

2009年 2月

博士學位論文

자색고구마(*Ipomoea batatas* L.)의 습관성캘러스로부터 유도된

안토시아닌 생합성 세포주에 관한 연구

Study on the anthocyanin-biosynthesis habituated callus
derived from purple sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.)

朝鮮大學校 大學院

生物學科

朴 慧 貞

자색고구마(*Ipomoea batatas* L.)의 습관성캘러스로부터 유도
된 안토시아닌 생합성 세포주에 관한 연구

Study on the anthocyanin-biosynthesis habituated callus
derived from purple sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.)

2009年 2月 25 日

朝鮮大學校 大學院

生物學科

朴 慧 貞

자색고구마(*Ipomoea batatas* L.)의 습관성캘러스로부터 유도
된 안토시아닌 생합성 세포주에 관한 연구

Study on the anthocyanin-biosynthesis habituated callus
derived from purple sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.)

指導教授 朴 鉉 庸

이 論文을 理學博士學位申請 論文으로 製出함

2008 年 10 月 日

朝鮮大學校 大學院

生物學科

朴 慧 貞

朴慧貞의 博士學位論文을 認准함

委員長	全南大學校	教授	裴東奎	印
委員	朝鮮大學校	教授	金永坤	印
委員	朝鮮大學校	教授	李圭培	印
委員	朝鮮大學校	專任講師	田澤重	印
委員	朝鮮大學校	副教授	朴鉉庸	印

2008年 12月 日

朝鮮大學校 大學院

목 차

ABSTRACT	I
1. 서론	1
2. 재료 및 방법	6
2.1. 조직배양	6
2.1.1. 재료식물	6
2.1.2. 습관성캘러스 선발.....	7
2.1.2. 안토시아닌 생합성 습관성캘러스 유도.....	8
2.1.3. 생장곡선 및 안토시아닌 함량곡선	8
2.2. 현탁배양	9
2.2.1. 현탁배양세포주 선발 및 생장곡선	9
2.2.2. 생장조절제의 효과.....	9
2.3. 생리활성분석	10
2.3.1. 항산화 성분분석	10
2.3.2. 안전성 평가	16

3. 결과 및 고찰.....	20
3.1 조직배양	20
3.1.1. 앞 조직배양	20
3.1.2. 과근 조직배양.....	24
3.1.3. 안토시아닌 생합성 습관성캘러스 유도.....	25
3.1.4. 생장곡선	31
3.2. 현탁배양	35
3.2.1. 현탁배양세포주의 선발	35
3.2.2. 생장조절제의 효과.....	37
3.3. 생리활성분석	42
3.3.1. 항산화 성분분석	42
3.3.2. 안전성 평가	56
4. 적요.....	66
5. 참고문헌	67

List of tables

Table 1. Effect of plant growth regulators on the callus formation from leaf disk cultures of purple sweet potato after 4 weeks of culture.	23
Table 2. Percentage of the formation of purple and habituated calli from purple sweetpotato.	29
Table 3. Effect of various growth regulators on the growth and anthocyanins biosynthesis of PHC.	41
Table 4. Total phenolic content of storage root and pigmented callus from purple sweetpotato.	45
Table 5. Contents of flavonoid.	47
Table 6. Total anthocyanin contents of storage root and pigmented callus.	47
Table 7. DPPH radical scavenging activity of EtOH of BL0.5D and MPHc.	51
Table 8. Scavenging activity of extracts of MPHc against DPPH radical.	53
Table 9. Antibacterial activities of ethanol extracts of MPHc.	55
Table 10. Mortality and clinical signs of SD male rat treated with MPHc.	58
Table 11. Mortality and clinical signs in SD rats about single oral administration after 3 weeks with callus extract	62

Table 12. Hematological values in SD rats administered orally with MPHC powder
for 4 weeks. 65

List of figures

Figure 1. Morphological aspect of various purple calli after 4 weeks culture from purple sweetpotato.....	30
Figure 2. Growth curve of BL0.5D and MPHc.	33
Figure 3. Anthocyanin accumulation in BL0.5D and MPHc.	34
Figure 4. Growth pattern of an anthocyanin producing habituated cell aggregates in suspension culture.....	37
Figure 5. Body weight changes in SD rats for 2 weeks after single oral administration with MPHc powder.	59
Figure 6. Body weight changes in SD rats administered orally with callus for 3 weeks.....	63

Abstract

The callus, habituated and anthocyanin-biosynthesis, derived from the purple sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) was studied to select the *cell line* containing antioxidant activity and to test the safety. Callus induction was initiated from explants derived leaf and root storage. Using leaf, optimal combination of the growth regulators for callus formation was 1 μM 2,4-D and 5 μM BA with a Murashige and Skoog (MS) basal medium containing under light condition after 4 weeks of culture. The optimal concentration for callus formation derived storage root explants was the best in 10 μM 2,4-D and 0.5 ~ 5 μM BA combination. Purple mottled callus was induced on MS medium supplemented with 1 μM 2,4-D. Anthocyanin-biosynthesis habituated callus was isolated from this callus which highly accumulated anthocyanin pigment. 5 μM Jasmonic acid increased the anthocyanin accumulation about 1.8 times higher than the control. 20 μM ABA increased the growth about 2.5 times than the control. Extracts of anthocyanin-

biosynthesis habituated callus showed antioxidant and antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*. For single-dose toxicity and repeated toxicity test, no dead animals, clinical signs and abnormal necropsy findings were observed and also no significant difference in body weights was found. Therefore, the anthocyanin-biosynthesis habituated callus considered not to have the acute toxicity. The results of these researches will contribute to pigment source of cosmetics and food industry.

1. 서론

고령화 인구가 지속적으로 증가하고 있는 현대사회에서 건강에 대한 관심이 높아지면서 식품과 화장품산업 분야에서 인공색소의 소비는 감소하고 항산화 및 항균효과 등의 생리활성을 가지는 물질을 식물에서 찾으려는 연구가 활발히 이루어지고 있다. 식물의 플라보노이드 화합물을 항산화능이 강하고, phenolic 화합물은 항균작용, 소염작용, 항알러지작용 등 알려져있다(Madhavi and Salunkhe 1995).

고구마(*pomoea batatas* L.)는 감자, 카사바 등과 함께 열악한 환경에서 잘 생육되어 단위 면적당 높은 수확을 얻을 수 있어 개발도상국에서 주요 식량작물로 재배되어 왔지만(Dodds et al. 1991; Phuc et al. 2001), 최근 선진국에서 비타민과 미네랄이 풍부한 4대 건강식품의 하나로 주목 받으며 소비가 증가하고 있다(Islam et al. 2003; Woolfe 1992). 이러한 고구마의 품종 가운데 자색고구마는 여러 품종들 가운데 표피뿐만 아니라 육질 전체에 안토시아닌을 다량 함유하고 있으며 작물과학원 목포시험장에서도 일부 품종이 육종되고 있다. 안토시아닌의 공급원은 750 mg/100fwg의 안토시아닌을 함유한 적포도 껍질이 대부분이었으나 190 mg/fwg으로 함량은 다소 낮지만 자색고구마는 수확량이 높기 때문에 포도와 비슷한 생산성을 유지할 수 있을 것으로 기대하기 때문이다(류수노 2000).

안토시아닌은 식물체에서 생합성 되는 페놀성 화합물의 한 종류로 300여 종류 이상이 보고 되고 있다(Cho *et al.* 2005; Park and Park 1994; Sakanaka *et al.* 2000). 분리 정제된 특정 안토시아닌은 생체내에서 항종양성(Kamei *et al.* 1995), 방사선 보호(Akhmadieva *et al.* 1993), 혈관수축(Colantuoni *et al.* 1991), human low-density lipoprotein과 lecithin-liposome system에서의 항산화 활성(Satue-Gracia *et al.* 1997; Wang *et al.* 1997), 간 보호 효과 등이 보고 되어(Obi *et al.* 1998), 색소로 심미적 기능을 증가시킬 뿐만 아니라 여러 생리활성을 지니는 물질로 재평가되고 있다. 이에 육종연구를 비롯한 자색고구마로부터 추출한 안토시아닌의 생리활성에 관한 연구가 국내에서도 진행되고 있다. 자색고구마는 주로 경작지 재배방식에 생산되며 지리적, 기후적 영향에 따라 수확량과 품질이 영향을 받기 때문에 안정적으로 높은 수율의 안토시아닌을 생산할 수 있는 새로운 생산방법이 요구된다.

식물조직배양기술의 발전으로 하나의 세포로부터 완전한 식물체의 재생이 가능하게 되면서, 식물세포가 형태 형성에 관여하는 완전한 유전 정보를 갖는 전형성능(totipotency)은 배양세포의 물질대사에서도 모본식물과 동일한 정보를 갖는 것을 시사한다. 이와 같은 기초지식을 바탕으로 식물조직배양이 식물의 유용물질 생산의 새로운 수단이 될 수 있는 것을 기대케 하였다. 식물조직배양을 통한 유용물질의 기내생산은 자연환경의 제약을 받지 않고, 질과 수율을 일정하게

유지하며 계획적인 생산이 가능한 장점이 있다. 그러나, 이러한 장점에도 산업화가 활성화 되기 어려운 원인은 우수 세포주의 선발, 배지 및 배양조건의 최적화가 어렵고, 외부 요인이나 유전자수준에서의 규명하지 못한 변이로 인한 생산성 급감과 해결 능력 부재 등 기초 연구의 부족으로 지적되고 있다.

안토시아닌의 기내생산에 관한 연구는 주로 당근과 포도를 이용하여 보고되었고(Decendit and Meorillon 1996), 포도를 이용한 안토시아닌의 기내생산은 미국에서 특허를 취득하였다. 안토시아닌의 기내생산에 대한 기술도입은 로열티 지불 등으로 경제성이 낮아져 대규모 국제시장에서 국내시장으로 제한되는 결과를 초래할 것이다. 이에 반해 자색고구마를 이용한 안토시아닌의 기내생산은 일본과 호주에서 주도하고 있으나 아직까지 특허나 산업화가 시도된 바는 없다(Konczak-Islam *et al.* 2003; Konczak *et al.* 2004). 또한, 유전적 차이로 인해 국내 품종의 자색고구마를 이용한 안토시아닌의 기내생합성은 그 기작이나 생합성량은 다를 것으로 예상된다. 따라서, 기술도입보다는 국내 자색고구마를 대상으로 기내 안토시아닌 생산 개발이 유리한 조건으로 국제시장에 대처 할 수 있을 것으로 기대된다. 즉 식물조직배양을 통해 유용한 생리활성물질의 생산에 있어서 가장 중요한 요인은 유용물질을 대량생산하는 세포주의 선발과 배양의 최적조건 확립이다.

식품은 저장이나 유통과정 중 미생물의 오염에 의하여 부패나 변질을 일으킬

수 있으므로 식품 보존제를 첨가하여 저장성을 높이고 있다. 식품 보존제로는 인공 합성품이 많이 사용되고 있으나 천연물 중에서도 상당한 항균성 물질이 존재하여 이의 검색과 식품의 이용에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다 (Beuchat and Golden 1989; Kim *et al.* 1999; Kim *et al.* 2006). 항균성을 갖는 것으로 보고된 천연물질은 주로 lysozyme, polylysine, protamine, conalbumin, avidin, 유기산, polyphenol 물질 등이 있다(Kim *et al.* 2006; Topisirovic *et al.* 2006). 천연물에 존재하는 항균성 물질을 항균소재로 이용하고자 하는 연구는 식품, 의약 및 생물공학산업 등에서 연구가 진행되고 있으나 대부분 항균성에 대한 연구가 식품이나 한약재로 이용되는 식물체 및 자생식물에 국한되어 있고 기내배양에서 생산된 산물에 대한 연구는 미흡한 실정이다(Blois 1958; Jimenez-Escrig and Goni 1999; Nishikimi *et al.* 1972; Oak and Lee 2005). 기내에서 생합성된 안토시아닌이 단순 식품첨가 색소뿐 아니라 항산화효과, 항균효과에 대해 조사하여 식품 보존제 기능으로서 여부를 검토하고자 했다. 생합성 세포주로부터 다양한 생리활성물질을 효과적으로 추출하여 실제 식품첨가용 항균제 등 무독성 항균제로 사용하기 위해서는 독성이 없는 용매의 선택과 최적 추출조건이 조사되어야 한다. 또한, 대표적인 식품부패균으로 알려진 그람 양성구균인 포도상 구균(*Staphylococcus aureus*)은 식물추출물을 이용한 항균 및 항진균성 검증연구는 많이 이루어지고 있으나 식물세포배양으로 생산된 추출물에

대한 연구는 보고된 바가 없다. 따라서, 향산화능 및 항균효과를 가지는 안토시아닌을 생합성 켈러스를 선발하고 안전성을 검사하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 조직배양

2.1.1. 재료식물

실험에 사용된 자색고구마는(자미, 보라미, 무안 5호) 작물과학원 목포시험장에서 공급 받아 이용하였다. 정단부를 포함하여 완전히 전개된 2개의 잎을 갖는 줄기를 채취하여 70% ethanol에 1분, 2% 락스 용액에 5분간 표면살균 후, 멸균수로 3회 세척하여 100 ml의 MSBM [MS (Murashige and Skoog 1962) basal medium supplemented with 3% sucrose, 0.1% myo-inositol, pH5.8, 0.3% phytigel, 고압증기멸균]이 첨가된 배양병(1,000 ml)에서 무균 생육시켜 사용하였다. 배양조건은 낮과 밤이 26/20℃, 16/8 hr(5000 ~ 7000 lux cool-white)로 유지하였으며, 4주마다 계대하였으며 이때 정단부에서 3 ~ 5번째 3 ~ 5 cm 가량의 잎을 잘라 잎 조직배양의 재료로 사용하였다. 괴근 조직배양은 시험장에서 공급받은 괴근을 물에 깨끗이 씻고 70% ethanol에 1분, 3% 락스 용액에 5분간 표면살균 후, 멸균수로 3회 세척하였으며 최종적으로 탈색된 부분을 제거한 후 사용하였다.

