

인삼세포 배양에서 자스몬산과 안식향산이 Ginsenoside 생산에 미치는 영향

유 병 삼 · † 변 상 요
아주대학교 공과대학 화학생물공학부
(접수 : 2002. 2. 9., 게재승인 : 2002. 2. 21.)

Effects of Jasmonic Acid and Benzoic Acid on Ginsenoside Production in Suspension Cultures of *Panax ginseng* C.A. Meyer

Byoung Sam Yoo and Sang Yo Byun†

School of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon, Kyunggi 442-749, Korea

(Received : 2002. 2. 9., Accepted : 2002. 2. 21.)

Studies were made to examine the various effects of jasmonic acid and benzoic acid on ginsenoside production in suspension cultures of *Panax ginseng* C. A. Meyer. Jasmonic acid increased the ginsenoside production when it was dosed at the concentration of 50 μ M or higher. The cell growth, however, was reduced with jasmonic acid. When benzoic acid was dosed simultaneously with jasmonic acid, the ginsenoside production increased 9.6 folds. It was 2.2 times higher than the result of single dose of jasmonic acid.

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

서 론

고려인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 한방의학이 성립되기 시작한 이래로 현재까지 전 세계적으로 잘 알려져 있는 오갈피나무과(Araliaceae), 人蔘屬(*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(1)에 의해 처음으로 인삼 캘러스로부터 ginsenoside의 분리 동정이 확인되었고, 이후 이들은 각종 regulators, inhibitor, precursor 들에 대한 인삼 캘러스의

ginsenoside 생산 특성(2,3)을 조사하였다. 또한 더 나아가서 인삼세포 현탁배양에서 ginsenoside 생산 특성(4)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 polysaccharide의 생산에 대한 삼투압의 영향(5), 질소원(nitrogen source) 성분 영향(6), 고밀도 배양 조건의 영향(7), Cu^{2+} 의 영향(8) 그리고 탄소원 농도의 영향(9) 등을 조사하였다. 최근에 저자들은 고려인삼 세포 현탁배양에서 elicitor들에 대한 연구를 통하여 자스몬산(jasmonic acid)이 ginsenoside 생산을 크게 증가시키는 것을 확인하였다(10). 가장 우수한 elicitor로 선정된 자스몬산은 methyl jasmonate와 함께 세포내에서 이차대사계를 활성화시키는 중간 신호전달 물질(transducer)로서 비교적 최근인 1990년대 초부터 식물세포배양에 의한 이차대사산물 생성 연구에 많이 활용되어 왔다(11-14). 본 연구에서는 ginsenoside 생성을 증가시키는 자스몬산의 elicitor로서의 특성을 규명하였다. 또한 ginsenoside 생성 대사과정의 전구체인 안식향산(benzoic acid)이 ginsenoside 생산에 미치는 효과를 연구하였다.

재료 및 방법

유도된 인삼 캘러스(10)를 MS 기본배지의 탄소원은 sucrose 3%, pH 5.8인 액체배지에 접종하여 현탁배양을 유도하였다. 유도된 현탁배양세포는 500 mL 삼각플라스크에서 200 mL

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

배양부피를 유지하며 10일 간격으로 25℃, 암 조건하에서 계대배양하였고, 회분배양 실험에 사용하였다. 삼각플라스크에서의 회분배양 실험에 사용된 현탁세포는 대수성장기 상태에 있는 것을 사용하였다. 무균대에서 Whatman No. 1의 여과지가 들어있는 멸균된 funnel을 사용하여 진공펌프에 의해 현탁세포의 배지가 제거되었고, 여과되고 남은 세포들을 고르게 섞어 준 후 40 mL 배지가 들어있는 125 mL 삼각플라스크에 15%(w/v)의 점종량으로 접종하였다. 회분배양 온도 조건은 25℃, 진탕기의 회전속도는 120 rpm, 암 조건으로 유지하였다.

배양된 세포의 세포량은 freeze dry cell weight (DCW)로 측정되었다. Fresh cell은 배양된 세포를 Whatman No. 1의 여과지를 사용하여 수분을 제거한 후, 남은 세포의 무게를 저울로 측정하여 얻었고, DCW는 용기의 무게가 미리 측정된 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. 회분배양 실험에서 ginsenoside 함량은 intracellular와 extracellular로 구분하여 조사하였다. Intracellular ginsenoside 함량 분석을 위해 동결 건조된 세포 100 mg을 이용하였으며, 수포화 n-butanol을 5 mL 첨가하여 30분 동안 초음파 분쇄하고 원심분리 후, 상등액을 회수하였다. Turbo Vap^R II(Zymark, USA)에 의해 회수된 상등액을 농축한 다음 methanol로 정용하여 분석에 사용하였다. Extracellular ginsenoside 함량 분석을 위해서는 배양배지 5 mL에 동량의 수포화 n-butanol을 첨가하여 partitioning에 의해 2회 추출하고, 각각의 추출단계에서 얻은 butanol 층을 Turbo Vap^R 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. Meyer에 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(15)의 방법을 참고하여 최적화 하였다. 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 gradient조건으로 분석하였다(10).

