

## 마늘의 Callus 배양과 Alliin 생성에 관한 연구

이갑랑 · 김준희 · 박동철

영남대학교 식품영양학과

## Studies on the Callus Culture of Garlic and the Formation of Alliin

Kap-Rang Lee, Jun-Hee Kim and Dong-Cheol Park

Dept. of Food and National University, Gyongsan 713-749, Korea

### Abstract

This study was conducted to find out the effect of various plant hormones on the growth of garlic callus and to determine the effects of sulfur and nitrogen on the formation of alliin. The following results were obtained. The callus was grown effectively on the basal Linsmainer and Skoog medium supplemented with  $10^{-6}$ M of kinetin and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. When alliin produced by callus were extracted and identified by PPC, alliin appeared to have Rf value 0.21 in PPC which was exactly same as standard and it gave a deep red color by Grot's reagent. The highest amount of alliin which is produced in callus culture was 270mg per 100g of dry weight in the basal Linsmaier and Skoog medium supplemented with 100% of  $\text{NO}_3^-$  as a nitrogen source.

### 서 론

마늘(*Allium sativum* L.)은 일반적으로 널리 분포되고 있는 식물로서 옛날부터 동양에서는 향신 조미료로써 많이 사용되어 오고 있다. 한편, 마늘은 오랫동안의 영양번식에 의하여 virus감염에 의한 구의 퇴화로 수량의 감소를 가져오고, 종자비용이 차지하는 비율이 커서 마늘생산에 있어 문제점이 되어 왔으므로<sup>1,2)</sup> 이러한 문제점을 해결하기 위한 방법으로 최근 많이 이용되고 있는 식물 callus 배양법을 들 수 있다. Callus 배양법은 지금까지의 생물공학에 도입된 각종기술을 적용해서 시험관내에서 무균적으로 배양하는 것이 가능하므로 자연조건에 관계없이 인위적으로 대량생산이 가능하게 될 뿐 아니라, 마늘 callus 및 마늘 생산의 증대를 위한 기초적 연구자료가 될 수 있다<sup>3)</sup>. 근년에와서 세계 각국의 마늘 재배지

에서 virus 무감염종구의 생산을 목적으로 마늘 callus 배양에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있는 실정이다<sup>4,5)</sup>. 본 실험에서는 마늘 조직에서 callus를 유도시켜 이 배양세포가 천연마늘 중의 주성분인 alliin의 생성가능성을 검토하고 기본배지중의 각종 무기질( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ )이 마늘 유효성분인 alliin 생성량에 미치는 영향을 조사하였다.

### 실험재료 및 방법

#### 실험재료 및 callus

본 실험에 사용된 시료 및 배지, callus 유도 방법등은 전보<sup>6)</sup>에서와 같다.

#### 마늘 callus의 최적 배양조건 검토

전보<sup>6)</sup>의 실험에서 유도된 callus의 성장상태를

조사하기 위해 식물성 hormone인 cytokinin류와 auxin류를 농도별로 첨가하여 최적배양조건을 조사하였다.

#### 무기질의 alliin생성에 미치는 영향

유도된 callus 조직을 Linsmaier & Skoog(L & S) 기본배지의 질소원종 질소형태와  $\text{SO}_4^{2-}$  양을 변화시켜 alliin의 함량 변화를 조사하였다. 즉 1군은 L & S medium의 원래조성으로서 배지 1 liter당  $\text{NO}_3^-$  552.10mg,  $\text{NH}_4^+$  288.7mg,  $\text{SO}_4^{2-}$  170.74mg을 함유하게 했으며, 2군은  $\text{NH}_4^+$  840.80mg,  $\text{SO}_4^{2-}$  170.74mg을 함유시키고,  $\text{NO}_3^-$ 는 첨가시키지 않았으며, 3군은  $\text{NO}_3^-$  840.80mg,  $\text{SO}_4^{2-}$  170.74mg을 함유시키고  $\text{NH}_4^+$ 를 첨가시키지 않았으며, 4군은  $\text{SO}_4^{2-}$ 를 전혀 첨가시키지 않고  $\text{NO}_3^-$  552.10mg,  $\text{NH}_4^+$  288.7mg를 함유케 하였고, 5군은  $\text{NO}_3^-$  552.10mg,  $\text{NH}_4^+$  288.7mg,  $\text{SO}_4^{2-}$  512.22mg을 함유케 하여 callus를 배양하여 alliin 생성량을 조사하였다.

