

## 고려인삼세포 현탁배양에서 회분배양 특성 및 Ginsenoside 생산에 대한 다양한 elicitors의 영향

유 병 삼 · † 변 상 요  
아주대학교 공과대학 화학생명공학부  
(접수 : 2001. 12. 7., 게재승인 : 2001. 12. 20.)

### Characteristics of Batch Cultures and Effects of Various Elicitors on Ginsenoside Production in Suspension Cultures of *Panax Ginseng* C.A. Meyer

Byung Sam Yoo and Sang Yo Byun†  
School of Chemical Engineering and Biotechnology, Ajou University, Suwon 442-749, Korea  
(Received : 2001. 12. 7., Accepted : 2001. 12. 20.)

This study was examined to investigate the time course behaviors of cell growth and sucrose consumption, and effects of various elicitors on ginsenoside production in batch suspension cultures of *Panax ginseng* Meyer. Suspended cells reached to the stationary phase at 12 days after inoculation. The maximum cell concentration was 14.7 g-DCW/L at 17 days. The highest cell growth rate was 0.59 g-DCW/L · d. The sucrose used as a sole carbon source was hydrolysed to glucose and fructose in 4 days, then quickly utilized until the middle-log phase and consumed completely at 16 days. Various elicitors were applied at 8 days from inoculation which is the middle-log phase. Among the elicitors tested, jasmonic acid was the most efficient to increase the ginsenoside production, which was 1.5 times higher than control.

**Key Words :** *Panax ginseng*, ginsenoside, elicitor, jasmonic acid, suspension culture

#### 서 론

식물세포배양에 의한 유용물질 생산 연구는 1980년대 초부터 활기를 띠기 시작한 이래 많은 성과가 있어왔다. Shiconin의 최초 상업화(1)를 시작으로 최근에는 주목세포배양에 의한 함암계 택솔의 대량생산의 성과가 있었다(2). 이러한 결과는 식물세포 배양공학의 다양한 기술에 의해 이루어 질 수 있었다. 예를 들면, 목적하는 유용물질을 고수율로 생산하는 세포주 선발 방법(high yield-cell line selection)이나, 유용물질의 생산성을 증가시키기 위한 배양배지 성분들의 최적화, elicitation 기법, 그리고 two-phase 배양 기술 등이 있다. 이와 같이 식물유래의 유용물질을 대량생산하기 위한 식물세포배양 기술의 개발 동기는 무엇보다도 천연자원의 공급 한계성이란 문제를 극복하기 위해서였다.

본 연구에서는 실험재료로 사용된 고려인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 한방의학이 성립되기 시작한 이래로 현재까

지 전 세계적으로 잘 알려져 있는 오갈피나무과(Araliaceae), 人參屬(*Panax*)에 속하는 대표적인 약용식물의 하나이다. 그리고 전 세계적으로 고려인삼을 포함한 다양한 인삼종들의 연간 판매량이 약 10억불에 이르고 있으며(3), 이들의 공급은 주로 민간 재배에 의해 대부분 공급되고 있다. 그런데 이와 같이 증가 추세에 있는 인삼류의 수요를 위해서는 현재의 재배방법에 한계성이 있다. 보통 인삼은 파종 후 완전히 성장하는데 까지 5-6년이 소요되며, 각종 병충해 및 기후영향 인자에 생육상태가 매우 민감하게 반응하므로 재배비용 및 노동력이 많이 요구되는 난점이 있다. 그래서 최근에는 위와 같은 문제점들을 극복하기 위해서 인삼 세포배양에 의한 유용물질 생산연구가 활발히 진행되고 있다. 초기의 인삼 세포배양 실험은 캘러스 수준에서 진행되었는데, Furuya 등(4)에 의해 처음으로 인삼 캘러스로부터 ginsenoside의 분리 동정이 확인되었고, 이후 이들은 각종 regulators, inhibitor, precursor들에 대한 인삼 캘러스의 ginsenoside 생산 특성(5,6)을 조사하였다. 또한 더 나아가서 인삼세포 현탁배양에서 ginsenoside 생산 특성(7)을 조사하였다. 그리고 한동안 인삼세포 현탁배양 연구가 다소 소강상태에 있었으나, 1995년 이후 Jian-Jiang Zhong 등에 의해 다시 활발한 연구가 재개되었다. 이들은 *Panax notoginseng*의 세포현탁배양에서 ginsenoside와 polysaccharide

