

## 2段階 培養方法을 이용한 人蔘 毛狀根의 大量培養과 Ginsenoside 生産

高 庚 珉·梁 德 春<sup>1</sup>·朴 芝 昶<sup>1</sup>·崔 康 注<sup>1</sup>·崔 光 泰<sup>1</sup>·黃 栢\*

全南大學校 生物學科 및 호르몬研究센터, 韓國人蔘煙草研究院

인삼의 모상근 HRB-15 clone을 3 L 용량의 생물반응기에서 배양하여 ginsenoside 생산량을 증진시킬 수 있는 방법을 찾고자 본 연구를 수행하였다. 모상근을 광배양하면 암배양에 비해 생장이 30% 정도 억제되지만 ginsenoside 함량(ginsenoside-Rb<sub>1</sub>, -Rb<sub>2</sub>, -Rc, -Rd, -Re, -Rg<sub>1</sub>)은 크게 증가되어 암배양시보다 2배 높은 1.10%로 나타났으며, 이때에는 ginsenoside-Re의 함량이 매우 높은 반면 다른 ginsenoside들의 함량은 암배양시보다 다소 감소하는 경향이였다. 또한 초기 10일간 암배양한 후 20일간 광배양하는 방법을 기준으로 sodium acetate를 농도별로 처리하여 본 결과, sodium acetate의 농도가 증가할수록 모상근의 생장이 억제되고 ginsenoside 함량도 감소하였으며, 배양배지내 인산의 농도를 변화시켜 본 결과, 1.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 처리가 모상근의 성장과 ginsenoside 함량 모두에서 가장 높게 나타났다. 한편 모상근의 성장과 ginsenoside 함량을 증가시키기 위해 yeast elicitation과 ammonium nitrate를 이용한 2단계 배양방법(two-step culture process)을 개발하였다. Elicitor로서 50 µg/g yeast extract를 배양 20일째(광배양 10일째)에 첨가하여 본 결과, 총 ginsenoside 함량은 1.15%, 모상근의 생장은 암배양보다 21% 감소하였다. 또한 배양배지 성분중 ammonia를 제거하면 ginsenoside-Rd (0.27%)와 -Rc의 함량이 크게 증가하여 총 ginsenoside 함량은 암배양의 2.5배인 1.26%, 모상근의 생장은 암배양에 비해 10% 정도만 감소하여 모상근의 성장과 ginsenoside 생산 모두에서 상승된 효과를 보여주었다. 따라서 2단계 배양방법은 인삼 모상근의 대량배양을 통해 이차대사산물인 ginsenoside 생산량을 증가시킬 수 있는 하나의 좋은 방법으로 생각된다.

주요어: 모상근, 2단계 배양방법, 진세노사이드, 효모 추출 elicitor

모상근 배양기술을 이용한 2차대사산물의 생산 연구는 모상근이 지니는 여러가지 장점, 즉 유전적, 생화학적 안정성, 빠른 성장속도, 모식물체와 동일한 유용산물 합성능력 등이 밝혀짐에 따라 배양조건을 최적화하여 목적하는 산물의 생산량을 증가시키거나, 이를 점차적으로 상업적 공정에 응용하려는 연구가 현재 진행되고 있다(Ahkam Subroto and Doran, 1994; Downs et al., 1994; Jung et al., 1994; Granicher et al., 1995). 이러한 상업화의 추세에 따라 최근에는 식물재료(캘러스, 현탁배양 세포, 부정아, 부정근, 모상근, 미분화된 개체 등)의 대량배양을 통한 여러가지 산물 및 유식물체 생산기술이 발달되고 있으며, 이때에는 생물반응기 내에서 mixing, sampling, aeration ratio 등이 세포의 성장과 2차대사산물의 합성에 주요한 요인으로 작용한

다. 따라서 scale-up에는 세심한 계획이 요구된다고 할 수 있다(Taya et al., 1992; Asaka et al., 1994; Jay et al., 1994).

생물반응기를 통한 모상근의 대량배양은 몇가지 식물의 모상근을 이용하여 반응기 형태와 용량 및 변수 등에 따른 모상근의 성장특성 조사(Kondo et al., 1989), 지치(*Lithospermum erythrorhizon*) 모상근의 airlift형 reactor 배양을 통한 220일 동안의 지속적인 shikonin 생산(Shimomura et al., 1991), 그리고 일일초(*Catharanthus roseus*) 모상근의 bubble column reactor 배양을 통한 catharanthine 생산성 증가(Liu et al., 1995) 등 다각적인 연구가 진행되고 있다.

