

Chitosan과 Jasmonic acid 처리에 의한 인삼 부정근의 Ginsenosides의 생산성 증대

이범수, 인준교, 송원섭¹⁾, 양덕춘^{2)*}

(주)바이오피아, ¹⁾순천대학교 농업생명과학대학,

²⁾경희대학교 생명과학대학 및 한방재료가공센터

Increase of Ginsenosides Production by the Treatment of Chitosan and Jasmonic Acid in the Adventitious Roots of Korean Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer)

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

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

¹⁾Agriculture and Life Science, Suncheon 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

In order to investigate the effects of elicitors on the growth and ginsenosides biosynthesis of ginseng adventitious roots, chitosan and jasmonic acid were treated with various concentrations. The growth rate of adventitious roots was increased with the addition of chitosan at higher concentrations (10 mg/L), but the best accumulation of ginsenosides was observed at the lower concentration (5 mg/L). Jasmonic acid was an effective elicitor for ginsenosides biosynthesis in ginseng adventitious roots. The maximum accumulation of ginsenosides was observed at the treatment of 10 uM jasmonic acid. But the jasmonic acid was found to decrease the growth rate of adventitious roots.

Key words : Adventitious roots, chitosan, chunpoong, ginsenosides, jasmonic acid,
Panax ginseng

서론

천연자원의 공급 한계성을 극복하기 위하여 식물

세포배양에 의한 유용물질 생산 연구는 1980년대 초
부터 활기를 띠기 시작한 이래 많은 성과가 있어왔
다. Shikonin의 최초 상업화(Curtin, 1983)를 시작으

* 교신저자 : E-mail : dcyang@khu.ac.kr

로 최근에는 주목세포배양에 의한 합암제 택솔의 대량생산의 성과가 있었다(Kwon *et al.*, 1998). 이러한 결과는 유용물질을 대량으로 생산하는 세포주 선발 방법 (high yield-cell line selection)이나, 유용물질의 생산성을 증가시키기 위한 배양배지 성분의 최적화, elicitation 기법과 같이 식물세포 배양공학의 다양한 기술에 의해 이루어 질 수 있었다.

고려인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 한방의학이 성립되기 시작한 이후로 현재까지 전 세계적으로 잘 알려져 있는 오갈피나무과(Araliaceae), 인삼속(*Panax*)에 속하는 대표적인 약용식물이다.

인삼의 효능은 중추신경계에 대한 작용, 뇌 기능 향진작용, 항암작용, 면역기능 조절작용, 항당뇨작용, 간기능 향진효과, 심혈관 장애개선 및 항피로작용, 항염증작용, 마약해독작용, 항산화활성 및 노화억제 등의 수많은 효능이 알려져 있다(남, 1996). 그러나 인삼은 그 세대기간이 길어 4~6년을 재배하여야 생체중 100~150g의 수삼을 수확할 수 있고, 연작이 불가능하여 재배가능 면적이 점차 줄어들고 있어, 앞으로 인삼 원료공급에 지장을 초래할 가능성이 있다.

따라서 식물 조직배양기술의 발달과 더불어 조직배양에 의해 생산된 인삼 캘러스를 재배인삼 대용으로 사용하기 위한 연구가 꾸준히 진행되어 왔다. 조직배양법에 의해 생산된 인삼 캘러스나 조직이 재배인삼과 동일한 약효성분을 가지며, 약리작용 및 독성 실험결과도 재배인삼과 차이가 없다면, 이를 대량으로 생산하여 제조된 인삼 엑기스나 인삼 사포닌으로 재배인삼의 원료를 대체하여 의약품 및 건강음료 등의 원료로 사용할 수 있을 것이다(Yoshikawa, and Furuya, 1987; Staswick, 1992).

Furuya 등(1970)이 처음으로 인삼 캘러스로부터 ginsenosides의 분리·동정을 확인하였고, 이후 각종 regulators, inhibitor, precursor 등에 대한 인삼 캘러스의 ginsenosides 생산 특성(Furuya *et al.*, 1983)을 조사하였다. 또한 인삼세포 현탁배양에서 ginsenosides 생산 특성을 조사하였다(Furuya *et al.*, 1983).

최근 연구결과 고려인삼 세포 현탁배양에서 chitosan과 jasmonic acid가 ginsenosides 생산을 크게

증가시키는 것을 확인하였다(Yoo *et al.*, 2001). 가장 우수한 elicitor로 선정된 jasmonic acid은 methyl jasmonate와 함께 세포내에서 이차대사계를 활성화시키는 중간 신호전달 물질로서 비교적 최근인 1990년대 초부터 식물세포배양에 의한 이차대사산물 생성 연구에 많이 활용되어 왔다(Mizukami, 1993).

