

Vitis Hybrid 세포배양에 의한 Anthocyanin 의 생산

박형환^{1*} · 강신권¹ · 이재호¹ · 최장윤¹ · 이윤수¹ · 권익부¹ · 유주현²

¹롯데그룹중앙연구소 ²연세대학교 식품공학과

Production of Anthocyanins by Vitis Hybrid Cell Culture

Park, Hyung-Hwan¹, Shin-Kwon Kang¹, Jae-Ho Lee¹, Jang-Yoon Choi¹,
Youn-Soo Lee¹, Ik-Boo Kwon¹ and Ju-Hyun Yu²

¹Lotte Group R&D Center, 4-20 Yangpyong-dong, Yongdeungpo-ku, Seoul 150-104, Korea

²Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

The induction of calli from tissues of a grape, *Vitis* hybrid, and their suspension cultures were performed and various factors were investigated on cell growth and anthocyanin production. It was shown that light intensity and inorganic nitrogen concentration played an important role on anthocyanin production. The contents of anthocyanin produced under 10,000 lux light irradiation were about twice as much as under the dark. The reduction of inorganic nitrogen concentration of MS medium to one to twenty brought about the increase of approximately five to six-fold in total anthocyanin or sixteenfold in anthocyanin content per dry cell weight and addition of nitrate only as inorganic nitrogen source was shown to be the best for anthocyanin production. Miller medium and Gamborg medium were suitable for the anthocyanin production, as well as high concentrations of Co²⁺ and Fe²⁺. And high yield of 40mg anthocyanins per 200ml flask was obtained by two stage culture using MS medium for the first stage and the modified MS medium for the second stage.

고등식물에 특유한 이차대사산물중 의약(1-3), 농약(4, 5), 향신료(6), 감미료(7), 색소(8-10) 등을 중심으로 한 천연물질의 세포배양을 통한 대량생산은 무한한 가능성을 지니고 있다.

Misawa(4), Tabata(11) 등은 재배식물의 유용 이차대사산물을 다량 생산하는 식물 세포배양의 예를 조사하였는데 *Catharanthus roseus* 가 생산하는 ajmalicine 과 serpentine 은 원식물보다 각각 3 배, 1.5 배 이상을 생산하였다. *Nicotiana tabacum* 으로 부터의 nicotine 및 ubiquinone-10 은 각각 1.5 배, 60 배를, *Coptis japonica* 가 생산하는 berberine 의 경우는 약 1.1 배, *Dioscorea* sp. 의 diosgenin 은 1.3 배, *Panax ginseng* 의 ginsenoside 는 6 배, *Lithospermum erythrorhizon* 의 shikonin 은 약 10 배를 생산할 수 있어 세포배양에 의하면 재배식물보다 고품량의 이차대사산물의 생산이 가능하다는 것을 입

증하고 있다. 이들 중 naphthoquinone 계 색소인 shikonin 은 이미 공업화되어 있는 실정이다(12). 특히 XO(896I)-장품 등에 있어서 변이원성, 발암성, 안전성 등의 이유로 인해 합성색소의 사용범위가 줄어들면서 천연색소에 관한 관심이 높아지고 있다. 여러 환경적 제약을 받지 않는 식물 세포배양에 의한 천연색소, 그중에서도 수용성 적색 색소인 anthocyanin 의 생산은 여러 연구진들에 의하여 검토되어 *Vitis* sp.(13, 14), *Haplopappus gracilis*(16), *Daucus carota*(17), *Zea mays*(18)의 callus 및 액체 배양세포가 anthocyanin 을 생산하는 것으로 보고하고 있다. 그러나 이들 배양세포는 anthocyanin 을 생산하는데 광을 절대적으로 필요로 하거나, 배양세포의 anthocyanin 생산량이 재배식물의 경우보다 적다는 문제점을 안고 있다. 실제 *Vitis* sp.의 경우 재배식물의 건조 과피중의 anthocyanin 함량은 106 mg/g

Key words: *Vitis*, cell culture, anthocyanin

*Corresponding author

(10.6%)인데 대하여 배양세포는 그것의 약 1/2 정도밖에 생산하지 못하였다(14, 15). 따라서 본 연구에서는 포도 세포배양을 통한 anthocyanin 생산수율의 향상을 목적으로 세포생육 및 anthocyanin 생성에 미치는 각종 인자들의 영향에 관하여 조사하였다.

