

인삼 형질전환 조직의 다량배양에 의한 Saponin 고 생산 I. 인삼에서 형질전환 조직의 유도, 배양과 Saponin 고 생산능주 선발

이 정 석 · *고 경 민 · *안 준 철 · *배 동 규 · **박 기 영 · ***고 성 룡 · *황 백
전남대학교 임학과 · *생물학과, **순천대학교 생물학과, ***한국인삼연초연구소

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

Jung Seok Lee, *Kyeong Min Ko, *Jun Cheul Ahn, *Dong Gyu Bai,
Ky Young Park, *Sung Ryong Ko and *Baik Hwang

Department of Forestry · *Department of Biology,
Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

**Department of Biology, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

***Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

ABSTRACT

Hairy root clones of *Panax ginseng* were established by selection of some hairy roots formed on the leaf, stem and root segments transformed with *Agrobacterium rhizogenes* strain A₄. The transformed roots grew well in MS medium under the dark condition. To confirm the transformation with Ri-T-DNA, dot blot hybridization and opine analysis were performed. Among four hairy roots induced from different part of ginseng, the HB3 hairy roots were examined for selection of high-saponin-producing clones. Four clones isolated from HB3 hairy root cultures displayed various phenotypes characterized by growth and total saponin content. Maximum growth was obtained for cultures of HB3-10 clone and the content of total saponin was 0.55 wt%. However, higher amount of total saponin was obtained with HB3-2 clone cultures(0.74 wt%) in spite of lower growth. Dot blot hybridization confirmed the introduction of Ri-T-DNA in the plant genome. In the opine test, agropine and mannopine were detected from all hairy root clones.

서 론

식물로부터 얻을 수 있는 천연화합물이 약리학의 발달과 더불어 그 유효성분이 명확해지고, 또한 그것에 포함되어 있는 각종 성분의 작용 등이 점차로 알려짐에 따라 유용성분을 기내에서 조직배양 방법을 통해 생산하여 식품, 색소, 화장품, 의약품 등의

원료 및 소재로 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다(1). 이러한 연구는 1960년 이후 빠르게 진보되어 탈분화된 캘러스 또는 세포 현탁배양으로부터 alkaloids, flavones, perfumes, pigments, terpenes and terpenoids 등 다양한 물질의 생산이 보고되고 있다(2). 그러나 세포배양은 변이가 우발적이며, 재현성이 낮고, 우량형질 선발 체계의 개발 미진 등 여

러 가지 문제점들이 있으며(3-5), 특히 일부 대사 물질의 생산은 shoot와 뿌리(root)같은 세포 또는 식물기관의 분화와 연관이 되어 있어(6-7) 기관에 특이적인 물질의 생산을 위해서는 기관배양의 필요성이 요구된다. 따라서 1980년대 후반부터 Ri-plasmid가 내재된 *Agrobacterium rhizogenes*라는 토양 박테리아를 목적하는 식물체에 감염시켜 형질이 전환된 조직을 유도, 배양하여 특정 형질의 지속적 보존에 의한 기내 동종 clone의 번식, 식물 육종, 2차 대사산물의 안정적 공급 등에 이용하고 있다.

*Agrobacterium rhizogenes*가 감염된 조직은 숙주 식물의 genome내로 Ri-plasmid의 T-DNA가 도입되어 감염 부위에서 형질이 전환된 뿌리(모상근)를 만들어 내게 된다(8). 이러한 모상근은 외부에서 식물호르몬의 공급이 없이도 활발하게 성장하며, 어떤 식물종에 있어서는 개체의 분화가 자발적으로 또는 적절한 성장 호르몬의 첨가에 의해 일어난다(9). 또한 모상근은 굴지성 반응을 보이지 않으며, 유전학적으로 매우 안정하고(10-11), opine(mannopine, agropine 등)이라는 특이한 아미노산 유도체를 합성하여 이러한 특징에 의해 쉽게 형질전환 여부를 확인할 수 있다(12).

한편 유용산물의 상업적 생산에 있어서 우선적으로 고려하여야 할 문제는 생산자원의 선택인데, 여기에는 자원의 보존이 어렵고 부가가치가 높으며 약리효과가 널리 알려져 있는 자원의 선택이 국제 경쟁력면이나 국가발전에 기여도가 크다고 본다. 건강 식품으로 각광을 받고 있는 인삼은 비정상적인 신체 기능을 정상화시켜 주는 효과, 항암효과, 항당뇨효과, 고혈압 치료효과, 항스트레스 및 항피로효과 등이 알려져 있다(13-14). 이와 같은 작용을 나타내는 인삼 성분에는 glycoside, 지방산, peptide, steroid, polyethylene계 화합물 등 여러 가지 물질들이 알려져 있으며 생체대사에 중요한 기능에는 saponin이 유효하다고 인정되고 있다(15-16). 그리고 saponin 성분 중에는 홍분 및 억제제의 상반되는 작용을 가진 성분이 공존하고 있어서 중추신경계의 작용을 조절하여 혈압 및 기타 대사활동에 지대한 영향을 미친다고 하였다(17-18). 따라서 이러한 물질들을 생산해내는 방법을 자연상태의 재배기술에 의존하지 않고 기내에서 다량 획득하려는 연구는 미래의 인류가 추구해야 할 당면과제라 하겠다.

