

인삼 육성계통 캘러스로부터 항산화물질 고함유 세포주의 선발

양덕춘[#] · 권혜경 · 박효진 · 민병훈* · 송남현** · 최광태

한국인삼연초연구원, *배재대학교 원예조경학과, **충남농업기술원

(2000년 6월 26일 접수)

Selection of Cell Lines for High Yields of Antioxidants from Callus of Ginseng Superior Lines

Deok Chun Yang[#], Hye Kyoung Kwon, Hyo Jin Park, Byung Hoon Min*,
Nam Hyun Song** and Kwang Tae Choi

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon, 305-345, Korea

*Department of Horticulture, Paichai University, Taejon, 302-735, Korea and
Chungchong Nam-do Agricultural Research & Extension Services Taejon, 305-313

(Received June 26, 2000)

Abstract : Cell growth and production of phenolic compounds by callus cultures of *Panax ginseng* C. A. Meyer were investigated under various phytohormones concentrations and inoculum size. The results indicated that the cell growth was improved by a MS medium supplemented with 2 mg/L of CPA. The maximum cell yield was obtained at inoculum size of 1 g/flasd. The production of phenolic compounds in the callus cultures was higher than those in the ginseng root. Especially, one cell line (20601) showed the highest content of phenolic compounds and antioxidant activity.

Key words : Antioxidant activity, *Panax ginseng*, phenolic compound, phytohormone.

서 론

인삼성분에 대한 연구는 주요 약리성분으로 알려진 ginsenosides에 대해서 집중적으로 진행되어왔으나, 최근 비사포닌 계 활성물질에서도 항산화성분,¹⁾ 항피로성분,²⁾ 항당뇨성분³⁾ 및 항암성분⁴⁾ 등이 함유되어 있음이 보고되면서 비사포닌계 활성물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 나이가 들어감에 따라 활성산소종에 의한 조직손상이 증가하여 병적 노화나 암 등 여러 가지 질병의 발생이 급증하면서 이와 관련된 항산화물질에 대한 연구가 점차 증가하고 있다.^{1,2,5,6)} 생체내에서 형성된 활성산소종에 의한 지질과산화는 생체막 내부에 있는 지질을 공격하여 산화적 손상을 주며,⁷⁾ 이로 인해 생리적 기능을 저하시키므로 노화와 유전적 장애의 원인이 되는 것으로 알려져있다.^{8,9,10)} 따라서, 생체내에는 활성산소종에 의한 조직손상으로부터 스스로 보호하기 위한 방어체계를

갖추고 있다. 그 방어기작은 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 등의 항산화효소와 저분자 항산화 물질인 α-tocopherol, vitamin C등의 항산화제, 또는 항산화력을 갖는 혈청단백질인 ceruloblasmin 및 transferrin이 보고된 바 있다.^{11,12)} 인삼에는 maltol, caffeic acid, vanillic acid, salicylic acid등의 폐놀산 및 폴리아세틸렌계 성분이 지질과산화에 대하여 항산화 활성을 나타낸다고 보고하였다.^{1,2,5,13)} 폐놀화합물의 지질과산화 억제활성을 두개 이상의 hydroxyl기가 서로 인접해 있는 경우 또는 폐놀기의 ortho-위치에 붙어 치환되어 있는 alkyl기가 클수록 강하였다고 보고된 바 있다.⁶⁾ 또한 인삼의 폐놀성 성분들이 생체내에서 항산화 활성을 발휘하는 기작은 폐놀성 성분이 생체내에서 생성되는 3가철과 chelation을 함으로서 NADPH-dependent microsomal peroxide generating system에서 initiator로 작용하는 ADP-Fe³⁺를 탈취하기 때문이라고 보고되었다.⁵⁾ 한편 식물조직배양기술의 발달로 배양세포로부터 목표로 하는 유용생리활성 물질을 대량으로 생산하고자 하는 연구가 진행되고 있으며, 활성물질의 생산성을 높이기 위해서 외부환경조건을 최적으

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-866-5434; (팩스) 042-866-2522
(E-mail) dcyang@gtr.kgtri.re.kr

로 조절하여 배양하고 있으나, 배양세포간에 활성물질의 생산이 큰 차이가 있기 때문에 각 식물체 및 조직간의 차이의 검정이 요구된다.

