

인삼 뿌리 부위별 및 모상근 세포주간 ginsenoside 양상 및 함량

양덕춘* · 양계진¹

한국인삼연초연구원, ¹충부대학교 생명자원학부

Patterns and Contents of Ginsenoside in Normal Root Parts and Hairy Root Lines of *Panax ginseng* C. A. Meyer

YANG, Deok Chun* · YANG, Kye Jin¹

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon, 305-345, Korea

¹College of Life Science, Joongbu University, Kumsan, Chungnam, 312-600, Korea

ABSTRACT The patterns and contents of ginsenosides were examined in normal root parts and hairy root lines of *Panax ginseng* C. A. Meyer. Ginsenoside-Rb₁, -Rb₂, -Rc, -Rd, -Re, -Rf, -Rg₁, -Rg₂ were detected in normal roots and hairy roots of ginseng. The patterns and contents of ginsenosides in that were very difference each other. The contents of total ginsenoside of hairy root (KGHR-1) was 17.42 mg/g dry wt, it's highest compared to others. Ginsenoside contents of hairy root (KGHR-1) was higher on ginsenoside-Rd, Rg₁, KGHR-5 was higher on ginsenoside-Rb₁, Rg₁, and KGHR-8 was higher on ginsenoside-Rd, Re than others. The contents of total ginsenosides on 6 years old ginseng cultured in the field were high in the order of main root, lateral root and fine roots, and content of ginsenosides in fine roots was 3.2 times higher than that in main root. The ratio of ginsenoside-Rg₁ to total ginsenosides were about 3.43%, 8.68% and 14.18% respectively on fine root, lateral root and main root, it's very lower than that in hairy roots. It is suggested that specific ginsenosides can be produce in cultures of ginseng hairy roots.

Key words : Ginseng, ginsenoside, hairy root, normal root

서 론

고려인삼은 한국의 대표적인 자원식물로서 근래 소비자의 기호 추세에 부합하는 여러가지 타입의 인삼 단일제제 및 생약 복합제제가 개발되어, 건강식품 또는 의약품으로 등록되고 있으며, 점차 그 범위가 확대되고 있다. 근래에 인삼의 대표적인 생리활성물질인 진세노사이드 (ginsenoside)의 약리작용이 밝혀지면서 진세노사이드 대량생산의 필요성이 대두되고 있는 실정이다. 인삼의 ginsenoside는 여러 가지 약리작용과 효능이 밝혀지고 있는데, 중추신경계에 대한 작용, 뇌기능 향

진작용, 항발암작용과 항암작용, 면역기능 조절작용, 항당뇨작용, 간기능 향진효능, 심혈관 장애개선 및 항동맥경화작용, 혈압 조절작용, 갱년기 장애 개선, 항스트레스 및 항피로작용, 항염증작용, 마약해독작용, 항산화활성 및 노화억제 효능 등이 알려지고 있다 (Nam 1994). 그러나 인삼은 4~6 년간 장기간 재배를 해야하므로 매우 고가로 판매되고 있어 단일 ginsenoside의 대량생산을 위해서는 많은 원료삼이 소비되기 때문에 경제성을 맞추기가 매우 어려운 상황이다. 최근 ginsenoside의 대량생산을 위한 방안으로 형질전환된 인삼모상근의 대량배양을 통하여 가능할 것으로 보고되고 있는데 (Yang et al. 1998), 인삼 모상근은 식물호르몬 무첨가 배지에서 서도 성장할 수 있는 장점과 증식속도가 빠른 특징을 지니고 있어 모상근을 이용한 ginsenoside의 생산연구가 진행되고 있는 실정이다 (Hwang et al. 1989; Yang et al. 1996;

*Corresponding author. Tel 042-866-5434

E-mail dcyang@gtr.kgtri.re.kr

Yoshikawa and Furuya 1987). 인삼모상근의 대량배양을 통하여 단일 panaxatriol, panaxadiol 그리고 총 ginsenoside의 생산성을 높이기 위해서는 우수한 세포주의 선발이 선행되어야 하며, 모상근세포주가 생성하는 ginsenoside의 양상 및 함량을 인삼근과 비교함으로써 ginsenoside의 대량생산을 위한 기초자료로 사용될 것으로 판단된다. 따라서 본 연구는 생장이 우수한 모상근세포주들의 ginsenoside 양상 및 생성특성을 6년생 인삼의 부위별과 비교 조사하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 배양

