

광 및 UV 조사가 인삼 모상근의 생장 및 사포닌 생합성에 미치는 영향

인준교*¹ · 박동식****¹ · 이범수* · 이태후** · 김세영** · 노영덕** · 조동하*** · 김성무*** · 양덕춘***[†]

*(주)바아오피아 생명공학연구소, **경희대학교 생명과학부, ***강원대학교 생명공학부, ****강원대학교 농업과학연구소

Effects of White Light and UV Irradiation on Growth and Saponin Production from Ginseng Hairy Root

Jun Gyo In*¹, Dong Sik Park****¹, Bum Soo Lee*, Tae Hoo Lee**, Se Young Kim**, Yeong Deok Rho**, Dong Ha Cho***, Cheng Wu Jin***, and Deok Chun Yang***[†]

**Institute of Biotechnology, BioPia Co., Ltd., Yongin 449-598, Korea.*

***Department of Oriental Medicinal Materials and Processing, Kyung Hee University, Yongin 449-701, Korea.*

****Kangwon National University, School of Bioscience & Biotechnology, Chuncheon 200-701, Korea.*

*****Kangwon National University, Research Institute of Agricultural Sciences, Chuncheon 200-701, Korea.*

ABSTRACT : To investigate the effect of culture conditions on growth and ginsenosides accumulation, we cultured the ginseng hairy root under three different media, white light or ultra-violet irradiation. The MS/B5 medium containing MS basal salt and B5 vitamin was good for the growth and ginsenoside accumulation. The light during the culture period of ginseng hairy root was irradiated. The growth was abundant in the ginseng hairy root cultured in dark. But the ginsenosides accumulation was higher than in the ginseng hairy root cultured in the light irradiation. When the ginseng hairy root was cultured in 20 L bioreactor, the ginsenosides accumulation was observed at 34% higher than the hairy root cultured in dark. UV irradiated the ginseng hairy root during the culture period. The long time irradiation of UV was caused decreasing the growth of ginseng hairy root, but the accumulation of ginsenosides was increased as to the irradiated time.

Key Words : *Agrobacterium rhizogenes*, ginsenosides, hairy root, light, UV

서 언

식물이 생산하는 이차대사산물 (secondary metabolite)은 오래 전부터 의약품, 기호품 및 염료 등으로 인류의 생활과 밀접한 관계에 있어 왔지만, 식물체로부터 필요한 이차대사산물을 대량으로 얻는다는 것은 극히 어렵다. 오가피과 (Araliaceae) *Panax* 속에 속하는 인삼 (*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 사포닌 (saponin)이라고 하는 주요약리성분을 함유하고 있다. 사포닌 함유식물은 옛부터 세정, 거담, 진해 등에 처방되어 왔는데, 인삼 사포닌은 dammarane계 사포닌으로서 인삼 (*Panax*)속 식물에 특이적으로 존재하는 것으로 알려져 있다 (남, 1996). 고려인삼의 사포닌류는 panaxadiol (PD)과 panaxtriol (PT)이 당과 결합하고 있는 배당체로서 ginsenosides라고 불리우며, 동물계의 sterol 합성과정과 유사한 것으로 알려져 있다 (Hong *et al.*, 1987; Joo *et al.*, 1983;

Kitagawa *et al.*, 1983).

토양미생물인 *Agrobacterium rhizogenes*에 들어있는 Ri-plasmid의 T-DNA가 식물체에 도입되면 다수의 모상근이 발생하는데, 이러한 모상근은 식물 생장조절제가 첨가되지 않은 배지에서도 빠르게 성장하며, 아울러 자연의 식물체와 동일하거나 그 이상의 유용물질의 생합성능력이 밝혀져 이를 상업적으로 응용하려는 연구가 진행되어 왔다 (Christen *et al.*, 1989; Jung & Tepfer, 1987; Ooms *et al.*, 1986; Park *et al.*, 2000; Yang & Choi, 2000; Yang *et al.*, 1998, 2000). 인삼에서는 callus 배양과 (Choi *et al.*, 1990; Choi & Yang, 1987)과 모상근 (hairy root) 배양 (Yang *et al.*, 1998; Yoshikawa & Furuya, 1987)을 통한 사포닌 생산성이 확인된 바 있다.

