

반응표면분석법을 이용한 인삼 Root 액체배양조건의 최적화

오훈일[#] · 장은정 · 이시경* · 박동기*

세종대학교 식품공학과, *건국대학교 응용생물화학과
(2000년 5월 13일 접수)

Optimization of Submerged Culture Conditions for the Production of Ginseng Root Using Response Surface Method

Hoon-Il Oh[#], Eun-Jung Chang, Si-Kyung Lee* and Dong-Ki Park*

Department of Food Science and Technology, Sejong University, Seoul 143-747, Korea

*Department of Applied Biology and Chemistry, KonKuk University, Seoul 143-701, Korea

(Received May 13, 2000)

Abstract : To develop the production of ginseng root using plant tissue culture technology, submerged culture conditions were optimized by means of the fractional factorial design with 4 factors and 3 levels by a RSM computer program. The ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) roots induced by plant growth regulators were cultured on SH medium and the effects of various pH of medium, sucrose concentration, nitrogen concentration and phosphate concentration on fresh weight of the ginseng root were investigated. The fresh weight of ginseng root increased with a decrease in nitrogen concentration and fresh weight of ginseng root varied from 1.00 to 2.33g under various conditions. The optimum pH of medium and sucrose concentration determined by a partial differentiation of the model equation, nitrogen and phosphate concentration were pH 5.6, sucrose 3.8%, nitrogen 50 mg/L and phosphate 80.7 mg/L, respectively. Under these conditions, the predicted growth of ginseng root was estimated to be 2.36g.

Key words : *Panax ginseng* C. A. Meyer, response surface methodology, ginseng root culture, fresh weight.

서 론

다년생식물인 고려인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 세대기간이 4~6년으로 길며, 6년을 재배하여야 100~150 g (fresh weight)의 수삼을 수확할 수 있고, 연작이 불가능하여 재배가능 면적이 점차 줄어들고 있는 실정이라 재배인삼을 이용하여 약품, 건강음료 등을 제조할 경우 제조원가가 비싸지는 등 여러문제가 있어 산업적으로는 미삼을 주로 이용하고 있는 실정이다.¹⁾ 따라서 최근에 식물조직배양기술의 발달과 더불어 조직배양에 의해 생산된 인삼 캘러스나 뿌리를 재배인삼 대용으로 사용하기 위한 연구가 꾸준히 진행되고 있다.

Slepyan 등²⁾이 1967년 최초로 인삼을 재료로 하여 인삼조직배양을 실시한 이래 인삼에서 캘러스의 유기 및 증식, 캘러스조직에서 식물체의 재분화, 그리고 기내배양을 위한 최

적배지조성 등에 관한 연구들이 보고된 바 있다.³⁻⁵⁾ 또한 Furuya 등⁶⁾은 기내배양한 캘러스 조직 및 단세포의 화학적 성분과 약리적 효과에 관해 보고하였던 바, 사포닌 함량이 캘러스에 0.44%(dry weight) 함유되어 있어 재배인삼근의 사포닌함량 0.40%와 비슷한 함량을 보였고, 인삼근 추출물이 나타내는 약효와 동등한 효과를 나타낸다고 하였다. 우리나라에서는 이 등⁷⁾이 한국산 4년근 인삼에 대한 조직배양에서 White배지를 캘러스유도배지로, MS배지를 발근배지로 사용하여 뿌리를 유도하였고, 최 등⁸⁾은 인삼근 캘러스로부터 기관을 분화시키기 위해 NAA, 2,4-D, kinetin, BA, GA₃ 등의 생장조절물질을 여러농도로 달리 첨가하였을 경우 기관분화에 미치는 영향을 보고하였다.

