

人蔘 組織培養에서 CO₂處理가 multi-shoot 分化 및 사포닌 함량에 미치는 影響

鄭燦文*·裴吉寬*

Effect of CO₂ Enrichment on the Differentiation of Multi-shoots and Saponin contents in Tissue culture of Korean ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer)

Chan Moon Chung* and Kil Kwan Bae*

ABSTRACT : This experiment was conducted to study the effect of CO₂(0, 2,500, 5,000, 10,000ppm) enrichment by enabling ventilation on micropropagation of multi-shoot and on the saponin contents *in vitro* in Korean ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). Embryo was cultured in Murashige and Skoog medium added 3mg/l of Indolbutyric acid, Benzyladenin and Gibberellic acid(GA₃), respectively. CO₂ enrichment had little effects on the number of adventitious buds and shoots originated from adventitious buds. The ratio of differentiated shoots to adventitious buds were about 50% in CO₂ enrichment treatment. The shoots originated from adventitious bud showed more rapid growth and had larger leaf area than the shoots originated from the leaf primordia did. The number of shoot primordia was the highest in 2,500ppm of CO₂ enrichment treatment. On the contrary, 10,000ppm of CO₂ enrichment made smaller the number of shoot primordia and ratio of shoots to shoot primordia. The range of shoots differentiated from shoot primordia were 15.4 to 23.9. The rate of dry weight of cultured shoots showed lowest (7.5%) in control and highest (8.59%) in 2,500ppm of CO₂ enrichment. Rate of *in vitro* flower in control was 7.6% and that in 2500ppm of CO₂ was about twice (15.7-16.3%) as much as in control. Flower number per a embryo cultured was about 1.2-1.3. In the multi-shoots with callus enriched by 2,500ppm of CO₂, the contents of crude saponin and ginsenosides in multi-shoots alone were higher than in multi-shoots with callus. The characteristics of ginsenosides in multi-shoots were especially the higher content of ginsenoside Rd, Re, and Rg₁.

Key words : environment control, *In vitro* culture, CO₂ enrichment, multi-shoot, propagation, saponin content

* 충북대학교 연초학과 (Dept. of Tobacco science, Chonbuk National Univ., Cheongju, 360-763, Korea)

< '99. 10. 4 접수 >

緒 言

인삼조직배양은 Slepyan 등(1967)이 최초 시도한 이래 Chang 등(1980a, 1980b)이 배발생에 의한 재분화를 보고하였으나 30년이 지난 지금도 재분화 기술에 의한 대량증식에 많은 어려움을 겪고 있다. 인삼 조직배양의 목적은 치상 절편체의 재분화를 통한(Arya et al., 1993; Asaka et al., 1993) 식물체 대량증식과 세포배양 등을 통한 이차대사산물 생산에 있다(Furuya et al., 1970; Yoshikawa & Furuya 1978). 그러므로 인삼과 같이 종자증식이 어려운 작물에서 재분화는 대량번식의 수단이 될 수 있고 생물공학 기법에 의한 이차대사산물 생산은 수년에 걸쳐 경비와 노동력을 투자하여야 하는 현재의 고비용 생산성을 실내에서 단기간에 저비용, 고효율의 하이테크 농법으로 전환 할 수 있어 기대하는 바가 크다. 특히 인삼의 이차 대사산물 생산에 대한 연구는 Furuya 등(1970)이 70년대에 세포배양의 배양조건 정립에 대하여 집중 연구한 이래 Yoshikawa & Furuya(1987)는 모상근 생장을 통한 대량생산을 보고하였고, 최근 국내에서도 이에 대한 연구가 시도(Yang et al., 1996)되고 있으나 모두가 Bioreactor 또는 Fermentor를 이용한 현탁배양 시스템이 주류를 이루고 있다.

한편 Chung 등(1992, 1995a)은 인삼의 기관분화 유형을 조사하였던 바 신초 primordium에서 다량의 신초가 발생된다는 사실과 이들 신초에는 캘러스보다 더 많은 양의 사포닌 성분이 포함되어 있다는 사실을 보고하였다. 따라서 인삼의 사포닌 함량이 뿌리보다는 지상부인 잎에 많다고 하는 사실에서 잎을 주 생산으로 하는 multi-shoot의 이용은 세포 또는 모상근 배양과 함께 새로운 아이টে็ม으로 실용성이 예견된다고 하겠다.

