

## 인삼 모상근의 캘러스를 이용한 ginsenoside 생산

권정희 · 천현준 · 양덕조<sup>#</sup>

충북대학교 자연과학대학 생명과학부, 기초과학연구소<sup>#</sup>  
(2002년 11월 10일 접수, 2003년 5월 14일 수리)

### Production of Ginsenoside in Callus of Ginseng Hairy Roots

Jung-Hee Kwon, Hyun-Choon Cheon and Deok-Cho Yang<sup>#</sup>

School of Life Sciences, College of Natural Sciences, Chungbuk National University · Institute for Basic Sciences Cheongju, 361-763, Korea

(Received November 10, 2002, Accepted May 14, 2003)

**Abstract :** By the *Agrobacterium rhizogenes* A<sub>4</sub> were induced a transformed callus of ginseng hairy root and examine to find the possibility whether it can produce certain ginsenoside. Investigations for a finding out to optimal culture medium showed that BA application is better than more factorial composition between auxins and cytokinins. For the induction of hairy root callus of ginseng, 1/2 MS medium containing 1 to 3 mg of benzyladenine(BA) per liter gave the best result. The growth of ginseng hairy root callus(GHC) cultured with the 1/2MS medium supplemented with 2 mg BA/L was selected for best suspension cultures. The optimum concentration of BA for ginsenosides production was found to be 2 mg/L. Probably the inoculum size of callus plays a role with the ginsenoside production in suspension culture. AS for inoculum size of callus, 50 mg was superior to 150 mg for growth and ginsenoside production. Ginsenoside contents were highest in the suspension culture grown for four weeks under continuous light condition. In fact that continuous light treatment promote strongly the synthesis of ginsenoside of the hairy root callus is first result in the world and the numerous induced root hairs of the callus leads a new method for ginsenoside production.

**Key words :** hairy root callus, 1/2MS, benzyladenine, ginsenoside, light

## 서 론

고려인삼(*Panax ginseng* C. A Meyer)은 다년생 약용식물로 근래에 생리활성물질인 ginsenoside의 자양강장, 당뇨개선, 항암 및 면역증강 등의 효능이 알려지면서 건강식품 및 각종 질환의 치료제로 각광 받고 있으며 약재로서 뿐만 아니라 식품, 화장품, 비누제품 등의 조제에 있어서까지도 그 수요가 점차 증가되고 있는 실정이다. 또한 근래 소비자의 기호 추세에 부합하는 여러 가지 타입의 인삼 단일제제 및 생약 복합제제가 개발되어, 건강식품 또는 의약품으로 등록되고 있으며, 점차 그 범위가 확대되고 있다.<sup>1)</sup> 그러나 자생 인삼은 재배가 까다롭고 연작이 쉽지않으며 병충해 발생 등으로 인하여 원료삼

의 수요를 충족시키지 못하고 있는 실정이다. 따라서 이러한 문제점을 해결하여 다량의 ginsenoside를 생산하고자 기내배양에 대한 연구가 진행되고 있다.

그 중 *A. rhizogenes*의 Ri-plasmid에 의해 형질전환되어 유도되는 모상근(hairy root)은 이차대사산물의 함량과 성장이 모본 식물체보다 높다고 알려져 인삼모상근이 ginsenoside의 획득에 좋은 재료로 활용될 수 있을 것으로 기대되고 있다.<sup>2)</sup> 또한 그 동안의 실험실 수준에서의 기초적인 연구에서 벗어나 응용 및 산업화를 위해서 대량배양이 필수적으로 요구되고 있다. 대부분의 식물세포 배양에 있어서 생물반응기의 적용은 실험실 규모의 삼각플라스크 배양과 매우 다른 배양 환경을 제공하게 되며 이로 인한 세포의 성장 저하와 유용물질의 생산성 감소 및 생성물의 조성에도 변화를 보이는 경우가 많다.<sup>3,4)</sup> 식물의 세포, 조직 및 기관배양에 있어서 생물반응기를 이용한 배양법은 액체 배지를 사용한다는 점에서 기존의

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 043-261-2293; (팩스) 043-261-2293  
(E-mail) dcyang48@hotmail.com

조직배양법과 다소 차이를 보이며 플라스크 수준의 현탁배양과 다른 점은 기내환경을 다양하게 변화시킬 수 있다는 것과 산업화 수준의 대규모 배양이 가능하다는 것이다. 인삼모상근 배양의 상업적 개발에 주로 제약되는 것은 높은 수율이다. 경제적 생산을 위해서는 배양기의 구석구석에 불균등하게 분포되어 서로 얽힌 모상근 표면조직의 생장을 가능하게 하는 특별히 고안된 생물배양기의 개발이 필요하다. 그러나 현재까지 국내에서 개발된 생물배양기는 영양분이나 가스공급에 문제가 있으며, 그 비용도 고가여서 현실화하는데 문제가 있다.<sup>5)</sup>

따라서 본 연구에서는 대량배양에 문제점으로 지적되고 있는 자동적인 양분공급, 산소공급, 수확 등의 난제를 덜기 위해 반영구적 특징을 갖는 모상근에서 비교적 산소공급이나 모상근 근모(hair of hairy root)에 균등한 영양공급이 가능한 모상근 캘러스(GHC)를 유도하고 그 캘러스 세포로부터 부정근을 유발 배양하였다. 그 밖에 현탁배양의 최적 조건을 규명하여 모상근캘러스(callus of hairy root)의 생장과 ginsenoside 함량이 우수한 세포주(cell line)를 선발함으로써 대량 배양을 위한 제반조건을 규명하고자 본 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 식물 재료

