

*Agrobacterium rhizogense*에 의해 형질 전환된 인삼의 모상근
배양에서 Ginsenoside의 생산

고 경 수 · 허 인 옥 · *고 정 삼 · **이 윤 진
제주대학교 자연대학 생물학과, *농과대학 농화학과, **경희대학교 약학대학

Ginsenoside Production by Hairy Root Cultures of *Panax ginseng*
Transformed with *Agrobacterium rhizogenes*

Kyung-Soo Ko, In-Ok Heo, Jeong-Sam Koh* and Woon-Jin Lee**
Department of Agricultural Chemistry, *Department of Biology
Cheju National University and College of Pharmacy, Kyung-Hee University**

ABSTRACT

New methods have been developed to transform *Panax ginseng* with Ri plasmids of *Agrobacterium rhizogenes* 15834 and *A. rhizogenes* A4. Modified leaf disc method was made feasible to establish hairy root culture even when an axenic plantlet was not available as in the case of *P. ginseng*. The contents of ginsenosides(Rg1, Rf, Rc, Rb1, and Rb2) in hairy roots, were determined by HPLC. Hairy root cultures, established as liquid culture in MS medium, was produced 0.34~ 1.19% ginsenosides on dry weight basis, and this result is significantly higher level than that of normal *P. ginseng*.

서 론

식물세포 배양에 의한 유용물질 생산에 대한 연구는 anthocyanin, saponin, isoquinolinalkaloid, indolalkaloid, skikinin 유도체 등에서 검토되었으나, 목적하는 성분의 함량이 낮아서 실용화하기 위해서는 세포선택에 의한 생산성이 높은 주를 얻거나 생산성을 안정하게 유지하는데 필요한 연구가 있어야 할 것으로 보인다(1~8).

Rhizobiaceae에 속하는 *Agrobacterium*은 그림염성의 토양세균으로서 이 중에 *A. tumerfaciens*, *A. rhizogenes*, *A. rubi*, *A. radiobacter* 등이 연구의 대상이 되어 왔다. *A. tumerfaciens*는 외부로 부터의 감염원에 의해 식물종양(crown gall)을 만들고, *A. rhizogenes*는 감염부위에 모상근(hairy root)을 형성한다. 또한 *A. rubi*는 특징의 숙주에 종양을 만들지만 *A. radiobacter*는 병원성이 없는

특징을 가지고 있다(9). 병원성의 유무와 균체내에 180~240kb의 plasmid 존재는 균주의 특징을 나타내며, 병상에 따라 crown gall 혹은 teratoma를 유기하는 Ti tumor inducing) plasmid 또는 모상근을 유기하는 Ri root inducing) plasmid라 불리지고 있다(10). T-DNA 상에는 각각의 *Agrobacterium*만이 이용하는 비천연성 amino acid(opine이라 불리짐)을 합성하는 부위가 있으며, 이것이 조환되는 숙주는 이 amino acid를 합성한다(11, 12).

또한 agropine형 Ri plasmid를 갖는 *A. rhizogenes*는 높은 감염효율이 있는 병원미생물로 알려졌다(13). 이 plasmid 상에는 TL-DNA와 TR-DNA가 존재하고, agropine 합성에 관여하는 유전자는 TR-DNA 상에 있으며 auxin 합성효소 유전자가 존재함으로써 병원성의 원인으로 생각되고 있다(14, 15). 한편 agropine형 Ri plasmid

의 TL-DNA 상의 유전자에 대해서는 transposone에 의해 작성되는 부위지향형 돌연변이주를 사용한 실험에 의해 (rol root loci) A~D라고 불리는 4개의 기능유전자의 존재가 보고되었다(13, 16, 17). 즉 rol B, C, D 유전자중의 어느 하나가 불활성화된 Ri plasmid를 갖는 것에 의해 감염된 경우 모상근이 형성되지 않고 crown gall이 출현한다. 현재까지 수종의 식물에서 모상근이 얻어졌고, clone간의 형질이 크게 다르고 안정성도 있는 것으로 밝혀졌다(18, 19).

본 연구에서는 이와 같은 Ri plasmid를 사용하여 약용 식물의 모상근을 유도 및 배양함으로써 원래의 식물이 생산하는 2차대사산물이 생산될 것으로 여겨져, 특히 고대로부터 자양강장, 당뇨병 및 혈행개선 등에 유용한 인삼의 ginsenoside의 생산성을 검토하였다.