따라서, 본 연구는 한국인삼연초연구원에서 육성된 인삼계통별로 기내에서 callus를 유기하여 생장의 최적조건을 조사하고, 항산화물질 고함유 세포주를 선발하고자 페놀성 화합물의 함량 및 antioxidant 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 인삼우수계통으로 부터 callus의 유기

인삼우수계통(Table 1)으로부터 생리활성물질 고함유 세포주를 선발하기 위해서 각 계통의 6년근 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)을 2% 차아염소산으로 소독하여 절편을 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D)가 3 mg/L 첨가된 MS 고체배지¹⁴⁾에 처상하여 25°C의 배양조건에서 callus를 유기하였다.

2. 인삼 callus의 생장조건

유기된 인삼 callus의 생장에 미치는 식물호르몬의 영향을 알아보기 위하여 MS 기본배지에 다양한 식물호르몬(2,4-D, CPA, IBA, IAA)을 혼합처리하여 30일간 25°C에서 배양하였다. 또한 CPA 2 mg/L가 첨가된 MS 기본배지에 인삼 cal-

lus 생중량 0.5, 1.0, 2.0 g을 각각 접종하여 callus 접종량에 따른 callus 생중률을 조사하였다.

3. 생리활성물질 추출 및 고함유 세포주 선발

유기된 callus는 다시 동일 배지에서 30일 이상 배양한 후, methanol 추출물로부터 생리활성물질 함량을 조사하였다. Methanol 추출물은 배양된 인삼 callus의 생체중 40 g을 methanol 80 mL 넣어 추출한 후, 감압 농축시켜 중량법에 의하여 추출하였다. 유기된 인삼 callus로부터 생리활성물질인 페놀성 화합물의 함량과 antioxidant 활성도를 조사하였다.

4. 페놀성 화합물 정량분석

페놀성 화합물의 정량은 Hammerschmidt와 Pratt¹⁵⁾의 방법을 약간 변형하여 수행하였다. 동결 건조된 인삼 callus 0.3 g에 2N HCl 14 mL를 넣고 1시간동안 가열하여 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상동액에 동일량의 EtOAc를 넣고 2회 추출하여 감압건조 시킨 후 1% HCl이 함유된 methanol에 녹여 추출용액으로 사용하였다. 페놀성 화합물의 함량은 추출된 methanol 용액 0.4 mL에 1.6 mL의 Na₂CO₃를 넣고, 혼합된 용액에 50% folin-ciocalteu's phenol 용액 1 mL를 첨가하여 vortex mixer에서 잘 섞은 후 30분 후에 spectrophotometer 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 전체 페놀성 화합물의 정량은 chlorogenic acid의 정량곡선으로 계산하였다.

5. Antioxidant 활성도 측정

Antioxidant 활성도 측정은 Wee¹⁶⁾등의 방법에 의하여 α-diphenyl-β-picrylhydrazyl(DPPH)를 이용하여 측정하였다. DPPH 용액은 DPPH 분말 약 20 mg을 methanol 150 mL에 녹여 그 중 6 mL에 dimethylsulfoxide 2.5 mL를 가지고 10초간 진탕하여 517 nm에서 대조군의 흡광도가 0.93~0.97이 되도록 methanol로 희석하였다. 측정은 추출된 methanol 용액 0.2 mL에 2.5 mL의 DPPH 용액을 넣고 잘 혼합하여 1분 동안 반응시켜 대조군과 517nm에서 흡광도를 조사하여 소거활성(units/min/mg dry callus wt)으로 나타내었으며, OD값 0.01을 1 unit로 하였다.

