

가시오갈피나무 不定根 培養에서 不定根의 生長과 Eleutheroside類의 生産에 미치는 Salicylic Acid 處理의 영향

安珍權* · 李胃煥 · 朴應峻
국립산림과학원 산림자원육성부

Effect of Salicylic Acid on the Root Growth and the Eleutheroside Accumulation in the Adventitious Root Culture of *Eleutherococcus senticosus*

Jin-Kwon Ahn*, Wi Young Lee and Eung-Jun Park

Department of Forest Resources Utilization, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-847 Korea

요 약: 생물반응기를 이용한 가시오갈피 부정근 배양시에 salicylic acid를 농도별(0, 5, 10, 20, 40, 80 μM)로 처리하여 부정근의 성장과 eleutheroside류 생산과의 관계를 조사하였다. Salicylic acid 처리농도별 부정근의 생장은 무처리구에서 4.4 g dry weight(DW)/L로 가장 높았으며, salicylic acid 농도가 증가할수록 부정근 생장은 감소하였다. 그러나 eleutheroside B, E 및 E₁의 함량은 대체로 salicylic acid 농도가 높을수록 증가하여 80 μM 처리구에서 각각 179.5, 1169.9 및 45.4 μg/g DW로 생산량이 가장 많았다. 배지 1 L당 eleutheroside류의 총생산량은 무처리구에서 4975.8 μg/L를 생산하여 가장 우수하였다. 80 μM의 salicylic acid 처리 후 15일간 eleutheroside류의 함량을 조사한 결과 eleutheroside B는 salicylic acid처리 후 9일째, eleutheroside E 및 E₁은 처리 후 6일째 각각 가장 많은 생산량을 보여 주었다.

Abstract: This study was carried out to investigate the dose-dependent effect of salicylic acid on both the adventitious root growth and the accumulation of various eleutherosides in the bioreactor culture of *Eleutherococcus senticosus*. The highest biomass production (5.4 g DW/L) was observed in the absence of salicylic acid, while the root growth was significantly decreased by increasing the concentration of salicylic acid. Salicylic acid stimulated the production of both eleutheroside B, E and E₁. The highest levels of eleutheroside B (179.5 μg/g DW), E (1169.9 μg/g DW) and E₁ (45.4 μg/g DW) were obtained by the addition of 80 μM of salicylic acid. The maximum eleutheroside production was 4975.8 μg/L when salicylic acid was not added. In addition, when the adventitious roots were cultured in the basal medium supplemented with 80 μM of salicylic acid, the highest levels of eleutheroside B was observed at the 9th day, while eleutheroside E and E₁ were observed at the 6th day, respectively.

Key words : *Eleutherococcus senticosus*, eleutheroside B, eleutheroside E, eleutheroside E₁, adventitious root culture, bioreactor

서 론

약효가 우수하여 시베리아 인삼으로도 불리는 가시오갈피나무(*Eleutherococcus senticosus* Maxim)는 러시아, 중국 북부(만주), 한국, 일본 등지에 자생하는 두릅나무과 낙엽활엽관목으로 주로 자양강장, 고혈압, 신경통, 당뇨, 항암작용 및 건강상태 평형유지 등에 활용된다(李時珍,

1974; 東醫寶鑑, 1959; Slacanin *et al.*, 1991). 가시오갈피의 뿌리, 줄기 등에는 lignan류의 sesamin, eleutheroside B, E, E₁, coumarin류의 isofraxidin, eleutheroside B₁, steroid 및 triterpene류의 β-sitosterol, friedelin, saponin류의 eleutheroside A, I, K, L, M, ciwujianoside A₁, A₂, B, C₁, C₂, C₃, C₄, D₁, D₂, E 등 여러 종류의 약용성분이 함유되어 있다(최영해와 김진웅, 2002; Tang, 1992). 특히 lignan계 성분인 eleutheroside B와 E성분은 가장 강력한 생리활성 효과를 갖는 것으로 알려져 있으며, 가시오갈피

*Corresponding author
E-mail: AHNJK@forest.go.kr

배당체 성분의 약 80%를 차지하며 뿌리와 줄기에 함량이 높다(최영해와 김진웅, 2002; Kang *et al.*, 2001). 이 중 eleutheroside E는 흥분완화, 스트레스 억제 및 면역활성에 매우 뛰어난 물질로 보고 되고 있다(Slacanin *et al.*, 1991).

