

高麗人蔘 (*Panax ginseng* C. A. Meyer) 培養細胞의 生育 및  
窒素吸收에 미치는 Ammonium Citrate 와  
Ammonium Succinate 의 影響

金洪成 · 金明苑 · 蘇祥燮 · 康榮熹  
(延世大學校 理科學科 生物學科)

The Effects of Ammonium Citrate and Ammonium Succinate  
on the Growth of Cells and Nitrogen Absorption  
in Korean Ginseng Suspension Cultures

Kim, Hong Seong, Myong Won Kim, Sang-Sup So and Young Hee Kang  
(Department of Biology, Yonsei University, Seoul)

ABSTRACT

In order to investigate the effects of ammonium citrate and ammonium succinate on the growth and absorption of nitrogen compounds supplied in the medium, Korean ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) calli were suspension cultured in MS medium with various concentrations of ammonium citrate and ammonium succinate.

When Korean ginseng calli were cultured with 10 mM ammonium citrate, 10 mM ammonium succinate, and 10 mM ammonium nitrate (control) in MS media as the nitrogen sources, the growth,  $\text{NO}_3\text{-N}$  absorption and total nitrogen content of the Korean ginseng cells were greatest in the ammonium citrate and ammonium succinate concentrations. When Korean ginseng calli were cultured with 5 mM ammonium citrate and 5 mM ammonium succinate, the growth and nitrogen content were superior to those of the control: however,  $\text{NO}_3\text{-N}$  and  $\text{NH}_4\text{-N}$  absorptions were similar to those of the control. In conclusion, the 10 mM ammonium citrate and 10 mM ammonium succinate may be better able to facilitate the growth and  $\text{NO}_3\text{-N}$  utilization and uptake than 5 mM ammonium citrate and 5 mM ammonium succinate concentrations. The concentrations of ammonium citrate and ammonium succinate may be varied in order to obtain the desired effects to facilitate the growth of the ginseng callus.

서 론

인삼에 대한 연구는 그의 약효성분에 대한 논의를 위시하여, 그에 따른 약리적 연구 및 재배의 합리화에 관하여 많은 조사 연구를 거듭하고 있는 실정이다.

인삼의 조직배양은 1967년 Butenko 가 처음 보고한 이래 국외에서는 Kita and Michiyasu (1969), Furuya *et al.* (1970), Staba (1974) 등이, 국내에서는 Lee (1972), Kang (1978) 등이 종래의 기존배지에서 식물 호르몬을 조절하면서 생육량의 차이를 비교한 바 있다. 본연구실에서도 계속 배양하고 있으나 타 식물에 비해 callus의 증식속도가 대단히 느리며 비록 이러한 현상은 인삼 특유의 유전적 현상이라고 할 수는 있으나 보다 적절한 배지의 개발을 위하여 인삼 특유의 영양요구도나 최적배지조성 및 배양조건을 찾음으로서 증식속도를 증가시킬 수 있을 것이라고 생각된다.

특히 최근에는 배양세포의 생육속도를 더욱 증가시키기 위해서 배지내 질소원으로서는 상기의 무기태 질소 뿐만 아니라 유기태 질소 즉, glutamine, asparagine 등의 아미노산도 식물의 종류에 따라서 좋은 질소원으로 사용될 수 있다는 보고가 나와 있으며 (Behrend and Mateles, 1976; Salonen and Simola, 1977; Kang and Lee, 1977), Gamborg (1970), 小島 및 大平 (1976) 등의 보고에 의하면 크렙스회로의 중간대사산물인 citrate, succinate, malate 등의 유기산을 암모니움염으로 배지에 공급했을 때 더욱 효과적인 질소원이라는 것이 밝혀져 있다.

따라서 본 실험은 인삼배양세포의 생육에서 크렙스회로 중간대사산물들의 질소원으로서의 효과를 조사하기 위하여 ammonium citrate와 ammonium succinate를 사용하여 인삼 배양세포의 생육과 N의 함유율의 변화를 조사하고, 또한 공급한 질소원중 질산태 질소와 암모니아태 질소의 흡수상태를 조사하였다.

