

기내배양을 통한 황기 부정근의 생산과 유효성분 분석

허 목 · 이대영 · 이재원 · 안태진 · 이정훈 · 김영국 · 차선우 · 엄유리[†]

농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부

Production of Adventitious Root and Analysis of Effective Components from *in vitro* Culture of *Astragalus membranaceus*

Mok Hur, Dae Young Lee, Jae Won Lee, Tae Jin An, Jeong Hoon Lee, Young Guk Kim, Seon Woo Cha and Yurry Um[†]

Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 27709, Korea.

ABSTRACT

Background : A series of studies were conducted to optimize adventitious root induction *in vitro* from explants of *Astragalus membranaceus* using various nutrient media supplemented with plant hormones.

Methods and Results : Levels of active components were analyzed from adventitious roots induced under different media conditions. Among the different media conditions, Murashige and Skoog medium supplemented with 1.0 mg · ℓ⁻¹ indole-3-butyric acid resulted in the greatest adventitious root induction rate. The amount of the major active component of the adventitious roots of Aml, calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside was higher than that of other adventitious root samples.

Conclusions : These results suggest that the adventitious roots of *A. membranaceus* could be used for the commercial production of medicines.

Key Words : *Astragalus membranaceus*, Adventitious Roots, Calycosin-7-O-β-D-Glucopyranoside

서 언

황기는 단너삼이라고도 하며 콩과의 다년생 초본식물로 학명은 *Astragalus membranaceus*, 약명은 *Astragali Radix* 이다. 황기는 뿌리를 그대로 또는 주피를 제거하여 사용한다. 황기는 주산지인 한국, 중국, 몽골 등 아시아 지역에 주로 분포하는 것으로 알려져 있으며 한국에서는 최근 충북 제천, 강원도 정선이 주산지를 이루고 있으며 그 외 강원도 영월, 경북 봉화 등지에도 재배하고 있다. 한국에서는 황기를 주로 식품과 한약재로서 재배하고 있으며, 그 뿌리는 원뿌리가 곧게 뻗으며 외피는 황갈색이지만 잘라 보면 들레는 유백색이고 속은 황백색을 띤다. 황기의 뿌리는 독성이 없어 안전하면서도 다양한 약리효능이 있기 때문에 식용과 약용으로 모두 사용되는 주요 약초이다. 황기는 전통적으로 피로, 식욕감퇴, 자연발한,

호흡곤란 등의 증세를 치료하고 쇠약해진 기운을 회복시켜주는 약재로 많이 사용되어 왔으며, 이외에도 항염증 및 항고혈압, 간장보호, 항산화, 항바이러스, 심장혈관보호, 면역증진활성, 항노화 등의 효능이 보고된 바 있다 (Kim *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 1984, 2003; Dong *et al.*, 2003; Wang and Feng, 2000; Kajimura *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2003; Du *et al.*, 2012; Lei *et al.*, 2003). 최근에는 새로운 cycloartane type saponin 물질이 발견되어 항염증효과를 비롯해 항암효과, 골다공증 개선 및 관절연골 분해 억제효과 등에 대하여 보고되기도 하였다 (Lee *et al.*, 2013; Cho and Leung, 2007; Kim *et al.*, 2012b; Choi *et al.*, 2005). 이러한 다양한 활성은 황기가 triterpenoid glycosides, flavonoid 및 polysaccharide와 같은 다양한 생리활성 화합물들을 함유하고 있기 때문이다 (Liu *et al.*, 2011). 황기의 주요 triterpenoid glycosides로는

[†]Corresponding author: (Phone) +82-43-871-5665 (E-mail) urspower@korea.kr

Received 2015 August 12 / 1st Revised 2015 September 1 / 2nd Revised 2015 September 15 / 3rd Revised 2015 September 18 / Accepted 2015 September 18

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

astragalosides 화합물이 알려져 있으며, 연근별, 수확시기별 astragalosides 함량변이가 보고되기도 하였다 (Kim *et al.*, 2012a). 특히 황기의 flavonoid 성분은 다양한 생리활성의 주요 활성물질로 평가되고 있다 (Kim and Kim, 1997, 2000). 그중에도 calycosin-7-O- β -D-glucopyranoside는 항염증 및 골관절염 억제효과가 보고된 바 있어 관절건강 개선 기능성 원료로 주목받고 있다 (Choi *et al.*, 2005, 2007).

