

新甘味資源植物 스테비아의 Callus 培養과 Stevioside 生成에 關한 研究

李 甲郎 · 朴 正隆 · 崔 奉順* · 韓 在淑** · 吳 相龍*** · 山田康之****

嶺南大學校 食品營養學科, *曉星女子大學校 家庭學科, **嶺南大學校 家庭管理學科

農漁村開發公社 食品研究所, *京都大學 農藝化學科

(1982년 4월 1일 수리)

Studies on the Callus Culture of Stevia as a New Sweetening Source and the Formation of Stevioside

Kap Rang Lee, Jyung Rewng Park, Bong Soon Choi*, Jae Sook Han**,
Sang Lyong Oh*** and Yasuyuki Yamada****

Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, *Department of Home Economics,
Hyosung Woman's University, **Department of Home Management, Yeungnam University,

Food Research Institute, AFDC, *Department of Agricultural Chemistry, Kyoto University

(Received April 1, 1982)

Abstract

This experiment was carried out to clarify the optimal concentrations of growth regulators for callus induction and the condition of callus culture of leaf tissue taken from *Stevia rebaudiana* Bertoni. The content of stevioside, sweetening component, in leaf-derived callus of stevia was also investigated.

It was shown that the optimal concentrations of benzyladenine (BA) and α -naphthalene acetic acid (NAA) for callus induction were $10^{-6}M$ and $10^{-5}M$, respectively. Reculture of these calli in media (Linsmaier and Skoog) supplemented with BA $10^{-6}M$ and NAA $10^{-5}M$ resulted in profuse calli 15 to 20 days after incubation. When sweetening components produced by callus were extracted and identified by TLC, stevioside appeared to have Rf value 0.50 in TLC which was exactly same as standard stevioside. Stevioside content obtained by TLC-FID analyzer was 260 mg per 100 g on the basis of dry weight.

序 論

새로운 甘味資源 植物로서 注目되고 있는 stevia(*Stevia rebaudiana* Bertoni)는 南美 原産의 菊花科에 屬하는 多年生 草本으로 主甘味 成分인 stevioside의 甘味度는 설탕의 約 300배에 相當하며⁽¹⁾ 無色, 無臭의 良質의 새로운 天然 甘味物質로 알려져 있다.

이와같은 새로운 甘味資源 開發에 關係分野가 關心을 갖게된 것은 食生活 패턴의 變化로 因하여 雪糖을 비롯한 糖類의 섭취량이 增加함에 따라 人體에 미치는 副作用 등으로 因하여 우리들의 食生活의 새로운 문제로 대두되어 왔으며, 또한 지금까지 使用되어온 사카린, 들신 등의 合成 甘味料 中에는 發癌性 등의 安全性에 關한 문제가 대두되고 있기 때문이다.

한편 우리나라의 스테비아葉의 生産과 輸出現況을

보면 1979年 生産量은 乾葉量으로서 約 300톤으로 極히 生産이 부진하여 對日本 輸出豫定量에 크게 不足하였다⁽²⁾. 이같이 스테비아의 生産量이 크게 저조하여 需要에 미치지 못한 것은 스테비아 栽培가 旱魃과 霜다 等の 自然的 氣候條件에 依해 그 生産量이 크게 영향을 받기 때문이며 이 點이 스테비아葉 生産에 가장 큰 問題로 지적되고 있다⁽²⁾.

이러한 自然的 氣候條件을 脫皮하여 植物組織을 利用한 callus 培養에 依한 植物의 生産機能 開發을 爲한 研究의 일환으로 最近 微生物工學에 導入된 各種 技術을 高等植物 細胞에 適用하므로써 有用組織이나 細胞를 多量 培養하고자 하는 研究가 先進 各國에서 활발히 進行되고 있다⁽³⁻⁶⁾. Callus 培養에 依한 有用 植物 組織 細胞의 多量培養에 成功한 例를 보면 당근^(7,8), 박하⁽⁹⁾, 은행⁽¹⁰⁾ 및 대두^(11,12) 等を 들 수 있으며, 담배의 경우는 噸單位의 텡크 培養이 10日 以內에 完了되며 nicotine의 生成量도 培養條件에 따라 人爲的으로 調節할 수 있으므로 關係分野에 많은 注目을 받고 있다⁽¹³⁾. 그 以外에도 아미노산⁽¹⁴⁾, 酵素⁽¹⁵⁾, 天然色素^(16,17) 等の 有用成分의 生成에 關한 研究報告가 많다.