또한 인삼(*Panax ginseng*)의 경우는 캘러스로 부터 유용물질 고생산성 세포주를 선발한 후 2-20톤 생물반응기에 배양하여 드링크제, 비누, 향료 등으로 상품화시켜 판매하고 있으며(Furuya and Ushiyama, 1994), 이러한 연구를 기반으로 모상근의 생물반응기 배양을

\*교신저자: Fax (062) 520-6872  
© 한국식물학회 [서울] 1996

통한 saponin 생산 뿐만 아니라 (RS)-2-phenylpropionic acid(PPA)로 부터 계속적으로 glycosides를 합성시켜 목적하는 물질을 대량생산하는 기술 개발 등 모상근을 다방면의 연구에 활용하고 있다(Yoshikawa, 1995). 그러나 아직까지도 생물반응기 배양을 통한 2차 대사산물의 대량생산에 대한 연구는 미흡한 실정이라 할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 100-500 mL 용량의 플라스크 배양을 통해 확립된 인삼 모상근의 배양 기술을 기반으로(Hwang *et al.*, 1991; Ko *et al.*, 1993a, b, 1994; Lee *et al.*, 1994), 생물반응기(3 L)를 이용한 모상근의 대량배양과 2차대사산물의 생산능을 증가시킬 수 있는 여러가지 방법들을 조사하여 scale-up 가능성을 타진하는 기본적 자료를 제공하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 고성장능 모상근 clone의 선발과 배양

MS(Murashige & Skoog, 1962) 고형배지(pH 5.8, 3% sucrose)에서 1년 이상 계대배양된 HB3-10 clone(Lee *et al.*, 1994)의 모상근으로부터 새로운 clone을 선발하고자 인위적으로 60개의 모상근을 선택하였으며, 모상근 각각은 근단으로부터 1 cm 크기로 잘라 45일 동안 암배양하여 가장 빠른 성장능을 보유했던 모상근 clone을 선발하였다. 이후 확보된 모상근은 회전식 진탕배양기(50 rpm)를 사용하여 동일조성의 액체 배지(생장배지)가 함유된 100 mL (25 mL의 배지) 플라스크에서 배양, 증식시켰으며, 다시 500 mL (100 mL의 배지) 플라스크로 옮겨 암상태(21°C)에서 20일간격으로 계대배양하였다.

### 반응기 형태와 배양조건

반응기는 3 L 용량이며 자체 제작하여 사용하였다. 즉 반응기내의 밑바닥은 2개의 ring sparger로 통기시키고 바닥에서 1.5 cm 높이로 직경 1.0 mm의 스테인레스망을 부착하였으며 반응기의 공기유출속도는 0.5 L/min, 사용한 배지의 양은 2.4 L (MS배지, 3% sucrose), pH 5.5(멸균 후)로 설정하였다. 선발된 고성장능 모상근 clone의 초기 접종량은 1.35 g(건중량), 전체 배양일수는 30일로 한정하였고, 연구목적에 따라 16/8 광주기(1,000 lux, F36W cool white 133, Sylvania GTE)조건과 암조건(21°C)을 혼용하여 배양방법

을 세분화시켰다.

### 광처리 기간의 효과

암조건의 반응기에서 새로운 배지를 첨가하여 15일간 성장한 모상근을 동량씩 취한 다음 새로운 반응기로 옮겨 배양하였으며, 16/8의 광주기 조건으로 광조사 기간을 0, 10, 20, 30일로 정하였다. 또한 모상근의 성장과 ginsenoside 함량 조사는 Lee 등(1994)의 방법에 따랐다.

### 인산 농도 변화, sodium acetate 처리 효과

MS 배지의 기본 인산 농도인 1.25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 기준으로 0, 0.63, 2.5 mM로 인산 농도를 변화시켰으며, 2차대사의 전구물질인 sodium acetate는 10, 20, 40 mM을 배양배지에 첨가하여 주었다. 배양방법은 암조건으로 10일간 배양 후 광조건으로 20일간 배양하여 전체 배양일수를 30일로 하였으며 광주기와 모상근의 성장률, 그리고 ginsenoside 함량 조사는 위와 동일한 과정으로 수행하였다.

