

세포배양에 의한 고려인삼 성분의 생산연구

지 형 준 · 김 현 수

서울대학교 생약연구소

The Production of Ginseng Saponins with the Cell Culture of Korean Ginseng Plant

Hyung Joon CHI and Hyun Soo KIM

Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110, Korea

Abstract—*Panax ginseng* root has been widely used as an important drug for thousands years in China, Korea and Japan. The main effective components of ginseng have been believed to be saponins. However, ginseng cultivation is very difficult and needs many years for growth. It has already been shown that *Panax ginseng* callus produces a considerable amount of the same kinds of saponins as in intact plants. Various culture conditions were examined for increased production of ginseng saponins by cell culture. The saponin contents and the growth rates in two cell lines of ginseng callus were compared in static and suspension cultures, rotary and reciprocal shaking cultures. It was shown that the growth rate in rotary shaking cultures of D5-B2K-B2K callus was the highest and ginseng saponin production was most effective in reciprocal cultures of D5-B2K-B2K callus. The saponin content per fresh weight of the culture was 1.03 times higher than that of the fresh ginseng root.

Keywords—*Panax ginseng* · Araliaceae · cell culture · ginsenoside Rb, Rg groups

식물성 천연물질이 의약품과 식품의 제조원료로서 필수적이며 그 수요도가 증대함에 따라 세포배양법, 즉 식물을 재배에 의하지 않고 생물공업적 방법을 응용하여 이들 천연물질을 생산하려는 시도가 활발히 추진되고 있다.

따라서 카루스에서 2차 대사산물의 생산 및 축적, 특히 생합성 반응이 크게 증가된 세포배양주를 얻는다는 것은 목표로 하는 천연물질이 보다 높은 축적량을 갖도록 하는 세포배양 기술과 안정된 생산능력을 갖는 유전자형의 안정화로서 경제적인 대규모 배양방법의 수립의 기본이 되는 것이다.

고려인삼 식물(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 뿌리는 약용 및 건강식품으로 쓰이며 6년간 재배하여야 100~150g(생중량)의 뿌리(수삼)를 수

확할 수 있으며, 인삼의 약효성분인 ginsenoside의 함량은 0.06~0.09%(수삼)에 지나지 않는다.

연구자들은 이와같이 장기간에 걸쳐 농업적인 재배생산방법에 의하여 얻고 있는 인삼 사포닌을 세포배양에 의한 생산을 하기 위하여 인삼식물의 뿌리에서 카루스를 유도하고 이를 계대배양하여 얻은 카루스 세포를 여러가지 다른 조건에서 액체배양시험을 한바 B2K 배지에서 카루스를 유도하고 회전진탕배양법으로 세포배양을 하는 것이 가장 많이 인삼 사포닌을 생성함을 알았다.

실험재료 및 방법

실험재료

경기도 강화산 4~6년생 고려인삼(*Panax gin-*

seung C.A. Meyer)의 뿌리(수삼)를 구입하여 사용하였으며, 식물성장 조절물질로는 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), indole-3-butyric acid (IBA), kinetin (K)을 사용하였다.

D5-DK 카루스와 D5-B2K 카루스의 유도

인삼의 뿌리를 중성세제로 깨끗이 씻어 자외선등을 쬐 라미나 후로우안에서 70% 에탄올에 1~2분간 담근것을 유한락스 희석액(염소농도 2.5%)에 20분간 담구었다가 꺼내어 멸균 증류수로 3번 씻고 걸점질을 벗겨 두께 1~3mm, 지름 0.5~1cm 정도의 크기로 잘라 한배지당 1~2개씩 접종하였다. 기본배지로 Murashige와 Skoog의 수정배지¹⁾에 한천(Difco-Bacto agar) 10g/l와 식물성장조절제로서 2,4-D 5mg/l²⁾를 가하고 가압멸균(121°C, 15 min)하였다. 이것을 25±1°C의 암소에서 4주간 배양하면 카루스가 생성되고 이를 계속하여 4주마다 계대배양하여 카루스를 유도하였다(D5 callus). 위의 D5 카루스를 2,4-D의 농도를 1ppm으로 낮추고 kinetin 0.1ppm을 첨가한 배지로³⁾ 이식하여 3주간 배양하면 최고성장이 왕성한 카루스를 얻을 수 있었다(D5-DK callus). 한편 D5 카루스를 IBA 2ppm과 kinetin 0.1ppm을 함유한 배지(B2K 배지)⁴⁾에 이식하고 2주마다 계대배양하여 D5-B2K 카루스를 얻었다.

