

인삼 천풍의 부정근 배양을 통한 Ginsenosides 생산

인준교, 이범수, 송원섭¹⁾, 양덕춘^{2)*}

(주)바이오피아, ¹⁾순천대학교 농업생명과학대학, ²⁾경희대학교 한방재료가공센터

Ginsenosides Production through *in vitro* Culture of Adventitious Roots Induced from *Panax ginseng* “Chunpoong”

Jun-Gyo In, Bum-Soo Lee, Won-Seob Song¹⁾, and Deok-Chun Yang^{2)*}

Phytopia Research Institute, Biopia Co., Ltd., Yeongi 339-813, Korea.

¹⁾Agriculture and Life Science, Sunchon National Univ. Suncheon 540-742, Korea.

²⁾College of Life Science & Center for Oriental Medicinal Materials and Processing, Kyung Hee Univ., Suwon 449-701, Korea.

ABSTRACT

We have investigated the optimal conditions for the growth and ginsenoside production in adventitious root of “Chunpoong” (*Panax ginseng* C.A. Meyer). Ginseng adventitious roots induced from the embryo of “Chunpoong” were cultured in various plant media supplemented with several growth hormones. The best growth rate and high ginsenoside contents were obtained in B5 medium supplemented with IBA (2 mg/L) and kinetin (0.1 mg/L). The supplement of 2.5 mM KH_2PO_4 was good for high growth rate of the adventitious roots, but the accumulation of ginsenosides was increased by reducing the KH_2PO_4 concentration to 1.25 mM. We have established the effective liquid culture system for the optimal growth and ginsenoside production of “Chunpoong” adventitious roots.

Key words : Adventitious roots, chunpoong, ginsenosides, *Panax ginseng*

서언

인삼은 오가피과(Araliaceae) 인삼속에 속하는 다년생 음지성 초복식물로서 동양에서는 오래 전부터 약용으로 사용되어 왔다. 인삼의 주요한 효능으로는 중추신경계에 대한 작용, 항암작용, 항당뇨작용 등 다양한 약리 효능이 있는 것으로 밝혀졌다(Takagi *et al.*, 1972; Yokozawa *et al.*, 1987; Matsunaga *et al.*,

1990). 그러나 인삼은 재배하기가 까다롭고 그 세대기간이 길어 4-6년을 재배하여야 비로소 수삼을 수확할 수 있고, 게다가 연작이 어려워 재배면적이 협소한 우리나라의 경우 인삼의 재배가능 면적이 점차 줄어들고 있는데 반하여 중국 및 캐나다 등에서는 생산량이 증가 추세에 있다(최, 1996).

이러한 문제점의 해결방안으로서 식물 조직배양을 통하여 이차대사산물을 대량으로 생산하려는 시

*교신저자 : E-mail : dcyang@khu.ac.kr

도가 활발히 진행되어 왔다. 식물세포를 기내에서 배양하면 병충해나 계절변화 등의 환경요인에 관계 없이 재배가 어려운 약용식물의 조직이나 세포를 연중 안정적으로 대량생산이 가능하다. 특히 생육기간이 비교적 긴 약용식물의 대량생산이 가능하여 생산물질의 품질유지는 물론이고 이차대사를 특정한 방향으로 유도할 수도 있다(Signs and Flores, 1990; Aird *et al.*, 1998). 또한 식물체내에서는 극히 미량으로 존재하는 유용물질의 대량 생산도 가능하다(Berlin, 1984).

이처럼 유용약용작물의 수요가 증가함에 따라서 대표적인 약용식물인 인삼으로부터 유도한 캘러스를 재배인삼 대용으로 사용하기 위한 연구가 꾸준히 진행되어 왔고, 조직배양에 의해 생산된 인삼 캘러스나 부정근이 재배인삼과 동일한 약효성분을 가지며, 이러한 유용물질의 대량생산에 사용되는 배지성분과 식물생장조절물질 등이 배양조직의 성장과 유용 이차대사산물의 축적에 중요한 영향을 미친다는 것이 밝혀졌다(Furuya, 1981; Furuya *et al.*, 1986; Yoshikawa and Furuya, 1987; Staswick, 1992). 최근 이들 배양조직으로부터 추출된 유용물질이 약리작용 및 독성 실험결과 재배인삼과 큰 차이가 없는 것으로 나타나 의약품 및 건강음료 등의 원료로서 이용 가능성이 제시되었다(Lee *et al.*, 2003; Yoo *et al.*, 2003).