식물재료로 사용된 6년근 고려인삼 (*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 한국인삼연초연구원 포장에서 1998년 10월 중순에 채굴한 것을 부위별 (주근, 지근, 측근)로 동결건조한 후 사용하였다. 모상근은 3년근 인삼의 주근에서 *Agrobacterium rhizogenes* A4에 의하여 유도 선발된 모상근 세포주 (Yang et al. 1998)를 사용하였다. 인삼 모상근 세포주의 계대배양은 생체중 0.5g를 Gamborg B5 (Gamborg et al. 1968)배지의 비타민과 3% sucrose가 첨가된 MS (Murashige and Skoog 1962) 액체배지에서 3주 간격으로 배양하였다. 모상근세포주의 ginsenoside 양상 및 함량 비교를 위해서 사용한 모상근은 생체중 1 g을 40 ml MS/B5 액체배지가 들어 있는 100 ml 삼각플라스크에서 23°C로 4주간 암상태에서 배양한 것을 사용하였다.

Ginsenoside의 추출 및 분석

Ginsenoside의 추출은 n-BuOH 추출법에 의하여 추출하였다. 건조 분말시료 1 g을 취하여 60°C 수욕조에서 80% MeOH로 추출하여 건조시킨 후, 에테르로 추출하여 탈지시켰다. 그리고 수포화 1-BuOH로 추출하고 증류수로 세척한 뒤, 1-BuOH층을 건조시켜 TLC 및 HPLC로 분석하였다. 추출한 진세노사이드의 TLC 분석은 조사포넨 5 µl을 TLC plate (silica gel 60 F₂₅₄, Merck)에 점적한 후, CHCl₃:MeOH:H₂O (13:7:2, v/v)의 하층부로 전개하였으며, 30% 황산 (H₂SO₄)을 분무하여 105°C 건조기에서 발색하였다. Ginsenoside의 정량분석은 HPLC를 이용하여 refractive index (RI) 검출기 (Waters R40I)로 분석하였으며, 컬럼은 Lichrospher-NH₂ column (Merk Co., 10 µl, 0.46 cm I.D×25cm), 이동상은 acetonitrile/H₂O/1-butanol (80:20:10, V/V),

flow rate는 Waters사의 U6K를 사용하였고, flow rate는 0.3 ml/min 조건 하에서 chromatogram의 각 peak를 표준품과 비교하여 ginsenosides의 함량을 peak height로 계산하였다.

결과 및 고찰

3년근 고려인삼으로부터 선발한 인삼모상근 세포주 (KGHR-1, KGHR-5, KGHR-8; Yang et al. 1998)의 특성을 조사하고자 6년생 인삼근의 부위별 (Figure 1)에서 인삼의 대표적인 8가지 ginsenoside의 양상과 함량을 비교하였다. 모상근 세포주를 MS/B5배지에서 4주간 배양하였을 때, KGHR-5 세포주는 갈색이면서 가느다란 형태로 성장하였으며, KGHR-1과 KGHR-8 세포주는 KGHR-5보다 굵으면서 흰색이었다 (Figure 1). 3 종류의 인삼모상근 세포주에서 ginsenoside 양상을 TLC 및 HPLC로 비교한 결과, 8가지 ginsenoside-Rb₁, -Rb₂, -Rc, -Rd, -Re, -Rf, -Rg₁, -Rg₂를 확인하였으며 (Figures 2, 3), ginsenoside의 함량은 총 ginsenoside 및 각각의 함량에서 큰 차이를 나타내었다 (Table 1).

인삼의 대표적인 8종류의 총 ginsenoside 함량은 KGHR-1 세포주가 17.42 mg/g dry wt로 가장 높고, 다음으로 KGHR-5 세포주가 16.33 mg/g dry wt 그리고 KGHR-8 세포주가 12.66 mg/g dry wt를 생성하였다. 모상근세포주 KGHR-1의 ginsenoside 함량은 지금까지 보고된 보문 (Hwang et al. 1989; Yang et al. 1996; Yoshikawa and Furuya 1987)보다 높은 수준으로 총 ginsenoside의 대량생산을 위한 우수한 세포주라 판단된다. 인삼의 ginsenoside는 크게 panaxatriol-ginsenoside (PT)와 panaxadiol-ginsenoside (PD)로 나누며,