본 연구에서는 형질전환 조직으로부터 원하는 2차 대사산물을 다량 획득하기 위한 방법 개발의 일환으로, 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)을 재료로 하

여 이들 조직에 *A. rhizogenes*를 감염시켜 형질전환된 조직을 유도, 배양한 후 형질전환 여부를 dot blot hybridization과 opine 분석으로 확인하였으며, 이들로부터 saponin류 등을 다량 생산할 수 있는 clones을 조사하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 사용균주

재료로 사용한 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 금산 수삼시장에서 구입한 5년근 자경종(紫莖種) 수삼과 기내에서 켈러스로부터 재분화시킨 유식물체를 사용하였다. 사용균주는 *Agrobacterium rhizogenes* A₄ strain이며, 감자추출배지(potato extract medium)에서 2~3일 암배양(27°C)하여 무균수로 약 10⁸ bacteria/ml로 희석하여 사용하였다.

배(胚) 배양에 의한 유식물체 재분화

인삼으로부터 재분화 식물체를 얻기 위하여 Lee 등(19)의 방법을 사용하였다. 즉 개감된 종자의 종피를 제거하여 7%(v/v) NaOCl 용액으로 15분간 표면살균하고 무균수로 2회 세척한 후 무균적으로 배(embryo)를 절취하여 배 배양배지(1mg/ℓ의 2,4-D와 0.01mg/ℓ의 kinetin을 조합한 MS배지)로 옮겨 암소에서 켈러스를 유도하고, 이를 재분화배지(1mg/ℓ의 BA와 1mg/ℓ의 GA₃를 첨가한 1/2 MS배지)로 옮겨 1500lux의 cool-white fluorescent lamp를 조사하면서 16/8 광주기 조건(16시간의 광조건, 8시간의 암조건)에서 배양하여 재분화 식물체를 유도하였다.

모상근의 유도

인삼의 잎, 줄기, 뿌리로부터 모상근을 유도하기 위하여 다음과 같은 방법을 사용하였다. 1) 재분화 식물체의 줄기 부위에 direct infection 방법으로 균(*A. rhizogenes*)을 접종하여 모상근을 유도하였으며 또한 줄기와 잎을 1~1.5 cm의 크기로 잘라 균 현탁액과 2일간 co-culture한 다음 각 절편을 무균수로 3회 세척하고 멸균된 여과지(Whatman filter paper, No 2)로 여분의 물기를 제거하여 항생제(300mg/ℓ cefotaxime)가 첨가된 MS(20) 고형배지에 치상하여 암소(27°C)에서 모상근을 유도하였다. 2) 인삼 재배지역에서 자경종 수삼(5년근)을 구입하여 70%(v/v) 에탄올로 10분, 7%(v/v) NaOCl 용액으로 18분간 표면살균하고 무균수로 3

화 세척한 후 1~2cm 두께로 잘라 기부면 위에 균 현탁액을 접종시켜 항생제(300mg/l cefotaxime)가 첨가된 MS 고형배지에 치상하여 암소(27℃)에서 모상근을 유도하였다.

모상근의 배양

위의 조건에서 유도된 각각의 모상근을 조직으로부터 절취하여 carbenicillin, vancomycin 등의 항생제가 들어 있는 호르몬 무첨가 MS 배지로 옮겨 균을 제거한 다음, 항생제가 들어 있지 않은 동일한 고형배지로 옮겨 1~2개월간 배양하였다. 아울러 이들 모상근으로부터 생장이 활발히 진행되고 있는 재료만을 선별하여 모상근의 유도 부위에 따라 clones을 선정하였으며, 선정된 clones을 다시 동일한 액체배지가 함유된 250ml의 플라스크로 옮겨 회전식 진탕 배양기(50rpm)에서 계대배양하여 모상근의 성장과 총 saponin 함량을 조사하였다.