본 연구는 우리나라에서 육성된 인삼 천풍 종자를 재료로 하여 식물생장조절제 처리에 의하여 부정근을 유도하고 특정성분의 생리활성물질을 기내조직배양으로 대량생산하기 위하여 수행하였다. 우선적으로 인삼 부정근의 성장량과 ginsenosides의 함량을 높이기 위하여 다양한 배지를 종류별로 처리하여 부정근 성장량과 ginsenosides의 함량이 가장 양호한 배지조건을 확립하고, kinetin과 KH₂PO₄를 추가적으로 처리하여 인삼 부정근의 성장량과 사포닌의 생산성 향상을 검토하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험에 사용된 천풍(*Panax ginseng* C.A. Meyer "Chunpoong")종자는 포장에서 수확하여 개갑한 것을 "한국인삼연초연구원"으로 부터 분양받아 개갑 종자를 흐르는 물에 3일간 침지한 후 1주일간 그늘에서 건조한 후 사용하였다.

인삼 부정근 유도 및 증식

종자는 종피를 제거한 후 70% 에탄올에 30초, 2% sodium hypochlorite 수용액에 15분간 침지하여 소독한 후 멸균수로 3회 세척하고 살균된 여과지 위에 올려놓아 물기를 제거하였다. 물기를 제거한 종자는 무균적으로 배를 적출하여 5 mg/L IBA(Indole 3-butyric acid)가 함유된 1/2 SH 고체배지에 옮긴 후 25 ± 1℃에서 암배양하여 부정근을 유도하였다. 천풍 종자로부터 유도한 부정근은 근단을 2~3 cm 길이로 잘라 2 mg/L IBA가 첨가된 1/2 SH 액체배지로 옮기고 암조건하에서 진탕배양기(100 rpm, 25℃)기로 배양하면서 4주 간격으로 계대배양하여 유지하였다.

최적 부정근 성장을 위한 배지처리

실험에 사용된 SH(Schenk and Hidebrandt, 1972), MS(Murashige and Skoog, 1962), WPM(Lloyd and McCown, 1981), B5(Gamborg *et al.*, 1968) 배지는 stock solution을 각각 해당량씩 첨가한 후 3% sucrose를 넣어 제조한 후에 0.5 N HCl 용액을 사용하여 pH를 5.8로 조절하고 100 ml 삼각플라스크에 40 ml씩 분주한 후, 121℃에서 15분간 고압 멸균하여 사용하였다.

식물생장조절제 처리

인삼 부정근의 성장과 ginsenosides의 함량에 미치는 kinetin의 영향을 조사하고자 2 mg/L IBA가 함유된 B5 배지를 대조구로 하고 kinetin을 각각 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 mg/L를 2m/L IBA가 함유된 B5 배지에 첨가한 후 인삼 부정근의 성장과 ginsenosides의 함량을 측정하였다.

KH₂PO₄의 농도별 처리

인삼 부정근의 성장과 ginsenosides의 함량에 미치는 KH_2PO_4 의 영향을 조사하고자 2 mg/L IBA가 함유된 B5배지를 대조구로 하고 KH_2PO_4 를 1.25, 2.50, 5.00 mM을 2 mg/L IBA가 함유된 B5배지에 첨가한 후 인삼 부정근의 성장과 ginsenosides의 함량을 측정하였다.

인삼 부정근의 성장을 측정

인삼 부정근 생장율은 1/2 SH 액체배지 40 ml를 함유한 100 ml 삼각플라스크에 증식된 인삼 부정근 근단을 2-3 cm 길이로 잘라내어 5개씩 접종하여 암실에서 4주간 진탕배양기(100 rpm, 25°C)로 배양하였다. 수확된 인삼 부정근은 증류수로 세척하고 여과지로 건조시킨 후 생체중(fresh weight)을 측정하였으며, 이들 시료들은 건조시켜 건중량(dry weight)을 측정하였다.