†Corresponding Author : School of Chemical Engineering and Biotechnology, Ajou University, Suwon 442-749, Korea  
Tel : +82-31-219-2451, Fax: +82-31-214-8918  
E-mail : sybyun@ajou.ac.kr

의 생산에 대한 삼투압의 영향(8), 질소원(nitrogen source) 성분 영향(9), 고밀도 배양 조건의 영향(10),  $Cu^{2+}$ 의 영향(11) 그리고 탄소원 농도의 영향(12) 등을 조사하였다. 또한 *Panax ginseng*의 세포현탁배양에서 ginsenoside와 polysaccharide의 생산에 대한 식물생장호르몬의 영향(13), 질소원(nitrogen source) 성분 영향(14), potassium ion의 영향(15) 등을 조사하였다. 이와 같은 미분화 세포단계의 인삼 세포배양 연구와 더불어 분화단계의 인삼 hairy root 배양 연구가 ginsenoside 생산 연구를 위해 진행되어 왔다. Yoshikawa and Furuya (16)는 최초로 *Agrobacterium rhizogenes*에 의해 형질전환된 인삼 hairy root를 유도하였고, 이후 현재까지 이를 이용한 ginsenoside 생산 연구가 다양하게 진행되어 왔다(17-20).

본 연구의 목적은 현재까지 진행되어온 인삼 세포배양 연구를 바탕으로 ginsenoside 생산성을 더욱 증가시킬 수 있는 세포배양 기술로서 elicitation의 가능성 및 최적의 elicitor를 탐색하고자 수행되었다. 또한, 인삼 세포배양에 대한 elicitation 효과를 정확히 조사하기 위해서 본 연구실에서 현재까지 확립되어온 고려인삼세포주의 기초 배양 연구를 먼저 수행하게 되었다.

**재료 및 방법**

**식물재료 및 캘러스(Callus) 유도**

본 연구에 사용된 *Panax ginseng* 세포는 금산 지역에서 채취된 고려인삼 종자의 배(embryo)로부터 캘러스를 유도하여 확립하였다. 캘러스 유도를 위한 기본 배양 조건은 다음과 같다. MS 기본배지(21)에 탄소원으로 sucrose - 3%, pH 5.8, agar 0.7%의 고체배지에 살균된 종자시료를 무균상태로 유지하며 배를 분리하여 치상하였다. 이때 식물생장조절제로서 2,4-D와 kinetin을 사용하였고, 이들을 각각 1 - 5 ppm, 0.1 - 1 ppm의 농도 범위 내에서 다양한 농도 조합으로 캘러스 유도를 시도하였다. 또한, 캘러스 유도율이 가장 우수하였던 식물생장 호르몬 농도는 2,4-D와 kinetin을 각각 1 ppm, 0.1 ppm 또는 2,4-D 단독으로 3 ppm의 두 가지 조건이었고, 세포증식을 위한 조건으로 확립하였다. 그리고 25℃, 암 조건으로 유지하며 실험하였다.

**현탁배양(Suspension Culture) 조건**

유도된 인삼 캘러스를 MS 기본배지의 탄소원은 sucrose 3%, pH 5.8인 액체배지에 접종하여 현탁배양을 유도하였다. 유도된 현탁배양세포는 500 mL 삼각플라스크에서 200 mL 배양부피를 유지하며 10일 간격으로 25℃, 암 조건하에서 계대배양하였고, 회분배양 실험에 사용하였다.

**회분배양(Batch Culture) 실험 조건**

삼각플라스크에서의 회분배양 실험에 사용된 현탁세포는 대수성장기 상태에 있는 것을 사용하였다. 무균대에서 Whatman No. 1의 여과지가 들어있는 멸균된 funnel을 사용하여 진공 펌프에 의해 현탁세포의 배지가 제거되었고, 여과되고 남은 세포들을 고르게 섞어 준 후 40 mL 배지가 들어있는 125 mL 삼각플라스크에 15%(w/v)의 접종량으로 접종하였다. 회분배양 온도 조건은 25℃, 진탕기의 회전속도는 120 rpm, 암 조

건으로 유지하며, 모든 실험은 2 반복으로 수행하였다.

**세포성장 측정**

배양된 세포의 세포량은 fresh cell weight(FCW)와 freezing drying cell weight(FDCW)로 측정되었다. FCW는 배양된 세포를 Whatman No. 1의 여과지를 사용하여 수분을 제거한 후, 남은 세포의 무게를 저울로 측정하여 얻었고, FDCW는 용기의 무게가 미리 측정된 falcone tube에 fresh cell을 넣고, deep freezer에서 -70℃로 얼린 후, 동결건조기에서 건조하여 세포내 수분을 완전히 제거한 후, 세포의 건조량을 측정하여 얻었다. 그리고 모든 세포량의 단위는 g/L로 환산하여 나타내었다.