재료 및 방법

Callus 의 유도 및 배양

Vitis hybrid (*V. lincecumii* × *V. labrusca* × *V. vinifera*) × (*V. vinifera* × *V. vinifera*), 일명반이 Bailey Alicante A 인 착색용 포도품종의 잎 또는 넝쿨로부터 callus 를 유도하였다. 95% ethanol 에서 30 초간, 유효 염소 농도 1.5% 인 antiformin 수용액에서 10 분간 침지시켜 살균을 행한 후 멸균 증류수로 3 회 세정하고 적당한 size 로 잘라 Murashige-Skoog (MS) 무기염 (19), thiamine · HCl (1.0 mg/l), myo-inositol (100 mg/l) 그리고 sucrose (30g/l) 를 함유한 기본배지에 식물 생장조절물질로서 2,4-D (0.05 mg/l), kinetin (0.2 mg/l) 을 첨가한 0.5% agar medium 에 치상하였다. 이것을 30°C, 광선이 차단된 곳에서 약 2-4 주간 배양하여 적색 및 백색의 callus 를 유도하였다. 유도된 callus 는 2 주 간격으로 새로운 배지에 이식하여 계대배양하였다. 액체배양은 배지 10 ml 을 넣은 ϕ21 시험관 또는 30 ml 을 넣은 200 ml 진탕플라스크에 callus 를 접종하여 30°C에서 왕복진탕배양 (170 rpm) 하였고 2 주 간격으로 계대배양하였다. 접종량은 10-15% (v/v) 였으며 필요에 따라 주광색형광등 (NEC FL-40SD) 을 이용하여 배양하였다.

Anthocyanin 의 추출 및 정량

15 일간 배양한 배양세포를 1% hydrochloric methanol 로 실온에서 3 회에 걸쳐 2 시간 동안 추출하여 이 현탁액을 500 rpm 으로 원심분리하고 그 상등액을 Spectrophotometer (Shimadzu UV-260) 로 525 nm 에서의 흡광도를 측정하여 cyanidin-3-monoglucoside 의 표준곡선에 의하여 anthocyanin 의 함량을 결정하였다(14).

세포 생육도 측정

액체 배양세포는 Toyo No.2 filter 로 여과하여 fresh weight 를 측정하였고, dry weight 는 여과된 배양세포를 80°C 의 drying oven 에서 overnight 시켜 측정하였다.

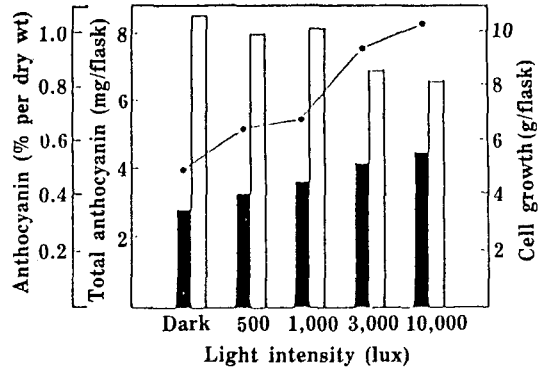


Fig. 1. Effect of illumination on anthocyanin formation and cell growth.

■: Total anthocyanin, □: cell growth, ●: anthocyanin content (% per dry wt)

당 및 무기질소 농도의 정량

배양액중의 당은 HPLC (high performance liquid chromatography) 를 사용하여 분석하였다. column 은 μ -Bondapak carbohydrate (Waters) 를, mobile phase 는 80% acetonitrile 를 사용하여 1.8 ml/min 의 flow rate 로 용출시켰고, RI detector 로 검출하였다. Ammonium 과 nitrate 의 농도는 각각 phenate method 및 ultraviolet spectrophotometric screening method (20) 에 의해 계산하였다.

결과 및 고찰

광조사량의 영향

Anthocyanin 의 생합성에는 일반적으로 광이 요구되며, 광조사량이 큰 영향을 미친다는 사실 (17, 21) 은 이미 알려져 있다. 따라서 광조사량에 의한 영향을 검토한 결과 anthocyanin 생성량은 광조사량에 따라 증가한다는 사실을 알 수 있었다 (Fig. 1). 광선이 차단된 곳에서 배양하였을 때 세포량은 10.6g/flask, 색소 생성량은 2.5 mg/flask 였으나 10,000 lux 의 광조사하에서는 세포량은 8.1g/flask 로 감소하였으나 색소 생성량은 4.5 mg/flask 로 증가하였다.

