

## 고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer) 모상근으로부터 Ginsenosides 생산에 미치는 Jasmonic acid와 Methyl jasmonate의 영향

박효진 · 오승용 · 최경화 · 맹성주 · 윤의수\* · 양덕춘#

한국인삼연초연구원 신사업연구부, \*공주대학교 생물학과  
(2000년 4월 26일 접수)

### Effects of Jasmonic acid and Methyl jasmonate on the Production of Ginsenosides in the Hairy Roots of Korean Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer)

Hyo-Jin Park, Seung-Yong Oh, Kyung-Hwa Choi, Sung-Ju Meang, Eui-Soo Yoon\* and Deok-Chun Yang#

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea  
Department of Biology, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea

(Received April 26, 2000)

**Abstract :** To elucidate the effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on the production of ginsenosides and growth, ginseng hairy root KGHR-8 clone was cultured on the 1/2 MS medium without growth regulators, which was supplemented with of various concentrations jasmonic acid and methyl jasmonate and culture period. The highest growth rate was obtained when 1  $\mu$ M jasmonic acid and methyl jasmonate were treated. However, the growth was inhibited at more than 30  $\mu$ M of concentration. Treatment with high concentration of jasmonic acid (10  $\mu$ M) and methyl jasmonate (50  $\mu$ M) increased the contents and productivity of ginsenosides reversion of the growth inhibition. The highest contents and productivity of ginsenosides were appeared at 4 weeks after onset of the treatment of jasmonic acid and at 3 weeks in the case of methyl jasmonate.

**Key words :** Ginseng hairy root, ginsenosides, jasmonic acid, methyl jasmonate.

## 서 론

인삼은 옛날부터 한방의약품으로 오랫동안 이용되어온 전통약용 식물로서 특정성분의 약리효능을 과학적으로 인정받아 그 수요가 점차 전세계적으로 증가하고 있는 실정이다. 그러나 인삼은 재배기간이 길고 해가림이라는 특수한 조건하에서 재배해야 하므로 생산성이 낮아서 약리효과를 지닌 특정성분을 대량으로 생산하는데 많은 어려움이 있다.<sup>1)</sup> 따라서 식물세포를 미생물처럼 기내에서 배양하면서 식물세포의 2차 대사과정에서 생성되는 유용물질을 대량으로 생산하려는 연구가 시도되고 있다.<sup>2-4)</sup> 최근에 인삼에서 가장 중요한 성분으로 알려진 ginsenosides 각각의 성분에 대한 약리기작이 밝혀지면서,<sup>5,6)</sup> 특정 ginsenosides의 대량생산에 대한 요구가

높아지고 있으며 따라서 이러한 특정 ginsenosides의 대량생산을 위해서 형질전환된 모상근으로부터 생리활성물질을 생산하고자 하는 연구가 활발히 수행되고 있다.<sup>7-9)</sup> 형질전환된 모상근은 유전적으로 안정하며 식물생장조절제가 없는 배지에서 성장이 가능하기 때문에 대량배양이 가능한 것으로 알려지고 있다.<sup>10-15)</sup> 일반적으로  $\beta$ -glucan, glycoprotein, chitin, chitosan jasmonic acid, methyl jasmonate 등 여러 elicitor 들은 2차대사산물의 생합성과 분비를 촉진시키는 작용을 하기 때문에 식물 세포배양시 2차대사산물의 생산을 위한 촉진 도구로 사용되고 있다.<sup>14)</sup> 이들중 특히 jasmonic acid와 methyl jasmonate는 식물이 상처를 받았을 때 세포내 2차신호전달 물질로 작용하는 것으로 알려져 있다. 식물이 상처를 받으면 상처를 받은 부위는 물론 상처받은 부위와 떨어진 부위에서도 단백질 분해효소 저해제 등 여러 방어물질의 합성이 유도된다. 이러한 일련의 반응들은 물관을 거쳐 상해신호체가 다른 부위로 전달되어야 하는데 이때 상해 신호전달과

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 042-866-5434; (팩스) 042-862-2522  
(E-mail) dcyang@gtr.kgtri.re.kr