따라서 황기 뿌리추출물은 다양한 형태의 건강식품으로써의 가능성뿐만 아니라 추출물의 분리, 정제를 통하여 의약품 개발도 가능할 것으로 기대되고 있다. 건강식품이나 의약품 원료로 사용되기 위해서는 계속적인 황기의 공급이 필요하나 공급량이 증가되기 위해서는 많은 경작지가 필요하며 황기의 수확시기까지는 평균적으로 3-4년에 걸친 재배와 관리가 필수적이다 (Ma *et al.*, 2000). 따라서 최근 연구자들은 이러한 재배적인 문제점을 해결하기 위해 식물 조직배양기술을 이용하여 기내배양 시스템을 계속적으로 개발하고 있으며 성공적인 사례로 인삼 배양근이 있다 (Kim *et al.*, 2003; Paek and Hahn, 2005; Jeong *et al.*, 2006; Sivakumar *et al.*, 2006). 황기를 대상으로 *Agrobacterium rhizogenes*를 이용한 모상근 형성과 호르몬을 이용한 부정근 형성에 대한 보고가 있으며, 황기 모상근이 재배적인 문제점을 해결하고 이용할 수 있는 잠재력을 가진다고 하였다 (Hirotani *et al.*, 1994; Du *et al.*, 2003; Ionkova *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011; Thwe *et al.*, 2012). 또한 선행연구자들에 의하면 조직배양법에 의해 생산된 식물의 캘러스나 조직이 재배식물과 동일한 약효성분을 가지며 이를 대량으로 생산하여 제조된 엑기스나 식물 사포닌으로 재배식물의 원료를 대체하여 의약품 및 건강음료 등의 원료로 사용할 수 있을 것이라고 보고하였다 (Yoshikawa and Furuya, 1987; Staswick, 1992; Lee *et al.*, 2004). 특히, 황기 추출물을 이용한 반복경구투여 독성시험에서도 투여가능 최대 용량으로 실험하였을 때 독성이 나타나지 않았기 때문에 안전한 천연물임이 보고되었다 (Park *et al.*, 2013). 따라서 약용작물 특히, 장기간 재배시기가 소요되는 뿌리작물에 대해 유용성분을 대량으로 생산할 수 있는 기내배양 시스템이 계속적으로 연구되어야 한다.

본 연구에서는 황기 유용물질 생산량 증대에 효과적인 부정근을 유도하기 위하여 식물 호르몬인 IBA를 농도별로 배지에 첨가하여 이상적인 배지조건을 확립하고 황기의 유효성분인 calycosin-7-O- β -D-glucopyranoside, calycosin 그리고 formononetin을 HPLC 분석으로 비교 하였다. 이를 바탕으로 황기 부정근의 대량생산을 통해 건강식품 및 의약품을 개발할 수 있는 기초기반을 마련하는 것이 본 연구의 목적이다.

재료 및 방법

1. 식물재료

식물재료는 인삼특작부 약용작물과 시험포장에서 육성한 황기 (*Astragalus membranaceus*) 식물체를 사용하였다. 부정근을 생산하기 위하여 황기종자를 1% NaOCl 5분, 70% EtOH 3분간 표면 살균 후 멸균수에서 3회 세척하여 1/2 MS (Murashige and Skoog, 1962; Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherlands) 배지에 치상하였고 1일 16시간 조명, 25 \pm 2 $^{\circ}$ C, 3000럭스의 광량으로 조절되는 배양실에서 생육시키며 무균발아를 유도하였다.