식물세포 및 조직배양에서 배지내의 영양물질과 생장조절물질 등의 첨가가 배양에 중요한 역할을 담당하고 있는 것이 식물의 성장과 2차대사산물의 생성에 미치는 배양배지 조성의 영향에 대한 여러 연구를 통하여 이미 밝혀졌다. 그러나 현재까지 진행되고 있는 인삼조직배양 연구들은 각

[#] 본 연구에 대한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-8408-3229; (팩스) 02-3408-3569
(E-mail) ohhi@kunjasejong.ac.kr

배지성분들 각각의 효과를 독립적으로 조사하는 방법을 사용하였으므로 각 요소들간의 상호효과를 확인할 수 없고 각 요소들의 종합적인 결과를 얻을 수 없었다. 따라서 본 연구의 목적은 다양한 조성의 배지에 인삼을 배양한 후 생장율을 측정하여 각 실험요소들간의 종합적인 효과를 평가할 수 있는 반응표면분석법(Response Surface Methodology : RSM)으로 등고분석과 삼차원 분석을 수행함으로써 인삼 root의 최적액체배양조건을 확립하는데 있다.

재료 및 방법

1. 재료

고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 씨앗은 한국인삼연초연구원 수원경작시험장에서 분양받아 사용하였다. 캘러스 유도에 사용한 MS 배지는 Murashige와 Skoog의 방법⁹⁾에 따라 각 stock solution을 제조하였고, root 유도에 사용한 SH 배지는 Schenk와 Hilderbrant 방법¹⁰⁾에 따라 stock solution을 특급시약으로 제조한 후 냉장고에 보관하면서 사용하였다. 식물생장조절제인 6-Benzylaminopurine(BAP), 1-Naphthaleneaceticacid(NAA)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였고, agar는 Junsei Chemical Co.(Tokyo, Japan)의 제품을 사용하였으며, chlorox는 유한양행의 제품을 사용하였다. 또한 sucrose, ethanol 등은 특급시약을 사용하였다.

2. 캘러스의 유도

고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 씨앗의 외피를 제거한 후 70%(v/v) ethanol로 20초, 4% NaOCl용액(v/v)으로 15분간 살균하고, 무균수로 5회 세척한 다음 살균된 여과지(Whatman No. 1)위에 올려놓아 물기를 제거하였다. 캘러스를 유도하기 위해서 knife로 외피를 제거한 씨앗에 작은 상처를 낸 후 0.5 mg/L BAP + 3.0 mg/L NAA¹¹⁾ 조합으로 식물생장조절제가 첨가된 MS배지에 씨앗을 심어 암조건, 25°C에서 3개월간 배양하여 캘러스를 유도시켰다.

3. Root의 유도 및 배양

MS배지에서 유도된 캘러스로부터 root를 유도하기 위해서 0.5 mg/L BAP + 3.0 mg/L NAA 조합의 식물생장조절제가 첨가된 SH배지에 옮겨 25°C 암조건에서 배양하여 약 3개월 후에 root를 얻었다. 이렇게 유도된 인삼 root를 다음의 실험에 사용하였고, 유도된 root의 계대배양에는 0.5 mg/L BAP + 3.0 mg/L NAA를 첨가한 SH 액체배지를 사용하여 25°C, 암조건으로 진탕배양기(KSI-200L, 고려기기)에서 60 rpm으로 배양하여 4주간격으로 계대배양 하였다.

4. 반응표면분석법에 의한 배양최적조건의 설정

(1) Experimental design block 설정

Stat-graphics(STSC Inc. Rockville, MD, USA)내의 central composite design(CCD) program을 이용하여 root 배양배지의 조건인 pH, sucrose 농도, nitrogen 농도, phosphate 농도 등을 독립변수로 3 level - 4 factor의 fractional factorial block을 정하였다(Table 1). 배지의 초기 pH는 최대 7.0, 최소 4.0, 중간값 5.5로 맞추었으며, sucrose 농도는 최대 5%, 최소 1%, 중간값으로 3% 되게끔 첨가하였고, nitrogen 농도는 최고 750 mg/L, 최소 50 mg/L, 중간값으로 400 mg/L 첨가하였으며, phosphate 농도는 SH배지의 phosphate 농도를 기준으로 하여, 최고 5/3배, 최소 1/3배, 중간값 1배가 되도록 각각 독립변수의 level을 설정하였다. 배지는

Table 1. Fractional factorial block of experimental design for ginseng root culture and fresh weight

