

형질전환된 인삼 모상근의 배양조건 규명

정귀택, 류화원, 강춘형, 박돈희, 황 백*

전남대학교 화학공학부, 생명과학부*

전화 (062)530-0232, FAX (062)530-1849

초록

Panax ginseng hairy roots, transformed by *Agrobacterium rhizogenes* KTCT 2744, was incubated flask, and investigated its optimal growth conditions.

Transformed *P. ginseng* hairy roots showed active branching pattern and fast growth at free-hormone medium. Optimal conditions of hairy roots showed maximum growth at 23°C, pH 5.8, 1/2 MS medium, 3% sucrose. Effects of combined sugar showed that it had a better growth at only sucrose without glucose or fructose than with glucose or fructose. Also the case of sucrose with glucose had a better growth than with fructose.

서론

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 식물학적으로 오가과(Araliaceae), 인삼속(*Panax*)에 속하는 식물을 말하며, 뿌리를 약용으로 이용한다. 여기서 "Panax"란 어휘는 희랍어로 Pan(all)과 Axos(cure)의 복합어로 만병을 치료한다는 뜻이다. 세계적으로 인삼속의 식물종은 6~7종이 알려져 있으나, 경제적으로 재배되어 세계시장에서 상품으로 유통되고 있는 인삼종은 크게 3종류가 있다.¹⁾

*P. ginseng*은 비정상적인 신체를 정상화시켜주는 효과, 항암효과, 항당뇨 효과, 고혈압치료 효과, 항스트레스 및 항피로 효과, 항방사선 효과 등이 알려져 있다. 이와 같은 작용을 나타내는 인삼 성분에는 glycoside, fatty acids, peptide, steroide, polyethylene 계 화합물 등 여러 가지 성분들이 알려져 있다.²⁾

이러한 인삼의 조직배양을 이용한 대량생산에 관한 연구가 많이 시도되어 왔다.

본 연구에서는 *P. ginseng* 모상근 배양을 위한 cell line의 확립과 그에 따른 최적 배양조건에 대하여 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

본 실험에서 형질전환을 위하여 사용된 균주는 *Agrobacterium rhizogenes* KCTC 2744이며, 유전자원센터 유전자 은행(한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소)에서 분양 받아 사용하였다. 형질전환된 모상근의 배양조건 규명을 위해서 온도, pH, 배

지 종류, 당 종류, 당 농도, 그리고 혼합당의 영향을 알아보았다.

모상근의 생체량은 멸균된 티슈를 이용하여 충분히 수분을 제거한 후 생체량을 측정하였고, 건조중량은 60°C로 고정된 dry oven에서 항량이 되도록 충분히 건조하여 건조중량을 측정하였다.

결과 및 고찰

인삼 모상근의 유도

표면살균한 인삼근에 *A. rhizogenes* KTCC 2744 균주를 감염시킨 후 7주 정도 경과 하였을 때 절단면에서 모상근이 유도되었으며, 유도된 모상근을 절취하여 항생제(300mg/L Cefotaxime)이 첨가된 1/2 MS 고형배지(3% sucrose)에서 3~4회 계대 배양한 결과 균을 완전히 제거할 수 있었다. 균이 제거된 모상근은 *A. rhizogenes*의 Ri-plasmid에 의해 형질전환된 식물조직에서 나타나는 일반적인 특징인 식물 생장조절제가 첨가되지 않은 배지에서 활발한 분지능과 빠른 성장을 보였다.

모상근의 배양조건 규명

Fig. 1은 배양온도가 모상근의 성장에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 1L 생물반응기(Working Volume 800mL)에 초기 접종량 2g의 모상근을 접종하여 21, 23, 27, 30°C에서 30일 동안 배양한 결과 21°C에서 최고 성장을 보였다.