2. 부정근 생산을 위한 황기 캘러스 유도

부정근 유도를 위해 잎, 줄기, 뿌리 절편을 재료로 사용하였다. 각 부위별 절편은 0.5 cm의 길이로 절단하였다. 캘러스 유도배지는 indole-3-butyric acid (IBA)를 각각 3, 4, 5 mg \cdot l $^{-1}$ 로 하고 3% sucrose에 0.35% gelite가 첨가된 고체 1/2 MS 배지를 사용하였다. 배양조건은 1일 16시간 조명, 25 \pm 2 $^{\circ}$ C, 3000럭스의 광량으로 조절되는 배양실에서 4주간 배양하였다. 캘러스 유도배지에 접종된 황기 부위별 절편에서 캘러스를 유도한 후 각각의 부정근을 약 0.5 cm로 절단하여 1, 2, 3, 4, 5 mg \cdot l $^{-1}$ IBA와 3% sucrose, 0.35% gelite가 첨가된 고체 MS 배지로 옮겨 증식하였다. 배양조건은 캘러스 유도조건과 동일한 환경에서 2주간 배양하였다. 부정근의 진탕 배양을 위해 증식배지에서 배양된 부정근 1g (FW)을 1, 0.5 mg IBA와 3% sucrose, 0.35% gelite가 첨가된 액체 MS 배지 30 ml에 넣어 인큐베이터에서 진탕배양 하였다. 배양조건은 암조건으로 25 \pm 2 $^{\circ}$ C에서 2주간 배양하였다.

3. 분석 시약 및 기기

황기 부정근의 정량분석에 사용된 지표성분 (calycosin-7-O- β -D-glucopyranoside, calycosin, formononetin)은 ChromaDex 사 (Santa Ana, CA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 분석에 사용된 acetonitrile은 HPLC급 용매 (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA)를 사용하였고 황기의 추출에는 주정 (Daehan Ethanol life Ltd., Seoul, Korea)을 사용하였다. 황기 지표성분 분석 장비는 Agilent 1100 series HPLC system (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)을 사용하였다. 그 외 기타 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 및 Junsei Chemical Co. (Tokyo, Japan)의 일급 또는 특급 시약을 사용하였다.

4. 추출조건

성분 분석을 위해 황기 부정근은 앞서 연구된 배양조건에서

가장 우수하게 배양된 부정근 4개 라인 (Ama1, Ama2, Ama3, Ama4)을 선발하여 사용하였다. 각 시료는 동결건조기에서 48시간 건조하고 커터기 (Hanil, Seoul, Korea)를 이용해 조분쇄 하고, 30 g씩 정량하여 추출시료에 이용하였다. 선행연구에서 추출물 및 지표성분의 수율을 확인한 결과 50% EtOH를 사용하여 추출 하였을 때 수율이 가장 높은 것을 확인하였고 (Kim *et al.*, 2013), 추출을 위하여 각 분석 시료에 50% EtOH를 300 ml 을 넣은 후, 80°C 수조에서 40분간 2회 반복 환류추출을 실시하였다. 추출된 시료는 rotary evaporator (N1000-S, Eyela, Tokyo, Japan)로 농축하였고, 건조된 시료 10 mg 을 1 ml 50% MeOH에 녹인 후 0.45 µm membrane filter (Waters, Milford, MA, USA)로 여과하여 HPLC 분석을 실시하였다.

5. 분석조건

HPLC 분석에 사용된 컬럼은 Thermo Hypersil (4.6 × 250 mm, 5 µm, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA)을 사용하여 오븐 온도 30°C에서 실시하였다. 사용된 이동상은 water (A) 및 acetonitrile (B)를 각 20분씩 초음파 처리를 하여 사용하였다. Autosampler를 이용해 20 µl를 주입하

였다. 이동상의 기울기 조건은 0 - 30분 : 15 → 55% B, 30 - 35분 : 55 → 100% B, 35 - 40분 : 100 → 15% B, 40 - 45분 : 15% B의 조건으로 기울기 용리하였다. 이때 유속은 0.8 ml/min으로 하고, UV 검출기의 230 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

6. 통계분석

HPLC 추출조건별 수율 및 성분 정량분석은 3회 반복으로 실시하였다. 분석된 데이터 값은 means ± SE 값으로 나타내었으며 실험값의 통계처리 및 유의성 검정은 SAS (Statistical Analysis System)프로그램을 사용하여 분산분석 (ANOVA)과 Duncan’s Multiple Range Test (DMRT)로 유의성을 검증하였다. 또한 각 처리구간의 최소유의차 (p < 0.05) 수준에서 통계처리 하였다.

결과 및 고찰

1. 황기 기내배양을 위한 부정근 유도

황기 (*Astragalus membranaceus*)의 잎, 줄기, 뿌리절편을 3, 4 및 5 mg · l⁻¹의 IBA와 sucrose 30 g · l⁻¹가 첨가된 1/

Table 1. Effect of callus induction by explant types and IBA concentrations in tissue culture of *A. membranaceus*.