### 2단계 배양방법(Two-step culture process)

MS 배지를 사용하여 배양중인 모상근을 위의 배양방법과 동일하게 암조건으로 10일, 광조건으로 20일간 배양하는 방법을 1단계로 설정하고, 배양 21일째부터 총질소 농도를 변화시키거나 elicitor를 첨가시켜 2단계 배양방법을 수행하였다. 전체 배양 과정 중의 총질소 농도는 60 mM ( $20.6 \text{ mM NH}_4^+$ ,  $39.4 \text{ mM NO}_3^-$ )을 기준으로 하였고, 질소 농도의 변화에는  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 를 사용하여 배지내 총질소농도를 18.8 mM ( $-\text{NH}_4^+$ , 18.8 mM  $\text{NO}_3^-$ ), 39.4 mM ( $10.3 \text{ mM NH}_4^+$ ,  $29.1 \text{ mM NO}_3^-$ ), 101.2 mM( $41.2 \text{ mM NH}_4^+$ ,  $60.0 \text{ mM NO}_3^-$ )로 조절하였다. 또한 yeast elicitor(Difco사)는 한국인삼연초연구원에서 제조한 yeast extract를 12.5, 25, 50, 75  $\mu\text{g/g}$ (fr wt)씩 처리하여 2단계 배양방법이 모상근의 성장과 ginsenoside 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 고성장능 모상근 clone의 선발

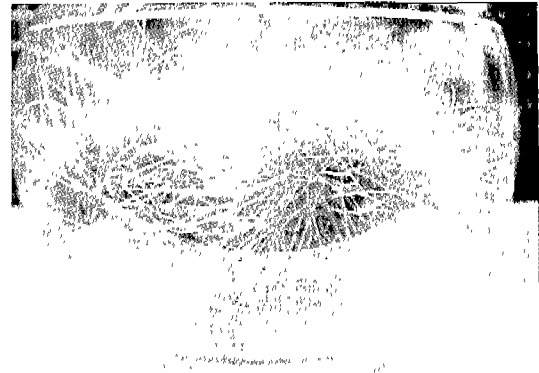
HB3-10 clone의 모상근 60개를 근단으로부터 약 1

cm의 크기로 잘라 MS 고형배지상에서 45일간 암배양한 결과, 대부분의 모상근 clone들은 성장능과 외부형태가 서로 유사하게 나타났으나 이중에서 성장능이 우수한 1개의 clone, 즉 HRB-15 clone이 관찰되어 이를 고성장능 clone으로 선발하였다(Fig. 1). 이 경우 선발된 clone과 다른 clone들과의 성장비는 1.4:1의 비율을 보였으며(자료미제시), 확보된 clone은 액체배양으로 증식시켜 점차 배양 용기의 크기를 증가시켰으며 3 L 반응기에 적응시켰다.

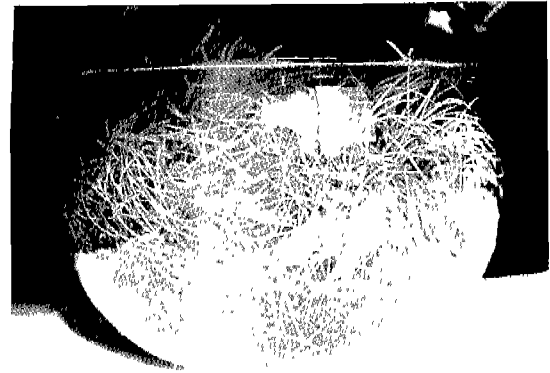
**광처리 기간에 따른 모상근의 성장과 ginsenoside 함량 변화**

반응기를 이용하여 30일 동안 암조건과 광조건에서 성장한 모상근은 Fig. 2와 Fig. 3에 각각 보여주고 있으며, 암조건에서 배양한 결과를 대조구로 선정하고 광처리 기간에 따른 모상근의 성장과 ginsenoside 함량 변화를 조사한 결과(Table 1), 모상근의 성장이 10일간의 광조건에서 8.38 g으로 암조건 9.37 g에 비해 약 11% 억제되었으며, 광처리 기간이 길어질수록 성장억제 효과가 뚜렷하게 나타나 배양 전체과정을 광조건으

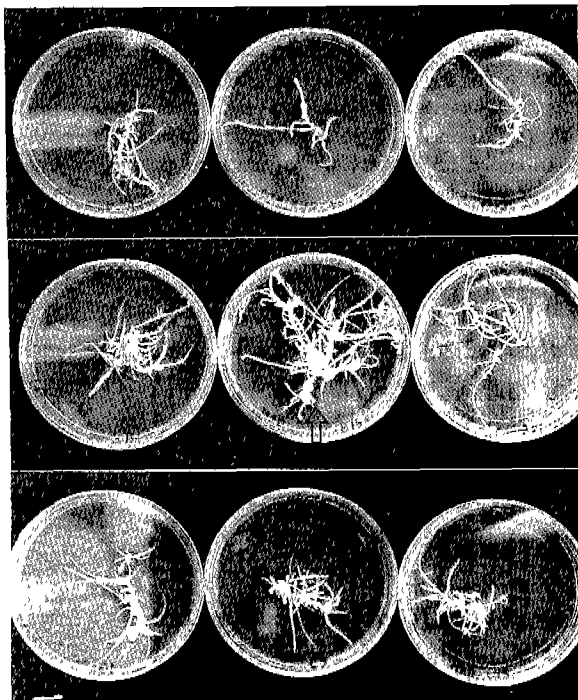
로 수행할시에는 성장이 약 30% 억제되었다. 그러나 광의 조사는 ginsenoside 함량에 많은 변화를 주어