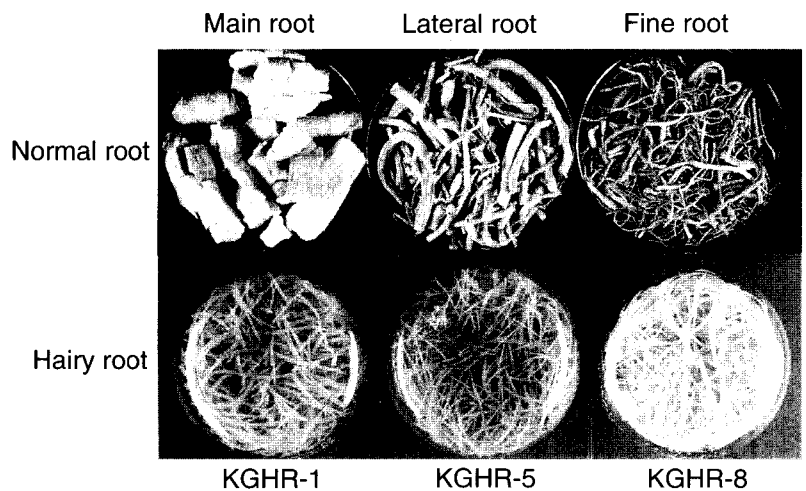


Figure 1. Normal roots of 6 years old and hairy root lines in *Panax ginseng* C. A. Meyer. Hairy roots were cultured in MS/B5 liquid medium (3% sucrose, 40ml/100flask) in the dark conditions for 4 weeks at 23°C on rotary shaker (100 rpm). The initial inoculum was 1g fresh hairy roots per flask.

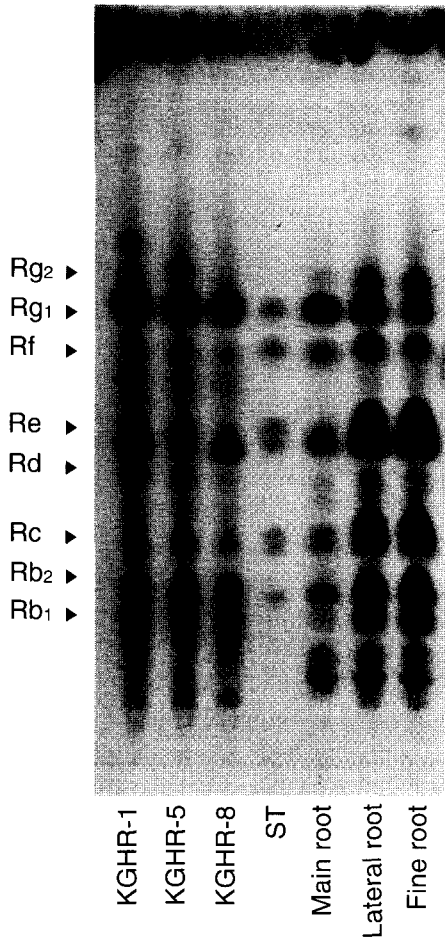


Figure 2. TLC profiles of crude ginseng saponins prepared by BuOH extraction methods from hairy root lines and normal roots. Mobile phase : CHCl₃:MeOH:H₂O (13:7:2, v/v, lower phase). ST: ginsenoside standard.

이들의 약리효능도 다르기 때문에 PT 및 PD 중에서 어느 한 쪽만을 많이 생성하는 세포주의 선발도 중요하다. 따라서 3종류 모상근세포주의 PT 및 PD의 생성특성을 조사한 결과, PD/PT의 비율이 가장 높은 모상근세포주는 KGHR-5로 1.17이었으며, KGHR-1과 KGHR-8은 각각 0.97, 1.00 수준으로 나타나 PD 생산을 위한 세포주는 KGHR-5 세포주가 적합한 것으로 판단된다. 최근 단일 ginsenoside에 대한 약리효능이 밝혀지면서 단일 ginsenoside에 대한 대량생산의 필요성이 대두되고 있는 실정이므로 단일 ginsenoside 생성에 대한 특성을 조사한 결과 세포주 간 많은 차이를 나타내었다. 인삼모상근 세포주 KGHR-1의 경우 ginsenoside-Rd와 Rg₁은 다른 ginsenoside보다 많은 양을 생성하였으며, ginsenoside-Rd는 4.31 mg/g dry wt로써 총 ginsenoside의 24.74%였고, ginsenoside-Rg₁은 3.59 mg/g dry wt로써 20.61%의 높은 비율을 차지하였다 (Table 1). 인삼모상근 세포주 KGHR-5의 경우 ginsenoside-Rb₁과 Rg₁을 많이 생성하는 세포주로서 ginsenoside-Rb₁은 3.28 mg/g dry wt로써 총 ginsenoside 20.09%이고 ginsenoside-Rg₁은 3.99 mg/g dry wt로써 24.43%의 높은 비율을 차지하였다. 또한 인삼 모상근세포주 KGHR-8의 경우 ginsenoside-Rd와 Re을 많이 생성하였는데 ginsenoside-Rd는 3.91 mg/g dry wt로써 총 ginsenoside의 30.88%이고 ginsenoside-Re는 3.00 mg/g dry wt로써 23.70%의 높은 비율을 차지하였다 (Table 1). 위의 결과에서 인삼모상근 세포주가 상대적으로 많이 생성하는 ginsenoside는 ginsenoside-Rb₁, -Rd, -Re, -Rg₁이며, ginsenoside-Rb₂, -Rc, -Rg₂의 생성은 0.57~1.47 mg/g dry wt로써 총 ginsenosides의 4.50~9.00%로 중간 수준이었다.