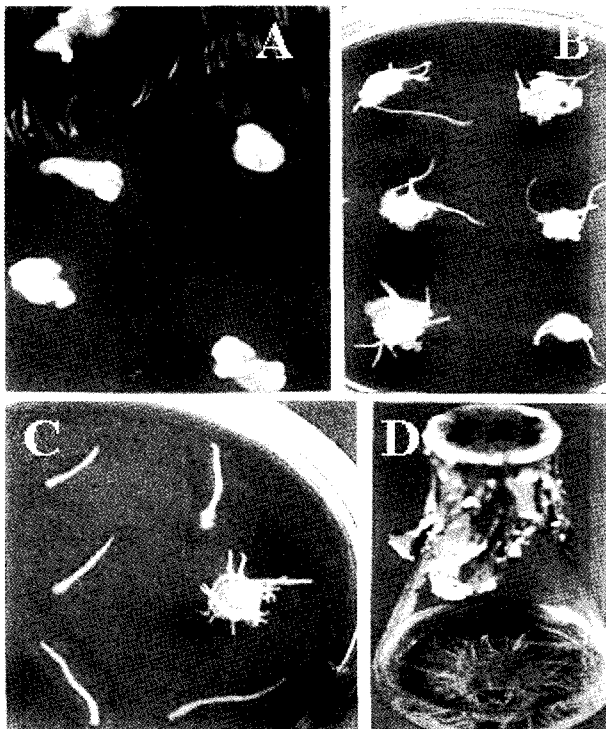


Fig. 1. Adventitious root induction from embryo. A and B; Embryos were cultured for 2 weeks in 1/2 SH solid medium supplemented with IBA 5 mg/L at 25°C under the dark condition. C; Adventitious roots cutted from embryos. D; Adventitious root cultured on the 1/2 SH liquid medium supplemented with IBA 2 mg/L.

인삼 부정근의 ginsenoside 함량측정

Ginsenosides의 함량은 수포화 *n*-butanol 추출법인 Ando 등(1971)의 방법을 참조하였다. 건조시킨 분말 시료 0.5 g을 취하여 80°C에서 메탄올 30 ml로 3회 추출하여 건조시킨 후 메탄올 엑기스를 얻은 다음 에테르로 추출하여 탈지시키고 수포화 *n*-butanol로 3회 추출하고 이들을 모두 합하여 증류수로 1회 세척한 후 수층은 버리고 *n*-butanol층만 감압·농축시킨 후 HPLC용 메탄올 500 μ l에 용해한 후 0.45 μ m millipore syringe filter(Satorius)로 여과한 후 10 μ l를 HPLC(Waters)기에 주입하여 ginsenosides를 분리·정량하였다.

사포닌 화합물의 확인 및 정량에 사용된 개별 사포닌 성분인 ginsenosides 표준품(Rg, Rf, Re, Rd, Rc, Rb₂, Rb₁)은 한국인삼연초연구원에서 분양 받은 것을 사용하였다. Chromatogram의 각 peak는 표준품 사포닌의 chromatography에 의하여 동정되었고, 각 ginsenosides의 함량은 표준품과 비교하여 peak 높이로 계산하였다.

결과 및 고찰

인삼 천풍종자로 부터 부정근의 유도

천풍 종자로 부터 부정근을 유도하기 위하여 표면살균하고, 무균적으로 적출하여 5 mg/L IBA가 첨가된 1/2 SH 고체배지에 25°C 암조건에서 4주간 배양하여 부정근을 유도하였다(Fig. 5A, B). 유도된 부정근은 2 mg/L IBA가 첨가된 1/2 SH 고체배지에 계대배양하여 25°C 암조건에서 1개월간 증식시킨 후, 동일 액체배지에 25°C 암조건 하에서 100 rpm으로 4주간격으로 계대배양하여 유지였다(Fig. 1C).

