

게르마늄 함유 인삼 부정근의 생장 증대를 위한 액체배양 조건의 최적화

장은정 · 오훈일*

세종대학교 식품공학과

(2009년 5월 25일 접수; 2009년 6월 16일 수정; 2009년 6월 16일 수리)

Optimization of Submerged Culture Conditions for the Growth Increase of Ginseng Adventitious Root Containing Germanium

Eun Jung Chang and Hoon Il Oh*

Dept. of Food Science and Technology, Sejong University, Seoul

(Received May 25, 2009; Revised June 16, 2009; Accepted June 16, 2009)

Abstract : This study was carried out to determine the optimal submerged culture conditions for the growth increase of ginseng adventitious roots containing germanium by means of a fractional factorial design with four factors and three levels, using the response surface methodology (RSM). The ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) adventitious roots were induced by plant growth regulators and cultured in a liquid SH medium. The effects of various GeO_2 and phosphoric acid (H_3PO_4) concentrations in the medium, GeO_2 addition time and the pH of the medium on the fresh weight of the ginseng adventitious roots were investigated. The optimum pH of the medium and the phosphoric acid concentration determined by the partial differentiation of the model equation were 4.7 and 6.0 mM, respectively. The predicted optimal GeO_2 concentration was 10 ppm and the GeO_2 addition time did not affect the growth of ginseng adventitious roots. Under these conditions, the growth of the ginseng adventitious root containing germanium was predicted to be 2.47 g.

Key words : Ginseng, adventitious root, germanium, fresh weight, response surface methodology

서 론

게르마늄 (Ge)은 토양, 물, 식물 및 동물 체내에서 자연적으로 발견되는 미량원소로, 1886년 독일의 화학자 Clemens Winkler에 의해 최초로 발견되어 초기 전자산업에서 반도체로서 널리 사용되었다.¹⁾ 이후 1930년에 이르러 노벨의학상 수상자인 Alexi Carel 박사 등에 의해 프랑스와 스페인의 국경에 위치한 Lourdes 샘물이 암, 결핵, 뇌종양 등 여러 가지 난치병에 큰 효과가 있다고 알려져 성분을 분석한 결과, 높은 함량의 게르마늄에 의해 치료효과가 나타난다는 보고서를 통해 그 의학적 효능이 처음 알려졌다.^{2,3)}

게르마늄은 형태에 따라 무기게르마늄과 유기게르마늄으로 분류할 수 있는데, GeO_2 와 같은 무기게르마늄은 장기 복용 시 빈혈, 신기능장애, 신경병증, 근장애 등을 유발하는 것으로 알려져 있으나,^{4,5)} 유기게르마늄은 항종양 효과,^{6,7)} 항돌연변이

효과,⁸⁾ 면역강화 작용^{9,10)} 등의 다양한 약리작용을 가지는 것으로 보고되었다. 따라서, 독성이 있는 무기게르마늄을 유기 게르마늄화 하기 위해 식물 및 미생물^{3,11)}을 이용한 다양한 연구들이 수행되었고, 최근에는 게르마늄이 식물 생육에 미치는 영향에 관한 연구와 게르마늄을 함유한 식물체를 개발하기 위해 벼,^{12,13)} 콩나물,¹⁴⁾ 인삼,¹⁵⁾ 녹두,¹⁾ 마늘¹⁶⁾ 명일엽 및 일당귀^{17,18)} 등을 이용한 연구들이 보고되고 있다. 그러나, 이러한 연구들의 대부분은 토양재배 또는 양액재배 방법을 이용하였고 조직배양방법을 이용하여 게르마늄 함유 식물을 생산하고자 한 연구는 일부에 지나지 않으며, 조직배양방법을 이용한 일부 연구들도 캘러스에 대한 게르마늄의 영향을 규명하는 연구들이 대다수이고 부정근에 대한 게르마늄의 영향을 연구한 예는 거의 없는 실정이다. 따라서, 저자들은 무기게르마늄 GeO_2 의 첨가가 인삼부정근의 생장과 게르마늄 및 사포닌 함량에 미치는 영향에 대한 연구를 전보^{19,20)}에 발표한 바 있다. 그러나, 본 연구에서는 개별요소들의 영향이 아니라 각 실험요소들간의 종합적인 효과를 평가할 수 있는 반응표면분

*Corresponding author. E-mail: ohhi@sejong.ac.kr
Phone: +82-2-3408-3229, Fax: +82-2-3408-4319

석법 (Response Surface Methodology: RSM)을 이용하여 게르마늄 함유 인삼부정근의 생장을 증대시킬 수 있는 최적 액체배양조건을 확립하고자 하였다.