Tissue	IBA (mg · l ⁻¹)	Frequency of callus (%)	No. of roots/explant	Root length (cm)
Leaf	3	25.2	1.50 ± 0.50b	0.37 ± 0.08*
	4	75.4	3.00 ± 0.58a	0.50 ± 0.05
	5	-	-	-
Stem	3	40.2	4.50 ± 0.29a	2.50 ± 0.27
	4	-	-	-
	5	-	-	-
Root	3	75.4	1.83 ± 0.65b	1.05 ± 0.18
	4	25.5	1.50 ± 0.50b	0.27 ± 0.03
	5	88.1	4.14 ± 1.00a	0.99 ± 0.11

Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. -; Not induced. *Means within a column followed by the same letter are not significantly different based on the DMRT test (p < 0.05).

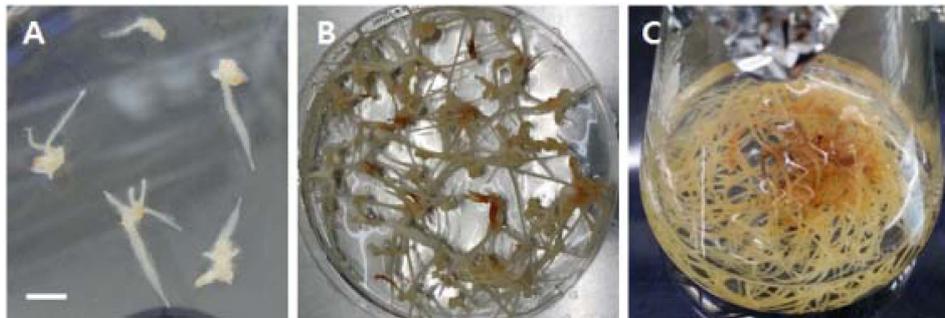


Fig. 1. Development of adventitious roots from root of *A. membranaceus*. A; young roots produced on the 1/2 MS medium using adventitious roots, B; subcultured callus, C; adventitious root cultured on MS liquid medium. Scale bars indicate as a 1 cm (A).

2 MS 배지위에 치상하여 캘러스 유도율을 조사하였더니 캘러스의 유도는 Table 1에서 보는바와 같이 낮은 4 mg · l⁻¹ IBA에서 75.4%, 줄기는 3 mg · l⁻¹ IBA에서 40.2% 그리고 뿌리에서 5 mg · l⁻¹ IBA에서 75.4%의 유도율을 보였다 (Fig. 1A).

유도된 부정근을 이용하여 증식배지로 계대배양 하였을 때 캘러스의 유도율이 가장 우수한 조건인 유도배지에서 얻어진 각 조직부위별 부정근을 이용하여 고체배양을 실시하였으며 기본배지는 MS로 교체하였다. 선행연구자 (Thwe *et al.*, 2012)에 의하면 Gamborg's B5 (B5), MS 그리고 Schenk and Hildebrandt (SH)배지에서 황기 부정근을 배양하였을 때 MS배지에서 생장이 가장 양호한 결과로 보고하였기 때문에 해당 배지를 선택하였다.

부정근 유도를 위해서는 식물호르몬 중 auxin을 많이 사용한다. 이는 부정근의 측근형성과 길이신장에 큰 영향을 미치는 식물생장조절물질로써 연구자들이 많이 사용하는 auxin의 종류로는 IAA, IBA, NAA 등이 있다. 부정근의 생장에 있어서 호르몬의 종류와 농도에 관한 보고는 식물 종류와 실험조건에 따라 상이하지만 대체로 고농도의 IBA와 저농도의 NAA에서 생장이 양호한 것으로 알려져 있다 (Jang *et al.*, 2012). 황기 부정근에 대해 선행 연구한 Thwe 등 (2012)에 의하면 황기의 부정근을 유도하기 위하여 IAA, IBA 그리고 NAA를 이용한 결과 NAA에 의해 부정근 생장이 가장 양호한 것으로 보고하였다. 본 연구에서도 3종의 auxin을 이용해서 부정근을 유도한 결과 IAA에서 12.4%, NAA에서 23.6% 그리고 IBA에서 56.3%의 캘러스 발아율을 보였다. 따라서 본 연구에서는 황기의 부정근을 유도하기 위하여 기내에서 무균발아 된 황기의 잎, 줄기, 뿌리 절편을 이용하여 높은 캘러스 발아율을 나타낸 IBA를 사용하였고 호르몬의 농도를 다르게 첨가하여 유도 배지를 제조하였다.

