

최 종
연구보고서

야생마의 세포배양을 통한 Dioscin
대량생산 시스템 개발
Development of Dioscin Mass Production
System through *In Vitro* Culture of
Dioscorea nipponica Makino

연구기관
안동대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “야생마의 세포배양을 통한 Dioscin 대량생산 시스템 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 11월 7일

주관연구기관명 : 안동대학교

총괄연구책임자 : 권 순 태

세부연구책임자 : 손 건 호

세부연구책임자 : 손 호 용

연 구 원 : 안 정 희

연 구 원 : 전 수 진

연 구 원 : 김 영 숙

연 구 원 : 금 은 주

위탁연구기관명 : 경희대학교

위탁연구책임자 : 양 덕 춘

참여기업명 : 엠디바이오알파

요 약 문

I. 제 목

야생마의 세포배양을 통한 Dioscin 대량생산 시스템 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

- 자생하는 마과식물의 dioscin 함량분석을 통한 고생산성 자원의 탐색
- Dioscin 고 생산 식물체의 세포배양, 고 생산 배양주 선발 및 유용물질의 대량 생산을 위한 elicitor 개발
- Dioscin 고 생산 배양주를 활용한 biomass의 대량 생산 및 물질의 기내 생산 시스템 확립
- 대량생산된 biomass로부터 dioscin의 순수정제 및 산업화에 이용

2. 연구개발의 필요성

마과에 속한 식물 중 야생종은 부채마, 도꼬로마, 참마, 각시마, 단풍마 등과 같이 다양하나, 재배마는 *D. opposita* Thunb. 또는 *D. batatas*로 분류되는 한 종만이 재배되고 있다. 재배 마의 함유성분은 전분이 생체중의 약 8~24%, 점질물이 약 0.6~2.4%를 차지하며, 점질물은 당 단백질의 일종인 mucin과 미량의 비타민(B1, C)을 함유한다. 마의 약용성분으로는 amylose, cholin, saponin 등이며, 한방에서는 신체허약, 폐결핵, 정력부족, 야뇨증, 설사, 당뇨병, 대하증 등에 쓰이고 있다.

최근 들어 마는 가공식품이 다양하게 개발되어 약용뿐만 아니라 건강식품으로도 중요한 위치를 차지하며 재배면적은 약 318 ha로 1990년대 초의

83.4ha보다 4.5배가 증가하였다. 전국의 마 재배 면적 중 약 69%인 269ha가 안동, 영주, 봉화를 중심으로 한 경북북부지역에서 재배되고 있으며, 그 생산량은 1,702톤에 달하여 경북북부지역의 중요한 소득작물이다.

최근 야생마와 재배마의 saponin 함량 비교 연구에서 야생마인 부채마와 단풍마가 재배마보다 강력한 항암활성을 가진 dioscin의 함량이 각각 약 150배 또는 20배 많다고 보고 되었다. Dioscin은 여러 가지 약용식물의 주요 약리성분으로 항돌연변이원성작용, 항암작용, 항염증의 지표인 phospholipase A2 저해작용 등의 다양한 생리활성이 보고 되고 있다.

항암활성 물질의 대량생산과 상업화는 시장성이 넓고 고부가가치를 창출하여 상업적으로도 엄청난 파급효과를 가져오기 때문에 선진국을 중심으로 한 연구기관 및 기업체 연구소에서 이 분야에 집중적인 투자를 하고 있는 실정이다. 특히 우리나라의 마는 1991년도에 비해 재배면적이 5배 가량 증가하였는데, 경상북도 북부지역은 전국의 마 생산량의 약 70%를 차지하여 이 지역은 1992년 8월 농림부고시에 의해 마 주산지로 지정된바 있다. 항암활성물질인 dioscin의 기내생산 시스템의 개발에 의한 물질의 대량 생산 및 상업화는 마의 효능에 대한 인식의 제고로 마의 소비촉진을 초래할 것이며 이는 농가소득 증대 방안이 될 것이다.

마의 주요 약리성분이면서 강력한 항암활성을 지닌 dioscin이 야생마에는 다량 함유되어 있으나 재배마에는 그 성분이 아주 미약하여, 야생마의 세포대량 배양법을 이용한 dioscin을 기내에서 대량생산하는 시스템을 개발함으로써 기내배양에 의한 고부가의 유용물질을 산업화하는 방안을 모색할 필요성이 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 야생 및 재배마의 dioscin 탐색 및 함량분석 : 재배마 및 야생 수집종의 dioscin 함량을 조사하여 고 함유 종을 선발하며, 식물체로부터 dioscin을 순수 정제하는 체계를 확립 함.

- 세포 대량배양 시스템 개발 : dioscin 고 함유 종으로부터 캘러스를 유도하고 증식한 후 부정근의 유도를 실시함. 부정근으로부터 dioscin 고 함유 배양주를 선발 함. 소규모 배양에서 증식조건이 구명되면 2L, 5L, 및 15L 배양과 톤급 배양을 위한 체계를 확립 함. Boimass의 증식조건은 당의 종류와 농도, 배지염류의 종류와 농도, 질소원의 종류와 농도, 배지의 산도, 성장조절제의 종류와 농도 등 다양한 요인을 구명 함.

- 대량배양을 위한 bioreactor 개발 : 2L 및 5L 이상 바이오리액터를 이용한 대량배양 시스템을 개발하며, 이에 따르는 sparger, 공기분배 시스템, 저가의 밴트 시스템, 무균공기 공급 시스템을 개발함. 15L 배양을 위한 배양대, 공기분배기 등을 개발하며, 다중 연결에 의한 동시배양 시스템을 구축하여 한꺼번에 톤급이상까지 배양이 가능한 체계를 확립 함.

- Dioscin의 기내생산 유도 조건 연구 : dioscin 고 생산 변이주를 선발하며, 물질의 효율적인 생산유도를 위한 당의효과, 배지의 종류 및 농도 효과, 성장조절물질, 질소원의 종류와 농도, 배지 산도효과, 다양한 elicitor의 효과를 구명하며, 부정근의 물질생산 유도를 위한 최적시점을 파악함.

- 배양세포로부터 dioscin의 순수 정제법 연구 : 세포 및 부정근 배양체로부터 dioscin을 효과적으로 정제에 하는 방법을 정립하며, 액체배양 시스템에서 배지로부터 효과적으로 dioscin을 정제하는 방법을 개발 함.

- Dioscin 기내 대량생산 모델정립 : 최적배지 및 성장조절물질, 계대 배양 회수 및 방법, elicitor의 투여시기 및 방법, 산도의 조절 및 안정화된 배양주를 유지하고 증식하는 방법을 확립 함.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발결과

부채마 (*D. nipponica* Makino)의 부정근을 기내배양을 통해 대량생산 하여 부정근에 함유된 dioscin을 생산하는 시스템을 개발하기 위한 연구

를 수행한 결과는 다음과 같다.

NAA와 BA 농도별 부정근 생장은 NAA를 단독으로 1.0 mg/L를 처리한 곳에서 가장 효과적이었으나 NAA에 BA를 첨가하면 부정근의 생장에 오히려 억제효과를 보였다.

20종의 각각 다른 부정근의 배양주로부터 세 종류의 steroidal saponins 즉, dioscin, prosapogenin A 및 prosapogenin C의 함량을 조사한 결과 배양주에 따라 큰 차이를 보였는데, 그 중 dioscin 함량이 건물 당 2.5%로 가장 높았던 No. 10번의 부정근 배양주를 선발하였다.

부정근에 함유된 세 종류의 steroidal saponin 함량은 부정근의 생장이 왕성한 4주까지는 낮으나 부정근의 생장이 거의 정지되는 5주째에 급격히 증가하였다. Dioscin과 prosapogenin C의 함량은 NAA보다 IBA를 처리한 곳에서 현저히 높으나 prosapogenin A의 함량은 이들 두 성분의 종류와 농도에 영향을 받지 않았다.

부정근의 유도 및 증식은 MS 액체배지에 sucrose 3%와 NAA 1.0 mg/L가 첨가된 배지가 양호하였으며, steroidal saponin함량 및 부정근 증식은 배양 5주-6주 후가 가장 효과적이었다.

부정근을 여러 가지 배양조건에서 배양하여 부정근의 생장과 물질생산을 관찰하였다. IBA와 NAA 처리 시 부정근의 생장은 NAA 1.0 mg/L에서 높았으며, steroidal saponin함량은 IBA 1.0 mg/L 첨가 시 가장 높았다.

NAA와 cytokinin 혼용 처리시 부정근 생장과 물질함량에 cytokinin 류 성장조절제의 효과는 없고 NAA 1.0 mg/L을 단독 처리한 것이 가장 양호하였다. 배지종류별 부정근의 성장량은 1/4×MS, 1/4×SH, 3/4×SH배지 순으로 높게 나타났으며, steroidal saponin함량은 1/4×SH배지에서 가장 높았다. 질소원의 농도에 따른 부정근의 생장은 농도와 관계없이 비슷하였으며, 물질함량은 $1\times\text{KNO}_3 + 2\times\text{NH}_4\text{NO}_3$ 처리에서 가장 높게 나타났다.

Sucrose 농도 3% 처리에서 부정근의 생장과 steroidal saponin 함량이 가장 양호하였다. Elicitor를 처리하면 부정근 내의 dioscin함량은 무처리

보다 낮으나 배지내로 누출된 dioscin 량은 현저히 증가하였고, AgNO₃ 50 mg/L 처리에서 가장 높았다.

부정근의 대량배양을 위해 공기부양식 2L, 5L 및 15L 생물배양기를 개발하였다. 이를 위해 공기의 주입 및 배출 시스템, 효율적인 sparger, 무균화 공기공급 시스템, 공기 건조장치 등을 개발하였다. 특히 15L 배양기 18대를 동시에 배양할 수 있는 배양대를 개발하였고 다중 연결방법에 의해 톤급까지 배양이 가능한 시스템을 확립하였다.

공기부양식 생물반응기를 사용한 부정근 대량배양은 MS 배지, sucrose 3%, NAA 1.0 mg/L 처리시 가장 높은 생장을 보였으며, 5L 배양기에서 6주간 배양시 약 200g의 부정근 생산이 가능하며, 이들로부터 최대 730 mg의 dioscin의 획득이 가능하다. 15L 배양기로부터는 6주간 배양 후 1.2kg의 부정근 수확이 가능하고 1,900 mg의 dioscin 생산이 가능하였다.

2. 활용에 대한 건의

야생에서 수집한 부채마의 기내배양을 시도하여 최종적으로 부정근을 15L bioreactor 배양까지 가능하며, 대량으로 배양된 biomass로부터 순수한 dioscin을 정제하는 방법이 확립되었고, 많은 수의 배양대를 동시에 연결하여 부정근을 톤급까지 배양 할 수 있는 시스템을 확립할 수 있었다. 고 부가가치의 생리활성 물질인 dioscin을 포함한 steroidal saponin의 산업화를 위해 다음과 같은 추가 연구의 지원이 필요한 것으로 사료된다.

a. Diosci 고함유 배양근의 산업화연구 : 식품으로의 안정성, 기능성 첨가제로 사용하기 위한 방안, 정제된 dioscin의 약리작용 및 제품화 연구.

b. Dioscin과 함께 포함된 타 steroidal saponins 연구 : 본 연구과정에서 dioscin 뿐만 아니라 prosapogenin A 및 prosapogenin C 가 부정근과 배지에 상당량 포함된 것으로 밝혀졌음. 이들의 생리작용뿐만 아니라 생산 시스템을 구축하는 것도 필요할 것임.

c. 부채마의 dioscin 생합성 기작 연구 : dioscin의 생합성 기작을 세포

및 기내배양 수준에서 정확히 밝힘으로써 생합성경로 및 관련효소, 중간체등을 밝혀 관련 인자를 탐색하는 연구 지원.

d. 재배마로 dioscin 고 생산 인자의 도입연구 : 최근 발달한 유전공학적 기법을 이용하여 부채마에 존재하는 dioscin 생합성관련 유전자를 탐색하고 재배마로 도입할 수 있다면, 재배마의 부가가치를 획기적으로 증가시킬 수 있을 것이며 농가 소득증대에도 기여할 것임.

SUMMARY

Dioscorea nipponica Makino which is a perennial herb growing in mountainous areas of the Korean peninsula, has long been used as a folk medicine for asthma, rheumatoid arthritis, bronchitis, and other disease in Korea, Japan, and China. The pharmaceutically active components of the *Dioscorea* sp. were identified as diosgenin and related steroidal saponins, such as dioscin, gracillin, prosapogenin A of dioscin, prosapogenin B of dioscin, and prosapogenin C of dioscin. These steroidal saponins showed various bioactivities; (1) anticancer activity of dioscin, and prosapogenin A, (2) antimicrobial activity of dioscin and diosgenin, (3) lipase inhibitory activity of diosgenin, dioscin, prosapogenin A and prosapogenin C, and (4) antiviral activity of dioscin. Also, diosgenin and related saponins are well known starting materials for the manufacture of pharmaceutically important steroids, and can be obtained from tubers, seeds, or cultivated cells of various plants including in many in the genera, *Dioscorea*, *Costus*, *Trigonella* and *Tribulus*.

However, the production of dioscin, a useful anticancer, antiviral, antimicrobial, and anti-obesity compound, is not established until now. The cultivated yam, such as *D. opposita* or *D. batatas*, contained only trace of dioscin, and dioscin-high content wild yam species were not cultivated due to the very poor growth and tiny root formation. Although the chemical synthesis of dioscin and dioscin derivatives was recently succeeded, the practical production is still problematic by the complexity of reactions and low yield of chemical synthesis. Therefore, it was considered that the production of dioscin via *in vitro* cultivation

of wild yam is necessary.

In the present study, we have applied a plant tissue culture method for mass production of steroidal saponins from adventitious cultures of *D. nipponica* through bioreactor system. The effects of different sugars, growth regulators, basal media and nutrients strengths, nitrogen sources, acidity of the media, elicitors were evaluated for the production of adventitious root biomass, and the biosynthesis of steroidal saponins such as dioscin, prosapogenin A and prosapogenin C. We also developed bioreactor system for large-scale production of adventitious roots containing high amount of useful chemicals, dioscin.

The maximum growth of adventitious roots was observed in MS medium supplemented with 30 g/L sucrose and 1.0 mg/L NAA. Addition of BA in combination with NAA appeared to be no effective in the growth of adventitious root as well as steroidal saponin production. Among the twenty different adventitious roots formed from different seeds, strain No. 10 was selected based on production ability of dioscin, and its stability through the successive liquid culture. During the first 4 weeks of incubation, contents of steroidal saponins in adventitious roots were negligible but the contents were markedly increased at 5 weeks of incubation.

Dioscin and prosapogenin C content in IBA-treated adventitious roots were significantly higher than those in NAA-treated roots. However, content of prosapogenin A was not significantly different among NAA or IBA level.

Effects of cultured conditions on the growth and saponin content of *D. nipponica* were determine at 6 week after culture. In IBA and/or NAA treatments, the optimal growth was 1 mg/L of NAA, and the maximum content of steroidal saponin was 1 mg/L of IBA. In NAA + cytokinin (BA, kinetin, 2iP) explants, the optimal growth and high

steroidal content was supplement of 1 mg/L NAA.

Effect of nitrogen salt was not significantly affected. Addition of $1\times\text{KNO}_3 + 2\times\text{NH}_4\text{NO}_3$ showed high steroidal saponin production. Based on salt strength of MS and SH explant the maximum growth was $1/4\times\text{MS}$ media, and high steroidal saponin content was $1/4\times\text{SH}$ media. Sucrose 3% was most effective in the growth and content of saponins as compared to the other concentrations such as 1.5%, 6%, 9%.

Effect of various elicitor such as chitosan and jasmonic acid were examined. Dioscin in adventitious roots was lower than control, but dioscin content in media was higher than control. Dioscin content in media was highest in AgNO_3 50 mg/L treated cultures.

The optimum condition for adventitious root cultures in bioreactor with air bubble system was MS medium containing 3% sucrose and 1 mg/L of NAA. When adventitious roots were cultured in a 5L or 15L air-lift type bioreactor for six weeks, we harvested biomass of adventitious roots 200g from 5L and 1.2kg from 15L bioreactor, and obtained dioscin 730 mg from 5L and 1,900 mg from 15L bioreactor.

Results provide that liquid culture of adventitious roots of *D. nipponica* in larger scale bioreactor have a potential for mass production of useful steroidal saponins such as dioscin including prosapogenin A and prosapogenin C.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	13
Chapter 2. Status of the Art	17
Chapter 3. Contents and Results of the Research ..	19
Section 1. Materials and Methods	19
1. Analysis and purification of dioscin	19
2. Establishment of <i>in vitro</i> culture system	22
3. Large scale production of biomass and dioscin	23
4. Development of bioreactor	25
Section 2. Results	26
1. Analysis and purification of dioscin	26
2. Establishment of <i>in vitro</i> culture system	33
3. Large scale production of biomass	51
4. Production of dioscin and steroidal saponins	61
5. Development of bioreactor and culture	71
Chapter 4. Achievement and Contribution	90
Chapter 5. Application of the Results	93
Chapter 6. Review of Advanced Research	95
Chapter 7. References	97

목 차

제1장 연구개발과제의 개요	13
제2장 국내외 기술개발 현황	17
제3장 연구개발 수행 내용 및 결과	19
제1절 재료 및 방법	19
1. Dioscin 및 관련물질의 탐색 및 분석	19
2. 야생마의 기내배양체제 확립	22
3. 부정근의 대량생산 및 Steroidal saponin의 생산	23
4. Bioreactor의 개발 및 배양	25
제2절 연구결과	26
1. 물질의 탐색 및 분석	26
2. 마의 기내배양체제 확립	33
3. 부정근의 대량생산 조건 구명	51
4. 부정근의 steroidal saponin의 생산에 미치는 영향	61
5. Bioreactor 개발 및 배양	71
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	90
제5장 연구개발결과의 활용계획	93
제6장 해외과학기술정보	95
제7장 참고문헌	97

제1장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 필요성

마과(*Dioscoreaceae*)에 속한 식물 중 야생종은 부채마(*Dioscorea nipponica* Makino), 도꼬로마(*D. tokoro* Makino), 참마(*D. japonica* Thunb.), 각시마(*D. tenuipes*), 단풍마(*D. quinqueloba* Thunb.) 등과 같이 다양하나, 재배마는 *D. opposita* Thunb. 또는 *D. batatas*로 분류되는 한 종만이 재배되고 있다. 재배마의 함유성분은 품종, 재배환경 등에 따라 다르나 전분은 생체중의 약 8~24%, 점질물이 약 0.6~2.4%를 차지하며, 점질물은 당단백질의 일종인 mucin과 미량의 비타민(B1, C)을 함유한다. 마의 약용성분으로는 amylose, cholin, saponin 등이며, 한방에서는 신체허약, 폐결핵, 정력부족, 야뇨증, 설사, 당뇨병, 대하증 등에 쓰이고 있다.

최근 들어서는 마 가공식품이 다양하게 개발되어 약용뿐만 아니라 건강식품으로도 중요한 위치를 차지하게 되어 재배면적은 약 318ha (생산량: 2,186톤)로 1990년대 초의 83.4ha 보다 4.5배가 증가하였다. 전국의 마 재배 면적 중 약 69%인 269ha가 안동, 영주, 봉화를 중심으로 한 경북북부 지역에서 재배되고 있으며, 그 생산량은 1,702톤에 달하여 경북북부지역의 중요한 소득작물이다.

최근 야생마와 재배마의 saponin 함량 비교 연구에서 야생마인 부채마(*D. nipponica*)와 단풍마(*D. quinqueloba*)가 재배마(*D. batatas*)보다 강력한 항암활성을 가진 dioscin의 함량이 각각 약 150배 또는 20배 많다고 보고 되었다(Kim 등, 1991). Dioscin은 여러 가지 약용식물의 주요 약리성분으로(Kim et al., 1989; Kim et al., 1991; Son and Seo, 2000) 항돌연변이원성작용(Kim et al., 1989), 항암작용, 항염증의 지표인 phospholipase A2(PLA2) 저해작용(Baek et al., 1994)등의 다양한 생리활성이 보고 되고

있다. Heble과 Staba(1980)는 *D. delroidea* 식물체의 세포배양을 통하여 diosgenin을 생산하는데 성공하였고, *D. composita*의 신초배양에 의해서도 이 물질의 생합성에 성공하였다. Tal과 Goldberg (1982)는 연속배양 (continuous culture) 및 Batch culture를 통하여 diosgenin의 대량생산을 시도하였고, Drapeau등(1986)도 세포배양에 의한 기내생산을 시도한 바 있다.

항암활성 물질의 대량생산과 상업화는 시장성이 넓고 고부가가치를 창출하여 상업적으로도 엄청난 과급효과를 가져오기 때문에 선진국을 중심으로 한 연구기관 및 기업체 연구소에서 이 분야에 집중적인 투자를 하고 있는 실정이다. 특히 마는 1991년도에 비해 재배면적이 5배 가량 증가하였는데, 경상북도 북부지역은 전국의 마 생산량의 약 70%를 차지하여 이 지역은 1992년 8월 농림부고시에 의해 마 주산지로 지정 바 있다. 항암활성물질인 dioscin의 기내생산 시스템의 개발에 의한 물질의 대량 생산 및 상업화는 마의 효능에 대한 인식의 제고로 마의 소비촉진의 증가를 초래할 것이며 이는 농가소득 증대 방안이 될 것이다.

본 연구는 마의 주요 약리성분이면서 강력한 항암활성을 지닌 dioscin이 야생마에는 다량 함유되어 있으나 재배마에는 그 성분이 아주 미약하여, 야생마의 세포대량 배양법을 이용한 dioscin을 기내에서 대량생산하는 시스템을 개발함으로써 기내배양에 의한 고부가의 유용물질을 산업화하는 방안을 모색하기 위해 수행되었다.

제2절 연구개발의 목적과 범위

최근 식물을 대상으로 한 생물공학기술 중에서 주목받는 분야중의 하나는 특정의 유익성분을 대량생산하는 방법을 개발하거나 그 성분을 대량생산하는 cell line을 찾고, biomass를 빠른 시간 내에 급속히 증식하여 유

용성분을 전천후 생산하는 공장 시스템을 구축하는 것이다. 이러한 연구는 천연에 존재하는 고부가가치의 유용성분을 대량생산하는데 이용될 뿐만 아니라 최근에 급속히 발달한 유전자형질전환 기법을 활용한 유전자조작기술을 이용하여 인류에게 획기적인 유용성을 부여하는 백신, 인슐린, 인터페론 등을 생산하는 수단으로도 이용될 수 있다. 한편, 이 연구는 재배마에는 거의 존재하지 않고 야생마에만 다량 존재하는 dioscin의 생산인자를 재배마에 도입함으로써 재배마의 품질과 부가가치를 획기적으로 향상시키는데도 기여할 수 있다. 야생마(山藥)의 세포배양을 통한 Dioscin의 대량생산 시스템 개발 연구의 목표는 다음과 같다.

- 자생하는 마과식물의 dioscin 함량분석을 통한 고생산성 자원의 탐색
- Dioscin 고 생산 식물체의 세포배양, 고 생산 배양주 선발 및 대량 생산을 위한 elicitor 개발
- Dioscin 고 생산 세포주를 활용한 biomass의 대량 생산 및 물질의 기내 생산 시스템 확립
- 대량생산된 biomass로부터 dioscin의 순수정제 및 이용

이상의 연구목표를 달성하기 위하여 본 연구에서는 야생마인 부채마를 대상으로 다음과 같은 연구를 수행하였다.

① 야생 및 재배마의 dioscin 탐색 및 함량분석 : 재배마 및 야생에서 수집한 종의 dioscin 함량을 조사하여 고 함유 종을 선발하며, 식물체로부터 dioscin을 순수 정제하는 체계를 확립함

② 세포 대량배양 시스템 개발 : dioscin 고 함유 종으로부터 캘러스를 유도하고 증식한 후 부정근의 유도를 실시함. 유도된 부정근으로부터 dioscin 고 함유 배양주를 선발하며 증식조건을 구명함. 소규모 배양에서 증식조건이 구명되면 2L, 5L, 및 15L 배양과 톤급의 대량배양을 위한 배양체계를 확립함. Biomass의 증식조건은 당의 종류와 농도, 배지염류의 종류와 농도, 질소원의 종류와 농도, 배지의 산도, 성장조절제의 종류와 농도 등 다양한 요인을 구명함.

③ 대량배양을 위한 bioreactor 개발 : 2 L 및 5 L 이상 바이오리액터를 이용한 대량배양 시스템 개발하며 이에 따르는 sparger, 공기분배 시스템, 저가의 맨트 시스템, 공기 무균화 방법을 개발함. 15 L 배양을 위한 배양대, 공기분배기, 멸균 시스템 등을 개발하며, 다중 연결에 의한 동시배양 시스템을 구축하여 한꺼번에 톤급이상까지 배양이 가능한 체계를 확립함.

④ Dioscin의 기내생산 유도 조건 연구 : dioscin 고 생산 변이주를 선발하며, 물질의 효율적인 생산유도를 위한 당의효과, 배지의 종류 및 농도효과, 성장조절물질, 질소원의 종류와 농도, 산도효과, 다양한 elicitor의 효과를 구명하며, 부정근의 물질생산 유도를 위한 최적의 시점을 파악함.

⑤ 배양세포로부터 dioscin의 순수 정제법 연구 : 세포 및 부정근 배양체로부터 dioscin을 효과적으로 분리정제 하는 방법을 정립하며, 액체배양 시스템에서 배지로부터 효과적으로 dioscin을 정제하는 방법을 개발 함.

