

인삼 모상근의 생장과 Ginsenoside 생합성에 미치는 석결명의 영향

정대영¹ · 김유진¹ · 심주선¹ · 이정혜¹ · 정석규¹ · 김세영¹ · 인준교² · 이범수² · 양덕춘^{1*}

¹경희대학교 고려인삼명품화사업단 및 인삼유전자원소재은행, ²(주)한방바이오
(2009년 8월 25일 접수; 2009년 9월 10일 수정; 2009년 9월 12일 수리)

The Effect of *Haliotidis Concha* on the Growth and Ginsenoside Biosynthesis of Korean Ginseng Hairy Root

Dae-Young Jeong¹, Yu-Jin Kim¹, Ju-Sun Shim¹, Jung-Hye Lee¹, Seok-Kyu Jung¹,
Se-Young Kim¹, Jun-Gyo In², Bum-Soo Lee² and Deok-Chun Yang^{1*}

¹Korean Ginseng Center for Most Valuable Products & Ginseng Genetic Resource Bank,
Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea

²Biopia Co., Ltd., Yongin 449-598, Korea

(Received August 25, 2009; Revised September 10, 2009; Accepted September 12, 2009)

Abstract : In order to investigate the effects of elicitors on the growth and ginsenoside biosynthesis of ginseng hairy roots, we treated *Panax ginseng* hairy root with various concentrations of *Haliotidis concha* according to different time course. *Haliotidis concha* supplement increased the biomass and ginsenoside accumulation at 10 mg/L concentration. The growth rate of hairy root under a lighter concentration was greater than hairy root treated with a denser concentration. The highest content and productivity of ginsenosides appeared at 2 weeks after the treatment of 10 mg/L *Haliotidis concha*. The gene expression of squalene synthase, squalene epoxidase, dammarenediol synthase, cycloartenol synthase, β -amyrin synthase in hairy roots of ginseng were examined by RT-PCR. The *Haliotidis concha* treatment resulted in the obvious accumulation of the mRNA of triterpene biosynthesis in *Panax ginseng* hairy root as compared with the control. In this study, *Haliotidis concha* acts as a kind of elicitor for the production of ginsenosides.

Key words : elicitor, *Haliotidis concha*, *Panax ginseng* hairy root, RT-PCR

서 론

고려인삼 (*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 오랫동안 이용되어온 전통 약용식물로 그 약리효능은 전 세계적으로 인정받고 있다. 인삼은 단백질과 핵산의 생합성 촉진, 간기능 회복, 항암 및 항산화 효과 등이 탁월한 것으로 밝혀지고 있으며, 사포닌을 비롯한 몇 가지 특정 생리활성 성분에 대해서는 생체 내에서의 작용기전도 보고된 바 있다.^{1,2)} 하지만 인삼은 만능지성 식물로서 해가림 시설 하에서만 재배가 가능하고 재배기간이 길어 대량으로 생산하는데 어려움이 크다.³⁾ 이러한 문제점을 해결하기 위하여 토양 미생물인 *Agrobacterium rhizogenes* 균주를 이용하여 인삼의 모상근을 유도함으로써 특

정 ginsenosides를 대량으로 생산하는 연구가 진행 중에 있다.⁴⁾ 모상근은 세포의 생장이 빠르며 유효성분도 다량 함유하고 있어서 특정 생리활성성분을 생산하는데 효과적이며,⁵⁾ 특히 생물반응기 (bioreactor)를 활용하여 이차 대사과정에서 생성되는 유용물질을 대량 생산할 수 있다. 일반적으로 β -glucan, glycoprotein, chitin, chitosan, jasmonic acid, methyl jasmonate, potassium phosphate 등 여러 elicitor들은 이차 대사산물의 생합성과 분비를 촉진시키는 작용을 하기 때문에 식물의 세포배양 시 이차 대사산물의 생산을 위한 촉진 도구로 사용되고 있다.⁶⁻⁸⁾ 실험에 사용된 석결명 (*Haliotidis Concha*)은 전복과 말전복 (*Haliotis gigantea*) 및 동속 근연동물의 패각을 건조 후 분쇄한 것으로 arginine, glycine, CaCO₃, conchiolin 등의 성분을 함유하고 있다.

