

## 산삼과 재배인삼의 세포배양 및 Ginsenoside 생성 특성

유 병 삼 · 장 문 식 · † 변 상 요  
아주대학교 화학생명공학부 생명공학전공  
(접수 : 2003. 3. 3., 게재승인 : 2003. 4. 28.)

### Characterization of Cell Cultures and Ginsenoside Production by Cultured Ginseng and Wild Mountain Ginseng

Byoung Sam Yoo, Moon Sik Chang, and Sang Yo Byunt  
School of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University,  
Suwon, Kyunggi 442-749, Korea  
(Received : 2003. 3. 3., Accepted : 2003. 4. 28.)

Established cell-line cultures of cultured and wild mountain ginseng were characterized and their abilities to produce ginsenoside were determined. Cell lines were made of calli induced from the roots of wild mountain ginseng and cultured ginseng (*Panax ginseng*). Suspension cultures of wild mountain ginseng and cultured ginseng showed different growth and ginsenoside production rate. Their specific growth rates were 0.067 and 0.035 day<sup>-1</sup> in spite of having the same sugar consumption rates, where cells from wild mountain ginseng grew almost twice as fast as those of cultured ginseng. Their respective abilities to produce ginsenoside, however, were 0.53 and 2.53 mg/L · day, which means cells from cultured ginseng produced around 5 times more than wild mountain ginseng.

**Key Words** : Wild mountain ginseng, *Panax ginseng*, ginsenoside

#### 서 론

한국산 산삼이란 국내의 십산유곡에서 야생상태로 자생하고 있는 *Panax ginseng* C.A. Meyer라고 정의할 수 있다. 한국산 산삼은 그 파종 기원에 따라 천연산삼과 산양삼(山養蔘) 두 부류로 크게 나눌 수 있다. 여기서 산양삼은 십산에서 야생적으로 재배되었으므로 일반 재배인삼과 구분되고, 최초 파종이 사람의 손에 의해 이루어지므로 천연산삼과 또한 구분이 된다. 이와 같은 의미의 산양삼에는 최초 파종방식에 따라 여러 종류로 분류할 수 있다. 첫째, 천연산삼의 종자를 산중에 파종하여 가꾸는 것, 둘째, 천연산삼의 유근(幼根)을 십산에서 채취하여 적당한 위치의 산림 중에 재이식하여 가꾸는 것, 셋째, 재배인삼의 종자를 산림 중에 파종하여 가꾸는 것 등으로 분류할 수 있다. 그리고 산양삼은 일반 대중에게 장뇌삼(長腦蔘) 이라고도 알려져 있는데, 형태학적으로 볼 때 뇌두 부분이 길다고 하여 붙여진 일반 명칭이다(1). 따라서 산삼이라 함은 천연산삼 및 산양삼을 모두를 포괄적으로 일컫는 명칭이라 할 수 있다.

오래 전부터 천연산삼은 약초로서 그 효능이 알려지면서 과도한 채굴로 점차적으로 고갈되기 시작하였고, 조선시대의 숙종 영종대에는 더욱 문제가 심각해져서 인삼 재배와 함께 산삼의 일종인 장뇌삼 재배 또한 본격화되기 시작하여 현재에 이르고 있다. 현재에도 정부 및 민간단체에서 산삼을 활성화시키기 위한 재배법 등을 개발하여 보급하고 있다. 그런데 산삼 재배의 근본 목적은 약초식물로서 매우 중요한 천연산삼의 희귀성 문제를 극복하면서, 약리 효능 및 사람들의 심리효과는 천연산삼에 미치지 못하지만 미흡하게나마 대응으로서의 가치를 인정받는 것이다. 그러나 일부 산삼 재배자들은 속성재배의 욕심으로 일반 인삼과 유사하게 비료와 농약 등을 처리하여 산삼으로서의 가치를 떨어뜨리고 있다. 이와 같이 재배된 산삼은 천연 산삼 및 자연적인 조건 하에서 최소 10년 이상 성장한 산삼과는 약초로서의 품질이 구분되어야 할 필요가 있다.

최근에는 중국산 산삼이 대량으로 국내로 밀반입되면서 우리나라 산삼과 혼동되어 고가의 가격으로 불법 유통되고 있어 새로운 사회적 문제로서 대두되고 있다. 중국산 산삼의 근원이 우리나라 지역에서 유래한 재배 인삼 씨앗일 가능성이 높다는 견해가 있고, 재배기술이나 지리적 조건이 뒤지지 않고 오히려 더 넓은 재배 면적과 산삼 재배에 적합한 기후 등의 입지조건이 조성되어 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 조건에서 재배인삼과 같이 대량으로 재배된 중국산 산삼들은 밀수입자들에 의해 국내의 산삼 가격보다 훨씬 낮은 가격으

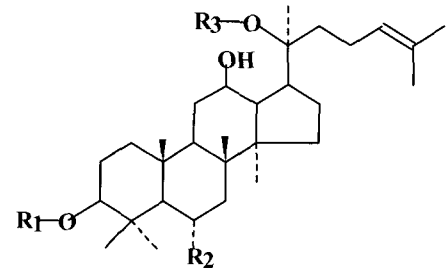
† Corresponding Author : School of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon, Kyunggi 442-749, Korea  
Tel : +82-31-219-2451, Fax : +82-31-219-1612  
E-mail : sybyun@ajou.ac.kr

로 손쉽게 구입이 가능하고, 국내로 밀반입 되어 국내산으로 유통되는 등 여러 문제를 발생시키고 있다.