**Ginsenoside 분석**

회분배양 실험에서 ginsenoside 함량은 intracellular와 extracellular로 구분하여 조사하였다. Intracellular ginsenoside 함량 분석을 위해 동결 건조된 세포 100 mg을 이용하였으며, 수포화 n-buthanol을 5 mL 첨가하여 30분 동안 초음파 분쇄하고 원심분리 후, 상징액만을 회수하였다. Turbo Vap<sup>R</sup> II (Zymark, USA)에 의해 회수된 상징액을 농축한 다음 methanol로 정용하여 분석에 사용하였다. Extracellular ginsenoside 함량 분석을 위해서는 배양배지 5 mL에 동량의 수포화 n-buthanol을 첨가하여 partitioning에 의해 2회 추출하고, 각각의 추출단계에서 얻은 buthanol 층을 Turbo Vap<sup>R</sup> II에 의해 농축한 다음 methanol로 정용하여 분석에 사용하였다. 두 가지 경우의 최종 methanol 추출액은 0.45 μm filter로 여과한 후, HPLC 분석방법으로 분석하였다. *Panax ginseng* C. A. Meycr에 속하는 한국산 재배인삼에는 ginsenoside-Re, -Rg1, -Rf, -Rb1, -Rc, -Rb2, -Rd 등 총 7 종류가 가장 높은 함량으로 존재하며, 본 연구에서는 이들을 분석 대상으로 선정하였다. 분석조건은 Samukawa 등(22)의 방법을 참고하여 최적화하였다. UV 검출기(UV3000, Spectra SYSTEM, USA)를 사용하였고, 파장 203 nm에서 역상 컬럼인 C18(UG, 120 Å, 5 μm, 4.6 mm × 250 mm, Shiseido, Japan)을 이용하여 컬럼온도 55℃를 유지하며 다음과 같은 이동상 용매와 유속조건으로 분석하였다.

Solvent A → MeCN : H<sub>2</sub>O = 10 : 90, (v/v)

Solvent B → MeCN : H<sub>2</sub>O = 80 : 20, (v/v)

Time(min)	A(%)	B(%)	Flow(mL/min)
0	75	25	0.8
10	69	31	1.0
30	50	50	1.0
35	75	25	0.8

**당 분석**

세포배양동안 배지의 당 농도를 측정하기 위해 sucrose 그리고 이것의 가수분해 산물인 glucose와 fructose를 HPLC 방법에 의해 동시 분석하였다. Refractive index(RI) 검출기(Showa Denko K. K., Tokyo, Japan)를 사용하였고, Asahipak NH2P-50 4E(4.6 mm × 250 mm, Shodex, Japan)컬럼을 사용하여 이동상 조건은 상온에서 acetonitrile 과 물을 80 : 20

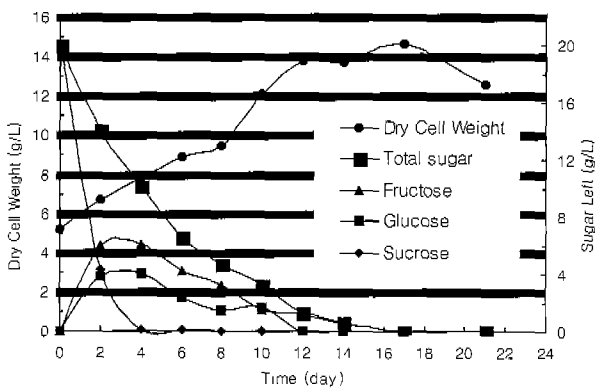


Figure 1. Time course behaviors of cell growth and sugar consumption in batch suspension cultures of *Panax ginseng* cell.

으로 유지하면서 2.0 mL/min 의 유속으로 분석하였다. 그리고 모든 시료는 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과한 후, 분석하였다.

