

세포배양에 의한 고려인삼 성분의 생산 연구(Ⅱ).

지형준 · 신국현 · 김현수 · 조희재
서울대학교 생약연구소

Production of Ginseng Saponins with Cell Culture(Ⅱ)

Hyung Joon Chi, Kuk Hyun Shin, Hyun Soo Kim and Hee Jae Cho
Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

Abstract—Tissue culture of the roots of *Panax ginseng* was carried out to enhance the production of ginseng callus as well as to increase its contents of ginsenosides. A long cylinder type callus mass was formed when cultured IK callus by rotary shaking culture method, the growth ratio of the callus being 7.71 which was approximately 4 fold higher than those obtained by other culture methods. Ginsenosides Rg₁, Re and Rb₁ could be detected from the callus mass by TLC, however, their total contents were revealed to be approximately 9% compared to that of the fresh ginseng root equivalent by HPLC analysis,.

Keywords—*Panax ginseng* · ginseng callus · ginsenosides · IK callus · rotary shaking culture · HPLC

조직배양법에 의해 생산된 인삼 callus를 재배 인삼 대용으로 사용하기 위한 연구가 Furuya 등에 의해 그동안 꾸준히 있어왔다.¹⁻³⁾ 세포·조직 배양법에 의해 생산된 인삼 callus가 재배인삼과 동일한 약효성분을 가지며 약리 및 독성 시험 결과도 재배인삼과 차이가 없다면, 의약품 및 건강음료 등의 원료로 쓰이는 인삼엑기스나 인삼 saponin 등의 제조에는 구태여 재배인삼을 사용할 필요없이 이 인삼 callus를 사용할 수 있으리라 생각된다.⁴⁾ 그러할 경우 인삼재배에 사용되는 경작지를 다른 목적으로 활용할 수 있고, 단기간내에 인삼 saponin을 생산할 수 있으며 기후 등의 영향이 없이 균질의 제약원료를 지속적으로 공급할 수 있는 장점이 있을 것이다.

이에 대규모의 조직배양에 의한 인삼 saponin의 생물공학적 생산이 우리나라에서도 가능토록 하기 위한 연구의 일환으로, 전보⁵⁾에 이어 보다

빠른 증식속도, 높은 saponin함량 및 재배인삼과 동일한 ginsenoside pattern을 갖는 인삼 callus를 선발할 목적으로 인삼의 세포 및 조직배양 연구를 시도한 바, 특이한 외관을 갖는 callus를 발견하여 이에 대한 성분연구를 실시하였다. 즉 인삼 callus에서 형성된 뿌리부분을 취하여 액체 배지에서 회전진탕배양하여 외관이 미삼과 비슷한 긴 원통형의 callus mass를 얻었고, 성분을 재배인삼과 비교하기 위하여 인삼의 유효성분으로 인정되고 있는 saponin분획을 분리하여 TLC 및 HPLC로 비교 분석하였다.

실험 방법

실험재료

Callus의 유도에 사용된 인삼은 5~6년생의 신성한 수삼을 서울 경동시장에서 구입하여 사용

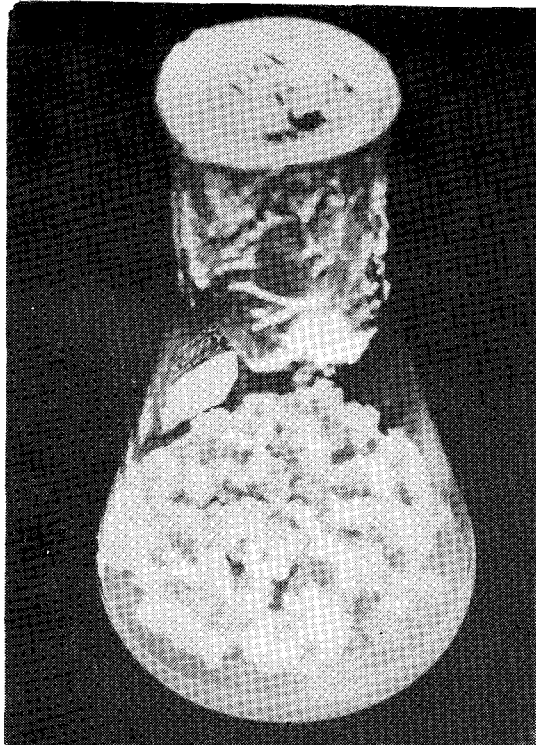


Fig. 1. Picture of DI callus induced from ginseng root.