가한 Murashige-Skoog (MS)²¹ 고체배지에서 배양하였다. 배양온도는 25°C로 유지하였으며 빛이 없는 암조건에서 배양하였다.

재료 및 방법

1. 켈러스의 유도

한국인삼연초연구원 (현 KT&G 중앙연구원) 수원경작시험장에서 분양받은 고려인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer) 씨앗을 개압하여 70% (v/v) ethanol로 20초, 4% NaOCl 용액 (v/v)으로 15분간 살균한 후, 켈러스를 유도하기 위해 메스로 씨앗에 작은 상처를 낸 다음, BAP (6-Benzylaminopurine) 0.5 mg/L와 NAA (1-Naphthaleneacetic acid) 3.0 mg/L를 첨

2. 부정근 (Adventitious root)의 유도 및 배양

MS배지에서 유도된 켈러스로부터 부정근을 얻기 위해 BAP 0.5 mg/L와 NAA 3.0 mg/L를 첨가한 Schenk-Hilderbrant (SH)²² 고체배지에 켈러스를 옮겨 25°C 암조건에서 배양하였다. 이 조건에서 3개월간 배양한 후 유도된 root를 동일한 조성의 SH 액체배지에 옮겨 25°C, 암조건에서 60 rpm으로 4주간 진탕배양한 후 다음의 실험에 사용하였다.

Table 1. Fractional factorial block of experimental design for ginseng adventitious root culture containing germanium and fresh weight

Treatment No.	Coded var.				Process var.				Fresh weight (g)
	X ₁ *	X ₂	X ₃	X ₄	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	
1	-1	-1	-1	+1	10	0	4.5	10.0	2.42
2	-1	-1	+1	-1	10	0	6.5	0.10	2.11
3	-1	+1	-1	-1	10	2	4.5	0.10	2.25
4	-1	+1	+1	+1	10	2	6.5	10.0	2.07
5	+1	-1	-1	-1	110	0	4.5	0.10	1.69
6	+1	-1	+1	+1	110	0	6.5	10.0	1.34
7	+1	+1	-1	+1	110	2	4.5	10.0	2.16
8	+1	+1	+1	-1	110	2	6.5	0.10	1.74
9	0	0	0	0	60	1	5.5	5.05	2.08
10	0	0	0	0	60	1	5.5	5.05	2.08
11	-1	-1	-1	-1	10	0	4.5	0.10	2.13
12	-1	-1	+1	+1	10	0	6.5	10.0	1.89
13	-1	+1	-1	+1	10	2	4.5	10.0	2.19
14	-1	+1	+1	-1	10	2	6.5	0.10	2.34
15	+1	-1	-1	+1	110	0	4.5	10.0	1.97
16	+1	-1	+1	-1	110	0	6.5	0.10	1.72
17	+1	+1	-1	-1	110	2	4.5	0.10	2.21
18	+1	+1	+1	+1	110	2	6.5	10.0	1.87
19	0	0	0	0	60	1	5.5	5.05	2.08
20	0	0	0	0	60	1	5.5	5.05	2.08
21	+1	0	0	0	110	1	5.5	5.05	1.99
22	-1	0	0	0	10	1	5.5	5.05	2.32
23	0	+1	0	0	60	2	5.5	5.05	2.04
24	0	-1	0	0	60	0	5.5	5.05	2.06
25	0	0	+1	0	60	1	6.5	5.05	1.72
26	0	0	-1	0	60	1	4.5	5.05	1.93
27	0	0	0	+1	60	1	5.5	10.0	1.76
28	0	0	0	-1	60	1	5.5	0.10	1.84
29	0	0	0	0	60	1	5.5	5.05	2.08
30	0	0	0	0	60	1	5.5	5.05	2.08

