

紫蘇의 조직배양에 관한 연구(II)

신 순 희

덕성여자대학 약학과

Studies on Tissue Culture of *Perilla* Species

Soon-Hee Shin

Ducksung Women's College, Seoul 132, Korea

Abstract—The young leaf of *Perilla* species was cultured by two stage culture system using the medium containing mevalonic acid lactone. The growth rate and productivity of essential oil of callus were increased. The essential oil from intact plant and callus was also analysed. Sesquiterpene hydrocarbons and one sesquiterpene alcohol were identified in essential oils of callus.

Keywords—*Perilla* species • mevalonic acid lactone • essential oil • two stage culture system

전보¹⁾에 보고된 바와 같이 紫蘇의 조직배양은 주성분인 정유를 다른 정유식물과는 달리 미분화 callus상태에서 형성시킬 수 있다는 점이 조직배양에 의한 약효성분의 생산측면에서 흥미있는 과제이다. 이에 관하여는 이미 Nabeta^{2,3)} 등의 연구보고가 있으나 紫蘇는 산지에 따라 많은 성분변종이 있어 정유의 주성분이 다르다는 점과⁴⁾ callus에 생성된 정유의 양 및 조성에 문제점이 있어 이 방법의 실용화에 이르기까지는 아직도 많은 연구의 여지를 남기고 있다.

전보에서는 광선이 紫蘇의 callus생장은 억제시키나 callus 단위중량에 대한 정유생성율은 증가시킨다는 것을 밝힌 바 있다. 이에 이어서 본 연구에서는 증식과 정유생성을 동시에 증가시킬 목적으로 callus를 일정기간 암소에서 배양한후 짧은 기간동안만을 광선에 노출시키는 소위 two stage culture system⁵⁾에 의해 紫蘇의 callus를 배양하여 정유생성결과를 측정하였다.

또한 배양시 조사되는 광선의 종류에 따라 이차 대사 산물의 조성이 변화한다는 점^{6,7)}에 착안, 이제까지 광원으로 사용되었던 형광램프 대신 보다 태양광선에 가까운 true light lamp를

사용하였고, 정유생성량 증가의 목적으로 정유생합성 전구물질인 mevalonic acid lactone등을 첨가 하였다. 또한 위의 물질의 흡수 촉진 및 이용을 위해 막투과성 및 각종 효소의 활성화 촉진작용이 있는 것으로 알려진 원소, Ca, Mg, Mn, 및 B의 함량을 기본배지보다 증가시킨 후 결과를 비교하여 보았다.

또한 callus에 생성된 정유를 추출하여 한국재배품 자소의 신선한 잎으로 부터 획득한 정유 및 시판 건조 자소엽의 정유와 함께 분석, 비교하였다.

실 험

1. 배지

Modified Murashige and Skoog medium⁸⁾에 yeast extract 5g, 2, 4-D 1ppm, kinetin 5ppm을 첨가한 것을 기본배지(이하 medium A로 표기)로 하였다. 여기에 각각 limonene 10ppm, Ca, Mg, Mn, B의 함량을 2배로 증량시킨 배지를 따로 제조하여 시험관에 10ml씩 부어 멸균하여 굳힌 것을 사용하였다.

2. 조직배양

전보와 같은 방법으로 紫蘇의 어린잎으로 부터 유도시킨 callus를 위에서 조제한 4종의 배지에 ① 암소 4주, ② 백열등(1,600 lux) 밑에서 4주 ③ 암소 3주 배양후 true light lamp(1,600 lux) 조사하에 1주간 배양하였다. 배양온도는 가장 높은 callus증식을 나타낸 27±2°C로 고정하였다.

3. Callus 증식 및 정유 생성 측정

위에서 배양한 callus를 약 1주 간격으로 8~12 시험관을 채취하여 중량을 측정, 시험관당 평균 무게로 계산한 후 K.P. 규정 정유측정장치로 2시간 수증기증류하여 정유를 분리하였다.

4. 정유의 분석

1) TLC: TLC plate로는 Kieselgel 60(merck)를 사용 dichlormethane으로 10cm 전개시킨 후 anisaldehyde·H₂SO₄ 시액으로 발색시켰다.