2.1.2. 습관성캘러스 선발

조직배양은 무균생장하고 있는 식물체의 정단부로부터 3 ~ 6번째, 2 ~ 3 cm 크기의 잎을 가장자리와 주맥을 제거하고 0.5 × 0.5 cm 크기로 잘라 배지에 치상하여 배양하였다. 배지는 MSBM배지를 기본배지로하여 0, 1, 10, 100 μM 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)와 0, 0.5, 5, 50 μM BA (6-benzylaminopurine)를 조합 처리하였다. 배지는 pH 5.8로 조절하고 phytigel을 0.3 % 첨가하여 고압멸균기 (121℃에서 15분)에서 멸균하여 60 × 10 mm petri dish에 10 ml씩 분주하였다. 각각의 petri dish에 4개의 절편체를 치상하였다. 캘러스 성장 상태에 따라 1주, 12, 24, 30일에 각각 관찰하여 캘러스 성장률과 안토시아닌 생합성률을 조사하였다. 배양은 26±1℃로 조절되는 배양실에서 3000 lux의 광도의 약광하에서 배양하였다.

작물과학원 목포시험장에서 재배한 자색고구마 괴경을 공급받아 70 % 에탄올에 1 분간, 2 % 락스에 5 분간 표면살균 후, 탈색된 조직을 제거하여, 0.5 cm × 0.5 cm × 0.1 cm 크기로 절단 후 배지에 달도록 치상하였다. 괴근 조직배양용 배지는 MSBM 배지에 0, 1, 10, 100 μM 2,4-D와 0, 0.5, 5, 50 μM BA를 혼합 처리하여 121℃에서 15분간 고압 멸균하여 60 × 10 mm petri dish에 10 ml 씩 분주하여 사용하였다. 조건 당 4개의 절편체를 치상하여 4반복 실시하였다. 배양조건은 24시간 26℃로 하여 암과 광조건(6000 lux)에서 4주 배양 후, 캘러스 형성률을 조사하였다.

2.1.2. 안토시아닌 생합성 습관성캘러스 유도

무균 생육한 자미와 보라미의 잎을 5 × 5 mm 크기로 잘라 4개의 절편을 10 ml 배지가 담긴 직경 6 cm 페트리디쉬 25개에 각각 치상하여 4주간 배양한 후, 습관성 캘러스와 안토시아닌 생합성 습관성캘러스 유도율을 백분율로 나타내었다. 사용된 배지는 MSBM에 자미와 보라미, 잎 조직배양에는 각각 1 μM와 0.5 μM 2,4-D를 첨가하여 3,000 lux 광 조건에서 배양하였다. 무안5호 괴근은 1 μM 2,4-D가 첨가된 MSBM 배지에 암조건에서 배양하여 유도하였다.

2.1.3. 성장곡선 및 안토시아닌 함량곡선

보라미의 잎 조직을 0.5 μM 2,4-D가 첨가된 MSBM에 약광조건에서 4주간 배양하여 유도한 자색캘러스와 무안 5호의 괴근 조직으로부터 유도된 안토시아닌 생합성 습관성캘러스의 성장양상을 조사하고자 하였다. 4주간 배양하여 유도된 각각의 자색캘러스 1g을 배지에 계대 배양 한 후, 6일 간격으로 생체중과 안토시아닌 생합성을 측정하였다. 생체중은 배지를 제거한 후 즉시 측정하였고, 이를 잘게 잘라 안토시아닌 함량 분석에 이용하였다. 안토시아닌 함량 분석은 3 mm filter paper를 이용하여 배양액을 제거한 후, 1 × 1 mm 정도로 세절 한 후 즉시 추출액에 넣었다. 추출액은 0.1% citric acid가 첨가된 20% 에탄올을 사용했으며 시료의 20배 추출액에서 추출하였다. 24시간 동안 25℃에서 추출하였으며, 24시간 후 vortex 하여 800

rpm에서 5분 동안 원심분리하고 상층액을 취하여 분광광도계(Mecasys 1210)를 이용하여 530 nm에서 안토시아닌 함량을 측정하였다(Park and Kim 2007).

2.2. 현탁배양

2.2.1. 현탁배양세포주 선발 및 성장곡선

현탁배양에 가장 적합한 JHC(Jami habituated callus)를 MSBM 액체배지 50 ml을 담은 250 ml 삼각플라스크로 옮겨 26°C, 120 rpm, 암 조건에서 1주 간격으로 35회 계대배양하여 안토시아닌 생합성 캘러스인 PJHC (purple Jami habituated callus)를 선발하였다. 성장곡선 측정을 위해 생장률과 안토시아닌 생합성량을 다음의 방법을 통해 조사하였다. MSBM액체배지에서 2년 6개월 배양한 캘러스 0.1 g을 채취하여 10 ml의 MSBM이 담긴 50 ml 의 삼각플라스크에서 암 조건으로 30일간 배양하였다. 캘러스의 생체중과 안토시아닌 함량측정을 위해 자색세포괴를 3 mm whatman filter paper (No. 1)를 이용하여 배양액을 즉시 제거, 생체중을 측정한 후 잘게 잘라 안토시아닌 추출에 사용하였다. 3일 간격으로 생체중을 측정하고, 6일 간격으로 분광광도계를 이용하여 안토시아닌 함량을 측정하였다.

2.2.2. 성장조절제의 효과

생장조절제 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), NAA (α -naphthaleneacetic acid), BA (6-benzyladenine), Kinetin, Jasmonic acid는 시그마에서 구입하여 다양한 농도로 처리하여 생장과 안토시아닌 생합성을 조사하였다.

2.3. 생리활성분석

2.3.1. 항산화 성분분석

2.3.1.1. 재료 및 기기

MPHC는 배양 6 ~ 12일 후에 수거하여 사용하였다. 자색고구마는 흐르는 물로 잘 씻고 표면 건조시킨 후에 사용하였으며 MPHC는 수거직후 배양액을 분리하였고 증류수로 1회 5초간 수세한 후 사용하였다. 사용 기기는 분광광도계(Mecasys 1210, 한국), 회전식감압농축기(buchi RE 121, 스위스), high power homogenizer (Janke & Kunkel D-2300 Kiel, 독일)을 이용하였다.

2.3.1.2. 페놀성 물질의 총함량

페놀 함량은 1 × 1 mm 정도로 세절 한 자색고구마의 괴근과 MPHC를 0.01 g에 Folin-Denis 시약 5 ml 비율로 첨가하여 혼합한 후, 증류수로 100 ml 정량한 다음

실온에서 30분간 방치 하여 760 nm에서 HPLC(SHIMADZU UV-160A)를 이용하여 흡광도를 측정하였다 (Folin and Denis 1915). Caffeic acid(Sigma Co., USA)를 0~100 µg/ml의 농도로 제조하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선으로부터 시료 추출물의 총 페놀 함량을 산출하였다. 사용된 caffeic acid와 Folin & Ciocalteau's phenol reagent은 sigma로부터 구입하여 사용하였다.

2.3.1.3. 총 플라보노이드 함량

시료 0.01 g에 증류수를 첨가한 후 90℃에서 30분간 추출하였으며, 여과하여 100 ml로 정용하였다. 여과액을 일정량 취하여 시험관에 옮긴 후 diethylene glycol과 NaOH 0.75 ml을 혼합하여 420 nm 에서 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 이때 표준곡선은 quercetin (Sigma Co. USA)의 농도를 0 ~ 0.5 mg 범위가 되도록 제조하였으며, 검량 선으로 시료 추출물의 플라보노이드 함량을 계산하였다 (Slinkard and Singleton 1977).

2.3.1.4. 안토시아닌 함량

사용된 검량선은 무안시험장에서 공급받은 자색고구마 색소분말을 정량적으로 취하여 0.1% citric acid가 첨가된 20% ethanol 추출용액에 녹인 후 530 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다. 샘플의 안토시아닌 함량 측정은 3 mm filter paper를 이

용하여 배양액을 제거한 샘플을 1 mm × 1 mm 정도로 세절 한 후 즉시 추출액에 넣었다. 추출액은 0.1% citric acid가 첨가된 20% 에탄올을 사용했으며 시료의 20배 액에서 추출하였다. 24시간 동안 25℃에서 추출하였으며, 24시간 후 vortex 하여 800 rpm에서 5분 동안 원심분리하고 상층액을 취하여 분광광도계(Mecasys 1210)를 이용하여 530 nm에서 안토시아닌 함량을 측정하였다(Park et al. 2007).

2.3.1.5 자색색소 aglycone 분석

자색고구마와 안토시아닌 생합성 켈러스인 MPHIC로부터 생합성된 안토시아닌 성분을 HPLC를 통해 분석 하였다. 괴근과 자색 켈러스 6 g을 0.1 cm × 0.1 cm × 0.1 cm로 잘게 잘라, 1%(v/v) HCL MeOH 용액 100 ml에 침지시켜 4℃ 암소에서 12시간 방치한 후, 색소를 추출하였다. 추출액을 Whatman No. 1 여과지를 사용한 Buchner funnel을 사용하여 흡인 여과하여 잔사는 시료의 색소가 완전히 제거될 때까지 동일 용매를 사용하여 반복 추출하였다. 이렇게 얻어진 추출액을 회전감압농축기를 사용하여 농축한 후, 농염산을 첨가하여 100℃의 water bath에서 1시간 가열하여 색소를 완전히 가수분해하였다. 가수분해한 색소액을 냉각한 후, 물을 첨가하여 색소액의 2배로 희석하고, 희석액에 isoamylalcohol을 첨가하여 강하게 흔들고, 잠시 방치해 두어 aglycone이 상층의 알코올 층으로 전용되게 하였다. 상층의 알코올 층을 다른 비이커에 옮긴 다음, ether 혹은 벤젠을 첨가하여 여러

지질성분을 제거하는 과정을 3회 반복하여 실행하였다. 이렇게 정제된 색소액에 소량의 isoamylalcohol을 첨가하여 상층의 aglycone 부분을 취하여 HPLC 시료로 사용하였으며, 이때 색소 성분을 확인하기 위해 표준물질의 aglycone (cyanidin, peonidin)을 구입하여 사용하였다. HPLC는 다음에서 분석하였다.

Instrument – Shimadzu LC10ADVP

Detector – UV detector

Wavelength – 520 nm

Mobile phase – H₂O:MeOH:CH₃COOH=63:35:2(v/v/v)

Column – Capcell Pak C18 SG120(4.6mmI.D.×250mm)

Flow rate – 1.0ml/min

2.3.1.6. 항산화 활성 측정

산화스트레스에 의하여 발생하는 free radical (ROO-, RO-)을 포착하는 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)법을 이용하여 측정하였다 (Cevallos-Casals and Cisneros-Zevallos 2003; Gulcin *et al.* 2005). 각각 배양 2주째의 켈러스를 수거하여 MeOH 침지시켜 얻은 추출물을 dry oven (Cheil Co., Korea)에서 건조 후 99.5% methanol에 용해시켜 1, 10, 100배로 희석하여 시료로 사용하였다 2.5mM DPPH solution 2ml를 농도에 따라 희석한 시료 1ml에 각각 첨가하여 혼합하고 상온에서

약 1 시간 동안 방치 한 뒤, 대조군과 513 nm에서 흡광도를 조사하여 소거활성으로 표시했다. 대조군으로는 시료 용액 대신 각각의 추출용매를 사용하였고, UV blank는 메탄올로 하였다. DPPH 소거능은 다음의 식을 이용하여 측정하였고 3반복 실행한 실험의 평균값을 나타냈다.