⑥ Dioscin 기내 대량생산 모델정립 : 최적배지 및 성장조절물질, 계대 배양 회수 및 방법, elicitor의 투여시기 및 방법, 산도의 조절 및 안정화된 배양주를 유지하고 증식하는 방법을 확립함

제2장 국내외 기술개발 현황

마의 분포 및 분류에 관한 연구는 주로 일본의 학자들에 의해 비교적 상세하게 이루어진 것으로 알려져 있다. 마에 관한 많은 연구에도 불구하고 아직까지도 형태적으로 비슷한 변종의 분류에 학자들 간에 논란이 있다. 우리나라에는 경북북부지역의 산간, 제주도, 울릉도 등지에 야생종이 분포하고 있다. 마는 암수가 구분되어 있으며 자연 상태에서 잡종이 이루어지며 염색체의 자연배가에 의한 다양한 유전적 변이가 생겨 마속에는 600여종의 변종이 있고 재배마의 경우 장기간의 재배로 품종이 퇴화하는 특성이 있는 것으로 알려져 있다.

마의 성분은 전분 8~24%, 단백질 2~3%정도이며, 비타민 C와 B1이 풍부하며, amylose, cholin, saponin, yonogenin, criptogenin, dioscin 등이 주된 약효성분으로 알려져 있다. 마의 주요 약효는 혈중 콜레스테롤 함량 저하, 동맥경화증 완화, 혈압강하, 신장강화 및 당뇨병, 노화방지 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 최근 들어서는 마 가공식품이 다양하게 개발되어 약용뿐만 아니라 건강식품으로도 중요한 위치를 차지하고 있다.

Kim등(1991)은 몇몇 국내 약용식물의 steroidal saponin 함량을 조사하였는데 *Dioscoreaceae*에 속하는 부채마(*D. nipponica*)에서 타 속의 약용식물보다 최고 수백배에 해당하는 diosgenin이 검출되며, 한국의 재배마(*D. batatas* 또는 *opposita*)보다 약 150배가 더 함유되어 있다고 하였다. 이는 재배마의 diosgenin의 생합성 능력이 야생마인 부채마보다 현저히 떨어진다는 것을 말해준다.

손 등(1993)은 단풍마의 근경으로부터 3종의 steroid saponin을 분리하여 diosgenin 3-O- α -L-rhamno pyranosyl- β -D-glucopyranoside, diosin 및 gracillin을 확인하여 마가 steroidal saponin을 생산하는 자원식물로의 잠재성 있음을 보고한 바 있다.

Steroidal saponin 중 dioscin은 생체의 암화나 종양을 일으키는 원인인 돌연변이원성물질이나 발암성물질에 대항하여 돌연변이나 발암성을 억제하는 성분으로 알려져있다(Kim et al., 1989). Dioscin의 항돌연변이원성작용(Kim et al., 1989), 항암작용 외에도 phospholipase A2(PLA2) 저해작용(Baek et al., 1994) 및 여러 가지 약리성분(Kim et al., 1989; Kim et al., 1991; Son and Seo, 2000) 으로 다양한 생리활성이 보고 되어 있다.

마과식물의 dioscin의 생산능력을 세포배양이나 조직배양을 통하여 대량생산을 시도한 많은 예가 있다. Heble과 Staba(1980)는 *D. deltoidea* 식물체의 세포배양을 통하여 dioscin을 생산하는데 성공하였고, *D. composita*의 신초배양에 의해서도 이 물질의 기내생산에 성공하였다. Tal과 Goldberg (1982)는 세포대량배양 기법인 연속배양(continuous culture) 및 batch culture를 통하여 dioscin의 대량생산을 시도하였고, Drapeau등(1986)도 세포배양에 의한 기내생산을 성공한바 있다.

마는 약용식물로 오래 전부터 사용되어 왔으나 아직 마의 결정적인 약리작용과 관련된 물질이 무엇인지에 대한 규명이 없다. 따라서 약리성분의 함량이나 질을 이용한 품질표준화 연구도 되어 있지 않다. 마는 타 생약제와는 달리 전분과 단백질의 함량이 높은 편이며 약리성분에 관해서는 주로 사포닌을 대상으로 이루어 졌다. 야생에 존재하는 마는 dioscin의 함량이 재배마 보다 100배 이상 많다는 연구결과를 바탕으로, 이 물질을 다량으로 생산할 수 있는 재배마의 육성이 필요하다. 마과식물은 야생마와 재배마 간에 형태적·생리적으로 상당한 차이가 난다. 따라서 재배마 간에 혹은 일부 형태적으로 가까운 야생마 간에 교잡은 가능하나 재배마와 야생마간의 교잡은 어려운 것으로 알려져 있다.

제3장 연구개발 수행 내용 및 결과

제1절 재료 및 방법

1. Dioscin 및 관련물질의 탐색 및 분석

가. 물질의 탐색

부채마(*Dioscorea nipponica*)의 근경 또는 배양된 부정근 3 kg을 세절한 후, 환류 냉각장치를 사용하여, 25°C에서 MeOH 500 ml로 72시간동안 3회 연속 추출하였다. 얻어진 MeOH 추출액을 여과지를 사용한 깔대기로 여과한 후 76 cmHg에서 감압, 농축하여 부채마 MeOH 추출물 115.1g을 얻었다. 부채마 MeOH 추출물 25g을 column (90×6cm, Merck 7734 silica gel 900g)에, CHCl₃ : CH₃OH:H₂O = 7:3:1의 용매를 사용하여 전개시켰다. 전개 60분 후부터 2000ml씩 8개의 분획을 수득하였다.

분획 5를 EtOAc : CH₃OH=98:2의 용매로부터 EtOAc:CH₃OH = 95:5의 용매까지 단계적으로 극성을 높여가며, chromatography를 실시하였다. 전개를 시작한 후, 30분 후부터 500ml씩 60개의 분획으로 수득하였다. 수득된 분획중 35에서 50번까지의 분획으로부터 dioscin을 얻었으며, TLC 및 NMR 분석법을 사용하여, 이 물질이 dioscin임을 확인하였다.

8개의 분획 중 4번 분획을 CHCl₃:CH₃OH:H₂O=7:3:1의 용매로 column chromatography를 실시하여, 전개 후 15분부터 500ml씩 유출시킨 15개의 소분획 중 6번에서 12번 소분획으로부터 prosapogenin A를 얻었다.

8개의 분획 중 2번 분획을 CHCl₃ : CH₃OH : H₂O = 8:2:0.5의 용매로 chromatography를 실시하여, 전개 후 30분부터 500ml씩 유출시킨 24개의 소분획 중 7번에서 16번까지의 소분획으로부터 prosapogenin C를 얻었다. 모든 물질은 TLC 및 NMR 분석법을 사용하여, 이 물질의 존재를 확인하였다.

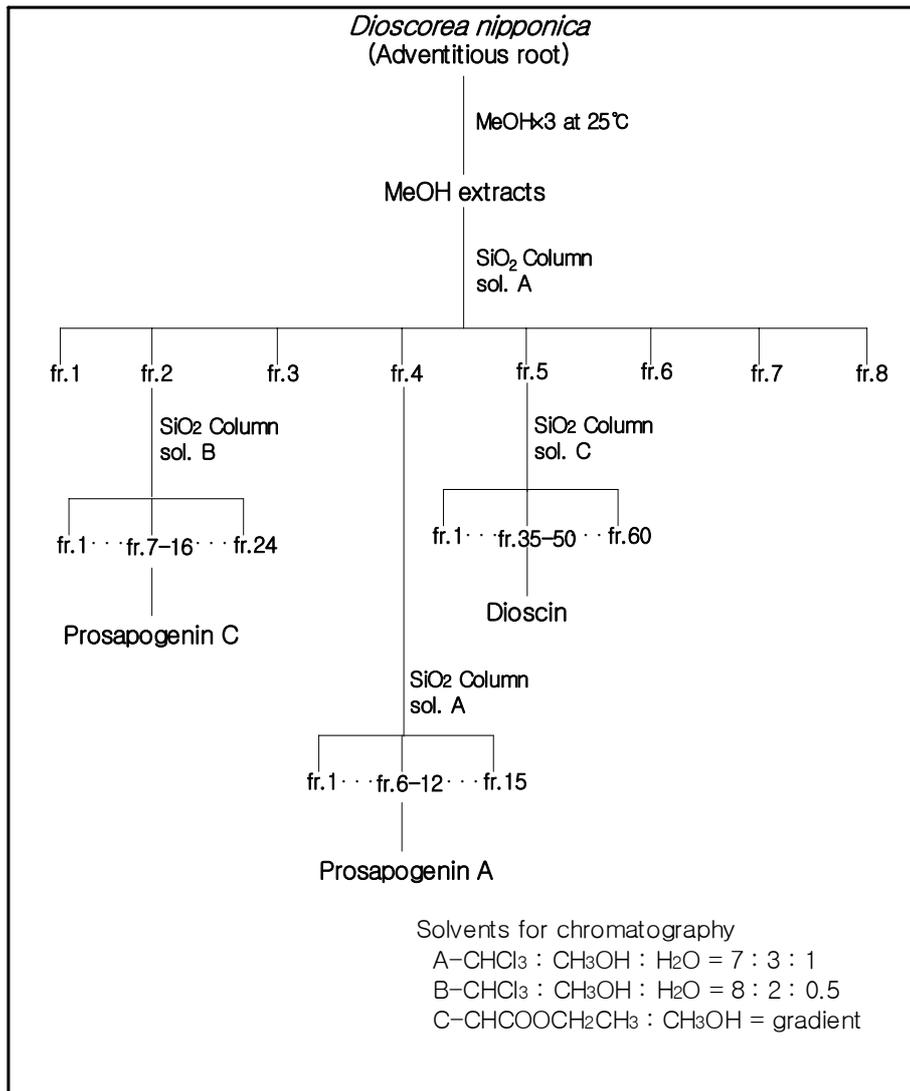


Fig 1. Purification of three steroidal saponins, dioscin, PA and PC from adventitious roots of *D. nipponica*.

나. 정성 및 정량분석

정성분석은 TLC법을 이용하였다. 순수분리 확인된 표준품 (dioscin, prosapogenin A, prosapogenin C, gracillin, diosgenin) 각 1 mg을 메탄올

1 ml 에 녹여 표준액을 준비하였으며, 검액은 마의 다양한 부위로부터 메탄올을 이용하여 추출한 추출농축액, 또는 유도 배양된 켈러스, 부정근의 메탄올 추출물을 농축하여 사용하였다. 부정근 배양액으로부터 검액의 제조는 각각의 배양액 5 ml를 에틸아세테이트로 추출한 후, 상층액을 감압 농축하여 사용하였다. 표준액과 검액을 각각 5 μ l씩 silica gel TLC plate (Merck 5715)에 점적한 후 CHCl_3 -MeOH- H_2O (52:28:8, 하층부)의 용매로 전개하여 10% H_2SO_4 으로 발색시켜 표준품과의 Rf값을 비교하였다.

Dioscin 및 관련물질의 정량분석을 위해 두 종류의 HPLC 분석시스템을 사용하였다. 기본시스템으로는 SCL-10A system controller, LC-10AD pump, SPD-10A UV detector (이상 Shimadzu Co., Japan)를 사용하여 20 μ l 의 시료를 주입 후 218 nm에서 대상물질들을 분석하였다. 크게 두 종류의 분석 시스템 (시스템-1, 시스템-2)을 조사하였다.

다. 시료로부터 dioscin 및 관련물질의 함량분석

경북북부지역의 재배마와 경북 안동의 갈라산 인근에서 채취한 야생 부채마를 일주일간 실온에서 음건한 후, 지상부위와 지하부위로 각각 구분하고 분쇄기를 사용하여 분말화하였다. 이후 각각의 분말 2g에 100 ml 메탄올을 가한 후, 50 $^{\circ}$ C 추출기 (Branson 3210R-DTH, Branson, USA)에서 8시간 추출한 후, 감압 농축하여 HPLC 및 TLC로 분석하였다.

기내 배양체의 dioscin 및 관련물질의 분석을 위해 확보된 callus와 부정근에서의 dioscin 및 관련물질의 함량분석은, 각각의 시료를 60 $^{\circ}$ C에서 수분을 제거한 후 상기 기술한 방법과 동일하게 추출, 농축하여 TLC와 HPLC로 분석하였다. 분석 결과는 필요에 따라 클러스터링 (Gene cluster: <http://rana.stanford.edu/software>)과 이미지화 프로그램 (Tree View: <http://rana.stanford.edu/software>)을 이용하여 분석하였으며, 확보된 다양한 모상근의 분류와 이후 실험을 위한 모상근 선별기준으로 사용하였다.

2. 야생마의 기내배양체제 확립

가. 초대배양

멸균된 부채마 종자를 MS배지 (Murashige and Skoog, 1962)를 기본 염류로 하여 sucrose 3%를 첨가한 다음 생장 조절물질로 2,4-D 1.0, 2.0 mg/L 와 BA 0, 0.1, 1.0 mg/L를 단독 또는 혼합하여 gelrite 4 g/L가 첨가된 고행배지(pH5.8)에 배양하였다. 배양조건은 27℃에서 암상태로 유지하여 6주 후에 싹, 뿌리형성 및 캘러스 유도율을 조사하였다.

나. 부정근의 유도 및 증식

고행배지를 사용한 뿌리배양은 MS 기본배지에 sucrose 3%와 생장조절제인 BA 0, 0.01 mg/L와 NAA 0.1, 1.0, 3.0 mg/L를 단독 또는 혼합처리하여 부채마 종자의 부정근 유도에 사용하였으며, 개별 종자로부터 유도된 각각의 부정근을 약 100 mg정도를 현탁배양을 위해 잘게 자른 후 액체배지 50 ml이 든 250 ml 삼각플라스크에 접종하여 진탕배양기에 100 rpm속도로 배양 하였다. 27℃ 항온에서 6주간 배양후 새로 형성된 부정근의 수와 길이 및 생체중을 측정하였다.

다. Steroidal saponin 고생산 배양주 선발

각각의 부채마 종자로부터 유도된 부정근에서 20개의 배양근을 선발하여 dioscin, PA, PC를 부정근과 배지에서 HPLC로 분석하여 가장 높은 dioscin 함량을 가진 배양주를 선발하였다. 선발된 배양주의 부정근을 배양하면서 5주 동안 매주 부정근과 배지를 획득하여 dioscin, PA, PC의 함량 및 부정근의 생체중을 측정하였다.

라. IBA와 NAA의 효과

식물 호르몬 중 auxin류인 IBA와 NAA가 부정근의 생장과 steroidal saponin 생산에 미치는 효과를 알아보기 위하여 IBA와 NAA의 농도를 각각 1.0, 3.0, 5.0 mg/L씩 배양배지에 첨가하였다. 배양 5주 후 부정근의

생체중과 부정근 및 배지에 함유된 steroidal saponin의 함량을 측정하였다.

3. 부정근의 대량생산 및 steroidal saponin의 생산

가. 당의 종류와 농도효과

부채마 부정근의 성장 및 steroidal saponin의 생산에 미치는 당의 종류와 농도의 영향을 조사하고자 sucrose, fructose, glucose 및 galactose의 효과를 조사하였다. 기본배지는 NAA 1.0 mg/L를 포함한 MS 액체배지를 설정하고, 당의 농도를 1.5~9%로 조정된 배지를 사용하였다. 배양 5주 후에 부정근의 생체중과 steroidal saponin의 정량분석을 수행하였다.

나. 배지종류 및 염류농도

부채마 부정근의 성장 및 steroidal saponin 생산에 미치는 배지의 영향을 조사하고자 1×MS, 3/4×MS, 1/2×MS, 1/4×MS, 1×SH (Schenk and Hildebrandt, 1972), 3/4×SH, 1/2×SH, 1/4×SH의 농도로 조정된 배지에 NAA 1.0 mg/L를 첨가한 후 사용하였다. 배양 5주 후에 부정근의 생체중과 steroidal saponin의 정량분석을 수행하였다.

다. NAA와 cytokinin의 혼용효과

앞의 실험에서 부정근의 성장에 가장 효과가 좋았던 NAA 1.0 mg/L를 기본으로하여 cytokinin류인 BA, kinetin (6-furfuryl amino purine), 2iP (N^6 -isopentenyl amino purine)를 각각 0.1과 1.0 mg/L를 배양배지에 첨가하였다. 배양 5주 후에 각각 배지에서 성장한 부정근의 생체중과 steroidal saponin의 함량을 분석하였다

라. NAA, IBA 및 IAA효과

식물 호르몬 중 auxin류인 IBA, IAA, NAA가 부정근의 성장과

steroidal saponin 생산에 미치는 효과를 알아보기 위하여 IBA, NAA, IAA의 농도를 각각 1.0, 3.0, 5.0 mg/L씩 배양배지에 첨가하였다. 배양 5주 후 부정근의 생체중과 부정근 및 배지에 함유된 steroidal saponin의 함량을 측정하였다.

마. 질소원의 종류와 처리비율

부채마 부정근의 성장 및 steroidal saponin의 생산에 미치는 질소원의 종류와 농도의 영향을 조사하고자 NAA 1.0 mg/L를 첨가하여 MS배지에 함유되는 NH_4NO_3 , KNO_3 의 기본량을 1이라 보고 $1/2 \text{ KNO}_3 + 1/2 \text{ NH}_4\text{NO}_3$, 1 KNO_3 , $1 \text{ KNO}_3 + 1/2 \text{ NH}_4\text{NO}_3$, $1 \text{ KNO}_3 + 1 \text{ NH}_4\text{NO}_3$, $1 \text{ KNO}_3 + 2 \text{ NH}_4\text{NO}_3$, $2 \text{ KNO}_3 + 1 \text{ NH}_4\text{NO}_3$ 의 농도로 첨가한 후 사용하였다. 배양 5주 후 부정근의 생체중과 steroidal saponin의 정량분석을 수행하였다.

바. 배지의 산도영향

배지의 산도를 pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 및 7.0으로 조정하여 배양 5주 후 부정근의 생체중과 steroidal saponin의 정량분석을 수행하였다. 배지 산도의 조정은 NaOH로 하였다.

사. Elicitor의 효과

부채마 부정근의 성장 및 steroidal saponin의 생산에 미치는 elicitor의 종류와 농도의 영향을 조사하였다. Elicitor로서 NaF, AgNO_3 , cyclohexamide, chitosan, yeast extract는 10.0 및 50.0 mg/L, cellulase는 2.0 및 10.0 mg/L, jasmonic acid는 1.0 및 5.0 mg/L 농도로 사용하였다. 배양 5주 후 elicitor를 처리하여 48시간동안 배양한 후 steroidal saponin의 함량을 분석하였다

4. Bioreactor의 개발 및 배양

상기실험에서 수행된 다양한 요인 중 최적 조건에서 부정근의 biomass를 대량생산하기 위해 bioreactor의 개발 및 배양을 실시하였다. 본 연구에서는 2L와 5L 공기부양식반응기 (air-lift type bioreactor)와 18L형 배양기를 개발하였다. 각 생물반응기의 공기주입방식, 스파자 종류, 공기분배 시스템, 배양기의 무균화 공기 주입장치, 압력 콤프레셔 등 배양의 최적화를 위한 다양한 장치가 개발되었다.

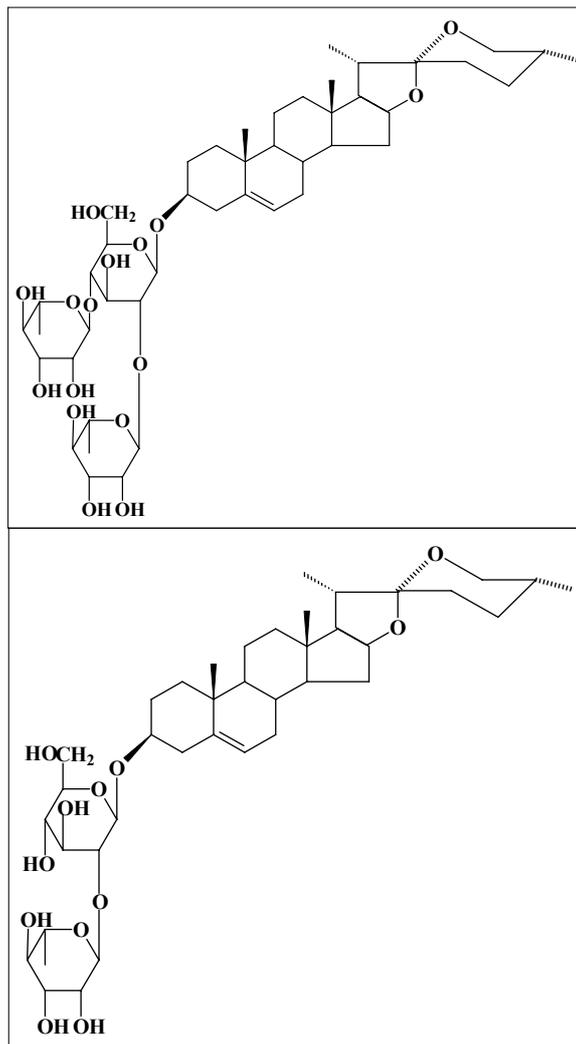
특히 18L 형 배양기는 한번에 18개의 배양기를 한번에 가동할 수 있는 셸트형으로 개발되어 한꺼번에 톤급이상의 배양이 가능한 시스템을 개발하였다. 한편 18L 상에서 부채마 부정근의 대량배양을 실시하여 본 연구에서 구명된 최적조건하에서 유용 물질의 대량생산을 위한 biomass의 생산과 물질생상조건을 구명하였다. 모든 실험의 처리군간 비교는 분산분석하고 Duncan의 다중검정으로 5% 수준에서 유의성을 검정하였다.

제 2 절 실험결과

1. 물질의 탐색 및 분석

가. 구조결정

부채마의 근경에서 분리한 주요 활성물질인 dioscin, prosapogenin A 및 C의 분자구조와 분광학적 data는 Fig. 2와 같다.



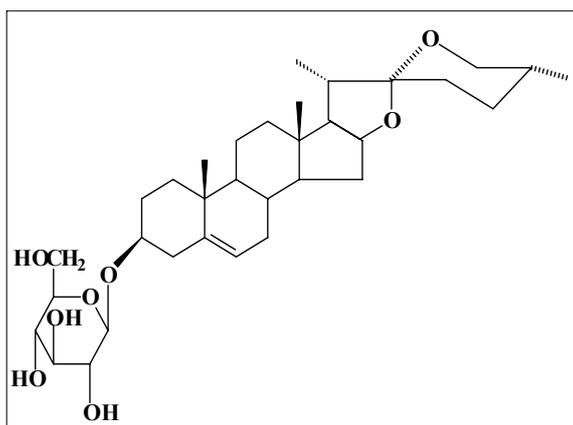


Fig. 2. Molecular structure of dioscin(first), prosapogenin A(second) and prosapogenin C(third).

1) Dioscin의 물리화학적 성질 및 분광학적 data

Mp.: 290~292℃	$[\alpha]_D^{25}$: -112.3° (c. 0.3 in MeOH)
IR(KBr, cm^{-1}) 3420, 1640, 1100~1000, 920, 900, 866, 838(900>920, 25(R)-spiroketal), 811	
^1H NMR(300 MHz, pyridin- d_5) δ 0.81(1H, s, H-18), 1.01(1H, s, H-19), 1.09(1H, d, J=6.9Hz, H-21), 0.69(1H, d, J=5.2Hz, H-27), 5.30(1H, brd, J=4.6Hz, H-6), 1.52(3H, d, J=6.2Hz, Rha- CH_3), 1.66(3H, d, J=6.1Hz, Rha- CH_3), 4.82(1H, d, J=7.4Hz, anomeric H), 5.62(1H, brs, anomeric H), 6.17(1H, s, anomeric H).	
^{13}C NMR (75.5 MHz, pyridin- d_5) δ 37.4, 29.9, 78.0, 38.8, 140.7, 121.5, 32.0, 31.6, 50.6, 37.0, 20.9, 39.8, 40.3, 56.5, 32.2, 80.9, 62.8, 16.2, 19.3, 41.8, 14.8, 109.0, 31.7, 29.1, 30.4, 66.7, 17.1, 100.1, 79.5, 76.5, 77.7, 77.6, 61.8, 101.7, 72.1, 72.2, 73.9, 70.1, 18.2, 102.7, 72.4, 72.5, 73.6, 69.2, 18.3	

2) Prosapogenin A의 물리화학적 성질 및 분광학적 data

Mp.: 238 ~ 240°C	$[\alpha]_D^{25}$: -12.5° (c. 0.4 in MeOH)
IR(KBr, cm^{-1}) 3410, 1650, 1100 ~ 1000, 920, 900, 865, 837(900 > 920, 25(R)-spiroketal), 811	
^1H NMR(300 MHz, pyridin- d_5) δ 0.81(1H, s, H-18), 1.01(1H, s, H-19), 1.09(1H, d, J=6.9Hz, H-21), 0.68(1H, d, J=5.7Hz, H-27), 5.28(1H, brd, J=4.8Hz, H-6), 1.67(3H, d, J=6.3Hz, Rha- CH_3), 4.92(1H, d, J=7.2Hz, anomeric H), 6.20(1H, s, anomeric H).	
^{13}C NMR (75.5 MHz, pyridin- d_5) δ 37.4, 30.0, 77.9, 38.8, 140.8, 121.5, 32.0, 31.6, 50.2, 37.0, 20.9, 39.8, 40.3, 56.5, 32.2, 80.9, 62.8, 16.1, 19.2, 41.8, 14.8, 109.0, 31.7, 29.1, 30.4, 66.7, 17.1 100.3, 79.3, 77.8, 71.8, 77.9, 62.6, 101.7, 72.2, 72.6, 73.9, 69.2, 18.4	

3) Prosapogenin C의 물리화학적 성질 및 분광학적 data

Mp.: 247 ~ 249°C
IR(KBr, cm^{-1}) 3450, 1650, 1070, 1045, 1025, 920, 900, 865, 835 (900 > 920, 25(R)-spiroketal), 810
^1H NMR(300 MHz, pyridin- d_5) δ 0.70(3H, d, J=5.2Hz, 27- CH_3), 0.83(3H, s, 18- CH_3), 0.92(3H, s, 19- CH_3), 1.13(3H, d, J=6.9Hz, 21- CH_3), 5.01(1H, d, J=7.7Hz, anomeric H), 5.31(1H, brd, J=4.4Hz, H-6)
^{13}C NMR (75.5 MHz, pyridin- d_5) δ 37.3, 30.0, 78.3, 39.1, 140.7, 121.5, 32.0, 31.5, 50.1, 36.9, 20.9, 39.7, 40.3, 56.5, 32.1, 80.9, 62.7, 16.2, 19.2, 41.8, 14.8, 109.1, 31.6, 29.1, 30.4, 66.7, 17.1, 102.4, 75.1, 78.0, 71.5, 78.2, 62.7

나. 시료로부터 dioscin 및 관련물질 분석

Dioscin 및 관련물질의 정량을 위해 두 종류의 HPLC 분석시스템을 사용하였다. Nova-Pak C₁₈ column (Waters, USA), 60% acetonitrile (v/v) 용매로 분당 0.5 ml의 유속으로 분석한 경우, dioscin, prosaogenin A, prosapogenin C의 retention time은 각각 9.79분, 13.26분, 24.11분이었으며, 검출한계 (detection limit)는 각각 20 µg/ml, 15 µg/ml, 15 µg/ml이었다 (시스템-1) (Fig. 3).

