

^{60}Co γ -ray를 조사한 인삼모상근 돌연변이 세포주의 생장과 Ginsenoside의 생산

최규명 · 권정희 · 반성희 · 양덕조[#]
충북대학교 자연과학대학 생명과학부
(2002년 9월 17일 접수)

Production of Ginsenoside in the Hairy Roots Irradiated by ^{60}Co γ -ray on *Panax ginseng* C.A Meyer

Kyu-Myoung Choi, Jung-Hee, Kwon, Sung-Hee Ban and Deok-Cho Yang[#]
School of Life Sciences, College of Natural Sciences, Chungbuk National University,
Cheongju, 361-763, Korea
(Received September 17, 2002)

Abstract : Study was performed to know the effects of *Panax ginseng* C.A. Meyer hairy root due to ^{60}Co γ -ray irradiation. We irradiated the hairy roots under the various ^{60}Co γ -ray; 0.5~4 Krad. The growth of hairy roots is inhibited over 3 Krad treatment. The lateral roots are used as a cell line after removing the apical meristem of hairy roots irradiated below 2 Krad. We selected 206 hairy root cell lines having various different growth rates and forms, and incubated in the 1/2 Murashige & Skoog(MS) medium in the absence of hormone. We selected 10 out of 206 showing superior growth. Among those, γ -GHR 70 and γ -GHR 94 showed higher growth; 34.5, 44.7%, respectively. We observed shapable, sizable characteristics according to the width of the primary roots, the process formation of the lateral roots, and the growth of lateral roots. The discriminable cell line showed that primary root is thinner, and has a vigorous growth. 8 out of 10 had much more contents than control in the aspect of the ginsenoside. γ -GHR 59 and γ -GHR 94 showed higher contents; 19, 16.9%, respectively. Therefore, we selected γ -GHR 70, γ -GHR 94 as a superior cell line in the aspect of ginsenoside contents, and growth among those irradiated by γ -ray. According to content of ginsenoside, Rb₂ effective in anticancer has 7.5% of γ -GHR 59. Rc, also effective in anticancer showed 16.2% content increase of γ -GHR 69. It is thought that those lines will be effective in manufacturing ginsenoside. Gene analysis (VNTRP) related to the mutation is in progress.

Key words : ginsenoside, ^{60}Co γ -ray, higher growth, 0.5~4 Krad, γ -GHR

서 론

고려인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 다년생 약용식물로서 Araliaceae(오가과)에 속해 있다. 예로부터 인삼은 건강식품 및 각종질환의 치료제로 각광 받고 있으며, 과학적인 약리 효능을 인정받아 약재로서 뿐만 아니라 식품, 화장품, 비누제품 등의 조제에 그 수요가 점차 증가되고 있는 실정이다. 한국의 대표적인 식물자원인 인삼은 소비자의 기호추세에 부합하는 여러가지 타입의 단일체제 및 생약 복합체제가 개발되

어, 건강식품 또는 의약품으로 등록되고 있으며, 점차 그 범위가 확대되고 있다. 최근에는 단일 ginsenoside의 특정한 생리적 효능을 이용한 음료, 식품 등 기능성 제품의 개발에 관심이 집중되고 있다.¹⁾

하지만 특정한 ginsenoside를 다량으로 공급하고, 정제하기에는 많은 어려움이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 조직배양기술을 이용한 기내배양에 대한 연구가 진행되고 있다. 기내배양을 통하여 식물체에 함유되어 있는 유용 2차 대사산물을 다량으로 얻을 수 있는 기술이 개발된다면 지역적, 계절적, 기후의 영향없이 일정한 환경하에서 안정되게 자원세포를 공급할 수 있고, 배양세포의 빠른 생육속도에 의해 생산성을 높일 수 있다. 또한 환경의 제어가 용이하기 때문에 대

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 043-261-2293; (팩스) 043-261-2293
(E-mail) ccyang48@hotmail.com

사과정을 인위적으로 조절하여 특정한 2차 대사산물을 더 많이 축적하는 큰 이점을 지니고 있다.

*Agrobacterium rhizogenes*에 의해 형질전환된 모상근은 유전적, 생화학적으로 안정하며, 물질함유량 및 성분이 모식물체보다 높은 것으로 보고되고 있다.²⁾

기내배양을 통한 ginsenoside의 생산은 많은 장점을 가지고 있지만 성공적인 배양을 위해서는 자연상태보다 우수한 세포주를 확보하고, 생산성이 높은 배양방법을 찾아야 한다. 아무리 다양한 생리적 기능을 가진 물질이라도 원료공급이 까다롭고, 수율이 낮으면 이용가치를 상실하게 된다.