DPPH radical 소거활성 (%)

$$(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

A_{control} : 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도

A_{sample} : 시료를 첨가한 반응군의 흡광도

2.3.1.7. 추출용매에 따른 MPHC의 항산화능

계대배양 후 4주째인 MPHC를 수거하여 증류수로 수세한 후 두께 2 mm, 길이 2 mm 정도로 세절한 후 건조시켜 분말화하였다. 극성이 다른 7종(hexane, chloroform, ethylacetate, ethanol, methanol, distilled water)의 추출용매를 MPHC 중량 20배의 양을 첨가하여 30℃, 24시간 동안 추출한 후 homogenizer로 마쇄하고 G3 glass filter와 여과지(Whatman No.1) 및 membrane filter (pore size ; 5 µm, Millipore Co)를 사용하여 정제하였다(Lee *et al.* 1999). 모든 추출은 5반복 실행하여 평균값을 구하였다

2.3.1.8. 다양한 에탄올 농도별 MPHIC 추출물의 항균효과

시료 제조를 위해 계대배양 후 4주째 MPHIC를 수거하여 증류수로 수세한 후 두께 2 mm, 길이 2 mm 정도로 세절한 후 건조시켜 분말화하였다. MPHIC 분말 1g에 대해 H₂O, 에탄올 농도 5, 10, 20, 40, 60, 80%(v/v)의 용매를 각각 10 ml씩 첨가하여 4시간 현탁한 후 membrane filter (pore size: 5 µm, Millipore Co)로 여과한 후 80°C에서 2시간 동안 용매추출을 이용하여 증탕 한 후 회전식감압농축기로 농축하여 건조하고 잔사를 1% tween 20에 섞어 시료로 사용하였다. 항균효과를 조사하기 위해 disk diffusion test를 실행하였으며, 실험에 사용된 균주는 한국중균협회로부터 분양 받은 *staphylococcus aureus* (KCCM 12214)로 trypticase soy broth (TSB, pH7.2, 27°C)에서 배양시켰다. 이 균주를 30°C에서 2일간 배양한 후 균액을 배지 1ml당 1×10^6 cell이 되도록 접종하였다. 균체를 도말한 soft agar를 충분히 건조시킨 후 paper disc를(8 mm Advanctec, Toyo Roshi Co., Japan) 클린벤취에서 안착시켰고, 그 위에 준비한 추출물 용액을 100 µl씩 분주하여 균체의 최적 생육온도에서 24시간 배양한 후 disc 주변에 생성된 clear zone (mm) 크기를 측정하였다. 1% tween 20만으로 공시험한 결과 항균활성이 없어 용매에 의한 항균가능성은 배제하였다.

2.3.2. 안전성 평가

2.3.2.1. 단회투여 독성시험

2.3.2.1.1. 시험동물

SPF (Specific Pathogen Free) 5 주령 SD rat (male)를 (주)오리엔트로부터 구입하여 사육실에서 온도 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도는 $50\pm 10\%$, 환기 횟수 10~20회/hr, 형광등 명암은 12 hr cycle, 조도 200~300 Lux의 환경하에서 rat용 polycarbonate 케이지(400 L×250 W×189 H mm)에서 사육하였다. (주)오리엔트의 실험동물사료를 구입하여 공급하였으며, 1차 증류수를 자유롭게 섭취시켰다. 분양 후 1주일간의 순화기간을 거친 후 모든 동물의 체중을 측정, 220 ± 10 g의 범위에 드는 동물을 무작위로 선택하여 배분하였다

2.3.2.1.2. 시험물질

시험물질로 사용된 캘러스는 자색고구마로부터 유도된 안토시아닌 생합성 습관성캘러스(MPHC)로 MSBM에서 4주간 배양하여 수거하였다. MPHc를 실험동물에 투여 직전에 배지가 붙지 않게 수거한 후 세절 하여 1차 증류수에 용해시켜 시험에 사용하였다. 식품의약품안전청의 의약품의 독성시험기준(1999)에서,

시험물질의 독성이 낮아 중독량을 구하기 곤란한 경우 투여할 수 있는 한계량의 투여를 권장하고 있다(1,000~2,000 mg/kg). MPHIC의 Sprague-Dawley (SD) rat에 대한 단기 급성경구독성 평가는 최고용량인 2,000 mg/kg/day로 단회투여 독성시험을 실행하였다.

2.3.2.1.3. 중간치사량(LD₅₀) 결정

구입한 5주령의 SD rat은 1주일간 실험실에서 적응시킨 후 12시간 절식시켰다. 대조군과 실험군을 5마리씩 나누어 2,000 mg/kg의 MPHIC를 1차 증류수 2 ml와 혼합하여 지름 2 mm 존대를 이용하여 위내에 강제투여 하였다. 대조군은 증류수만 투여하였다.투여 당일은 투여 후 1시간에서 6시간까지 매시간, 투여 익일부터 14일까지는 매일 1회씩 사망동물, 일반증상 및 해부학적 조직을 관찰하여 중간치사량을 결정하였다.

2.3.2.1.4. 체중변화와 부검소견

투여 전일, 투여 당일, 그리고 투여 후 1주 간격으로 3주까지 체중변화를 관찰하였다. 투여 3주 후에 CO₂를 흡인하여 마취시킨 후, 회복하여 복대동맥을 절단하여 방혈 치사 시켰다. 육안적 소견을 보았다.

2.3.2.2. 3주 반복투여 독성시험

2.3.2.2. 1. 시험물질

시험 물질로 사용된 캘러스는 자색고구마로부터 유도된 습관성캘러스로(MPHC) 조직배양에 기술된 방법으로 4주간 배양된 MPHIC를 실험동물에 투여 직전에 배지가 붙지 않게 수거한 후 세절 하여 준비하였다. MPHIC의 SD rat에 대한 단기 급성경구 독성 평가는 MBBM배지에서 성장조절제 없이 생장하므로 독성은 낮을 것으로 예상되어 체중 kg당 2 g의 MPHIC를 1차 증류수 2 ml와 섞어 rat 의 위에 직접 지름 2mm 존대를 이용하여 위내에 직접 투여하였고, 대조군은 증류수만 투여하였다. 사육실 환경은 단회투여독성시험과 동일하게 조절하였다. 단회투여 독성시험 결과 독성징후가 관찰되지 않아 식약청 고시에 명시된 최고농도인 2,000 mg/kg B.W을 투여량으로 설정하였다 5주령의 SD rat를 (주)오리엔트로부터 구입하여 일주일간 순화시킨 후 군당 5마리로 나누어 체중 kg당 2000 mg의 MPHIC를 1차 증류수 2 ml와 섞어 지름 2 mm 존대를 이용하여 위내에 직접 투여하였고, 대조군은 증류수만 투여하였다.

2.3.2.2. 2. 일반증상, 사망률 관찰과 혈액학적 검사

에테르를 이용하여 흡인 마취를 시키고 tail vein에서 혈액 0.5 ml을 일주간격으로

채취 하였다. 채취 전에 10 μ l 헤파린을 eppendorf tube에 담아 혈액과 섞이게 하였
고 complete blood counting (CBC) 전까지는 얼음에서 보관하였고, 모두 3시간 이
내에 측정하였다. CBC검사는 캘러스 투여 하루 전, 당일, 그리고 일주일 간격으로
3주까지 일주간격으로 자동혈구분석기(HEMAVET HV-950FS, USA)를 이용하여 백혈
구수(WBC,white blood cell count), 호중구수(NEUT, neutrophil count), 림프구수
(LYMPH, lymphocyte count), 단핵구수(MONO, monocyte count), 호산구수(EOSIN,
eosinophil count), 호염기구수(BASO, basophil count), 적혈구수(RBC, red blood
cell count), 혈색소농도(HGB, hemoglobin concentration), 적혈구용적(HCT,
hematocrit), 평균적혈구용적(MCV, mean corpuscular volume), 평균적혈구혈색소량
(MCH, mean corpuscular hemoglobin), 평균적혈구혈색소농도(MCHC, mean
corpuscular hemoglobin concentration), 적혈구분포폭(RDW, redcell distribution
width), 혈소판수(PLT, plate count)를 측정하였다. 또한, 투여개시 전과, 투여 당일,
그 후 일주일 간격으로 체중을 측정하였으며 CO₂ 흡인하여 마취시킨 후, 회복하여
복대동맥을 절단하여 방혈 치사 시켰다. 희생 후엔 심장, 간, 허파를 떼어내어 무게
를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 조직배양

3.1.1. 잎 조직배양

배양 결과 전체적으로 1 μM 2,4-D와 BA 혼합 처리한 배지가 단독 성장조절제를 첨가한 배지보다 훨씬 더 빠른 캘러스 성장을 나타냈다. 성장 조절제를 첨가한 배지에 잎 절편체를 치상한 후, 빛 조건과 관계없이 4 ~ 5일 후부터 상처 부위가 비대하기 시작하면서 캘러스가 형성되었다. 비대한 절편체는 시간이 경과함에 따라 배발생 캘러스(Type A), 황색의 쉽게 부서지는 캘러스(Type B), 녹색의 쉽게 부서지는 캘러스(Type C), 녹색의 밀집형 캘러스(Type D) 등 주로 4가지 형태의 캘러스로 유도되었다(Table 2). 이러한 형태의 캘러스 형성률은 품종에 따라 차이가 있었는데, 자미, 보라미, 무안 5호의 잎 절편체를 0 ~ 100 μM 2,4-D와 0 ~ 50 μM BA를 혼합 처리한 MS 배지 상에서 4주간 배양한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 캘러스 생장이 가장 높은 조건은 1 μM 2,4-D와 0.5 ~ 50 μM BA 혼합 처리구였다.

성장조절제 농도에 따른 캘러스 형태는 1 μM 2,4-D 단독 처리 조건과, 1 μM 2,4-D와 저농도의 BA 혼합 처리구에서 Type A형의 캘러스가, 1 μM 2,4-D와 0.5 μM BA 혼합 처리구에서 Type B형의 캘러스가 주로 형성되었다. 1 ~ 10 μM 2,4-D와

5 μM BA 혼합 처리 구에서는 Type C형의 캘러스가, BA가 단독 첨가된 조건과 2,4-D에 50 μM BA가 첨가된 조건에서는 Type D형의 캘러스가 주로 형성되었다. 배양 4주 경과 시 Type B, C, D형의 캘러스 성장이 Type A형의 캘러스의 2배 정도의 성장을 나타냈다. 1 μM 2,4-D 단독처리시 자미와 보라미에서 안토시아닌 생합성 캘러스가 유도되었다(Figure 1A). 그러나, 무안 5호에서는 유도되지 않았다. 보라미 잎 조직으로부터 유도된 안토시아닌 생합성캘러스는 BA가 첨가되거나 2,4-D가 농도가 높아질 경우 안토시아닌 생합성은 감소하였다. 자미 잎 조직으로부터 유도된 안토시아닌 생합성 캘러스는 매우 낮은 빈도로 형성되었다. 저농도의 2,4-D 단독처리가 자미와 보라미의 잎 조직으로부터 안토시아닌 생합성 캘러스를 유도하여 정확한 2,4-D의 농도를 찾기 위해, 0.5, 1, 1.5 μM 2,4-D를 첨가한 조건으로 동일 실험을 실행한 결과 0.5 μM 2,4-D 첨가 조건에서 가장 높은 안토시아닌 생합성 캘러스 유도율을 나타냈다. 유도된 안토시아닌 생합성 캘러스의 유지 및 증식을 위해 1 μM 2,4-D에 0.5 ~ 50 μM BA 첨가 배지로 계대배양 한 결과 안토시아닌 생합성의 캘러스의 정도는 감소하였다. 결과적으로, 자색고구마의 안토시아닌 생합성 캘러스의 유도 시에는 초기 배양에 사용된 자색고구마의 품종, 성장조절제 종류, 성장조절제의 농도 선택이 중요할 뿐만 아니라 안토시아닌 생합성을 유지 증식시키기 위해서는 계대배양으로 배양이 지속될 수 있는 배양조건 조성이 요구되었다.

계대배양 하지 않을 경우, 배양 6주 후부터는 부분적 갈변이 진행되어 8주째에

50 %가 괴사하였다. 따라서, 캘러스의 유지와 증식을 위해서는 최소 6주 이내에 계대배양이 요구되어 초기배양 4주 후에 동일조건으로 계대배양 하였다. 이때, 초기배양에서 유도된 안토시아닌 생합성 캘러스는 안토시아닌 생합성능을 잃었다. 2,4-D와 BA를 첨가한 조직배양과 동일한 농도 혼합으로 NAA와 BA 및 Kinetin 조합 조성으로 안토시아닌 생합성 캘러스를 계대배양 한 실험에서 안토시아닌 생합성은 유지되지 못해 안토시아닌을 기내 생산하여 상업적으로 이용하기에는 부적절한 캘러스로 판단되었다.

Table 1. Effect of plant growth regulators on the callus formation from leaf disk

cultures of purple sweet potato after 4 weeks of culture.

		<u>Jami</u>	<u>Borami</u>	<u>Muan 5</u>
0 μ M 2, 4 - D	0 μ M <u>BA</u>	-	-	0 \pm 0
	0.5 μ M <u>BA</u>	40 \pm 5	35 \pm 5	50 \pm 5
	5 μ M <u>BA</u>	70\pm10	93\pm10	50 \pm 5
	50 μ M <u>BA</u>	80\pm5	35 \pm 5	15 \pm 5
1 μ M 2, 4 - D	0 μ M <u>BA</u>	80\pm5	<u>30\pm5</u>	80\pm10
	0.5 μ M <u>BA</u>	98\pm5	90\pm5	90\pm15
	5 μ M <u>BA</u>	90\pm5	95\pm5	95\pm10
	50 μ M <u>BA</u>	70 \pm 5	90\pm10	40 \pm 5
10 μ M 2, 4 - D	0 μ M <u>BA</u>	5 \pm 0	-	0 \pm 0
	0.5 μ M <u>BA</u>	30 \pm 5	40 \pm 5	25 \pm 5
	5 μ M <u>BA</u>	70 \pm 10	60 \pm 5	30 \pm 5
	50 μ M <u>BA</u>	45 \pm 10	-	0 \pm 5
100 μ M 2, 4 - D	0 μ M <u>BA</u>	-	-	-
	0.5 μ M <u>BA</u>	-	-	-
	5 μ M <u>BA</u>	-	-	-
	50 μ M <u>BA</u>	-	-	-

(bold ; good response of callus formation, underline ; anthocyanin-biosynthesis callus)

3.1.2. 괴근 조직배양

자색고구마 괴근 절편체를 0 ~ 100 μM 2,4-D와 0 ~ 50 μM BA를 혼합 처리한 배지에 치상하여 암, 광 조건에서 4주간 배양한 결과, 잎 조직배양과 유사하게 절편체를 치상한 4일 후부터 조직의 확장이 관찰되었으며, 캘러스 형성이 시작되었다. 배양 4주 후에 1 μM 2,4-D 첨가조건에서 무안 4호의 괴근으로부터 안토시아닌 생합성 캘러스가 형성되었지만(Figure 1B), 잎 조직배양에서와 같이 여러 계대배양으로 안토시아닌 생합성능을 유지 할 수 없었다.