실험재료 및 방법

모상근의 유도

1) 재배하는 3년생 인삼을 화분에 옮겨 심은 후, *Agrobacterium rhizogenes* 15834와 *Agrobacterium rhizogenes* A4를 YEB배지에서 3일간 정치배양하여 direct infection법으로 처리하였다. 감염시킨 인삼은 습도를 적절히 유지하였을 때 감염부위에서 crown gall이 발생하였다. crown gall 조직을 잘라내어 증성세제로 씻은 후, 70% EtOH과 1% sodium hypochlorite로 표면살균하였다.

2) 또한 Leaf Disk법(20)에 의해 인삼의 줄기와 뿌리를 5~8cm 정도로 자른 후, 절편부위를 순간 접착제로 봉한 후 표면살균하여 *A. rhizogenes*를 direct infection법(21)으로 감염시켰다.

유도된 모상근은 claforan (Handok pharm, Co)이 300 mg/l 첨가된 MS30(30g/l sucrose Murashige and Skoog medium)배지에서 1주일 간격으로 2회 반복하여 정치배양하였다(Fig. 1).



Solid Culture (MS30)



Solid Culture (N30)



Liquid Culture (MS30)



Liquid Culture (IBA2KO1)

Fig. 1. Hairy root cultures of *Panax ginseng* transformed by *Agrobacterium rhizogenes*.

모상근의 배양

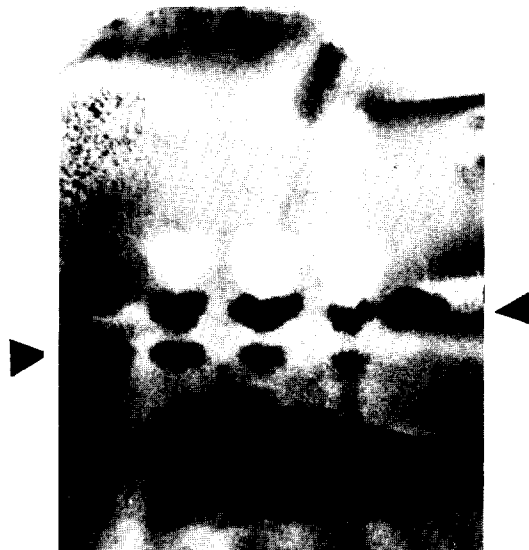
유도된 각 모상근은 hormone free의 MS30배지와 N30(sucrose Nitsch and Nitsch, 1969)배지 및 IBA 2ppm / 1과 Kinetin 0.1ppm / 1이 첨가된 IBA2 KOI MS30배지에서 정치배양과 진탕배양에 따라 모상근의 생장율을 검토하였다.

Opine의 확인

배양한 모상근을 분쇄한 후, 원심분리하고 상등액을 두께 3mm Whatman여과지에 점적한 후, formic acid: acetic acid: H₂O(30 : 60 : 910)을 완충액으로 하고 Orange와 methylene blue를 maker로 하여 등전점 전기영동하였다.

1) 0.5g AgNO₃을 0.5ml물에 녹여 250ml acetone에 혼합한다.

2) 20% NaOH 50ml와 EtOH 450ml을 사용전에 혼합한다.



M 6 7 8 A

Fig. 2. Paper electrophoretic analysis of extracts from hairy roots of *Panax ginseng*.
 lane M: Mannopine
 lane M: Agropine
 lane 6: Strain of Hairy root
 lane 7: Strain of Hairy root
 lane 8: Strain of Hairy root

3) 10% sodium thiosulfate와 1.5% sodium dimetasulfate을 혼합한다.

전기영동된 Whatman여과지는 1), 2), 3)의 용액에서 각각 1분, 10분, 20분 담구어 염색하였다(Fig. 2)

Ginsenoside의 정량

모상근 건량 100mg에 25ml 50% MeOH을 가하여 3시간 환류추출하는 조작을 2회 반복하였다. 추출액은 감압농축한 다음 aqueus layer를 ether로 2회, 포화 n-BuOH 로 2회 진탕추출하였다. BuOH층은 Fig. 3과 같이 XAD2로 중성당을 제거하였고, prepd. TLC로 ginsenoside를 정제한 후, Fig. 4와 같은 HPLC조건을 설정하여 정량하였다.