본 연구는 이러한 모상근의 장점을 이용하여 2차 대사산물을 획득하고자, 모상근을 유도하기로 하였다. 또한 보다 많은 우수한 세포주를 확보하고자 여러 돌연변이 유도 방법 중 ⁶⁰Co γ -ray를 조사하여 돌연변이를 유발하였다. 다양한 세포주로부터 고성장 세포주와 총 ginsenoside의 함량 뿐 아니라 특정 ginsenoside 함량이 우수한 세포주를 선발하고자 하였다.

실험방법

1. 공시재료

4년근 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer) 뿌리에 *Agrobacterium rhizogenes* A4 균주를 접종하여 유도한 인삼모상근 [Ghr(ginseng hairy roots) A4]^{3,4)}를 사용하였다(Fig. 1).

2. γ -ray처리에 의한 돌연변이 유도

⁶⁰Co γ -ray 처리는 한국 원자력 연구소의 원자로를 사용하

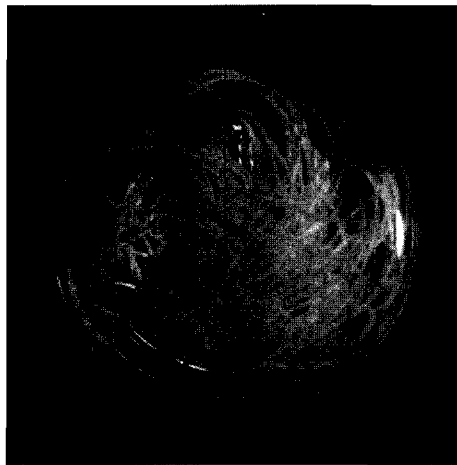


Fig. 1. Ginseng hairy roots A4 line induced by *Agrobacterium rhizogenes* A4 strains. Hairy roots were cultured in hormone-free 1/2MS medium with 3% sucrose at 23°C for 4 weeks in dark condition.

여 인삼 모상근(Ghr A4) 세포주 T78에 0.5, 1, 2, 3 및 4 Krad의 저준위 방사선을 처리하였다. ⁶⁰Co γ -ray를 처리할 모상근은 처리구당 3 cm의 크기로 50개씩 접종하였다. 방사선 처리 후 각각을 100 ml flask의 50 ml 1/2 Murashige & Skoog (MS)⁵⁾ 액체배지에 모상근을 1.5 cm 크기로 10개씩 접종하고 25°C 암상태에서 4주간 배양하여 조사선량에 따른 모상근의 성장과 lateral density를 측정하였다.

3. 돌연변이 모상근 선발

방사선을 조사한 모상근의 선단 부위를 제거하고 1/2 Murashige & Skoog(MS) 배지에서 접종 후 새로 생성된 측근을 세포주로 선발하였다(Fig. 2).

4. 돌연변이주의 성장을 측정

방사선을 처리하여 얻은 돌연변이 모상근의 생장은 50 ml의 1/2MS액체배지가 담긴 100 ml flask에 모상근의 root tip(1.5 cm) 10개씩을 접종하여 23°C에서 4주간 진탕 배양(120 rpm)한 후, 냉동건조시켜 건물중을 측정하였다. 건물중을 토대로 생장률이 우수한 세포주를 선발하였다. 이때 대조구는 모상근 세포주중 생장이 가장 좋았던 T78 세포주로 하였다.

5. 돌연변이주의 ginsenosides 함량 측정

돌연변이 모상근의 ginsenosides 함량은 수포화 *n*-BuOH 추출법에 의하여 추출하였다. 동결건조한 조직 50 mg을 80%(v/v) MeOH로 추출하여 건조한 다음, ethyl ether와

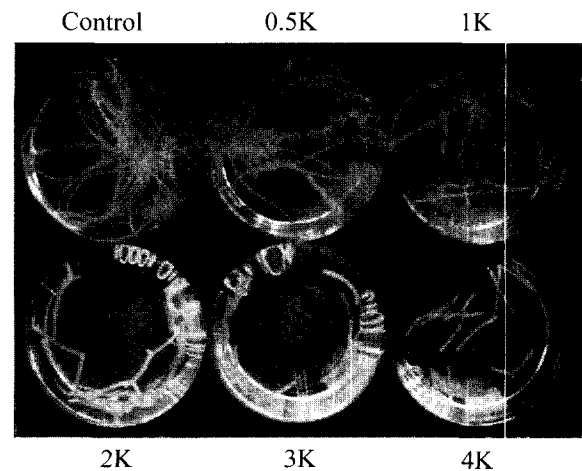


Fig. 2. Effects of γ -ray on ginseng hairy roots. Hairy roots were cultured in hormone-free 1/2 Murashige & Skoog(MS) medium with 3% sucrose at 23°C for 4 weeks in dark condition. Initial inoculum was 10 hairy root tips(size : 1.5 cm).