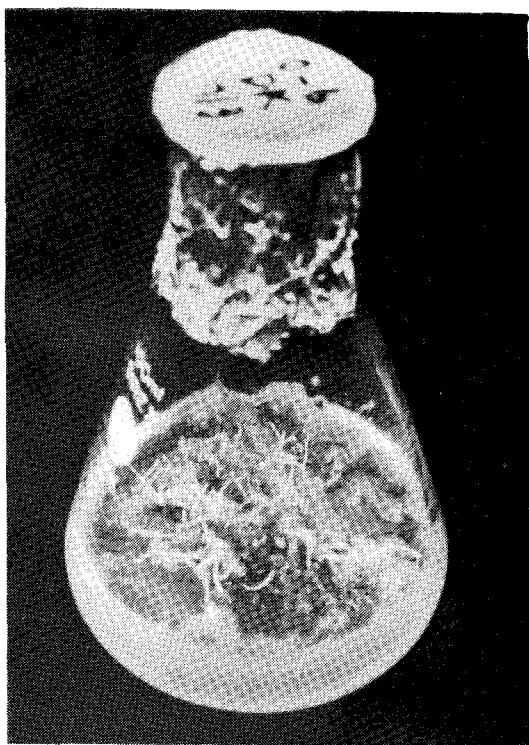


Fig. 2. Picture of DK callus during subculture.

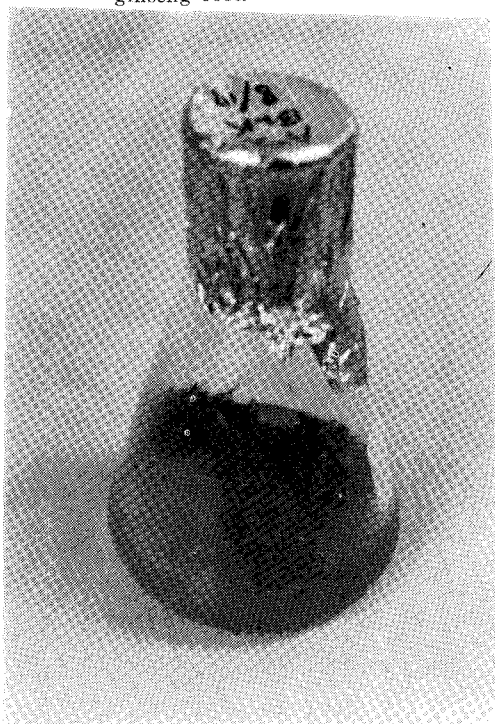


Fig. 3. Picture of IK callus differentiated many rootlets.

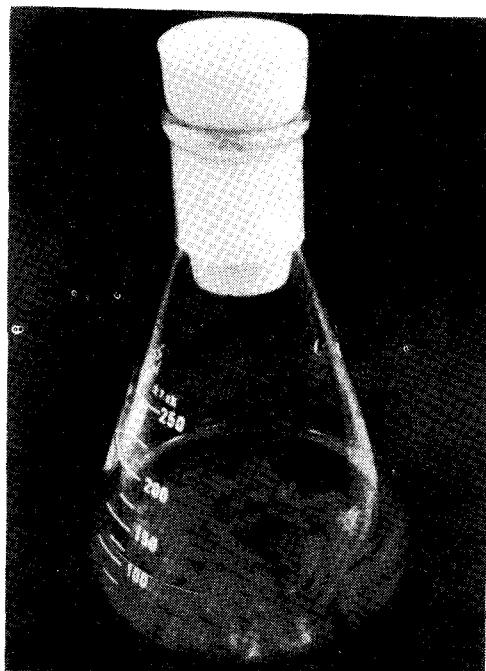


Fig. 4. Picture of cylinder type callus in liquid culture.