본 실험에 사용된 식물재료는 인삼(*Panax ginseng* C.A Meyer) 뿌리에 *Agrobacterium rhizogenes* A<sub>4</sub> 균주를 접종하여 유도한 인삼 모상근(Ginseng hairy root A<sub>4</sub>, GHR-T78)을 사용하였다.<sup>6)</sup> 유도된 모상근은 100 mL 삼각플라스크에 50 mL

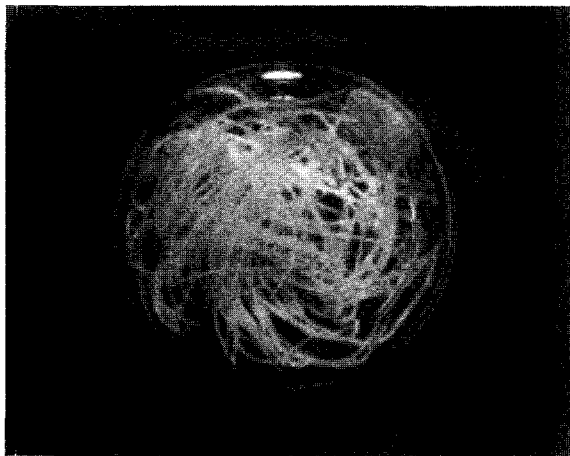


Fig. 1. Hairy roots A<sub>4</sub> lines(GHR-T78) induced from *Panax ginseng* C.A. Meyer by infection of *Agrobacterium rhizogenes* A<sub>4</sub> strain. Hairy roots cultured in 50 ml of 1/2 MS liquid medium at 23°C in dark condition.

의 1/2 Murashige and skoog(MS)<sup>7)</sup> 액체 배지를 넣어 23°C, 암조건에서 진탕 배양(100 rpm) 하였다. 실험에서 사용된 모상근은 계대배양 후 4주가 경과한 후 새로 나온 모상근의 선단부위를 1.5 cm로 균일하게 잘라 사용하였다(Fig. 1).

### 2. 모상근 캘러스의 유도

인삼 모상근의 호르몬에 대한 효과를 조사하기 위하여 1/2 MS 고체배지(agar 0.8%)을 이용하였다. 호르몬은 auxin류인 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid), IAA(indole-3-acetic acid), IBA(indole-3-butyric acid), NAA(1-naphthaleneacetic acid)와 cytokinin류인 kinetin, BA(benzyladenine)를 0.5, 1, 3, 6 mg/L의 농도로 단독처리 또는 혼합처리하여 23°C로 암상태에서 16주동안 배양, 각각 캘러스 유도를 촉진하였다.

### 3. 모상근 캘러스의 현탁배양 및 ginsenoside 분석

인삼 모상근(GHR-T78)으로부터 3 mg/L BA를 처리하여 유도한 인삼 모상근 캘러스(Ginseng hairy rott callus; GHC-T78)는 250 mL 삼각플라스크에 BA가 3.0 mg/L로 첨가된 1/2 MS 액체배지를 150 mL을 넣어 암조건과 광조건(1.9 μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>)에서 23°C, 100 rpm으로 현탁배양한 후 수확하여 각각의 성장률을 40°C dry oven에서 24시간 건조시킨 dry weight으로 측정하여 산출하였다.

Ginsenoside는 수포화 n-butanol 추출법에 의해 추출하였다. 냉동 건조시킨 분말시료 50 mg을 취하여 50~60°C 수욕조에서 80% MeOH 500 μL로 3회 추출하여 강압농축시킨 후, 증류수로 용해시켜 ethyl ether를 가하여 지질 등을 제거한 다음, 수층을 수포화 n-butanol로 3회 추출하여 n-butanol층을 모두 합하여 다시 증류수로 3회 세척한 후 수층은 버리고 n-butanol층만 건조시킨 후 HPLC용 MeOH 60 μL에 녹여 12000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 상등액 20 μL를 Pharmacia's LKB HPLC PUMP 2248 기에 주입하여 ginsenoside로 분리 정량하였다. 이때 사용한 용매는 E, Merck 회사의 HPLC용을 사용하였으며 ginsenoside 표준품은 한국인삼 연초 연구원에서 분리한 표준품을 사용하였다. 분석조건은 다음과 같다.

Column; Lichrosorb-NH<sub>2</sub> Column (5 μM, Merck), Detector; KNAUER differential refractometer, Solvent; Acetonitril/H<sub>2</sub>O/n-butanol(80/20/10), Flow rate; 1.0mL/min Attenuator; 1x, Data module; 1.0 cm/min chart speed (SHIMADAZU, C-R6A Chromato PAC).

Chromatogram의 각 peak는 표준화 saponin의 chromatography에 의해 동정하고, 각 ginsenoside의 함량은 peak height로 산출하였다.

**결과 및 고찰**

**1. 인삼모상근의 캘러스 유도**

모상근 배양은 호르몬 없는 배지에서도 무한세포 배양이 가능하여<sup>8,9)</sup> 이차대사산물인 ginsenoside를 얻기 위한 반영구적 재료로 사용되고 있으나, 모상근 배양시 영양생장을 증가시키기 위해서는 배양도중에 조직을 절단해야 하는 등의 문제점을 가지고 있으며, 대량배양시 조직이 서로 얽혀 root ball을 형성하고 양분공급과 통기가 불량하여 생장이 지연된다. 따라서 비교적 양분공급이 용이한 캘러스를 모상근으로부터 유도하고자 하였다. 일반적으로 캘러스는 auxin과 cytokinin 조성에 따라 유도되며, 모상근 세포에는 전술한 두 호르몬의 유전

