

第三次年度  
最終報告書

# 人蔘의 新種創成 및 有用物質生産을 爲한 生物工學 技術開發

Development of Biotechnological Techniques for Breeding  
of New Variety and Production of Physiologically Active  
Components in Korean Ginseng(*Panax ginseng* C. A. Meyer)

研究機關

韓國人蔘煙草研究所

科學技術處

# 提 出 文

科學技術處長官 貴下

本 報告書를 “人蔘의 新種創成 및 有用物質生産을 爲  
한 生物工學 技術開發” 事業의 最終報告書로 提出합니다.

1992. 6.

主管研究機關名：韓國人蔘煙草研究所

研究責任者：崔 光 泰

研 究 員：朴芝昶 金甲植

金南源 梁德春

千成龍 李鍾華

安仁玉 朴性苑

李清浩 姜信雄

여 백

# 要 約 文

## I. 題 目

人蔘의 新種創成 및 有用物質 生産을 爲한 生物工學 技術開發

## II. 研究開發의 目的 및 重要性

高麗人蔘(*Panax ginseng* C.A.Meyer)은 옛날부터 동양의 한의학 처방에 독보적인 위치를 차지하고 우리나라 고유의 전통 藥材植物로 재배되어 왔다.

그러나 인삼은 타 작물과는 달리 品種分化가 되어 있지 않은 혼계상태로 재배되고 있으며, 종자과종 후 3~4년후에나 개화결실하기 때문에 육종년한이 길고 異種間의 교잡이 거의 불가능하여 교잡육종에 어려움이 많은 실정이다.

또한 인삼은 半陰地性 작물로서 재배시 해가림설치가 필수적으로 노동력이 많이 들고 생육이 늦어 4~5년동안 한 곳에서 재배되므로 뿌리썩음병과 같은 지하부 병해, 한발, 폭우 및 폭설등의 自然災害에 의한 피해가 많아 안정된 수량확보가 어렵다. 특히 産業化에 따른 농촌의 노동인력의 감소는 대단위 인삼 재배의 企業化를 불가능하게 하여 생산효율의 저하와 생산비 급증의 요인이 되어 재배원료삼 공급이 더 어려워지고 있다.

따라서 인삼의 신품종 육성에 필요한 生物工學技術인 原形質體 培養, 融合, 遺傳子操作 및 器內再分化 등의 기술이 개발된다면 耐病, 耐災害성과 같은 새로운 遺傳因子가 導入된 신품종이 육성될 것이며, 또한 인삼의 세포배양 기술이 개발되면 無菌的으로 인삼의 有效成分들을 대량으로 생산할 수 있고 병충해 및 재해에 관계없이 균일한 원료를 주기적으로 대량생산할 수 있어 인삼제품 원료생산의 공장산업화가 가능할 것이다. 이러한 목적을 달성하는데는 특수 有效成分이 많은 細胞株를 選拔하므로서 생산성을 배가시킬 수 있으며 適正培

養 條件의 確立, 有效成分 合成促進要因究明 등이 선결되어야 하겠다.

本 研究는 인삼의 신품종 육성에 필수적인 기술과 有效物質의 大量生産을 위한 細胞培養技術을 개발하기 위한 綜合研究로서 1) 인삼의 原形質體 融合細胞의 선발기술 개발, 2) 再分化를 위한 인삼 callus의 體細胞胚 形成요인과 物質代謝와의 관계 확립, 3) 인삼의 가장 중요한 2차산물인 인삼 saponin의 함량 증대를 위한 배지 및 식물호르몬 조성 등의 培養條件究明, 4) 2차산물의 高含有 變異株 誘起 및 선발방법개발 등을 위하여 遂行되었던 바, 그 結果를 綜合하여 報告하고자 한다.

### III. 研究開發 內容 및 範圍

人蔘의 新種創成 및 有用物質 生産을 위한 生物工學 技術開發을 위해서 다음과 같은 研究를 遂行하였다.

#### 1. 人蔘의 原形質體 融合 및 融合體 選拔技術 開發

- 가. 原形質體의 裸出 및 培養
- 나. 電氣衝擊에 의한 原形質體 融合
- 다. 裸出 原形質體의 生存率에 미치는 electric field strength의 影響
- 라. 電氣融合時 電氣場의 세기가 原形質體의 融合率에 미치는 影響
- 마. 人蔘 및 무우 原形質體의 buoyant density 分布
- 바. 人蔘과 무우의 融合原形質體 選拔

#### 2. 人蔘의 體細胞胚 形成과 關聯物質代謝

- 가. 體細胞胚 발생조건

- 나. 培養時期別 物質代謝의 變化
- 다. 一次 代謝產物의 變化
- 라. 酸化 還元 정도와 體細胞胚 발생
- 마. 二次代謝產物의 變化

### 3. 組織培養에 의한 人蔘 saponin의 生産과 高含有細胞株의 選拔

- 가. 培養時期別 사포닌 含量的 變化
- 나. 培養人蔘 callus의 사포닌 含量에 미치는 植物호르몬 및 培地組成의 影響
- 다. 사포닌 含量에 미치는 L-phenylalanine 및 elicitor의 影響
- 라. 人蔘細胞의 生長 및 사포닌 含量에 미치는 細胞密度와 培養期間의 影響
- 마. 人蔘細胞의 生長 및 사포닌 生産에 미치는 光, 植物호르몬 및 培養時期의 影響
- 바. 2,4-D 代替 生長調節物質에 의한 人蔘細胞의 사포닌含量 變化
- 사.  $\gamma$ -ray 處理에 의한 變異體 選拔
- 아. 化學物質 處理에 의한 變異體 選拔
- 자. 人蔘의 우수육성계통으로부터 사포닌 高含有 細胞株의 選拔
- 차. *A. tumefaciens*에 의한 人蔘의 形質轉換

## IV. 研究開發結果 및 活用に 대한 建議

原形質體 融合技法을 利用하여 神祕의 靈藥인 人蔘의 새로운 品種을 育成하기 위한 研究의 일환으로 우선 電氣衝擊에 의한 原形質體融합을 시도하였으며, 人蔘 培養細胞로부터 體細胞胚가 발생되는데 적합한 培養條件과 培養과정중의 주요 代謝產物의 變化를 調査하였으며, 또한 人蔘細胞의 器內培養技術을 利用하여 人蔘사포닌을 大量生産하기 위한 研究의 일환으로, 固體培養에 의한 사

포닌의 生産에 미치는 制限요인과 液體培養을 통한 人蔘 細胞의 生長 및 사포닌의 生産에 미치는 각종 植物호르몬 및 光의 影響을 究明하였고, 그리고 人蔘 사포닌 高含有 細胞株를 器内에서 選拔하여 사포닌 高生産細胞株로 使用하고자 각종 變異體를 選拔하였던 바, 그 結果를 요약하면 다음과 같다.

1. 人蔘 callus에서 原形質體 裸出은 容易하였고 培養 40時間後 부터 細胞分裂 이 시작되었으며 培養 3주후에는 細胞 colony가 形成되었다.
2. 電氣場의 세기에 따른 人蔘原形質體의 融合率은 1kv/cm부근에서 融合率이 가장 높았으며, fusion facilitator로서 1mM spermin의 添加가 가장 좋았다.
3. 人蔘原形質體 및 무우원형질체의 buoyant density는 1.0447kg/ℓ ~ 1.0718kg/ℓ 사이에 고루 분포하고 있어 gradient centrifugation에 의해 heterokaryon의 選拔이 가능하였다.
4. 人蔘 培養細胞와 무우 葉육細胞에서 遊離시킨 原形質體를 電氣衝擊을 가해 본 結果 AC電氣場에서 이웃하는 細胞끼리 서로 pearl chanin을 이루며 DC 충격에 의해 60초後 細胞膜의 融合이 이루어졌다.
5. Sucrose와 2,4-D의 濃度가 增加함에 따라 體細胞胚 發生이 촉진되는 傾向을 보였다.
6. 단백질은 培養初期에는 높았으나 3개월이후 減少하여 낮은 狀態를 유지하였으며 體細胞胚가 발생되면서 급증하였다.
7. 지방산은 培養期間이 경과함에 따라 含量이 서서히 減少하였다가 體細胞胚 발생과 더불어 급증하였다.
8. 페놀류는 培養後 4개월에 이르러 최대치를 보이다가 減少하였다.
9. 과산화지질은 培養이래 낮은 含量을 유지하다가 體細胞胚 발생과 더불어 급증하였다.
10. 人蔘 callus의 사포닌 含量은 BA濃度 0.01mg/ℓ에서 높았으며, 사포닌 生産

수율도 가장 높았다.

11. 사포닌 生産에 SH 培地가 MS 培地보다 양호하였으며, L-phenylalanine 5mg/ℓ 添加區에서 생산이 증가하였다.
12. 人蔘 細胞群의 生長은 液體 培養時 2,4-D濃度 1mg/ℓ가 3mg/ℓ보다 良好하였으며, 暗條件에서의 生長이 良好하였다.
13.  $\gamma$ -ray 2-3kR에서 照射한 後 變異體를 選拔하는 것이 效果的이었으며, 自然 人蔘根보다 사포닌의 含量이 많은 R194번과 R219번 單一細胞株를 選拔 하였다.
14. 化學物質處理에 의한 사포닌 高含有細胞株 選拔은 aminopterin 1mM, potassium chlorate 10mM,  $\alpha$ -methyl-D.L. methionine 80mg/ℓ, D,L-norleucine 100mg/ℓ의 각각 處理區에서 選拔하는 것이 效果的이었다.
15. 人蔘우수계통으로부터 사포닌 高含有 細胞株인 20601, JY104 細胞群을 選拔 하였다.
16. *A. tumefaciens* C58에 의해서 人蔘組織은 부위에 관계없이 crown gall tumor가 形成되었으며, 人蔘 tumor callus는 基本培地에 hormone을 添加함으로써 오히려 callus의 生長이 減少하였다.
17. 人蔘 tumor callus는 정상 callus보다 液體培養에서는 2배가량 生長量이 많았다.
18. 人蔘 形質轉換 callus는 정상 callus보다 粗saponin含量이 3배정도 많았으며 ginsenoside pattern도 재배人蔘 뿌리와의 비슷한 傾向을 보였다.

## V. 計劃과 實績 對比

本 研究는 計劃대로 遂行되었으며, 問題點과 不振事項은 없었다.

여 백

# SUMMARY

## I. Title of the project

Development of biotechnological techniques for the breeding of new variety and production of physiologically active components in Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer)

## II. Objective and significance of the study

Korean ginseng(*Panax ginseng* C.A. Meyer) has been cultivated as a traditional herb medicine from the ancient time in Korea and known as an elixir in Asia.

The application of the conventional breeding method to ginseng plant is very difficult, because the ginseng is a perennial plant, and does not have the cross compatability among the species. Furthermore, the improvement of ginseng productivity is extremely restricted by the physiological characteristics of this plant, i.e. low growth rate as a perennial semi-shade plant and high susceptability to disease and environmental stresses. Recently, the industrialization in Korean caused the rapid reduction of the number of labor-population in country and made it more difficult to cultivate the ginseng in large scale. As a result, the shortage of the raw material for the red ginseng products becomes more and more serious, which was harvested only from ginseng farm after 6-year cultivation.

In order to solve these problems, (1) disease and specific environment tolerant varieties should be bred, (2) optimal culture conditions for *in vitro* production of ginseng saponin should be clarified, and (3) new biotechnological techniques such as protoplast culture and fusion, somatic embryo formation, gene transformation, and selection of high-producing cell lines should be applied for release of new varieties and mass production of the biologically active components. Major research strategies in this study are as follows :

- 1) To improve techniques for ginseng breeding, such as protoplast isolation and culture, protoplast electrofusion, heterokaryon selection, and somatic embryo formation.
- 2) To develop biotechnological techniques for *in vitro* production of biologically active components from ginseng cells.

### **III. Contents and scope of the study**

The contents and scope of the studies are outlined as follows :

1. Development of techniques for the fusion of ginseng protoplasts and selection of fused protoplasts
  - 1) Isolation and culture of ginseng protoplasts
  - 2) Effects of electric field strength of electrofusion on the viability of ginseng protoplasts.
  - 3) Effect of electric field strength of electrofusion on the rate of proto-

plast-fusion.

- 4) Distribution of ginseng and radish protoplasts by buoyant density.
  - 5) Selection of the fused protoplasts between ginseng and radish protoplasts.
2. Somatic embryo formation in ginseng and its related metabolism
- 1) Conditions inducing the somatic embryo.
  - 2) Pattern of cell growth and respiration during embryo formation.
  - 3) Change in contents of the primary metabolites.
  - 4) Change in the oxidative and reductive activity in cell sap.
  - 5) Change in contents of the secondary metabolites.
3. Ginseng saponin production by ginseng tissue culture
- 1) Saponin content in ginseng callus cultured on solid media.
    - a) Effect of culture duration
    - b) Effect of plant hormones
    - c) Effect of L-phenylalanine and elicitor
  - 2) Saponin content in ginseng cell cultured in liquid media.
    - a) Effects of amount of inoculum and culture duration on the saponin biosynthesis.
    - b) Effects of plant hormones and light on growth of ginseng cell.
    - c) Effect of IBA and IAA as an alternative of 2,4-D on the ginsenoside pattern in ginseng cell.
  - 3) Selection of cell lines containing high level of saponin.

- a) Selection of mutant cell lines by  $\gamma$ -ray.
- b) Selection of mutant cell lines by chemical mutagens.
- c) Selection of cell lines from calli induced from the superior bred lines of ginseng.
- d) Transformed cell line with *Agrobacterium tumefaciens*.

#### **IV. Results and its application**

This study was carried out to develop the biotechnological techniques about protoplast culture, electrofusion, selection of heterokaryons, somatic embryogenesis, *in vitro* production of ginseng saponin, and selection of high-producing cell lines. The results are summarized as follows :

1. Protoplasts isolated from ginseng callus started the cell division after 40 hrs of culture, and aggregation of cell appeared 3 weeks after culture.
2. The fusion rate of ginseng protoplasts was high at 1.0KV/cm of electric field strength and raised by the addition of 1 mM spermin as a fusion facilitator.
3. Protoplasts isolated from ginseng callus and radish mesophyll tissue were distributed within the buoyant density range of 1.0447~1.0718kg/ $\ell$ , which was available for the selection of heterokaryons.
4. Heterokaryons between ginseng callus and radish mesophyll protoplasts could be observed 1 min. after the DC electric pulse.
5. Somatic embryogenesis in ginseng was stimulated by sucrose and 2,4-D

up to 5% and 1 ppm, respectively.

6. The content of protein maintained low value and increased suddenly with the outbreak of somatic embryo.

7. The content of lipid gradually decreased at first, and increased suddenly with the outbreak of somatic embryo.

8. The phenolics showed the maximum content at 4 months after culture, and then gradually decreased.

9. The content of lipid peroxide significantly increased with the outbreak of somatic embryo.

10. The saponin content in callus cultured in media containing 0.01mg/ℓ BA showed a maximal value.

11. The SH media was better for the production of saponin from ginseng callus than the MS media and the saponin biosynthesis was stimulated by addition of 5 mM L-phenylalanine.

12. The cell growth in suspension culture was better in darkness than in light and by the addition of 1mg/ℓ 2,4-D to media than that of 3mg/ℓ 2,4-D.

13. Optimal dose of  $\gamma$ -ray irradiation for the mutation was in range of 2-3 kR and the selected cell lines, R194 and R219, showed higher in saponin content than normal roots.

14. Optimal concentrations of chemical mutagens for the ginseng cell mutation were 1mM for aminopterin, 10mM for potassium chlorate, 80mg/ℓ for  $\alpha$ -methyl-D.L. methionine, and 100mg/ℓ for D.L.-norleucine, respectively.

15. High saponin cell lines, 20601 and JY104, were selected from the calli

of superior bred ginseng lines.

16. Tumor callus could be induced by the infection of root, stem, and leaf by *A. tumefaciens* C58, and showed a higher growth rate on the media without the plant hormones than untransformed callus.
17. The growth rate of tumor callus in suspension culture was about twice in comparison with that of normal callus.
18. The saponin content in tumor callus was about three-fold in comparison with normal callus, the ginsenoside pattern in saponin of tumor callus was similar to that of normal ginseng root.

# CONTENTS

Chapter I. Introduction .....	23
1. Objective of study .....	23
2. Contents and scope of study .....	24
Chapter II. Development of techniques for the fusion and selection of fused protoplasts .....	26
1. Introduction .....	26
2. Materials and methods .....	28
1) Isolation of ginseng protoplast .....	28
2) Protoplast fusion of ginseng .....	28
3) Checking of viability of protoplast .....	29
4) Effect of electric field strength on fusion ratio of protoplast ...	29
5) Distribution of ginseng protoplast using the buoyant density ...	29
6) Protoplast fusion and selection of fused protoplasts using the buoyant density .....	30
3. Results and discussion .....	30
1) Isolation and culture of ginseng protoplasts .....	30
2) Protoplast fusion of ginseng using the electric shock .....	32

3) Effect of the electric field strength on the viabilities of ginseng protoplasts .....	35
4) Effect of electric field strength on fusion ratio of ginseng protoplasts .....	37
5) Distribution of buoyant density of ginseng and radish protoplasts.....	39
6) Selection of fused protoplasts between ginseng and radish .....	41
4. Conclusion .....	42
5. Literature cited .....	43

### Chapter III. Somatic embryogenesis and changes of the related metabolism of ginseng.....

1. Introduction .....	46
2. Materials and methods .....	47
1) Cell culture of ginseng .....	47
2) Measurement of metabolite content .....	47
3. Results and discussion .....	49
1) Embryogenesis of ginseng cultured cells .....	49
2) Changes of metabolites during the culture .....	50
4. Conclusion .....	58
5. Literature cited .....	59

Chapter IV. <i>In vitro</i> production of saponin and selection of cell lines with high level of ginseng saponin .....	62
1. Introduction .....	62
2. Materials and methods .....	64
1) Production of saponin in solid culture of ginseng callus .....	64
2) Growth and saponin production in liquid culture of ginseng cells .....	66
3) Selection of cell lines with high level of ginseng saponin .....	68
3. Results and discussion .....	69
1) Production of saponin in solid culture of ginseng callus .....	69
2) Growth and saponin production in liquid culture of ginseng cells .....	76
3) Selection of cell lines with high level of ginseng saponin .....	81
4. Conclusion .....	93
5. Literature cited .....	96
Chapter V. Summary .....	99

여 백

# 目 次

第 1 章 緒 論 .....	23
第 1 節 研究의 目的과 範圍 .....	23
1. 研究의 目的 .....	23
2. 範 圍 .....	24
第 2 章 原形質體 融合 및 融合體 選拔 技術開發 .....	26
第 1 節 序 說 .....	26
第 2 節 材料 및 方法 .....	28
1. 原形質體의 遊離 .....	28
2. 原形質體의 融合 .....	28
3. 融合原形質體의 生存率 .....	29
4. 電氣場의 세기에 따른 原形質體의 融合率 調査 .....	29
5. Buoyant density 차이에 의한 原形質體의 分布 .....	29
6. Buoyant density 차이에 의한 原形質體 融合 및 融合原形質體의 選拔 .....	30
第 3 節 結果 및 考察 .....	30
1. 人蔘原形質體의 裸出 및 培養 .....	30
2. 電氣衝擊에 의한 原形質體 融合 .....	32
3. 裸出 原形質體의 生存率에 미치는 electric field strength의 影響 .....	35
4. 電氣融合時 電氣場의 세기가 原形質體의 融合率에 미치는 影響 .....	37

5. 人蔘 및 무우 原形質體의 buoyant density 分布 .....	39
6. 人蔘과 무우의 融合原形質體 選拔 .....	41
第4節 結 論 .....	42
參 考 文 獻 .....	43
第3章 人蔘의 體細胞胚 形成과 關聯物質代謝 .....	46
第1節 序 說 .....	46
第2節 材料 및 方法 .....	47
1. 人蔘의 세포배양 .....	47
2. 대사산물 함량분석 .....	47
第3節 結果 및 考察 .....	49
1. 體細胞胚 발생조건 .....	49
2. 배양시기별 物質代謝의 變化 .....	50
第4節 結 論 .....	58
參 考 文 獻 .....	59
第4章 組織培養에 의한 人蔘 saponin의 生産과 高含有 細胞株의 選拔 .....	62
第1節 序 說 .....	62
第2節 材料 및 方法 .....	64

1. 固體培養에 의한 人蔘 callus의 사포닌生産 .....	64
2. 懸濁培養 人蔘細胞의 生長 및 사포닌含量 .....	66
3. 사포닌 高含有 細胞株의 選拔 .....	68
<b>第 3 節 結果 및 考察 .....</b>	<b>69</b>
1. 固體培養에 의한 人蔘 callus의 사포닌生産 .....	69
2. 懸濁培養 人蔘細胞의 生長 및 사포닌含量 .....	76
3. 사포닌 高含有 細胞株의 選拔 .....	81
<b>第 4 節 結 論 .....</b>	<b>93</b>
<b>參 考 文 獻 .....</b>	<b>96</b>
<b>第 5 章 要 約 .....</b>	<b>99</b>

여 백

# 第 1 章 緒 論

## 第 1 節 研究의 目的과 範圍

### 1. 研究의 目的

人蔘은 반음지성 多年生 作物로서 아직까지 品種分化가 되지 않은채 재래종이 栽培되고 있으며, 育種年限이 길고 異種間의 교잡이 거의 不可能하여 전통방법으로 品種을 改良하는 것에는 어려운 점이 대단히 많다.

또한 人蔘 製品의 原料는 이제까지 人蔘圃場에서 관행재배 方法에 의해서 생산공급이 되어 왔으나 産業化에 따른 農村 勞動力의 감소로 재배관리의 어려움이 가중되고, 연작장해에 따른 재배면적 확보가 날로 심각해져 생산원가의 상승요인이 되고 있으며, 병충해가 심하여 安定된 수량확보가 불가능하여 제품 원료의 안정적 공급이 위협받고 있는 실정이다.

그러나 최근에 生物工學技術의 발달과 더불어 관행육종방법에 의한 식물육종의 限界性을 넘어선 新品種 창출이 가능하게 되고, 生合成 植物細胞의 培養시스템을 이용하여 醫藥산업 분야에 사용되는 藥理效能물질을 생합성하는 식물세포의 잠재능력을 현실화하여 유효물질을 大量生産하려는 研究가 여러 연구팀에 의해 수행되고 있다. 특히 합성의약품의 부작용에 대한 인식이 높아지면서 natural product에 대한 생물공학적 생산기술이 주목을 끌고 있다.

본 연구는 인삼의 신품종 육성에 필수적인 인삼의 原形質體 融合 및 融合세포의 선발, 원형질체의 배양에 의한 callus의 유기, 유기된 callus에서 再分化時 體細胞胚 형성과정을 정립하기 위한 일련의 기술과 인삼의 가장 중요한 2차산물인 인삼saponin의 함량증대를 위한 세포배양기술, 그리고 2차산물의 고함유

변이주 유기 및 선발기술 등을 개발하기 위하여 수행되었는 바, 그 범위는 아래와 같다.

## 2. 範 圍

人蔘의 新種創成 및 有用物質 生産을 위한 生物工學 技術開發을 위해서 다음과 같은 研究를 遂行하였다.

