 향상효과를 나타냈다. 각 광의 조사 시간에 따른 효과는 2~4시간 처리에서 가장 높은 상승효과를 나타냈으며 8시간 이상 조사한 경우 오히려 억제되는 결과를 나타냈다. Sato 등은 지속적인 광 처리는 안토시아닌 생합성에 관련된 효소의 활성을 높이는 것으로 보고하였으며, 이 가운데 청색광이 안토시아닌 생합성에 관련된 유전자의 발현을 촉진한다고 밝히고 있다 (Kubasek et al. 1992, Noh and spalding 1998). 본 연구의 자색고구마의 캘러스 배양도 청색광이 안토시아닌의 색소 생합성을 40% 상승 시키는 것으로 나타났다. 따라서 이러한 결과를 바탕으로 안토시아닌의 기내생산을 위한 배양조건을 위해서는 청색광에 의한 특정 유전자의 발현양상과

여러 elicitors와의 병행 실험을 통해 효율적인 색소 생합성에 관한 배양 조건을 확립할 수 있을 것으로 사료된다.

#### 적 요

자색고구마의 캘러스 배양에서 광의 조사가 안토시아닌 생합성에 미치는 효과를 실험하였다. 일조직으로부터 자색캘러스는 0.5  $\mu$ M 2,4-D가 첨가된 MS배지, 광조건에서 유도되었다. 광의 세기에 따른 효과는 암 조건에 비교하여 광 조건에서 안토시아닌 생합성이 2~3배에 이르는 것으로 나타났다. 약광 (3000 lux)에서 안토시아닌 생합성량이 높게 나타났다. 이러한 광 조사에 의한 안토시아닌 생합성의 촉진효과는 LED를 이용하여 실험한 결과에서 청색광을 2시간 처리한 경우 3000 lux의 백색광을 처리한 대조구에 비교하여 1.4배의 안토시아닌 생합성 향상효과를 나타냈다.

#### 감사의 글

이 논문은 2004년도 전통식품 첨단화 인력양성 사업단 산학협력연구비(NURI)의 지원을 받아 연구되었으며, “보라미” 식물체를 제공해 준 작물과학원 목포시험장에 감사드립니다.

#### 인용문헌

- Blando F, Scardino AP, De Bellis L, Nicoletti I, Giovinazzo G (2005) Characterization of in vitro anthocyanin-producing sour cherry (*Prunus cerasifera* L.) callus culture. *Food Res Int* 38: 937-942
- Cevallos-Casals BA, Cisneros-Zevallos L (2004) Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. *Food Chem* 86: 69-77
- Bridle P, Timberlake CF (1997) Anthocyanins as natural food colours—selected aspects *Food Chem* 58: 103-109
- Callebaut A, Terahara N, de Haan M, Declaire M (1997) Stability of anthocyanin composition in *Ajuga reptans* callus and cell suspension cultures. *Plant Cell Tiss Org Cult* 50: 195-201
- Francis L (1989) Food colourants : Anthocyanins. *Crit Rev Food Sci* 28: 273-314
- Ghiselli A, Naridini M, Baldi A, Scaccini C (1998) Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *J Agr Food Chem* 46: 361-367
- Glaebgen WE, Rose A, Madlung J, Koch W, Gleitz J, Seitz HU (1998) Regulation of enzymes involved in anthocyanin biosynthesis in carrot cell cultures in response to

- treatment with ultraviolet light and fungal elicitors. *Planta* 204: 490-498
- Jackman RI, Yada RY, Tung MA, Speers RA (1993) Anthocyanina as food colorants. *J Food Biochem* 11: 201
- Jeong ST, Goto-yamamoto N, Kobayashi S, Esaka M (2004) Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Sci* 167: 247-252
- Kamei H, Hashimoto Y, Koide T, Kojima T, Hasegawa J (1998) Anti-tumor effect of methanol extracts from red and white wines. *Cancer Biother and Radiopharm* 136: 447-452
- Kang SY, Seeram NP, Nair MG, Bourquin LD (2003) Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in ApcMin mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. *Cancer Lett* 194: 13-19
- Kim SJ, Rhim JW, Lee LS, Lee JS (1996) Extraction and characteristics of purple sweetpotato pigment. *Kor J Food Sci Technol* 28: 345-351
- Konczak I, Yoshinaga M, Nakatani M, Yamakawa O, Terahara N (2000) Establishment and characteristics of an anthocyanin-producing cell line from sweetpotato storage root. *Plant Cell Rep* 19: 472-477
- Kubasek WL, Shirley BW, McKillop A, Goodman HM, Briggs W, Ausbel FM (1992) Regulation of flavonoid biosynthetic genes in germinating *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* 4: 1229-1236
- Madhavi DL, Smith MAL, Berber-Jimenez MD (1995) Expression of anthocyanins in callus cultures of cranberry (*Vaccinium macrocarpa* Ait.). *J Food Sci* 60: 351-355
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Narayan MS, Thimmaraju R, Bhagyalakshmi (2005) Interplay of growth regulators during solid-state and liquid batch cultivation of anthocyanin producing cell line of *Daucus carota*. *Process Biochem* 40: 351-358
- Noh B, Spalding E (1998) Anion channels and the stimulation of anthocyanin accumulation by blue light in *arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol.* 116: 503-509
- Odake K, Terahara N, Saito N, Toki K, Honda T (1994) Chemical structure of two anthocyanins from purple sweet potato, *Ipomoea batatas*. *Phytochem* 31: 2127-2130
- Park HJ, Ahn YS, Jeong BC, Park HY (2003) Plant regeneration derived from leaf disk cultures in purple sweetpotato. *Kor J Plant Biotech* 30: 245-249
- Rhim JW, Lee JW, Jo JS, Yeo KM (2001) Pilot plant scale extraction and concentration of purple-fleshed sweetpotato anthocyanin pigment. *Korean J. Food Sciil. Technol.* 33: 808-811
- Sato K, Nakayama M, Shigeta J (1996) Culturing conditions affecting the production of anthocyanin in suspended cell cultures of strawberry. *Plant Sci* 113: 91-98
- Stapleton AE, Walbot V (1994) Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage. *Plant Physiol* 105: 881-889
- 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 Exp Bot* 41: 749-755
- Zhang W, Curtin C, Kikuchi M, Franko C (2002) Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. *Plant Sci* 162 : 459-468
- Zhong J, Yoshida M, Fujiyama K, Seki T, Yoshida T (1993) Enhancement of anthocyanin production by *Perilla frutescens* cells in a stirred bioreactor with internal light irradiation. *J Frment Bioeng* 75: 299-303

(접수일자 2005년 8월 16일, 수리일자 2005년 12월 8일)