### 재료 및 방법

본 실험에서 사용한 callus는 5년근 인삼의 엽병을 사용하였다.

채취한 실험재료는 엽병 기부에서부터 5~10 mm 정도로 절단하여 70% ethyl alcohol에서 1분, 6~7% calcium hypochlorite 수용액에서 5~6분 멸균하고 살균수로 3회 세척한 뒤 접종 배양하였다. 온도는 25°C에서 암배양했으며 배양후 4~5주마다 6회 계대배양하여 생육상태가 양호한 부분을 Murashige and Skoog (MS) 배지에 1주일 suspension하여 stock culture로 사용하였다. Succinate와 citrate의 callus 증식에 대한 효과를 보기 위하여 MS 배지의 ammonium nitrate 대신에 ammonium succinate와 ammonium citrate를 각각 10 mM, 5 mM 씩 첨가하여 1주일간 배양하였다(25°C, dark, 120 rpm).

생육조사는 각각 2, 4, 6일에 시료를 여과지(Toyo No. 2)에 여과하여 80°C에서 3시간 dry하고 건물중을 측정하였으며 배양액의 잔존 질소량의 변화는  $\text{NH}_4\text{-N}$  정량에 nessler 시약에 의한 비색법,  $\text{NO}_3\text{-N}$  정량에 phenol sulfonic acid method로 각각 정량하였다. 그리고 전질소량은 microkjeldahl method에 의해 측정하였다.

### 결과 및 고찰

생육조사. Citrate와 succinate의 인삼배양세포에 미치는 효과를 알기 위하여 MS 배지에 ammonium nitrate 대신에 ammonium succinate와 ammonium citrate를 각각 10 mM 첨가하여 배양세포의 증식율을 조사하였던 바 Fig. 1과 같다. 또한 ammonium succinate와 ammonium citrate를 각각 5 mM 씩 첨가했을 때의 증식율 변화는 Fig. 2와 같다.

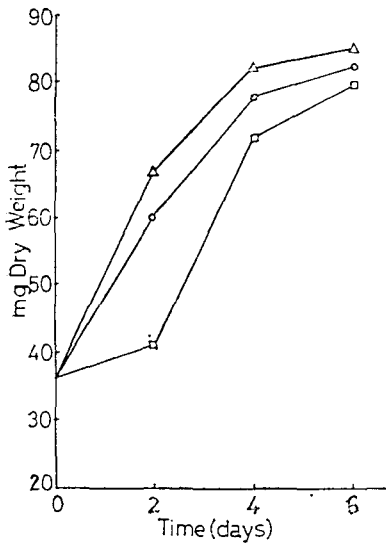


Fig. 1. Effects of ammonium citrate on the growth of the ginseng suspension cultured cells. □—□, Control; △—△, Amm. succinate 10 mM; ○—○, Amm. succinate 5 mM.

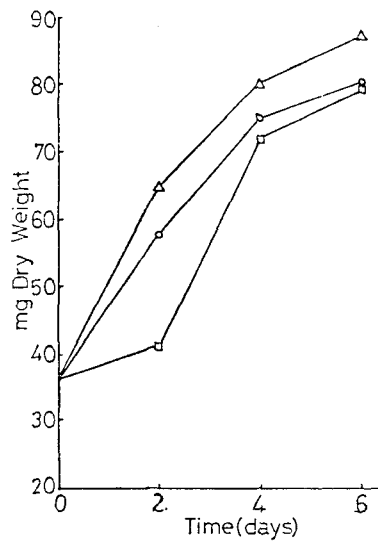


Fig. 2. Effects of ammonium succinate on the growth of the ginseng suspension cultured cells. □—□, Control; △—△, Amm. citrate 10 mM; ○—○, Amm. citrate 5 mM.