Saponin 고생산능 Clone의 선발

유도 부위에 따라 선정된 각각의 모상근 clone을 암배양한 다음 성장과 총 saponin 함량과의 관계를 검토하여 이들 중 하나의 clone을 선택하였으며, 선택한 clone으로부터 새로운 clone을 2차로 선발하였다. 즉 성장중인 모상근을 근단으로부터 2cm의 크기로 잘라서 하나의 플라스크에 하나씩 접종한 후 분지능, 성장속도, 외부형태에 의해 10개의 clone을 선발하였으며, 이들 각각의 모상근 약 0.56g(건물중)을 air-in, out 설비가 되어 있는 500ml의 플라스크(배지량 300ml, pH 5.8, sucrose 3%)로 전이한 후 외부로부터 여과된 공기(공기유출속도 0.25 l/min)를 공급하고 암조건에서 30일 동안 배양하여 모상근의 성장과 총 saponin 함량을 조사하였다. 모상근의 생장은 위의 조건에서 배양한 각각의 모상근을 회수하여 증류수로 3회 세척한 다음 여과지(Whatman filter paper, No로 물기를 제거하고 이를 5회 반복하여 여분의 물기를 제거한 다음 건조기(60℃)로 시료를 건조시킨 후 건조량으로 측정하였으며, saponins의 확인 및 정량은 TLC 패턴과 HPLC에 의한 방법을 사용하였다.

Crude saponin의 추출

Crude saponin은 수포화 n-butanol 추출방법(21)으로 추출, 분리하였다. 건조(60℃) 분말시료 5g씩을 취하여 70~75℃ 수욕조에서 80% methanol 50ml로 5회 추출하여 여과, 농축 후 50ml의 증

류수로 2회 세척하고 ethyl ether를 가하여 지질 등을 제거한 다음, 수층을 수포화 n-butanol로 4회 추출하여 n-butanol층을 모두 합하여 이 n-butanol용액을 다시 증류수로 2회 세척한 후 수층은 버리고, n-butanol용액만을 감압 농축시켜 중량법으로 crude saponin함량을 측정하였다.

Saponin 성분의 확인

수포화 n-butanol 추출 방법으로 추출, 분리된 crude saponin을 silica gel plate(Art. 5554, Merck Co.)에 5 μ l 점적하여 CHCl₃: MeOH: H₂O(65:35:10, lower phase)으로 전개시킨 후 30%-sulfuric acid(v/v)를 분무하여 105℃의 건조기에서 발색시켜 ginsenoside-Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re 및 Rg1을 확인하였다.

HPLC에 의한 정량

Crude saponin을 약 5%(w/v)가 되도록 HPLC용 methanol에 녹여 0.45 μ m millipore filter로 여과한 후 15~20 μ l를 HPLC 기(analytical HPLC/ALC 244)에 주입하여 saponin을 분리, 정량하였다. 이때 사용한 acetonitrile과 n-butanol은 E. Merck 회사의 HPLC용 용매류를, ginsenoside 표준품은 한국인삼연초연구소에서 분리한 표준품을 사용하였으며, column은 Lichrosorb-NH₂(Merck, 5 μ m, 25 \times 0.46cm I.D.)을 검출기는 differential refractometer RI 401을 사용하였고, mobile phase는 acetonitrile/H₂O/n-butanol(80:20:15)을 용매로 하여 1.0 ml/min flow rate, Attenuator 8x, Data module, 1.0 cm/min chart speed로 분석하였다. 또한 chromatogram의 각 peak는 표준화 saponin의 chromatography에 의하여 동정하고 각 ginsenoside의 함량은 peak height로 계산하였다.

DNA 분리

동결건조기로 시료를 건조시킨 후 Park 등(22)의 방법에 따라 0.2g의 시료를 마쇄하여 6ml의 DNA 용출용액(100mM Tris HCl, 50 mM EDTA, 500mM NaCl, pH 8.0)과 5 μ l의 β -mercaptoethanol을 넣어 DNA를 용출시킨 다음 65℃에서 10분간 방치시키고 5ml의 5M potassium acetate를 첨가하여 0℃에서 20분간 방치한 후 10,000rpm으로 20분간 원심분리하여 상등액을 모아 isopropanol을 첨가하여 -2℃에서 30분간 놓아둔 다음 다시 10,000rpm에서 20분간 원심분리하여 DNA의 침전

물을 모아 건조하였다. 건조된 DNA를 증류수로 녹여 100% ethanol을 가하여 -20°C 에 30분간 놓아둔 다음 10분간 원심분리하여 침전물을 $200\ \mu\text{l}$ 의 Tris-EDTA 완충용액에 용해시키고 phenol 추출과 ethanol로 정제하여 최종적으로 $20\ \mu\text{l}$ 의 Tris-EDTA 완충용액에 용해시켰다.