**Fig. 2.** Hairy roots cultured in bioreactor with air bubbles in the dark conditions for 30 days. Approximately 1.35 g (dry wt) of hairy roots were inoculated into the liquid medium.



**Fig. 3.** Hairy roots cultured in bioreactor with air bubbles in the light conditions (1,000 lux, 16/8 photoperiod) for 30 days. Approximately 1.35 g (dry wt) of hairy roots were inoculated into the liquid medium.



**Fig. 1.** Ginseng hairy root clones cultured on MS agar medium for 45 days. The first inoculum size was a ca. 1 cm from root tip. Arrow indicates the hairy root clone of HRB-15.

**Table 1.** The growth and ginsenoside content of ginseng hairy roots cultured in different illumination time using a 3 L bioreactor with air bubbles

Clone	Growth (g) dry wt	Content of ginsenosides (%)						
		Rb <sub>1</sub>	Rb <sub>2</sub>	Rc	Rd	Re	Rg <sub>1</sub>	TG
HRBD <sup>a</sup>	9.37	0.14	0.03	0.04	0.04	0.18	0.08	0.51
HRB10L <sup>b</sup>	8.38	0.14	0.05	0.09	0.05	0.32	0.11	0.76
HRB20L <sup>b</sup>	7.84	0.15	0.09	0.10	0.04	0.35	0.10	0.83
HRB30L <sup>b</sup>	6.52	0.11	0.09	0.11	0.09	0.58	0.12	1.10

<sup>a</sup>Hairy roots cultured in the dark conditions for 30 days; <sup>b</sup>Hairy roots cultured in the light conditions (1,000 lux, 16/8 photoperiod) for 10, 20, 30 days, respectively; Approximately 1.35 g (dry wt) of hairy roots were inoculated into the liquid medium.

30일간의 광조건에서는 암조건의 0.51%에 비해 2배 이상 증가된 1.10%의 함량을 나타냈으며, 특히 ginsenoside-Re의 함량이 현격히 증가한데 반하여 다른 성분들의 함량이 상대적으로 다소 감소하여 빛에 대하여 가장 민감하게 영향을 받는 성분은 ginsenoside-Re로 나타났다. 이러한 광처리에는 *Leontopodium alpinum*, *Hyoscyamus albus* 등(Sauerwein *et al.*, 1992; Hook, 1994) 몇몇 식물의 모상근 배양에서 생장과 대사산물의 생합성능을 증가 또는 감소시키는 효과가 있음이 입증되었는데, 인삼 사포닌의 경우는 디올계 사포닌(protoanaxadiol-saponin)과 트리올계 사포닌(protoanaxatol-saponin)의 조성비율에 의해 약리효능이 결정되므로(Lim *et al.*, 1981), 자연재배 인삼과 기내배양한 모상근이 보유하는 사포닌의 조성비율이 일정하게 유지되어야 한다. 따라서 대량배양에 따른 모상근의 생장과 물질생산능과의 관계를 고려하여 볼때, 본 연구에서의 최적 광처리 기간은 암조건에 비해 모상근의 생장이 16% 감소되나 ginsenoside 함량은 1.6배 증가되어 0.83%로 나타난 20일이 가장 적합하다고 판단된다.

### 인산 농도 변화, sodium acetate 처리 효과

인산의 농도변화가 모상근의 생장과 ginsenoside 생산에 미치는 영향을 조사한 결과, MS 기본배지의 인산농도인 1.3 mM 처리구에서 모상근의 생장과 물질생산능이 가장 높았으며, 농도를 증, 감시킨 경우에는 모상근의 생장 뿐만 아니라 ginsenoside 함량도 감소시켰다(Table 2). 일반적으로 모상근 배양을 통해 물질생산능을 증가시키는 방법으로 인산을 처리하지 않거나 인산 농도를 감소시켜 배양하는 경우가 많은데 이때에는 모상근의 생장이 둔화되는 경향을 보인다. 그러나 betanin과 catharanthine 생산에 있어서는 모상근의 생장과 물질생산능 모두를 향상시킬 수 있었다(Jung *et al.*, 1994; Taya *et al.*, 1994). 따라서 본 연구에서는 이 점에 착안하여 인산의 농도를 조절하였으나 모상근의 생장과 물질생산능 모두가 현저히 억제되는 결과를 나타내었다. 또한 sodium acetate를 농도별로 배양배지에 첨가시킨 결과, 20 mM 처리구가 미처리구와 비슷한 ginsenoside 함량을 나타내었으나, 전반적으로 모상근의 생장과 물질생산능을 억제되었다(Table 3). Saponin의 생합성 과정은 acetate→mevalonate→squalene→sapogenin→saponin 경로가 존재하여 동물계에서의 sterol 합성 과정과 유사할 것으로 예측되는