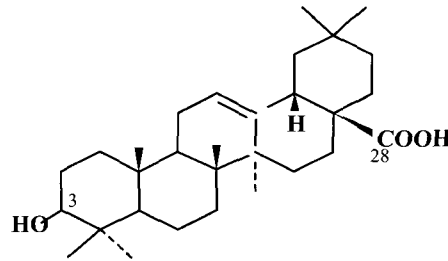
국내에서 산삼은 재배 인삼과는 달리 체계적이고 과학적인 연구가 거의 없었다. 이는 산삼 육성에 대한 다양한 견해 차이 때문이기도 하지만, 보다 근본적으로는 세계적으로 인정 받을 수 있는 우리 고유의 산림자원에 대한 무관심이 가장 큰 원인이었다고 본다. 최근 산삼에 대한 관심이 정부 부처 간에 이동되면서 이를 본격적으로 육성하려는 움직임도 있다. 하지만 현재로서 가장 시급한 문제는 보다 과학적인 산삼의 진위 및 산지 판별을 통하여 산삼의 부정 거래를 방지하는 것이다. 최근 과학적 연구(2)를 통하여 산삼의 유전자 차이 및 재배 환경에 따른 산삼 식별이 일부 가능해진 것은 매우 다행스런 일이며, 앞으로 관련 연구가 계속적으로 이루어져야 할 것으로 생각한다.

소련의 Brekhman(3)이 1957년 인삼의 adaptogen 활성과 사포닌을 인삼의 유효성분으로 강조한 이래 ginsenoside에 관한 많은 연구들이 시작되었다. 화학적으로 Libermann-Buchard 반응에 적색으로 발색되고 비당부(sapogenin, aglycone)에 당류가 결합된 배당체이다. Dammarane 타입의 triterpene(탄소 30개의 골격)인 비당부(protopanaxadiol과 protopanaxatriol)의 R1, R2, 및 R3 위치의 알콜성 -OH기에 glucose, rhamnose, xylose, arabinose와 같은 당류가 에텔결합되어 인삼 사포닌을 구성하며 현재까지 고려인삼에서 총 29종(홍삼 25종, 백삼 22종)이 밝혀졌다. 총사포닌 성분은 1966년 Shibata(4)가 인삼에 함유된 배당체란 뜻으로 ginsenoside라 명명하였으며 TLC에서 분리된 이동거리 순으로 oleanane계 사포닌인

ginsenoside-Ro와 diol/triol계 사포닌인 ginsenoside-Ra, -Rb1, -Rb2, -Rc, -Rd, -Re, -Rf, -Rg1, -Rg2, -Rg3, 및 -Rh 등으로 명명하였다. Ginsenoside의 종류별 화학구조는 Fig. 1과 Table 1에서와 같다.



<Aglycone of diol/triol line>



<Aglycone of oleanane line>

Figure 1. The structure of the Aglycone of Diol, Triol and Oleanane line Ginsenoside.

Table 1. Structures of Ginsenosides ( Refer to the Fig. 1 )

Ginsenosides	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>Diol</b>			
20S-protopanaxadiol	H	H	H
ginsenoside-Ra <sub>1</sub>	Glc(1→2)Glc-	H	Xyl(1→4)Ara(1→6)Glc-
ginsenoside-Ra <sub>2</sub>	Glc(1→2)Glc-	H	Xyl(1→2)Ara(1→6)Glc-
ginsenoside-Rb <sub>1</sub>	Glc(1→2)Glc-	H	Glc(1→6)Glc-
ginsenoside-Rb <sub>2</sub>	Glc(1→2)Glc-	H	Ara(1→6)Glc-
ginsenoside-Rb <sub>3</sub>	Glc(1→2)Glc-	H	Xyl(1→6)Glc-
ginsenoside-Rc	Glc(1→2)Glc-	H	Ara(1→6)Glc-
ginsenoside-Rd	Glc(1→2)Glc-	H	Glc-
ginsenoside-Rh <sub>2</sub>	Glc	H	H
malonyl-ginsenoside-Rb <sub>1</sub>	Glc(1→2)Glc(6)Ma	H	Glc(1→6)Glc-
-ginsenoside-Rb <sub>2</sub>	Glc(1→2)Glc(6)Ma	H	Glc(1→6)Ara-
-ginsenoside-Rc	Glc(1→2)Glc(6)Ma	H	Glc(1→6)Ara-
-ginsenoside-Rd	Glc(1→2)Glc(6)Ma	H	Glc-
ginsenoside-Rs <sub>1</sub>	Glc(1→2)Glc(6)Ac	H	Glc(1→6)Ara-
ginsenoside-Rs <sub>2</sub>	Glc(1→2)Glc(6)Ac	H	Glc(1→6)Ara-
ginsenoside-Rg <sub>3</sub>	Glc(1→2)Glc-O-	H	H
<b>Triol</b>			
20S-protopanaxatriol	H	OH	H
ginsenoside-Re	H	Rha(1→2)Glc-O-	Glc-
ginsenoside-Rf	H	Glc(1→2)Glc-O-	H
ginsenoside-Rg <sub>1</sub>	H	Glc-O-	Glc-
ginsenoside-Rg <sub>2</sub>	H	Rha(1→2)Glc-O-	H
20S-glucoginsenoside-Rf	H	Glc(1→2)Glc-O-	Glc-
ginsenoside-Rh <sub>1</sub>	H	Glc-O-	H
<b>Oleanane</b>			
ginsenoside-Ro	3-O-[β-D-Glucopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranosiduronic acid], 28-β-D-glucopyranoside		