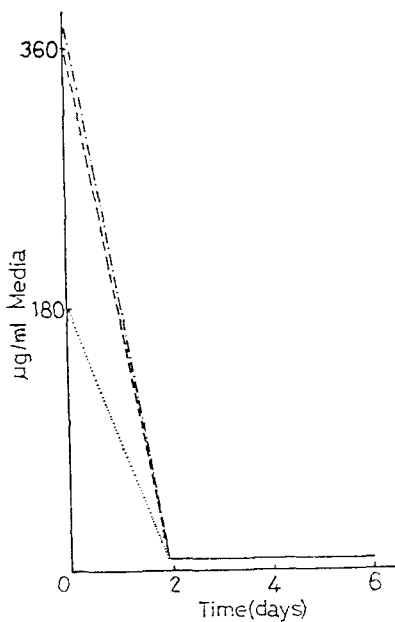


Fig. 3. Change of residuals of NH<sub>4</sub>-N in ammonium citrate media during the growth of the ginseng suspension cultured cells. ---, Control; —, Amm. citrate 10 mM; ····, Amm. citrate 5 mM.

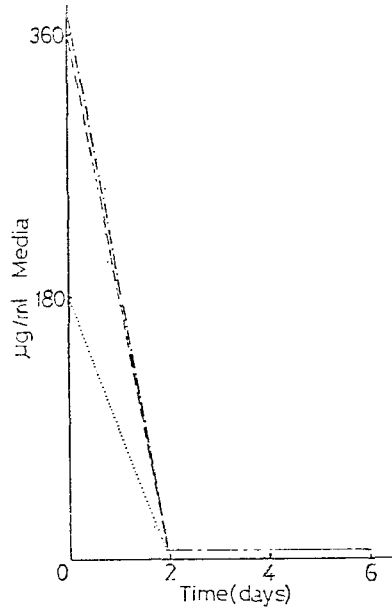


Fig. 4. Changes of residuals of NH<sub>4</sub>-N in ammonium succinate media during the growth of the ginseng suspension cultured cells. ---, Control; —, Amm. succinate 10 mM; ····, Amm. succinate 5 mM.

Fig. 1에서 볼 수 있는 바와 같이 ammonium nitrate 10 mM을 첨가한 대조구에서는 배양 후 6일까지 계속 증가하는 경향이었고 ammonium succinate와 ammonium citrate 10 mM씩 각각 첨가한 배양기에서의 인삼 배양세포 증가율은 배양 후 6일까지 모두 대조구에 비해 상당한 증가를 보였으나 배양초기에 60%정도 증가한 것에 비해 배양 후 4~6일경에는 증가폭이 감소되어 6~10%정도 증가되었다.

그리고 Fig. 2에서도 ammonium succinate 10 mM과 ammonium citrate 10 mM 첨가한 경우와 마찬가지로 대조구에 비해 배양초기에는 40~50% 증가되었으나 배양 후 6일에는 증가폭이 급격히 감소되어 1~4%의 증가를 보였다. 이러한 경향은 soybean cell의 액체 진탕배양에서 크렙스회로의 중간대사물인 citrate와 succinate의 ammonium 염의 효과를 보고한 Gamborg and Shyluk(1970)의 실험결과와 유사한 것으로서 중간대사의 유기산 효과를 확인할 수 있다. 또 지금까지 사용해 온 기본배지의 ammonium nitrate 보다는 ammonium citrate와 ammonium succinate가 배양세포의 생육속도를 증가시키는데 효과적이며 5 mM 보다는 10 mM이 더욱 효과적일 것으로 생각된다.

**배양액의 암모니아태 질소량의 변화.** Ammonium succinate와 ammonium citrate를 각각 5 mM, 10 mM씩 첨가하여 각 배지내의 암모니아태 질소 흡수량 및 대사정도를 알기 위하여 각 배양기별 배지내 암모니아태 질소 잔존량을 조사한 결과 Figs. 3 및 4와 같다. Ammonium citrate와 ammonium succinate 첨가 경우와 대조구 모두에서 접종 후 2일만에 처음 공급한 양의 거의 대부분이 흡수되었다. 이는 Caldas(1976), Martin *et al.* (1977), Kang(1978) 등이  $\text{NH}_4\text{-N}$ 은 접종 2~3 일내에 완전 흡수되어 잔존치 않는다고 보고한 결과와 일치했다.

