

사탕무(*Beta vulgaris* L.)의 子葉鞘 培養에 의한 callus의 誘起, 赤色色素 및 蛋白質 含量的 變化

金賢勅 · 金度勳[†] · 鄭大守 · 朴賢鎭

東亞大學校 生命資源科學大學 農學科

Changes of Callus Induction, Betacyanins and Protein Contents from Cotyledons of Sugar Beet(*Beta vulgaris* L.)

Hyoun-Kyoung Kim, Doh-Hoon Kim[†], Dae-Soo Chung and Hyeon-Jin Park

Department of Agronomy, Dong-A University, Pusan, 604-714, Korea

Abstract

In order to produce betacyanins from sugar beet(*Beta vulgaris* L.) *in vitro*, callus induction, shoot formation, root formation, betacyanin contents and protein contents determined from callus which was induced cotyledons of sugar beet seedling under an addition of NAA and BAP on the MS medium. The results were summarized as follows : The combination 3.0mg/l NAA and 1.0mg/l BAP treatment showed the most high callus induction rate, betacyanin and protein contents. The combination NAA and BAP treatments were not shoot formation, but BAP treatments was high shoot formation. NAA treatments showed high root formation rate. But high concentrations of BAP have not shown root formation.

Key words : Sugar Beet, Betacyanins, callus induction, protein.

서 론

食品添加物로 사용하고 있는 일부 合成 色素의 人體에 대한 잠재적인 有害性 問題가 야기됨에 따라¹⁾ 植物이 生成하는 天然色素인 anthocyanin, shikonin 및 betacyanin 등을 植物의 細胞培養에서 얻고자 하는 시도가 활발히 이루어지고 있다^{2,3,4)}. 이는 일반적으로 植物로부터 人間과 밀접한 관련이 있는 香料, 色素, 호르몬 및 酵素 등의 物質은

植物體에서 직접 抽出하면 대체적으로 이들 物質의 含量이 낮으며, 또한 栽培條件 등의 기타 環境에 따라 生産量の 差異가 크므로 供給이 安定되지 않다. 따라서 이러한 成分의 多量生産을 위하여 植物組織培養을 이용한 有用物質의 生産에 관한 基礎的인 研究가 활발히 이루어지고 있다.

한편 사탕무(*Beta vulgaris* L.)는 주로 雪糖의 原料를 生産하기 위하여 栽培되어지고 있으며, 世界 雪糖 生産量の 약 40% 정도가 사탕무에서 生産된다. 사탕무는 地上부와

[†] Corresponding author

根部로 大別되며 全部를 利用할 수 있으며, 특히 根部는 溫湯으로 雪糖을 抽出하고 찌꺼기는 家畜의 飼料로 利用되어 지고 있으나, 食品色素로서의 利用은 낮은 편이다. 사탕무의 뿌리에서 抽出되는 주된 色素인 betalain은 빨간색의 betacyanin과 노란색의 betaxanthin의 두 범주로 區分이 되며⁵⁾, 특히 이들 色素는 化學적으로 合成된 人工色素에 비해 健康에 대한 安全性이 높으며, 비교적 熱處理가 약한 食品과 飲料인 요구르트, 아이스크림, 냉음료 및 젤라틴 디저트 등의 色素原으로 使用되어지고 있다⁶⁾.

사탕무에 대해서는 callus 誘導와 關聯하여 많은 研究가 遂行되어져 왔으나, 거의 大部分의 研究가 organogenesis와 somatic embryogenesis 및 再分化和 關聯한 研究가 重點의 으로 進行되어져 왔다^{7,8,9,10,11)}. 그러나 사탕무 callus내의 色素 形成과 含量 및 蛋白質 含量 등의 變化에 관한 研究는 미비한 실정이다.

따라서 本 研究는 사탕무의 子葉鞘를 利用하여 callus의 誘導 및 器官形成 정도를 究明하고, 이에 따른 赤色色素 및 蛋白質含量의 變化를 調査함으로써 赤色色素의 大量生産을 위한 사탕무의 機内 培養條件을 確立하기 위하여 實施하였다.