*X₁: GeO₂ conc. (ppm), X₂: addition time of GeO₂ (weeks), X₃: medium pH, X₄: H₃PO₄ conc. (mM)

3. 반응표면분석법에 의한 게르마늄 함유 인삼 부정근의 생장 증대를 위한 최적 액체배양 조건 설정

1) Experimental design block 설정

Stat-graphics (STSC Inc. Rockville, MD, USA)내의 central composite design (CCD) program을 이용하여 게르마늄 함유 인삼부정근 생산에 영향을 미치는 4가지 요소인 GeO_2 의 농도, GeO_2 의 첨가시기, 배지의 초기 pH, phosphoric acid (H_3PO_4)의 농도를 독립변수로 3 level - 4 factor의 fractional factorial block을 정하였다 (Table 1). Phosphoric acid는 전보²⁰⁾에서 인삼부정근의 게르마늄 흡수를 촉진시키는 것으로 확인된 바 있어, 본 연구에서도 그 농도를 독립변수에 포함시켜 fractional factorial block을 설정하였다. GeO_2 의 농도는 최대 110 ppm, 최소 10 ppm, 중간값 60 ppm이 되도록 첨가하였고, GeO_2 의 첨가시기는 최대 2주, 최소 0주, 중간값 1주로, 배지의 초기 pH는 최대 6.5, 최소 4.5, 중간값 5.5로 맞추었으며, phosphoric acid의 농도는 최대 10.0 mM, 최소 0.1 mM, 중간값 5.05 mM이 되도록 각각 독립변수의 level을 설정하였다. 배지는 SH배지를 기본으로 하고, growth regulator로 0.5 mg/L BAP와 3.0 mg/L NAA를 첨가하였다.

2) 인삼 부정근의 배양 및 생체중량 측정

3 level - 4 factor로 구성된 fractional factorial block에 따라 배지를 제조하여 부정근 0.6 g씩을 100 mL flask에 접종하고 25°C 암조건 하에서 60 rpm으로 6주간 진탕배양한 뒤, 인삼부정근을 증류수로 2회 세척하고 여과지 (Whatman No. 1)로 표면의 물기를 제거한 다음, 생체중량을 측정하였다.

3) 최적 배양조건 설정을 위한 통계 처리

측정한 생체중량을 종속변수로 설정하고 각 독립변수들 간의 관계를 SAS (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA)로 다중회기분석 및 분산분석을 실시한 후 유의성이 인정되는 변수만을 채택하여 각 종속변수에 해당하는 model식을 설정하고 이를 RSM에 의하여 등고분석과 3차원 분석을 실시하여 최적조건을 설정하였다.

결과 및 고찰

1. 생체중량에 대한 fractional factorial block

Stat-graphics 내의 program중 하나인 central composite design (CCD)을 이용하여 3 level - 4 factor로 fractional factorial block을 design한 후, 6주간 인삼부정근을 배양하고, 생체중량 (fresh weight)을 종속변수로 하여 측정한 결과는

Table 1과 같다. 1번 처리구인 GeO_2 10 ppm, GeO_2 첨가시기 0주, pH 4.5, phosphoric acid 농도 10 mM 일때 인삼 부정근의 생체중량이 2.42 g으로 최대였고, GeO_2 110 ppm, GeO_2 첨가시기 0주, pH 6.5, phosphoric acid 농도 10 mM 인 6번 처리구에서 최소 생장을 하였다. GeO_2 10 ppm에서 최대값을 GeO_2 110 ppm에서 최소값을 나타낸 것은 Lee 등¹⁵⁾이 인삼의 기내배양시 GeO_2 10 ppm 처리구가 켈러스 형성이 가장 좋았고 그 이상의 농도부터는 켈러스의 갈변현상이 나타났다는 보고와 Chang과 Oh¹⁹⁾가 GeO_2 를 첨가한 배지에서 인삼 부정근을 배양한 결과, GeO_2 10 ppm 처리구에서의 생장이 가장 높았고 50 ppm 이상의 농도에서부터 생장이 현저히 저하되었다고 하는 결과와도 일치한다. 이 외에 Lee 등¹⁷⁾은 명일엽과 일당귀의 조직배양시 무기게르마늄의 농도가 5 ppm일 때까지는 켈러스의 형성이 좋았으나, 그 이상의 농도에서는 저해를 받았다고 보고하였고, Park 등¹⁸⁾은 강활의 켈러스 유도시 GeO_2 농도 2.5 ppm에서 켈러스 형성이 가장 좋았다고 보고하였다. 또한 Lee 등¹⁶⁾ 역시 마늘에서 켈러스의 유도와 증식 및 기관 분화 등이 GeO_2 5 ppm까지는 무처리구와 동일하게 양호하였으나, 10 ppm부터 조금씩 저해되다가 50 ppm부터 불량했다고 보고하였다. 이처럼 식물의 종에 따라 다소 농도의 차이는 있으나 대체로 저농도의 GeO_2 첨가시에 높은 생장율을 나타낸 점에서는 본 연구결과와 일치하였다.

