

## 사포닌 생산을 위한 인삼 root 액체배양조건의 최적화

오훈일<sup>#</sup> · 장은정 · 이시경<sup>\*</sup>

세종대학교 식품공학과, \*건국대학교 응용생물화학과  
(2000년 6월 5일 접수)

### Optimization of Submerged Ginseng Root Culture Conditions for the Production of Saponin

Hoon-Il Oh, Eun-Jung Chang and Si-Kyung Lee<sup>\*</sup>

Department of Food Science and Technology, Sejong University, Seoul 143-747, Korea  
<sup>\*</sup>Department of Applied Biology and Chemistry, KonKuk University, Seoul 143-701, Korea  
(Received June 5, 2000)

**Abstract :** This study was carried out to determine the optimal liquid medium composition of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) root induced by growth regulators in order to improve the yield of saponin production. Submerged culture conditions were optimized using the fractional factorial design with 4 factors and 3 levels by a RSM computer program. The effects of various pH values of medium, sucrose, nitrogen and phosphate concentration on the saponin content of the ginseng root were investigated. The optimum phosphate concentration determined by a partial differentiation of the model equation, pH of medium, sucrose and nitrogen concentration were phosphate 93 mg/L, pH 5.5, sucrose 5% and nitrogen 50 mg/L, respectively. Under these conditions, the predicted saponin content of ginseng root was estimated at 0.308%.

**Key words :** *Panax ginseng* C.A. Meyer, response surface methodology, ginseng root culture, saponin.

## 서 론

고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 예로부터 한약 재료 널리 쓰였을 뿐 아니라 최근에는 인삼을 원료로 한 인삼정, 인삼차, 인삼음료, 캡슐 등 다양한 형태의 가공식품이 제조되어 소비되고 있다.<sup>1)</sup> 그러나, 고려인삼은 세대기간이 길고, 연작이 불가능하며, 해가림이라는 특수 시설 조건 하에서만 재배가 가능하고, 수삼의 사포닌 함량이 0.06~0.09%에 지나지 않아, 재배인삼을 이용하여 약품, 건강음료 등을 제조할 경우 제조원가가 비싸지는 등 여러문제가 있어 산업적으로는 미삼을 주로 이용하고 있는 실정이다.<sup>2)</sup>

따라서, 최근 식물조직배양기술의 발달과 더불어 조직배양에 의해 생산된 인삼 캘러스를 재배인삼 대용으로 사용하기 위한 연구가 꾸준히 진행되고 있다. Slepyan 등<sup>3)</sup>이

1967년 최초로 인삼을 조직배양한 이래로, Furuya 등<sup>4)</sup>은 고려인삼의 여러 조직과 다양한 세포 배양에서 성장과 사포닌 생산과의 관계 등을 연구하였고, 켈러스 배양시 사포닌 생산과 성장에 미치는 auxin의 효과를 살펴보았다.<sup>5)</sup> 또한 지 등<sup>6)</sup>은 세포배양에 의한 고려인삼 성분의 생산연구에서 인삼캘러스에서 형성된 뿌리부분을 취하여 액체배지에 회전진탕배양하여 외관이 미삼과 비슷한 긴 원통형의 켈러스 mass를 얻었고 그 성분을 재배인삼과 비교하였는데, 사포닌 pattern은 재배인삼과 비슷하나 ginsenoside 총합량은 0.036%로 재배인삼보다 다소 낮은 함량을 얻었다. 황 등<sup>7)</sup>과 Yoshikawa 등<sup>8)</sup>은 인삼에 *Agrobacterium rhizogenes*를 감염시킨 후 생산되는 모상근 배양에 의한 사포닌생산 등을 연구하였으며, 고 등<sup>9)</sup>도 *Agrobacterium rhizogenes*에 의하여 형질전환된 인삼모상근 배양을 통해 주성분인 사포닌 함량을 증가시키기 위한 방법으로 여러가지 배양조건을 이용하여 모상근의 성장과 사포닌 함량과의 관계를 조사하였다. 모상근을 이용한 현재까지의 연구에서는 모상근 유도시 토양세균인 *Agrobacterium rhizogenes*를 감염시켜 형질전환을