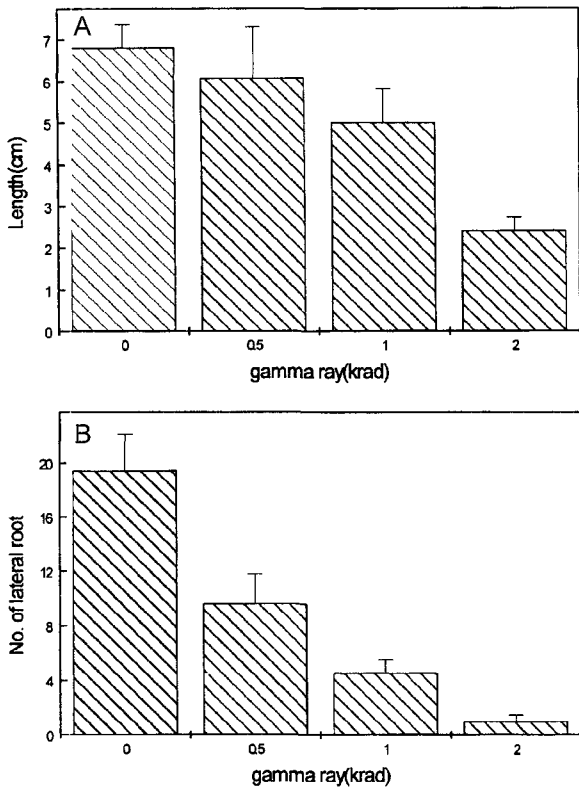


Fig. 3. Effects of γ -ray on length(A) and number of lateral roots (B) of ginseng hairy roots. Hairy roots were cultured in hormone-free 1/2 Murashige & Skoog(MS) medium with 3% sucrose at 23°C for 4weeks in dark condition. Bar shown are means \pm standard errors of three replicates.

chloroform으로 지질 및 색소를 제거하였다. *n*-BuOH층은 증류수로 3회 세척하여 ginsenosides 정량에 사용하였다. 유리당과 ginsenoside의 정량은 Lichroside-NH2(5 μ m, Merck)를 사용한 HPLC(Pharmacia, Sweden)로 분석하였다. 회합물은 차등굴절기(RI detector)를 이용하여 검출하였다. ginsenoside의 용매는 acetonitrile : water : *n*-BuOH(80 : 20 : 10, v/v/v)를 사용하였다. 각각의 정량은 chromatogram의 retention time을 표준품과 비교하여 peak height로 계산하였다.

결과 및 고찰

1. ^{60}Co γ -Ray 처리에 의한 돌연변이주의 형태

^{60}Co γ -ray의 조사에 의한 인삼모상근 돌연변이체를 선발하고자 암상태에서 배양된 인삼 모상근을 0.5, 1, 2, 3, 4 Krad의 저준위 방사선을 처리하였다. 그 결과, 고선량으로 조사할수록 모상근의 길이 생장이 억제되었으며 측근의 형성 또한 줄어들었다(Fig. 3). 특히 3 krad 이상의 조사선량시 길이 생장과 측근형성 모두 억제되었다. 따라서 2 krad이하의 선량

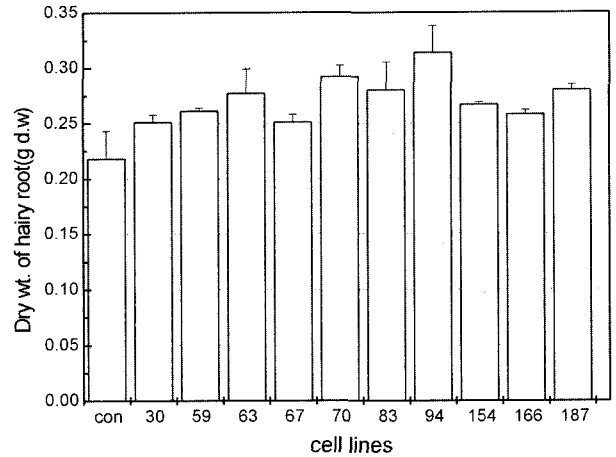


Fig. 4. Comparison of dry weight of hairy root to be of mutated 10 ginseng hairy root lines with normal line T78. Mutation is induced by γ -ray irradiation on GHR T78. Bar shown are means \pm standard errors of three replicates.