황기 부정근의 증식을 위한 증식용 배지는 IBA의 농도를 더욱 세분화하여 1, 2, 3, 4, 5 mg · l⁻¹로 첨가한 배지에 부정근을 치상하였다. 그 결과 황기 뿌리로부터 유도된 부정근은 1 mg · l⁻¹ IBA에서 부정근 증식이 가장 우수하였다 (Table 2, Fig. 1B).

황기의 세 조직부위별 증식배지에서 생장이 가장 우수한 뿌리로부터 유도된 부정근을 사용하여 부정근 대량생산을 위한 액체배양을 수행하였다. 황기 부정근의 액체배양을 위해 MS 배지에 0.5와 1.0 mg · l⁻¹ IBA 농도로 배지를 제조하여 배양하였다 (Fig. 1C). 그 결과 Table 3에서와 같이 0.5 mg · l⁻¹ IBA의 배지에서 2.80 ± 0.84 g, 1.0 mg · l⁻¹ IBA의 배지에서 4.70 ± 1.32 g으로 고농도의 IBA가 첨가된 배지에서 배양된 황기 부정근이 저농도의 배지에서 배양된 황기 부정근에 비해 약 2배의 생산량 차이를 관찰할 수 있었다.

이와 유사한 실험으로 Jang 등 (2012)은 1.0 mg · l⁻¹의

Table 2. Effect of adventitious roots by IBA concentrations in tissue culture using roots of *A. membranaceus*.

IBA (mg · l ⁻¹)	Frequency of callus (%)	No. of roots /explant
1	100.0	15.00 ± 3.00a*
2	22.8	4.00 ± 1.22b
3	83.5	1.00 ± 0.20c
4	21.6	4.00 ± 1.02b
5	76.5	1.33 ± 0.33c

Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. *Means within a column followed by the same letter are not significantly different based on the DMRT test (p < 0.05).

Table 3. Growth of adventitious root by IBA concentrations in tissue culture of *A. membranaceus*.

IBA (mg · l ⁻¹)	Fresh weigh (g)
0.5	2.80 ± 0.84
1.0	4.70 ± 1.32

Mean values ± SD (n = 5) from triplicate separated experiments are shown.

IBA가 첨가된 처리구에서 에키네시아 (Echinacea) 부정근의 형성과 부정근 내 생리활성물질 축적이 촉진되었다고 보고하였다. 또한 Wu 등 (2011)이 황기 부정근의 polysaccharide, saponin 및 flavonoid의 함량을 분석한 결과 노지 재배된 황기보다 높은 함량을 보였다. 따라서 본 연구에서 검증된 황기 부정근 생산조건으로 bioreactor에 적용하여 부정근을 생산한다면 단기간에 대량으로 원료를 공급할 수 있어 식품과 의약품 산업의 기대 효과가 클 것으로 사료된다.

2. 유효성분 분석

황기의 주요성분 정량을 위하여 황기의 isoflavonoid 성분인 calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside, calycosin 및 formononetin을 지표성분으로 하여 HPLC로 분석하였다. 분석시료는 본 연구에서 유도된 황기 부정근 중에서 생장이 활발한 4개 라인을 선별하여 이용하였다. 선별된 각 라인을 Ama1, Ama2, Ama3 그리고 Ama4로 명명하였다. 그 결과 Fig. 2와 같이 Ama1의 calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside과 calycosin성분함량이 최대치를 나타내었다.