자가 삽입되어 있다. 그 결과 auxin류의 경우 2,4-D 처리시에는 3 mg/L 이상에서 캘러스가 유도되지 못하였고 그 성장 또한 억제되었으나 그 외 IAA, IBA 그리고 NAA 처리시에는 모든 처리구에서 각각 6 ppm이상의 농도에서도 캘러스가 유도되었다. Cytokinin류의 경우, kinetin은 0.5, 1 mg/L 첨가한 배지에서 BA는 1, 3 mg/L로 첨가한 배지에서 캘러스 유도율이 가장 좋았다(Table 1). 인삼 모상근에서 캘러스 유도에는 auxin류의 호르몬보다 Cytokinin류(kinetin, BA)가 훨씬 더 효과적인 것으로 밝혀졌다. 호르몬의 혼합처리는 단독 처리에 비해 인삼 모상근의 캘러스 유도에 좋지 않았다. 2,4-D와 BA 또는 Kinetin 복합처리구에서는 캘러스 형성이 억제되었으며 IAA와 Kinetin 조합에서는 캘러스 형성율이 다소

**Table 1.** Influences of auxin and cytokinin on the induction of callus from ginseng hairy roots

Hormone mg/L		*Relative growth rate						
		Auxin				Gytokinin		
		2,4-D	IAA	IBA	NAA	Kinetin	BA	
0.5		++	++	++	++	++++	++++	
1		++	++	++	++	++++	++++	
3		-	++	++	++	+++	++++	
6		-	+++	+	++	+++	++++	

-: poor, +: low, ++: moderate, +++: good, ++++: very good, +++++: excellent  
 The data was measured after 16 weeks of culture in 1/2 MS solid medium at 23 in dark condition. The initial inoculum was 1.5 cm length of 10 hairy root tips per treatment.

**Table 2.** Influences of auxins and cytokinins on the induction of callus from ginseng hairy roots

Cytokinin(mg/L)		Relative growth rate							
		Kinetin				BA			
Auxin(mg/L)		0.5	1	3	6	0.5	1	3	6
2,4-D	0.5	++	++	+++	+	+	+	+	-
	1	+	++	++	+	+	-	+	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-
IAA	0.5	++	++	+++	+	+	-	-	++
	1	++	++	+++	+	+	-	-	++
	3	++	+	+++	-	-	-	-	-
	6	++	++	++	+	+	-	-	-
IBA	0.5	++	+++	+	+	+	+	+	++
	1	++	++	+	+	+	+	+	-
	3	++	++	+	+	+	+	+	++
	6	++	++	+	-	-	-	+	-
NAA	0.5	+	+	+	+	+	+	++	++
	1	++	+	+	+	+	+	++	++
	3	++	+	-	+	+	+	++	-
	6	+	+	+	+	+	++	++	-

-: poor, +: low, ++: moderate, +++: good, ++++: very good, +++++: excellent  
 The data was measured after 16 weeks of culture in 1/2 MS solid medium at 23°C in dark condition. The initial inoculum was 1.5 cm length of 10 hairy root tips per treatment.

높았다(Table 2).

이는 결과적으로 인삼 모상근으로부터 모상근 캘러스를 유도하기 위해서는 BA의 단독처리가 매우 효과적임을 확인하였다. 이러한 결과는 6년근 인삼 뿌리의 캘러스 유도 시에 2,4-D가 가장 효과적이며, BA와 2iP, Kinetin과 같은 cytokinin은 캘러스의 분열증식을 강하게 억제한다는 보고<sup>10)</sup>와는 상반되는 결과로 모상근에서의 캘러스 유도는 인삼 정상근에서의 캘러스 유도시 나타나는 현상과는 전혀 다른 호르몬 요구도를 보임을 알 수 있었다. 모상근 절편이 캘러스를 형성하도록 하기 위하여 외부로부터 성장조절제를 공급하고 있는데, 이때 성장조절제의 효과는 내생호르몬의 함량에 따라 크게 좌우됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 모상근에 삽입된 T-DNA의 auxin 생합성 유전자가 cytokinin 유전자보다 더 강하게 발현되고 있다고 생각되며, 캘러스 형성에 필수적인 BA만 첨가함으로써 호르몬의 균형을 이루어 캘러스 형성에 효과적이었다고 생각된다.

성장조절제의 처리가 ginsenoside의 함량에 미치는 효과를 조사해 보았던 바, 단독처리구에서는 IAA 0.5 mg/L 처리구에서 총 ginsenoside 함량이 2.631 mg · g dry wt<sup>-1</sup>. 으로 가장 높았고, 2,4-D와 NAA의 0.5 mg/L 처리구는 각각 1.542, 1.790 mg · g dry wt<sup>-1</sup>. 으로 호르몬을 처리하지 않은 대조구인 2.173 mg · g dry wt<sup>-1</sup>. 보다 낮음을 보여 2,4-D와 NAA의 단독처리가 ginsenoside 합성을 억제하고 있음을 나타내었다.