Dot Blot Hybridization

분리시킨 DNA 100ng을 Nytran membrane에 점적한 후 0.25 M HCl 용액을 이용하여 depurinate 시킨 후 denature 시키고 중화시켜 Nytran membrane에 DNA를 전이시킨 다음 80°C 의 진공오븐에서 2시간 동안 baking하였다. DNA가 결합되어 있는 Nytran membrane을 봉합이 가능한 비닐 bag에 넣은 후 prehybridization 용액을 첨가하여 4시간 동안 prehybridization을 시켰다. 또한 probe는 Ri-T₁-DNA의 *rol* A, B, C 유전자가 들어 있는 약 5kb의 DNA 절편을 random priming 방법을 사용하여 ³²P로 label시켰다. Prehybridization이 완료된 membrane에 500,000cpm/ml prehybridization solution의 농도로 probe를 첨가하여 68°C 에서 18시간 동안 hybridization 시킨 다음 3xSSC와 0.1% SDS로 이루어진 washing solution에 3회 세척한 후 건조하여 -80°C 에서 X-ray film에 노출시켜 radiography하였다.

Opine의 확인

Mannopine과 agropine의 확인은 Petit 등(23)의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉 동결건조 시료 0.3g(건물중)을 5ml의 에탄올로 균질화한 다음 $15,000\times g$ 에서 10분간 원심분리하여 상등액만을 감압증발 시킨 후 $20\ \mu\text{l}$ 의 증류수로 재용해시켜 5~ $10\ \mu\text{l}$ 를 Whatman 3MM paper에 점적하고 horizontal electrophoresis system(LKB Co. Model 2217)를 사용하여 1500 V로 45분간 전기영동하였다. 이때 완충용액은 formic acid : acetic acid : distilled water를 30 : 60 : 910의 비율로 조성하였고 전기영동이 끝난 후 paper를 건조, 염색액 A(1g AgNO₃를 소량의 증류수에 녹인 후 200ml의 acetone을 가한다)에 담귀 30분 정도 염색시킨 다음 다시 건조, 염색액 B(2% NaOH in MeOH)에 담귀 발색건조하여 NH₄OH로 여분의 AgNO₃를 씻고 5% Na₂S₂O₃ 용액에 고정하여 1시간 이상 흐르는 물로 세척하였다. 또한 표준 mannopine은 Sigma 제품을 구입하여 사용하였고 agropine은 mannopine을 재

료로 합성하여 사용하였다(24).

결과 및 고찰

배(胚) 배양에 의한 유식물체 재분화

인삼의 성숙한 배를 배 배양배지에서 배양한 결과 3~5주 후부터 캘러스가 형성되었으며 이를 1/2 MS+BA 1mg/l+GA₃ 1mg/l의 배지로 옮겨 주었을 때 4주 후부터 유식물체가 발달하였다(Fig. 1). 유식물체의 발달은 캘러스의 특정부위에서 형성되었으며 대부분 2개 이상의 줄기가 발달하여 Lee 등(19)의 결과와 동일하였다. 그러나 동일 배지에서 6개월 이상 배양하였을 때 유식물체의 생장이 빠르게 감소하며 뿌리의 형성이 빈약한 특징을 나타내었다.



Fig 1. Plant regeneration from ginseng callus cultures.

모상근 Clone의 선정 및 Saponin 함량

인삼의 잎, 줄기로부터 모상근의 유도는 재분화후 2개월 이내의 유식물체를, 뿌리로부터 모상근의 유도는 5년근 수삼을 사용하여 균을 접종하였을 때 잎과 줄기로부터는 7~8주, 뿌리절편으로부터는 12주가 경과하여 모상근이 유도되었다(Fig. 2). 아울러 모상근 clone의 선정은 유도부위에 따라 선정하였다. 뿌리로부터 유도된 모상근은 외부 형태와 성장 속도에 의해 HB1(직경 3~4mm, 성장과 분지능이 낮음)과 HB2(직경 1~2.5mm, 성장과 분지능이 높음)로 구분하고, 줄기로부터 유도된 모상근은 HB3, 잎으로부터 유도된 모상근은 HB5 clone으로 선정된 후 각각의 clone에 대한 성장과 ginsenosides 함량을 측정하였다. 그 결과 시간의 경과에 따른 모상근의 생장은 HB3가 가장 높아 HB1에 비하여 2.7배,