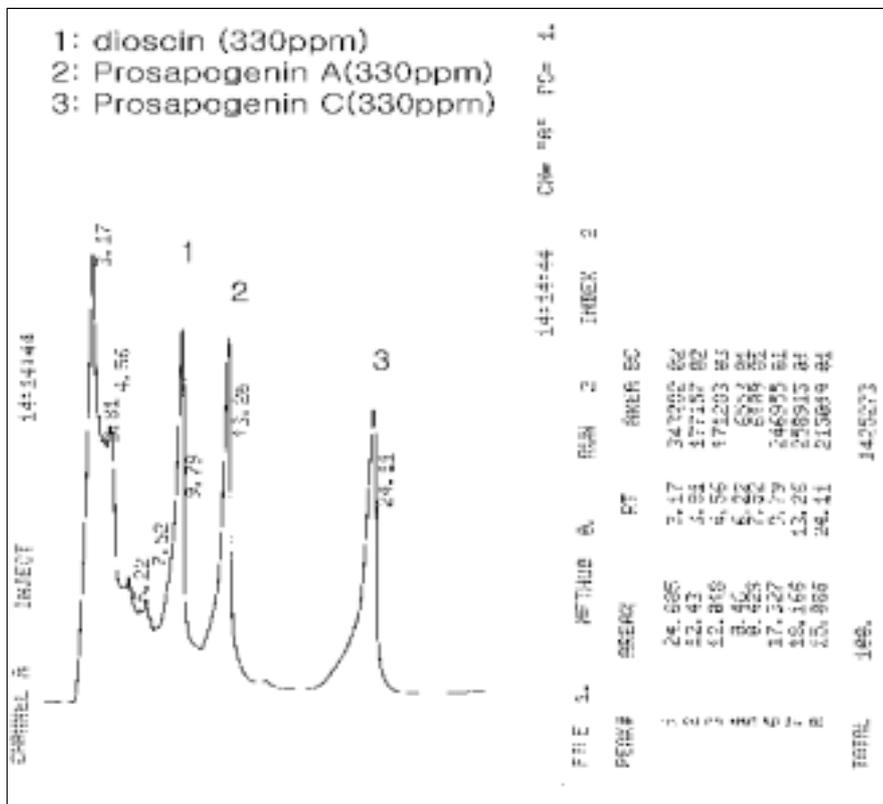


Fig. 3. HPLC chromatogram of dioscin, prosapogenin A, C in system I.

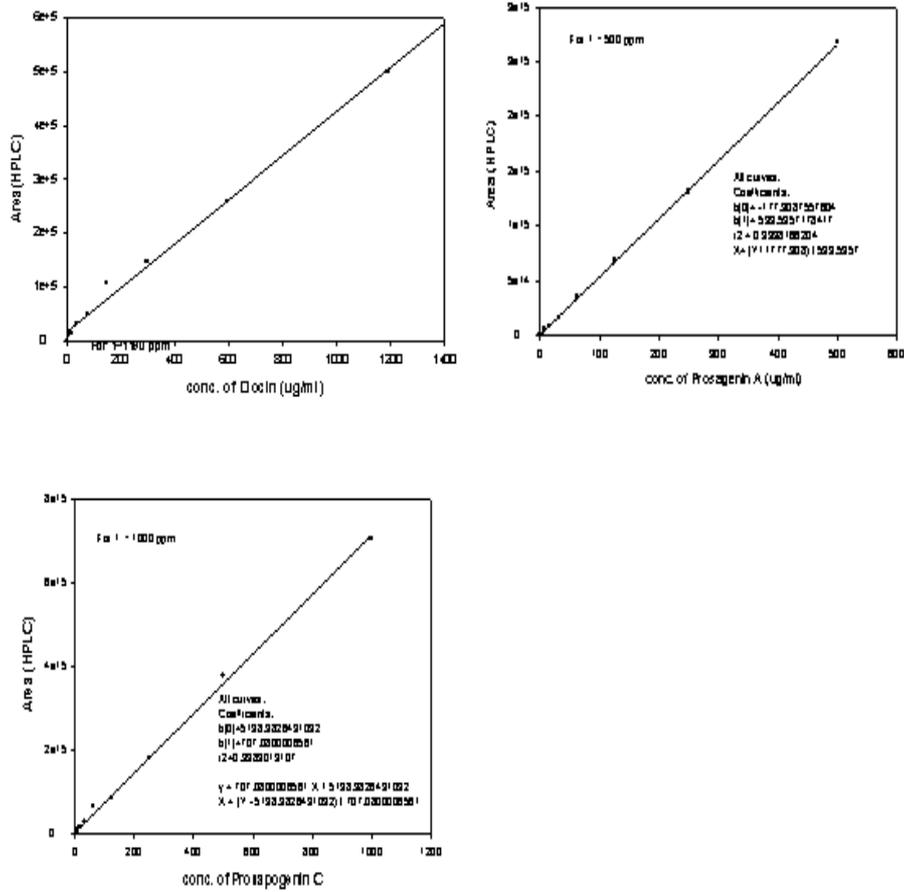


Fig. 4. Standard curve of dioscin, prosapogenin A, C in HPLC system I.

한편 RP-18 reverse phase (Mightysil GP 250-4.6, Kanto. Japan,)의 경우 컬럼 온도는 40°C 로 고정하였으며, 75% acetonitril을 분당 1 ml 유속으로 사용한 경우 dioscin, prosapogenin A, prosapogenin C의 retention time은 각각 5.44, 6.48, 9.47분이며, 검출한계는 각각 $10\ \mu\text{g/ml}$, $5\ \mu\text{g/ml}$, $5\ \mu\text{g/ml}$ 이었다 (시스템-2) (Fig. 5). 두 조건 모두에서 gracillin과 diosgenin

의 정량은 할 수 없었다.

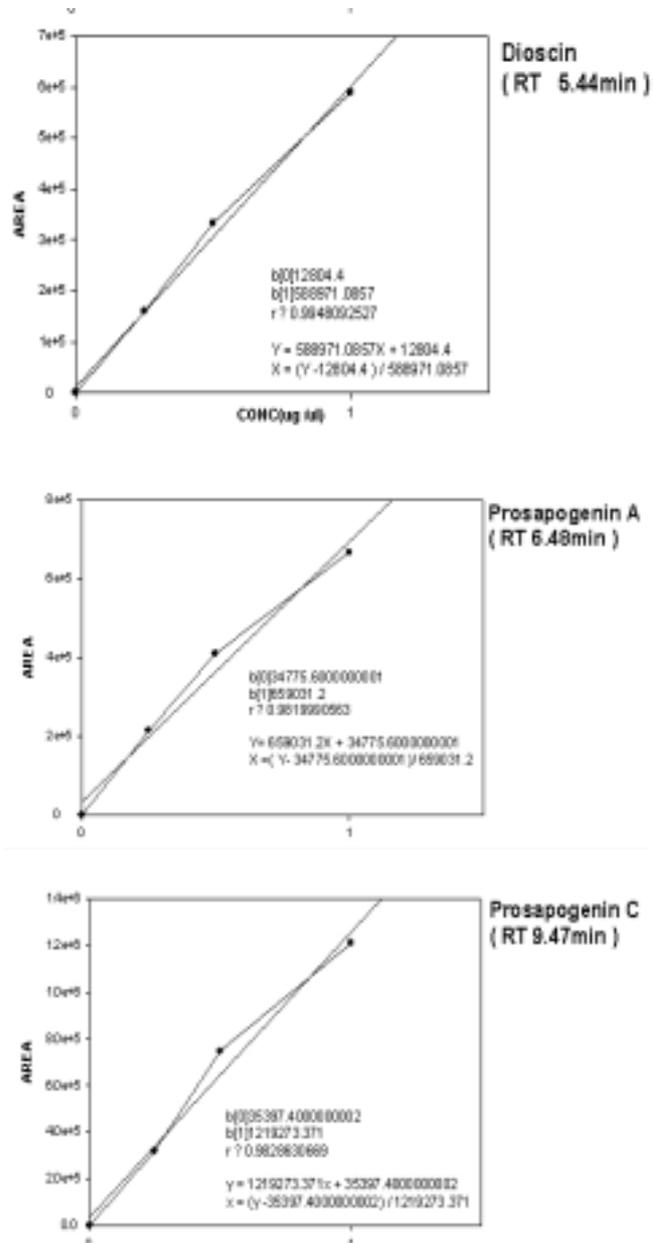


Fig 5. Standard curve of dioscin, prosapogenin A, C in HPLC system II.

다. 재배마와 부채마의 dioscin 및 관련물질 분석

경북북부지역의 재배마와 안동의 산야에서 채취한 야생마의 dioscin 및 prosapogenic A, prosapogenic C의 함량을 조사하였다. 먼저 TLC 결과 재배마에서는 dioscin은 지상부위 및 지하부위 모두 검출이 되지 않았으며, 반면 야생마에서는 다량의 dioscin을 확인하였다(Fig. 6).



Fig. 6. TLC chromatogram of dioscin in *D. batatas*(cultivated) and *D. nipponica*(wild) A: *D. nipponica*, B: dioscin standard, C: *D. batatas*

HPLC에 의한 정량 결과 야생마의 지상부위에서는 검출범위 이하의 dioscin이 발견되었으나, 지하부위에서는 건조중량의 약 2.7% (w/w)가 검출되었다. 이는 손등 (Son et al., 2001)이 *Smilacis Chinae Radix*.에서 보고한 양의 27배 이상의 dioscin이 야생마의 지하부에 존재함을 알 수 있었다. 그러나 dioscin의 함량은 시기별로, 또한 채취장소별로 상당한 변화를 나타내었다 (0.8~6.7 % w/w).

한편 prosapogenin A와 prosapogenin C의 경우 야생마, 재배마의 지하부위, 지상부위 모두에서 검출한계 이하로 존재함을 확인하였다.

2. 마의 기내배양체계 확립

가. 초대배양(primary culture)

마의 근경에서 노두를 무균 배양하여 발생된 재배마(장마, *D. batatas*)와 야생마(부채마, *D. nipponica*)로부터 줄기와 잎 절편체를 채취하여 BA 및 2,4-D 효과를 검정하였고, 종자는 휴면타과를 위해 GA의 효과도 함께 조사하였다 (Table 1, 2). 재배마는 야생마에 비해 캘러스 형성률이 현저히 높으나 절편체로부터 페놀성 독성물질이 심하게 누출되어 배양초기에 대부분의 절편체가 고사되었다(Table 1, Fig. 7).

Table 1. Effects of BA and 2,4-D on *in vitro* culture of *Dioscorea batatas*¹⁾

Treatments (mg/L)	Stem explant			Leaf explant		
	Shoot /Root	Callus	Toxin ²⁾	Shoot /Root	Callus	Toxin
Unt. control	36/0	7	+	0/0	0	+++
BA 0 +2,4-D 1.0	33/1	33	++	0/1	23	+++
+2,4-D 2.0	17/0	20	++	2/0	19	++
+2,4-D 5.0	18/0	0	++	0/0	7	+++
BA0.1 +2,4-D 1.0	28/1	30	++	0/0	30	+++
+2,4-D 2.0	21/1	16	+++	0/0	21	+++
+2,4-D 5.0	26/0	0	++	0/0	16	+++
BA1.0 +2,4-D 1.0	14/1	0	++	0/0	38	+++
+2,4-D 2.0	24/1	4	++	0/1	39	+++
+2,4-D 5.0	20/0	0	+++	0/0	37	++

¹⁾One hundred explants were inoculated on MS/sucrose 30 g/L medium and incubated for 6 weeks

²⁾Degree of phenolic toxin secretion from explants : +++: high, ++: medium, +: low

한편 재배마에서 유도된 캘러스, 신초, 뿌리로부터 dioscin을 분석한 결과 어느 곳에서도 전혀 검출되지 않았으나, 야생마의 부정근 으로부터는 상당량이 검출되어 식물체분석과 같은 결과를 보였다. 따라서 본 연구에는 재배마의 기내배양은 고려하지 않기로 하였다. 부채마는 줄기 및 잎 절편체로부터 페놀성 독성물질은 누출되지 않으나 캘러스 형성률이 재배마에 비해 현저히 낮았고, 형성된 캘러스의 증식도 아주 저조하였다. 따라서 종자로부터 직접 캘러스 유도를 실시하였다

Table 1. Effects of BA and 2,4-D on *in vitro* culture of *Dioscorea nipponica*¹⁾

Treatment (mg/L)	Stem explant			Leaf explant		
	Shoot /Root	Callus	Toxin ²⁾	Shoot /Root	Callus	Toxin
Unt. control	53/44	0	-	0/0	0	-
BA 0 +2,4-D 1.0	36/3	3	+	0/0	2	-
+2,4-D 2.0	20/3	0	-	0/0	0	-
+2,4-D 5.0	20/0	0	+	0/0	0	-
BA0.1 +2,4-D 1.0	37/9	3	-	0/0	1	-
+2,4-D 2.0	33/4	0	+	0/0	1	-
+2,4-D 5.0	10/0	0	-	0/0	0	-
BA1.0 +2,4-D 1.0	42/11	7	-	0/0	1	-
+2,4-D 2.0	23/5	0	+	0/0	0	-
+2,4-D 5.0	26/4	0	+	0/0	0	-

¹⁾One hundred explants were inoculated on MS/sucrose 30 g/L medium and incubated for 6 weeks

²⁾Degree of phenolic toxin secretion from explants : +++: high, ++: medium, +: low

부채마의 종자배양에서 BA 0.1 + 2,4-D 1.0 mg/L를 처리한 배지에서 켈러스 형성율이 가장 양호하였다 (Fig. 7). GA 처리는 종자의 휴면을 타파하여 발아율을 증가에는 효과적이었으나 켈러스 유도에는 효과적이지 못하였다. 따라서 GA를 종자에 1차적으로 처리한 후 BA 0.1 + 2,4-D 1.0 mg/L배지로 옮기는 방식으로 켈러스의 유도율을 증가 시킬 수 있었다. 부채마 종자로부터 발생한 신초, 뿌리, 켈러스의 dioscin 함량을 분석한 결과 신초와 켈러스에서는 아주 미량이 검출되나 발생된 뿌리에서는 이들보다 함량이 현저히 높았다. 따라서 켈러스로부터 부정정근을 유도하는 것이 dioscin의 기내 생산에 유리한 것으로 판단되었다. 따라서 종자에서 유도된 켈러스로부터 부정정근을 유도하는 실험을 수행하였다.



Fig. 7. Secretion of phenolic toxin from explant of *D. batatas* (upper-left), callus for adventitious root formation(upper-right), formation of shoot and root from stem explants (lower-left), initiation of callus from stem and leaf explants(lower-right).

Table 3. Effects of BA, GA and 2,4-D on *in vitro* culture of *D. nipponica* seeds.

Treatments (mg/L)	% Germination	No. of Shoot	No. of Root	No. of Callus
Unt. control	12	6	11	2
BA 0 +2,4-D 1.0	15	3	13	3
+2,4-D 2.0	17	4	15	0
+2,4-D 5.0	6	0	2	4
BA0.1 +2,4-D 1.0	21	4	14	18
+2,4-D 2.0	19	3	16	11
+2,4-D 5.0	15	1	11	3
BA1.0 +2,4-D 1.0	23	11	15	7
+2,4-D 2.0	18	7	17	7
+2,4-D 5.0	21	9	18	6
GA0.5 only	34	16	26	3
GA0.5 +2,4-D 1.0	43	14	22	5
+2,4-D 2.0	37	15	24	5
+2,4-D 5.0	35	14	18	1

¹⁾One hundred explants were inoculated on MS/sucrose 30 g/L medium and incubated for 6 weeks

나. 부정근의 유도 및 증식

예비실험에서 2,4-D에 의해서 유도된 뿌리를 이용하여 대량증식을 위해 다시 발생된 뿌리를 절편체로하여 2,4-D가 함유된 액체배지에 계속 배양할 경우 부정근의 발생율이 현저히 낮고 절편체로 사용한 뿌리가 계속 성장하지 못하고 고사하였다. 따라서 2,4-D 대신 NAA를 처리하여 다시 부정근 유도를 시도 하였다.

부채마 종자를 BA와 NAA가 함유된 배지에 배양하여 뿌리 발생율과 캘러스 유도율을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 신초발생율은 사용된 BA 농도 간에는 차이를 보이지 않으나 NNA의 농도가 1.0에서 2.0 mg/L

로 증가하면 현저히 억제되었다. 싹발생율은 NAA 2.0 mg/L에서 10.1%로 가장 낮았고 BA 1.0 + NAA 1.0 mg/에서 32.7%로 가장 높았다. 본 실험에서 대량증식의 대상이 되는 뿌리는 발생율이 상당히 저조 하였는데, BA 1.0 + NAA 1.0 mg/L 처리를 제외하고는 모두 10% 이하로 낮았다. 한편 캘러스는 NAA 2.0 mg/L를 처리한 배지에서는 전혀 유도되지 않았으나 NAA 1.0 mg/L를 처리한 곳에서는 미량이 유도되었다.

Table 4. Effects of BA and NAA on shooting, rooting and callus formation from *D. nipponica* seeds^a

Treatments (mg/L)	Shooting (%)	Rooting (%)	Callus (%)
BA 0.0 + NAA 1.0	25.7	3.4	5.4
+ NAA 2.0	10.1	4.5	-
BA 0.1 + NAA 1.0	26.5	9.5	3.0
+ NAA 2.0	22.8	6.7	-
BA 1.0 + NAA 1.0	32.7	14.1	6.7
+ NAA 2.0	10.3	8.7	-

^aThe 100 seeds of *D. nipponica* Makino were inoculated with three replications into MS medium and incubated at 27±1°C for 6 weeks.

부채마의 종자배양에서 뿌리의 발생율과 발생량이 저조하여 초대배양에서 발생한 미량의 캘러스와 뿌리를 다시 채취하여 동일한 배지에서 6주간 3회 이상 계대배양하였다. 예비실험에서 2,4-D가 함유된 배지에서는 뿌리의 길이 생장은 일어났으나, 절단된 뿌리로부터 새로운 부정근이 발생되지 않아 오옥신류 생장조절제로 NAA를 사용하였다. 뿌리의 대량증식을 위해서는 각각의 뿌리 절편체로부터 부정근을 유도하고, 이를 대량 증식에 이용하는 것이 효율적이다. 따라서 뿌리 절편체를 약 1 cm 길이로 잘라 NAA 또는 NAA + BA가 함유된 배지에서 액체배양을 실시하여 부정

근의 발생 수, 부정근의 길이 및 생체중을 조사하였다 (Table 5). 뿌리 절편으로부터 발생된 부정근의 수를 보면 NAA 1.0 mg/L 단독처리에서 1 cm 뿌리 절편체 당 24.7개로 가장 효과적이었으나 NAA 1.0 + BA 0.01 mg/L를 혼합 처리한 배지에서는 13.7개로 NAA 단독처리보다 효율이 떨어졌다. 새로 발생된 부정근의 길이는 NAA 0.1 mg/L를 처리하였을 때 평균 77 mm로 가장 길었고, 3.0 mg/L를 처리하였을 때는 7 mm로 가장 짧아 NAA의 농도가 높아질수록 새로 생성된 부정근의 길이는 짧았다. 특히 NAA 3.0 mg/L를 처리한 뿌리는 새로운 부정근의 수가 1.0 mg/L를 처리한 것보다 현저히 낮을 뿐만 아니라 새로 발생된 부정근의 상당부분이 캘러스화 되어 부정근의 증식에 적당하지 않은 것으로 나타났다 (Fig. 8, picture 6).

Table 5. Effects of NAA and BA on adventitious root formation from *in vitro* cultured roots of *D. nipponica*^a.

Treatments (mg/L)	No. of new adventitious roots (/cm · root)	Length of adventitious root(mm)	Fresh weight (mg/flask)
NAA 0.1	2.2 a	77 c	617.7 b
NAA 1.0	24.7 c	21 b	1,278.0 d
NAA 3.0	7.0 b	7 a	337.2 a
BA 0.01 + NAA 0.1	0.0 a	36 b	427.7 ab
+ NAA 1.0	13.8 b	24 b	1,035.6 c
+ NAA 3.0	8.9 b	21 b	554.8 ab

^aThe 100 mg of sliced roots were initially inoculated into 250 ml Erlenmeyer flask containing 50 ml MS medium with 30 g/L sucrose. The flasks were agitated at 100 rpm, 27±1°C for 6 weeks. Statistic analysis was conducted by DMRT at the 5% level.

배양한 뿌리로부터 증식된 부정근의 생체중을 보면 NAA 1.0 mg/L에서 1,278.0 mg으로 최초 100 mg의 배양체로부터 시작하여 6주 후에 12배 이상의 증식효율을 보였다.

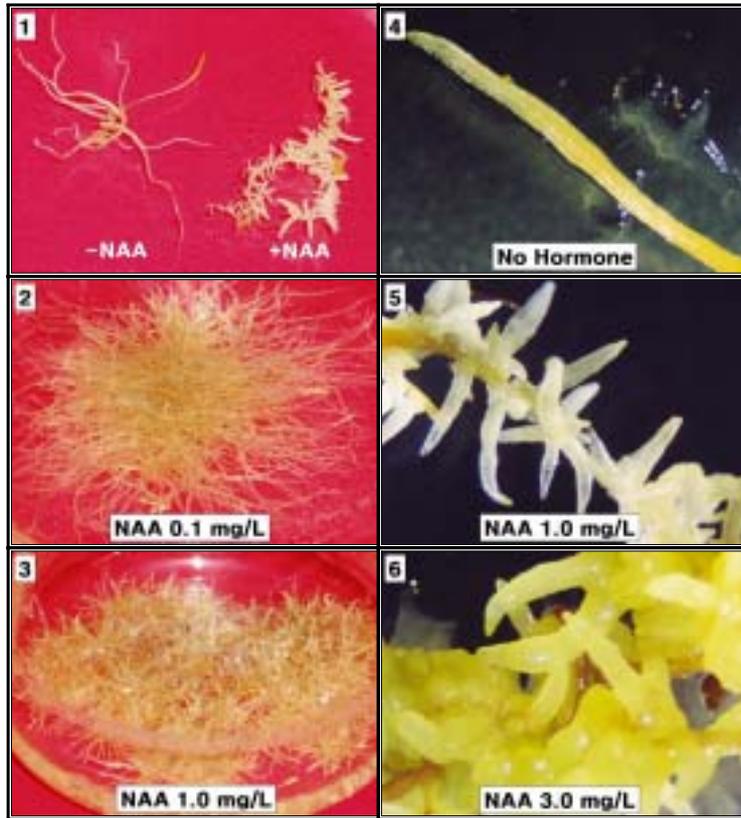


Fig. 8. Formation of adventitious root from the roots explants of *Dioscorea nipponica* by treatment of different concentrations of NAA. 1, comparison of no-NAA and NAA 1.0 mg/L; 2, NAA 0.1 mg/L; 3, NAA 1.0 mg/L; 4. microscopic views (x400) of new forming adventitious roots of picture 4, 5 and 6.

BA 0.01 mg/L를 첨가한 배지에서도 NAA 1.0 mg/L처리가 1,035.6 mg/L로 혼합농도 중 가장 높았으나 NAA 1.0 mg/L 단독처리에 비해 효과가 떨어졌다. Fig. 8의 사진 1, 2, 3은 NAA 농도에 따른 부정근의 발생양상을 나타낸 것으로 NAA 1.0 mg/L 처리에 의해 새로운 부정근의 발생이 현저히 증가하는 것을 보여 주고 있으며, Fig. 8의 사진 4, 5, 6은 이들을 400배 현미경으로 관찰한 사진이다.

조직배양에 있어서 오옥신류 식물생장조절제는 다양한 부분에 사용되는데, 캘러스의 유도에는 2,4-D가 주로 사용되고 있으나, 부정근발생이나 기관분화에는 2,4-D보다 NAA, IAA 또는 IBA와 같은 오옥신이 주로 사용되고 있다 (Blakesely et al, 1991). Seo 등 (2003)은 *Eleutherococcus sessiliflorus*의 부정근 유도에 NAA 또는 IBA 0.5 mg/L이 효과적이라고 하였고, Yoon과 Choi (2002)는 *Polygonatum odoratum*의 부정근 유도에 NAA 0.5 mg/L가 효과적이라고 하였다. Yu 등 (2000)은 인삼의 캘러스로부터 부정근 유도에는 IBA 2.0 + kinetin 0.1 mg/L가 효과적이거나 부정근의 대량증식에는 NAA 2.0 mg/L가 가장 효과적이라고 하였고, NAA에 BA를 첨가하면 오히려 증식효율이 감소된다고 하였다. 이와 같이 많은 연구자들에 의해 여러 종류의 식물체로부터 부정근의 유도와 증식을 시도한 바 있으나, 식물 종이나 절편체의 종류에 따라 오옥신의 요구 농도는 많은 차이를 보였다. 부채마의 경우는 NAA 1.0 mg/L가 가장 효과적 이었으며 BA의 첨가는 오히려 증식 효율을 떨어뜨리는 것으로 나타났다.