6. TLC pattern 비교

TLC pattern은 추출된 methanol 용액을 10 μL씩 silica gel 60 F₂₅₄ TLC plate에 점적하였으며, 표준품으로는 caffeic acid 와 ferulic acid를 사용하였다. TLC plate에 시료를 점적한 후 toluene : ethylacetate : formic acid=5 : 4 : 1의 혼합액으로 전개하였다. 전개가 끝난 후 50% folin-ciocalteu's 용액을 분무하여 발색시켜 조사하였다.

Table 1. Characteristics of ginseng superior lines

Species	Characteristics
<i>Panax ginseng</i> violet stem	
control	
30101	High contents of saponin
30201	High contents of saponin
81983-1	Resistant to root rot
84768	Resistant to root rot
84725	Resistant to root rot
20401	High yield
20501	High yield
20601	High yield
<i>Panax ginseng</i> yellow berry	
control	
YO101	High yield
YO501	Resistant to root rot
<i>Panax ginseng</i> cultivated in Japan	
JY101	
JY104	
<i>Panax ginseng</i> cultivated in USSR	
control	
<i>Panax quinquefolium</i>	
GO901	
WO101	

결과 및 고찰

1. 인삼 callus의 유기 및 callus의 생장에 미치는 식물호르몬의 영향

포장에서 선별한 인삼 우수계통 6년생 뿌리를 절편으로 기내배양하여 계통별 callus를 유기하였던 바, 계통간에 다소의 차이는 있었지만 3 mg/L의 2,4-D를 첨가한 배지에서 root의 유기는 거의 일어나지 않았으며, callus의 유기율은 매우 높았다(Table 2). 즉 callus의 유기는 3 mg/L 2,4-D를 함유한 MS배지에서 가장 효과적이다.

유기된 인삼 callus의 생장에 미치는 식물호르몬의 영향을 조사하기 위하여 2,4-D, CPA, IBA, IAA 등의 식물호르몬을 MS 기본배지에 농도별로 혼합처리하여 인삼 callus의 생장량을 조사하였다(Table 3). 인삼 callus의 생장은 callus 유기율이 가장 높았던 3 mg/L의 2,4-D를 함유한 기본 MS 배지의 경우 6.057 g/flask의 생장을 보였으며, CPA의 경우 2 mg/L

Table 2. Induction of root and callus cultured on MS medium with 3 mg/L of 2,4-D in superior 2,4-D

Superior lines	Rooting	Callus initiation
30101	-*	++
20601	-	+++
20401	-	+
20501	-	+
JY101	-	++
JY104	-	++
YO201	-	+
YO501	-	+

*-; Not induced, +; induced, ++; good growth, +++; excellent growth.

Table 3. Effects of some phytohormones on the growth of ginseng callus cultures of *P. ginseng* callus

Phytohormone	Concentration (mg/L)	Fresh weight of callus (g/flask)
2,4-D	3	6.057
CPA	1	5.881
	2	8.602
	3	7.508
	4	6.332
	1	2.180
IBA	3	2.103
	5	2.480
	7	1.711
	1	1.205
IAA	3	1.233
	5	1.225
	7	1.211

를 처리하였을 때 8.602 g/flask로 가장 높았고, 3 mg/L 이상의 농도부터는 오히려 감소하였다. IBA와 IAA의 경우에는 농도가 높아짐에 따라 인삼 callus의 생장이 약간 감소하는 경향을 보였으나, 큰 차이를 보이지 않았다. 일반적으로 분열 조직이 포함되지 않은 절편의 배양에서는 탈분화 과정에 호르몬의 요구가 필수적이며 주로 auxin과 cytokinin의 농도균형이 탈분화와 재분화의 조절에 중요하다.¹⁷⁾ 따라서 많은 경우에 있어서 탈분화와 체세포배 발생에는 2,4-D가 필수적인 것으로 보고되고 있는데,^{18,19)} 본 실험에서는 조직의 탈분화 과정 후 형성된 callus의 생장에는 2,4-D보다 CPA 2 mg/L 가 더 효과적임을 알 수 있다.