결과 및 고찰

모상근의 유도과 배양

모상근은 leaf disk개량법을 사용하여 쉽게 유도 되었다. 유도된 모상근은 N30(30g / 1 sucrose, Nitsch and Nitsch, 1969)배지를 사용하여 정치배양하였을 때는 callus 화하는 경향을 보였으며, MS30배지에서는 뿌리의 형태를 유지하였다. 또한 MS30과 IBA2KOI 배지에서 진탕배양한 모상근의 형태는 MS30 IBA2KOI배지에서 MS30 배지보다 가는 뿌리로 성장하였다(Fig. 1).

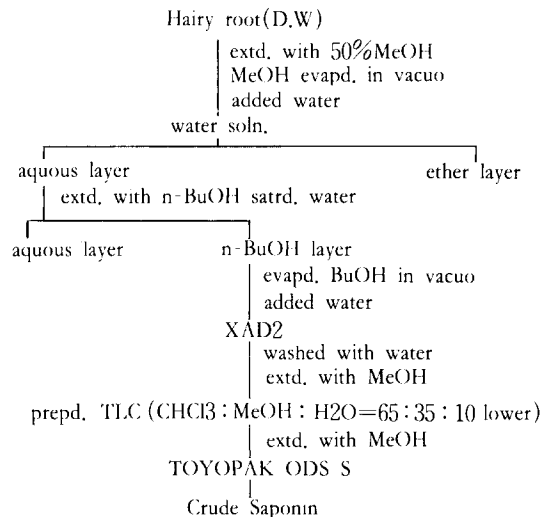


Fig. 3. Preparation method of crude saponine fraction in hairy roots.

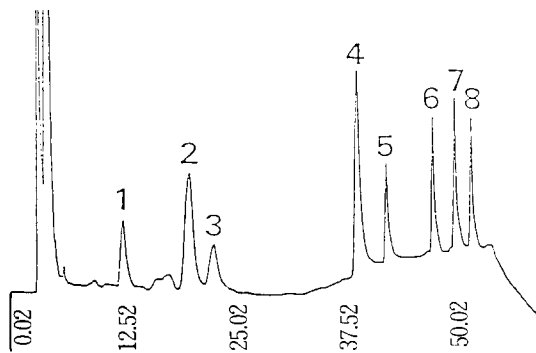


Fig. 4. HPLC analyses of ginsenosides were carried out on a LS-450NH2 column with a gradient elution of solvent system, MeCN: H₂O=93:17-77:23, and monitored with a detector at 203nm. Peaks: 1=Rg2; 2=Rg1; 3=Rf; 4=Rd; 5=Re; 6=Rc; 7=Rb2; 8=Rb1

30일 간격으로 6회 이상 계대배양하여 안정된 세계의 strain (6, 7, 8로 명명함)을 얻었다. 안정된 세계의 strain에 대해서는 전기영동 결과 agropine과 mannopine이 검출되어 형질전환체임을 확인하였다(Fig. 2).

각각의 strain을 정지배양 한 결과 MS30배지에서는 30일에 8.62배의 성장율을 보였고, N30배지에서는 callus화하는 경향을 보여 2~3배로 성장율이 저조하였다(Fig. 5). 또한 진탕배양에서는 hormone free의 MS30배지에서 가장 높은 성장율을 보여 30일만에 20.1배가 되었고, MS30 IBA2K0I 배지에서 7~12배였다(Fig. 6). 이는 Yoshikawa와 Furuya의 뿌리배양에서 hormone첨가 배지에서 성장율이 높아지는 것과는 달리 모상근은 hormone free배지에서 잘 분지하며 성장한다는 일반론과 일치하였다.

Ginsenoside의 생산

Ginsenoside의 생산에 대해서는 Rg1 group과 Rb1 group의 총 ginsenoside생산에 대한 보고(23)가 있으나, 본 실험에서는 gradient HPLC에 의해 Rg2, Rg1, Rf, Re, Rd, Rc, Rb2, Rb1을 한꺼번에 분석하는 방법을 사용하였다.