3.1.3. 안토시아닌 생합성 습관성캘러스 유도

자미와 보라미의 잎과 무안 5호의 괴근 조직배양에서 공통적으로 저 농도의 2,4-D 단독 첨가 조건에서 안토시아닌 생합성 캘러스가 유도되어 안토시아닌 생합성 캘러스의 형성률이 최대가 되는 2,4-D 농도를 조사한 결과 자미의 잎 조직에서는 1 μM 2,4-D 첨가조건에 4주간 약광 조건에서 배양하여 자색캘러스 J1D(table 3 참조)를 32.7% 유도하였고, 보라미 잎 조직을 0.5 μM 2,4-D에서 4주간 약광조건에서 배양하여 자색캘러스 BL0.5D(table 3 참조)를 91.3% 유도하였으며, 무안 5호의 괴근을 1 μM 2,4-D를 첨가배지에서 4주간 암 조건 배양하여 자색캘러스 MST1D(table 3 참조)를 27.9%를 유도하였다. J1D와 BL0.5D는 습기가 있는 부스러지기 쉬운 형태로 잎맥과 상처부위에서 주로 자색캘러스가 형성되었으며(Figure 1A), 괴근으로부터 유도한 MST1D 또한 부스러지기 쉬운 형태로 유도되었다(Figure 1B). J1D, BL0.5D 그리고 MST1D는 4주간 배양 하여 생체중이 약 2배 증가하여 타 연구자들이 보고한 안토시아닌 생합성 세포주에 비교하여 낮은 성장량을 나타내었다 (Konczak *et al.* 2004). 이들로부터 세포집합체 클론방법을 통해 MS 기본배지에서 성장조절제의 첨가 없이 무한생장이 가능한 습관성캘러스를 J1D로부터 0.1%의 Jami habituated callus (JHC) (Figure 1C),

MST1D로부터 0.02%의 Muan 5 habituated callus (MHC) (Figure 1D)를 선발하였다(Table 2). 유도된 습관성캘러스는 성장조절제 첨가 없이 무한 증식이 가능하였고 JL1D와 MST1D의 성장량의 5 ~ 10배 이상이었으며, 특히 MHC는 자색의 캘러스였고 이로부터 다시 세포집합체 클론법으로 성장속도를 유지하면서 색소생합성 능이 양호한 MPHHC를 선발하였다(Figure 2C). 이러한 습관성캘러스는 자색고구마의 다른 품종과 다른 성장조절제의 조합에서는 유도되지 않았다. 이와 같은 결과는 식물의 유전자형, 세포와 조직의 발달단계 등이 습관성캘러스 형성을 결정할 뿐 아니라(Meins and Foster 1985) 습관성 유도 및 증식에 초기배양의 성장조절제의 선택과 농도가 중요함을 시사한다.

식물기내배양 과정에서 캘러스의 형성은 옥신과 싸이토키닌의 적절한 조합을 통해 유도되고 성장한다. 그러나 지속된 계대배양시 성장조절제의 첨가 없이 세포분열을 지속할 수 있는 배양 즉, 성장조절제를 외부에서 공급하지 않아도 성장 가능한 경우가 있다. 이와 같이 성장조절제의 첨가 없이도 증식이 가능 하도록 변화된 것을 습관성(habituatation) 이라고 한다(Fox 1963). 이러한, 습관성은 DNA 변형과정에서 일어나는 다양한 DNA methylation 수준에서의 변화로(Koukalova *et al.* 2005), 일반캘러스와 비교하여 cytokinin-inducible genes, cytokinin synthase의 발현은 감소되고 cytokine oxidase, cytokine receptor CRE1의 발현이 증가하여, 일반적인 캘러스보다 성장이 우수한 것으로 보고 되었다(Pischke *et al.* 2006).

식물의 유용대사산물을 기내에서 대량생산이 상업성을 가지기 위해서는 무엇보다 생장이 빠르게 이루어져야 하고 안정적인 증식이 가능하여야 한다. 식물세포배양의 목적은 성장조건, 계절과 같은 자연환경 영향을 받지 않고 유용한 대사산물을 생산하기 위해서이다. 그러나, 대사산물의 기내생산은 목적 대사산물이 모본식물이 자연에서 생산하는 양보다 적은 경우가 많거나, 또한 획득한 고생산성 세포주는 장기간의 계대배양에 의해 그 특성을 상실하게 하는 경우가 많아 재선발해야 한다는 문제점이 있다(Lee 1989). 이러한 생산성 문제와 세포주 재선발 문제를 해결하기 위한 연구가 꾸준히 진행되어 왔지만 세포주의 불안정은 여전히 식물의 유용한 이차대사산물의 기내생산의 걸림돌이 되고 있다. 자색고구마 조직배양을 통한 안토시아닌의 기내생산을 위해서도 우수한 세포주의 선발이 우선 해결되어야 할 과제였지만, 성장조절제 조합을 통한 잎과 괴근 조직배양으로 유도된 일반적인 캘러스에서는 매우 낮은 성장률을 나타냈다.

이러한 세포주의 성장과 생산성 문제를 해결하고자 *Agrobacterium*에 의한 종양 캘러스 및 hairy root 유도방법이 시도되고 있다. 형질전환시 삽입되는 T-DNA내에 옥신과 싸이토키닌 합성 관여 유전자가 존재하여 세포 내에 호르몬을 합성하기 때문에 외부 성장조절제의 첨가 없이도 지속적이고 높은 생장이 가능하다는 장점이 있다(Chilton et al. 1982). 하지만, 외래유전자의 도입은 안전성의 문제에서 자유로울 수 없다. 그러나, 본 연구에서 선발한 변이체인 습관성캘러스는 외래유전자의

도입에 따른 안전성 문제가 없고 종양세포처럼 정상세포에 비하여 증식속도가 빠르기 때문에 유용 2차대사산물의 기내생산에 유용한 세포주로 사용 될 것으로 기대한다. 또한, 암 조건으로 계대배양 할 경우 안토시아닌 생합성이 급격히 감소하며 광 조건에서의 생장의 50 ~ 70%로 감소하였다. MPHIC 다량의 장기보존을 위해서는 암 조건이 경제적인 것으로 판단되나, 안토시아닌 생합성 유도에는 광 조사가 필수적이었다.

식물에서 안토시아닌 함량은 유전적 요인이 크게 지배되지만, 광, 온도, 수분, 생장조절제 등 여러 가지 요인들이 영향을 미친다. 뿐만 아니라 질소(Bongue Bartelsman and Phillips 1995; Do and Cormier 1991) 및 인산의 결핍(Trull *et al.* 1997), 산성조건(Suzuki 1995), Methyl jasmonate (Franceschi and Grimes 1991), 상처(Ferreres *et al.* 1997), 병균의 감염(Dixon *et al.* 1994) 등은 안토시아닌의 함량을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 생장이 빠르고 안토시아닌 함량이 높은 MPHIC는 여러 배양조건을 조작하여 안토시아닌 함량을 최대화 시킬 수 있는 방법을 찾는다면 생산성 향상에 기여 할 수 있을 것으로 판단된다.

Table 2. Percentage of the formation of purple and habituated calli from purple sweetpotato.

cv ¹⁾	tissue	2,4-D	(lux)	PC ²⁾	HC ³⁾	Abb. ⁴⁾
jami	leaf	1 µM	3,000	32±7	0.1 ⁵⁾	JL1D
borami	leaf	0.5 µM	3,000	91±3	0.02	BL0.5D
muan 5	storage root	1 µM	0	27±9	0.02 ⁶⁾	MST1D

¹⁾; Data recorded on 12th day after culture, *****; JHC, *****; It was anthocyanin-biosynthesis habituated callus (MPHC) when were subcultured from dark to light, cv: cultivar, PC: purple callus formation, HC: habituated callus formation, Abb: an abbreviation

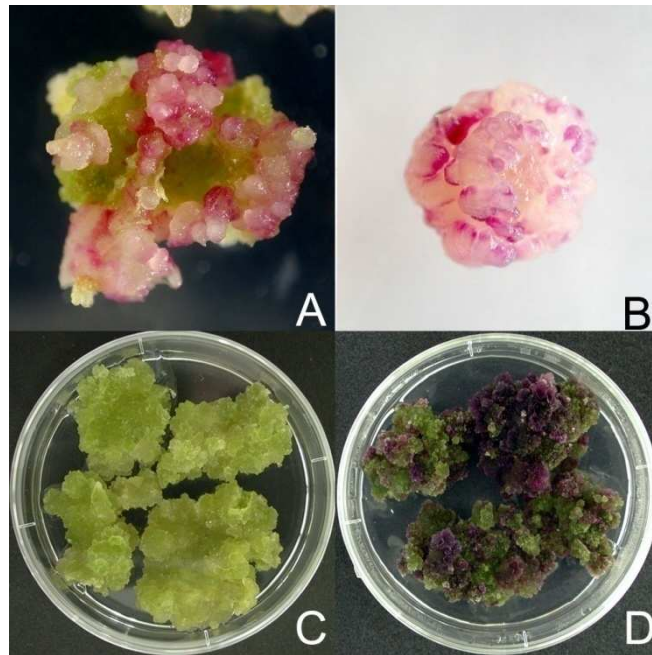


Figure 1. Morphological aspect of various purple calli after 4 weeks culture from purple sweetpotato.

(A) BL0.5D; (B) MST1D; (C) JHC; (D) MPH. Each callus was collected as described in the legend of Table 2.

3.1.4. 생장곡선

조직배양에서 안토시아닌 생합성이 가장 양호하였던 BL0.5D와 안토시아닌 습관성 캘러스인 MPHIC를 이용하여 각각의 유도조건과 동일조건으로 계대배양하여 캘러스의 생체중과 안토시아닌 함량을 비교한 결과는 Figure 2,3과 같다.

BL0.5D, MPHIC 모두 6일간의 잠복기를 거쳐, 12일과 24일 사이에 급격한 성장을 나타내고, 30일부터 생장이 감소하는 sigmoid 형을 보였다. 그러나, MPHIC는 6일간의 잠복기이후에 시작된 급속생장이 배양 30일 이후 다소 감소할 뿐 BL0.5D에 비교하여 감소폭이 작기 때문에 이후에도 생장은 지속될 것으로 예상된다.

생장조절제가 첨가되지 않은 MSBM에서 성장시킨 MPHIC는 BL0.5D에 비교하여 배양 6일 이후에 급격한 성장차이를 보여 배양 30일째에는 BL0.5D보다 평균 생체중은 5배 높은 7.3g의 높은 성장을 나타내었다. 이와 같은 결과는 자색고구마를 포함한 고구마의 기내배양에서 보고 된바 없는 가장 빠른 성장을 보이는 캘러스이다.

정지기에서 일반적으로 이차대사산물의 생성이 촉진되는 것과 달리 본 연구에서 선발한 BL0.5D와 MPHIC 안토시아닌 생합성은 잠복기에 속하는 배양 6일 후 최대를 나타낸 후, 감소하여 상호 반비례 관계를 나타내었다(Figure 2). 배양 6일째, 안토시아닌 색소함량은 BL0.5D는 괴근의 1/5수준이었으며 MPHIC는 1.2배 수준으로 나타났(Figure 3). 이러한 함량 비는 MPHIC가 성장하면서 생체중의 증가분에 비교하여 색소생합성부분이 줄어 들기 때문으로 판단된다.

기내배양에서 이차대사산물의 생합성량을 높이기 위해 일차적으로 배양세포의 영양생장률을 증가시킨 후, 배양환경을 조절하여 이차대사산물의 생합성량을 상승시키는 다단계 배양을 실험한다. 이러한 다단계 배양에서 우선적으로 해결 시 되어야 하는 것은 최적 시기에 배지를 교체해 주는 것이다. 본 실험의 결과로부터, 30일간 연속 배양하여 세포괴를 최대로 성장시킨 후, 동일조건으로 간단하게 배지만 교체 해준 후 6일 후 안토시아닌 생합성량을 향상시키거나, 대수증식 시기의 중기에 *L-Phenylalanine*를 첨가하여(Edahiro et al. 2005) 기내 안토시아닌 생합성량을 증가시킬수 있을 것으로 기대한다.

식물세포배양을 통한 기내유용물질 생산 연구에서는 우선적으로, 목적하는 물질을 다량 함유한 고생산 세포주가 선발되어야 한다. 이를 위해 보편적으로 성장속도가 빠른 현탁배양이 선호된다. 그러나, MPHIC는 보통의 현탁배양시에 보이는 성장속도 보다 우수하다. 본 연구에서 선발한 MPHIC 또한 현탁배양으로 더욱 높은 속도의 성장을 보일 것으로 기대한다. 그러나, 식물조직배양유래 유효물질의 안전성검사에서 현탁배양의 경우 배지성분의 안전성도 조사되어야 한다. 하지만, MPHIC는 고체배지에서 자라고 고체배지와 분리 가능하기 때문에 더 안전한 세포주일 것으로 사료된다.