결과 및 고찰

인삼 세포배양체에 대한 jasmonic acid의 투여량 변화에 따라서 ginsenoside 생산성을 조사하였다. 세포 접종 후, 8일째 되는 시기에 jasmonic acid를 10, 50, 100, 200, 400, 1000 μM 이 되게 40 mL 세포배양체에 동시 투여하였고, 투여 후 2일 째에 모두 샘플링 하였다. 투여량에 따른 ginsenoside 생성량을 분석한 결과 Figure 1과 같이 50 μM 투여 농도에서 가장 높은 생성량을 나타내었고, 그 이상의 투여량에서도 비슷한 생성량을 나타내었다. 그러나 세포성장에 있어서는 jasmonic acid 투여량이 높아질수록 저하되는 경향을 나타내었다. 따라서 세포배양에 의한 ginsenoside 생산시 생산성 향상을 위한 elicitation 효과를 위해서 jasmonic acid 최적 투여량은 40 mL

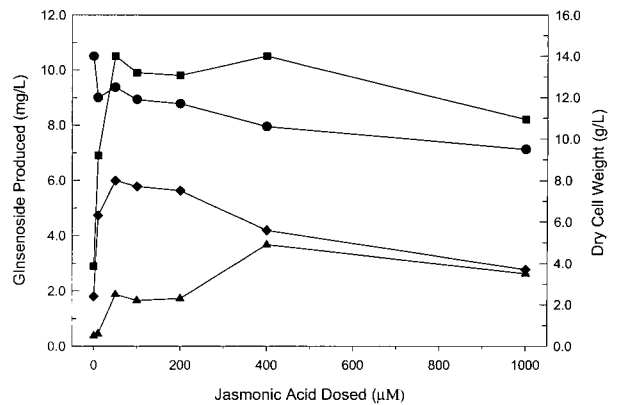


Figure 1. Effects of jasmonic acid concentration on cell growth and ginsenoside production. ●, dry cell weight; ■, ginsenoside produced (total); ◆, extracellular ginsenoside produced; ▲, intracellular ginsenoside produced.

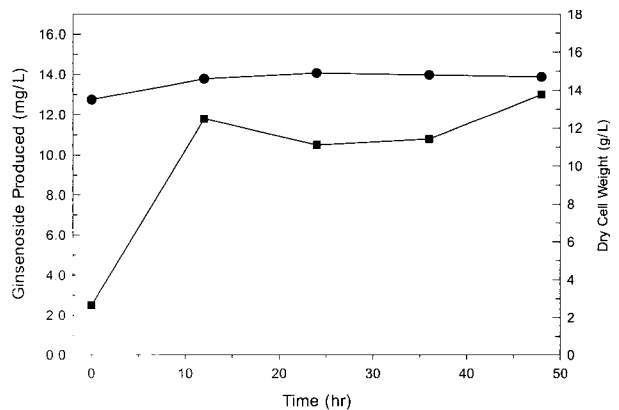


Figure 2. Kinetics of cell growth and ginsenoside production after the addition of jasmonic acid. ●, dry cell weight; ■, ginsenoside produced (total).

배양체에서 50 μM이었고, 이 때 정확한 투여량 기준은 0.36 μmol/g-FCW로 조사되었다. 0.36 μmol/g-FCW의 최적 투여량 결과는 이후의 모든 elicitation 실험에서 투여량 기준이 된다. 자스몬산은 methyl jasmonate와 함께 세포내에서 이차대사체를 활성화시키는 중간 신호전달 물질(signal transducer)로서 비교적 최근인 1990년대 초부터 식물세포배양에 의한 이차대사산물 생성 연구에 많이 활용되어 왔으며, 본 연구 결과를 포함하여 많은 종류의 배양 식물세포에서 이차대사산물의 생성을 증가시키는 효과를 보이고 있다(11-14).

세포배양에 의한 ginsenoside 생산성 향상 실험으로서 elicitation 기법을 적용하기 위해 먼저 elicitor인 jasmonic acid 투여 후 시간에 따른 ginsenoside 생성 경향을 조사하였다. 이 실험의 목적은 elicitor 투여 후 샘플링 시간을 최적화 하기 위한 것이다. 0.36 μmol/g-FCW의 투여량 조건으로 jasmonic acid를 투여 후 12시간 간격으로 ginsenoside 생성량을 조사한 결과 Figure 2와 같이 투여 후 12시간까지 생성량이 급격히 증가하여 48시간까지 감소하지 않고 유지되는 경향을 나타내었다. 따라서 이후의 모든 elicitation 실험에서는 elicitor 투여 후 36시간 후에 샘플링을 하였다. 이러한 실험을 통하여 ginsenoside는 최종산물로서 생성 축적되는 경향을 보임을 알