그 결과 인삼 부정근은 액체배지에서 진탕배양하는 것이 고체배지에서 배양할 때보다 빠르게 성장하였다(Fig. 1D). 이렇게 증식된 인삼 부정근의 형태는 *Agrobacterium rhizogenes*에 의해 유도된 모상근과 유사하였으며, 새로 자라는 부정근은 가늘며 흰색을 띄고 배양기간이 경과함에 따라 부정근의 굵기가 두꺼워지고 노란색이 진해지는 것을 관찰할 수 있었

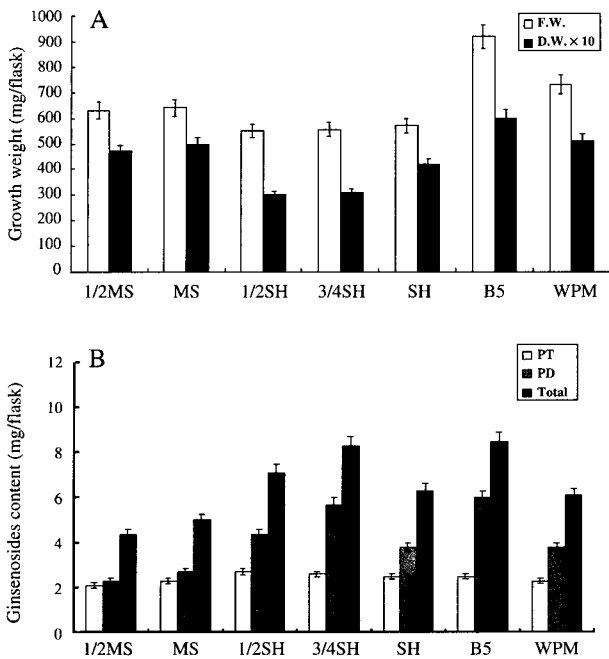


Fig. 2. The effect of media on the growth (A) and content of ginsenosides (B) in adventitious roots induced from *Panax ginseng* "Chunpoong". F.W.; fresh weight, D.W.; dry weight, PD; panaxa diol, PT; panaxa triol.

다(Fig. 1D).

배지의 종류 및 농도에 따른 부정근의 성장과 ginsenosides 생산성 증대

인삼 부정근의 성장과 사포닌 생산에 가장 효과적인 배지를 선택하기 위하여 1/2 MS, MS, 1/2 SH, 3/4 SH, SH, B5, WPM 등 7종의 배지에서 배양하여 비교한 결과 인삼 부정근의 성장, ginsenosides의 함량 및 생산성이 B5 배지에서 가장 양호하였다(Fig. 2). 인삼 부정근의 성장은 B5 배지에서 배양하였을 때 919 mg/flask로 MS 배지의 658 mg/flask 및 1/2 MS 배지의 639 mg/flask, WPM 배지의 742 mg/flask 등보다 성장량이 높게 나타났다(Fig. 2A).

Ginsenosides의 함량 역시 B5 배지에서 9.8 mg/g · DW로 가장 높았고, 3/4 SH > 1/2 SH > SH순으로 양호하였으며, 1/2 MS 배지에서는 4.7 mg/g · DW로 가장 낮았다(Fig. 2B). 생산성 면에서는 플라스크당 함량이 B5 > 1/2 SH > WPM 순으로 나타났다.

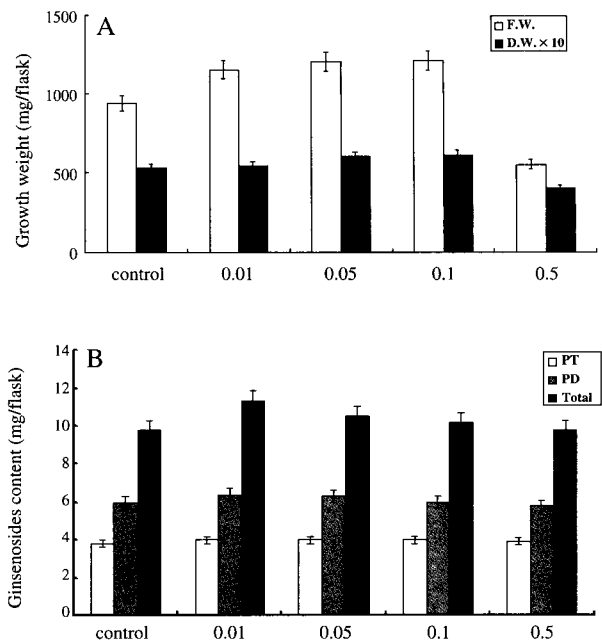


Fig. 3. The effect of kinetin on the growth (A) and contents of ginsenosides (B) in adventitious roots induced from *Panax ginseng* "Chunpoong". F.W.; fresh weight, D.W.; dry weight, PD; panaxa diol, PT; panaxa triol.