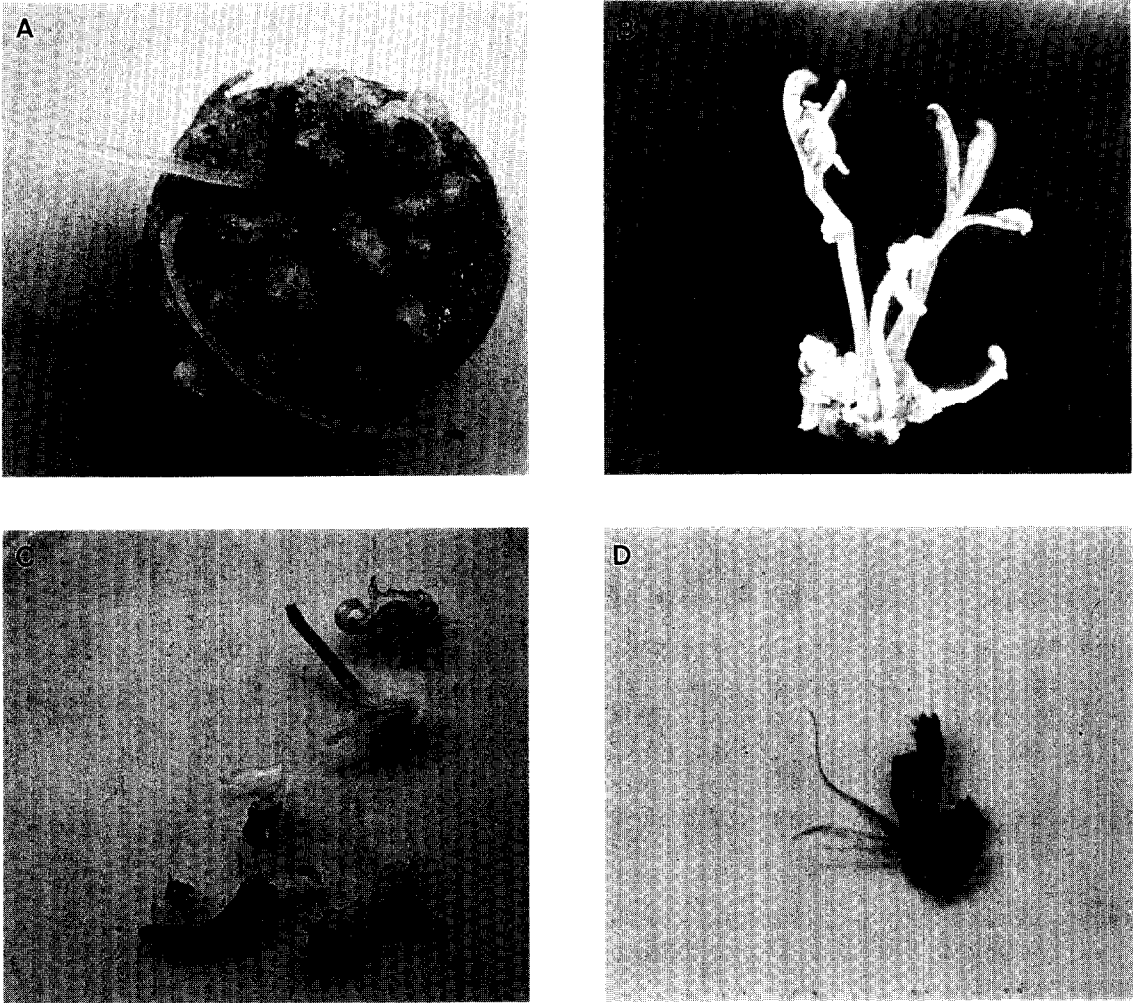


Fig 2. Hairy roots induced from root segment(A), stem(B), stem segment(C) and leaf discs(D) of ginseng

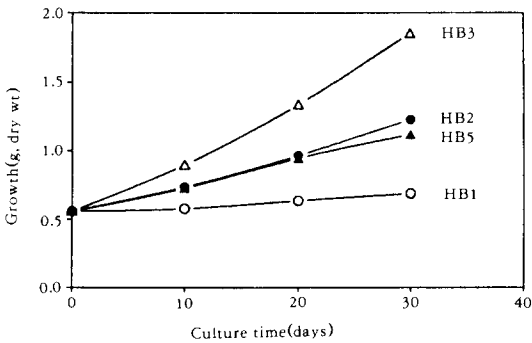


Fig 3. Growth of ginseng hairy root cultures of four different clones.

HB2에 비하여 1.5배, HB5에 비하여 1.7배 증가하였다(Fig. 3). 또한 각각의 crude saponin을 추출하여 TLC plate에서 분리한 바(Fig. 4), 모상근 모두가 동일한 ginsenosides 양상을 보여주었으며, ginsenoside-Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1을 기준으로 총 saponin 함량은 HB1 0.48%, HB2 0.74%, HB3 0.55%, HB5 0.53%로써 HB2 clone의 함량이 가장 높았다(Table 1).