본 연구에서는 고려인삼의 뿌리조직에서 균주를 통해 유도

*Corresponding author. E-mail: dcyang@khu.ac.kr
Phone: +82-31-201-2688, Fax: +82-31-202-2687

한 세포주 (KGHR-8)를 이용하여 석결명을 농도별로 처리한 후 인삼 모상근의 ginsenosides 함량과 성장변화를 분석함으로써 석결명이 인삼 모상근의 성장 및 사포닌 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

모상근 배양

고려인삼 3 년근 뿌리 절편에 *A. rhizogene* A₄T⁹ 균주를 공동 배양하여 모상근을 유도하였으며, 유도된 모상근의 근단 배양을 이용하여 우수한 세포주를 선발하였다.¹⁰ 본 연구에서는 다른 세포주에 비해 약 1.5배 이상의 높은 성장율을 보인 KGHR-8 line을 사용하였다. 모상근이 7-8 cm 정도 자라면 근단으로부터 2-3 cm 길이로 잘라내어 5-6개의 절편 조각을 1/2 MS 배지에 치상하여 진탕배양기 (100 rpm, 23°C)에서 암배양하였다. 배지는 1/2 MS¹¹ 배지와 3% sucrose를 첨가하고 pH 5.8로 조절하였으며, 항생제 및 호르몬은 전혀 첨가하지 않았다. 100 ml 삼각플라스크에 배지 40 ml씩 분주하여 121°C에서 20분간 고압멸균 한 후, 모상근을 치상하고 암 상태에서 진탕배양 하였으며, 3주 간격으로 계대배양 하였다.

석결명 처리

석결명 (*Haliotidis Concha*)은 우리나라의 서해안에 채취한 전복의 패각을 말려 분쇄한 가루를 사용하였다. 인삼 모상근의 성장과 사포닌 생합성 및 사포닌 조성에 미치는 석결명의 영향을 조사하고자, 1/2 MS 배지를 대조군으로 하고 석결명을 고체배양에서는 0, 5, 10, 50, 100, 300, 500, 1000 mg/L을 첨가하였고 액체배양에서는 0, 5, 10, 15, 20 mg/L을 첨가하였다. 인삼 모상근은 각 실험처리 구별 1 g의 모상근을 접종하여 1개월간 암상태에서 배양한 후 수확하여 생체 중량을 측정하고, 80°C 건조기에서 12시간 건조한 후 건조중량을 측정하였다. 또한 석결명의 농도를 10 mg/L로 고정하여 처리시기별로 처음부터 석결명을 첨가한 모상근과 7, 14, 21 일 배양한 후에 석결명을 첨가한 모상근으로 구분하여 30일간 배양하였다.

Ginsenosides의 함량

Ginsenosides 함량은 수포화 1-부탄올 추출법에 따라 추출¹² 하여 80°C 온수 욕조에서 80% 메탄올 30 ml로 3회 추출하여 건조시킨 후 메탄올 추출물을 얻었다. 그 후 에테르로 재추출하여 탈지시킨 다음 수포화 1-부탄올로 3회 추출하여 1-부탄올 층만을 감압하면서 농축하였다. 농축물을 High performance liquid chromatography (HPLC)용 메탄올 500

μl에 녹여 0.45 μm millipore syringe filter로 여과한 후 10 μl를 HPLC (Waters)에 주입하여 ginsenosides를 panaxatriol (PT)과 panaxadiol (PD)로 분리하고 정량하였다.

Ginsenosides 검정은 Refractive index (RI, Waters R401) 검출기로 검출 정량하였고, column은 Lichrosorb-NH2 column (Merck, 10 μm, 4 mm ID×250 mm)에 acetonitrile/H₂O/n-butanol (80:20:10) 용매를 사용하여 flow rate는 0.5 μl/min로 하여 분석하였다. Chromatogram의 각 peak는 사포닌 표준품과 retention time을 비교하여 동정하였고, 각 ginsenosides 함량은 표준품과 비교하여 peak height로 계산하였다.

