Jour. Korean For. Soc. Vol. 96, No. 1, pp. 48~53 (2007)

한국임학회지

JOURNAL OF KOREAN FOREST SOCIETY

가시오갈피의 부정근 배양시 부정근의 생육과 eleutheroside류의 함량에 미치는 NO_3^-와 NH_4^+ 비율 및 농도의 영향

安珍權* · 李胃煐 · 朴永起

국립산림과학원 산림유전자원부

Effect of NO_3^- and NH_4^+ Concentrations on Root Growth and Eleutherosides Accumulation in adventitious root Culture of *Eleutherococcus senticosus*

Jin-Kwon Ahn*, Wi-Young Lee and Young-Ki Park

Depatment of Forest Genetic Resources, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-350, Korea

요 약: 생물반응기를 이용하여 가시오갈피 부정근 증식시 부정근의 생장과 유용 이차대사산물인 eleutheroside 류 생산에 미치는 NO_3^-와 NH_4^+의 영향 및 배양기간에 따른 배지성분의 변화량을 분석하였다. 부정근 증식은 질소농도가 50 mM NO_3^-와 10 mM NH_4^+ 농도비율로 첨가된 처리구에서 최대(24.4g FW/L)에 이르러 60 mM NH_4^+ 첨가에 비해서는 3.4배 증식되었다. 또한 NH_4^+의 첨가농도비율이 높아질수록 부정근의 증식은 감소하였다. Eeleutheroside B와 E1은 총 질소량이 30 mM 처리에서 각각 249 μg/g와 43 μg/g을 생산하여 가장 우수하였으나, eleutheroside E는 총 질소농도가 높아질수록 생산량도 높아져 120 mM에서 788 μg/g로 가장 우수하였다. 부정근 생장은 초기 접종량 대비 배양 9주만에 6.2배가 증식되었고, 배양기간별 배지 성분의 변화에서 산도는 4.81-6.35로 변화가 비교적 심했고, NH_4^+와 K^+는 배양기간이 경과할수록 함유량이 낮았다. 이러한 결과로 보아 부정근의 생장과 유용이차대사산물의 함량을 높이기 위하여 다양한 처리의 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

Abstract: This study was carried out to investigate the effect of NO_3^- and NH_4^+ on the adventitious root growth and eleuthroside synthesis of *Eleutherococcus senticosus* during 3 L-bioreactor culture. The change of medium component ratio was also measured during culture. The fresh weignt of adventitious root reached to the greatest level of 24.4g FW/L in the presence of 50 mM NO_3^- and 10 mM NH_4^+, representing 3.4-fold increase compared to the 60 mM NH_4^+. However, as the increase of the portion of NH_4^+, the root growth was decreased. Maximum eleutheroside B and E1 production were 249 μg/g and 43 μg/g, respectively, with 30 mM total nitrogen source. The maximum production of eleutheroside E were 788 μg/g with 120 mM total nitrogen source. The greatest weight of adventitious root increased up to 6.2 fold of inoculum size within 9 weeks. The change of pH was influenced from 4.81 to 6.35 and the amounts of NH_4^+ and K^+were decreased during culture periods. From these results we suggest, need further study of various treatment to increase the growth of biomass and the accumulation of useful secondary metabilites.

Key words **:** *bioreactor, NO_3^-, NH_4^+, adventitious root, eleutheroside B, E and E1*

서 론

가시오갈피나무(*Eleutherococcus senticosus*)는 러시아, 중국 북부(만주), 한국, 일본 등지에 자생하는 두릅나무과 낙엽활엽관목으로 약효가 인삼에 버금간다고 하여 'Siberian ginseng'으로 불리어진다(Slacanin *et al.* 1991). 가시오갈피의 뿌리, 줄기 등에는 eleutheroside A (daucosterol), eleutheroside B(syringin), eleutheroside C (methyl α-D-galactoside), eleutheroside E(liriodendrin, syringaresinol di-o-β-D-glucoside), chlorogenic acid(5-caffeoylquinic acid), caffeic acid, β-sitosterol 등과 함께 여러 종류의 약용성분이 함유되어 있다. 특히 lignan계 성분인 eleutheroside B와 eleutheroside E성분은 오가피속 식물의 주요 약용성분으로 뿌리와 줄기에 함량이 높다(Kang *et al.* 2001). 이 중 eleutheroside E는 흥분완화, 스트레스 억제 및 면역활성에 매우 뛰어난 물질로 보고 되어 있고, 또한 chlorogenic

*Corresponding author
E-mail: AHNJK@foa.go.kr

acid는 eleutheroside E의 효과를 상승시키는 주요물질로 알려져 있다(Ahn *et al.* 2000; Slacanin *et al.* 1991). 그러나 가시오갈피나무의 중요한 증식수단인 종자는 채취시 미숙종자로 자연상태에서는 발아에 3년 이상이 소요되어 유용한 개체의 기내급속대량증식에 촛점을 맞춘 연구가 수행되어 왔다(Han and Choi 2003).