가. 原形質體의 裸出 및 培養방법 確立

나. 電氣衝擊에 의한 原形質體 融合조건 究明

다. 裸出 原形質體의 生存率에 미치는 electric field strength의 影響 조사

라. 電氣融合時 電氣場의 세기가 原形質體의 融合率에 미치는 影響 調査

마. 人蔘 및 무우 原形質體의 buoyant density 分布 調査

바. 人蔘과 무우의 融合原形質體 選拔方法 檢討

사. 體細胞胚 발생조건 究明

아. 배양시기별 物質代謝의 變化 調査

자. 一次 대사산물의 變化 調査

차. 酸化 還元 정도와 體細胞胚 발생과의 關係檢討

타. 二次대사산물의 變化 調査

카. 培養時期別 사포닌 含量的 變化 調査

과. 培養人蔘 callus의 사포닌含量에 미치는 植物호르몬 및 培地조성의 影響 調査

하. 사포닌含量에 미치는 L-phenylalanine 및 elicitor의 影響

거. 人蔘細胞의 生長 및 사포닌含量에 미치는 細胞밀도와 培養期間의 影響

너. 人蔘細胞의 生長 및 사포닌生産에 미치는 光, 植物호르몬 및 培養時期의

## 影響

- 더. 2,4-D 대체 生長調節物質에 의한 人蔘細胞의 사포닌含量 變化
- 러.  $\gamma$ -ray 處理에 의한 變異體 選拔
- 머. 化學物質 處理에 의한 變異體 選拔
- 버. 人蔘의 우수육성계통으로 부터 사포닌 高含有 細胞株의 選拔
- 서. *A. tumefaciens*에 의한 人蔘의 形質轉換

## 第2章 原形質體 融合 및 融合體 選拔 技術開發

### 第1節 序 說

1960년 영국의 Cocking이 tomato의 뿌리 組織에 enzyme을 처리하여 細胞壁을 成功的으로 除去한 이후<sup>3)</sup> 高等植物의 原形質體에 대한 研究가 여러 方面에서 매우 활발하게 이루어졌다. 특히 1970년 Nagata와 Takebe는 煙草의 葉肉 組織으로부터 分離시킨 原形質體에서 다시 細胞壁이 再生되고 細胞分裂이 일어남을 報告<sup>13)</sup>하여 細胞壁이 없는 原形質體에서도 組織培養에 의해 whole plant를 誘起시킬 수 있게 됨으로써 더욱 활발해졌다. 그후 細胞壁이 없는 植物 細胞間에 原形質體 融合에 의한 體細胞雜種을 얻고자 많은 노력들을 기울여 왔으며, 植物細胞에서 cell wall을 제거한 후 原形質體를 이용한 실험은 많은 技術의 開發로 여러 植物體에서 활발히 研究가 이루어져 많은 식물들에서 細胞融合에 의한 體細胞 雜種을 성공하였다. 따라서 人蔘과 같이 栽培期間이 4~6년간으로 育種하는데 매우 長時日이 소요되어 일반 재래식 育種方法으로는 새로운 品種을 育成하기가 매우 어려운 경우 原形質體融合과 같은 새로운 方法의 도입이 필요한 실정이다. 그러나 人蔘을 材料로하는 실험은 거의 全無한 상태로 이는 人蔘의 경우 잎과 줄기에서는 原形質體가 전혀 遊離되지 않으며 뿌리에서는 遊離된 原形質體의 細胞膜이 매우 약하며, 細胞内に starch의 함량이 매우 많아 실험 수행에 障礙가 매우 크기 때문으로 생각된다. 따라서 callus를 誘起하여 培養細胞에서 原形質體를 遊離시켜야만 한다. 細胞融合 方法중 제일 먼저 중요한 課題로 등장하는 것은 融合劑의 선택으로 動物과 微生物에서 polyethylene glycol(PEG)를 이용하여 細胞融合에 성공한 이래 1974년 Kao와 Michayluk<sup>8)</sup> 및 Wallin등<sup>21)</sup>이 植物原形質體의 融合에도 PEG의 사용이 좋은 結果

를 얻었음을 報告하여 1980년대 말까지 많은 研究者들이 PEG를 이용한 融合方法을 실시하여 왔다. 그러나 PEG는 그 자체가 融合劑 이외의 植物細胞에 독성으로 작용을 하므로 PEG의 사용이 하나의 문제로 대두되기 시작하였다. 原形質體 融合時 또다른 문제로 대두되는 것은 cell wall을 제거한 細胞膜이 구조상 電氣的으로 (-) charge를 띄게 되어 細胞融合의 前段階인 細胞間의 접촉을 방해한다<sup>14)</sup>. 이같은 이유는 細胞膜의 구성성분인 phospholipid의 phosphate가 때문이며, 성공적인 細胞融合을 위해서는 細胞膜의 (-) charge를 제거하여야만 된다. 그러기 위하여 fusion media에 100mM의 CaCl<sub>2</sub>를 添加하고 pH를 10.5정도로 하여 본 結果, 融合率을 크게 향상시키지는 못하고 PEG와 혼합 사용으로 다소 향상시킬 수는 있었으나 PEG의 독성은 계속 남아있게 되었으며, 0.5mg/ml의 phosphatase acid의 添加로 細胞膜의  $\zeta$ -potential을 약 40~50% 감소시킬 수 있었다<sup>14)</sup>. 그러나 이같은 방법이 細胞融合을 증대시키기는 하지만 細胞 自體에 生存率을 감소시키는 정도가 크게 나타나 바람직하지 못한 것으로 알려져 있다. 그래서 PEG의 독성을 해결하고 細胞膜의 電氣的 charge를 해결하기 위한 방법으로 1981년 Zimmermann과 Scheurich가 電氣場 下에서 原形質體가 성공적으로 融合함을 報告하여<sup>23)</sup> 현재까지 대부분의 研究者들 사이에 原形質體의 融合方法은 電氣融合方法을 의미하는 것으로 여겨지게까지 되었다<sup>1)</sup>. 細胞融合에 의한 遺傳因子 도입에서는 融合後에 融合細胞의 選抜이 또 하나의 큰 과제로 등장하게 되며 融合細胞의 選抜을 위하여 많은 研究者들은 selection marker가 있는 mutant cell을 fusion partner로 사용하여 heterokaryon을 성공적으로 選抜하고자 시도하고 있으나<sup>11,12,15,23)</sup> selection marker가 있는 mutant cell을 만드는 것 자체가 매우 어려운 과제의 하나로 등장하게 된다. 어렵게 선택된 mutant cell을 fusion partner로 사용하여 cell fusion을 하고 heterokaryon의 選抜을 성공적으로 이루었다 하더라도 選抜된 融合細胞는 有用 遺傳因子를 갖고

있는 細胞株가 아닌 단지 融合細胞의 選拔만을 위한 突然變異體에 불과한 것이다. 따라서 人工交配가 불가능한 種, 屬間에 有用形質을 갖고 있는 일반 細胞株를 대상으로, 또는 突然變異體라 할지라도 그 突然變異形質이 selection marker가 아니라 실제 有用形質을 나타내는 突然變異體와의 細胞融合에서도 heterokaryon의 選拔이 가능한 方法의 개발은 필수적이다. 그러기 위하여는 모든 植物細胞 자체가 근본적으로 갖고 있는 차이점을 selection marker로 이용하는 方法을 개발하여야만 한다. 따라서 細胞 개개의 buoyant density를 이용하는 方法을 모색할 수가 있겠다<sup>4,5)</sup>. 本 實驗은 人蔘 培養細胞에서 나출시킨 原形質體와 무우의 葉肉組織에서 나출시킨 原形質體間에 電氣衝擊에 의한 融合 및 각 原形質體들의 buoyant density 차이에 의해 融合細胞의 選拔에 관한 技術을 開發코자 遂行되었는 바, 그 結果를 이에 報告코자 하는 바이다.

## 第2節 材料 및 方法

### 1. 原形質體의 遊離

人蔘의 경우 뿌리에서 誘起시킨 callus를 MS液體培地(MS basal salts with vitamins, 30g/l sucrose, 3mg/l 2,4-D, pH ; 5.8)에서 1주일간 懸液배양한 培養細胞를 2% cellulase, 2% macerozyme, 2% driselase, 13% mannitol, pH 5.8인 酵素溶液에서, 무우의 경우 잎조직을 1% cellulase, 0.5% macerozyme, 13% mannitol, pH 5.8인 酵素溶液에서 각각 약 18시간 incubation시킨 후 21% sucrose용액에서 purification시켰다.

### 2. 原形質體의 融合

人蔘 培養細胞 및 무우 葉肉組織에서 裸出시킨 原形質體를 BTX의 Electro cell manipulator 401A로 電氣融合을 시켰다. 이때 原形質體을 일열로 배열(cell

alignment)시키기 위한 AC의 충격은 amplitude를 40으로 10초간 가했으며, 細胞의 compression을 위하여 AC의 amplitude를 50으로 2초간 충격을 주었다. 그후 細胞融融合을 위하여 DC 電氣場 下에서 amplitude를 20, 40, 60, 80, 100, 120으로, pulse width는 2, 10 $\mu$ sec.씩 電氣衝擊을 가했다.

### 3. 融合原形質體의 生存率

電氣衝擊으로 原形質體를 融合處理한 후 生存率의 調査는 fluoresein diacetate로 염색하여 Nikon fluorescent microscope로 B filter下에서 형광을 발하는 정도로 調査하였다.

### 4. 電氣場의 세기에 따른 原形質體의 融合率 調査

DC 電氣場 下에서 electric field strength의 변화에 따라 原形質體에 電氣衝擊을 가했을 때 原形質體의 融合率을 modified carbol fuchsin으로 핵염색하여 현미경 下에서 調査하였다.

### 5. Buoyant density 차이에 의한 原形質體의 分布

Table 2-1. Composition of the iso-osmotic(660mOs/kg · H<sub>2</sub>O) sucrose/mannitol density gradient solution.

D (kg/ℓ)	Mixing ratio	
	Sucrose	Mannitol
1.0379	0	10
1.0447	2	8
1.0514	4	6
1.0582	6	4
1.0650	8	2
1.0718	10	0

\* Mannitol : 660mOs/kg · H<sub>2</sub>O → 603.13mM → 1.0379kg/ℓ

\* Sucrose : 660mOs/kg · H<sub>2</sub>O → 545.96mM → 1.0718kg/ℓ

植物細胞는 品種 및 培養條件別로 細胞内 成分의 濃도차이에 따라 細胞 개개의 buoyant density의 차가 발생하며 이를 이용하여 Table 2-1과 같이 545.96mM의 sucrose와 603.13mM의 mannitol을 일정비율씩 혼합하여 specific density가 1.0379kg/l~1.0718kg/l이며 660mOs/kg·H<sub>2</sub>O의 iso-osmotic density gradient solution을 만들어 人蔘 培養細胞로부터 遊離시킨 原形質體 및 무우의 葉肉組織에서 유리시킨 原形質體를 buoyant density별로 분리시켰다.

#### 6. Buoyant density 차이에 의한 原形質體 融合 및 融合原形質體의 選拔

Table 2-1과 같이 545.96mM의 sucrose와 603.13mM의 mannitol을 一定比率씩 混合하여 specific density가 1.0379kg/l, 1.0447kg/l, 1.0514kg/l, 1.0582kg/l, 1.0650kg/l, 1.0718kg/l 중에서 1.0650kg/l 上層部の 무우 mesophyll 原形質體와 1.0514kg/l 上層部の 무우 mesophyll 原形質體 電氣融合後 다시 specific density가 1.0379kg/l~1.0718kg/l이며 660mOs/kg·H<sub>2</sub>O의 iso-osmotic density gradient centrifugation에 의하여 중간층에서 融合原形質體를 選拔하였다.

### 第3節 結果 및 考察

#### 1. 人蔘原形質體의 裸出 및 培養

植物細胞膜의 構成成分은 品種 및 培養條件에 따라 약간씩 차이가 있는고로 이들 構成成分에 對應하는 分解酵素의 濃度에도 차이가 있을 것이다. 人蔘根細胞에서 原形質體를 裸出시키기 위한 條件은 macerozyme 0.5%, cellulase 2%, mannitol 0.9M 그리고 pH 5.2에서 7~8시간 處理한 것이 原形質體 裸出率이 가장 높았으나 人蔘뿌리에서 나출시킨 원형질체는 세포막이 매우 약하여 실험도중에 파괴되는 것이 많아 바람직하지 못하여 人蔘 callus에서 原形質體를 나출시켰다. 人蔘 培養細胞도 일반적인 培養細胞와 같이 2% cellulase, 2%

macerozyme, 2% driselase, 0.7M mannitol 溶液에서 over night시켰을 때 실험에 충분한 양의 原形質體를 획득할 수 있었다.

人蔘 callus로부터 裸出된 原形質體의 培養 初期 樣相을 觀察하였던 바 培養 1일후에는 原形質體의 크기가 약간 膨脹되면서 얇고 透明한 原形質膜의 돌기가 생겼으며 培養후 40時間에는 일부 分裂細胞를 觀察할 수 있었는데 細胞分裂 樣相을 보면 不均等分裂이 混在하였다. 그러나 대부분의 原形質體들은 細胞 膨脹壓力에 의해 돌기가 培地 表面으로 噴出되어 얇게 펼쳐졌다. 이때는 각기 투명하고 細胞膜이 형성되지 않아서 약간의 物理的 刺戟(水分乾燥, 調査를 위한 操作)에 의하여 쉽게 과열되어 다른 調査가 불가능하였고, 이때 FDA와 fluorescent brighter 28을 이용한 染色은 많은 細胞破裂을 誘發하였는 바<sup>22)</sup>, 이는 細胞膜이 形成되기 전에 細胞膨脹 壓力에 의해 培地위로 밀려났기 때문인 것으로 생각된다. 表面에 넓게 置床된 細胞는 이어 2~3일이 經過되면 細胞内容物과 核이 形成되어 완전한 細胞로 자라게 되며 이때문에 細胞 核分裂도 旺盛해져서 2개 核이 한 細胞에 있는 것도 발견되었다. 培養 3주후에는 細胞들이 완전히 aggregation되어 왕성하게 증식되었는데, 人蔘 原形質體의 이러한 生育樣相은 培地表面에 횡적으로 증식하여 細胞間에 서로 접하게 되어 單細胞 由來 cell colony의 획득이 대단히 어려웠다. 細胞의 증식을 보면 agarose내에 묻혀 있는 細胞는 細胞膨脹만 이루어지고 分열은 되지 않았다.

人蔘 原形質體 培養時 細胞膜 재생이 늦기 때문에 이를 보완하기 위하여 kinetin을 1ppm 添加한 것과 添加하지 않은 培養液으로 原形質體를 培養했던 結果 모든 接種區에서 cell colony를 얻을 수 있었으며, osmoticum을 sucrose 單獨 또는 mannitol과 併用 添加하였을 때에도 處理區 모두 cell colony를 形成하였는데(Table 2-2), 人蔘 原形質體 培養時에 mannitol 대신 sucrose를 사용 하므로서 mannitol 희석과정에 따른 원형질체의 과열을 방지할 수 있었다.

Table 2-2. Effect of osmoticum and kinetin on the formation of colony from the ginseng protoplasts.

Protoplast culture medium	Concentration of kinetin(ppm)	Rate of Colony formation(%)
MS + 3 ppm 2,4-D	0	100
+ 0.2M sucrose	1	100
MS + 3 ppm 2,4-D + 0.13M sucrose	0	100
+ 0.2M mannitol	1	100

## 2. 電氣衝擊에 의한 原形質體 融合

효소용액에 의해 細胞壁이 제거된 植物原形質體의 細胞膜은 phospholipid의 2중구조로 구성되어 있으며 細胞 전체의 電氣的 charge는 (0)이지만 외부에 phosphate기가 있어 細胞外膜의 電氣的 charge는 (-)를 띠게 된다<sup>14)</sup>. 따라서 PEG와 같은 화학제를 이용한 細胞融合에서는 細胞膜의 (-) charge를 제거하기 위하여  $Ca^{++}$ 을 添加한다<sup>14)</sup>. 그러나 電氣衝擊에 의한 原形質體融合의 경우  $Ca^{++}$ 의 添加없이도 2개의 electrode사이의 原形質體는 電氣的으로 서로 끌어당기게 되어 人蔘原形質體의 融合時 AC電氣場 下에서 pearl chain을 이루게 되며<sup>1,10,19)</sup> 人蔘과 무우 原形質體를 材料로 한 本 實驗에서도 AC 電氣場에서 pearl chain이 形成되는 것을 觀察할 수 있었으며(Photo. 2-1 A), 시간이 경과함에 따라 原形質體間의 融合이 서서히 이루어 졌는가 하면(Photo. 2-1 B~E), DC電氣衝擊 60초後에 完全 融合되었으며(Photo. 2-1 F), 또한 電氣衝擊에 의하여 原形質體들은 2~3개씩 融合되는 것을 觀察할 수 있었다(Photo. 2-2).

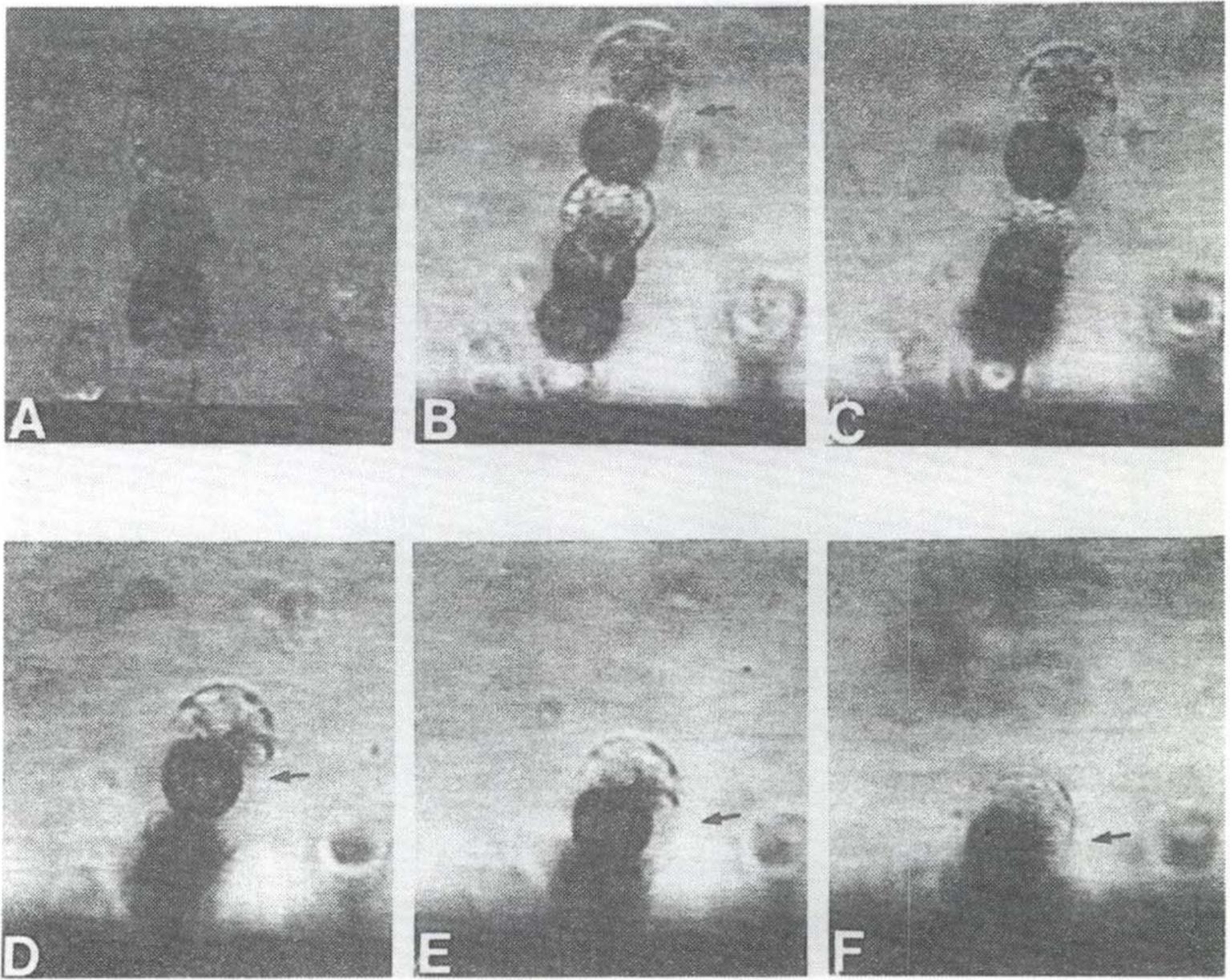


Photo. 2-1. Electrically-induced fusion between ginseng and radish protoplasts. Micrographs show the time course of fusion 0 second(A), 10 seconds(B), 20 seconds(C), 30 seconds(D), 50 seconds(E) and 60 seconds(F) after application of the breakdown pulse.

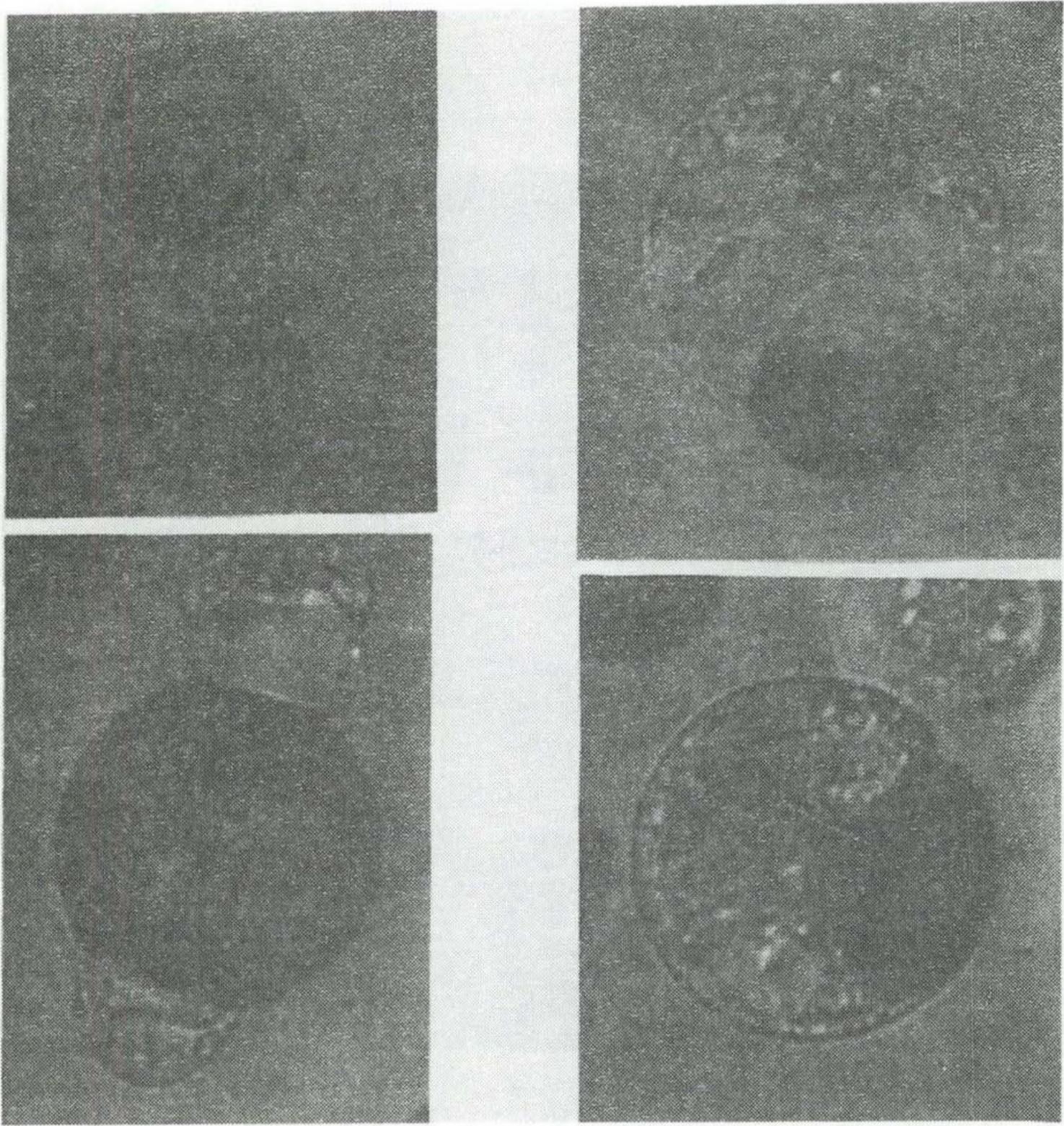


Photo. 2-2. Various shape of electro-fused protoplasts between ginseng callus and radish mesophyll.

### 3. 裸出 原形質體의 生存率에 미치는 electric field strength의 影響

植物原形質體 融合時 融合率을 높이기 위하여 여러 종류의 fusion facilitator 들의 添加를 생각해 볼 수가 있겠으며, 이들 fusion facilitator들은 原形質體 細胞膜의 구조 및 구성성분에 따라 선택할 수가 있다. 일반적으로 植物原形質體 細胞膜의 경우 구성성분이 주로 phosphatidyl choline으로 이루어졌으며 原形質體의 바깥쪽이 (-) charge를 띄고 있다<sup>1)</sup>. 原形質體의 (-) charge를 제거하는 方法으로 본 실험에서는 細胞膜의 구성성분으로 이루어져 있는 phospholipid의 phosphate기에 작용하는 acid phosphatase를 添加하므로써 (-) charge를 제거하는 方法<sup>14)</sup>과 spermine과 spermidine같은 polyamines을 添加하는 方法<sup>2)</sup>으로 (+) charge를 더해 주어 (-) charge를 제거하는 두가지 方法을 시도하여 보았다. 먼저 fusion media에 0.5mg/ml acid phosphatase와 1mM polyamines(spermine, spermidine)을 13% mannitol액에 添加하고 AC電氣場에서 amplitude를 40에서 10초간 alignment시키고, 다시 50에서 2초간 compression시킨후 DC電氣場에서 amplitude를 20, 40, 60, 80, 120으로 각각 2, 10μsec.씩 외부 電氣衝擊을 가했을 때 人蔘原形質體가 받는 damage를 調査해 보았다. 電氣場 強度가 증가할수록 裸出原形質體가 받는 damage는 크게 나타났으며, 電氣衝擊을 주는 시간이 길수록 damage도 크게 나타났다. 그러나 fusion media의 성분이 13% mannitol만 존재할 경우에는 電氣場의 強度가 증가할수록 生存率이 서서히 감소하였으나(Fig. 2-1 A), 1mM spermidine, spermine 및 0.5mg/ml acid phosphatase를 添加하였을 경우에는 약 1.5kv/cm이상에서 生存率이 급격히 감소하였다(Fig. 2-1 B, C, D). 電氣場下에서 植物細胞의 變化에 관한 研究는 1981년 Zimmermann과 Scheurich가 電氣場 下에서 原形質體가 성공적으로 融合함을 報告<sup>23)</sup>한 이래 매우 많은 연구가 이루어졌으며 특히 1986년 Saunders등<sup>19)</sup>은 담배 原形質體의 生存率에 미치는 電氣融合의 諸般 要素들에 관한 研究에서 電氣場

의 세기는 약 1kv/cm이고 시간은 10~30 $\mu$ sec.이 적당하다고 하였으며, 또한 Electroporation에 의해 外部에서 RNA를 插入시킬 때는 2.5kv/cm 이상에서는 生存率이 減少한다고 報告<sup>17)</sup>하고 있어 植物種에 따라 다소 차이는 있겠으나 人蔘의 경우에도 1kv/cm가 原形質體 生存率에 가장 적당한 電氣場의 세기라 思料된다.