( Ma : Malonyl, Ac : Acetyl )

산삼의 식별 못지 않게 중요한 것이 산삼의 유용 생리활성 물질 확보라 할 수 있다. 이는 산삼의 회귀성 및 재배의 어려움 때문에 더욱 중요하고 어려운 문제가 될 수 있다. 다양한 해결 방안이 있을 수 있지만 산삼 세포배양을 통한 산삼 생리활성물질의 대량 생산도 큰 가능성을 지닌 대안으로 여겨진다. 식물세포배양에 의한 유용물질 생산 연구는 1980년대 후반부터 활기를 띠기 시작한 이래 많은 성과가 있어왔다. 시코닌의 최초 상업화(5)를 시작으로 최근에는 주목세포배양에 의한 항암제 택솔의 대량생산의 성과가 있었다(6). 본 연구에서는 식물세포배양 기술을 이용하여 산삼 세포배양을 우선 확립하고 안정된 세포주를 확보하고자 한다. 그 동안 연구 보고된 결과가 많지 않은 산삼 세포주의 배양 특성은 기존의 인삼 세포 배양 결과와 비교함으로써 분석이 가능할 것으로 여겨진다. 이러한 산삼과 인삼의 세포 배양 특성 외에도 이들이 생산하는 생리활성물질의 생산 특성도 본 연구에서 비교 분석하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 세포배양

산삼과 재배인삼 시료로부터 세포배양을 시작하였다. 산삼 시료는 한국산 산삼시료 중 KM2, KM3, KM5의 뿌리에서 callus를 유도하였고, 재배인삼의 경우 포천, 홍천, 영주, 무주, 금산에서 재배된 시료로부터 callus를 유도하였다.

Callus 유도를 위하여 산삼 시료는 뿌리 및 너두 부위, 재배인삼 시료는 배(embryo), 잎, 뿌리 부위를 구분하여 각각 표면 살균을 실시한 후, 적당한 크기로 절편을 내어 callus 유도용 agar 배지에 치상하였다. 시료의 부위별 살균방법은 다음과 같다. 배(embryo)의 경우, 종자의 종피를 벗긴 후, 증류수에 침지하여 건조를 막는다. 10%-NaOCl(with Tween X-100, 3-4 drops) 용액에서 약 30분간 교반하면서, 중간에 3-4분 sonication을 2회 나누어 실시하고 증류수로 3-4회 세척 후, clean bench로 이동한다. 멸균수로 연속하여 2회 세척 후, 70% 알콜 용액에 약 30초 내지 1분 동안 침지하고 멸균수로 3회 세척 후, callus 유도에 사용하였다. 뿌리 또는 너두로부터 유도할 때, 껍질을 최대한 얇게 벗긴 후, 수도물로 세척한다. 원액(12.5%) NaOCl 용액을 1/5로 희석한 용액에서 적당한 크기로 절단한 시료를 30분간 교반하면서, 중간에 30초 내지 1분 동안 sonication 시킨다. 증류수로 3-4회 세척 후, clean bench로 이동한다. 멸균수로 연속하여 2회 세척 후, 70% 알콜 용액에 약 30초 동안 침지시키고 멸균수로 3회 세척 후, callus 유도에 사용하였다.

산삼으로부터 callus를 유도하기 위해서 지금까지 발표되어온 인삼 callus 유도과 관련된 논문들(7-12)을 참고하여 일차적인 기본조건을 찾았다. 또한, 산삼으로부터 callus 유도 실험을 수행하기 전에 먼저 재배인삼 시료로부터 callus 유도 실험을 수행하여 실험 오류를 줄였다. MS 기본배지에 탄소 원으로서 sucrose 3%, pH 5.8, agar 0.7%의 고체배지에 살균된 시료를 치상하여 callus를 유도하였다. 이때 식물생장조절제로서 2,4-D와 kinetin을 사용하였고, 이들을 각각 1 - 5 ppm, 0.1 - 1 ppm의 농도 범위 내에서 다양한 농도 조합으로 callus를 유도하였다. 유도된 산삼 및 재배인삼 callus는

MS 기본배지에 탄소원은 sucrose 3%, pH 5.8, agar 0.7%, 그리고 식물생장조절제로서 2,4-D와 kinetin을 각각 1 ppm, 0.1 ppm 갖는 고체배지에서 약 30일 간격으로 계대 배양 하였다. 현탁 배양은 위와 동일 조건을 갖는 액체배지가 들어있는 500 mL 삼각플라스크에서 10일 간격으로 계대 배양하여 증식시키고, 회분배양 실험에 사용하였다.