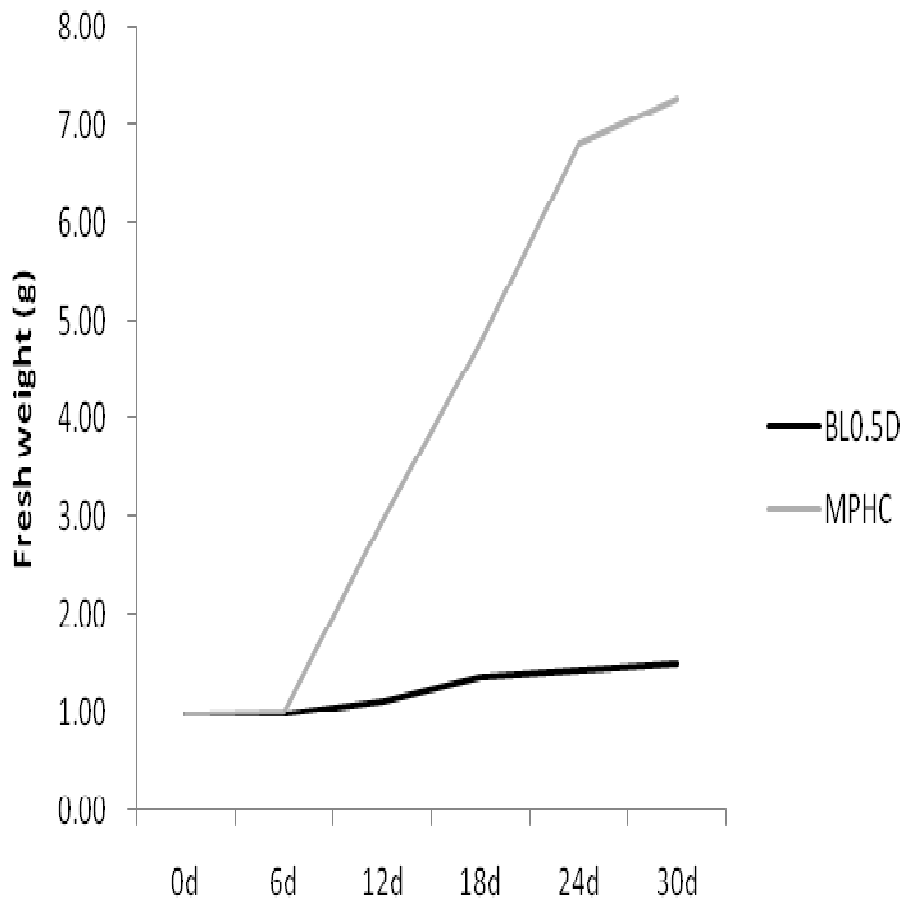


Figure 2. Growth curve of BL0.5D and MPHc.

One gram fresh callus was cultured on each medium containing 0.5 μ M 2,4-D MS (BL0.5D) and MS basal medium (MPHC) for 30 days under 24-h photoperiod provided by white fluorescent light. (d; day)

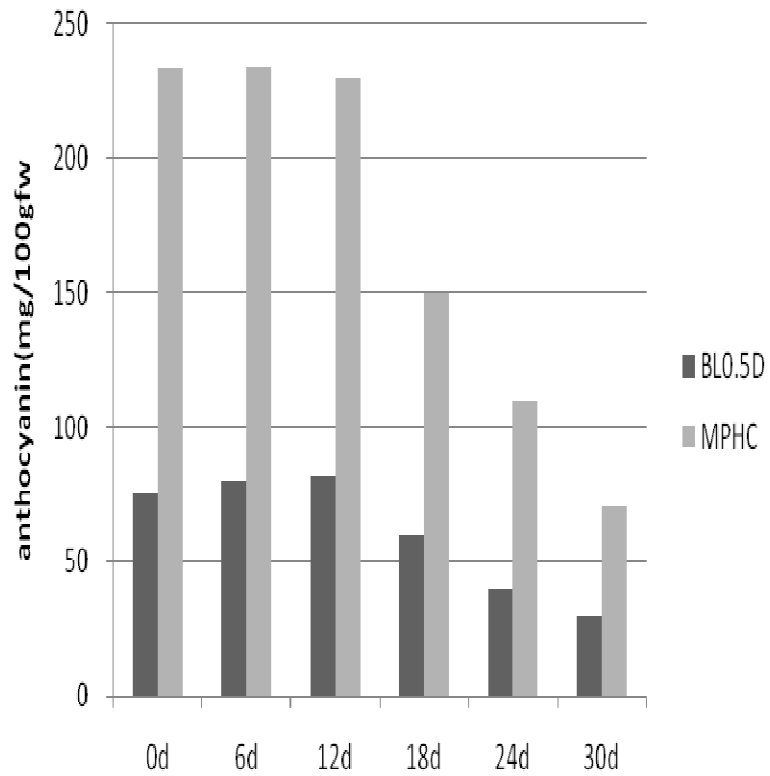


Figure 3. Anthocyanin accumulation in BL0.5D and MPHC.

One gram fresh callus was cultured on each medium containing 0.5 μ M 2,4-D MS (BL0.5D) and MS basal medium (MPHC) for 30 days under 24-h photoperiod provided by white fluorescent light. (d; day)

3.2. 현탁배양

3.2.1. 현탁배양세포주의 선발

안토시아닌 고생합성 습관성세포괴의 성장형태와 안토시아닌 생합성량 조사는 MSBM 10 ml의 배지에 0.1 g의 캘러스를 접종한 후, 3일 간격으로 측정하며 계대배양 없이 30일간 배양한 결과, 12일간의 잠복기를 거쳐, 12 ~ 30일 까지 급격한 logarithm 성장을 나타내었다. 30일 이후에는 세포괴 생장이 감소하는 전형적인 sigmoid 성장양상을 나타내었으며 정지기에서 일반적으로 이차대사산물의 생성이 촉진되는 것과 달리 본 연구에서 선발한 자색 습관성세포괴의 안토시아닌 생합성은 잠복기에 속하는 배양 6일 후 최대를 나타낸 후 감소하여 상호 반비례 관계를 나타내었다(Figure 4). 배양 6일째, 안토시아닌 색소는 조직배양의 재료로 사용되었던 동일 괴근의 2/3 정도의 수준으로 나타났(Figure 4). 실험실에서 선발한 안토시아닌 고함유 습관성세포괴는 우선적으로 성장조절제를 첨가하지 않는 배지에서 생체중의 경우 19배까지 증가하는 탁월한 성장률을 나타냈으며, 안토시아닌 생합성량 또한 4배 증가하는 결과를 나타냈다. 기내배양에서 이차대사산물의 생합성량을 높이기 위한 방법으로 일차적으로 배양세포의 영양성장률을 증가시킨 후, 배양환경을 조절하여 이차대사산물의 생합성량을 높이는 다단계 배양을 한다. 이러한 다단계 배양에서 우선적으로 해결 시 되어야 하는 것은 최적 시기에 배지를 교체해 주는 것이다. 본

실험의 결과에서 나타나는 것은 30일간 연속 배양하여 세포괴를 최대로 성장시킨 후, 동일조건으로 간단하게 배지만 교체 해준 후 6일 후에 안토시아닌 생합성량을 향상시킬수 있는 가능성을 나타내고 있다. Edahiro (2005) 등에 의하면 대수성장시기에 *L-Phenylalanine*을 첨가하여 기내 안토시아닌 생합성량을 증가시킬수 있다고 보고하고 있어 동일한 실험의 시도가 요구된다. 안토시아닌 생합성 전사인자들의 발굴(Park et al. 2004), signaling network의 규명(Vitrac et al. 2000)과 더불어 본 연구에서 선발한 습관성캘러스의 안토시아닌 색소의 성분 및 특성 연구, 안정화 방안이 연구된다면 안토시아닌 기내대량 생산연구에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

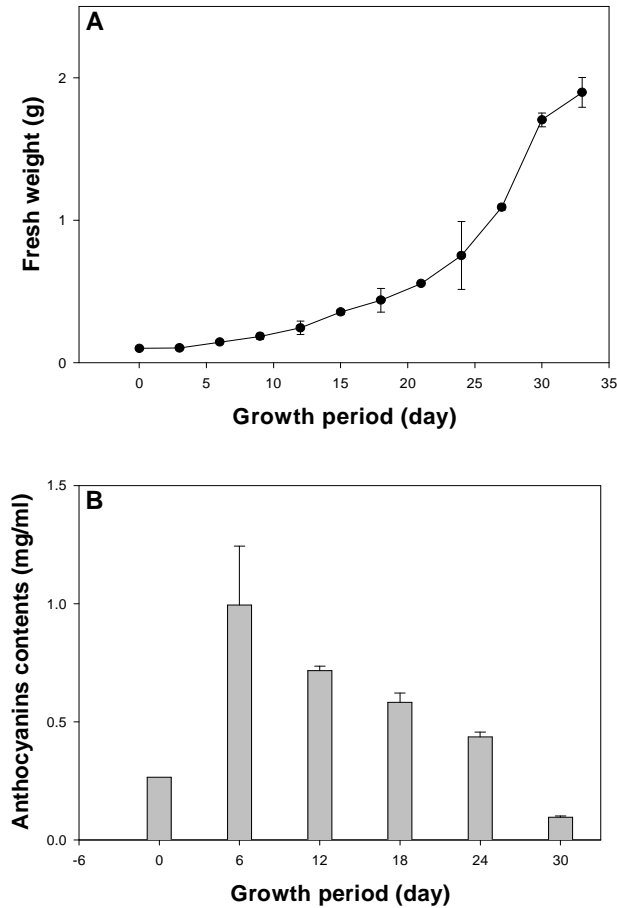


Figure 4. Growth pattern of an anthocyanin producing habituated cell aggregates in suspension culture.

(A) Growth curve for habituated cell aggregates (B) Anthocyanin accumulation in habituated cell aggregates during a growth cycle. Callus was proliferated in 50 ml Erlenmeyer flasks containing 10 ml MS hormone free medium and 0.1g callus on a gyratory shaker (120 rpm, 26°C, dark conditions). Data represent the means of four replicates and the vertical bars are standard deviation of replicates.

3.2.2. 생장조절제의 효과

식물세포배양으로부터 생산되는 이차대사산물은 배양환경의 변화에 의한 자극으로 생산이 촉진되는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 식물세포의 이차대사산물 생산성에 영향을 미치는 여러 성장조절제의 처리에 따른 자색 습관성켈러스의 생장을 및 색소 생합성능을 조사한 결과는 Table 3과 같다.

2,4-D (1, 5, 10 μ M)를 첨가한 결과, 1 μ M 처리시에 생장률과 안토시아닌 생합성이 각각 대조구의 32~42%, 66~70%로 나타내어 자색 습관성켈러스의 생장과 안토시아닌 생합성능 모두 감소시켰다. 그러나, 5 μ M 이상 처리 구에서는 culture 일주일 내에 모두 괴사하였다. 이는 2,4-D를 고농도 처리시 제초제 효과로 독성이 존재하기 때문에 생장에는 오히려 저해 효과를 갖는 것으로 사료된다.

BA는 phenylalanine ammonia lyase 1, chalcone synthase, chalcone isomerase, 그리고 dihydroflavonol reductase 의 mRNA 수준의 발현을 증가시켜 안토시아닌 생합성을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Deikman and Hammer 1995). 자색 습관성 켈러스에서도 BA첨가에 의해 안토시아닌 생합성이 증가되는 것으로 나타났는데, 최적농도는 5 μ M로 조사되었고 그 이하나 이상의 농도에서는 다소 감소하였다. 한편, 자색 습관성켈러스의 생장은 배양 12일 경과 시 50 μ M에서 가장 높게 나타났으나 배양 30일 경과 시에는 5 μ M에서 가장 높게 나타났다. Kinetin의 경우 자색 습관성 켈러스의 생장과 색소생합성능에 미치는 영향이 배양초기나 후기에 미미한 정도로

나타났으며, ABA의 경우는 배양 초기와 후기에 걸쳐 생장을 촉진시키나 색소생합성 능에 있어서는 큰 변화가 나타나지 않았다. Jasmonic acid는 세포내 신호전달 물질로 상처나, elicitor, 병원균에 감염 시 유전자발현이 활성화 되는 것으로 알려져 있고 콩의 껍질에서 광 조사로 안토시아닌이 축적될 때 작용하는 것으로 보고되었다 (Creelman and Mullet 1995; Franceschi and Grimes 1991). 본 연구에서는, 배양 초기에 색소생합성을 크게 촉진시킬 뿐만 아니라 생장을 저하도 나타나지 않았다. 대부분의 경우 빛의 강도, 빛의 파장, 현탁속도, 배양온도, 순환 가스의 질 등이 생장과 안토시아닌 생합성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 따라서, 자색 습관성캘러스의 생장과 안토시아닌 생합성을 극대화 하기 위해서는 배지의 구성성분 조합에 관한 조사뿐만 아니라 culture의 환경조건의 올바른 확립이 요구된다.