유용 약용식물로부터 모상근이나 부정근을 유도하여 생물반응기 배양을 통한 biomass 대량생산이 인삼(Yu *et al.*, 2002), *Hypericum perforatum*(Zobayed and Saxena, 2003), *Beta vulgaris*(Suresh *et al.*, 2004), 가시오갈피 및 섬오갈피(안진권 등, 2006; 2007; 2010) 등에서 실시되었다. 부정근 배양은 생산비 절감, 연속적인 증식과 안정적인 공급이 가능하고 현탁배양 세포보다 유전적, 생화학적으로 안정적이므로 이차대사산물 생산에 적합한 재료(Bourgau *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2002; Lazaridou *et al.*, 2002; Paek and Chakravarthy, 2003)로 인식되었고, 대용량 생물반응기의 대량배양에 의한 산업화 가능성이 제시되었다(Seon *et al.*, 1999).

또한 배양체로부터 목적하는 이차대사산물의 생산량을 높이기 위하여 배지내 elicitor처리(안진권 등, 2006, 2010; Kang *et al.*, 2004; Suresh *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2002), 무기염류(안진권 등, 2007; Liu and Zhong 1997, 1998), 배양방법(Zhong *et al.*, 1999) 및 당 농도(Akalezi *et al.*, 1999) 등을 조절, 처리하는 연구가 진행되었다.

식물에 함유된 대부분의 이차대사산물은 세포가 영양의 고갈이나 환경의 변화 및 다른 미생물에 의한 오염과 같은 스트레스를 받을 때 축적되기 시작하는 것으로 알려져 있다(Bourgau *et al.*, 2001). 식물체배양에 있어서 이차대사산물의 수율을 향상시키기 위한 방안으로 외부인자를 배양액에 첨가함으로써 식물배양체의 대사과정을 변화시키는 것이 있다. Elicitor는 식물배양체에 첨가함으로써 다양한 스트레스를 주어 이차대사산물의 축적을 변화시키는 외부 자극 물질 (pathogen) 유래의 화합물이다. 외부 자극 물질에 의한 외부 신호가 gene expression, cell division, cell suicide 등과 같은 세포내 반응으로 전환되는 과정에 관여하는 물질을 signal transducer라 한다. 이러한 물질 중에서 salicylic acid, jasmonic acid 및 methyl jasmonate는 식물체 또는 식물배양체에서 이차대사산물의 생합성을 유도하는 신호전달물질로 알려져 있다(Chen and Chen, 1999; Creelman and Mullet, 1997; Gundlach *et al.*, 1992). 특히 *Scopolia parviflora*의 부정근 배양시 배지내에 salicylic acid를 처리한 결과 부정근의 생장과 알칼로이드의 일군인 scopolamine이 증가하였으나, salicylic acid 처리농도(0-2.0 mM) 및 배양시간(0-72시간)에 따라 큰 차이를 보여주었다.(Kang *et al.* 2004). 또한 Oleanolic acid 생산을 증대시키기 위하여 백화사설초(*Oldenlandia diffusa*)의 세포배양 6일째 elicitor류를 첨가하여 10일째 수확한 결과 0.5 mM의 salicylic acid 처리가 무처리에 비해

1.74배로 증가하였다(이용일과 김동일, 2004). 그러나 고려인삼세포 현탁배양에서 salicylic acid 50 μ M처리에서 ginsenoside 생산량이 무처리에 비해 감소하여(유병삼과 변상요, 2001), 식물부정근 및 세포배양시 salicylic acid 처리가 목적으로 하는 유용물질의 종류와 배양조건에 따라 차이가 있음을 확인 할 수 있었다.