삼각플라스크에서의 회분배양 실험에 사용된 현탁세포는 대수 성장기 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 10 -20%(w/v)의 접종량으로 접종하였다. 회분배양 온도 조건은 25°C, 진탕기의 회전속도는 120 rpm으로 유지하였다.

### 분석

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

세포 배양 중 배지의 당 농도를 측정하기 위해 sucrose, glucose와 fructose를 HPLC 방법에 의해 동시 분석하였다. 분석에 사용된 검출기는 refractive index(RI) detector 였고, 컬럼은 Shodex Asahipak NH<sub>2</sub>P-50 4E를 사용하였으며, 이동상 조건은 상온에서 acetonitrile 과 물을 80 : 20으로 유지하면서 2.0 mL/min의 유속으로 분석하였다.

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, 상정액을 진공 건조한 다음 methanol로 녹여 분석에 사용하였다. Extracellular ginsenoside 함량 분석을 위해서는 배양배지 5 mL에 동량의 수포화 n-butanol을 첨가하여 partitioning에 의해 2회 추출하고, 각각의 추출단계에서 얻은 butanol 층을 진공 건조한 다음 methanol로 녹여 분석에 사용하였다. 두 가지 경우의 최종 methanol 추출액은 0.45 µm filter로 여과한 후, HPLC 분석방법으로 분석하였다. 분석조건은 Samukawa 등(13)의 방법을 참고하여 최적화 하였는데, 분리 칼럼은 C-18 (Shiseido사의 UG 120 Å, 5 µm, 4.6 mm × 250 mm)을 이용하였고, UV 203 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 이동상은 아세토나이트릴(MeCN)과 물을 혼합 사용하는데, 초기에는 MeCN의 농도를 25%로부터 시작하여 30분 후에 50%까지 증가시키며 분석하였다.

## 결과 및 검토

### Callus 유도

세포배양 연구를 위해 직접 산삼 및 재배인삼으로부터

callus를 유도하였다. 산삼 시료는 고가이며 귀하기 때문에 우선 재배인삼을 사용하여 callus 유도방법을 최적화 한 후 산삼 callus를 유도하였다. MS 기본배지에 탄소원으로 sucrose 3%, pH 5.8, agar 0.7% 그리고 식물생장조절제로서 2,4-D와 kinetin을 각각 1 ppm과 0.1 ppm 또는 2,4-D 단독으로 3 ppm 일 때, callus를 가장 잘 유도할 수 있었다. 한국산 재배인삼은 포천, 홍천, 영주, 무주, 금산 지역의 인삼을 사용하여 뿌리로부터 각각 callus를 유도하였으며, 또한 금산지역에서 유래한 종자의 embryo로부터도 유도하였다. 유도된 callus들은 각각 P(포천), H(홍천), Y(영주), M(무주), 그리고 KE(금산, embryo)로 명명하여 cell line을 유지하였다. 한국산 산삼의 경우 생리활성성분 분석결과 한국산 산삼으로 판별되는 시료들 중에서 총 3 종류의 산삼시료로부터 callus 유도를 하였고, 각각 KM2, KM3, KM5로 명명하였다. 같은 방법으로 판별된 중국산 산삼 시료들 중 총 2 종류의 산삼시료로부터 callus를 유도하였고, 각각 CM1, CM2로 명명하였다. 이들 cell line들은 약 30일 간격으로 계대 배양 하였고, 증식된 callus 세포들은 같은 조건의 액체배지에 현탁 배양하여 세포 배양 실험을 위해 사용되었다.

**재배인삼 유래의 KE 세포를 이용한 세포배양 및 ginsenoside 생성 연구**

세포배양방법에 의한 인삼의 ginsenoside 생산 연구현황은 국내의 경우, *Panax ginseng*의 재배인삼 유래 형질전환체인 hairy root를 배양하여 ginsenoside를 생산하는 연구를 주로 수행하여 왔는데(14-19), 인삼의 현탁 세포배양체를 이용한 경우는 거의 없었다. 다만, 최근에 국외의 경우 *Panax ginseng*과 *Panax notoginseng*을 이용하여 현탁세포배양 방법으로 ginsenoside 및 polysaccharide 생산에 관한 연구들을 활발히 진행하고 있다(20-23). 본 연구에서는 직접 유도한 산삼 cell line의 경우 성장속도가 매우 느리므로 세포배양 실험을 위한 증식에 어려움이 있었다. 따라서 상대적으로 세포성장 속도가 빠른 재배인삼 유래의 KE 세포를 대상으로 세포배양 기초 실험을 수행하였다. 또한 세포배양 과정에서 인삼의 대표적 생리활성물질인 ginsenoside의 생합성 특성을 조사하였다. 그리고 기초 실험 결과로부터 최적화된 현탁 세포배양 조건 및 이차대사산물 생산성 증대를 위한 조건들을 산삼세포에 적용하여 실험하였다.