으로 조사한 모상근의 tip부위를 제거하고 1/2 Murashige & Skoog(MS) 액체배지에 접종한 후 새로 생성된 측근을 하나의 세포주로 선발하였다. 각 세포주를 γ -GHR 1부터 γ -GHR 206까지 표식하고 각각의 형태적 특성을 관찰하였다. 형태적으로 관찰된 모상근의 특징을 보면 주근의 약 80% 가량이 켈러스를 형성하였으며, 1차근과 2차근에서는 켈러스가 형성되지 않았다. 주근은 1차근과 2차근에 비해 비후되었으며 길이생장은 2차근에서 양호하여 2차근이 잘 발달됨을 확인할 수 있었다. 세포주마다 형태를 관찰하였던 바, 크게 주근이 비후된 것, 주근이 가는 것, 측근의 돌기가 많은 것, 측근의 생장이 양호한 것 등으로 그 형태를 나누어 볼 수 있었다. 그러한 큰 특징중에는 주근이 켈러스를 형성하면서 매우 비후되어 있고 두꺼운 1차근을 형성하며 길게 자라지 않으면서 2차근으로 분지하지 않는 것, 1차근은 비후되어 길게 자라지 않고 2차근은 가늘며 길게 자라지 않는 것, 주근이 비후하여 길게 자라며 1차근은 가늘면서 측근의 돌기가 많은 것, 주근과 1차근 모두 가늘며 2차근을 형성하지 않으면서 길게 자라는 것 등의 복합적인 형태적 특징으로 나타났다. 또한 가늘고 길게 자라면서 좋은 생장을 보이는 것이 있는가 하면, 두껍게 부피 생장을 하면서 저조한 생장을 보이는 것, 생장에 장애가 있는 것 등 다양한 형태를 나타내었다(Table 1, 2).

2. 고생장 돌연변이주의 선발

206개의 모상근 line의 생장률을 측정하여 생장이 우수한 45개의 세포주를 1차로 고생장 돌연변이주로 선발하였다. 이 45개의 세포주 중 방사선을 조사하기 전의 대조군에 비해 생장이 우수한 35개의 세포주였으며 10개의 세포주 γ -GHR

Table 1. Callus formation, diameter, length and number of branching in hairy root lines of ginseng mutated by γ -ray.

Hairy root lines	Callus formation			Root diameter			Root length			No. of BR	
	Main root	1st BR	2nd BR	Main root	1st BR	2nd BR	Main root	1st BR	2nd BR	1st BR	2nd Br
30	++			+++++	+++++	++	+++	+++++	+++	+	++
59	++			+++++	+++	++	++	+++	+	+++	
63	++			+++++	+++	++		+++			
67	++			+++	+++	++	+++	+++	+++	+++++	++++
70	++	+		+++++	+++++	+++	++	+++++	++	++	++++
83	++				++++	++		++++	++	++++	-
94	++				++++	++		++++	++	++	-
154	++				+++++	++		++++	++	++++	-
166	++				++++	++		+++++	++	++++	++
187	++				+++++	++		+++++	++	+++	++

Table 2. Thickness and number of branching in hairy root lines of *Panax ginseng* C. A. Meyer transformed with *Agrobacterium rhizogenes* strains.

Hairy root lines	Root thickness (cm of diameter)			NO. of BR		Root length		
	Main root	1st BR	2nd BR	1st BR	2nd BR	Main root	1st BR	2nd BR
γ -GHR 30	0.481 ± 0.034	0.143 ± 0.012	0.094 ± 0.008	+	++	+++	+++++	+++
γ -GHR 59	0.208 ± 0.013	0.175 ± 0.019	0.115 ± 0.013	+++	-	++	+++	+
γ -GHR 63	0.369 ± 0.021	0.228 ± 0.027	0.142 ± 0.027	+++++	-	++	+++	-
γ -GHR 67	0.558 ± 0.049	0.187 ± 0.018	0.09 ± 0.013	+++++	++++	+++	+++	+++
γ -GHR 70	0.625 ± 0.031	0.344 ± 0.083	0.113 ± 0.019	++	++++	++	+++++	++
γ -GHR 83	0.462 ± 0.044	0.146 ± 0.043	-	++++	-	+++	++++	-
γ -GHR 94	0.292 ± 0.028	0.146 ± 0.028	-	++	-	+++	++++	-
γ -GHR 154	0.287 ± 0.033	0.136 ± 0.013	-	++++	-	+++	++++	-
γ -GHR 166	0.289 ± 0.043	0.135 ± 0.016	0.074 ± 0.011	++++	++	+++	+++++	++

Hairy roots were cultured in hormone-free 1/2MS medium with 3% sucrose at 23°C for 4 weeks in dark conditions. BR: branching root. +++++: very very high, ++++: very high, +++: little high, ++: high, +: low, -: no data