RT-PCR 분석

기내 배양한 인삼 모상근을 재료로 하여 농도별로 석결명 처리한 후 각각의 total RNA를 추출하였고 (QIAGEN RNeasy Mini Kit), 사포닌 생합성 유전자의 발현분석을 위하여 RT-PCR 분석을 실시하였다. Oligo-dT (18mer)를 primer로 RNA를 역전사시켜 cDNA를 합성한 후, *P. ginseng* SS (squalene synthase, AB115496) primer로 5'-ATGGGAAGTTTGGGGCAATTCT-3'와 5'-GTTCTCACT-GTTTGTTCAGTAGGTT-3', SE (sq-ualene epoxidase, AB003516) primer로 5'-AGCAGCAGTTGACACAAAGG-3'와 5'-GCCACATTCGTTTTGGTGAAGG-3'를 사용하였으며 DDS (dammarenediol synthase, AB014057) primer는 5'-ATGTGGAAGCTGAAGGTTGCTCAAGGA-3'와 5'-TTAAA TTTTGAGCTGCTGGTGGTGTCTTAGGC-3'를 사용하였다. PNX (cycloartenol synthase, AB009029) primer는 5'-TCA TCAGATGGCTCATGGTACG-3'와 5'-TCTCCTCCTGTGG-GAAATCACC-3'를 사용하였고 PNY (β-amyrin synthase, AB009030) primer는 5'-TATCCTGGACACCGAAAGAAGG-3'와 5'-CTCCACTTATTTCTGTTGGGG-3'에 특이적인 primer를 이용하여 유전자의 ORF 부분을 증폭하였다 (TopTaqTM). PCR증폭은 96°C, 2분을 개시로 94°C 40초, 55°C 40초, 72°C 40초의 35cycles를 조건으로 하였다. 정량 비교를 위한 보정 실험군은 actin primer를 사용하였으며, actin primer는 5'-CGTGATCTTACAGATAGGTTGATGA-3' (forward)와 5'-AGAGAAGCTAAGATTGATCCTCC-3' (reverse)을 사용하였다.

결과 및 고찰

인삼 모상근 성장과 ginsenosides 함량증대에 미치는 석결명의 영향

인삼 모상근의 성장과 ginsenosides의 함량에 미치는 석결

명의 영향을 조사한 결과, 고체배양에서는 5, 10 mg/L에서 인삼 모상근의 생체중량이 대조군보다 15% 정도 증가하였고 50, 100 mg/L에서는 대조군보다 약간 낮은 생장을 보였다. 그러나 300 mg/L 이상 고농도에서는 대조군에 비해 65~81% 정도 생장이 낮았다 (Fig. 1). 액체배지에서는 10, 15, 20 mg/L에서 인삼 모상근의 생체중량이 대조군보다 2~29% 정도 증가 하였으며, 특히 10, 15 mg/L에서 크게 증가하였다. Total ginsenosides의 함량은 10, 15 mg/L 석결명 처리구에서 각각 8.8%, 11.8%의 증가를 보였다 (Table 1). 고체 및 액체배양에서 인삼 모상근의 성장량, ginsenosides 함량 및 균일성을 고려하면 석결명 10 mg/L 첨가가 효과적인 것으로 조사되었다.

칼슘은 세포 밖에 특별한 반응 신호를 받아들이는 세포내 연결요소로서 역할을 하며¹³⁾ 세포벽을 유지하여 저장력을 향상시키는 것과 밀접한 관계가 있고, 세포벽의 유지를 위해 세포내에 함유되어 있는 Ca²⁺함량이 매우 중요한 요인으로 작용한다.¹⁴⁾ 세포 밖 Ca²⁺는 flavanol과 tropane alkaloid 등과 같은 이차대사산물에 영향을 주는 것으로 밝혀졌다.^{15,16)} *Cupressus lusitanica*와 *Sanguinaria canadensis*의 세포배양에서 칼슘 길항제를 이용한 실험을 통해 외부 Ca²⁺유입이 β-thujaplicin과 benzophenanthridine alkaloid 생산을 촉진시키는 것으로 알려져 있으며,^{17,18)} 칼슘 첨가가 여귀 (*Persicaria hydropiper*)의 flavanol 축적과 커피의 alkaloid 생산을 촉진시킨다고 보고되었다.¹⁹⁾ 또한 낮은 칼슘농도는 *Datura stramonium* 모상근의 이차대사산물인 hyoscyamine 합성 능력을 감소시키고,¹⁵⁾ 최근에는 인삼의 외부 Ca²⁺신호에 의한 ginsenoside Rb₁ 생합성 과정이 밝혀진 바 있다.²⁰⁾

