

형질전환 인삼 callus의 단백질, 환원당 및 Ginsenoside의 양상

양덕춘 · 최광태 · 양덕조*

한국인삼연구소 유전생리부, *충북대학교 생물학과
(1991년 7월 22일 접수)

Patterns of Soluble Protein, Reducing Sugar and Ginsenosides in Transformed Calli of Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer)

Deok-Chun Yang, Kwang-Tae Choi and Deok-Cho Yang*

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Science Town, Taejeon 305-345, Korea

*Department of Biology, Chungbuk National University, Chungju 360-763, Korea

(Received July 22, 1991)

Abstract□This study was conducted to obtain basic information about the transformation of ginseng tissue, identification of opine compound and protein, and saponin production from ginseng callus transformed with Ti-plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* C58. Ginseng crown gall callus induced by pTiC58 could be continuously cultured on the phytohormone-free medium. The transformation was reconfirmed by the detection and identification of opine compound, from the gall callus. The transformed ginseng callus contained higher amounts of protein than normal callus and the protein pattern of transformed callus was quite different from that of normal callus. The xylose which is not detected in the normal callus and ginseng root was identified in gall callus. The saponin contents of gall callus of ginseng were three times higher than that of normal callus, and ginsenoside composition of the transformed callus was similar to that of the cultivated ginseng root, but quite different from that of normal callus.

Key words□*Agrobacterium tumefaciens*, Crown gall, Ginsenoside, *Panax ginseng*, Reducing sugar, Soluble protein

서 론

최근 식물세포를 미생물과 같은 방법으로 대량배양하여 식물세포의 이차대사작용으로 생성되는 유용물질을 생산할 수 있는 식물조직배양 기술이 발달되어 인공적인 환경조건하에서 식물조직을 배양함으로써 포장에서 재배할 경우 발생할 수 있는 많은 제한요소들을 감소시킬 수 있게 되었다. 특히 미생물이나 동물에서 생산할 수 없는 물질을 식물세포만이 생산할 수 있는 귀중한 화학물질도 존재함으로써 식물세포 배양을 이용한 대사산물을 획득하려고 하는 연구가 활발히 추진되고 있으며, 이 중에서도 alkaloids, steroids, terpenes, quinone 계열 등의 화합물이 주류를

이루고 있다. 실제로 식물조직배양을 이용하여 이차대사산물을 상업화한 것은 *Lithospermum erythrorhizon*의 배양세포에서 의약품으로 사용되고 있는 shikonin이며, 인삼에서도 *in vitro* 배양 방법에 의해서 대량 생산 체제를 갖추고 있는 실정이다.^{5,8,17,19)} *In vitro* 배양 방법에서는 배양조건을 달리해줌으로써 식물세포의 최대생장과 이차대사산물의 최대생산을 다소 조절할 수 있지만 대개 이 두 가지 요소는 상호반비례 관계에 놓여 있는 경우가 많기 때문에 적절한 생산지수(생장률×생산율)를 구해서 사용함으로써 이차대사산물의 최대생산을 극대화시킬 수 있다.

일반적으로 대사산물 생성에 큰 영향을 미치는 배양조건으로서 배지내에 첨가된 무기물, 유기물 및

식물호르몬과 pH를 들 수 있는데, 이 중 식물호르몬의 종류와 농도에 따라서 세포의 성장과 이차대사산물 생산의 변이가 심한 것으로 보고되고 있다. 한편 배양조건을 최적으로 하여 이차대사산물 생산을 조절하는데 한계가 있으므로 최근에는 새로운 세포주를 선발하여 사용하고자 하는 연구가 많이 진행되고 있으며 주로 자연상태에서 발생하는 crown gall과 hairy root 조직을 이용하여 효과를 얻은 결과가 보고되고 있다.^{1,11,20)}