삼각플라스크 회분 배양실험을 위해서 MS 기본 배지에 탄소원으로 sucrose 3%, pH 5.8, 그리고 식물생장조절제로서 2,4-D 3 ppm 조건의 배지를 125 mL용 삼각플라스크에 40 mL씩 넣고 15%(w/v)로 세포접종을 하여 실험하였다. 실험에 사용된 세포는 한국산 재배인삼에서 유도된 KE였다. 배양조건은 120 rpm으로 유지되는 진탕 배양기에서 25°C 배양온도를 유지하였으며, 시간별로 샘플링하여 세포성장 및 탄소원 소모량 그리고 ginsenoside 생산량을 측정하였다. 회분배양 실험 결과 Fig. 2와 같은 세포성장 및 탄소원 소모 경향이 조사되었다. 세포성장 유형에서 lag phase는 거의 나타나지 않았고, 접종 후 12일 만에 stationary phase로 전환되어 최대 세포량인 13.7 g/L의 DCW를 기록하였다. 배양 17일 이후에는 탄소원의 결핍으로 인한 세포량 감소 결과를 나타내었다. 탄소원으로 사용된 sucrose는 배양 4일째에 glucose와 fructose

로 완전히 분해되었다. 생성된 glucose는 fructose 보다 먼저 탄소원으로 사용되었는데, 식물세포 배양 시 나타나는 전형적인 유형과 같은 결과였다. 이들 탄소원들은 배양초기부터 배양 중기까지 급격하게 소모되었고, 이후 서서히 감소하여 배양 16일째에 완전히 고갈되었다.

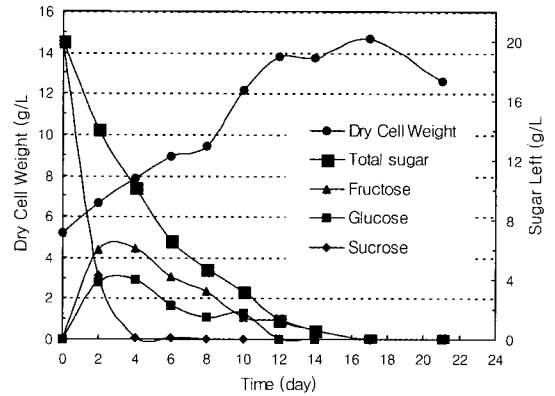


Figure 2. Time course changes of cell growth and sugar consumption in batch suspension cultures of KE(originated from cultivated ginseng).

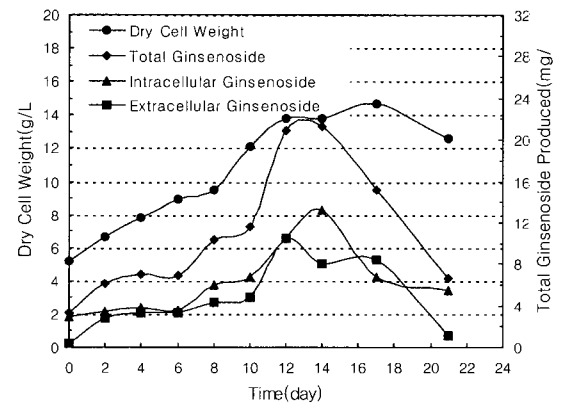


Figure 3. Time course changes of ginsenoside production in suspension cultures of KE.

인삼의 주요 이차대사산물인 ginsenoside의 현탁 배양에서의 생성 변화를 조사 하였다. 실험 결과, Fig. 3과 같이 세포 성장이 대수증식기로 접어들면서 생성량이 급격히 증가하기 시작하였고, 세포성장이 stationary phase로 전환되면서 생성이 더 이상 증가하지 못하고, 오히려 감소되는 경향을 보였다. 이러한 결과는 식물세포배양에 의한 이차대사산물 생성 시 나타나는 non-growth associated 생성 유형에 가깝다고 판단된다. 세포 내외의 ginsenoside 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 세포 안 밖의 생성물

농도차에 기인하는 물질수송 능력과 더불어 물에 잘 녹을 수 있는 배당체의 화학구조를 갖는 ginsenoside의 친수성에 기인하여 나타난다고 여겨진다. 이러한 특성은 인삼세포배양에 의한 ginsenoside 생산 시 생산성 향상을 위한 여러 기술들의 적용에 매우 유리한 조건이 될 것이다.

