

장록에서 유도한 Betalain 합성 세포주의 액체 배양과 모상근의 특성

양 덕 조 · 이 성 종 · 윤 길 영 · 강 영 희*
충북대학교 자연과학대학 생물학과, *연세대학교 이과대학 생물학과

Suspension Culture of Betalain Producing Cell-Line and Characteristics of Hairy Root of *Phytolacca esculenta* V. Houtte

Deok Cho Yang, Sung Jong Lee, Kil Young Yun and Young Hee Kang

Department of Biology, Chungbuk National University, Cheongju

*Department of Biology, Yonsei University, Seoul

ABSTRACT

The effect of light and phytohormone on the betalain synthesis was tested using the suspension culture of a red (betalain producing) cell line from *Phytolacca esculenta* V. Houtte. Betalain synthesis of red cell line was strongly dependent on the irradiation of blue light, but not induced by hormone, IAA and/or kinetin, in dark conditions. In a light condition, however, 2 mg/ℓ of IAA increased the betalain content about 30% (per gram fresh weight), whereas more than 0.5 mg/ℓ of kinetin remarkably decreased. The hairy root derived from the same plant was also observed for the blue light dependent pigmentation in the root-tips. When the hairy root grown in dark was transferred to the light condition, the accumulation of betalain was initiated after 12 hours. Such pigmentation was completely inhibited by addition of a protein synthesis inhibitor.

서 론

Betalain은 chromo-alkaloid계 물질인 자홍색 (λ_{max} 540 nm) 천연색소로서 중심자목(Oder *Centrospermae*)의 식물에서 발견된다(1, 2). Beta-lain은 천연색소로서의 가치가 높을 뿐만 아니라 항생(antibiotic), 항균(antifungal) 및 spermatocidal 효과를 지니고 있는 것으로 알려져 있다(3, 4). Betalain에 대한 연구는 주로 *Beta*, *Amaranthus*, *Opuntia* 등에서 수행되었으나(5-7), 오래전부터 국내에서 한약재로 이용되어 온 장록(*Phytolacca esculenta* H. Voutte)은 열매와 줄기에 다량의 betalain 색소를 함유하고 있는 유용식물로서 betalain의 생산 및 betalain 합성 조절기작에 대한 연구가 요구된다.

식물체내에서 betalain의 합성을 조절하는 시스템으로 크게 광(phytochrome/cryptochrome system)과 식물호르몬이 알려져 있으며, 식물마다 각기 다른 조절기작을 통해 betalain 합성이 유도된다(8-10). 이 중에서도 광에 의한 betalain 합성유도 즉 “광의존성 색소합성(pigmentation)” 과정은 식물의 광형태형성(photomorphogenesis)의 일환으로 세포 배양기술 및 형질전환된 모상근을 이용하면 세포 및 조직수준에서의 광신호전달(photosignal transduction) 과정을 연구하는데 매우 효율적인 실험재료로 이용될 수 있다.

따라서, 본 연구는 장록의 액체배양 및 모상근 배양을 통하여 betalain 생산을 위한 기초자료로 배지와 광조건, 그리고 호르몬에 대한 최적조건을 규명하고, 광신호전달의 모델시스템을 개발하기 위한

목적으로 수행되었다.

재료 및 방법

장록 캘러스의 세포주 선발

장록의 엽조직으로부터 유기한 캘러스를 MS-D 배지(1mg/ℓ 2, 4-D/1mg/ℓ kinetin)에서 광상태로 배양하면서 betalain이 합성되는 세포군과 색소가 합성되지 않는 세포군을 분리하여 15일 간격으로 계대배양하였으며 이와같은 실험을 반복하여 적색 및 백색세포주를 선발하였다.

적색세포주의 최적배지 및 호르몬 효과

선발된 세포주를 100mesh 스크린(190 μ m, Sigma)을 통과시켜 MS, MS-D, WHITE 및 M-9 액체배지에 0.6gram fresh weight(g-fr.wt) 씩 접종하여 광상태(800lux, 28 $^{\circ}$ C) 및 암상태의 shaker(100rpm)에서 1주간 배양한 후에 세포농도 및 색소함량을 측정하였다. Betalain 합성에 대한 호르몬의 효과는 M-9 배지에서 indole-3-acetic acid(IAA)를 농도별(0.1-5mg/ℓ)로 처리하여 최적 IAA 농도를 밝힌 다음, 최적 농도의 IAA와 kinetin(0.1-2.0 mg/ℓ)과 gibberellin[GA₃(0.1-2.0mg/ℓ)]을 복합처리하여 그 효과를 조사하였다.