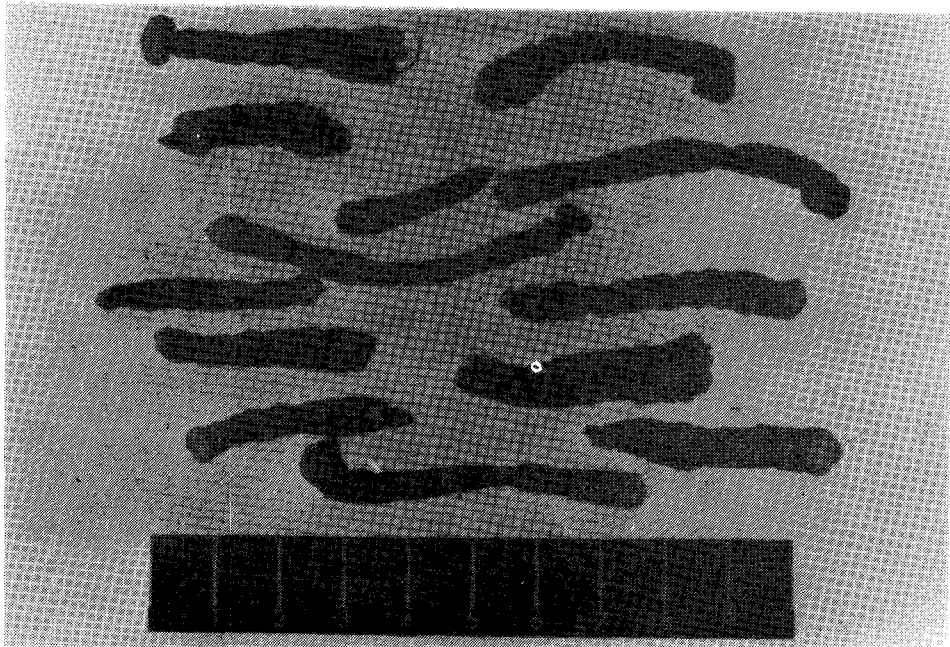


Fig. 5. Picture of fresh cylinder type callus.

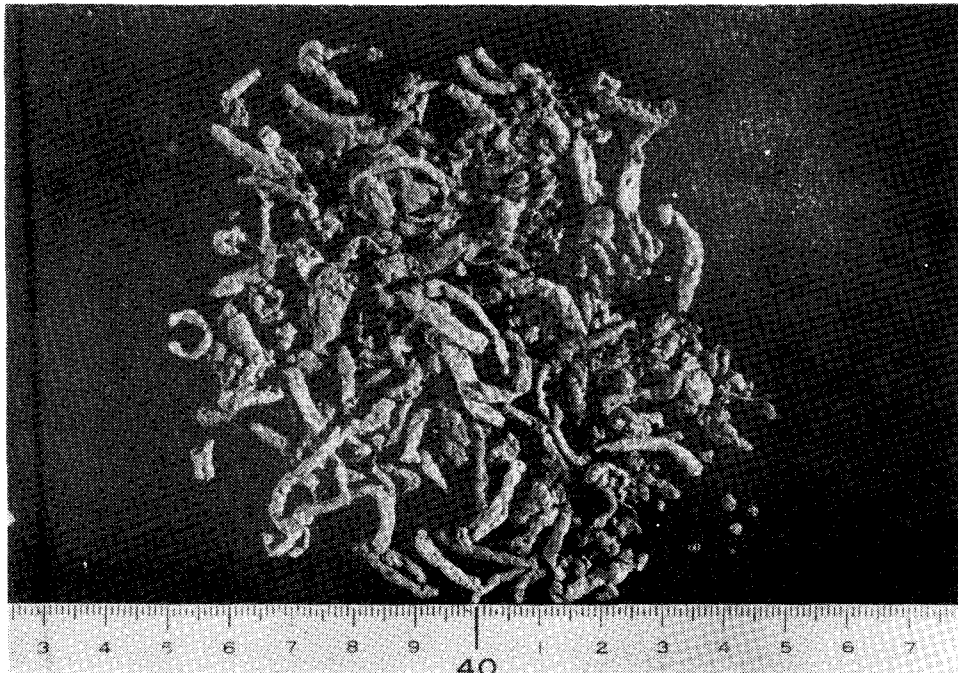


Fig. 6. Picture of dried cylinder type callus.