본 연구에서는 고려인삼의 뿌리조직에서 유도한 인삼 모상근으로부터 우수한 세포주 (cell line)을 선발하고 특정 ginse-

¹ These two authors contributed equally to this work

[†]Corresponding author: (Phone) +82-31-201-2688 (E-mail) dcyang@khu.ac.kr
Received November 9, 2006 / Accepted November 28, 2006

nosides를 대량으로 생산하기 위한 배양배지 선발과 광조사 실험을 실시하였다. 인삼 ginsenosides는 2차대사산물로서 배양 조건 및 환경에 따라서 그 생합성이 다양하게 변화할 수 있는데, 배양과정 중에 광과 UV (ultraviolet) 조사가 인삼 모상근의 생장과 ginsenosides 생합성에 미치는 영향을 조사하여, 고부가가치가 있는 특정 ginsenoside를 대량생산하기 위한 최적 배양조건을 규명하고 대량배양을 위한 기초자료로 활용하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 식물재료

4년생 인삼으로부터 채종한 인삼종자를 파종 후 발아까지의 기간을 단축하기 위해서 개갑처리를 하여 직파한 후 1년생 싹생묘를 이식하여 재배한 후 3년 된 인삼을 5월달에 육안으로 건강한 삼을 선별하여 사용하였다.

2. *Agrobacterium rhizogenes*의 배양

인삼뿌리로부터 모상근을 유도하기 위해서 deep freezer에 보관하고 있던 cell stock을 YM agar 배지 (0.4 g yeast extract, 10 g mannitol, 0.1 g NaCl, 0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g K_2HPO_4 , pH 7.0)에 streaking하여 28°C incubator에서 2일간 배양하였다. 형질전환을 하기 위해서 100 ml 삼각플라스크에 YM 액체배지 20 ml을 넣고 *A. rhizogenes* A₄ single colony를 접종하여 180 rpm으로 28°C에서 OD₆₀₀값이 1.0이 될 때까지 24-30시간 동안 회전진탕배양하였다.

3. 모상근의 유도 및 배양

포장에서 수확한 3년생 인삼뿌리를 수돗물에 잘 세척한 후 세균과 표면의 물기를 제거하고 clean bench안에서 70% EtOH로 1분간 표면 살균하였다. 3% NaOCl을 사용하여 15-20분간 표면살균 한 후 멸균증류수로 3회 세척한 후 멸균한 filter paper를 사용하여 표면의 물기를 제거하였다. 인삼 주근을 메스로 0.2-0.5 mm 두께로 자른 후 MS agar (Murashige & Skoog, 1962)배지에 11개 씩 치상한 후 25°C incubator에서 48시간 전배양을 실시하였다. 액체 배양한 *A. rhizogenes* A₄ 균주와 인삼주근 절편을 15분간 공동배양한 후 멸균 filter paper를 사용하여 표면의 균을 제거한 후 carbencillin을 500 µg/ml 이 첨가된 MS agar배지에 옮겨 25°C에서 암배양하면서 인삼 모상근을 유도하였다. Carbencillin이 첨가된 MS 배지는 2주 간격으로 교체하여 주었고, 유도된 모상근은 적당한 길이로 성장하면 root tip으로부터 1-2 cm 길이로 절단한 후 carbencillin이 첨가된 1/2 MS agar배지로 옮겨 배양하였다. 교체배지에서 성장한 인삼 모상근의 근단을 0.5 cm 크기로 절단하여 1/2 MS 액체배지에 접종하여 진탕배양기 (100

rpm, 23°C)에서 암배양하고, 3주 간격으로 계대배양을 실시하면서 실험재료로 사용하였다.

4. 백색광 및 UV 조사처리

인삼 모상근의 생장 및 사포닌 생합성에 미치는 광조사 효과를 조사하기 위해서 백색광은 형광등 (20W FL, 3.5 Wm⁻² sec⁻¹, Korea)을 사용하였고, UV는 G30T8 30W 형광등 (0.25 Wm⁻²sec⁻¹, Sankyo, Japan)을 사용하였다. 백색광은 1일 16 hr 처리하였으며, UV 처리는 모상근을 접종한 후 20, 25, 30일간 각각 전배양하고 나서 처리구별로 0, 30, 60, 120, 240 min 조사한 후 다시 20, 15, 10일간씩 총 40일간 배양하여 모상근의 생장량과 사포닌 함량을 조사하였다.

5. 인삼 모상근의 사포닌 성분분석

Ginsenosides 함량은 수포화 1-부탄올 추출방법에 따라 실시하였다 (Ando *et al.*, 1971). 동결 건조시킨 분말시료 0.5 g을 취하여 80°C 온수욕조에서 80% 메탄올 30 ml로 3회 추출하여 건조시킨 후 메탄올 엑기스를 얻었다. 그 후 에테르로 재추출하여 탈지시킨 다음 수포화 1-부탄올로 3회 추출하여 1-부탄올층만을 모두 합하여 증류수로 1회 세척한 후 수층은 버리고 1-부탄올층만 건조시켰다. 건조된 분말을 HPLC용 메탄올 500 µl에 녹여 0.45 µm millipore syringe filter로 여과한 후 10 µl를 HPLC (Waters)기에 주입하였으며, column은 Lichrosorb-NH₂ column (Merck Co., 10 µm, 4 mm ID × 250 mm)을 사용하였다. Detection은 Waters R401 Refractive index (RI) 검출기로 검출한 후 정량하여 분석하였다. 사포닌은 ginsenosides 표준품 (Rg₁, Rf, Re, Rd, Rc, Rb₂, Rb₁)을 사용하였고 chromatogram의 각 peak는 표준품과 retention time 및 함량을 비교하여 정량하였다.