다. 부정근 및 배지에 함유된 steroidal saponin의 분석

야생 부채마로부터 무균적으로 유도된 24종의 부정근을 6주간 배양한 후 배양세포와 배지를 회수하여 dioscin 및 관련 물질의 함량, 생산성 및 분비효율을 조사하였다. 그 결과는 <Table 6>에 나타내었으며, 부정근의 dioscin함량이 1% 이상인 경우는 24종 중 8종에 달하였다. 특히 20-1 부

정근 배양의 경우 8.65% (w/w)의 dioscin 함량을 보였으며, 배양액에서도 7.26 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 dioscin이 검출되어(분비효율 7.4%), 차기 년도의 대량배양의 가능성을 확인하였다(Table 6, 7, 8).

한편 31-1 부정근 배양의 경우에는 부정근내 dioscin의 함량은 4.67% (w/w) 였으나, 배양액 중으로 86 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 dioscin을 분비하여 생산된 dioscin의 대부분이 배양액으로 분비됨 (분비율 96%)을 확인하였다. 이러한 부정근은 고농도 고정화 배양에 의한 dioscin의 대량생산을 가능하게 하리라 생각된다.

Table 6. Content of three steroidal saponins, dioscin, prosapogenin A and prosapogenin C in different strains of adventitious roots initiated from *D. nipponica*.

sample No.	sample 무게(ug)	%			total(%)	실제 dioscin	실제 PA	실제 PC양
		Dioscin	PA	PC				
1-1	196870	0.804226	0.678493	0.173768	1.656487	1583.28	1335.75	342.09641
2-1	75510	0	13.02663	1.020127	14.04676	0	9836.408	770.29797
3-1	70900	0.085935	0.033286	0.03611	0.155331	60.92802	23.59976	25.60189
4-1	142890	0.072649	0.005594	0.018813	0.097056	103.8086	7.993195	26.881432
6-1	118960	0.124902	0.010405	0.026667	0.161974	148.5835	12.37806	31.72324
10-1	143340	0.074271	0.036064	0.024946	0.135281	106.4594	51.69411	35.75808
14-1	144040	0.706865	0.260945	0.16184	1.12965	1018.168	375.8659	233.11427
15-1	283540	0.183769	0.002233	0.022231	0.208233	521.0587	6.330408	63.034705
16-1	341170	0.16739	0.001628	0.008019	0.177037	571.0832	5.553878	27.359533
17-1	116860	0.120193	0.002012	0.022445	0.14465	140.4579	2.350692	26.229225
18-1	54870	2.45242	0.592692	0.234933	3.280045	1345.643	325.21	128.90762
19-1	25340	2.966189	3.766318	0	6.732507	751.6323	954.385	0
20-1	52180	8.657395	1.756969	0.055844	10.47021	4517.429	916.7866	29.139284
21-1	107620	0.139662	0.016792	0.023314	0.179768	150.3045	18.07121	25.090626
22-1	52640	1.877829	2.142053	0.223303	4.243184	988.4893	1127.577	117.5465
23-1	64330	0.912051	0.270621	0.165171	1.347843	586.7224	174.0904	106.25448
24-1	65960	1.779988	0.583263	0.042384	2.405635	1174.08	384.72	27.956468
25-1	38720	0.9278	0	0.059055	0.986855	359.2443	0	22.865937
26-1	85890	0.967591	0.728153	0.031413	1.727157	831.064	625.4106	26.980921
27-1	141880	0.540313	0.117705	0.01673	0.674748	766.5958	167.0004	23.736467
28-1	324180	0.274127	0.003383	0.006054	0.283565	888.6655	10.96849	19.62701
29-1	10880	4.079243	1.067675	0.382356	5.529273	443.8216	116.163	41.600308
30-1	28190	1.159623	0.232212	0.085153	1.476987	326.8976	65.46064	24.004535
31-1	20230	4.671805	0.048899	0.118221	4.838925	945.1062	9.892318	23.916101

다양한 부정근 배양의 분석결과를 log 값으로 변환 후, 80% 신뢰도로 cluster와 treeview program을 사용하여 이미지화하여 분석한 결과는 Fig. 9 에 나타내었다.

Clustering 결과 배양액과 부정근으로 명확히 구분되었으며, dioscin과 prosapogenin A 및 C의 생산성으로 또한 구분이 가능하였다. 배양 부정근은 average linkages방법에서는 3가지로 대별되었으며, dioscin 및 관련물질을 ① 고효율로 분비하는 그룹과, ② 부정근, 배양액 모두에 가지고 있으면서 prosapogenin A, C 분비가 특별히 구분되는 그룹, ③ 생산과 분비가 독자적인 그룹 (예, 19-1, 2-1) 으로 확인되었다.

Table 7. Content of three steroidal saponins, dioscin, prosapogenin A and prosapogenin C in culture media of adventitious roots initiated from *D. nipponica*.

sample No.	배양액(배양액 총 50ml)			T(ug-cpds/ml broth)	실제 dioscin	실제 PA	실제 PC양
	Dioscin	PA	PC				
1-1	1.112627	1.054103	1.353527	3.520258	55.63137	52.70517	67.676351
2-1	0	32.95574	11.41591	44.37166	0	1647.787	570.79565
3-1	0	0.283723	0.763738	1.04746	0	14.18614	38.18688
4-1	0	2.007222	0.760303	2.767525	0	100.3611	38.015143
6-1	0	9.808937	8.025344	17.83428	0	490.4469	401.26722
10-1	0	1.396126	1.716663	3.112789	0	69.80632	85.833131
14-1	0.685842	1.341082	2.27621	4.303135	34.29212	67.0541	113.81052
15-1	4.262156	0.750666	0.955531	5.968353	213.1078	37.53329	47.776535
16-1	6.212348	1.545223	2.2284	9.985971	310.6174	77.26113	111.42002
17-1	0.59608	1.476432	2.983571	5.056083	29.80399	73.8216	149.17854
18-1	0	0.980731	1.265092	2.245823	0	49.03655	63.254608
19-1	2.252068	1.09094	2.02575	5.368759	112.6034	54.54702	101.28752
20-1	7.263016	1.367368	2.12066	10.75104	363.1508	68.36841	106.03299
21-1	0	5.124857	3.910597	9.035454	0	256.2429	195.52986
22-1	7.30204	1.276693	0.92904	9.507772	365.102	63.83463	46.451986
23-1	9.193985	1.264394	2.354775	12.81315	459.6992	63.21968	117.73877
24-1	5.67204	1.304185	1.592814	8.569039	283.602	65.20923	79.640718
25-1	3.427315	1.528341	2.818032	7.773688	171.3657	76.41707	140.90159
26-1	0	12.92416	4.709511	17.63367	0	646.2081	235.47556
27-1	2.748155	1.0617	1.274765	5.084619	137.4077	53.08499	63.738236
28-1	10.71071	1.135072	1.620924	13.4667	535.5354	56.75362	81.0462
29-1	0	1.572293	2.46749	4.039783	0	78.61463	123.37452
30-1	0	3.980259	2.679694	6.659954	0	199.013	133.98472
31-1	86.07665	5.585651	3.31232	94.97462	4303.832	279.2825	165.61598

Table 8. Secretion efficiency of three steroidal saponins, dioscin, PA and PC from adventitious roots to culture media of *D. nipponica*.

sample No.	분비율 (%)			Total produced amount		
	dioscin	PA	PC	dioscin	PA	PC
1-1	3.394411	3.795958	16.51558	1638.911	1388.455	409.7728
2-1	0	14.3483	42.56195	0	11484.19	1341.094
3-1	0	37.54348	59.86458	60.92802	37.78591	63.78877
4-1	0	92.62309	58.57804	103.8086	108.3543	64.89657
6-1	0	97.5383	92.67346	148.5835	502.8249	432.9905
10-1	0	57.45355	70.59156	106.4594	121.5004	121.5912
14-1	3.258283	15.1391	32.80553	1052.46	442.92	346.9248
15-1	29.02718	85.568	43.11524	734.1666	43.8637	110.8112
16-1	35.22935	93.29363	80.28562	881.7006	82.815	138.7796
17-1	17.5048	96.91398	85.04671	170.2618	76.1723	175.4078
18-1	0	13.10274	32.9173	1345.643	374.2465	192.1622
19-1	13.02925	5.406412	100	864.2357	1008.932	101.2875
20-1	7.440731	6.939863	78.44285	4880.579	985.155	135.1723
21-1	0	93.41222	88.62725	150.3045	274.3141	220.6205
22-1	26.97284	5.357901	28.32464	1353.591	1191.411	163.9985
23-1	43.93059	26.64011	52.56354	1046.422	237.3101	223.9932
24-1	19.45568	14.49322	74.01747	1457.682	449.9292	107.5972
25-1	32.29598	100	86.03756	530.61	76.41707	163.7675
26-1	0	50.81776	89.71985	831.064	1271.619	262.4565
27-1	15.19991	24.12018	72.86476	904.0035	220.0854	87.4747
28-1	37.60252	83.80368	80.50424	1424.201	67.7221	100.6732
29-1	0	40.36122	74.78384	443.8216	194.7776	164.9748
30-1	0	75.24871	84.80622	326.8976	264.4736	157.9893
31-1	81.99434	96.57912	87.3815	5248.939	289.1749	189.5321

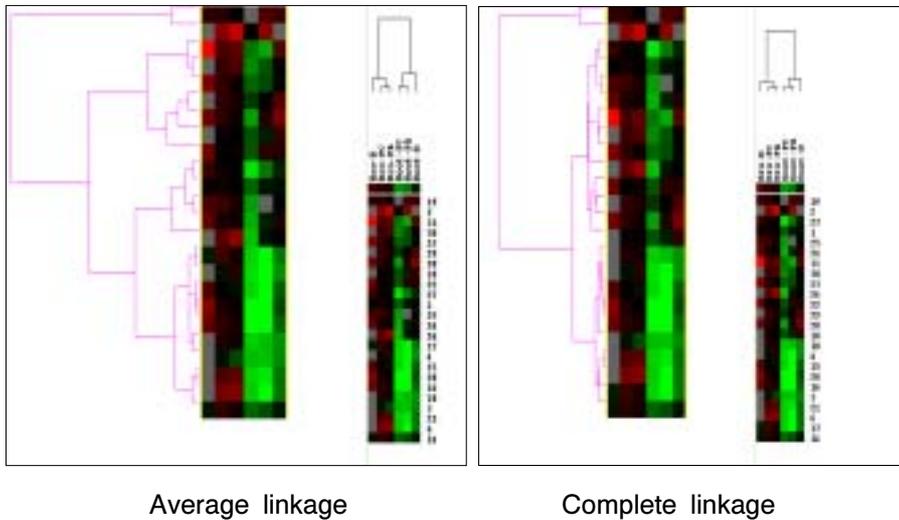


Fig. 9. Cluster analysis of different strains of adventitious roots based on the content of three steroidal saponins

라. 배양주의 선발 및 saponin 함량 비교

부정근의 증식효율이 좋고 saponin의 함량이 많은 배양주 (strain)를 선발하기 위하여 여러 지역에서 채취한 각각 다른 부채마 실생묘 20종의 뿌리로부터 유도된 부정근을 증식시켜 부정근과 배양배지에 함유된 dioscin, prosapogenin A (PA) 및 prosapogenin C (PC)의 량을 분석하였다 (Fig. 10). 각각의 배양주는 3 종류의 steroidal saponin의 함량에서 많은 변이를 보였다. 먼저 부정근에 포함된 함량을 보면 대부분의 배양주가 dioscin, PA 및 PC를 모두 함유하고 있으나, 7, 8, 9, 14번 배양주의 부정근에서는 PA가 전혀 검출되지 않았고, 11번 배양주에서는 PC가 검출되지 않았다.

Dioscin은 20종의 모든 배양주에서 검출되었으나 배양주 간에 상당한 차이가 있는 것으로 나타났다. 부정근에 함유된 dioscin의 량은 2, 3, 5번 배양주와 같이 건물 1g당 2.0 mg (0.2%) 이하의 아주 적은 량이 포함된 것이 있는 반면, 10번 배양주는 약 25 mg (2.5%)으로 배양주에 따라 10 배 이상의 차이가 났다. 한편 부정근을 배양한 배지로 누출된 이들 3성분의 함량을 보면 대부분의 배양주가 3개의 성분 중 2개 이상의 성분을 배지로 분비하는 것을 볼 수 있다 (Fig. 10). Dioscin을 배지로 가장 많이 분비한 배양주는 13번과 14번 배양주로 50 mL 배양액으로 각각 5.5 및 6.0 mg이 분비되었다. 각각의 배양주가 배지로 분비하는 이들 성분에 상당한 차이를 나타내는 것이 다양한 변이성을 가진 개별 배양주의 유전적 특성인지 또는 미세한 배양환경의 차이에 의한 분비시점의 차이인지는 알 수 없다. 그러나 일반적으로 이차대사산물의 특정성분이 배지로 분비되는 특성은 식물세포가 가진 유전적 특성이라기보다는 물질자체의 고유 특성이거나 배양환경에 좌우될 가능성이 높다. 따라서 dioscin, PA 및 PC는 배양주에 따라 분비량의 차이는 있을지 모르나 이들 세 가지 성분은 어느 정도 이상 세포내에 축적이 된 후에는 이를 배지로 분비하는 것으로 판단된다. 유용한 2차대사물을 생산할 목적으로 부정근 기내 대량 배양할 경우 이들 세 가지 성분은 부정근에서 뿐 만 아니라 배지내로 분비되는 원

리를 이용하여 연속배양에 의한 분비유도 조건을 부여하여 대량생산에 이
 용할 수도 있다

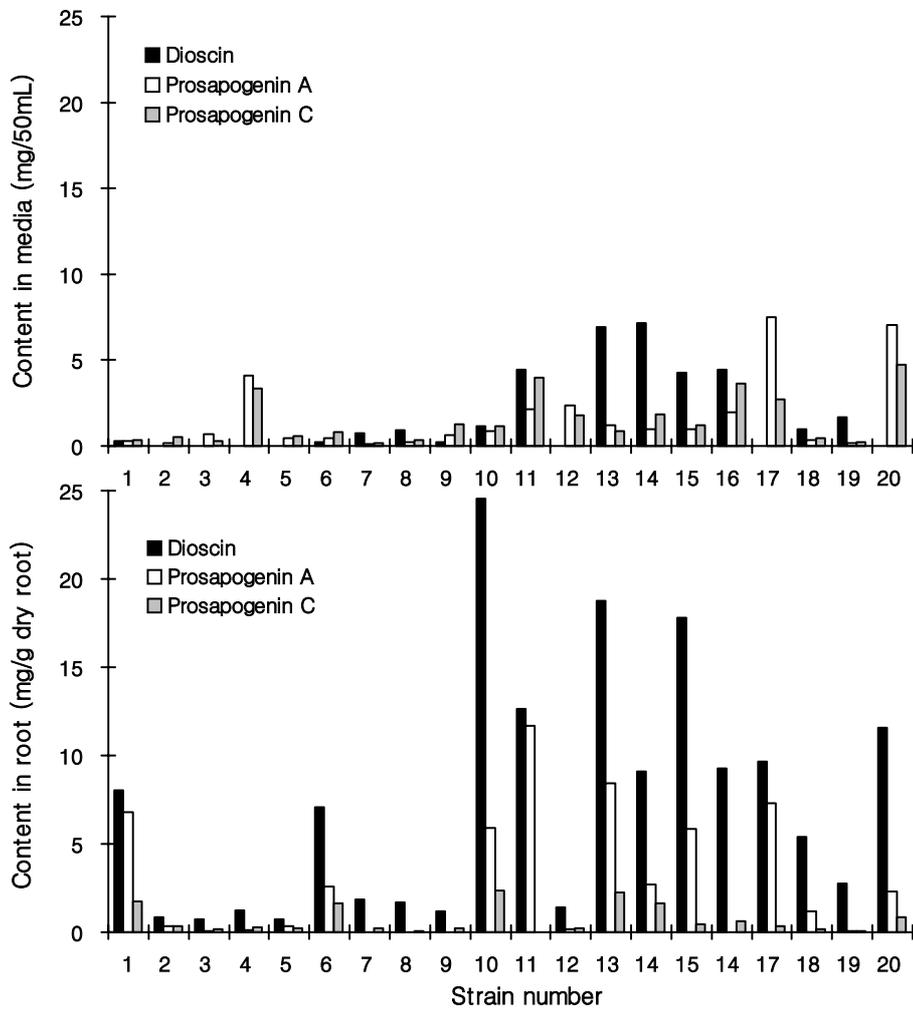


Fig. 10. The contents of three steroidal saponins, dioscin, prosapogenin A and prosapogenin C in the twenty different strains of adventitious roots induced from different seeds of *Dioscorea nipponica*.

마속식물의 기내배양을 통한 steroidal saponin의 생산을 시도한 예를 보면, Tal과 Goldberg (1982)가 *Dioscorea deltoidea*를 세포배양하여 diosgenin의 함량을 세포 건물 당 3.8% 까지 증가시켰으며, Heble과 Staba (1980)는 *Dioscorea composita*의 신초배양에서 diosgenin의 생산을 시도하여 자연 식물체 함량의 72%까지 생산되는 효율이 있었다고 보고하였다. 지금까지 우리나라에 재배 또는 야생에 존재하는 마속 식물의 부정근을 배양하여 steroidal saponin의 생산을 시도한 예는 아직 없다.

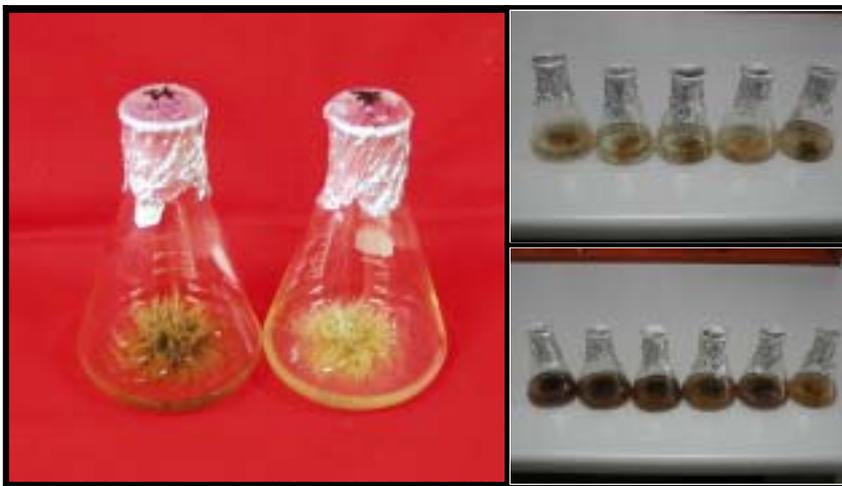


Fig. 11. Different strains of adventitious roots initiated from *D. nipponica* callus. Left strain with brown color produce more dioscin than right strain with white color. Dioscin production from adventitious root in 250 mL culture.

수집종의 다양한 변이성 배양주를 관찰한 결과 dioscin을 많이 분비하는 배양주는 자신이 분비한 dioscin이 발휘하는 자체독성 때문에 일정 정도의 배양기간이 경과하면 부정근의 색이 갈색으로 변하여, 계대배양을 하지 않을 경우 갈변되어 고사하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 11). 따

라서 배양체의 색이 갈변하는 정도로 대량 배양시에 biomass가 dioscin을 생산하는 시점과 안전하게 계대배양을 하는 시각적으로 관찰할 수 있는 지표가 될 수도 있다.

Table 9는 부정근이 함유한 3종의 steroidal saponin의 량과 배양액이 함유한 함량간의 상관관계를 나타낸 것이다. 부정근에 함유된 dioscin의 량은 다른 어떤 성분과도 상관관계가 유의하게 나타나지 않았으나 부정근이 함유한 PA의 량과 부정근의 PC 함량간에는 고도의 상관관계를 가지고 있으며, 부정근 내에 PA함량과 배지내의 PA 및 PC함량과도 정의 상관관계가 있었다. 이 결과로 보면 dioscin보다 PA나 PC가 생합성 후 쉽게 배지로 방출되는 것으로 추정된다.

Table 9. Relation coefficient among dioscin, prosapogenin A(PA) and prosapogenin C(PC) in adventitious roots of *D. nipponica*.

Content in adventitious Roots(AR) or media	DoR	PAR	PCR	DoM	PAM	PCM
Dioscin in AR (DoR)		.31	.013	.374	.123	.389
PA in AR (PAR)			.873*	-.077	.725*	.411*
PC in AR (PCR)				-.010	.756*	.542*
Dioscin in media (PCM)					.423*	.414*
PA in media(PAM)						.772*
PC in media (PCM)						

* : significant at $P = 0.01$

Fig. 10에서 20종의 배양주 중에서 dioscin의 함량이 가장 많은 것으로 나타났던 10번 배양주의 부정근을 이용하여 지속적인 실험을 수행하였다.

Fig. 12는 10번 배양주의 계대배양 시기별 부정근의 증식량과 3종류의

steroidal saponin 함량을 나타낸 것이다. 부정근 약 0.2g을 50 mL의 액체 배지가 함유된 250 mL 삼각플라스크에 접종하였는데, 계대배양 후 약 2주까지는 생장이 느린 유도기가 진행되다가 2주에서 3주 사이에 급속하게 부정근의 증식이 이루어지는 것으로 나타났다.

부정근의 증식량은 계대배양 5주 째에 5.0 g으로 최초 치상한 부정근량의 25배가 증가하였고, 배양 6주 째에는 부정근의 성장량이 더 이상 늘어나지 않고 거의 정체되는 것으로 나타났다. 세가지 성분의 함량을 시기별로 분석한 결과 4주까지는 dioscin이 거의 합성되지 않았으나 뿌리의 생장이 최대로 도달한 5주 째에 급격히 증가하였다.

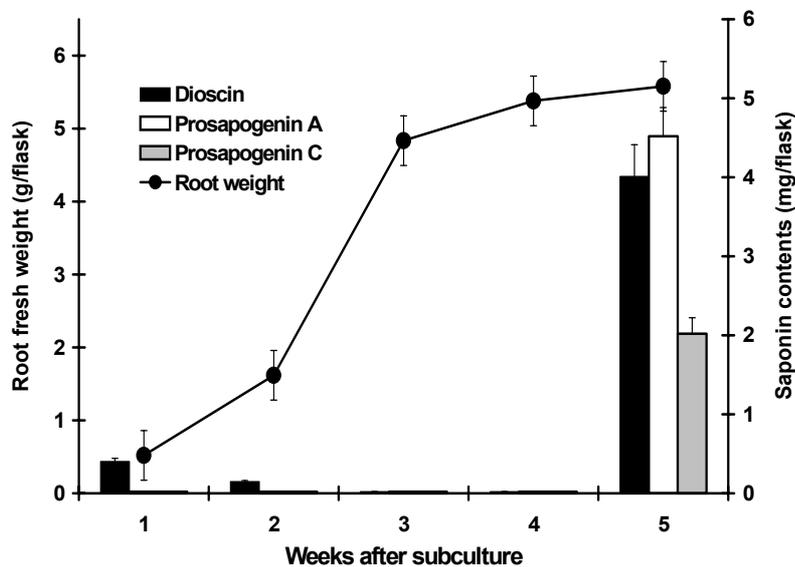


Fig. 12. Time course changes in contents of three steroidal saponins and increase of biomass during 5 weeks cultivation of strain No. 10. The 200 mg of adventitious roots were initially inoculated in 250 mL flask containing 50 mL MS medium with 30 g/L sucrose and 1.0 mg/L NAA.

Tal 등 (1984)은 *Dioscorea deltoidea*의 세포배양에서 diosgenin은 분열 중인 세포에서는 거의 합성되지 않고, 계대배양 후 세포의 양이 더 이상 증가하지 않는 정체기에 급속히 증가한다고 하였다. 이는 본 연구에서 부채마 부정근에 함유된 3종류의 steroidal saponin의 양이 biomass의 양이 더 이상 증가하지 않는 정체기(stationary phase)에 급속히 증가하는 것과 일치하는 결과를 보였다. 250 mL 삼각플라스크에서 5주간 배양한 부정근의 dioscin, PA 및 PC 함량은 각각 3.96, 4.78 및 2.78 mg/flask 이었다. 부정근을 배양한 배지에도 이들 성분이 함유된 것으로 나타났으나, 부정근에 비해 함량이 낮아 본 보고에는 제시하지 않았다. 본 실험에서는 5주째에 조사한 부정근에서 PA의 함량이 가장 높았고, 그 다음이 dioscin 및 PC 였으나, dioscin 함량과 PA 함량간에는 통계적 유의성이 인정되지 않았다. 앞의 실험에서 (Fig. 10) 10번 배양주는 dioscin의 함량이 PA보다 월등히 높았으나, 본 결과에서는 동일한 10번 배양주 임에도 불구하고 dioscin보다 PA의 함량이 오히려 높아 부정근이 함유된 이들 성분의 함량이 배양시기, 배양조건에 따라 상당한 차이를 보이는 것으로 나타났다. 이 부분에 대해서는 이차대사물질의 안정적인 생산 조건을 구명하기 위하여 계속 연구할 필요가 있을 것으로 생각된다.