일반적으로 *Panax ginseng* C. A. Meyer 종에 속하는 인삼에는 약 20 여종의 ginsenoside 중에서 대표적으로 ginsenoside-Re, -Rg1, -Rf, -Rb1, -Rc, -Rb2와 -Rd 등이 높은 함량으로 존재한다. 이 중에서도 ginsenoside-Re와 -Rg1이 제일 높은 함량으로 존재함이 앞의 생리활성분석 실험 결과 조사되었다. 그러나 세포배양 동안 생성된 ginsenoside는 제한된 종류로 생성되는 특성을 나타내었다(Fig. 4). 즉, ginsenoside-Re, -Rg1, -Rf와 -Rb2 등이 세포배양 시 주로 생성되었는데, 인삼 식물체에서와 같이 세포배양에 의해서도 ginsenoside-Re와 -Rg1이 가장 높은 함량 비율로 생성되었다.

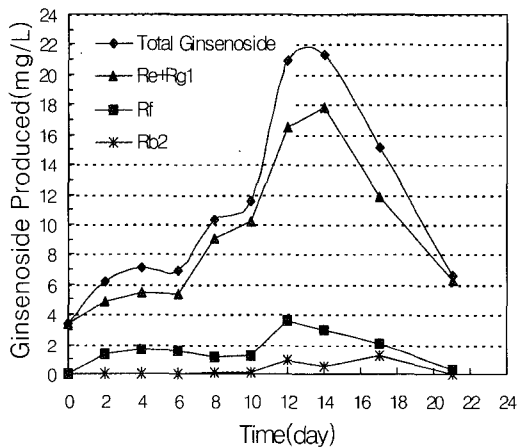


Figure 4. Production kinetics of ginsenoside-Re, -Rg1, -Rf, -Rb2 in suspension cultures of KE.

**산삼과 재배인삼 세포의 세포성장 및 생리활성 물질 생산 비교**

세포의 증식 속도를 증가시키기 위해 배지의 종류에 따라서 세포성장 정도를 비교 조사하였다. 비교 조사된 배지의 종류는 MS, B5, hMS, SH 기본 배지이며, 모든 배지는 공통적으로 탄소원은 2%, 식물생장조절제는 2,4-D와 kinetin을 각각 2 ppm, 0.2 ppm으로 제조하여 사용하였다. KE 세포를 접종 후, 주기적으로 계대배양을 하면서 세포의 성장량을 조사하였는데, 총 4회의 계대 배양 후 세포량 증식 정도는 MS 기본배지 조건에서 가장 우수하였다 (자료 미제시). 이러한 결과는 실험에 사용하기 위한 세포량 확보를 위해서 세포증식이 매우 어려운 산삼 세포들에 대하여 적용하였다. 그 결과 산삼 세포들의 증식률이 증가하였고, 계대배양 기간 또한 10일 이내로 단축되는 결과를 얻게 되었다. 그러나 세포의 성장에 대한 배지 조건의 최적화 연구는 좀더 다양하게 진행되어야 할 것으로 생각된다. 즉, 배지의 구성 성분들 중 salt 성분들의 최적화, 탄소원의 최적화, 그리고 식물생장조절제의

최적화 등 많은 성분들에 대한 체계적인 조사와 더불어 최적화 연구를 진행함으로써 산삼 세포주의 세포 성장에 가장 알맞은 배양배지 조건을 규명할 수 있을 것이다.

산삼과 재배인삼 세포 배양에서 basic kinetics를 비교하였다. 세포배양 비교실험에 사용된 산삼은 KM5 세포로서 나머지 세포주들에 비교하여 세포성장 속도가 좀더 우수한 경우였다. 재배인삼 세포는 앞에서 진행된 세포배양 기초실험에 사용되었던 KE 세포를 사용하였다. 그리고 앞에서 수행되었던 basic kinetics 실험 결과에서 세포의 증식속도가 매우 느림을 알 수 있었는데, 세포배양 비교 연구에 경제적인 측면에서 불리한 면이 있으므로, 이를 해결하기 위해 본 실험부터는 세포 접종량을 증가하여 실험하였다. 또한 새로 선정된 MS 기본 배지의 탄소원 2%, 식물생장조절제는 2,4-D와 kinetin이 각각 2 ppm와 0.2 ppm인 배지 조건에서 비교 실험을 수행하였다.

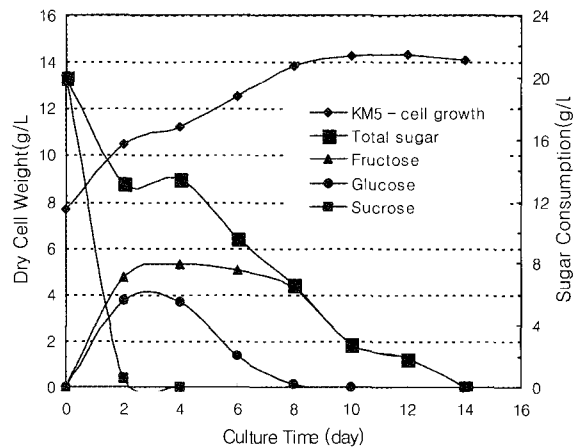


Figure 5. Time course changes of cell growth and sugar consumption in suspension cultures of KM5(originated from Korean mountain ginseng).

