

식물조직배양에 의한 배초향유의 생산

신 순 희 · 김 혜 경 · 지 형 준
덕성여자대학교 약학대학 · 서울대학교 생약연구소*

Production of Giant Hyssop Oil by Plant Tissue Culture

Soon-Hee Shin, Hae Kyung Kim and Hyung Joon Chi*

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714 and

*Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

Abstract—Callus was derived from the seedlings of *Agastache rugosa* (Labiatae). The growth rate of callus and the production of essential oil were studied with the variation of culturing conditions. 2, 4-D 2 ppm in the medium was more effective for the production of essential oil than NAA 2 ppm. The growth rate of callus and the production of essential oil were inhibited by the illumination of the light. The essential oils from *Agastache rugosa* and the callus cultivated on the medium containing 2, 4-D 2 ppm and kinetin 0.2 ppm were analysed by TLC, gas chromatography and mass spectrometry. These two oils showed different compositions. The main component of the plant oil, methyl chavicol was not contained in the callus oil.

Keywords—*Agastache rugosa* · Labiatae · tissue culture · essential oil · methyl chavicol · growth regulators · cinnamic acid · mevalonic acid lactone

배초향(排草香 · *Agastache rugosa* O. Kuntze)은 꿀풀과에 속하는 다년생 초본으로 우리나라에 자생하며 재배되기도 한다.¹⁾ 한방에서는 배초향의 잎을 토곽향(土藿香)이라 하며 중국산 광곽향(廣藿香 *Pogostemon cablin* Benth.)과 함께 곽향(藿香)이라는 이름으로 통용되고 있다.²⁾ 곽향의 약리작용으로는 지사(止瀉) 제토(除吐) 해열(解熱) 항진균(抗真菌) 담낭수축(膽囊收縮) 작용 등이 알려져 있으며 특히 위액분비를 촉진하고 소화력을 증진시키는 작용이 강하여 위장 기능이 저하되는 여름철에 많이 쓰여지며 곽향정기산(藿香正氣散) 불환금정기산(不換金正氣散) 향사육군자탕(香砂六君子湯) 등에 배합된다.³⁻⁵⁾ 배초향의 성분으로는 flavonoid^{6,7)} 및 정유가 약려져 있으며 그외 이 식물의 지하부로부터는 수종의 triterpenoid가 보고된 바 있다.^{8,9)}

정유의 함량은 약 0.23%이며 그중 80%가 methyl chavicol로 되어 있으며 그외 anethol, anisaldehyde, α -limonene, ρ -methoxy cinnamic aldehyde, α -pinene, β -pinene, 3-octanone, 3-octanol, ρ -cymene, 1-octen-3-ol, linalool, *l*-caryophyllene, β -elemene, β -humulene, α -ylangene, β -farnesene, γ -cadinene, calamene 등이 확인되었다.¹⁰⁻¹²⁾

본 연구에서는 조직배양의 방법으로 배초향 정유를 생산하기 위하여 배초향의 어린싹에서 캘러스를 유도한 후 여러 조건에서 배양하여 식물생장조절물질, 정유생합성 전구물질의 첨가와 배양온도, 광선 등의 배양조건이 캘러스의 생장 및 정유생성에 미치는 효과를 실험하여 적정배양조건을 찾았으며 캘러스에 생성된 정유의 조성을 배초향 식물 정유와 비교하여 지견을 얻었

기에 보고한다.

실험방법

기기—GC-MS는 Hewlett Packard 5985 B GC-MS system으로 OV-101 fused silica capillary column (0.2 mm i.d.×25 m)을 사용하여 측정하였다. UV-visible spectrum은 double beam Pye Unicam SP-100으로 hexane (0.01%)을 용매로 400 nm에서 200 nm까지 연속측정하였고 IR은 Perkin-Elmer 1,310 IR spectrophotometer(KBr thin film method)로 측정하였다.

식물재료—배초향은 경기도 시흥시 서울대학교 생약연구소 생약재배시험장에서 재배한 것을 개화기(8월)에 지상부를 채취하여 정유분석용으로 사용하였고 조직배양용 종자는 11월에 채취하였다. 시판배초향은 서울 경동한약상가에서 구입하여 비교분석용으로 사용하였다.