결과 및 고찰

1. 인삼모상근의 유도 및 배양

인삼 뿌리로부터 모상근을 유도하기 위해서 *A. rhizogenes* A₄ 균주와 공동배양한 후 carbencillin을 첨가한 MS 배지에 옮겨 23°C ± 1 암실에서 배양을 하였다. 배지를 2주 간격으로 교체하여 준 결과 배양 3-4주 사이에 gall의 형성이 관찰되었다 (Fig. 1A, B). 그 후 40-50일 정도에 모상근의 분화가 관찰되었으며 (Fig. 1C), 1-2 cm 크기로 신장된 것을 새로운 배지로 옮겨 배양한 결과 왕성하게 측근이 발생하였다 (Fig. 1D). 신장된 모상근의 근단을 절단하여 호르몬이 첨가되지 않은 1/2 MS 액체배지에 접종한 후 진탕배양기 (100 rpm, 23°C ± 1) 배양을 한 결과 접종 2주째부터 왕성하게 측근 형성이 관찰되었으며, 배양 30일째에는 왕성하게 자란 모상근을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1 E, F).

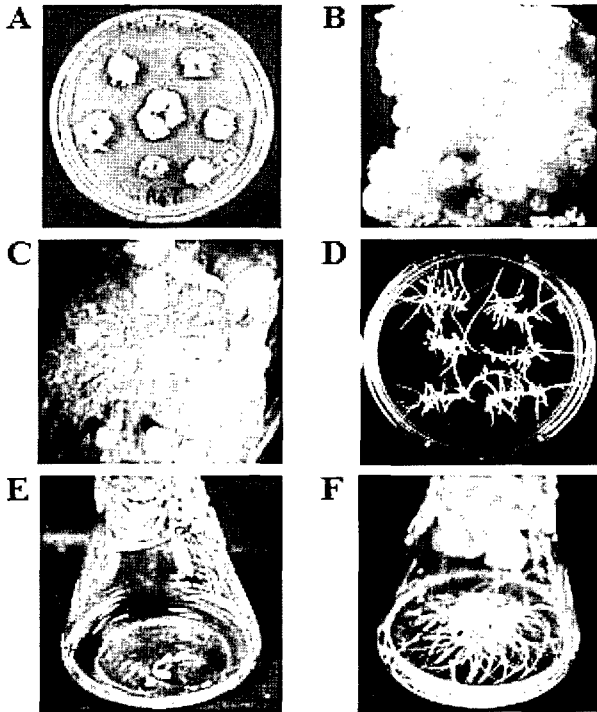


Fig. 1. Induction of ginseng hairy roots mediated by *Agrobacterium rhizogenes* A₄. A, B, Gall induction (30 days after inoculation); C, Hairy root elongation; D, 21 days after transfer; E, Inoculation of hairy root tip in liquid medium; F, 30 days after inoculation.

모상근은 인삼뿌리에 Ri-plasmid 유전자를 도입하여 형질전환시킴으로써 생육이 매우 빠르고, 기내에서 생장속도 및 유효성분을 조절할 수 있는 잔뿌리 상태의 뿌리로서 외부 식물 성장조절제가 전혀 첨가되지 않은 배지에서도 생육이 잘되며 callus 배양보다 많은 유효성분을 함유하고 있어 기내배양을 통한 유용물질을 대량으로 생산하는데 있어 매우 유용하다. 본 실험에서는 *A. rhizogenes* A₄T를 배양하여 인삼 3년생 disk에 접종하여 인삼 모상근을 유도하였고, root-tip 배양을 이용하여 생장이 가능한 많은 종의 세포주를 선발하였다.

2. 체세포 변이에 의한 고생장 모상근의 선발

인삼모상근은 외부에서 유전자가 무작위로 도입되기 때문에 도입된 유전자의 수와 삽입된 위치에 따라 특성이 매우 달라 변이가 매우 심하다 (Chilton, 1978). 따라서 많은 변이주를 선발할 수 있는 반면 세포주로서의 고정이 절대적으로 필요하다. 선발한 모상근 중에서 체세포 변이에 의한 형태적 차이가 확실하고 생장이 비교적 빠른 세포주를 일차 선발하였으며, 이 중에서 고정된 13종에 대하여 생장지수를 조사하였다 (Table 1). 그 결과 생장이 빠른 것은 대조구에 비해 약 1.5-2배 생장량이 많았으며, 이들을 선발하여 지속적으로 배양을 실시한 결과 3개의 세포주 (KGHR-1, KGHR-5, KGHR-8)의 경우에는

Table 1. Superior Cell lines selection among hairy roots induced from ginseng root by *A. rhizogenes*.