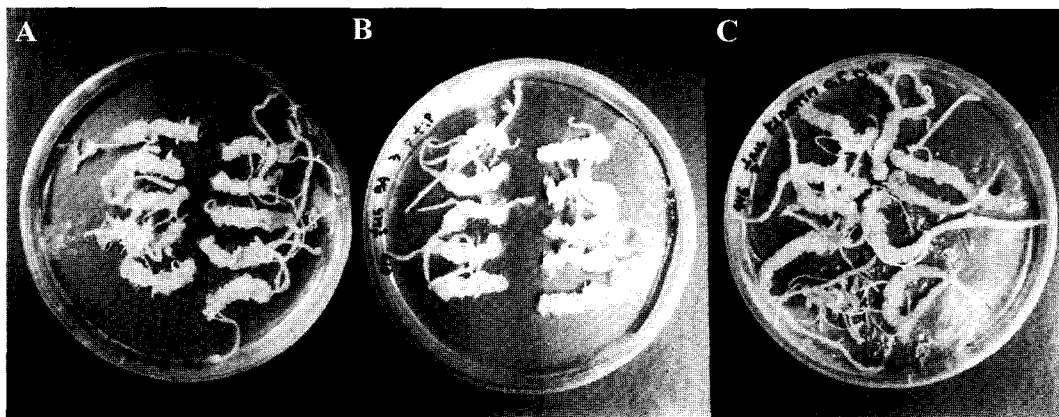
유사한 실험에서 Furuya 등<sup>11)</sup>은 2,4-D의 농도를 증가시키면, 사포닌 합성이 억제되는 것을 확인하였으며, 그밖에 2,4-D와 NAA은 nicotin<sup>12)</sup>, polyphenol<sup>13)</sup>, anthocyanin<sup>14)</sup>의 합성을 억제한다고 보고하였다. 본 실험에서도 2,4-D와 NAA은 인삼 모상근 캘러스의 이차대사산물인 ginsenoside의 생성을 억제

하였다. cytokinin 단독 처리구에서는 캘러스 형성에 탁월한 BA 처리구가 auxin류의 처리구에 비해 ginsenoside의 함량이 월등하게 증가하였다(Table 4). Kinetin 0.5, 1, 3 그리고 6 mg/L 처리구의 ginsenoside 함량은 각각 3.050, 2.394, 1.771 mg · g dry wt<sup>-1</sup>. 그리고 2.410 mg · g dry wt<sup>-1</sup>. 으로 나타났으며 Kinetin 단독처리구 중 생장이 가장 우수하였던 0.5 mg/L 처리구에서 ginsenoside의 함량 또한 가장 높게 나타났다(Fig. 2).

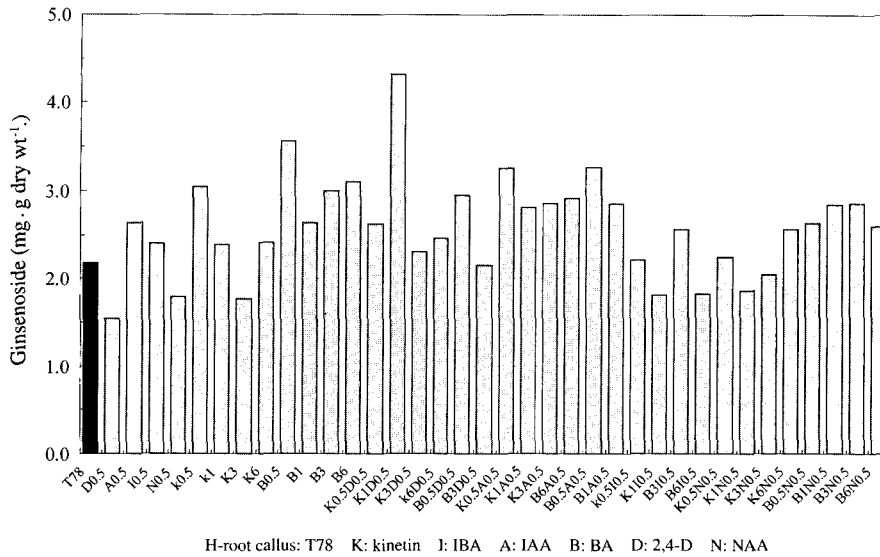
BA 0.5, 1, 3 그리고 6 mg/L 처리구의 함량은 각각 3.563, 2.632, 2.997 그리고 3.107 mg · g dry wt<sup>-1</sup>. 으로 나타났으며 BA의 처리가 옥신류 또는 Kinetin 단독처리보다 ginsenoside 생산에 가장 효과적인 성장조절제임을 확인하였다. 결론적으로 BA의 단독처리는 캘러스 성장뿐 아니라 ginsenoside 함량에 있어서도 효과적이었으며 ginsenoside 함량은 BA 0.5 mg/L 처리구에서 3.857 mg · g dry wt<sup>-1</sup>. 으로 가장 우수하였다.

호르몬 조합처리가 ginsenoside의 함량에 미치는 효과를 조사해 보았던 바, BA와 NAA조합처리구와 BA와 IAA 조합처리구 그리고 Kinetin과 IAA의 조합처리구에서 ginsenoside 생성에 효과적임을 볼 수 있었다.

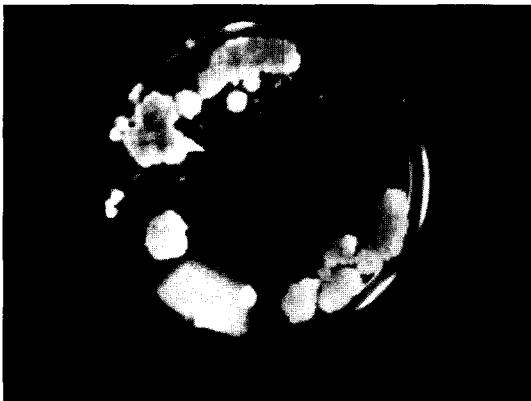
Kinetin 1 ppM과 2,4-D 0.5 ppM, kinetin 0.5 ppM와 IAA 0.5 ppM 그리고 BA 0.5 ppM와 IAA 0.5 ppM의 조합처리구에서 각각 4.316, 3.261 그리고 3.269 mg · g dry wt<sup>-1</sup>. 으로 ginsenoside 함량을 나타내었다. Kinetin 1 ppM와 2,4-D 0.5 ppM의 조합을 제외한 Kinetin과 2,4-D의 조합처리와 Kinetin과 NAA의 조합처리의 경우 ginsenoside가 각각 2.623 mg · g dry wt<sup>-1</sup>. 2.559 mg · g dry wt<sup>-1</sup>. 이하로 비교적 낮았으며 단독처리의 2,4-D와 NAA의 ginsenoside함량의 억제효과가 조합처리에도 영향을 주고 있음을 보여주고 있다