Treatment No.	Coded var.				Process var.				Fresh weight (g)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄₄	
1	-1	-1	-1	+1	4.0	1	50	134.5	1.04
2	-1	-1	+1	-1	4.0	1	750	26.9	1.35
3	-1	+1	-1	-1	4.0	5	50	26.9	2.24
4	-1	+1	+1	+1	4.0	5	750	134.5	1.67
5	+1	-1	-1	-1	7.0	1	50	26.9	1.30
6	+1	-1	+1	+1	7.0	1	750	134.5	1.23
7	+1	+1	-1	+1	7.0	5	50	134.5	2.13
8	+1	+1	+1	-1	7.0	5	750	26.9	1.90
9	0	0	0	0	5.5	3	400	80.7	2.33
10	0	0	0	0	5.5	3	400	80.7	2.33
11	-1	-1	-1	-1	4.0	1	50	26.9	1.26
12	-1	-1	+1	+1	4.0	1	750	134.5	1.00
13	-1	+1	-1	+1	4.0	5	50	134.5	1.82
14	-1	+1	+1	-1	4.0	5	750	26.9	1.94
15	+1	-1	-1	+1	7.0	1	50	134.5	1.20
16	+1	-1	+1	-1	7.0	1	750	26.9	1.25
17	+1	+1	-1	-1	7.0	5	50	26.9	2.08
18	+1	+1	+1	+1	7.0	5	750	134.5	1.81
19	0	0	0	0	5.5	3	400	80.7	2.33
20	0	0	0	0	5.5	3	400	80.7	2.33
21	+1	0	0	0	7.0	3	400	80.7	1.95
22	-1	0	0	0	4.0	3	400	80.7	1.98
23	0	+1	0	0	5.5	5	400	80.7	2.06
24	0	-1	0	0	5.5	1	400	80.7	1.21
25	0	0	+1	0	5.5	3	750	80.7	1.94
26	0	0	-1	0	5.5	3	50	80.7	2.02
27	0	0	0	+1	5.5	3	400	134.5	2.03
28	0	0	0	-1	5.5	3	400	26.9	2.20
29	0	0	0	0	5.5	3	400	80.7	2.33
30	0	0	0	0	5.5	3	400	80.7	2.33

X₁: medium pH, X₂: sucrose conc. (%), X₃: nitrogen conc.(mg/L), X₄: phosphate conc. (mg/L)

SH배지를 기본으로 하고, 식물생장조절제로 0.5 mg/L BAP + 3.0 mg/L NAA를 첨가하였다.

(2) Root 배양 및 생장율 측정

3 level - 4 factor에 의해 design된 fractional factorial block에 따라 배지를 제조하여 root 0.6 g씩을 100 mL flask에 접종하고 25°C 압조건 하에서 60 rpm으로 4주간 진탕배양한 뒤 생장율을 측정하였다. Root의 생장율은 인삼 root를 살균된 여과지(Whatman No. 1)위에 놓고, 수분을 제거한 뒤 무게를 측정하여 생체중량으로 나타내었다.

(3) 반응표면분석법에 의한 배양최적조건의 결정

측정한 생장율을 종속변수로 설정한 후 각 독립변수들 간의 관계를 SAS(SAS Institute Inc. Cary, NC, USA)로 다중회기분석 및 분산분석을 실시한 후 유의성이 인정되는 변수만을 채택하여 각 종속변수에 해당하는 model식을 설정하고 이를 RSM에 의하여 등고분석과 3차원 분석을 실시하여 최적조건을 설정하였다.