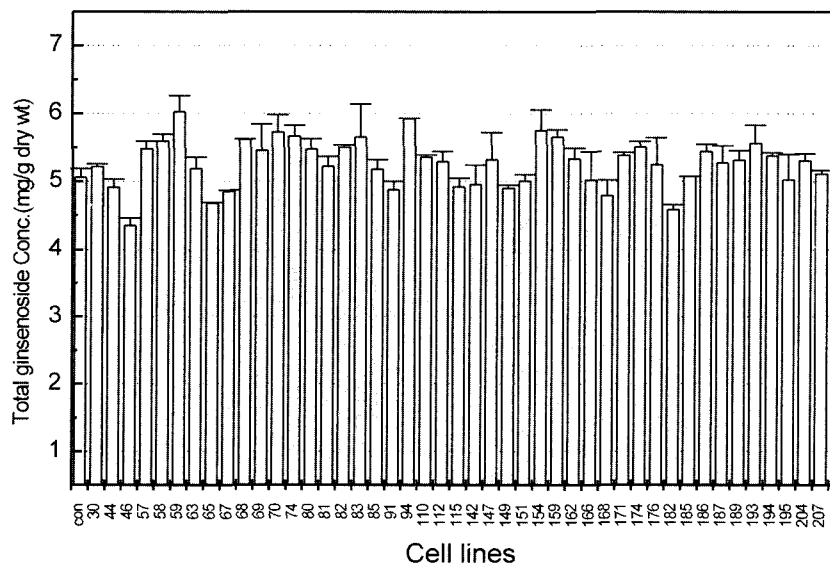


Fig 5. Comparison of ginsenosides concentration of mutated 45 ginseng hairy root lines with normal line T78. Mutation is induced by γ -ray irradiation on GHR T78. Bar shown are means ± standard errors of three replicates.

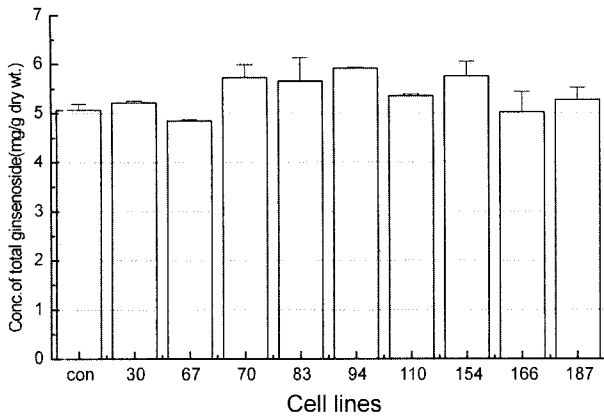


Fig 6. Comparison of ginsenosides concentration of mutated 10 ginseng hairy root lines with normal line T78. Mutation is induced by γ -ray irradiation on GHR T78. Bar shown are means \pm standard errors of three replicates.

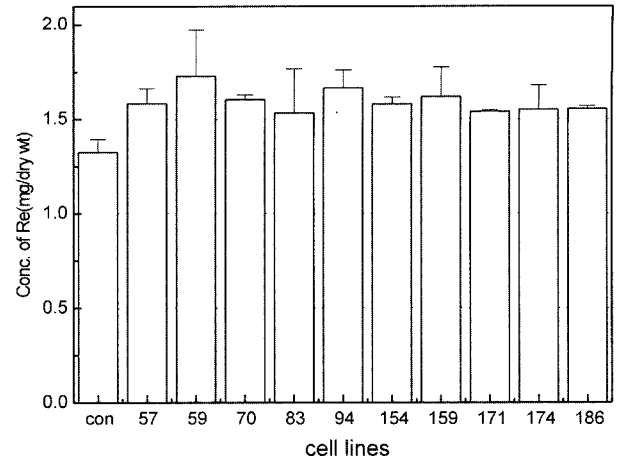


Fig 8. Comparison of Re concentraion of mutated 10 ginseng hairy root line with normal line T78. Mutation is induced by γ -ray irradiation on GHR T78. Bar shown are means \pm standard errors of three replicates.

30, 67, 70, 83, 94, 110, 154, 166, 187를 고성장 세포주로 선발하고 그 특징을 관찰하였다(Fig. 4). 우수한 생장률을 보인 세포주는 γ -GHR 70, 83, 94, 187로서, 각각 34.5%, 29.0%, 44.7%, 29.0%의 생장률 증가를 나타내어 44.7%의 생장증가를 보인 γ -GHR 94가 생장이 가장 우수함을 확인하였다. 형태적인 특징을 보면 γ -GHR 94는 가늘고 길게 자라는 1차근이 발달하였다. γ -GHR 70은 주근과 2차근이 비후하였으며 역시 1차근이 발달하였다. γ -GHR 187 주근과 1차근, 2차근 모두 가늘고 역시 1차근이 잘 발달하였다. 생장시험에서 우수성을 나타낸 세포주들은 근이 비후하였다기 보다는 1차근의 길이 생장이 발달한 것이 대부분이었다. 따라서 근이 비후한 것들은 근 내부의 조직이 치밀하지 못하고 속이 비어 있기

도 하였으며 길이 생장 또한 발달하지 못함을 알수 있었다.