**Fig. 2.** Influences of cytokinins on the induction of ginseng hairy root callus(GHC-T78). GHC induced from hairy roots of ginseng. Hairy root callus cultured in solid 1/2 MS(agar 0.8%) medium supplemented with cytokinins(A: BA 1 mg/L, B: BA 3 mg/L, C: kinetin 0.5 mg/L)for 16 weeks at 23°C in dark condition. The initial inoculum was 1.5 cm length of 10 hairy root tips per treatment.



**Fig. 3.** Influences of combination of cytokinin and auxins on the ginsenoside contents of ginseng hairy root callus(GHC-T78). The data was measured after 16 weeks of culture in 1/2 MS solid medium at 23°C in dark condition. The initial inoculum was 1.5 cm length of 10 hairy root tips per treatment.



**Fig. 4.** Hairy root callus(GHC-T78) induced from the hairy roots line GHR-T78 of Korean ginseng. Hairy root callus cultured in 150 ml 1/2 MS liquid medium supplemented with BA 3 mg/L at 23°C in dark condition.

(Fig. 3).

**2. 인삼모상근 캘러스의 현탁배양**

BA(Benzyladenine) 3 mg/L이 첨가된 고체배지에서 유도된 캘러스를 선별하여 BA가 3 mg/L로 첨가된 1/2 MS 액체배지로 옮겨 암상태에서 현탁배양하였다(Fig. 4). 액체배양에서는 캘러스가 고체배지에서보다 더욱 잘 성장함을 볼 수 있었는데 이는 고체배지에서는 캘러스 덩어리가 제한된 부분에서만 배지와 접촉함으로써 배지로부터 양분흡수가 적는데 반해 액체배지에서는 캘러스가 덩어리가 조각으로 부서지기도 하면서 표면적이 더 커져서 배지로부터 양분의 흡수와 산소공급이 더 원활히 일어나기 때문이다. 인삼 모상근 캘러스의 액체

배양의 경우 callus가 free cell을 형성하지 않는 compact한 캘러스 덩어리로 성장하였다.

액체배양 과정 중 캘러스 생장에 효과적인 호르몬과 배양기간에 따른 효과를 조사해 본 결과 호르몬을 첨가하지 않은 배지에서는 4주간 배양한 모상근 캘러스의 건조중량이 20.167±1.153 dry wt.로 배양 초기부터 높은 성장을 보였다. BA가 2 mg/L 첨가된 배지에서 배양한 모상근 캘러스는 4주 배양후 21.133±1.053 mg dry wt.으로 호르몬 무첨가 배지보다 4.79%의 성장증가를 나타내었으며 BA 3.4 mg/L 첨가한 배지내 캘러스의 건조중량은 19.4±1.422 mg, 18.8±1.075 mg으로 각각 3.80%, 6.78%의 성장감소를 나타내었다. 따라서 인삼모상근 캘러스의 현탁배양에는 BA를 2 mg/L로 비지에 첨가하는 것이 생장에 있어 최적호르몬임을 확인하였다.

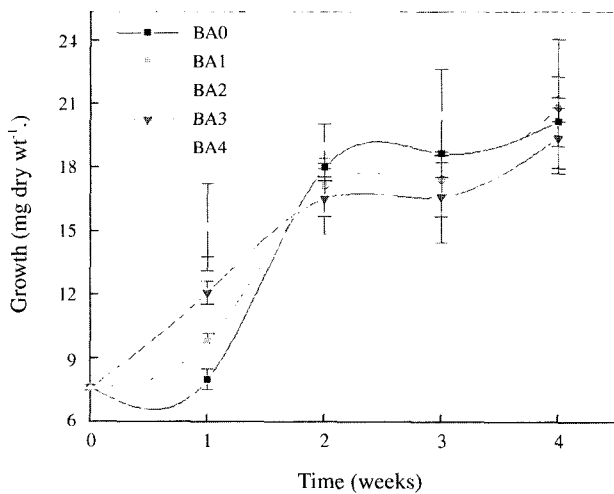
접종량(Inoculum size)은 식물 배양에 중요한 요인으로 대사산물의 생산<sup>15)</sup>과 모상근의 성장<sup>16)</sup>에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 따라서 모상근 캘러스의 생장에 미치는 접종량의 영향을 알아본 결과, BA를 1, 2, 3, 4 mg/L로 농도를 달리하여 접종량을 50 mg과 150 mg 씩 각각 접종하여 4주 배양하였던 바, 접종량과는 상관없이 두 처리구 공히 BA를 2 mg/L로 첨가한 배지에서 가장 높은 성장을 나타내었다. BA가 2 mg/L 첨가된 배지에 50 mg의 캘러스를 접종한 4주 후 건조중량(DW)은 9.2±1.193 mg이었고, 150 mg을 접종한 처리구의 건조중량은 20.167±0.0819 mg이었다. 이러한 결과는 모상근 캘러스의 액체 배양 과정에서는 접종량이 작은 것이 GHC의 대량생산에 효율적임을 제시하여 준다(Fig. 5, 6).