자색 습관성캘러스의 최적 배양 조건을 조사한 결과는 2,4-D 혹은 BA는 자색 습관성캘러스의 생장과 안토시아닌 생합성을 억제하며, ABA는 생장률을 증가시키고 jasmonic acid는 안토시아닌 생합성량을 증가시켰다. 분광광도계를 이용한 정량분석에서는 자색고구마 자미 괴근의 안토시아닌 함량은 생체중 0.3 g당 1.3 mg/ml 함유되어 있는 것으로 조사되었고, 자색 습관성캘러스는 1.1 mg/ml 가량 함유되어 있는 것으로 나타났다.

돌연변이를 유발하는 방법 혹은 선발제(selective agent)를 이용한 방법 역시 목적 물질 생합성을 증가시키는 방법으로 이용되었다(Rhodes *et al.*, 1988). 선발제를 이용

한 방법은 대량의 세포 클론을 환경적인 스트레스나 독성 억제제에 노출시키고 이에 살아남은 세포만을 선발하는 것이다. Phenylalanine과 유사한 p-Fluorohpenlylalanine (PFP)는 페놀류를 고생산하는 세포주 선발에 널리 이용되고 (Berlin et al. 1982), 고추와 *Anchusa*의 PFP 저항성 세포주는 capsaicin과 rosmarinic acid를 다량 함유한 것으로 밝혀진 바 있다(Salgado-Garciglia and Ochoa-Alejo 1990). 기타 다른 선발제로는 5-methyltryptophna, glyphosate, biotin 등이 있으며, 향후 본 연구의 계속적인 추가연구로 요구된다.

Table 3. Effect of various growth regulators on the growth and anthocyanins biosynthesis of PHC.

Growth regulators	(μM)	Fresh weight (g/flask)		Anthocyanins contents (mg/100fwg)	
		12 days	30 days	12 days	30 days
con		0.282 \pm 0.116	1.241 \pm 0.162	189	90
2,4-D	1	0.090 \pm 0.152	0.829 \pm 0.154	50	35
BA	0.5	0.151 \pm 0.022	1.136 \pm 0.340	195	80
	5	0.293 \pm 0.034	1.389 \pm 0.012	200	72
	50	0.322 \pm 0.153	1.339 \pm 0.183	220	124
Kinetin	5	0.258 \pm 0.127	1.213 \pm 0.028	150	44
	50	0.089 \pm 0.013	0.068 \pm 0.003	113	30
ABA	5	0.487 \pm 0.232	1.904 \pm 0.183	180	41
	10	0.550 \pm 0.485	1.549 \pm 0.170	140	25
	20	0.633 \pm 0.307	1.562 \pm 0.031	165	60
Jasmonic acid	5	0.304 \pm 0.004	1.328 \pm 0.078	380	120
	10	0.210 \pm 0.025	1.412 \pm 0.025	320	135
	20	0.303 \pm 0.035	1.278 \pm 0.154	324	125

Callus was proliferated in 50 ml Erlenmeyer flasks containing 10 ml and 0.1g callus on a gyratory shaker (120 rpm, 26°C, dark conditions). Data represent the means of four replicates and the vertical bars are standard deviation of replicates.

3.3. 생리활성분석

3.3.1. 항산화 성분분석

3.3.1.1. 페놀성 물질 총함량

페놀성 화합물은 생체 내에서 다양한 생리 활성을 나타내는 것으로 알려지면서 천연물로부터 항산화 물질을 추출 하려는 연구가 여러 분야에서 시도되고 있다(Kang *et al.* 2002). 고구마의 페놀계화합물은 caffeic acid와 quinic acid의 에스테르 결합 형태인 chlorogenic acid, isochlorogenic acid 등이 다량 함유되어 있고, 이들 성분들이 항산화 활성을 보이는 것으로 보고되었다 (Hayase and Kato 1984; Konczak-Islam *et al.* 2003). 이러한 자색고구마로 부터 선발한 안토시아닌 고함유 캘러스의 생리활성물질 중 페놀성 물질을 조사한 결과, 자색고구마(cv. *Jami*) 괴근, BL0.5D와 MPHIC의 총 페놀 함량을 조사한 결과 자미괴근 2.65 g/100fwg, BL0.5D 2.1 g/100fwg, MPHIC 2.57 g/100fwg으로 자미에서 가장 높게 나타났으나 MPHIC가 유사한 수준으로 조사되었다(Table 4).

천연산물의 항산화의 성분은 대부분이 polyphenol이나 phenolic acid 등에 기인되며 이들 phenol compound는 ROS 제거 기능 등의 항산화 효과 및 금속과

chelating 효과가 있어 암과 심혈관 질환에 밀접한 관계가 있다. Polyphenol은 색소의 형성, 병에 대한 저항, 발아 등에 작용하며 천연색소나 천연보존제, 향생제, 항염증제, 그리고 ROS를 제거하는 항산화제 등으로 사용되는 등 그 상업적 가치가 크다. Polyphenol류는 플라보노이드 형태구조를 갖는 것이 많으며 이들 구조에 따라 항산화능은 차이를 나타내게 된다.

BL0.5D와 MPHIC는 각각 보라미의 잎과 무안 5호 괴근의 한 개의 절편체로부터 유도된 캘러스이지만 여러 종류의 세포들이 혼재되어 있을 가능성이 있다. 원형질체 배양을 통한 안토시아닌 고함유 단세포를 선발하여 배양하거나 low melting agarose gel상에서 단세포 성장을 유도한 후 상기 생리활성물질이 높은 세포주를 선발한다면 본 실험에서 조사된 함량과 활성도에 비해 더욱 높은 세포주를 선발할 수 있을 것으로 기대한다. 특히 MPHIC는 BL0.5D 보다 높은 페놀성 물질을 함유하고 있고 생장도 빠르기 때문에 추후 이로부터 새로운 세포주를 선발할 수 있을 것으로도 기대된다. 이러한, 페놀성 화합물을 기내배양을 통해 얻고자 하는 연구는 인삼 육성계통으로부터 시도된 바 있지만 세포주의 조직배양으로 선발한 자색캘러스가 상업적 이용 가치를 갖기 위해서는 이러한 건강보호기능이 높아져야 한다고 판단된다. 식품재료의 총 페놀 함량은 대부분 분광광도법에 의해 정량 되어 왔는데, 실험방법과 표준물질 및 추출방법에 따라 분석치의 차이가 크다고 보고되었다(Whang *et al.* 2001). MPHIC의 식품첨가물로 이용가능성 검토를 위해서는 좀 더 다양한 추출방법으로 총

페놀 함량의 분석이 요구된다.

Table 4. Total phenolic content of storage root and pigmented callus from purple sweetpotato.

	Phenol contents¹⁾ (g/100fwg)
JSR	2.65
BL0.5D	2.10
MPHC	2.57

1) Total phenol contents based on a standard curve generated by caffeic acid.

JSR; storage root of cv. Jami, BL0.5D and MPHC; refer to table 3.

3.3.1.2. 총 플라보노이드 함량

자색고구마(cv. *Jami*) 괴근, BL0.5D와 MPHIC의 총 플라보노이드 함량을 검토한 결과는 Table 5과 같다. 총 플라보노이드 함량은 자미괴근 28 mg/100fwg, BL0.5D 18.9 mg/100fwg, MPHIC 35 mg/100fwg으로 MPHIC에서 가장 높게 나타났다.

3.3.1.3. 안토시아닌 함량

자색고구마(cv. *Jami*) 괴근, BL0.5D와 MPHIC의 총 페놀, 총 플라보노이드 및 총 안토시아닌 함량을 검토한 결과는 Table 6과 같다. 총 플라보노이드 함량은 자미괴근 28 mg/100fwg, BL0.5D 18.9 mg/100fwg, MPHIC 35 mg/100fwg으로 MPHIC에서 가장 높게 나타났다. 총 안토시아닌 함량은 자미괴근 200 mg/100fwg, BL0.5D 80 mg/100fwg, MPHIC 230 mg/100fwg으로 MPHIC에서 가장 높게 나타났으며, 총 페놀 함량은 자미괴근 2.65 g/100fwg, BL0.5D 2.1 g/100fwg, MPHIC 2.57 g/100fwg으로 자미에서 가장 높게 나타났으나 MPHIC가 유사한 수준으로 조사되었다.

안토시아닌 함량은 MPHIC에서 가장 많이 함유되어 있었다. 포도의 과피에 비교하여 다소 낮은 함량이지만, 기내배양시 연중생산이 가능한 장점이 있고, 세포주의 생산속도가 안토시아닌의 기내생산 세포주에 비교하여 2배 이상 빠르기 때문에 생산이 효율적일 것이다.

Table 5. Contents of flavonoid.

	Flavonoid contents¹⁾ (mg/100fwg)
JSR	28
BL0.5D	18.9
MPHC	35

1) Total flavonoid contents based on a standard curve generated by myricetin.

JSR; storage root of cv. Jami, BL0.5D and MPHC; refer to table 3.

Table 6. Total anthocyanin contents of storage root and pigmented callus.

	Anthocyanins contents¹⁾ (mg/100fwg)
JSR	200
BL0.5D	80
MPHC	230

1) Total anthocyanin contents based on a standard curve generated by cyanidin-3-galactoside. JSR; storage root of cv. Jami, BL0.5D and MPHC; refer to

table 3.

3.3.1.4. 자색색소 aglycone 분석

식물의 안토시아닌을 가수분해 하면 cyaniding, pelargonidin, delphinidin, peonidin, petunidin, malvidine 등의 anthocyanidin이 생성된다 (우원식 1997). 자미괴근과 MPHIC의 안토시아닌을 비교한 결과, 괴근의 경우 cyanidin이 7.1 ppm/g, peonidin이 2.15 ppm/g이 함유되어 있고 MPHIC는 cyanidin이 검출되지 않았으며, 10.5 ppm/g이, peonidin이 1.05 ppm/g으로 분석되었다. MPHIC가 자색고구마 괴근보다 높은 cyanidin 함유량을 나타냈다. 식물의 유용한 2차대사물질은 대부분 모식물의 특정 기관에 존재하고 세포 분화와 관련된 것이 많이 미분화 캘러스에는 축적되지 않는 경우가 많은데, 이는 분화된 식물과 미분화 세포의 생합성경로의 활성에 차이에서 기인한 것으로 보고되고 있다. 이런 경우 캘러스를 분화배지에 옮겨 분화를 유도한 후 기관배양을 목적으로 하는 2차 대사산물을 생산하는 경우도 있다(고려인상진세노사이드). 본 연구에서 자색고구마 괴근과는 다소 다른 함량비를 지닌 MPHIC를 이용하고 배양환경 조절과 생명공학 기술을 도입하여 대사기능을 조절하여 조절함으로써, 미생물처럼 고효율의 배양은 어려우나 MPHIC에만 존재하는 많은 유용물질의 생산이 가능할 것으로 기대된다.

3.3.1.5. 항산화 활성 측정

DPPH 라디칼 소거능은 MPHIC가 76%, 자미 괴근이 71%, 그리고 BL0.5D가 48%를 나타냈다(Table 7). 조직배양으로 유도된 캘러스의 항산화활성에 관한 연구는 국내외적으로 활발하지는 않다. 국내에서는 쪽파로부터 유도된 캘러스가 모본식물체의 구근과 잎 조직에 비교하여 높은 항산화 활성을 가지는 것으로 보고 된바 있으며(Ryu and Song 2004) , 캘러스의 항산화 활성이 식물생장조절제에 따라 증감이 가능한 것으로 보고되었다(Song *et al.* 2002). 본 연구에서 선발된 BL0.5D와 MPHIC 또한 배양조건을 적절히 조절함으로써 항산화능의 증가는 가능할 것으로 기대되며 나아가 천연 무공해 항산화물질로 이용이 가능할 것으로 본다.

Table 7. DPPH radical scavenging activity of EtOH of BL0.5D and MPHC.

	Antioxidant activity¹⁾(%)
JSR	71
BL0.5D	48
MPHC	76

Values are mean of triplications. ¹⁾Antioxidant activity (%) expressed as $100 \times$ difference of absorbance between reactant of extracts and control with DPPH solution. JSR; storage root of cv. Jami, BL0.5D and MPHC; refer to table 1.

3.3.1.6. 추출용매에 따른 MPHIC의 항산화능

MPHC의 항산화능을 크게 하는 용매의 선정을 위해 극성이 다른 7종의 추출용매를 사용하여 항산화능을 비교하였다(Table 8). 추출용매에 따른 항산화능은 에탄올과 메탄올에서 높은 항산화 활성을 보였고, 다음에 hexane, ethylacetate, distilled water 순이며, chloroform을 사용하였을 경우는 항산화능이 거의 없었다. 이는, 자색고구마 자미의 추출용매에 따른 항산화능 비교 보고와 동일한 순서이나 전체적으로 자색고구마에 비교하여 다소 낮은 항산화능을 나타내었다(Lee *et al.* 1999). 이와 같은 결과는 김 등이 보고한 자색고구마의 추출용매에 따른 항산화능 비교연구에서 자색고구마인 자미의 항산화능이 가장 높은 결과에 조금 낮지만, 이는 항산화능에 가장 큰 영향을 미칠 것으로 예상되는 안토시아닌의 함량 차에서 기인된 결과일 것으로 사료된다. 이는 배양조건을 조절하여 안토시아닌 등의 함량을 조절함으로써 항산화능의 증대가 가능할 것으로 사료된다. 따라서 MPHIC의 항산화능을 높이기 위한 배양조건 규명으로 생장조절제 처리에 따른 안토시아닌 함량과 항산화능 정도를 조사하였으며, 이후의 항산화능 검사에는 항산화활성이 높은 추출용매이면서 인체에 해가 없는 에탄올을 사용하였다.