2) GC-MS: OV-101 capillary column을 사용하여 Fig. 5, A는 80°C에서 5 min, 80-280°C, 2°C/min로 승온하였고 Fig. 5, B의 경우는 60°C에서 2 min, 60-280°C, 5°C/min로 승온하여 측정하였다.

3) Column chromatography

자소, 시판생약과 재배품의 신선 잎을 수증기 증류하여 획득한 정유를 직경 1cm, 길이 1m column으로 silicagel, dichlormethane을 흡착제와 전개용매로 사용하여 spot a 및 b에 해당되는 물질을 분리하였다.

결과 및 고찰

1. Callus증식

1) mevalonic acid lactone등 첨가물에 의한 영향

Fig.1에 나타난 바와 같이 암소배양한 경우 mevalonic acid lactone의 첨가된 배지에 배양한 callus가 배양시작후 3주경부터 기본배지에 비해 높은 증식율을 보였고, 광선조사하에서는 전반적으로 증식속도가 느린 것으로 나타났다.

B, Mn, Ca, Mg를 기본배지보다 2배로 증가시킨 배지에서는 Fig. 2에서 볼수 있는 바와 같이 오히려 낮은 증식을 나타냈고, limonene을 첨가한 경우에는 더욱 낮은 결과를 보였다.

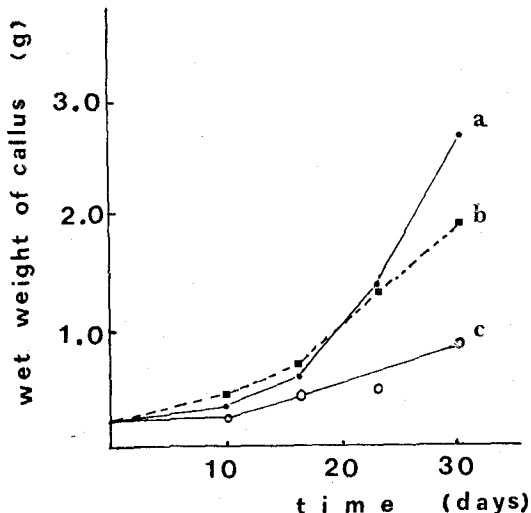


Fig. 1. Growth curve of callus: Effects of mevalonic acid lactone (weights of inocula; ca 250mg) a; callus cultured on medium A containing mevalonic acid lactone(10ppm) in the dark b; callus cultured on medium A in the dark c; callus cultured on medium A containing mevalonic acid lactone (10ppm) in the light.

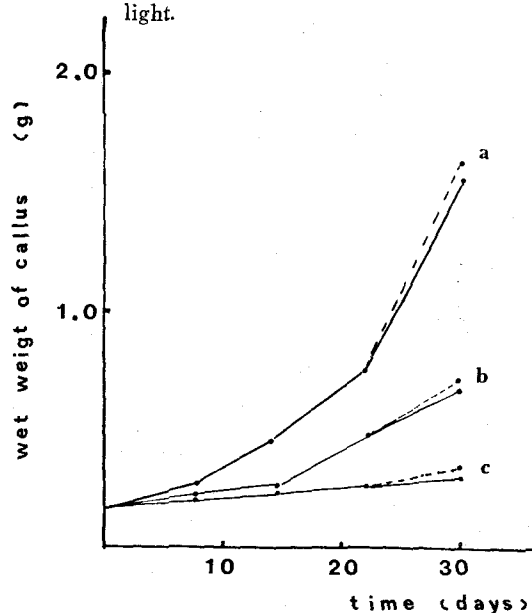


Fig. 2. Growth of callus: Influences of light(two stage culture system, weights of inocula; ca 200mg) a; callus cultured on medium A containing mevalonic acid lactone b; callus cultured on medium A containing mevalonic acid lactone, double amount of HBO₃, MnSO₄, CaCl₂, and MgSO₄ c; callus cultured on medium A containing limonene (10ppm) — callus cultured in the darkcultured in the light(true light lamp)

2) 광선조사에 의한 영향(two stage culture system)

Fig. 2에 나타난 바와같이 a, b, c 3가지 경우에 모두 암소에서만 4주 배양한 것보다 암소에서 3주 배양후 1주간 광선조사하에 배양한 callus가 더 큰 증량증가를 보였다.