#### Elicitor 준비

본 연구에서 사용된 elicitor 중 jasmonic acid, methyl jasmonate, ferulic acid, salicylic acid 그리고  $H_2O_2$ 는 Sigma 사 제품을 구입하여 사용하였고, chitosan oligosaccharide는 (주)KITTO LIFE(서울, 한국)에서 공급받아 사용하였다. 한편, yeast extract elicitor의 경우 효모 추출물(Difco Co., Detroit, MI)로부터 Hahn and Albersheim의 방법(23)에 의해 직접 제조하여 사용하였다. 우선 200 g의 효모추출물을 이온이 제거된 물 1 L로 완전히 섞어준 다음 그 용액에 ethanol을 80%가 되게 첨가하고 6°C에서 4일 동안 침전시킨 후, 상층액을 조심스럽게 분리해서 제거하였다. 지금까지의 과정을 2회 반복한 후, 침전물을 이온이 제거된 물 800 mL에 녹이고, 이 용액은 분자량 cut-off No. 13,000의 dialysis membrane(Medicell Co., London)을 이용하여 이온이 제거된 물에 대하여 투석(dialysis)하였다. 투석이 완료된 내부 용액을 1.2  $\mu$ m filter로 여과시키고, 여과된 용액은 40% ethanol 용액으로 만들었다. 이때 생성되는 침전물은 Sorvall RC5B centrifuge(Du Pont Co., Wilmington, DE)에서 21,500 g로 15분 동안 원심분리하여 제거시키고, 상층액은 350 mL이 될 때까지 40°C에서 감압 증류하였다. 이렇게 하여 얻은 최종 용액은 증기멸균하고 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 고려인삼세포 현탁배양시 세포성장 및 탄소원의 변화

고려인삼세포 현탁배양에 의한 회분배양 실험에서 배양시간에 따른 세포성장 및 탄소원 소모 경향을 조사하였다(Figure 1). 세포성장 유형에서 lag phase는 거의 나타나지 않았고, 접종 후 12일 만에 stationary phase로 전환되어 배양 17일째에 DCW로 최대 세포량인 14.7 g/L를 기록하였다. 그리고 배양 17일 이후에는 탄소원의 결핍으로 인한 세포량 감소 결과를 나타내었다. 이러한 결과를 1995년 이후 현재까지 고려인삼세포 현탁배양에서 ginsenoside 생산 연구를 수행해 온 Zhong의 최근 연구결과(24)와 비교해 보았다. Zhong의 연

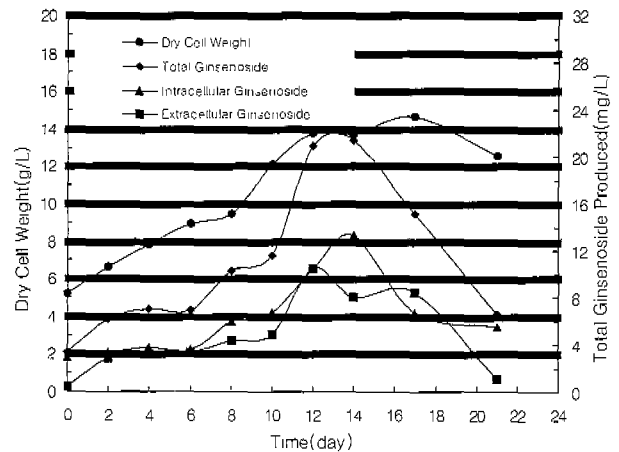


Figure 2. Time course behaviors of ginsenoside production in batch suspension cultures of *Panax ginseng* cell.

구에서는 고려인삼세포 현탁배양시 초기 탄소원의 농도와 접종량에 따라 최대 세포량을 증가시킬 수 있었는데, 먼저 본 연구의 배양조건과 같은 초기 탄소원(30 g/L)과 접종량(4.5 g-DCW/L)에서 최대 세포량을 비교하면 거의 유사한 결과를 나타내었다. 하지만 이들 결과를 단위 배양 부피와 시간을 기준으로 비교한다면, 본 연구의 결과는 0.59 g-DCW/L · d로 약 1.8배 더 높은 수준 이었고, 또한, Zhong의 연구결과에서 초기 탄소원 60 g/L과 접종량 6 g-DCW/L에서 제일 높은 최대 세포량인 0.55 g-DCW/L · d를 나타내었는데, 이러한 결과보다도 약간 더 높은 결과였다. 한편, 탄소원으로 사용된 sucrose는 배양 4일째에 glucose와 fructose로 완전히 분해되었다. 생성된 glucose는 fructose 보다 선호되어 탄소원으로 사용되었는데, 식물세포 현탁배양시 나타나는 전형적인 유형과 같은 결과였다. 이들 탄소원들은 배양초기부터 배양 중기까지 급격하게 소모되었고, 이후 서서히 감소하여 배양 16일째에 완전히 고갈되었다.