정에서 신호전달물질로 jasmonic acid와 methyl jasmonate가 유력한 후보물질로 생각되고 있다. 또한 jasmonic acid는 식물의 성장과 뿌리 발달에 있어 천연 성장조절물질로서의 생리적 기능이 있으며 토마토나 감자에서 단백질 분해효소 저해제의 합성 및 대두에서 저장단백질의 합성을 유도하기 때문에, 이렇듯 jasmonic acid는 몇몇 과학자들에 의해 새로운 식물호르몬으로 불리고 있다.<sup>11)</sup> 따라서 본 연구는 인삼 모상근으로부터 ginsenosides를 대량 생산하기 위하여 2차대사산물 elicitor로 쓰이는 jasmonic acid와 methyl jasmonate를 처리하여 ginsenosides의 함량을 증대시킬 수 있는 방안을 찾고자 수행하였으며 그 결과를 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

본 실험에서 사용한 인삼 모상근은 *Agrobacterium rhizogenes* A4 균주를 이용하여 유도된 KGHR-8 라인 세포주를 사용하였다.<sup>14)</sup> 모상근이 7~8 cm로 자라면 근단으로부터 2~3 cm 길이로 잘라내어 5~6개의 절편 조각을 배지에 치상하였다. 배지는 항생제 및 호르몬이 전혀 첨가되지 않은 1/2 MS, 3% sucrose배지로 100 ml 삼각플라스크에 배지 40 ml를 분주하여 모상근을 치상하고 암상태에서 진탕배양(100 rpm, 23°C)하며 3주 간격으로 계대배양 하였다.

### 2. Jasmonic acid와 Methyl jasmonate의 처리

모상근 세포주(KGHR-8)의 성장과 ginsenosides 생산에 미치는 jasmonic acid와 methyl jasmonate의 영향을 조사하고자 jasmonic acid(Sigma, J-2500)를 20 mM 농도로 제조하여 사용하였고, methyl jasmonate(Aldrich Chem. co)는 1 M의 stock solution을 만들어 냉동보관하며 사용하였다. 각 실험 처리구는 배양중인 모상근에 0, 0.5, 1, 5, 10, 30, 50, 100 µM 농도로 일주일 간격으로 첨가하였으며 각처리구는 4주 동안 배양한 후 모상근의 성장을 플라스크당 생체중과 건조중으로 조사하였다,

### 3. Ginsenosides 함량측정

Ginsenosides 함량은 수포화 1-부탄올 추출법인 Ando<sup>2)</sup> 등의 방법에 따라 추출, 분석하였다. 동결건조시킨 분말시료 0.5g을 취하여 80°C 온수욕조에서 80% 메탄올 30 ml로 3회 추출하여 건조시킨 후 메탄올 엑기스를 얻었다. 그후 에테르로 재추출하여 탈지시킨다음 수포화 1-부탄올로 3회 추출하여 1-부탄올층만을 모두 합하여 증류수로 1회 세척한 후 수층은 버리고 1-부탄올층만 건조시켰다. 건조된 분말을 High Performance Liquid Chromatograph(HPLC)용 메탄올 500

µl에 녹여 0.45 µm millipore syringe filter로 여과한 후 10 µl를 HPLC(Waters)기에 주입하여 ginsenosides를 panaxatriol(PT)과 panaxadiol(PD)로 분리하고 정량하였다.

사포닌 화합물의 확인 및 정량분석에 사용된 ginsenosides 표준품(Rg<sub>1</sub>, Rf, Re, Rd, Rc, Rb<sub>2</sub>, Rb<sub>1</sub>)은 한국인삼연구소에서 분양받은 것을 사용하였다. 실험재료의 ginsenosides 검정은 Waters R401 Refractive index(RI) 검출기로 검출, 정량하였고, column은 Lichrosorb-NH<sub>2</sub> column(Merck Co., 10 µm, 4 mm ID × 250 mm), 용매는 acetonitrile/H<sub>2</sub>O/*n*-butanol(80:20:10), flow rate는 0.5 ml/min로 하여 분석하였다. Chromatogram의 각 peak는 사포닌 표준품과 retention time을 비교하여 동정하였고, 각 ginsenosides 함량은 표준품과 비교하여 peak height로 계산하였다. 추출 및 용매 분획 분리용매로 사용한 메탄올, 에테르, 1-부탄올 등은 일급 시약을 사용하였으며, 액체크로마토그래피의 전계용매인 아세토니트릴, 증류수, 1-부탄올, 메탄올 등은 Merck사 HPLC용을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 인삼 모상근 성장과 ginsenosides 함량증대에 미치는 Jasmonic acid의 영향