총정유의 추출 및 분석—계대배양하여 얻은 캘러스 덩이와 배초향 식물 및 시판배초향을 상법에 따라 수증기 증류하여 총정유를 얻고 TLC는 Kieselgel 60F₂₅₄(Merk)상에 n-hexane : dichloromethane(1:1)로 전개시킨 후 anisaldehyde-H₂SO₄로 발색시켰다. Column chromatography에서는 흡착제로 Kieselgel 60(70~230 mesh ASTM Merk)를 사용하고 n-hexane 및 dichloromethane으로 용출시켰다.

조직배양실험

배지의 조제 : Murashige and Skoog medium (MS medium)에 casein acid hydrolysate 2g을 첨가한 후 성장조절제로 2,4-D 2 ppm, kinetin 0.2 ppm을 첨가한 a배지와 NAA 2 ppm, kinetin 0.2 ppm을 각각 첨가한 b배지를 각각 조제하였다.

캘러스의 유도 및 계대배양 : 배초향의 완숙한 씨를 멸균증류수로 세척한 후 상법에 따라 발아시킨 후 어린싹을 멸균처리하여 a배지상에서 4~6주간 캘러스를 유도시켰다(27±2°). 생성된 캘러스를 같은 조건하에서 계대배양하였다.

정유 생성능에 미치는 영향 : a배지와 b배지에 캘러스를 배양하여 배양온도(26°, 29°, 31°), 광선(암소, 500 lux)에 따른 정유생성량의 변

화를 측정하였으며 또한 a배지에 정유 생합성의 전구체인 pyruvic acid, phenylalanine, cinnamic acid, shikimic acid를 각각 0.01%씩을 첨가한 배지를 조제하여 정유생성량을 비교하였다.

실험 결과 및 고찰

배양조건이 캘러스의 증식에 미치는 영향

NAA 2 ppm과 kinetin 0.2 ppm을 가한 b배지에서의 캘러스의 증식속도가 2,4-D 2 ppm과 kinetin 0.2 ppm을 가한 a배지에 비하여 현저히 빠른 것으로 나타났고, 광선(백색형광등 500 lux) 조사는 캘러스의 증식을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 1).

한편 캘러스를 a배지에서 26°, 28°, 31°에서 각각 배양하여 비교한 결과 28°에서 배양한 캘러스의 증식이 다른 온도 조건에 비해 5배 이상 빠름을 알 수 있었다(Fig. 2).

또한 a배지에 정유 생합성의 전구체로 알려진 pyruvic acid, cinnamic acid, shikimic acid 0.1% 첨가는 캘러스의 성장을 억제하였다(Fig. 3).

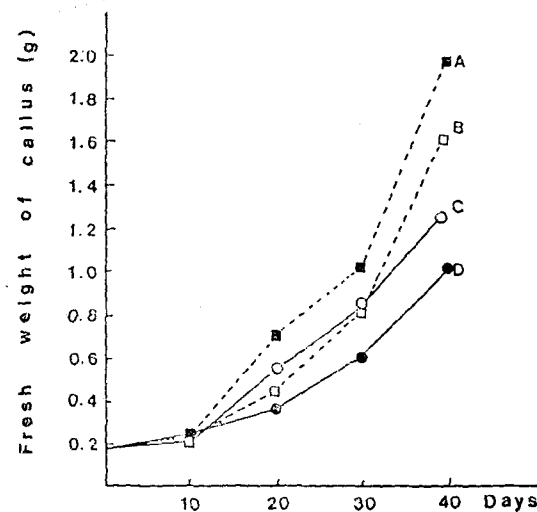


Fig. 1. The effects of light and growth regulators on growth of callus.

- A; on medium b in the dark,
- B; on medium b under illumination
- C; on medium a in the dark,
- D; on medium a under illumination.