Saponin 고생산능 Clone의 선발
모상근의 성장과 총 saponin 함량과의 관계를 검

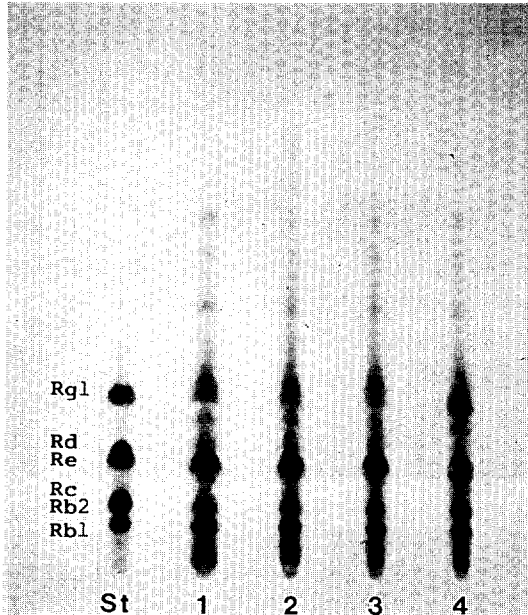


Fig 4. Thin layer chromatograms of saponin components in ginseng hairy roots of four different clones. Lane St, standard saponin; Lane 1, hairy root clone of HB1; Lane 2, hairy root clone of HB2; Lane 3, hairy root clone of HB3; Lane 4, hairy root clone of HB5.

Table 1. Crude saponin and ginsenoside contents in ginseng hairy roots of four different clones.

Clones	Crude saponin (wt%)	Content of ginsenosides(wt%)						
		Rb1	Rb2	Rc	Rd	Re	Rg1	T.G ^a
HB1	3.78	0.15	0.04	0.04	0.03	0.19	0.03	0.48
HB2	4.72	0.16	0.08	0.08	0.09	0.22	0.11	0.74
HB3	4.60	0.15	0.04	0.05	0.03	0.21	0.07	0.55
HB5	4.31	0.15	0.03	0.05	0.03	0.20	0.07	0.53

^a Total ginsenosides quantified by HPLC

토하여 생산성이 우수한 하나의 clone으로 HB3 clone을 선택하였다. 아울러 이들 모상근을 근단으로부터 2cm의 크기로 잘라서 하나의 플라스크에 하나씩 접종한 후 분지능, 생장속도, 외부형태에 의해 10개의 clone을 선발하여 clone을 동질화한 다음 2개월간 회전식 진탕배양 하였을 때(Fig. 5), 70%가

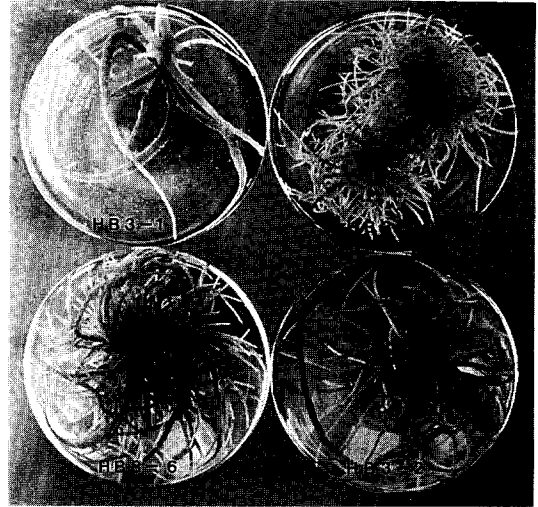


Fig 5. Hairy root clone cultures in MS liquid medium.

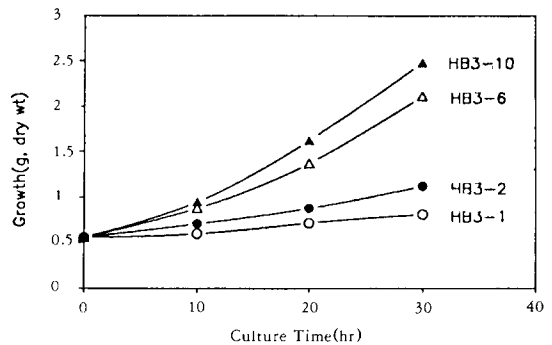


Fig 6. Growth of ginseng hairy root cultures selected from HB3 clone.

Table 2. Crude saponin and ginsenoside contents in ginseng hairy roots selected from HB3 clone.