지치(*Lithospermum erythrorhizon*)로 유도한 모상근에서는 성장과 shikonin 합성에 낮은 질소농도가 효과적이었고(Shimomura *et al.*, 1991), red beet에서 유도한 모상근의 경우에는 성장과 betalain 합성에 65 mM의 질소원 농도에서 빠른 성장과 많은 색소 축적을 보였다고 한다(Paek *et al.*, 1993). 위 결과에서 보듯이 B5 배지가 부정근 생장이 가장 양호한 것은 배양 배지의 성분 중에 질소 농도가 인삼 부정근의 성장과 ginsenosides 함량에 영향을 미친것으로 사료된다.

이러한 결과는 Fujita 등(1981)의 연구결과에서 지치의 캘러스에서 shikonin을 생산하기 위하여 도입한 성장용 최적배지 MG-5와 색소합성을 위한 최적배지 M-9를 서로 다르게 사용한 것에서도 알수 있으며, Yonemitsu 등(1990)도 *Lobelia inflata*에서 유도한 모상근 배양시 MS, 1/2MS, B5 배지에서 배양한 모상근이 생장이 빠르고, NN 배지에 배양한 모상근의 생장은 1/3정도로 떨어지지만 단위 그램당 lobeline

함량은 오히려 3배정도 높아진다고 하였다. 이러한 결과들을 종합하여 볼 때 인삼 부정근에 있어서도 성장과 유용물질 생산을 위한 2 단계의 배양을 통하여 부정근 성장과 ginsenosides의 생성에 적절한 배지조건을 선별한다면 보다 효율적으로 인삼 부정근을 대량으로 생산할 수 있을 것으로 사료된다.

Kinetin처리에 의한 부정근의 성장과 ginsenosides 생산성 증대

고체배지에서 부정근의 생장이 가장 효과적이었던 kinetin을 0~0.5 mg/L을 조합하여 처리한 배지에서 인삼 부정근을 배양하여 성장량과 ginsenosides 함량을 조사하였다. 그 결과 부정근의 생장은 kinetin 0.1 mg/L의 조합에서 가장 양호하였으나, 농도가 가장 높았던 0.5 mg/L에서는 인삼 부정근의 생장이 오히려 저하되었다(Fig. 3A). Ginsenosides 함량은 전체적으로 대조구에 비하여 모두 높았다. Kinetin 0.01 mg/L 처리구에서 총 ginsenosides 함량이 11.65 mg/g로 가장 높게 나타났으며, PD/PT 조성비가 kinetin의 농도가 증가함에 따라 panaxa triol계 사포닌의 비율이 증가하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 3B). 성장량을 고려한 ginsenosides 생산성은 kinetin 0.01 mg/L의 조합에서 12.89 mg/flask로 가장 높은 함량을 나타내었으나, 0.05 및 0.1 mg/L 조합에서도 각각 12.68, 12.39 mg/flask로 거의 차이가 나지 않았다. 이상의 결과로 보면 인삼의 부정근 배양에 있어서 오옥신 계열인 IBA 호르몬 단독 처리구 보다는 kinetin을 병용처리하는 것이 부정근의 성장과 사포닌의 생산에 더 효율적인 것으로 사료된다.

KH₂PO₄의 첨가에 의한 부정근의 성장과 ginsenosides 생산성 증대

인삼 부정근의 성장과 ginsenosides의 함량에 미치는 KH₂PO₄의 영향을 조사하기 위하여 B5 기본배지에 1.25, 2.5, 5.0 mM로 각각 첨가하여 배양한 결과 인삼 부정근의 생장은 2.5 mM 첨가배지에서 12.16 g/flask로 1.25 mM 첨가배지의 11.78 g/flask보다 양호하였다(Fig. 4A). Ginsenosides의 함량은 1.25 mM 첨가배지의 13.70 mg/flask으로 2.5 mM의 12.87