대용량의 생물반응기를 이용해 식물세포나 조직을 대량으로 배양하여 2차대사산물을 생산하고자 하는 연구가 주목(Son *et al.* 1999), 인삼(Liu and Zhong 1997; Yu *et al.* 2002) 등의 약용식물에서 보고되었다. 그리고 배지내 elicitor처리(Kang *et al.*, 2004; Suresh *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2002), 무기염류 (Liu and Zhong 1997; 1998; Ahn *et al.* 2003) 및 당 농도(Akalezi *et al.* 1999) 등을 조절하여 배양체의 생산 증대와 함께 목적하는 유용물질의 생산량을 높이기 위한 연구가 진행되었다.

배지내 첨가되는 무기염류 중 질소원은 단백질 또는 아미노산 생산에 영향을 주어 세포 및 조직생장이나 이차대사산물 생성에 영향을 미친다(Liu and Zhong 1997). Oil palm(*Elaeis guineensis*)을 1개월간 세포현탁배양하였을 경우, 생물반응기를 이용한 배양이 삼각플라스크 배양보다 약 3-5배의 배양체 생산 효율이 높게 나왔는데, 이것은 배양 말기에 탄소원은 완전히 고갈되었으나, 질소원이 고갈되지 않고 남아 영향을 주었기 때문이다(Gorret *et al.* 2004). 그리고 인삼세포배양시 세포생장은 배지내 총 질소량이 60 mM, NO_3^- : NH_4^+비율이 2:1일때 우수한 생장을 보여주었다(Liu and Zhong 1997). 또한 인삼의 이차대사산물인 ginseng saponin 함량은 배지내 총 질소농도가 5-20 mM로 비교적 낮을 때 높았고, 5 mM의 NO_3^- 첨가구에서 최대의 saponin 생산을 보여 NO_3^- 농도를 낮추는 것이 saponin 생산에 효과적이었다. 그러나 ginseng polysaccharide함량은 배지내 총질소량이 60 mM, NO_3^- : NH_4^+ 의 비율이 60:0일 때 최대의 생산량을 보여 ginseng saponin 생산함량에 미치는 질소원의 비율과는 상이함을 보여주었다(Liu and Zhong 1997). 그리고 생물반응기를 이용한 가시오갈피 세포배양시 질소원으로 KNO_3가 15 mM농도로 첨가된 처리구에서 세포증식이 최대가 되었다(Ahn *et al.* 2003). 또한 지치(*Lithospermum erythrorhizon*)와 *Phytolacca americana*, *Holarrhena antidysenterica*의 세포배양에서 이차대사산물인 시코닌(shikonin)과 알칼로이드(alkaloid), 베타시아닌(betacyanin)의 생성, 증진에 질소원이 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다(Sakuta *et al.* 1987; Panda *et al.* 1992; Fujita *et al.* 1981)

그러나 가시오갈피 부정근배양에서 배지내 질소원이 배양체 생육 및 이차대사산물의 생산에 미치는 영향에 관한 연구는 아직 보고 된 바 없다. 이에 본 연구에서는 생물반응기를 이용한 가시오갈피 부정근 배양시 총 질소량과 NO_3^-와 NH_4^+의 비율 및 농도가 부정근의 생장과 eleutheroside 류의 함량에 미치는 영향을 구명하여 가시오갈피내 유용물질 생산을 위한 기초 자료로 삼고자 하였다.

재료 및 방법

1. 식물재료

강원도 오대산에 자생하는 가시오갈피나무에서 종자를 채취하여 과육을 깨끗이 제거하고 충분히 젖은 모래(중사)에 섞어 15°C에서 2.5개월 습윤저장한 것을 이용하였다. 종자소독은 70% 에탄올에 30초간 침지시킨 후 멸균수로 3회 세척하고 5% NaOCl로 20분 표면 살균하고 멸균수로 3회 세척하였다. 멸균된 종자로부터 성숙배를 적출하여 1.0 mg/L GA_3(Gibberellic acid)가 첨가된 MS(Murashige and Skoog 1962) 또는 1/2 MS배지에 치상하여 식물체를 유도하였다. 유도된 식물체는 다시 생장조절제가 포함되지 않은 1/2 MS 또는 1/3 MS 고체배지에 옮겨 식물체로 발달시켰다. 2개월 후 종자배 유래 식물체로부터 뿌리를 절단하여 1.5-2.0 cm 길이로 자른 후 3.0 mg/L indolebutyric acid (IBA)와 60 g/L sucrose가 첨가된 1/2 MS 액체배지에 접종하고 110 rpm 속도로 암배양하였다. 부정근은 4주 간격으로 동종의 신선한 배지로 계대배양하여 생물반응기 배양을 위한 재료로 사용하였다.