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-3408-3229; (팩스) 02-3408-3569  
(E-mail) ohhi@kunjasejong.ac.kr

일으키도록 하여 모상근을 유도하였는데, 이때 외래 유전자인 Ri plasmid가 인삼염색체에 무작위로 incorporation하므로 이로 인한 인삼유전자의 발현(gene expression)이 달라져 인삼액기스의 경우 안전성에 대한 검토가 있어야 할 것으로 사료된다.

본 연구는 *Agrobacterium rhizogenes*의 감염없이 식물호르몬에 의해 유도된 인삼 root의 사포닌 생산에 배지의 조성이 어떠한 영향을 미치는지를 조사하기 위하여 반응표면분석법(Response Surface Methodology: RSM)을 이용하여 인삼 root의 사포닌 생산을 위한 최적배양조건을 선정하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 씨앗은 한국인삼연초연구원 수원경작시험장에서 분양받아 사용하였고, 배지와 growth regulator 및 시약은 모두 전보<sup>10)</sup>와 동일하게 사용하였다.

### 2. Callus 및 root의 유도과 배양

전보<sup>10)</sup>와 동일한 방법으로 callus와 root를 유도하여 실험에 사용하였다.

### 3. 반응표면분석법에 의한 배양최적조건의 설정

#### (1) Experimental design block 설정

Stat-graphics(STSC Inc. Rockville, MD, USA)내의 central composite design(CCD) program을 이용하여 root 배양배지의 조건인 pH, sucrose 농도, nitrogen 농도, phosphate 농도 등을 독립변수로 3 level-4 factor의 fractional factorial block을 정하였다(Table 1). 배지의 초기 pH는 최대 7.0, 최소 4.0, 중간값 5.5로 맞추었으며, sucrose 농도는 최대 5%, 최소 1%, 중간값으로 3% 되게끔 첨가하였고, nitrogen 농도는 최고 750 mg/L, 최소 50 mg/L, 중간값으로 400 mg/L 첨가하였으며, phosphate 농도는 SH배지의 phosphate 농도를 기준으로 하여, 최고 5/3배, 최소 1/3배, 중간값 1배가 되도록 각각 독립변수의 level을 설정하였다. 배지는 SH배지를 기본으로 하고, growth regulator로 0.5 mg/L BAP+3.0 mg/L NAA를 첨가하였다.

#### (2) Root 배양 및 사포닌 분석

3 level-4 factor에 의해 design된 fractional factorial block에 따라 배지를 제조하여 root 0.6 g씩을 100 mL flask에 접종하고 25°C 암조건 하에서 60 rpm으로 4주간 진탕배양한 뒤 사포닌함량을 측정하였다. Total saponin은