현재까지 가시오갈피나무의 기내 배양 부정근 생육과 이차대사산물 생산과의 관계에 관한 연구는 거의 보고된 바가 없다. 이에 본 연구에서는 생물반응기를 이용한 가시오갈피의 부정근 배양시 elicitor인 salicylic acid 처리 농도가 부정근의 생육 및 유용 이차대사산물인 eleutheroside B, E 및 E₁의 함량에 미치는 영향을 구명하여 가시오갈피 부정근 배양체의 대량생산과 이차대사산물 생산을 위한 기초 자료로 이용하고자 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 식물재료

강원도 오대산에 자생하는 가시오갈피나무에서 종자를 채취하여 과육을 깨끗이 제거하고 충분히 씻은 모래(중사)에 섞어 15°C에서 2.5개월 습윤저장한 것을 이용하였다. 종자소독은 70%에탄올에 30초간 침지시킨 후 멸균수로 3회 세척하고 5% NaOCl로 20분 표면 살균하고 멸균수로 3회 세척하였다. 멸균된 종자로부터 성숙배를 적출하여 1.0 mg/L GA₃(Gibberellic acid)가 첨가된 MS(Murashige and Skoog, 1962) 또는 1/2 MS배지에 치상하여 식물체를 유도하였다. 유도된 식물체는 다시 생장조절제가 제거된 1/2 MS 또는 1/3 MS 고체배지에 옮겨 식물체로 발달시켰다. 2개월 후 종자배 유래 식물체로부터 뿌리를 절단하여 1.5-2.0 cm 길이로 자른 후 3.0 mg/L indolebutyric acid (IBA)와 60 g/L sucrose가 첨가된 1/2 MS 액체배지에 접종하고 110 rpm 속도로 암배양하였다. 부정근은 4주 간격으로 동종의 신선한 배지로 계대배양하여 생물반응기 배양을 위한 재료로 사용하였다.

2. 생물반응기 배양과 salicylic acid 처리

생물반응기 배양은 5 L 풍선형 공기부양식 생물반응기(Son *et al.*, 2000)에 2 L의 액체배지를 첨가하고 1.5 cm 길이로 절단한 부정근 10.0 g FW을 각각 접종하였다. 이때 생물반응기내 공기공급량은 flowmeter(Dwyer Inc., IN, USA)로 0.1 vvm 되게 조절하였고, 배양은 21.5°C가 유지되는 배양실에서 9주간 암배양하였다. 배지는 절편체에서 부정근 원기가 형성되어 왕성하게 성장하는 5주 후에 salicylic acid(Sigma사, C₇H₆O₃, M.W.=138.1)의 처리농도(0, 5, 10, 20, 40, 80 μ M)에 따른 부정근 증식과 eleutheroside 류의 생산 특성을 구명하기 위해 동종의 신선한 배지를 각

각 2 L씩 더 첨가하여 총 배지량이 4 L되게 하여 4주 동안 더 배양하여 수확하였다. 즉 시료 접종시 elicitor인 salicylic acid 을 처리할 경우에 부정근의 성장을 저해(유병삼과 변상요, 2001; Kang *et al.*, 2004) 하기 때문에 salicylic acid가 첨가되지 않은 배양배지 2 L에서 5주 동안 부정근을 왕성하게 성장시킨 후에, eleutheroside류의 증진을 위하여 전체배지 4 L 가 salicylic acid의 처리농도가 0, 5, 10, 20, 40, 80 μM 이 되도록 조제한 배지 2 L를 더 첨가하여 4주 배양하였다.

배양 9주 후에 수확하여 흐르는 수돗물에 3회에 걸쳐 깨끗이 세척한 후 물기를 제거하기 위하여 1시간 정도 음건 후 생중량을 측정 한 다음 동결건조, 분쇄하여 eleutheroside B, E 및 E₁ 분석을 위한 시료로 사용하였다. 그리고 성장율(growth ratio)은 수확된 생중량 무게에 접종시료의 무게 10.0 g FW로 나누어 산출하였다.

또한 5 L생물반응기에 배지 2 L, 시료 10 g을 접종하여 5주 배양 후 배지 2 L에 salicylic acid를 80 μM 농도로 첨가하여 배양시기별로 수확(salicylic acid처리 후 0, 3, 6, 9, 12, 15일)하여 분석하였다. 배지, 배양조건 및 분석방법은 상기와 동일하게 실시하였으며 salicylic acid 처리 후 eleutheroside류의 생산량이 가장 많은 시기를 구명코자 하였다.