질소원의 영향

유기질소원의 영향

유기질소원으로서 yeast extract, malt extract, casamino acid, coconut milk 등을 각각 0.001-1% 까지 첨가하여 15 일간 배양한 후 각각의 세포 생육도 및 색소 생성량을 조사하였다. Yeast extract 및

malt extract의 경우 0.5% 이상의 농도에서 생육저해를 일으켰으며, 0.001-0.1%의 저농도에서도 색소 생성에는 효과가 없거나 오히려 저해하는 것으로 나타

났다. Casamino acid는 1% 농도에서 생육저해를 나타냈고 저농도 (0.01-0.5%)에서도 색소 생성에는 효과가 없었으며, coconut milk는 전반적으로 세포 생육은 촉진시켰으나 색소 생성에는 적합하지 않았다(Data 제시되지 않음). 이상의 결과로서 유기질소원을 다량 함유한 천연물의 anthocyanin 생성에 미치는 효과는 거의 없다는 사실을 알 수 있었다.

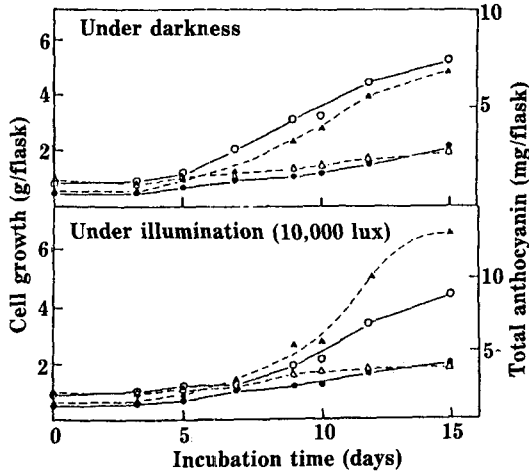


Fig. 2. Cell growth and anthocyanin production curve under decreased inorganic nitrogen concentration. ○; Cell growth at $6 \times 10^{-2}M$, ●; Total anthocyanin at $6 \times 10^{-2}M$, △; Cell growth at $3 \times 10^{-3}M$, ▲; Total anthocyanin at $3 \times 10^{-3}M$

Table 1. Effect of ammonium and nitrate on anthocyanin formation under darkness or illumination.

Under darkness

Ratio of ammonium to nitrate	Cell yield (g/flask)	Total anthocyanin (mg/flask)	Anthocyanin content per dry wt.(%)
1 : 0	1.07	2.40	4.49
2 : 1	1.92	6.83	7.11
1 : 1	2.03	9.16	9.02
1 : 2	2.35	8.74	7.44
0 : 1	2.67	12.18	9.12

Under illumination (10,000 lux)

Ratio of ammonium to nitrate	Cell yield (g/flask)	Total anthocyanin (mg/flask)	Anthocyanin content per dry wt.(%)
1 : 0	0.96	2.77	5.77
2 : 1	1.75	9.37	10.73
1 : 1	1.87	14.42	15.42
1 : 2	1.92	14.91	14.58
0 : 1	1.70	15.52	18.22

무기질소원의 영향

Total inorganic nitrogen 농도의 영향 : Ammonium과 nitrate를 무기질소원으로 하여 그 농도가 감소된 배지에서 15일간 진탕배양하여 세포 생육 및 색소 생성량을 조사하였다. 전체 무기질소원 농도가 감소할수록 세포 생육 저해를 받고 있으나 세포 건조 중량당 anthocyanin 함량 및 전체 색소 생산량은 매우 증대되었다. 그러나 전체 무기질소원 농도가 $3 \times 10^{-3}M$ 이하에서는 세포는 거의 증식하지 않았다. 또한 무기질소원 저농도 배지에서의 세포 생육 및 색소 생산을 경시적으로 검토한 결과 배양초기에는 거의 영향이 없으나 대수 증식기 초기에 anthocyanin의 생성이 급증하는 것을 알 수 있었다 (Fig.2).