인삼 모상근 생장에 미치는 석결명 처리시기의 영향

이차대사산물의 생합성을 증진시키는 elicitor들은 자연상태에서 식물들이 화학적 또는 미생물의 공격에 반응하여 phytoalexin을 합성하도록 유도하며,²¹⁾ 이러한 elicitor들은 초기에 처리할 경우 세포의 성장을 억제하는 경향이 있다.^{22,23)} 따라서 초기 배양단계를 지나 생산단계에서 elicitor를 처리하는 것이 효과적일 수 있다. 대조군과 유의한 차이를 보인 석

결명 10 mg/L 처리구에 two step culture를 시도한 결과, 모상근의 생장은 접종과 동시에 10 mg/L 석결명을 첨가한 처리구에서는 대조군에 비해 생체중량 1.7% 증가하였으며, 7일 후 접종한 처리구는 생체중량 3.2%, 건조중량 2.4%, 14

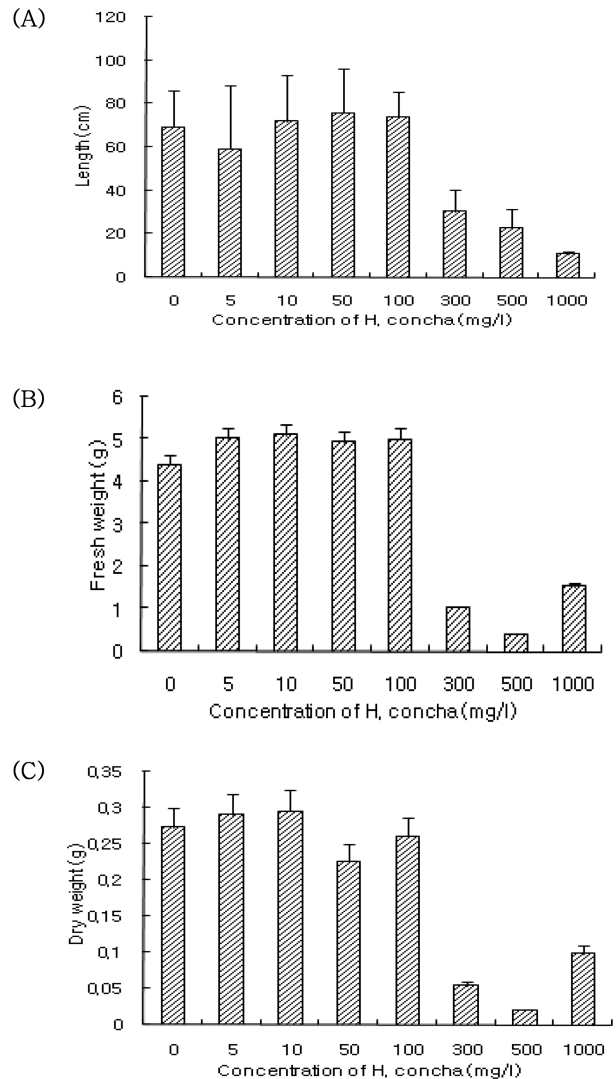


Fig. 1. The effect of Haliotidis Concha supplement on length (A), fresh weight (B), dry weight (C) in Korean ginseng hairy root.