장록 모상근 유기 및 특성

장록 종자를 무균발아시켜 무균 식물체의 잎과 줄기조직에 *Agrobacterium tumefaciens* A₄T를 접종하고, 약 4주후에 유기된 모상근을 2.5mg/ml carbenicillin이 첨가된 배지에 치상하여 항생제 농도를 낮추면서 계대배양하였다. 균이 제거된 모상근은 각 line 별로 SH 액체배지에서 배양하였다.

광조건 및 betalain함량 측정

광원으로는 형광램프와 텅스텐, 할로겐 램프를 사용하였으며, 청색필터(400-500nm 투광률 50% 이상/600-700nm 투광률 0%)와 적색필터(380-570nm 투광률 0%/600nm 이상 투광률 90% 이상)를 사용하여 분광하였다. 색소함량은 배양 현탁액을 200mesh 스크린(73 μ m, Sigma)에 걸러 수분을 제거한 후에 70% methanol로 추출하여 UV-Vis spectrophotometer(Hitachi, U 3400)를 이용하여 540.6nm에서 흡광도를 측정하였다(11).

결과 및 고찰

캘러스의 색소합성에 대한 광의 효과

장록 캘러스를 광상태에서 배양하면 먼저 부분적으로 betalain이 합성되는 세포군집과 색소합성능이 결여된 세포군집이 나타나는데, 이와 같이 색소합성능에 따라 세포들을 분리하여 계대배양한 결과 제 8 대째에서 형질이 고정된 적색세포주(red-cell line)와 백색세포주(white-cell line)를 선발할 수 있었다(Fig. 1). 장록의 적색세포주의 betalain 함량은 0.8-1.2 $\Delta E_{540.6nm}/g \cdot fr.wt$ 였으며, 이 세포주를 가지고 색소함량을 증가시키기 위한 최적 광조건 조사 및 액체배양 실험에 사용하였다.

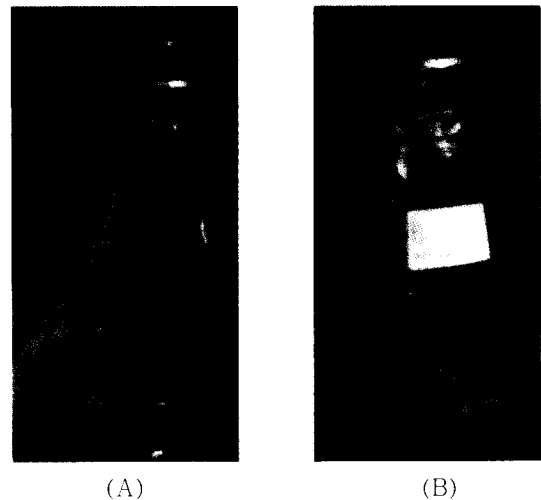


Fig. 1. Red(A) and white(B) cell lines derived from leaf callus of *P. esculenta*. Two cell lines were obtained from 8th subculture.

장록의 줄기로부터 유기한 적색세포주는 광조건에서만 betalain 합성이 유도되었고, 광질별로는 청색광하에서 색소 합성률이 현저히 높았으며, 적색광하에서는 betalain 함량이 청색광의 1/3 이하로 현저히 낮은 색소합성률을 나타내었다(Fig. 2). 백색광의 광량을 증가시켰을 때 장록 캘러스의 색소함량은 1200 lux 까지 급속한 증가율을 보였고, 2000 lux 이상에서는 증가율이 현저히 둔화되었으며, 청색광은 약 800 lux까지 백색광의 효과를 완벽하게 대체할 수 있었다(Fig. 3). 따라서, 장록 캘러스에서 betalain 합성을 유도시키기 위해서는 배양시 700 lux 정도의 청색광이나 1200 lux 범위의 백색광이