그러나 스테비아의 callus 培養에 關한 研究가 國內에서는 거의 시도되어 있지 않으므로, 著者들은 stevia callus 培養에 關한 基礎的 調查를 行할 目的으로, 먼저 스테비아葉 組織으로부터 callus를 誘起한 後 이들 callus를 容器內에서 培養한 다음 甘味物質인 stevioside의 生成能을 調查하였으므로 그 結果를 報告한다.

材料 및 方法

材料 本實驗에 使用한 callus誘起用 材料는 大邱근 교에서 栽培되고 있는 스테비아葉 部分을 使用하였으며, 葉의 殺菌은 0.1% 승홍수와 70% 에탄올로 行한 후 殺菌 증류수로 3回 洗滌하여 callus 誘起用 試料로 使用하였다.

Callus誘起 및 培養 條件 callus誘起 및 增殖用 培地는 Linsmarier-Skoog 基本培地를 使用하였으며 (Table 1) 이 基本培地에 cytokinine類로서 kinetin과 benzyleadenine(BA), 그리고 auxin類로서 α -naphthaleneacetic acid(NAA), 2,4-dichlorophenoxy acetic acid(2,4-D) 및 3-indoleacetic acid(IAA)를 各各 10^{-4} ~ $10^{-7}M$ 이 되게 添加하여 pH 5.6으로 調整하여 한천 1.5%와 蔗糖 3%를 添加하였다.

Callus의 誘起 및 成長 狀態는 各 處理區別로 培養液을 넣은 100 ml 삼각플라스크에 스테비아葉 切片을 移植한 후 25°C 恒온기 光照射下에서 培養하면서 callus 誘起狀態와 成長狀態를 관찰, 測定하였으며 成長狀態

Table 1. Medium composition for *Stevia rebaudiana* Bertoni basal medium(Lismaier and Skoog RM 1964)

(Unit: mg/l)

NH ₄ NO ₃	1650	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
KNO ₃	1900	KH ₂ PO ₄	0.17
H ₃ BO ₃	6.2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.4	Na ₂ EDTA	37.3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8
KI	0.83	Myo-inositol	100
Na ₂ McO ₄ ·2H ₂ O	0.25	Thiamine-HCl	0.1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	Final pH	5.6
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025		

는 5日 간격으로 測定하여 增殖된 callus의 生體 重量으로 表示하였다.

얇은 막 크로마토그래피에 依한 stevioside의 同定 培養 callus가 生成한 stevioside의 抽出과 同定은 Kohda 等⁽¹⁸⁾의 方法에 依하여 行하였다. 即 培養 callus을 一定量(50 g) 取하여 10倍量의 40% 메탄올로 3回 抽出, 濾過한 後 감압농축하여 少量의 증류수에 溶解시켰다. 이 抽出溶液을 에틸에테르로 洗滌한다음, *n*-부탄올로 3回 抽出한후 감압농축하였다. 이 抽出液을 silica gel G plate에 spot한 後 CHCl₃ : MeOH : H₂O(30 : 20 : 4)를 展開溶媒로하여 展開시켰으며 發色劑는 10% H₂SO₄를 使用하였다.

Stevioside의 定量 三橋 等의 方法⁽¹⁹⁾에 따라 stevia callus(50 g)와 스테비아葉(10 g)을 取하여 삼각플라스크에 넣고 40% 메탄올을 10~25倍量 加한후 冷却 管을 달고 70°C에서 2時間 抽出後 濾過한뒤 감압농축하여 少量의 40% MeOH에 녹인후 TLC-FID analyzer (IATRON 社, model TFG-10)의 分析用 試料로 삼았다. 標準物質로서는 精製한 stevioside⁽²⁴⁾와 rebaudioside (農漁村開發公社 食品研究所 精製品)를 使用하였으며 stevioside 및 rebaudioside A 約 500 mg을 칭량하여 少量의 에탄올과 증류수에 녹여 100 ml로 定容하여 냉 藏고에 保管하면서 標準溶液으로 사용하였다. 앞서 準備한 培養 callus 抽出液과 標準液 1~5 μ l를 microsyringe로 取하여 TLC-FID analyzer用 glass rod에 spot한 後 105°C에서 5~10分間 乾燥하여 展開槽에 넣고 CHCl₃ : MeOH : H₂O(65 : 30 : 10)을 展開溶媒로 하여 60~80分間 展開하였다. 전개가 끝난 glass rod는 105°C에서 乾燥한後 TLC-FID analyzer에 依해 分析하였으며, 얻어진 stevioside와 rebaudioside A의 크로마토그램은 적분곡선의 높이를 求하여 標準곡선에 依해 그 含量을 求하였다.