2. 생물반응기 배양

생물반응기 배양은 3 L 풍선형 공기부양식 생물반응기(Son *et al.*, 2000)에 2 L의 액체배지를 첨가하고 1.5 cm 길이로 절단한 부정근 7.0 g FW을 각각 접종하였다. 이때 생물반응기내 공기공급량은 flowmeter(Dwyer Inc., IN, USA)로 0.1 vvm 되게 조절하였고, 배양은 21.5°C의 온도가 유지되는 배양실에서 9주간 암배양하였다. 배지는 질소원이 제거된 1/3 MS 배지에 IBA 3.0 mg/L와 TDZ 0.05 mg/L에 sucrose 6%를 첨가하여 제조하였다. 배지내 질소원인 NO_3^-와 NH_4^+의 총 농도는 0, 15, 30, 60, 120 mM로, NO_3^-와 NH_4^+의 비율은 0:60, 10:50, 20:40, 30:30, 40:20, 50:10, 60:0 mM 농도로 조절하여 첨가(MS배지에 첨가되는 NO_3^-와 NH_4^+의 총 농도 60 mM과 농도비율 20:40 mM을 기준하여 처리농도를 달리함)하였다. 배양 9주 후에 수확하여 흐르는 수돗물에 3회에 걸쳐 깨끗이 세척한 후 물기를 제거하기 위하여 1시간 정도 음건 후 생중량을 측정한 다음 동결건조, 분쇄하여 eleutheroside B, E 및 E_1분석을 위한 시료로 사용하였다.

3. Eleutheroside류 및 배지 분석

Eleutheroside류의 추출과 분석은 안진권 등(2000)의 방법에 따라 실시하였다. Eleutheroside류 분획은 Spherisorb

ODS column(4.6 mm 250 mm, Jasco, GroB-Umstadt, Germany)에 UV 검출기(UV 3000 HR, TSP, USA)가 장착된 Thermo Separation Products HPLC system(TSP, CA, USA)을 이용하여 분석하였다. 이동상은 물과 acetonitrile을 초기 10, 30, 40, 45, 46, 50분에 각각 95:5, 90:10, 60:40, 50:50, 45:55과 95:5의 비율로, 0.6 ml/min의 속도로 흘려보냈다. 표준 물질로 사용한 eleutheroside B(syringin), eleutheroside E(lilriodendrin)와 eleutheroside E_1{(+)-syringaresinol-O-β-D-glucoside}는 Nakarai Inc. (Japan)와 Sigma (USA)로부터 구입하여 부정근에서 추출한 이차대사산물과 비교하였고, 220 nm에서 검출하였다.

또한 배양기간에 따른 배지성분의 변화량을 구명하기 위하여 배양 중인 생물반응기에서 7일 간격으로 배지를 1 ml씩 채취하여 Bioprofile 300 analyzer(Nova Biomedical, USA)를 사용하여 biomass, pH, NH_4^+ 및 K^+ 등의 변화량을 분석하였다

결과 및 고찰

배양 중인 부정근 7.0 g을 1.5 cm 길이로 절단하여, 배지내 질소원인 NO_3^-와 NH_4^+의 총 농도가 MS배지에 첨가되는 양과 동일한 총 질소량 60 mM 첨가량을 1로 할 때 0(0 mM), 1/4(15 mM), 1/2(30 mM), 1(60 mM), 2(120 mM)배로 조절된 배지에서 9주간 암배양하였다. 배양 9주 후 부정근 생장은 총 질소량이 MS배지 기준첨가량인 60 mM 농도로 첨가된 처리구에서 최대 21.8 g FW/L를 보여 무첨가구의 6.2 g FW/L에 비해서는 3.5배, 초기 접종량 대비 6.2배 증식되어 가장 우수하였다. 그 다음으로 120 mM로 첨가된 처리구에서 양호한 것으로 나타나 가시오갈피 부정근 배양시 질소량은 MS배지에 첨가되는 양과 동일하거나 약간 높은 농도로 처리하는 것이 생장에 좋을 것으로 생각된다(Table 1). 처리구별 부정근의 건물률은 30 mM에서 8.6%로 가장 낮게 나타났으나, 이 처리농도를 중심으로 질소량을 높이거나 낮추면 부정근의 건물률은 증가하는 것으로 나타났다. 아울러 부정근 생산과 생중량에 대한 건중량 생산비도 질소처리농도에 따라 큰 차이를 보여 질소처리농도가 부정근 생장과 함께 건중량의 생산

Table 1. Effect of total nitrogen on adventitious root growth after 9 weeks of culture in *E. senticosus*.