Multi-shoot는 기존의 밀폐된 용기에서 ethylene 개스 등에 의해 생장이 정체되고 생장량도 적은 단점이 있어 이를 효과적으로 이용하기 위하여는 Kozai 등(1988a, 1988b)이 제안한 광독립 영양배양이 효과적일 수 있다. Aoki 등(1992)은 강제통기방식에 의한 CO₂공급모형을 개발하였고 기타 작물에서도 CO₂처리가 기내배양과 작물생육에

현저한 효과가 있음을 보고하였다(Alexander et al., 1992; Lim et al., 1992; Ulrich et al., 1993).

따라서 본 연구는 multi-shoot 대량배양을 통한 이차대사산물의 이용 가능성을 탐색코자 배배양 방법에 의해 CO₂를 농도별로 기내에 첨가하여 인삼의 신초 분화능 및 성장특성 그리고 사포닌 함량 등을 조사하였다.

材料 및 方法

본 시험에 공시한 시료는 개갑처리한 종자를 3일간 흐르는 물에 침지한 후 1일간 음건하여 비닐팩에 넣어 상온에서 5개월 보존하고 다시 2개월을 저온처리하여 사용하였다.

배지는 Murashige and Skoog (MS) 기본배지에 saccharose 30g/l, agar 8g/l를 첨가하였고 생장 조절물질은 indolbutyric acid (IBA), benzyladenin (BA) 그리고 gibberellic acid (GA₃)를 3mg/l 처리하였다.

기내 환경조절에 사용한 부품의 특성에서 배양 용기는 magenta GA-7으로 용량은 380cm³/個이었고 용기의 空氣流量은 배양용기당 17cm³/分, 換氣回數는 용기당 3.1回/時間 그리고 空氣供給除菌필타는 東洋(株)製 13JP020AN으로 孔徑 0.2μm이었다. CO₂ 농도는 control, 400, 2,500, 5,000, 10,000ppm을 임의 조절할 수 있도록 하였다.

공기의 통기는 Aoki 등(1992)이 개발한 강제통기방식을 사용하였고 광은 16시간 광상태와 8시간 암상태로 하였으며 온도 25℃, 광도 4000lux 배양 조건하에서 60일씩 2차에 걸쳐 배양하였다.

조사포닌은 Ando 등(1971)의 수포화 n-butanol 분획 방법으로 분리한 다음 감압농축시켜 중량법으로 측정하였고, 개별 ginsenoside 함량은 중량법으로 얻은 조사포닌을 분리정제하여 HPLC로 측정하였다.

結果 및 考察

1. 부정아 및 shoot primordium의 분화

부정아 수와 부정아 유래의 신초수는 무처리와 CO₂ 두 처리구간에 차이가 적었고 분화율은 50%

Table 1. Effect of CO₂ enrichment on the number of shoot from adventitious bud and shoot primordium in ginseng embryo culture.

CO ₂ enrichment (ppm)	Adventitious bud			Shoot primordium		
	No. of bud (B)	No. of shoot (S)	S/B	No. of primordium (P)	No. of shoot (S)	S/P
Control	5.5c [†]	2.8b	50.9b	20.0ab	7.3b	36.5c
400	6.6bc	3.4b	51.5ab	19.4b	11.4a	58.8a
2,500	7.7b	3.5b	54.2ab	23.9a	13.0a	54.4a
5,000	9.7a	4.8a	49.5b	16.7c	8.0b	47.7b
10,000	7.7b	4.5a	58.4a	15.4c	7.5b	45.5b

[†] The same letters indicate Duncan, s multiple range grouping which do not differ significantly at 5% level.

내외이었으며 부정아에서 분화한 싹은 경엽의 전개가 빠르고 성장량이 높은 것이 특징이었다. 한 개의 자엽에서 분화되는 shoot primordium의 수는 대체로 15.4개-23.9개로 CO₂ 2,500ppm처리구가 가장 양호하였고 CO₂ 10,000ppm의 고농도는 오히려 shoot primordium수 뿐 만 아니라 싹 분화율도 저하시켰다.