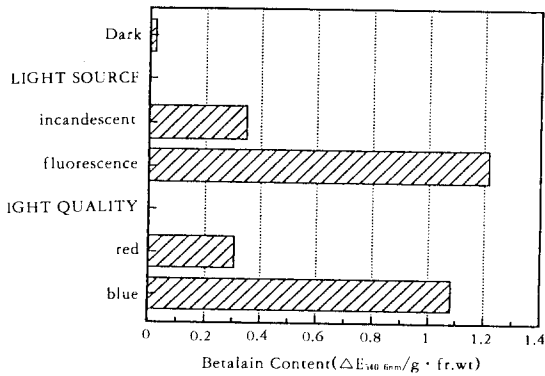


Fig. 2. Effects of light source and quality on the betalain synthesis in the red-cell line of *P. esculenta* (cultured for 7 days after inoculation at 28°C).

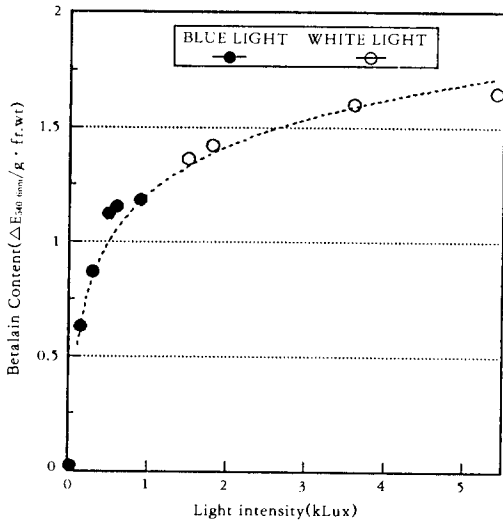


Fig. 3. Effects of the intensity of white and blue light on the betalain synthesis of the red-cell line from *P. esculenta* (cultured for 7 days after inoculation at 28°C).

요구되며, 장류의 betalain 합성은 적색광 수용체인 phytochrome계가 조절하는 것이 아니고 청색광 수용체인 crytochrome계가 색소합성을 직접 조절하고 있음을 나타내고 있다.

Betalain 합성에 대한 호르몬 효과

장류 적색세포주의 액체 배지별 증식 및 색소합량을 보면, MS-D와 MS배지에서 세포증식률은 각각

2.20과 2.00g · fr.wt/30ml로 WHITE나 M-9 배지에 비해 1.5배 이상 높았고, 색소합량은 M-9 배지에서 2.19 ΔE_{540 nm}/g · fr.wt로 가장 높은 증가율을 나타냈다(Tab. 1). 장류의 적색세포주에서도 세포배양을 통하여 이차 대사산물(anthocyanin, shikonin, alkaloids 등)을 생산하려는 다른 연구결과(12, 13)에서와 같이 세포증식과 색소생산은 반비례관계를 나타냈으며, 이는 shikonin 생산(14)에서와 같이 단기간 특정배지에 배양하여 betalain 합성률을 높이는 이단 배양(two-stage culture)이 효과적인 방안임을 제시해 주고 있다.

장류의 세포주의 색소합성이 가장 왕성하게 유도되는 M-9 배지에서 단기간(7일) 배양할 때 betalain 합성률을 증가시킬 수 있는 호르몬 조합을 찾고자 IAA, kinetin 및 GA₃의 효과를 조사하였다. IAA는 장류 현탁배양시 세포 증식에 필수적인 호르몬으로서, 광상태에서 2ppm까지 betalain 합성을 증가시켰으며 그 이상의 농도에서는 색소 함량이 서서히 감소하였다(Fig. 4). 그러나, 광상태에서의 최적 IAA 농도인 2mg/l를 처리하고 암상태에서 현탁배양하였을 때 색소합성은 전혀 유도되지 못하였으며 성장률까지도 광상태의 50% 정도에 머물렀다(Tab. 1).