#### Alliin의 분리 및 함량측정

Alliin의 추출은 Sugii<sup>7)</sup>의 방법에 따라 마늘 callus에 물을 가하여 10분간 가열하여 효소에 의한 alliin의 분해를 정지시킨 후, 막사사발에서 파쇄한 다음 ethylalcohol의 농도를 70%되게 조절하여 추출여과한 후, 감압 건조시켰다. 그리고 Whatman No. 1 filter paper와 전개용매로서 n-butanol : HAc :  $\text{H}_2\text{O}$ (4 : 2 : 1)를 사용하여 paper

chromatography를 행하였으며, 0.25% ninhydrin과 Grot reagent<sup>8)</sup>로서 발색시켜 표준품과 비교하여 Rf치를 측정하였다. Alliin의 함량측정은 paper chromatography에 의하여 분리하여 절취한 alliin을 Gaind 등<sup>9)</sup>의 방법에 따라 methanol로 추출하여 40°C에서 rotary evaporator로 농축한 후 일정량의 methanol로 녹여 spectrophotometer로 570 nm에서 O.D를 측정하였다. 이와같은 방법으로 조작하여 얻은 표준품의 검량선에 의하여 alliin의 함량을 측정하였다.

#### 결과 및 고찰

##### Callus 성장

전보<sup>6)</sup>의 실험에서 유도된 callus가 적변과 고사현상으로 성장이 불량한 현상을 보였으므로 유도된 callus 배양의 적당한 조건을 조사하기 위하여 각종 hormone를 농도별로 처리한 결과, Table 1에서와 같이 L & S medium에 kinetin  $10^{-6}$  M과 2,4-D  $10^{-6}$  M을 가한 혼합구에서 callus 성장이 가장 양호하였다. 지금까지 몇 가지 식물의 callus 생육에 미치는 식물 hormone의 영향을 보면 고추, 인삼등의 경우, kinetin과 2,4-D가 효과적이었으며 stevia에서는 benzyladenine과 NAA가 효과적이었다고 보고되고 있다<sup>10)</sup>.

##### Alliin의 동정

Sugii<sup>7)</sup>의 방법에 따라 추출한 alliin을 paper

Table 1. Effect of growth regulators on growth of garlic callus

Kinetin (M)	none	Auxin(M)											
		2, 4-D					NAA				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 growth

- no, ± poor, + fair, ++ good, +++ excellent

chromatography로서 동정한 결과 Fig. 1에 나와 있는 것처럼 표준품 alliin과 같은 Rf치 0.21을 나타내었다. 이 부위를 절취하여 70% ethanol로 용출시켜 Grot시약<sup>8)</sup>과 반응시킨 결과 심적색을 나타내었다. 그리고 배양 callus가 생성하는 alliin의 함량은 Gaind 등<sup>9)</sup>의 방법에 따라 파장 570 nm에서 흡광도를 측정하여 표준품 alliin의 검량

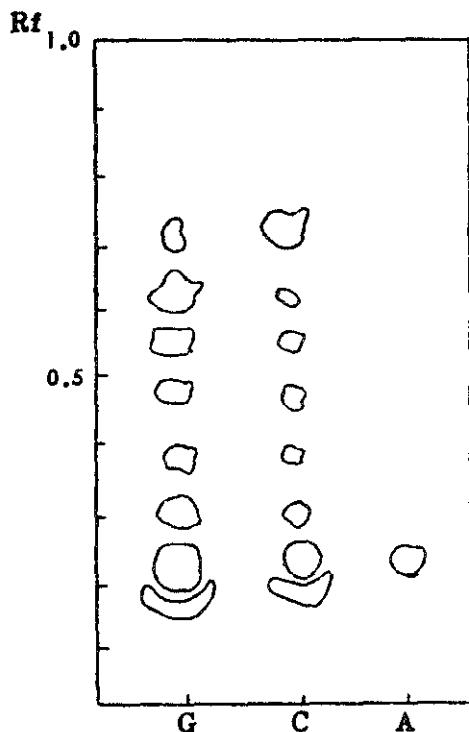


Fig. 1. Paper chromatogram showing the separation of alliin from garlic callus.

G : Intact garlic, C : callus

A : Standard alliin

선에 의해 alliin을 정량하였다.

무기질( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ )이 alliin생성에 미치는 영향

Callus 배양에 필요한 각종 무기질은 L & S medium에서처럼 그 종류가 많으며 이 무기질이 alliin생성에 미치는 영향<sup>11)</sup>은 매우 다양하며, 본 실험에서는  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ 의 비율을 조절함과 동시에 alliin 구성요소로써 중요한  $\text{SO}_4^{2-}$  함량을 변화시켜 alliin생성량을 조사해 본 결과 Table 2와 같았다.