**Table 1.** Fractional factorial block of experimental design for ginseng root culture and saponin content

Treatment No.	Process var.				Process var.				Saponin content(%)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	
1	-1	-1	-1	+1	4.0	1	50	134.5	0.246
2	-1	-1	+1	-1	4.0	1	750	26.9	0.174
3	-1	+1	-1	-1	4.0	5	50	26.9	0.246
4	-1	+1	+1	+1	4.0	5	750	134.5	0.248
5	+1	-1	-1	-1	7.0	1	50	26.9	0.223
6	+1	-1	+1	+1	7.0	1	750	134.5	0.200
7	+1	+1	-1	+1	7.0	5	50	134.5	0.303
8	+1	+1	+1	-1	7.0	5	750	26.9	0.264
9	0	0	0	0	5.5	3	400	80.7	0.297
10	0	0	0	0	5.5	3	400	80.7	0.297
11	-1	-1	-1	-1	4.0	1	50	26.9	0.206
12	-1	-1	+1	+1	4.0	1	750	134.5	0.230
13	-1	+1	-1	+1	4.0	5	50	134.5	0.300
14	-1	+1	+1	-1	4.0	5	750	26.9	0.219
15	+1	-1	-1	+1	7.0	1	50	134.5	0.241
16	+1	-1	+1	-1	7.0	1	750	26.9	0.230
17	+1	+1	-1	-1	7.0	5	50	26.9	0.262
18	+1	+1	+1	+1	7.0	5	750	134.5	0.267
19	0	0	0	0	5.5	3	400	80.7	0.297
20	0	0	0	0	5.5	3	400	80.7	0.297
21	+1	0	0	0	7.0	3	400	80.7	0.244
22	-1	0	0	0	4.0	3	400	80.7	0.193
23	0	+1	0	0	5.5	5	400	80.7	0.260
24	0	-1	0	0	5.5	1	400	80.7	0.229
25	0	0	+1	0	5.5	3	750	80.7	0.219
26	0	0	-1	0	5.5	3	50	80.7	0.245
27	0	0	0	+1	5.5	3	400	134.5	0.216
28	0	0	0	-1	5.5	3	400	26.9	0.189
29	0	0	0	0	5.5	3	400	80.7	0.297
30	0	0	0	0	5.5	3	400	80.7	0.297

X<sub>1</sub>: medium pH, X<sub>2</sub>: sucrose conc.(%)

X<sub>3</sub>: nitrogen conc.(mg/L), X<sub>4</sub>: phosphate conc.(mg/L)

수포화 *n*-butanol 추출방법<sup>11)</sup>으로 추출, 분리하였는데, 배양한 인삼 root 1g을 취하여 80% methanol로 3회 추출하여 여과, 농축한 후 ethyl ether를 가해 지질 등을 제거한 다음, 물층을 수포화 *n*-butanol로 4회 추출한 뒤 *n*-butanol 층을 모아 감압농축시켜 vanillin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 비색법<sup>12)</sup>으로 정량하였다.

#### (3) 반응표면분석법에 의한 배양최적조건의 결정

측정한 사포닌함량을 종속변수로 설정한 후 각 독립변수들 간의 관계를 SAS(SAS Institute Inc. Cary, NC, USA)로 다중회귀분석 및 분산분석을 실시한 후 유의성이 인정되는 변수만을 채택하여 각 종속변수에 해당하는 model식을 설정하고 이를 RSM에 의하여 등고분석과 3차원 분석을 실시하여 최적조건을 설정하였다.

결과 및 고찰

1. Fractional factorial block design에 의한 인삼 root 중 사포닌 함량

Stat-graphics 내의 프로그램중 하나인 Central Composite Design(CCD)을 이용하여 3 level-4 factor로 design하여 4 주간 인삼 root를 배양한 뒤, 생산된 사포닌 함량을 종속변수로 하여 측정한 결과는 Table 1과 같다. pH 7.0, sucrose 5%, nitrogen 50 mg/L, phosphate 134.5 mg/L에서 0.303%로 최대함량을 나타내었고, pH 4.0, sucrose 1%, nitrogen 750 mg/L, phosphate 26.9 mg/L에서 0.174%로 최소 함량을 나타내었다. pH 7.0에서 최대 함량을 보인 것은 pH 5.5~6.5에서 인삼 모상근 배양시 성장과 사포닌생산에 최대 효과를 보였다는 황 등<sup>13)</sup>의 결과와 유사하였고, pH 4.0에서 최소 성장을 보인 것은 pH가 4.5이하에서는 조직의 발달과 성장이 정지된다는 사실<sup>14)</sup>과 일치하는 것이다. Sucrose는 5%에서 최대 사포닌 함량을 나타내었는데 이는 인삼모상근 배양시 sucrose 농도가 증가할수록 사포닌 함량이 증가된다는 최<sup>15)</sup>의 보고와 일치하는 결과이다. Nitrogen은 50 mg/L에서 최대값을, 750 mg/L에서 최소값을 나타내었는데 이는 nitrogen 농도가 증가할수록 사포닌 함량도 증가한다는 최<sup>15)</sup>의 보고와 차이가 있다. Phosphate의 경우 134.5 mg/L에서 가장 높은 값을 얻었는데 이것 역시 인삼 모상근 배양시 phosphate 농도가 낮을수록 사포닌 함량이 증가한다는 최<sup>15)</sup>의 보고와 차이가 있다. 이는 phosphate와 nitrogen 각각의 단독효과를 나타낸 것이 아니라 여러 요소들이 인삼 root의