**Table 2.** The effect of potassium dihydrogenphosphate on the growth and ginsenosides content of ginseng hairy roots cultures using a 3 L bioreactor with air bubbles

Clone	Growth (g) dry wt	Content of ginsenosides (%)						
		Rb <sub>1</sub>	Rb <sub>2</sub>	Rc	Rd	Re	Rg <sub>1</sub>	TG
PL-0 <sup>a</sup>	4.89	0.13	0.04	0.04	0.04	0.27	0.09	0.61
PL-1 <sup>b</sup>	6.82	0.14	0.03	0.06	0.05	0.30	0.11	0.69
PL-2 <sup>c</sup>	7.84	0.15	0.09	0.10	0.04	0.35	0.10	0.83
PL-3 <sup>d</sup>	7.37	0.13	0.05	0.04	0.05	0.33	0.08	0.68

The hairy roots were cultured in the light conditions for 20 days after 10 days dark cultures with different concentration of potassium dihydrogenphosphate(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>); <sup>a,b,c,d</sup>indicated that the hairy roots cultured with 0, 0.63, 1.25 and 2.50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in MS liquid medium, respectively; Approximately 1.35 g (dry wt) of hairy roots were inoculated into the liquid medium.

**Table 3.** The effects of sodium acetate on the growth and ginsenoside content of ginseng hairy roots cultured in the light conditions using a 3 L bioreactor with air bubbles

Clone	Growth (g) dry wt	Content of ginsenosides (%)						
		Rb <sub>1</sub>	Rb <sub>2</sub>	Rc	Rd	Re	Rg <sub>1</sub>	TG
HRBL <sup>a</sup>	7.84	0.15	0.09	0.10	0.04	0.35	0.10	0.83
SAL10 <sup>b</sup>	7.82	0.11	0.04	0.09	0.04	0.35	0.06	0.69
SAL20 <sup>b</sup>	7.16	0.14	0.04	0.11	0.06	0.38	0.06	0.79
SAL40 <sup>b</sup>	6.23	0.12	0.04	0.09	0.05	0.34	0.07	0.71

<sup>a</sup>Hairy roots cultured in the light conditions for 20 days after 10 days dark cultures; <sup>b</sup>Hairy roots cultures treated with 10, 20 and 40 mM sodium acetate, respectively; Approximately 1.35 g (dry wt) of hairy roots were inoculated into the liquid medium.

데(Joo *et al.*, 1983; Hong *et al.*, 1987), acetate가 2차대 사과정에서 다양한 물질의 합성에 관여하므로(Payne *et al.*, 1992) 인위적으로 공급된 acetate가 ginsenoside 합성 경로에 이용되기 보다는 활성화된 다른 물질의 합성 경로에 이용되었을 것으로 추정할 수 있다. 따라서 배양기간을 한정하여 생산물의 양을 증가시키고자 할 때에는 목적하는 물질 생산에 근접한 전구물질을 사용하는 방법이 타당하리라 사료된다.

### 2단계 배양방법(Two-step culture process)의 효과

암조건으로 10일, 광조건으로 20일간 배양하는 방법을 1단계로 설정하고, 배양 21일째에 yeast extract elicitor를 농도별로 첨가시켜 2단계 배양을 수행한 결과, elicitor의 농도가 증가함에 따라 ginsenoside 함량도 증

**Table 4.** The effects of yeast elicitation on the growth and ginsenosides content of ginseng hairy roots cultures by two-step process using a 3 L bioreactor with air bubbles

Clone	Growth (g) dry wt	Content of ginsenosides (%)						
		Rb <sub>1</sub>	Rb <sub>2</sub>	Rc	Rd	Re	Rg <sub>1</sub>	TG
YE-0 <sup>a</sup>	7.84	0.15	0.09	0.10	0.04	0.35	0.10	0.83
YE-1 <sup>b</sup>	7.68	0.17	0.13	0.12	0.04	0.46	0.11	1.03
YE-2 <sup>c</sup>	7.55	0.18	0.12	0.09	0.04	0.50	0.10	1.03
YE-3 <sup>d</sup>	7.43	0.26	0.11	0.12	0.03	0.55	0.08	1.15
YE-4 <sup>e</sup>	7.35	0.13	0.09	0.09	0.03	0.44	0.08	0.86