분석결과 정지배양에서의 ginsenoside생산은 MS30배지에서 chd 0.94%, N30배지에서 총 0.3%였다(Table 1). 이는 callus화하는 N30배지가 hormone free의 MS30배지

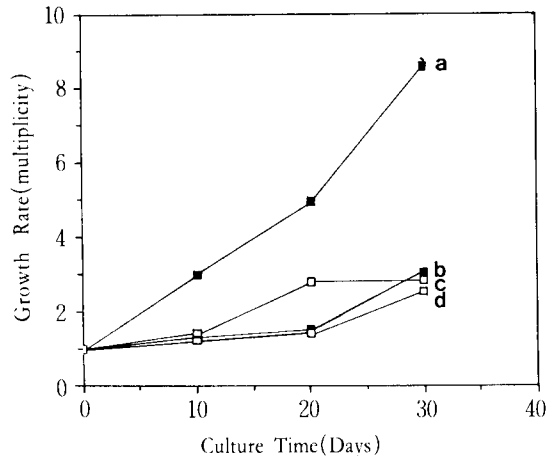


Fig. 5. Growth rate of *Panax ginseng* hairy roots in solid culture.
a: Strain from stem(MS30), b: Strain from root(N30),
c: Strain from stem(N30), d: Strain from root(MS30)

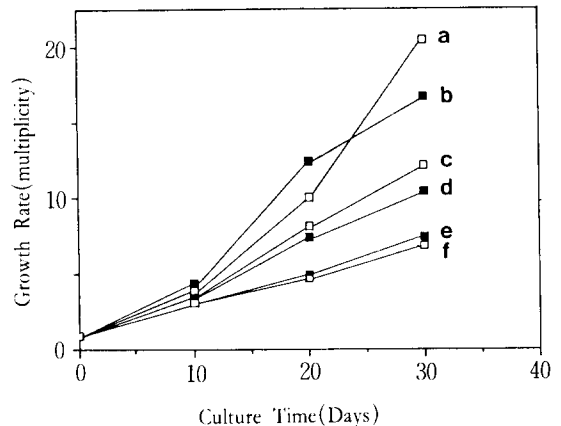


Fig. 6. Growth rate of *Panax ginseng* hairy roots in liquid culture.
a: Strain 6 (MS30), b: Strain 8 (MS30),
c: Strain 8 (MS30IBA2K0I)
d: Strain 6 (MS#)IBA2K0I
e: Strain 7 (MS30)
f: Strain 7 (MS30IBA2K0I)

Table 1. Contents of ginsenosides in hairy roots of *Panax ginseng* petridish culture

Sample	Contents of ginsenosides(%)						
	Rg2	Rg1	Re	Rd	Rc	Rb2	Rb1
HR(MS30)	0.11	0.17	0.45	0.02	0.06	0.02	0.11
HR(N30)	0.01	0.06	0.18	trace	0.01	0.02	0.10
Callus(MS30)	trace	0.01	0.08	0.01	0.01	0.01	0.02
White ginseng*							
A (Korea)		0.13	0.10	0.05	0.06	0.05	0.17
B (Japan)		0.37	0.14	0.04	0.25	0.13	0.36

MS: Murashige & Skoog(1962) medium N: Nitch and Nitch (1969) medium

* N. Nishimoto et al (1986) Shoyakugaku Zasshi 40(3), 345-351. HR: hairy roots.

Table 2. Contents of ginsenosides in hairy roots of *Panax ginseng* liquid culture

Sample	Contents of ginsenosides(%)						
	Total	Rg1	Re	Rd	Rc	Rb2	Rb1
HR6(MS30)	0.49	0.11	0.15	0.04	0.02	0.02	0.15
HR6(IBA2KO1)	1.18	0.08	0.15	0.19	0.07	0.13	0.56
HR7(MS30)	0.82	0.08	0.23	0.09	0.04	0.06	0.32
HR7(IBA2KO1)	0.78	0.11	0.22	0.15	0.03	0.04	0.23
HR8(MS30)	0.34	0.14	0.09	0.02	0.01	0.01	0.07
HR8(IBA2KO1)	0.31	0.11	0.07	0.02	0.01	0.03	0.07

MS: Murashige & Skoog(1962) medium HR: Hairy roots. IBA2KO1: 2 ppm / 1 IBA, 0.1 ppm / 1 kinetin

보다 낮은 ginsenoside 함량을 생산하고 있으며, 또한 모상근은 인삼의 ginsenoside 생산과 같이 조직배양에서도 형태형성과 2차대사물질의 생산에 밀접한 관계가 있다고 판단된다. 특히 인삼의 모근의 주성분인 Re가 모상근에서도 주성분인 점은 공통되었다(Table 1).