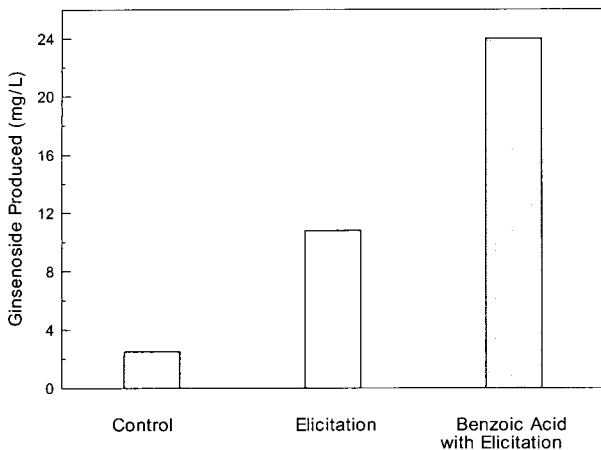


Figure 3. Effect of precursor feeding with elicitation on ginsenoside production in batch suspension cultures of *Panax ginseng* C. A. Meyer.

수 있는데, 많은 식물세포에서 생성되는 이차대사산물들이 중간물질로서 생성이 증가되다 계속되는 대사반응에 의하여 감소하는 경향을 보이기도 한다. 이러한 중간물질들은 샘플링 하는 시간에 따라 존재 유무가 달라지는 복잡한 양상을 띄기도 한다.

세포배양에 의한 이차대사산물 생산성 향상을 위한 또 다른 방법으로서 생성물의 전구체를 직접 세포배양액에 첨가하여 주는 precursor feeding 기법이 있다. 그런데 이러한 방법은 단독으로 사용할 경우 이차대사산물 생산성 향상 효과를 명확하게 나타내지 못하는 경우가 많이 있다. 따라서 precursor feeding 기법에 의한 이차대사산물 생산성 향상 효과를 확실하게 나타내기 위해서는 일반적으로 elicitation 기법과 동시에 적용한다. 따라서 이번 실험의 경우에도 precursor feeding과 동시에 elicitor를 동시 투여하여 ginsenoside 생산성을 비교 조사하였다. 세포 접종 후 4일째에 0.36 $\mu\text{mol/g-FCW}$ 의 투여량 조건으로 jasmonic acid를 투여함과 동시에 precursor로서 benzoic acid를 0.5 mg/g-FCW 투여량 조건으로 투여하였고, 36시간 동안 배양한 후 ginsenoside 생성량을 조사하였다. Precursor의 투여량 조건은 문 (16)의 연구논문 결과에 기초하여 결정하였다. 실험 결과 Figure 3에서와 같이 control 보다 ginsenoside 생산이 9.6배 증가하는 결과를 나타내었다. 이러한 자스몬산의 elicitation 효과와 benzoic acid의 precursor 효과가 동시에 적용되어 상승 효과를 보였는데, 앞에서 수행되었던 elicitation 단독 처리 효과보다 2.2배 ginsenoside 생산이 증가된 결과를 보였다.

요 약

본 연구에서는 고려인삼세포 현탁배양에 의한 회분배양 실험에서 자스몬산과 안식향산이 ginsenoside 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 세포내에서 이차대사계를 활성화시키는 중간 신호전달 물질(signal transducer)로 알려진 자스몬산은 50 μM 이상의 농도로 투여되었을 때 ginsenoside 생산을 증가시킬 수 있었다. 그 이상의 농도에서는 세포 성장을 저하시키는 결과를 보였다. 자스몬산 투여 후 12시간까지 ginsenoside의 생산은 증가하였고, 그 이후에는 더 이상 증가하지 않았

다. 안식향산과 자스몬산을 동시에 투여하면 ginsenoside 생산이 9.6배 증가하는 결과를 나타내었다. 이는 자스몬산 단독 투여 때보다 2.2배 증가된 결과였다.

감 사

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

REFERENCES

1. Furuya, T., H. Kojima, K. Syono, and T. Ishii (1970), Isolation of Panaxatriol from *Panax ginseng* Callus, *Chem. Pharm. Bull.* **18**, 2371-2372.
2. 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.
3. 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.
4. Furuya, T., T. Yoshikawa, Y. Orihara, and H. Oda (1983), Saponin Production in Cell Suspension Cultures of *Panax ginseng*, *Planta Med.* **48**, 83-87.
5. 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*, *Biotechnol. Lett.* **17**(12), 1347-1350.
6. 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.
7. 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.
8. 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^{2+} Effect, *J. Biotechnol.* **46**, 69-72.
9. 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, *J. Biotechnol.* **51**, 49-56.
10. Byoung-Sam Yoo and Sang Yo Byun (2001), Characterization of Batch culture and Effect of the Various Elicitors on Ginsenoside Production in Suspension Cultures of *Panax ginseng* C.A. Meyer, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 620-625.
11. Farmer, E. E. and C. A. Ryan (1992), Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors, *The Plant Cell*, **4**, 129-134.
12. 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.
13. 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.
14. Laskaris, G., M. Bounkhay, G. Theodoridis, R. van der Heijden, R. Verporte 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.
 15. 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.
 16. 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.