각 성분의 함량을 살펴보면 calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside는 5.25 ± 0.10 μg · g⁻¹으로 calycosin과 formononetin의 함량은 각각 0.73 ± 0.01 μg · g⁻¹, 1.53 ± 0.01 μg · g⁻¹로 분석되었다. Kim 등 (2013)이 보고한 연구에서도 황기의 유효성분인 calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside은 모든 조건에서 높은 함량을 가지는 것으로 분석되었다. 따라서 황기의 flavonoid 성분 중에는 calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside의 함량이 calycosin과 formononetin에 비해 높은 비율로 차지한 다는 것을 확인할 수 있었다. 특이한 점은 모든 황기 부정근 라인에서 formononetin

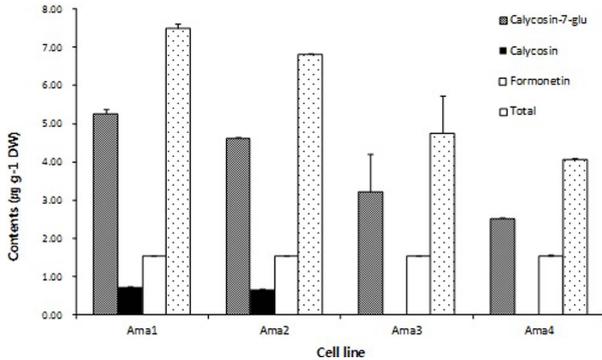


Fig. 2. Contents of effective components from adventitious root of *A. membranaceus* cultured in liquid medium for 2 weeks. Ama; cell line. Data were represented as mean values (n = 3) with standard error.

의 함량은 Ama1 $1.52 \pm 0.01 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, Ama2 $1.53 \pm 0.01 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, Ama3 $1.53 \pm 0.02 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, Ama4 $1.54 \pm 0.03 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 로 동일한 검출량을 보이는 반면 calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside과 calycosin의 함량은 변화하는 것으로 나타났다. Calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside의 약리효능은 이미 많은 연구자들에 의해 보고되어 왔으며 특히 관절염에 대한 완화효과와 간보호 효과, 염증유발 물질인 COX-2 효소활성 억제효과, 항균효과 및 허혈재관류 증상이 있는 실험용 쥐에서 뇌 세포막의 유동성을 증가시킬 수 있다는 보고가 있다 (Choi and Leung, 2007; Baek et al., 1996; Kim et al., 2001; Yu et al., 2005; Lu et al., 2002; Wang et al., 2006). 결과적으로 유도된 황기 부정근 4개 라인 중 Ama1의 유효성분 함량이 가장 우수한 것으로 보아 Ama1을 선발하여 bioreactor를 이용한 대량생산시스템에 적용한다면 황기 부정근에 다량으로 함유된 calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside을 상업적으로 유용하게 이용할 수 있을 것이라고 사료된다. 또한 본 연구결과로부터 생산된 부정근을 이용하여 체세포배를 유도하고 식물체를 순화하여 노지에서 재배하는 방법을 지속적으로 연구한다면 오랜 시간 걸쳐 얻을 수 있는 우수 개체를 단기간에 얻을 수 있고 나아가 황기 전통육종법의 개선이 가능할 것이다.

결과적으로 본 연구에서 검증한 황기부정근 생산의 최적조건을 바탕으로 황기의 이차대사산물의 대량생산과 산업화를 위한 기초자료로써 활용 가치가 높을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립원예특작과학원 기관고유사업 황기 고품질 품종육성 및 재배기술개선 연구(과제번호: PJ101288022015) 과제의 연구비 지원으로 수행된 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

Baek NI, Kim YS, Kyung JS and Park KH. (1996). Isolation of antihepatotoxic from the root of *Astragalus membranaceus*. Korean Journal of Pharmacognosy. 27:111-116.

Cho WCS and Leung KN. (2007). *In vitro* and *in vivo* antitumor effects of *Astragalus membranaceus*. Cancer Letters. 252:43-54.

Choi S, Park SR and Heo TR. (2005). Inhibitory effect of Astragali radix on matrix degradation in human articular cartilage. Journal of Microbiology and Biotechnology. 15:1258-1266.

Choi SI, Heo TR, Min BH, Cui JH, Choi BH and Park SR. (2007). Alleviation of osteoarthritis by calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside(CG) isolated from Astragali radix(AR) in rabbit osteoarthritis(OA) model. Osteoarthritis and Cartilage. 15:1086-1092.