Cell line	Fresh weight (g/flask)	Ginsenoside contents (mg/g · DW)
HB-H	3.89 ± 0.35 ^a	4.70 ± 0.41
HB-T	5.20 ± 0.47	6.08 ± 0.62
HB-A	4.71 ± 0.51	7.07 ± 0.68
KGHR-1	7.13 ± 0.59	10.32 ± 0.85
KGHR-2	6.22 ± 0.49	4.49 ± 0.35
KGHR-4	6.74 ± 0.65	5.26 ± 0.54
KGHR-5	7.72 ± 0.43	9.55 ± 0.72
KGHR-8	7.65 ± 0.61	10.25 ± 0.93
KGHR-9	7.42 ± 0.67	5.95 ± 0.60
KGHR-10	6.34 ± 0.48	6.53 ± 0.51
KGHR-11	5.58 ± 0.51	4.05 ± 0.37
KGHR-12	5.67 ± 0.59	6.04 ± 0.61
KGHR-13	5.37 ± 0.45	4.82 ± 0.33

^a: Each values represneted mean ± SE

다른 모상근에 비해 약 1.5배 이상 생장이 높았다 (Table 1). 식물호르몬 무첨가 1/2 MS고체배지에 모상근 근단을 포함하여 약 1 cm로 절단하여 암배양 한 후 형성된 세포주 중에서 ginsenoside 고함유 세포주를 선발하였다. 이들 중에 생장이 우수한 4종의 세포주 (KGHR-1, KGHR-5, KGHR-8)의 경우에는 총 ginsenoside의 함량이 다른 세포주에 비하여 높게 나타났다 (Table 1).

3. 인삼 모상근의 생장 및 사포닌의 함량에 미치는 배지의 영향

인삼 모상근의 생장과 ginsenosides 생성에 적합한 각각의 배지를 선정하고자 KGHR-8 모상근주를 이용하여 MS와 B5 배지 그리고 MS 무기염에 B5 vitamins을 첨가한 MS/B5 배지를 사용하였다. B5 배지의 vitamins에는 MS 배지의 vitamins (2.0 mg glycine, 100 mg myo-inositol, 0.5 mg nicotinic acid, 0.5 mg pyridoxine-HCl, 0.1 mg thiamine-HCl) 보다 nicotinic acid와 pyridoxine-HCl이 0.5 mg/L씩 더 첨가되어 있고 thiamine-HCl의 경우에는 10 mg/L 더 첨가되어 있다. 각각의 배지에 인삼 모상근 생체중 1g을 40 ml 액체배지에 접종한 후 30일간 현탁배양한 결과 다른 배지보다 MS/B5배지에서 25% 이상 모상근 생장이 증가하였는데 우수하였다. 그러나 사포닌 함량을 분석한 결과 total ginsenosides는 생장이 우수했던 MS/B5배지 보다는 MS 배지에서 8.745 mg으로 높아 생산성 면에서는 MS 배지가 더 높게 관찰되었다 (Table 2). 이러한 결과로 볼 때 배지 중의 추가된 vitamins 성분함량은 이차대사계 보다는 모상근의 생장을 촉진하는 쪽으로 작용하는 것으로 사료된다.

기내배양을 통하여 유용물질을 대량으로 생산하기 위해서는

Table 2. Media effect on the growth and ginsenoside production of ginseng hairy root (KGHR-8).

Media	Fresh weight (g/flask)	Dry weight (g/flask)	Total ginsenoside (mg/g · DW)
MS	9.040 ± 0.582 ^a	0.554 ± 0.023	8.745 ± 0.651
B5	8.440 ± 0.229	0.548 ± 0.019	6.250 ± 0.562
MS/B5	9.960 ± 0.397	0.560 ± 0.012	7.135 ± 0.463

^a: Each values represneted mean ± SE.

bioreactor 배양이 필수적이다. 따라서 삼각 플라스크에서의 실험 결과와 scale up한 20 L bioreactor에서의 배지 종류에 따른 모상근의 생장과 ginsenoside의 함량을 조사하였다. 선발된 모상근중 생장속도가 빠르고 ginsenoside 생산성이 좋았던 KGHR-8 모상근을 사용하였는데, 최초 선발배양에서 100 ml 삼각 flask를 사용하였기 때문에 약 200배가 큰 20 L의 배양기에서도 동일하게 성장하며, 또한 ginsenoside의 함량이 그대로 유지되는지에 대한 확인하는 것이 필요하다. KGHR-8 모상근을 20 L배양기에 종근 (seed root) 50 g을 접종하여 dim light 하에서 배양하였다. 그 결과 실험에 사용된 배지에서 대부분 1 kg 이상의 성장량을 나타내었으며, 100 ml 삼각 flask를 사용한 실험 결과와 동일하게 MS배지에 B5배지의 비타민을 첨가한 MS/B5 배지에서 가장 높은 성장량을 나타내었다 (Table 3). 인삼 모상근의 경우 삼각플라스크에서 배양을 하거나 용량이 큰 bioreactor에서 배양을 하는 성장비율 및 사포닌 생합성은 비교적 일정하게 유지되는 것으로 나타나 대량배양을 위한 여러 조건을 탐색할 때 삼각플라스크를 이용한 기초 실험결과를 대량배양에 이용 가능할 것으로 사료되었다.