본 연구에서는 인삼 천풍 종자의 부정근 배양계를 이용하여 인삼사포닌의 생산성을 높이기 위한 최적 조건을 개발하는데 그 목적이 있다. 인삼 부정근의 ginsenosides 함량을 높이기 위하여 생장이 가장 양호한 배지를 선택하여 생리활성물질 유도제로 쓰이는 chitosan과 jasmonic acid을 처리하여 인삼 부정근의 성장량과 ginsenosides 함량을 조사하였다.

재료 및 방법

식물재료

천풍(*Panax ginseng* C.A. Meyer "Chun-Poong") 종자의 배(embryo)로부터 유도한 부정근을 2 mg/L IBA(indole 3-butyric acid)가 첨가된 1/2 SH 액체배지에서 4주 간격으로 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

Chitosan 처리

Chitosan은 Young(1982)의 방법에 따라서, chitosan을 90 ml의 0.1 M acetic acid에 녹인 후, 이를 30분 동안 원심분리 한 후 상등액을 5 M NaOH로 pH 8.0으로 맞추어 흰색으로 침전된 chitosan 덩어리를 여과지로 걸러낸 후 증류수로 세척하여 동결건조하였다. 건조된 chitosan은 0.1 M acetic acid(1 g chitosan/90 ml acetic acid)로 녹인 후 pH 5.0으로 조정하여 사용하였다.

실험처리구는 0, 5, 10, 20, 30 mg/L 농도로 처리하였으며 각 처리구는 3반복하여 4주 동안 배양한 후 인삼 부정근의 성장과 ginsenosides의 함량을 측정하였다.

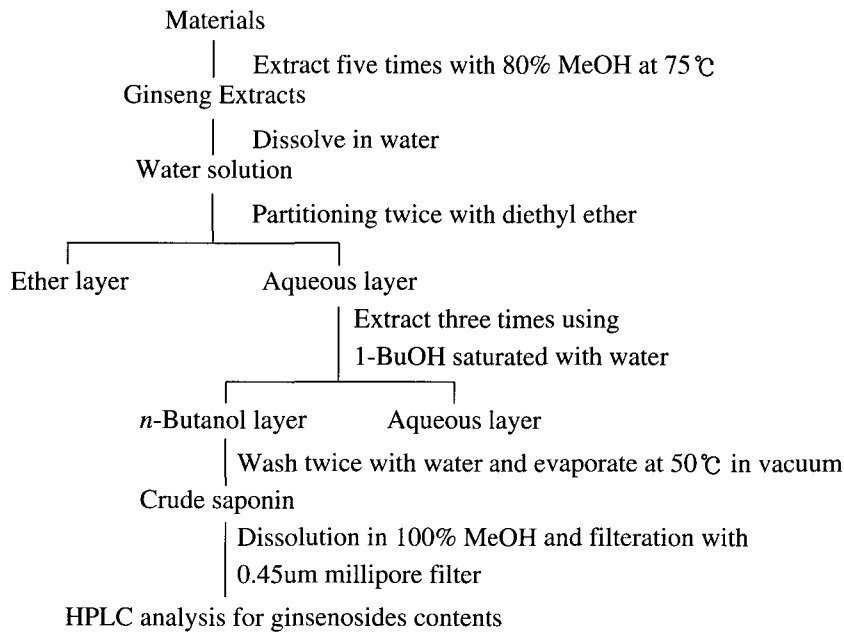


Fig. 1. Extraction procedure of crude saponin in the adventitious roots.

Jasmonic acid 처리

인삼 부정근의 생장과 ginsenosides의 함량에 미치는 jasmonic acid(Sigma)의 영향을 조사하고자 jasmonic acid를 stock solution으로 200 mM을 만들어 놓은 후 다시 20 mM로 희석하여 working solution을 만들어 냉장 보관하여 사용하였다. 실험 처리구는 0, 5, 10, 30, 50 mg/L 농도로 처리하였으며 각 처리구는 3반복하여 4주 동안 배양한 후 인삼 부정근의 생장과 ginsenosides의 함량을 측정하였다.