결과 및 고찰

1. 반응표면분석법에 의한 최적배양조건의 결정

(1) 생장율 증가의 최적화

생장율에 대한 fractional factorial block

Stat-graphics 내의 program중 하나인 Central Composite Design(CCD)을 이용하여 3 level - 4 factor로 design하여 4주간 인삼 root를 배양하고, fresh weight를 종속변수로 하여 측정한 결과는 Table 1과 같다. pH 5.5, sucrose 3%, nitrogen 400 mg/L, phosphate 80.7 mg/L에서 2.33g으로 최대 생장을 하였고, pH 4.0, sucrose 1%, nitrogen 750 mg/L, phosphate 134.5 mg/L에서 1.00g으로 최소 생장을 하였다. pH 5.5와 pH 4.0에서 각각 최대값과 최소값을 나타낸 것은 인삼모상근 배양시 pH 5.5~6.5에서 최대효과를 보았고 pH 4.0 이하에서는 생장이 감소하였다는 황 등¹²⁾의 보고와 일치하였다. Sucrose 농도 3%일때 최대생장을 나타낸 것은 *Beta vulgaris* L.의 모상근 배양시 sucrose 5~7%에서 최대 생장을 하였다는 백 등¹³⁾의 보고와 차이가 있는 결과이다. 그러나 이는 식물종이 다르며 본 실험이 sucrose 단독효과만을 조사한 것이 아니라 sucrose 이외에 다른 조건들이 복합적으로 작용하였기 때문에 사료된다. Nitrogen 농도는 400 mg/L에서 최대 생장을 하였는데, 이 결과는 *Lithospermum erythrorhizon* 모상근의 생장에 낮은 nitrogen 농도가 효과적이라는 Shimomura 등¹⁴⁾의 보고와 유사하며, 400 mg/L는 SH기본배지의 nitrogen 농도와 일치한다. Nitrogen이 750 mg/L일때 최소 생장을 하였는데, Salisbury와 Ross¹⁵⁾가

식물의 뿌리 생장에 있어서 nitrogen이 과다하면 뿌리 생장이 억제된다고 한 보고와 유사하다. Phosphate의 경우 80.7 mg/L에서 최대 생장을 하였고, 134.5 mg/L 일때 최소 생장을 하였는데, 이는 Yamakawa 등¹⁶⁾의 연구에서 phosphate 농도가 증가할수록 세포 성장도 증가한다는 결과와 차이가 있는 결과이다. 이것은 실험방법상의 차이로 본 실험에서는 phosphate 단독의 효과가 관찰된 것이 아니라 여러 변수들이 혼합되어 복합적으로 작용하였기 때문인 것으로 생각된다.

생장율 증가 조건의 최적화

인삼 root 배양에서 생장율을 증가시키기 위하여 배지 내 pH, sucrose농도, nitrogen농도, phosphate농도를 독립변수로 설정하고, root의 생체중량을 종속변수 Y로 설정하여 다중회기분석을 수행한 결과는 Table 2와 같다. 이 결과를 근거로 하여 90% 유의수준에서 유의성이 있는 독립변수 중 상수, X₁항인 pH, X₂항인 sucrose, 교호작용을 나타내지 않는 interaction terms 중 sucrose × nitrogen, 동일한 독립변수간의 교호작용을 나타내지 않는 quadratic terms 중 pH, sucrose항을 채택하여 model식 $Y = -1.603614 + 0.761822X_1 + 0.936974X_2 - 0.067455X_1^2 - 0.120444X_2^2 - 0.000063X_2X_3$ 를 얻었다. 다중회기분석 전체에 대한 분산분석(Table 3)을 행한 결과 유의수준을 검정하는 F-value도 99.9% 수준에서 유의성을 나타내어 다중회기분석에 의하여 선정된 각 변수에 의해 설정된 model식이 99.9% 수준에서 유의성이 있었음을 알 수 있었다. 위에서 얻은 model식에 대한 반응표면분석법을 수행하여 Fig. 1~3과 같은 결과를 얻었다. 독립변수 pH를 고정시켜 분석한 결과 pH 5.5일 때, sucrose 4%, nitrogen

Table 2. Values of regression coefficients calculated for the fresh weight

Ind. variable	Coefficient	T-value	Prob > T
Constant	-1.603614	-1.7566	0.0917
pH	0.761822	2.0176	0.0549
Sucrose	0.936974	7.9829	0.0000
pH × pH	-0.067455	-1.9686	0.0606
Sucrose × Sucrose	-0.120444	-6.2490	0.0000
Sucrose × Nitrogen	-0.000063	-2.3245	0.0289

Table 3. Analysis of variance for full regression of the fresh weight

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-value
Regression	5	5.29667	1.05933	51.7424***
Error	24	0.491357	0.0204732	
Total	29	5.78802		