Table 1. Ginsenoside contents of hairy root lines and normal root parts in *Panax ginseng* C.A. Meyer.

Lines and parts	Ginsenoside contents (mg/g dry wt)												
	Rb ₁	Rb ₂	Rc	Rd	Re	Rf	Rg ₁	Rg ₂	PD	PT	PD/PT	Total	
Hairy roots	KGHR-1	1.97 (11.31)	1.11 (6.37)	1.20 (6.89)	4.31 (24.74)	3.42 (19.63)	0.80 (4.59)	3.59 (20.61)	1.02 (6.08)	8.59	8.83	0.97	17.42
	KGHR-5	3.28 (20.09)	1.33 (8.14)	0.98 (6.00)	3.21 (19.66)	1.70 (10.41)	0.37 (2.27)	3.99 (24.43)	1.47 (9.00)	8.80	7.53	1.17	16.33
	KGHR-8	1.22 (9.64)	0.57 (4.50)	0.62 (4.90)	3.91 (30.88)	3.00 (23.70)	0.51 (4.03)	2.17 (17.14)	0.66 (5.21)	6.32	6.34	1.00	12.66
Normal roots	Main root	2.67 (12.25)	1.33 (6.10)	11.11 (50.99)	0.67 (3.07)	1.70 (7.80)	0.44 (2.02)	3.09 (14.18)	0.78 (3.58)	15.78	6.01	2.63	21.79
	Lateral root	12.27 (21.68)	8.67 (15.32)	10.67 (18.85)	2.67 (4.72)	12.80 (22.62)	2.49 (4.40)	4.91 (8.68)	2.11 (3.73)	34.28	22.31	1.54	56.59
	Fine root	16.00 (22.93)	10.66 (15.28)	14.00 (20.06)	5.11 (7.32)	16.21 (23.23)	1.86 (2.67)	2.39 (3.43)	3.55 (5.09)	45.77	24.01	1.91	69.78

The culture conditions of hairy roots were the same as figure 1, PD:Ginsenoside-Rb₁+Rb₂+Rc+Rd, PT:Ginsenoside-Re+Rf+Rg₁+Rg₂. (): %/total ginsenoside.