인삼 부정근의 생장을 측정

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

인삼 부정근의 ginsenoside 함량측정

Ginsenosides의 함량은 수포화 *n*-부탄올 추출법인 Ando 등(1971)의 방법을 참조하여 Fig. 1과 같은 방법으로 추출하였다. 건조시킨 분말시료 0.5 g을 취하여 80 °C에서 메탄올 30 ml로 3회 추출하여 건조시킨 후 메탄올 액기스를 얻은 다음 에테르로 추출하여 탈지시키고 수포화 *n*-부탄올로 3회 추출하여 *n*-부탄올층을 모두 합하여 증류수로 1회 세척한 후 수층은 버리고 *n*-부탄올층만 건조시킨 후 HPLC용 메탄올 500 μ l에 녹여 0.45 μ m millipore syringe filter로 여과하여 10 μ l를 HPLC(Waters)기에 주입하여 ginsenosides를 분리정량하였다.

사포닌 화합물의 확인 및 정량에 사용된 개별 사포닌 성분인 ginsenosides 표준품(Rg₁, Rf, Re, Rd, Rc, Rb₂, Rb₁)은 한국인삼연초연구원에서 분양 받은 것을 사용하였다. 검출은 Waters R401 Refractive index(RI) 검출기로 정량하여 분석하였다. Column은 Lichrosorb-NH₂ column(Merck Co., 10 μ m, 4mm ID \times 250 mm)을 사용하였고 Solvent는 acetonitrile / H₂O / *n*-butanol (80:20:10)을 사용하였으며, flow rate은 0.5 ml

/min이었고, attenuator는 2×로하여 분석하였다. Chromatogram의 각 peak는 표준화 사포닌의 chromatography에 의해 동정하고, 각 ginsenosides의 함량은 표준품과 비교하여 peak height로 계산하였다. 추출 및 용매분획 분리용매로 사용한 메탄올, 에테르, *n*-부탄올 등은 일급시약을 사용하였으며, 액체크로마토그래피의 전개용매인 아세토니트릴, 증류수, *n*-부탄올, 메탄올 등은 Merck사 HPLC용을 사용하였다.

결과 및 고찰

Chitosan 처리에 의한 ginsenosides 함량 증대

인삼 부정근의 생장은 chitosan 10 mg/L 처리구에서 가장 양호하였으며 30 mg/L 처리구에서 평균 대조구에 비해 낮은 성장률을 보였다(Fig. 2). Ginsenosides의 함량은 5 mg/L 처리구에서 14.58 mg

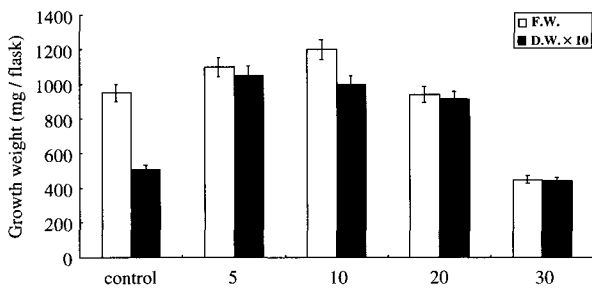


Fig. 2. The effect of chitosan on the growth of ginseng adventitious root. F.W.; fresh weight D.W.; dry weight.

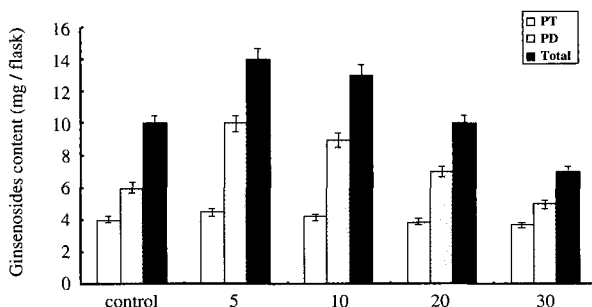


Fig. 3. Increase of ginsenoside production by the addition of chitosan. PD; panaxa diol PT; panaxa triol.

/g · DW로 생장율이 양호한 10 mg/L 처리구의 12.55 mg/g · DW보다 12.6%정도 높은 ginsenosides 함량을 보였으며, PD/PT 조성비율이 control에 비하여 5, 10 mg/L 처리구에서 증가하였으나, ginsenosides 생산성 면에서는 5 mg/L 처리구에서 가장 높았다(Fig. 3).