Total nitrogen (mM)	Inoculation (g.FW/L)	Fresh wt (g/L)	Dry wt (g/L)	Dry matter (%)	Growth ratio
0	3.5	6.2	0.8	12.9	1.8
15	3.5	13.8	1.4	10.1	3.9
30	3.5	18.5	1.6	8.6	5.3
60	3.5	21.8	2.4	11.1	6.2
120	3.5	20.9	2.2	10.5	6.0

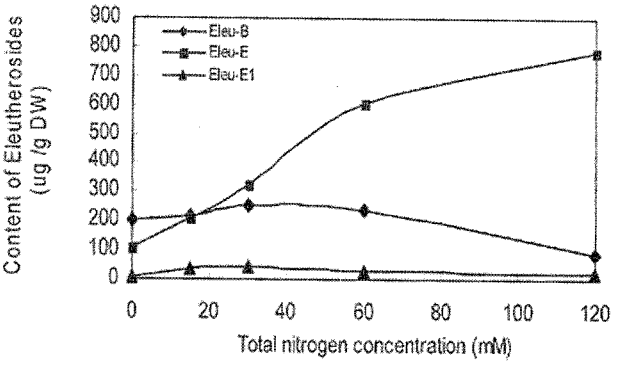

Figure 1. Changes in eleutheroside contents according to total nitrogen concentration in adventitious root cultures of *E. senticosus*.

에도 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다

배지내 총 질소량 처리에 따른 부정근 증식과 함께 가시오갈피의 유용 2차대사산물인 eleutheroside B, E 및 E_1 함량을 조사하였다. 부정근내 eleutheroside류의 함량은 2차대사산물의 종류에 따라 총 질소처리농도와는 각각 상이한 관계를 보였다. 즉 eleutheroside E 함량은 총 질소농도가 증가할수록 비례하여 증가하였다. 즉 질소원을 첨가하지 않았을 경우에는 106 μg/g의 eleutheroside E를 생산하였으나, 120 mM의 질소원을 첨가시에는 788 μg/g을 생산하여 가장 우수하였다. 그러나 eleutheroside B와 E_1의 함량은 총 질소농도를 30 mM처리시 각각 249 및 43 μg/g을 생산하여 가장 우수하였으며, 이 처리농도를 기준으로 총 질소농도가 증가하거나 감소함에 따라 비례하여 eleutheroside B와 E의 함유량도 비례적으로 증감하여 eleutheroside E와 다른 경향을 보여주었다(Figure 1). 이러한 경향은 Yu 등(2002)이 인삼 부정근 배양시의 jasmonic acid처리(2.0 mg/L)에서 수확된 부정근의 ginsenoside류 분석에서 Rb그룹은 배양기간이 경과할수록 생산량이 증가하였으나, Rg그룹은 감소한 것으로 나타나 이차대사산물의 종류에 따라서도 각기 다른 반응을 보였다. 또한 섬오갈피 부정근 배양에서 식물생장조절물질인 zeatin은 부정근 생육과 eleutheroside E 함량에는 크게 영향을 미치지 않는 반면, eleutheroside B와 chlorogenic acid 생산은 크게 억제하였다고 보고(안진권 등, 2005)하여 이차대사산물의 종류에 따라서도 다른 반응을 보여주었다. 이는 이차대사산물의 최대 생산을 목적으로 하는 부정근 배양시 생장과 이차대사산물이 가장 많이 생산되는 배양기간에 수확이 이루어져야만 최종적으로 더 많은 이차대사산물을 생산할 수 있을 것으로 사료된다.

총 질소처리농도를 60 mM로 고정하고 NO_3^-와 NH_4^+의 비율을 달리한 처리에서 가시오갈피 부정근 생장은 NO_3^-/NH_4^+의 비율이 높은 처리구가 생장이 양호하였다(Table 2). 수확한 부정근의 생산량을 조사한 결과 NO_3^-와 NH_{4+}의 비율이 50:10인 처리구에서 초기접종량 3.5 g FW/L의

Table 2. Effect of NO_3^- and NH_4^+ on adventitious root growth after 9 weeks of culture in *E. senticosus*.