재료 및 방법

사탕무의 callus 誘導

사탕무 種子를 滅菌수로 1회 洗滌하고 70% ethanol로 30秒間 殺菌한 후 滅菌수로 헹구고, Tween 20을 1~2방울을 添加한 2% sodium hypochloride에 3時間 浸漬한 다음 滅菌수로 數回 水洗하여 24時間 浸漬한 후 다시 70% ethanol로 30秒間 殺菌하여 滅菌수로 헹구고, 다시 1% sodium hydrochloride에 30分間 浸漬하여 滅菌수로 數回 水洗한 후 濾過紙로 물기를 除去하여 MS培地¹²⁾에서 無菌發芽시켰다.

無菌發芽後 2 週동안 成長한 子葉鞘 部位를 0.5cm²의 길이로 잘라 植物生長調節劑인 NAA를 0, 1.0, 2.0 및 3.0 mg/l와 BAP는 0, 0.5, 1.0, 2.0 및 3.0mg/l로 混用하여 添加한 MS培地¹²⁾에 植상하여 25±1℃에서 4週間 培養하여 callus를 誘導시켰다. 이렇게 誘導된 callus를 4週마다 繼代培養하여 增殖시킨 후 赤色色素 및 蛋白質含量 測定에 利用하였다.

赤色色素 및 蛋白質含量의 측정

Betacyanin 含量의 測定은 生體試料 1g을 磨碎하여 100 ml의 50% methanol로 2회 抽出하여¹³⁾, 5℃ 冷藏庫內에서 濾過紙(Whatman No. 40)를 使用하여 濾過한 後 分光光度計(Hewlett Packard, 8452A)를 利用하여 537nm에서 吸光度를 測定하였으며, 赤色色素 含量은 다음의 식에 따라 計算하였다¹⁴⁾.

$$\text{Betacyanin content (\%)} = \frac{A \times V}{1120 \times W}$$

1120 : value for the maximum absorptivity of betan-
ine

A : maximum red absorption at 537nm

V : volume of the solution in ml

W : weight of the sample in gram

蛋白質 含量의 測定은 生體試料 2g을 液體窒素에 넣어 磨碎한 뒤 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.2)에 넣어 21,000×g에서 40分間 遠心分離하여 粗酵素液을 抽出하여, Bradford¹⁵⁾의 方法에 따라 蛋白質含量을 測定하였다.

결과 및 고찰

Callus의 形成

사탕무의 子葉鞘를 NAA와 BAP가 添加된 培地에서 4週間 培養한 후 callus의 形成率을 그림 1에서 살펴보면, BAP와 NAA가 添加되지 않은 培地에서는 callus의 形成率이 11%로 가장 낮게 나타났으며, NAA 單用處理區에서는 16.7%의 形成率을 나타냈으며, BAP 0.5, 1.0, 2.0 및 3.0 mg/l의 單用處理區에서는 각각 16.7, 33.3, 50.0 및 33.3%로 NAA 單用處理區에 비해 多少 높은 callus 形成率을 나타내었으나, NAA와 BAP 單用處理區가 混用處理區에 비해 낮은 callus의 形成率을 보여 callus의 形成에는 不適當한 것으로 觀察되었는데, Kang¹⁶⁾ 등은 사탕무 子葉部를 利用하여 SH培地에서 callus를 誘導할 때 NAA와 BAP 單用處理에서는 NAA 2.0mg/l處理에서만 46.2%의 callus의 形成率을 나타내고, 다른 濃度에서는 전혀 callus의 形成이 되지 않았다고 報告하여, 本 試驗의 結果와 類似하였다.