Table 1. The effects of Haliotidis Concha concentration on growth of ginseng hairy root and saponin production

Con. of H. Concha (mg/L)	Growth		Ginsenoside content(mg/g dry wt)							
	Fresh wt. (g/flask)	Dry wt. (g/flask)	Rg1	Re	Rb1	Rc	Rb2	Rd	Rf	Total
0	5.76±0.81	0.27±0.016	0.591	0.144	0.49	0.263	0.227	0.307	0.08	2.022
5	5.88±1.44	0.25±0.059	0.527	0.13	0.558	0.269	0.236	0.321	0.081	2.041
10	7.17±0.62	0.31±0.030	0.631	0.159	0.562	0.274	0.244	0.33	0.082	2.2
15	7.48±1.17	0.31±0.037	0.592	0.138	0.672	0.28	0.251	0.329	0.081	2.262
20	7.12±1.20	0.30±0.047	0.585	0.142	0.552	0.277	0.232	0.335	0.083	2.123

일 후 집중한 처리구는 생체중량 22.9%, 건조중량 20.7%, 그리고 21일 후 집중한 처리구는 생체중량 21.9%, 건조중량 19.5%가 대조군에 비하여 증가하였다 (Table 2). 이러한 결과로 볼 때 석결명 처리에 의한 ginsenosides의 함량을 증대하기 위해서는 생장이 최적인 배지에서 인삼 모상근을 배양한 후 석결명을 처리하는 two step culture 방법으로 ginsenosides 생산성을 향상시킬 수 있다고 판단된다.

광조사 처리가 인삼 모상근의 생장에 미치는 효과

배양 시 광조사 처리에 의한 변화를 조사하기 위해서 인삼 모상근 1 g을 1/2 MS 40 ml 배지에서 치상하여 암실과 광조사 처리구로 나누어 30일간 배양하였다. 그 결과 대조군보다 석결명 처리구의 생체량이 증가하였고 건조중량은 대조군과 비교하여 암배양에서는 큰 차이를 보이지 않았으나, 광배양에서는 18% 정도 증가하였다 (Table 3).

Bioreactor를 이용한 대량배양

기내배양을 통하여 유용물질을 대량생산하기 위해서는 bioreactor를 이용한 배양방법이 유용하다. 인삼 모상근의 대량배양을 위해서 2 L bioreactor에 1/2 MS배지 1.5 L을 넣고 멸균처리한 후 2 g의 모상근을 배양기에 접종하여 membrane filter를 이용하여 무균 공기를 주입하면서 5주간 배양을 실시하였다. 그 결과 석결명 처리구가 생체중량은 18.4 g으로 대조군에 비해 5% 증가를 보였으며, ginsenosides 함량도 2.63 g으로 대조군에 비해서 증가하였다 (Fig. 2). 따라서 석결명을 추가로 첨가하여 배양을 하면 인삼 모상근의 생장량이 증가하며 ginsenosides의 생합성도 증가하는 elicitor로 작용함을 알 수 있었다.

Table 2. The effect of Haliotidis Concha on growth of ginseng hairy root according to the culture periods

H. Concha(10mg/L) supplement	Growth	
	Fresh wt. g/flask	Dry wt. g/flask
Control	8.69±0.14	0.41±0.01
0 day	8.84±0.59	0.405±0.005
7th day	8.975±0.095	0.42±0.02
14th day	10.68±1.11	0.495±0.045
21th day	10.60±0.245	0.49±0.01

Table 3. The effect of light irradiation on the growth of ginseng hairy root in 1/2 MS medium supplemented with 10 mg/L Haliotidis Concha

Culture condition	Fresh wt. g/flask	Dry wt. g/flask
Dark	4.246±1.13	0.184±0.005
Light	4.856±1.44	0.216±0.063
Control	3.757±0.86	0.183±0.05