인삼 callus의 생장이 가장 높았던 2 mg/L의 CPA가 함유된 MS 기본배지에 2,4-D를 농도별(0, 1, 2, 3, 4, 5 mg/L)로 처리하여 callus 생장에 미치는 2,4-D의 영향을 조사하였다. 그 결과, 인삼 callus의 생장량은 2,4-D를 전혀 처리하지 않은 구에서 13.299 g/flask로 가장 높은 생장을 보였으며, 2,4-D의 농도가 높아질수록 크게 감소하였다(Fig. 1). 이는 callus 유기에는 2,4-D가 필수적이지만 고농도 처리시 제초제로 사용될 만큼 독성이 존재하기 때문에 생장에는 오히려 저해 효과를 갖는 것으로 사료된다.²⁰⁾

3 mg/L의 2,4-D와 2 mg/L의 CPA가 혼합된 각각의 MS 기본배지에서 유기된 callus를 혼합계대 후 생장량을 측정한 결과는 다음과 같다(Table 4). CPA 혼합배지에서 유기된 1

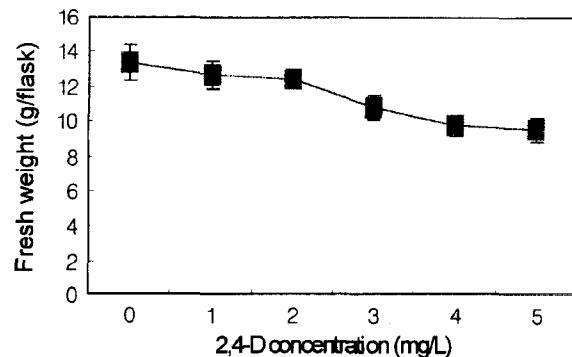


Fig. 1. Effect of 2,4-D in the MS medium with 2 mg/L of CPA on the callus cultures of *P. ginseng*.

Table 4. Effects of 2,4-D and CPA on the callus cultures of *P. ginseng* precultured on the medium with 3 mg/L 2,4-D or 2 mg/L CPA

Auxin of precultured medium	Auxin of subcultured medium	Fresh weight of callus (g/flask)
2,4-D	2,4-D	8.439 ± 0.662
	CPA	11.295 ± 1.082
CPA	2,4-D	12.401 ± 0.585
	CPA	14.451 ± 0.580

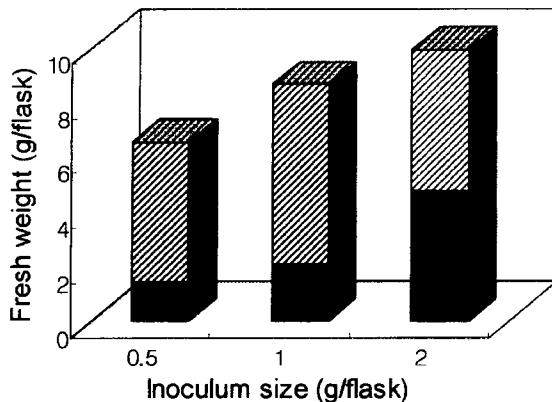


Fig. 2. Effect of inoculum size on the callus cultures of *P. ginseng* cultured in the medium with 2 mg/L of CPA. —■—; 15 days, —▨—; 30 days

차 callus를 CPA 혼합배지로 계대한 인삼 callus의 생장량은 14.451 g/flask로 가장 높았으며 2,4-D 혼합배지에서 2,4-D 혼합배지로 인삼 callus를 계대하였을 때, 8.439 g/flask로 가장 낮은 생장을 보였다. 또한 CPA 혼합배지로부터 2,4-D 혼합배지로의 계대 후 생장량이 이와 반대의 경우보다 높은 것으로 보아 callus 초기 생장에 독성을 가지는 2,4-D의 처리로 후대의 생장에까지 영향을 끼치는 것으로 사료된다.