4. 백색광 조사 효과

인삼 모상근의 배양시 광조사가 모상근의 생장과 사포닌 생합성에 미치는 효과를 조사하기 위해서 우선 100 ml 삼각플라스크를 이용하여 실험을 실시하였다. 그 결과 암배양한 처리구

Table 3. Media effect on the growth and ginsenoside production of ginseng hairy root (KGHR-8) in 20 L bioreactor.

Media	Fresh wt. (g/bioreactor)	Dry wt. (g/bioreactor)	Total ginsenoside (mg/g · DW)
MS	1,450 ± 102	96 ± 0.624	8.90 ± 0.701
B5	1,123 ± 105	88 ± 0.783	7.02 ± 0.631
MS/B5	1,597 ± 143	105 ± .050	9.12 ± 0.583

^a: Each values represneted mean ± SE.

가 생체중 기준으로 11.5 g으로 광조사 처리한 구에 비해서 생장이 높은 것으로 나타났다 (Table 4). 그러나, 사포닌 분석 결과는 광조사한 처리구가 11.7 mg으로 암처리구에 비해서 높은 사포닌 생합성을 나타내었으며, 특히 PD계 사포닌이 암배양한 모상근에 비해서 4.8 mg으로 30% 이상 높았다. 광조사 하면서 배양한 인삼 모상근의 사포닌 함량이 높게 나온 것은 광이 자극인자로서 작용하여 2차대사산물이 사포닌의 생합성을 촉진하였기 때문으로 사료된다.

20 L bioreactor를 사용하여 선발된 모상근으로부터 사포닌의 함량을 증대시키기 위해서 광처리와 암처리를 하여 그 효과를 조사하였다 (Table 5). 최초 접종량 50 g의 모상근을 배양기에 넣고 40일간 광 처리와 암 배양한 후 생체중과 건물중 그리고 사포닌의 함량을 조사한 결과 100 ml 플라스크 배양한 결과와 마찬가지로 암배양이 광조사 처리하면서 배양한 모상근에 비하여 1.78 kg으로 높은 성장량을 나타내었다. 그러나 총 ginsenosides 함량은 광조사 처리하여 배양한 모상근이 12.41 mg으로 34% 정도 높게 나타났으며, 특히 삼각플라스크 배양과는 다르게 PT계 사포닌의 함량이 높게 나타났다. 이러한 결과는 광조사에 의해서 인삼 모상근의 2차대사산물생합성이 크게 영향을 받으며, 배양용량의 크기에 따라서도 광조사 효과에 차이가 있다는 것을 나타내는 것으로 대량배양을 통한 유용사포닌의 대량생산을 위해서는 좀 더 세밀한 연구를 실시하여 가장 효과적인 광조사 조건을 탐색할 필요가 있다.

Table 4. The effect of light irradiation on the growth and ginsenosides accumulation of ginseng hairy root.

Culture condition	Fresh wt. (g/flask)	Dry wt. (g/flask)	Ginsenoside (mg/g · DW)		
			Total	PT	PD
Dark	11.55 ± 0.43 ^a	0.81 ± 0.05	10.37 ± 0.91	6.84 ± 0.53	3.53 ± 0.38
Light	10.20 ± 0.30	0.71 ± 0.05	11.73 ± 1.02	6.88 ± 0.61	4.84 ± 0.41

^a: Each values represneted mean ± SE.

Table 5. The effect of light irradiation on the growth and ginsenosides accumulation of ginseng hairy root in 20 L bioreactor.

Condition of Culture	Fresh wt. (g/bioreactor)	Dry wt. (g/bioreactor)	Ginsenoside (mg/g · DW)		
			Total	PT	PD
Light	1,692 ± 162 ^a	112 ± 10.0	12.41 ± 0.62	9.27 ± 0.49	3.14 ± 0.13
Dark	1,781 ± 195	121 ± 10.3	9.25 ± 0.43	6.29 ± 0.27	2.33 ± 0.16

^a: Each values represneted mean ± SE.

Table 6. Effects of UV irradiation on the growth and content of ginsenoside of ginseng hairy roots.