인삼모상근 배양시 jasmonic acid가 인삼 모상근 성장과 ginsenosides 생산에 미치는 효과를 조사한 결과, 0.5, 1 µM 처리구는 대조구보다 약간 높은 성장을 나타냈고 1, 5, 10 µM에서는 대조구보다 약간 낮은 성장을 보였다. 그러나 30 µM 이상 고농도에서는 대조구에 비해 30~40% 정도 생장이 낮았다(Fig. 1A). Ginsenosides 생성의 경우 10 µM 처리구에서 13.46 mg · g DW<sup>-1</sup>로 생장이 양호했던 1 µM 처리구의 12.54 mg · g DW<sup>-1</sup>보다 오히려 10% 정도 높은 ginsenosides 함량을 보였다(Fig. 1B). 그 이외의 모든 처리구에서는 대조구와 비슷하거나 더 적은량의 ginsenosides가 생성되었는데 특히 생장이 급격히 낮아졌던 30 µM 이상 농도에서는 ginsenosides 함량도 역시 낮게 나타났다. 또한 플라스크당 ginsenosides의 생산성도 ginsenosides 함량이 높았던 10 µM 처리구에서 11.45 mg · flask<sup>-1</sup>로 가장 높게 나타났다(Fig. 1C). 따라서 인삼모상근으로부터 ginsenosides를 대량생산하기 위해서는 jasmonic acid를 10 µM을 첨가하는 것이 가장 효과적인 것으로 밝혀졌다.

이상의 결과를 바탕으로 ginsenosides 함량이 가장 높았던 10 µM 농도의 jasmonic acid를 배양시기별로 달리 처리하여 본 결과, 모상근 성장량은 처리 전후반 구별 없이 그 효과가 미미하였으나 플라스크당 생산성은 4주후 jasmonic acid를 처리한 처리구에서 가장 양호하였다(Fig. 2A). 즉, 배양 4주후

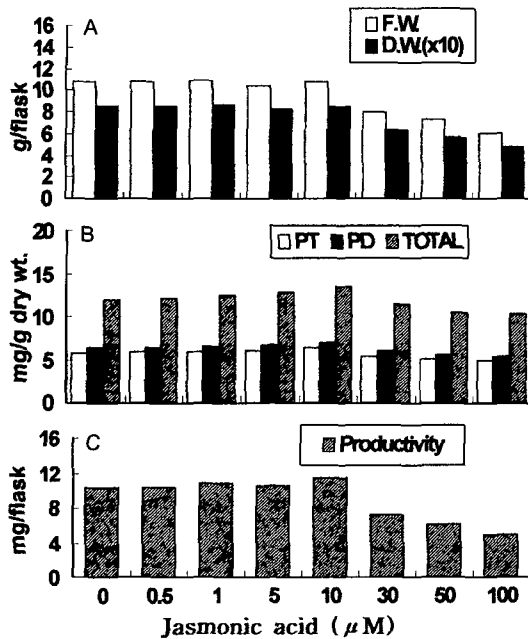


Fig. 1. The effects of jasmonic acid on the growth (A), contents of ginsenosides (B) and productivity (C) from ginseng hairy root cultured containing various concentrations of jasmonic acid in the 100 ml flask (PT: panaxatriol, PD: panaxadiol).

처리구에서 ginsenosides 함량이  $14.12 \text{ mg} \cdot \text{g DW}^{-1}$ 으로 대조구의  $12.02 \text{ mg} \cdot \text{g DW}^{-1}$  보다 9% 정도 높았다(Fig. 2B).