The hairy roots were cultured in the light conditions for 20 days after 10 days dark cultures; The elicitor was added on 20 days from initial cultures as two-step process; <sup>a,b,c,d,e</sup> indicated that the hairy roots cultured with 0, 12.5, 25, 50 and 75 µg of yeast elicitor per g of hairy root fresh weight in MS liquid medium, respectively; Approximately 1.35 g (dry wt) of hairy roots were inoculated into the liquid medium.

가하여 50 g/g (fr wt) 처리구에서 1.15%의 함량을 나타내었으며 그 이상의 농도를 처리하였을 때는 ginsenoside 함량이 다시 감소하였다. 이때 첨가하는 elicitor의 농도가 높아짐에 따라 모상근의 생장은 억제 되었으며 50 g/g (fr wt) 처리구의 경우도 암배양에 비해 21% 정도 억제되었다(Table 4). 모상근 배양시 2차 대사산물의 생산능력을 증진시키는 elicitor에 대한 연구는 *Hyoscyamus muticus* 배양에 의한 tropane alkaloids, *Bidens sulphureus* 배양에 의한 polyacetylenes, *Tagetes patula* 배양에 의한 thiophene 등의 생산량 증가를 들수있다(Flores and Medina-Bolivar, 1995). 특히 *Hyoscyamus muticus* 배양시에는 elicitor를 처리한 후 24-48시간내에 solavetivone과 lubimin이 유도되었다. 또한 *Catharanthus roseus* 모상근 배양시에는 fungal elicitor (10 mg/l)의 종류에 따라 indole alkaloids의 생산량이 다르게 나타나지만 일반적으로 모상근의 생장과 alkaloid 생산을 증진시켰는데(Sim *et al.*, 1994), 본 연구에서도 적정 농도의 elicitor 처리는 ginsenoside 생산량을 증가시킬 수 있는 하나의 좋은 방법임을 알 수 있었다. 한편 반응기내 배양배지의 성분중 총질소 농도와 질소원의 종류를 배양 21일째에 변화시켜 2단계 배양을 수행한 결과, 총질소 농도가 18.8 mM로써 질소원으로 암모니아가 없이 nitrate 단독으로 조성시켰을 경우에 ginsenoside 함량이 1.26%로 크게 증가되었으며, 모상근의 생장은 암배양에 비해 약 10% 정도만 감소하였다(Table 5). 이러한 결과는 지치(*Lithospermum erythrorhizon*)의 모상근 배양시 높은 농도의 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>는

**Table 5.** The effects of nitrogen (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) concentration on the growth and ginsenosides content of ginseng hairy roots cultures by two-step process using a 3 L bioreactor with air bubbles

Clone	Growth (g) dry wt	Content of ginsenosides (%)						
		Rb <sub>1</sub>	Rb <sub>2</sub>	Rc	Rd	Re	Rg <sub>1</sub>	TG
NS-0 <sup>a</sup>	8.47	0.16	0.11	0.21	0.27	0.41	0.10	1.26
NS-1/2 <sup>b</sup>	7.84	0.15	0.06	0.09	0.14	0.45	0.12	1.03
NS-1 <sup>c</sup>	7.84	0.15	0.09	0.10	0.04	0.35	0.10	0.83
NS-2 <sup>d</sup>	7.27	0.27	0.08	0.06	0.03	0.31	0.11	0.86

The hairy roots were cultured in the light conditions for 20 days after 10 days dark cultures; In the first the ammonium:nitrate ratio (20.6:39.4) was maintained as in the MS basal medium for 20 days. In a second series the NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ratio was changed to <sup>a</sup>0+18.8, <sup>b</sup>10.3+29.1, <sup>c</sup>20.6+39.4 and <sup>d</sup>41.2+60.0 mM for 10 days; Approximately 1.35 g (dry wt) of hairy roots were inoculated into the liquid medium.

shikonin 생산을 억제하며 암모니아가 없는 배지내에서 모상근의 생장이 빠르고 shikonin 생산량이 크게 증가되는 경우(Shimomura *et al.*, 1991)와 *Hyoscyamus muticus* 모상근 배양시 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>의 비율이 높을수록 모상근의 생장과 hyoscyamine 생산이 억제되는 경우(Sevon *et al.*, 1992; Oksman-Caldentey *et al.*, 1994) 등과 매우 일치하고 있다. 따라서 인삼 모상근의 대량배양 방법을 목적 산물의 생산과 연계시킬 때는 질소원으로 암모니아가 하나의 핵심 요소가 되며 이를 적절히 이용할 필요가 있겠다.