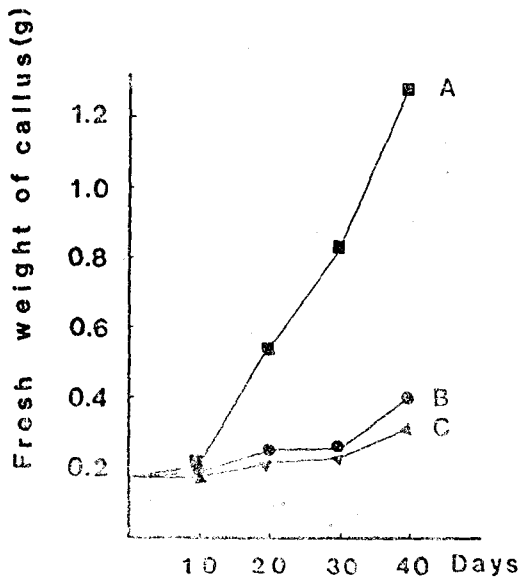


Fig. 2. The effects of culturing temperature on growth of callus.
A: 28°, B: 26°, C: 31°.

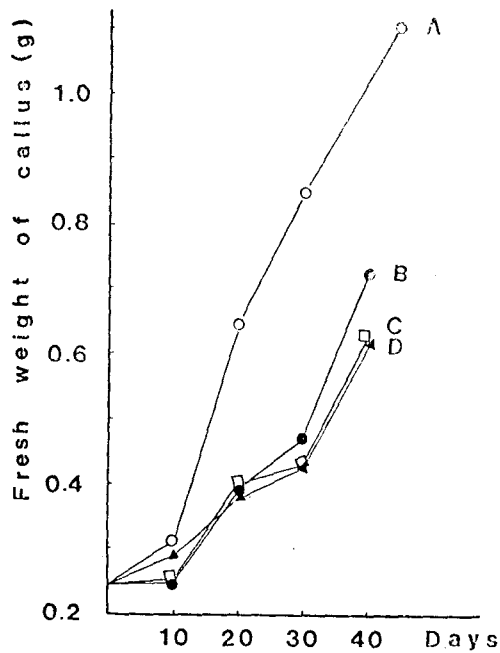


Fig. 3. The effects of biosynthetic precursors on growth of callus.
A: control (medium a), B: on medium containing 0.01% phenylalanine, C: on medium containing 0.01% cinnamic acid, D: on medium containing 0.01% pyruvic acid.

캘러스의 정유생성량

a배지와 b배지를 사용하여 암소에서 40일간 배양한 캘러스에 생성 축적된 총정유생성량을 측정한 결과 2,4-D첨가(a배지)의 경우 0.03%, NAA첨가(b배지)의 경우 0.01%의 정유생성율을 보였다. 500 lux의 광선조사는 캘러스의 정유생성율에 별다른 영향을 주지 못하는 것으로 나타났다. 정유생합성의 전구체가 정유생성율에 미치는 영향을 실험한 결과 정유생합성의 전구체 첨가는 전반적으로 캘러스의 정유생성율을 높여 주었다. a배지를 사용하여 온도를 27 ± 2°로 조절시킨 후 암소에서 배양한 캘러스 (control group)에서의 정유생성율이 0.03%인데 비해 pyruvic acid 첨가시 0.08%, phenyl alanine 첨가시 0.07%, cinnamic acid 첨가시 0.06%, mevalonic acid lactone 첨가시 0.06%로 나타났다.

총 정유의 분석 및 비교

재배한 배초향의 지상부를 수증기 증류하여 얻은 정유 및 성장조절제로 2,4-D 2 ppm 및 kinetin 0.2 ppm을 첨가한 배지(a배지)에서 배양한 캘러

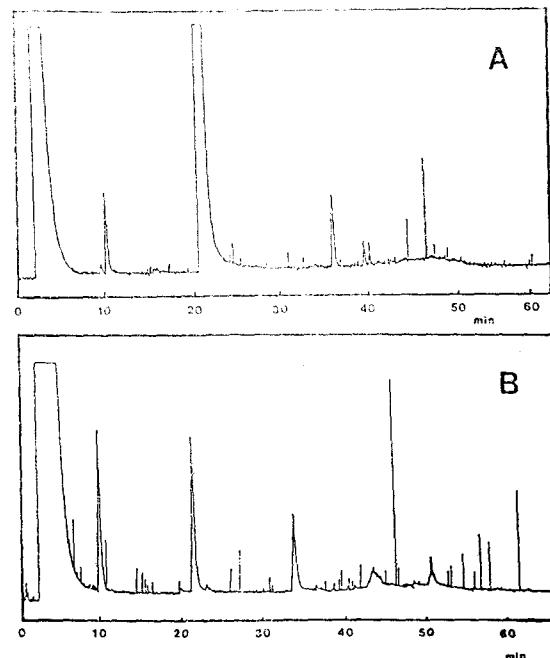


Fig. 4. Gas chromatograms of total essential oils from the aerial parts(A) and the callus mass(B) of *Agastache rugosa*.