3. Eleutheroside류 분석

Eleutheroside류의 추출과 분석은 안진권 등(2000)의 방법에 따라 실시하였다. Eleutheroside류 분획은 Spherisorb ODS column(4.6 mm 250 mm, Jasco, GroB-Umstadt, Germany)에 UV 검출기(UV 3000 HR, TSP, USA)가 장착된 Thermo Separation Products HPLC system(TSP, CA, USA)을 이용하여 분석하였다. 이동상은 물과 acetonitrile을 초기 10, 30, 40, 45, 50분에 각각 95:5, 90:10, 60:40, 50:50, 45:55과 95:5의 비율로, 0.6 mL/min의 속도로 흘려보냈다.

표준 물질로 사용한 eleutheroside B(syringin), eleutheroside E(lilriodendrin)와 eleutheroside E₁ {(+)-syringaresinol-O- β -D-glucoside}는 Chroma Dex TM(USA)과 Sigma(USA)로부터 구입하여 부정근에서 추출한 이차대사산물과 비교하였고, 220 nm에서 검출하였다.

결과 및 고찰

가시오갈피 부정근의 성장을 왕성하게 유지하기 위하여 배양에 적합한 TDZ 0.01 mg/L에 NAA 3.0 mg/L가 첨가된 1/3 MS 배지 2 L에 1.0 cm길이의 절단한 부정근 10.0 g을 5 L 공기부양식 생물반응기에 접종하여 5주 동안 암배양하였다. 배양 10일 후 뿌리 표면에 형성된 부정근 원기를 관찰할 수 있었고, 3주가 지나면서 부정근은 길이와 부피 성장을 하였다(Figure 1). 부정근의 길이가 3.0-5.0 cm정도로 성장한 배양 6주째 2 L의 배지에 salicylic acid를 농도별(0, 5, 10, 20, 40, 80 μM)로 처리하였다. Salicylic acid를 첨가한 후 4주 동안 배양, 수확하여 salicylic acid 농도 처리별로 부정근의 성장과 eleutheroside류의 생산량을 조사하였다. 부정근의 성장은 salicylic acid가 첨가되지 않은 무처리에서 생중량 130.6 g으로 접종량에 비하여 13.1배의 가장 좋은 성장을 보인 반면, salicylic acid의 처리농도가 가장 높은 80 μM 처리구에서는 생중량 68.2 g으로 접종량의 6.8배로 가장 저조한 성장을 보여 주었다. 건중량의 생산도 salicylic acid가 처리되지 않은 배양에서 17.7 g을 보여 처리농도가 가장 높은 80 μM 처리구의 10.5 g에 비하여 1.7 배의 생산증대가 있었다(Table 1). 즉 salicylic acid의 처리농도가 높을수록 부정근의 성장은 저조하였는데, 이러한 현상은 Methyl jasmonate 처리에 의한 인삼 부정근 배양과 동일한 결과(임순 등, 2005)로 salicylic acid를 가시오갈피 부정근 배양에 처리하였을 경우 성장을 지연시키는 것으로 나타났다.

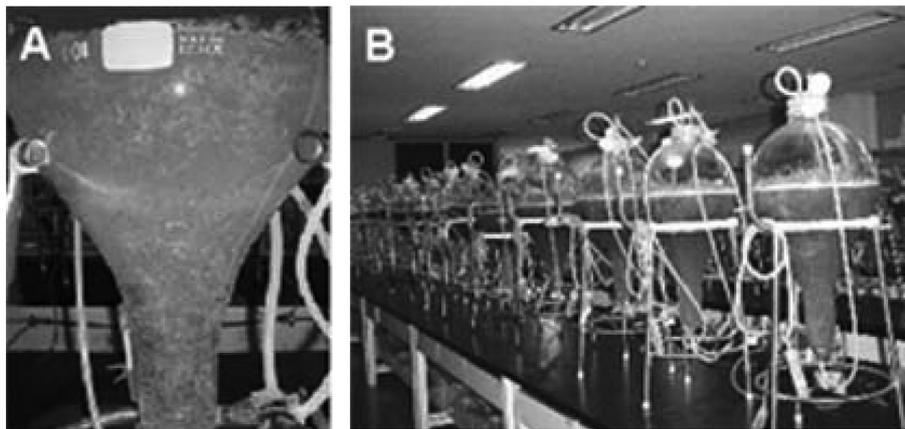


Figure 1. Balloon type air-lift bioreactor culture of the *Eleutherococcus senticosus* adventitious roots. Growth of *E. senticosus* adventitious roots via bioreactor culture for 10 days (A) and 9 weeks (B).

