



## 특허청구의 범위

### 청구항 1.

삭제

### 청구항 2.

염선된 산삼시료의 무균화, MS배지를 이용한 캘러스의 유도, IBA가 함유된 4/5배지상에서의 캘러스의 배양, 배양 중의 산소공급, 배양 5~6주의 pH5.8 조절로 산삼배양근을 배양함에 있어서, 상기 4/5배지에 키토산 0.05~0.5g/l, 크롤렐라 0.05~0.1g/l, 코코넛 밀크 0.5g/l 중의 어느 1종으로 된 인삼조사포닌 함량증가 촉진제를 첨가하여 배양하는 것을 특징으로 하는 고품질 산삼배양근 대량 생산방법.

### 청구항 3.

삭제

명세서

## 발명의 상세한 설명

### 발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 산삼배양근(부정근)을 배양할 때 철저한 오염방지로 품질을 높이고, 생산량 극대화도 달성할 수 있는 고품질 산삼배양근의 대량 생산방법에 관한 것이다.

지금까지는 특정 기계와 기구를 이용하여 산삼배양근(부정근)을 배양해 왔다. 실제로 산삼배양근을 대량으로 배양했을 때 상품가치가 있는 산삼배양근의 최종 수확량은 이론치와는 달리 매우 낮다. 낙후된 배양기술과 온도, 습도, 계절별 환경변화 등 성장환경변화에 유효 적절히 대처하지 못한 것도 원인이지만, 보다 근본적인 문제는 미생물 등에 의한 산삼시료 및 배양 중의 미생물 감염과 성장에 필요한 영양분의 부족, pH 조절 실패 등이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서 본 발명의 목적은 산삼시료 및 배양 중에 철저한 오염방지와 신선한 O<sub>2</sub> 및 영양분의 적기 보급을 통하여 인삼사포닌 함량이 높고 품질도 우수한 양질의 산삼배양근을 대량으로 생산할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.

상기의 과제는, 염선된 산삼시료의 무균화와 MS배지를 이용한 캘러스의 유도, 상기 캘러스를 IBA가 함유된 4/5배지를 이용하여 산삼배양근을 배양함에 있어서, 산삼시료의 무균화는 멸균수에 2% 차아염소산소다가 첨가된 용액에 침지한 후 70% 에탄올이 투입된 진공감압세척기에서의 살균으로 진행하고, 캘러스의 유도는 초음파로 진동시켜 진행하며, 배양 중간에 O<sub>2</sub>를 공급하며, IBA가 함유된 배지에 인삼조사포닌 함량증가촉진제를 첨가하고, 배양 5~6주의 pH를 5.8로 조절함과 동시에 4/5 MS 배지를 투입하여 배양하는 고품질 산삼배양근 대량 생산방법으로 달성할 수 있다.

### 발명의 구성

배양할 산삼의 시료는 강원도 오대산에서 채취한 자연산 야생 산삼으로서 산삼 감정 인증된 것으로 한다. 생산단계는 산삼의 소독, 캘러스(미원시분화세포괴)유도, 액체배양, 산삼배양근(부정근)의 수확 등으로 이뤄진다.

산삼시료 소독방법은 산삼의 표면과 뿌리사이의 이물질을 흐르는 수돗물에 깨끗이 세척하고, 멸균수로 3회 이상 세척한다.

산삼을 비이커에 넣고 멸균수와 2%의 차아염소산소다(NaOCl)를 넣어 교반기에서 약 10분간 교반한 후, 멸균수로 3회 이상 세척하는 방법과, 재세척된 산삼 시료를 클린벤치 내에서 진공감압세척기에 넣고 70% 에탄올을 첨가하고 진공 감압하여 기포를 발생시키면서 뿌리 사이에 존재하는 미생물 및 기타 오염물질을 완전히 제거하고 약 15분간 지속시키는 방법으로 한다.

산삼 시료를 빼내어 멸균수로 3회 이상 세척한다.

상기한 소독방법에다 2% 차아염소산소다, 또는 70% 에틸렌알콜과 진공감압세척방법을 적용한 산삼 시료의 오염도 측정 결과는 75%와 35%로 큰 차이가 있음을 확인하였다.