pH 4.5에서 인삼 부정근의 생장율이 최대값을 나타낸 것은 Kwon 등¹³⁾이 GeO_2 50 ppm을 첨가하고 pH를 4.5~6.5까지 조절한 배지에서 현미로부터 유도된 켈러스의 생장을 측정하였을 때 pH 4.5와 5.0에서의 생장보다 pH 5.5, 6.0, 6.5에서의 생장이 더 좋았다고 한 보고와 Park 등¹⁸⁾이 강활의 켈러스 배지에 GeO_2 2.5 ppm과 citric acid 0.1 mM을 첨가하고 pH를 각각 4, 5, 6, 7로 조절하여 켈러스의 증식률을 측정하였을 때 pH 6에서 가장 높았다고 한 보고와는 차이가 있다. 이는 식물의 종이 다를 뿐만 아니라 실험방법상의 차이로, 본 실험에서는 pH 단독의 효과를 관찰한 것이 아니라 여러 변수들이 혼합되어 복합적으로 작용하였기 때문인 것으로 생각된다.

2. 생체중량 증대 조건의 최적화

게르마늄을 첨가한 인삼 부정근 배양에서 부정근의 생장을 증가시키기 위하여 배지내 GeO_2 농도, GeO_2 첨가시기, pH, phosphoric acid의 농도를 독립변수로 설정하고, 인삼부정근의 생체중량을 종속변수 Y로 설정하여 다중회기분석을 수행한 결과는 Table 2와 같다. 이 결과를 근거로 하여 95% 유의수준에서 유의성이 있는 독립변수 중 X_1 항인 GeO_2 농도, X_3

Table 2. Values of regression coefficients calculated for the fresh weight

Ind. variable	Coefficient	T-value	Prob > T
GeO ₂	-0.014155	-3.1875	0.0041
pH	0.909692	12.9047	0.0000
H ₃ PO ₄	0.156681	2.5690	0.0172
pH × pH	-0.085092	-7.5223	0.0000
GeO ₂ × GeO ₂	0.000087	2.3974	0.0250
H ₃ PO ₄ × H ₃ PO ₄	-0.005811	-1.5811	0.1275
pH × H ₃ PO ₄	-0.018554	-2.2030	0.0379

Table 3. Analysis of variance for full regression of the fresh weight

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-value
Regression	7	123.080	17.5829	628.152***
Error	23	0.64380	0.02799	
Total	30	123.724		

R sq.=0.994796. ***: $p < 0.001$

향인 배지의 pH, X₄향인 phosphoric acid 농도, interaction term 중 pH×phosphoric acid 농도, quadratic term 중 pH, GeO₂ 농도, phosphoric acid 농도 항을 채택하여 model 식 $Y = -0.014155X_1 + 0.909692X_3 + 0.156681X_4 - 0.085092X_3^2 + 0.000087X_1^2 - 0.005811X_4^2 - 0.018554X_3X_4$ 를 얻었다. 다중회기분석 전체에 대한 분산분석 (Table 3)을 수행한 결과,

유의수준을 검정하는 F-value가 99.9% 수준에서 유의성을 나타내어 다중회기분석에 의하여 선정된 각 변수로 구성된 model식 역시 99.9% 수준에서 유의성이 있음이 확인되었다.