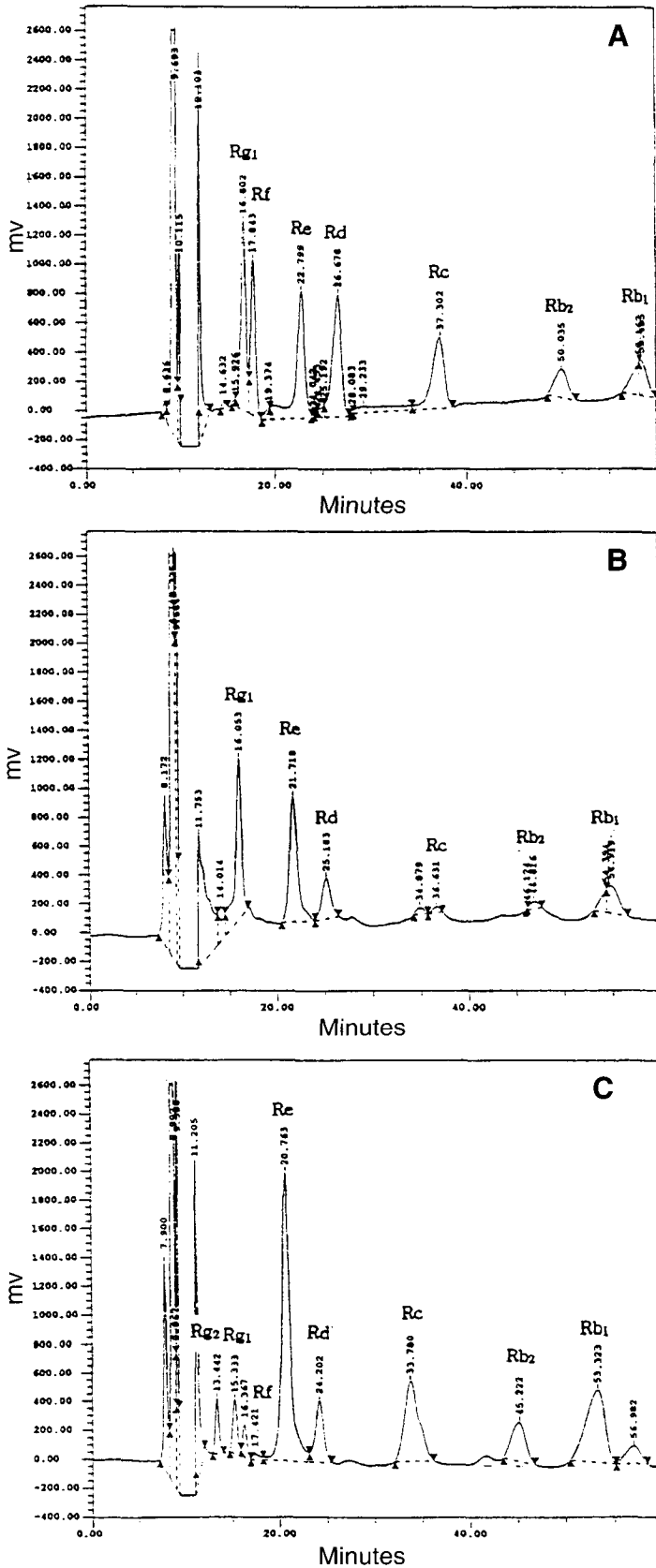


Figure 3. HPLC profiles of crude ginseng saponins prepared BuOH extraction methods from hairy roots normal roots. HPLC conditions : RI detector, LiChrospher-NH2 column (4.6cm I.D× 250mm), CH₂CN/H₂O/BuOH (80:20:10, v/v) element A: ginsenoside standard, B: hairy root (KGHR-8), C: normal root (fine root).

그러나 ginsenoside-Rf의 생성은 매우 낮은 수준으로 0.37~0.8 mg/g dry wt로써 총 ginsenoside의 2.27~4.59%로써 매우 낮았다. 따라서 선발된 인삼모상근 세포주는 ginsenoside 생성에서 다양한 특성을 지니고 있기 때문에 총 ginsenoside, PD/PT 및 특이 ginsenoside의 생산에 매우 적합한 세포주라 판단된다. 또한 ginsenoside-Rb₁, -Rd, -Re, -Rg₁은 인삼모상근이 상대적으로 많이 생성하는 것으로서 단일 ginsenoside는 함량을 증대시켜 ginsenoside의 생산에 적합할 것으로 판단된다. 한편 6년근 인삼근의 부위별 총 ginsenoside 함량(8종류)은 주근, 지근, 세근 순으로 많았으며, 그 함량은 각각 21.79, 56.59, 69.78 mg/g dry wt로써 세근의 총 ginsenoside 함량은 주근의 약 3.2배, 지근의 2.6배 높은 함량을 나타내었다. 이러한 결과는 세근의 총 ginsenoside 함량이 주근보다 높다는 결과 (Kim et al. 1987)와 일치하였다. Panaxatriol-ginsenoside (PT)에 대한 panaxadiol-ginsenoside (PD)의 비율은 주근이 2.63으로 가장 높으며, 지근 및 세근이 각각 1.54, 1.91 수준으로 인삼모상근 세포주의 0.97~1.17과 비교할 때 6년생 인삼근의 PD/PT 비율이 높은 것으로 나타났다. 주근의 ginsenoside 생성 특성은 ginsenoside-Rc의 생성 비율이 총 ginsenoside의 50.99%로서 매우 높은 함량을 나타내었고, 지근 및 세근은 각각 18.85, 20.06% 수준으로 인삼모상근 세포주의 4.90~6.89%와 비교할 때 높은 수준을 나타내었다. 지근 (lateral root) 및 세근 (fine root)의 ginsenoside 생성양상은 유사한 경향을 나타내었으며, ginsenoside-Rc, -Rg₁을 제외한 다른 ginsenoside는 주근에 비하여 총 ginsenoside에 대한 비율이 증가한 경향을 나타내었다 (Table 1). 반면 ginsenoside-Rg₁의 총 ginsenoside에 대한 비율은 3.43~14.18% 수준으로 주근, 지근 세근순으로 급격히 감소하는 특징을 나타내었으며, 모상근의 17.14~24.43%와 비교할 때 매우 낮은 정도를 나타내었다. 위의 결과에서 인삼모상근 세포주 (KGHR-1)의 ginsenoside 생성 정도는 6년생 인삼근 주근의 80%, 지근의 31%, 세근의 25% 수준이다. 또한 인삼모상근의 ginsenoside-Rd, Rg₁은 6년생 인삼근보다 모상근에서 높은 생성물을 나타내었다. 이상의 결과에서 인삼의 부위별 무게중 절반 정도가 ginsenoside의 함량이 가장 낮은 주근임을 감안할 때 (Kim et al. 1987), 본 연구진이 선발한 모상근의 ginsenoside 생성정도는 높은 수준이라고 판단된다. 또한 인삼모상근의 ginsenoside-Rd, Rg₁은 6년생 인삼근보다 높은 생성물을 나타내는 특징을 지니고 있기 때문에 단일 ginsenoside의 대량생산에 좋은 세포주라 생각되며, 앞으로 ginsenoside의 생산성 향상을 위한 일련의 연