Clones	Crude saponin (wt%)	Content of ginsenosides(wt%)						
		Rb1	Rb2	Rc	Rd	Re	Rg1	T.G ^a
HB3-1	4.05	0.13	0.04	0.04	0.04	0.20	0.05	0.50
HB3-2	4.62	0.17	0.09	0.06	0.09	0.23	0.10	0.74
HB3-6	4.54	0.16	0.05	0.05	0.07	0.20	0.09	0.62
HB3-10	4.33	0.15	0.05	0.05	0.03	0.20	0.07	0.55

^a Total ginsenosides quantified by HPLC

HB3-10의 표현형을 보여주었으며 나머지 3개의

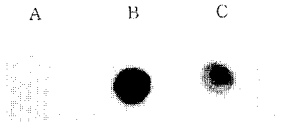


Fig 7. Dot blot hybridization of DNA from native ginseng tissue(lane A), hairy root clones of HB3-10(lane B) and HB3-6(lane C). Denatured DNA was dot-blotted on Nytran membrane and then hybridized with 32 P labeled Ri-T₁-DNA probe.

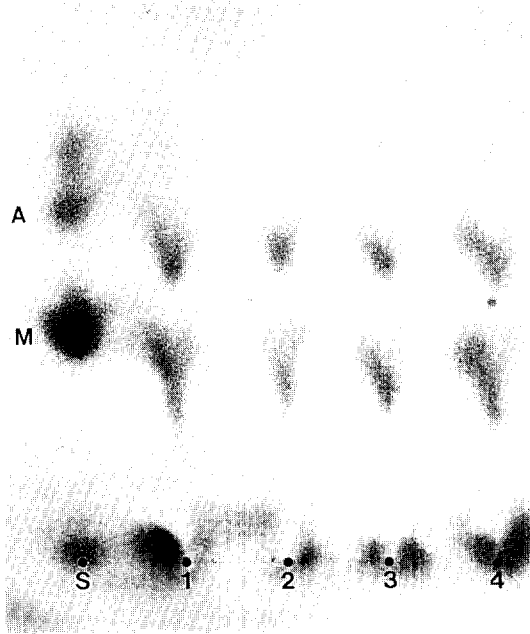


Fig 8. Paper electrophoretic analysis of extracts from ginseng hairy roots. Lane S, standard mannopine(M) and agropine(A); Lane 1, hairy root clone of HB3-1; Lane 2, hairy root clone of HB3-2; Lane 3, hairy root clone of HB3-6; Lane 4, hairy root clone of HB3-10.

clone은 다소 다른 형태를 나타내었다. 따라서 HB3 clone의 모상근으로부터 4개의 clone을 선택하여 시간의 경과에 따른 모상근의 생장을 조사한 결과 (Fig. 6), HB3-10 clone이 가장 빠른 생장을 보여

HB3-1에 비하여 3.1배, HB3-2에 비하여 2.2배, HB3-6에 비하여 1.2배 증가하였다. 그러나 총 saponin 함량은 HB3-1 0.50%, HB3-2 0.74%, HB3-6 0.62%, HB3-10 0.55%로써 HB3-2 clone의 함량이 가장 높게 나타났다(Table 2). 이러한 결과는 모상근 배양에 있어서 선발 clone간의 성장비가 10배의 차이를 보이며 또한 2차 대사산물의 함량이 개개의 clone마다 매우 다르게 나타난다는 Mano 등 (25)의 결과와 유사하였으며, 모상근의 빠른 생장이 2차대사산물의 생산과 비례하지 않음을 입증하였다.

Dot Blot Hybridization

*A. rhizogenes*의 감염에 의하여 유도된 모상근이 Ri-plasmid의 T-DNA 영역이 도입되어 형질이 전환된 세포에서 유래하였는지를 판정하는 방법의 하나로 Ri-T₁-DNA의 *rol* A, B, C 유전자를 probe로 하여 dot blot hybridization을 수행한 결과(Fig. 7), 형질전환이 되어 있지 않은 인삼에서 추출한 DNA는 signal을 나타내지 않았으나, 모상근의 DNA는 강한 signal을 나타냄으로써 모상근의 DNA에는 Ri-plasmid에서 유래한 DNA가 들어 있었으며 또한 이들 모상근은 Ri-T-DNA에 의하여 형질이 전환된 것임을 확인하였다(26).

Opine의 확인

Agropine type인 *A. rhizogenes*에 의하여 형질전환된 조직은 opine이라는 특이한 아미노산 유도체를 합성하므로(12), DNA수준에서 확인된 T-DNA가 숙주 염색체와 더불어 발현하는지의 여부를 확인한 결과(Fig. 8), HB3 clone에서 선발한 4개의 clone 모두가 표준시료로 사용한 mannopine, agropine과 같은 위치에서 opine이 검출되어 숙주세포 내로 도입된 T-DNA 영역이 세포의 염색체와 함께 발현하고 있음을 확인하였다.