일반적으로 외부로부터의 상처나 자극이 새로운 단백질 합성을 유도하기 위해서는 세포막에서 핵으로의 신호전달이 필수적인데, 물리적인 상처나 자극이 생화학적 반응을 유도하는 이러한 과정에 신호로 작용하는 엘리트가 세포벽 성

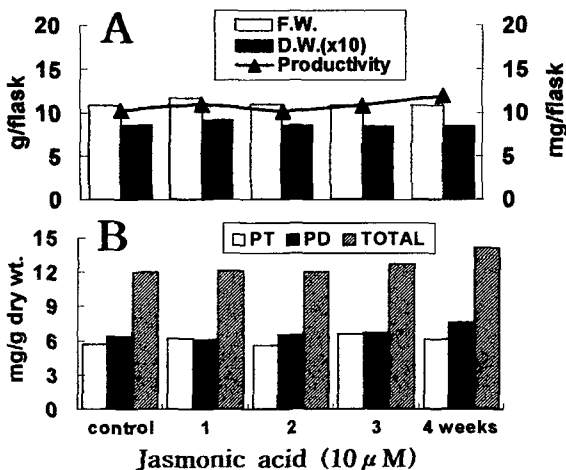


Fig. 2. The effects of jasmonic acid ( $10 \mu\text{M}$ ) on the growth (A), and ginsenosides productivity (B), of ginseng hairy root according to culture period (PT: panaxatriol, PD: panaxadiol).

분인 올리고당인 것은 잘 밝혀져 있다.<sup>1)</sup> 이 올리고당들은 상처나 자극시에 식물의 세포벽 또는 미생물세포벽 유래인데, 인위적으로 이것을 상처받지 않은 식물에 처리해 주면 단백질 분해효소 저해제 등 여러 방어물질의 합성이 유도된다.<sup>11)</sup> 이들 중에서 식물의 성장과 발달에 있어 천연 생장조절물질의 기능을 하는 것으로 알려진 jasmonic acid는 일반적으로 피자식물에 광범위하게 분포되어 있으며, 나자식물에도 다소 함유되어 있는 것으로 밝혀졌다. Ravnkar<sup>10)</sup> 등은 감자에  $1 \mu\text{M}$ 의 jasmonic acid를 처리할 경우 뿌리의 비대생장을 가져왔다고 보고하였으며, Barbara<sup>3)</sup> 등은 감자에 jasmonic acid를 처리한 경우 24시간 이후부터 뿌리 끝부분의 세포의 수가 지속적으로 증가된다고 보고하였다. 본 실험 결과 인삼 모상근의 경우 뿌리의 생장은 저농도의 jasmonic acid에서는 증가하였으나, 고농도에서는 오히려 생장이 둔화되었다. 그러나 생산성과 ginsenosides 함량은 오히려  $10 \mu\text{M}$ 의 고농도에서 증가한 것으로 보아 세포의 크기가 증가되면서 생리활성 물질의 축적이 증가된 것으로 생각된다. 그러므로 인삼의 모상근 배양시 적정농도의 jasmonic acid와 배양기간이 매우 중요하며 본 실험 결과  $10 \mu\text{M}$ 의 jasmonic acid를 사용하면 인삼모상근의 대량생산과 ginsenosides의 생성촉진에 효과적인 것으로 구명되었다.

## 2. Methyl jasmonate의 영향

식물의 성장과 발달에 있어 천연 생장조절물질의 일종으로 작용하는 methyl jasmonate는 jasmonic acid와 함께 식물의 signal transduction에 관여하는 물질이며, 상처에 의해 생성되고, 방어유전자를 자극한다고 알려져 있다.<sup>5)</sup>

