

자색고구마 습관성캘러스로부터 안토시아닌 고생합성 세포주 선발

박혜정¹, 김윤실¹, 박현용^{1*}
¹조선대학교 자연과학대학 생물학과

Selection of High Anthocyanin-Producing Cells from Habituated Callus Derived from Purple Sweetpotato

Hye-Jeong Park¹, Yoon-Sil Kim¹, and Hyeon-Yong Park^{1*}

¹Department of Biology, College of Natural Science, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

ABSTRACT Callus induction using leaf of purple sweetpotato (PSP) was decreased when subcultured. So we selected habituated callus in MS medium supplemented with 1 μ M 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) after 6 months of cultures (without subculture). It grew faster and easier than any other callus. It was able to proliferate in MS hormone free solid and liquid medium without any growth regulators and subculture limits. During subculture in liquid medium, a purple mottled spot formed in one of habituated cell aggregates without any treatment. This purple cell aggregates were carefully separated from habituated cell aggregates, and then subcultured by selecting purple cell aggregates for more than 2 years to be isolated. The color value of the pigment extracted of culture was 1.0 mg/mL, which was close to that of a pigment extracted from storage root, which was 1.5 mg/mL. This purple cell aggregates could therefore be used for the industrial mass production of anthocyanin.

서 론

안토시아닌은 식물의 꽃, 과일, 잎 그리고 괴근 등에 분포하는 플라보노이드계 색소로 음식, 음료수 등에 첨가되는 천연식용색소로 널리 사용되고 있으며 (Francis 1989), 최근에는 항산화 (Montoro et al. 2006), 항암 (Chen et al. 2005), 간 보호 (Tsuda et al. 1999), 그리고 심혈관계 질환에 효과가 (Kim et al. 2006) 보고 되면서 건강보조 식품으로써 잠재적 수요가 높아지고 있다. 식물의 전통적인 노지재배에 의한 안토시아닌 공급은 인건비의 지속적인 상승과, 긴 재배기간, 그리고 자연재해 등의 영향으로 거래가는 지속적으로 상승되고 있다. 이에, 안토시아닌을 식물조직배양을 기반으로 대량생산 하려는 연구가 시도되고 있다 (Meyer et al. 2002).

표피 뿐 아니라 육질전체에 자색을 띠는 자색고구마는 안토시아닌 함량이 생체중의 약 2~3% 내외로 포도의 5~7배 많은 안토시아닌을 함유하고 있고 (Bridle and Timber-

lake 1997), 기내배양에서 안토시아닌 생합성이 자색 괴근과 유사한 수준에 이르는 것으로 보고되면서 안토시아닌 기내대량생산을 위한 조직배양 재료로 각광 받고 있다 (Konczak-Islam et al. 2000). 그러나, 당근과 포도 등에서도 시도된 바 있는 안토시아닌 기내생산에 관한 연구는 상업적으로 실용화 된 바는 없다 (Decendid and Mérillon 1996). 그 이유는 기내배양과정에서 일어나는 다양한 somaclonal variation, 긴 계대배양주기, 배양과정에서 생합성능 상실, 그리고 세포주의 증식능 한계와 불안정이 주된 원인으로 지적되고 있다. 따라서, 안토시아닌 기내대량생산을 위해서는 고생합성능을 유지하면서 빠르고, 안정적으로 지속생장이 가능한 세포주의 선발이 우선 요구된다.

식물기내배양 과정에서 캘러스의 형성은 옥신과 사이토키닌의 적절한 조합을 통해 유도되고 성장한다. 그러나 지속된 계대배양시 성장조절제의 첨가 없이 세포분열을 지속할 수 있는 배양 즉, exogenous requirement를 상실하는 경우가 있다. 이와 같이 성장조절제의 첨가 없이도 증식이 가능한 heritable change를 습관성 (habituation) 이라고 한다 (Fox

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

E-mail: hypark@chosun.ac.kr

1963). 이러한 습관성은 DNA modification 과정에서 일어나는 다양한 DNA methylation 수준에서의 변화로 (Koukalova et al. 2005), 비습관성캘러스와 비교하여 cytokinin-inducible genes, cytokinin synthase의 발현은 감소되고 cytokine oxidase, cytokine receptor CRE1의 발현이 증가하여, 성장조절제를 첨가하여 생육시킨 캘러스 보다도 성장량이 높게 나타나게 한다 (Pischke et al. 2006).