NO_3^- and NH_4^+(mM)		Inoculation (g.FW/L)	Fresh wt (g/L)	Dry wt (g/L)	Dry matter (%)	Growth ratio
NO_3^-	NH_4^+					
60	0	3.5	19.2	1.9	9.9	5.5
50	10	3.5	24.4	2.4	9.8	7.0
40	20	3.5	17.0	1.8	10.6	4.9
30	30	3.5	13.2	1.4	10.6	3.8
20	40	3.5	10.5	0.9	8.6	3.0
10	50	3.5	9.0	0.8	8.9	2.6
0	60	3.5	7.1	0.7	9.9	2.0

7.0배인 24.4 g FW/L의 증식율을 보여 가장 우수하였다. 또한 이 처리구는 생장이 가장 불량한 NO_3^-/ NH_{4+}의 비율이 0:60인 처리구 생산량인 7.1 g FW/L에 비하여 3.4배의 높은 증식율을 보여주었다. 처리구별 부정근의 건물률은 NO_3^-/NH_{4+}의 비율이 40:20 및 30:30인 처리구에서 10.6%로 가장 높게 나타났으나, 이 처리농도를 중심으로 높아지거나 낮아지면 이에 비례하여 부정근의 건물률이 감소하였다. Liu와 Zhong (1997)은 인삼 세포배양시 배지내 초기 NH_4^+ 농도가 20 mM 이상인 경우 세포 증식이 억제되고 NO_3^-/NH_4^+ 비율이 높을수록 세포 생육이 활발하다고 하였다. 이는 배지내 높은 NH_4^+ 농도가 NH_4^+ 대사작용과 관련있는 glutamate 생합성 효소의 활성에 영향을 미치고, 배지의 pH를 낮추기 때문에 세포 생장에 필수적인 특정 효소의 활성을 억제시키기 때문일 것이라고 하였다. 본 실험에서 가시오갈피 부정근 생장 역시 배지내 NO_3^-농도가 NH_4^+의 2.0~6.0배였을 때 부정근 생산에 좋은 것으로 나타났으며, 건물중 역시 NO_3^-농도가 NH_4^+의 1.0~2.0배 정도로 높게 처리하였을 때 가시오갈피 부정근의 건물량 생산이 유리한 것으로 나타났다.

NO_3^-와 NH_4^+ 처리농도비율별 부정근 증식과 함께 가시오갈피의 주요 이차대사산물인 eleutheroside B, E 및 E_1 함량를 각각 조사하였다(Figure 2). Eleutheroside B와 E함량은 각각 NO_3^-/ NH_4^+ 비율이 60:0 및 50:10인 처리구에서 각각 457과 720 μg/g으로 가장 높았으며 NH_4^+ 처리농도비율이 증가함에 따라 급격히 감소하였다. 그러나 eleutheroside E_1의 함량은 NH_4^+ 비율이 증가함에 따라 다소 증가하는 경향을 보여주어 NO_3^-/ NH_4^+ 비율이 10:50인 처리구에서 가장 많은 61 μg/g의 생산량을 보여 이차대사산물에 따라 상이한 반응을 보였다. 이런 점으로 미루어 보아 배지내 총 질소함량과 함께 NO_3^-와 NH_4^+ 비율도 가시오갈피 부정근 생장과 eleutherosid류 생산에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 인삼 세포배양시(Liu and Zhong 1997) 인삼의 2차 대사산물인 ginseng saponin 함량은 배지내 총 질소농도가 5-20 mM로 비교적 낮을 때 높았고 5 mM의 NO_3^- 첨가구에서 최대의 saponin 생산을 보여

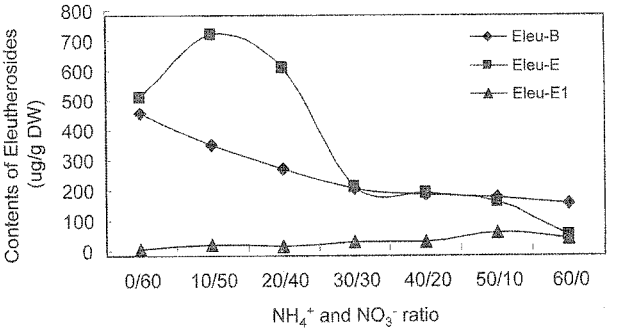

Figure 2. Changes in eleutheroside contents according to the concentration of NH^+_4 and NO_3^- in adventitous root cultures of *E. senticosus*.