Crown gall은 토양 세균인 *Agrobacterium tumefaciens*의 감염에 의해서 주로 쌍자엽 식물에 나타나는 현상으로써 Ti-plasmid의 일부인 T-DNA가 식물세포의 핵내로 안정되게 삽입되어 식물호르몬 자가합성 유전자가 발현되어 식물호르몬이 과잉 생산되어 형성되는 것으로 알려져있다.²⁾ 이런 gall 조직은 정상 조직과는 달리 *in vitro*내에서 조직배양시 식물호르몬이 전혀 첨가되지 않은 기본배지에서도 왕성히 생육하게 된다.^{2,3)} 최근에는 *Agrobacterium* spp.에 의하여 형질전환된 조직을 새로운 세포주로 선발하여 이차대사산물 생산 연구에 이용하고자 많은 연구가 진행되고 있는데, 주로 hairy root를 형성하는 *Agrobacterium rhizogenes*를 감염시켜 이차대사산물로써 alkaloids를 생산하고자 하는 연구가 진행되고 있다.^{9,10,13,14)}

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 옛날부터 한방의약품으로 오랫동안 이용되어 온 우리나라 고유의 전통 식물로써 체내의 성분 중 어떤 것이 유효성분으로 작용하는지에 관하여는 많은 연구자들에 의하여 연구가 계속 수행되고 있다. 그러나 전반적인 약리효능은 과학적으로 입증되지 못하고 있지만 지금까지 알려진 인삼의 가장 유효한 성분 중의 하나는 인삼 saponin으로 구명되어 있다.^{15,16,18)}

인삼은 원래 초본성 다년생 식물로서 기후풍토 즉, 토양의 화학성 및 물리성, 광의 강도, 통기성, 온도 등에 대하여 대단히 민감한 반응을 보이며, 토양세균에 의하여 발생하는 근부패병의 방제는 거의 불가능한 것으로 알려져 있다. 이상의 문제점 때문에 인삼은 재배하기가 대단히 까다롭고 어려우며, 해마다 생산량이 대단히 불안정하여 인삼제품의 원료공급이 원활하지 못한 실정이다.

그래서 최근에는 기후풍토의 영향을 전혀 받지 않은 인삼의 조직배양기술을 이용하여 인삼을 생산하려고

하는 연구가 활발히 수행되고 있으며, 배양세포 및 조직에서 인삼의 유효성분 중의 하나인 인삼 saponin을 분리한 바 있다.⁵⁻⁷⁾ 그리고 또한 *Agrobacterium* spp.를 이용하여 형성된 형질전환체의 물질대사 연구도 수행되고 있는 실정이다.^{1,6,7,22)}

본 연구는 *Agrobacterium tumefaciens* C58의 T-DNA에 의하여 형질전환된 인삼 gall callus의 특성을 구명하였으며, 또한 형질전환 callus로부터 인삼 saponin과 ginsenoside pattern를 조사하였는 바, 그 결과를 이에 보고코져 한다.

재료 및 방법

1. 공시재료

본 실험에 사용한 재료는 *Agrobacterium tumefaciens* C58의 T-DNA에 의하여 형질전환된 2년생 인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer) gall callus와 정상 2년생 인삼뿌리로부터 유기된 callus,³⁾ 그리고 자연포장에서 성장한 2년생 인삼뿌리를 사용하였다. 분석시료로 사용하기 위해서 gall callus의 경우에는 식물호르몬 무첨가배지에서, 정상 callus는 2,4-D 3 mg/l와 BA 0.5 mg/l 첨가된 배지에서 30일간 25°C의 배양실에서 암상태로 배양한 후, 그리고 재배인삼은 vermiculite, perlite, peatmoss를 각각 3 : 1 : 1로 배합한 flower bed(30×80 cm²)에 재식하여 7월에 수확하여 freeze dryer에서 동결건조시킨 후 마쇄하여 분말로 만든 후 냉동고에 저장하면서 분석시료로 사용하였다.

