

들깨 수집종의 유효성분 분석 및 Limonene 합성유전자(PLS)의 클로닝

강원대학교 : 서은원¹, 성은수¹, 임정대², 이주경¹, 김명조¹, 유창연^{1*}

건국대학교 : 김석주³, 김재우³, 정일민³

Molecular Characterization of Limonene Synthase(PLS) and Analysis of bioactive compounds in *Perillafrutescens*

¹College of agriculture and Life Science, Kangwon National University*,

²Department of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University,

³KonKuk University, Seoul 143-701, Korea

Eun Won Seo¹, Eun Soo Seong¹, Jung Dae Lim², Seok Ju Kim³, Jae Woo Kim³,

Ju Kyong Lee¹, Ill Min Chung³, Myong Jo Kim¹ and Chang Yeon Yu^{1*}

실험목적

들깨는 오래 전부터 재배해 오던 유료작물로 지방, 필수아미노산, 비타민, 미네랄 등의 함량이 풍부하며, 최근 신선엽 채소로서 소비가 점점 증가되고 있다. 본 연구는 수집종 들깨의 페놀화합물 함량 및 정유성분을 비교분석하고, limonene 성분이 높아 향기와 맛이 우수한 개체로부터 limonene 합성 유전자를 분리하여 분자적 특성을 연구하였다.

재료 및 방법

○ 실험재료

페놀화합물 및 정유성분분석은 들깨 수집종 17계통을 대상으로 하였고, Limonene synthase의 클로닝 및 분자적 특성은 17계통 중 pf141번으로 수행하였다.

○ 실험방법

1. 페놀화합물 분석 및 정유 성분 분석

HPLC 시료는 들깨잎을 pure acetonitrile 10mL과 0.1N HCl로 추출하였고, GC 시료는 정유 추출 장치를 사용하여 glycerin-water solution (4:1) 125 mL에 추출하였다. HPLC는 SHIMADZU HPLC system과 YMC-Pack ODS AM-303 (4.6×250 mm I.D.) column을 사용하였고, GC는 SHIMADZU GC-2010 system으로 분석하였다.

2. Southern blot 분석

들깨의 genomic DNA는 *Hind*III와 *Eco*R I 으로 절단하였고, ³²P로 라벨된 PLS의 full-length cDNA는 probe로써 사용하였다.

3. 산화적 스트레스 하에서 Limonene synthase의 발현 분석

4. Limonene synthase 클로닝 및 Transient overexpression

pf141로부터 분리한 PLS는 *xba* I 과 *sac* I 으로 절단한 후 pMBP1에 삽입하였고, *A. tumefaciens* LBA4404로 형질전환하였다. Agroinfiltration 방법을 이용하여 *N. benthamiana* 잎에서 PLS유전자의 일시적 발현 양상을 조사하였다.

실험결과

1. 총 페놀 함량을 살펴본 결과, 페놀 물질을 많이 함유하고 있는 계통은 pf139번이었으며, 정유 성분 분석 결과, pf141번이 유일하게 α -pinene, β -pinene, limonene이 검출되었다.
2. Southern blot 분석 결과, 한 개 이상의 유전자가 존재하는 것으로 나타났다.
3. Agroinfiltration을 통한 PLS의 일시적인 발현은 24, 48시간에서 증가됨을 알 수 있었다.

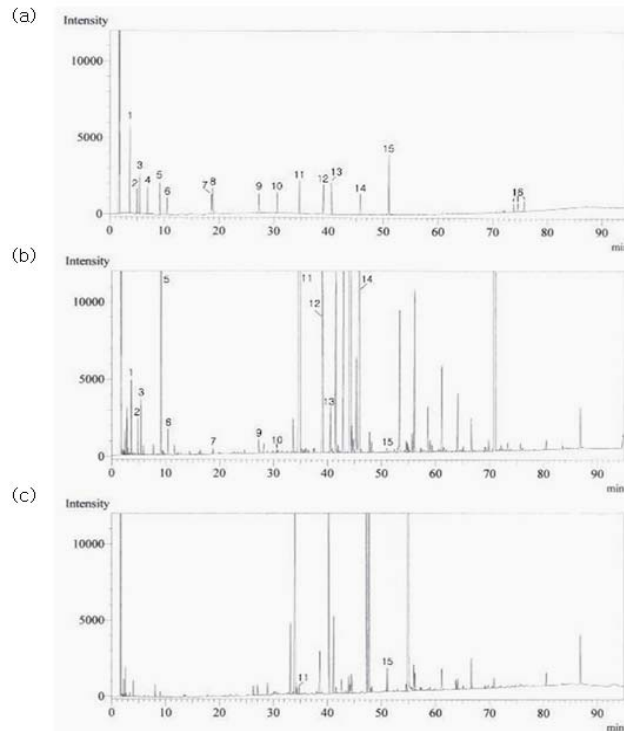


Fig. 1. GC profiles of volatile compounds in *perilla frutescens*. 16 standard compound(A), pf141(B) and pf102(C).

1. α -pinene 2.hexanal 3. β -pinene 4.d-3-carene 5.limonene 6.t-2-hexanal
 7.6-methyl-5-heptene-2-one 8.anisol 9.1-octene-3-ol 10.benzaldehyde 11.caryophyllene
 12. α -humulene 13. β -farnesene 14.perilladehyde 15.tetra-tetra-contane 16.tricosane

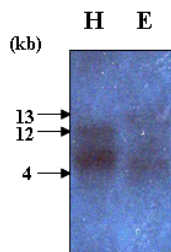


Fig. 2. Genomic DNA blot analysis of PLS gene.

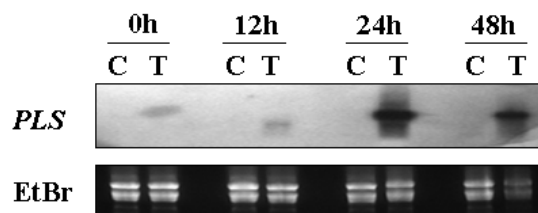


Fig. 3. Transient expression of PLS by agroinfiltration in *Nicotiana benthamiana*.