3. ginsenosides 고품량 돌연변이주의 선발

방사선을 조사하지 않은 대조군에 비해 32개의 γ -GHR 세포주가 total ginsenoside 함량이 높게 나타나 생장이 우수한 45개의 세포주 중 71% 이상이 대조군과 비교해 ginsenoside 함량이 우수하였다(Fig. 5). 이 중 ginsenoside를 가장 많이 함유한 세포주는 γ -GHR 59로서 19%가량의 함량증가를 나타냈으며, 최소의 ginsenoside를 함유한 세포주인 γ -GHR 115의 경우 약 2.8%의 함량감소를 나타내 감마선의 조사가 ginsenoside의 함량증가에 효과적임을 알 수 있었다. 이는 유해물질

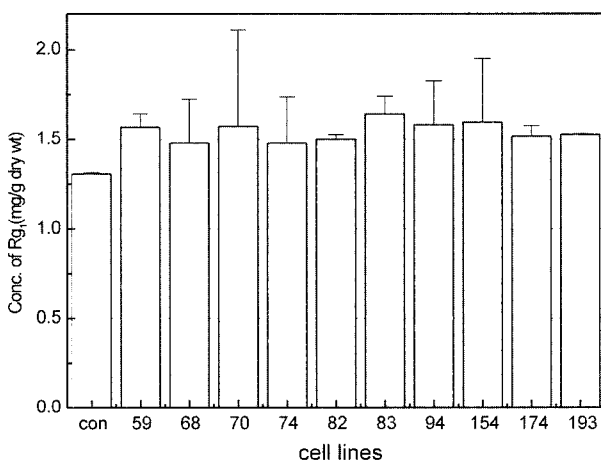


Fig 7. Comparison of Rg1 concentraion of mutated 10 ginseng hairy root line with normal line T78. Mutation is induced by γ -ray irradiation on GHR T78. Bar shown are means \pm standard errors of three replicates.

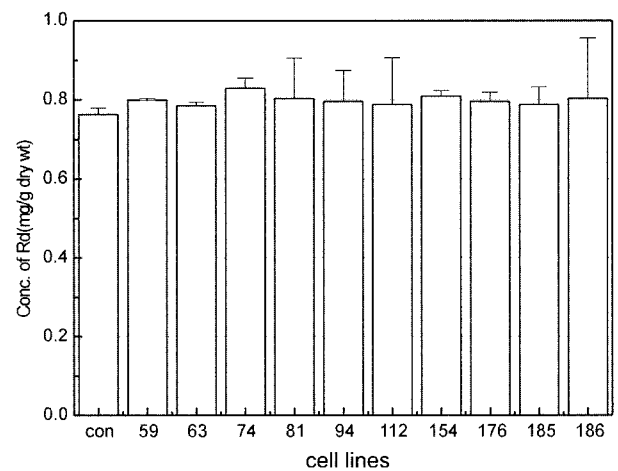


Fig 9. Comparison of Rd concentraion of mutated 10 ginseng hairy root line with normal line T78. Mutation is induced by γ -ray irradiation on GHR T78. Bar shown are means \pm standard errors of three replicates.

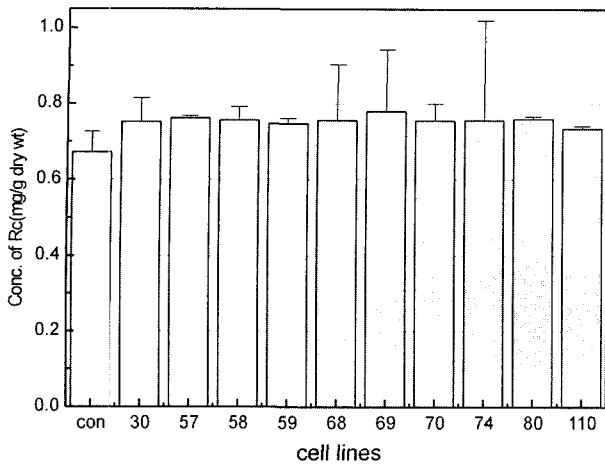


Fig. 10. Comparison of Rg₁ concentration of mutated 10 ginseng hairy root line with normal line T78. Mutation is induced by γ -ray irradiation on GHR T78. Bar shown are means \pm standard errors of three replicates.