사포닌 함량에 미치는 복합적인 효과를 나타내었기 때문으로 생각된다.

2. 사포닌 생산 조건의 최적화

인삼 root 배양에서 사포닌 생산의 최적조건을 결정하기 위하여 배지내 pH, sucrose농도, nitrogen농도, phosphate농도의 4가지 factor를 독립변수로 설정하고, vanillin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>법<sup>12)</sup>으로 정량한 사포닌 함량을 종속변수 Y로 설정하여 다중회기분석을 수행한 결과는 Table 2와 같다. 이 결과를 근거로 하여 90% 유의수준에서 유의성이 있는 독립변수 중 상수, X<sub>3</sub>항인 nitrogen, X<sub>4</sub>항인 phosphate, quadratic terms 중 sucrose, phosphate항을 채택하여 model식 Y=0.167488-

Table 2. Values of regression coefficients calculated for the saponin content

Ind. variable	Coefficient	T-value	Prob T
Constant	0.167488	6.7748	0.0000
Nitrogen	-0.000035	-1.7726	0.0885
Phosphate	0.002068	3.2781	0.0031
Sucrose × Sucrose	0.001812	3.1724	0.0040
Phosphate × Phosphate	-0.000011	-2.9506	0.0068

Table 3. Analysis of variance for full regression of the saponin content

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-value
Regression	4	0.0199742	0.00499356	5.78247**
Error	25	0.0215892	0.000863569	
Total	29	0.0415635		