2. 인삼형질전환체의 opine 분석

Opine 분석은 Otten 방법¹²⁾을 약간 변경하여 사용하였는데, 우선 냉동건조된 분말 0.1g씩을 95% EtOH로 추출하여 17,200×g에서 centrifugation하고 상정액을 30°C vacuum evaporator에서 농축한 후 aqueous phase를 취하여 동일량의 ether에서 3번 세척하고 aqueous phase에 0.02% methyl green을 첨가한 후 3MM Whatman filter paper에 spot하여 전기영동하였다. Running buffer로써는 formic acid : acetic acid : D.W = 11 : 30 : 159(v/v/v) 용액을 사용하였으며, cold room에서 1 kV, 15 mA로 30분간 running시켜 paper를 50~60°C에서 30분간 건조시킨 후 0.02% phenanthrenequinone과 10% NaOH를 1 : 1(v/v)로 혼합한 용액을 spray하여 1시간 동안 실온에서 건조시킨 후 366 nm UV하에서 opine을 확인

하였다. Standard로 사용한 octopine, nopaline 및 arginine은 Sigma Chemical Company 제품을 사용하였다.

3. 단백질정량 및 pattern 조사

가용성 총 단백질 함량은 냉동건조된 분말 0.1g을 1M KCl 용액에서 추출하고 Whatman filter paper에서 filtration한 후 17,200×g에서 10분간 centrifugation하여 상침액을 회수하였다. 정량된 상침액을 2회에 걸쳐 TCA(final concentration, 5%)로 단백질 침전을 유도한 후 Lowry method에 의하여 정량하였다. Protein pattern은 10% SDS PAGE 방법에 의하여 확인하였으며 polyacrylamide는 8%를 사용하였고, 전기영동은 처음 stacking gel에서 24 mA로, running gel에서 32 mA로 약 3시간 정도 전기영동하여 0.125% Coomassie brilliant blue R-250(Sigma chemical company)으로 staining하였다. Standard로 사용한 단백질은 bovine serum albumin(66,000), albumin, egg(45,000), carbonic anhydrase(29,000)을 사용하였으며 Sigma chemical company에서 구입하였다.

4. Invertase activity 및 환원당 측정

냉동건조된 인삼분말 0.1g을 0.02 M Na_2HPO_4 citrate buffer(pH 4.5)로 추출하여 20 μl 를 취하고 이것을 0.5 M sucrose 20 μl 및 0.2 M Na_2HPO_4 -citrate buffer(pH 4.5) 100 μl 와 혼합하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 환원당 함량을 측정하여 invertase activity로 표시하였다. 환원당은 Somogy 방법 및 HPLC에 의하여 측정하였다.¹⁾

5. 인삼 saponin 정량 및 pattern 조사

냉동건조된 인삼 분말 2g을 취하여 Ando 등¹⁾의 방법에 의하여 조사포닌함량을 측정하였으며, 건조된 조사포닌을 MeOH로 용해해서 HPLC(analytical HPLC/ALC221)로 재배인삼에 가장 많이 함유되어 있는 ginsenoside인 Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re 그리고 Rg₁의 함량을 조사하였다. 또한 전체적인 ginsenoside pattern은 TLC로 조사하였고 전개용매로써는 수포화 n-butanol과 CHCl_3 : methanol : H_2O = 65 : 35 : 10(v/v/v)으로 전개한 뒤, 50% 황산으로 발색시켜 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 인삼 gall callus에서 opine의 확인

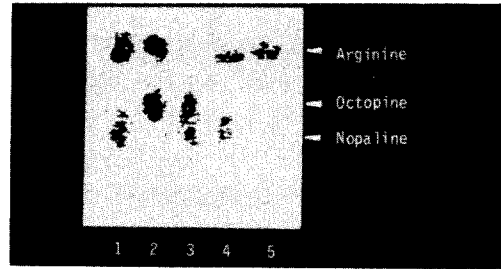


Fig. 1. Electrophotogram of opine of crown gall and normal calli in *Panax ginseng* C.A. Meyer. (lane 1, nopaline + arginine; lane 2, octopine + arginine; lane 3, nopaline + octopine; lane 4, gall callus; lane 5, normal callus).