Callus의 생장 효율을 높이기 위하여, 가장 높은 생장을 보였던 2 mg/L CPA를 함유한 MS 기본배지에 callus의 양을 달리 접종하여 그에 따른 생장량을 조사하였다(Fig. 2). 그 결과, 접종 후 15일에는 2 g/flask를 접종하였을 때 빠른 생장을 보였으나, 30일 후에는 노화가 진행되었고, 1 g/flask를 접종하였을 때, 인삼 callus의 생장이 가장 효율적인 것으로 나타났다.

2. 육성계통 callus의 페놀성 화합물 함량 및 antioxidant 활성도

기내에서 유기된 인삼육성계통 세포군으로부터 인삼의 생리 활성물질 중 노화억제작용을 나타내는 페놀성 물질의 함량과 페놀성 물질의 항산화력 활성정도를 조사한 결과, 총 페놀성 물질은 공시계통 callus 모두 재배 인삼뿌리보다 높았다. 특히 계통번호 20601은 3.082 mg/g. dry wt.로서 가장 높았으며 그 다음으로 JY101이 2.889 mg/g dry wt.로 높았다(Fig. 3-PC). 또한 페놀성 물질의 항산화 활성도 계통번호 20601에서 12.444 unit/min/mg로 가장 높았으며 JY101에서도 11.822 unit/min/mg로 매우 높은 경향을 보였다(Fig. 3-AO). 그러나 본 조사에 들어간 callus 군은 한 개의 인삼절편에서 유기된 callus이지만 여러 종류의 세포들이 혼재되어 있을 가능성이 높기 때문에 동세포군을 이용해서 low melting agarose gel 상에서 단세포생장을 유도한 후 다시 상기 생리활성물질이

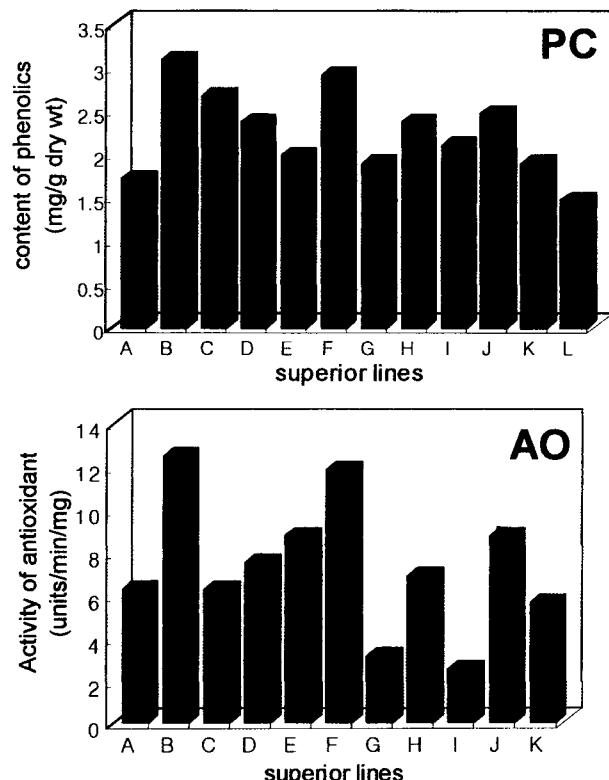


Fig. 3. Contents of phenolic compound (PC) and activity of antioxidant (AO) in ginseng superior line callus cultured on MS medium with 3 mg/L of 2,4-D. A 730101, B 20601, C 20401, D 20501, E 301, F JY101, G JY104, H Y0201, I Y0501, J W0101, K G0901

높은 세포주를 선발한다면 본 실험에서 조사된 함량과 활성도에 비해 더욱 높은 세포주를 선발할 수 있을 것이다. 특히 계통번호 20601은 다른 세포군에 비해 폐놀성 물질의 함량과 항산화 활성이 높을 뿐만 아니라 세포군의 생장도 매우 양호한 경향을 보여 추후 이 계통의 세포군으로부터 새로운 세포주를 선발할 수 있을 것으로 생각된다.