\*\*p<0.01

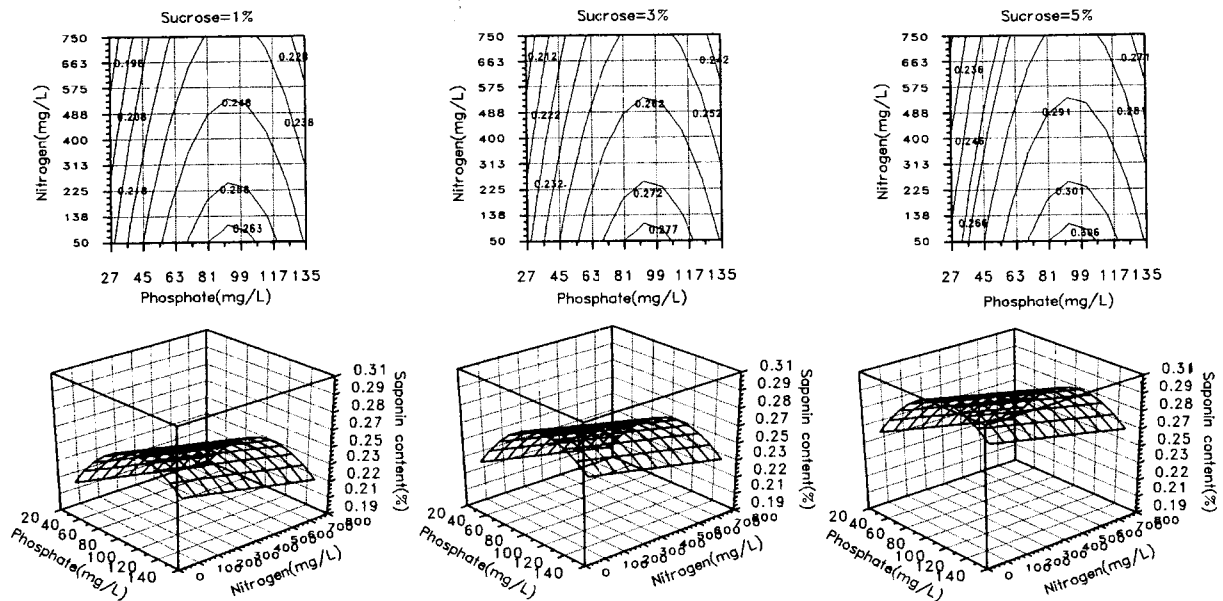


Fig. 1. Contour plots and response surfaces of the saponin content of ginseng root cultured at constant sucrose concentration of 1, 3 and 5%, respectively.

$0.000035X_3 + 0.002068X_4 + 0.001812X_2^2 - 0.000011X_4^2$ 를 얻었다. 다중회귀분석 전체에 대한 분산분석(Table 3)을 행한 결과 유의수준을 검정하는 F-value가 99% 수준에서 유의성을 나타내어 다중회귀분석에 의하여 선정된 각 변수에 의해 설정된 model식이 99% 수준에서 유의성이 있었음을 알 수 있었다. 위에서 얻은 model식에 대한 반응표면분석법을 수행하여 Fig. 1~3과 같은 결과를 얻었다. 독립변수 sucrose 농도를 고정시켜 분석한 결과 sucrose 5%일 때, nitrogen 50

mg/L, phosphate 90 mg/L 부근에서 반응값이 0.306%로 최고 반응값을 나타내었고, sucrose 1%, nitrogen 750 mg/L, phosphate 27 mg/L 부근에서 0.198%로 최저 반응값을 나타내었다(Fig. 1). 독립변수 nitrogen을 고정하였을 때에는 nitrogen 50 mg/L일때 sucrose 5%, phosphate 99 mg/L 부근에서 0.302%로 가장 높은 사포닌 함량을 나타내었고, nitrogen 750 mg/L일때 sucrose 1%, phosphate 27 mg/L 부근에서 0.197%로 가장 낮은 함량을 보였다(Fig. 2). Phos-