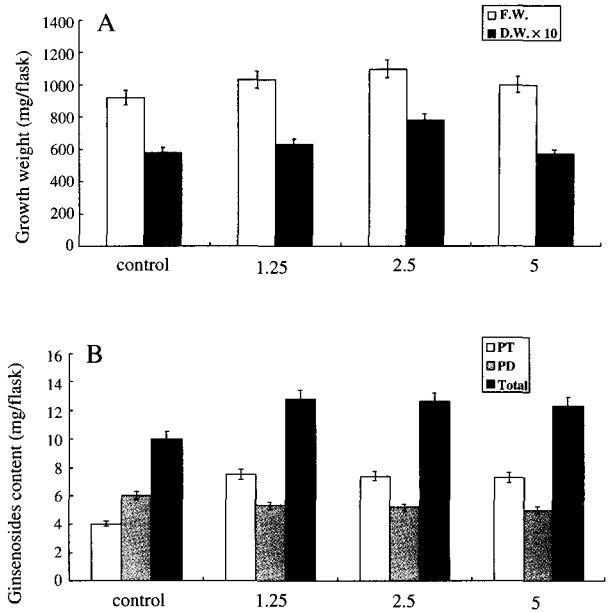


Fig. 4. The effect of KH₂PO₄ on the growth (A) and accumulation of ginsenosides (B), in adventitious roots induced from *Panax ginseng* "Chunpoong". F.W.; fresh weight, D.W.; dry weight, PD; panaxa diol, PT; panaxa triol.

mg/g · DW, 5 mM의 12.10 mg/g · DW보다 양호하였다(Fig. 4B). PD/PT 조성비율은 control에서 1.66으로 가장 높았고, KH₂PO₄를 첨가한 처리구에서 PD/PT 조성비가 0.6 이하로 감소하였다. Ginsenosides 생산성은 3 처리구 모두 유사하였으나, 1.25 mM 처리구에서 다소 양호한 경향으로 나타났다.

일반적으로 배지내의 암모늄태와 질산태 질소의 비율은 부정배 분화나 2차 대사산물생산 등에 영향을 미친다. 또한 칼륨이온은 세포내의 원형질 구조의 유지나 pH, 삼투압조정 등의 작용을 하며, 인은 핵산, 에너지 대사 중간체, 보조소, 지질 등에 포함되는데 KH₂PO₄의 경우는 염의 형태로 첨가한다. Yamakawa 등(1983)은 *Vitis callus* 배양에서 phosphate 농도가 증가할수록 생장은 증가하나 2차 대사산물인 anthocyanin 생산이 감소된다고 보고하였다. 즉 인삼 부정근과 *Vitis callus*는 식물종이 다른 데도 불구하고 유사한 결과를 보인 것은 phosphate가 2차 대사산물의 생산에 영향을 미치는 조절인자로

서 작용하는 것으로 보이며, phosphate의 부족으로 인한 2차대사산물의 증대효과는 주요 효소의 활성 변화에 기인하는 것으로 사료된다. 따라서 인삼 부정근의 액체 배양을 통한 대량생산을 위해서는 phosphate의 첨가량을 적정량 선별하여 사용하여야 할 것으로 사료된다.

적요

인삼 천풍의 배(embryo)로부터 부정근을 유도하고 배양배지조성, 식물 호르몬과 인삼염의 농도가 인삼 부정근의 성장과 ginsenosides의 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 배지종류별 인삼 부정근의 성장량은 B5, WPM, MS 배지 순으로 높았으며, ginsenosides 함량은 B5배지에서 가장 높았으며 panaxa triol계 사포닌 보다 panaxa diol계 사포닌이 증가하였다. 식물 성장조절제 처리구에서의 인삼 부정근의 성장량은 kinetin 0.1 mg/L에서 높게 나타났으며, ginsenosides 함량은 kinetin 0.01 mg/L에서 오히려 높게 나타났다. 특히 kinetin 0.01 mg/L 첨가에서 ginsenoside Rb₁의 함량이 크게 증가하였다. KH₂PO₄를 추가 첨가 할때에는 부정근의 성장에 2.5 mM에서 대조구에 비해 양호하였으나, ginsenosides의 함량은 1.25 mM에서 높았으며, 특히 ginsenosides Re의 급격한 증가로 인하여 panaxa triol계 사포닌의 함량이 증가되었다.