***p<0.001

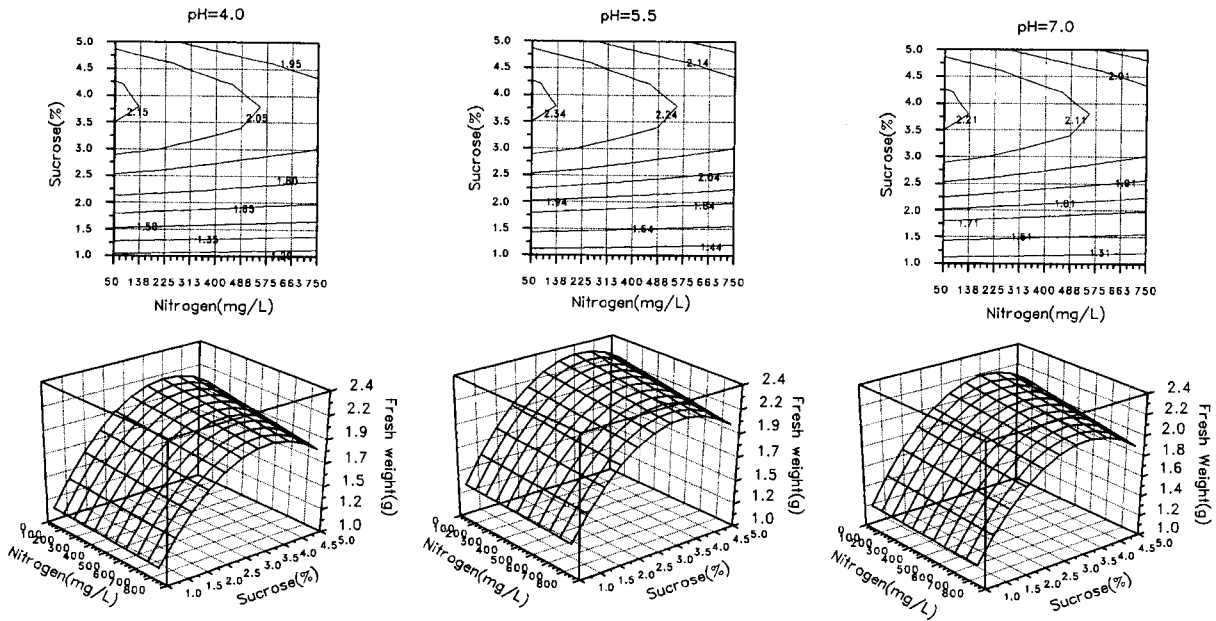


Fig. 1. Contour plots and response surfaces of the fresh weight of ginseng root at constant pH of 4.0, 5.5 and 7.0, respectively.