Table 1. Content of betalain and cell mass of suspension culture of the red-cell line in 4 kinds of media

MEDIA	CELL MASS (g · fr.wt./30ml)	BETALAIN CONTENT (ΔE _{540 nm} /g · fr.wt.)
WHITE	1.30 ± 0.12	0.49 ± 0.05
MS - D	2.20 ± 0.23	1.26 ± 0.21
M S	2.00 ± 0.21	1.48 ± 0.14
M - 9	1.16 ± 0.16	2.19 ± 0.19

Kinetin을 농도별(0.1-2ppm)로 2ppm IAA와 복합 처리하면 kinetin의 농도가 증가함에 따라 성장률에 대한 유의차는 나타나지 않았으나, betalain 함량은 현저히 감소하는 효과를 나타내었다(Fig. 5). Wohl-part와 Marby(15)는 *Beta vulgaris*의 잎 캘러스에서 betalain 합성이 암상태에서도 유도될 수 있으며, Kehler(16)와 Kinsman 등(17)은 exogenous한 kinetin이 betalain 합성을 촉진한다는 연구 결과를 발표하였다. 이 과정에서 kinetin은 "second messenger"인 cyclic-AMP와 유사한 기

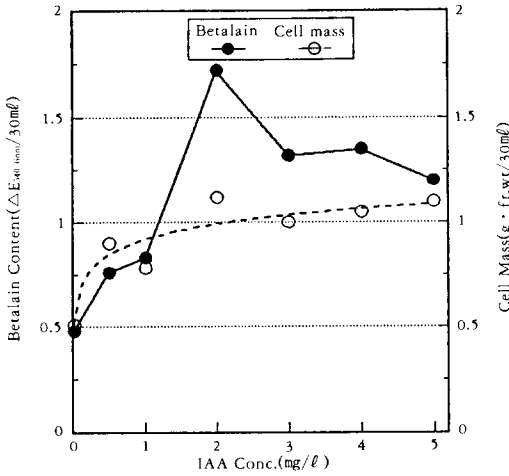


Fig. 4. Effects of IAA concentrations on the betalain content and cell mass of the red-cell line in the M-9 liquid medium (the maximum value of SD was 0.26).

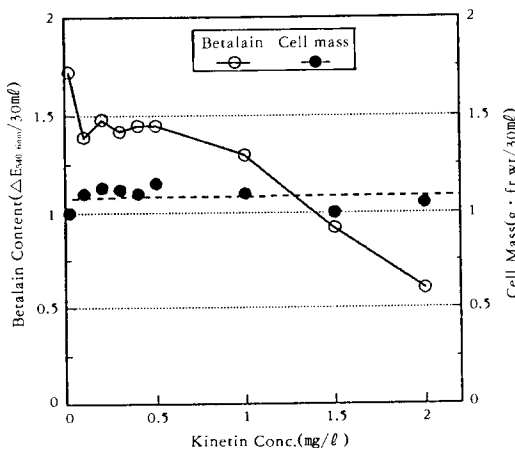


Fig. 5. Effects of kinetin concentrations on the betalain content and cell growth of the red-cell line in the M-9 liquid medium containing 2mg/l IAA (the maximum value of SD was 0.28).

능을 갖는다고 보고되었다(17). 그러나, 장록은 phytochrome이나 kinetin에 의해 조절되는 식물들과는 다른 신호전달과정을 통해 betalain 합성이 유도되는 것으로 판단되며, 이에 대한 구체적인 연구가 요구된다.

또한, betalain 합성과정에서 kinetin의 antago-

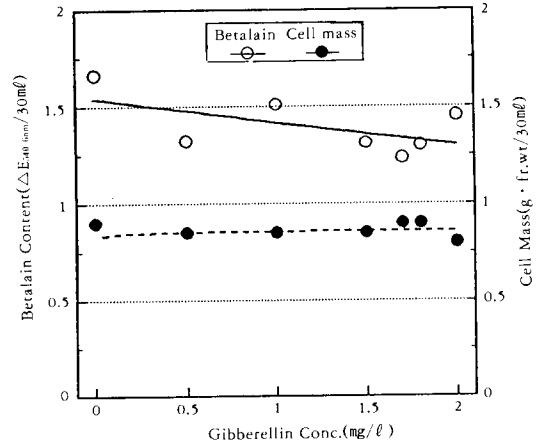


Fig. 6. Effects of GA₃ concentration on the betalain content and cell growth of the red-cell lines in the M-9 liquid medium containing 2mg/l IAA (the maximum of SD value was 0.26).