##### 고려인삼세포 현탁배양시 ginsenoside 생성 변화

고려인삼세포 현탁배양에 의한 회분배양 실험에서 배양시간에 따른 ginsenoside 생성 변화를 조사하였다(Figure 2). 세포 성장이 대수증식기로 접어들면서 생성량이 급격히 증가하기 시작하여 배양 13일째에 최대 생성량인 22 mg/L까지 증가되었고, 세포성장이 stationary phase로 전환되면서 생성이 더 이상 증가하지 못하고, 오히려 감소되는 경향을 보였다. 이러한 결과는 식물세포배양에 의한 이차대사산물 생성시 나타나는 일반적인 non-growth associated 생성 유형 이었다. 본 연구의 결과를 productivity의 기준으로 Zhong의 결과(24)와 비교해 보았는데, 먼저 본 연구의 배양조건과 같은 초기 탄소원(30 g/L)과 접종량(4.5 g-DCW/L)에서는 본 연구의 결과가 약 1.6배 더 높은 1.69 mg/L · d로 나타났다. 그러나 Zhong의 연구결과에서 초기 탄소원이 60 g/L과 접종량 3 g-DCW/L에서 최대의 ginsenoside 생산성인 7.18 mg/L · d를 나타내었는데, 본 연구의 결과보다 약 4.2배 더 높은 수준이었다. 따라서 고려인삼세포 현탁배양에 의한 ginsenoside 생산성 향상을 위한 본 연구의 목적을 달성하기 위해서는 기초 배양조건으로 탄소원 농도와 초기 접종량의 최적화가 요구되

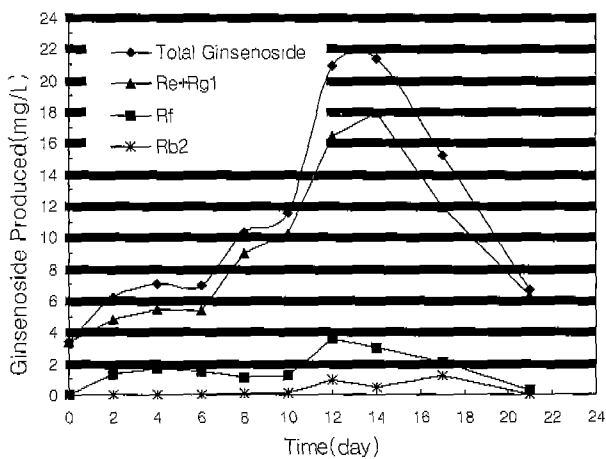


Figure 3. Production kinetics of ginsenoside-Re, -Rg1, -Rf, -Rb2 in batch cultures of *Panax ginseng* cell.

며, 이때 ginsenoside의 생산성을 더욱 향상시킬 수 있을 것으로 생각된다. 한편, 세포안과 배지 내에 ginsenoside의 함량을 비교 조사한 결과, 세포에서 생성된 ginsenoside는 세포막을 통과하여 세포 밖으로 원활하게 분비된다는 특성을 알 수 있었다. 위 결과와 같이 생성된 ginsenoside가 대등한 함량비율로 세포 밖으로 분비되는 특성은, 세포막을 기준으로 세포안 밖의 생성물 농도차에 기인하는 물질수송 능력과 더불어 막에 잘 녹을 수 있는 배당체의 화학구조를 갖는 ginsenoside의 친수성에 기인하여 나타난다고 생각된다. 이러한 특성은 인삼세포배양에 의한 ginsenoside 생산시 생산성 향상을 위한 elicitation, precursor feeding 및 two-phase 배양 기술들의 적용에 매우 유리한 조건이 될 것이다.

본 연구에서는 고려인삼세포 현탁배양시 시간에 따른 종류별 ginsenoside의 생산 변화를 조사하였는데(Figure 3), 최근까지 보고된 관련 연구논문들에는 이에 대한 내용이 거의 진무하였다. 일반적으로 *Panax ginseng* C. A. Meyer에 속하는 인삼에는 약 20여종의 ginsenoside 중에서 대표적으로 ginsenoside-Re, -Rg1, -Rf, -Rb1, -Rc, -Rb2, -Rd 등이 높은 함량으로 존재한다. 이중에서도 ginsenoside-Re와 -Rg1이 제일 높은 함량으로 존재함이 유(25)의 연구논문에서 조사되었다. 그런데 세포배양 동안 생성된 ginsenoside는 제한된 종류로 생성되는 특성을 나타내었다. 즉, Ginsenoside-Re, -Rg1, -Rf, -Rb2 등의 종류만이 세포배양시 주로 생성되었는데, 인삼 식물체에서와 같이 세포배양에 의해서도 ginsenoside-Re와 -Rg1이 가장 높은 함량 비율로 생성된다는 것이 특징적이였다.