Table 8. Scavenging activity of extracts of MPHC against DPPH radical.

Extraction solvents	MPHC
Hexane	30
Chloroform	2
Ethyl acetate	25
Ethanol	78
Methanol	75
Distilled water	10

Antioxidant activity (%) was expressed as $100 \times$ difference of absorbance between reactant of extracts and control with DPPH solution.

3.3.1.7. 다양한 에탄올 농도별 MPHC 추출물의 항균효과

다양한 에탄올 농도별 MPHC 추출물을 이용하여 증식저지환의 유무로 그 활성을 검색한 결과는 table 9과 같다. 5% 에탄올에서 추출물은 0.4 cm, 10%-0.42cm, 20%-0.45 cm, 40%-0.6 cm, 60%-0.9 cm, 80%-0.92 cm의 clear zone을 나타내었다. 즉 농도가 증가할수록 항균활성이 증가하였고, 60 ~ 80% 에탄올 농도가 효과적이었고 60% 이상에서는 큰 차이가 없었다.

모든 고구마가 효모와 곰팡이에 대해 항균성을 나타내지는 않으며, 주로 박테리아에 대한 항균성이 보고되었다. 품종 별로는 자색과 황색 고구마가 일반 고구마에 비교하여 특히 항균활성이 높다고 보고되었고(Lee *et al.* 1999), 이와 같은 이유로 유색고구마의 저장성이 높은 것으로 밝혀지고 있다. 천연색소성분의 항균성은 잘 알려져 있는데, 한국산 감귤 과피에서 분리한 naringin과 narigenin이 각각 그람 양성균과 음성균 대해(Han and You 1988), cranberry를 에탄올로 추출한 flavonoid과 proanthocyanin류 물질이 *Saccharomyces bayanus*와 *Pseudomonas fluorescens*에 대해 항균효과가 보고되어 식물추출물의 항균효과는 이미 잘 알려져 있다. 또한, 식물유래 캘러스, 현탁배양체의 crude extract (Sokmen *et al.* 1999) 의 항균효과가 밝혀진바 있어 식물조직배양유래 캘러스의 항균효과를 뒷받침 해준다.

Table 9. Antibacterial activities of ethanol extracts of MPHIC.

Ethanol (% v/v)	Clear zone (cm)
5	0.41 ± 0.06
10	0.44 ± 0.01
20	0.47 ± 0.03
40	0.55 ± 0.17
60	0.86 ± 0.07

3.3.2. 안전성 평가

3.3.2.1. 단회투여 독성실험

3.3.2.1.1. 중간치사량(LD₅₀) 결정

검체를 백서에 1회 경구 투여에 의한 사망동물, 일반증상 및 해부학적 조직의 육안 관찰 시 특이한 독성학적 변화는 관찰되지 않았다(Table 10). 일반적으로 급성독성시험의 경우 사망 예가 관찰되지 않을 경우에는 최고 용량을 5000 mg/kg까지 투여하여 시험을 실시하나 MPH에 대한 경구 투여 시 본 실험의 경우 시험물질의 양적 부족으로 인해 최고 용량을 2000 mg/kg까지 투여하여도 사망 예를 관찰 할 수 없어 본 시험물질의 경구 투여 시 중간치사량은(LD₅₀)은 2000 mg/kg 이상으로 산출하였다. 또한 시험 전기간 동안 경구 투여 시 시험물질에서 기인된 것으로 판단되는 이상 소견은 발견되지 않았다.

3.3.2.1.2. 체중변화와 부검소견

대조군과 실험군에서 지속적인 체중증가 추세를 보였다. 부검소견부검 결과 모든 생존동물에서 본 시험물질투여와 관련된 어떠한 육안 병변도 관찰되지

않았다(Figure 5). 단회투여독성시험결과, 본 시험조건하에서 사망동물은 관찰되지 않았으며 시험물질과 연관된 특기할만한 일반증상, 체중변화 및 부검 시 육안적 소견이 관찰되지 않았기 때문에 LD₅₀치는 2000 mg/kg이상일 것으로 판단되며, 켈러스는 rat에 있어서 단기 급성경구독성이나 부작용을 유발하지 않는 소재로 평가되었다.

Table 10. Mortality and clinical signs of SD male rat treated with MPHIC

Dose (mg/kg B.W)	Final mortality	Clinical signs
0	0/5	-
2000	0/5	-

Values expressed as number of dead animals/total number of animals. -; no clinical signs

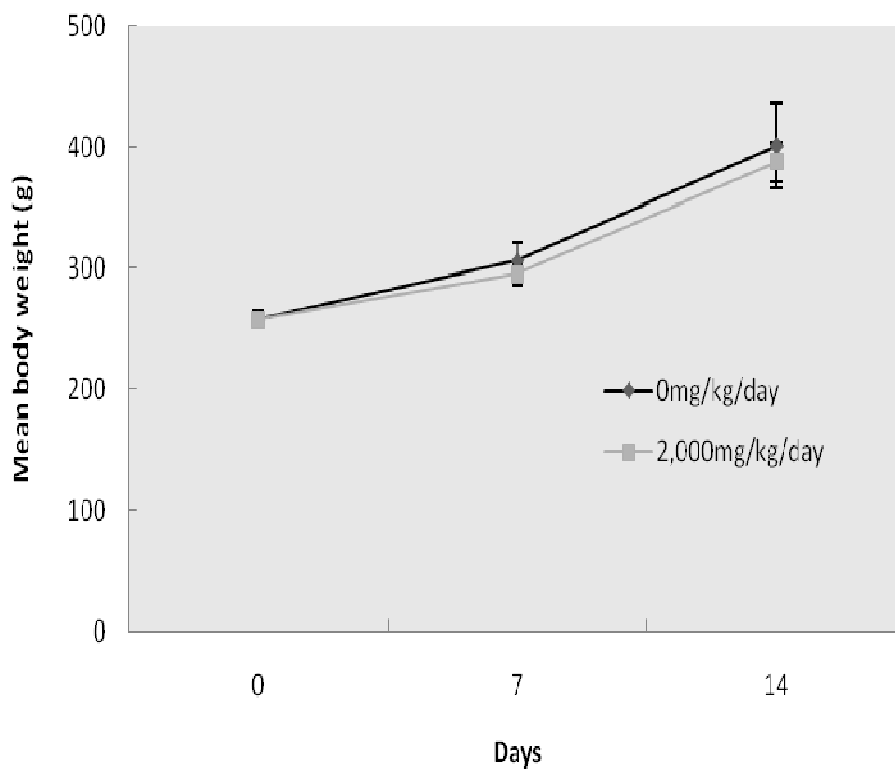


Figure 5. Body weight changes in SD rats for 2 weeks after single oral administration with MPHC powder.

3.3.2.2. 3주 반복투여 독성시험

3.3.2.2.1. 일반증상 및 사망률

시험 전기간 동안 시험물질 투여로 인한 특이할 만한 일반 증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다. 3주 반복투여독성시험결과, 모든 시험 군에서 시험기간 동안 시험물질로 인한 일반증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다(Table 11). 체중의 변화는 지속적인 증가 추세를 보였으며 통계학적으로 유의한 차이는 보이지 않았고 혈액학적 검사에서 모든 투여군에서 정상범위의 수치를 보였다(Figure 6, Table 13). 이상의(단회, 3주연속독성) 시험결과로 보아 본 시험조건하에서 습관성캘러스는 rat에 대한 무해용량(no observed adverse effect level, NOAEL)은 500 mg/kg/day 이하인 것으로 추측된다.

안정성 검사에서 제조공정상 식물세포, 미생물 등을 배양하기 위하여 사용되는 배지성분의 제한은 없다. 그러나, 배지 성분 중 식품원료 또는 식품첨가물로 인정되지 않은 원료가 포함되어 있다면 그 원료가 최종 기능성 원료에 잔류하지 않음을 입증하는 자료가 안전성 평가에 포함되어야 한다. 그러나 본 실험에서 선발한 MPHc는 안전성 논란이 있는 성장조절제가 전혀 첨가되지 않은 MSBM에서 무한 증식하는 세포주로 고체배지에서 배양되어, 간편하게 배지로부터 분리되어

안전성문제에서 더욱 자유롭다.

Table 11. Mortality and clinical signs in SD rats about single oral administration after 3 weeks with callus extract

Dose (mg/kg B.W)	Final mortality	Clinical signs
0	0/4	–
2000	0/4	–

Values are expressed as number of dead animals/total number of animals

–; no clinical signs

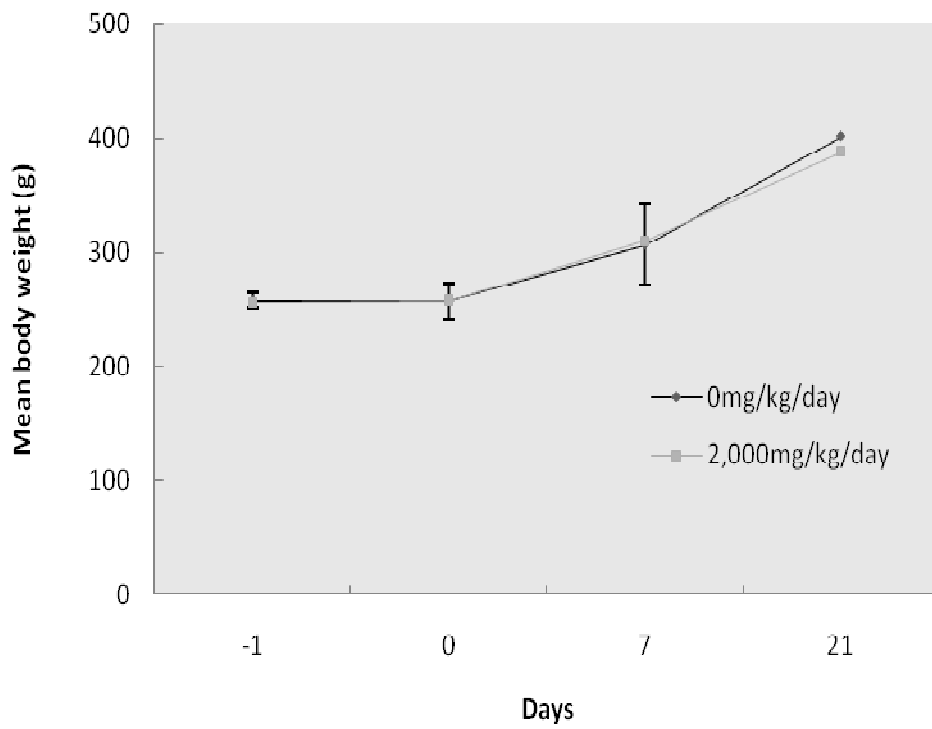


Figure 6. Body weight changes in SD rats administered orally with callus for 3 weeks.

3.3.2.2.2. 혈액학적 검사

MPHC에 대한 안전성 평가의 일환으로 21일간 반복투여시에 나타날 수 있는 독성의 검토하고자 rat에 21일간 반복경구 독성시험을 의약품 등의 독성시험기준에 준하여 수행하였다. SD rat 수컷에 시험물질 2000mg/kg의 용량으로 주 7회 3주간 투여한 결과 시험 물질 투여군은 대조군에 비해 시험 물질 투여후의 혈액학적 검사에서 시험 물질 투여에 의한 유의성 있는 변화는 보이지 않았다(Table 12). 이상의 결과는 종합해 보면, 본 연구를 통하여, MPHC가 급성독성을 유도하지 않음을 알 수 있었다.

Table 12. Hematological values in SD rats administered orally with MPHC powder for

4 weeks.

		control	crude extract Tx
WBC(103/cu mm)	(-)1d	17.0 ± 4.5	17.1 ± 5.7
	0d	19.5 ± 5.9	19.2 ± 2.3
	7d	18.2 ± 9.2	13.9 ± 3.6
	21d	19.7 ± 5.1	16.4 ± 6.1
RBC(106/cu mm)	(-)1d	7.20 ± 0.2	7.6 ± 0.5
	0d	6.90 ± 0.1	7.2 ± 0.5
	7d	7.10 ± 0.3	7.2 ± 0.3
	21d	7.90 ± 0.4	8.1 ± 0.3
Hgb (g/dL)	(-)1d	15.0 ± 0.3	15.0 ± 0.6
	0d	14.2 ± 0.2	14.0 ± 0.5
	7d	14.7 ± 0.2	14.3 ± 0.6
	21d	15.9 ± 0.4	15.2 ± 0.3
PLT(x 109/l)	(-)1d	196.0 ± 21.0	307.5 ± 41.4
	0d	167.0 ± 7.3	179.0 ± 32.1
	7d	223.3 ± 38.1	211.0 ± 18.6
	21d	230.0 ± 47.1	236.0 ± 58.2
Lymph (%)	(-)1d	37.5 ± 13.0	51.8 ± 11.7
	0d	52.5 ± 13.5	46.0 ± 1.0
	7d	48.4 ± 19.6	57.0 ± 12.6
	21d	42.3 ± 8.4	54.5 ± 13.5

4. 적요

자색고구마의 잎과 괴근 조직에서 유도된 배양캘러스로부터 향산화 물질 고품유 세포주를 선발했다. 저농도의 2,4-D 첨가 조건으로 안토시아닌 생합성 캘러스를 유도하였고, 이로부터 옥신과 싸이토키닌에 습관성을 나타내고 안토시아닌을 생합성하는 MPHIC 을 선발하였다. MPHIC 의 안토시아닌 함량은 230mg/100fwg 로써 괴근 조직보다 조금 높게 나타났으며, 향산화 활성은 자미보다 5% 상승한 76%를 나타냈다. 향산화 활성의 차이는 안토시아닌 함량과 플라보노이드 함량차이에서 나타나는 것으로 추측되며, MPHIC 의 경우 MS 기본배지에 배양한 결과 ABA 를 첨가 시 4 주 후 생체중의 9 배 높은 생장률을 나타냈고, Jasmonic acid 의 첨가는 안토시아닌 함량을 2 배 증가하였다. MPHIC 는 항균효과를 가지며, 안전성시험에서 급성경구 독성 및 부장용을 유발하지 않는 소재로 판단되어 향산화효능을 가지는 식품의 천연착색료로 안전하게 사용이 가능할 것으로 기대된다.