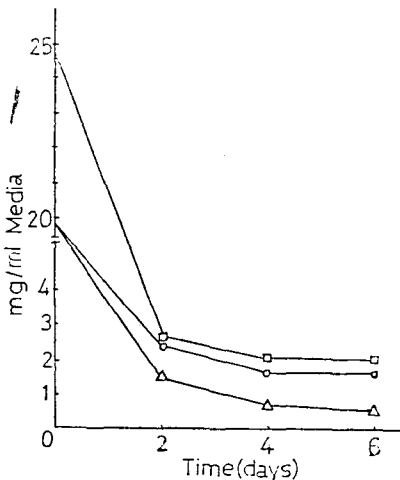


Fig. 5. Change of residuals of  $\text{NO}_3\text{-N}$  in ammonium citrate media during the growth of the ginseng suspension cultured cells. □-□, Control; △-△, Amm. citrate 10 mM; ○-○, Amm. citrate 5 mM.

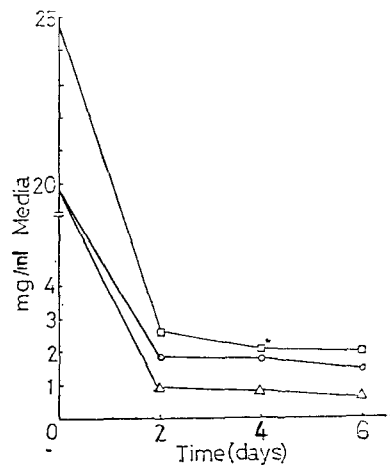


Fig. 6. Changes of residuals of  $\text{NO}_3\text{-N}$  in ammonium succinate media during the growth of the ginseng suspension cultured cells. □-□, Control; △-△, Amm. succinate 10 mM; ○-○, Amm. succinate 5 mM.

또한 Behrend and Mateles(1976)는 tobacco cells의 액체 진탕배양에서 크랩스회로의 중간대사물인 succinate가 ammonium ion 흡수율에 영향을 주지 못하나 growth를 증가시켰다고 보고한 바 있다. 본 실험에서 대조구와 succinate 첨가배지와 별차이 없는 것으로 보아 이를 뒷받침 한다고 볼 수 있다. 그리고, ammonium citrate와 ammonium succinate가 대조구보다 생육을 증가시킨 것으로 보아 암모니움의 흡수보다는 체내 이용율을 높이는 역할을 하는 것으로 추측된다.

**배양액의 질산태 질소량의 변화.** 상기와 같은 배양기에서 succinate와 citrate가 배지내의 NO<sub>3</sub>-N 흡수량 및 세포내 대사에 미치는 영향을 알기 위하여 각각의 배지에서의 인삼 배양세포 생육에 따른 NO<sub>3</sub>-N 배지내 잔존량을 경시적으로 조사한 것은 Figs. 5 및 6과 같았다. Fig. 5에서 ammonium nitrate 10 mM 첨가한 control보다 ammonium citrate를 첨가한 경우 배양후 2일까지는 control과 비슷하였으나 6일경부터는 control보다 NO<sub>3</sub>-N 흡수량이 증가하였으며, 특히 ammonium citrate 10 mM 첨가한 경우 control에 비해 상당히 흡수됨을 나타내었다. Fig. 6에 나타난 바와 같이 ammonium succinate첨가 경우에도 control에 비해 NO<sub>3</sub>-N의 흡수량이 증가되었다. NO<sub>3</sub>-N 흡수는 NH<sub>4</sub>-N 흡수에 비해 흡수속도가 늦는 것은 Caldas(1976), Martin *et al.*(1977), Kang(1978) 등이 보고한 바와 같으며 이러한 양 질소원의 흡수차가 생기는 것은 배양하는 동안의 pH의 변화 때문인 것으로 생각된다. 본 실험의 결과로 NO<sub>3</sub>-N 흡수는 NH<sub>4</sub>-N 흡수보다 늦으나 ammonium citrate 10 mM과 ammonium succinate 10 mM 첨가하여 NO<sub>3</sub>-N 흡수 이용도가 높아졌음을 알 수 있다. 이와같은 암모니움 및 질산의 흡수상태를 종합해 볼 때 ammonium citrate와 ammonium succinate가 생육을 증가시키는 것은 먼저 암모니아태 질소의 흡수보다는 체내 이용율을 높이고, 이 후 질산태 질소의 흡수와 체내 이용율을 높여 단백질 합성을 왕성