Table 1. Effect of salicylic acid on the growth of *Eleutherococcus senticosus* adventitious roots after 9 weeks.

Salicylic acid (μM)	Biomass		Growth ratio
	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	
0	130.6	17.7	13.1
5	125.5	16.4	12.6
10	95.7	13.7	9.6
20	83.8	11.2	8.4
40	79.9	10.8	8.0
80	68.2	10.5	6.8

Table 2. Effect of salicylic acid on the production of eleutherosides after 9 weeks.

Salicylic acid (μM)	Eleutherosides content (μg/g DW)		
	B	E	E ₁
0	154.7	947.1	22.7
5	132.5	935.2	21.5
10	132.9	1144.6	30.4
20	142.3	1041.8	35.0
40	168.5	1078.4	38.8
80	179.5	1169.9	45.4

Salicylic acid 처리농도에 따른 이차대사산물 생산을 보면 eleutheroside B의 함량은 salicylic acid 처리농도가 높아짐에 따라 점차적으로 높아져 5 μM 처리구에 비하여 80 μM 처리구가 최고 1.4 배의 함유량을 보여주었다(Table 2). 즉 eleutheroside B의 경우 salicylic acid를 80 및 40 μM 처리하였을 경우 각각 179.5, 168.5 g/g DW을 생산하여 5 μM 처리구의 132.5 g/g DW비하여 1.3-1.4배의 생산량을 보여주었다.

Eleutheroside E와 E₁도 비슷한 결과로 80 μM처리에서 가장 함유량이 높았으며, salicylic acid농도가 낮아질수록 대체로 함유량이 낮아지는 현상을 보여주었다. 즉 salicylic acid농도가 80 μM처리에서 함유량이 각각 1169.9, 45.4 g/g DW인데 비하여 무처리에서는 각각 947.1, 22.7 g/g DW가 생산되었다.

그러나 *Scopolia parviflora*의 부정근 배양시 배지내에 salicylic acid를 처리한 결과 부정근의 성장과 알칼로이드의 일군인 scopolamine이 동시에 증가하여 가시오갈피 부정근 배양과 차이가 있었다(Kang *et al.*, 2004). 또한 인삼 부정근 배양에서 ginsenoside 함량을 증가시킨 것은 jasmonic acid가 protopanaxadiol ginsenoside의 생합성에 관여하는 효소의 활성을 촉진시킨 것(Yu *et al.*, 2002)과 기내배양에서 이차대사산물의 집적이 종종 식물의 성장과 상반된 결과를 보여주는데 이는 식물의 일차대사산물이 세포증식과 이차대사 생합성에 동시에 이용되어 경합에 의해 이차대사산물의 식물생장이 증가하면 물질생산량이 감소하는 결과를 초래하기도 한다(Bourgau *et al.*, 2001).

Table 3. Effect of salicylic acid on total eleutheroside content after 9 weeks of bioreactor culture.

Salicylic acid (μM)	Eleutherosides content (μg/L)			
	B	E	E ₁	Total
0	684.5	4190.9	100.4	4975.8
5	543.3	3834.3	88.2	4465.8
10	455.2	3920.3	104.1	4479.6
20	398.4	2917.0	98.0	3413.4
40	455.0	2911.7	104.8	3471.5
80	471.2	3071.0	119.2	3661.4

가시오갈피 부정근에 salicylic acid를 처리했을 때 농도가 높을수록 일차근의 생장이 느리고 이차 부정근의 발생율이 보다 낮아지는 성장저해 현상을 발견할 수 있었다. 목적으로 하는 유용이차대사산물의 전체 생산량을 최대한으로 하기 위해서는 부정근의 성장과 함께 부정근에 함유된 이차대사산물의 양을 고려해야 한다. Table 3은 salicylic acid처리 농도별로 수확된 부정근에 대하여 배지 1 L당 함유된 eleutheroside류의 생산량을 알아보기 위하여 수확된 biomass 건중량(Table 1)에 eleutheroside류의 생산량(Table 2)을 곱하여 계산한 결과이다.