**고려인삼세포 현탁배양에서 다양한 elicitors에 대한 ginsenoside 생산성 비교**

고려인삼세포 현탁배양시 ginsenoside 생산성 향상을 위한 elicitation 실험을 위해 회분배양 실험과 동일 조건으로 세포 접종하였고, elicitor 투여시기는 대수증식기(exponential growth phase) 이면서 ginsenoside의 생성이 급격히 증가하는 배양 8 일째로 결정하였다. Elicitor 선정을 위해서 jasmonic acid, methyl jasmonate, yeast extract, ferulic acid, salicylic acid, chitosan, hyperoxide 등을 이용하였으며, 투여량은 관련 논문들을 참조하여 결정하였다. Jasmonic acid, methyl jasmonate

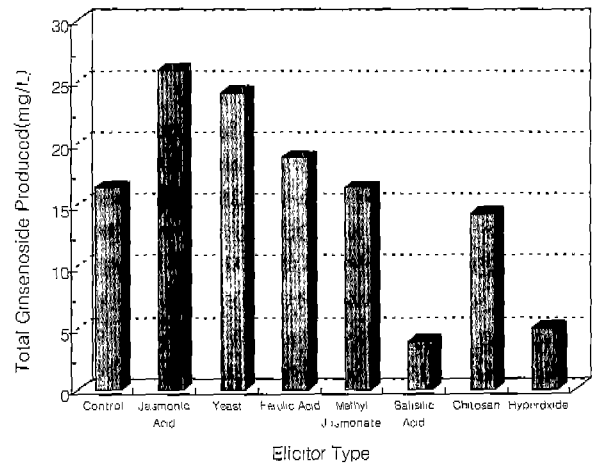


Figure 4. Effect of various elicitors on ginsenoside production in batch suspension cultures of *Panax ginseng* cell.

(26) 그리고 ferulic acid(27)의 경우 100 μM로 투여하였고, salicylic acid의 경우 50 μM, hyperoxide는 10 mM 그리고 yeast extract(28)와 chitosan(28)의 경우 각각 100 μg/FCW와 1000 μg/FCW로 투여하였다. Figure 4에서와 같이 100 μM의 jasmonic acid를 투여한 경우 elicitor를 투여하지 않은 control보다 가장 높은 약 1.5배의 ginsenoside 생산성 향상을 나타내었고, 이외에도 yeast elicitor와 ferulic acid를 투여한 경우에도 control 보다 약간 더 높은 생산성 향상의 결과를 나타내었다. 반면에 salicylic acid 및 chitosan 그리고 hyperoxide를 투여한 경우 control 보다 더 낮은 ginsenoside 생산성을 나타내었는데, 이들 elicitor 물질들은 투여 후 세포성장을 저해하는 결과를 나타내었다(data not shown). 이번 실험에서 가장 우수한 elicitor로 선정된 jasmonic acid는 methyl jasmonate와 함께 세포내에서 이차대사계를 활성화시키는 중간 신호전달 물질(transducer)로서 1990년대 초부터 최근에 이르기까지 식물세포배양에 의한 이차대사산물 생성 연구에 많이 활용되어 왔다(29-31). Singh 등(30)의 연구보고에 의하면, yeast 혹은 fungal 유래 elicitors는 세포 밖에서 세포막의 receptor에 반응하고 신호전달에 의해 세포내 이차대사계(secondary metabolism)를 활성화시키는 반면에 jasmonic acid와 methyl jasmonate는 세포내에서 직접 이차대사계 활성을 유도한다고 하였다. 또한, Lu 등(31)의 연구보고에 의하면, 고려인삼세포 현탁배양에서 yeast elicitor와 methyl jasmonate 투여시 각각의 경우에서 서로 다른 종류의 ginsenoside 생합성 증가 결과를 얻었는데, 이를 토대로 위의 두 가지 elicitors가 서로 다른 방식으로 ginsenoside 생합성을 유도한다고 추측하였다. 본 연구에서도 jasmonic acid와 yeast elicitor가 ginsenoside 생합성을 활성화시킨다는 유사한 결과를 얻었다. 이러한 결과들을 고찰해 볼 때, 앞으로의 고려인삼세포 현탁배양에서 jasmonic acid와 yeast elicitor에 대한 다양하고 더욱 정밀한 elicitation 실험을 수행한다면, ginsenoside 생성량을 더욱 증가시킬 수 있음과 동시에 ginsenoside 생합성 과정과 elicitation 기작의 상호 관계를 이해하는데 도움이 될 것으로 생각된다.