Table 2. Effects of IAA and kinetin plus IAA with or without light on the cell mass (g · fr.wt./30ml) and betalain content (ΔE_{540.6nm}/g · fr.wt.) of red-cell line

HORMONES	CELL MASS		BETALAIN CONTENT	
	LIGHT	DARK	LIGHT	DARK
2ppm IAA	1.08 ± 1.13	0.58 ± 0.10	2.01 ± 0.15	0.20 ± 0.04
2ppm IAA + 0.2ppm KINETIN	0.88 ± 0.11	0.58 ± 0.07	1.24 ± 0.16	0.13 ± 0.02

nist인 GA₃는 betalain의 전구물질인 tyrosine 대사를 조절하여 betalain 합성을 억제한다고 알려져 있으나(18, 19), 장록의 적색 세포주에서는 GA₃의 농도가 증가함에 따라 betalain 함량을 다소 감소시키는 경향을 나타내었다(Fig. 6)

그러므로, 장록 적색세포주의 betalain 함량을 증가시키기 위해서는 청색광상태의 M 9 배지에서 2 mg/l IAA를 단독처리하는 것이 바람직하며, M-9 배지의 조성을 변화시키고 적당한 전구물질(tyrosine, DOPA 등)을 첨가함으로써 betalain 생산성을 더욱 향상시킬 수 있을 것으로 생각된다.

장록의 모상근과 특성

장록의 모상근은 접종후 약 4주 후에 잎과 줄기

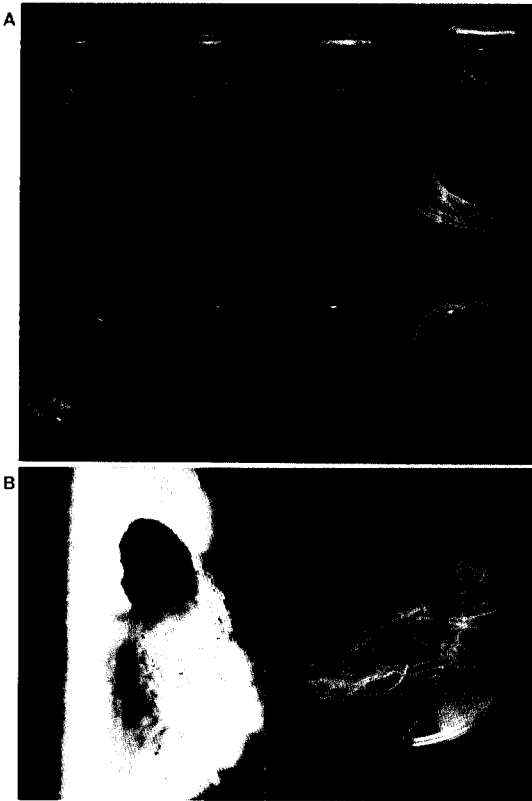


Fig. 7. The 4 strains of hairy root induced from *P. esculenta* with *Agrobacterium tumefaciens* A₄T(A). The pigmentation of Hairy root-tip dependent on the blue light(B).

조직으로부터 유기되었으며, 유기된 12 strains 중에서 성장율이 비교적 높은 형태적으로 구별되는 4가지의 strain을 확보하였다(Fig. 7A). 특히, 장록의 모상근 strain S₈을 광상태에서 배양하면 모상근의 tip(정단분열조직)에 betalain 색소가 축적되는 “청색광 의존성 pigmentation” 현상이 나타난다(Fig. 7B).

장록 모상근의 pigmentation은 광조사 후 24시간이 경과되면 육안으로 색소축적이 관찰되며, 48시간 경과후에는 최대의 합성물을 나타내고, 또한 이 과정에 단백질합성 억제제인 cycloheximide(10⁻⁶M)를 처리하면 색소합성이 차단되는 효과를 나타낸다(data not shown). 이러한 결과들은 장록 모상근의 pigmentation이 광신호전달(photo-signal transduction) 과정을 거쳐 효소단백질이 생합성(de novo

synthesis)됨으로써 나타남을 알 수 있다. 그러므로, 모상근을 이용한 betalain 색소생산 가능성 이외에도 모상근의 생리적 특성 즉, 안정된 표현형을 지닌 조직수준의 단순화된 실험재료의 다량 확보와 광의 존성 등을 고려해 볼때, 광신호전달과정을 연구하는데 있어서 매우 적합한 실험 모델로서 그 활용성이 기대된다.