반응표면분석을 수행하여 얻은 결과는 Fig. 1~3과 같다. 독립변수 GeO₂를 고정시켜 분석한 결과 GeO₂ 10 ppm일 때 pH 4.75, phosphoric acid 6 mM 부근에서 반응값이 2.45 g으로 최고 반응값을 나타내었고, GeO₂ 60 ppm일 때 pH 6.5, phosphoric acid 10.0 mM 부근에서 1.55 g으로 최저 반응값을 나타내었다. 독립변수 pH를 고정하였을 때에는 pH 4.5일 때 GeO₂ 10.0 ppm, phosphoric acid 6.25 mM 부근에서 2.44 g으로 최고 반응값을 보였으며, 최소 반응값은 pH 6.5일 때 GeO₂ 80 ppm, phosphoric acid 10.0 mM 부근에서 1.57 g으로 나타났다. 독립변수 phosphoric acid를 고정하였을 때는 phosphoric acid 5.05 mM 일 때 GeO₂ 10 ppm, pH 4.75 부근에서 2.45 g으로 최대 생장을 보였으며 phosphoric acid가 10.0 mM 일 때 GeO₂ 80 ppm, pH 6.5 부근에서 1.55 g으로 최소생장을 나타내었다. 이상의 결과로 보아 GeO₂ 적정 농도는 10 ppm, pH 범위는 pH 4.5~4.75이고, phosphoric acid의 적정농도 범위는 5~6.25 mM임을 알 수 있었다. 최대 생장을 보이는 각 독립변수의 최적조건값을 미분하여 얻은 최적조건은 GeO₂ 10 ppm, pH 4.7, phosphoric acid 6.0 mM이었으며 model식에 이를 대입하여 얻은 예상치는 2.47 g이었다.