하였다. Callus와의 성분비교를 위하여 사용된 인삼은 2~3년생으로 추정되는 수삼을 지근이나 채근을 제거하지 않고 통째로 실험재료로 사용하였다.

인삼 callus의 유도 및 배양

배지—MS배지의 기본 조성에서 thiamine · HCl을 0.4 mg/ml로 증가시키고 glycine을 빼것을 기본배지로 하여 각 식물성장호르몬을 일정량 첨가한 것을 사용하였다.

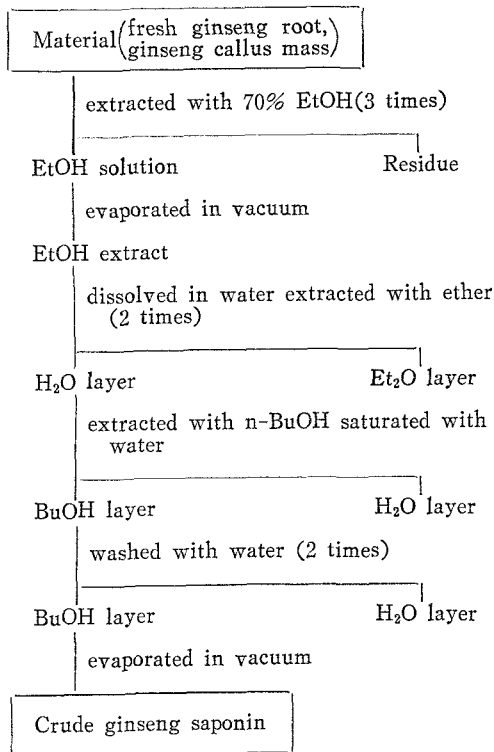
Callus의 유도 및 계대배양—수삼을 세척하고 멸균한 후 피층을 벗겨내고 두께 3~5 mm 정도의 원반형 절편으로 절단한 다음 2, 4-D가 1 ppm으로 첨가된 MS수정고체배지에 이식하여 인삼 callus(D1 callus)를 유도시켰다(Fig. 1). 그 후 식물호르몬의 조성을 2, 4-D 1 ppm, kinetin 0.1 ppm으로 변경한 배지에 이식하여 25° 암소하에서 4주간적으로 계대배양하여 비교적 잘 성장하는 callus(DK callus)를 얻었다(Fig. 2).

원통형 callus mass의 생성—DK callus중 뿌리형태로의 기관분화가 일어난 callus를 IBA와 kinetin이 2.0 및 0.1 ppm 함유된 배지에 이식하여 뿌리가 좀더 왕성히 분화되는 callus(IK callus)를 얻었다(Fig. 3). 이 IK callus의 뿌리부분을 IK배지와 동등조성의 액체배지에서 암소하에 100 rpm으로 회전진탕배양시 외관이 인삼의 미삼과 비슷한 길이 5~6 cm, 지름 0.3~0.5 cm의 긴 원통형 callus mass가 생성되었다(Fig. 4, 5, 6).

원통형 callus의 성장률 및 건조량—원통형 callus는 10일 간격으로 새 액체배지로 계대배양하였으며 그때마다 중량을 측정하였다. 그리고 30일 전후의 callus중량의 비율로부터 성장률의 지표인 growth ratio를 구하였다.⁶⁾ 또한 신선한 callus 및 수삼의 중량을 측정한 다음 60°에서 48시간 건조한 후 중량을 측정하여 신선한 중량 100 g당의 건조중량을 구하였다.

성분의 분석

Saponin분획의 분리—원통형 callus mass 및 잘게 절단한 재배인삼(수삼)을 70% 에탄올로 수욕상에서 환류냉각하에 4시간씩 3회 열탕추출하여 여과한 후 추출액을 감압농축시킨 다음 증류수에 다시 녹이고 에칠에테르로 2회 진탕



Scheme 1. Separation of crude ginseng saponin from fresh ginseng root and ginseng callus mass.

추출하여 정유, 색소 등의 지용성성분을 제거시켰다. 수층을 물로 포화시킨 부탄올로 5회 추출하고 부탄올층을 다시 증류수로 2회 세척한 후 감압농축하여 crude saponin분획을 얻었다⁷⁾ (Scheme 1).