NAA와 BAP 混用處理區에서는 NAA의 濃도가 높을수록 平均 callus의 形成率도 높게 나타났으며, BAP의 경우 2.0 mg/ℓ의 濃度에서 平均 callus의 形成率이 79.23%로 가장 높게 나타났다. 그리고, NAA 3.0mg/ℓ와 BAP 1.0mg/ℓ의 混用處理區에서 callus 形成率이 100%로 가장 높게 나타났는데, Kang¹⁶⁾등의 報告에 의하면 사탕무의 경우 SH培地에서는 BAP의 濃도가 낮고 NAA의 濃도가 높은 組合條件에서 callus의 誘導가 좋게 나타났다고 報告하여, 本 試驗의 結果와 一致하였다.

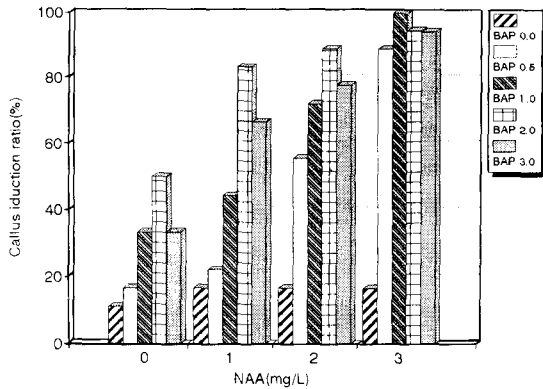


Fig. 1. Effect of NAA and BAP on the callus induction from cotyledon of sugar beet.

한편, 全般的으로 全處理區에서 callus의 狀態는 잘 부수어지고 성긴 組織의 callus를 形成하였는데 비해, BAP 1.0 mg/ℓ와 NAA 2.0mg/ℓ의 混用處理區에서는 切片의 切斷面에서 노란색의 特異한 callus가 形成되었다.(그림 2A)

Shoot 및 root의 再分化

子葉에서 由來된 callus로부터 再分化 培地에 植상하여 shoot의 分化 정도를 그림 3에서 살펴보면, NAA와 BAP 混用處理時에는 shoot의 分化가 전혀 나타나지 않았다. BAP를 單獨으로 使用한 경우에는 BAP 濃도가 2.0mg/ℓ까지는 濃도가 增加함에 따라 shoot의 分化率도 增加하였으나, BAP가 3.0mg/ℓ에서는 shoot의 分化가 되지 않았다.

특히, BAP 1.0mg/ℓ에서 發生한 shoot는 完全한 葉序 模樣으로 發達하였으며(그림 2B), BAP 2.0mg/ℓ에서는 매우 良好한 multifid shoot를 形成하였다.

Rooting의 形成 정도를 그림 2C와 그림 4에서 살펴보면,

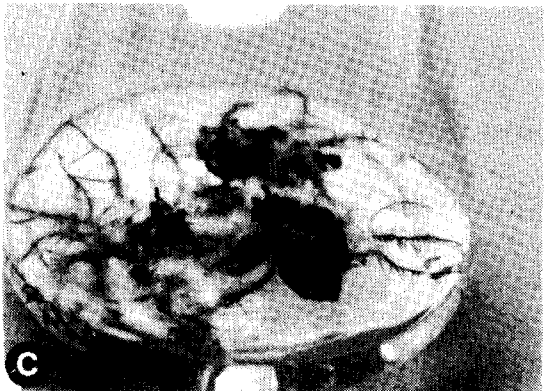
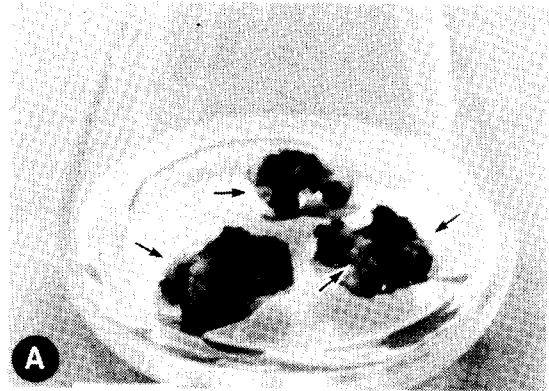


Fig. 2. Callus and yellow spot formation after incubated at 4 weeks on cotyledons of sugar beet (A). Shoot and root formation from cotyledons of sugar beet (B & C).