정치배양에 의한 성장률과 사포닌 함량

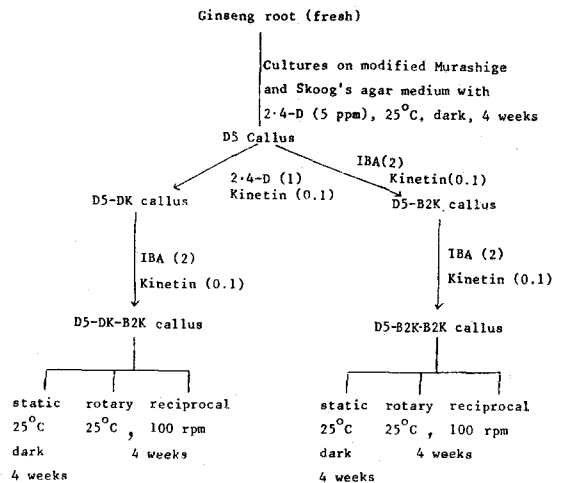
D5-DK 카루스와 D5-B2K 카루스 각 1,000mg 씩을 B2K 배지 30ml를 담은 100ml의 배양후라스크 7개와 3개에 각각 접종하고 25±1°C의 암소에서 4주간 배양후 카루스를 수확하여 생증량을 측정하여 성장률과 사포닌 함량을 구하였다.

액체배양에 의한 성장률과 사포닌 함량

정치배양에서 얻은 D5-DK 카루스와 D5-B2K 카루스 각 1,000~2,000mg을 B2K배지 30~40ml를 담은 250ml 배양후라스크에 접종하고 25±1°C의 암소에서 100rpm의 속도로 회전진탕배양과, 왕복진탕배양을 계속한 4주후에 세포 및 카루스를 수확하여 생증량을 측정하여 성장률과 사포닌 함량을 구하였다. 성장증식된 세포 및 카루스를 메탄올로 추출후 남은 잔사를 80°C에서 말려 건조증량을 구하였다.

Table I. Modified Murashige and Skoog's media

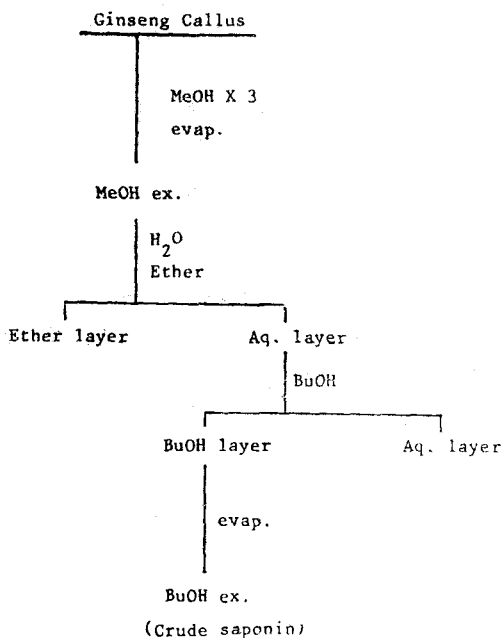
Chemicals	Quantities(mg/l)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8
Na ₂ · EDTA	37.3
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
CoCl ₃ · 6H ₂ O	0.025
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.025
KI	0.83
Thiamine HCl	0.1
Pyridoxine	0.5
Nicotinic acid	0.5
myo-Inositol	100
Sugar	10000
H ₂ O	q.s.



Scheme 1. Callus induction of D5, D5-DK-B2K and D5-B2K-B2K callus and their static and suspension cultures.

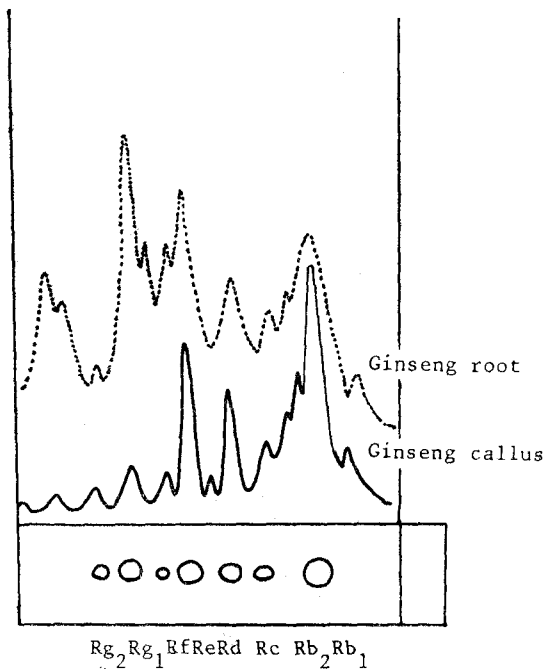
사포닌의 추출과 확인

시료의 3~4 배양의 메탄올을 가하고 3시간씩 3회 환류냉각장치를한 추출기에서 추출하여 여과한 여액을 감압농축하여 메탄올을 엑기스를 만들고, 이를 물에 녹여 에틸로 씻은후 수층을 부



Scheme 2. Fractionation of ginseng saponin in callus mass.