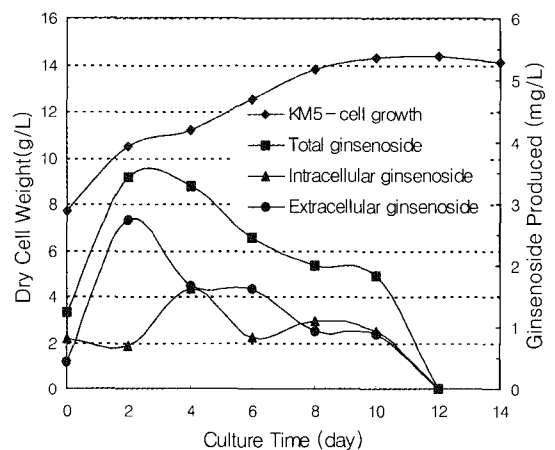


Figure 6. Time course changes of cell growth and ginsenoside production in suspension cultures of KM5.

Fig. 5는 KM5 세포의 배양 시간에 따른 세포 성장과 탄소원의 소모 경향을 나타낸 것이다. 이 경우 세포접종 후 10일

재에 최대 세포량인 14 g/L의 DCW로 성장이 더 이상 증가하지 않았고, 이때 탄소원 또한 거의 소모되는 결과를 나타내었다. 탄소원의 소모 경향도 앞의 기초실험과 같이 배양 초기에 급격히 glucose와 fructose로 분해되며 glucose를 선호하여 먼저 소모되었다. 세포배양 동안 ginsenoside 생성 유형은 Fig. 6 에서와 같이 배양 초기에 급격히 증가하는 경향을 나타내었는데, 이것은 재배 인삼 세포 배양과는 다른 경향이였다. 배양 12일째에는 생성되었던 ginsenoside가 분해되어 없어지는 경향이였다. 한편, Fig. 7에서와 같이 재배 인삼인 KE 세포의 경우 배양시간에 따른 세포성장과 탄소원의 소모 경향이 KM5 세포와 유사한 결과를 나타내었지만, 세포성장이 약 2일 정도 늦은 성장 곡선을 나타내었고, 최대 세포량 또한 약 12 g/L의 DCW로 더 낮은 결과를 나타내었다. 그런데 세포 배양 동안 ginsenoside의 생성 경향은 앞서 진행되었던 기초배양실험에서와 같이 세포성장이 대수증식기로 전환되면서 급격히 증가하였는데, 특히 세포 내부의 ginsenoside 함량보다 세포 밖의 배지에서 함량이 더 높은 특징적인 결과를 나타내었다(Fig. 8). 그리고 최대 ginsenoside 생성량 또한 KM5의 경우 보다 약 5배 높은 결과를 나타내었다.

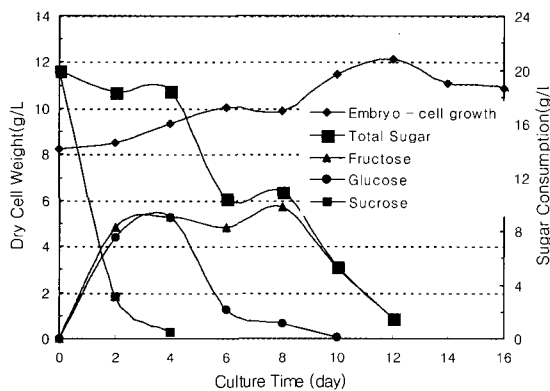


Figure 7. Time course changes of cell growth and sugar consumption in suspension cultures of KE.

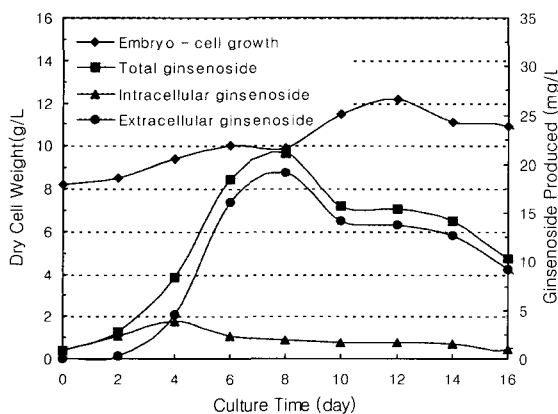


Figure 8. Time course changes of cell growth and ginsenoside production in suspension cultures of KE.

산삼과 재배인삼 세포배양 결과 나타난 특성을 종합적으로 비교해 보면, specific growth rate( $\mu$ , day<sup>-1</sup>)는 각각 0.067과

0.035로서 산삼유래의 KM5 세포가 약 2배 정도 빨랐고, 반면에 ginsenoside 생성속도는 각각 0.53과 2.53 mg/L day로 재배인삼 세포에서 약 5배 더 높게 나타났다. 그런데 sugar consumption rate는 각각 1.51과 1.54 g/L day로 비슷한 수준으로 나타났는데, 이러한 결과들을 고찰해 볼 때, 기초 세포배양 조건에서는 KM5 보다 재배인삼인 KE 세포에서 ginsenoside 생합성 대사가 더욱 활발하게 이루어지고 있음을 알 수 있었다.