A : Combination 2.0mg/ℓ NAA and 1.0mg/ℓ BAP, B : 1.0 mg/m BAP, C : 1.0mg/ℓ NAA Arrow indicated in plate A shows a yellow spot callus.

NAA 1.0, 2.0 및 3.0mg/l 單用處理區에서는 94.4%, 94.4% 및 88.9%로 NAA의 濃度에 따라 큰 差異를 나타내지 않았으며, BAP는 濃度가 增加함에 따라 root의 分化가 현저히 낮아져 BAP 2.0mg/l 이상의 濃度에서는 NAA의 濃度가 增加하여도 root의 分化가 나타나지 않았다.

一般的으로 cytokinin류는 shoot의 分化를 促進하는 반면 뿌리의 形成을 抑制하고, auxin류는 이와 反對作用을 하는 것으로 알려져 있으며¹⁷⁾, Freytag¹⁸⁾등도 사탕무 shoot의 再分化를 위한 試驗에서 BAP의 適合度를 0.5mg/l에서 1.0 mg/l라고 하였으며, Lowell¹⁹⁾등은 사탕무의 root 形成에서 NAA를 1.0mg/l 添加하여 86%의 root 形成率을 보였다고 하였으며, Zhongxian²⁰⁾등은 3% sucrose를 包含한 1/2 SH 培地에 NAA 1.0mg/l 濃度에서 葉切片으로부터 70%의 root形成 結果를 얻었다고 報告 하였는데, 本 試驗의 結果도 이와 비슷하였다.

赤色色素 및 蛋白質含量의 變化

生長調整劑의 組合에 따른 callus내의 betacyanin의 含量 變化를 表 1에서 살펴보면, BAP의 處理 濃度에 따라서는 BAP 1.0mg/l에서 平均 1.9%로 가장 높았으며, NAA의 경우 NAA 無處理에서 平均 1.61%, NAA 1.0mg/l 處理에서 1.62%로 NAA 2.0 및 3.0mg/l 處理에서의 平均 1.14% 및 1.39%보다 높게 나타나 NAA의 處理 濃度가 낮을수록 多少 높은 色素含量을 나타내었다. 한편, BAP 1.0

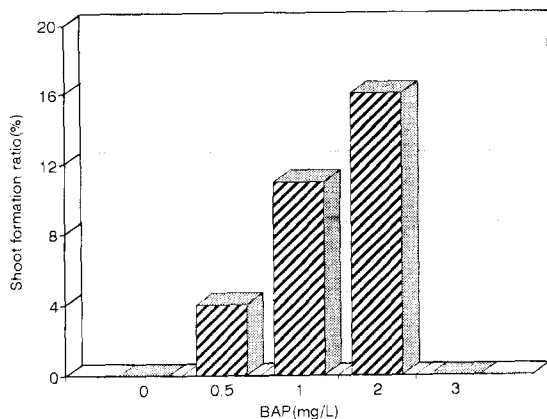


Fig. 3. Effect of BAP on the adventitious shoot formation from cotyledon derived calli in sugar beet.

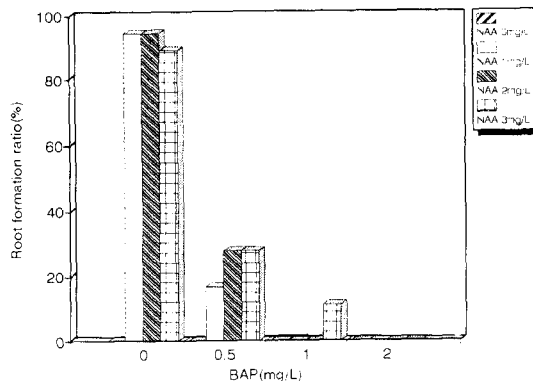


Fig. 4. Effect of NAA and BAP on the root formation from cotyledon derived calli in sugar beet.