의 유효량 이하의 적당한 용량은 생물체에 대하여 자극작용을 가질 수 있다는 Arndt-Schulz의 hormesis법칙에 상응하며 동물의 경우 수 10 rad이하, 식물의 경우 수 10rad~수 Krad의 방사선 조사는 이러한 hormesis를 유발한다는 보고와 일치한다. 높은 ginsenoside 함량을 보이는 세포주는 γ -GHR 59, γ -GHR 94, γ -GHR 154로서 각각 19%, 16.9% 그리고 13.6%의 함량 증가효과를 나타내었다. 특히 가장 높은 생장을 보이는 세포주인 γ -GHR 94가 높은 ginsenoside 함량을 나타내 생장과 ginsenoside함량 모두 충족시키는 세포주임을 확인하였다. 고생산을 위한 세포주로서는 γ -GHR 59가 우수함을 확인하였다(Fig. 6).

비록 총 ginsenoside의 함량은 낮을지라도 단일 ginsenoside 함량은 높은 세포주들이 존재하였는데, *Panaxtriol*(PT)계의 Rg₁의 경우 γ -GHR 83와 γ -GHR 154 세포주가 25.5%, 22.0%의 함량증가를 나타내었다(Fig. 7). Re의 경우 γ -GHR 59와 γ -GHR 94 세포주가 23.3%, 25.7%의 함량증가를 나타내었다(Fig. 8). *Panaxdiol*(PD)계의 Rd의 경우 γ -GHR 74와 γ -GHR 154 세포주가 8.6%, 5.9%의 함량증가를 나타내었다(Fig. 9). Rc의 경우 γ -GHR 57와 γ -GHR 69 세포주가 13.5%, 16.2%의 함량증가를 나타내었으며(Fig. 10), Rb₂의 경우 γ -GHR 57과 γ -GHR 59 세포주가 각각 7%, 7.6%의 함량증가를 나타내었다(Fig. 11). Rb₁의 경우 γ -GHR 57와 γ -GHR 58, 94 세포주가 각각 27.7%, 29.9%, 24.4%의 함량증가를 나타내었다(Fig. 12). 따라서 특정한 생리적 기능을 가진 단일 ginsenoside의 생산에 효과적인 세포주의 선별이 가능하고, 특정

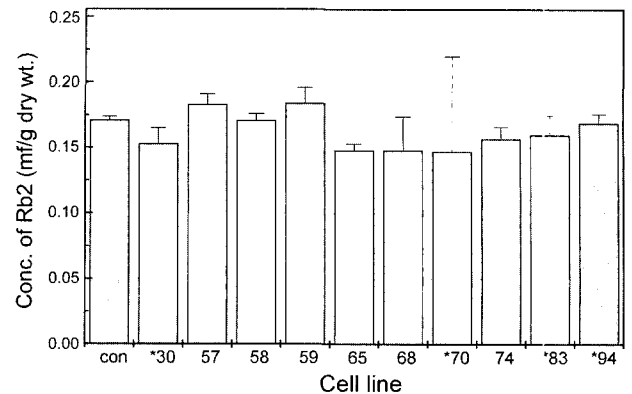


Fig 11. Comparison of Rb₂ concentration of mutated 10 ginseng hairy root line with normal line T78. Mutation is induced by γ -ray irradiation on GHR T78. Bar shown are means \pm standard errors of three replicates.

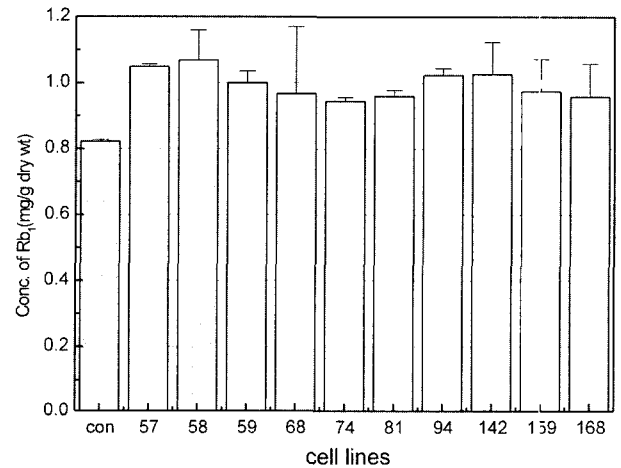


Fig. 12. Comparison of Rb₁ concentration of mutated 10 ginseng hairy root line with normal line T78. Mutation is induced by γ -ray irradiation on GHR T78. Bar shown are means \pm standard errors of three replicates.

ginsenosides 고함유 세포주의 안정적인 공급이 이루어질 수 있을 것이라 생각된다.

4. Ginsenoside 고생산을 위한 세포주 선발

모상근의 성장률과 ginsenoside 생산이 동시에 우수한 세포주는 γ -GHR 70, γ -GHR 83, γ -GHR 94로 대조군과 비교하여 각각 34.5%, 29%, 44.7% 성장량이 높았다. ginsenoside 함량 역시 대조군에 비해 각각 13.1%, 11.7%, 16.9% 더 높았다. 단일 ginsenoside로 보면 Rg₁의 경우 γ -GHR 83, Re의 경우 γ -GHR 94, Rd의 경우 γ -GHR 74, Rc의 경우 γ -GHR 69, Rb₂의 경우 γ -GHR 59, Rb₁의 경우 γ -GHR 94가 특정 ginsenoside의 생산에 효과적 세포주임을 확인하였다.