Eleutheroside B의 함량은 무처리구에서 가장 높은 1 L당 684.5 g을 생산하여 5 L 생물반응기(4 L working volume)의 경우 총 2738.0 g의 eleutheroside B 생산이 가능하였다. 비슷하게 eleutheroside E 함량도 무처리구에서 1 L당 4190.9 g으로 5 L 생물반응기(4 L working volume)에서 총 16763.6 g의 eleutheroside E 생산이 가능하였다. 그러나 eleutheroside E₁ 함량은 salicylic acid 80 μM첨가된 처리구에서 가장 높은 119.2 g/L을 생산하였다. 또한 eleutheroside B, E 및 E₁의 전체생산량은 무처리구에서 1 L당 4975.8 g을 생산하여 가장 우수하여 salicylic acid처리가 eleutheroside류의 증진에 큰 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다(Table 3). 이러한 현상은 고려인삼세포 현탁 배양에서 salicylic acid 50 μM처리에서 Ginsenoside 생산량이 control에 비해 감소한 것(유병삼과 변상요, 2001)과 비슷한 결과임을 확인 할 수 있었다. 또한 이차대사산물의 생산증진을 위하여 elicitor를 처리할 경우 처리농도에 따라 부정근의 성장과 이차대사산물의 생산량을 동시에 고려해야만 최대의 생산을 기대할 수 있을 것이다. Figure 2는 가시오갈피 부정근 배양시에 salicylic acid를 80 μM 농도로 처리하여 배양기간별 eleutheroside류의 생산량을 나타낸 것이다.

Eleutheroside B는 salicylic acid처리 후 점진적으로 생산량이 감소 및 증가하는 양상을 보이다가 9일째 최대의 생산량을 나타낸 후 다시 근소한 생산량 감소를 보여주었다. 즉 eleutheroside B는 salicylic acid처리 직후부터 감소하여 3일 째에 149.0 g/g DW으로 최소의 생산량을 보였고

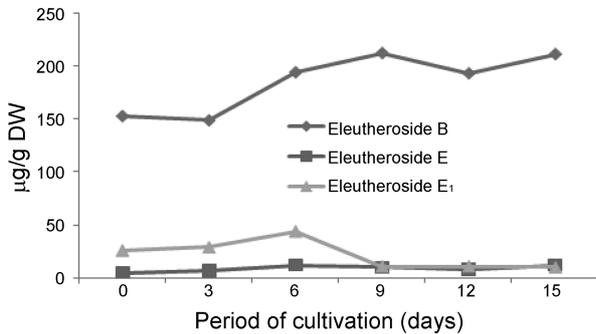


Figure 2. Time-course accumulation of eleutheroside during 15 days of salicylic acid treatment (80 µM) in the 5 L air-lift bioreactor. Adventitious roots were grown for 4 weeks before the treatment of salicylic acid.

9일째에 212.2 g/g DW으로 최대의 생산량을 보여주었다, eleutheroside E은 처리 6일째에 12.1 g/g DW의 최대생산량을 나타낸 후 감소하였다. 또한 eleutheroside E₁는 salicylic acid처리 후 6일 째에 44.0 g/g DW로 가장 우수하였고 배양기간이 짧아지거나 길어질수록 eleutheroside E₁의 함유량은 감소하였다.