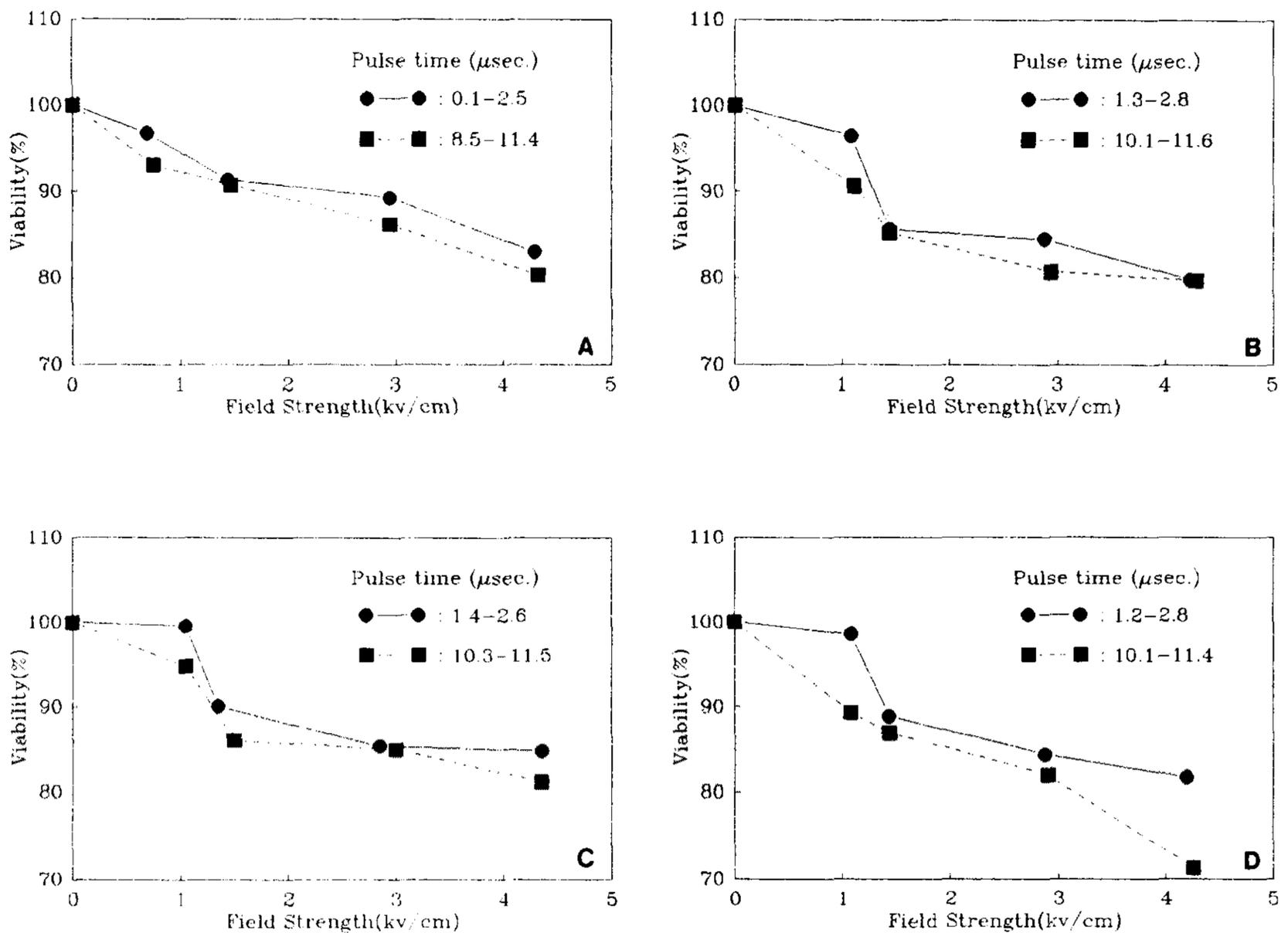


Fig. 2-1. The effect of DC electric field strength on the viability of ginseng protoplast in 13% mannitol solution(A), with 0.5mg/l acid phosphatase(B), with 1mM spermine(C) and 1mM spermidine(D).

#### 4. 電氣融合時 電氣場의 세기가 原形質體의 融合率에 미치는 影響

裸出된 人蔘原形質體와 無우 原形質體를 13% mannitol액에 混合한 후 電氣融合을 실시하면 AC電氣場에서 Photo. 2-1(A)와 같이 cell alignment가 일어난 후에 DC電氣場에서 電氣衝擊을 가하여 細胞融合이 順서적으로 일어나게 된다(Photo. 2-1 B~F). 본 실험에서는 融合율을 精確히 조사하기 위하여 하나의 細胞속에 2개 이상의 核이 존재하는 것을 carbol fuchsin으로 核染色하여 관찰하였다. 이때 電氣場의 세기나 fusion facilitator의 影響을 조사하여 본 결과 fusion media가 13% mannitol 단독인 경우 電氣衝擊을 가하지 않은 自然融合이 1.79% 이루어졌으며 DC 電氣場의 세기가 1kv/cm에서 17.74%로 融合率이 증가하여 3kv/cm까지는 完滿히 증가하다 그 이상에서는 다시 감소하는 傾向이었다(Fig. 2-2 A). 그러나 fusion facilitator의 添加 media에서는 電氣衝擊을 주지 않은 自然融合率은 0.5mg/ml acid phosphatase의 경우는 8.73% (Fig. 2-2 B), 1mM spermine 添加의 경우 24.49% (Fig. 2-2 C), 1mM spermidine은 17.14% (Fig. 2-2 D)로 나타나 spermine添加 media의 경우 自然融合率이 가장 높았다. 그러나 電氣場의 세기를 증가시켜 본 결과 polyamines를 添加한 경우에는 電氣場의 세기가 1kv/cm 전후에서 가장 融合率이 높았으며(Fig. 2-2 C, D), acid phosphatase 添加 media에서는 3kv/cm 부근에서 融合率이 높았다 (Fig. 2-2 B). 한편 原形質體의 融合에서 실제로 요구되어지는 것은 살아있는 融合細胞로 DC電氣場에서 電氣場의 세기에 따른 살아있는 融合細胞의 形成을 fusion facilitator 種類별로 調査해 본 결과 그 效果는 細胞膜에 (+)기를 添加해주는 spermine과 spermidine의 경우에는 電氣場의 세기가 1kv/cm 전후에서 가장 높았으며, 細胞膜의 phosphate를 제거하는 acid phosphatase의 添加는 無添加에 비해 큰 效果가 없었다(Fig. 2-3). Chapel등<sup>2)</sup>은 electrofusion에 의해 原形質體를 融合할 때 fusion media에 0.5mM 간격으로 spermine을 添加해 본 결과 0.5mM~1mM 사이에서 融合率이 가장 높았으며, 無添加 때와 비교하여 약 20% 증가하였는데 본 실험에서도 電氣場의 세기가 낮을 때는 1

mM spermine을 添加함으로써 融合率이 상당히 증가됨을 알 수 있었으며 電氣場의 세기가 클수록 그 효과는 적었다. Polyamines의 添加는 Ruzin과 McCarthy<sup>16)</sup>의 실험에서는 無添加와 비교해서 비슷하거나 다소 감소하는 것으로 나타나 본 실험과는 다른 경향이었으나, 이는 pulse width 및 number of pulse 等の 電氣的 衝擊方法 差異로 서로 다른 研究結果가 나온 것으로 생각된다. 그리고 融合率 및 生存率에 대한 acid phosphatase의 효과에 대한 實驗報告는 아직 없는 상태이며 단지 cell membrane의  $\zeta$ -potential은 cell membrane의 구성요소

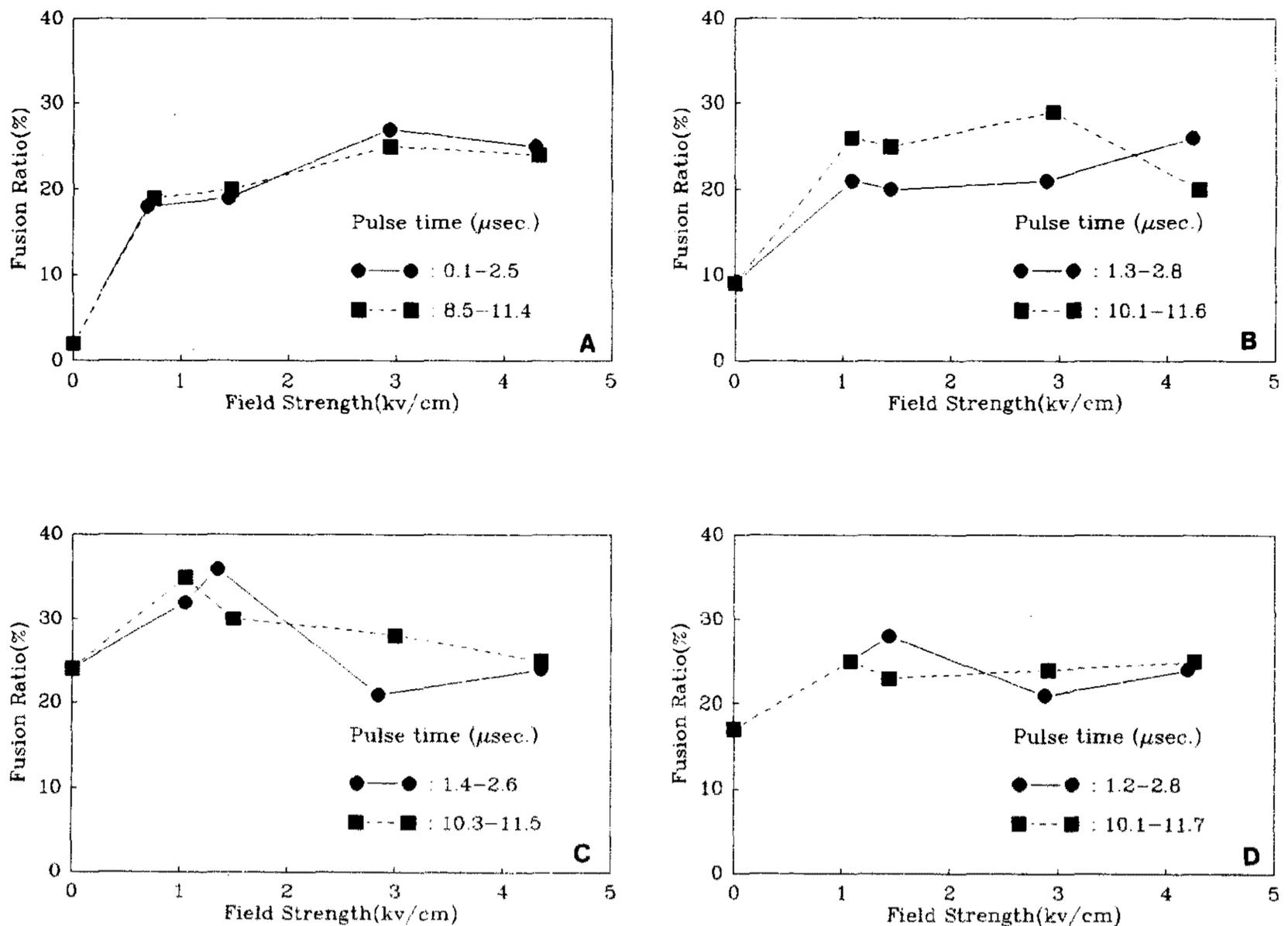


Fig. 2-2. The effect of DC electric field strength on the frequency of electrofusion of ginseng protoplasts in 13% mannitol solution(A), with 0.5mg/l acid phosphatase(B), with 1mM spermine(C) and 1mM spermidine(D).

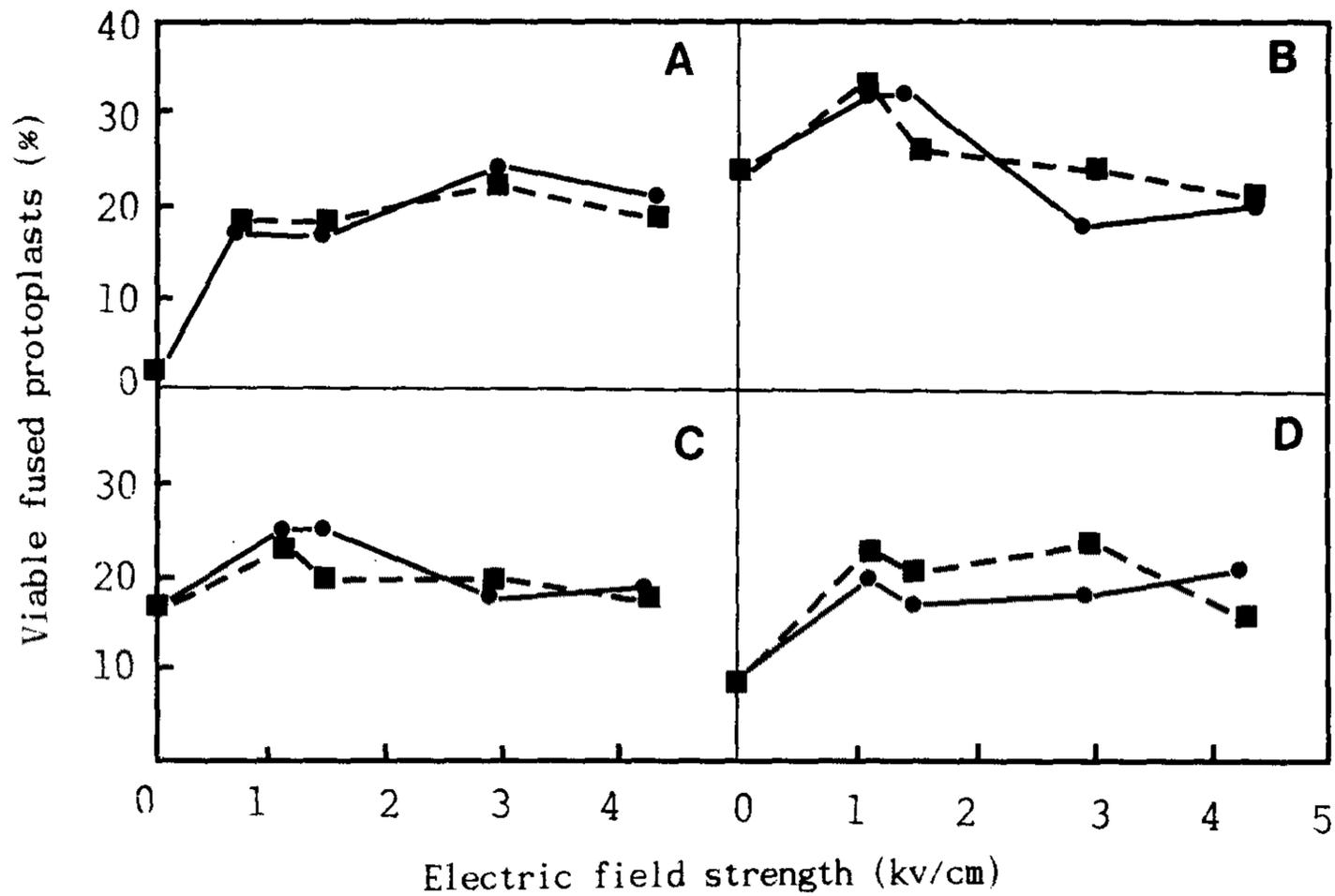


Fig. 2-3. The effects of field strength and fusion facilitators on the frequency of viable fused protoplasts. A : 13% mannitol, B : 1mM spermine, C : 1mM spermidine, D : 0.5mg/ml acid phosphatase.  
 ●—● : 0.1~2.8μsec., ■—■ : 8.5~11.7μsec.

인 phospholipid의 phosphate side chain에서 유래되는 것으로 acid phosphatase의 添加로 ζ-potential을 줄일 수 있기 때문에<sup>14)</sup> acid phosphatase를 添加하여 본 것이었으나 融合率의 증가효과를 기대할 수는 없었다.

##### 5. 人蔘 및 무우 原形質體의 buoyant density分布

細胞融合에 의한 遺傳因子 導入에서는 融合後에 融合細胞의 選抜이 또 하나의 큰 課題로 登場하게 되며 融合細胞의 選抜을 위하여는 selection marker가 있는 cell을 fusion partner로 사용하여 heterokaryon을 選抜하여야 한다. 그러나 selection marker가 있는 cell을 獲得하는 것이 용이한 일이 아니며, 따라서 모든 植物細胞 자체가 근본적으로 갖고 있는 차이점을 selection marker로 이

용하는 方法<sup>45)</sup>을 모색하고자 모든 細胞가 갖고 있는 특성인 細胞의 buoyant density 차이를 이용하는 方法을 모색하여 보았다. 따라서 植物細胞가 갖고 있는 buoyant density를 이용한 gradient centrifuge를 시도하여 본 結果 人蔘 培養細胞 및 무우 葉肉細胞의 buoyant density는 Table 2-3과 같이 나타났다. 人蔘 callus 組織에서 裸出시킨 原形質體의 buoyant density를 보면 density gradient가 1.0447~1.0717kg/ℓ에 대부분 分布되어 있으며 1.065~1.0718kg/ℓ에 위치한 細胞數가 40%로서 가장 많았고, 무우 葉肉細胞의 경우 1.0379~1.0718 kg/ℓ에 대부분 分포하고 있어, 人蔘 callus組織과 같이 1.065~1.0718kg/ℓ에서 가장 많이 分포하였다. 이와같이 buoyant density gradient에 의한 세포들의 分布는 一般的으로 葉肉細胞가 培養細胞보다 무겁게 나타나고 있으며 이는 葉肉細胞들에 chloroplast나 starch granule이 많이 包含되어 있기 때문이며 栽培條件이나 培養條件에 따라서도 약간의 차이가 생길 수 있다.

Table 2-3. Distribution profile of protoplasts isolated from ginseng callus and radish mesophyll tissues in various sucrose and mannitol density gradients.

Density gradient	Ginseng callus	Radish mesophyll
1.0379-1.0047		$8.7 \times 10^5$ ( 8.08)
1.0447-1.0514	$9.5 \times 10^5$ (16.52)*	$1.9 \times 10^6$ (17.64)
1.0514-1.0582	$1.1 \times 10^6$ (19.13)	$2.0 \times 10^6$ (18.57)
1.0582-1.0650	$1.4 \times 10^6$ (24.35)	$2.2 \times 10^6$ (20.43)
1.0650-1.0718	$2.3 \times 10^6$ (40.00)	$3.8 \times 10^6$ (35.28)
over 1.0718	debris	debris

Figures in parentheses are per cent.

## 6. 人蔘과 무우의 融合原形質體 選拔

人蔘 培養細胞와 무우 葉肉細胞에서 나출시킨 原形質體의 buoyant density차이에 의해 融合原形質體를 選拔하고자 buoyant density가 1.0447kg/l~1.0514kg/l인 人蔘培養細胞의 原形質體와 1.0582kg/l~1.0650kg/l인 무우 葉肉細胞의 原形質體間 그리고 buoyant density가 1.0514kg/l~1.0582kg/l인 무우 葉肉細胞의 原形質體와 1.0650kg/l~1.0718kg/l인 人蔘培養細胞의 原形質體間에 각각 電氣融合을 실시한 후 다시 specific density가 1.0447kg/l~1.0718kg/l의 gradient centrifugation하였던 바, 각각의 中間層에서 融合細胞가 위치하는 것을 發見할 수 있었다(Photo. 2-4). 대부분의 實驗에서 細胞融合後 融合細胞의 選拔은 fu-

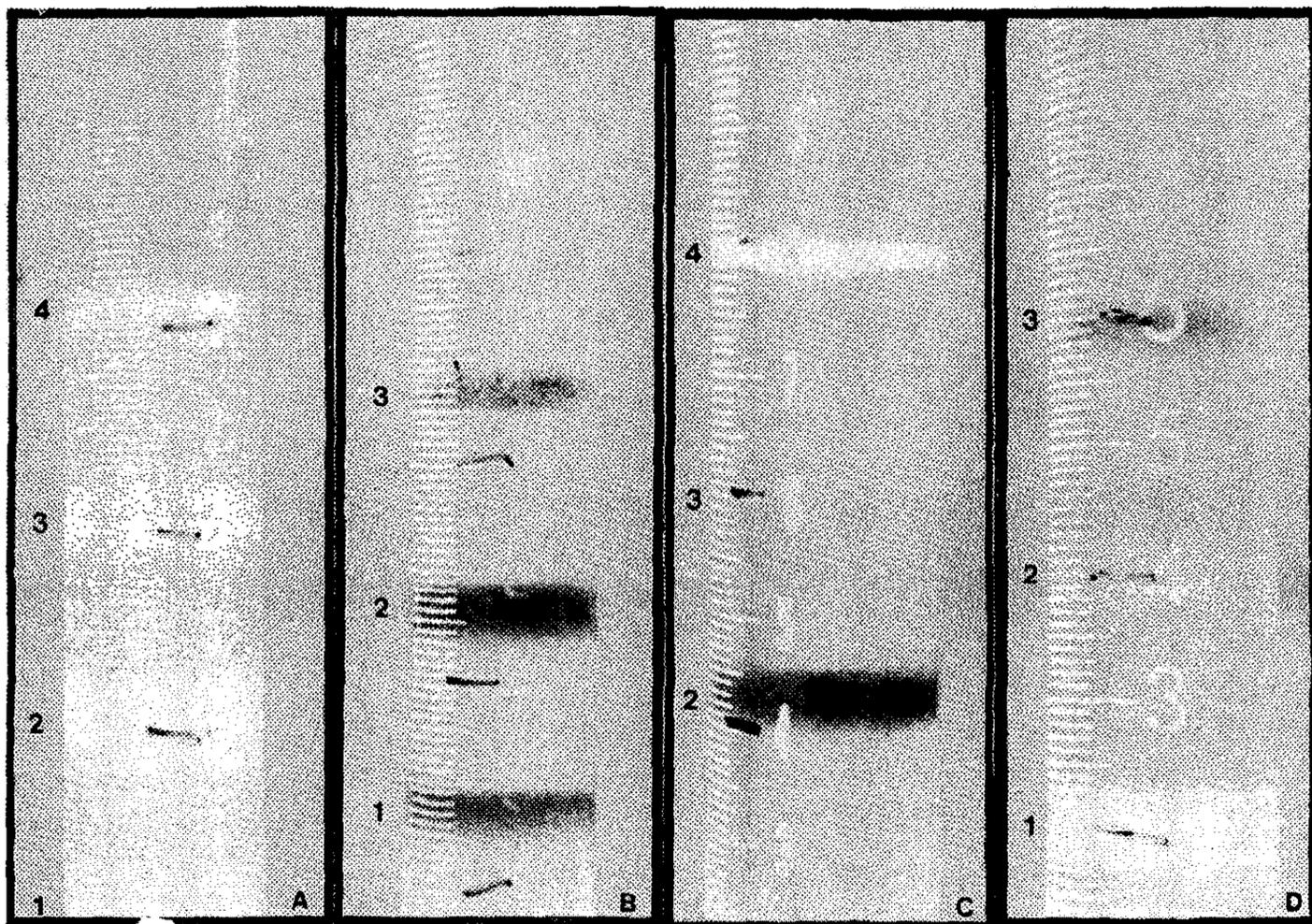


Photo. 2-4. Protoplasts from ginseng callus(A) and radish mesophyll(B) tissues in various interface fractions formed by sucrose and mannitol density gradient centrifugation. Most heterokaryons were formed in intermediate density gradient(C-3, D-2). 1 : 1.0659~1.0718kg/l, 2 : 1.0582~1.0650kg/l, 3 : 1.0514~1.0582kg/l, 4 : 1.0447~1.0514kg/l

sion partner를 融合前에 選拔可能한 突然變異體를 이용한 것이 거의 전부였으며 buoyant density를 이용한 선발은 1978년 Harms와 Potrykus가 밀의 어린잎과 옥수수의 줄기 組織에서 裸出시킨 原形質體間 buoyant density의 分布를 調査하여 본 結果 옥수수의 줄기 組織이 밀의 葉肉組織보다 가벼운 것을 알고 두 原形質體間을 PEG를 이용하여 細胞融合을 實施한 後 density gradient centrifugation에 의해 中間層에서 異形接合體가 좀더 많이 분포하고 있음을 기대하고 다시 從來의 突然變異體가 갖는 selection marker를 이용해 좀더 쉽게 選拔해 보고자 한 것이지 一般 植物細胞 自體가 根本적으로 갖고 있는 特性을 이용한 방법은 아니라 할 수 있겠다.

#### 第4節 結 論

原形質體 融合技法을 이용하여 神祕의 靈藥인 人蔘의 새로운 品種을 育成하기 위한 研究의 일환으로 우선 電氣衝擊에 의한 原形質體融合을 시도하였던 바, 그 結果는 다음과 같았다.

1. 裸出原形質體는 培養 40時間後부터는 細胞分裂이 시작되었으며, 培養 3週後에는 細胞群들이 形成되었다.
2. DC 電氣場에서 人蔘原形質體의 生存率은 電氣場의 세기에 따라 전반적으로 감소하였다.
3. 電氣場의 세기에 따른 人蔘原形質體의 融合率은 1kv/cm부근에선 가장 融合率이 높았으며, fusion facilitator로는 1mM spermin의 添加가 가장 좋았다.
4. 人蔘原形質體 및 무우원형질체의 buoyant density는  $1.0447\text{kg}/\ell \sim 1.0718\text{kg}/\ell$  사이에 고루 분포하고 있어 gradient centrifugation에 의해 heterokaryons의 選拔이 가능하였다.

5. 人蔘 培養細胞와 무우 엽육세포에서 遊離시킨 原形質體를 電氣衝擊을 가해 본 結果 AC 電氣場에서 이웃하는 細胞끼리 서로 pearl chain을 이루며 DC충격에 의해 60초후 細胞膜의 融合이 이루어졌다.