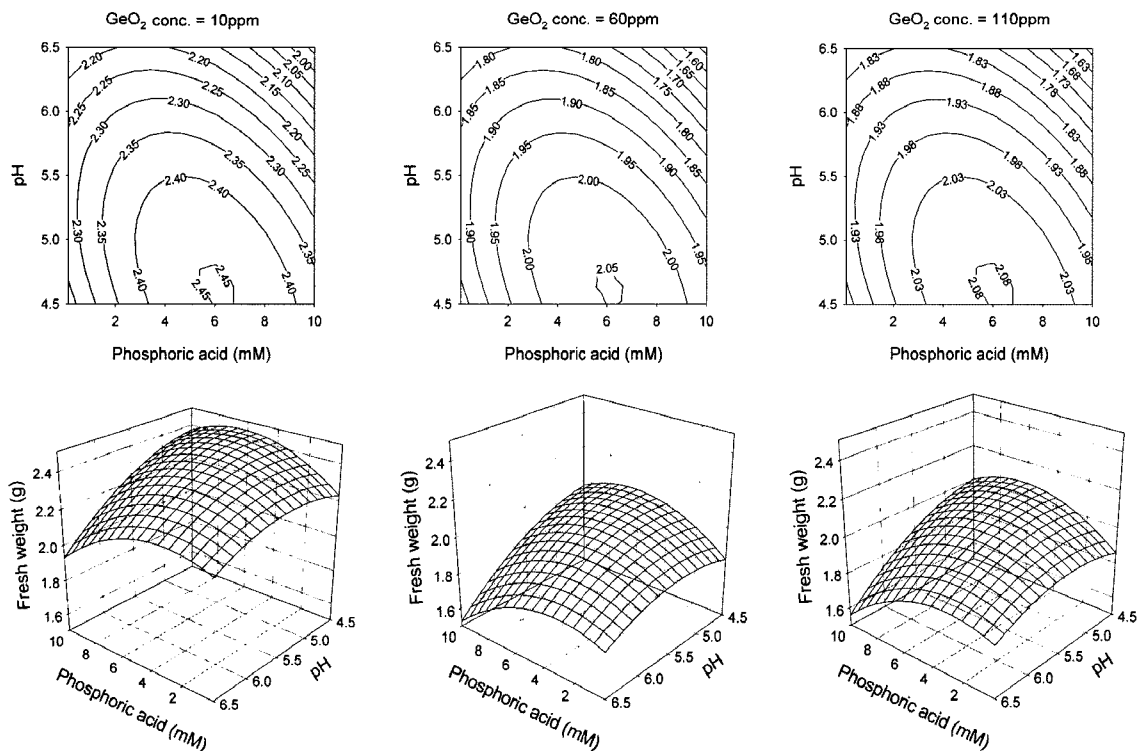


Fig. 1. Contour plots and response surfaces of the fresh weight of ginseng adventitious root at constant GeO₂ concentration of 10, 60 and 110 ppm, respectively.

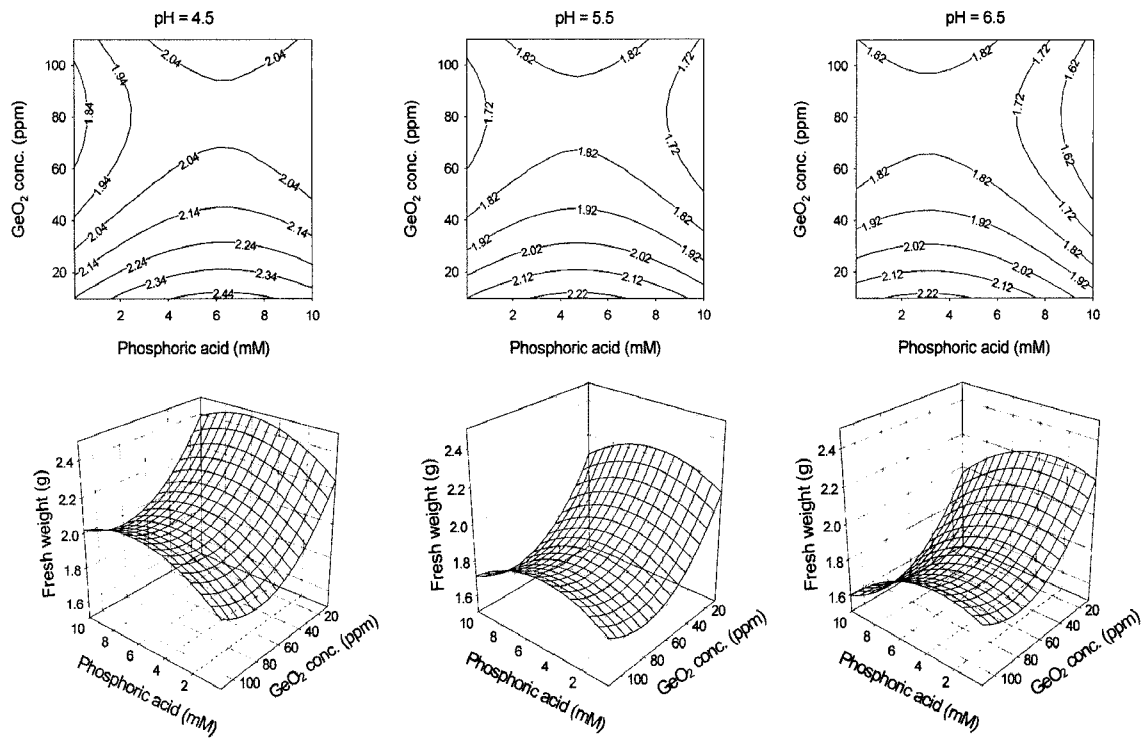


Fig. 2. Contour plots and response surfaces of the fresh weight of ginseng adventitious root at constant pH of medium of 4.5, 5.5 and 6.5 ppm, respectively.