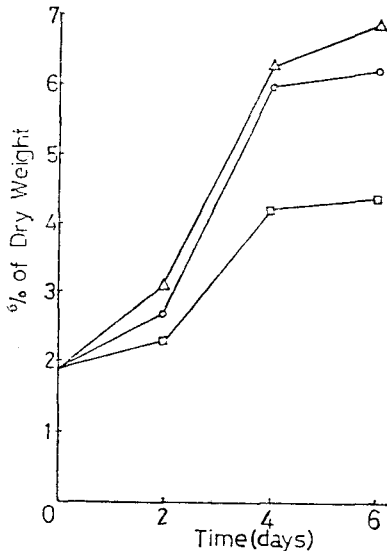


Fig. 7. Effects of ammonium citrate on total nitrogen content of ginseng callus. □-□, Control; △-△, Amm. citrate 10 mM; ○-○, Amm. citrate 5 mM.

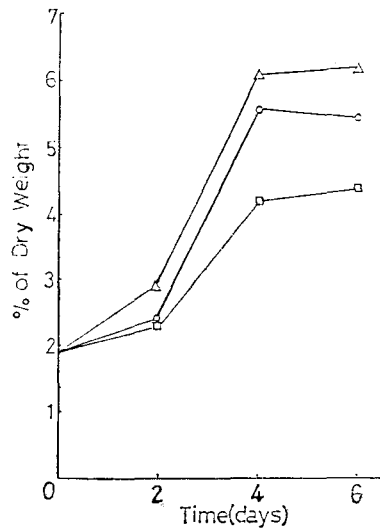


Fig. 8. Effects of ammonium succinate on total nitrogen content of ginseng callus. □-□, Control; △-△, Amm. succinate 10 mM; ○-○, Amm. succinate 5 mM.

케하여 생장에 보다 더 유리하도록 이용되는 것으로 풀이된다(Kang, 1973).

**전질소의 함유율.** Ammonium citrate와 ammonium succinate가 체내 대사에 미치는 영향을 알기 위하여 배양세포내에서 전질소함유량을 건물중량 %로 경시적으로 Figs. 7 및 8에 나타내었다. Ammonium nitrate 10 mM을 첨가한 control의 전질소량은 배양 후 2일에 2.3%, 4일에는 4.2%, 6일에 4.4%로 약간씩 증가되었다. Ammonium citrate 10 mM을 첨가한 배지에서 배양한 인삼 배양세포내의 전질소량은 배양 후 2일에 3.1%, 4일에는 급격히 증가하여 6.3%, 6일에는 약간 감소되어 6.9%이었다. Ammonium citrate 5 mM첨가 배지에서는 ammonium citrate 10 mM첨가한 경우보다 감소되어 control과 거의 비슷한 정도이었다(Fig. 7).

Ammonium succinate 첨가 배양기에서도 마찬가지로 10 mM첨가하였을 경우에는 대조구에 비해 전질소량이 상당히 증가되어 배양 후 2일 이후 각각 2.9%, 6.1%, 6.4%이었으나 5 mM첨가하였을 경우, control 보다는 전질소량이 증가되었으나 10 mM첨가 경우보다 약간 떨어지는 경향이었다(Fig. 8).