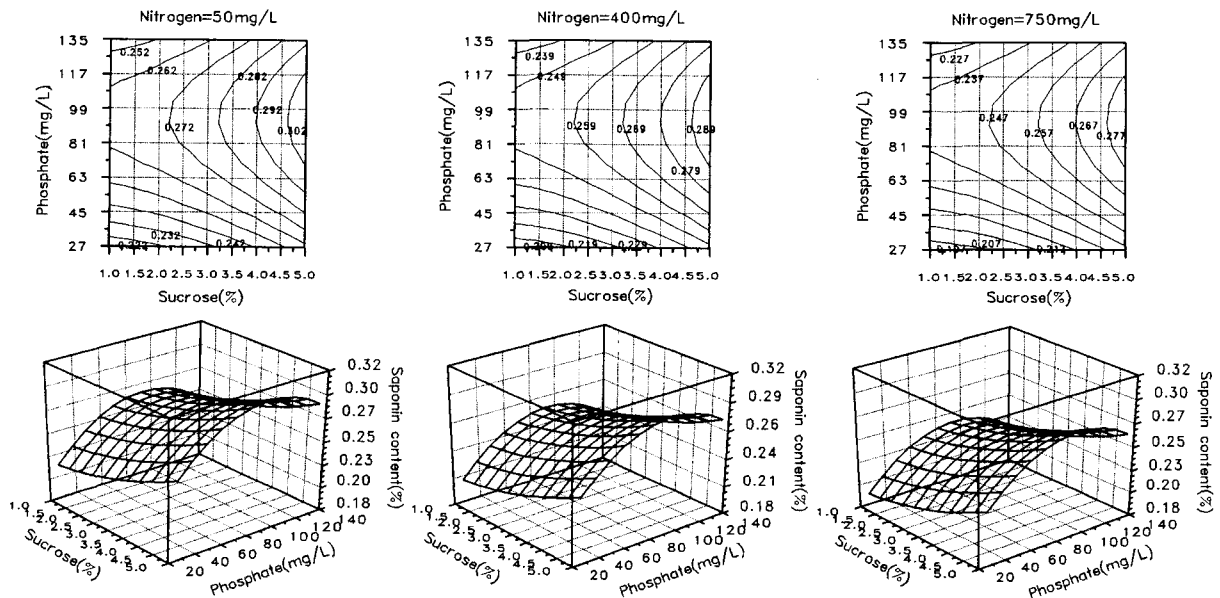


Fig. 2. Contour plots and response surfaces of the saponin content of ginseng root cultured at constant nitrogen concentration of 50, 400 and 750 mg/L, respectively.

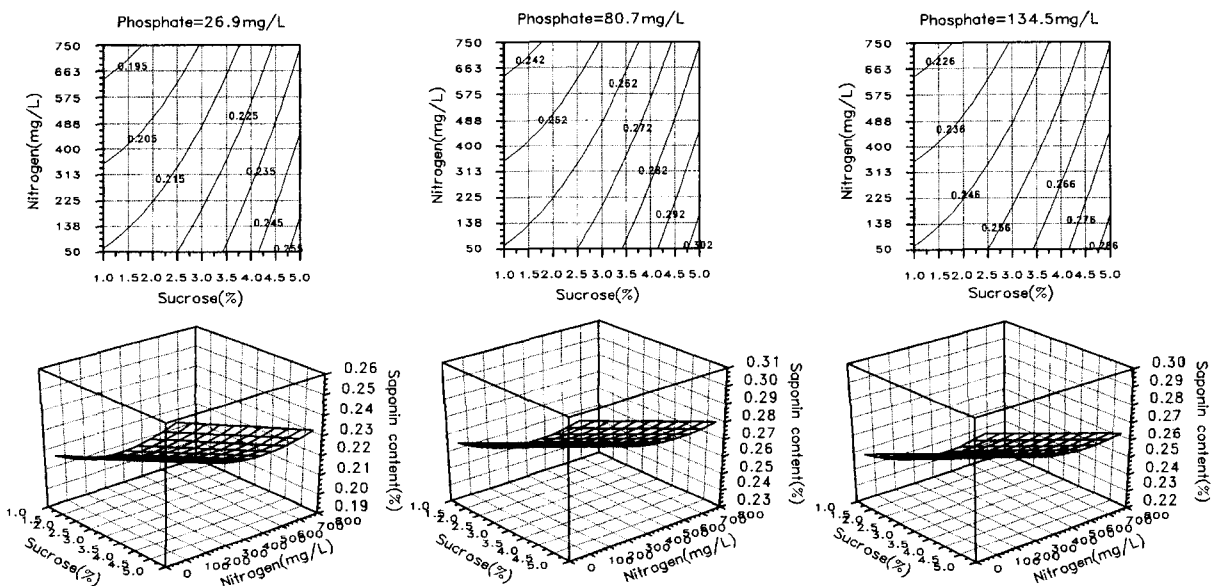


Fig. 3. Contour plots and response surfaces of the saponin content of ginseng root cultured at constant phosphate concentration of 26.9, 80.7 and 134.5 mg/L, respectively.