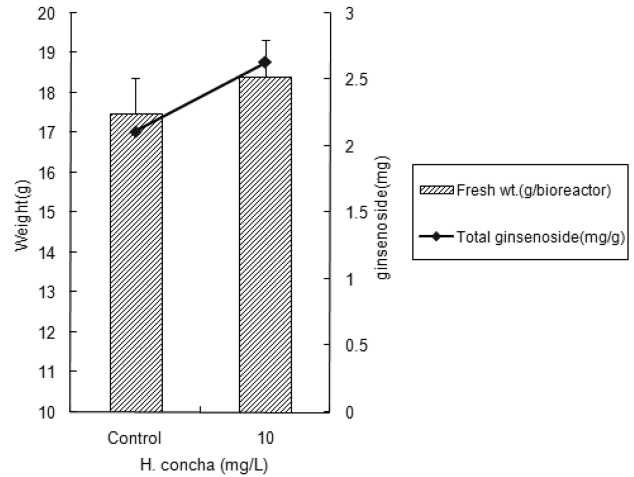


Fig. 2. The effect of Haliotidis Concha on the growth of ginseng hairy roots in bioreactor (2L).

사포닌 합성 유전자 발현

RT-PCR을 이용하여 인삼 모상근의 석결명 처리에 따른 SS, SE, DDS, PNX 및 PNY의 발현 양상을 확인하였다. SS, DDS의 전사량은 석결명 처리농도가 증가할수록 점점 증가하였다. SE, PNX의 전사량은 초기에 과량으로 증가하였다가 점차 감소하였으며, PNY의 전사량은 변화가 없었다 (Fig. 3). 이는 석결명 처리에 의해 total ginsenosides의 함량이 증가한 결과와 일맥상통하는 결과라 할 수 있으며, 전구물질

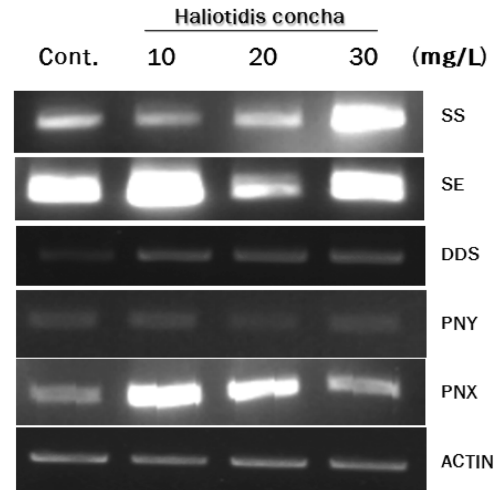


Fig. 3. Accumulation of mRNA involved in ginsenoside biosynthesis in hairy roots of *P. ginseng* cultured on medium with Haliotidis Concha. Expression of SS (squalene synthase), SE (squalene epoxidase), DDS (dammarenediol synthase), PNY (β -amyrin synthase), and PNX (cycloartenol synthase) genes after 30 days of 10, 20 and 30 mg/L Haliotidis Concha treatment by RT-PCR. The actin gene was used as the standard for RNA loading.

이 되는 squalene, 2,3-oxidosqualene, dammarediol 등의 생합성이 증가됨에 따라 total ginsenosides 함량 증가가 유도된 것으로 생각된다.

칼슘은 고등식물의 생존을 위한 필수원소로서 생체 내에서 다양한 기능을 가지며, 자연 상태에서는 많은 식물들이 생명의 기본과정에 요구되는 양보다 더 많은 Ca^{2+} 를 흡수하고,²⁴⁾ 토양의 칼슘 함량이 식물분포에 결정적인 영향을 주는 것으로 알려져 있다.²⁵⁾ 기내 배양 시 칼슘이 없는 배지에서 *Digitalis thapsi* 세포는 급격한 성장저하를 보였고,²⁶⁾ *Datura stramonium*의 모상근 배양에서 칼슘이온은 peroxidase의 활성을 제어하며 alkaloid hyosamine 합성에 영향을 미치는 것으로 알려졌다.¹⁵⁾ 또한 중국 삼칠삼 (*Panax notoginseng*)에 관한 보고에 의하면, 최적 농도에서의 칼슘이온 첨가는 세포 성장 증가를 가져왔고, 세포 내에 칼슘이온의 함량 증가가 ginsenoside Rd glucosyltransferase의 활성을 촉진시켜 Rd가 Rb_1 으로 전환되는 것으로 밝혀졌다.²⁰⁾ 본 실험에서는 석결명의 주성분인 탄산칼슘 ($CaCO_3$)이 이온화되어 생성된 칼슘이온이 인삼 모상근의 성장 촉진, 사포닌 생합성 유전자 발현 증가 및 total ginsenosides 함량의 증가를 유도한 것으로 추정된다.