이와 같이 무처리에 비해 CO₂처리에서 특히 효과가 좋았던 것은 일반적으로 사용하는 100ml의 삼각플라스크에 비해 본시험에 사용한 배양용기가 380ml로 약 4배 가량 크고 외부에서 CO₂등 신선한 공기를 적당히 공급할 수 있어 기내 배양환경이 개선된 효과도 있었을 것으로 생각된다(그림 1).

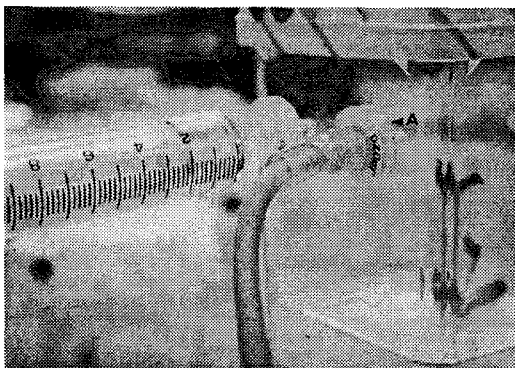


Fig. 1. Culture vessel for aseptic ventilation in embryo culture.

A : air supplying aseptic filter

B : nutrient supplying aseptic filter

특히 CO₂는 분화 초기단계보다 분화 후 성장단계에서 효과가 컸고 부정아에 비해 shoot primordium의 성장에 효과가 큰 것으로 나타나 분화형태의 종류에 대한 반응이 달랐다. 외국의 경우, 인삼은 아니지만 작물에 CO₂를 기내 공급하여 유식물체의 생장이 촉진되었다는 결과는 많이 보고된 바 있으나 인삼의 경우, 조직배양에서 CO₂를 기내에 공급하여 그 효과를 검토한 것은 본 연구가 최초로서 앞으로 이에 대한 연구가 깊이 논의되어야 할 것으로 생각한다.

2. 건물중 및 건물물

배양한 시료의 생체중은 CO₂ 2,500ppm 처리구가 3.26g으로 가장 높았고 무처리구는 2.16g 그리고 CO₂ 10,000ppm의 고농도 처리구는 오히려 1.62g으로 가장 낮았다. 건물중은 무처리구가 0.16g으로

Table 2. Effect of CO₂ enrichment on the fresh and dry weight of multi-shoot with callus in ginseng embryo culture.

CO ₂ enrichment (ppm)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	D/F (%)
Control	2.16	0.16	7.50
400	2.34	0.17	7.09
2,500	3.26	0.28	8.59
5,000	2.85	0.23	8.12
10,000	1.62	0.13	7.90

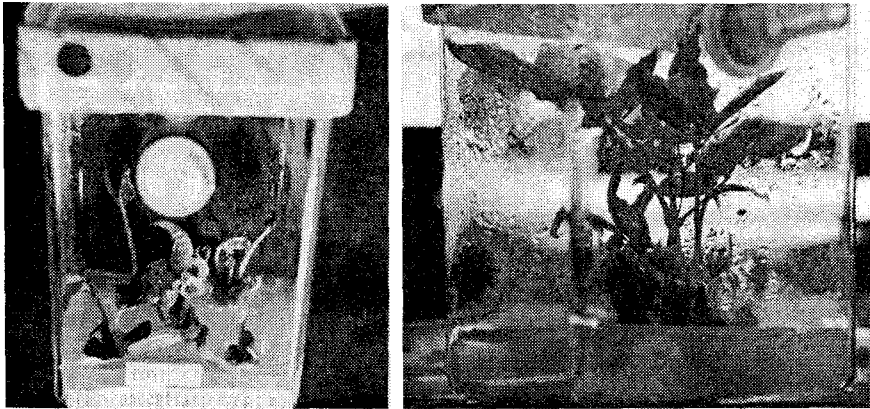


Fig. 2. State of differentiation and growth on enabling ventilation vessel in embryo culture.

left : control,

right : CO₂ 2, 500ppm treatment

건물율이 7.50%이었던데 반하여 CO₂ 2, 500ppm 처리구는 건물율이 8.59%로 여타 CO₂ 처리구에 비하여 가장 높았다.

이와 같은 결과는 일반적으로 배양 callus가 대략 3% 정도의 건물율을 나타내는 것에 비하면 현저한 차이가 있고 같은 CO₂ 처리구 내에서도 소식물체의 생육에 따라 건물율도 상당한 차이를 나타내었다.