*Scopolia parviflora*의 부정근 배양시 배지내에 salicylic acid를 처리한 결과 부정근의 성장과 알칼로이드의 일군인 scopolamine이 증가하였으나, salicylic acid 처리농도(0-2.0 mM) 및 배양시간(0-72시간)에 따라 큰 차이를 보여주었다(Kang *et al.*, 2004). 또한 Oleanolic acid 생산을 증대시키기 위하여 백화사설초(*Oldenlandia diffusa*)의 세포 배양 6일째 Elicitor류를 첨가하여 10일째 수확한 결과 0.5 mM의 salicylic acid 처리가 control에 비해 1.74배로 증가하였다(이용일과 김동일, 2004). Yu 등(2002)도 인삼 부정근 배양시의 jasmonic acid처리(2.0 mg/L)에서 수확된 부정근의 ginsenoside류 분석에서 Rb그룹은 배양기간이 경과할수록 생산량이 증가하였으나 Rg그룹은 감소한 것으로 나타나 이차대사산물의 종류에 따라 다른 반응을 보였다. 또한 가시오갈피 부정근 배양에서 질소원인 NO₃⁻와 NH₄⁺의 비율 및 농도를 달리한 처리에서 부정근 증식에는 50 mM NO₃⁻와 10 mM NH₄⁺농도비율로 첨가된 처리구가 가장 생장이 좋았으나 NH₄⁺는 첨가농도비율이 높아질수록 부정근의 증식은 감소하였다. Eleutheroside B와 E₁은 총 질소량이 30 mM 처리에서 가장 많은 함유량을 보였으나 eleutheroside E는 총 질소농도가 높아질수록 함유량이 높아졌다고 보고하였다(안진권 등, 2007). 이는 이차대사산물 생산을 목적으로 하는 부정근 배양시 생장에 가장 적합한 최적배지를 선별한 다음 elicitor를 이용한 물질합량 증진과 목적으로 하는 이차대사산물이 가장 많이 생산되는 배양기간에 수확이 이루어져야만 최종적으로 더 많은 양의 이차대사산물을 생산할 수 있을 것으로 사료된다.

본 결과는 생물반응기 배양에서 유용이차대사산물인

eleutheroside류의 생산성을 높이기 위하여 elicitor로서 salicylic acid를 농도별로 처리하여 부정근의 성장과 수확한 부정근내 함유된 eleutheroside류를 분석함으로써 최대 생산에 적합한 salicylic acid 처리농도의 수준과 목적으로 하는 이차대사산물의 최대 수확시기를 구명하였다는데 의미가 있다고 하겠다.

인용문헌

1. 李時珍. 本草綱目. 1974. 高文社. pp. 1204.
2. 東醫寶鑑. 1959. 東方書店. pp. 740.
3. 안진권, 이위영, 오성진, 박유현, 허성두, 최명석. 2000. 가시오갈피나무의 eleutheroside E 및 chlorogenic acid 성분함량. 한국임학회지 89(2): 216-222.
4. 안진권, 이위영, 박영기. 2007. 가시오갈피의 부정근 배양시 부정근의 생육과 eleutheroside류의 함량에 미치는 NO₃⁻와 NH₄⁺비율 및 농도의 영향. 한국임학회지 96(1): 48-53.
5. 안진권, 이위영, 박용준. 2010. 가시오갈피나무 부정근 배양에서 부정근의 생육과 eleutheroside류의 생산에 미치는 methyl jasmonate 처리의 영향. 한국임학회지 99(3): 331-336.
6. 안진권, 박소영, 이위영, 박영기. 2006. 섬오갈피 부정근 배양에서 부정근의 성장과 eleutheroside류의 생산에 미치는 jasmonic acid 처리의 영향. 한국임학회지 95(1): 32-37.
7. 유병산, 변상요. 2001. 고려인삼세포 현탁배양에서 회분 배양 특성 및 Ginsenoside 생산에 대한 다양한 elicitor의 영향. 한국생물공학회지 16(6): 620-625.
8. 이용일, 김동일. 2004. 백화사설초의 현탁세포배양에서 Elicitation에 의한 Oleanolic acid 생산성 증대. 한국생물공학회지 19(6): 471-477.
9. 임 순, 배기화, 신치균, 김윤명, 김운수, 2005, Methyl jasmonate 처리에 의한 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer) 부정근의 이차대사산물 및 항산화활성 증가. 식물생명공학회지 32(3): 225-231.
10. 최영해, 김진웅. 2002. HPLC-ESI/MS를 이용한 eleutheroside B와 E의 정량. 생약학회지 33(2): 88-91.
11. Akalezi, C.O., Liu, S., Li, Q.S., Yu, J.T. and Zhong, J.J. 1999. Combined effects of initial sucrose concentration and inoculum size on cell growth and ginseng saponin production by suspension cultures of *Panax ginseng*. Process Biochemistry 34: 639-642.
12. Bourgaud, F., A. Grivot., S. Milesi and E. Gontier. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science 161: 839-851.
13. Chen, H. and Chen, H. 1999. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on cell growth and cryptotanshinone formation in Ti transformed *Salvia miltiorrhiza* cell suspension cultures. Biotechnology Letter 21: 803-807.
14. Creelman, R.A and Mullet, J.E. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. Annual Review. Plant Physiol-