結果 및 考察

Callus 誘導

스테비아葉 組織으로부터 callus를 誘起하기 爲하여 Linsmaier-Skoog 基本培地에 몇 가지의 植物成長調節物質을 種類別 및 濃度別로 處理하여 callus 誘起狀態를 調査한 結果 Table 2에서 나타난 바와 같이 benzyl-

Table 2. Effect of growth regulators on the induction of stevia callus

BA (M)	Auxin(M)												
	None	NAA				2,4-D				IAA			
		10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10 ⁻⁷	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10 ⁻⁶	—	—	±	±	±	—	+	±	—	—	—	—	—
10 ⁻⁵	—	—	±	—	—	—	±	—	—	—	—	—	—
10 ⁻⁴	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Degree of callus formation: —, no; ±, poor; +, fair; ±, good; ±, excellent

adenine 單獨 處理區 및 NAA, 2,4-D, IAA 등의 auxin 單獨處理區에서는 callus가 誘起되지 않았으며, benzyladenine과 NAA 및 2,4-D을 混合한 培地에서 callus 誘起가 일어났으며 그中 benzyladenine과 NAA를 混合한 培地에서 callus 誘起狀態가 가장 良好하였으며 이들의 濃度는 benzyladenine 10⁻⁶M과 NAA 10⁻⁵M 을 含有한 培地가 가장 좋은 誘起狀態를 나타내었다 (Fig. 1).

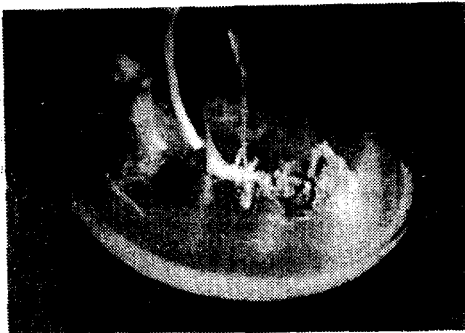


Fig. 1. Stevia callus induced on the Linsmaier-Skoog basal medium containing benzyladenine 10⁻⁶M and NAA 10⁻⁵M

지금까지 몇 가지 植物에 있어서 callus 誘起에 미치는 植物成長調節物質의 影響을 보면 高추 人蔘 等の 경우, cytokinin類로서 kinetin이 效果的이었으며 auxin類로서는 2,4-D 등이 效果的이었다는 報告가 있으나 (20-22), 본실험에서는 benzyladenine과 NAA가 더 좋은 效査를 나타내었다.

Callus의 成長

앞에서 誘起된 callus의 成長狀態를 調査하기 爲하여 callus 일정량(2g)씩을 無菌의으로 取하여 benzyladenine 10⁻⁶M과 NAA 10⁻⁵M을 含有한 培地에 移植

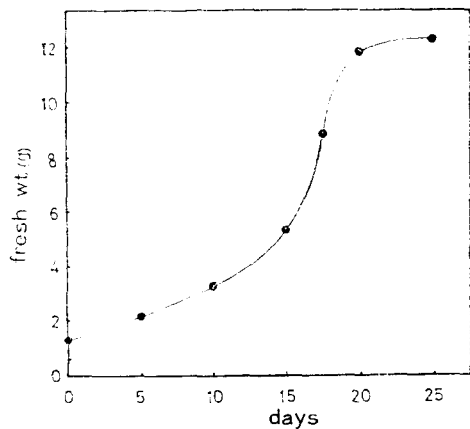


Fig. 2. Time course of callus growth in the Linsmaier-Skoog medium containing benzyladenine 10⁻⁶M and NAA 10⁻⁵M