인삼 조직배양에서 CO₂ 처리는 무처리에 비해 부정아 또는 shoot primordium 유래의 소식물체 성장량을 현저히 증가시키는 효과뿐만 아니라 경우에 따라서는 380ml 배양용기가 부족할 만큼 생장이 이루어졌다(그림 2).

따라서 인삼 조직배양에서 적절한 CO₂ 공급에 의한 배양환경 조절은 세포배양이나 모상근 배양과 비교될 수 있는 이차대사산물 생산이 가능할 것으로 기대된다. 지금까지 인삼에서 이차대사산물 이용은 배양체의 성분함량도 중요하지만 그 보다는 배양체의 성장량 증가가 더 비중있게 다루어져 왔다. (Yang et al., 1996 ; Yoshikawa et al., 1987) 그러나 본 연구는 배배양 방법으로 배양체를 shoot primordium으로 제한하였고 지상부 경엽의 대량분화 및 건물율 증가에 의한 이차대사산물 생산에 목적이 있는 바 이러한 결과는 앞으로 이차대사산물 생산과 관련한 많은 정보를 제공할 것으로 생각한다.

3. 부정아 유래의 기내개화 특성

CO₂ 처리가 인삼의 기내개화에 미치는 효과를 조사하였던 바 무처리인 기내개화율이 7.6%이었으나 CO₂ 2, 500-5000ppm 처리구는 16.3-15.7%로 무처리에 비하여 2배 가량 높았다. 1개의 치상배에서 얻어지는 개화수는 1.2-1.3개이었고, 1개의 화기에서 얻어지는 소화수는 3.1-3.9개로 CO₂ 처리농도에 따른 차이가 없었다.

인삼의 개화현상에 대하여 Ahan & Kim(1987)은 조직형태학적 방법을 통해 인삼의 화기는 경의 정단분열조직에서 생겨난다고 하였고 Chung 등(1995b)은 배배양을 통해 부정아 유래의 기내개화

Table 3. Effect of CO₂ enrichment on the flower emergence in ginseng embryo culture.

CO ₂ enrichment (ppm)	Rate of in vitro flower	No. of flower/embryo	No. of flowerlet/flower
Control	7.6b [†]	1.3a	3.3a
400	8.0b	1.2a	3.1a
2,500	16.3a	1.3a	3.5a
5,000	15.7a	1.3a	3.9a
10,000	3.2c	1.2a	3.5a

[†] The same letters indicate Duncan, s multiple range grouping which do not differ significantly at 5% level.

가 발생한다고 보고한바 있는데 인삼에서 부정아는 잠아가 되는 기관으로서 잠아 중 일부가 경엽의 분화가 이루어지는 특징이 있어 기내개화가 가능한 것이었다. 본 시험에서 CO₂ 처리구가 무처리구에 비해 기내개화 발생율이 높았던 것은 CO₂ 처리에 의해 부정아 유래 식물체의 경엽전개가 양호하였기 때문으로 생각된다.

4. 사포닌 함량

CO₂ 처리에 의해 기내 배양한 소식물체의 경엽만을 채취한 것과 켈러스와 경엽이 혼재된 소식물체를 구분하여 사포닌과 ginsenoside 함량을 조사하였다.

먼저 조포닌 함량은 무처리구의 경우, 켈러스와 신초가 혼재되어 있는 소식물체가 7.56%이었고 경엽만의 소식물체는 8.50%이었다. 한편 CO₂ 2,500ppm처리구의 경우, 켈러스와 신초가 혼재되어 있는 소식물체가 7.56%이었고 경엽만의 소식물체는 8.50%이었다. 한편 CO₂ 2,500ppm처리구의 경우, 켈러스와 신초가 혼재되어 있는 소식물체는 5.80%이었던데 비하여 경엽만의 소식물체가 8.30%로 높았다.

Kim 등(1987)은 재배삼의 경우 조사포닌 함량이 뿌리에 4.28%, 엽에 19.58% 함유되어 있다고 하였는데 본 시험의 결과에서 multi-shoot 소식물체의 조사포닌 함량도 재배삼의 엽보다는 적으나 뿌리보다는 많은 것으로 나타나 경엽 분화에 의한 사포닌 성분의 이용가능성이 충분히 있다고 생각된다.