2. 정유의 생성량

1) Fig. 3에 나타난 바와 같이 매 시험관당 callus의 정유생성량은 mevalonic acid lactone을 첨가한 것이 첨가하지 않은 것에 비해 현저히 높았고 a,b 양쪽다 2주와 3주사이에 정유생성량이 가장 많았다.

3. 정유의 조성

정유를 TLC(Fig. 4)한 결과 callus의 정유는 한국재배종인 자소의 신선한 잎이나 시판 건조생약의 정유와 조성이 다른 것으로 나타났다.

Fig. 4의 spot a 및 spot b에 해당되는 물질을 column chromatography의 방법으로 순수분리하여 구조동정한 결과 spot a는 myristicin으로, spot b는 apiol(Fig.6)로 밝혀졌다.

이렇게 재배 신선 잎과 건조 시판생약의 주성

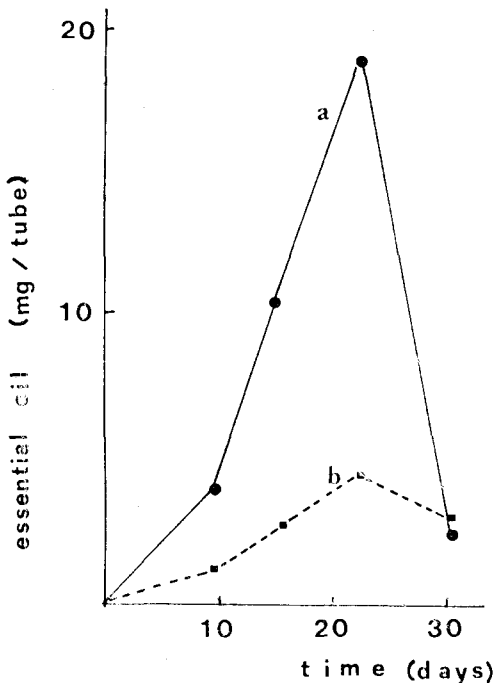


Fig. 3. Production of essential oils in callus.
a; from callus cultured on medium A containing mevalonic acid lactone (10ppm)
b; from callus cultured on medium A

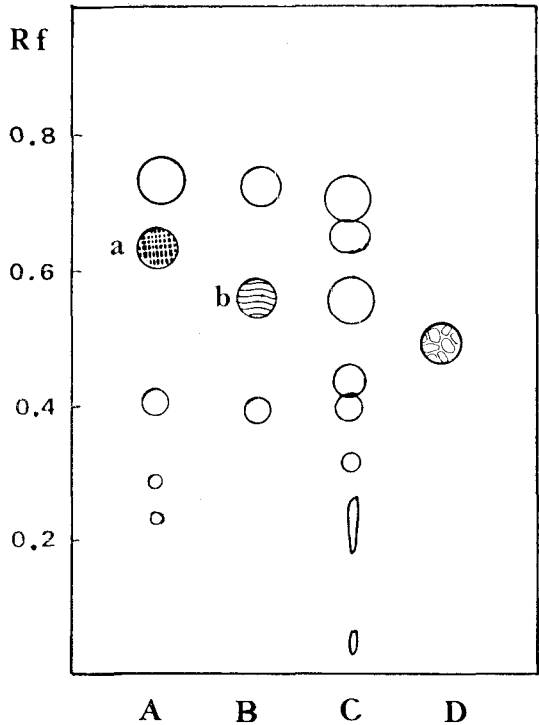


Fig. 4. TLC of essential oils.
A; essential oil from fresh leaves of in Korea cultured species
B; essential oil from dried drug in commerce
C; essential oil from callus cultured on medium A
D; perilla aldehyde

분이 다른 원인으로는 이상 두 자소잎의 기원식물이 성분변종일 가능성과 건조 및 보관기간중의 성분변화 가능성등을 생각해 볼 수 있겠다.