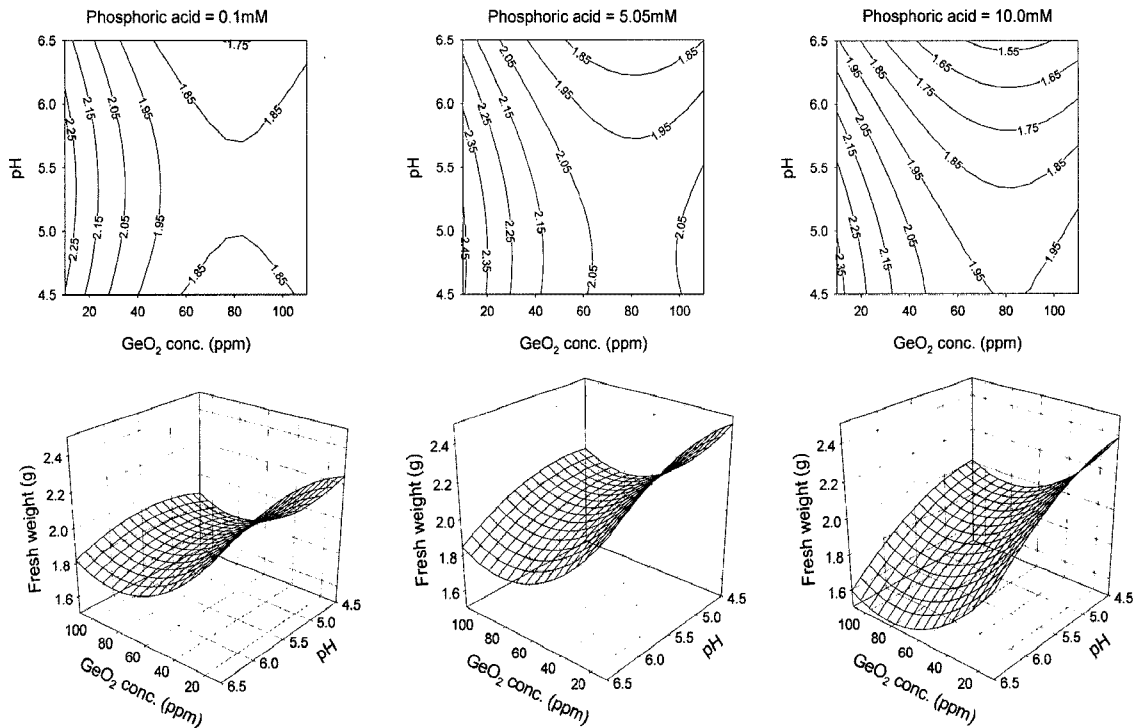


Fig. 3. Contour plots and response surfaces of the fresh weight of ginseng adventitious root at constant phosphoric acid concentration of 0.1, 5.05 and 10.0 mM, respectively.

요 약

식물조직배양기술을 이용하여 게르마늄 함유 인삼 부정근을

생산하고자, 식물생장조절물질로 유도된 인삼 부정근을 사용하여 게르마늄 함유 인삼 부정근의 성장을 증가시킬 수 있는 최적액체배양조건을 RSM으로 조사하였다. 최적 액체배양조

건을 GeO_2 의 농도, GeO_2 의 첨가시기, 배지의 초기 pH, phosphoric acid (H_3PO_4)의 농도의 3 level-4 factor의 fractional factorial block에 의하여 조사한 결과, 인삼 부정근의 생체중량은 최저 1.55 g에서 최고 2.45 g까지 나타났다. 다중회귀분석으로 구한 model식을 가지고 등고 분석과 3차원 분석을 수행한 후, 독립변수의 최저 또는 최고수준에서 종속변수가 최대치를 나타내지 않는 '배지의 초기 pH'와 'phosphoric acid의 농도' 변수에 대하여 model식을 편미분한 결과, 인삼 부정근의 생체중량이 최고치를 나타내는 액체배양조건은 GeO_2 10 ppm, pH 4.7, phosphoric acid 6.0 mM로 예측되었다. 이렇게 결정된 조건값들을 model식에 대입하여 얻은 예상치는 2.47 g이었다.