이러한 실험결과로, ammonium citrate와 ammonium succinate가 대조구에 비해 전질소량을 증가시킨 것은 이미 상술한 바와 같이 ammonium citrate와 ammonium succinate가 질소원의 흡수와 이용을 증가시킨다는 사실을 뒷받침한 것으로 생각된다.

## 적 요

Ammonium citrate와 ammonium succinate가 고려인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer) 배양세포의 생육 및 질소성분의 흡수에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Murashige and Skoog 배지에서 ammonium nitrate 대신에 농도를 달리하여 ammonium citrate와 ammonium succinate를 첨가한 MS배지에 인삼 callus를 액체 진탕배양하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

Ammonium citrate 10 mM과 ammonium succinate 10 mM을 첨가한 배양기에서 생육량,  $\text{NO}_3\text{-N}$  흡수량 및 전질소량이 control보다 많았고,  $\text{NH}_4\text{-N}$  흡수량은 control과 같았다. 또한 각각 5 mM씩 첨가한 경우에는 거의 모두 control과 별 차이가 없었다. 결론적으로 ammonium citrate 10 mM과 ammonium succinate 10 mM첨가한 배양기에서는  $\text{NO}_3\text{-N}$  등의 흡수를 촉진하여 배양세포의 대사를 촉진시켜 생육량을 증가시키는 것으로 생각된다. 그리하여 ammonium citrate 또는 ammonium succinate의 농도를 조절 공급하면 인삼 배양세포의 증식을 촉진시킬 수 있다고 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Behrend, J. and R.I. Mateles. 1976. Nitrogen metabolism in plant cell suspension cultures. II. Role of organic acids during growth on ammonia. *Plant Physiol.* 58: 510~512.
- Butenko, R.G. 1967. Tissue culture of medicinal plants and prospective of its usage in medicine. *Vopr. Farmokogn.* 21: 184~191.
- Caldas, R.A. 1976. Nitrate, ammonium and kinetic effects on growth and enzyme activities of Paul's Scarlet Rose callus. *Physiol. Plant.* 37: 111~116.
- Furuya, T. H., K. S. Kojima and I. Ishii. 1970. Isolation of panaxatriol from *Panax ginseng*

- callus. *Chem. Pharm. Bull.* **18**: 2371~2372.
- Gamborg, O. L. 1970. The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. *Plant Physiol.* **45**: 372~375.
- Gamborg, O. L. and J. P. Shyluk. 1970. The culture of plant cells with ammonium salts as the sole nitrogen source. *Plant Physiol.* **45**: 598~600.
- Kang, Y. H. 1973. Studies on the nitrogen nutrition of the soybean cultured cells. *Yonsei Non-chong* **10**: 435~447.
- Kang, Y. H. and J. S. Lee. 1977. Plant nutritional and physiological studies of Korean ginseng. Res. Report funded by K.G.R.I., Seoul.
- Kang, Y. H. 1978. The fundamental study about the media composition of Korean ginseng for growth. Res. Report funded by K.G.R.I., Seoul.
- Kita, K. and S. Michiyasu. 1969. Tissue culture studies on *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Yakugaku Zasshi* **39**: 1474~1476.
- Lee, C. D. 1972. Ginseng tissue culture. *Korean J. Pharm.* **3**: 65~72.
- Salonen, M.-L. and L. K. Simola. 1977. Dipeptides and amino acids as nitrogen sources for the callus of *Atropa belladonna*. *Physiol. Plant.* **41**: 55~58.
- Martin, S. M., D. Rose and V. Hui. 1977. Growth of plant cell suspension cultures with ammonium as the sole source of nitrogen. *Can. J. Bot.* **55**: 2838~2843.
- 小島國彦, 大平孝治. 1976. 硝酸態およびアンモニア態両窒素源による水耕培養細胞の生育. *日土肥誌* **47**: 75~78.
- Staba, E. J. 1974. American and Korean ginseng tissue culture. *In Vitro* **9**: 253~259.

(1981. 2. 5. 接受)