* myristicin

ir, ν max (KBr) 3060, 2750, and 1600 cm^{-1} ;

uv, λ max (pentane) 220nm; ms, m/z , 192(M^+)

*apiol

ir, ν max(KBr) 3070, 2920 and 1630 cm^{-1} ;

uv, λ max(pentane) 220nm; ms, m/z , 222(M^+)

callus로 부터의 정유는 GC-MS(Fig.5)의 방법으로 분석하였다.

mevalonic acid lactone을 첨가한 배지에 배양

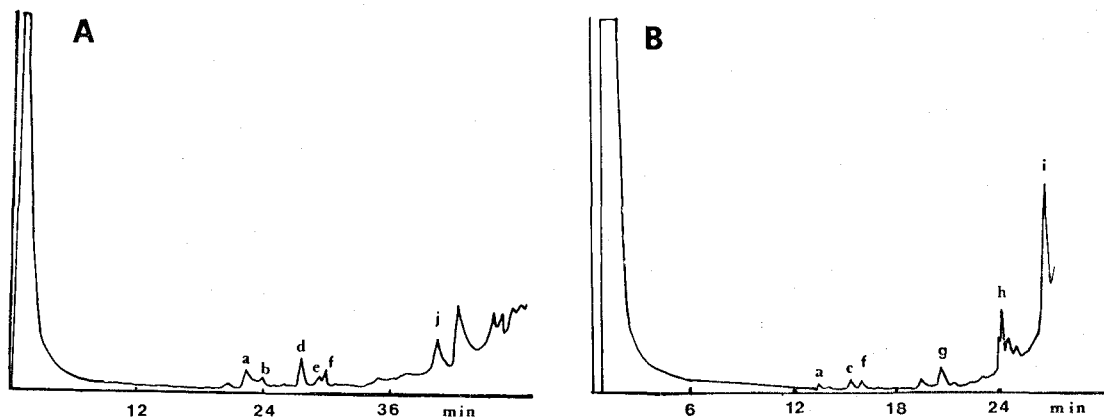


Fig. 5. GC-MS of essential oil from callus.

A; cultured on medium A (GC temperature; at 60°C, 2 min, 60-280°C 5°C/min)

B; cultured on medium A containing mevalonic acid lactone, two stage culture system (GC temperature; at 80°C 5min. 80-280°C, 2°C/min)