TLC에 의한 ginsenoside pattern분석⁸⁾—재배인삼 및 원통형 callus mass로부터 분리한 saponin 분획을 각각 일정량의 메탄올에 녹인 후 ginsenoside 표준들과 함께 여러 전개용매계에서 TLC를 실시하여 callus mass중에 함유되어 있는 각 ginsenoside를 동정하였으며 발색시약에 의한 정색의 정도에 의해 함량을 재배인삼과 비교하고 ginsenoside pattern을 비교분석 하였다. 시험에 사용된 TLC조건은 아래와 같다.

TLC Plate: Precoated silica gel 60 F-254 (Merck); Solvent: System 1 : CHCl₃—MeOH—H₂O(65 : 35 : 10, lower layer); System 2 : CHCl₃—n-BuOH—MeOH—H₂O(20 :

40 : 15 : 20, lower layer); Detection: Spraying with 10% H₂SO₄ solution and heating at 120°.

HPLC에 의한 각 ginsenoside의 정량⁹⁾—재배인삼 및 원통형 callus mass로부터 얻은 crude saponin 분획을 일정량의 MeOH에 녹인후 15 μl씩 HPLC에 injection하였다. 또한 동일조건하에서의 각 ginsenoside 표준들의 retention time과 비교하여 시료중의 각 peak를 동정하였으며 overlap test를 통해 재확인하였다. 그리고 여러 농도의 표준용액으로부터 얻은 chromatogram에서 peak height와 용액의 농도로부터 검량선을 구한 후, 이에 의해 시료중의 각 ginsenoside를 정량하였다. Column은 역상의 C₁₈ column을 사용하였고 용출용매는 acetonitrile과 water의 혼합용매를 사용한 바, 30 : 70의 용매를 사용할 경우 대부분의 ginsenoside는 분리상태가 양호하였으나 Rg₁과 Re는 동일한 t_R을 나타내어 분리정량이 곤란하였다. Rg₁과 Re의 분리정량을 위해선 22 : 78로 acetonitrile의 양을 줄이고 flow rate를 2.0 ml/min로 증가시켰다. 분석에 사용될 HPLC조건은 다음과 같다.

Model : Waters Associates
 Colum : μ Bondapak C₁₈(3.9 mm×30 cm)
 Solvent system : Acetonitrile-Water(30 : 70)
 Flow rate : 1.0 ml/min
 Detector : UV Detector(203 nm)
 Injection volume : 15 μl

실험결과 및 고찰

원통형 callus mass의 외관 및 증식속도

대부분의 인삼 callus가 무정형의 덩어리형태인 데 반하여 IK callus의 뿌리부분을 액체진탕배양할때 생성된 원통형 callus는 길이 5~6cm, 직경 0.3~0.5cm로 미황색을 띠우며 외부형태가 미삼과 비슷하였다(Fig. 4, 5, 6).

또한 이 원통형 callus는 성장속도가 다른 callus들 보다 현저히 빨랐다(Fig. 7). 30일간의 성장률인 growth ratio는 7.71을 나타내어 정치

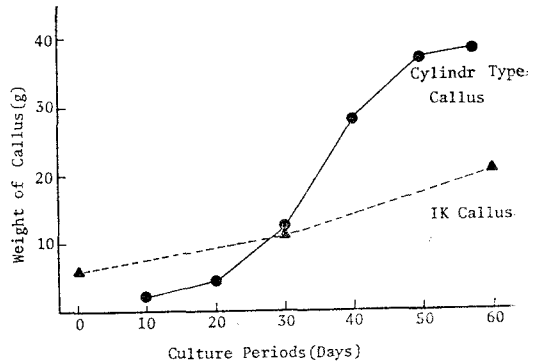


Fig. 7. Growth curve of each callus.

배양한 IK callus의 1.96보다 약 4배정도나 큰 증식률을 보였다. 이 값은 문헌에 보고된 여러 인삼 callus들의 3.40~6.22보다 큰 값으로 물질 생산 효율면에서 유리하다고 생각된다.¹⁰⁾

그리고 이 원통형 callus는 재배인삼보다는 못하였지만 고체배양한 다른 인삼 callus들 보다 더 단단하였다. 생중량 100g당의 건조중량을 측정하여 비교해 본 결과 고체배양한 IK callus가 4.7g, 원통형 callus가 8.8g, 재배인삼(수삼)이 26.5g을 나타냈다(Fig. 8).