사 사

본 연구는 한국과학재단의 1995년도 국내 Post Doc. 연구비 지원과 호르몬연구센터 연구비 지원에 의해 수행되었음.

인 용 문 헌

Ahkam Subroto, M. and P.M. Doran. 1994. Production of steroidal alkaloids hairy root of *Solanum aviculare* and the effect of gibberellic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* **38**: 93-102.

Asaka, I., I. Ii, M. Hirotsu, Y. Asada, T. Yoshikawa and T. Furuya. 1994. Mass production of ginseng (*Panax ginseng*) embryoids on media containing high concentrations of sugar. *Planta Medica* **60**: 146-148.

Downs, C.G., M.C. Christey, D. Maddocks, J.F. Seelye and D.G. Stevenson. 1994. Hairy roots of *Brassica napus*: I. Applied glutamine overcomes the effect of

- phosphinothricin treatment. *Plant Cell Rep.* **14**: 37-40.
- Flores, H. and F. Medina-Bolivar.** 1995. Root culture and plant natural products: "unearthing" the hidden half of plant metabolism. *Plant Tissue Cult. and Biotechnol.* **1**: 59-74.
- Furuya, T. and K. Ushiyama.** 1994. Ginseng production in cultures of *Panax ginseng* cells. In *Biotechnological Application of Plant Cultures*. P.D. Shargool and T.T. Ngo (eds.), CRC Press, USA. pp. 1-22.
- Granicher, F., P. Christen and I. Kapetanidis.** 1995. Production of valepotriates by hairy root cultures of *Centranthus ruber* DC. *Plant Cell Rep.* **14**: 294-298.
- Hong, S.J., Y.W. Lee and C.N. Joo.** 1987. Biosynthesis of saponins in *Panax ginseng*. *Kor. J. Ginseng Sci.* **11**: 136-144.
- Hook, I.** 1994. Secondary metabolites in hairy root cultures of *Leontopodium alpinum* Cass. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* **38**: 321-326.
- Hwang, B., K.M. Ko, K.H. Hwang, S.J. Hwang and Y. H. Kang.** 1991. Production of saponin by hairy root cultures of ginseng (*Panax ginseng* C.A Meyer) transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Kor. J. Bot.* **34**: 289-296.
- Jay, V., S. Genestier and J.C. Courduroux.** 1994. Bioreactor studies of the effect of medium pH on carrot somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* **36**: 205-209.
- Joo, C.N., H.S. Kwak, H.B. Lee and C.H. Lee.** 1983. Biosynthesis of saponins in *Panax ginseng* C.A. Meyer. I. Probable sites of the biosynthesis of ginseng saponin from acetate. *Kor. J. Ginseng Sci.* **7**: 108-114.
- Jung, K.H., S.S. Kwak, C.Y. Choi and J.R. Liu.** 1994. Development of two stage culture process by optimization of inorganic salts for improving catharanthine production in hairy root cultures of *Catharanthus roseus*. *J. of Ferment. and Bioeng.* **77**: 57-61.
- Ko, K.M., J.J. Song, B. Hwang and Y.H. Kang.** 1993a. Cytogenetic and histological characteristics of ginseng hairy root transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Kor. J. Bot.* **36**: 75-81.
- Ko, K.M., J.C. Ahn, S.J. Hwang, Y.H. Kang and B. Hwang.** 1993b. Production of secondary metabolites from hairy root of *Panax ginseng* transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. II. Improvement of saponin contents and mass cultures of ginseng hairy root. *Kor. J. Plant Tissue Cult.* **20**: 41-46.
- Kondo, O., H. Honda, M. Taya and T. Kobayashi.** 1989. Comparison of growth property of carrot hairy root in various bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 291-294.
- Lee, J.S., K.M. Ko, J.C. Ahn, D.G. Bai, K.Y. Park, S. R. Ko and B. Hwang.** 1994. High yield saponin production by mass cultures of ginseng transformed tissue. I. Induction, culture of transformed tissue and selection of high-saponin-producing clones in ginseng. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **9**: 157-164.
- Lim, C.J., E.H. Park and S.K. Hong.** 1981. Comparative studies on the effects of total, protopanaxadiol and protopanaxatriol saponins of ginseng. I. Their effects on lipid and glucose content in rat serum. *Kor. J. Ginseng Sci.* **5**: 192-199.
- Liu, J.R., K.H. Jung and S.S. Kwak.** 1995. Production of indole alkaloids in cell and hairy root cultures of *Catharanthus roseus*. In *Production of Useful Secondary Metabolites from Plants, '95 Symposium of Plant Science, Korea*. pp. 27-39.
- Murashige, T. and F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.
- Oksman-Caldentey, K.M., N. Sevon, L. Vanhala and R. Hiltunen.** 1994. Effect of nitrogen and sucrose on the primary and secondary metabolism of transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* **38**: 263-272.
- Payne, G., V. Bringi, C. Prince and M. Shuler.** 1992. *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid System*. Hanser Publishers, New York. pp. 25-45.
- Sauerwein, M., K. Yoshimatsu and K. Shimomura.** 1992. Further approaches in the production of secondary metabolites by plant tissue cultures. *Plant Tissue Cult. Let.* **9**: 1-9.
- Sevon, N., T. Varjonen and R. Hiltunen.** 1992. Effect of sucrose, nitrogen and copper on the growth and alkaloid production of transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus*. *Planta Medica* **58**: 609-610.
- Shimomura, K., H. Sudo, H. Saga and H. Kamada.** 1991. Shikonin production and secretion by hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Rep.* **10**: 282-285.
- Sim, J.S., H.N. Chang, J.R. Liu and K.H. Jung.** 1994. Production and secretion of indole alkaloids in hairy root cultures of *Catharanthus roseus*: effects of in situ adsorption, fungal elicitation and permeabilization. *J. of Ferment. and Bioeng.* **78**: 229-234.
- Taya, M., K. Mine, M. Kino-Oka, S. Tone and T. Ichi.** 1992. Production and release of pigments by culture of transformed hairy root of red beet. *J. of Ferment. and Bioeng.* **73**: 31-36.
- Taya, M., K. Yakura, M. Kino-Oka and S. Tone.** 1994. Influence of medium constituents on enhancement of pigment production by batch culture of red beet hairy roots. *J. of Ferment. and Bioeng.* **77**: 215-217.
- Yoshikawa, T.** 1995. Production of useful compounds by tissue culture of ginseng (*Panax ginseng*). In *Production of Useful Secondary Metabolites from Plants, '95 Symposium of Plant Science, Korea*. pp. 12-26.