요 약

인삼의 잎, 줄기, 뿌리절편에 *Agrobacterium rhizogenes*(strain A₄)를 접종하여 형질이 전환된 조직(모상근)을 유도, 배양한 후 saponin 고생산능 clones을 선발하였으며, 아울러 형질전환 여부를 dot blot hybridization과 opine 분석으로 확인하였다. 여러 부위에서 유도된 모상근은 모두 암조건의 MS 배지에서 활발히 성장하였으며, 이들 중 HB3 clone을 이용하여 동질화된 모상근 clone으로 배양한 후 saponin 고생산능 clone을 선발한 결과 HB3

-10 clone이 최대의 생장을 보였으며 총 saponin 함량은 0.55wt%로 나타났다. 그러나 총 saponin 함량이 가장 높은 clone은 비교적 생장이 느린 HB3-2 clone이었으며 0.74wt%의 함량을 나타내었다. 아울러 dot blot hybridization 결과 Ri-T-DNA가 식물체의 genome 내로 삽입되어 있었으며, opine 확인 결과 모든 모상근 clones으로부터 agropine과 mannopine이 검출되었다.

감 사

본 연구는 1993년도 교육부 학술연구조성비(유전공학)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다. 또한 probe로 사용된 Ri-T₁-DNA의 rol A, B, C 유전자를 제공하여 주신 연세대학교 강빈구 박사님에게 깊은 감사를 드립니다.

참고문헌

1. G. Payne, V. Bringi, C. Prince and M. Shuler (1992), *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*, 3~10, Hanser Publishers, New York.
2. S. H. Mantell, J. A. Matthews and R. A. Mckee(1985), *Industrial Plant Products*. In, *Principles of Plant Biotechnology*, 186~220, Blackwell Publishers, London.
3. M. H. Zenk(1980), *J. Nat. Prod.*, **43**, 438.
4. D. K. Dougall(1985), *Chemicals from Plant Cell Cultures*, 179~190, Academic Press, New York.
5. M. Taya, A. Yoyama, O. Konda, T. Kobayashi and C. Matsui(1989), *J. Chem. Eng.*, (Japan), **22**, 84.
6. G. Toppel, L. Witte, B. Riebsehl, K. V. Borstel and T. Hartmann(1987), *Plant Cell Rep.*, **6**, 466.
7. T. Hirata, S. Murakami, K. Ogihara and T. Suga(1990), *Phytochem.*, **29**, 493.
8. K. H. Beach and P. M. Gresshoff(1988), *Plant Sci.*, **57**, 73.
9. G. Ramsay and A. Kuma(1990), *J. of Exp. Bot.*, **41**, 841.
10. E. L. H. Aird, J. D. Hamill and M. J. C. Rhodes(1988), *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, **15**, 47.
11. P. Christen, M. F. Roberts, J. D. Phillipson and W. C. Evans(1989), *Plant Cell Rep.*, **8**, 75.
12. V. Guellec, C. David, M. Branchard and J. Tempe(1990), *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, **20**, 211.
13. D. K. Rhee, C. J. Lim and S. K. Hong(1981), *Kor. J. Ginseng Sci.*, **5**, 216.
14. H. Yamamoto, M. Katano and H. Matsunaga (1990), *Kor. J. Ginseng Sci.*, **14**, 244.
15. W. I. Hwang and S. K. Oh(1984), *Kor. J. Ginseng Sci.*, **8**, 153.
16. H. Y. Kim, Y. H. Lee, S. I. Kim and S. H. Jin (1988), *Proceedings of the 5th International Ginseng Symposium*, 455~460, Seoul.
17. C. J. Lim, E. H. Park, D. K. Rhee and S. K. Hong(1981), *Yakhak Hoeji*, **25**, 65.
18. C. J. Lim, E. H. Park, S. K. Hong and D. K. Rhee(1981), *Kor. J. Ginseng Sci.*, **5**, 192.
19. H. S. Lee, K. W. Lee, S. G. Yang, J. H. Jeon and J.R. Liu(1989), *Kor. J. Bot.*, **32**, 145.
20. T. Murashige and F. Skoog(1962), *Physiol. Plant.*, **15**, 473.
21. S. R. Ko, K. J. Choi, S. C. Kim and M.W. Kim(1989), *Kor. J. Pharmacol.*, **20**, 170.
22. K. Y. Park, A. Drory and W. R. Woodson (1992), *Plant Mol. Biol.*, **18**, 377.
23. A. Petit, A. Berkaloff and J. Tempe(1986), *Mol. Gen. Genet.*, **202**, 388.
24. A. Petit, C. David, G. A. Dahl, J. G. Ellis, P. Guyon, F. Casse-Delbart and J. Tempe (1983), *Mol. Gen. Genet.*, **190**, 204.
25. Y. Mano, S. Nabeshima, C. Matsui and H. Ohkawa(1986), *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2715.
26. T. Handa(1992), *Plant Tissue Cult. Lett.*, **9**, 10.