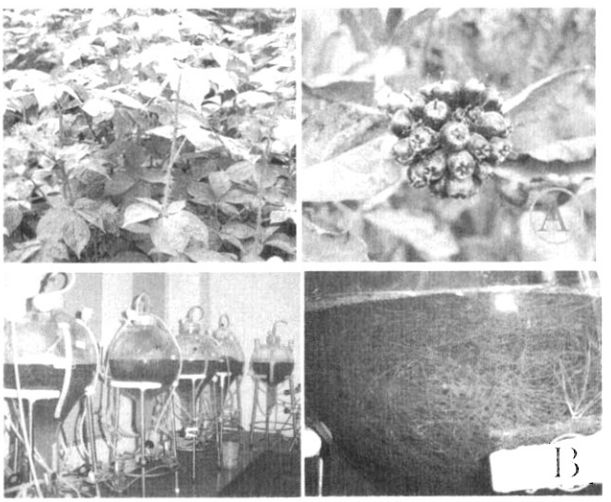

Figure 3. Plant and adventitious root production system for *E. senticosus*. using bioreactor.
A. Plant and seed of *E. senticosus*, B. Balloon type air-lift bioreactor culture of adventitious root of *E. senticosus*.

NO_3^- 농도를 낮추는 것이 saponin 생산에 효과적이라 하였다. 그러나 본 가시오갈피 부정근에 함유된 유용 2차대사산물인 eleutheroside B, E 및 E_1의 함량은 총 질소농도가 30-60mM로 중간정도일 때가 가장 높았으며, NO_3^-와 NH_4^+ 비율별 처리에서는 Eleutheroside B와 E함량은 NO_3^-의 농도가 높을 때 비교적 높은 생산량을 보여 saponin 생산과 다른 현상을 보였다. 반면에 eleutheroside E_1의 함량은 NH_4^+ 비율이 증가함에 따라 증가하는 경향을 보여 saponin 생산과 같은 현상을 보였으며, 배양 식물체와 이차대사산물의 종류에 따라 상이한 경향을 보이는 것으로 생각된다. 실제로 섬오갈피 부정근 배양에서 elicitor인 jasmonic acid처리에 의한 이차대사산물인 eleutheroside B, E 및 E_1 함량를 조사한 결과 처리농도가 높을수록 부정근의 생장은 감소하였으나 eleutheroside B, E의 함량은 증가하였다. 그러나 eleutheroside E_1 함량은 감소하여 jasmonic acid처리가 이차대사산물에 따라 물질집적에 다르게 영향을 미치는 것으로 나타났다(안진권 등. 2006).

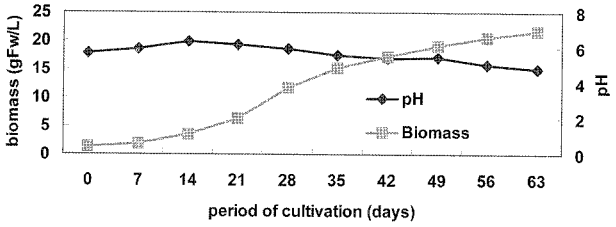

Figure 4. Changes in pH and biomass during adventitious root culture of *E. senticosus* in a 3L balloon type air-lift bioreactor.

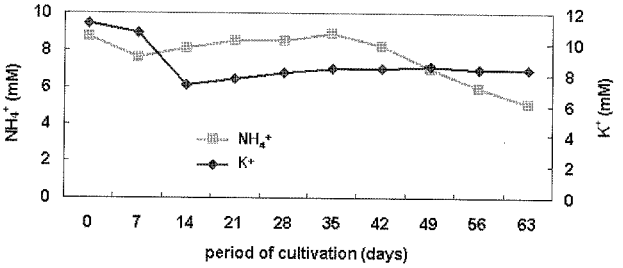

Figure 5. Changes in ammonia and potassium during adventitious root culture of *E. senticosus* in a 3L balloon type air-lift bioreactor.

가시오갈피 부정근의 biomass 생장과 배지의 pH 변화를 구명하기 위하여 1주일 간격으로 부정근의 생중량과 pH 변화를 조사하였다(Figure 4). Bionass 증가는 접종 후 4주일까지 생장이 상승세를 보이다가 그 이후에는 증가세가 둔화되는 것으로 나타났다. 즉 부정근의 biomass량은 배양 9주에 21.6 g FW/L으로 접종량 3.5 g FW/L의 6.2배의 생장증가를 보였고, 배양 3주에서 배양 4주일째의 1주간의 생장증가량이 6.3 g FW/L에서 11.6 g FW/L으로 증가하여, 그 차이가 5.3 g FW/L로 1주일간에 1.8배의 생장증가로 전 배양기간 9주를 통하여 가장 왕성한 생장을 한 것으로 나타났으나, 그 이후에는 점차적으로 생장세가 감소하였다.