(1996. 3. 5 接受)

---

## Mass Culture and Ginsenoside Production of Ginseng Hairy Root by Two-Step Culture Process

Ko, Kyeong Min, Deok Chun Yang<sup>1</sup>, Ji Chang Park<sup>1</sup>, Kang Ju Choi<sup>1</sup>,  
Kwang Tae Choi<sup>1</sup> and Baik Hwang\*

*Department of Biology and Hormone Research Center, Chonnam National University,  
Kwangju 500-757, Korea; and*

*<sup>1</sup>Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea*

### ABSTRACT

A hairy root clone of *Panax ginseng* C.A. Meyer, HRB-15 was cultured in various conditions with 3 L bubble type bioreactor to enhance both growth and ginsenoside production. The hairy roots were more rapidly grown under the dark condition than under the light condition. However, total amount of ginsenoside of hairy roots cultured under the light for 30 days increased 2 folds as compared with the dark condition and was 1.10% based on 6 ginsenosides. Especially, ginsenoside-Re was significantly increased and some ginsenosides except for ginsenoside-Re was slightly reduced. Also, the growth of hairy roots decreased about 30% as compared with the dark condition. In contrast, addition of sodium acetate led to decreased production of ginsenoside and growth of hairy roots under light condition. The influence of potassium dihydrogenphosphate concentration was examined in MS medium and a 1.25 mM concentration was found to be the most appropriate for growth and ginsenoside production under light condition. Two-step process of hairy roots culture with yeast elicitation or without ammonia in culture medium was developed to enhance growth and ginsenoside synthesis. 50 µg of yeast elicitor per g of fresh weight showed a synergistic effect on the ginsenoside synthesis of hairy roots on 20 days after culture. At that time, the content of total ginsenoside was 1.15%, while the growth of hairy roots decreased 21% as compared with the dark condition. In addition, when elimination of ammonia on 20 days after culture, the content of total ginsenoside was 1.26% with significant increment of ginsenoside-Rd (0.27%) in addition to ginsenoside-Re and the growth of hairy roots decreased 10% as compared with the dark condition. In this system, we have demonstrated a unique two-step process of hairy root cultures to maximize biomass and secondary metabolites. It has found possibility to enhance ginsenosides production by growing hairy roots in this method.

*Keywords:* hairy root, two-step culture process, ginsenoside, yeast extract elicitor

---

\*Corresponding author: Fax +82-62-520-6872