스에서 얻은 정유를 gas chromatography로 비교한 결과 광향식물 정유의 GC-chromatogram(Fig. 4, A)에서 retention time 21.5 min에 나타난 methyl chavicol¹³⁻¹⁵⁾의 peak가(GC-MS로 확인) 같은 조건으로 측정된 켈러스 정유의 chromatogram(Fig. 4, B)에는 나타나지 않았으며 켈러스 정유의 경우 10.0 min, 22.1 min, 34.0 min에 주요성분들의 peak가 있었으며 GC-MS로 분석한 결과 켈러스정유의 조성은 광향식물정유와 전혀 다를 수 있었다.

결 론

배초향의 어린 싹에서 켈러스를 유도하여 배양조건에 따른 켈러스 증식속도의 변화 및 정유생성을 비교 실험한 결과 성장조절제로 2.4-D 2 ppm과 kinetin 0.2 ppm을 가하고 28°에서 암소배양하는 것이 켈러스의 정유생성효율을 높이는 데 가장 유리한 것으로 나타났다.

정유생합성 전구체의 첨가는 켈러스의 증식을 억제하였으나 단위무게당 정유 생성효율을 증가시켰다.

켈러스에 생성된 정유는 배초향 식물의 정유와는 다른 조성을 나타냈는데 배초향 식물정유의 주 성분인 methyl chavicol이 켈러스에는 생성되지 않았다.

감사의 말씀—이 연구는 1989년도 문교부 학술연구조성비(유전공학분야)에 의하여 이루어졌으며 연구비의 일부를 지원한 서울대학교 및 덕성여자대학교에 감사드립니다.

〈1991년 4월 20일 접수 : 5월 20일 수리〉

문 헌

1. 이창복 : 대한식물도감, 향문사, 서울, p. 649, (1980).
2. 難波恒雄 : 原色和漢藥圖鑑(下), 保育社, 大阪 p. 58, (1980).
3. 高木敬次郎, 木村正康, 原田正敏, 大塚恭男 : 和漢藥物學, 南山堂, 東京, p. 265 (1982).
4. 陳存仁 : 漢方醫藥大事典, 講談社, 東京, p. 358 (1982).
5. 江蘇醫院 編 : 中藥大辭典(下), 上海科學技術出版社, p. 2710 (1982).
6. Itokawa, H., Suto, K. and Takeya K.: *Chem. Pharm. Bull.* 29, 1777 (1981).
7. Vogelmann, J.E.: *Biochem. Syst. Ecol.* 12(4), 363 (1984).
8. 한대석 : 생약학회지 18, 50 (1987).
9. 한대석 : 생약학회지 19, 97 (1988).
10. Fujita, S. and Fujita, Y.: *Yakugaku Zasshi* 92, 908 (1972).
11. 恩田治 : 香科化學總覽(1), 廣川書店, p. 353 (1980).
12. Hsu, H.Y., Chen, Y. and Hong, M.: *The Chemical Constituents of Oriental Herbs*, Oriental Healing Arts Institute, 131, 240, 577, 611, 612 (1982).
13. Stenhagen, E., Abrahamsson, S. and Mclafferty, F.W.: *Registry of Mass Spectral Data* (1), John Wiley and Sons, p. 373 (1973).
14. Masada, Y.: *Analysis of Essential Oils by Gaschromatography and Mass Spectrometry*, Hirokawa Publishing Company, Inc., p. 4 (1975).
15. Jennings, W., and Shibamoto, T.: *Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Gas Chromatography*, Academic Press, p. 47 (1980).