요 약

천연색소인 betalain을 함유하고 있는 장록(*Phytolacca esculenta* H. Voutte)으로부터 betalain을 합성이 활발한 적색세포주(red cell line)을 선발하여 색소생산을 위한 최적조건을 규명하고, *Agrobacterium tumefaciens* A₄T로 형질전환시킨 모상근(hairy root)의 betalain 합성에 대한 특성을 조사하였다. 장록 적색세포주의 betalain 합성 과정에는 청색광이 필수적으로 요구되며, kinetin이나 IAA와 같은 호르몬에 의해서는 betalain 합성이 유도되지 않았다. 그러나, IAA는 광상태에서 적색세포주의 betalain 함량을 30%(단위 gram 생체량당) 정도까지 증가시켰으며, 반면에 kinetin은 특히 0.5ppm 이상에서 betalain 합성을 현저히 억제하였다. 장록으로부터 성장율과 형태적으로 구별되는 4종류의 모상근 strain을 분리하였으며, 이 중에서 모상근 strain S₈은 뿌리끝(root-tip)에서 단백질생합성(de novo synthesis)이 관련되어 있는 “청색광 의존성 pigmentation” 현상이 나타남을 관찰하였다.

감 사

본 연구는 1990년도 한국과학재단 일반연구지원(901-0408-054-1)에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. H. Reznik(1980), *Plant in Pigments*, (F. C. Czygan, eds), 370, Gustav Fisher Press, N. Y.
2. T. W. Goodwin and E. I. Mercer(1983), *Introduction to Plant Biochemistry*, 2nd ed., P. 505, Pergamon Press, N. Y.
3. T. J. Marby and A. S. Dreiding(1968), *Recent Advances in Phytochem.*, 1, 145.

4. T. J. Marby, L. Kimler, and C. Chang(1972), *Recent Advances in Phytochem.*, **5**, 105.
5. L. Minale, M. Piattelli, and R. A. Nicolaus (1965), *Phytochem.*, **4**, 593.
6. A. S. Garay and G. H. N. Towers(1966), *Canad. J. Bot.*, **44**, 231.
7. L. Hoerhammer, H. Wagner, and W. Fritzsche(1964),*Biochem. Z.*, **339**, 1398.
8. M. Piattelli, M. Giudici de Nicola, and V. Castrogiovanni(1969), *Phytochem.* **8**, 731.
9. K. H. Koehler(1973), *Biol. Zbl.* **92**, 307.
10. A. K. Stobart and L. T. Kinsman(1977), *Phytochem.* **16**, 1137.
11. A. Wohlpart and S. M. Black(1973), *Phytochem.*, **12**, 1325.
12. F. Constabel, J. P. Shyluk, and O. L. Gamborg(1971), *Planta*, **96**, 306.
13. H. Boehm(1977), *Secondary Metabolism and Cell Differentiation*(M. Lucner, L. Nover, and H. Boehm eds), 104, Springer-Verlag, N. Y.
14. Y. Fujita, M. Tabata, A. Nishi, and Y. Yamada(1982), *Plant tissue Culture*(A. Fujuwara eds), 399, Maruzen, Tokyo.
15. A. Wohlpart and T. J. Marby(1968), *Plant Physiol.* **43**, 457.
16. K. H. Koehler(1972), *Phytochem.* **11**, 133.
17. L. T. Kinsman, N. J. Pinfield, and A. K. Stobart(1975), *Planta*, **127**, 149.
18. D. Rast, R. Skirvanova, and R. Bachhofen, *Phytochem.*, **12**, 2669.
19. H. E. Muller, H. Roster, A. Wohlpart, H. Wyler, M. E. Wilcox, H. F. Frohofer, T. J. Marby, and A. S. Dreiding(1968), *Helv. Chim. Acta*, **51**, 1470.
20. C. J. French, R. C. Pecket, and H. Smith (1974), *Phytochem.*, **13**, 1505.