BA(Benzyladenine)를 1, 2, 3, 4 mg/L로 서로 다르게 첨

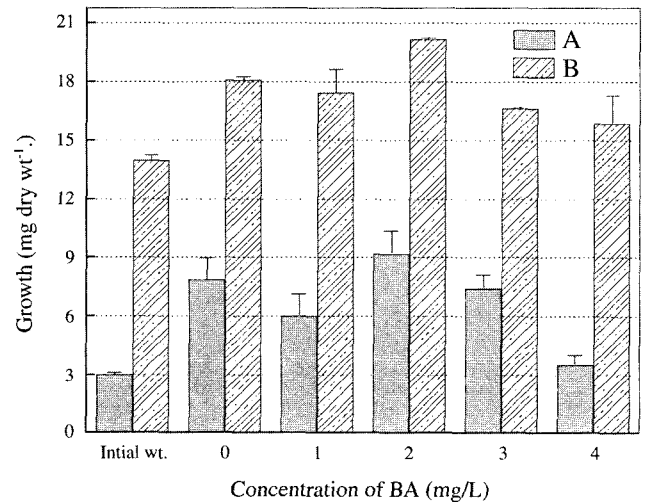
가한 1/2 MS 액체배지에 50 mg(A)과 150 mg(B)의 켈러스를 접종하여 4주 배양한 켈러스의 총 ginsenoside 함량은 BA 2 mg/L를 첨가한 50 mg(S) 처리구에서 가장 높게 나타났다. 50 mg(S) 처리구에서는 BA 2 mg/L가 3.603 mg/g dry wt. 으로 2.084 mg/g dry wt. 의 함량을 나타내는 150 mg을 접종한 BA 2 mg/L 처리구보다 72.9% 가량 ginsenoside 함량이 더 높게 나타나 inoculum size가 적은 것이 ginsenoside 생성에 더 효율적임을 나타내었다(Table 3). 또한 50 mg(s) 처리구의 경우 BA를 1, 2 그리고 3 mg/L첨가하여 배양한

켈러스는 각각 43.9%, 52.3% 그리고 20.3%으로 BA첨가하지 않는 켈러스보다 높은 함량을 나타내었다. 그러나 150 mg(L) 처리구의 경우 BA 2와 4 mg/L 처리구만이 각각 11.6%와 3.69%으로 약간의 함량증가를 보였으며 BA 1와 2 mg/L의 처리구는 5.24%와 8.6%의 함량감소를 나타내어 inoculum size가 현탁배양에 있어 켈러스성장뿐만 아니라 ginsenoside함량에도 큰 영향을 미치고 있음을 확인하였다.

GHC의 현탁배양을 위한 최적 배지를 규명하고자 SH<sup>17)</sup>, 1/2 MS, MSM 배지에서 켈러스를 4주간 배양한 결과 SH, 1/2 MS, MSM 배지 각각 GHC의 건물중이 57.33 mg, 66.33 mg, 95.00 mg으로 측정되었다. 1/2 MS 배지와 비교해 볼 때



**Fig. 5.** Influences of culture periods and benzyladenine(BA) contents on the growth of ginseng hairy root callus(GHC-T78). GHC cultured in 50 ml 1/2 MS liquid medium supplemented with various BA concentration at 23°C in dark condition. The initial fresh weight of inoculum was 50 mg. The data represent the mean ± SE of triplicates measured after 4 weeks culture. BA : benzyladenine 0 mg-4 mg.

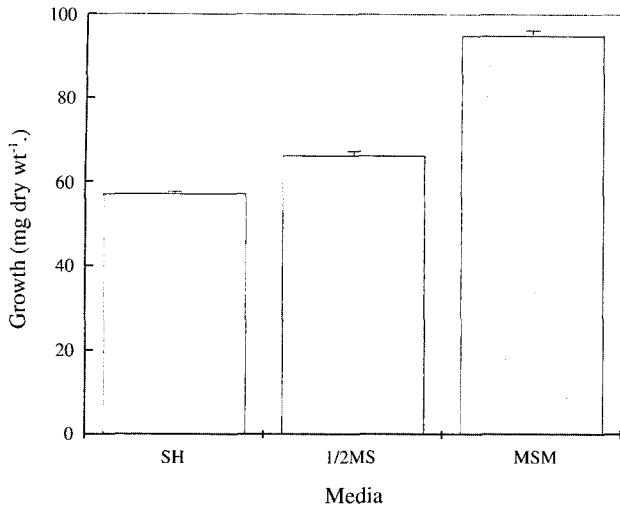


**Fig. 6.** Influences of inoculum size, hormone contents on the growth of ginseng hairy root callus(GHC-T78). A: The initial inoculum was 50 mg. B: The initial inoculum was 150 mg. The data represent the mean ± SE of triplicates measured after 4 weeks culture.

**Table 3.** Influences of hormone and culture periods on the ginsenoside contents of ginseng hairy root callus

Hormone (mg/L)	Inoculum size (mg)	Contents of ginsenoside (mgg dry wt <sup>-1</sup> .)						
		Panaxatriol ginsenosides			Panaxadiol ginsenosides			Total
		Rg <sub>1</sub>	Re	Rd	Rc	Rb <sub>2</sub>	Rb <sub>1</sub>	
BA0	50	0.610±0.010	0.099±0.006	0.347±0.000	0.351±0.020	0.348±0.015	0.610±0.014	2.365±0.030
	150	0.471±0.014	0.070±0.005	0.302±0.010	0.262±0.000	0.287±0.000	0.477±0.048	1.868±0.064
BA1	50	0.785±0.038	0.130±0.018	0.548±0.000	0.566±0.123	0.582±0.104	0.792±0.053	3.404±0.102
	150	0.490±0.000	0.072±0.000	0.271±0.009	0.231±0.005	0.253±0.006	0.458±0.000	1.775±0.020
BA2	50	0.883±0.026	0.133±0.004	0.571±0.010	0.529±0.012	0.589±0.000	0.900±0.012	3.603±0.021
	150	0.534±0.017	0.111±0.010	0.263±0.005	0.283±0.016	0.307±0.000	0.585±0.029	2.084±0.074
BA3	50	0.681±0.031	0.131±0.011	0.496±0.070	0.391±0.033	0.421±0.009	0.726±0.017	2.846±0.023
	150	0.450±0.016	0.071±0.000	0.257±0.021	0.249±0.026	0.261±0.000	0.432±0.027	1.720±0.053
BA4	50	-	-	-	-	-	-	-
	150	0.479±0.009	0.091±0.005	0.295±0.014	0.287±0.052	0.288±0.019	0.497±0.012	1.937±0.115