Dong TTX, Ma XQ, Clarke C, Song ZH, Ji ZN, Lo CK and Tsim KWK. (2003). Phylogeny of *Astragalus* in China: Molecular evidence from the DNA sequences of 5S rRNA spacer, ITS, and 18S rRNA. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51:6709-6714.

Du M, Wu XJ, Ding J, Hu ZB, White KN and Branford-White CJ. (2003). Astragaloside IV and polysaccharides production by hairy roots of *Astragalus membranaceus* in bioreactors. Biotechnology Letters. 25:1853-1856.

Du XG, Zhao B, Li JY, Cao XH, Diao MK, Feng HB, Chen XB, Chen ZY and Zeng XY. (2012). *Astragalus* polysaccharides enhance immune responses of HBV DNA vaccination via promoting the dendritic cell maturation and suppressing Treg frequency in mice. International Immunopharmacology. 14:463-470.

Hirotsu M, Zhou Y, Lui H and Furuya T. (1994). Astragalosides from hairy root cultures of *Astragalus membranaceus*. Phytochemistry. 36:665-670.

Ionkova I, Momekov G and Proksch P. (2010). Effects of cycloartane saponins from hairy roots of *Astragalus membranaceus* Bge., on humantumor cell targets. Fitoterapia. 81:447-451.

Jang YS, Cui HY, Lee EJ, Kim HW and Paek KY. (2012). Auxin affects on production of adventitious roots and secondary metabolites in *Echinacea angustifolia*. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 20:479-486.

Jeong CS, Chakrabarty D, Hahn EJ, Lee HL and Paek KY. (2006). Effects of oxygen, carbon dioxide and ethylene on growth and bioactive compound production in bioreactor culture of ginseng adventitious roots. Biochemical Engineering Journal. 27:252-263.

Kajimura K, Takagi Y, Ueba N, Yamasaki K, Sakagami Y, Yokoyama H and Yoneda K. (1996). Protective effect of Astragali radix by intraperitoneal injection against Japanese encephalitis virus infection in mice. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 19:855-859.

Kim EJ, Oh OJ, Lee SK and Yang KS. (2001) Inhibitory effect of Astragali Radix on COX-2 activity. Korean Journal of Pharmacognosy. 32:311-315.

Kim GS, Lee DY, Lee SE, Noh HJ, Choi JH, Park CG, Choi SI, Hong SJ and Kim SY. (2013). Evaluation on extraction conditions and HPLC analysis method for bioactive compounds