Ammonium과 nitrate 농도비의 영향 : MS 기본배지에 있어 ammonium과 nitrate의 mole 농도비는 1 : 2이다. 색소생성량을 증대시키기 위하여 전체 무

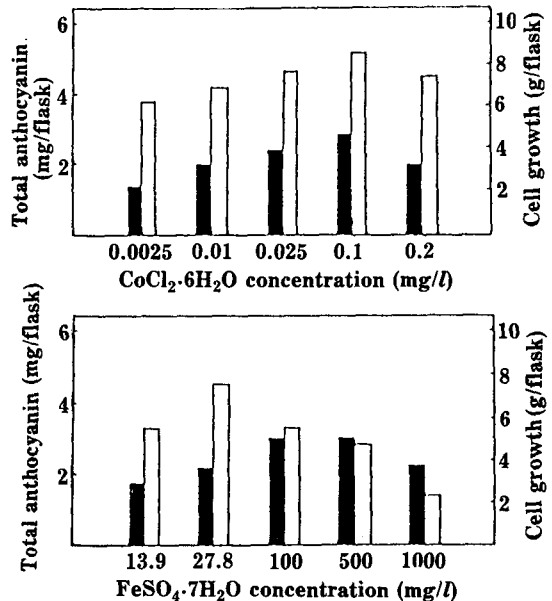


Fig. 3. Effect of cobalt and ferrous concentration on anthocyanin formation.

■: Total anthocyanin, □: Cell growth

기질소원 농도를 $3 \times 10^{-3} M$ 로 유지시킨 상태에서 ammonium과 nitrate의 mole 비에 따른 영향을 검토하였다. 무기질소원으로서 기본적으로 NH_4Cl 을 사용하고 KCl로 potassium ion 농도를 유지시켰다. 암조건 또는 광조사 상태에서 공히 nitrate 만의 첨가에 의해 가장 높은 색소 생성량을 나타내었고 ammonium 만을 첨가하였을 때는 세포 생육 및 색소 생성이 저해됨을 알 수 있었다(Table 1).

이 결과는 *Acer pseudoplatanus* (22), *Glycine max* (23) 등을 이용한 실험에서 입증되었듯이 배지중의 질소농도를 감소시킴으로써 세포내 phenolic compounds의 생성이 촉진되고 또한 anthocyanin 생합성 과정의 key enzyme인 PAL(Phenylalanine ammonia lyase)의 활성이 높아진 결과라고 추정된다.

Metal ion의 영향

각종 metal ion 농도를 변화시킨 배지에서 15일간 진탕배양한 적색 배양세포를 여과하여 세포 중량 및 anthocyanin 생성량을 조사하였다(Fig.3). Co^{2+} , Fe^{2+} 의 농도를 MS medium의 농도보다 각각 4배, 5배 정도 높임으로써 색소 생성량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 동일 농도에서 Co^{2+} 는 세포 생육은 촉진시켰으나, Fe^{2+} 는 저해하는 것으로 나타났다. 그러나 Cu^{2+} , Zn^{2+} 등을 고농도 첨가하였을 때는 오히려 anthocyanin의 생성은 저해되었다(Data 제시되지 않음).

각종 합성배지의 영향

식물 세포배양에 사용되는 주요 기본배지에 각각

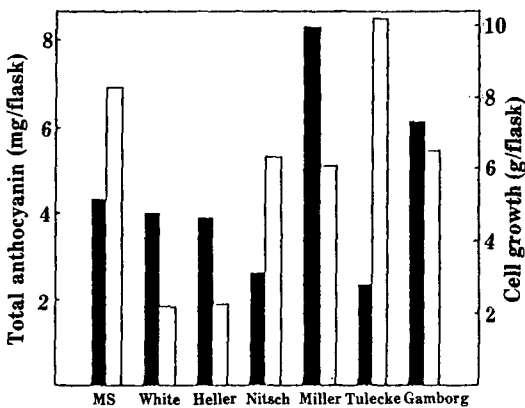


Fig. 4. Effect of various synthetic media on anthocyanin formation and cell growth.