Fig. 2는 모상근의 성장에 미치는 pH의 영향을 나타낸 것이다. 모상근의 생장은 pH 2~10까지의 범위 중에서 pH 4~7까지의 범위에서 최적성장을 보였으며, pH 4 이하와 8이상에서는 모상근의 성장이 감소함을 보여주었다. 또한 모상근이 성장함에 따라 각각의 배지의 pH가 4.5~6.0 사이의 값으로 유지되었다.

식물 종에 따라 최적 배지(염)의 종류와 농도가 다양하게 알려져 있다. 모상근의 성장에 최적의 배지를 선정하기 위하여 1/2 MS, MS, B5, N6, White, R2 액체배지를 사용하여 배양하였다. 배지의 종류가 모상근의 성장에 주는 영향을 보면 Fig. 3과 같으며, 250mL flask에서 각 종류의 배지에 3%의 sucrose를 첨가하여 26일 동안 배양한 결과 1/2 MS 배지에서 12.83g으로 최고 성장을 보였고, B5에서는 12.48g의 성장을 보였다. 또한 N6(8.16g), R2(8.62g) 배지의 경우에는 목질화된 굵은 주근을 보였으며, white(7.05g) 배지에서는 목질화된 주근에 아주 가늘고 긴 잔 뿌리가 많았다.

세포주에 따라 탄소원의 이용은 다양하기 때문에 최적의 탄소원을 조사하기 위하여 배지에 첨가되는 탄소원을 달리하여 배양하였다. 탄소원의 종류에 따른 모상근의 성장을 조사한 결과 Fig. 4와 같았다. 250mL flask에서 1/2 MS 배지염에 각각의 탄소원을 3%가 되게 첨가하여 26일 동안 배양하였을 경우, Sucrose가 12.75g으

로 최고의 성장을 보였으며, 다음으로는 Maltose가 11.24g으로 나타났다. Glucose(4.28g)와 Fructose(4.38g)는 그 성장이 저조하였으며, Lactose(1.29g)에서는 거의 성장하지 못 하였다. Starch(2.67g)의 경우에서도 성장이 미진하였다. 그리고 1.5%의 Glucose와 1.5%의 Fructose를 혼합하여 첨가한 배지에서도 그 성장(3.87g)이 저해되었다. 또한 1.5% glucose 만, 그리고 1.5% fructose 만을 첨가한 경우에도 그 성장이 좋지 않았다.

Sucrose의 경우에는 긴 모상근에 branch가 주로 형성되었으나, maltose 경우에는 sucrose보다는 낮은 성장을 보였지만, sucrose 에서보다 가는 branch의 수가 많았다.

1/2 MS 배지하에서 sucrose의 농도에 따른 영향을 10 g/L에서 100 g/L 까지 10g/L 단위로 실험한 결과가 Fig. 5와 같다. 당농도가 30g/L일 때 최고 성장을 나타내었으며, 40~80g/L에서 비교적 양호한 성장을 보였다. 낮은 당농도에서는 배양 기간 중 당이 모두 소모된 것으로 사려되며, 높은 당농도에서는 기질에 의한 저해 현상을 보이고 있다.

모상근 성장의 최적 당인 sucrose는 glucose와 fructose로 구성되어 있는 이당이다. 이에 배지 멸균시 sucrose가 분해되어 glucose와 fructose로 일부(15-25%)가 변환된다. 이 변환된 glucose와 fructose의 농도에 따른 모상근의 성장을 알아보면 Fig. 6과 같다. Fig. 6에 의하면 2가지의 당이 혼합된 경우에는 fructose가 glucose 보다 모상근 성장을 저해함을 알 수 있었고, 3가지의 당(sucrose, glucose, fructose)이 혼합된 경우에는 glucose와 fructose의 농도가 높을 수록 저해가 심함을 알 수 있었다.