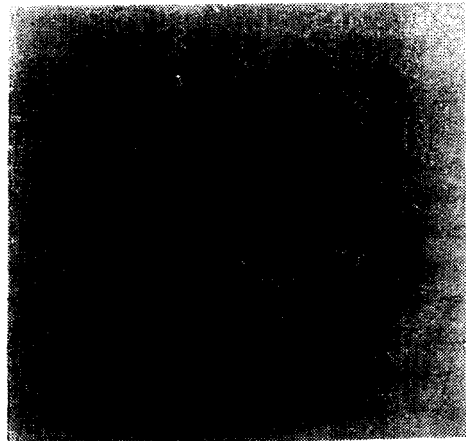


Fig. 3. Stevia callus grown on the Linsmaier-Skoog basal medium containing benzyladenine 10⁻⁶M and NAA 10⁻⁵M

하여 25日間 25°C에서 培養하면서 5日 간격으로 callus 増殖을 調査한 結果, 移植後 7日까지는 完단한 増殖을 나타내었으나 15日부터 20日 사이에 급격한 増殖을 나타내었다(Fig. 2 및 Fig. 3).

Stevia callus의 stevioside 生成

앞에서 誘起, 培養한 callus가 stevioside을 生成하는 지를 調査하기 爲해 培養 callus 및 스테비아葉 抽出物을 얇은막 크로마토그래파로 分析하여 Fig. 4와 같은 結果를 얻었다.

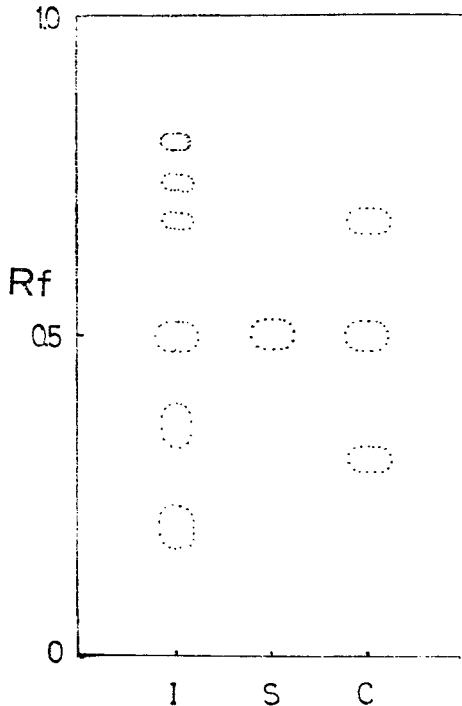


Fig. 4. Thin layer chromatogram showing the separation of stevioside from stevia I, intact stevia; S, standard stevioside; C, cultured callus

即 培養 callus 및 stevia葉의 抽出液으로부터 다같이 Rf 0.50의 크로마토그램이 얻어졌으며, 이는 精製한 stevioside의 Rf값과 同一하였다. Callus 抽出物에서는 stevioside 以外에 未同定의 Rf값 0.31과 0.68의 크로마토그램이 檢出되었다.

Callus誘起用 材料로 使用된 스테비아葉의 抽出液에서는 stevioside 以外에 rebaudioside A로 同定된 Rf값 0.36의 크로마토그램과 未同定의 Rf값 0.21, 0.68, 0.74 및 0.80의 크로마토그램이 檢出되었다.

培養 callus가 生成한 stevioside를 TLC-FID analyzer로 分析한 結果 callus 乾物重當 0.26%이었으며, rebaudioside A는 檢出되지 않았다. 한편 callus 誘起에 使用한 스테비아葉中에 含有된 stevioside量은 乾物

重當 stevioside가 2.9%이었으며, rebaudioside A가 2.8%로서 total stevioside 함량은 5.7%이었다.