또한 ginsenoside 함량에 있어서도 개별사포닌간에 함량의 차이는 다소 있으나 대체로 무처리구의

경엽 소식물체에 비하여 CO₂ 처리구의 경엽 소식물체가 많았고 특히 total ginsenoside의 함량은 CO₂ 2,500ppm처리구의 경엽소식물체가 2배이상 많았는데 이러한 결과는 개별사포닌 ginsenoside Rd가 5.54mg/g, Re가 18.5mg/g 그리고 Rg1이 9.83g/g으로 현저히 많았던데 기인한 결과이었다.

본 결과가 비록 경엽 소식물체에 국한된 것이기는 하나 켈러스 배양에 의한 조사포닌 함량에 비하여 3배 정도가 많았고(Choi et al., 1995) 그리고 인삼 모상근의 배양에 의한 ginsenoside 함량에 비하여 ginsenosides Rd, Re 그리고 Rg1 등은 대략 5배 이상 많았다(Yang et al., 1996). 그러나 이 같은 결과는 단순 수치 비교일 뿐 수십여종의 개별사포닌을 전체적으로 비교한 결과가 아니기 때문에 앞으로 더욱 연구되어야 할 부분이다.

摘 要

인삼 조직배양에 있어 multi-shoot 대량번식을 통한 이차대사산물의 이용가능성을 조사코자 강제 통기방식에 의해 CO₂를 기내에 공급하여 배배양하였던 바 multi-shoot 분화특성 및 사포닌 함량에 미치는 CO₂의 효과는 다음과 같다.

부정아 수와 부정아 유래의 신초수는 무처리와 CO₂ 2처리구간에 차이가 적었고 분화율은 50%내외이었고 부정아에서 분화한 신초는 경엽의 전개가 빠르고 성장량이 높은 것이 특징이었다.

한 개의 자엽에서 분화되는 shoot primordium의 수는 대체로 15.4개-23.9개로 CO₂ 2,500ppm처리

Table 4. Effect of CO₂ enrichment on the crude saponin and ginsenoside content of multi-shoot with callus (MC) and multi-shoot alone (MS) in ginseng embryo culture.

CO ₂ enrichment (ppm)	Plant type	Crude saponin (%)	Ginsenoside content (mg/g)								Total ginsenoside
			Rb ₁	Rb ₂	Rc	Rd	Re	Rf	Rg ₁	Rg ₂	
Control	MC	7.56	1.86	0.95	0.73	2.43	10.4	0.33	5.16	1.25	23.1
"	MS	8.50	2.17	1.41	1.38	5.15	15.2	0.30	8.45	2.10	35.2
2,500	MC	5.90	1.85	0.85	0.81	1.53	9.2	0.31	5.10	0.93	20.6
"	MS	9.32	2.46	1.62	1.64	5.54	18.5	0.50	9.83	1.75	41.8

* MC : Multi- shoot with callus, MS : multi-shoot alone

구가 가장 양호하였고 CO₂ 10,000ppm의 고농도는 오히려 shoot primordium수 뿐만 아니라 신초 분화율도 저하시켰다. 무처리외의 건물율은 7.50%이었던데 반하여 CO₂ 2,500ppm처리구는 건물율이 8.59%로 여타 CO₂ 처리구에 비하여 가장 높았다.

기내개화율은 무처리가 7.6%이었으나 CO₂ 2,500-5,000ppm처리구는 16.3-15.7%로 무처리에 비하여 2배 가량 높았다. 그러나 1개의 치상 배에서 얻어지는 개화수는 1.2-1.3개로 CO₂ 처리농도에 따른 차이가 없었다.

조사포닌 함량은 CO₂ 2,500ppm처리구의 경우, 켈러스와 신초가 혼재되어 있는 소식물체는 5.80%이었던데 비하여 multi-shoot가 8.32%로 높았고 ginsenoside 함량은 multi-shoot의 경우, ginsenoside Rd, Re 그리고 Rg₁이 특히 많았다.