사사

본 연구는 21세기 프론티어 사업인 자생식물 사업단의 연구비 지원(PF003101-01)에 의해 일부 수행되었습니다.

인용문헌

Ando, T., O. Tanaka and S. Shibata. 1971. Comparative

studies on the saponins and sapogenins of ginseng and related crude drugs. Syoyakugaku Zasshi. 25:28-32.

Aird, E.L.H., J.D. Hamil and M.J.C. Rhodes. 1998. Cytogenetic analysis of hairy root cultures from a number of plant species transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 15:47-57.

Berlin, J. 1984. Plant cell cultures as a future source of natural products. Endeavour New Series. 8:5-8.

Fujita, Y., Y. Hara, T. Ogino and C. Suga. 1981. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. I. Effect of nitrogen sources on the production of shikonin derivatives. Plant Cell Rep. 1:59-60.

Furuya, T. 1981. Plant tissue culture of Korean ginseng. In Recent Studies on ginseng. p67-72.

Furuya, T., T. Yoshikawa, K. Ushiyama and H. Oda. 1986. Formation of plantlets from callus cultures of *Panax ginseng*. Experientia. 42:193-194.

Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:148-151.

Lee, E.J., H.L. Zhao, D.W. Li, C.S. Jeong, J.H. Kim and Y.S. Kim. 2003. Effect of the MeOH extract of adventitious root culture of *Panax ginseng* on hyperlipidemic rat induced by high fat-rich diet. Kor. J. Pharmacogn. 34:179-184.

Lloyd, G.B., B.H. McCown. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laural (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. Prop Int Plant Proc Soc. 30:421-427.

Matsunaga, H., M. Katano, H. Yamamoto, H. Fujito, M. Mori and Takata K. 1990. Cytotoxic activity of polyacetylene compounds in *Panax ginseng* C.A. Meyer. Chem. Pharm. Bull. 38:3480-3482.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-479.

- Paek, Y.W., J.C. Ahnm, B.G. Jung, S.U. Kim and B. Hwang. 1993. Betalain production by hairy root cultures of red beet (*Beta vulgaris* L.). Kor. J. Plant Tissue Cult. 20:159-165.
- Schenk, R.V. and A.C. Hilderbrant. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell culture. Can. J. Bot. 50:199-204.
- Shimomura, K., H. Sudo, H. Saga and H. Kamada. 1991. Shikonin production and secretion by hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. Plant Cell Reports. 10:282-285.
- Signs, M.W. and H.E. Flores. 1990. The biosynthetic potential of plant roots. Bio. Essays. 12:7-13.
- Staswick, P.E. 1992. Jasmonate, genes, and fragrant signals. Plant Physiol. 99:804-807.
- Takagi, K., H. Saito and H. Nabata. 1972. Pharmacological studies of *Panax ginseng* root : Estimation of pharmacological action of *Panax ginseng* root. Jap. J. Pharmacol. 22: 245-259.
- Yamakawa, T., S. Kato, K. Ishida, T. Kodama and Y. Minoda. 1983. Production of anthocyanins by *Vitis* cells in suspension culture. Agric. Biol. Chem. 47:2185-2191.
- Yokozawa, T., H. Oura and Y. Kawashima. 1987. Effect of administration of ginsenoside-Rb₂ in diabetic rats : In terms of carbohydrate and lipid metabolites. Chem. Pharm. Bull. 35:4872-4877.
- Yoo, B.S., M.S. Chang and S.Y. Byun. 2003. Characterization of cell cultures and ginsenoside production by cultured ginseng and wild mountain ginseng. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 18:133-139.
- Yoshikawa, T. and T. Furuya. 1987. Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Rep. 6:449-453.
- Yonemitsu, H., K. Shimomura, M. Satake, S. Mochida, M. Tanaka, T. Endo and A. Kaji. 1990. Lobeline production by hairy root culture of *Lobelia inflata* L. Plant Cell Reports. 9:307-310.
- 최광태. 1996. 최신고려인삼 (재배편). 천일인쇄사, 서울 pp. 9-32.

(접수일 2004. 1. 02)

(수락일 2004. 1. 30)