TLC에 의한 ginsenoside pattern

Saponin분획에 대하여 여러 용매계에서 TLC를 실시한 결과, 원통형 callus mass에선 ginsenoside Rb₁, Re, Rg₁이 다른 ginsenoside에 비해 비교적 많이 함유되어 있었으며 발색시약에 의한 정색의 정도로 미루어 함량이 큰 순서는 Rb₁>Rg₁>Re임을 추정할 수 있었다. 또한 원통형 callus중의 각 ginsenoside의 함량은 재배인삼과

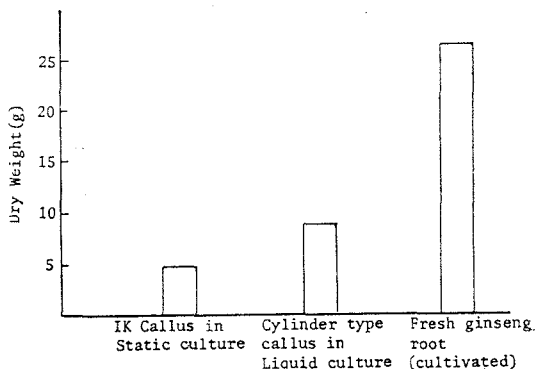


Fig. 8. Dry weight per 100 g fresh materials.

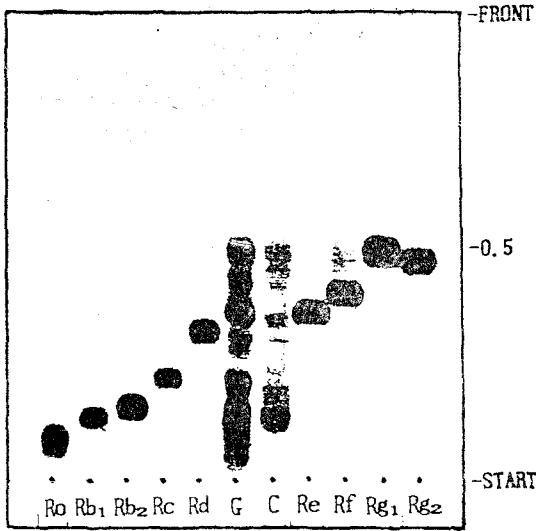


Fig. 9. Thin layer chromatogram of 9 ginsenoside standard samples and saponin fractions obtained from ginseng root and cylinder type callus.
 G=fresh ginseng root
 C=cylinder type callus
 Solvent : CHCl_3 -n-BuOH-MeOH-H₂O
 (20 : 40 : 15 : 20, lower layer)

비교할때 비교적 적었으나 pattern은 대체적으로 일치하였다. 즉 재배인삼중에서도 Rb₁, Rg₁ 및 Re가 주요 saponin으로 함유되어 있었다(Fig. 9, 10).

HPLC에 의한 각 ginsenoside의 정량

실험방법에서 기술된 HPLC 조건으로 측정된 각 ginsenoside표품, 원통형 callus 및 재배인삼의 HPLC chromatogram은 Fig. 11, 12, 13과 같았다. 재배인삼의 경우 ginsenoside Rg₁, Re, Rf, Rg₂, Rb₁, Rc 및 Rb₂가 검출되었으나 원통형 callus중에선 Re, Rg₁ 및 Rb₁만 검출되고 나머지는 검출되지 않았는데 이는 이들이 미량함유되어 있기 때문으로 추측된다.