본 연구에서는, 이러한 습관성캘러스의 왕성한 생육 특성을 이차대사산물의 기내생산을 위한 세포주에 이용 가능하다면 대량생산에 효과적인 세포주로 사용될 수 있을 것으로 기대하여, 아직까지 습관성캘러스에 관한 연구가 진행되지 않은 국내 자색고구마를 대상으로 조직배양을 통해 습관성캘러스를 선발한 후, 이로부터 안토시아닌 고생합성 습관성세포괴를 선발 배양하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 조직배양

작물과학원 목포시험장에서 공급 받은 자색고구마 (*Ipomoea batatas* cv. Jami) 정단부의 완전히 전개된 잎을 2개 포함한 마디를 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, 0.3% phytigel, pH5.8]이 첨가된 배양병 (1,000 ml)에서 무균 생육시켰다. 배양은 낮 / 밤을 16 / 8 hr, 6000 / 0 lux로 조절시킨 성장상에서 4주 간격으로 계대배양하여 배양재료로 이용하였다. 조직배양은 무균 조건에서 성장하고 있는 자색고구마로부터 2~3 cm 크기의 잎 절편체를 채취하여 주맥을 제거하고 5×5 mm 크기로 준비한 4개의 절편체를 캘러스 유도배지가 담긴 직경 60 mm의 petri dish에 치상하였다. 캘러스 유도는 MSBM을 기본으로 하여 0, 1, 10, 100 μ M의 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)와 0, 0.5, 5, 50 μ M의 benzylaminopurine (BA)를 조합하여 사용하였다. 배지에 접종하여 26°C, 24시간 광조건 (6000 lux)에서 배양을 시작하여 4주 후에 가장 큰 표면적 증가를 보인 조건을 100% 기준으로 보고 상대적인 캘러스 형성률을 조사하였다. 각 실험 모두 5반복 실행하여 평균값을 구하였다.

습관성캘러스 선발 및 증식

조직배양으로 유도된 캘러스를 계대배양 하지 않고 2,000 lux 이하로 광량을 낮춘 후 6개월간 지속 배양하여 습관성캘러스를 유도하였다. 선발된 습관성캘러스는 5×5 mm 크기로

잘라 성장조절제가 첨가되지 않은 MSBM에서 조직배양과 동일한 조건으로 3주에 1회 계대배양하며 유지 및 증식시켰다.

습관성캘러스의 현탁배양과 안토시아닌 고함유습관성세포괴 선발

MSBM에서 4차 계대배양한 습관성캘러스를 계대배양 3주 후, 1×1 mm 크기로 잘라 phytigel을 첨가하지 않은 MSBM 액체배지 50 ml을 담은 250 ml 삼각플라스크에서 옮겨 현탁배양을 시작하였다. 26°C, 120 rpm, 암 조건으로 조정된 현탁배양기에서 1주 간격으로 계대배양하며 2년간 육안으로 자색세포괴를 선발하였다.

안토시아닌 고함유 습관성세포괴의 성장곡선과 안토시아닌 함량

선발된 습관성 자색세포괴의 성장률과 안토시아닌 생합성량을 다음의 방법을 통해 조사하였다. MSBM 액체배지에서 2년 6개월 배양한 캘러스 0.1 g을 채취하여 10 ml의 MSBM이 담긴 50 ml의 삼각플라스크에서 암 조건으로 30일간 배양하였다. 캘러스의 생체중과 안토시아닌 함량측정을 위해 자색세포괴를 3 mm whatman filter paper (No. 1)를 이용하여 배양액을 즉시 제거, 생체중을 측정하고 후 잘게 잘라 안토시아닌 추출에 사용하였다. 3일 간격으로 생체중을 측정하고, 6일 간격으로 안토시아닌 함량을 측정하였으며, 안토시아닌 추출은 0.1% citric acid가 첨가된 20% ethanol용액을 시료의 20배로 첨가하여 30°C에서 24시간 동안 추출하였다. 24시간 후 시료를 5초간 vortex 시킨 후 800 rpm에서 5분 동안 원심분리 후 상등액을 취하여 spectrophotometer (Mecasys, optizen 1412V)를 이용하여 530 nm에서 안토시아닌 함량을 측정하였다. 각 실험 모두 5반복 실행하여 평균값을 구하였다.