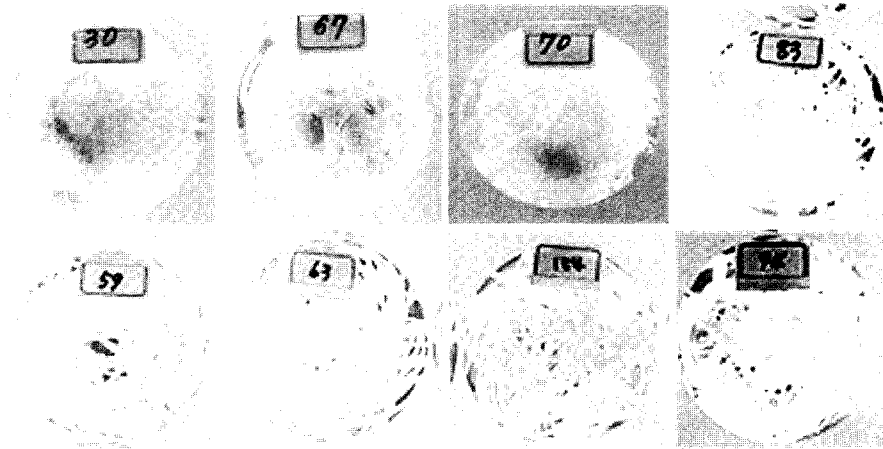


Fig. 13. Character of the hairy roots irradiated by ^{60}Co γ -ray on *Panax ginseng* C.A Meyer.

요 약

본 연구는 인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)의 모상근에 ^{60}Co γ -ray의 조사에 따른 영향을 구명하고자 수행되었다. 0.5~4 Krad의 다양한 방사선을 조사한 결과 모상근은 3Krad이상에서 생장이 억제되었다. 2 Krad이하의 방사선을 조사한 모상근의 정단을 제거한 후 자라난 측근을 하나의 세포주로 하여 성장과 형태가 다양한 206개의 모상근 세포주를 선발하고 1/2 MS 호르몬 무첨가 배지에서 배양하였다. 206개의 세포주 중 생장이 우수한 10개의 세포주를 선발하였는데 특히 대조구에 비해 γ -GHR 70과 γ -GHR 94의 생장이 각각 34.5%, 44.7% 으로 가장 높음을 확인하였다. 생장이 우수한 10개 세포주의 형태적 특징을 주근의 굵기와 측근의 돌기형성, 측근의 성장정도에 따라 관찰하였던 바, 생장이 우수한 세포주는 1차근이 가늘며 왕성한 성장을 나타남을 확인하였다. Ginsenoside의 함량에 있어서 생장이 우수한 10개의 세포주 중 8개의 모상근 세포주가 대조구보다 함량이 높았으며 특히 γ -GHR 59와 γ -GHR 94는 각각 19%와 16.9%로 가장 높은 함량을 나타내었다. 따라서 γ -ray를 조사한 모상근 세포주 중 총 ginsenoside 함량이 우수하고 성장 또한 우수한 세포주로 γ -GHR 70, γ -GHR 94를 선발하였다. 특정

ginsenoside의 함량별로 보면 항암에 효과적인 Rb_2 는 γ -GHR 57가 7.6%, Rc 는 γ -GHR 69가 16.2%의 함량 증가를 나타내어 특정 ginsenoside 생산에 효율적일 것으로 보인다. 돌연변이와 관련된 유전자(VNTRP)분석은 현재 진행 중에 있다.

감사의 글

본 연구는 충북대학교 기초과학 연구소에서 지원한 연구비(2001년~2002년도)로 수행한 연구결과의 일부로 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Zhang, J. and Li, J. : *The Korean Society of Ginseng*, p.12 (1998).
2. Green, K. D. and Thomas, N. H. : *Biotech. & Bioeng.* **39**, 195-202 (1992).
3. Yang, D. C., Choi, H. Y., Kim, Y. H., Yun, K. Y. and Yang, D. C. : *Korean J. Ginseng Sci.* **20**(3), 318-324 (1996a).
4. Yang, D. C., Choi, H. Y., Kim, Y. H., Yun, K. Y. and Yang, D. C. : *Korean J. Ginseng Sci.* **21**(1), 28-34 (1996b).
5. Murashige, T. and Skoog, F. : *Physiol. Plant* **15**, 473-479 (1962).