## 參 考 文 獻

1. Bates, G.W., J.A. Saunders and A.E. Sowers. 1987. Electrofusion Principles and Applications. In : Cell Fusion A.E. Sowers ed. Plenum Press, NY. 367-395.
2. Chapel, M., J. Teissie and G. Aliber. 1984. Electrofusion of spermine-treated plant protoplasts. FEBS. 17 : 331-336.
3. Cocking, E.C. 1960. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. Nature 187 : 962-963.
4. Harms, C.T. and I. Potrykus. 1978. Fractionation of plant protoplast types by iso-osmotic density gradient centrifugation. Theor. Appl. Genet. 3 : 57-63.
5. Harms, C.T. and I. Potrykus. 1978. Enrichment for heterokaryocytes by use of iso-osmotic density gradients after plant protoplast fusion. Theor. Appl. Genet. 53 : 49-55.
6. Hong, K., F. Schuber and D. Papahadjopoulos. 1983. Polyamines, Biological modulators of membrane fusion. Bioch. Biophys. Acta. 732-469-472.
7. Kao, K.N. 1977. Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soybean-Nicotiana glauca. Molec. gen. Genet. 150-225-230.
8. Kao, K.N. and M.R. Michayluk. 1974. A method for high-frequency inter-

- generic fusion of plant protoplasts. *Planta* 11 : 355–367.
9. Kao, K.N., F. Constabel, M.R. Michayluk and O.L. Gamborg. 1974. Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells. *Planta* 120 : 215–227.
  10. Kuta, A.E., R.S. Rhine and G.M. Heebner 1985. Electrofusion : A new tool for biotechnology. *American Biotech. Lab.* 3(3) : 31–37.
  11. Melchers, G. and G. Labib. 1974. Somatic hybridization of plants by fusion of protoplasts. I. Selection of light resistant hybrids of “haploid” light sensitive varieties of tobacco. *Theor. Appl. Genet.* 59 : 191–195.
  12. Menczel, L., F. Nagy, Z. Kiss and P. Maliga, 1981. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* + *N. knightiana* : Correlation of resistance to *N. tabacum* plastids. *Theor. Appl. Genet.* 59 : 191–195.
  13. Nagata, T. and I. Takebe. 1971. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta* 99 : 12–20.
  14. Nagata, T. and G. Melchers. 1978. Surface charge of protoplasts and their significance in cell-cell interaction. *Plant.* 142–235–238.
  15. Nehls, R. 1978. The use of metabolic inhibitors for the selection of fusion products of higher plant protoplasts. *Molec. gen. Genet.* 166 : 117–118.
  16. Ruzin, S.E. and S.C. McCarthy. 1986. The effect of chemical facilitators on the frequency of electrofusion of tobacco mesophyll protoplast. *Plant Cell Reports* 5 : 342–345.

17. Saunders, J.A., C.R. Smith. and J.M. Kapper. 1989. Effect of electroporation profiles in the incorporation of viral RNA into tobacco protoplasts. Submitted to Plant Physiology.
18. Sauders, J.A. 1985. Electrically induced fusion of cells and protoplasts. Frontiers of Membrane Research in Agriculture. Beltsville Symposium 9. NJ. 147–156.
19. Sauders, J.A., L.A. Roskos, S. Mischke, M.A.M.Aly and L.D.Owens. 1986. Behavior and viability of tobacco protoplasts in response to electrofusion parameters. Plant Physiol. 80 : 117–121.
20. Schuber, F., K. Hong, N. Duzgunes, and D. Parahadjopoulos. 1983. Polyamines as modulators of membrane fusion : Aggregation and fusion of liposomes. Biochemistry. 2 : 6134–6140.
21. Wallin, A., Glimelius and T. Eriksson. 1974. The induction of aggregation and fusion of *Daucus carota* protoplasts by polyethylene glycol. Z. Pflanzenphysiol. 74 : 64–80.
22. White, D. and I.K. Vasil. 1979. Use of amino acid analogue-resistant cell lines for selection of *Nicotiana sylvestris* somatic hybrids. Theor. Appl. Genet. 55 : 107–112.
23. Widholm, J.M., 1972. The use of fluorescein diacetate and Phenosafranine for determining viability of culture cells, Stain Technology, 47(4) : 189–194.
24. Zimmermann, U. and P. Scheurich. 1981. High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. Planta 151 : 26–32.

## 第3章 人蔘의 體細胞胚 形成과 관련물질대사

### 第1節 序 說

최근 조직배양기술이 식물체의 대량증식에 이용됨으로써 배양세포로부터 유전적으로 균일한 體細胞胚가 단기간에 대량으로 생산될 수 있게 되었다.

그러나 인삼에서는 배양 후 7-8개월이 지난 다음에야 褐變된 세포로부터 體細胞胚가 발생되기 때문에, 體細胞胚를 이용한 인삼의 단기 대량증식을 실현시키기 위해서는 體細胞胚가 발생되기까지의 배양기간을 단축시킬 수 있는 방법이 강구되어야 하겠다.

植物은 種에 따라 배양세포의 재분화능이 다르며<sup>12</sup>, 또한 배양조직의 분화 정도에 따라 재분화능에 차이가 있다<sup>13</sup>, 본 연구는 이같은 현상의 원인에 대한 일련의 가정으로부터 시작되었다. 즉 재분화능의 차이는 재분화를 유기시키는 물질의 많고 적음에 기인될 수 있으며, 種이나 部位에 따라 재분화능이 달리 나타나는 것은 이같은 유기물질의 증가속도에 차이가 있기 때문일 것이라는 점 등이 그것이다.

본 연구는 2次年度에 遂行한 것으로서, 배양중인 인삼세포로부터 體細胞胚가 발생하는 과정에서 意味가 있다고 생각되는 주요 代謝物質의 經時的인 함량변화를 추적하고 이로부터 體細胞胚 발생을 억제 또는 촉진시키는 요인을 찾고자 하였으며, 궁극적으로는 體細胞胚 발생에 소요되는 기간을 단축하여 조직배양을 이용한 인삼의 短期 大量増殖을 실용화하는데 이바지하고자 하였는바, 2次年度의 연구결과를 요약하여 이에 종합 보고하는 바이다.

## 第2節 材料 및 方法

### 1. 人蔘의 세포배양

#### 가. 體細胞胚 발생조건

Murashige-Skoog(MS) 기본배지에<sup>12)</sup> 2, 4-D 0, 0.5, 1, 2mg/l씩, sucrose를 1, 3, 5, 7%씩 조합하여 첨가한 고체배지를 100ml의 삼각 flask에 35ml씩 분주한 후 인삼 캘러스를 500mg씩 접종하였으며 접종후 1개월 간격 으로 體細胞胚의 발생을 관찰·조사하였다.

#### 나. 배양시기별 세포배양

MS 기본배지에 1.1mg/l의 2, 4-D와 5%의 sucrose를 첨가한 고체배지를 100ml의 삼각 flask에 35ml씩 분주한 후, 인삼 캘러스를 500mg씩 접종 하여 배양시기별로 캘러스생장량, 내용성분의 함량등을 조사하였다.

#### 다. 體細胞胚 발생 및 성장량 조사

캘러스의 표면에 발생한 體細胞胚의 표면적을 조사하여 캘러스 표면적에 대한 비율을 측정하여 體細胞胚 발생정도로 하였으며, flask當 캘러스 무게를 측정하여 생체중과 건물중을 조사하였고 수확 후 냉동건조하여 분석시료로 사용하였다.

### 2. 대사산물 함량분석

#### 가. 단백질 및 유리아미노산

단백질 정량은 Lowry방법<sup>9)</sup>을 사용하였으며, 유리아미노산 함량은 ninhydrin 발색법<sup>17)</sup>을 이용하여 측정하였다.

#### 나. 지질, 전분, 페놀 및 안토시아닌

##### 1) 지질(lipids)

건조시료 1g에 diethylether를 가한 후 40°C에서 24시간 추출하였으며, 농축

된 지질을 Folch의 방법<sup>5)</sup>에 따라 정제 분리하여 copper reagent를 이용한 colorimeter법<sup>4)</sup>으로 정량하였다.

## 2) 전분(starch)

건조시료 0.5g에 증류수를 가한 후 100°C에서 호화시킨 다음 30% perchloric acid로 전분을 추출하였다. 추출된 전분을 phenol-sulfuric acid으로 발색시켜 520nm에서 흡광도를 측정하였다<sup>16)</sup>.

## 3) 페놀성분(phenolic compound)

건조시료 0.5g에 80% methanol을 가한 후 80°C에서 추출하고 diethylether, 5% NaOH, ethyl acetate로 차례로 분획하여 페놀성분을 정제하였다. 정제된 페놀성분을 Folin-Ciocalteu법으로 발색시켜 750nm에서 흡광도를 측정하였다<sup>6)</sup>.

## 4) 사포닌(saponin compound)

건조시료 0.5g에 80% methanol을 가한 후 80°C에서 추출하여 diethylether, chloroform, 1-butanol로 차례로 분획하여 사포닌 성분을 정제하였다. 정제된 사포닌 성분을 vanilline-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>법으로 발색시켜 545nm에서 흡광도를 측정하였다<sup>7)</sup>.

## 5) 안토시아닌(anthocyanin)

건조시료 0.5g을 5ml의 0.1% HCl/methanol에 침지하여, 4°C의 암소에서 24시간 색소를 추출하여 536nm에서 흡광도를 측정하였다<sup>14)</sup>.

$$\text{mg anthocyanin/g fresh weight} = A/E \times \text{dilution factor} \times 10/W$$

A : absorbance    E : extinction coefficient    W : sample weight

## 다. 호흡량과 에틸렌가스

MS 기본배지에 3% sucrose를 첨가하여 19×48mm vial에 5ml씩 분주한 후, 200mg의 캘러스를 접종하여 25°C에서 배양하였다. 배양 5일후 배양병의 입구를 막고 24시간이 경과한 다음 1ml의 head gas를 채취하여 gas분석을 하였다.

에틸렌가스는 gas chromatography를 이용하여 분석하였으며<sup>11)</sup>, 탄산가스는 CO<sub>2</sub> gas analyzer를 이용하여 분석하였다<sup>9)</sup>.

#### 라. 환원물질 및 과산화지질

##### 1) 환원물질(reductant)

건조시료 100g에 10ml의 증류수를 가한 후 마쇄하여 12,000×g에서 15분간 원심분리하고 상층액을 시료원으로 하였다. 상층액 1ml와 동량의 ferric chloride-potassium ferricyanide용액을 첨가하여 30°C에서 1시간동안 반응 시킨 후에 760nm에서 흡광도를 측정하였다<sup>18)</sup>.

##### 2) 과산화지질(lipid peroxide)

건조시료 100mg에 chloroform을 가한 후 40°C에서 추출하였다. 지질이 용출되어 있는 chloroform용액 0.1ml와 ethanol 5ml, 1M HCl 0.2ml 및 1% ammonium ferrous sulfate 0.1ml를 혼합하여 30초간 반응시킨 후, 20% ammonium thiocyanate 1ml를 첨가하여 3분이 지난 다음 480nm에서 흡광도를 측정하였다<sup>15)</sup>.

### 第3節 結果 및 考察

#### 1. 體細胞胚의 발생조건

體細胞胚가 발생하는데 적합한 배양조건을 알아보려고 MS배지에 sucrose와 2, 4-D를 농도별로 처리한 고체배양기에 인삼캘러스를 접종하여 體細胞胚의 발생을 조사하였다.

Sucrose의 효과를 보면, 1% sucrose 添加區에서는 體細胞胚 發生이 관찰되지 않았으나 3% 添加區에서는 發生되었고, 5% 處理區에서 最大를 보이다 7% 處理區에서는 다소 減少하였다(Fig. 3-1). 콩에서는 6% 이상 sucrose 添加된 培養基에서 體細胞胚 發生이 良好한 것<sup>4)</sup>에 비해, 人蔘의 경우는 5% 處理區에서

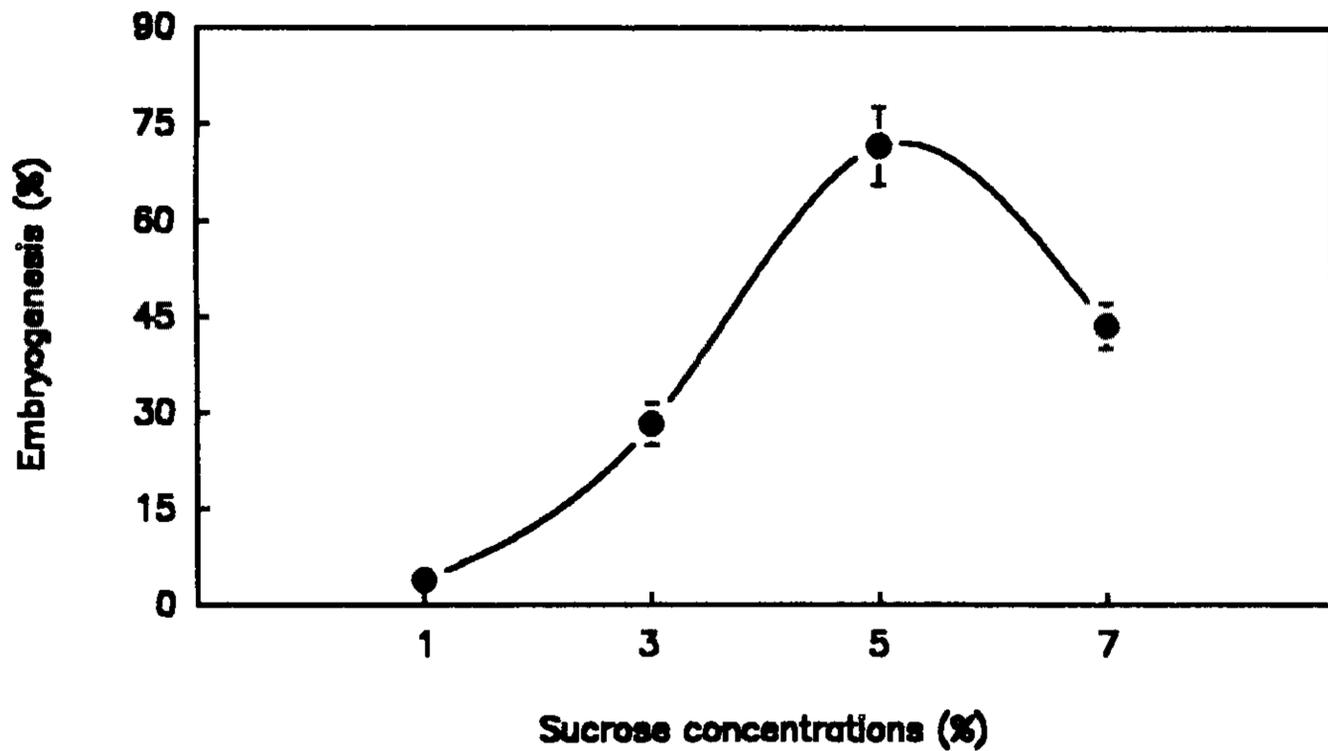


Fig. 3-1. Effect of sucrose on somatic embryogenesis in callus cultures of ginseng. Culture media were supplemented with  $1\text{mg}/\ell$  2, 4-D. Vertical bars represent SE of the means.

體細胞胚 發生이 活潑하였다.

2, 4-D의 효과를 보면, 2, 4-D의 첨가량이  $0.5\text{mg}/\ell$  이하일 때는 體細胞胚 발생율이 낮았고,  $1\text{mg}/\ell$  처리구에서 가장 많이 발생하였으며,  $2\text{mg}/\ell$  처리구에서는 體細胞胚 발생이 감소하였는데 (Fig. 3-2), 이는  $1-2\text{mg}/\ell$ 의 2, 4-D가 첨가된 배양기에서 體細胞胚가 많이 발생하였던 셀러리<sup>8)</sup>의 세포배양에서와 유사한 결과라 할 수 있다.

## 2. 배양시기별 物質代謝의 變化

캘러스의 생육이 왕성한 배양초기에는 體細胞胚가 발생하지 않고,褐變化가 진행된 배양후기의 캘러스에서 노랗고 신선한 體細胞胚가 발생하였는데, 이는 體細胞胚의 발생을 촉진하는 물질이 신선한 세포에는 적거나 없으며 배양기간이 경과함에 따라 그 함량이 증가되어 體細胞胚의 발생을 촉진하는 것이라 생각되어, 배양 시기별로 인삼세포의 一次 및 二次대사 산물의 변화를 조사하였다.

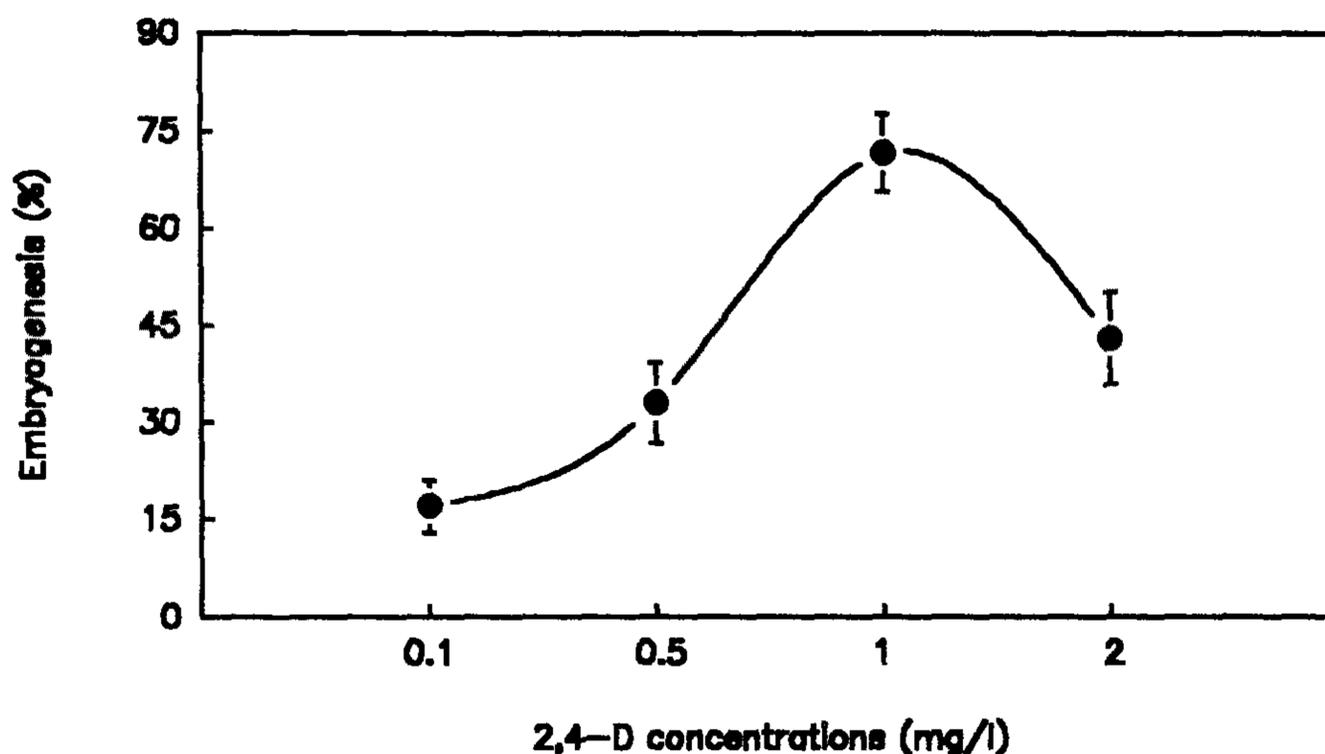


Fig. 3-2. Effect of 2, 4-D on somatic embryogenesis in callus cultures of ginseng. Culture media were supplemented with 50g/l sucrose. Vertical bars represent SE of the means.

#### 가. 배양세포의 변화

##### 1) 세포생장 및 호흡량

배양시기별로 세포생장 및 호흡량 변화를 조사하였던 바, Fig. 3-3과 같았다. 즉 배양세포의 생체중은 배양시기가 경과함에 따라 증가하여 배양후 6개월에 9.2g/flask로 최대치로 보이다가 감소하였으며(Fig. 3-3A), 건물중도 배양기간이 경과함에 따라 계속 증가하여 배양후 7개월에 0.45g/flask로 최대치로 보여 생체중과 유사한 증감경향을 나타내었다(Fig. 3-3B). 한편 호흡의 지표로써 탄산가스(CO<sub>2</sub>)의 함량변화를 보면, 배양초기에는 잠시 증가하였으나 배양기간이 경과함에 따라 현저히 감소하여 體細胞胚 발생 직전에 최저치를 나타내었으며 體細胞胚 발생과 더불어 다시 증가하였다(Fig. 3-3C). 배양후 4-6개월간에 생체중은 계속 증가하였으나 호흡량이 상당히 낮았으며 건물중의 증가도 미비하였던 것으로 보아, 이 시기의 생체중의 증가는 세포분열이나 세포내 저장물

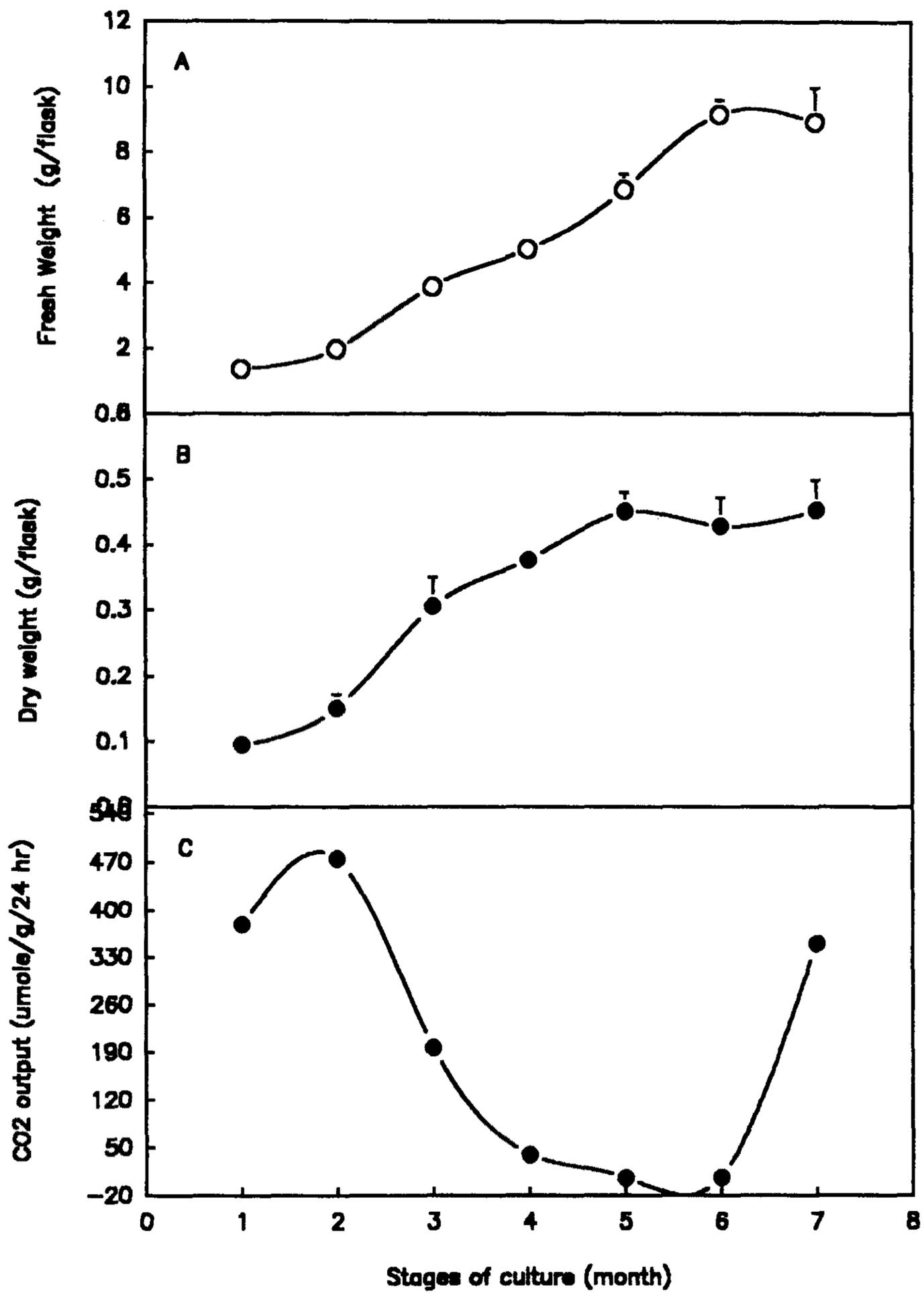


Fig. 3-3. Change in fresh weight(A), dry weight(B), and CO<sub>2</sub> output(C) during callus culture of ginseng.

Culture media were supplemented with 50g/l sucrose and 1mg/l 2, 4-D. Vertical bars represent SE of the means.

질의 증가에 기인하였다기 보다는 세포내 滲透壓의 증가에 의해 수분흡수가 활발하였기 때문인 것으로 생각된다.

나. 一次 대사산물의 변화

단백질과 유리아미노산 함량을 측정한 결과는 Fig. 3-4와 같다. 즉 단백질은 배양초기에는 증가하였으나 배양 3개월 이후에는 감소하여 10mg/g 내외의 낮은 함량을 유지하다가 體細胞胚가 발생하면서 157mg/g으로 크게 증가하고 있으며, 유리아미노산은 배양기간이 경과하면서 증가하여 배양후 4개월에 104 mg/g으로 최대를 보인 후에 감소하다가 體細胞胚가 발생되면서 약간 증가하였다. 여기서 배양 중기 이후에 단백질이 계속 감소하는 것은 이 기간중에는 세포분열도 감소하기 때문으로 생각된다.