<표1> 소독방법에 따른 오염도 비교

소독액	소독방법	오염도(%)
차아염소산	2% 차아염소산소다용액에 5~10분 침지	75%
차아염소산, 70% 에탄올	2% 차아염소산소다용액으로 5~10분 침지 후 70% 에탄올이 첨가된 진공감압기에서 2~5분 살균	35%

산삼 시료의 배양배지 조제는 산삼 시료의 조직배양에 보편적으로 사용되는 MS배지의 4/5MS배지를 만들고 설탕 3%와 한천 0.8%를 첨가하였으며, 식물생장호르몬으로는 오옥신류중에서 1BA 1ppm 및/또는 코코넛밀크를 추가 첨가하고 멸균처리 후 클린벤치에서 멸균된 페트리 디쉬(Petri-dish)에 20ml씩 분주하여 사용하였다.

산삼 시료는 클린벤치 내에서 멸균된 유리접시에 넣고 멸균된 메스로 뿌리의 껍질을 약간 벗겨낸 후 2~3mm 크기로 절단하여 배양배지가 있는 페트리 디쉬에 4~5개씩 치상하여 파라필름(parafilm)으로 밀봉한 후 실온 23℃의 인큐베이터에서 암(暗)배양한다.

산삼 시료의 페트리 디쉬의 1차 확인 및 재소독은 3~5일 경과 후 인큐베이터에서 배양된 페트리 디쉬를 꺼내어 육안으로 세균 및 곰팡이 등에 의한 오염상태 등을 확인한다.

오염된 배양조직 산삼 시료를 꺼내어 2% 차아염소산소다용액에서 약 10분간 침지하여 소독한 후 멸균수로 3회 이상 세척하고 새로운 배지에다 재차 치상하여 인큐베이터 내에서 배양하는 방법으로 반복 확인하면서 배양오염을 줄이고, 캘러스를 유도과정 중에는 배양된 페트리 디쉬를 꺼내어 초음파를 3일 간격으로 15~20분 간 68KHz 이상 3~4주간 진동하면서 캘러스를 유도한다.

캘러스(미원시분화세포피)가 유도된 산삼 시료를 인큐베이터에서 꺼내어 양호한 캘러스를 선별하고, 선별된 캘러스를 클린벤치 내에서 멸균된 메스로 0.1cm 미만으로 잘게 자른 후 4/5MS배지에 접종한다. 또는 액체 현탁액 배지에 접종하여 2~3주 후 접종된 4/5MS배지와 액체 현탁액 배지에서 산삼배양근이 유도된 것을 선별하여 메스로 0.2cm 길이로 자른 후 멸균된 4/5MS배지에 있는 액체 현탁액 배지 2ℓ용 유리용기에 접종한다.

2주일 경과 후, 산삼배양근이 유도된 것을 페트리 디쉬에서 꺼내어 클린벤치에서 우수한 배양근을 멸균된 메스로 흰색, 노란색 부분을 0.5cm 이하의 길이로 잘라내 4/5MS 액체 배지에 넣어서 배양한다.

배양은 자르는 방법과 찢어서 풀어헤치는 방법을 병행하였으며, 배양 시 메스로 자르는 방법의 작업소요시간은 17~19분이고, 집게로 찢고 풀어헤치는 방법의 작업소요시간은 10~12분이어서 집게로 찢고 풀어헤치는 방법이 메스로 절단하는 방법보다 7분 가량 시간이 단축되었고, 미생물 오염도도 30% 보다 적은 17%로 감소하였지만 성장 후 산삼배양근의 수거량에 있어서는 10~12배로 현격한 차이가 나타났다.

<표2> 산삼근 배양시 자르는 방법과 찢어 풀어헤치는 방법의 생산량 비교

절단방법	실험수량(g)	작업소요시간(분)	오염도(%)	성장 후 수거량(g)
메스로 자르는 방법	50	17-19	30	600-700(12배)
집게로 찢고 풀어헤치는 방법	50	10-12	17	500-600(10배)

식물생장조절물질인 IBA 1ppm + 0.05g/l, 0.1g/l, 0.5g/l의 키토산(키토올리고당) 첨가방법, IBA 1ppm + 0.05g/l, 0.1g/l의 크로렐라 첨가방법, IBA 1ppm + 0.1g/l키토산 + 0.05g/l 크로렐라 + 0.5g/l 코코넛 밀크 첨가방법으로 급속배양통에 함께 넣고 배양하였다.