결과 및 고찰

조직배양

자미의 잎 절편체를 배지에 치상하여 광조건에서 4주간 배양한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 잎 절편체를 치상한 후 1주일 후부터 캘러스화가 시작되어 4주 후 최대생장을 나타내었다. 가장 큰 표면적 증가를 보인 1 μ M 2,4-D와 0.5 μ M BA 혼합처리군을 기준으로 상대적인 캘러스생장률을 측정하였다. 2,4-D와 BA가 첨가되지 않는 처리군을 제외한 0~10 μ M 2,4-D와 0~50 μ M BA 혼합처리군에서 캘러스 유도가 가능하였다. 2,4-D 농도가 1 μ M에서 10 μ M로 증가되면 35~75% 캘러스 형성이 감소되었고, 100 μ M 2,4-D 처리구

Table 1. Effects of plant growth regulators on the callus formation from leaf disk of purple sweetpotato (*Ipomoea batatas* cv. Jami) after 4 weeks of culture. All values represent relative percentage of callus-forming to 1 μ M 2,4-D and 0.5 μ M BA combination. Data were obtained from means of 5 independent replicates.

2,4-D (μ M)	BA (μ M)	Callus formation (%)
0	0	0
"	0.5	40 \pm 5
"	5	70 \pm 10
"	50	80 \pm 5
1	0	80 \pm 5
"	0.5	100 \pm 0
"	5	100 \pm 0
"	50	70 \pm 5
10	0	5 \pm 0
"	0.5	30 \pm 5
"	5	70 \pm 10
"	50	45 \pm 10
100	0	0
"	0.5	0
"	5	0
"	50	0

에서는 BA와 상관없이 모두 괴사하였다. 1 μ M 2,4-D와 5 μ M BA 혼합처리시에 (Figure 1A) 1 μ M 2,4-D와 0.5 μ M 첨가구와 동일하게 가장 큰 성장량을 보였고, 0.5 μ M BA 첨가시보다 캘러스 짜임이 더 조밀하였다. 10 μ M 2,4-D와 BA 조합에서도 BA 농도가 높아질수록 캘러스의 짜임은 더 조밀해졌다. 이와 같은 결과는 전반적으로 자색고구마의 잎 조직배양의 결과 (Park et al. 2003)와 유사하게 나타났으며, 캘러스 수준에서 안토시아닌 생합성은 육안 관찰되지 않았다. 실험재료로서 자색고구마 괴근은 조직 자체 내에 많은 안토시아닌을 함유하고 있기 때문에 조직배양에서도 안토시아닌 생합성이 용이할 것으로 기대하여 잎 조직배양과 동일조건으로 자미의 괴근조직을 이용하여 조직배양 한 결과, 캘러스 형성과정에서 잎 조직의 결과에 비교하여 초기 캘러스의 형성은 빠르게 시작 되었으나 안토시아닌 생합성 캘러스도 출현하지 않는 등 최종적으로는 유사한 결과를 나타냈다.

습관성캘러스 선발 및 증식

잎과 괴근조직배양으로 안토시아닌 생합성이 유도되지 않을 뿐만 아니라, 1차 계대배양 이후에는 증식능이 감소하였다. 따라서, 우선적으로 생장이 우수하면서 지속 생장이 가능한 캘러스의 선발을 위해 습관성캘러스 선발을 시도하였다. 1 μ M 2,4-D가 첨가 조건의, 잎 조직배양 4주 후 계대배양을 하지 않고 광 조건을 2,000 lux 이하로 낮춘 후 계대배양 없이

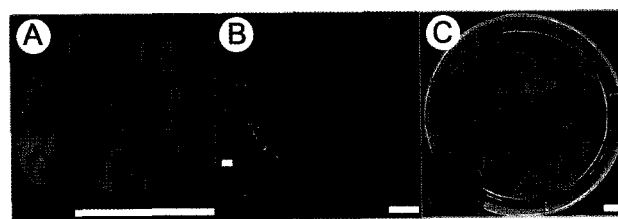


Figure 1. Morphology of nonhabituated and habituated callus induced from leaf disk of purple sweetpotato (*Ipomoea batatas* cv. Jami). A: Nonhabituated callus cultured for 4 weeks on MS basal medium supplemented with 1 μ M 2,4-D and 5 μ M BA, B: Induced habituated callus (arrows=original leaf disks), C: Habituated callus cultured on hormone free MSBM for 3 weeks (small picture is 0 day after subculture), (Bars=0.5 cm).