지금까지 各種植物의 callus培養에 關한 報告에서, 原植物이 含有한 有用成分을 培養細胞가 生成한 例를 보면 담배의 nicotine⁽¹³⁾, 人蔘의 사포닌類⁽²³⁾ 컴프리葉의 glutamin⁽¹⁶⁾, 고추의 capsaicin⁽²¹⁾ 등이 있으나, 그렇지 않은 경우도 많다^(5,6). 本實驗에서 行한 스테비아 培養 callus가 스테비아葉中에 함유된 stevioside을 生成한 것은 매우 흥미있는 일이며 그 生成量이 스테비아葉中에 함유된 量보다 적은 量이지만, 이는 앞으로 callus의 培養조건 등을 檢討함으로써 stevioside 生成量을 增加시킬 수 있을 것으로 기대된다.

要 約

Stevia葉 組織에서 callus의 誘起 및 培養을 爲한 條件을 調査하고 이들 培養 callus가 甘味成分인 stevioside를 生成하는지를 調査하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

Callus誘起에는 Linsmaier-Skoog基本培地에 benzyladenine 10⁻⁶M과 α-naphthalene acetic acid 10⁻⁵M을 含有한 培地가 가장 效果의이었으며 callus의 成長率도 비교적 良好하였으며 이들 callus는 培養後 15日부터 20日 사이에 가장 빠른 成長率을 나타내었다.

Stevia callus가 生成한 stevioside는 TLC에 依해 同定하였으며, 이는 精製한 標準品の stevioside와 同一한 Rf값인 0.50을 나타내었다. 또한 stevioside을 TLC-FID analyzer에 依해 分析한 結果, 培養 callus 乾物重 100 g當 260 mg이었다.

謝 意

本 研究는 産學協同財團 學術研究補助로 이루어졌으며, stevioside 精製品을 제공하여 주신 嶺南大學校 理科學 化學科 李相稷 교수에게 감사드립니다.

文 獻

1. Wood, H. B., Jr., Allerton, R., Diehl W. and Fletcher, G.: *J. Org. Chem.*, 20, 875 (1975)
2. 徐奇奉: 食品科學, 12(1), 38 (1979)
3. 大澤勝次: 化學と生物, 15, (9), 559 (1977)
4. Nickell, L. G.: *Science*, 187, 457 (1975)
5. 原田宏, 山田康之, 古谷力: 組織培養, 1(3), 109 (1975)
6. 田端守, 平岡昇: 組織培養, 1(3), 120 (1975)

7. Byrne, A. F. and Koch, R. B.: *Science*, **135**, 215 (1961)
8. Byrne, A. F.: *In Activities Report* 14, Armed Forces Food and Container Institute, Chicago. p.177 (1962)
9. Wang, C. and Staba, E. J.: *J. Pharm. Sci.*, **52**, 1058 (1963)
10. Tulecke, W. and Nickel, L. G.: *J. Pharm. Sci.*, **130**, 863 (1959)
11. Kaul, B. and Staba, E. J.: *J. Pharm. Sci.*, **150**, 1731 (1965)
12. Kaul, B. and Stabu, E. J.: *Planta Medica*, **15**, 145 (1967)
13. Takahashi, M. and Yamada, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 1755 (1973)
14. Tanaka, H., Machiya, Y., Tanaka, H., Murai, N. and Misawa, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 987 (1974)
15. Ukita, M., Furuya, A., Tanaka, H. and Misawa, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 2849 (1973)
16. Anstis, B. J. P. and Northcote, D. H.: *Planta* (Berl.), **116**, 105 (1974)
17. Sugano, N., Iwata, R. and Nishi, A.: *Phytochem.*, **14**, 1205 (1975)
18. Kohda, H., Kasai, R., Yamasaki, K., Murakami, K. and Tanaka, O.: *Phytochem.*, **15**, 851 (1976)
19. 三橋博, 上野純子, 住田哲也: *藥學雜誌*, **95**(12), 1501 (1975)
20. 李甲郎, 朴正隆, 岩井和夫: 嶺南大學校 食糧資源開發 論文集, **1**(1), 23 (1977)
21. 李甲郎, 崔奉順: 嶺南大學校 天然物化學研究所報告, **7**(1), 1 (1980)
22. 李載斗: *韓國生藥誌*, **3**(2), 65 (1972)
23. 李甲郎, 崔奉順, 吳景淑: 嶺南大學校 論文集, **14**, 315 (1980)
24. 李相稷, 李甲郎, 朴正隆, 金光秀, 蔡範錫: *韓國食品科學會誌*, **11**, 224 (1979)