감사의 말씀

본 연구는 2001년도 한국인삼공사출연 고려인삼학회 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Kim DK, Chon SU, Jung SY, Lee KD, Kim KS, Rim YS. Effects of germanium (Ge) on growth, yield and Ge content of mungbean. Korean J. Crop Sci. 52: 380-386 (2007)
- Sandra G. Therapeutic effects of organic germanium. Medical Hypothesis 26: 207-215 (1988)
- Kim SY, Kim MH, Woo HG, Kim BH, Sohn TU, Jung JW, Baek DH. Qualitative analysis of GeO_2 in germanium-fortified yeast. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 35: 163-172 (2007)
- Obara K, Saito ST, Yamakage H, Watanabe KT, Kakizawa M, Tsukamoto T, Kobayashi K, Hongo M, Yashinaga K. Germanium poisoning; clinical symptoms and renal damage caused by long-term intake of germanium. Japanese J. Medicine 30: 67-72 (1991)
- Lee ST, Lee YH, Lee HJ, Cho JS, Heo JS. Germanium contents of soil and crops in Gyeongnam Province. Kor. J. Environ. Agri. 24: 34-39 (2005)
- Jang JJ, Cho KJ, Lee YS, Bae JH. Modifying responses of allyl sulfide, indole-3-carbinol and germanium in a rat multi-organ carcinogenesis model. Carcinogenesis 12: 691-695 (1991)
- Jao SW, Lee W, Ho YS. Effect of germanium on 1,2-dimethylhydrazin induced intestinal cancer in rats. Dis. Colon Rectum. 33: 99-104 (1990)
- Mochizuki H, Kada T. Antimutagenic effect of Ge-132 on γ -ray induced mutation in *Escherichia coli* B/rWP2 trp-. Int. J. Radiat. Biol. 42: 65-659 (1982)
- Aso H, Suzuki F, Yamaguchi T, Hayashi Y. Induction of interferon and activation of NK cells and macrophages in mice by oral administration of Ge-132, an organic germanium compound. Microbiol. Immunol. 29: 65-74(1985)
- Kobayashi H, Aso H, Ishida N, Suzuki F. Preventive effect of a synthetic immunomodulator, 2-carboxyethylgermanium sesquioxide, on the generation of suppressor macrophages in mice immunized with allogenic lymphocytes. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 14: 841-846 (1992)
- Wei XS. Effect of yeast on bioenrichment of germanium. Food Sci. 149: 49-54 (1992)
- Tensho K, Yeh KL. Tracer study on preferential uptake of germanium by rice plant. Soil Sci. Plant Nutr. 18: 173-179 (1972)
- Kwon TO, Namkoong SB, Park BW. Effect of germanium treatment in culture medium on germanium adsorption by callus induced from brown rice. Korean J. Crop Sci. 41: 729-735 (1996)
- Kim EJ, Lee KI, Park KY. Effects of germanium treatment during cultivation of soybean sprouts. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 31: 615-620 (2002)
- Lee MS, Lee JH, Kwon TO, Namkoong SB. Increment of germanium content in *Angelica keiskei* Koidz. and *Panax Ginseng* G.A. Meyer by *in vitro* propagation. Korean J. Medicinal Crop Sci. 3: 251-258 (1995)
- Lee MS, Choi YH. Effect of inorganic germanium (GeO_2) in callus growth and organ differentiation of *Allium sativum* L. J. College of Agriculture, Univ. of Wonkwang 13: 21-31 (1990)
- Lee MS, Kim SH, Baek SH, Namkoong SB. : Basic studies for increment of germanium contents in *Angelica keiskei* KOIDZ. and *A. acutiloba* KITAGAWA. Korean J. Medicinal Crop Sci. 3: 45-49 (1995)
- Park BW, Lee JH, Kwon TO. Effect of GeO_2 and citric acid on germanium content of callus and plant in *Angelica koreana* MAX. Korean J. Medicinal Crop Sci. 4: 101-108 (1996)
- Chang, EJ, Oh HI. Effects of addition of inorganic germanium, GeO_2 on the growth, germanium and saponin contents of ginseng adventitious root in submerged culture. J. Ginseng Res. 29: 145-151 (2005)
- Chang EJ, Oh HI. Effects of various chelating agents on accumulation of germanium in ginseng adventitious roots in submerged culture. J. Ginseng Res. 31: 154-158 (2007)
- Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum 15: 473-497 (1962)
- Schenk RU, Hildebrandt AC. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell culture. Can. J. Bot. 50: 199-204 (1972)