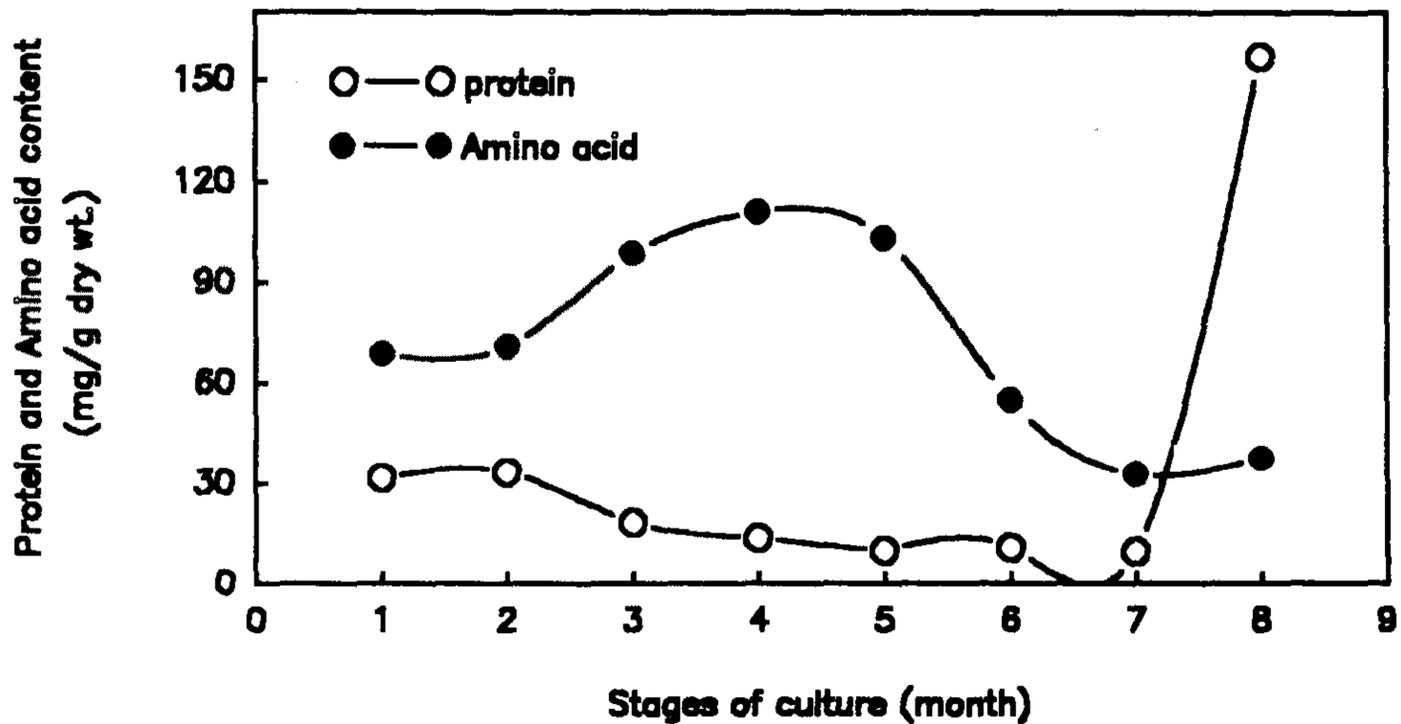


Fig. 3-4. Changes in protein and amino acid contents during callus culture of ginseng. Culture media were supplemented with 50g/l sucrose and 1mg/l 2, 4-D.

지질과 전분함량을 측정한 결과는 Fig. 3-5과 같다. 배양초기에 12mg/g이었던 지질은 이와 큰 차이가 없는 낮은 함량을 유지하다가 體細胞胚 발생기에 급증

하였는데, *Papaver*의 세포배양에서도 지질이 급증하면서 體細胞胚가 발생하였음<sup>17)</sup>이 보고된 바 있어, 지질함량의 증가와 체세포배 발생과는 밀접한 관계를 가지는 것으로 생각된다. 한편 전분은 배양초기에 11.6mg/g이었던 것이 배양기간이 경과함에 따라 증가하여 배양후 4개월에 52mg/g으로 최대치를 보이고 다시 감소하여 배양후 6, 7개월에는 최대치의 절반정도의 함량을 보였으며 그 이후 體細胞胚가 발생하는 시기에도 비슷한 수준을 보였다.

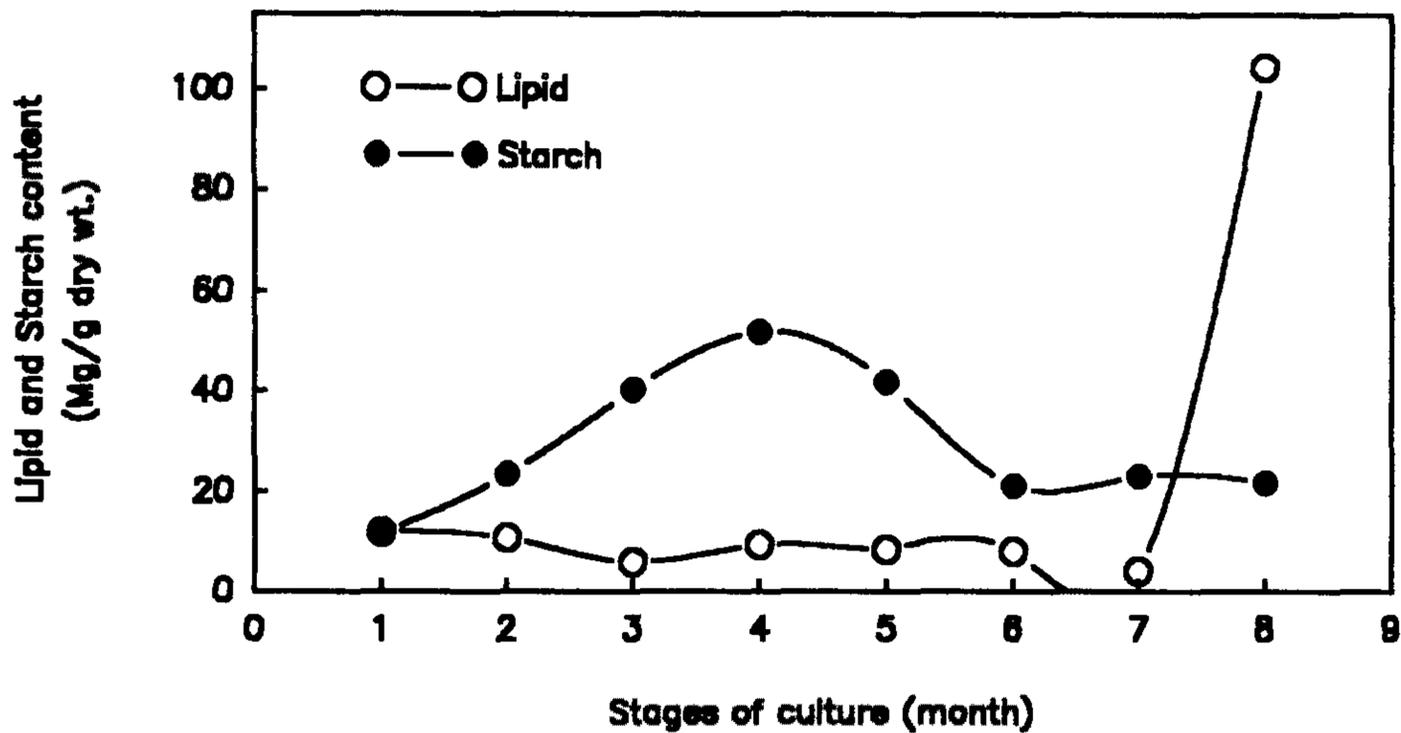


Fig. 3-5. Changes in lipid and starch contents during callus culture of ginseng. Culture media were supplemented with 50g/l sucrose and 1mg/l 2, 4-D.

#### 다. 酸化還元 정도와 體細胞胚 발생

체세포배 발생을 억제하는 2, 4-D 또는 에틸렌이 첨가된 배양기에는還元물질이 많으며<sup>16)</sup>, 이러한還元물질을 처리하면 體細胞胚 발생이 또한 억제되는 것<sup>5)</sup>으로 보아,還元물질의 증감에 따라 體細胞胚 발생이 조절될 수 있는 것으로 생각되어, 이와 관련하여 體細胞胚가 발생하는 현상을 관찰하였다.

##### 1)還元물질의 영향

배양세포내還元물질은 배양후 4개월에서 최대치를 보이고 점차 감소하여

배양후 7개월에서 최저를 나타내었으며 體細胞胚 발생기에도 이와 비슷한 함량이 유지되었다(Fig. 3-6B). 환원물질이 높게 나타나는 배양중기에 에틸렌은 거의 발생되지 않았는데(Fig. 3-6A), Wann(1967)등은 1개월 정도 배양한 신선한 캘러스에서 에틸렌과 還元물질의 함량을 측정하였으나 본 실험에서는 접종후 1개월 간격으로 8개월에 이르기까지 갈변이 진행되는 캘러스를 수확하여 측정하였기 때문에 서로 다른 실험결과를 보인 것이라 생각된다.

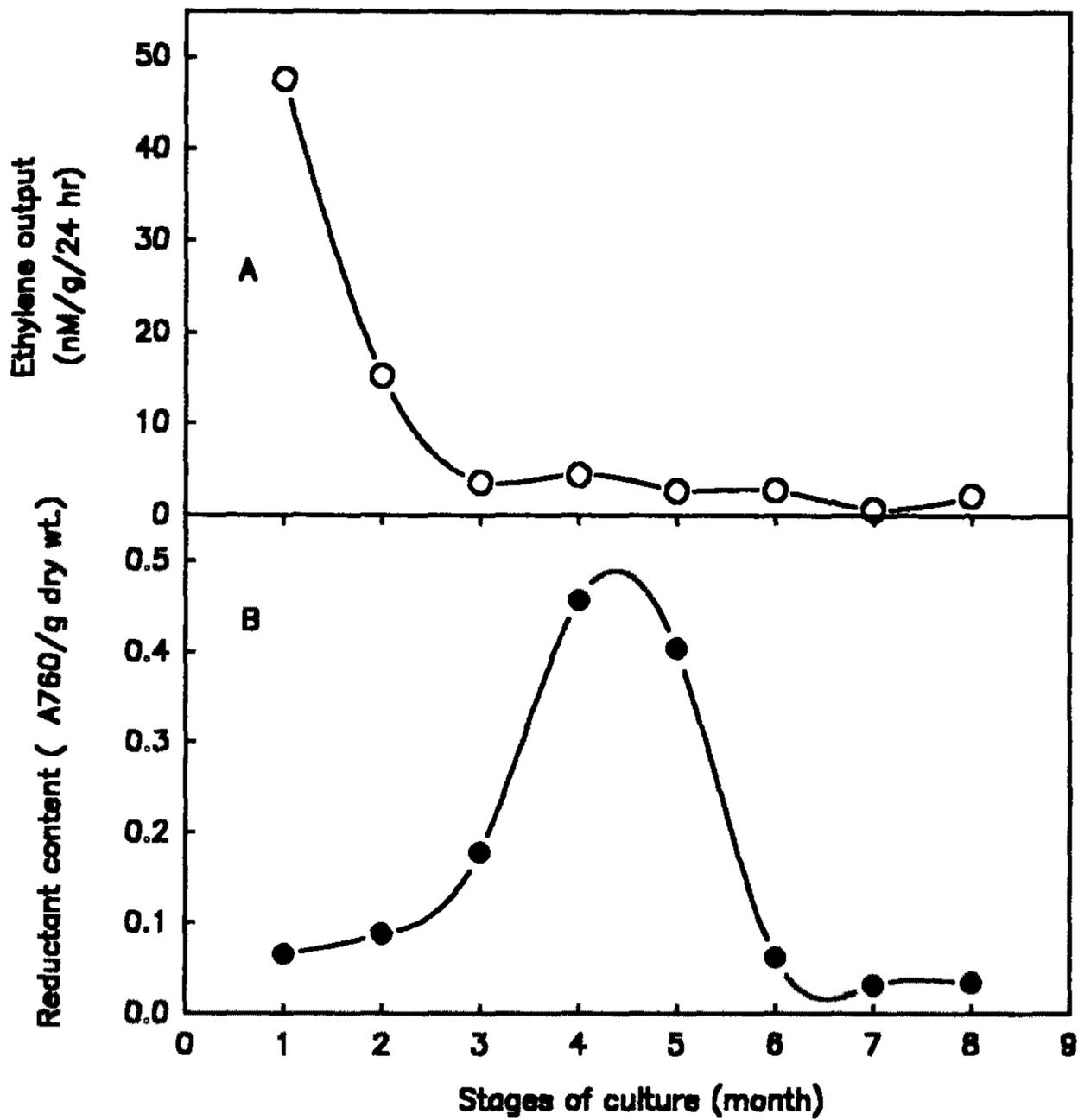


Fig. 3-6. Changes in reductant content during callus culture of ginseng. Culture media were supplemented with 50g/l sucrose and 1mg/l 2, 4-D.

## 2) 酸化물질의 영향

脂質이 산화되어 생성된 과산화지질의 함량을 측정하였던 바, 배양초기와 중기를 통하여 대체로 일정량이 유지되고 있었으나 體細胞胚 발생기에서는 2.07로 매우 높게 나타났다(Fig. 3-7). 산화물질의 지표로 삼은 과산화지질의 함량변화는 환원물질의 함량변화와 증감시기가 달리 나타나고 있으며, 특히 體細胞胚 발생기에는 酸化물질의 함량은 높고 還元물질은 적었다.

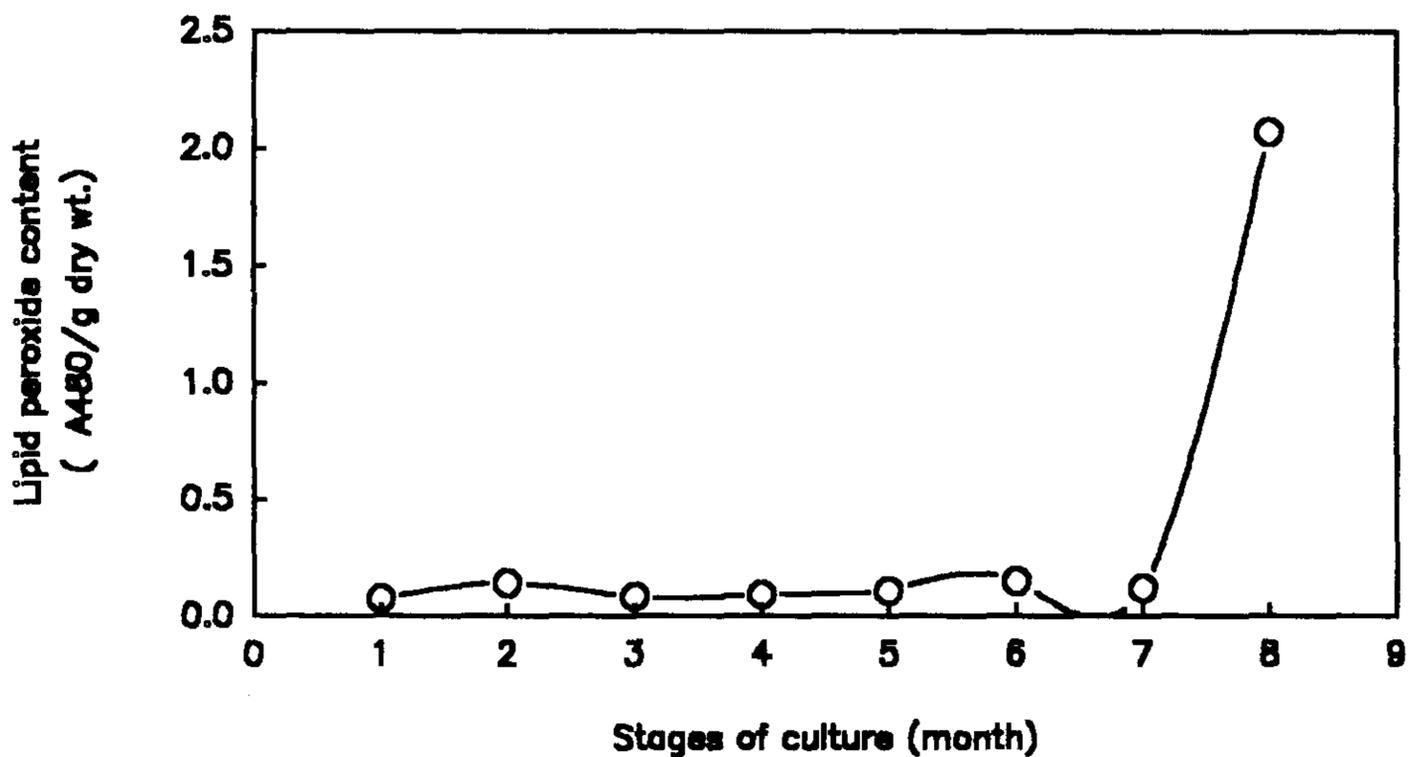


Fig. 3-7. Changes in lipid peroxide content during callus culture of ginseng. Culture media were supplemented with 50g/l sucrose and 1mg/l 2, 4-D.

## 라. 二次대사산물의 변화

배양세포의 二次대사의 변화를 알고자 주요 이차대사산물인 페놀류, 사포닌 및 안토시아닌의 함량을 시기별로 조사하였던 바, 페놀류는 배양후 계속 증가하여 4개월에 60mg/g으로 최대치를 보이고 감소하여 6개월 이후에는 이의 절반 정도의 수준을 유지하였다(Fig. 3-8A). 사포닌은 배양후 5개월에 17.4mg/g으로 최대치를 보이고 감소하다가 체세포가 발생하면서 다시 약간 증가하였고(Fig. 3-8), 안토시아닌 색소도 배양후 5개월에 0.34mg/g으로 최대치를 보이고

이후에는 급히 감소하였다(Fig. 3-8C). 전반적으로 이차대사산물은 배양중기에 최대치를 보이고 감소하는 비슷한 증감 패턴을 보였다.

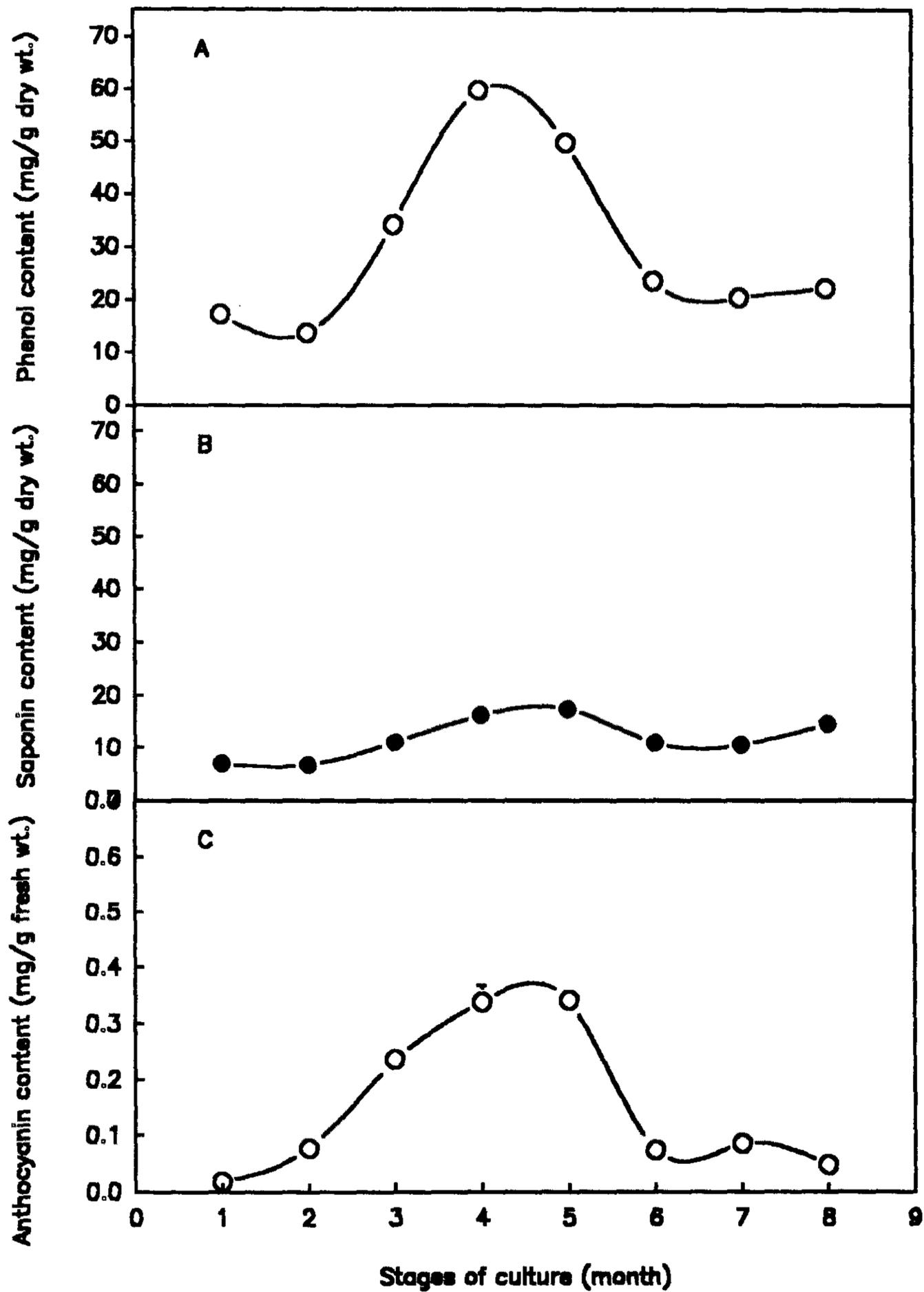


Fig. 3-8. Changes in content of phenol(A), saponin(B) and anthocyanin(C) during callus culture of ginseng. Culture media were supplemented with 50g/l sucrose and 1mg/l 2, 4-D.

## 第4節 結 論

인삼 배양세포포부너 체세포가 발생되는데 적합한 배양조건과 배양과정중의 주요대사산물의 변화를 조사하였던 바 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. Sucrose와 2, 4-D의 농도가 증가함에 따라 체세포배 발생이 촉진되는 경향을 보였다.
2. 세포의 생체중은 배양후 점차 증가하여 배양후 6개월에서 최대치를 보인 다음 감소하였다.
3. 단백질은 배양초기에는 높았으나 3개월이후 감소하여 낮은 상태를 유지하였으며 체세포배가 발생되면서 급증하였다.
4. 지방산은 배양기간이 경과함에 따라 함량이 서서히 감소하다가 체세포배 발생과 더불어 급증하였다.
5. 페놀류는 배양후 4개월에 이르러 최대치를 보이다가 감소하였다.
6. 환원물질은 배양중기까지 증가하였다가 후기에는 감소하였다.
7. 과산화지질은 배양이래 낮은 함량을 유지하다가 체세포배 발생과 더불어 급증하였다.

## 參 考 文 獻

1. Aitken, J. 1961. Influence of explant selection on the shoot-forming capacity of juvenile tissue of *Pinus radiata*. Can. J. For. Res. 11 : 112–117.
2. Duncombe, W. G. 1963. The colorimetric micro-determination of long fatty acids. Biochem. J. 88 : 7–10.
3. Earnshaw, B.A. and Johnson, M.A. 1985. The effect of glutathione on development in wild carrot suspension cultures. Biochem. and Biophys. Res. Commun. 133(3) : 988–993.
4. Finer, J.J. 1988. Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean [*Glycine max*(L.) Merrill. *Plant Cell Repts* 7 : 238–241.
5. Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G.H.S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226 : 497–509
6. Hammerschmidt, P.A. and Pratt, D.A. 1978. Phenolic antioxidants of dried soybeans. J. Food Science 43 : 556–559.
7. Hiai, S., Oura, H., Hamanaka, H. and Odaka, Y. 1975. A color reaction of panaxadiol with vanilline and sulfuric acid. *Planta Medica* 28 : 131–138.
8. Kim, Y.H., Kim, H.I., Chung, T.Y., and Harn, C. 1986. Induction of somatic embryos and germination of encapsulated embryos in celery. *Korean J. Plant Tissue Cult.* 13(2) : 129–136.
9. Kumar, P.P., Reid, D.M., and Thorpe, T.A. 1987. The role of ethylene and carbon dioxide in differentiation of shoot buds in excised cotyledons of *Pinus radiata in vitro*. *Physiol. Plant.* 69 : 244–252.

10. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin's phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265–275.
11. Martins-Loucao, M.A. and Rodriguez-Barrueco, C. 1983. Ethylene production by carob (*Ceratonia siliqua*) callus cultures on varying media. *Physiol. Plant.* 58 : 204–208.
12. Montague, M. J., Enns, R.K., Siegel, N.R., and Jaworski, E.G. 1981. A comparison of 2, 4–dichlorophenoxyacetic acid metabolism in cultured soybean cells and in embryogenic carrot cells. *Plant Physiol.* 67 : 603–607.
13. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 473–497.
14. Park, K.H. 1979. Studies on the anthocyanins in *Brassioa junoea* III. Quantitative determination of anthocyanins. *J. Korean Agri. Chem. Soc.* 22(1) : 39–41.
15. Paulin, A., Droillard, M.J., and Bureau, J.M. 1986. Effect of a free radical scavenger, 3, 4, 5–trichlorophenol, on ethylene production and on changes in lipids and membrane integrity during senescence of petals of cut carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Physiol. Plant.* 67 : 465–471.
16. Robyt, J.F. and Bemis, S. 1967. Use of the autoanalyzer for determining the blue value of the amylose-iodine complex and total carbohydrate by phenol-sulfuric acid. *Anal. Biochem.* 19 : 56–60.
17. Schuchmann, R. and Wellmann, E. 1983. Somatic embryogenesis of tissue cultures of *Papaver somniferum* and *Papaver orientale* and its relationship to alkaloid and lipid metabolism. *Plant Cell Reports* 2 : 88–91.

18. Wann, S.R., Johnson, M.A., Noland, T.L., and Carlson, J.A. 1987. Biochemical differences between embryogenic and nonembryogenic callus of *Picea abies* (L.) Karst. Plant Cell Reports 6 : 39–42.
19. Yemm, E.W., and Cocking, E.C. 1955. Ninhydrin assay for the determination of total amino acids. Analyst 80 : 209–213.