배지의 pH는 6.4에서 4.8로 큰 변화를 보여주었다. 부정근의 접종 후 생장이 완만하게 상승되는 배양 2주일까지 pH도 동반 상승하여 6.4까지 상승하였다. 그러나 부정근의 생장이 보다 빠르게 진행되는 3주째부터 수확기인 9주째까지 완만하게 감소하여 수확시 pH 4.8로 가장 낮았다. 이러한 점으로 미루어 보아 가시오갈피 부정근 배양에 적합한 배지 pH는 6.1-6.4사이인 것으로 사료된다. Gorret 등(2004)은 *Elaeis guineensis*의 세포현탁배양에서 bionass 증가는 배양 25일 동안에 약 3.5배로 증가하였고, 배지의 pH는 배양 초기의 9일 동안에 5.6에서 4.0으로 감소폭이 컸으나 그 후 25일 후에는 4.4로 완만하게 증가하였다고 보고하였다. 가시오갈피 부정근 배양의 경우 biomass 증가는 *Elaeis guineensis*의 세포현탁배양과 비슷한 배양초기 28일까지 왕성한 증가세를 보였다. 그러나 배양액의 pH는 배양초기 14일까지 완만한 상승세를 보이다가 그 후 완만한 감소세로 나타나 다소 차이를 보였는데, 이것은 수종 및 배양재료의 상이함과 신진대사작용 및 배양방법의 차이에서 기인된 것으로 생각된다.

가시오갈피 부정근이 생장하는데 가장 중요한 배지내 영양원인 질소원(NH_4^+)과 칼리(K^+)에 대한 함량변화를 조사하였다(Figure 5). 배지내 중요한 질소원인 암모니아태 질소(NH_4^+)는 부정근을 접종한후 생장이 시작되는 배양 1주일까지는 급격한 감소량을 보이다가 생장이 가장 왕성한 배양 2주에서 배양 5주까지는 완만한 상승세를 보였다. 그러나 배양 5주째에 NH_4^+ 8.9 mM의 함유량을 나타낸 후 수확기인 9주까지 계속하여 감소하였다. *Elaeis guineensis*의 세포현탁배양(Gorret 등. 2004)에서 배지내 질소원(NH_4^+)의 함량변화는 배양초기 25일까지는 감소세가 컸으나, 그 후에는 완만한 감소세를 보여 가시오갈피 부정근 배양과 비슷한 흡수형태를 보였다. 역시 가시오갈피 부정근 배양에서 중요한 영양원인 칼리(K^+)는 접종시 배지내 함유량이 11.3 mM로 전 배양기간을 통하여 가장 높았다. 부정근의 생장이 시작되어 많은 영양원이 필요한 2주일까지는 감소량이 컸으나, 부정근의 초기 생장 단계가 지나고 본격적인 왕성한 생장을 시작하는 2주 이후에는 약간의 상승세를 보였다. 이러한 경향은 *Elaeis guineensis*의 세포현탁배양(Gorret 등. 2004)에서 질산태 질소(NO_3^-)의 변화와 동일한 경향을 보여 수종 및 배양재료에 따라 무기염류의 흡수형태가 다소 차이가 있음을 보여준 것으로 사료된다.

본 실험을 통하여 가시오갈피 부정근 배양시 최대의 생장과 이차대사산물의 증진 및 생산을 위하여 배지내 질소원 뿐만 아니라, 다른 무기염류의 처리와 elicitor, 배양방법, 생장조절물질 및 당 농도 처리 등 보다 다양하고 심도있는 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

인용문헌

1. Ahn, J.K., Park, S.Y., Lee, W.Y., and Park, Y.P. 2006. Effect of jasmonic acid on root growth and eleutheroside accumulation in adventitious root culture of *Eleutherococcus koreanum.* Journal of Korean Forest Society. 95(1): 32-37.
2. Ahn, J.K., Park, S.Y., Lee, W.Y., and Lee, J.J. 2005. Effect of growth regulators on adventitious root growth and eleutherosides and chlorogenic acid accumulation in air lift bioreactor culture of *Eleutherococcus koreanum.* Korean Journal of plant biotechnology. 32(1): 57-61.
3. Ahn, J.K., Lee, W.Y., and Park, S.Y. 2003. Effect nitrogen source on the cell growth and production of secondary metabolites in bioreactor cultures of *Eleutherococcus senticosus.* Korean Journal of Plant Biotechnology. 30(3): 301-305.