위의 배지에 callus를 배양하여 생성한 alliin을 조사한 결과, 제1군의 alliin 생성량은 배양 callus건물 100g당 175mg이었으며, sulfur를 첨가하지 않은 4군의 alliin생성량은 90mg으로서 가장 낮았다. 한편  $\text{NO}_3^-$  840.80mg,  $\text{SO}_4^{2-}$  170.74mg을 첨가한 3번 group에서 alliin생성량이 가장 많았다.

그리고 sulfur가 alliin생성에 및는 영향을 본 결과, sulfur를 전혀 넣지 않은 4번 group과 L & S 기본배지(1번 group) 조성에서 배양한 callus를 비교하여 보면 sulfur가 alliin 생성에 많은 영향을 미치는 것을 볼 수 있으며, 질소보다는 그 영향이 적은 것으로 나타난다.

이것은 일반적으로 아미노산 대사에는 nitrogen이 절대적으로 필요함을 의미하고, 또 alliin의 생성은 유황화합물을 공급함으로서 증가를 가져올 수 있다는 보고<sup>11)</sup>와 유사한 결과를 나타내었다.

Table 2. Concentration of mineral ions in Linsmaier-Skoog medium

Treatments	Mineral ions( $\text{mM/L}$ )			Alliin content*
	$\text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4^+$	$\text{SO}_4^{2-}$	
1	552.10	288.7	170.74	175
2		840.80	170.74	165
3	840.80		170.74	270
4	552.10	288.7		90
5	552.10	288.7	512.22	255

\* Alliin content was expressed as mg per 100g of dry wt.

## 결 론

마늘조직으로부터 유도된 callus의 성장상태를 시험성 hormone을 첨가하여 조사하고, 이를 callus로부터 L & S 합성배지중의 무기질 조성을 변화시켜 나타나는 alliin 함량변화를 조사한 결과 다음과 같았다.

유도된 callus의 성장은 kinetin  $10^{-6}$ M과 2, 4-D  $10^{-6}$ M을 가한 Linsmaier & Skoog 합성배지에서 가장 잘 자랐다. 마늘 callus가 생성한 alliin은 PPC에 의해 동정하였으며, 이는 정제한 표준품의 alliin과 동일한 Rf값인 0.21을 나타내었다. 또한 이 chromatogram을 추출한 액이 Grot시약에 의해 alliin 특유의 적색반응을 나타내었으므로 alliin으로 동정되었다. Alliin 생성에 미치는 배양액중의 무기질의 영향을 보면, L & S 기본배지에 질소원으로서  $\text{NO}_3^-$ 만을 첨가한 경우가 가장 효과적 이었으며 배양 callus 전물 100g당 270mg이 생성되었다.

## 문 헌

1. 이강희, 김병우, 김준천, 김용기 : 조작배양에 의한 마늘의 부록성양성 및 증식방법에 관한 연구. 건국대 학술지, 제20집(1976)

2. P. Havranek and F. J. Novak, The bud formation in the callus cultures of *Allium sativum*, Z Pflanzenphysiol Bd. 68, 308(1973)
3. 古谷力：第一回組織培養ツソボツウム(東京)(1968)
4. 森寛一, 游屋悦, 次下村, 徹池上雄春：組織培養法によるウイルス 罷病植物の無毒化. 日本農事試験場報告 13 ; 45(1969)
5. 大村敏博, 腸本哲：カルス培養法による無ウイルス植物の育成. 日本植物 病理學會報, 44(3), 387(1979)
6. 장무용, 이갑량, 조수열, 정희돈 : 마늘의 callus배양에 관한 연구, 한국 식물보호학회지, 19(2), 91(1980)
7. Michiyasu Sugii, Tomoji Suzuki, Toshio Kaki-moto and Jyoji Kato : Stdies on the sulfur-containing amino acids and the related compounds in garlic. (1). J. Pharm. Soc. Japan, 246 (1964)
8. I. W. Grote, J. Biol. Chem. 93, 25(1931)
9. M. N Gaind, R. N. Dar, and S. D. Popil : Determination of alliin in garlic. Indian J. Pharm, 27(7), 19(1965)
10. 이갑량, 박정룡, 최봉순, 한재숙, 오상룡, 山田康之 : 신감미자원물질 스테비아의 callus 배양과 stevioside생성에 관한 연구, 한국식품과학회지, 14(2), 179(1982)
11. 조수열 : 마늘유효 성분의 무기영양소에 의한 인위적 조절에 관한 연구, 한국영양식량학회지, 3(1), 83(1974)

(1990년 9월 5일 접수)