## 第4章 組織培養에 의한 人蔘 saponin의 生産과 高含有細胞株의 選拔

### 第1節 序 說

人蔘(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 옛날부터 漢方醫藥品으로 오랫동안 利用되어온 우리나라 固有의 傳統植物로써 體內的 成分中 어떤 것이 有效成分으로 作用하는지에 관하여는 아직 많은 研究者들에 의하여 研究가 계속 수행되고 있다. 그러나 전반적인 藥理效能은 科學的으로 立證되지 못하고 있지만 지금까지 알려진 人蔘의 가장 有效한 成分中的 하나는 人蔘 saponin으로 究明되어 있으며, saponin 이외에도 微量含有된 일부 成分들의 效能도 점차 알려지고 있다<sup>15, 17, 19</sup>. 人蔘은 다년생 음지성 植物로서 土壤의 化學性 및 물리성, 광의 強度, 通氣性, 溫度등에 대하여 대단히 민감한 반응을 보이며, 토양세균에 의하여 발생하는 根腐敗病의 防除는 매우 힘들어 재배하기가 대단히 까다롭고 어려우며, 해마다 生産量이 대단히 불안정하여 人蔘製品의 原料供給이 圓滑하지 못한 實情이다. 그래서 最近에는 기후풍토의 影響을 전혀 받지 않고 人蔘原料를 계속적으로 生産할 수 있는 組織培養技術을 개발하고자 많은 研究가 활발히 수행되고 있다.

植物組織培養技術은 植物細胞를 미생물과 같은 方法에 의해서 器內培養 하여 培養細胞의 二次代謝作用으로 생성되는 有用物質을 生産할 수 있는 方法으로써 人工적인 환경條件하에서 培養하기 때문에 포장에서 재배할 境遇 발생될 수 있는 많은 제한 요소들을 減少시킬 수 있으며, 生産의 안정성과 有效成分 含量의 增加를 높일 수 있는 方法으로 알려져 있다. 특히 일부 植物細胞에서는 動物細胞와 微生物細胞등에서 전혀 生産할 수 없는 고가의 有用物質을 함유하고 있어 植物培養細胞를 利用한 代謝產物을 획득하려고 하는 研究가 활발히 추

진되고 있으며, 이중에서도 alkaloids, steroids, terpenes, quinone 계열 등의 화합물이 주류를 이루고 있다<sup>9, 10, 13, 14)</sup>.

植物組織培養技術을 利用하여 二次代謝產物을 상업화 한 것은 *Lithospermum erythrorhizon*의 培養細胞로써 의약품으로 使用되고 있는 物質은 shikonin이며<sup>3)</sup>, 이외에도 몇종의 二次代謝產物이 器內培養方法에 의해서 大量生産 체제를 갖추고 실용화단계에까지 와 있는 실정이다<sup>7, 18, 20)</sup>. 器內培養方法에서는 培養條件을 달리해줌으로써 植物培養細胞의 最大生長과 二次代謝產物의 最大生産을 다소 조절할 수 있지만 대개 이 두가지 요소는 상호 반비례 관계에 놓여 있는境遇가 많기 때문에 적절한 生産수율(生長率×生産率)을 구해서 使用함으로써 二次代謝產物의 最大生産을 극대화 시킬 수 있다. 일반적으로 代謝產物 生成에 큰 影響을 미치는 培養條件으로서는 (1) 培地內에 無機物, 有機物 및 植物 hormone의 添加, (2) 生産 코자 하는 有用물질의 前驅物質의 添加, (3) 미생물 등의 elicitor의 添加, (4) 培養環境條件등을 들 수 있는데, 이들을 달리하여 培養함으로써 生産수율을 다소 높일 수 있다<sup>6, 16, 19)</sup>. 그러나 正常組織細胞를 利用할境遇 상기 方法에 의하여 生産의 最適條件을 究明하였다고 할境遇, 더 이상 生産의 增加를 도모할 수 없으므로 最近에는 목적으로 하는 有用物質을 大量生産할 수 있는 새로운 細胞株를 選拔, 육성하여 使用하고자 하는 많은 研究가 進行되고 있다<sup>8, 12, 18)</sup>. 새로운 細胞株의 選拔에는 (1) 고온, 저온등의 환경적인 자극, (2) UV,  $\gamma$ -ray등의 물리적인 자극, 그리고 (3) antibiotics, herbicide, salt, heavy metal등과 (4) mutagen으로 使用되고 있는 5-bromodeoxyuridine, nitrosoguanidine, 5-methyltryptophan, aminopterin, potassium chlorate,  $\alpha$ -methyl-D,L methionine, D,L-norleucine, D,L- $\rho$ -fluorophenylalanine등을 使用한 化學的인 자극등이 利用되고 있다<sup>8, 12, 17)</sup>. 또한 最近에는 토양세균인 *Agrobacterium tumefaciens*의 Ti-plasmid를 利用 하여 植物細胞를 形質轉換시켜 變異體로 使

用하고 있는데 이는 Ti-plasmid의 일부인 T-DNA가 植物細胞의 핵내로 안정되게 삽입되어 植物 hormone 自家合成遺傳子가 발현되어 變異體가 되며 특히 T-DNA가 植物細胞의 핵내로 삽입될 때 무작위로 삽입되어 발현되므로 많은 變異體를 만들 수 있게 되었다<sup>1)</sup>. *Agrobacterium* spp.에 의하여 形質轉換된 組織을 새로운 細胞株로 選拔하여 二次代謝產物을 生産하는 結果는 이미 많이 보고되고 있으며, 주로 hairy root를 形成하는 *Agrobacterium rhizogenes*를 감염시켜 二次代謝產物을 生産하고자 하는 研究가 進行되고 있다<sup>9, 13, 14, 21)</sup>.

本 研究는 人蔘 사포닌 器內生産條件을 究明하고, 사포닌 高含有 세포주 育성을 위한 變異體를 育기 選拔하였는 바, 그 結果와 2年次 結果의 要約을 綜合的으로 報告코져 한다.

## 第2節 材料 및 方法

### 1. 固體培養에 의한 人蔘 callus의 사포닌 生産

#### 가. 培養時期別 사포닌 含量的 變化

人蔘 callus의 培養時期에 따른 사포닌의 含量을 調査하기 위해서 MS培地에 2, 4-D가 3mg/ℓ를 添加하여 60일간 固體培養하면서 培養 10일간격으로 사포닌의 含量을 측정하였다. 사포닌 測定方法은 황산 vanillin법을 변형하여 使用하였으며, standard는 ginsenoside Re를 使用하였고 사포닌 抽出 및 分析方法은 Fig. 4-1과 같다.

#### 나. 培養人蔘 callus의 사포닌 含量에 미치는 植物호르몬 및 培地조성의 影響

人蔘 callus의 生長과 사포닌의 合成에 미치는 植物호르몬과 培地의 影響을 調査하기 위해서 CPA 2mg/ℓ 添加된 培地에 추가로 BA를 0, 0.005, 0.01, 0.03,

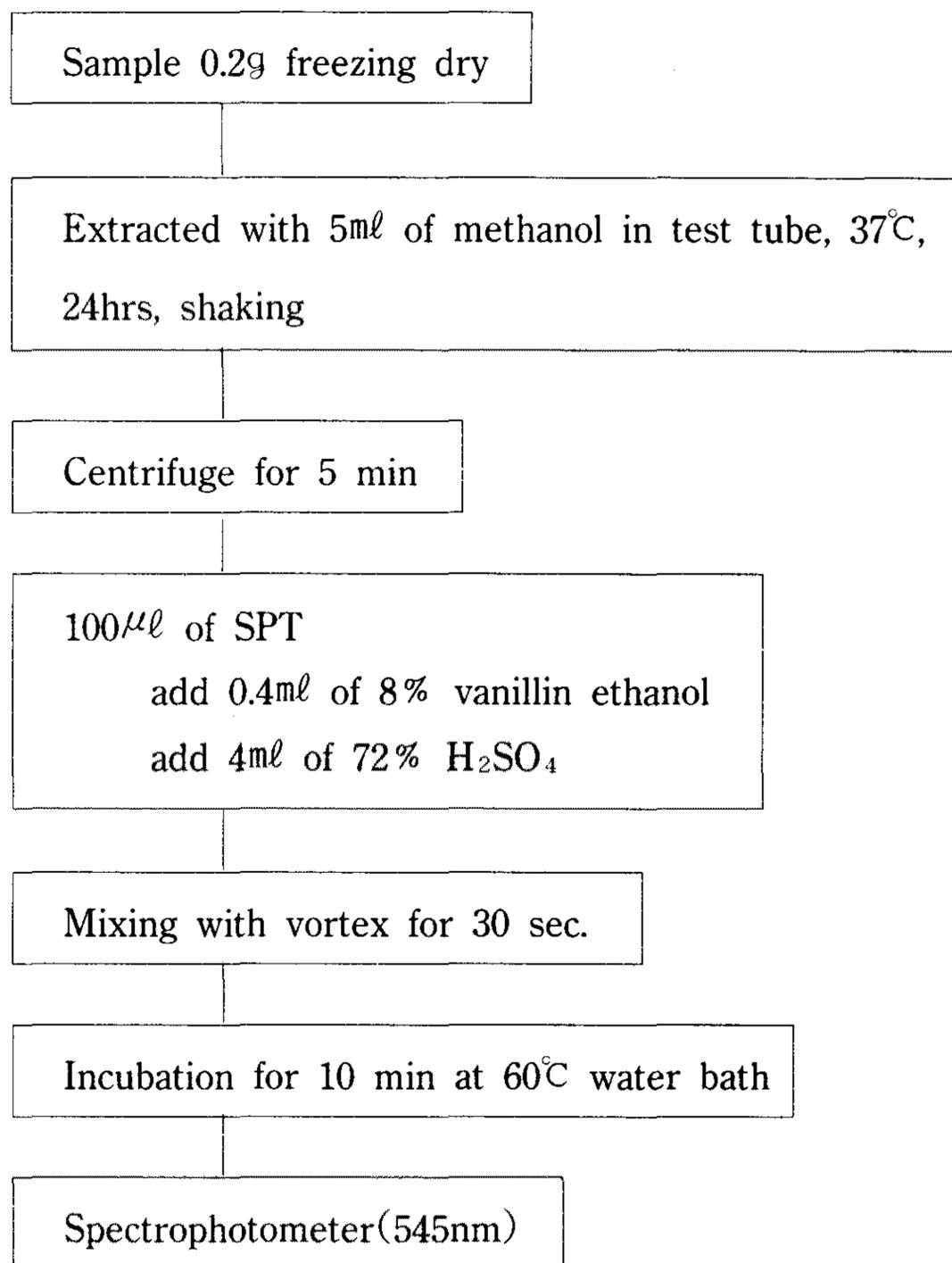


Fig. 4-1. Extraction procedure and analysis of saponins from cultured call.

0.05, 0.1, 0.5mg/l씩 각각 添加하여 30일간 固體培養한 後 사포닌의 含量을 測定하였으며, 사포닌의 生産수율은 生長量에 사포닌含量을 곱하여 flask당 사포닌의 生産量으로 환산하였다. 또한 NAA, sucrose 및 培地 종류의 影響을 調査하기 위해서는 CPA가 添加된 培地에 역시 NAA의 濃度を 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0mg/l씩, sucrose 濃度は 10, 20, 30, 40, 50g/l씩, 그리고 基本培地로서 Murashige and Skoog培地와 Schenk and Hildebrandt 培地를 使用하여 30일간 培養한 後 사포닌의 含量과 生産수율을 調査하였다.

다. 사포닌 함량에 미치는 L-phenylalanine 및 elicitor의 影響

人蔘 callus의 사포닌合成에 미치는 L-phenylalanine의 影響을 調査하고자 濃度를 0, 1, 5, 10, 20, 50mg/ℓ씩 處理하였으며, elicitor의 影響을 調査하기 위해서 chitosan의 濃度를 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10, 20, 50, 100, 200mg/ℓ씩 添加하였으며, nigeran은 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0mg/ℓ씩 添加하여 30일간 培養한 後 사포닌의 含量과 生産수율을 調査하였다.

## 2. 懸濁培養 人蔘細胞의 生長 및 사포닌 含量

가. 人蔘細胞의 生長 및 사포닌 含量에 미치는 細胞密度와 培養期間의 影響

人蔘 單細胞由來變異體의 生育에 적합한 cell density 및 培養期間을 究明하기 위하여 MS培地에 liquid culture 한 單細胞群을 cell density를 1, 2, 3, 4%로 치상하여 培養한 後 5, 10, 15, 20, 25일 後에 각각 生體重과 사포닌含量을 測定하였으며 사포닌의 含量은 황산 vanillin법을 利用하여 수행하였다.

나. 人蔘細胞의 生長 및 사포닌 生産에 미치는 光, 植物호르몬 및 培養時期의 影響

人蔘 callus이 生長과 사포닌의 生産에 미치는 植物호르몬의 影響을 調査하기 위하여 人蔘 細胞株를 2, 4-D를 함유하고 있는 固體 培地에서 1개월동안 培養한 後에 MS基本培地로 마쇄하여 1mm mesh의 체를 利用하여 여과시켰다. 마쇄한 人蔘 細胞株를 MS 基本 培地로 3회에 걸쳐 세척하고 침전법을 利用하여 일정한 PG-4 人蔘 細胞를 얻었다. 이 人蔘細胞를 植物호르몬(2, 4-D, IBA, IAA)을 添加한 250ml의 MS 液體 培地에 細胞의 濃度가 7%되게 懸濁시켜서 光條件(0와 1000lux), 60rpm, 25°C 培養하여 生長量과 사포닌의 含量을 調査하였다. 사포닌 분석은 液體 培養後 人蔘 callus를 수확하여 냉동 건조시키고 Fig. 4-2와 같은 方法으로 사포닌 분석을 얻었으며, HPLC에 의하여 ginsenoside의 含量을 분석하였다.

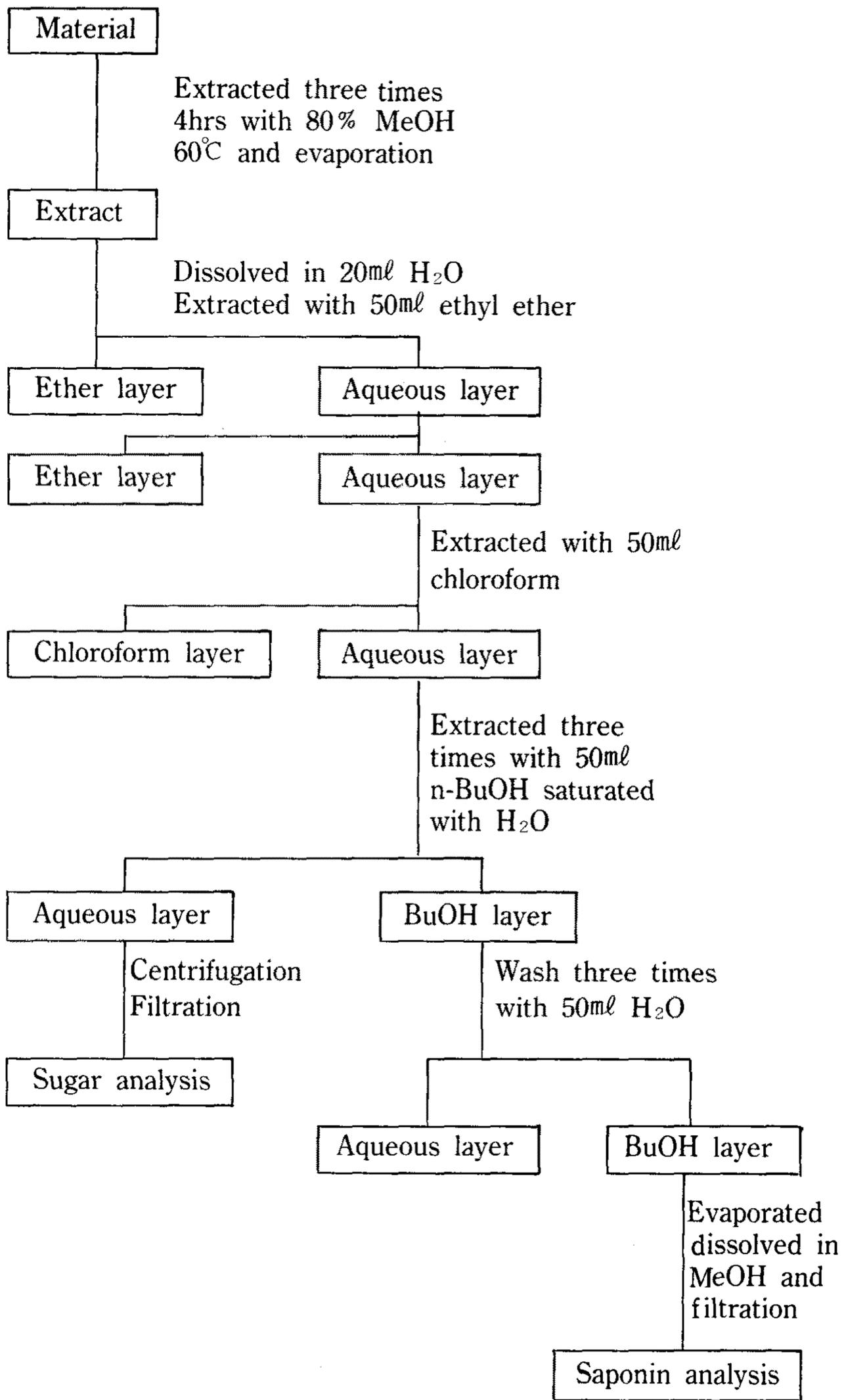


Fig. 4-2. Extraction procedure of saponin from cultured calli.

다. 2, 4-D 대체 生長調節物質에 의한 人蔘 細胞의 사포닌 含量  
IBA 및 IAA 3mg/l 添加된 培地에 10일 및 20일간 懸濁培養하여 callus 수확한  
後 HPLC에 의해서 ginsenoside의 含量을 調査하였다.

### 3. 사포닌 高含有 細胞株의 選拔

#### 가. $\gamma$ -ray 處理後 plating method에 의한 變異體 選拔

人蔘 培養細胞로부터 變異體를 選拔하기 위해서 low melting agarose에 의하  
여 培養된 人蔘 callus에  $\gamma$ -ray의 dose를 0, 1, 2, 3, 4, 5kR로 處理하여 최저 生  
長정도를 調査하였으며, 3kR 調査된 處理區에서 생존한 細胞株를 選拔하여 CPA  
2mg/l 添加된 MS 培地에서 계대 培養한 後 수확하여 황산 vanillin 方法에 의하여  
사포닌의 含量을 調査하였다.

#### 나. 化學物質 處理에 의한 變異體 選拔

人蔘 callus 變異體를 選拔하고자 CPA가 2mg/l 添加된 培地에 추가로 變異  
體유발 化學物質을 添加하였다. 化學物質으로써  $\alpha$ -methyl-D.L-methionine의 濃  
도를 0, 5, 10, 50, 80, 100mg/l, D.L-norleucine의 농도를 0, 5, 10, 30, 50, 80,  
100, 200mg/l, D.L- $\rho$ -fluorophenylalanine의 濃도를 0, 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80  
 $\mu$ M, aminopterin의 濃도를 0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10, 20mM 그리고 potassium  
chlorate의 濃도를 0, 10, 20, 30, 50, 80, 150mM을 添加하여 30일간 培養한 後  
수확하여 사포닌의 含量을 調査하였다.

#### 다. 人蔘우수육성계통으로 부터 사포닌 高含有 細胞株의 選拔

고사포닌, 내병성 및 다수성인 人蔘육성계통 18종을 공시하여 이들의 뿌리  
로부터 callus를 유기하기 위해서 2, 4-D 3mg/l 添加된 MS 培地에 6년생  
뿌리를 살균한 다음 치상하여 25°C 培養室에서 培養하였다. 유기된 callus는 계  
속적인 계대培養에 의해서 生長을 촉진시킨 後 수확하여 사포닌의 含量을 調  
査하였다.

라. *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 人蔘組織의 形質轉換

Nopaline type인 *A. tumefaciens* C58을 YEB(Nutrient broth 13.3g, yeast extract 1.0g sucrose 5.0g, MgSO<sub>4</sub> 0.24g, dH<sub>2</sub>O 1ℓ) 培地에서 29°C로 懸濁培養한 後 2년생 人蔘의 莖, 줄기, 뿌리에 상처를 주고 주사기로 감염시켰다. 形成된 crown gall tumor 組織을 절취하여 깨끗이 세척한 後 70 EtOH 용액에 3분간 침지한 後 2%의 NaOCl 용액에서 15분간 침지하고 멸균증류수로 4회 세척하여 표면살균하였다. 멸균된 組織은 잘게 썰어 植物 hormone 無添加培地에 접종하여 25±1°C의 培養室에서 암상태로 培養하여 tumor callus를 유기하였다.

形質轉換된 人蔘 crown gall tumor의 生長에 대한 植物 hormone의 效果를 究明하기 위해서 MS 개량 培地에 IAA, 2, 4-D 및 NAA를 각각 0, 1, 3, 5mg/ℓ씩 添加하여 25°C의 광상태에서 30일간 培養하여 생체량을 測定 하였다. 懸濁培養에 의한 callus의 生長量을 調査하기 위해서 2, 4-D 3mg/ℓ와 BA 0.5mg/ℓ 添加 培地에 callus를 1g씩 접종하여 100rpm의 gyratory shaker에서 30일간 培養한 後 生體重과 건물중을 測定하였다.

形質轉換된 callus에서 사포닌의 含量을 調査하기 위해서 植物호르몬이 전혀 添加되지 않은 培地에 生長한 tumor callus와 2, 4-D 3mg/ℓ 및 BA 0.5mg/ℓ 添加된 培地에서 生長한 callus와 자연산 人蔘根을 대상으로 하여 HPLC에 의해서 사포닌의 含量을 調査하였다.

### 第3節 結果 및 考察

#### 1. 固體培養 人蔘 callus의 사포닌 生産

##### 가. 培養時期別 사포닌 含量의 變化

人蔘에서 有效成分으로 밝혀진 것은 주로 사포닌으로써 현재까지 인삼뿌리에서 20여종의 人蔘사포닌(ginsenoside)이 알려져 있고 또한 그 구조식도 밝혀졌으며

이런 사포닌의 함량과 ginsenoside pattern은 포장 재배條件이나 재배時期에 따라서 차이가 있다. 本實驗에서는 器内培養에 의해서도 培養時期에 따라서 사포닌의 함량에 차이가 있을 것으로 생각되어 培養 10일부터 10일 간격으로 60일까지 固體培養한 後 사포닌의 함량을 調査하였던 바, 培養 30일경에 사포닌 함량이 가장 높았으며 40일 이후부터 서서히 減少하는 傾向을 보였다(Table 4-1). 人蔘 callus 組織은 培養 30일경까지는 生長이 왕성하다가 이후에는 stationary phase에 다다르게 되며, 人蔘사포닌의 함량 또한 stationary phase 초기에서 최고치를 나타내었는 바, 이는二次代謝產物 생성이 組織細胞의 stationary phase에서 가장 많다는 일반적인 結果와 일치하였다. 또한 재배人蔘根과 30일간 培養한 培養細胞간의 사포닌의 함량은 각기 3.77% 및 1.915%로 培養細胞가 재배 人蔘根에 비해서 2배정도 적은량으로 나타났다(Table 4-1).

Table 4-1. Changes in content of saponin in ginseng callus(PG4 line) cultured on the medium with 3mg/l 2, 4-D for 10 to 60 days.

Culture period(days)	Content of saponin(%)
10	1.818
20	1.802
30	1.915
40	1.864
50	1.720
60	1.780
Ginseng root(6 years)	3.777

나. 培養人蔘 callus의 사포닌 함량에 미치는 植物호르몬 및 培地조성의 影響

培養人蔘 callus의 사포닌 함량에 미치는 植物호르몬의 影響을 調査하기 위해서 CPA가 2mg/ℓ 添加된 培地에 cytokinin으로써 BA를 濃度別로 處理하여 30일간 培養한 後 황산 vanillin법에 의하여 사포닌의 함량을 調査하였던 바, BA 0.01 mg/ℓ에서 사포닌의 함량이 2.381%로 가장 많았으며, 다른 濃度에서는 BA無 處理區와 거의 비슷한 수준이었다(Table 4-2). 또한 二次代謝産物의 生産과 callus의 生長은 서로 차이가 있으므로 生長에 따른 二次代謝産物의 生産수율을 調査하였던 바, 역시 BA 0.01mg/ℓ에서 가장 높아 BA 添加에 의한 사포닌의 生産條件은 CPA 2mg/ℓ에 BA를 0.01mg/ℓ 添加하여 30일간 培養한 後 수확하는 것이 가장 바람직한 것으로 나타났다(Table 4-2).

Table 4-2. Effect of BA on content of saponin in ginseng callus.

Conc. of BA (mg/ℓ)	Content of saponin (%)	Productivity of saponin (mg/flask)
0	1.899	223.134
0.005	1.917	231.708
0.01	2.381	293.839
0.03	1.943	246.547
0.05	1.978	246.162
0.1	1.748	183.767
0.5	1.695	183.767
Ginseng root(6 years)	4.818	

한편 auxin계통인 NAA가 二次代謝産物の生産에 效果가 있는 것으로 보고 되어 本實驗에서도 CPA 2mg/ℓ에 NAA를 濃度別로 添加하여 사포닌의 含量을 調査하였던 바, NAA는 濃度에 관계없이 사포닌 含量에 차이를 보이지 않았으며 오히려 2mg/ℓ 이상의 高濃度の NAA의 處理에 의해서 사포닌의 수율은 다소 減少되는 傾向을 보였다(Table 4-3). 高濃度の NAA 處理時 사포닌 수율이 減少한 원인을 보면 2mg/ℓ 이상의 濃度로 NAA를 處理하면 人蔘 callus組織의 生長이 저하되었는 바, 이로 인하여 사포닌 수율이 떨어진 것으로 생각되어진다.

Table 4-3. Effect of NAA on content of saponin in ginseng callus.