Chitosan은 poly(1-4) β -D-glucosamine 또는 poly(1-4) 2-amino-2deoxy β -D-glucan이라 불리며, 우리 신체의 조직과 유사한 구조를 이루고 있는 천연고분자 화합물이다. 일반적으로 위장약이나 상처의 지혈 및 치료제로 사용되어왔던 새우껍질이나, 오징어 뼈는 그 주성분이 키토산으로 이루어져 있다(김, 1990). 이처럼 키토산은 현대에 들어 그 효능이 전해지면서 식품, 위약, 화장품 등 여러 산업에서 중요한 자리를 차지하고 있는 자원이다(Minami *et al.*, 1995). 또한 chitosan은 여러 가지 생리학적 활성을 나타내어 *Catharanthus roseus*와 *Wasabia japonica*의 배양세포에 처리했을 때 막 투과성과 원형질 형성 등에 기여함이 밝혀졌으며, *Mentha piperita*를 배양시 200 mg/L

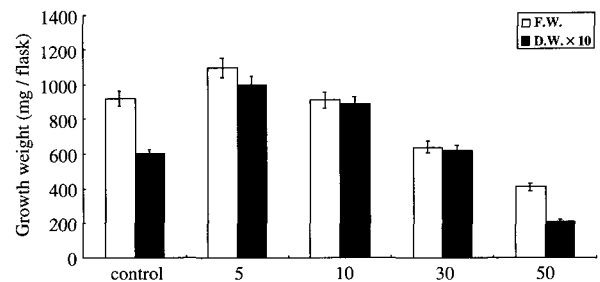


Fig. 4. The effect of jasmonic acid on the growth of ginseng adventitious roots. F.W.; fresh weight D.W.; dry weight.

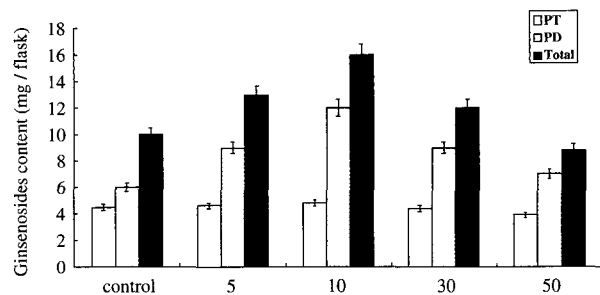


Fig. 5. Increase of ginsenoside production by the addition of jasmonic acid. PD; panaxa diol, PT; panaxa triol.

의 chitosan을 처리가 menthol을 생산하는데 있어 효과적인 elicitor 역할을 한다는 보고 등이 있다(Kim et al., 1993).

이상의 결과를 종합하여 보면 인삼의 부정근에서 ginsenosides의 생산증대를 위해서는 chitosan 5 mg/L를 첨가하는 것이 가장 효율적일 것으로 판단된다.

Jasmonic acid 처리에 의한 ginsenoside 함량 증대

Jasmonic acid(JA)를 인삼 부정근 배양시 배지에 첨가하여 생장과 ginsenosides 생산성을 확인한 결과 인삼 부정근의 생장은 대조군에 비해 5, 10 uM 처리구를 제외한 모든 처리구에서 감소되었으며(Fig. 4), ginsenosides 함량은 50 uM 처리구에서 대조군에 비하여 낮은 함량을 보였다. PD/PT의 조성비율은 JA 처리구에서 증가하였으며 PD 계열중 ginsenosides Rb1 함량이 높았던 10 uM에서 가장 높았다(Fig. 5).

따라서 JA 처리시 생장량이 생산성에 비례하지 않는다는 것을 알 수 있었다. 인삼 부정근의 ginsenosides의 생산을 위해서는 JA 10 uM을 첨가하는 것이 가장 효율적일 것으로 판단된다(Fig 5). 이 결과는 인삼모상근 배양에서 JA 5, 10 uM 처리구에서 생장이 가장 양호하였고 10 uM 처리구에서 ginsenosides 함량이 높았다는 Park 등(2000)의 보고와 유사하였다.

식물의 생장과 발달에 있어 천연 성장조절물질의 개념으로 분류되어있는 JA는 일반적으로 피자식물에 광범위하게 분포되어 있으며, 나자식물에도 다소 함유되어 있다는 것으로 밝혀졌다. 일반적으로 상처나 자극이 새로운 단백질의 합성을 유도하기 위해서는 세포막에서 핵으로의 신호전달이 될 수 있어야 하는데, 물리적인 상처자극이 생화학적인 반응을 유도하는 과정에 작용하는 elicitor가 세포벽 성분인 올리고당으로 이 들이 상처 자극시에 식물의 세포벽에서 떨어져 나온 것인데, 인위적으로 이것을 상처받지 않은 식물에 처리해 주면 단백질 분해효소 저해제 등 여러 방어물질의 합성이 유도된다. 상처 신호전달고정에서 세포내 2차 신호전달 물질로 JA가 유력한 후보물질로 생각되고 있다. JA는 호르몬으로서 생리적 기능이 있으며, Strukelj 등(1995)은 감자