탄올로 추출한것을 감압농축하여 조 사포닌분획을 얻었다. 이 사포닌 분획을 규정농도로 희석하여 silica gel TLC plate(Merck, 60F 254)에 정량적으로 spotting 한후 전개용매 A(n-BuOH-



Solvent A: n-BuOH-EtOAc-H₂O=4:1:5 (upper layer)

Fig. 1. Thin layer chromatogram and dual-wave length spectra of crude saponin in ginseng callus and ginseng root.

Table II. Growth and saponin content of D5 callus in static culture

Cell line	Growth ratio	Dry wt.(g) per 100g fr. wt.	Saponin content (mg) per 100g fr. wt.				Rb group
			Solvent A	Rb group	Rg group	Total	Rg group
D5-DK-B2K	1.39	3.86		14.95	6.8	21.8	2.2
D5-B2K-B2K	1.24	3.79		5.54	4.25	9.8	1.30

Table III. Growth and saponin content of D5 callus in suspension culture

Cell line	Growth ratio	Dry wt.(g) per 100g fr. wt.	Saponin content (mg) per 100g fr. wt				Rb group
			Solvent A	Rb group	Rg group	Total	Rg group
D5-DK-B2K (rotary)	1.1	2.12		10.25	4.2	14.5	2.45
D5-DK-B2K (reciprocal)	1.16	3.64		11.04	3.77	14.9	2.94
D5-B2K-B2K (rotary)	1.51	1.77		43.7	12.9	56.6	3.38
D5-B2K-B2K (reciprocal)	1.44	1.46		62.1	22.1	84.2	2.81
fresh ginseng root				37.4	44.3	81.7	0.85

EtOAc-H₂O=4:1:5, 상층)에서 전개시키고 10% H₂SO₄을 뿌려 100°C에서 10분간 구워서 발색시켰다. 각 ginsenoside의 spot density는 S. Sanada⁵⁾의 방법에 준하여 dual-wave length TLC scanner (Shimadzu Model CS-910)로 λs 530nm와 λr 700nm에서 측정하여 총 사포닌량으로 계산하였다. Ginsenoside Rb군의 양은 ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc, Rd의 총량으로써 Rg군의 양은 ginsenoside Re, Rf, Rg₁, Rg₂의 총량으로써 계산하였다.

결과 및 고찰

카루스에서 얻은 조 사포닌의 TLC pattern을 보면 수삼의 그것과 거의 같으므로 (Fig. 1) 세포, 조직배양법을 이용한 인삼 사포닌의 생산이 유용함을 알 수 있었다.

즉 카루스의 성장률은 정치배양이나 액체배양에서 큰 차이를 보이지 않으나 회전진탕배양한 D5-B2K-B2K 카루스가 가장 높은 성장률을 보였고, 다음으로는 왕복진탕배양한 D5-B2K-B2K 카루스인 것으로 나타났다.

총 사포닌 양은 D5-B2K-B2K 카루스를 왕복진탕배양하였을 때가 가장 많아, 수삼에 비하여 1.03배가 되며 D5-B2K-B2K 카루스를 회전진탕

배양하였을 때가 그 다음인 것으로 나타났다.

이 실험을 통하여 얻은 celline의 카루스들의 사포닌 함량은 수삼의 경우와 비교하여보면 전반적으로 적으나 위의 두 카루스를 볼때 B2K 배지에서 카루스를 유도하여 액체배양을 이용하여 생산하는 방법이 인삼의 주성분인 ginsenoside 생산에 유효한 방법임을 알 수 있었다.

감사—이 연구는 한국학술진흥재단 '83첨단과학기술분야 연구과제에 대한 연구비의 지원에 의하여 이루어 졌으며 이에 감사드립니다.

〈1985년 8월 5일 접수 : 9월 12일 수리〉

문헌

1. Oura, H., Gumagai, A., Shibata, H. and Takagi, K.: *Yakuyonininging*, Kyoristu Pub. Co., Tokyo, Japan, p. 68, (1982).
2. Choi, K.T., Kim, M.W., and Shin, H.S.: *J. Ginseng Sci.*, 6, 162 (1982).
3. Furuya, T., Yoshikawa, T., Orihara, Y. and Oda, H.: *Lloydia*, 47, 70 (1984).
4. Furuya, T., Yoshikawa, T., Orihara, Y. and Oda, H.: *Planta Medica*, 48, 83 (1983).
5. Sanada, S., Shosi, J. and Shibata, S.: *Yakugaku Zasshi*, 98, 1048 (1978).