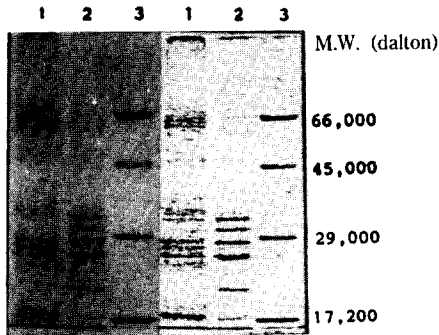
Agrobacterium tumefaciens C58 균주가 함유하고 있는 pTiC58의 T-DNA에 의하여 형질전환이 유도된 조직은 식물호르몬 무첨가 배지에서의 생존여부와 opine 합성유전자의 발현여부를 조사함으로써 쉽게 확실한 형질전환체임을 확인할 수 있다.¹²⁾ 본 실험에서 획득한 gall callus의 경우에는 이미 식물호르몬 무첨가 배지에서 왕성히 생장을 하였으므로,³⁾ 이차적으로 형질전환여부를 재확인하기 위하여 opine 검정을 하였다. Fig. 1은 gall callus와 정상 callus에서 opine 존재여부를 확인할 수 있는 paper electrophotogram을 나타낸 것인데, lane 1은 standard로써 nopaline + arginine이며, lane 2는 octopine + arginine, lane 3은 nopaline + octopine을 혼합하여 전개한 결과이며, lane 4는 gall callus, lane 5는 정상 callus로서, 정상 callus에서는 opine이 전혀 검출되지 않았으나 gall callus(lane 4)에서는 nopaline만이 존재하고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 1). Opine 중에서도 nopaline이 검출된 것은 본 실험에서 사용했던 균주가 nopaline type인 *Agrobacterium tumefaciens* C58이었기 때문이며, 정상 callus에서는 전혀 opine이 검출되지 않은 점으로 보아 gall callus는 확실히 형질전환된 조직인 것으로 생각된다.

2. 형질전환조직의 단백질정량 및 pattern 조사

T-DNA에 의하여 형질전환된 gall 조직은 정상 식물조직과는 달리 특이하게 opine 화합물을 함유하고 있는데¹²⁾ 이런 물질은 아미노산 유도체로서 주로 arginine과 유기산의 결합물질이므로 단백질 대사에 영향을 미칠것으로 생각되어 가용성 총 단백질 함량을 측정하였다. Gall callus는 단백질 함량이 6.00 mg/g·dry weight(D.W.), 정상 callus는 3.21 mg/g·D.W.로써

Table 1. Contents of soluble protein of crown gall and normal calli in *Panax ginseng* C.A. Meyer

Callus	Content (mg/g D.W.) of Protein
Gall callus	6.00
Normal callus	3.21

**Fig. 2.** SDS-PAGE electrophotogram of total protein of crown gall and normal calli in *Panax ginseng* C.A. Meyer. (lane 1, gall callus; lane 2, normal callus; lane 3, standard).

gall callus가 정상 callus보다 2배 정도 더 많은 경향을 나타내었다(Table 1). 또한 단백질 pattern을 조사한 결과 단백질 pattern이 gall callus와 정상 callus에서 각각 전체적으로 매우 상이하였으며, 특히 gall callus에서는 정상 callus에 비해서 저분자의 protein band가 없어지고 고분자의 protein이 다소 많아지는 경향을 보였다(Fig. 2).