5. 참고문헌

- 류수노 (2000) 연구논문/재배식물에 함유된 천연색소 안토시아닌의 최근 연구 1. 벼, 보리, 밀, 옥수수 및 두류. 한국국제농업개발학회지 12: 41-53
- 우원식 (1997) 천연물화학연구법. 서울: 서울대학교출판부
- Akhmadieva A, Zaichkina SI, Ruzieva R, Ganassi EE (1993) [The protective action of a natural preparation of anthocyan (pelargonidin-3,5-diglucoside)]. Radiobiologiya 33: 433-435
- Berlin J, Knobloch KH, H?fle G, Wilte L (1982) Biochemical Characterization of Two Tobacco Cell Lines With Different Levels of Cinnamoyl Putrescines. Journal of Natural Products 45: 83-87
- Beuchat LR, Golden DA (1989) Antimicrobials occurring naturally in foods. Food Technol 43: 134-142
- Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181: 199-1200
- Bongue Bartelsman M, Phillips DA (1995) Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes in the flavonoid biosynthetic pathway of tomato [anthocyan]. Plant Physiology and Biochemistry 33: 539-546
- Cevallos-Casals BA, Cisneros-Zevallos L (2003) Stoichiometric and kinetic studies of phenolic antioxidants from Andean purple corn and red-fleshed sweetpotato. Journal of agricultural and food chemistry 51: 3313-3319

- Chilton MD, Tepfer DA, Petit A, David C, Casse-Delbart F, Tempe J (1982) *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature* 295: 432–434
- Cho MH, Bae EK, Ha SD, Park JY (2005) Application of natural antimicrobials to food industry. *Food Sci Ins* 38: 36–45
- Colantuoni A, Bertuglia S, Magistretti MJ, Donato L (1991) Effects of *Vaccinium Myrtillus* anthocyanosides on arterial vasomotion. *Arzneimittelforschung* 41: 905–909
- Creelman RA, Mullet JE (1995) Jasmonic Acid Distribution and Action in Plants: Regulation During Development and Response to Biotic and Abiotic Stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 4114–4119
- Decendit A, Meorillon JM (1996) Condensed tannin and anthocyanin production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports* 15: 762–765
- Deikman J, Hammer PE (1995) Induction of Anthocyanin Accumulation by Cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *Am Soc Plant Biol*, pp 47–57
- Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ (1994) Early Events in the Activation of Plant Defense Responses. *Annual Reviews in Phytopathology* 32: 479–501
- Do CB, Cormier F (1991) Effect of low nitrate and high sugar concentration on the accumulation of anthocyanins in grape (*Vitis cinifera* L.) cell suspensions. *Plant Cell Rep* 9: 500–504
- Dodds JH, Merzdorf C, Zambrano V, Sigeeas C, Jaynes J (1991) Potential use of *Agrobacterium*-mediated gene transfer to confer insect resistance in sweet potato. *Sweetpotato pest management: a global perspective*, Richard K.

- Jansson, Kandukuri V. Raman, eds, West view Press, Oxford, UK: 203–219
- Eda-hiro J, Nakamura M, Seki M, Furusaki S (2005) Enhanced accumulation of anthocyanin in cultured strawberry cells by repetitive feeding of L-phenylalanine into the medium. *J Biosci Bioeng* 99: 43–47
- Ferreres F, Gil MI, Castañer M, Tomás-Barberán FA (1997) Phenolic Metabolites in Red Pigmented Lettuce (*Lactuca sativa*). Changes with Minimal Processing and Cold Storage. *Journal of agricultural and food chemistry* 45: 4249–4254
- Folin O, Denis W (1915) A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine *Journal of Biological Chemistry* 22: 305–308
- Fox JE (1963) Growth factor requirements and chromosome number in tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 16: 793–803
- Franceschi VR, Grimes HD (1991) Induction of Soybean Vegetative Storage Proteins and Anthocyanins by Low-Level Atmospheric Methyl Jasmonate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 6745–6749
- Gulcin I, Berashvili D, Gepdiremen A (2005) Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla panchinensis* decne. *Journal of ethnopharmacology* 101: 287–293
- Han SS, You IJ (1988) Studies on antimicrobial activities and safety of natural naringin in Korea. *Korean Journal of Mycology (Korea R.)* 16: 33–40
- Hayase F, Kato H (1984) Antioxidative components of sweet potatoes. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 30: 37–46
- Islam MS, Yoshimoto M, Yamakawa O (2003) Distribution and Physiological Functions of Caffeoylquinic Acid Derivatives in Leaves of Sweetpotato

- Genotypes. *Journal of Food Science* 68: 111–116
- Jimenez–Escrig A, Goni CI (1999) Nutritional evaluation and physiological effects of edible seaweeds. *Arch Latinoam Nutr* 49: 114–120
- Kamei H, Kojima T, Hasegawa M, Koide T, Umeda T, Yukawa T, Terabe K (1995) Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro. *Cancer Invest* 13: 590–594
- Kang MH, Choi CS, Kim ZS, Chung HK, Min KS, Park CG, Park HW (2002) Antioxidative Activities of Ethanol Extract Prepared from Leaves, Seed, Branch and Aerial Part of *Crotalaria sessiflora* L. *Korean journal of food of food science and technology* 34: 1098–1102
- Kim HY, Lee YJ, Kim SH, Hong KH, Kwon YK, Lee JY, Ha SC, Cho HY, Chang IS, Lee CW (1999) Studies on the Development of Natural Preservatives from Natural Products. *Korean journal of food of food science and technology* 31: 1667–1678
- Kim J, Lee J, Yoon W, Oh D, Jung Y, Lee WJ, Park S (2006) Antioxidative and Antimicrobial Activities of *Euphorbia jolkini* Extracts. *KOREAN JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY* 38: 699
- Konczak–Islam I, Yoshimoto M, Hou DX, Terahara N, Yamakawa O (2003) Potential Chemopreventive Properties of Anthocyanin–Rich Aqueous Extracts from In Vitro Produced Tissue of Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.). *Journal of agricultural and food chemistry* 51: 5916–5922
- Konczak I, Okuno S, Yoshimoto M, Yamakawa O (2004) Caffeoylquinic Acids Generated In Vitro in a High–Anthocyanin–Accumulating Sweet potato Cell

- Line. J Biomed Biotechnol 2004: 287–292
- Koukalova B, Fojtova M, Lim KY, Fulnecek J, Leitch AR, Kovarik A (2005) Dedifferentiation of tobacco cells is associated with ribosomal RNA gene hypomethylation, increased transcription, and chromatin alterations. *Plant Physiol* 139: 275–286
- Lee HH, Kang SG, Rhim JW (1999) Characteristics of Antioxidative and Antimicrobial Activities of Various Cultivars of Sweet Potato. *Korean journal of food of food science and technology* 31: 1090–1095
- Lee HJ (1989) Production of natural products by plant cell culture. '89 Agricultural Biotechnology Symposium 207–235
- Madhavi DL, Salunkhe DK (1995) Toxicological Aspects of Food Antioxidants. *Food science and technology–NEW YORK–MARCEL DEKKER–*: 267–360
- Meins FJ, Foster R (1985) Reversible, cell-heritable changes during the development of tobacco pith tissues. *Dev Biol* 108: 1–5
- Murashige T, Skoog F (1962) Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497
- Nishikimi M, Appaji N, Yagi K (1972) The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun* 46: 849–854
- Oak JH, Lee IK (2005) Taxonomy of the Genus *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae) from Korea I. Subgenus *Bactrophycus* Section *Teretia*. *ALGAE–INCHON–* 20: 77
- Obi FO, Usenu IA, Osayande JO (1998) Prevention of carbon tetrachloride–

induced hepatotoxicity in the rat by *H. rosasinensis* anthocyanin extract administered in ethanol. *Toxicology* 131: 93–98

Park HJ, Kim YS, Yong PH (2007) Selection of high anthocyanin-producing cells from habituated callus derived from purple sweetpotato. *J Plant Biotechnol* 34: 19–24

Park KI, Choi JD, Hoshino A, Morita Y, Iida S (2004) An intragenic tandem duplication in a transcriptional regulatory gene for anthocyanin biosynthesis confers pale-colored flowers and seeds with fine spots in *Ipomoea tricolor*. *Plant J* 38: 840–849

Park SK, Park JC (1994) Antimicrobial activity of extracts and coumaric acid isolated from *Artemisia princeps* var. *orientalis*. *Korean J Biotechnol Bioeng* 9: 506–511

Phuc BHN, Lindberg JE, Ogle B, Thomke S (2001) Determination of the nutritive value of tropical biomass products for monogastrics using rats. Part 1. Comparison of eight forage species at two levels of inclusion in relation to a casein diet. *Asian Aus. J. Anim. Sci* 14: 986–993

Pischke MS, Huttlin EL, Hegeman AD, Sussman MR (2006) A transcriptome-based characterization of habituation in plant tissue culture. *Plant Physiol* 140: 1255–1278

Ryu SH, Song WS (2004) Amino Acid Analysis and Antioxidation Activity in *Allium wakegi* Araki. *Korean Journal of Plant Resources* 17: 35–40

Sakanaka S, Juneja LR, Taniguchi M (2000) Antimicrobial effects of green tea polyphenols on thermophilic spore-forming bacteria. *Journal of Bioscience*

and Bioengineering 90: 81–85

Salgado–Garciglia R, Ochoa–Alejo N (1990) Increased capsaicin content in PFP–resistant cells of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports* 8: 617–620

Satue–Gracia MT, Heinonen M, Frankel EN (1997) Anthocyanins as Antioxidants on Human Low–Density Lipoprotein and Lecithin–Liposome Systems. *Journal of agricultural and food chemistry* 45: 3362–3367

Slinkard K, Singleton VL (1977) Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 28: 49–55

Sokmen A, Jones BM, Erturk M (1999) Antimicrobial activity of extracts from the cell cultures of some Turkish medicinal plants. *Phytother Res* 13: 355–357

Song WS, Chi HJ, Rim YS, Yoon JH (2002) Constituents Analysis of Amino Acid and Antioxidative Activity from Cultivated Callus and Rhizome in *Rhodiola sachalinensis*. *Plant Resources* 5: 78–85

Suzuki M (1995) Enhancement of anthocyanin accumulation by high osmotic stress and low pH in grape cells. *Vitis*: 152–155

Topisirovic L, Kojic M, Fira D, Golic N, Strahinic I, Lozo J (2006) Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 112: 230–235

Trull MC, Guiltinan MJ, Lynch JP, Deikman J (1997) The responses of wild–type and ABA mutant *Arabidopsis thaliana* plants to phosphorus starvation. *Plant, Cell & Environment* 20: 85–92

Vitrac X, Larronde F, Krisa S, Decendit A, Deffieux G, Merillon JM (2000) Sugar

sensing and Ca²⁺-calmodulin requirement in *Vitis vinifera* cells producing anthocyanins. *Phytochemistry* 53: 659–665

Wang H, Cao G, Prior RL (1997) Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins. *Journal of agricultural and food chemistry* 45: 304–309

Whang HJ, Han WS, Yoon KR (2001) Quantitative Analysis of Total Phenolic Content in Apple. *Analytical science and technology* 14: 377–383

Woolfe JA (1992) Sweet potato. Cambridge University Press. New York. USA.

저작물 이용 허락서

학 과	생물학과	학 번	20047332	과 정	박사
성 명	한글 박혜정 한문 朴慧貞 영문 Hye-Jeong Park				
주 소	전남 화순군 남면 사평리 61-1				
연락처	E-mail : plantlet@hanmail.net				
논문제목	한글 : 자색고구마(<i>Ipomoea batatas</i> L.)의 습관성캘러스로부터 유도된 안토시아닌 생합성 세포주에 관한 연구				
	영문 : Study on the anthocyanin-biosynthesis habituated callus derived from purple sweetpotato (<i>Ipomoea batatas</i> L.)				
<p>본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.</p> <p style="text-align: center;">- 다 음 -</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함. 2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함. 3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함. 4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함. 5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함. 6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음. 7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함. <p style="text-align: center;">동의여부 : 동의(<input checked="" type="checkbox"/>) 반대(<input type="checkbox"/>)</p> <p style="text-align: center;">2009년 2월</p> <p style="text-align: right;">저작자: 박혜정 (인)</p> <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">조선대학교 총장 귀하</p>					