Preculture period (day)	Postculture period (day)	UV irradiated time (min)	Fresh wt. (g/flask)	Dry wt. (g/flask)	Ginsenoside (mg/g)		
					G-Rg ₁	Triol	Diol
20	20	30	9.10 ± 0.81 ^a	0.55 ± 0.05	1.64 ± 0.06	3.84	3.32
		60	8.91 ± 0.70	0.53 ± 0.05	1.38 ± 0.03	3.53	3.99
		120	8.43 ± 0.83	0.51 ± 0.04	1.81 ± 0.09	4.37	4.31
		240	8.20 ± 0.57	0.49 ± 0.03	2.51 ± 0.10	4.87	4.54
25	15	30	10.0 ± 0.91	0.61 ± 0.05	0.92 ± 0.02	3.50	2.54
		60	8.91 ± 0.71	0.53 ± 0.04	1.57 ± 0.07	3.60	2.02
		120	8.87 ± 0.55	0.53 ± 0.04	2.54 ± 0.15	3.81	3.63
		240	8.70 ± 0.80	0.52 ± 0.04	2.73 ± 0.19	4.54	3.58
30	10	30	11.31 ± 1.01	0.68 ± 0.02	1.65 ± 0.08	3.22	3.28
		60	10.40 ± 1.00	0.62 ± 0.03	1.01 ± 0.06	3.97	3.09
		120	10.35 ± 0.82	0.62 ± 0.03	1.09 ± 0.04	3.90	3.76
		240	9.60 ± 0.83	0.57 ± 0.02	1.20 ± 0.04	3.96	3.83

^a: Each values represneted mean ± SE.

5. UV 조사 효과

인삼 모상근 배양시 UV 조사에 의한 모상근의 생장 및 사포닌 생합성에 미치는 조사하기 위해서 삼각플라스크에서 20, 25, 30일간 배양한 후 UV를 0, 30, 60, 120, 240분간 각각 조사한 후 다시 20, 15, 10일간씩 총 40일간 배양한 후 이를 수거하여 인삼 모상근의 생장량과 사포닌 함량을 조사하였다. UV 처리전 배양기간이 길고 UV 처리기간이 짧을수록 생체중과 건물중이 증가하는 경향을 보였으며 동일한 기간 중에는 UV의 처리시간이 길어질수록 생장량이 감소하는 경향을 보였다 (Table 6). 그러나 조사포닌의 경우에는 UV의 처리전 배양기간이 길고 UV의 처리기간이 짧을수록 감소하는 경향을 보여 UV의 처리에 의해 모상근의 생장은 다소 억제되는 경향을 나타내었으나, 이차대사산물인 사포닌의 함량은 증가되는 경향을 보였다 (Table 6). 특히 ginsenoside-Rg₁ 경우는 25일로 전배양한 후 UV 처리를 240분 처리하고 15일 간 후배양을 하였을 때 가장 높은 함량을 나타내었다 (Table 6).

UV는 핵산과 단백질에 의해서 흡수되어 생물에 다양한 영향을 미친다. 식물에 UV 조사할 경우 식물의 신장, 잎의 수, 잎의 길이 같은 형태변화가 발생하며, 광합성을 억제키켜 이산화탄소 동화율을 감소시키고 광합성 전자전달계의 부분적인 반응을 변화시킨다 (Park et al., 1997). 또한 UV는 식물의 이차대사계를 자극하여 isoflavonoid를 형성시키고 (Beggs et al., 1985), 당근의 현탁배양세포에서 anthocyanin의 축적 (Beggs et al., 1985; Ozeki, 1996)을 유도하는 것으로 알려져 있다. 인삼 모상근의 경우에도 배양시 UV 조사에 의하여 생장은 다소 억제되었으나, 이차대사산물인 사포닌의 축적은 증가하는 경향을 나타내었다.

최근 Ri-plasmid에 의해 형질전환된 대황 (*Rheum undulatum*) 모상근에서 tannin (Hwang et al., 2000) 생산과 시호