6개월간 지속 배양하여 습관성캘러스를 유도하였다. 습관성캘러스 선발을 위한 배양에서 대부분의 캘러스는 계대배양하지 않으면 8주 이후에는 배지고갈이 심하여 Figure 1B 화살표의 캘러스와 같이 고사하였다. 그러나 매우 낮은 빈도로 Figure 1의 B와 같이 고사되지 않고 새로운 캘러스괴를 형성하게 되는데, 이를 분리하여 5 \times 5 mm 크기로 잘라 성장조절제가 첨가되지 않는 MSBM에 계대해주면 (Figure 1C small picture) 계대배양 횟수와 무관하게 빠르고 지속적인 생장이 가능하였다 (Figure 1C). 1 μ M 2,4-D와 0.5 μ M BA 조합조건에서도 습관성캘러스가 유도되었으나 계대배양이 지속되면서 생장이 점점 감소하였다. 이러한 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. 선발된 습관성캘러스는 Figure 1에서 보는 바와 같이 잎 조직배양시 최대성장량을 보인 1 μ M 2,4-D와 BA 조합처리 조건의 캘러스에 비교하여 (Figure 1A) 성장량에 있어 5배 가량의 차이를 나타내어 (Figure 1C), Pischke 등이 (2006) 선발한 캘러스에 비교하여 더 큰 성장을 보일 뿐 아니라, 습관성캘러스 유도시기를 *Nicotina*, *Arabidopsis*의 기존 보고보다 1년 이상을 단축시켰다 (Binns and Meins 1973, Pischke et al. 2006). 이후, 선발된 습관성캘러스는 MSBM에서 3주 간격으로 계대배양하며 유지 및 증식시키며 실험에 사용하였다.

습관성캘러스의 현탁배양과 안토시아닌 고함유 관성세포주 선발

50 ml의 MSBM 액체배지에 습관성세포주 5 g 을 접종하여 2주간 배양하면 (Figure 2A,B), 생체중이 약 10 g으로 증가하였다. 1주 간격으로 배지를 교환하며 3주 배양하면 세포괴가 10 \times 5 mm 이상 크기까지 성장하였는데, 이때 세포괴가 약간 물리지는 현상과 함께 성장량이 낮아졌다. 그러나, 2주 간격으로 세포괴를 0.3 \times 0.3 mm 미만의 크기로 세절하면 정상적

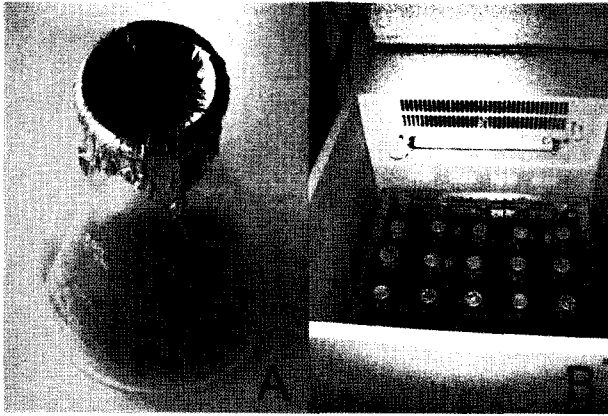


Figure 2. Suspension culture of habituated cell aggregates from purple sweetpotato.

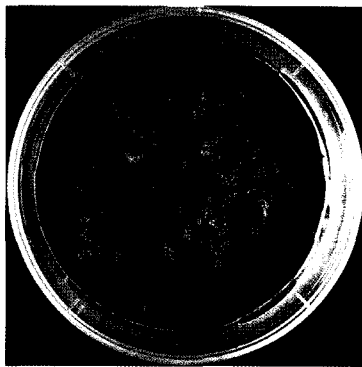


Figure 3. Selection of high anthocyanin producing cell line from habituated cell aggregates of purple sweetpotato.