■: Total anthocyanin, □: Cell growth

동량의 유기성분 및 식물 생장조절물질을 첨가하고 최종 pH가 6.1이 되도록 조정하여 15일간 암조건 하에서 진탕배양하여 세포 생육 및 anthocyanin 생성량에 미치는 영향을 MS 배지와 비교 검토하였다. Miller 배지와 Gamborg 배지에서의 색소 생산량은 MS 배지에 비해 각각 1.8배, 1.4배 증대되는 것을 알 수 있었다(Fig.4). Miller 배지와 Gamborg 배지의 무기질소원 농도는 각각 $3.8 \times 10^{-2} M$, $1.3 \times 10^{-2} M$ 로 (MS 배지, $6 \times 10^{-2} M$) 낮으며 $NH_4^+ : NO_3^-$ ratio는 각각 1 : 2, 1 : 3이다. 이 결과는 무기질소원 농도가 anthocyanin 생성에 중요한 역할을 한다는 사실을 시사하고 있다.

2 단계 배양에 의한 색소의 생산

*Lithospermum erythrorhizon*의 세포배양에 의한 shikonin의 효율적 생산에는 2 단계 배양을 이용하고 있다(12). 그러나, 세포배양에 의한 anthocyanin의 생산에 2 단계 배양을 이용한 예는 아직 보고된 바 없다. 따라서, 저자 등은 포도 세포배양의 경우도 배지의 조성, 특히 무기질소원 농도가 anthocyanin 생성에 매우 큰 영향을 미친다는 사실에 착안하여 2 단계 배양을 시도하였다. 먼저 제 1 단계 세포 증식용 배지로서 MS 배지를 채택하고, 제 2 단계 색소 생산용 배지(무기질소원으로서 nitrate 만을 $3 \times 10^{-3} M$ 첨가)에 이식할 최적시기를 결정하기 위하여 200 ml 진탕플라스크에 30 ml의 액체 배지를 넣고 멸균한 후 15% (v/v)의 배양세포를 접종하여 30°C, 암조건하에서 진탕배양(170 rpm)을 행하여 배지중 당 및 무기질소원 농도의 변화를 경시적으로 조사하였다.

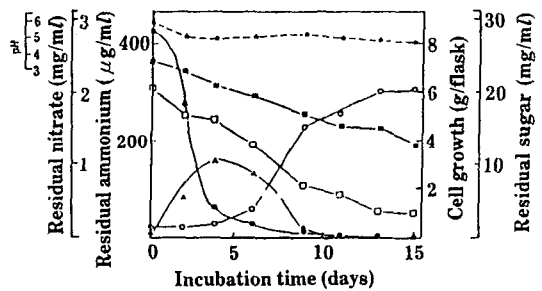


Fig. 5. Time course of sugar and inorganic nitrogen consumption by cultured Vitis cells.

○; Cell growth
 □; Residual ammonium
 ■; Residual nitrate
 ●; Residual sucrose
 ▲; Residual glucose
 ★; pH

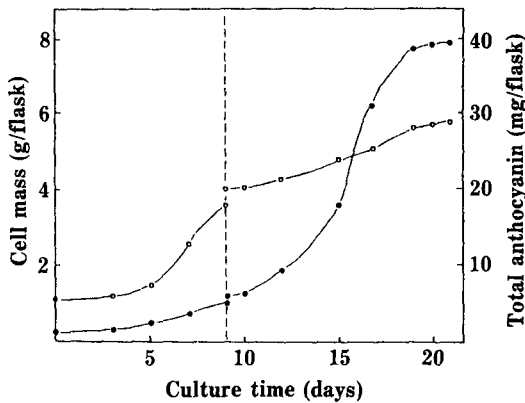


Fig. 6. Cell growth and anthocyanin production curve through two-stage cultivation. Dotted line indicate the point of transfer to the second-stage.

○; Cell mass, ●; Total anthocyanin

배양 초기 약 30g/l의 sucrose는 배양 9일째 거의 대부분은 소비되었고, sucrose가 배양세포의 sucrose에 의해 분해된 것으로 추정되는 배양액중 glucose 농도는 배양 4일째 최고(11g/l)였으나 왕성한 세포 생육과 함께 배양 9일째 거의 고갈됨을 알 수 있었다. 무기질소원은 탄소원과는 달리 급격한 소비는 나타내지 않았으며 nitrate에 비하여 ammonium의 소비속도가 더 큰 것을 알 수 있었다 (Fig.5). 따라서 탄소원의 고갈이 현저한 배양 9일째를 제 2단계 색소 생산용 배지에 이식할 가장 적절한 시기로 결정하였다. 9일간 MS 배지에서 생육된 세포는 멸균된 stainless sieve로 여과하여 200 ml 플라스크에 15% (v/v)의 배양세포를 접종하고 상기조건에서 12일간 배양을 행하여 플라스크당 40 mg의 높은 생산량을 얻을 수 있었다 (Fig.6).