- ogy and Plant Molecular Biology 48: 355-381.
15. Gundlach, H., Muller, M., Kutchan, T. and Zenk, M. 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. Proceeding of National Academy of Science U.S.A. 89: 2389-2393.
 16. Kang, S.M., Jung, H.Y., Kang, Y.M., Yun, D.J., Bahk, J.D., Yang, J.K. and Choi, M.S. 2004. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. Plant Science 166: 745-751.
 17. Kang, J.S., Linh, P.T., Cai, X.F., Kim, H.S., Lee, J.J. and Kim, Y.H. 2001. Quantitative determination of eleutheroside B and E from *Acanthopanax* species by high performance liquid chromatography. Archives pharmacol research 24: 407-411.
 18. Lazaridou, A., Roukas, T., Biliaderis, C.G. and Vaikousi, H. 2002. Characterization of pullulan produced from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank reactor under varying agitation. Enzyme and Microbial Technology 31: 122-132.
 19. Liu, S. and Zhong, J.J. 1997. Simultaneous production of ginseng saponin and polysaccharide by suspension cultures of *Panax ginseng* Nitrogen effects. Enzyme and Microbial Technology 21: 518-524.
 20. Liu, S. and Zhong, J.J. 1998. Phosphate effect on production of ginseng saponin and polysaccharide by cell suspension cultures of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium*. Process Biochemistry 33: 69-74.
 21. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
 22. Paek, K.Y. and Chakravarthy, D. 2003. Micropropagation of woody plants using bioreactor, in: Jain, S.M and K. Ishii (Eds). Micropropagation of woody trees and fruits. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht pp. 735-755.
 23. Seon, J.H., Yu, K.W., Cui, Y.Y., Kim, M.H., Lee, S.J., Son, S.H. and Paek, K.Y. 1999. Application of bioreactor for the production of saponin by adventitious roots cultures in *Panax ginseng*, in: Altman A (Ed), Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century, Kluwer Academic Publishers, Netherlands pp. 329-332.
 24. Slacanin, I., Marston, A. and Hostettmann, K. 1991. The isolation of *Eleutherococcus senticosus* constituents by centrifugal partition chromatography and their quantitative determination by high performance liquid chromatography. Phytochemistry Analysis 2: 137-142.
 25. Son, S.H., Choi, S.M., Lee, Y.H., Choi, K.B., Yun, S.R., Kim, J.K., Park, H.J., Kwon, O.W., Noh, E.W., Seon, J.H. and Paek, K.Y. 2000. Large-scale growth and taxane production in cell cultures of *Taxus cuspidata* (Japanese yew) using a novel bioreactor. Plant Cell Reports 19: 628-633.
 26. Suresh, B., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N. and Ravishankar, G.A. 2004. Polyamine and methyl jasmonate-influenced enhancement of betalaine production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* grown in a bubble column reactor and studies on efflux of pigments. Process Biochemistry 39: 2091-2096.
 27. Tang, W. 1992. Chinese drugs of plant origin, Springer-Verlag, Heidelberg pp. 1-12.
 28. Yu, K.W., Gao, W., Hahn, E.J. and Paek, K.Y. 2002. Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of *Panax ginseng* C.A. Meyer. Biochemical Engineering Journal 11: 211-215.
 29. Zhong, J.J., Chen, F. and Hu, W.W. 1999. High density cultivation of *Panax notoginseng* cells in stirred bioreactors for the production of ginseng biomass and ginseng saponin. Process Biochemistry 35: 491-496.
 30. Zobayed, S.M.A. and Saxena, P.K. 2003. *In vitro* grown roots a superior explant for prolific shoot regeneration of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv 'New Stem') in a temporary immersion bioreactor. Plant Science 165: 463-470.

(2011년 1월 28일 접수; 2011년 3월 17일 채택)