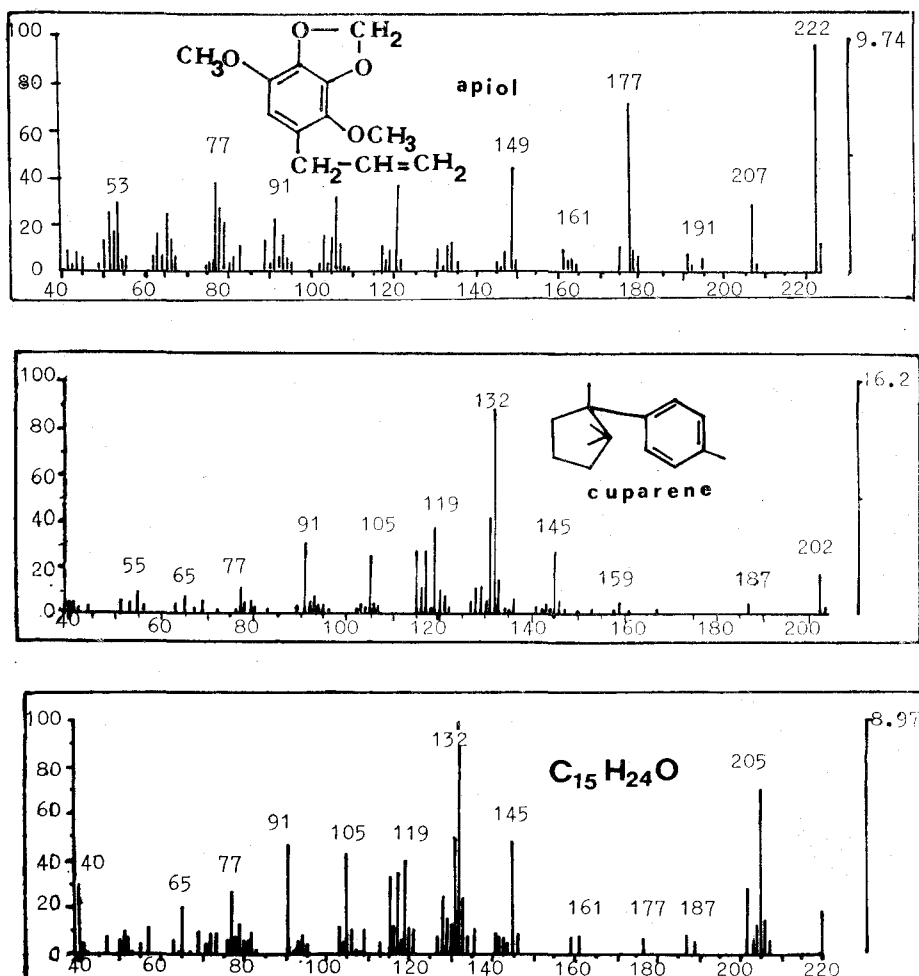


Fig.6. Mass Spectra of compounds in essential oils.

Table I. Mass data of essential oils from callus

Peak	Identity	m/z
a	C ₁₅ H ₂₂	204(M ⁺), 123, 108, 93(100%), 77
b	unknown	189(M ⁺), 136, 121(100%), 108, 93
c	C ₁₅ H ₂₄ O	220(M ⁺), 145, 132(100%), 119, 91
d	cuparene	202(M ⁺), 145, 132(100%), 119, 91
e	widdrene	204(M ⁺), 133, 119(100%), 105, 93
f	bisabolene	204(M ⁺), 135, 107, 93(100%), 79
g	cadalene	198(M ⁺), 183(100%), 155, 127, 77
h	unknown	273(M ⁺), 210, 109, 93, 79(100%)
i	unknown	274(M ⁺), 238, 223(100%), 165, 152
j	unknown	401(M ⁺), 147, 85, 71, 57(100%)

3. 자소 callus의 정유를 GC-MS한 결과,

배양 조건에 따라 정유조성이 다른 것으로 나타났다. 정유성분 중 cuparene, widdrene, β -bisabolene 등의 sesquiterpene과 분자식 C₁₅H₂₄O인 sesquiterpene alcohol이 확인되었다.

한 callus와 첨가하지 않은 기본배지에 배양한 callus는 정유조성이 다른 것으로 나타났다. 즉 Fig. 5의 peak a와 f만을 제외하고는 일치하는 성분이 없었다. peak a에서 j까지에서 확인된 성분의 MS data는 Table I과 같다. m.w.=202, 혹은 204의 sesquiterpene이 제일 많았고 특이한 성분으로는 two stage culture system에 의해 배양한 callus 정유에서 확인된 m.w.=220의 화합물로 이성분은 분자식이 C₁₅H₂₄O이고 mass spectrum으로 보아 cuparene과 구조가 관련깊은 sesquiterpene alcohol(Fig.6)인 것으로 밝혀졌다.

결 론

1. Mevalonic acid lactone첨가와 동시에 two stage culture system으로 광선을 조절하여 배양한 결과 callus의 증식 및 정유의 생성이 증가되었다.

2. 한국 재배품 자소(紫蘇)의 신선한 잎의 정유주성분은 mycristicin으로, 시판자소 건조생약의 정유 주성분은 apiol로 확인되었다.

감사의 말씀—본 연구는 1985년도 문교부 학술 연구조성비에 의하여 연구된 것입니다.

<1986년 2월 24일 접수 : 3월 14일 수리>

문 헌

1. Shin, S.H.: *Kor. J. Pharmacogn.* 16, 210(1985)
2. Nabeta, K., Ohnishi, T., Hirose, H. and Sugisawa, H.: *Phytochemistry* 22, 423(1983)
3. Nabeta, K. and Sugisawa, H.: *Proc. 5th Internal Congr. Plant Tissue & Cell Culture* p.289, The Japanese Association for Plant Tissue Culture (1982)
4. Nabeta, K. and Sugisawa, H.: *Instrumental Analysis of Foods*, p. 65, Academic Press(1983)
5. Staba, E.J.: *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals*, p.182, CRC Press (1980)
6. Staba, E.J.: *ibid.* p.134 CRC Press (1980).
7. Mantel, S.H. and Smith, H.: *Plant Biotechnology*, p. 82, Cambridge University Press (1983)
8. Devlin, R.M. and Witham, F.H.: *Plant Physiology*, p.139~152, Willard Grant Press (1983)
9. 한창열 : 식물조직배양, p.27, 일조각, 서울(1982)