3. 페놀성 화합물의 TLC pattern 비교

추출된 페놀성 물질의 TLC pattern을 조사하기 위해서 TLC plate에 페놀성 화합물의 함량을 측정하고 남은 추출액을 점滴하였다. 그 결과 표준품인 caffeic acid와 ferulic acid의 위치에서 주로 band가 형성되는 경향을 보였으며, band의 크기는 계통간에 다소 차이를 나타내었다(결과미제시). Band의 크기는 계통번호 20601에서 가장 강하게 나타났고, 그 다음으로 JY101이 크게 나타나 총 페놀성 물질의 함량이 높은 계통에서 역시 band가 강하게 나타났다. 이와 같이 band의 크기는 계통간에 큰 차이를 보였으나, Band의 위치는 재배 인삼근과 각 계통에서 유기된 세포군 간에 큰 차이 없이 비슷한 경향을 보였다. 재배 인삼근에서는 ferulic acid 위치에

있는 band가 매우 강하게 나타났고, caffeic acid 위치에 있는 band는 매우 약하게 나타났다. 그러나 이와 반대로 인삼 세포군에서는 대부분 ferulic acid 위치의 band가 약하게 나타났고, caffeic acid 위치에 있는 band가 매우 강하게 나타났다. 최근에 홍삼 메탄을 추출물의 에테르 분획으로부터 분리한 salicylic acid, p-coumaric acid, vanillic acid 및 ferulic acid와 에칠아세테이트 분획으로부터 분리한 p-hydroxybenzoic acid, gentisic acid, caffeic acid 및 polyphenol 성분을 흰쥐의 간 microsome에서의 지질과산화억제활성을 검정한 결과, caffeic acid 만이 활성을 나타내었고 그 밖의 성분은 활성이 매우 미약하였다고 보고하였으며,⁶⁾ 특히 caffeic acid의 지질과산화억제 활성은 인삼의 노화억제성분인 maltol과 비슷한 수준이라고 보고하였다. 그러나 Kim¹³⁾ 등은 본 실험의 결과에서처럼 인삼 callus에서 많이 나타나는 ferulic acid 위치에는 주로 ferulic acid 뿐만 아니라 p-coumaric acid, vanillic acid 및 p-hydroxybenzoic acid가 공존해있으며, caffeic acid 위치에는 protocatechic acid 및 gentisic acid가 함께 존재하고 있는 것으로 보고하였다. 따라서 본 실험에서 인삼 세포군이 재배 인삼근보다 항산화 활성이 우수한 caffeic acid 위치에 더 강한 band가 형성되어 매우 고무적인 현상으로 이해될 수 있지만 추후 caffeic acid 위치에 함께 공존해 있는 다른 폐놀산을 조사하여야 할 것으로 생각된다. 한편 재배삼 인삼근보다 기내에서 배양한 세포군에서 caffeic acid 위치에 더 많은 폐놀산이 왜 존재하는지 그 원인은 확실히 알 수 없으나 Kim¹³⁾ 등은 폐놀산 및 폴리폐놀 성분의 함량이 중국홍삼에서 고려홍삼이나 일본홍삼보다 높았지만, 지질과산화 억제활성 성분인 caffeic acid의 함량의 경우 고려홍삼이 중국홍삼보다 1.5~2배정도 높았다고 보고한 바 있다. 이에 계통간, 종간, 그리고 조직 및 세포군 간의 차이점은 추후 좀 더 세밀한 연구가 이루워져야 할 것이며 이 연구를 토대로 하여 인삼 세포군에서 caffeic acid의 함량을 증가시킬 수 있는 방법을 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