4. Ahn, J.K., Lee, W.Y., Oh, S.J., and Park, Y.H. 2000. The contents of chlorogenic acid and eleutheroside E in *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms. Journal of Korean Forest Society. 89: 216-222.
5. Akalezi, C.O., Liu, S., Li, Q.S., Yu, J.T., and Zhong, J.J. 1999. Combined effects of initial sucrose concentration and inoculum size on cell growth and ginseng saponin production by suspension cultures of *Panax ginseng*. Process Biochemistry. 34: 639-642.
6. Fujita, Y., Hara, Y., Ogino, T., and Suga, C. 1981. Production of shikonin dervatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon.* 1. Effect of nitrogen sources on the production of shikonin dervatives. Plant Cell Reports. 1: 59-60.
7. Gorret, N., Rosli, S.K., Oppenheim, S.F., Willis, L.B., Lessard, P.A., Rha, C.K., and Sinskey, A.J. 2004. Bioreactor culture of oil palm (*Elaeis guineensis)* and effects of nitrogen source, inoculum size, and conditioned medium on biomass production. Journal of Biotechnology. 108: 253-263.
8. Han, J.Y., and Choi, Y.E. 2003. Mass production of *Eleutherococcus senticosus* plants through in *vitro* cell culture. Korean Journal of Plant Biotechnology. 30: 167-172.
9. Kang, S.M., Jung, H.Y., Kang, Y.M., Yun, D.J., Bahk, J.D., Yang, J.K., and Choi, M.S. 2004. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. Plant Science. 166: 745-751.
10. Kang, J.S., Linh, P.T., Cai, X.F., Kim, H.S., Lee, J.J., and Kim, Y.H. 2001. Quantitative determination of eleutheroside B and E from *Acanthopanax* species by high performance liquid chromatography. Archives pharmacal research. 24: 407-411.
11. Liu, S., and Zhong, J.J. 1997. Simultaneous production of ginseng saponin and polysaccharide by suspension cultures of *Panax ginseng*: Nitrogen effects. Enzyme and Microbial. Technology. 21: 518-524.
12. Liu, S., and Zhong. J.J. 1998. Phosphate effect onproduction of ginseng saponin and polysaccharide by cell suspension cultures of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium*. Process Biochemistry. 33: 69-74.
13. Murashige, T., and Skoog. F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15: 473-497.
14. Panda, A.K., Mishra, S., and Bisaria, V.S. 1992. Alkaloid production by plant cell suspension cultures of *Holarrhena antidysenterica* : 1. Effect of major nutrients. Biotechnology Bioeng. 39: 1043-1051.
15. Sakuta, M., Takagi, T., and Komamine, A. 1987. Effects of nitrogen source on betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacca americana.* Physiology Plant. 71: 459-463.
16. Slacanin, I., Marston, A., and Hostettmann, K. 1991. The isolation of Eleutherococcus senticosus constituents by centrifugal partition chromatography and their quantitative determination by high performance liquid chromatography. Phytochemistry Analysis. 2: 137-142.
17. Son, S.H., Choi, S.M., Choi, K.B., Lee, Y.H., Lee, D.S., Choi, M.S., and Park, Y.G. 1999. Selection and proliferation of rapid growing cell lines from embryo derived cell cultures of Yew tree (*Taxux cuspidata* Sieb. et Zucc). Biotechnology Bioprocess Engineering. 4: 112-118.
18. Son, S.H., Choi, S.M., Lee, Y.H., Choi, K.B., Yun, S.R., Kim, J.K., Park, H.J., Kwon, O.W., Noh, E.W., Seon, J.H., and Paek, K.Y. 2000. Large-scale growth and taxane production in cell cultures of *Taxus cuspidata* (Japanese yew) using a novel bioreactor. Plant Cell Reports. 19: 628-633.
19. Suresh, B., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N., and Ravishankar, G.A. 2004. Polyamine and methyl jasmonate-influenced enhancement of betalaine production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* grown in a bubble column reactor and studies on efflux of pigments. Process Biochemistry. 39: 2091-2096.
20. Yu, K.W., Gao, W., Hahn, E.J., and Paek, K.Y. 2002. Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of *Panax ginseng* C.A. Meyer. Biochemical Engineering Journal. 11: 211-215.

(2006년 11월 3일 접수; 2007년 3월 7일 채택)