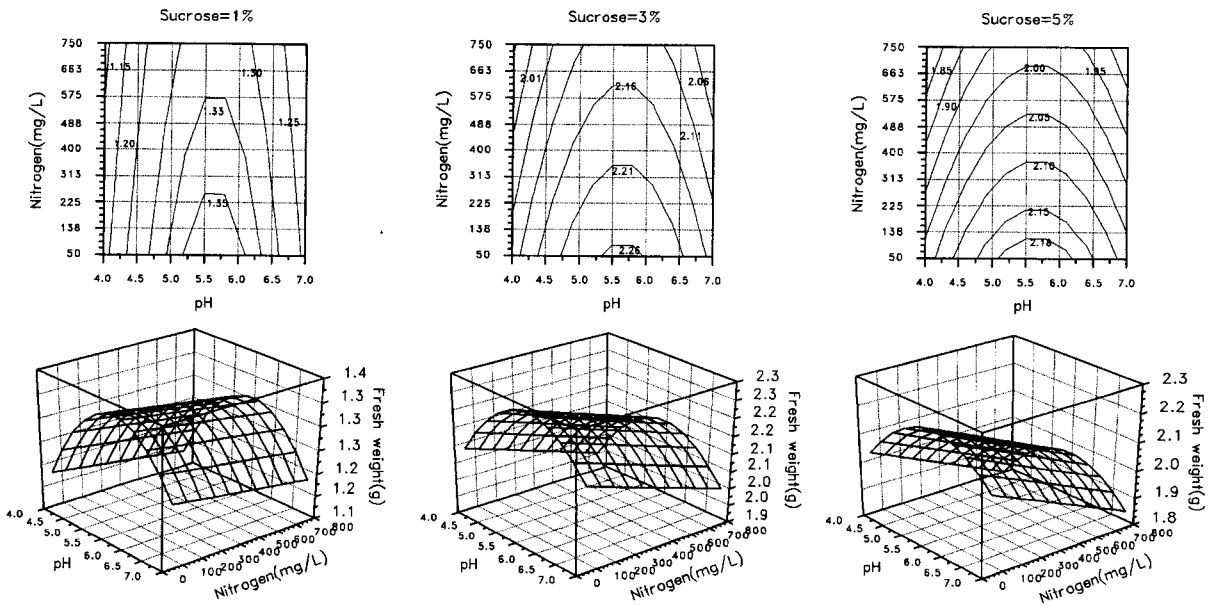


Fig. 2. Contour plots and response surfaces of the fresh weight of ginseng root at constant sucrose concentration of 1, 3 and 5%, respectively.

50 mg/L 부근에서 반응값이 2.34 g으로 최고 반응값을 나타내었고, pH 4.0, sucrose 1%, nitrogen 750 mg/L 부근에서 1.20g으로 최저 반응값을 나타내었다(Fig. 1). 독립변수 sucrose를 고정하였을 때에는 sucrose 3%일 때 pH 5.5, nitrogen 50 mg/L 부근에서 2.26g으로 가장 높은 반응값을 나타내었고, sucrose 1%일 때 pH 4.0, nitrogen 750 mg/L 부근에서 1.15 g으로 가장 낮은 반응

값을 보였다(Fig. 2). Nitrogen을 고정시켰을 경우 nitrogen 50 mg/L일 때 pH 5.5, sucrose 3.75%에서 2.35 g으로 최고값을 보였고, nitrogen 750 mg/L일 때 pH 4.0, sucrose 1% 부근에서 1.26 g으로 최소값을 나타내었다(Fig. 3). 이상에서 알 수 있듯이 nitrogen 농도가 적을수록 생장은 증가하였고, pH와 sucrose 농도는 중간농도에서 최고 생장을 나타내었고, 그 이상이나 이하의 농도

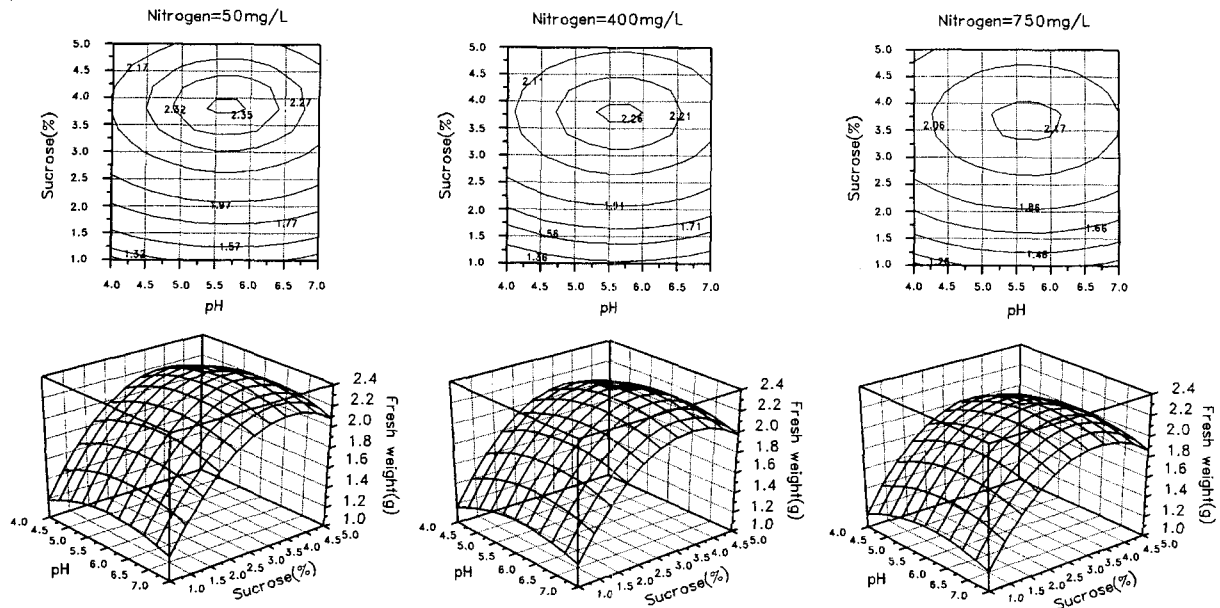


Fig. 3. Contour plots and response surfaces of the fresh weight of ginseng root at constant nitrogen concentration of 50, 400 and 750 mg/L, respectively.