Table 1. Accumulation of betacyanins(%) in cotyledon of sugar beet(*Beta vulgaris* L.) callus as affected by combination of NAA and BAP

NAA (mg/l)	BAP(mg/l)					mean
	0	0.5	1.0	2.0	3.0	
0	0.70	1.50	2.20	2.19	1.48	1.61
1.0	1.43	1.58	1.78	1.75	1.57	1.62
2.0	1.59	1.04	1.26	0.72	1.11	1.14
3.0	0.89	0.65	2.36	1.31	1.76	1.39
mean	1.15	1.19	1.90	1.49	1.48	

Table 2. The protein content(mg/g) in cotyledon of sugar beet(*Beta vulgaris* L.) callus as affected by combination of NAA and BAP

NAA (mg/l)	BAP(mg/l)					mean
	0	0.5	1.0	2.0	3.0	
0	32.78	42.69	31.02	38.41	36.08	36.20
1.0	12.46	25.68	53.63	39.53	43.97	35.05
2.0	16.63	29.74	40.83	48.35	37.44	34.60
3.0	13.87	19.06	50.12	30.04	32.18	29.18
mean	18.94	30.19	43.90	39.08	37.42	

mg/l, NAA 3.0mg/l의 濃度組合에서 betacyanin 含量이 2.36%로 가장 높은 含量을 보였는데, 이는 callus의 狀態가 比較的 良好한 경우에는 callus내의 酸素供給과 養分 및 植物 호르몬 등의 傳達이 빠르므로 callus가 赤色色素를 比較

的 많이 생성 또는 함유하는 것으로 생각된다.

生長調整劑의 組合에 따른 callus 내의 蛋白質 含量의 變化를 表 2에서 살펴보면, NAA의 處理의 경우 NAA의 濃度가 높아질수록 蛋白質 含量은 減少하였으며, 특히 NAA 1.0, 2.0, 및 3.0mg/ℓ 單用處理區에서는 12.46, 16.63 및 13.82 mg/g으로 상당히 낮은 蛋白質含量을 나타내었는데, Cho²¹⁾ 등의 報告에 의하면 莖낭콩의 不定根 形成過程에서 水溶性 蛋白質의 變化 樣相은 不定根 誘起 前段階에 비하여 不定根 形成段階로 접어들수록 蛋白質含量이 완만히 減少하였다고 하였는데, 이는 本 試驗의 結果와 一致하였다. BAP處理의 경우, BAP의 濃度가 1.0mg/ℓ의 處理까지는 蛋白質含量이 增加하였으나, BAP 2.0mg/ℓ부터 減少하였는데, 이는 callus로 부터 새로운 組織이나 器官의 分化가 일어날 때 細胞內에 蓄積된 貯藏物質이 유리아미노산으로 바뀌어져 利用되기 때문에 思考된다.

요 약

사당무(*Beta vulgaris* L.)내에 含有된 赤色色素인 betacyanin을 細胞培養으로 大量 生産하고자, 사당무의 子葉軸를 使用하여 生長調整劑인 NAA와 BAP가 添加된 MS培地에서 callus의 形成과 shoot 및 root의 分化 정도와 赤色色素 및 蛋白質含量을 測定하였다. 그 結果 NAA 3.0mg/ℓ와 BAP 1.0mg/ℓ 混用培地에서 가장 높은 callus의 形成率을 보였으며, 또한 赤色色素인 betacyanin 및 蛋白質含量도 가장 높게 나타났다. Shoot의 形成은 NAA와 BAP의 混用處理區에서는 전혀 나타나지 않았으며, BAP 單用處理區에서만 多數의 shoot가 形成되었다. 한편, NAA 單用處理區에서는 NAA의 處理濃度에 상관이 없이 root의 形成率이 높게 나타났으며, BAP의 濃度가 0.5mg/ℓ까지는 多少의 root가 形成되었으나, 그 以後의 高濃度에서는 전혀 root가 形成되지 않았다.

감사의 글

本 論文은 1996年度 東亞大學校 短期 海外派遣 研究支援에 의하여 수행된 研究 結果이며, 이에 感謝드립니다.