마. IBA와 NAA의 효과 비교

부정근의 증식과 물질의 함량에 미치는 NAA와 IBA의 효과를 비교하기 위하여 각 성분을 각각 1.0, 3.0, 5.0 mg/L 씩 처리하였다. 먼저 부정근의 성장량을 보면 NAA는 1.0 mg/L에서 가장 양호하였고 3.0 또는 5.0 mg/L로 증가하면 현저히 감소하여 앞의 실험과 동일한 결과를 얻었다 (Fig. 13). IBA는 NAA가 1.0 mg/L에서 부정근의 성장량이 가장 많았던 것과는 달리 3.0 mg/L 처리에서 생장이 가장 양호한 것으로 나타났다. 이 결과로 보아 부채마의 부정근 성장에는 IBA보다 NAA의 요구도가 적은 것으로 판단된다.

한편 부정근에 함유된 3가지의 steroidal saponin 함량을 보면 PA는 NAA와 IBA 간에 유의한 차가 없었으나, dioscin과 PC는 IBA를 처리한 부정근에서 현저히 증가하는 것으로 나타났다. 특히 dioscin의 함량은 NAA 처리에서는 대부분 부정근 건물 1g당 20 mg 내외로 낮았으나 IBA를 처리한 경우 1, 3 및 5 mg/L 처리에서 각각 47, 45 및 38 mg 으로 월등히 높았다. 이 함량은 자연 상태에서 채취한 부채마의 뿌리에 함유된 dioscin 량인 6-8% (Kim et al., 1991)에 상당히 근접한 것으로 dioscin의 함량증가에 IBA가 효율적인 것으로 나타났다.

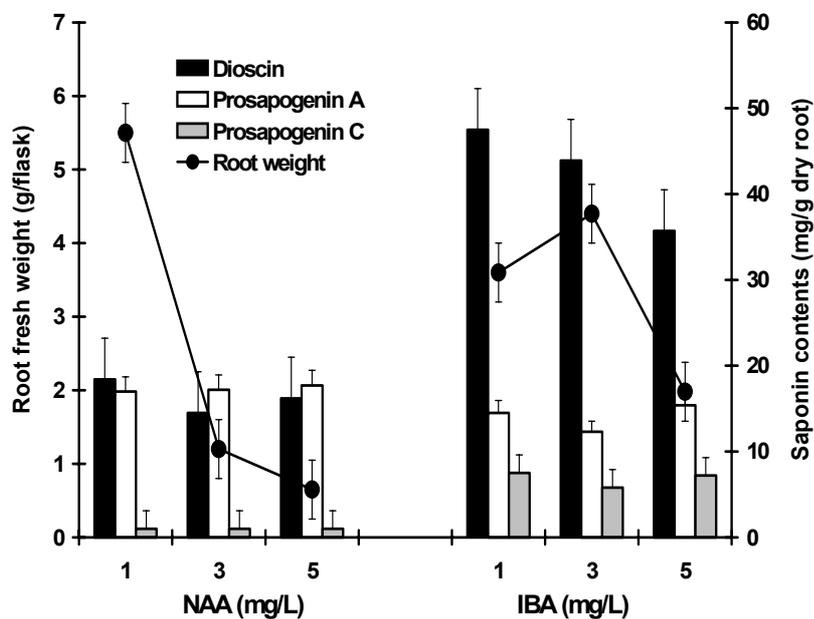


Fig. 13. Effect of NAA and IBA concentrations on growth of adventitious roots and production of three steroidal saponins at 5 weeks after cultivation of strain No.10. The 200 mg of adventitious root segments were initially inoculated in 250 mL flask containing 50 mL MS medium with 30 g/L sucrose..

이상에서 부채마의 부정근 배양을 통하여 steroidal saponin인 dioscin, prosapogenin A 및 prosapogenin C를 기내 생산하는 시스템을 확립하기 위해, 먼저 부정근의 유도과 대량증식 조건을 구명하였고, 20종의 배양주로부터 dioscin을 고생산하는 배양주를 선발하였으며, 선발된 배양주의 배양시기별 부정근 성장량과 물질함량, NAA 및 IBA의 효과를 구명하였다.

부채마의 부정근 대량배양을 통하여 이들 물질을 경제적으로 생산하는 시스템이 확립된다면, 야생식물 자원을 이용하여 고부가가치의 생리활성 물질을 산업화하는데 크게 기여할 것이다. 더불어 dioscin의 함량 면에서 재배마보다 100배 이상 더 많은 부채마의 dioscin 생합성 인자를 도입한 재배마를 개발하여 재배마의 기능성을 증가하는 방안도 함께 고려할 필요도 있다.

3. 부정근의 대량생산 조건 구명

가. 당의 종류 및 농도 효과

배지의 탄소 공급원으로 당의 종류를 달리 처리하여 부정근의 성장에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 14, Fig. 15). Sucrose는 3%의 처리가 6% 처리보다 부정근의 생장이 양호하였으나, fructose와 glucose은 3%보다 6%의 처리를 처리한 것이 부정근 성장에 효과적이었다. 한편 galactose는 두 농도 간에 차이가 나지 않았다. 따라서 biomass를 대량생산하는 비용적인 측면에서 sucrose가 가장 효율적인 것으로 판단되어 지속적인 실험에서는 sucrose를 사용하기로 하였다.

Sucrose 15, 30, 60 및 90 g/L를 처리한 결과 60g/L에서 증식효율이 가장 좋았다. 15, 30 및 90 g/L 간에는 유의차가 인정되지 않았다 (Fig. 16, 17). 당의 함량을 30에서 60 g/L로 두배 증가할 경우 부정근의 성장량은 양호하나 대량 배양에서 경제성이 문제가 되므로 무기염류나 성장조절 물질 등 다른 배지요인들도 조사할 필요가 있다.

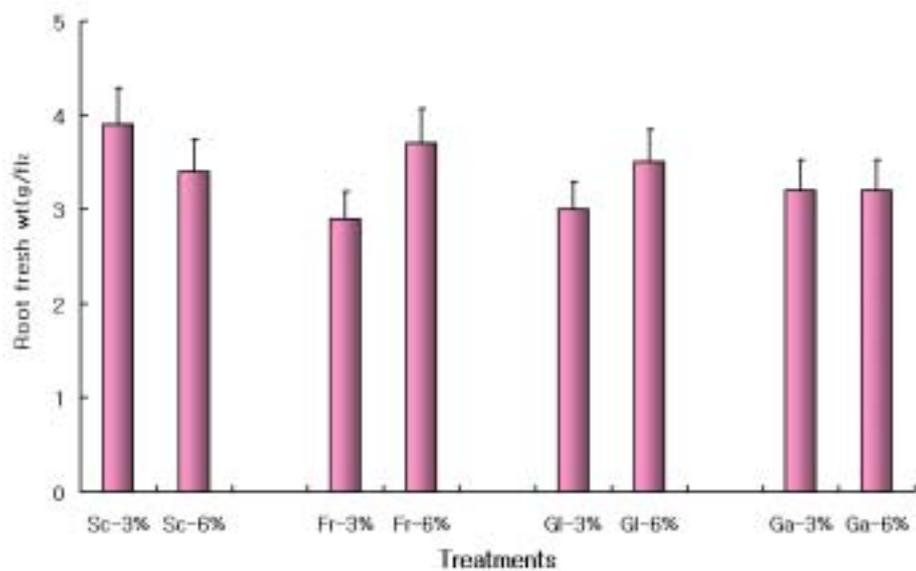


Fig. 14. Effect of sucrose(Sc), fructose(Fr), glucose(Gl) and galactose (Ga) the growth of adventitious root of *D. nipponica* after 5 weeks culture in MS medium (NAA 1.0 mg/L).



Fig. 15 Effect of different types of sugars on the growth of adventitious roots. Adventitious roots were cultures on MS medium supplemented with NAA 1.0 mg/L and 30 g/L of each sugar.

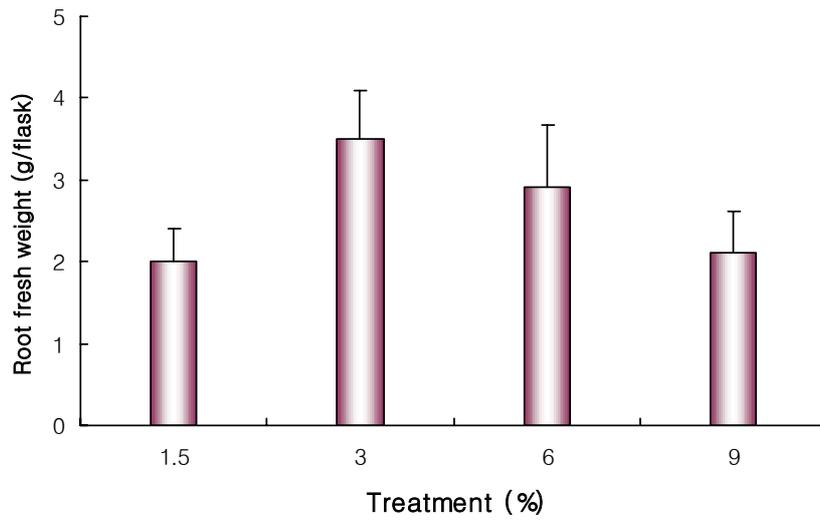


Fig. 16. Effect of sucrose concentration on the growth of adventitious root of *D. nipponica* after 5 weeks culture in MS medium (NAA 1.0 mg/L).



Fig. 17 Effect of sucrose concentration on the growth of adventitious roots in 5 L bioreactor. Adventitious roots were cultured on MS medium with NAA 1.0mg/L for 6 weeks.

나. 배지종류 및 염분농도

Fig. 18은 MS 배지와 SH배지의 염분농도를 기준의 1/4, 1/2, 1 배로 하였을 때 부정근의 증식량을 나타낸 것이다. MS배지와 SH 배지간에 차이가 인정되지 않았으며, 염분의 농도간에도 유의한 차이가 인정되지 않았다. 염분의 농도를 표준배지보다 1/4까지 낮추어도 부정근의 증식을 오히려 촉진(유의성은 없음)하는 경향으로 나타났다. 이 결과는 금후 대량배양시 다량의 배지가 소요되는 점을 감안할 때 상업적 이용에서는 염분의 농도를 낮춤으로써 획기적인 비용절감에 효과가 있을 것으로 사료 된다.

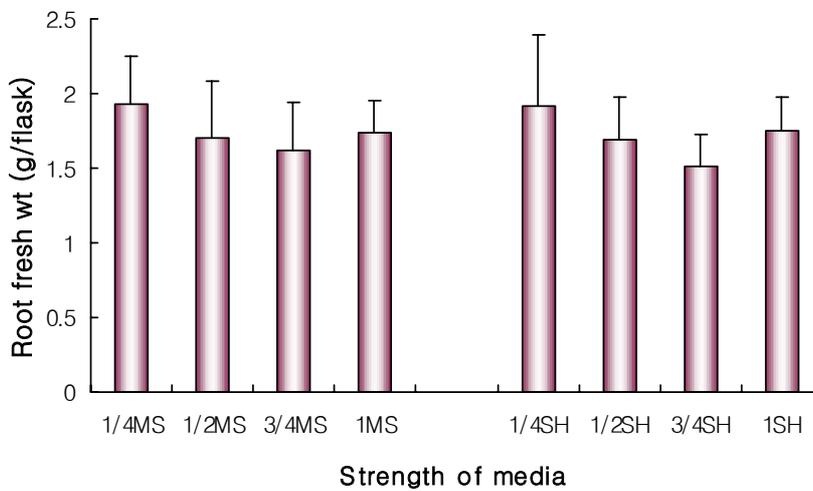


Fig. 18. Effect of different media and salt strength on the growth of adventitious root of *D. nipponica* after 5 weeks culture in MS medium.

다. NAA와 cytokinin의 혼용효과

NAA 1.0 mg/L에 BA, kinetin 및 2iP를 각각 0.1 및 1.0 mg/L를 첨가하여 부정근의 성장량을 조사하였다(Fig. 19). 모든 처리에서 NAA에 cytokinin 류를 1.0 mg/L 혼합하는 것보다 저농도인 0.1 mg/L를 혼합하여 처리하는 것이 부정근의 성장에 효과적이었다. 따라서 cytokinin의 농

도가 증가하면 부채마의 부정근의 증식에는 억제작용을 하는 것으로 나타났다. 본 실험에서 가장 양호한 처리는 NAA 1.0 + kinetin 0.1mg/L로 나타났다. NAA 1.0+2iP 0.1 처리도 NAA 1.0 mg/L 단독처리에 비해 양호한 것으로 나타났다.

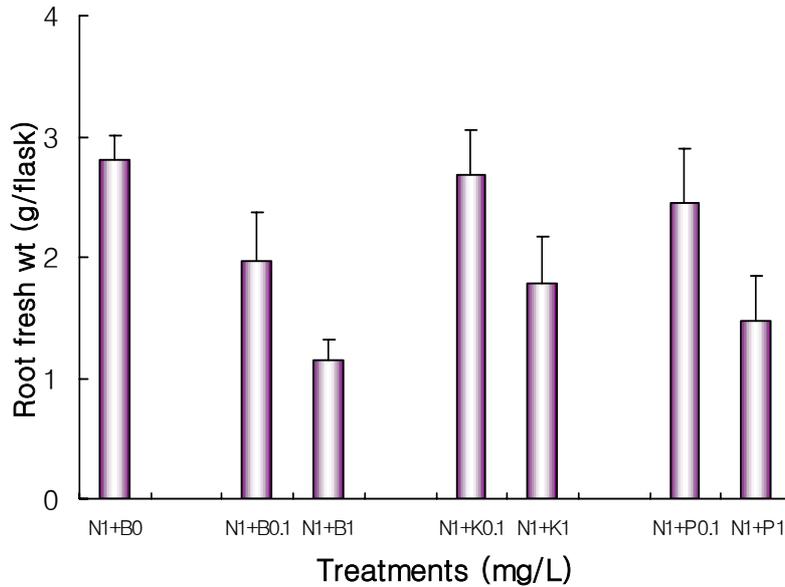


Fig. 19. Effect of different cytokinins concentration with NAA on the growth of adventitious root of *D. nipponica* after 5 weeks culture in MS medium (N: NAA, B: BA, K: Kinetin, P: 2iP).

라. 질소원의 종류와 처리비율

MS배지에서 질소원으로 사용되는 KNO_3 와 NH_4NO_3 의 처리 배율을 0, 1/2, 1 및 2배씩 혼합처리하여 부정근의 성장량을 조사하였다. KNO_3 는 MS 표준량이 가장 양호한 경향이었으며 NH_4NO_3 는 MS배지의 1/2정도를 처리하여도 부정근의 증식에는 영향을 미치지 않았다(Fig. 20).

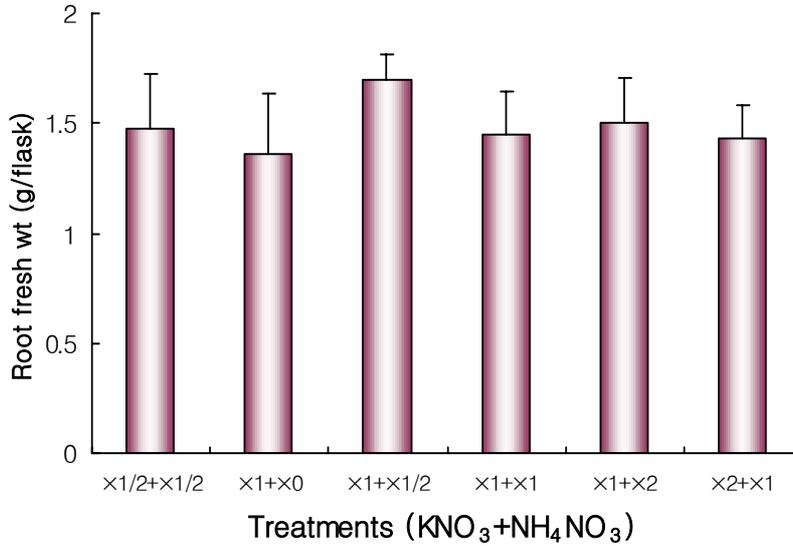


Fig. 20. Effects of initial nitrogen salt concentrations on the growth of adventitious root of *D. nipponica* after 5 weeks culture. Concentrations KNO₃ and NH₄NO₃ are base on MS basal medium.

이결과로 보아 부채마의 부정근 증식에는 MS 기본 배지에 함유된 량만으로 충분하며 필요시 이들 두성분의 함량을 반으로 줄여도 부정근의 증식에 영향이 없는 것으로 판단된다.

고등식물은 주 질소원으로 nitrate 와 ammonium를 흡수하는데, 대부분의 ammonium의 경우는 뿌리에 유기 합성물과 작용하는 반면, nitrate는 뿌리의 액포, 경엽부 그리고 기타 저장기관에 저장되어진다. 특히, *Chenopodium album*과 *Vritica dioica* (Smirnoff *et al.* 1985)에서 nitrophilic라 불리는 것처럼 액포에 nitrate의 축적은 삼투조절로서 양·음이온 균형에 중요한 역할을 한다.

마. Auxin의 효과 비교

부채마 부정근의 생장에 미치는 auxin의 효과를 알아보기 위하여 NAA, IBA 및 IAA를 각각 1.0, 3.0 및 5.0 mg/L 처리하였다. NAA는 1.0

mg/L처리에서 가장 양호하였고 IBA는 3.0 mg/L처리에서, IAA는 5.0 mg/L처리에서 가장 양호하였다. 이것으로 보아 NAA가 부정근의 성장에 가장 적절한 처리로 판단된다. IBA와 IAA는 각각 3.0 mg/L와 5.0 mg/L 처리가 저농도인 1.0 mg/L 처리보다 효과가 좋은 것으로 보아 부정근의 성장에 NAA보다와 이들 두 성장조절제를 고농도로 요구하는 것으로 추정된다. NAA의 농도별 처리시 1.0 mg/L에서 5.5 g/flask로 가장 좋은 성장을 보였으며 농도가 높아질수록 생장이 떨어졌다. IBA의 경우 3.0 mg/L에서 4.4 g/flask로 높은 성장을 보였으나 NAA 1.0 mg/L 처리보다는 낮은 성장을 보였다 (Fig. 21, 22, 23).

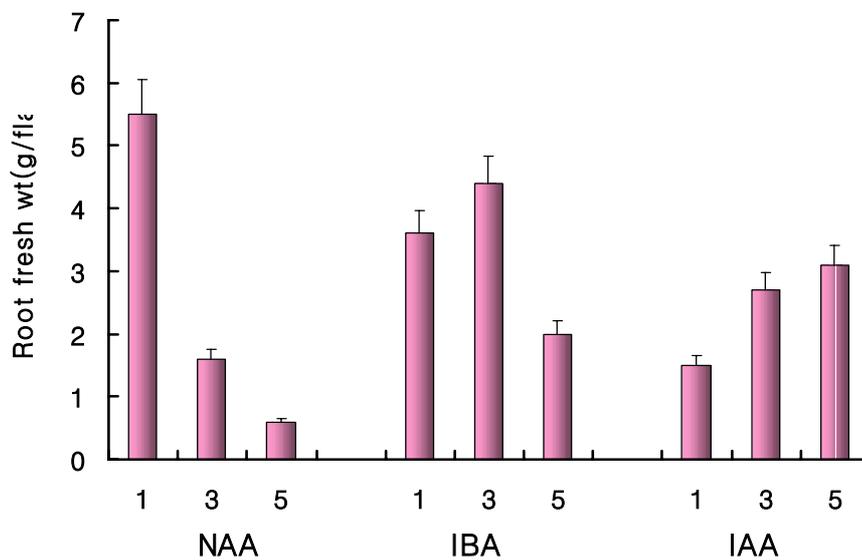


Fig. 21. Effect of NAA, IBA concentrations on the growth of adventitious roots of *D. nipponica* after 5 weeks culture in MS medium(NAA 1 mg/L).

본 연구는 부정근을 대량배양하여 biomass를 식용이나 약품의 첨가물로 이용하는 것이 아니라, 특정물질인 dioscin이나 관련 steroidal saponin을 추출·정제하는데 이용할 목적으로 사용된다.

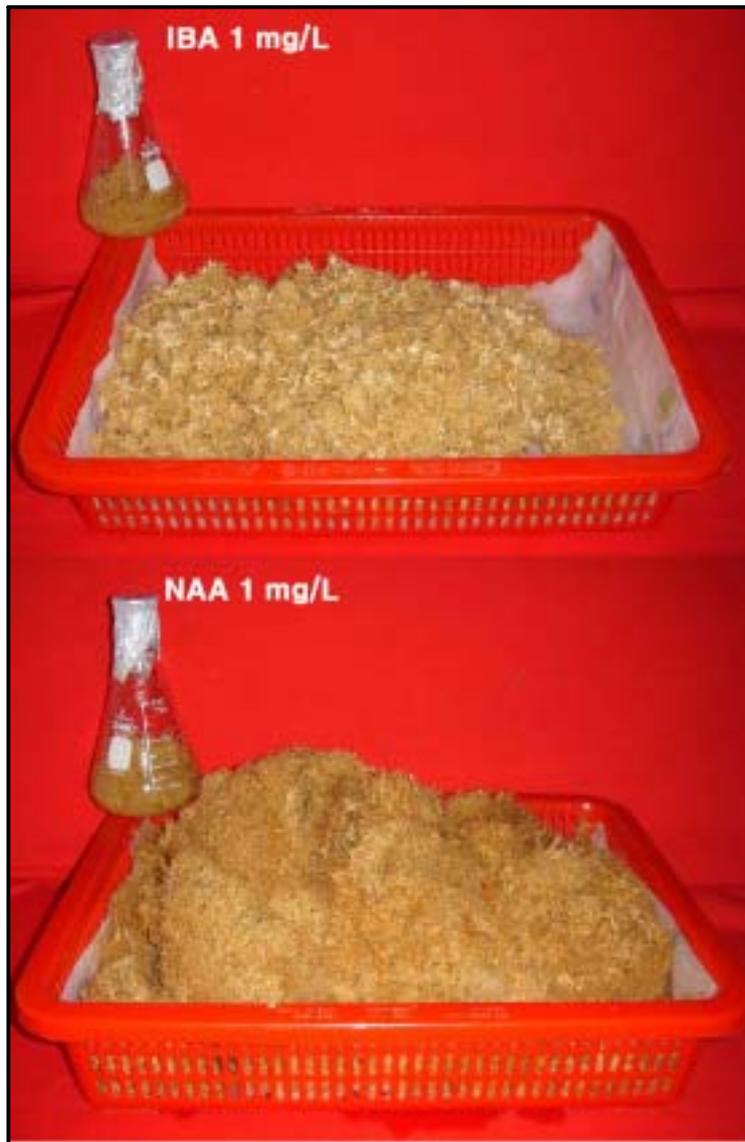


Fig. 22. Comparison of biomass yields between NAA and IBA through 18L bioreactor culture. Adventitious roots were harvested 6 weeks after culture inoculating 250 mL culture

따라서 사용된 생장조절물질은 정제과정에서 완전히 배제되며, 순수한 유

용물질만을 획득하게 된다.



Fig. 23. Comparison of biomass yields between NAA and IAA through 18L bioreactor culture. Adventitious roots were harvested 6 weeks after culture inoculating 250 mL culture

그러므로 조직배양에서 사용된 생장조절물질의 인체독성이나 부작용을 염

려할 필요는 전혀 없으므로 사용된 생장조절제의 종류와는 관계가 없을 것으로 사료된다.

본 실험의 결과에서 NAA가 biomass의 생산에는 저농도로서 가장 탁월한 효과가 있으므로 부정근의 대량배양에 NAA 1.0 mg/L를 적정 농도로 사용하기로 하였다.

바. 배지산도의 효과

MS 기본배지에 NAA 1.0mg/L, sucrose 30g/L 등 배지의 모든 조건을 동일하게하고 배지의 산도를 5.0에서 7.0까지 조정하여 부정근의 성장량을 조사하였다(Fig. 24). pH 6.0, 6.5 및 7.0 간에는 차이가 없었으나 pH가 5.5이하로 떨어지면 부정근 성장에 현저한 억제작용을 나타내었다. 따라서 부채마의 부정근은 산성조건에서는 강한 억제를 받고 중성근처의 산도에서 정상적인 성장을 하는 것으로 나타났다.

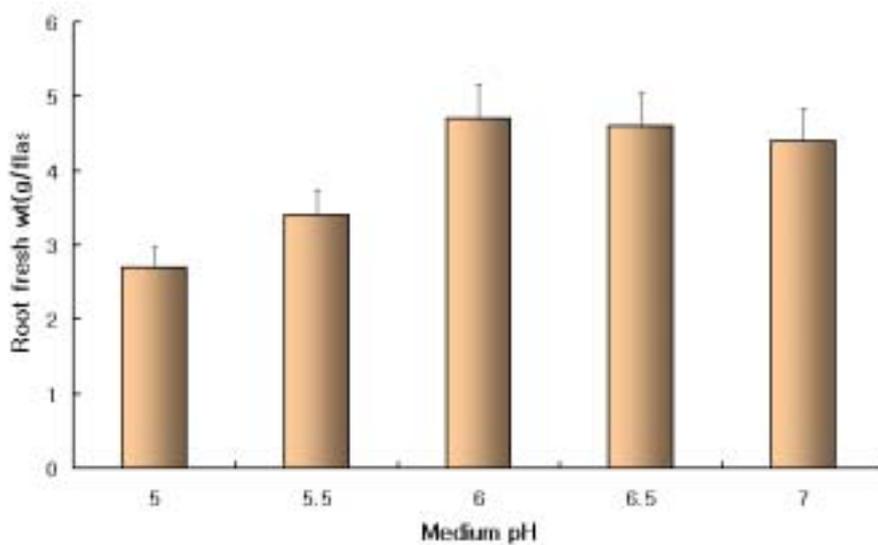


Fig. 24. Effect of medium pH on the growth of adventitious roots of *D. nipponica* after 5 weeks culture in MS medium(NAA 1 mg/L).