또한 각각의 strain에 대하여 MS30배지와 MS30 IBA2 KO1배지에서 진탕배양한 후 모상근의 ginsenoside의 함량을 분석한 결과, HR6의 strain을 MS30 IBA2KO1배지에서 배양한 것이 1.18%로 가장 많은 생산량을 보였고, 생산율이 가장 좋은 HR6을 MS30배지에서 배양한 것이 0.49%였다(Table 2). 이는 인삼조직배양에 관한 다른 strain의 배양에서 0.3~0.8%의 ginsenoside를 생산하였다는 Yoshikawa와 Furuya,(22) 自生堂에서 보고한 내용과 비교하여 보았을 때 본 연구결과는 매우 좋은 성과라고 할 수 있다(Table 2).

요 약

인삼의 조직에 *Agrobacterium rhizogenes* strain 1583 4와 A4을 감염하여 형질전환체를 얻었다. 이는 인삼에 서처럼 무관식물을 얻기 어려운 경우 leaf disk 방법으로 모상근을 유도할 수 있었다. 모상근의 ginsenoside(Rg2, Rg1, Rf, Rd, Rc, Rb1, and Rb2)는 HPLC에 의해 定量하였으며, 진탕배양한 모상근의 ginsenoside의 함량은 0.34-1.19% 건량이였다. 이러한 결과는 재배 인삼과 배양 인삼의 ginsenoside의 함량에 비해 좋은 성과라고 사료된다.

참 고 문 헌

1. E. W. Nester et al(1985), *Bio/Technology*, **3**, 637.
2. A. C. Brown(1947), *Am J. Bot.*, **34**, 234.
3. G. An et al(1985), *EMBO J.*, **4**, 277.
4. 牧野(1987). 組織培養(日本), **13**(6), 199.
5. I. Zaenen, N. Van Larebeke, H. Teuchy, M. Van Montague and J. Schell(1974). *J. Mol. Biol.*, **86**, 109.
6. P. J. J. Hooikaas and R. A. Schilperoort(1986). Recognition in Microloplant Symbiotic and Rathogenic interactions, ed. by B. Lugtenberg, Springer-verlag, 189.
7. N. S. Yadav(1986). Differentiation of Protoplasts and Transformed Cells, ed. by J. Reiuert and H. Binding, Springer-Verg, 109.
8. A. De Paolis et al(1985). *Plasmid*, **13**, 1
9. J. Schell, M. Van montagu, M. De Beuckeleer, M. De Block, A. Depicker, M. De wilde, G. Eugler, C. Genetello, J. P. Hernalsteens, M. Holsters, J. Scurinck, B. Silva, F. Van Vilet and R. Villarroel(1979), *Proc. R. Soc. Lond.*, **204**, 251.
10. 牧野(1989). 植物組織培養(日本), **6**(1), 1
11. M. J. J. Van Harren et al(1986) Recognition in Microloplant Symbiotic and Rathogenic Interactions, ed. by B. Lugtenberg, Springer-verlag, 203
12. M. J. J. Van Harren et al(1987). *Plant Mol. Biol.*, **8**, 95.
13. I. Spano et al (1987). *Theor Appl. Genet.*, **73**, 523.
14. M. Tabata et al (1972). *Phytochem.*, **11**, 949.
15. Y. Yamada et al (1982), *Plant Cell Report*, **3**, 186.
16. E. Rugini(1984). Abstract in 41st Conference in the Easter School Series in Agricultural Science, University of Nottingham, 83.
17. E. Rugini(1986). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 1, Terrs 1, ed. by Y. P. S. Bajaj, Springer-Verlag, 253-267.
18. T. Endo et al(1985), *Phytochem.*, **24**, 1233.
19. T. Zito et al(1982), *Plant Med*, **45**, 53.
20. M. D. Chilton et al(1982), *Nature*, **295**, 432.
21. K. S. Ko et al (1988). *Chem. Pharm. Bull.*, **36**(10), 4217.
22. T. Yoshikawa and T. Furuya(1987). *Plant Cell Report*, **6**, 449.
23. P. Pietta and P. Mauri(1986). *J. Chromatogr.*, **356**, 212.
24. K. S. Ko et al(1989). *Chem. Pharm. Bull.*, **37**(1), 245.

(Received; August 8, 1990, Revised; October 16, 1990.

Accepted; November 30, 1990)