phate를 고정시켰을 경우 phosphate 80.7 mg/L일때 sucrose 5%, nitrogen 50 mg/L에서 0.302%로 최고값을 보였고, phosphate 26.9 mg/L일때 sucrose 1%, nitrogen 750 mg/L부근에서 0.195%로 최소값을 나타내었다(Fig. 3). 이상에서 알 수 있듯이 nitrogen 농도가 적을수록 사포닌 함량이 증가하였고, sucrose 농도는 증가할수록 사포닌 함량이 증가하였다. 이를 전보<sup>10)</sup>에서 보고한 인삼 root의 최적생장조건과 비교해보면, nitrogen의 농도가 낮을수록 생장율이 증가하고 pH와 phosphate농도는 중간농도에서 최고 생장을 나타내어 사포닌생산을 위한 배양 조건과 동일하며, sucrose농도에 있어서는 중간농도에서 생장율이 가장 높고, 사포닌 생산은 sucrose농도가 높을수록 왕성해지므로 다소 차이가 있으나 전체적으로 인삼 root의 생장과 사포닌 생산이 서로 상관관계가 있음을 알 수 있었다. 최대 사포닌 함량을 나타내는 각 독립변수의 최적조건은 pH 5.5, sucrose 5%, nitrogen 50 mg/L였고, 중간값에서 최대 반응값을 나타내는 phosphate는 model식을 편미분하여 93 mg/L가 최적 조건임을 알아내었다. 이렇게 결정된 최적조건값 pH 5.5, sucrose 5%, nitrogen 50 mg/L, phosphate 93 mg/L를 model식에 대입하여 얻은 예상치는 0.308%였다.

## 요 약

식물조직배양기술을 이용하여 인삼의 주요약리성분인 사포닌을 생산하고자, 식물생장조절물질로 유도된 인삼 root를 사용하여 사포닌 생산을 위한 최적액체배양조건을 RSM으로 조사하였다. 최적액체배양조건을 배지의 pH, sucrose 농도, nitrogen 농도, phosphate 농도의 3 level-4 factor의 fractional factorial design에 의하여 조사한 결과, 인삼 root의 t 사포닌 함량은 최저 0.174%에서 최고 0.303%까지 나타났다. 다중회귀분석으로 구한 model식을 가지고 등고분석과 3차원 분석을 수행한 후 독립변수의 최저 또는 최고수준에서 종속 변수가 최대치를 나타내지 않는 phosphate농도 변수에 대하여 model식을 편미분한 결과 인삼 root의 사포닌 함량이 최

고치를 나타내는 액체배양조건은 pH 5.5, sucrose 5%, nitrogen 50 mg/L, phosphate 93 mg/L로 예측되었다. 이렇게 결정된 조건값들을 model식에 대입하여 얻은 예상치는 0.308%였다.

## 감사의 글

“이논문은 1998년도 한국학술진흥재단의 농업과학분야 거점 연구소 육성산업에 의한 학술연구비 지원으로 수행된 결과임.”

## 참고문헌

1. 박종대 : 고려인삼학회지 **20**, 389 (1996).
2. 지형준, 김현수 : 생약학회지 **16**, 171 (1985).
3. Slepian, L. I., Brushwitzky, I. V. and Butenko, R. G. : *Probl. Pharmacog.* **21**, 198 (1976).
4. Furuya, T., Yoshikawa, T., Ushiyama, K. and Oda, H. : *Experientia* **42**, 193 (1986).
5. Furuya, T., Yoshikawa, T., Ishii, T. and Kajii, K. : *Planta Medica* **47**, 183 (1983).
6. 지형준, 신국현, 김현수, 조희재 : 생약학회지 **20**, 162 (1989).
7. 황 백, 고경민, 황경화, 황성진, 강영희 : 식물학회지 **34**, 289 (1991).
8. Yoshikawa, T. and Furuya, T. : *Plant Cell Report* **6**, 449 (1987).
9. 고경수, 허인옥, 고정삼, 이윤진 : 한국생물공학회지 **5**, 263 (1990).
10. 오훈일, 장은정, 이시경, 박동기 : 고려인삼학회지 **24**, 58 (2000).
11. Shibata, S., Tanaka, O., Ando, T., Sado, M., Tsushima, S. and Ohsawa, T. : *Chem. Pharm. Bull.* **14**, 559 (1966).
12. 김영수, 이희자 : 한국식품과학회지 **10**, 356 (1978).
13. 황 백, 고경민, 황경화, 황성진, 강영희 : 식물학회지 **34**, 289 (1991).
14. 최광태, 김명원, 신희숙 : 고려인삼학회지 **5**, 35 (1981).
15. 최상진 : 식물의 조직 · 세포 배양, 대한교과서주식회사, 서울, p.18 (1993).