인삼배양세포로부터 항산화 물질 고함유 세포주를 선발하기 위하여 인삼육성계통별로 배양기 내에서 callus를 유기하여 callus 생장에 미치는 식물호르몬의 영향을 조사하였고, 폐놀성 화합물 및 항산화 물질의 함량을 조사함으로써 생리활성물질 고함유 세포주를 선발하고자 하였다. callus 생장은 2 mg/L의 CPA를 함유한 MS 기본배지에서 가장 높았고, CPA 혼합배지로부터 CPA 혼합배지로 계대배양할 때 가장 '효과적'이었으며 생장률은 계대시 1 g/flask의 callus를 접종할 때 가

장 효율적이었다. 생리활성물질인 폐놀성 화합물의 함량은 공시계통 callus가 재배 인삼뿌리보다 높았다. 특히 계통번호 20601은 폐놀성 화합물의 함량과 항산화 활성에서 가장 높았으며 callus의 생장도 매우 양호하였다. 또한 폐놀성 화합물의 TLC pattern은 재배 인삼근과 비슷하였으나 함량은 재배 인삼근에 비해 표준품인 caffeic acid의 위치에 더 많은 폐놀성 물질이 분포하였다.

인용문헌

1. Han, B. H., Park, M. H., Woo, L. K. and Han, Y. N. : *Korean Biochem. J.*, **12**, 33-36 (1979).
2. Han, B. H., Park, M. H. and Shin, S. C. : *Yakhakhoeji*, **28**(4), 232-235 (1984).
3. Okudam, H. and Yoshida, R. : Proceed. 3rd-Intern. Ginseng symp., Korea Ginseng Res. Inst. 53-56 (1980).
4. Shin, S. C., Koh, H. Y and Han, B. H. : *Phytochemistry*, **22**(8), 1817-1818 (1983).
5. Han, B. H., Park, M. H. and Han, Y. N. : *Korean Biochem. J.* **18**(4), 337-340 (1985).
6. Kim, M. U. : 157-196 (1989).
7. Joo, C. N. and Kwak, H. S. : *Korean J. Ginseng Sci.*, **12**, 128-134 (1988).
8. Fridovich, I. : *Science* **201**, 875-885 (1978).
9. Schraufstatter, I., Hyslop, P. A., Jackson, J. H. and Chochrane, C. G. : *J. Clin. Invest.*, **82**, 1040 (1988).
10. Bartoli, G. M., Giannattasio, B. G., Palozza, P. and Cittadini, A. : *Biochem. Biophys. Acta.*, **966**, 214 (1988).
11. Cutler, R. G. : *Arch. Gerontol. Geriatrics* **3**, 321-334 (1985).
12. Tappel, A. L., Fletcher, B. and Deamer, D. : *Gerontol.* **28**, 415-420 (1973).
13. Kim, M. U. : 148-189 (1990).
14. Murashige, T. and Skoog F : *Physiol Plant*, **15**, 473-497 (1962).
15. Hammerschmidt, P. A. and Pratt, D. : *J of Food Science*, **43**, 556-559 (1978).
16. Kwon S. T. and Cho, M. S. : *Korean J Plant Tissue Culture*, **25**, 119-123 (1998).
17. Sahai, O. and Shuler, M. : *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 111-120 (1984).
18. Guo, Z. and Gui, Y. : eds, *Advances in Developmental Biology and Biootechnology of Higher Plants*, New York. pp. 150-159 (1993).
19. Lee, K. S. and Soh, W. Y. : *Korean J Plant Tissue Culture*, **20**, 77-83 (1993).
20. Kwak, S. S., Kim, I. S., Kim, H. Y., Lee, S. C., Jung, J. D., Jee, S. Y., Choi, S. J. and Choi, C. D. : eds. *Plant growth regulator*, Korea, pp 57-71 (1996).