(*Buphurum falcatum*)에서 saikosaponin (Ahn et al., 1999) 등의 이차대사산물을 생산하고자 하는 연구가 많이 시도되어 왔다. 인삼 조직배양을 통한 사포닌 생산은 캘러스배양에서 확인되었으며 (Furuya et al., 1970, 1973), 이어 *A. rhizogenes* Ri-plasmid 도입에 의한 모상근이 유도되어 식물생장조절제가 전혀 첨가되지 않은 배양기에서 자란 모상근은 자연산 인삼뿌리와 사포닌 함량이 비슷하였으며, IBA를 첨가하여 배양하였을 경우에는 2배 정도 많이 축적이 되었다 (Yang et al., 1998). *Beta vulgaris*의 모상근에서는 자연산 뿌리보다 betacyanin과 betaxanthin의 함량이 거의 비슷하거나 다소 많은 경향을 보고 하였다 (Hamill et al., 1986). 반면 연초 (*N. rustica*)에서는 기내배양한 모상근에서 오히려 자연산 뿌리보다 약 2-3배 정도 nicotine 함량이 많이 축적된다고 보고한 바 있어 (Hagimori et al., 1982), 기내 배양에 의한 모상근의 이차대사산물 생합성은 그 성분특성에 따라서 차이가 있음을 시사하였다. 한편 sample채취시기에도 많은 차이가 있을 것으로 사료되는 바, 대부분 배양기간이 오래될수록 이차대사산물이 더 많이 축적되는 것으로 보고되어 있는데, Yoshikawa & Furuya (1987)는 인삼 모상근의 채취시기가 접종 18일 이후이고 본 실험에서는 30일 후에 모상근을 채취하였기 때문에 사포닌 함량에 차이가 있는 것으로 사료된다. 또한 배양환경면에서도 캘러스 배양시 광과 암상태에 따라서 이차대사 산물에 차이가 있으며 광질에 따라서도 차이가 있는 것으로 보고되어 (Laneri et al., 1990), 배양시의 환경조건에 따라서 차이가 있을 수 있을 것으로 판단되며 본 실험에서도 광조사에 따른 인삼모상근의 생장과 배양용기의 용량에 따라서도 사포닌 성분에 차이가 나타났다. 또 한편으로는 T-DNA에 의하여 형질전환되어 핵 DNA에 삽입되는 T-DNA의 copy수와 삽입위치에 따라 발현정도가 달라져 모상근 cell line간에도 이차대사산물

의 생합성능에 차이가 있을 수 있다고 보고 하였는데, *Atropa belladonna*의 모상근 clone간에는 alkaloid 함량이 적어도 10 배이상 차이가 관찰되었다고 하였다 (Kamada *et al.*, 1986). 이는 T-DNA에 의하여 형질전환될 경우 T-DNA내의 식물 호르몬 유사체 자가합성유전자의 발현에 의하여 호르몬 balance에 따라 이차대사산물의 증감에 차이가 나타나는 것으로 보이며, Yoshikawa & Furuya (1987)는 인삼 모상근에 외생 식물 호르몬으로 IBA와 kinetin을 추가 첨가할 때 생장량뿐만 아니라 사포닌 함량이 2배 이상 증가함을 보고하여 형질전환체에도 외생 식물생장조절제를 첨가함으로써 이차대사산물의 증감 가능성을 시사한 바 있다. 그러나 Kamada *et al.* (1986)이 보고한대로 clone간에 차이가 있다고 생각될 때 여러 clone중에서 외생 식물호르몬에 의하여 생장이 증가하며 사포닌 생성량에도 차이가 있다면 T-DNA에 의하여 형질전환된 인삼 모상근 세포주를 이차대사산물 생산을 위한 새로운 세포주로서 활용할 수 있는 가능성을 높여줄 것으로 기대된다.

적 요

A. rhizogenes A₄T를 이용하여 인삼 3년생 뿌리 절편에서 많은 모상근을 유도한 후 근단 배양을 이용하여 우수한 세포주를 선별하였고, 액체배양시 광조사 처리가 생장 및 사포닌 생합성에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 암배양한 처리구가 생체중 기준으로 11.5 g으로 광조사 처리한 구에 비해서 생장이 높았으나, 사포닌함량은 광조사한 처리구가 11.7 mg으로 높았다. 배양용기에 따른 효과를 조사하기 위해서 20 L 배양기에서 배양한 결과 암배양이 광조사 처리하면서 배양한 모상근에 비하여 1.78 kg으로 높은 생장량을 나타내었으나, 총 ginsenosides 함량은 광조사한 처리구의 모상근이 12.41 mg으로 34% 정도 높게 나타났으며, PT계 사포닌의 함량이 많은 증가를 보였다. UV처리에 의한 생장량 및 사포닌함량을 조사한 결과 UV처리 전 배양기간이 길고 UV처리기간이 짧을수록 생체중과 건물중이 증가하는 경향을 보였으며 동일한 기간 중에는 UV의 처리시간이 길어질수록 감소하는 경향을 보였다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구 (2006-124호) 지원으로 수행된 연구결과로 연구비 지원에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

Ando T, Tanaka O, Shibata S (1971) Chemical studies on the oriental plant drugs. Comparative studies on the saponins and sapogenins of ginseng and related crude drugs. *Syoyakugaku Zasshi* 25:28-32.