최근 전복이나 굴 등의 패각의 발생량은 연간 약 360,000톤에 이며, 이중에서 종패 접합용으로 9.0%, 비료 및 공업용 원료로 약 1.0%가 재활용되고 나머지 90%는 공유수면 매립이나 (39%), 해안방치 (51%) 등으로 폐기되고 있는 실정이다.²⁷⁾ 이와 같이 막대한 양의 패각으로 인한 환경오염을 감소시키고 폐자원을 재활용하기 위한 목적으로 전복의 껍데기를 분쇄한 석결명을 elicitor로 이용하여 실험한 결과, 석결명은 인삼 모상근의 성장 및 특정유효성분을 증가시켰다. 추후 실용화 연구를 통해 인삼 경작지에 보급함으로써 유효성분이 증가된 고려인삼의 생산 증대와 환경보호에 이바지 할 것으로 판단된다.

요 약

인삼 모상근의 성장과 ginsenosides의 함량을 증가시키기 위하여 성장조절제가 첨가되지 않은 1/2 MS 배지에 석결명의 농도와 처리시기를 달리하여 인삼 모상근 KGHR-8 세포주를 30일간 배양하였다. 실험 결과, 고체배양에서 10 mg/L 석결명을 첨가하였을 때 성장량이 가장 높으며, 300 mg/L 이상 처리구는 대조군에 비해 생장이 낮았다. 액체배양시 10, 15 mg/L 석결명을 첨가하였을 때 성장량이 증가하였고 ginsenoside 함량은 10, 15 mg/L 처리구에서 각각 8.8%, 11.8% 증가를 보였다. 석결명의 최적 처리시점을 구명하고자

첨가시점을 달리하여 인삼 모상근의 성장량을 조사한 결과, 대조군보다 14일 후 10 mg/L 석결명을 접종한 처리구에서 생체중량 22.9%, 건조중량 20.7%으로 가장 높은 인삼 모상근의 성장 증가를 보였다. 또한, 광조사 효과를 조사하기 위해 암실과 광조사 처리구로 나누어 30일간 배양한 결과, 대조군과 비교하여 광조사 처리구에서는 18% 정도 성장량이 증가하였고 암실 처리구에서 거의 차이가 없었다. RT-PCR 결과에서는 10, 20 mg/L 석결명 처리구가 대조군에 비해 사포닌 생합성 관련 유전자인 squalene synthase, squalene epoxidase, dammarediol synthase, cycloartenol synthase 및 β -amyrin synthase의 전사량이 증가하였다. Bioreactor (2L)를 이용하여 인삼 모상근을 배양한 결과 처리구가 대조군에 비해 5% 증가를 보였으며, ginsenosides 함량도 2.63 g으로 대조군에 비해 증가하였다. 따라서 석결명은 이차 대사산물인 사포닌의 생산에 영향을 미치는 elicitor로서 역할을 하는 것으로 판단된다.

감사의 말씀

본 연구는 과기부 자생식물이용기술개발사업단 (code PF06222-00)과 경희대 생명공학원 BK21사업의 지원으로 수행된 연구결과로 연구비 지원에 감사드립니다.

인용문헌

1. Aoki M, Horiguchi I, Itho C, Yang G, Harada T, Yakuwa T. Development of an aseptic plant tissue culture vessel system enabling ventilation air composition control and addition of nutrient solutions. J Agri Met. 48: 29-37 (1992)
2. Choi KT, Park JC, Ahn IO. Saponin production in tissue culture of ginseng. Kor J Ginseng Sci. 14: 107-111 (1990)
3. Butenko RG, Grushvitsky RV, Stepyan LI. Organogenesis and embryogenesis in a tissue culture (*Panax ginseng*) and other *Panax* species. Bot Zh. 53: 906-911 (1968)
4. Chang WC, Hsing TI. Callus induction, growth and rhizogenesis from root of *Panax ginseng* on a defined medium. Nat Sci Coun. 6: 770-772 (1978)
5. Park H J, Oh SY, Choi KH, Meang SJ, Yoon ES, Yang DC. 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 (2000)
6. Mizukami H, Tabira Y, Ellis BE. Methyl jasmonate induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. Plant Cell Rep. 12: 706-709 (1993)
7. Staswick PE, Jasmonate, genes, and fragrant signals. Plant Physiol. 99: 804-807 (1992)