LITERATURE CITED

- Ahan S. D. and Y. T. Kim. 1987. Study on the formation of dormancy bud and inflorescence in young ginseng plant. Korean J. Ginseng Sci. 11(2) : 111-117.
- Alexander A., R. Cheetham and P. Weathers. 1992. Carbon dioxide improves the growth of hairy roots cultured on solid medium and in nutrient mist. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37 : 463-467.
- Ando T., O. Tanaka and S. Shibata. 1971. Chemical studies on the oriental plant drug. (XXV) Comparative studies on the saponins and sapogins of ginseng and related crud drugs. Shyoyakugaku Zasshi 25(1) : 28-32.
- Aoki M., I. Horiguchi, C. Itoh, G. Yang, T. Harata, and T. Yakuwa. 1992. Development of an aseptic plant tissue culture vessel system enabling ventilation air composition control and addition of nutrient solution. J. Agr. Met. 48(1) : 29-37.
- Arya S., I. Arya and T. Erikson. 1993. Rapid multiplication of adventitious somatic embryos of *Panax ginseng*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34 : 157-162.
- Asaka I., I. Yoshikawa, T. Hirotoni and T. Furuya. 1993. Embryoid formation by high temperature treatment from multiple shoots of *Panax ginseng*. Planta Med. 59(4) : 293-390.
- Cellarova E., M. Rychlova and E. Vranova. 1992. Histological characterization of in vitro regenerated structures of *Panax ginseng*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 30 : 165-170.
- Chang W. C. and Y. I. Hsing. 1980a. In vitro flowering of embryoids derived from mature root callus of ginseng (*Panax ginseng*). Nature 284 : 341-342.
- Chang W. C. and Y. I. Hsing. 1980b. Plant regeneration through somatic embryogenesis in root-derived callus of ginseng. Proceedings of the 3rd International Ginseng Symposium.
- Choi K. T., J. C. Park, I. O. Ahn. 1990. Saponin production in tissue culture of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). Korean J. Ginseng Sci. 14(2) : 107-111.
- Chung C. M. 1992. Studies on callus induction and organ differentiation in vitro embryo culture of Korean ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). Doctor, s thesis of Chungnam national university.
- Chung C. M., J. Y. Kang and J. S. Jo. 1995a. Histomorphological characteristics in organ differentiation from embryo culture of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). Korean J. Breed. 27(3) : 284-289.
- Chung C. M., Y. Y. Chung and J. S. Jo. 1995b. Characteristics of in vitro flower emergence in embryo culture of *Panax ginseng* C. A. Meyer. Korean J. Breed. 27(4) : 398-405.
- Furuya T., H. Kogima, K. Syono, and T. Ishii. 1970. Isolation of panaxatriol from *Panax ginseng* callus. Chem. Pharm. Bull. 18 : 2371-2372.
- Kim S. C., K. J. Choi, S. R. Ko and H. K. Joo. 1987. Content comparison of proximate composition, various solvent extracts and saponins in root, leaf and stem of *Panax ginseng*. Korean J. Ginseng Sci. 11(2) : 118-122.
- Kozai T., Y. Koyama and I. Watanabe. 1988a. Multiplication of potato plantlets in vitro with sugar

- free medium under photosynthesis photon flux. *Acta Horticulture* 230 121 – 127.
- Kozai T., C. Kubota, and I. Watanabe. 1988b. Effects of basal medium composition on the growth of canation plantlets in auto- and mixo-trophic tissue culture. *Acta Horticulture* 230 : 159 – 166.
- Lim B., Y. Hew, S. Wong and C. Hew. 1992. Effects of light intensity, sugar and CO₂ concentration on growth and mineral uptake of dendrobium plantlets. *J. Horticultural Sci.* 67(5) : 601 – 611.
- Slepyan L. I., I. V. Brushwitkhy and R. B. Butenko. 1967. *Panax ginseng* C. A. Meyer as an object for introduction into tissue culture. *Proble. Phamacog* 21 : 198 – 203.
- Ulrich G., G. Franziska and B. Ludwig. 1993. The influence of sucrose and an elevated CO₂ concentration on photosynthesis of photoautotrophic peanut (*Arachis hypogaea* L.) cell culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33 : 143 – 150.
- Yang D. C., H. Y. Choi, Y. H. Kim, K. Y. Yun, and D. C. Yang. 1996 Growth and ginsenosides production of hairy root (*Panax ginseng* C. A. Meyer) *via* light energy. *Korean J. Ginseng Sci.* 20(3) : 318 – 324.
- Yoshikawa T. and T. Furuya. 1987. Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Report* 6 : 449 – 453.