인삼모상근의 대량생산과 ginsenosides의 대량생산을 위하여 methyl jasmonate를 농도별로 달리 처리해 본 결과 KGHR-8 모상근의 생장은  $1 \mu\text{M}$  처리구에서 가장 양호하였다(Fig. 3A). Methyl jasmonate  $1 \mu\text{M}$  처리구에서 생장이  $10.88 \text{ g} \cdot \text{flask}^{-1}$ 로 대조구의  $10.83 \text{ g} \cdot \text{flask}^{-1}$  및  $10 \mu\text{M}$ 의  $10.76 \text{ g} \cdot \text{flask}^{-1}$ 보다 약간 높았으나  $10 \mu\text{M}$  이상의 농도에서는 평균 대조구에 비해 20~30% 정도 낮은 생장을 보였다(Fig. 3A). 그러나 ginsenosides 함량은 생장이 낮았던  $50 \mu\text{M}$ 의 고농도 처리구에서  $24.97 \text{ mg} \cdot \text{g DW}^{-1}$ 로 생장이 가장 양호했던  $1 \mu\text{M}$  처리구의  $7.20 \text{ mg} \cdot \text{g DW}^{-1}$ 보다 오히려 3배 정도 높았으며(Fig. 3B) 플라스크당 ginsenosides의 생산성 또한  $50 \mu\text{M}$  처리구에서  $19.20 \text{ mg} \cdot \text{flask}^{-1}$ 로 모든 처리구들 중에서 가장 높았다(Fig. 3C).

인삼모상근 배양중에 methyl jasmonate의 처리시기가 인삼모상근의 성장량과 ginsenosides의 생산량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 ginsenosides 생성과 플라스크당 생산량이 가장 높았던  $50 \mu\text{M}$  methyl jasmonate를 배양시기별로

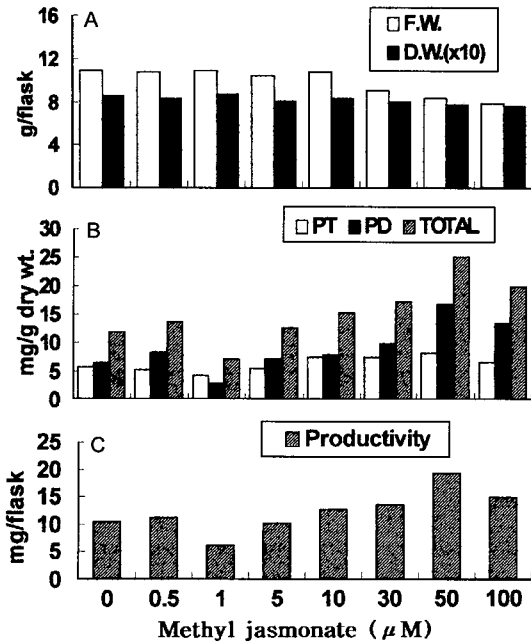


Fig. 3. The Effects of methyl jasmonate on the growth (A), contents of ginsenosides (B) and productivity (C) from ginseng hairy root cultured containing various concentrations of jasmonic acid in the 100 ml flask (PT: panaxatriol, PD: panaxadiol).

달리 처리하여 본 결과, ginsenosides 함량은 배양 3주째 처리구에서 17.88 mg · g DW<sup>-1</sup>로 대조구의 12.02 mg · g DW<sup>-1</sup> 보다 30%정도 높았다. Flask당 생산성 역시 3주 처리구가 4주 처리구보다 높은 것으로 나타났다(Fig. 4A). 본 실험 결과 인삼모상근 배양시 배양 3주후에 methyl jasmonate를 50 μM 농도로 처리하는 것이 ginsenosides 생산량을 가장 높일수 있음을 알 수있었다. 이러한 결과는 lubimin과 solavetivone을 대량생산하기 위하여 *Hyoscyamus albus*로부터 모상근을 유도하고 배양 3주후에 methyl jasmonate를 처리하는 것이 lubimin과 solavetivone 생산량을 높이는데 효과적이었으며, 또한 *Hyoscyamus muticus* 뿌리 배양시 methyl jasmonate 50 μM 농도를 처리하는 것이 sesquiterpene 생산량을 높일수 있다는 보고와 일치하였다.<sup>11)</sup>

본 실험 결과 KGHR-8 인삼모상근의 성장량을 높이고 ginsenosides 함량을 높일 수 있는 jasmonic acid와 methyl jasmonate의 농도와 처리시기가 밝혀졌다. 추후 본 실험 결과는 인삼의 모상근배양으로부터 사포닌을 효율적으로 생산하는데 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