- Ahn JC, Jeong YJ, Lee KB, Kim OT, Hwang B (1999) The effect of various culture media on histological anatomy and saikosaponin content in hairy root culture of *Buplurum falcatum*. *Kor. J. Med. Crop Sci.* 7:251-256.
- Beggs CJ, Stdzler-Jehle A, Wellman E (1985) Isoflavonoid formation as an indicator of UN stress in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Plant Physiol.* 79:630-634.
- Choi KT, Park JC, Ahn IO (1990) Saponin production in tissue culture of ginseng. *Kor. J. Ginseng Sci.* 14:107-111.
- Choi KT, Yang DC (1987) Characteristics of the growth of ginseng tumor callus. *Kor. J. Ginseng Sci.* 11:56-65.
- Chilton MD, Drummond MH, Merlo DJ, Nester EW (1978) Highly conserved DNA of Ti-plasmids overlaps T-DNA maintained in plant tumors. *Nature* 275:147-149.
- Christen P, Roberts MF, Phillipson JD, Evans WC (1989) High yield production of tropane alkaloids by hairy root cultures of a *Datura candida* hybrid. *Plant Cell Rep.* 8:75-77.
- Furuya T, Kojima H, Syono K, Ishill T (1970) Isolation of Panaxatriol from *Panax ginseng* callus. *Chem. Pharm Bull.* 18: 2371-2372.
- Furuya T, Kojima H, Syono K, Ishii T, Uotani K, Nishio M (1973) Isolation of saponins and sapogenins from callus tissue of *Panax ginseng*. *Chem. Pharm Bull.* 21:98-101
- Hagimori M, Matsumoto T, Obi Y (1982) Studies on the production of digitalis cardenolides by plant tissue culture. *Plant Physiol.* 69:653-656.
- Hamill JD, Parr AJ, Robins RJ, Rhodes MJC (1986) Secondary product formation by cultures of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.* 5:111-114.
- Hong SJ, Lee YW, Joo CN (1987) Biosynthesis of saponins in *Panax ginseng*. *Kor. J. Ginseng Sci.* 11:136-144.
- Hwang SJ, Na MS, Lee JB, Hwang B (2000) Production of tannin from hairy root cultures of *Rheum undulatum* L. *Kor. J. Med. Crop Sci.* 8:250-258.
- Joo CN, Kwak HS, Lee HB, Lee CH (1983) Biosynthesis of saponins in *Panax ginseng* C. A. Meyer. I. Probable sites of the biosynthesis of ginseng saponin from acetate. *Kor. J. Ginseng Sci.* 7:108-114.
- Jung G, Tepfer D (1987) Use of genetic transformation by the Ri T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* to stimulate bio-mass and tropane alkaloid production in *Atropa belladonna* and *Calystegia Sepium* roots grown *in vitro*. *Plant Sci.* 50:145-151.
- Kamada H, Okamura N, Satake M, Harada H, Shimomura K (1986) Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. *Plant Cell Rep.* 5:239-242.
- Kitagawa I, Taniyama T, Hayashi T, Yoshikawa M (1983) Malonyl-ginsenoside-Rb₁, -Rb₂, -Rc and Rd, four new malonylated dammarane-type triterpene oligosaccharides from *Ginseng radix*. *Chem. Pharm Bull.* 31:3353-3356.
- Laneri U, Franconi R, Altavista P (1990) Somatic mutagenesis of *Gerbera jamesonii* hyvr : irradiation and *in vitro* culture. *Acta Horticul.* 28:395-402.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Ooms G, Twell D, Bossen ME, Harry J, Hoge C, Burrell MM (1986) Developmental regulation of RI T_L-DNA gene expression

- in roots, shoots and tubers of transformed potato (*Solanum tuberosum* cv. Desiree). *Plant Mol. Biol.* 6:321-330.
- Ozeki Y** (1996) Regulation of anthocyanin synthesis in carrot suspension cultured cells. *J. Plant Res.* 109:343-351.
- Park HJ, Oh SY, Choi KH, Meang SJ, Yoon ES, Yang DC** (2000) Effect of jasmonic 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.
- Park KE, Chung HS, Song SD, Roh KS, Song JS** (1997) The effects of UV-B radiation on photosynthetic electron transport of barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *J. Kor. Environ. Sci. Soc.* 6:369-378.
- Yang DC, Choi YE** (2000) Production of transgenic plants via *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Panax ginseng*. *Plant Cell Rep.* 19:491-496.
- Yang DC, Kim YH, Yang DC, Min BH, Shin SL, Choi KT** (1998) Selection of active grow hairy root lines in ginseng. *Kor. J. Plant Tiss. Cult.* 25(6):525-530.
- Yang DC, Yun KY, Kim YH and Yang DC** (2000) Physiological responses of hairy roots of ginseng (*Panax ginseng* C.A.Meyer) to iron status and pH change. *Kor. J. Plant Tiss. Cult.* 27:31-37.
- Yoshikawa T, Furuya T** (1987) Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.* 6:449-453.
- 남기열** (1996) 최신고려인삼-성분 및 효능편. 한국인삼연초연구원. 천일인쇄사. p. 13-44.