참고문헌

1. 한국인삼연초연구원, 최신 고려인삼(성분 및 효능편)
2. 김영준, 표병석, 김광수, 황백, "활나물로부터 모상근의 유도 및 배양", 한국생물공학회지(1998) 13(2), 155-161
3. O. Moreno-Valenzuela, J. Coello, V.M. Loyola-Varas & F. Vazquez-Flota, "Nutrient consumption and alkaloid accumulation in a hairy root line of *Catharanthus roseus*", Biotechnology Letters(1999) 21, 1017-1021
4. Yi-Heng Zhang, Jian-Jiang Zhong, and Jun-Tang Yu, "Effect of Nitrogen Source on Cell Growth and Production of Ginseng Saponin and Polysaccharide in Suspension Cultures of *Panax notoginseng*", Biotechnol. Prog.(1996) 12 567-571

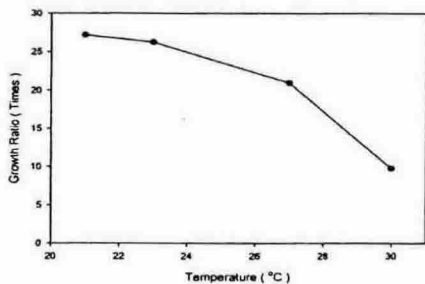


Fig. 1. Effect of Temperature on Growth of Hairy Roots Cultured for 30 Days in 1L Bioreactor.

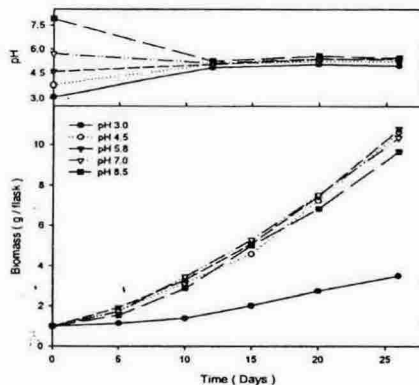


Fig. 2. Effects of Initial pH on Growth of Hairy Roots Cultured for 26 Days in 250mL Flask.

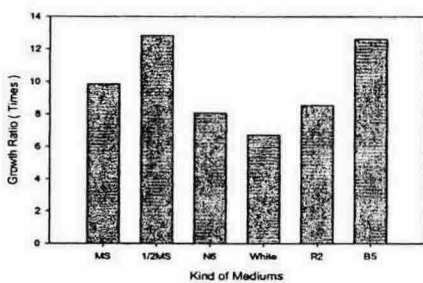


Fig. 3. Effects of Kind of Sugars on Growth of Hairy Roots Cultured for 26 Days in 250mL Flask.

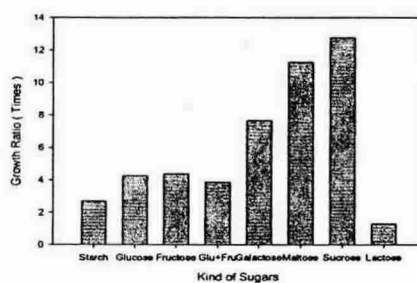


Fig. 4. Effects of Kind of Sugars on Growth of Hairy Roots Cultured for 26 Days in 250mL Flask.

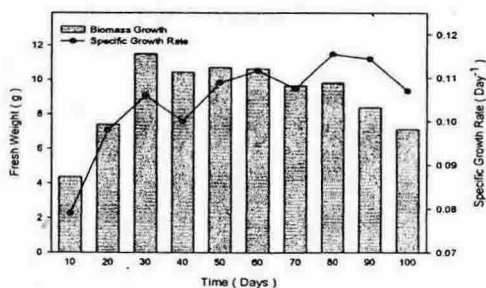


Fig. 5. Effects of Sucrose Concentrations on Growth of Hairy Roots Cultured for 25 days in 250mL flask.

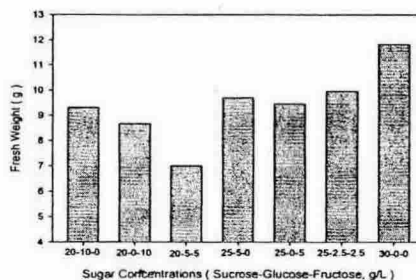


Fig. 6. Effects of Combined Sugar Concentrations on Growth of Hairy Roots Cultured for 26 days in 250mL flask.