4. 부정근의 steroidal saponin의 생산에 미치는 영향

가. 당의 종류 및 농도 효과

탄소원으로 당의 종류를 4종류로 달리하여 처리한 결과 부정근내에 함유된 dioscin, prosapogenin A 및 C의 함량차이는 유의성이 인정되지 않았고 배지내에 분비된 dioscin 및 PA의 함량에도 영향을 미치지 않았다. 그러나 배지로 분비된 PC의 함량은 모든 종류의 당 처리에서 60g/L 처리보다 낮은 농도인 30g/L를 처리한 배지에서 2배 이상 증가하였다. 따라서 당의 농도를 증가시키는 것보다 30g/L를 처리하는 것이 물질생산에 효율적이다. 앞의 실험에서 sucrose가 부정근의 biomass 성장에 가장 효과적이어서 sucrose를 대상으로 계속적인 실험을 수행하였다.

Table 10. Effects of various sugars on *in vitro* production of steroidal saponins, dioscin, PA and PC.

Sugars (g/L)	Content in advent. root (mg/g dry root)			Content in media (mg/L media)		
	Dioscin	PA	PC	Dioscin	PA	PC
Sucrose 30	32.0 a	12.7 a	0.9 a	5.9 a	4.7 a	7.9 b
60	28.2 a	11.8 a	1.1 a	4.8 a	4.1 a	3.3 a
Fructose 30	27.8 a	11.2 a	0.7 a	5.1 a	4.0 a	7.4 b
60	26.3 a	10.4 a	1.2 a	4.9 a	4.3 a	4.3 a
Glucose 30	30.1 a	9.3 a	1.3 a	5.7 a	3.9 a	7.8 b
60	28.4 a	11.1 a	0.8 a	5.6 a	4.4 a	2.4 a
Galactose 30	33.1 a	10.3 a	1.3 a	5.4 a	4.4 a	7.0 b
60	30.1 a	11.4 a	0.9 a	5.6 a	4.1 a	1.3 a

^aMeans followed within a column by DMRT at p=0.05

Sucrose의 농도가 부정근의 성장과 steroidal saponin의 함량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 NAA 1.0 mg/L가 포함된 MS배지에서 sucrose

농도를 달리하여 배양하였다. Sucrose를 1.5, 3, 6 및 9%의 농도로 첨가하여 5주 동안 배양한 결과 부정근과 배지내의 steroidal saponin의 함량은 Table 11과 같았다. Dioscin 함량은 sucrose 3%에서 31.0 으로 가장 높았으며 6%에서 14.3 mg/g으로 가장 낮은 함량을 보였다. 부정근 내의 PA는 처리간 큰 차이를 보이지 않았으나 dioscin함량과 같이 sucrose 3%에서 11.7 mg/g으로 높은 함량을 나타내었으며 부정근 내의 PC는 sucrose 3%에서만 미량 확인되었다. 배지내의 dioscin, PA 및 PC는 부정근 내의 dioscin, PA에 비해 매우 낮은 함량을 보였으며 각 처리 간 유의성이 없었다.

Table 11. Effects of sucrose concentrations on *in vitro* production of steroidal saponins, dioscin, PA and PC.

Conc. of sucrose (%)	Content in adventitious root (mg/g dry root)			Content in media (mg/L media)		
	Dioscin	PA	PC	Dioscin	PA	PC
1.5	20.9 ab ^z	7.4 a	0.0 a	1.3 a	12.7 b	3.8 a
3	36.1 a	11.7 a	0.9 a	5.9 a	4.7 a	7.9 b
6	14.3 b	10.3 a	0.0 a	4.4 a	6.8 a	1.5 a
9	26.8 ab	6.5 a	0.0 a	6.1 a	11.6 b	1.1 a

^zMeans followed within a column by DMRT at p=0.05

배지 내 탄소원의 농도는 타가영양체인 배양세포의 성장에 크게 영향을 줄 뿐만 아니라 대사물질의 합성에도 중요한 영향을 미치게 된다 (Weathers *et al.* 1997). 그 중 sucrose는 식물조직배양에 있어서 주요 에너지원으로서, 그리고 생합성의 요소로서 흔히 사용되는 탄소원이다. 이러한 당의 소비는 세포의 성장과 직접적으로 관계되어 있다.

나. 배지종류 및 염분농도

부채마 부정근의 성장과 steroidal saponin 생산에 가장 효과적인 배지를 선택하기 위하여 1/4×MS, 1/2×MS, 3/4×MS, 1×MS, 1/4×SH, 1/2×SH, 3/4×SH, 1×SH 등 8종의 배지에 탄소원으로 sucrose 3%와 호르몬으로 NAA 1.0 mg/L를 첨가하여 5주간 부채마 부정근을 배양하였다. 그 결과 부정근 내의 dioscin 함량은 MS배지 농도간에는 차이를 보이지 않았으나 SH배지 농도간에는 차이를 나타내었다 (Table 12).

Table 12. Effects of media and salt strength on *in vitro* production of steroidal saponins, dioscin, PA and PC.

Strength. of MS & SH	Content in adventitious root(mg/g dry root)			Content in media (mg/L media)		
	Dioscin	PA	PC	Dioscin	PA	PC
1/4 MS	22.7 b ^z	25.1 a	0.0 a	9.0 a	5.1 a	1.6 a
1/2 MS	26.7 ab	20.0 a	0.0 a	4.4 a	4.2 a	0.8 a
3/4 MS	27.6 ab	14.6 ab	2.1 a	1.0 a	1.2 a	0.8 a
1/1 MS	31.4 ab	15.5 ab	0.0 a	1.6 a	1.5 a	0.6 a
1/4 SH	43.6 a	16.4 ab	0.0 a	0.7 a	2.0 a	1.0 a
1/2 SH	20.5 b	5.0 b	0.8 a	3.7 a	4.6 a	2.5 a
3/4 SH	20.1 b	27.2 a	0.0 a	1.6 a	5.1 a	0.3 a
1/1 SH	16.0 b	10.8 b	0.0 a	0.9 a	1.4 a	0.1 a

^zMeans followed within a column by DMRT at p=0.05

1/4×SH 배지에서 43.6 mg/g으로 가장 높은 dioscin 함량을 나타내었고 1×SH배지에서 16.0 mg/g으로 가장 낮은 dioscin 함량을 나타내었다. 부정근 내의 PA의 함량은 3/4×SH, 1/4×MS 및 1/2×MS에서 높았으며 1/2×SH에서 5.0 mg/g으로 가장 낮은 함량을 나타내었다. 반면, 부정근 내

의 PC와 배지 내의 dioscin, PA, PC의 함량은 각 처리 간 통계적 유의성이 없었다 (Table 12). 조직배양에 있어서 배지 성분은 배양체의 성장은 물론 분화에 관여하는 가장 중요한 요소이며, 이차대사물질의 형성에도 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다 (Toivonen et al. 1991; Weathers et al. 1997).

다. NAA와 cytokinin의 혼용효과

액체배지에서 가장 효과적인 생장을 보였던 auxin류 중에서 NAA 1.0 mg/L와 cytokinin류 인 BA, kinetin, 2iP를 각 0.1 mg/L와 1.0 mg/L씩 조합한 배지에서 부정근을 배양하여 생장과 steroidal saponin 함량을 조사하였다 (Table 13).

Table 13. Effects of different cytokinins with NAA on *in vitro* production of steroidal saponins, dioscin, PA and PC.

Treatments(mg/L)	Content in adventitious root (mg/g dry root)			Content in media (mg/L media)		
	Dioscin	PA	PC	Dioscin	PA	PC
NAA 1.0+ 0	30.5 a ^z	11.1 b	0.4 a	0.8 a	1.1 a	2.0 a
+BA 0.1	16.8 b	7.6 b	0.0 b	0.8 a	1.4 a	2.0 a
+BA 1.0	23.5 ab	0.0 b	0.0 b	1.4 a	2.2 a	2.7 a
+Kinetin 0.1	17.3 b	4.8 b	0.0 b	2.2 a	4.6 a	1.7 a
+Kinetin 1.0	17.5 b	15.1 ab	0.0 b	1.8 a	2.6 a	0.8 a
+2iP 0.1	21.8 ab	8.7 b	0.0 b	1.1 a	2.8 a	0.6 a
+2iP 1.0	21.9 ab	28.3 a	0.0 b	2.2 a	1.2 a	2.7 a

^zMeans followed within a column by DMRT at p=0.05

부정근 내의 dioscin 함량은 NAA 1.0 mg/L 단독 처리시 30.5 mg/g으로 가장 높게 나타났으며 NAA 1.0 mg/L와 BA, kinetin, 2iP 1.0 mg/L를 혼용한 처리가 0.1 mg/L를 혼용한 배지보다 전체적으로 높은 dioscin 함량을 나타내었다 (Table 13).

부정근 내의 PA는 NAA 1.0 + 2iP 1.0 mg/L에서 가장 높았으며 NAA 1.0 + kinetin 1.0 mg/L, NAA 1.0 mg/L 단독처리 순으로 낮아졌고 BA 1.0 mg/L 혼용처리에서는 검출되지 않았다.

부정근 내 PC는 NAA 1.0 mg/L 처리에서 0.4 mg/L로 매우 미량이 검출되었으나 나머지 처리에서는 확인되지 않았다. 배지내의 dioscin, PA 및 PC는 부정근에 비해 매우 낮은 함량을 보였으며 각 처리 간 통계적 유의성이 없었다 (Table 13).

라. 질소원의 종류와 처리비율

질소원 중 nitrate와 ammonium의 농도를 $1/2 \times \text{KNO}_3 + 1/2 \times \text{NH}_4\text{NO}_3$, $1 \times \text{KNO}_3$, $1 \times \text{KNO}_3 + 1/2 \times \text{NH}_4\text{NO}_3$, $1 \times \text{KNO}_3 + 1 \times \text{NH}_4\text{NO}_3$, $1 \times \text{KNO}_3 + 2 \times \text{NH}_4\text{NO}_3$, $2 \times \text{KNO}_3 + 1 \times \text{NH}_4\text{NO}_3$ 로 변화시켜 MS배지에 탄소원으로 sucrose 3%와 호르몬으로 NAA 1.0 mg/L를 첨가하여 5주간 부채마 부정근을 배양하였다 (Table 14).

그 결과 부정근 내의 dioscin 함량은 $1 \times \text{KNO}_3 + 2 \times \text{NH}_4\text{NO}_3$ 처리에서 30.3 mg/g로 가장 높았으며, $1 \times \text{KNO}_3 + 0 \times \text{NH}_4\text{NO}_3$ 의 처리에서 18.3 mg/g로 가장 낮은 dioscin 함량을 나타내었다.

부정근 내의 PA는 전처리구에서 20.2~12.6 mg/g으로 다소 양호하였으며 PC는 $\text{KNO}_3 \times 1/2 + \text{NH}_4\text{NO}_3 \times 1/2$ 에서 2.6 mg/g, $\text{KNO}_3 \times 1 + \text{NH}_4\text{NO}_3 \times 2$ 에서 1.9 mg/g의 함량을 보였으며 그 밖의 처리에서는 확인되지 않았다. 배지내의 dioscin, PA 및 PC는 매우 미량으로 나타났으며 통계적 유의성은 없었다.

Table 14. Effects of KNO₃ and NH₄NO₃ on *in vitro* production of steroidal saponins, dioscin, PA and PC.

Treatments (strength of MS basal)	Content in adventitious root(mg/g dry root)			Content in media (mg/L media)		
	Dioscin	PA	PC	Dioscin	PA	PC
KNO ₃ ×1/2 + NH ₄ NO ₃ ×1/2	27.5 ab ^z	19.9 a	2.6 a	0.0 c	1.6 a	1.3 a
KNO ₃ × 1 + NH ₄ NO ₃ × 0	18.3 c	20.2 a	0.0 b	0.9 bc	2.0 a	1.1 a
KNO ₃ × 1 + NH ₄ NO ₃ ×1/2	21.5 c	15.2 a	0.0 b	1.8 ab	1.9 a	6.3 a
KNO ₃ × 1 + NH ₄ NO ₃ × 1	27.5 ab	12.8 a	0.0 b	0.3 bc	1.6 a	1.1 a
KNO ₃ × 1 + NH ₄ NO ₃ × 2	30.3 a	14.4 a	1.9 a	3.2 a	1.1 a	1.4 a
KNO ₃ × 2 + NH ₄ NO ₃ × 1	22.9 bc	12.6 a	0.0 b	1.8 ab	0.6 a	0.0 a

^zMeans followed within a column by DMRT at p=0.05

마. Auxin의 효과비교

Auxinfb 생장조절물질인 NAA, IBA 및 IAA의 효과를 비교하였다. 천연 호르몬인 IAA는 NAA나 IBA에 비해 물질생산량이 현저히 떨어지고 IBA처리가 NAA 처리에 비해 높았다 (Table 15).

Table 15. Effects of NAA and IBA on *in vitro* production of steroidal saponins, dioscin, PA and PC

Treatments (mg/L)	Content in adventitious root (mg/g dry root)			Content in media (mg/L media)			
	Dioscin	PA	PC	Dioscin	PA	PC	
NAA	1.0	17.1 b ^z	14.5 a	0.0 b	2.8 c	21.3 a	2.7 a
	3.0	8.2 c	16.0 a	0.0 b	1.8 c	9.5 ab	2.7 a
	5.0	13.6 b	16.5 a	0.0 b	6.5 c	10.6 ab	0.0 a
IBA	1.0	39.0 a	13.6 a	6.8 a	73.3 a	20.3 a	3.8 a
	3.0	36.9 a	16.5 a	3.5 ab	6.7 c	11.6 ab	1.1 a
	5.0	30.0 a	14.4 a	6.5 a	30.0 b	3.3 b	1.0 a
IAA	1.0	8.1 c	12.5 a	0.0 b	1.8 c	11.3 ab	1.7 a
	3.0	8.2 c	11.0 a	0.0 b	0.8 c	8.5 ab	2.4 a
	5.0	6.0 c	11.5 a	0.0 b	4.5 c	8.6 ab	1.1 a

^zMeans followed within a column by DMRT at p=0.05

따라서 식물의 천연호르몬인 IAA는 부정근의 성장뿐만 아니라 steroidal saponin의 기내생산에도 효과적이지 못한 것으로 나타났다.

NAA와 IBA를 비교해 보면, 부정근 내 dioscin 함량은 IBA처리시 30.0~39.0 mg/L로 NAA처리시 8.2~17.1 mg/L에 비해 높게 나타났다. 부정근 내 PA의 함량은 13.6~16.5 mg/g으로 큰 차이를 보이지 않았으며 IBA 1.0 mg/L에서 13.6 mg/g으로 가장 낮았다. 부정근 내의 PC는 IBA 처리시 미량 나타났고 NAA 처리에서는 나타나지 않았다. 배지 내 dioscin의 함량은 IBA 1.0 mg/L에서 73.3 mg/L로 다른 처리에 비해 현저히 높게 나타났으며 PA 역시 가장 높은 수치를 나타내었다. 배지 내 PC 함량은 각 처리 간 통계적 유의성이 없었다.

바. 배지산도의 효과

배지의 산도를 pH 5.0에서 7.0까지 조사한 결과 배지의 pH가 6.0이하로 떨어지면 부정근 내의 dioscin 함량이 유의하게 감소하였으나 PA 및 PC는 처리간에 유의차가 없었다(Table 16). 따라서 부정근의 biomass의 성장과 물질 산 측면에서 보면 배지의 pH는 6.0 내외로 조정하는 것이 가장 바람직할 것으로 판단된다.

Table 16. Effects of medium pH on *in vitro* production of steroidal saponins, dioscin, PA and PC.

Medium pH	Content in adventitious root(mg/g dry root)			Content in media (mg/L media)		
	Dioscin	PA	PC	Dioscin	PA	PC
5.0	12.5 b ^z	15.1 a	1.0 a	1.1 a	1.1 a	1.3 a
5.5	16.2 b	10.0 a	0.0 a	1.4 a	1.2 a	0.8 a
6.0	27.2 a	14.6 a	2.1 a	2.3 a	1.2 a	0.7 a
6.5	21.4 ab	15.5 a	0.1 a	1.4 a	1.5 a	0.3 a
7.0	23.6 a	10.4 a	0.0 a	0.7 a	2.0 a	1.0 a

^zMeans followed within a column by DMRT at p=0.05

사. Elicitor 효과

부채마 부정근에 NaF, AgNO₃, chitosan, cellulase, jasmonic acid, cyclohexamide 등의 elicitor를 농도별로 처리하여 steroidal saponin의 함량을 높이기 위한 조건을 구명하고자 하였다. 부정근을 NAA 1.0 mg/L가 첨가된 MS기본배지에서 5주 동안 배양한 후 elicitor를 처리하여 48시간 배양하여 steroidal saponin의 정량분석을 수행하였다 (Table 17).

Table 17. Effects of various elicitors on *in vitro* production of steroidal saponins, dioscin, PA and PC.

Concentrations of elicitors (mg/L)	Content in adventitious root (mg/g dry root)			Content in media (mg/L media)			
	Dioscin	PA	PC	Dioscin	PA	PC	
Control	30.5	7.2	0	10.3	0	8.7	
NaF	10	13.1	0.0	1.3	73.1	0	90.3
	50	11.9	0.0	0	22.3	0	87.4
AgNO ₃	10	5.1	0.7	0	55.7	0	122.3
	50	11.2	0.0	0	95.6	0	123.6
Chitosan	10	4.4	0.3	0	19.6	0	0
	50	5.1	0.3	0	0	0	0
Cellulase	2	13.0	1.0	0	9.1	0	111.0
	10	20.3	4.5	0	60.9	0	0
Jasmonic acid	1	4.2	0.6	0	53.4	0	68.4
	5	2.8	0.2	0	50.8	0	88.4
Cyclohexamide	10	19.3	0.0	0	14.6	0	93.9
	50	20.7	0.0	0	25.2	0	45.4

부정근 내 dioscin 함량은 모든 elicitor 처리에서 control에 비해 낮게

나타났으며, cellulase 10.0 mg/L처리에서 20.3 mg/g, cyclohexamide 50 mg/L 처리에서 20.7 mg/g으로 높은 함량을 나타내었다. 부정근 내의 PA 역시 control에서 7.2 mg/g으로 elicitor처리보다 높았으며 부정근 내의 PA와 PC는 대부분의 처리에서 검출되지 않았다. 배지내의 dioscin은 AgNO₃ 50 mg/L처리에서 95.6 mg/L로 가장 높았다. 배지의 경우 전체적으로 부정근 내의 물질함량과 반대로 대부분의 elicitor가 control보다 높게 나타나 control에서 가장 낮았다. 배지내의 PC함량 역시 부정근 내에는 거의 나타나지 않았으나 배지에서 다량 검출되었다. 이것은 elicitor 처리가 주로 세포막을 파괴하는 역할을 하여 부정근 내에 함유되어있던 물질이 배지내로 유출되었을 것이라고 추정된다.

정상적인 식물에 미생물이 침입하게 되면, 식물은 이에 방어하기 위해 이차 대사산물을 급격히 증가시키거나, lignification 등 여러 가지 방어기작을 일으킨다. 식물 방어기작 중 가장 잘 알려진 것은 감염 부위에 phytoalexin의 축적이다. Mansfield 등 (1974)은 잎에 *Botrytis cinerea*을 감염시켜 phytoalexin을 생산한 바 있다. 그 밖에 자외선, heat shock, elicitor, environmental stress등 stress나 방어기작을 이용한 이차 대사산물의 생산에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있는데, 그 중 지치 (*Lithospermum erythrorhizon*)의 경우 elicitor 처리를 하여 shikonin을 대량생산한 예가 있다 (Tabata *et al.*, 1985)

아. 최적조건 및 과제

본 연구에서 다양한 요인들을 조사한 결과, 부정근의 증식 dioscin의 함량에 가장 효과적인 배양 조건들을 정리하였다(Table 17). 지금까지 배양해 오던 MS/sucrose 30g · L⁻¹/NAA 1.0 mg · L⁻¹보다 부정근의 증식과 dioscin의 생합성에 효과적인 배양 조건이 다수 있었다. 따라서 최종적으로 가장 적합한 배양 조건을 찾기 위해서 다음과 같은 사항을 고려할 것이다.

Table 17. Optimal conditions for the growth of adventitious roots and dioscin production from roots or culture media.

Treatments	Growth of adventitious root		Dioscin content in adventitious root		Dioscin content in medium	
	Optimal	Result ¹⁾	Optimal	Result ²⁾	Optimal	Result ³⁾
Sucrose	30 g/L	100	30 g/L	36.1	90 g/L	6.1
MS strength	1/4	111	1.0	31.4	1/4	9.0
SH strength	1/4	111	1/4	43.6	1/2	3.7
Add BA	No effect	-	1.0 mg/L	23.5	1.0 mg/L	1.4
Add kinetin	No effect	-	1.0 mg/L	17.5	0.1 mg/L	2.2
Add 2iP	No effect	-	1.0 mg/L	21.9	1.0 mg/L	2.2
KNO ₃ +NH ₄ NO ₃	1+1/2	118	1+2	30.3	1+2	3.2
IBA	3.0 mg/L	80	1.0 mg/L	39.0	1.0 mg/L	73.3
IAA	5.0 mg/L	66	3.0 mg/L	8.2	5.0 mg/L	4.5
Medium pH	6.0	100	6.0	27.2	6.0	2.3

¹⁾Result calculated as % fresh weight of adventitious root comparison with the fresh weight of root grown in MS/sucrose 30g · L⁻¹/NAA 1.0 mg · L⁻¹. ²⁾Dioscin content mg/dry root weight. ³⁾Dioscin content mg/L culture medium.

- 기본배지는 MS 또는 SH 어느 것을 사용하더라도 염류농도를 1/4정도로 줄여도 부정근의 biomass 생산이나 부정근 내의 dioscin 함량에 영향을 미치지 않는다.
- Sucrose 처리는 30 g/L를 처리하는 것이 적정하고 타 종류의 당은 부정근의 성장이나 dioscin의 생산에 효과적이지 못하다.
- 생장조절물질인 NAA에 cytokinin (BA, kinetin, 2iP)의 첨가는 부정근의 biomass 생산을 억제할 뿐만 아니라 부정근 내의 dioscin의 함량을 감소시키므로 적절하지 못하다.

- NAA는 IBA로 대체하는 것이 dioscin의 함량증가에 유리하나 IBA를 처리할 경우 처리농도를 3.0 mg/L로 증가시켜야 한다.
- Elicitor를 처리하면 부정근에서 생합성된 dioscin이 배지내로 상당수 누출되므로 배양액으로부터 dioscin을 회수하는 것이 경제적이다.

4. Bioreactor 개발 및 배양

가. 2L air lift type 배양기

1) 형태 및 공기 주입 및 배출시스템

기존의 2 L 삼각 플라스크를 사용할 경우에는 외부의 공기유입이 극히 제한되기 때문에 야생마 부정근의 생장의 효율성이 현저히 저하된다. 그래서 본 새로운 공기주입식 배양기를 개발하게 되었다. 배양기는 유리 재질과 플라스틱 재질 두 가지 형태를 개발하였다(Fig. 25).

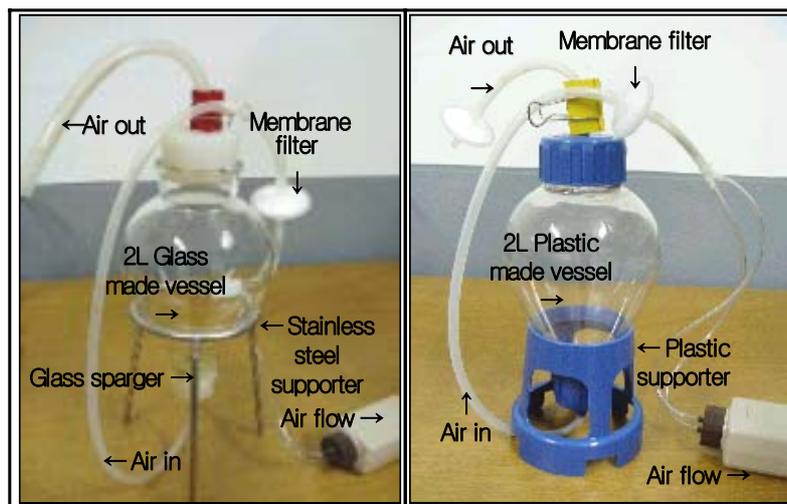


Fig. 25. Two types of 2L air lift bioreactor with glass(left) and plastic(right) made

2 L용량의 공기주입식 배양기(Fig. 26)의 구성을 살펴보면 우선 형태는 원형으로 하여 내부에서의 부정근의 순환을 효율적으로 할 수 있게 하였으며, 밑 부분에 공기를 미세한 공기방울의 형태로 주입할 수 있게 유리섬유를 사용한 스파자가 위치하고 있으며 이를 silicon으로 고정하였다. 배양기의 윗부분에는 내부로 주입되는 공기를 배출할 수 있는 벤트장치를 silicon으로 고정하였다(Fig. 27).