3. 형질전환조직의 invertase 활성 및 환원당 측정

세포배양액내의 각종 성분조성은 세포가 증식함에 따라 대사에 이용됨으로써 세포구성물질의 일부분으로 전환되어 존재한다. 세포의 증식양상은 일반적으로 일정기간의 lag phase 후에 exponential curve를 나타내는 sigmoid형 곡선이다. 본 실험에서는 세포가 성장하는 과정 중에 배지내에 첨가한 에너지원인 sucrose의 환원당으로의 전환과 sucrose의 가수분해 효소인 invertase 활성을 측정하여 자체내에서 생산한 내생식물호르몬에 의하여 증식되는 gall callus와 외생식물호르몬에 의하여 증식되는 정상 callus의 차이를 구명코자 하였다. Total 환원당과 invertase activity는 gall callus와 정상 callus간에 거의 차이가 없었으나(Table 2), 환원당 중 rhamnose의 경우에는

Table 2. Contents of reducing sugar and invertase activity of crown gall and normal calli in *Panax ginseng* C.A. Meyer

Callus	Reducing sugar (mg/g D.W.)	Invertase activity (mg glucose/g D.W./h)
Gall callus	6.28	13.6
Normal callus	8.53	12.4

정상 callus가 3배가량 많은 경향을 보였으며, fructose나 glucose의 함량은 거의 비슷한 경향을 보였다(Table 3). 그러나 5탄당인 xylose가 gall callus에서는 검출되었으나 정상 callus와 인삼근에서는 전혀 검출되지 않았고, 특히 gall callus의 xylose의 함량은 1.45 mg/g로서 다른 환원당에 비해 매우 많은 양을 함유하고 있었으며, sucrose의 경우에는 gall callus와 정상 callus에서는 무척 적은 양이었으나 인삼근에서는 30.91 mg/g로 매우 많이 함유하고 있었던 바(Table 3), 재배 인삼뿌리와 callus간의 당함량 차이는 매우 심하였다.

4. 인삼형질전환체의 조사포닌함량과 ginsenoside pattern

인삼에서 유효성분으로 밝혀진 것은 주로 사포닌으로써 현재까지 인삼뿌리에서만 약 20여종의 ginsenoside가 알려져 있고 또한 그 구조식도 밝혀져 있다.^{1,15,16,18)} 그러나 이런 ginsenoside의 함량과 pattern은 재배조건이나, 기내배양시 배양환경조건 그리고 식물체의 사용 부위에 따라 매우 다르게 나타나므로^{6, 8)} 인삼조직이 wild type T-DNA에 의하여 형질전환 되었을 경우 인삼의 주요성분인 ginsenoside 함량과 pattern에 어떤 변화를 가져오는지를 구명하기 위해서 TLC에 의한 ginsenoside pattern을 조사하였다. 수포화 n-butanol을 전개용매로 사용하여 분리하였던 바, 재배 인삼근의 경우에는 4년생 인삼근에서 추출한 순수정제된 standard와 거의 비슷한 경향을 보이고 있으나 정상 callus에서는 다소 상이한 현상을 보이고 있고 gall callus는 정상 callus에 비해서 ginsenoside pattern이 재배인삼과 더 유사한 경향을 나타내었다(Fig. 3). 그러나 재배인삼에는 많이 함유되어 있는 ginsenoside Rb 계통이 gall callus에서는 무척 적다는 점이 특이한 것으로 관찰되어 소량의 Rb를 검출하기 위해서 전개용매를 CHCl_3 :methanol: H_2O =65:35:10으로 사용하여 Rb의 존재를

Table 3. Contents of various sugars of crown gall, normal calli and fresh ginseng root

Callus	Sugars (mg/g D.W.)					Total
	Rhamnose	Xylose	Fructose	Glucoser	Sucrose	
Gall callus	1.22	1.45	0.54	0.28	0.16	3.65
Normal callus	3.18	—	0.50	0.33	0.38	4.39
Ginseng root	—	—	2.74	2.82	30.91	36.47

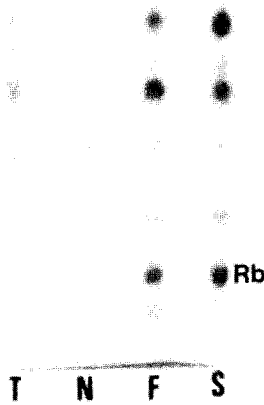


Fig. 3. Thin layer chromatogram for ginsenoside pattern of crown gall, normal calli and ginseng root. T, gall callus; N, normal callus; F, ginseng root; S, standard; Solvent system, n-butanol.