참 고 문 헌

1. Weller T. A., Lasure L. L. : Betalains in beet root tissue culture, *Journal of Food Science*, 47, 162(1981).
2. Fujita Y., Hara Y., Morimoto T. : Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. V. Differences in the production between callus and suspension culture, *Plant Cell Reports*, 6, 8(1987).
3. Hwang B., Ahn J. C., Park Y. W., Kang Y. H. : Production of anthocyanin by culture of hairy roots of *Raphanus sativus* cv. Chungpihongsim, *Korean J. Bot.*, 35(1), 37(1992).
4. Taya M., koji M., Masahiro K. O., Setsuji T., Takahito I. : Production and release of pigments by culture of transformed hairy root of red beet, *J. Fermentation and Bioengineering*, 73(1), 31(1992).
5. Girod D. A., Zryd J. P. : Secondary metabolism in cultured red beet (*Beta vulgaris* L.) cell : Differential regulation of betaxanthin and betacyanin biosynthesis, *Plant cell Tissue and Organ Culture*, 25, 1(1991).
6. Pasch J. H., von Elbe J. H., Sell R. J. : Betalains as colorants in dairy production, *J. Milk Food Technology*, 38(1), 25(1975).
7. Welander T. : Callus and root formation in explants of *Beta vulgaris*, *Physiol Plant*, 32, 305(1974).
8. Atanassov A. I. : Method for continuous bud formation in tissue cultures of sugar beet (*Beta vulgaris* L.), *Z. Pflanzenzuchtg*, 84, 23(1980).
9. Te'tu T., Sangwan R.S., Sangwan-Dorree B. S. : Hormonal control of organogenesis and somatic embryogenesis in *Beta vulgaris* callus, *J. Exp. Bot.*, 38, 506(1987).
10. Saunders J. W., Daub M. E. : Shoot regeneration from hormone autonomous callus from shoot cultures of several sugar beet (*Beta vulgaris* L.) genotypes, *Plant Sci.*, 34, 219(1984).
11. Saunders J. W., Shin K. : Germplasm and physiologic effects on induction of high-frequency hormone autonomous callus and subsequent shoot regeneration in sugar beet, *Crop Sci.*, 26(Nov.-Dec.), 1240, (1986).
12. Murashige T., Skoog F. : A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, *Physiol Plant*, 15, 473(1962).
13. Berlin, J., Sieg, S., Strack, D., Bokern, M., Harms, H. : Production of betalains by suspension cultures of *Chenopodium rubrum* L., *Plant Cell Tissue Organ Cul-*

- ture, 5, 163(1986).
14. Bradford, M. M. : A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem., 72, 248(1976).
 15. Knuthsen, P. : Investigations on beetroot colours for the purpose of regulation, Z. Lebensm Unters Forsch, 172, 195(1981).
 16. Kang Y. D., Oh H. I. : Effect of Plant Growth Regulators on the callus Induction from cotyledons of *Beta vulgaris* L. and Accumulation of Betacyanins, Korean J. Plant Tissue Culture, 20(4), 181(1993).
 17. Freytag A. H., Anand S. C., Rao-Arclli A. P. & Owens L. D. : An improved medium for adventitious shoot formation and callus induction in *Beta vulgaris* L. *in vitro*, Plant Cell Report, 7, 30(1988).
 18. Lowell D., Owens & Debra, R. Eberts : Sugarbeet leaf disc culture : an improved procedure for inducing morphogenesis, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 31, 195(1992).
 19. Zhongxian Zhong, Helen G. Smith & Tudor H. Thomas : *In vitro* culture of petiole and intact leaves of sugar beet (*Beta vulgaris* L.), Plant Growth Regulation 12, 59(1993).
 20. Cho D. Y., Chio P. S. & W. Y. Soh : A Comparison of Protein Pattern in Adventitious and Top Root Development of *Phaseolus vulgaris* L., Korean J. Plant Tissue Culture 23(3), 135(1993).