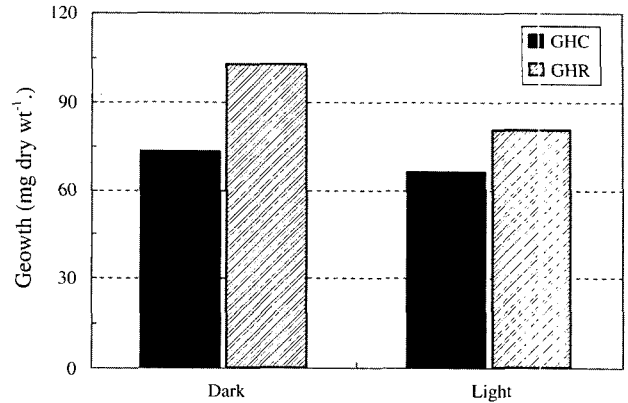
B: Benzyladenine, A: Indole-3-acetic acid



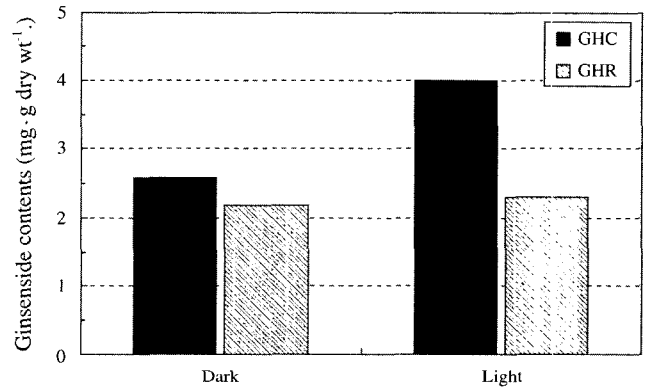
**Fig. 7.** Influences of culture media on the growth of ginseng hairy root callus(GHC-T78). GHC cultured in 50 ml liquid medium supplemented with BA 2 mg/L at 23°C in dark condition. Initial fresh weight of inoculum was 50 mg. The data represent the mean SE of triplicates measured after 4 weeks culture.

MSM 배지에서는 약 43.2%정도 높은 성장률을 보여 이 후의 GHC 배양은 MSM배지를 사용하였다(Fig. 7). 액체 배지의 질소 공급원은 주로 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>(ammonium)와 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>(nitrate)이다. MS 배지는 무기질소원으로서 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>와 KNO<sub>3</sub>을 다량으로 첨가하며, 특히 암모니아 농도가 높은 것이 특징<sup>19)</sup>이다. MSM은 1/2 MS배지에서 KNO<sub>3</sub>와 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>의 농도를 변형시켜 본 연구실에서 고안하였으며 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 농도와 KNO<sub>3</sub>농도가 모두 높으며 인산염의 농도 또한 높은 것이 특징이다. 따라서 MSM 배지에서 GHC의 생장이 높았다는 것은 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>와 KNO<sub>3</sub>의 농도에 영향을 받으며 특히 높은 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>(nitrate)의 농도에서 생장이 촉진됨을 알 수 있다. 인삼염의 농도를 증가시키면 *Daucus carota*의 세포생장이 촉진된다.<sup>20)</sup> *Nicotiana tabacum*의 경우에도 인산염의 농도 증가는 건물중에 커다란 효과를 나타내었고,<sup>21)</sup> *Vitis cells*에서도 인산염의 양을 늘렸을 때 역시 생장이 더 좋았다고 보고하였다.<sup>22)</sup> 따라서 다량의 인산염을 첨가한 본 MSM배지에서 GHC의 성장률이 매우 우수한 것으로 보아 인산염의 농도가 증가하면 배양 세포의 성장도 촉진된다는 일련의 보고들과 일치하고 있다.

GHC의 성장에 미치는 광의 효과를 조사하였던 바, 광처리구(1.9 mol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>)에서 엽록소와 안토시아닌이 형성됨을 육안으로 관찰할 수 있었다. 캘러스의 생장이 암상태보다 광상태에서 훨씬 더 높게 나타난 반면(Fig. 8), 모상근 캘러스의 ginsenoside 함량은 광상태에서 증가되었다. 모상근보다 모상근 캘러스에서 더 높은 함량을 나타내었다(Fig. 9). 이러한



**Fig. 8.** Influences of light on the growth of ginseng hairy root callus(GHC-T78). GHC cultured in 50 ml MSM liquid medium supplemented with 2 mg/L BA at 23°C for 4 weeks in dark condition.



**Fig. 9.** Influences of light on the ginsenoside contents of ginseng hairy root callus(GHC-T78). GHC cultured in 50 ml MSM liquid medium supplemented with 2 mg/L BA at 23°C for 4 weeks in dark condition. GHR: ginseng hairy roots.