인 생장이 가능하였다. 암 조건에서 현탁배양 6개월 후에 세포 표면 육안으로 관찰 가능한 자색부분이 발견되었는데 이 자색 부분을 지속적으로 2년 동안 선발하였다. 그 결과, 빠르게 증식이 가능한 안토시아닌 고생합성 습관성세포를 선발하였다 (Figure 3). 한편, 선발된 습관성세포는 배양 초기 암 상태에서 보다 광 상태의 현탁배양에서 생장이 약간 촉진되고 세포의 염색도가 유도되었으나 12개월 지속배양에도 자색세포가 출현하지 않아 배양을 중단하였다. 대부분의 안토시아닌 생합성 세포주는 광조건하에서 선발되고 그 생합성 또한, 촉진되는 것으로 보고되어 있으나 (Sakamoto K et al. 1994, Edahiro et al. 2005a, Mori et al. 1993), 본 연구 결과 자색고구마 습관성세포의 안토시아닌 생합성에는 암 조건이 효과적인 것으로 나타났다. 이러한 특성은 바이오리액터에서 대량배양시 광조사는 생산비 증가를 초래하지만, 선발한 자색세포는 암조건하에서 유지 증식가능하기 때문에, 타 세포주에 비교하여 생산비 절감 효과가 있을 것으로 기대한다 (Zhong et al. 1993).

안토시아닌 기내대량생산을 위해서는 무엇보다도 안토시아닌 고함유 세포주의 선발이 우선적으로 이루어져야 한다. 그러나 안토시아닌 고생합성 세포주의 선발이 쉽지 않고 또한, 장기간 계대배양에 의해 그 특성을 상실하는 경우가 많아

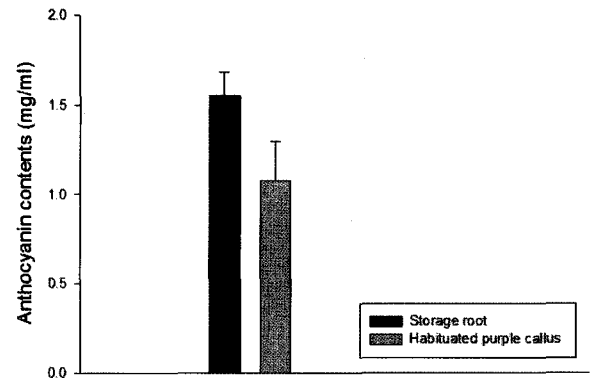
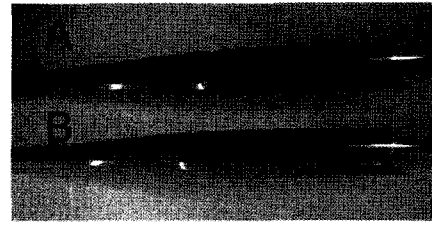


Figure 4. Comparison of anthocyanin color contents. A: storage root of cv. Jami, B: purple habituated cell aggregates.

일정 간격으로 세포주를 다시 선발해야 하는 문제점이 있다. 하지만, 본 실험에서 확립한 안토시아닌 고함유 습관성세포는 빠른 시간 내에 안정적으로 성장하고 안토시아닌 생합성량도 우수한 것으로 나타났다. 따라서 안토시아닌 생합성에 미치는 광조사 (Mori et al. 1993), jasmonic acid (Zhang et al. 2002), L-Phenylalanine (Edahiro et al. 2005b) 등의 첨가 또는 Nutrient conditions (Sakamoto et al. 1993), 그리고 oxygen supply (Zhong et al. 1993) 등을 조절함으로써 안토시아닌 생합성량을 더욱 증대 시켜 안토시아닌의 기내생산을 높이기 위한 중요한 세포주로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

안토시아닌 고함유 습관성세포의 성장곡선과 안토시아닌 함량

안토시아닌 고생합성 습관성세포의 성장형태와 안토시아닌 생합성량 조사는 MSBM 10 ml의 배지에 0.1 g의 캘러스를 접종한 후, 계대배양 없이 30일간 배양하며 각각 3일, 6일 간격으로 측정하였다. 12일간의 lag phase를 거쳐, 12~30일 까지 급격한 logarithm 성장을 나타내었다. 30일 이후에는 세포 표면 생장이 감소하는 전형적인 sigmoid 성장양상을 나타내었으며 stationary phase에서 일반적으로 이차대사산물의 생성이 촉진되는 것과 달리 본 연구에서 선발한 자색습관성세포의 안토시아닌 생합성은 lag phase에 속하는 배양 6일 후 최대를 나타낸 후 감소하여 상호 반비례 관계를 나타내었다 (Figure 4). 배양 6일째, 안토시아닌 색가는 조직배양의 재료로 사용되었던 동일 괴근의 2/3 정도의 수준으로 나타났다