8. Yoo BS, Byun SY. Characterization of batch culture and effect of various elicitors on ginsenoside production in suspension cultures of *Panax ginseng* C.A. Mayer. Korean J Biotechnol Bioeng. 16: 620-625 (2001)
9. Jung G, Tepfer D. 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 (1987)
10. Yang DC, Kim YH, Yang DC, Min BH, Shin SL, Choi KT. Selection of active grow hairy root line in ginseng. Kor J Plant Tissue Culture 25: 525-530 (1998)
11. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Plant Physiol. 15: 473-497 (1962)
12. Ando T, Tanaka O, Shibata S. Chemical studies on the oriental plant drugs. Comparative studies on the saponins and sapogenins of ginseng and related crude drug. Syoyakugaku Zasshi 25: 28-32 (1971)
13. Sander D, Brownlee C, Hanper JF. Communicating with calcium. Plant Cell 11: 691-706 (1999)
14. Poovaiah BW. Role of calcium in prolonging storage life of fruits and vegetables. Food Technol. 40: 86-89 (1986)
15. Pinl MT, Palazn J, CusidRM, RibM. Influence of calcium ion concentration in the medium on tropane alkaloid accumulation in *Datura stramonium* hairy roots, Plant Sci. 141: 41-49 (1999)
16. Nakao M, Ono K, Takio S. The effect oh calcium on flavanol production in cell suspension cultures of polygonum hydro-piper. Plant Cell Rep. 18: 759-763 (1999)
17. Zhao J, Sakai K. Multiple signalling pathways mediate fungal elicitor-induced β -thujalicin biosynthesis in *Cupressus lusitanica* cell culture. J Exp Bot. 54: 647-656 (2003)
18. Mahady GB, Beecher CWW. Elicitor-stimulated benzophenanthridine alkaloid biosynthesis in bloodroot suspension cultures is mediated by calcium. Phytochemistry 37: 415-419 (1994)
19. Bramble, J. L., Graves, D., Calcium and phosphate effects on growth and alkaloid production in *Coffea arabica* : experimental results and mathematical model. Biotechnol Bioeng. 37: 859-868 (1991)
20. Yue, CJ, Zhong JJ. Impact of external calcium and calcium sensors on ginsenoside Rb1 biosynthesis by *Panax notoginseng* cell. Wiley Periodicals. 89: 444-452 (2004)
21. Hans DV, Masfield JW, Banley JA, Farmer EF. Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus phytoantipicins. The Plant Cell 6: 1191-1192 (1994)
22. Oh SY, Park HJ, Min BH, Yang KJ, Yang DC. The effects of Auxin and casein hydrolysate on the growth of ginseng hairy root. J Ginseng Res. 24: 123-127 (2000a)
23. Oh SY, Park HJ, Min BH, Yang KJ, Yang DC. The Production of ginsenosides from ginseng hairy root by treatment of the chitin and chitosan. J Ginseng Res. 24: 68-73 (2000b)
24. Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press London. p. 889 (1995)
25. Gigon A. A hierarchic approach in causal ecosystem analysis. The calcifuge-calcicole problem in alpine grasslands. Ecological Studies 61: 228-244 (1987)
26. Margarita C, Margarita M, Jorge FT. Purification, C., Calcium restriction induces cardenolide accumulation in cell suspension cultures of *Digitalis thapsi* L. Plant Cell Rep. 14: 786-789 (1991)
27. Lee HS. A study on Calcination Characteristics of *Corbicula japonica* and *Ostrea virginica*. Kor J Env Hlth. 30: 427-431 (2004)