확인한 결과 gall callus에서도 Rb₁과 Rb₂가 다소 적지만 존재하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 4). 한편 조사포닌 함량과 재배인삼에 다량 함유되어 있는 6종의 ginsenoside의 함량을 HPLC를 이용하여 측정하였다. 인삼 callus 조직의 조사포닌 함량을 보면 gall callus가 31.2 mg/g, 정상 callus가 3배 가량 사포닌의 함량이 높았으며 재배인삼 뿌리와는 비슷한 경향을 보였다(Table 4). 또한 각각의 ginsenoside 함량을 보면 정상 callus에서는 Rb₂와 Rc가 검출되지 않았으나 gall callus의 경우에는 재배인삼 뿌리와 마찬가지로 모든 ginsenoside가 고루 함유되어 있었고, 다만 함량면에서는 재배인삼 뿌리보다 적은 경향을 보였다(Table 4).

그러나 재배인삼에 가장 많이 함유되어 있는 6종의 사포닌의 총 함량이 gall callus의 경우에는 6.63 mg

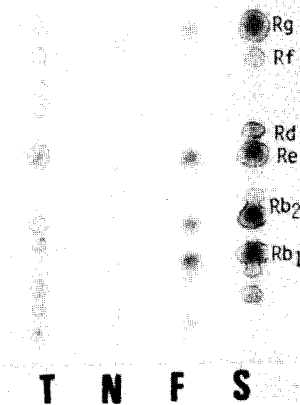


Fig. 4. Thin layer chromatogram for ginsenoside pattern of crown gall, normal calli and ginseng root. T, gall callus; N, normal callus; F, ginseng root; S, standard; Solvent system, CHCl₃: MeOH : H₂O = 65 : 35 : 10.

/g로, 재배인삼 14.32 mg/g에 비해 2배 가량 적지만 정상 callus에 비해서는 6배 정도 많은 양을 함유하고 있었다(Table 4). 특히 조사포닌에 비해 6종의 총 사포닌 함량의 비가 재배인삼의 경우에는 0.5로 6종의 사포닌의 경우에는 절반이 함유되어 있으나 gall callus의 경우에는 0.21로 매우 낮았으며 정상 callus의 경우에는 0.07로 더욱 낮았다. 이런 원인이 TLC pattern(Figs. 3, 4)에서 보는 바와 같이 gall callus와 정상 callus의 조사포닌속에 당성분이 많이 함유되어 있거나, 또는 기보고된 다른 종류의 사포닌들, 혹은 새로운 사포닌이 함유되어 있어—gall callus의 사포닌 pattern을 보면 standard에서 보이지 않은 물질이 보임—조사포닌의 함량에 비해 6종의 ginsenoside 함량이 적은 것으로 추측되지만 이에 대해서는 좀 더

Table 4. Contents of various ginsenosides of crown gall and normal calli induced from ginseng root

Callus	Crude Saponin(C) (mg/g D.W.)	Ginsenoside (mg/g D.W.)							T/C
		Rb ₁	Rb ₂	Rc	Rd	Re	Rg ₁	Total(T)	
Gall callus	31.2	0.82	0.50	0.55	1.38	2.36	1.02	6.63	0.21
Normal callus	13.1	0.25	—	—	0.20	0.29	0.26	1.00	0.07
Ginseng root	28.3	3.29	2.00	2.07	1.41	4.17	1.38	14.32	0.50

많은 연구가 요구된다.