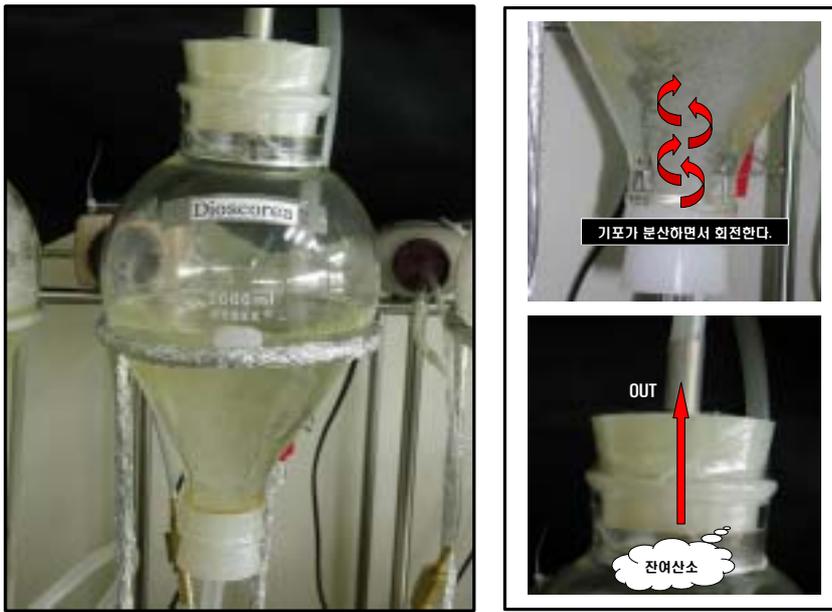


Fig. 26. Model of air supply and ventilation system for 2L air lift bioreactor developed for adventitious root growth.

2 L 바이오리액터는 스파자를 통하여 기포 형태의 공기가 배양기 하부에서 주입되게 되면 배양배지에 회전력이 생기게 되어 접종된 야생마의 부정근이 부양하게 되며 지속적으로 배양기 내를 순환하게 되어 부정근의 생장을 극대화 할 수 있다.



Fig. 27. Sparger and ventilation system of 2 L air-lift bioreactor.

2) 새로운 스파자(sparger) 시스템의 개발

공기 주입을 위한 스파자 시스템은 본 2 L 배양기에서 매우 중요한 역할을 담당하는 부분으로 주입되는 공기방울이 미세할수록 효과적이다. 또한 공기의 주입시 배양배지의 회전력을 일으키는 원동력이 되고 회전이 효율적으로 이루어지게 되면 집종된 야생마 부정균이 바이오리액터의 기저부에 침전되어 뭉치는 것을 방지할 수 있다. 부정균이 침전되어 뭉치게 되면 생장이 현저히 저하되므로 보다 효율적으로 회전력을 부여할 수 있는 스파자 장치의 개발이 요구된다.

기존에 사용하던 유리 스파자는 Fig. 28에서 보는바와 같이 일정한 각도 없이 일자형으로 구성되어 있는 것으로 볼 수 있다. 여기에 회전력을 증가시키기 위해서 본 연구팀에서는 유리섬유가 부착되어 있는 스파자의 주둥이 부분에 20°의 경사를 주어 제작하였다. 그 결과 기존의 일자형 스파자 보다 배양기 내에서 배양배지의 회전력이 증가되어 집종된 야생마 부정균의 침전을 효율적으로 억제할 수 있었다

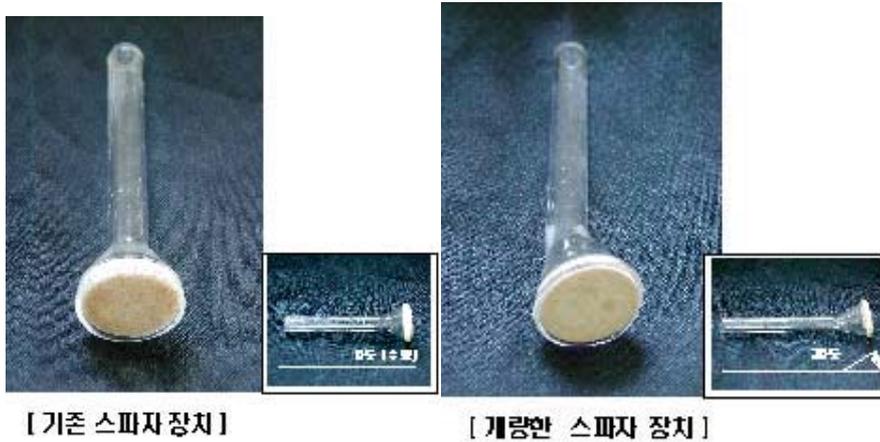


Fig. 28. New type of sparger system for 2L air lift type bioreactor.

효율적인 야생마 부정근의 성장을 위하여 무균적인 공기의 주입은 어항용 소형 공기주입기를 사용하였고 무균적으로 공기를 주입하기 위하여 membrane filter(0.2 μ m)를 부착하여 배양기와 연결하였다.

3) 부채마 부정근의 배양

다양한 배지가 함유된 2 L생물반응기에 부채마 부정근 1.0 g을 잘게 잘라 접종하여 6주간 배양한 후 생체중을 조사하였다. Fig. 14는 2 L 생물반응기에서 6주간 배양한 부정근의 생체중이다. 부정근의 성장은 sucrose 3%, NAA 1.0 mg/L가 첨가된 배지에서 135.2 g/2 L로 초기 접종량의 1.0 g의 135배 성장으로 최고의 성장을 보였으며 sucrose 3%, IBA 1.0 mg/L가 포함된 MS배지에서 20.58 mg/2 L로 가장 낮은 성장을 보였다. 이 결과는 앞의 250 mL삼각플라스크를 이용한 현탁배양 실험에서와 마찬가지로 2L bioreactor에서도 1.0 mg/L NAA가 포함된 MS배지에서 가장 높은 성장을 나타냄을 확인하였다 (Fig. 29, 30).

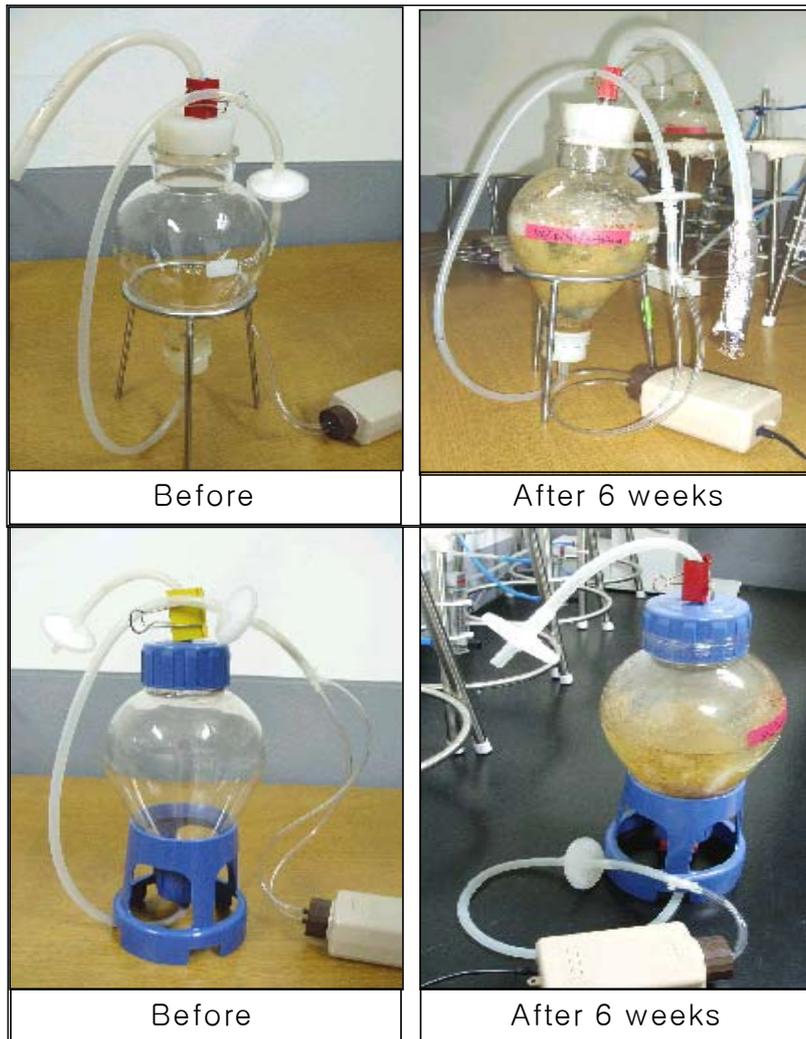


Fig. 29. Adventitious roots cultures of *D. nipponica* through two types of 2L air lift bioreactor system. Glass type(upper) and plastic type(lower).

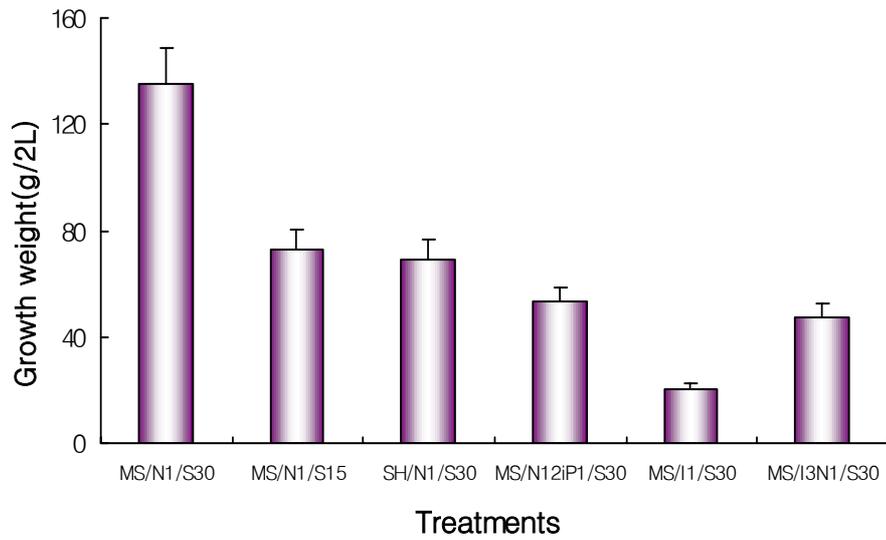


Fig. 30. Effect of various treatment on the growth of adventitious root of *D. nipponica* after 6 weeks culture in 2 L bioreactor (N : NAA (mg/L), I : IBA (mg/L), S : sucrose (g/L)).



Fig. 31. Modified 2L air lift type bioreactor with plastic material.

나. 5 L Bioreactor

본체는 유리로 된 5 L 용기이며 2 L 배양기와 원리는 같으나 sparger 윗부분에 배지를 교환, 공급하는 기능을 첨가하였으며 air pump를 설치하여 많은 배양기를 한꺼번에 공기주입 할 수 있게 하였다 (본 장치는 주식회사 Vitrosys에서 개발된 것을 주문 생산하여 사용하였음). 또한 5 L 배양기에 각각 air flow meter를 설치하여 개별로 공기 공급량을 조절할 수 있게 하였다 (Fig. 32).

본 배양기의 공기공급 장치는 compressor를 이용하여 발생하는 공기를 3단계의 membrane filter를 거쳐 공급하며, airflow meter를 이용하여 동일한 량의 공기를 공급할 수 있도록 하여 배양효율을 높였다 (Fig. 33).

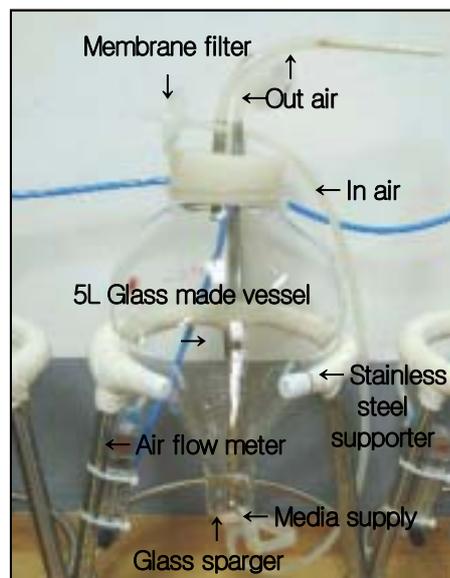


Fig. 32. 5L glass type air-lift bioreactor system used for culture of adventitious rpts



Fig. 33. Multi-connection culture by one air compressor for 5L glass type air-lift bioreactor used for culture of adventitious roots.

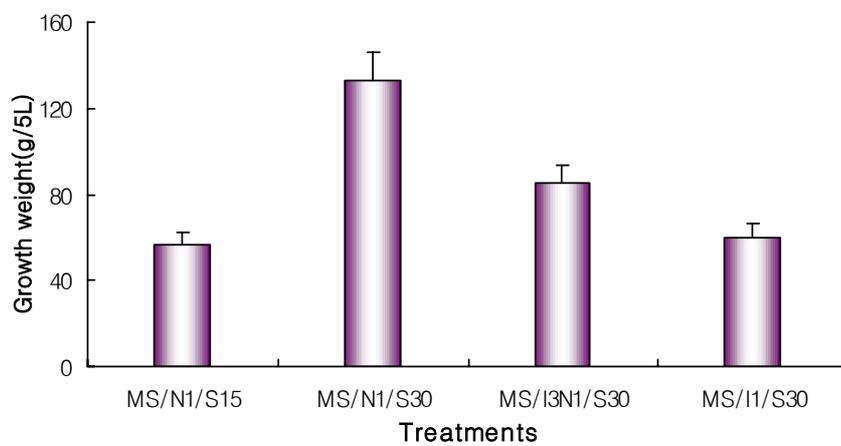


Fig. 34. Effect of various treatment on the growth of adventitious roots of *D. nipponica* after 6 weeks culture in 5 L bioreactor (N : NAA (mg/L), I : IBA (mg/L), S : sucrose (g/L)).

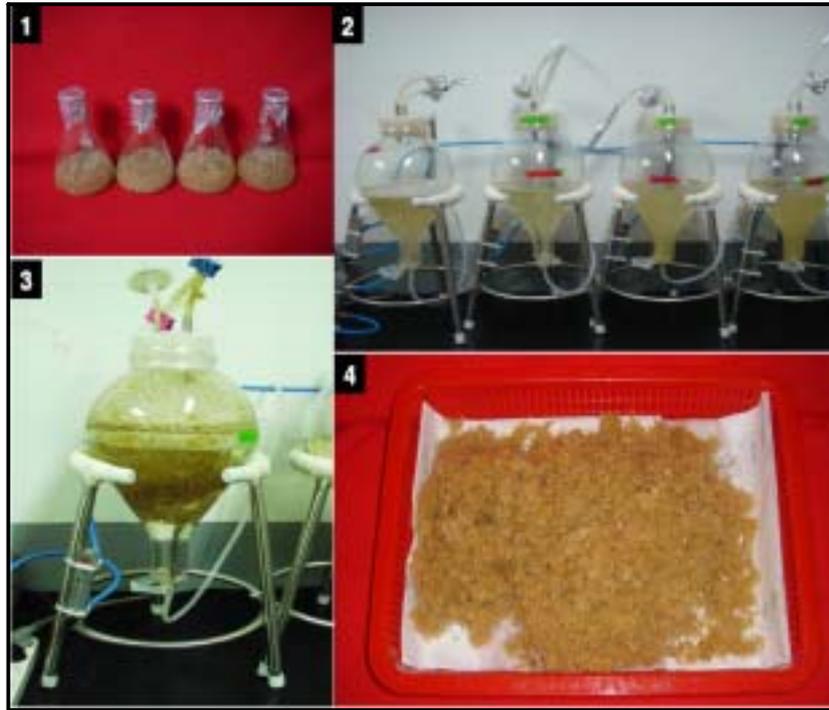


Fig. 35. Adventitious roots cultures of *D. nipponica* through 5L bioreactor system. 1: 250 mL seed culture, 2: just after inoculation, 3: 6 weeks culture, 4: harvest of adventitious roots.

Fig. 34는 5L 생물반응기에서 6주간 배양한 부정근의 생체중이다. 5 L 생물반응기 역시 sucrose 3%, NAA 1.0 mg/L가 첨가된 배지에서 132.9g으로 초기 접종량의 2.0 g의 66배로 최고의 생장을 보였다. 이 결과는 앞의 현탁배양 실험에서와 마찬가지로 2 L와 5 L의 대량배양에서도 NAA 1.0 mg/L가 포함된 MS배지에서 가장 높은 생장을 나타냄을 확인하였다

Fig. 35는 5 L 생물반응기의 배양전과 6주간의 배양 후 및 부정근을 수확한 사진이다. 배양 후로 갈수록 배양기 내부가 부정근으로 가득 차 있는 것을 확인할 수 있다.

5 L 생물반응기를 이용하여 배양 6주 배양 후 최대 200 g의 생체중을

확보하였으며, 그 중 20 g의 건물중을 획득하였다. 부정근을 MS 배지에서 NAA 1.0 mg/L 및 sucrose 30 g/L가 든 배지에서 배양하였을 때 3.6%의 dioscin을 포함하고 있어 최종적으로 5 L 생물반응기에서 약 720 mg의 dioscin이 생산됨을 확인하였다 (Fig. 36).

따라서 이러한 모든 결과로부터 부채마 부정근을 대량 배양하여 유용한 2차대사산물인 dioscin을 포함한 steroidal saponin을 대량으로 생산할 수 있음을 확인하였다.

식물세포 배양에 적용되어 왔던 생물반응기에는 그 운전 방식에 따라 공기부양식 반응기(air-lift bioreactor)와 탱크교반형 반응기 (stirred tank bioreactor)로 크게 분류할 수 있으며 식물세포 배양측면에서 볼 때, 그 종류에 따라 서로 장단점이 있으며, 목표에 적합한 생물반응기를 선택하는 것이 바람직하다.

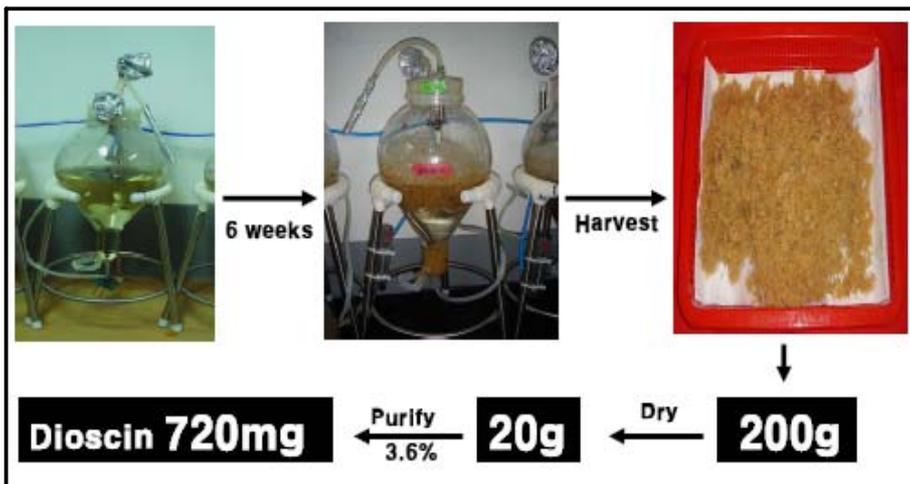


Fig. 36. Productivity of dioscin from adventitious roots using 5L bioreactor system.

식물세포의 대량배양은 바이오매스 또는 2차대사물질의 생산에 대해 이를 상업적 공정으로 진행시키는데 있어서 scale-up 문제를 연구하는 과

정으로부터 발달되었으며 식물세포의 대량배양에 있어서 생물반응기 (bioreactor)를 이용한 식물 세포배양에 관한 연구는 플라스크 수준의 배양방법에서 나아가 다양한 종류의 생물반응기를 이용하여 진행되고 있다.

또한, 대량배양은 재배조건에 관계없이 일정한 환경하에서 안정되게 자원세포를 공급할 수 있고, 배양세포의 빠른 생육속도에 의해 생산효율을 높일 수 있으므로 식물체내에 함유되어 있는 유용물질을 대량으로 얻을 수 있다. 생물 반응기를 통한 대량 배양시 생산 효율을 높이기 위해서는 충분한 산소공급, 교반, 영양소의 균등한 공급 등 부가적인 효과들에 기안한다고 하였다.

생물반응기를 이용한 대량 배양시 가장 크게 대두되는 문제는 부정근이 성장할수록 서로 엉켜서 성장함으로써 발생하는 물질전달의 문제이다. 액체 배지에서 부정근의 성장은 오래된 조직을 중심으로 주위에 성장하는 어린 부정근들로 구성된 뿌리 뭉치를 형성한다. 이러한 뿌리뭉치는 배양기간이 늘어날수록 조직의 중심부위에 영양물과 산소전달을 제한하여 부정근의 갈변과 노화를 나타낸다.

다. 15 L Bioreactor

1) 15 L 배양기 18개 배양용 배양대의 개발

2 L 배양기에서 야생마의 배양근 배양 시스템을 성공적으로 확립하고 이를 대량배양계로 확대하기 위하여 시중에서 생수통으로 사용되는 물통을 개량하여 바이오리액터로 개발을 하였다(Fig. 37). 본 시스템은 생수통의 뚜껑에 유리섬유로 된 스파자를 silicon tube를 이용하여 고정하고 생수통 밑 부분에 주입된 공기를 배출할 수 있는 벤트를 설치하였다. 공기의 공급은 compressor로부터 수차례의 공기정화와 멸균 필터를 거치며, 하나의 공기 공급 장치로부터 여러 대의 배양기가 한꺼번에 연결될 수 있도록 배양대와 공기분배 시스템이 함께 개발되었다. 이렇게 함으로써 배양규모를 무한정 늘릴 수 있게 된다.



Fig. 37. 15 L air-lift bioreactor with sparger for culture of adventitious roots.



Fig. 38. Frame of multi-connection culture system for 15 L air-lift bioreactor.

15 L 배양기를 고정할 수 있는 배양대는 본 생수통 개량형 바이오리액터의 특성을 고려하여 철판에 바이오리액터를 고정할 수 있는 구멍을 뚫었으며, 동시에 18개(270 L)를 배양할 수 있는 배양대를 개발(Fig. 38)하였다.

본 배양대는 한 단에 6개씩 바이오리액터를 고정하며 3단으로 구성되어 있어 총 18개의 바이오리액터를 설치할 수 있을 뿐 만 아니라, 배양대에 내구성 있는 바퀴가 부착되어 이동성을 부여하여 공간 활용을 극대화하였다.

2) 배양대의 공기분배기의 개발

배양대에는 15 L 배양기 각각에 공기주입을 조절할 수 있는 공기 분배기가 15개 설치되어 있다. 이 조절기는 나사식으로 구성되어 있어 쉽게 공기의 양을 효율적으로 조절할 수 있으며 바이오리액터마다 하나씩 설치가 되어 있어 효율적으로 사용 배양기의 수량에 맞출 수 있다(Fig. 39).

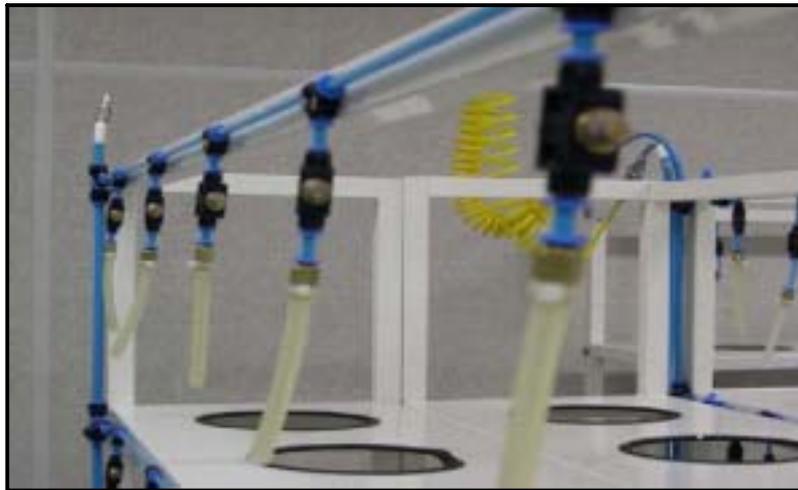


Fig. 39. Air distributor for 15 L air lift bioreactor for adventitious root culture..

3) 무균공기 생산 시스템의 개발

오염의 가장 큰 문제는 autoclave에 의한 멸균의 잘못과 공급된 공기에 의해서 오염된 경우가 대부분이므로 공기공급시 정화된 공기를 도입하고자 filtration system를 설치하여 조절하였다. 정화된 공기 주입을 위한 air compressor는 어항용 소형으로도 사용가능하며, 효율성과 안전성을 높이기 위하여 외장형 소형 compressor (3마력)와 air cooler, air dry를 구비한 compressor system을 개발하였다 (Fig. 40).

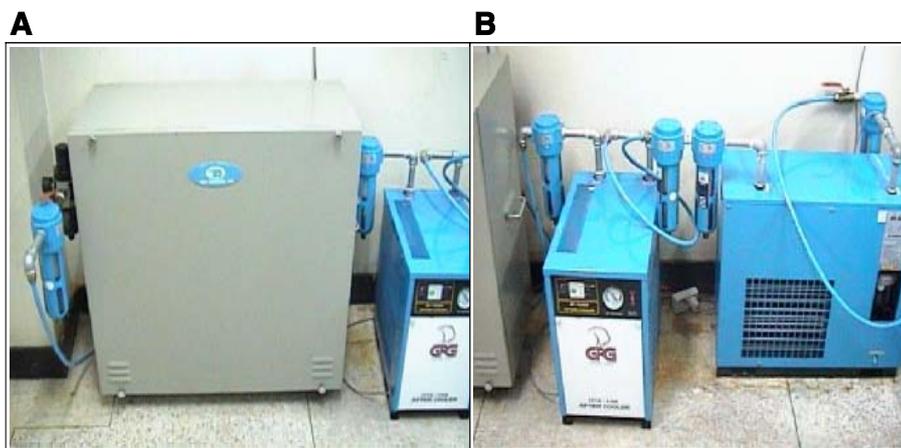


Fig. 40. Air supply system. A: compressor, cooler and air dryer, B: air filters

여기에 무균적으로 공기를 주입하기 위하여 membrane filter ($0.2\mu\text{m}$)를 부착하여 배양기의 sparger와 silicon tube로 연결하여 무균상태의 공기를 주입할 수 있는 시스템을 현재 개발진행 중에 있다. 시스템은 먼저 공기 공급기인 콤퓨레사에서 (Fig. 40-A) 직접 배양기로 가지 않고 cooler 시스템과 건조시스템을 걸쳐 공급된 공기에서 각종 오일류, 먼지 등을 제거하였으며 5개의 filter를 통해서 정화된 공기를 공급하도록 설치하였다.