원통형 callus mass중의 ginsenoside Rb₁, Rg₁ 및 Re는 각각 생중량당 0.020, 0.013, 0.003% 함유되어 있었고, 이 3가지를 합한 total ginsenoside의 양은 0.036%를 나타냈다(Table I). 저자 등은 전보에서 정치배양한 인삼 callus에서 0.010~0.024%의 total ginsenoside가, 현탁배양 시엔 0.012~0.084%의 total ginsenoside가 생성됨을 보고한 바 있다.⁵⁾ Furuya 등 다른 연구자

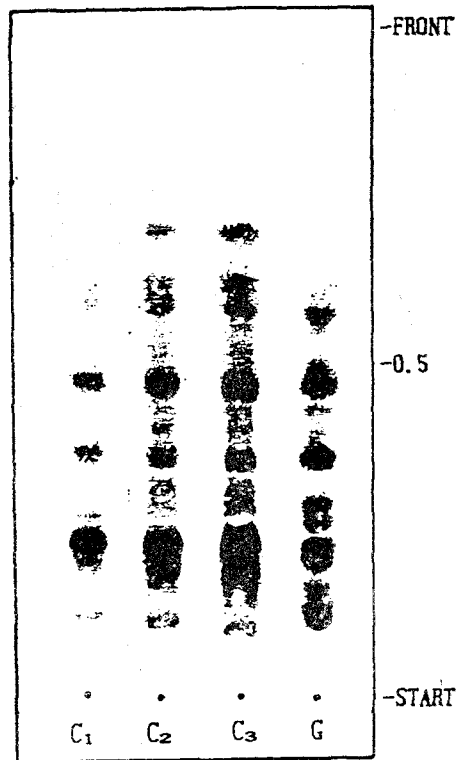


Fig. 10. TLC pattern comparison of saponin fractions obtained from fresh ginseng root and cylinder type callus.
 C₁-C₃ : saponin fraction from callus with increasing spotting volume
 G : saponin fraction from fresh ginseng root
 Solvent : CHCl_3 -MeOH-H₂O
 (65 : 35 : 10, lower layer)

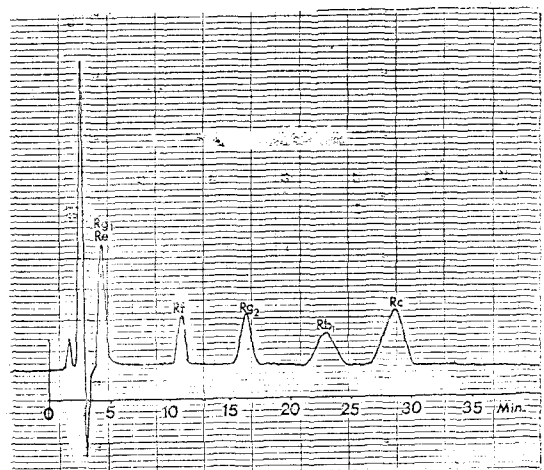


Fig. 11. HPLC chromatogram of ginsenoside standard samples.

Table 1. Contents of ginsenosides in cylinder type callus mass and fresh ginseng root

Material	Contents of ginsenosides (%)							total
	Rb ₁	Rb ₂	Rc	Re	Rf	Rg ₁	Rg ₂	
Cylinder type callus mass (fresh)	0.020	—	—	0.003	—	0.013	—	0.036
Fresh ginseng root	0.097	0.069	0.086	0.090	0.010	0.053	0.016	0.421

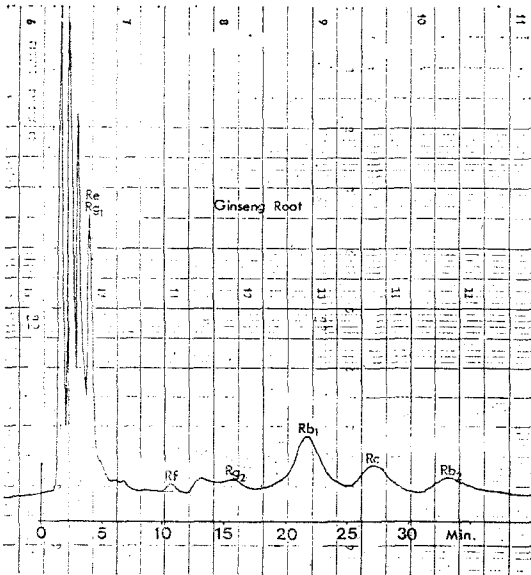


Fig. 12. HPLC chromatogram of saponin fraction of ginseng root.