최근 Ri-plasmid에 의해 형질전환된 hairy root 조직에서 이차대사산물을 생산코자 하는 연구가 많이 시도되고 있는데^{9,10)} 인삼 hairy root에서도 saponin이 확인되었고^{6,7,22)} 식물호르몬이 전혀 첨가되지 않은 배양기에서 자란 hairy root는 자연산 인삼뿌리와 saponin 함량이 비슷하였으며, IBA를 첨가한 배지에서는 2배 정도 많은 경향을 보였다.⁷⁾ 또한 Kamada 등¹⁰⁾에 의하면 Ri-plasmid에 의하여 형질전환된 연초 hairy root에서는 *in vitro*에서 자란 정상뿌리보다 10배 정도 많은 alkaloid 함량을 함유하고 있었으며 자연산 뿌리와는 비슷한 경향을 보여 본 실험과 유사한 경향을 보고하였으며, Hamill 등⁹⁾도 *Beta vulgaris*의 hairy root에서 자연산 뿌리보다 betacyanin과 betaxanthin의 함량이 거의 비슷하거나 다소 많은 경향을 보고하였다. 반면 연초 *N. rustica*에서는 hairy root가 오히려 자연산 뿌리보다 약 2~3배 정도 nicotine 함량이 많음을 보고하여⁹⁾ 이차대사산물에 따라서 차이가 있음을 시사하였다. 한편 sample 채취시기에도 많은 차이가 있을 것으로 사료되는 바, 대부분 배양 기간이 오래될 수록 이차대사산물이 더 많이 축적되는 것으로 보고되어 있어 Yoshikawa 등²²⁾은 인삼 hairy root의 채취시기가 18일 후이고 본 실험에서는 30일 후에 gall callus를 채취하였기 때문에 saponin 함량에 차이가 상이하지 않았나 생각된다. 또한 배양환경면에서도 callus 배양시 광과 암상태에 따라서 이차대사산물에 차이가 있으며 광질에 따라서도 차이가 있을 것으로 보고되어¹³⁾ 실험실 조건에 따라서 차이가 있을 수 있을 것으로 사료된다. 또 한편으로는 T-DNA에 의하여 형질전환되어 핵 DNA에 삽입되는 T-DNA의 copy 수와 삽입 위치에 따라 발현 정도가 달라져 hairy root의 clone 간에도 서로 차이가 있음을 보고하였는데,¹⁰⁾ Mono 등¹¹⁾은 *Scopolia japonica*의 hairy root의 clone 간에는 alkaloid 함량이 적어도 10배

이상 차이가 나는 clone이 있다고 하였다. 이는 T-DNA에 의하여 형질전환될 경우 T-DNA내의 식물 hormone 자가합성유전자의 발현에 의하여 식물 hormone의 balance에 따라 이차대사산물의 증감에 차이가 나타나는 것으로 사료되는 바 Yoshikawa 등²²⁾이 인삼 hairy root에 외생식물호르몬으로 IBA와 kine-tin을 추가 첨가할 때 성장량도 증가하였지만 saponin 함량이 2배 이상 증가함을 보고하여 형질전환체에도 외생식물호르몬을 첨가함으로써 이차대사산물의 증감 가능성을 시사하였으나 본 실험에서 사용한 gall callus는 외생식물호르몬을 첨가함으로써 성장량이 급격히 감소하는 경향을 보이고 있어³⁾ 균주간에 형질전환된 clone간에도 차이가 있었다. 또한 Mono 등¹¹⁾이 보고한데로 동일균주에 의하여 형질전환된 clone간에 차이가 있다고 생각될 때 여러 clone 중에서 외생식물호르몬에 의하여 생장이 증가하며 saponin 함량에도 차이가 있다면 T-DNA에 의하여 형질전환된 clone을 이차대사산물 생산을 위한 새로운 세포주로 활용할 수 있는 가능성을 높여줄 것으로 기대된다.

요 약

인삼의 조직배양에 의한 유용물질 대량생산 연구의 일환으로서 우선 기대배양에 의하여 증식된 인삼 callus 조직과 *Agrobacterium tumefaciens* C58의 T-DNA에 의하여 형질전환된 인삼 gall callus의 생리적 특성과 이차대사산물로써 인삼 saponin 및 ginsenoside pattern를 조사하였는 바, 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. *Agrobacterium tumefaciens* C58에 의하여 형질전환된 인삼 gall callus는 gall 조직 특유의 물질인 nopaline이 검출됨으로써 T-DNA에 의하여 형질전환이 되었음을 재확인되었다.