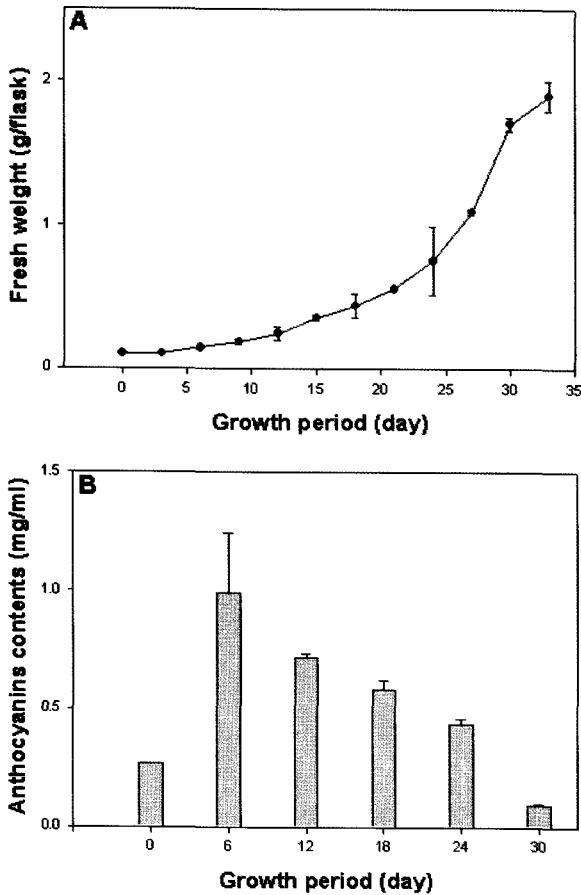


Figure 5. Growth pattern of an anthocyanin producing habituated cell aggregates in suspension culture. (A) Growth curve for habituated cell aggregates (B) Anthocyanin accumulation in habituated cell aggregates during a growth cycle. ^{*}Callus was proliferated in 50 ml Erlenmeyer flasks containing 10 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.

(Figure 5).

본 실험실에서 선발한 안토시아닌 고함유 습관성세포주는 우선적으로 성장조절제를 첨가하지 않는 배지에서 생체중의 경우 19배까지 증가하는 탁월한 성장률을 나타냈으며, 안토시아닌 생합성량 또한 4배 증가하는 결과를 나타냈다.

기내배양에서 이차대사산물의 생합성량을 높이기 위해 일차적으로 배양세포의 영양생장률을 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 결과로부터, 30일간 연속배양하여 세포괴를 최대로 성장시킨 후, 동일조건으로 간단하게 배지만 교체 해준 후 6일 후 안토시아닌 생합성량을 향상시키거나, 대수증식이 중기에 L-Phenylalanine을 첨가하여 (Edahiro et al. 2005b) 기내 안토시아닌 생합성량을 증가시킬수 있을 것으로 기대한다.

안토시아닌 생합성 전사인자들이 발굴 (Park et al. 2004), signaling network의 규명 (Vitrac et al. 2000)과 더불어 우리가 선발한 습관성세포괴의 안토시아닌 색소의 성분 및 특성 연구, 안정화 방안이 연구된다면 안토시아닌 기내대량 생산연구에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

자색고구마 (*Ipomoea batatas* cv. Jami) 잎 조직배양으로 유도된 캘러스는 계대배양시 성장량이 감소하였다. 빠르고 간편하게 성장하는 습관성캘러스를 1 μM 2,4-D 첨가된 MSBM에서 계대배양 없이 6개월간 지속배양하여 선발하였다. 습관성캘러스는 성장조절제가 첨가되지 않는 MSBM의 고체, 액체 배지에서 계대배양 횟수의 제한 없이 빠르게 지속생장이 가능하였다. 암조건의 액체배양 6 개월 후에는 자색생합성 부위가 생겼으며, 이를 2년 여간 분리하여 자색습관성세포괴를 선발하였다. 안토시아닌 함량은 자미의 괴근에서 추출되는 1.5 mg/ml에 근접한 1.0 mg/ml로 나타났다. 자색습관성세포괴는 안토시아닌 기내대량에 효과적 세포주로 사용될 수 있을 것으로 기대한다.

사 사

이 논문은 2001년도 (과제번호: 201033-3)와 2005년도 (과제번호: 105060-3) 농림기술개발사업의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다. 고구마 식물재료를 제공하여 준 농촌진흥청 작물과학원 목포시험장에 감사 드립니다.