이것은 같은 *Vitis* sp.(14)의 배양세포를 20일간 배양한 후 획득한 최대 수율의 약 3배의 해당하는 것으로, 급후 2단계 배양방법을 이용한 anthocyanin 생산의 최적화를 위하여 배양공학적인 연구가 검토된다면 보다 높은 수율을 얻을 수 있을 것으로 믿어진다.

요 약

착색용 포도품종 (*Vitis* hybrid)의 조직으로부터 callus를 유도하고 액체 진탕배양을 행하여 세포 생육 및 anthocyanin의 생성에 미치는 각종 인자들에 대하여 조사한 결과 광조사량 및 무기질소원 농도가 가장 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 즉, 광조

사량이 10,000 lux였을 때는 암소에서 배양했을 때보다 anthocyanin 생성량은 약 2배 증가하였다. 또한 기존 MS 배지의 무기질소원 농도를 20배로 감소시켜 배양했을 때 전체 anthocyanin 생성량은 약 5-6배, 건조 중량당 함량은 약 16배 증가함을 알 수 있었다. 또한 무기질소원으로 nitrate만을 첨가했을 때 가장 높은 수율을 나타냈다.

고농도의 Co^{2+} , Fe^{2+} 와 Miller 배지, Gamborg 배지 등이 anthocyanin 생산에 적합한 것으로 나타났으며, MS medium 및 modified MS medium을 이용한 2단계 배양을 시도하여 약 40 mg/flask의 높은 anthocyanin 수율을 얻을 수 있었다.

참고문헌

1. Furuya, T., K. Syono and A. Ikuta: *Phytochemistry*, **11**, 175 (1972).
2. Zenk, M.H.: *Naturwiss.*, **64**, 585 (1977).
3. Yamada, Y. and F. Sato: *Phytochemistry*, **20**, 545 (1981).
4. Misawa, M. and H. Samajima: Plant tissue culture 1982 (Fujiwara, A. ed) pp. 353, Mazuzen (1982).
5. Kueh, J.S.H., I.A. Mackenzie and G. Pattenden: *plant Cell Reports*, **4**, 118 (1985).
6. Radwan, S.S. and C.K. Kokate: *Planta*, **147**, 340 (1980).
7. Matsumoto, T. and T. Ikeda: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 2274 (1976).
8. Fujita, Y., Y. Maeda, C. Suga and T. Morimoto: *Plant Cell Reports*, **2**, 192 (1983).
9. Yamamoto, Y.: *Theor. Appl. Genet.*, **61**, 113 (1982).
10. Watanabe, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 553 (1985).
11. 田端守: *細胞工學*, **3**(3), 249(1982).
12. Bailey, J.E. and F. Ollis (eds.): *Biochemical engineering fundamentals* (2nd ed.), pp.643, McGraw-Hill Co., N.Y. (1986).
13. Slabecka-Szweykowska, A: *Acta Soc. Bot. Polon.*, **24**, 3 (1955).
14. Yamakawa, T., K. Ishida, S. Kato, T. Kodama and Y. Minoda: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2185 (1983).
15. Matsudomi, N., M. Yamamura, H. Ohta, Y. Osajima and S. Akuta: *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **24**, (7), 342 (1977).
16. Stickland, R.G. and N. Sunderland: *Ann. Bot.*, **36**, 433 (1972).
17. Alferman, A.W. and E. Reinhard: *Experientia*, **27**, 353 (1971).
18. Straus, J.: *Plant Physiol.*, **34**, 536 (1959).

19. Murashige, T. and F. Skoog: *Physiol. Plant.*, **15**, 473 (1962).
20. Greenberg, A.E., R.R. Trussel and L.S. Clesceri: Standard methods for the examination of water and wastewater (16th ed.), pp. 392, American Public Health Association, Washington, D.C.
21. 山田康之: 植物細胞培養 Maroual, pp. 55, 講談社 (1984).
22. Westcott, R.F. and G.G. Henshaw: *Planta*, **131**, 67 (1976).
23. Halbrock, K., J. Ebel, A. Oaks, J. Auden and M. Liersch: *Planta*, **118**, 75 (1974).

(Received April 27, 1989)