구가 진행된다면 인삼모상근 배양을 통한 ginsenoside의 대량생산이 가능하다고 판단된다.

적 요

생장이 우수한 인삼모상근 세포주 (KGHR-1, KGHR-5, KGHR-8) 및 6년생 인삼근의 부위별로 ginsenoside 양상 및 생성특성을 조사하였다. 인삼모상근 및 6년생 인삼근에서 ginsenoside-Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁, Rg₂을 확인하였으며, 인삼모상근 세포주간 및 인삼근 부위별로 ginsenoside의 함량은 큰 차이를 나타내었다. 8종류의 ginsenoside 함량이 가장 높은 인삼모상근은 KGHR-1 세포주로 17.42 mg/g dry wt와 함량을 나타내었다. 모상근세포주 KGHR-1은 ginsenoside-Rd, Rg₁을, KGHR-5는 ginsenoside-Rb₁, Rg₁을, 그리고 KGHR-8은 ginsenoside-Rd, Re을 상대적으로 많이 생성하는 특징을 지니고 있으며, ginsenoside-Rf의 생성은 매우 낮았다. 6년생 인삼근의 부위별 ginsenoside의 함량은 주근, 지근, 세근순으로 많았으며, 주근에서 ginsenoside-Rc의 생성은 ginsenoside의 50.99%로써 모상근 세포주의 4.90~6.89%보다 매우 높았다. 6년생 인삼근의 총 ginsenoside에 대한 ginsenoside-Rg₁의 비율은 3.43~14.18% 수준으로 주근, 지근, 세근순으로 급격히 감소하였으며, 모상근의 17.14~24.43%와 비교할 때 매우 낮은 수준을 나타내었다. 따라서 인삼모상근 배양을 통하여 특정 ginsenosides 생산이 가능하리라 생각된다.

인용문헌

- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Plant Cell Res* **50**:151-158.
- Hwang B, Ko KM (1989) Induction and culture of hairy roots from ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) roots discs by *A. rhizogenes*. *Kor J Biotechnol Bioeng* **4**:288-292.
- Kim MW, Ko SR, Choi KJ, Kim SC (1987) Distribution of saponin in various sections of *Panax ginseng* root and changes of its content according to root age. *Korean J Ginseng Sci* **11**:10-16.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* **15**:473-497.
- Nam KY (1994) Progressed Korean Ginseng. *Korea Ginseng & Tobacco Research Institute Reports* 56-115.
- Park JD (1996) Recent studies on the chemical constituents of Korean ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). *Korean J. Ginseng Sci* **20**:389-415.
- Yang DC, Choi HY, Kim YH, Yun KY, Yang DC (1996) Growth and ginsenosides production of hairy root (*Panax ginseng* C. A. Meyer) via light energy. *Korean J Ginseng Sci* **20**:318-324.
- Yang DC, Kim YH, Yang DC, Min BH, Shin SL, Choi KT (1998) Selection of active grow hairy root lines in ginseng. *Korean J Plant Tissue culture* **25**:525-530.
- Yoshikawa T, Furuya F (1987) Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep* **6**:449-453.

(접수일자 2000년 9월 5일)