Conc. of BA (mg/ℓ)	Content of saponin (%)	Productivity of saponin (mg/flask)
0	1.57	184.54
0.1	1.61	187.82
0.5	1.51	174.78
1.0	1.49	172.26
2.0	1.48	161.72
5.0	1.56	168.72
· Ginseng root(6 years)	5.09	

한편 에너지원으로써 使用되는 sucrose를 濃度別로 處理하여 사포닌 含量을 調査하였던 바, sucrose의 濃度가 減少할수록 사포닌의 含量은 增加하는 傾向을 보였으나 대조적으로 sucrose의 含量이 減少할수록 callus의 生長量이 減少되어 오히려 生産수율은 sucrose의 含量이 가장 적은 10g/ℓ에서 가장 낮았으며 ca- llus의 生長量이 良好한 30g/ℓ에서 生産수율이 가장 높았다(Table 4-4).

Table 4-4. Effect of sucrose on content of saponin in ginseng callus.

Conc. of BA (mg/ℓ)	Content of saponin (%)	Productivity of saponin (mg/flask)
10	2.464	126.82
20	2.277	156.68
30	2.004	208.48
40	1.914	206.94
50	1.539	153.56
Ginseng root(6 years)	5.817	

二次代謝産物生成은 植物호르몬이나 precursor 및 elicitor에 의하여 많은 영향을 받지만 培地속에 添加한 nitrogen source와 carbon source의 비율에 따라서도 매우 많은 차이가 생기므로 培地種類에 따른 사포닌의 함량을 조사한 결과, MS 培地에 비해서 SH 培地에서 사포닌의 함량이 많았으며, callus의 生長도 MS 培地에 비해 SH 培地에서 더 많아 사포닌의 수율도 SH 培地가 높은 傾向을 보였다(Table 4-5). SH 培地가 MS 培地보다 사포닌 함량이 높은 것은 SH 培地가 MS 培地보다 nitrogen source의 함량이 적기 때문인 것으로 생각되어진다.

Table 4-5. Effect of basal media on the biosynthesis of saponin of ginseng callus.

Conc. of BA (mg/ℓ)	Content of saponin (%)	Productivity of saponin (mg/flask)
Schenk and Hildebrandt	2.095	182.68
Murashige and Skoog	1.670	127.59
Ginseng root(6 years)	4.142	

다. 사포닌 함량에 미치는 L-phenylalanine 및 elicitor의 影響  
 사포닌 生産과 수율에 미치는 L-phenylalanine의 影響을 調査하기 위해서 L-phenylalanine를 濃度別로 處理하여 사포닌의 함량과 수율을 調査하였던 바, 사포닌의 生産에는 L-phenylalanine의 生産에는 전혀 影響을 미치지 못하였다. 다만 L-phenylalanine의 添加에 의해서 callus의 生長이 增加하였으며 5mg/ℓ 濃度에서 callus 生長이 가장 良好하여 生産수율도 가장 높은 것으로 나타났다 (Table 4-6).

Table 4-6. Effect of L-phenylalanine on content of saponin in ginseng callus.

Conc. of L-phenylalanine(mg/ℓ)	Content of saponin (%)	Productivity of saponin (mg/flask)
0	2.589	244.01
1	2.780	292.51
5	2.558	314.44
10	2.743	274.44
20	2.780	302.79
50	2.836	288.11
Ginseng root(6 years)	4.533	

사포닌 生産에 대한 elicitor의 效果를 調査하기 위해서 chitosan과 nigeran을 濃度別로 處理하여 사포닌 함량 및 수율을 調査하였던 바, 우선 chitosan의 境遇에는 0.5-5mg/ℓ 添加時 사포닌의 함량이 높았으며 濃度가 增加할수록 사포닌의 함량이 다소 減少하는 傾向을 보였다(Table 4-7). 그러나 chitosan의 濃度가 增加할수록 生長량이 급속히 減少하여 生産수율은 급격히 減少하

는 傾向을 보였다(Table 4-7). 특히 chitosan 20mg/l 이상부터는 生産수율이 급격히 減少하여 약 1/3 정도의 生産수율을 나타내었으며, chitosan 100mg/l 에서는 0.5mg/l 에 비해 사포닌 生産수율이 10배 정도 減少하는 傾向을 보였다(Table 4-7).

Table 4-7. Effect of chitosan on content of saponin in ginseng callus.

Conc. of BA (mg/l)	Content of saponin (%)	Productivity of saponin (mg/flask)
0.1	1.632	143.94
0.5	2.260	192.51
1.0	2.190	151.18
5.0	2.158	158.29
10.0	1.892	100.75
20.0	1.921	57.02
50.0	1.501	16.69
100.0	1.066	10.58
200.0	1.122	11.58
Ginseng root(6 years)	3.353	

또한 nigeran의 境遇에는 濃도가 增加할수록 사포닌의 含量이 增加하다가 0.2mg/l 에서 1.949% 로서 최대에 달하였으며, 그 이상의 濃도에서는 nigeran의 濃도가 增加할수록 사포닌의 含量은 오히려 減少하는 傾向을 보였다(Table 4-8). 그러나 nigeran 0.2mg/l 에서 사포닌의 含量이 가장 높긴 하였으나 callus의 生長이 불량하여 오히려 사포닌의 生産수율은 0.1mg/l 에서 더 높은 傾向을 나타내었다(Table 4-8). 本實驗 結果 사포닌 生産을 위한 elicitor로서는 nigeran보다 chitosan이 더 良好한 것으로 나타났다.

Table 4-8. Effect of nigeran on content of saponin in ginseng callus.

Conc. of BA (mg/ℓ)	Content of saponin (%)	Productivity of saponin (mg/flask)
0.02	1.088	77.06
0.04	1.256	84.27
0.06	1.315	107.09
0.08	1.439	87.51
0.10	1.785	138.61
0.20	1.949	119.88
0.50	1.581	120.82
1.00	1.354	82.31
Ginseng root(6 years)	3.353	

## 2. 懸濁培養 人蔘細胞의 生長 및 사포닌 含量

가. 人蔘細胞의 生長 및 含量에 미치는 細胞밀도와 培養時期的 影響

人蔘 單細胞由來 變異體를 選拔하기 위한 研究의 일환으로 2, 4-D가 3mg/ℓ 添加된 MS 培地를 Petri dish에 분주한 後 2일간 懸濁培養된 人蔘 callus를 low melting agarose 方法에 의하여 1, 2, 3, 4%의 濃度로 plating하여 單細胞由來組織 生成여부를 調査하였던 바, cell density가 3% 濃度에서 40일간 培養하였을 때 單細胞를 채취하기가 가장 적절하였다. 또한 懸濁培養時 細胞生長에 미치는 cell density와 培養時期的 影響을 調査한 結果 최초의 cell density 1%를 제외한 2, 3, 4% 공히 培養期間이 길수록 生長量이 많았고, 20일간 培養한 것이 生長率이 가장 높았으며, cell density 3%에서 生長지수가 가장 높은 傾向을 보였다(Table 4-9). 그리고 培養한 人蔘細胞群의 含量을 보면 cell density에 관계없이 培養期間에 따라 일정한 傾向은 없었지만 cell density 2, 3, 4% 공히 20일간 培養한

處理가 가장 높았으며, 특히 2% 處理區 20일간 培養한 細胞群의 사포닌 含量이 가장 높았다(Table 4-10).

이상에서 보면 cell density 3%에 40일간 培養하여 單細胞 유래 變異體를 選拔한 後 이들을 다시 2% cell density로 20일간 培養하는 것이 사포닌 生産 수율면에서 좋을 것으로 생각된다.

Table 4-9. Effect of density and incubation time on the growth in cell suspension culture of ginseng.

Days after culture	Fresh weight(g/flask) of calli cultured with with different cell densities by			
	1%	2%	3%	4%
5	0.397	0.717	0.653	1.762
10	0.509	1.323	1.676	2.149
15	1.016	2.662	4.138	4.976
20	3.288	7.458	7.541	5.414
25	3.401	9.258	9.079	8.412

Table 4-10. Effect of cell density and incubation time on the production of total saponin in cell suspension culture of ginseng.

Days after culture	Saponin contents(%) of calli cultured with different cell densities by			
	1%	2%	3%	4%
5	4.95	3.15	5.23	5.65
10	4.54	3.28	3.83	3.20
15	3.85	5.38	5.53	5.70
20	4.60	7.30	6.42	5.84
25	3.13	4.83	6.19	4.90

나. 人蔘細胞의 生長 및 사포닌 生産에 미치는 光, 植物호르몬 및 培養期間의 影響

2, 4-D(1mg/ℓ와 3mg/ℓ)를 添加시킨 液體培地를 使用하여 人蔘 細胞群의 生長에 미치는 光의 影響을 調査하였던 바, 2, 4-D의 濃度에 관계없이 暗條件에서의 人蔘 細胞群의 生長量이 光條件보다 7~8배 더 높은 傾向을 보였다 (Table 4-11). 그리고 2, 4-D 濃度에 따른 차이를 보면 光培養의 境遇에는 濃度の 차이를 인정할 수 없었으나 暗培養의 境遇에는 1mg/ℓ 處理區가 3mg/ℓ 處理區보다 細胞群의 生長이 良好한 傾向이었는데, 이는 固體培養과 비교하여 보면 반대현상으로서 液體培養한 境遇에는 전체의 組織細胞가 培地에 접촉해 있으므로 2, 4-D의 요구도가 固體培養보다 낮은 傾向을 보인 것으로 생각되어진다.

한편, 2, 4-D는 人체에 해로운 物質로 알려져 있기 때문에 2, 4-D 대체 生長調節物質로서 IBA와 IAA를 使用한 結果 거의 生長이 되지 않았다(Table 4-11).

Table 4-11. Effect of auxin on the growth of ginseng PG-4 cell line in suspension culture.

Auxin	Concentration (mg/ℓ)	Light intensity (lux)	Incubation time (days)	Dry weight (mg/ml)
2, 4-D	1	0	27	17.67
		1,000	27	2.67
	3	0	27	14.67
		1,000	27	2.83
IBA	3	0	10	1.47
			15	1.78
			27	2.58
IAA	3	0	10	0.49
			15	0.61
			27	3.04

일반적으로 auxin을 단독으로 處理할 境遇에 細胞의 신장(enlargement)만을 증대시키고 細胞增殖을 억제하며, auxin과 cytokinin을 동시에 處理하면 細胞 분열을 增加시킬 수 있는데<sup>11)</sup> 특히 auxin은 植物細胞내에서 생리활성을 나타낼 수 있는 최적濃度 그리고 植物의 종류와 최종산물의 종류에 따라서 auxin은 최적濃度가 다르게 나타나는 바, 本實驗에서 수행한 2, 4-D 대체 生長調節植物로서 IBA, IAA의 최적濃度는 callus 大量生産의 측면에서 계속적으로 광범위하게 검토되어져야 할 것이며, 또한 순화 callus를 選拔하는 방안도 확립되어야 할 것으로 생각된다.

한편 懸濁培養에 의한 人蔘 saponin의 生産에 미치는 광의 影響을 調査한 結果 調査포닌의 含量에는 광의 유무에 관계없이 차이가 없었으나 ginsenoside 含量은 차이가 있었으며, 특히 固體培養에서 뚜렷이 나타나는 Rb<sub>1</sub>은 懸濁培養에서는 거의 검출되지 않았으며, 조사포닌의 含量 또한 固體培養에 비해 매우 적었다(Table 4-12).

Table 4-12. Effect of light condition on the ginsenoside contents of ginseng PG-4 cells cultured on the medium containing 3mg/l IBA for 10 days.

Culture type	Light intensity (lux)	Crude saponin (mg/g D. W)	Ginsenosides(mg/g DW)					
			Rb <sub>1</sub>	Rb <sub>2</sub>	Rc	Rd	Re	Rg <sub>1</sub>
Suspension culture	0	47.2	—	—	9.23	5.43	7.73	1.81
	1,000	48.6	—	—	10.83	1.08	2.00	1.08
Solid culture	0	72.0	10.76	13.51	8.10	5.72	3.71	3.45

다. 2, 4-D 대체 生長調節物質에 의한 人蔘細胞의 사포닌 含量 변화  
 液體培養時 2, 4-D 대체 生長調節物質로 使用한 IBA, IAA의 濃度를 3mg/ℓ  
 로 하였을 때 培養時期別로 사포닌 含量을 調査하였던 바, IBA는 培養 10일後의  
 사포닌의 含量은 47.2mg/g DW로서 27일간 培養한 細胞의 사포닌 含量 15.7mg  
 /g DW보다 31.7%가 많았고, IAA는 培養 10일, 27일 각각 32.6mg/g DW와  
 31.6mg/g DW로서 사포닌의 含量에 變化가 없었으며, 특히 IBA 處理시에는  
 ginsenosides Rc, Rd, Rg<sub>1</sub>이 IAA 處理보다 훨씬 많은 傾向을 보였다(Table 4-13).  
 사포닌의 合成에 作用하는 IBA와 IAA의 차이를 보면 IAA는 사포닌 含量이 培  
 養時期에 關係없이 일정한 반면에 IBA는 培養期間이 길어짐에 따라 사포닌 含  
 量이 減少하는 傾向으로서 IBA가 사포닌 生合成에 중대한 역할을 하는 것으로  
 생각되어진다.

Table 4-13. Effect of the culture time on the ginsenoside contents of gin-  
 seng cells cultured on the media containing 3mg/ℓ IBA and  
 IAA under the dark condition.

Phytohor- mone type	Days after culture (lux)	Crude saponin (mg/g DW*)	Ginsenosides (mg/g DW*)					
			Rb <sub>1</sub>	Rb <sub>2</sub>	Rc	Rd	Re	Rg <sub>1</sub>
IBA	10	47.2	—	—	9.23	5.43	7.73	1.81
	27	15.0	—	—	2.47	1.83	2.51	0.74
IAA	10	32.6	—	—	1.34	4.46	6.18	0.68
	27	31.6	—	—	3.20	2.73	4.26	0.58

\*, DW : Dry weight

### 3. 사포닌 高含有 細胞株의 選拔

#### 가. $\gamma$ -ray 處理에 의한 變異體 選拔

植物培養細胞를 利用하여 有用한 二次代謝產物을 大量生産하기 위해서는 각종 培養 및 環境條件을 적절히 조절함으로써 정상培養細胞로부터 다소의 物質生産 증대를 기할 수 있으나 生産性에 한계가 있기 때문에 有用한 物質高含有 細胞株를 選拔하여 使用함으로써 生産性의 극대화를 기할 수 있다. 有用物質 高含有 細胞株 育성 方法으로는 (1) 器内에서 자연발생하는 突然變異體를 選拔하는 cloning 方法과 (2) 培養細胞에 chemical 혹은 physical mutagen을 處理하여 발생하는 突然變異體를 選拔하는 方法, 그리고 (3) 이미 育성된 有用物質高含有 혹은 특징적인 품종이나 계통의 植物기관을 器内培養하여 選拔하는 方法등을 들 수 있다. 本實驗은 人蔘 培養細胞로부터  $\gamma$ -ray 變異體를 選拔하기 위해서 전기 懸濁培養 實驗結果로 나타난 cell density 2%, 20일 培養한 人蔘 細胞를 low melting agarose 方法에 의하여 培養하여 形成된 人蔘 callus에  $\gamma$ -ray를 0, 1, 2, 3, 4, 5kR로 각각 處理하여 callus 生長정도를 調査하였던 바, 4kR 이상의 선량에서는 모두 치사하였고, 3kR에서는 극소수의 callus가 생존하였으나 生長이 불량하였다(Table 4-14). 그래서 人蔘 細胞의 變異體를 획득하기 위해서는 2-3kR정도 處理한 細胞群에서 選拔하는 것이 바람직한 것으로 생각되었다.

Table 4-14. Effect of  $\gamma$ -ray dose on the growth of ginseng callus.

Dose(kR)	Growth*
1	++++
2	++
3	+
4	-
5	-

\* +++++, Excellent growth : ++, good growth : +, poor growth : -, no growth.

$\gamma$ -ray 處理에 의해서 사포닌 高含有細胞株를 選拔하기 위해서 상기 實驗結果로 나타난  $\gamma$ -ray 2kR에서 處理된 人蔘 callus를 單細胞로 유기하여 계속 계대培養한 後 增殖시켜 單一細胞株로 選拔된 300개의 細胞株중에서 生長量이 良好하며 사포닌의 含量이 많은 13개의 細胞株를 選拔하였으며 자연산 人蔘根보다 사포닌의 含量이 많은 194번과 219번 單一細胞株를 選拔하였다(Table 4-15). 그러나 *in vitro* 培養에서는 계속해서 培養하게 되면 목적으로 하는 二次代謝產物의 生産이 저하되는 境遇가 많기 때문에 選拔한 사포닌 高含有細胞株는 계속해서 安定성을 調査하면서 도태와 選拔을 하여야 할 것으로 생각된다.

Table 4-15. Content of saponin in cell lines cultured on the medium with 3mg/l 2, 4-D after irradiation of  $\gamma$ -ray.

Cell lines	Content of saponin (%)	Cell lines	Content of saponin (%)
Ginseng root	2.782	R170	2.012
R15	2.661	R188	2.102
R40	2.181	R189	2.265
R43	2.418	R194	2.988
R67	2.276	R197	2.719
R76	2.223	R195	2.007
R80	2.603	R219	2.982

#### 나. 化學物質 處理에 의한 變異體 選拔

化學物質 處理에 의해서 變異體를 選拔하는 方法에는 (1) amino acid를 단독 및 혼용하여 使用하거나 amino acid analogue를 使用하는 方法, (2) nucleic acid base analogues (3) antibiotics, herbicides, heavy metals, toxic compound (4) phy-

totoxins, salt, drought, extreme temperatures 등 stress conditions 등이 사용되고 있다. 本實驗에서는 주로 amino acid analogues, nucleic acid base analogue와 toxic compound를 사용하여 人蔘 callus로부터 사포닌 高含有細胞株를 選拔하고자 하였다. 우선 amino acid analogue인  $\alpha$ -methyl-D.L methionine 添加에 의해서 細胞株를 選拔하고자 濃度別로 培地에 添加한 後 30일간 固體培養하여 生體重과 사포닌의 含量을 調査한 結果,  $\alpha$ -methyl-D.L methionine의 濃度가 대단히 높은 100mg/ℓ에서도 다소 生長이 가능하였으며(Table 4-16). 사포닌의 含量은 濃度가 增加할수록 減少하는 傾向이었으나 80mg/ℓ 이상부터는 增加하는 것으로 나타났는 바, 細胞株 選拔을 위한  $\alpha$ -methyl-D.L methionine의 濃度는 80mg/ℓ로 하여 處理하는 것이 좋을 것으로 생각되었다(Table 4-16).

Table 4-16. Effect of  $\alpha$ -methyl-D.L methionine ofn the content of saponin in ginseng callus.

Conc. of $\alpha$ -methyl-D.L methionine(mg/ℓ)	Fresh weight of callus (g/flask)	Content of saponin (%)
0	8.426 ± 0.473	2.211
5	5.872 ± 0.395	1.970
10	4.462 ± 0.670	1.469
30	5.288 ± 0.465	1.438
50	6.594 ± 0.684	1.191
80	4.973 ± 0.468	2.768
100	4.925 ± 0.457	2.886
Ginseng root(6 years)		4.533

또한 D, L-norleucin은 80mg/ℓ 이상부터는 生體重이 절반이상 減少되었으며, 100mg/ℓ의 高濃度에서도 生長이 가능하였고, 사포닌 含量도 다소 減少하는 傾向을 보여, D, L-norleucine의 境遇에는 100mg/ℓ에서 選拔하는 것이 좋을 것으로 생각된다(Table 4-17).

Table 4-17. Effect of D.L-norleucine on content of saponin in ginseng callus

Conc. of D.L-norleucine (mg/ℓ)	Fresh weight of callus (g/flask)	Content of saponin (%)
0	8.426 ± 0.473	2.131
5	8.451 ± 0.853	2.446
10	6.314 ± 0.583	2.447
30	5.445 ± 0.673	2.385
50	5.937 ± 0.981	2.910
80	4.573 ± 0.490	2.780
100	3.750 ± 0.164	2.922
200	1.701 ± 0.103	4.533
Ginseng root(6 year)		4.533

Amino acid analogue 중에서도 specific selection에 사용되는 D.L- $\rho$ -fluoro phenylalanine( $\rho$ -FP)은 chorismate mutase의 활성을 증가시킴으로써 phenylalanine의 合成이 촉진되고, 결국 phenylalanine ammonia lyase 활성을 증가시키는데 사용되는 것으로 알려져 있다. 本實驗에서는 D.L- $\rho$ -fluorophenylalanine( $\rho$ -FP)을 濃度別로 處理하여 callus의 生長量 및 사포닌의 含量을 調査하였던

바, 生體重은 處理濃度가 增加할수록 減少하는 傾向이었으며, 사포닌 含量은 處理간에 유의성 있는 차이가 없었다(Table 4-18).

Table 4-18. Effect of D.L- $\rho$ -fluorophenylalanine( $\rho$ -FP) on the growth and content of saponin in ginseng callus.

Conc. of $\rho$ -FP ( $\mu$ M)	Fresh weight of callus (g/flask)	Content of saponin (%)
0	12.04 $\pm$ 0.88	2.581
1	10.89 $\pm$ 0.37	3.022
1	10.89 $\pm$ 0.37	3.022
5	10.22 $\pm$ 0.81	2.553
10	9.84 $\pm$ 0.70	3.169
20	8.55 $\pm$ 0.38	2.944
40	7.94 $\pm$ 0.54	3.195
60	5.35 $\pm$ 0.33	2.545
80	4.43 $\pm$ 0.09	2.756
Ginseng root(6 years)		4.583

또한 nucleic acid base analogue인 aminopterin은 dihydrofolate reductase의 효소의 활성을 변화시키는 것으로 보고되어 있는 바, 本實驗에서는 aminopterin을 濃度別로 處理하여 사포닌 合成에 影響을 미치는 變異體를 選拔하고자 하였다. Table 4-19에서 보면 aminopterin 5mM이상에서는 callus의 生體重에 절반이상 減少되었으며 또한 사포닌의 含量도 減少되는 傾向을 보여 사포닌 高含有細胞株 選拔에는 거의 效果가 없는 것으로 나타났다.

Table 4-19. Effect of aminopterin on the growth and content of saponin in ginseng callus.

Conc. of Aminopterin (mM)	Fresh weight of callus(g/flask)	Content of saponin (%)
0.0	6.59 ± 0.19	2.119
0.1	7.03 ± 1.13	1.924
0.5	7.57 ± 1.05	2.119
1.0	5.39 ± 1.15	2.093
5.0	3.15 ± 0.54	1.544
10.0	4.41 ± 0.93	1.506
20.0	2.25 ± 0.18	1.377
Ginseng root(6 years)		4.533

Nitrate reductase(NR)와 nitrite reductase의 활성에 의해서 nitrate를 ammonium으로 변환시키는 nitrate 대사경로는 대부분의 植物에서 무기태질소를 유기물로 바꾸는 중요한 경로이다. Nitrate만 nitrogen source로 사용할 때 生長할 수 없는 NR deficient mutant 選拔研究가 많이 보고되어 있어 本實驗에서는 NR deficient 選拔에 사용되는 potassium chlorate를 利用하여 사포닌 高含有細胞株를 選拔하고자 하였다. 그러나 potassium chlorate는 10mM의 低濃度에서도 生長이 매우 불량하였고 사포닌의 合成에도 影響 미치지 않았다(Table 4-20).

Table 4-20. Effect of potassium chlorate on the growth and content of saponin in ginseng callus.

Conc. of potassium chlorate(mM)	Fresh weight of callus(g/flask)	Content of saponin (%)
0.0	6.59 ± 0.19	2.119
0.1	7.03 ± 1.13	1.924
0.5	7.57 ± 1.05	2.119
1.0	5.39 ± 1.15	2.093
5.0	3.15 ± 0.54	1.544
10.0	4.41 ± 0.93	1.506
20.0	2.25 ± 0.18	1.377
Ginseng root(6 years)		4.533

상기 實驗結果 사포닌 高含有細胞株 選拔에 가장 效果的인 化學物質은  $\rho$ -FP 였으며, 그 다음이 D.L - norleucine,  $\alpha$  - methyl - D.L methionine 이었고 potassium chlorate와 aminopterin은 거의 效果가 없었다.

다. 人蔘의 우수육성계통으로 부터 사포닌 高含有 細胞株의 選拔  
 人蔘의 우수계통으로 부터 사포닌 高含有 細胞株를 選拔하기 위해서 포장에서 내병성, 다수성등의 특징을 보유하고 있는 육성된 人蔘계통등 총 18계통의 6년 생 人蔘뿌리 組織을 器内에서 培養하여 사포닌의 生産性이 높은 callus群을 選拔하였다. 2, 4-D가 3mg/l 添加된 MS培地에 멸균된 人蔘組織절편을 接種하여 callus를 유도한 結果 모두 callus가 形成되긴 하였으나 生長속도는 계통간에 매우 차이가 있었다. 그중에서 다수성인 육성계통 20601이 callus의 유기 및 生長속도가 가장 빨랐으며, 增殖도 良好하였다. 유기된 人蔘 callus를 계속 계대培養하면 계통에 따라 계속 生長이 되지않고 갈변화 현상이 일어나 빨리 노화되는

callus群이 많았는데 이는 植物호르몬의 요구도가 각각 다를 것으로 사료되어 追後 계통간의 새로운 植物호르몬 濃度を 결정하여야 할 것으로 생각되었다. Callus의 生長이 비교적 良好한 細胞株에 대해서 사포닌의 含量을 測定한 結果 20610과 JY104에서 사포닌 含量이 많았다(Table 4-21).

Table 4-21. Content of saponin in superior line calli cultured on the medium with 3mg/l 2, 4-D.