4) 공기주입의 반자동화 시스템 개발

야생마의 배양시 전기가 계속적으로 공급이 될 경우 문제가 없지만 전기가 단전될 경우 공기가 역류되어 모두 오염될 가능성이 많다. 따라서 공기의 분배장치를 양방향에서 한쪽방향으로만 공기된 것을 활용하여 (Fig. 41).



Fig. 41. Direct air distributor for multi-connection 15L bioreactors.



Fig. 42. Automatic safety system for air supply for 15L bioreactor.

공기의 역류를 예방하였으며, 또한 공기 공급장치의 고장 및 전기의

공급이 차단될 경우 자동으로 인공공기 정화장치가 작동될 수 있도록 자동화 장치를 부착하였다(Fig. 42).

5) 15 L 바이오리액터를 이용한 2톤 배양의 실용화

20리터 배양기를 대량으로 다수 배양하기 위해서 배양장치를 구성하였다. 본 배양장치를 이용할 경우 1개의 배양기당 15리터의 배지를 넣을 수 있어 1세트에 18개의 배양기(총 270리터)를 고정시킴으로(Fig. 43, 44), 이런 배양 세트가 4대일 경우 약 1톤의 배양을 할 수 있어 매우 값싸게 1톤의 배양기에서 배양균을 배양할 수 있다.

본 배양장치를 이용하여 2.7톤 배양(총 10세트)이 가능하면 대략 15일간의 배지 및 배양기 준비와 수확기간으로 소요되었으며, 2개월간의 배양으로 1년 5회의 수확이 가능할 것으로 사료된다.

Fig. 44는 250 mL 삼각플라스크 배양에서 최종 수확까지의 과정을 나타낸 것이다. 100mg 정도의 부정균 절편을 250 mL 삼각플라스크에 약 6주간 배양하면 부정균의 생체중이 약 20g 까지 자라게 된다. 삼각플라스크에서 자란 부정균을 1cm 정도의 절편으로 자른 후 15L bioreactor에 모두 접종하여 6주간 배양하면 약 1.2kg의 부정균 biomass를 얻을 수 있다.

Fig. 45는 15 L 배양기에서 auxin인 NAA와 IAA의 효과를 비교한 것이다. 250 mL 배양에서 NAA가 IAA에 비해 부정균의 성장에 현저한 효과가 있었던 것과 같이, 15L 배양에서도 부정균의 biomass 성장에 큰 차이를 보였다. NAA와 IAA에서 성장한 부정균을 육안으로 관찰하여도 NAA가 좀더 짙은 갈색을 나타내는데, 이것은 부정균내의 dioscin 함량과 무관하지 않다.

Fig. 46은 15L 배양기로부터 생산된 부정균의 biomass를 건조한 후 및 정제 과정을 거쳐 최종적으로 dioscin을 획득하는 과정을 나타내었다. 15 L 배양기에서 6주후에 획득된 1.2kg의 부정균에서 약 1.9g의 순수 정제된 dioscin을 획득하였다.



Fig. 43. Mass production of adventitious roots of *D. nipponica*. Upper: one set of 15L bioreactors (18 x 15L bioreactor), Lower: Multi-sets of 18-bioreactors(10 x 18 x 15L bioreactors, 2.7 ton)

배양된 부정근을 정량분석하면 건물당 약 3.6%의 dioscin이 함유된 것으로 나타나는데, 이것으로 계산하면 15L 생물배양기 1개당 4.32g의 dioscin이 함유된 것이 된다. 그러나 추출과정의 유실이나 미량 포함된 분획들의 제거 등으로 추출효율은 약 44% 정도 되는 것으로 나타났다. 추출효율을 증가 하는 방법에 관해서는 지속적인 보완과 연구가 필요하다.



Fig. 44. Culture of adventitious roots from 250 mL seed culture to harvest. 1: 250 mL seed culture, 2: multi-culture of 15L bioreactor, 3: six weeks after culture, 4: harvest from bioreactor.



Fig. 45. Comparison of NAA 1.0 mg/L with IAA 1.0 mg/L for adventitious root culture in 15L bioreactor. Culture medium: MS basal, sucrose 3% and pH 5.8.

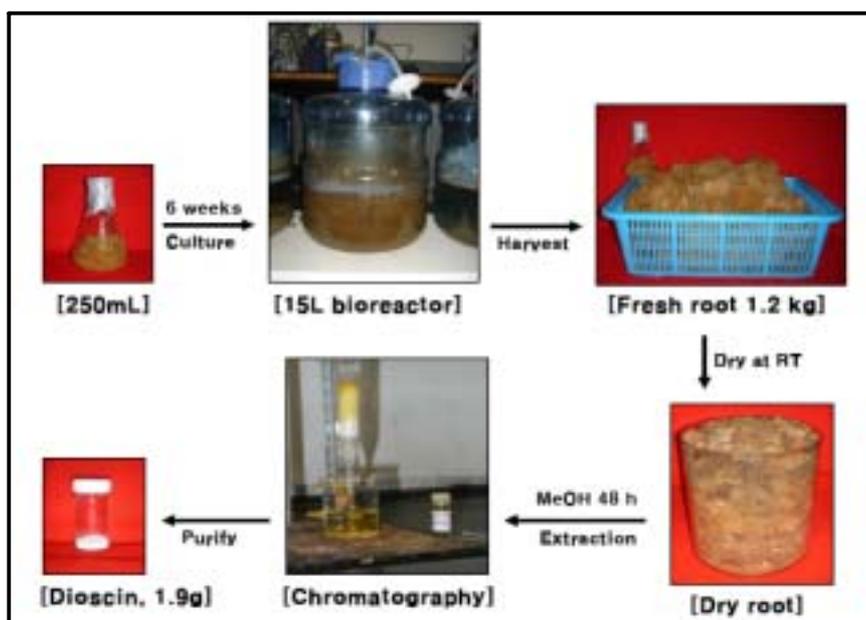


Fig. 46. Procedure of adventitious root culture and dioscin purification, and their productivity. Medium for bioreactor culture : MS with sucrose 3%, NAA 1.0 mg/L, pH 5.8.

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구개발 목표 및 달성도

구분	연구개발 목표	달성도	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (‘02 - ‘03)	<ul style="list-style-type: none"> 야생 및 재배마의 dioscin 탐색 및 함량분석 세포대량배양 시스템 개발 Dioscin의 기내 생산 유도 조건 연구 	100%	<ul style="list-style-type: none"> 수집된 종의 dioscin 함량 조사 Dioscin의 정량 및 정성 분석 체계 확립 Dioscin 고 함유 종의 선발 Dioscin 고 함유 종의 캘러스유도 증식 액체현탁배양 및 대량배양 방법의 개발 2L 이상 바이오리액터 개발 저가의 밴트 시스템 개발 15L 배양기를 배양한 배양대 개발 변이세포주의 선발 물질 생산을 위한 elicitor 처리
2차년도 (‘03 - ‘04)	<ul style="list-style-type: none"> 배양세포로부터 dioscin의 순수 정제법 연구 마의 대량배양 바이오리액터 및 배양대 개발 Dioscin의 기내 대량생산 조건 연구 	100%	<ul style="list-style-type: none"> 액체배양에서 dioscin의 정제방법 개발 배양배지 함유 dioscin의 분리 및 정제 10L 이상 배양세포로부터 대량추출법 세포의 연속 대량배양조건의 구명 바이오리액터를 이용한 야생마의 배양 배양대의 공기분배기 개발 Dioscin 고생산주 물질생산 조건의 구명 대량배양 시스템의 배양주의 안정화
3차년도 (‘04 - ‘05)	<ul style="list-style-type: none"> 대량배양에서 dioscin의 순수 정제품 개발 Dioscin의 기내 대량생산 모델 정립 	100%	<ul style="list-style-type: none"> 생산유도를 위한 elicitation 방법의 확립 제품화를 위한 순수 정제 시스템 확립 대량생산을 위한 모델정립 대량배양 시스템의 추출수율 확인 대량배양에서 생산된 dioscin의 수율 및 경제성 검토 생산원가 절감방안 모색

2. 대외기여도

가. 기술적 측면

비교적 세포배양이 어려운 것으로 알려진 마과식물을 세포배양하여 이 들로부터 왕성하게 증식하는 부정근을 획득하였으며, dioscin을 고생산하는 변이주를 선발하였다. 이들 배양주를 250 ml 삼각플라스크의 소형 배양에서부터 2 L, 5 L 및 15 L bioreactor 배양에 이르기 까지 모든 배양 시스템을 이용하여 biomass의 기내 대량 증식하는 시스템을 확립하였다. 이 기술은 실험과정에서 당의 종류 및 농도, 배지 염류의 종류와 농도, 질소원의 종류와 농도, 각종 식물생장조절제의 종류와 농도, 배지 산도 등 수많은 요인을 검토한 끝에 최적의 조건을 확립한 것으로 금후 타 식물의 기내 대량배양 시스템을 확립하는데 결정적인 모델이 될 것이다.

생산된 부정근 및 배양배지로부터 dioscin 뿐만 아니라 prosapogenin A 및 prosapogenin C 등 세 종류의 steroidal saponin을 효과적으로 정량하고 순수정제 하는 방법을 개발하여 다양한 생리활성을 지닌 이들 물질을 제품화하는데 큰 기여를 한 것으로 사료된다.

본 연구에서는 부채마의 부정근을 대량배양하기위한 bioreactor를 개발하였다. 효과적인 대량배양장치를 위해 공기분배기, 스파자, 안전한 공기공급시스템 등을 개발하였고, 15L 배양기 18대를 동시에 배양하는 배양대를 개발하여 부정근을 저렴한 비용으로 톤급 배양이 가능하도록 하였다. 본 연구과정에서 개발된 bioreactor 시스템은 부채마의 부정근 배양뿐만 아니라 타종류의 식물체를 배양하는데도 유용하게 쓰일수 있을 것으로 사료된다.

나. 경제·산업적 측면

우리나라에 재배하는 마는 야생마에 비하여 dioscin의 함량이 1/100도 함유 되지 않은 것으로 알려져 있다. 야생마로부터 항암, 항비만 등 다양한 생리활성을 가진 것으로 알려진 dioscin을 대량생산하는 시스템의 개

밭은 금후 이들 성분을 이용한 약품의 원료를 공급하는데 획기적인 기여를 할 것이다. 한편, 지속적인 연구에 의해 야생마의 dioscin을 생산하는 유전자를 확보하게 된다면 재배마로의 형질전환에 의해 재배마의 dioscin 함량을 획기적으로 증진하는 수단으로 이용될 수 있을 것이다. 이는 현재 경북북부지역 농가의 주 농업소득원인 마의 부가가치를 더욱 높일 것이며 농가소득증대에도 이바지 할 것이다.

다. 논문투고 및 학회발표, 특허출원

An,JH, KH Son, HY Sohn, ST Kwon. 2005. *In vitro* culture of adventitious roots from *Dioscorea nipponica* Makino for the production of steroidal saponins. Kor J Plant Biotechnology 32(4). In press

An,JH, KH Son, HY Sohn, ST Kwon. 2005. Production of steroidal saponins by culture of adventitious roots formed from root explants of *Dioscorea nipponica* Makino. Plant Cell. <Submission>

In vitro production of dioscin from adventitious root culture of *Dioscorea nipponica*. The 10th International Symposium for Plant Resources Society. Oct. 29, 2004.

Adventitious root culture of *Dioscorea nipponica* for the production of bioactive steroidal saponins. Proc. of Plant Biotechnology Society May 7, 2004.

Anticancer and antifungal activity of steroidal saponins isolated from root bark of wild yam. Proc. of Life Science Soc. May 1, 2004.

Steroidal saponins from Rhizomes of *Dioscorea nipponica*. Proc. Plant Biotechnology Society. Plant Bioventure Festival. April 24-26, 2003.

Callus and adventitious root culture of *Dioscoreaceae*. Proc. Plant Biotechnology Society. Plant Bioventure Festival. April 24-26, 2003.

특허출원: 생물배양기용 공기정화 필터 20-2004-0006442

특허출원: 공기분사주입용 세라믹 스파저 20-2004-0006441

제5장 연구개발결과의 활용계획

1. 추가연구의 필요성

야생에서 수집한 부채마를 기내배양을 위한 초대배양을 거쳐 최종적으로 부정근을 15L bioreactor에 배양하기까지 성공하였고, 대량으로 배양된 biomass로부터 순수한 dioscin을 정제하는 방법이 확립되었다. 한편 많은 수의 배양대를 동시에 연결하여 부정근을 톤급까지 배양하는 시스템을 확립할 수 있었다. 이 연구를 바탕으로 금후 다음과 같은 추가 연구를 수행한다면 본 연구의 지속적인 발전이 있을 것으로 사료된다.

- **Diosci 고효율 배양근의 산업화연구** : 식품으로의 안정성, 기능성 첨가제로 사용하기위한 방안, 정제된 dioscin의 약리작용 및 제품화 연구.

- **Dioscin과 함께 포함된 타 steroidal saponins 연구** : 본 연구과정에서 dioscin 뿐만 아니라 prosapogenin A 및 prosapogenin C 가 부정근과 배지에 상당량 포함된 것으로 밝혀졌음. 이들의 생리작용뿐만 아니라 생산 시스템을 구축하는 것도 필요할 것임.

- **부채마의 dioscin 생합성 기작 연구** : dioscin의 생합성 기작을 세포 및 기내배양 수준에서 정확히 밝힘으로써 biochemical pathway 및 관련효소, 중간체등을 밝혀 관련 인자를 탐색하는 연구.

- **재배마로 dioscin 고생산 인자의 도입연구** : 최근 발달한 유전공학 적 기법을 이용하여 부채마에 존재하는 dioscin 생합성관련 유전자를 탐색하고 재배마로 도입할 수 있다면, 재배마의 부가가치를 획기적으로 증가시킬 수 있을 것이며, 농가 소득증대에도 기여할 것임.

2. 타 연구에의 응용

마속식물은 기내배양이 상당히 어려운 것으로 알려져 있으나 본 연구를 통하여 다양한 규모에서 획기적으로 대량생산하는 방법이 개발되었다. 뿐만 아니라 부정근을 대량배양하는 bioreactor 시스템이 확립되어 야생마

뿐만 아니라 다른 식물에의 응용에도 유용하게 이용된 것이다.

- 지하경을 가진 식물로부터 켈러스를 유도하고, 이들로부터 부정근을 대량 배양하는 과정에서 다양한 요인들이 검정되었는데, 이 방법은 다른 식물체를 대상으로 할 경우에도 모델 시스템이 될 것임.

- 부정근의 대량 자동화 배양기술은 야생마뿐만 아니라 다른 여러 종류의 기능성물질을 생산하는 대량배양시스템을 적용할 수 있을 것임.

- 부정근에 다양한 요인과 elicitor를 처리하여 biomass의 확보뿐만 아니라 유용물질의 함량을 높여, 물질의 산업화를 위한 연구에 활용.

- 2L, 5L 및 15L 형까지 대량배양이 가능한 bioreactor를 개발한 것은 부채마의 부정근 배양뿐만 아니라 식물체의 종만 바꾸면 어느 식물이든 지기내 대량생산이 가능하도록 응용될 것임.

- 부채마 부정근의 dioscin 생산시점이 정확하게 파악되어 분자생물학적인 접근을 통한 유전자의 탐색이 가능해 질 것임.

3. 기업화 추진방안

먼저 본 연구에서 획득된 결과 중 dioscin 고생산 세포주의 선발, 부정근 biomass 대량생산시스템, bioreactor 개발, 부정근 및 배지함유 dioscin, prosapogenin A 및 C 기술 등은 특히 출원의 가능성이 있으므로 추진 중에 있다.

상업화 및 기업화 추진을 위한 대형 톤급 배양 시스템에서 생산된 biomass로부터 순수 정제된 dioscin의 정제효율을 높이고, 부가가치 및 경제성을 검토하여 산업화를 추진 중이다. 또한 야생마를 이용한 기능성 제품생산, 의약품생산의 가능성을 타진하여 추후 제품생산에 필요한 원료 공급 시스템을 안정화시키고 산업화와 연계할 계획이다.

제6장 해외과학기술정보

1. dioscin의 신규의 용도 및 생물활성 보고

- Diosgenyl saponin이 항암활성을 보이며, mitotic 저해와 apoptosis를 통해 항암제로 사용가능함을 제시함: Biol. Phar., Bull. 27 (7), 1059-1065. 2004.
- 인간의 cervical cancer에 대한 항암활성 보고 : Biol. Phar., Bull. 25(2), 193-196. 2002.
- Prosapogenin B의 항암활성 보고 : Ai Zheng, 22 (8), 795-800.
- Dioscin 유도체 중 prosapogenin A 의 경우 강력한 항균력을 나타냄 : Chem. Pharm. Bull. 52 (11). 1353-1355. 2004
- 이러한 항암, 항균 활성의 검증은 새로운 수요와 기존 관련제품의 과학적 거를 강화함으로써 dioscin 관련 제품의 시장수요를 증대시키는 역할을 하게 됨.

2. 재배마 및 야생마 추출물의 상업화

- 현재 재배마 추출물을 미국, 유럽, 중국, 일본에서 생산, 판매되며, 전세계적으로 약 90여개의 회사가 마의 활성성분으로 dioscin을 겨냥하며 제품 출시하고 있음.
- 주로 중국, 미국에서 시장 주도하며, 주도 회사는 다음과 같다.
 - a. Xi'an Yiergao Keyuan Biochemical Co. Ltd : 야생마분말
 - b. China Ningbo Medical Material Co.: 마 추출물 판매
 - c. UC medicine Co.: 상품코드 DOE (Dioscorea Opposita Extract)
 - d. Kinglong Co.: 재배마 분말
 - e. Nantong Newsmart Internat'l Trading Company : 야생마분말,
 - f. Pharm Chemical Shanghai Lansheng Co. : 뿌리분말
 - g. Tsnghua Science and Technology : 뿌리분말제조

- h. Ming Zhu Hui : Model No.: ZZY3015
- i. Futureceuticals Co.: *Dioscorae nipponica* 추출물
- j. Xian Sino-Dragon Import & Export Co., Ltd: 부채마추출물
- k. A&Z Food Additives Co.: 부채마에서 dioscin 추출

3. dioscin의 화학·효소적 합성

- 마에서 발견되는 steroidal saponin인 dioscin의 경우, 재배마보다 야생마에서 그 함량이 20배 이상 많다고 보고 되어 있으며, 다양한 마과 식물에서 보고 되고, 모 화합물로부터 다양한 steroidal saponin을 생산하거나, 또는 전체 화학합성 (total chemical synthesis)가 성공적으로 이루어짐 : Carbohydrate Res. 338. (8), 721-727, 2003.

- 2005년에 형광유도체의 dioscin 이 생산되어, 이의 대사 경로의 해명, 중간 대사산물 분석 등에 많은 진전이 예상됨. Fluorophore-appended steroidal saponin (dioscin and polyphyllin D) derivatives. Org Lett. 2005 Feb 17;7(4):669-72.

- 기내배양을 통한 Dioscin의 대량생산 이외에 상업적으로 저가인 diosgenine을 이용한 효소, 화학수식에 의한 Dioscin 생산에 대한 연구가 처음으로 보고됨. Planta Med. 2004 Jul;70(7):637-41.

제7장 참고문헌

- Aquino R, Conti C, De Simone F, Orsi N, Pizza C, Stein ML (1991) Antiviral activity of constituents of *Tamus communis*. J Chemother 3:305-309
- Baek SH, Kim SH, Son KH, Chung KC, Chang HW (1994) Inactivation of human pleural fluid phospholipase A₂ by dioscin. Arch Pharm Res 17: 218-222
- Blakesley D, Weston GD, Hall JF (1991) The roles of endogeneous auxin in root initiation. I. Evidence from studies on auxin application and analysis of endogeneous levels. Plant Growth Regul 10: 341-353
- Cai J, Liu M, Wang Z, Ju Y (2002) Apoptosis induced by dioscin in Hela cells. Biol Pharm Bull 25:193-196
- Chilton, MD, M. Drummond, DJ Merlo and EW Nester. 1978. Highly conserved DNA of Ti-plasmids overlaps T-DNA maintained in plant tumors. Nature 275:147-149
- Chun CK, Chung JD (1978) Studies on mericlone culture of Orchid, III. Effect of plant growth regulators to proliferation of protocorm and growth of mericlone in several varieties of Cymbidium. Kyungpook Univ. 24:295-303
- Deng S, Yu B, Hui Y, Yu H, Han X (1999) Synthesis of three diosgenyl saponins: dioscin, polyphyllin D, and balanitin 7. Carbohydr Res 317:53-62
- Heble MR, Staba EJ (1980) Diosgenin synthesis in shoot cultures of *Dioscorea composita*. Planta Medica Suppl, pp 120-123
- Hu K, Dong A, Yao X, Kobayashi H, Iwasaki S (1996) Antineoplastic agents; I. Three spirostanol glycosides from rhizomes of *Dioscorea collettii* var. *hypoglauca*. Planta Med 62:573-575
- Hu K, Yao X (2003) The cytotoxicity of methyl protodioscin against human cancer cell lines in vitro. Cancer Invert 21:389-393
- IM HH, Chung YM, Cho YS, Chang CH, Suh JH and Kwon OC 2000. The various suspension culture methods in the growth of culture cells of wild viola(*Viola patrinii* DC.). Kor J. Plant Tiss Cult 27, No.3:155-16

- Kano K (1965) Studies on the media for orchid seed germination. Mem. Fac Agri. Kagawa Univ. 20:1-68
- Kim CM, Son KH, Kim SH, Kim HP (1991) Steroidal saponin contents in some domestic plants. Arch Pharm 14: 305-310
- Kim SW, Son KH, Chung KC (1989) Mutagenic effect of steroidal saponins from *Smilax china* rhizomes. Yakhak Hoeji 33: 285-289
- Kwon CS, Sohn HY, Kim SH, Kim JH, Son KH, Lee JS, Lim JK, Kim JS (2003) Anti-obesity effect of *Dioscorea nipponica* Makino with lipase-inhibitory activity in rodents. Biosci Biotechnol Biochem 67:1451-1456
- Li C, Yu B, Liu M, Hui Y (1998) Synthesis of diosgenyl alpha-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-[beta-D-glucopyranosyl-(1→3)]-beta-D-glucopuranoside (gracillin) and related saponins. Carbohydr Res 306:189-195
- Li M, Han X, Yu B (2003) Synthesis of monomethylated dioscin derivatives and their antitumor activities. Carbohydr Res 338:117-121
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497
- Mansfield J.W, Hargreaves J.A, Boyle F.C (1974) Phytoalexin production by live cells in broad bean leaves infected with *Botrytis cinerea*. Nature. pp. 252-316
- Misawa M (1980) Industrial and government research. In: Plant tissue culture as a source of biochemicals. E.J. Staba(eds.). CRC Press, Florida. pp:167-188
- Oh YC, Lee CS, Lee HJ (1995) A systematic study on *Dioscorea* sects. *Enantipohyllum* and *Stenophora* in Korea. Kor J. Plant Tax 25(1):25-49
- Sautour M, Mitaine-Offer AC, Miyamoto T, Dongmo A, Lacaille-Dubois MA (2004) Antifungal steroid saponins from *Dioscorea cayenensis*. Planta Med 70:90-92
- Seo JW, Shin CG, Choi YE (2003) Mass production of adventitious roots of *Eleutherococcus sessiliflorus* through the bioreactor culture. J Plant Biotech 5: 187-191
- Smirnoff N, Stewart G.R (1985) Nitrogen assimilation and translation

by higher: comparative physiology and ecological consequences. *Physiol plant* 64:133-140

Tabata M, Fujita Y (1985) *Biotechnology in Plant Science*, Zaitilin, M., Day, P., and Hollaender, A., Eds., Academic Press, New York, 217

Tal B and Goldberg I (1982) Growth and Diosgenin production by *Dioscorea deltoidea* cells in batch and continuous cultures. *Planta medica* 44:107-110

Toivonen I, Ojala M, Kaupinnen V (1991) Studies on the optimization of growth and indole alkaloid production by hairy root cultures of *Catharanthus roseous*. *Biotechnol and Bioeng* 37:673-680

Vasiukova NI, Paseshnichenko VA, Davydova MA, Chalenko GI (1997) Fungitoxic properties of steroid saponins from the rhizomes of deltoid dioscorea. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 13:172-176

Wang SL, Cai B, Cui CB, Liu HW, Wu CF, Yao XS (2003) Apoptosis of human chronic myeloid leukemia k562 cell induced by prosapogenin B of dioscin (P.B) in vitro. *Ai Zheng* 22:795-800

Weathers PJ, Hemmavanh DD, Walcerz DB, Cheetham RD, Smith TC (1997) Interactive effects of nitrate and phosphate salts, sucrose, and inoculum culture age on growth and sesquiterpene production on *Artemisia annual* hairy root cultures. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 33:306-312

Yoshikawa T, T. Furuya (1987) Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep* 6:449-453

Yoon, ES, Choi YE (2002) Micropropagation and mass production of adventitious roots of *Polygonum odoratum* via the culture of seedling explants. *J Plant Biotech* 4: 33-37

Yu KW, Hahn EJ, Paek KY (2000) Production of adventitious ginseng roots using bioreactors. *Kor J Plant Tiss Cult* 27: 309-315.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.