2. 인삼 형질전환 callus는 정상 callus보다 단백질

함량이 많았으며 단백질 pattern도 매우 상이하였다.

3. 인삼 형질전환 callus는 정상 callus와 재배인삼 뿌리에서는 나타나지 않은 xylose가 검출되었다.

4. 인삼 형질전환 callus는 정상 callus보다 조 saponin 함량이 3배 정도 많았으며 ginsenoside pattern도 재배인삼 뿌리와도 비슷한 경향을 보였다.

5. 이런 점을 감안할 때 T-DNA에 의하여 형질전환된 인삼 callus는 기내에서 사포닌을 대량 생산할 수 있는 새로운 세포주로서 사용 가능성을 제시하였다.

인용문헌

1. Ando, T., Tanaka, O. and Shibata, S.: *Syoyakugaku Zasshi*, **25**(1), 28 (1971).
2. Chilton, M.D., Drummond, M.H., Merlo, D.J. and Nester, E.W.: *Nature*, **275**, 147 (1978).
3. Choi, K.T. and Yang, D.C.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **11**(1), 56 (1987).
4. Eilert, U., Deluca, V., Kurz, W.G.W. and Constabel, F.: *Plant Cell Reports*, **6**, 271 (1987).
5. Fujita, Y., Suga, C. and Morimoto, T.: *Plant Cell Reports*, **1**, 61 (1981).
6. Furuya, T., Kojima, H., Synon, K. and Ishill, T.: *Chem. Pharm. Bull.*, **18**(11), 2371 (1970).
7. Furuya, T., Kojima, H., Syono, K., Ishii, T., Uotani, K. and Nishio, M.: *Chem. Pharm. Bull.*, **21**(1), 98 (1973).
8. Hagimori, M., Matsumoto, T. and Obi, Y.: *Plant Physiol.*, **69**, 653 (1982).
9. Hamill, J.D., Parr, A.J., Robins, R.J. and Rhodes, M.J.C.: *Plant Cell Reports*, **5**, 111 (1986).
10. Kamada, H., Okamura, N., Satake, M., Harada, H. and Shimomura, K.: *Plant Cell Reports*, **5**, 239 (1986).
11. Mono, Y., Nabeshima, S., Matsui, C. and Ohkawa, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **50**(11), 2715 (1986).
12. Otten, L.A.B.M. and Schilperoort, R.A.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **527**, 497 (1978).
13. Payne, J., Rhodes, M.J.C. and Robins, R.J.: *Planta Medica*, **367** (1987).
14. Robins, R.J., Hamill, J.D., Parr, A.J., Smith, K., Walton, N.J. and Rhodes, M.J.C.: *Plant Cell Reports*, **6**, 122 (1987).
15. Sanada, S., Kondo, N., Shoji, J., Tanaka, O. and Shibata, S.: *Chem. Pharm. Bull.*, **22**(2), 421 (1974).
16. Sanada, S., Kondo, N., Shoji, J., Tanaka, O. and Shibata, S.: *Chem. Pharm. Bull.*, **22**(10), 2407 (1974).
17. Suzuki, T., Yoshioka, T., Tabata, M. and Fujita, Y.: *Plant Cell Reports*, **6**, 275 (1987).
18. Osamu, T.: *Korea. J. Ginseng Sci.*, **2**(1) 9 (1977).
19. Tarao, S., Kato, K., Shiraishi, M. and Morimoto, H.: *J. Org. Chem.*, **44**(5), 868 (1979).
20. Walton, N.J. and Belshaw, N.J.: *Plant Cell Report*, **7**, 115 (1988).
21. Yang, R., Choi, Y.C., Kim, H.J., Lee, S.C. and Park, S.H.: *Korean J. Food Sci. Technol.*, **10**(2), 181 (1977).
22. Yoshikawa, T. and Furuya, T.: *Plant Cell Reports*, **6**, 449 (1987).