### 요 약

산삼과 인삼의 세포주를 확립하고, 배양을 통하여 세포성장 및 탄소원 소모 경향과 이들이 생산하는 생리활성물질의 (ginsenoside) 생성 특성을 비교 분석하였다. 세포주는 직접 산삼(KM2, KM3, KM5의 뿌리) 및 재배인삼(포천, 홍천, 영주, 무주와 금산에서 재배된 시료)으로부터 callus를 유도하고 장기간 배양하여 확립하였다. 산삼과 재배인삼 세포배양 결과 나타난 특성을 비교해 보면, specific growth rate( $\mu$ , day<sup>-1</sup>)는 각각 0.067과 0.035로서 산삼유래의 KM5 세포가 약 2배 정도 빨랐고, 반면에 ginsenoside 생성속도는 각각 0.53과 2.53 mg/L day로 재배인삼 세포에서 약 5배 더 높게 나타났다. 그런데 sugar consumption rate는 각각 1.51과 1.54 g/L day로 비슷한 수준으로 나타났는데, 이러한 결과들을 고찰해 볼 때, 기초 세포배양 조건에서는 KM5 보다 재배인삼인 KE 세포에서 ginsenoside 생합성 대사가 더욱 활발하게 이루어지고 있음을 알 수 있었다.

### 감 사

본 연구는 한국과학재단지정 초정밀생물분리기술연구센터의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다

### REFERENCES

1. Park, M. K. (1993), Korean Ginseng, pp 7-16, Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejeon.
2. Yoo, B. S. (2002), 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.
3. Brekhman, I. I. (1957), Panax ginseng, *Mediz. Leningrad*, 1-181.
4. Shibata, S., O. Tanaka, M. Sado, S. Tsushima, and T. Oshawa (1966), Protopanaxadiol a genuine saponin of Ginseng Saponins, *Chem. Pharm. Bull.* 14(6), 595-600.
5. Curtin, M. E. (1983), Harvesting profitable products from plant tissue culture, *Bio/Technology*, 1, 649-657.
6. 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 Biochem.* 33(7), 701-708.
7. Furuya, T., T. Yoshikawa, K. Ushiyama, and H. Oda (1986), Formation of plants from callus cultures of Ginseng(*Panax ginseng*), *Experientia*, 42, 193-194.
8. Chang, W. C. and Y. I. Hsing (1980), *In vitro* flowering of bmbryoids derived from mature root callus of Ginseng(*Panax ginseng*), *Nature*, 284, 341-342.
9. Yang, D. C., J. C. Park, W. S. Kwon, K. H. Choi, and K. T.

- Choi (1996), Antioxidative activity in callus cultures of Ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) under various culture conditions, *Korean J. Plant Tissue Culture* **23**(4), 211-215.
10. Chung, C. M., Y. T. Kim, and J. S. Jo (1989), Studies on the embryo culture of Korean Ginseng I. Effects of growth regulators on adventitious bud formation and flower Emergence, *Korean J. Ginseng Sci.* **12**(1), 79-83.
  11. Choi, K. T., M. W. Kim, and H. S. Shin (1981), Root and shoot formation in explant and callus derived from root and Cotyledon of Ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer), *Korean J. Ginseng Sci.* **5**(1), 35-40.
  12. Furuya, T. (1988), Chapter 12. Saponins (Ginseng Saponins), In *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants Vol. 5*, Indra K. Vasil ed., pp213-234, Academic Press, Orlando.
  13. 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.
  14. Yoshikawa, T. and T. Furuya (1987), Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*, *Plant Cell Reports* **6**, 449-453.
  15. 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.
  16. 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.
  17. 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.
  18. 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.
  19. Lee, J. S., K. M. Ko, J. C. Ahn, D. G. Bai, K. Y. Park, S. R. Ko and B. Hwang (1994), High yield Saponin production by mass cultures of Ginseng transformed tissue I. Induction, culture of transformed tissue and selection of high-Saponin-producing clones in Ginseng, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **9**(2), 157-164.
  20. 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.
  21. Zhong, J. J. (1998), Production of Ginseng Saponin and polysaccharide by cell cultures of *Panax notoginseng* and *Panax ginseng* effect of plant growth regulators, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **75**, 261-268.
  22. Liu, S. and J. J. Zhong (1998), Phosphate effect on production of Ginseng Saponin and polysaccharide by cell suspension cultures of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium*, *Process Biochem.* **33**(1), 69-74.
  23. Zhong, J. J. and S. J. Wang (1998), Effects of nitrogen source on the production of Ginseng Saponin and polysaccharide by cell culture of *Panax quinquefolium*, *Process Biochem.* **33**(6), 671-675.