## 요 약

본 연구에서는 고려인삼세포懸液배양에 의한 회분배양 실험시 배양시간에 따른 세포성장 및 탄소원 소모 경향과 ginsenoside 생산성에 대한 다양한 elicitors의 영향을 조사하였다. 회분배양 실험결과 접종 후 12일 만에 stationary phase로 전환되어 배양 17일째에 DCW로 최대 세포량인 14.7 g/L를 기록하였다. 단위 배양 부피와 시간을 기준으로 한 세포성장에서는 0.59 g-DCW/L·d로 나타났다. 탄소원으로 사용된 sucrose는 배양 4일째에 glucose와 fructose로 완전히 분해되었고, 배양 중기까지 급격하게 소모된 후, 서서히 감소하여 배양 16일째에 완전히 고갈되었다. Elicitor 투여시기는 대수증식기 이면서 ginsenoside의 생성이 급격히 증가하는 배양 8일째로 결정하였고, 이때에 jasmonic acid를 투여한 경우에서 ginsenoside 생산성이 대조구보다 1.5배 향상되는 결과를 얻었다.

## 감 사

본 연구는 한국학술진흥재단의 선도연구자지원(과제번호: E00379)에 의해 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Curtin, M. E. (1983), Harvesting Profitable Products from Plant Tissue Culture, *Bio/Technology*, **1**, 649-657
- Kwon, I. C., Y. J. Yoo, J. H. Lee, and J. O. Hyun (1998), Enhancement of taxol production by in situ recovery of product, *Process Biochemistry*, **33**(7), 701-708
- Jiayong, W and J. J. Zhong (1999), Production of Ginseng and its Bioactive Components in Plant Cell Culture: Current Technological and Applied Aspects, *Journal of Biotechnology*, **68**, 89-99
- Furuya, T., H. Kojima, K. Syono, and T. Ishii (1970), Isolation of Panaxatriol from *Panax ginseng* Callus, *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 2371-2372
- Furuya, T., T. Yoshikawa, T. Ishii, and K. Kajii (1983), Effects of Auxins on Growth and Saponin Production in Callus Cultures of *Panax ginseng*, *Planta Med.*, **47**, 183-187
- Furuya, T., T. Yoshikawa, T. Ishii, and K. Kajii (1983), Regulation of Saponin Production in Callus Cultures of *Panax ginseng*, *Planta Med.*, **47**, 200-204
- Furuya, T., T. Yoshikawa, Y. Orihara, and H. Oda (1983), Saponin Production in Cell Suspension Cultures of *Panax ginseng*, *Planta Med.*, **48**, 83-87
- Zhang, Y. H., J. J. Zhong, and J. T. Yu (1995), Effect of Osmotic Pressure on Cell Growth and Production of Ginseng Saponin and Polysaccharide in Suspension Cultures of *Panax notoginseng*, *Biotechnology Letters*, **17**(12), 1347-1350
- Zhang, Y. H., J. J. Zhong, and J. T. Yu (1996), Effect of Nitrogen Source on Cell Growth and Production of Ginseng Saponin and Polysaccharide in Suspension Cultures *Panax notoginseng*, *Biotechnol. Prog.*, **12**, 567-571
- Zhang, Y. H. and J. J. Zhong (1997), Hyperproduction of Ginseng Saponin and Polysaccharide by High Density Cultivation of *Panax notoginseng* Cells, *Enzyme and Microbial Technology*, **21**, 59-63
- Zhong, J. J. and D. J. Wang (1996), Improvement of Cell Growth and Production of Ginseng Saponin and Polysaccharide in Suspension Cultures of *Panax notoginseng*: Cu<sup>2+</sup> Effect, *Journal of Biotechnology*, **46**, 69-72
- Zhang, Y. H., J. J. Zhong, and J. T. Yu (1996), Enhancement of Ginseng Saponin Production in Suspension Cultures of *Panax notoginseng*: Manipulation of Medium Sucrose, *Journal of Biotechnology*, **51**, 49-56
- Zhong, J. J. (1998), Production of Ginseng Saponin and Polysaccharide by Cell Cultures of *Panax notoginseng* and *Panax ginseng*: Effects of Plant Growth Regulators, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **75**, 261-268
- Liu, S. and J. J. Zhong, (1997), Simultaneous Production of Ginseng Saponin and Polysaccharide by Suspension Cultures of *Panax ginseng*: Nitrogen Effects, *Enzyme and Microbial Technology*, **21**, 518-524
- Liu, S. and J. J. Zhong (1996), Effects of Potassium ion on Cell Growth and Production of Ginseng Saponin and Polysaccharide in Suspension Culture of *Panax ginseng*, *Journal of Biotechnology*, **52**, 121-126