- of *Astragali radix*. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 21:486-492.
- Kim JH, Park SY, Lim HK, Park AY, Kim JS, Kang SS, Youm JR and Han SB.** (2007). Quantitative evaluation of *radix Astragali* through the simultaneous determination of bioactive isoflavonoids and saponins by HPLC/UV and LC-ESI-MS/MS. Bulletin of the Korean Chemical Society. 28:1187-1194.
- Kim JS and Kim CS.** (1997). A study on the constituents from the roots of *Astragalus membranaceus* Bunge (II). Korean Journal of Pharmacognosy. 28:75-79.
- Kim JS and Kim CS.** (2000). A study on the constituents from the roots of *Astragalus membranaceus* Bunge (III). Korean Journal of Pharmacognosy. 31:109-111.
- Kim SH, Jun YM, Lim JJ, Kim SH, Chung IM and Kim EH.** (2012a). Variation of astragalosides contents in cultivated *Astragalus membranaceus*. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 20:372-380.
- Kim SP, Kim SM, Ryu HS, Shin JC, Lee DG, Lee OJ, Lee JH and Kim JH.** (2012b). The effects of *Astragali radix* pharmacopuncture at CV12 on osteoporosis of senescence accelerated mice(SAM) P6. The Journal of Korean Acupuncture and Moxibustion Medicine Society. 29:59-71.
- Kim YS, Chakrabarty D, Hahn EJ and Paek KY.** (2003). Methyl jasmonate increases saponin content in bioreactor culture of ginseng(*Panax ginseng* C. A. Meyer) adventitious roots. Acta Horticulturae. 625:289-292.
- Lee BS, In JG, Song WS and Yang DC.** (2004). Increase of ginsenosides production by the treatment of chitosan and jasmonic acid in the adventitious roots of Korean ginseng(*Panax ginseng* C.A. Meyer). Korean Journal of Plant Resources. 17:48-53.
- Lee DY, Noh HJ, Choi JH, Lee KH, Lee MH, Lee JH, Hong YP, Lee SE, Kim SY and Kim GS.** (2013). Anti-inflammatory cycloartane type saponins of *Astragalus membranaceus*. Molecules. 18:3725-3732.
- Lee YS, Han OK, Park CW, Suh SI, Shin SW, Yang CH, Jeon TW, Lee ES, Kim KJ, Kim SH, Yoo WK and Kim HJ.** (2003). Immunomodulatory effects of aqueous extracted *Astragali radix* in methotrexate treated mouse spleen cells. Journal of Ethnopharmacology. 84:193-198.
- Lei H, Wang B, Li WP, Yang Y, Zhou AW and Chen MZ.** (2003). Anti-aging effect of astragalosides and its mechanism of action. Acta Pharmacologica Sinica. 24:230-234.
- Liu J, Zhao ZZ and Chen HB.** (2011). Review of *Astragali radix*. Chinese Herbal Medicines. 3:90-105.
- Lu JF, Li CX, Muteliefu G, Li TF, Tu PF, Yin JJ and Cai SQ.** (2002). Effects of BYHW decoction and its effective constituents on the fluidity of the cell membrane in a stroke modeled rat brain. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences. 11:132-136.
- Ma XQ, Duan JA, Zhu DY, Dong TX and Tsim KWK.** (2000). Chemical comparison of *Astragali radix*(Huangqi) from different regions of China. Natural Medicines. 54:213-218.
- Murashige T and Skoog F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15:473-497.
- Park YC, Lee JS, Kim DY, Son HY, Lee JW, Cheoi YS, Kim KK, Yu CY, Chung IM, Im MH, Lee KJ, Choi RN, Shim HS and Lim JD.** (2013). A 90 day repeated dose oral toxicity study of extracts from *Astragalus membranaceus* aboveground parts in rats. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 21:474-485.
- Paek KY and Hahn EJ.** (2005). Increase of saponin contents via elicitor treatments in bioreactor culture of ginseng(*Panax ginseng* C. A. Meyer) adventitious roots. Acta Horticulturae. 679:145-148.
- Sivakumar G, Yu KW and Paek KY.** (2006). Enhanced production of bioactive ginsenosides from adventitious roots of *Panax ginseng* in bioreactor culture. Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 81:549-552.
- Staswick PE.** (1992). Jasmonate, genes, and fragrant signals. Plant Physiology. 99:804-807.
- Thwe AA, Mai NTT, Li X, Kim Y, Kim YB, Uddin MR, Kim YS, Bae H, Kim HH, Lee MY and Park SU.** (2012). Production of astragaloside and flavones from adventitious root cultures of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*. Plant Omics Journal. 5:466-470.
- Wang JH, Kong J, Li W, Molchanova V, Chikalovets I, Belogortseva N, Luk'yanov P and Zheng YT.** (2006). A beta-galactose-specific lectin isolated from the marine worm *Chaetopterus variopedatus* possesses anti-HIV-1 activity. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology. 142:111-117.
- Wang XJ and Feng P.** (2000). Antioxidant activity of Qizhu tang. Acta Pharmacologica Sinica. 21:1141-1144.
- Wu SQ, Lian ML, Gao R, Park SY and Piao XC.** (2011). Bioreactor application on adventitious root culture of *Astragalus membranaceus*. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant. 47:719-724.
- Yoshikawa T and Furuya T.** (1987). Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Reports. 6:449-453.
- Yu DH, Duan YL, Bao YM, Wei CL and An LJ.** (2005). Isoflavonoids from *Astragalus mongholicus* protect PC12 cells from toxicity induced by L-glutamate. Journal of Ethnopharmacology. 98:89-94.
- Zhang WJ, Hufnagl P, Binder BR and Wojta J.** (2003). Anti-inflammatory activity of astragaloside IV is mediated by inhibition of NF-kappa B activation and adhesion molecule expression. Thrombosis and Haemostasis. 90:904-914.
- Zhang YD, Wang YL, Shen JP and Li DX.** (1984). Effect of astragaloside IV on inflammatory and hypertension. Acta Pharmacologica Sinica. 19:333-337.