인삼모상근의 성장과 ginsenosides의 함량을 높이기 위하

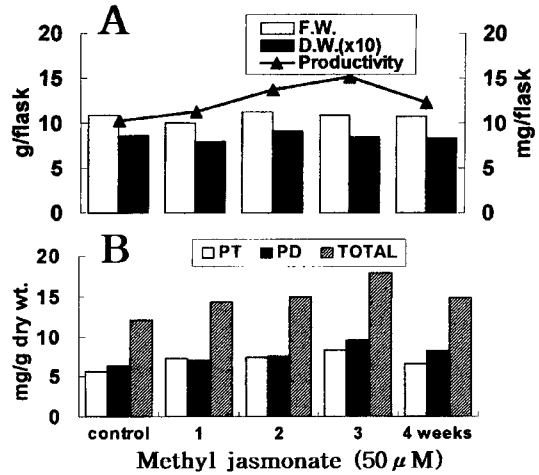


Fig. 4. The Effects of methyl jasmonate on the growth (A), and ginsenosides productivity (B) of ginseng hairy root according to culture period (PT: panaxatriol, PD: panaxadiol).

여 성장조절제가 첨가되지않은 1/2 MS 배지에 jasmonic acid와 methyl jasmonate의 농도와 처리시기를 달리하여 인삼모상근 KGHR-8 세포주를 배양하였다. 인삼모상근 생장은 jasmonic acid와 methyl jasmonate 모두 1 μM 농도에서 가장 양호하였으며 30 μM 이상 농도가 증가할수록 모상근생장이 감소하였다. 그러나 생장이 낮았던 jasmonic acid 10 μM 처리구와 methyl jasmonate 50 μM에서 ginsenosides 함량과 생산성이 더 높았다. 배양시기별로 jasmonic acid와 methyl jasmonate의 처리 효과는 jasmonic acid는 배양 후 4주, methyl jasmonate는 3주에 처리하는 것이 ginsenosides의 함량과 생산성을 높이는데 효과적이었다.

인용문헌

1. 강영희 : 식물바이오테크놀로지사전 (1997).
2. Ando, T., Tanaka, O. and Shibata, S. : *Syoyakugaku Zasshi*. **25**, (1971).
3. Barbara, V., Ravnika, M. and Dennis, F. : *Plenum*. **12**, (1997).
4. Christen, P., Roberts, M. F., Phillipson, J. D. and Evans, W. C.: *Plant Cell Reports* **8**, 75 (1989).
5. Farmer, E. E. : *Plant Mol. Biol.* **26**, 1423 (1994).
6. Hong, S. J., Lee, Y. W. and Joo, C. N. : *Kor. J. Ginseng Sci.* **11**, 136 (1987).
7. Hwang, B. and Ko, K. M. : *Kor. J. Biotechnol. bioeng* **4**, 288-292 (1989).
8. Kuroyanagi, M., Arakawa, T., Mikami, Y., Yoshida, K., Kawahar, N., Hayashi, T. and Ishimaru, H. : *J. Nat. Prod.* **61**, 1516-1519 (1998).
9. Murashige, T. and Skoog, F. : *Physiol. Plant.* **15**, 473-497.

- (1962).
10. Ravnkar, M., Beve, L. and Gogala, N. : *Acta Pharmaceu.* **45**, 241 (1995).
11. Singh, G., Gavrieli, J., Oakey, J. S. and Curtis, W. R. : *Plant Cell Reports.* **17**, 391-395 (1998).
12. Staswick, P. E. : *Plant Physiol.* **99**, 804-807 (1992).
13. Yang, D. C., Choi, H. Y., Kim, Y. H., Yun, K. Y. and Yang, D. C. : *Korean J Ginseng Sci* **20**, 318-324 (1996).
14. Yang, D. C., Kim, Y. H., Yang, D. C., Min, B. H., Shin, S. L. and Choi, K. T. : *Korean Society of Plant Tissue culture.* **25**(6), 525-530 (1998).
15. Yoshikawa, T. and Furuya, T. : *Plant Cell Rep.* **6**, 449-453 (1987).