Superior lines	Content of saponin (%)	Superior lines	Content of saponin (%)
20401	1.464	Y0501	3.320
20501	3.701	Y0101	4.146
20601	5.746	JY104	4.483
30101	2.108	Y0106	3.090
101	3.233	G901	2.399
301	2.545	WO101	2.035
YO101	2.144	UR101	2.363
YO201	2.799	<i>Panax quinquefolium</i>	2.472
YO301	1.780	Ginseng root(6 years)	3.290

라. *A. tumefaciens*에 의한 人蔘의 形質轉換

*A. tumefaciens* C58 균주를 人蔘의 잎과 줄기 그리고 뿌리에 상처를 주고 접종하였던 바, 접종 20일경 부터는 crown gall이 形成되기 시작하였으며 각 부위 모두 crown gall tumor가 형성되었다. 形成된 tumor의 形態는 부위에 따라 다소 다르게 나타났는데 잎과 줄기에 形成된 tumor는 callus 組織과 비슷하였고 뿌리에 形成된 tumor는 대단히 치밀한 組織形態를 나타내었다. 이런 원인은 *Agro-*

*bacterium*의 Ti-plasmid에 존재한 T-DNA가 植物組織내로 도입되어 形成된 植物 hormone과 植物자체내에서 생성되는 植物 hormone이 혼합하여 作用함으로써 組織에 따라 形態가 다르게 나타난 것으로 생각된다. 일반적으로 IAA는 주로 자엽이나 줄기 부위에서 많이 생성되고 뿌리부근에서는 cytokinin이 주로 形成되는 관계로 뿌리에 cytokinin이 많아 단단한 상태로 tumor가 形成된 것으로 생각된다. 形成된 crown gall tumor 組織을 절취하여 멸균한 다음에 植物 hormone 無添加 培地에 치상하여 callus 유기를 유도하였으나 잎고 줄기에 形成된 tumor 組織은 전혀 반응을 나타내지 않고 그대로 있다가 노화되어 고사하였으나 2,4-D 1mg/ℓ 처리구에서 약 5% 정도가 tumor callus를 形成하였다. 반면에 정상組織은 85% 이상의 탈분화능을 나타내었다(Table 4-22).

Table 4-22. Callus induction from normal and tumor root tissues cultured on the media with 2, 4-D.

Conc. of 2, 4-D(mg/ℓ)	Explant	Callus induction (%)
1	Normal	86.4
	Tumor	4.9
3	Normal	89.1
	Tumor	0
5	Normal	93.0
	Tumor	0

Ti-plasmid의 T-DNA내에서는 植物 hormone을 생성하는 유전자가 삽입되어 있기 때문에 形質轉換體는 植物 hormone 無添加 培地에서 탈분화가 잘되며 탈분화된 callus 역시 동일 培地에서 왕성히 잘 자라게 된다. 그러나 人蔘에 形成된 tumor 組織은 植物 hormone 無添加 培地에서는 물론 정상 人蔘 callus에서

는 매우 민감하게 生長반응을 나타내는 2, 4-D 添加培地에서조차도 탈분화가 잘 되지 않았기 때문에 뿌리에서 유기된 tumor callus를 대상으로 외생 hormone을 添加하여 나타나는 반응 정도를 究明하기 위해서 IAA, NAA, 2, 4-D를 각각 濃度別로 달리 處理하여 30일간 광상태에서 培養하여 그 生體重을 測定한 結果, auxin의 종류에 관계없이 모두 濃度の 增加에 따라 生長量이 減少하는 傾向을 보였다(Table 4-23).

Table 4-23. Effect of auxins on the growth of ginseng tumor callus.

Phytohormone	Concentration (mg/ℓ)	Fresh weight (g)
IAA	0	1.62
	1	1.46
	3	1.58
	5	1.38
NAA	1	1.51
	3	1.50
	5	1.10
2, 4-D	1	1.58
	3	1.38
	5	1.15

일반적으로 固體培養과 懸濁培養간에는 組織細胞의 生長에 큰 차이가 있으므로 이상의 固體培養을 기초로 하여 人蔘의 tumor callus와 정상 callus를 懸濁培養하여 生長양상을 調査하였다. 250ml Erlenmeyer flask에 100ml씩 培地씩 培地에 넣고 callus를 각각 1g씩 동일하게 inoculation하여 30일간 懸濁培養한 後에 生長

량을 調査한 結果 tumor callus는 4.887g, 정상 callus는 2.185g으로서 tumor callus가 정상 callus에 비하여 약 2배정도 生體重이 많았으며 건물중은 3.5배 가량 增加하였다(Table 4-24).

Table 4-24. Fresh and dry weight of ginseng tumor and normal calli in suspension culture.

Callus	Fresh weight(F) callus(g/flask)	Dry weight(D) (g/flask)	D/F
Tumor callus(T)	4.887	0.337	0.069
Normal callus(N)	2.185	0.096	0.044
T/N	2.237	3.510	1.568

특히 懸濁培養時 人蔘 callus의 增殖形態가 매우 특이한 현상을 보였는데 정상 callus의 境遇에는 friable하고 單細胞 혹은 작은 colony 形態로 있었으나 tumor callus의 形態는 細胞들이 뭉쳐서 둥근모양의 組織덩어리 形態로 관찰되었으며 매우 딱딱한 callus의 양상을 보였다. 그리고 人蔘組織이 wilde type T-DNA에 의하여 形質轉換 되었을 境遇 人蔘의 主要成分인 saponin 含量에 어떤 변화를 가져오는지를 究明하기 위해서 crude saponin 含量과 ginsenoside別로 含量을 測定하였다. 人蔘 callus 組織의 crude saponin 含量을 보면 tumor callus가 31.2 mg/g, 정상 callus가 13.1mg/g, 재배人蔘 뿌리가 28.3mg/g으로써 tumor callus가 가장 높았다(Table 4-25). 그리고 ginsenoside 含量을 보면 normal callus에서는 Rb<sub>1</sub>와 Rc가 거의 검출되지 않았으나 tumor callus의 境遇에는 재배人蔘 뿌리와 마찬가지로 모든 ginsenoside가 고루 함유되어 있었으며, 그 含量은 재배人蔘 뿌리보다 적었다(Table 4-25).

Table 4-25. Contents of ginsenosides of crown gall tumor and normal calli induced from ginseng root.

Callus	Crude saponin	Ginsenoside(mg/ℓ)						
		Rb <sub>1</sub>	Rb <sub>2</sub>	Rc	Rd	Re	Rg <sub>1</sub>	Total
Tumor callus	31.2	0.82	0.50	0.55	1.38	2.36	1.02	6.63
Normal callus	13.1	0.25	—	—	0.20	0.29	0.26	1.00
Ginseng root	28.3	3.29	2.00	2.07	1.41	4.17	1.38	14.32

最近 Ri-plasmid에 의해 形質轉換된 hairy root 組織에서 二次代謝産物を生産코자 하는 研究가 많이 시도되고 있는데<sup>4)</sup> 식물 hormone이 전혀 添加되지 않은 培養기에서 자란 hairy root는 자연산 人蔘뿌리와 saponin 含量이 비슷하였으며, IBA를 添加한 培地에서는 2배정도 많은 傾向을 보였다. 또한 kamada 등<sup>7)</sup>에 의하면 Ri-plasmid에 의하여 形質轉換된 연초 hairy root에서는 *in vitro*에서 자란 정상뿌리보다 10배정도 많은 alkaloid 含量을 함유하고 있었으며 자연산 뿌리와는 비슷한 傾向을 보여 本實驗과 유사한 傾向을 보고하였으며 hamill 등<sup>8)</sup>도 *Bata vulgaris*의 hairy root에서 자연산 뿌리보다 betacyanin과 betaxanthin의 含量이 거의 비슷하거나 다소 많은 傾向을 보고하였다. 반면 연초 *N. rustica*에서는 hairy root가 오히려 자연산 뿌리보다 약 2-3배 정도 nicotin 含量이 많음을 보고하여<sup>8)</sup> 二次代謝産物에 따라서 차이가 있음을 시사하였다. 한편 sample 채취時期에도 많은 차이가 있을 것으로 사료되는 바, 대부분 培養期間이 오래될 수록 二次代謝産物이 더 많이 축적되는 것으로 보고되어 있어 Yoshikawa 등<sup>9)</sup>은 人蔘 hairy root의 채취時期가 18일 後이고 本實驗에서는 30일 後에 tumor callus 채취하였기 때문에 saponin 含量차이가 상이하진 않았나 생각된다. 또한 培養환경에서도 callus培養시 광과 암상태에 따라서 二次代謝産物에 차이가 있으며 광질에 따라서도 차이가 있을 것으로 보고되어<sup>10)</sup> 實驗室 條件에 따라서 차이가 있을

수 있을 것으로 사료된다. 또 한편으로는 T-DNA에 의하여 形質轉換되어 핵 DNA에 삽입되는 T-DNA의 copy수와 삽입위치에 따라 발현정도가 달라져 hairy root의 clone간에도 서로 차이가 있음을 보고하였는데<sup>10)</sup>, Mono등<sup>10)</sup>은 *Scopolia japonica*의 hairy root의 clone간에는 alkaloid 함량이 적어도 10배이상 차이가 나는 clone이 있다고 하였다. 이는 T-DNA에 의하여 形質轉換될 境遇 T-DNA내의 植物 hormone 自家合成 유전자의 발현에 의하여 植物 hormone의 balance에 따라 二次代謝産物의 증감에 차이가 나타나는 것으로 사료되는 바 Yoshikawa등<sup>21)</sup>이 人蔘 hairy root에 외생 植物 hormone으로 IBA와 kinetin을 추가 添加할 때 生長量도 增加하였지만 saponin 함량이 2배이상 增加함을 보고하여 形質轉換體에도 외생 식물 hormone을 添加함으로써 二次代謝産物의 증감가능성을 시사하였으나 本實驗에서 使用한 tumor callus는 외생 植物 hormone을 添加함으로써 生長량이 급격히 減少하는 傾向을 보였다. 그러나 Mono등<sup>10)</sup>이 보고한대로 clone 간에 차이가 있다고 생각될 때 여러 clone중에서 외생 植物 hormone에 의하여 生長이 增加하며 saponin 함량에도 차이가 있다면 T-DNA에 의하여 形質轉換된 clone을 二次代謝産物 生産을 위한 새로운 cell line으로 活用할 수 있는 가능성을 높여줄 것으로 기대된다. 그러나 saponin 이외의 비saponin 物質의 축적 여부와 T-DNA의 影響으로 생성되는 opine과 다른 物質의 생성과의 관계등이 究明되어야 할 것이며 이에 대해서는 금후 더욱더 광범위한 實驗이 수행되어야 할 것으로 생각된다.

#### 第4節 結 論

人蔘細胞의 器內培養技術을 利用하여 人蔘사포닌을 大量生産하기 위한 研究의 일환으로 우선 (1) 固體培養에 의해서 사포닌의 生産에 미치는 制限요인과 (2) 液體培養을 통한 人蔘細胞의 生長 및 사포닌의 生産에 미치는 각종 植物호르몬 및 광의 효과를 究明하고, 그리고 人蔘사포닌 高含有 細胞株를 器內에서 選拔하

여 사포닌 高生産細胞株를 使用하고자 각종 變異體를 選拔하였던 바, 그 結果를 요약하면 다음과 같다.

### 1. 固體培養 人蔘 callus의 사포닌 含量

- 가. 培養人蔘 callus의 사포닌 含量은 培養 60일까지 有意차가 인정되지 않았다.
- 나. 人蔘 callus의 사포닌 含量에 미치는 cytokinin의 影響을 보면 BA濃度 0.01mg/l에서 사포닌 含量이 가장 높았으며, 사포닌 生産 수율도 가장 높았다.
- 다. Auxin으로 NAA를 添加하였을 境遇에는 NAA 濃度에 關係없이 사포닌 含量의 차이는 인정할 수 없었다.
- 마. 사포닌 生産에 미치는 基本培地의 影響을 보면 SH 培地가 MS 培地에 비하여 사포닌 含量이 높았다.
- 바. 사포닌 生産 수율에 미치는 前驅物質 L-phenylalanine의 影響을 보면 L-phenylalanine 5mg/l 添加區에서 사포닌生産 수율이 가장 높았다.
- 사. 사포닌 生産에 대한 elicitor의 效果를 보면 chitosan과 nigeran은 L-phenylalanine에 비해서 效果가 낮았다.

### 2. 懸濁培養 人蔘細胞의 生長 및 사포닌 含量

- 가. 懸濁培養시 接種量 및 培養時期에 따른 사포닌 變化를 調査한 結果 接種量 2%에서 培養 20일경에 사포닌의 含量이 가장 높았다.
- 나. 人蔘 細胞群의 生長은 液體 培養시 2, 4-D 濃度 1mg/l가 3mg/l보다 良好하였으며, 암 條件에서의 生長이 良好하였다.
- 다. 2, 4-D 대체 生長 조절 物質로 使用한 IBA와 IAA에 의한 人蔘細胞群의 生長量의 차이는 細胞내 生合成된 植物生長調節物質의 生理활성도의 차이에 의하여 일어나며, IBA가 사포닌 合成에 中대한 역할을 하는 것으로 생각된다.

### 3. 사포닌 高含有 細胞株의 選拔

- 가.  $\gamma$ -ray 處理에 의해서 變異體를 얻기 위해서는  $\gamma$ -ray 2-3 kR에서 照射한 後 變異體를 選拔하는 것이 效果的이었다.
- 나.  $\gamma$ -ray 2kR 處理된 人蔘 callus에서 單一細胞株로 選拔된 300개의 細胞株 중에서 生長量이 良好하며 사포닌의 含量이 많은 13개의 細胞株를 選拔하였으며, 자연산 人蔘根보다 사포닌의 含量이 많은 R19번과 R219번 單一細胞株를 選拔하였다.
- 다. 化學物質處理에 의해서 사포닌 高含有細胞株를 選拔하기 위해서는 aminopterin의 境遇에는 1mM의 濃度에서, potassium chlorate는 10mM에서,  $\alpha$ -methyl-D.L. methionine은 80mg/l, D, L-norleucine은 100mg/l의 處理區에서 選拔하는 것이 效果的이었다.
- 라. 사포닌 生産에 가장 效果的인 化學物質은  $\rho$ -FP였으며, 그 다음이 D, L-norleucine,  $\alpha$ -methyl-D.L. methionine, potassium chlorate, aminopterin의 순이었다.
- 마. 人蔘우수계통으로 부터 사포닌 高含有 細胞株인 20601, JY104 細胞群을 選拔하였다.
- 바. *A. tumefaciens* C58에 의해서 人蔘組織은 부위에 관계없이 crown gall tumor가 形成되었으며, 人蔘 tumor callus는 基本培地에 外生 hormone을 添加함으로써 오히려 callus의 生長이 減少하였다.
- 사. 人蔘 tumor callus는 정상 callus보다 液體培養에서는 2배가량 生長量이 많았다.
- 아. 人蔘 形質轉換 callus는 정상 callus보다 crudesaponin 含量이 3배정도 많았으며 ginsenoside pattern도 재배人蔘 뿌리와도 비슷한 傾向을 보였다.

## 참 고 문 헌

1. Chilton, M.D., M.H. Drummond, D. J. Merlo and E.W. Nester. 1978. Highly conserved DNA of Ti-plasmids overlaps T-DNA maintained in plant tumors. *Nature* 275 : 147-149.
2. Choi, K.T. and D.C. Yang. 1987. Characteristics of the growth of ginseng tumor callus. *Korean J. Ginseng Sci.* 11(1) : 56-65.
3. Fujita, Y., Jara, C. Suga and T. Morimoto. 1981. Production of sikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Reports*. 1 : 61-63.
4. Furuya, T., H. Kojima, K. Syono and T. Ishill. 1970. Isolation of Panaxatriol from *Panax ginseng* callus. *Chem. Pharm. Bull.* 18(11) : 2371-2372.
5. Furuya, T., H. Kojima, K. Syono and T. Ishill. K. Uotani and M. Nishio. 1973. Isolation of saponin and sapogenins from callus tissues of *Panax ginseng*. *Chem. Pharm. Bull.* 21(1) : 98-101.
6. Furuya, T., Yoshikawa, T., Ishill, T., and Kajii, K. 1983. Effects of auxins of growth and saponin production in callus cultures of *Panax ginseng*. *Planta Medica* 47 : 183-187.
7. Hagimori, M., T. Matsumoto, and Y. Obi. 1982. Studies on the production of digitalis cardenolides by plant tissue culture. *Plant Physiol.* 60 : 653-656.
8. Hamill, J.D., A.J. Parr, R.J. Robins and M.J.C. Rhodes. 1986. Secondary product formation by cultures of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports*. 5 : 111-114.
9. Ibrahim, K. M., H.A. Collin and J.C. Collins. Selection for salt tolerance in regenerant cultures of *Coleus blumei*. *Acta Horticulturae* 28 : 425-430.

10. Kamada, H., N. Okamura, M. Satake, H. Harada, and K. Shimomura. 1986. Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. *Plant Cell Reports*. 5 : 239–242.
11. Krishnamoorthy, H. N. 1981. Chapter 3. Cytokinin “In Plant Growth Substances” published in Tata McGraw-Hill, New Delhi, p. 97.
12. Laneri, U., R. Franconi and P. Altavista. 1990. Somatic mutagenesis of *Gerbera jamesonii* hyvr : irradiatio and *in vitro* culture. *Acta Horticulturae* 28 : 395–402.
13. Payne, J., M.J.C. Rhodes and R.J. Robins. 1987. Quinoline alkaloid production by transformed cultures of *Cinchona ledgeriana*. *Planta Medica*. 367–372.
14. Ronins, R.J., J.D. Hamill, A.J. Parr. K. Smith, N.J. Walton and M.J.C. Rhodes. 1987. Potential for use of nicotinic acid as a selective agent for isolation of high nicotine –producing lines of *Nicotiana rustica* hairyres. *Plant Cell Reports*. 6 : 122–126.
15. Sanada, S., N. Kondo, J. Shoji, O. Tanaka and S. Shibata. 1974. Studies on the saponins of ginseng. I. Structures of ginsenoside –Ro, –Rb<sub>1</sub>, –Rb<sub>2</sub>, –Rc and –Rd. *Chem. Pharm. Bull.* 22(2) : 421–428.
16. Sanada, S., N. Kondo, J. Shoji, O. Tanaka and S. Shibata. 1974. Studies on the saponins of ginseng. II. Structures of ginsenoside –Re, –Rf and –Rb<sub>2</sub>. *Chem. Pharm. Bull.* 22(10) : 2407–2412.
17. Sala, R., and G. Baratta. 1990. Somaclonal variation and chemically induced mutagenesis for the production of salt and drought tolerance in tomato. *Acta Horticulturae* 28 : 353–360.
18. Suzuki, T., T. Yoshioka, M. Tabata and Y. Fujita. 1987. Potential of *Datura*

- innoxia* cell suspension cultures for glucosylating hydroquinone. Plant Cell Repts 6 : 275–278.
19. Osamu, T. 1977. Recent studies on the chemistry of ginseng saponins. Korea. J. Ginseng Sci. 2(2) : 9–15.
  20. Tarao, S., K. Kato, M. Shiraishi and H. Morimoto. 1979. Sunthesis of ubiquinones. 2. An efficient preparation of ubiquinone –10. J. Org. Chem. 44(5) : 868–869.
  21. Yoshikawa, T. and T. Furugya. 1987. Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Reports. 6 : 449–453.

## 第5章 要 約

原形質體 融合技法을 利用하여 神祕의 靈藥인 人蔘의 새로운 品種을 育成하기 위한 研究의 일환으로 우선 電氣衝擊에 의한 原形質體融合을 시도하였으며, 人蔘培養 과정중의 주요 代謝產物의 變化를 調査하였으며, 또한 人蔘細胞의 器內培養技術을 利用하여 人蔘사포닌을 大量生産하기 위한 研究의 일환으로, 固體培養에 의해서 사포닌의 生産에 미치는 制限요인 究明과 液體培養을 통한 人蔘細胞의 生長 및 사포닌의 生産에 미치는 각종 植物 호르몬 및 광의 效果 그리고 人蔘사포닌 高含有 細胞株를 器內에서 選拔하여 사포닌 高生産細胞株로 使用하고자 각종 變異體를 選拔하였던 바, 그 結果를 요약하면 다음과 같다.

1. 裸出原形質體는 培養 40時間後 부터는 細胞分裂이 시작되었으며, 培養 3 週後에는 細胞群들이 形成되었다.
2. DC 電氣場에서 人蔘原形質體의 生存率은 電氣場의 세기에 따라 전반적으로 減少하였다.
3. 電氣場의 세기에 따른 人蔘原形質體의 融合率은 1kv/cm 부근에서 가장 融合率이 높았으며, fusion facilitator로는 1mM spermin의 添加가 가장 좋았다.
4. 人蔘原形質體 및 무우원형질체의 buoyant density는 1.0447kg/ℓ~1.0718 mg/ℓ 사이에 고루 분포하고 있어 gradient centrifugation에 의해 heterokaryons의 選拔이 가능하였다.
5. 人蔘 培養細胞와 무우 엽육細胞에서 遊離시킨 原形質體를 電氣衝擊을 가해 본 結果 AC 電氣場에서 이웃하는 細胞끼리 서로 pearl chain을 이루며 DC 충격에 의해 60초 後 細胞膜의 融合이 이루어졌다.

6. Sucrose와 2, 4-D의 濃度가 增加함에 따라 體細胞胚 발생이 촉진되는 傾向을 보였다.
7. 細胞의 生體重은 培養後 점차 增加하여 培養後 6개월에서 최대치를 보인 다음 減少하였다.
8. 단백질은 培養初期에 높았으나 3개월이후 減少하여 낮은 상태를 유지하였으며 體細胞胚가 발생되면서 급증하였다.
9. 지방산은 培養期間이 경과함에 따라 含量이 서서히 減少하다가 體細胞胚 발생과 더불어 급증하였다.
10. 페놀류는 培養後 4개월에 이르러 최대치를 보이다가 減少하였다.
11. 환원物質은 培養중기까지 增加하였다가 후기에는 減少하였다.
12. 과산화지질은 培養이래 낮은 含量을 유지하다가 體細胞胚 발생과 더불어 급증하였다.
13. 培養人蔘 callus의 사포닌 含量은 培養 60일까지 유의차가 인정되지 않았다.
14. 人蔘 callus의 사포닌 含量에 미치는 cytokinin의 影響을 보면 BA濃度 0.01 mg/l에서 사포닌 含量이 가장 높았으며, 사포닌 生産수율도 가장 높았다.
15. Auxin으로 NAA를 添加하였을 境遇에는 NAA 濃度에 관계없이 사포닌 含量의 차이는 인정할 수 없었다.
16. Sucrose 濃度別 사포닌 生産수율을 보면 sucrose 30g/l 添加區에서 가장 높은 傾向을 보였다.
17. 사포닌 生産에 미치는 基本胚地의 影響을 보면 SH培地가 MS培地에 비하여 사포닌 含量이 높았다.
18. 사포닌 生産수율에 미치는 前驅物質 L-phenylalanine의 影響을 보면 L-phenylalanine 5mg/l 添加區에서 사포닌 生産수율이 가장 높았다.
19. 사포닌 生産에 대한 elicitor의 效果를 보면 chitosan과 nigeran은 L-phenylalanine에 비해서 效果가 낮았다.

20. 懸濁培養時 接種량 및 培養時期에 따른 사포닌 變化를 調査한 結果 接種량 2%에서 培養 20일경에 사포닌의 含量이 가장 높았다.
21. 人蔘 細胞群의 生長은 液體培養時 2, 4-D 濃度 1mg/ℓ가 3mg/ℓ보다 良好하였으며, 暗條件에서의 生長이 良好하였다.
22. 2, 4-D 대체 生長調節物質로 使用한 IBA와 IAA에 의한 人蔘 細胞群의 生長量의 차이는 細胞내 生合成된 植物生長調節物質의 生理활성도의 차이에 의하여 일어나며, IBA가 사포닌 合成에 中대한 역할을 하는 것으로 생각된다.
23.  $\gamma$ -ray 處理에 의해서 變異體를 얻기 위해서는  $\gamma$ -ray를 2-3kR에서 照射한 後 變異體를 選拔하는 것이 效果的이었다.
24.  $\gamma$ -ray 2kR 處理된 人蔘 callus에서 單一細胞株로 選拔된 300개의 細胞株 중에서 生長量이 良好하며 사포닌의 含量이 많은 13개의 細胞株를 選拔하였으며, 自然산 人蔘根보다 사포닌의 含量이 많은 R194번과 R219번 單一細胞株를 選拔하였다.
25. 化學物質處理에 의해서 사포닌 高含有細胞株를 選拔하기 위해서는 aminopterin의 境遇에는 1mM의 濃度에서, potassium chlorate는 10mM에서,  $\alpha$ -methyl-D.L. methionine은 80mg/ℓ, D,L-norleucine은 100mg/ℓ의 處理區에서 選拔하는 것이 效果的이었다.
26. 사포닌 生産에 가장 效果的인 化學物質은  $\rho$ -FP였으며, 그 다음이 D,L-norleucine,  $\alpha$ -methyl-D.L. methionine, potassium chlorate, aminopterin의 순이었다.
27. 人蔘 우수계통으로부터 사포닌 高含有 細胞株인 20601, JY104 細胞群을 選拔하였다.
28. *A. tumefaciens* C58에 의해서 人蔘組織은 부위에 관계없이 crown gall tumor

가 形成되었으며, 人蔘 tumor callus는 基本培地에 外生 hormone을 添加 함으로써 오히려 callus의 生長이 減少하였다.

29. 人蔘 tumor callus는 정상 callus보다 液體培養에서는 2배가량 生長량이 많았다.

30. 人蔘 形質轉換 callus는 정상 callus보다 crude saponin 含量이 3배정도 많았으며 ginsenoside pattern도 재배人蔘 뿌리와의 비슷한 傾向을 보였다.