인용문헌

Zhong JJ, Yoshida M, Fujiyama K, Seki TTY (1993) Enhancement of anthocyanin production by *Perilla frutescens* cells in a stirred bioreactor with internal light irradiation. J Ferment Bioeng 75: 299-303

Sakamoto K, Iida K, Sawamura K, Hajiro K, Asada Y, Yoshikawa, T FT (1994) Anthocyanin production in cultured cells of *Aralia cordata* Thumb. Plant Cell Tiss Org Cult 36: 21-26

Binns A, Meins F (1973) Habituation of Tobacco Pith Cells for Factors Promoting Cell Division Is Heritable and Potentially Reversible. Proc Natl Acad Sci U S A 70: 2660-2662

Bridle P, Timberlake C (1997) Anthocyanins as natural food colours-selected aspects. Food Chem 58: 103-109

Chen PN, Chu SC, Chiou HL, Chiang CL, Yang SF, Hsieh YS (2005) Cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside inhibit tumor cell growth and induce apoptosis in vitro and suppress tumor growth in vivo. Nutr Cancer 53: 232-243

- Decendit A, Mérillon J (1996) Condensed tannin and anthocyanin production in *Vitis vinifera* cell suspension culture. *Plant Cell Rep* 15: 762-765
- Edahiro J, Nakamura M, Seki M, Furusaki S (2005a) Enhanced accumulation of anthocyanin in cultured strawberry cells by repetitive feeding of *L-phenylalanine* into the medium. *J Biosci Bioeng* 99: 43-47
- Edahiro J, Nakamura M, Seki M, Furusaki S (2005b) Enhanced Accumulation of Anthocyanin in Cultured Strawberry Cells by Repetitive Feeding of *L-Phenylalanine* into the Medium. *J BIOSCI BIOENG* 99: 43-47
- Fox JE (1963) Growth factor requirements and chromosome number in tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 16: 793-803
- Francis FJ (1989) Food colorants: anthocyanins. *Crit Rev Food Sci Nutr* 28: 273-314
- Kim HJ, Tsoy I, Park JM, Chung JI, Shin SC, Chang KC (2006) Anthocyanins from soybean seed coat inhibit the expression of TNF- α -induced genes associated with ischemia/reperfusion in endothelial cell by NF- κ B-dependent pathway and reduce rat myocardial damages incurred by ischemia and reperfusion in vivo. *FEBS Lett* 580: 1391-1397
- Konczak-Islam 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
- 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
- Meins FJ, Foster R (1985) Reversible, cell-heritable changes during the development of tobacco pith tissues. *Dev Biol* 108: 1-5
- Meyer J, Pepin M, Smith M (2002) Anthocyanin production from *Vaccinium pahalae*: Imitations of the physical microenvironment. *J Biotechnol* 93: 45-57
- Montoro P, Tuberoso CI, Piacente S, Perrone A, De Feo V, Cabras P, Pizza C (2006) Stability and antioxidant activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. *J Pharm Biomed Anal* 41: 1614-1619
- Mori T, Sakurai M, Shigeta J, Yoshida K, Konda T (1993) Formation of anthocyanins from cell cultured from different parts of strawberry plants. *J Food Sci* 58
- 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
- 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
- Pischke MS, Huttlin EL, Hegeman AD, Sussman MR (2006) A transcriptome-based characterization of habituation in plant tissue culture. *Plant Physiol* 140: 1255-1278
- Sakamoto K, Iida K, Sawamura K, Hajiro K, Asada Y, Yoshikawa T, Furuya T (1993) Effects of nutrients on anthocyanin production in cultured cells of *Aralia cordat*. *Phytochem* 33: 357-360
- Tsuda T, Horio F, Kitoh J, Osawa T (1999) Protective effects of dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside on liver ischemia-reperfusion injury in rats. *Arch Biochem Biophys* 368: 361-366
- Vitrac X, Larronde F, Krisa S, Decendit A, Deffieux G, Mérillon JM (2000) Sugar sensing and Ca²⁺-calmodulin requirement in *Vitis vinifera* cells producing anthocyanins. *Phytochemistry* 53: 659-665
- Zhang W, Curtin C, Kikuchi M, Franco C (2002) Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. *Plant Science* 162: 459-468
- Zhong JJ, 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 Ferment Bioeng.* 75: 299-303

(접수일자 2006년 12월 26일, 수리일자 2007년 2월 5일)