결과는 광량이 증가할수록 인삼 모상근의 생장이 감소한다<sup>23)</sup>는 결과와 마찬가지로 인삼 모상근 캘러스에서도 광처리시 성장률이 공히 감소함을 볼 수 있었는데, 이는 강광하에서 생성된 산화제들이 항산화 효소의 활성을 억제시켜 모상근 생장이 감소한다는 본문<sup>24)</sup>과 일치한다. 그러나 모상근을 광상태에서 배양할 경우에는 엽록체의 calvin회로에서 제공되는 PGA로부터 Acetyl-CoA가 생성되는 경로가 추가되므로, 결국 Acetyl-CoA가 풍부한 상태에서 saponin 합성과정은 분명히 더 촉진되어지는 것으로 추론할 수 있다.

**요 약**

*Agrobacterium rhizogenes* A<sub>4</sub> Ti-plasmid를 인삼 뿌리에 도입하여 유전적으로 안정하며 반영구적으로 이용할 수 있는 형

질전환된 인삼모상근 캘러스(GHC-T78)를 유도하였다. 특정 ginsenoside를 대량으로 생산할 수 있는 최적배양조건을 확립하기 위해서 먼저 모상근으로부터 캘러스의 유도하는 과정에서 BA의 단독 처리구는 auxin과 cytokinin의 혼합 처리구보다 캘러스 형성이 더 우수하였다.

인삼 캘러스 형성율은 Benzyladenine(BA)를 1 mg-3 mg/L 까지 첨가한 배지에서 가장 높게 나타났으며, ginsenoside 함량 역시 bezyladenine 단독처리구는 가장 우수하였다. 캘러스 세포의 액체배양 기간을 4주로 설정할 때 BA의 농도 역시 BA 2 mg/L로 첨가한 배지에서 가장 우수한 캘러스 생장률을 보였다.

실제로 인삼 모상근 캘러스의 생장율은 암상태에서 배양하는 것이 광상태에서 보다 다소 양호하였으나, ginsenoside의 생성이는 연속광상태에서 더 효과적임이 확인되었다. 모상근 캘러스에서 얻은 이러한 결과는 국내의 처음으로 보고되는 내용이며, 액체배양의 캘러스 세포에서 분화된 무수히 많은 단일 모상근 근모의 형성은 액체배양을 통한 특정 ginsenosid의 새로운 생산방법을 개발할 수 있도록 하고 있다.

### 감사의 말씀

본 연구는 충북대학교 자연과학원 기초과학연구소의 연구비 지원으로 수행되어졌으며 이에 감사 드립니다.

### 인용문헌

- 양덕춘, 양계진 : 식물조직배양학회지 **27**, 485 (2000).
- Green, K. D. and Thomas, N. H. : *Biotech & Bioeng* **39**, 195-202 (1992).
- Breuling, M., Afermann, A. W. and Reinhard, E. : *Plant Cell Report* **4**, 220-223 (1985).
- 변상요 : 생물화공 **5**(1): 8-14 (1991).
- Giri, A. and Narasu, M. L. : *Biotechnology Advances*, **18**, 1-22 (2000).
- Yang, D. C., Choi, H. Y. Kim, Y. H. Yun, K. Y. and Yang, D. C. : *Korean J. Ginseng Sci.*, **20**, 3 (1996).
- Murashige, T. and Skoog, F. : *Physiol. Plant*, **15**, 4 (1962).
- Einset, J. W. : *Biochem biophysic Res. Commum* **93**, 510-515 (1980).
- Weiler, E. W. spanie : *Planta* **153**, 326-337 (1981).
- Choi K. T., Park, J. C. and Ahn, I. O. : *Korean J. Ginseng Sci.*, **14**, 2:107-111 (1990).
- Furuya, T., Yoshikawa, T. Ishii, T. and Kajii, K. : *Planta medica*, **47**, 183-187 (1983).
- Tabata, M., Yamamoto, H. Hiraoka, N. Marumoto, Y. and Konoshima, M. : *Phytochemistry*, **10**, 723 (1971).
- Davies, M. : *Planta*, **104**, 50 (1972).
- Gamborg, O. et al., : *Le Centre National de lat Recherche Scientifique*. pp. 335-343 (1971).
- Zhang J., and Li, J. : Proceeding of the 7th International Symposium on Ginseng. *The Korean Society of Ginseng*, pp. 12-20 (1998).
- Kanokwaree, K. Doran, P. M. : *Biotechnol Prog.* **14**(3), 479-86 (1998).
- Schenk, F. V. and Hildebrandt, A. C. : *Can. J. Bot.* **50**, 199-204 (1972).
- Im, H. H., Chung, Y. M. Cho, Y. S. Chung, C. H. Suh, J. H. and Kwon, O. C. : *Korean J. Plant Tissue Culture* **27**(3), 155-161 (2000).
- 강영희, 황백, 최관삼 : 식물조직배양의 배양학, 지구문화사, P. 71 (1995).
- Yun, J. W., Kim, J. H. Yoo, Y. J. and Byun, S. Y. : *Kor J. Plant Tissue Culture* **5**(4) 347-353 (1990).
- Ikeda, T., Matsumoto, T. and Noguchi, M. : *Agr. Biol. Chem* **40**(9), 1765-1770 (1976).
- Chung, E. S. and Chae, Y. A. : *Kor J. Breed.*, **26**(2), 172-176 (1994).
- 양덕조, 최혜연, 김용해, 윤길영, 양덕춘 : *Korean J.Ginseng Sci.* **20**(3), 318-324 (1996).
- Yang, D. C., Kim, Y. H. Choi, H. Y. Choi, C. H. : *Kor. J. Plant Tissue Culture* **22**(2), 775-781 (1995).