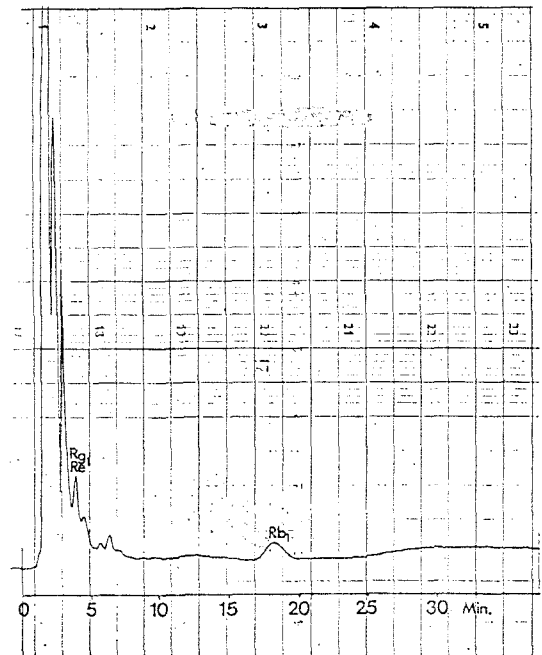


Fig. 13. HPLC chromatogram of saponin fraction of cylinder type callus mass.

들의 경우 0.014~0.109%의 함량을 보고 하고 있음을 볼 때¹¹⁾ 원통형 callus의 saponin 함량은 높지도 낮지도 않은 보통수준이라 할 수 있겠으나 이 callus의 높은 성장률을 고려할 때 생산성은 높은편이라 할 수 있겠다.

재배인삼의 경우엔 ginsenoside Rb₁, Re, Rc, Rb₂, Rg₁의 순서로 함유되어 있었으며, total ginsenoside 양은 생중량당 0.421%로 원통형 callus의 0.036%보다 약 11.7배 많았으며, 건조중량당 함량으로 환산할 경우에도 재배인삼이 1.59% 원통형 callus가 0.41%로서 재배인삼쪽이 약 4배 높았다. 그러나 4~6년이나 되는 인삼의 재배기간을 고려할 때 인삼 callus의 saponin 생산효율은 그다지 낮은 것만은 아니라고 할 수 있겠다.

결 론

인삼 callus에서 분화된 뿌리부분을 액체배지에서 진탕배양하여 외관 및 색상이 미삼과 비슷한 긴 원통형 callus를 얻었으며 이 callus는 growth ratio가 7.71로서 다른 callus들보다 빠른 성장속도를 나타냈다. TLC에 의한 ginsenoside의 pattern 분석결과 원통형 callus는 재배인삼과 saponin pattern이 대체로 비슷하였으며 ginsenoside Rb₁, Rg₁ 및 Re가 주요 saponin으로 함유되어 있었다. HPLC에 의한 ginsenoside의 정량결과 원통형 callus의 ginsenoside 총함량은 생중량당 0.036%를 나타내 재배인삼의 0.421%보다는 낮은 함량을 보였다.

감사의 말씀—이 논문은 1986년도 문교부자유
과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

〈1989년 7월 1일 접수 : 7월 31일 수리〉

문 헌

1. Furuya, T. *Yakugaku Zasshi*, **106**, 856 (1986).
2. Furuya, T., Yoshikawa, T., Orihara Y. and Oda, H. *J. Nat. Prod.* **47**, 70 (1984).
3. Furuya, T., Yoshikawa, T., Ishii T. and Kajii, K. *Planta Medica* **47**, 200 (1983).
4. Saito, H., Kohno, T., Tozuka, K. and Takagi, K. *Shoyakugaku Zasshi* **34**, 177 (1980).
5. 지형준, 김현수. 생약학회지 **16**, 171 (1985).
6. Furuya, T., Yoshikawa, T., Ishi T. and Kajii K. *Planta Medica* **47**, 183 (1983).
7. 김만옥, 이정숙, 남기열, 고려인삼학회지 **8**, 8 (1984).
8. Sanada, S., Shoji J. and Shibata, S. *Yakugaku Zasshi* **98**, 1048 (1978).
9. Soldati, F. and Sticher, O. *Planta Medica* **39**, 348 (1980).
10. Furuya, T., Yoshikawa, T., Ushiyama K. and Oda, H. *Experientia* **42**, 193 (1986).
11. Furuya, T., Yoshikawa T. and Oda, H. *Planta Medica* **48**, 83 (1983).