- Yoshikawa, T. and T. Furuya (1987), Saponin Production by Cultures of *Panax ginseng* Transformed with *Agrobacterium rhizogenes*, *Plant Cell Reports*, **6**, 449-453
- Hwang, B. and K. M. Ko (1989), Induction and Culture of Hairy Root from Ginseng(*Panax ginseng* C. A. Meyer) Roots Discs by *Agrobacterium rhizogenes*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **4**(3), 288-292
- Ko, K. S., I. O. Heo, J. S. Koh, and W. J. Lee (1990), Ginsenoside Production by Hairy Root Culture of *Panax ginseng* Transformed with *Agrobacterium rhizogenes*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **5**(3), 263-268
- Ko, K. M., J. C. Ahn, S. J. Hwang, Y. H. Kang, and B. Hwang (1993), Production of Secondary Metabolites from Hairy Root of *Panax ginseng* Transformed by *Agrobacterium rhizogenes*, *Korean J. Plant Tissue Culture*, **20**(1), 41-46
- Inomata, S., M. Yokoyama, Y. Gozu, T. Shimizu, and M. Yanagi (1993), Growth Pattern and Ginsenoside Production of *Agrobacterium*-Transformed *Panax ginseng* Roots, *Plant Cell Reports*, **12**, 681-686
- Murashige, T. and F. Skoog (1962), A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures, *Physiol. Plant*, **15**, 473-497
- Samukawa, K., H. Yamashita, H. Matsuda, and M. Kubo (1995), Simultaneous Analysis of Saponins in Ginseng Radix by High Performance Liquid Chromatography, *Chem. Pharm. Bull.*, **43**(1), 137-141
- Hahn, M. G. and P. Albershein (1981), Host-Pathogen Interactions-XIV. Isolation and Characterization of an Elicitor from Yeast Extract, *Plant Physiol.*, **67**, 768-773
- Akalezi, C. O., S. Liu, Q. S. Li, J. T. Yu, and J. J. Zhong (1999), Combined Effects of Initial Sucrose Concentration and Inoculum Size on Cell Growth and Ginseng Saponin Production by Suspension Cultures of *Panax ginseng*, *Process Biochemistry*, **34**, 639-642
- Yoo, B. S. (2001), Identification of Wild Mountain Ginsengs by analysis of DNA, Proteome, and Bioactive Compounds and Characterization of its Cell Cultures, Ph. D. Dissertation, Dept. of Biotechnology, Ajou University, Suwon
- Laskaris, G., M. Bounkhay, G. Theodoridis, R. van der Heijden, R. Verpoort, and M. Jaziri (1999), Induction of

- Geranylgeranyl Diphosphate Synthase Activity and Taxane Accumulation in *Taxus baccata* Cell Cultures after Elicitation by Methyl Jasmonate, *Plant Science*, **147**, 1-8
27. Moon, W. J. (1997), Studies on the Production Enhancement of (10-deacetyl)baccatin III and Paclitaxel in Suspension Cultures of *Taxus baccata* Pendular), M. S. Thesis, Dept. of Biotechnology, Ajou University, Suwon
28. Byun, S. Y. (1989), Studies on Elicitation and In Situ Recovery of Alkaloids in Suspension Cultures of California Poppy, Ph. D. Dissertation, Dept. of Chemical and Biochemical Engineering, The State University of New Jersey, New Jersey(USA)
29. Mizukami, H., Y. Tabira, and B. E. Ellis (1993), Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures, *Plant Cell Reports*, **12**, 706-709
30. Singh, G., J. Gavrieli, S. Oakey, and W. R. Curtis (1998), Interaction of methyl jasmonate, wounding and fungal elicitation during sesquiterpene induction in *Hyoscyamus muticus* in root cultures, *Plant Cell Reports*, **17**, 391-395
31. Lu, M. B., H. L. Wong, and W. L. Teng (2001), Effects of Elicitation on the Production of Saponin in Cell Culture of *Panax ginseng*, *Plant Cell Reports*, **20**, 674-677