에서는 생산이 감소되는 경향을 나타내었다. 최대 생산을 보이는 각 독립변수의 최적조건은 nitrogen 50 mg/L, phosphate 80.7 mg/L였고, 중간값에서 최대 반응값을 나타내는 pH와 sucrose는 미분하여 pH 5.6, sucrose 3.8%가 최적 조건임을 알아내었다. 이렇게 결정된 최적조건 값 pH 5.6, sucrose 3.8%, nitrogen 50 mg/L, phosphate 80.7 mg/L를 model식에 대입하여 얻은 예상치는 2.36g이었다.

요 약

식물조직배양기술을 이용하여 인삼 root를 생산하고자, 식물생장조절물질로 유도된 인삼 root를 사용하여 최적액체배양조건을 RSM을 이용하여 조사하였다. 최적액체배양조건을 배지의 pH, sucrose 농도, nitrogen 농도, phosphate 농도의 3 level - 4 factor의 fractional factorial design에 의하여 조사한 결과, 인삼 root의 생산량은 최저 1.00g에서 최고 2.33g까지 나타났다. 다중회귀분석으로 구한 model식을 가지고 등고분석과 3차원분석을 수행한 후 독립변수의 최저 또는 최고수준에서 종속변수가 최대치를 나타내지 않는 배지의 pH와 sucrose농도의 변수에 대하여 model식을 편미분한 결과 인삼 root의 최적액체배양조건은 pH 5.6, sucrose 3.8%, nitrogen 50 mg/L, phosphate 80.7 mg/L로 예측되었다. 이렇게 결정된 최적조건값들을 model식에 대입하여 얻은 예상치는 2.36 g이었다.

감사의 글

이 논문은 1998년도 농업과학분야 거점연구소 학술연구조성비에 의해 수행된 논문임(KRF-1998-024-G00087).

인용문헌

1. 지형준, 김현수 : 생약학회지 **16**, 171 (1985).
2. Slepian, L. I., Brushwitzky, I. V. and Butenko, R. G. : *Probl. Pharmacog.* **21**, 198 (1976).
3. 한창열, 김정선, 김교덕, 홍순근 : 식물조직배양학회지 **1**, 1 (1973).
4. 지형준, 신국현, 김현수, 조희재 : 생약학회지 **20**, 162 (1989).
5. Butenko, R. G., Brushwitzky, I. V. and Slepian, L. I. : *Bot. Zh.* **7**, 906 (1968).
6. Furuya, T., Kojima, H., Syono, K. and Ishii, T. : *Chem. Pharm. Bull.* **18**, 2371 (1970).
7. 이체두, 이상태 : 성균관대학교 논문집 **15**, 1 (1970).
8. 최광태, 김명원, 신희숙 : 고려인삼학회지 **6**, 162 (1982).
9. Murashige, T. and Skoog, F. : *Physiologia Plantarum* **15**, 473 (1962).
10. Schenk, R. H. and Hilderbrant, A. C. : *Can. J. Bot.* **50**, 199 (1972).
11. 강영동, 오훈일 : 식물조직배양학회지 **20**, 181 (1993).
12. 황백, 고경민, 황경화, 황성진, 강영희 : 식물학회지 **34**, 289 (1991).
13. 백운용, 안준철, 정병균, 김수웅, 황백 : 식물조직배양학회지 **20**,

- 159 (1993).
14. Shimomura, K., Sudo, H., Saga, H. and Kamada, H. : *Plant Cell Reports* **10**, 282 (1991).
15. Salisbury, F. B. and Ross, C. W. : Nutrient deficiency symptoms. In, *Plant Physiology*, Wordsworth Publishing Company, Inc., Belmont, California-, p. 88 (1978).
16. Yamakawa, T., Kato, S., Ishida, K., Kodama, T. and Minoda, Y. : *Agr. Biol. Chem.* **47**, 2185 (1983).