에 1 uM의 JA를 처리하여 뿌리의 비대생장을 가져왔다는 보고가 있으며, 토마토나 감자에서 단백질 분해효소 저해제의 합성 및 대두에서 저장단백질의 합성을 유도하는데 이러한 단백질들은 상처 자극반응에 의해서도 유도된다고 하였다(Staswick, 1992). 인삼 부정근의 경우 뿌리의 생장은 저농도에서는 증가하였고, 고농도에서는 둔화되었으나 함량은 적정 농도에서 증가하는 것으로 미루어 보아 세포의 크기가 증가되면서 생리활성물질의 축적이 증가된 것으로 사료된다.

적요

인삼 부정근의 생장과 ginsenosides 함량에 미치는 elicitor의 영향을 조사한 결과 chitosan 처리구의 생장량은 10 mg/L에서 가장 양호하였으며, ginsenosides의 함량은 5 mg/L 처리농도에서 14.48 mg/g · DW로 대조군에 비해 약 9%의 함량증대를 가져왔다. 세포내에서 이차대사계를 활성화시키는 중간 신호전달 물질(signal transducer)로 알려진 jasmonic acid를 인삼 부정근 배양에 처리한 결과 부정근의 생장량은 10 uM 처리구에서 ginsenosides 함량이 가장 양호하였으나, 인삼 부정근의 생장은 다소 억제되었다.

사사

본 연구는 농진청 Biogreen 21사업의 특용작물사업단의 연구지원금에 의해서 수행되었으며 이에 대해 심심한 감사를 표하는 바이다.

인용문헌

Ando, T., O. Tanaka, S. Shibata. 1971. Comparative studies on the saponins and sapogenins of ginseng and related crude drugs. Syoyakugaku Zasshi. 25:28-

- 32.
- Curtin, M. E. 1983. Harvesting Profitable Products from Plant Tissue Culture, *Bio/Technology*. 1:649-657.
- 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. 1981. Plant tissue culture of Korean ginseng. In *Recent Studies on ginseng*. pp. 67-72.
- 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 Callus Suspension Cultures of *Panax ginseng*. *Planta Med.* 48:83-87.
- Kim K.S., S.H. Park, H.J. Lee and S.U. Kim. 1994. Effect of chitosan treatment in the biotransformation (-)-isopoperitenone in *Mentha Piperita* cell culture. *Agricultural Chemistry & Biotechnology*. pp. 175.
- 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*. 33:701-708.
- Minami, S., Y. Okamoto, A. Matsuhashi and H. Eguchi. 1995. Effect of chitosan oligomer on wound healing. *J. Jpn. Wet. Med. Assoc.* 48:419-422.
- Mizukami, H., Y. Tabira and B. E. Ellis. 1993. Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.* 12:706-709.
- Park, H.J., S.Y. Oh., K.H. Choi., S.J. Meang, E.S. Yoon. and D.C. Yang. 2000. Effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on the production of ginsenosides in the hairy roots of Korean Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *J. Ginseng Res.* 24:74-78.
- Staswick, P. E. 1992. Jasmonate, genes, and fragrant signals. *Plant Physiol.* 99:804-807.
- Strukelj, B., M. Ravnikar, P. Mesko, M. Poljsak. Prijatelj, J. Pungercar, G. Kopitar, I. Kregar, V. Turk. 1995. Molecular cloning and immunocytochemical localization of jasmonic acid inducible cathepsin D inhibitors from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Adv Exp Med Biol.* 362:293-298.
- Yoo, B.S. and S.Y. 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 K. Biotechnol. Bioeng.* 16:620-625.
- Young, H. 1982. Estimation of fungal contamination in tomato products by a chemical assay for chitin. *J. Food Sci.* 47:437-444.
- Yoshikawa, T. and T. Furuya. 1987. Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.* 6:449-453.
- 김세권. 1990. 키틴, 키토산 및 그 유도체의 제조기술과 개발 동향. *식품공업*. 106:63-73.
- 남기열. 1996. 최신고려인삼(성분과 효능편). 천일인쇄사, 서울. pp. 247-252.

(접수일 2004. 1. 02)

(수락일 2004. 1. 30)