IBA 1ppm + 0.05g/l, 0.1g/l의 크로렐라 첨가방법은 평균 생산수거량이 750과 780이었고 향은 약하고 엷은 녹색을 띠었으며, IBA 1ppm + 0.1g/l키토산 + 0.05g/l 크로렐라 + 0.5g/l 코코넛 밀크 첨가방법의 산삼배양근 평균 생산수거량은 850이었고 향은 약하고 엷은 녹색을 띠는 반면, IBA 1ppm + 0.1g/l의 키토산 첨가방법은 산삼배양근의 평균 생산수거량이 920으로서 아주 높았고 향도 진한데다 색상도 진한 밤색으로 나타나 품질이 가장 우수한 것으로 나타났다.

<표3> 4/5MS배지에 영양원 첨가시 생산량 비교

배지	기본	첨가영양원	실험수량 (개)	수거 후 평균생산량 (g)	특징
4/5배지	IBA 1ppm	+0.05g/l 키토산	10	890	조금 약한 향, 발색
		+0.01g/l 키토산	10	920	진한 향, 진한 밤색
		+0.5g/l 키토산	10	900	진한 향, 진한 밤색
		+0.05g/l 크로렐라	10	750	약한 향, 녹색
		+0.1g/l 크로렐라	10	780	약한 향, 녹색
		+0.1g/l 키토산 +0.05g/l 크로렐라 +0.5g/l 코코넛밀크	10	850	다소 약한 향, 엷은 녹색

또한 IBA 1ppm 첨가와 IBA 1ppm + 0.1g/l 키토산 첨가방법으로 배양하여 생산한 후 인삼조사포닌 함량성분을 분석한 결과, IBA 1ppm 첨가방법으로 배양한 산삼배양근의 인삼조사포닌의 평균 함량은 75mg/g으로서 5% 이상 증가추세를 나타냈다.

<표4> 영양원 첨가후 인삼조사포닌 함량비교

배지	첨가영양원	인삼조사포닌 함량(mg/g)
4/5 MS 배지	IBA 1ppm	68~82(75)
4/% MS 배지	IBA 1ppm + 0.1g/l 키토산	74~83(78.2)

급속배양통에서 산소발생기를 이용하여 산소농도 35% 이상 정제된 O<sub>2</sub>를 배양통 내부 하단에 1주일 간격으로 25분 주입하는 방법과, 초음파 기계로 1주일 간격으로 배양통을 60~80 KHz로 25분 이상 진동하였다.

배양 30일 경과 후 O<sub>2</sub> 주입방법과 초음파 진동방법을 확인 후 비교한 결과, O<sub>2</sub> 주입에 의한 산삼배양근의 성장은 평균 420g이었고 초음파 진동에 의한 산삼배양근의 성장은 평균 510g으로 나타나서 초음파 진동쪽이 O<sub>2</sub> 주입보다 90g 많아 17.3%의 중량증가사실을 확인하였다.

<표5> O<sub>2</sub> 주입과 초음파 진동의 비교

주입원	실험수량 (개)	위치별 방법	조건방법	O <sub>2</sub> 함유량 (%)	주입시간 (분)	성장무게 (g)
O <sub>2</sub>	50	배양통 내부 하단에 주입	1~8 (ℓ /min)	35	25	420
초음파	50	배양통 주위에 진동방법	68~80KHz	0	25	510

성장과정에서는 배양통내에서 산삼배양근의 위치에 따라 성장도에 큰 차이가 나타나게 되므로 공기량을 조절하여 배양액의 하단부에서 산삼배양근이 성장하게 하는 방법과 배양액 속 상단부에서 산삼배양근이 성장하게 하는 방법을 비교 실험하였다.

비교 실험결과, 산삼배양근의 생산량은 상단부에서 자라는 방법의 경우 성장 후 산삼배양근의 수거량은 720g였고, 하단부에서 자라게 한 방법의 경우 성장 후의 산삼배양근 수거량은 780g으로 하단부에서 자라는 방법이 12%의 증대효과가 나타났다. 이는

<표6> 배양통속의 배양근의 위치별 생산량 비교

배양 위치	실험 수량(통)	성장후 수거량(g/통)	증대효과(%)
상단 부분	50	720	-
하단 부분	50	780	12

급속배양통에서 배양할 때, pH증가와 영양분의 감소로 인하여 5~6주 중에 pH 6.5 이상 상승하여 성장이 중단되는 경우가 있다. 그래서 식용목초액 또는 식용초산을 첨가 투입하여 pH 5.8 내외로 조절하고, 영양분도 4/5 MS 배지를 20% 투입하여 8주 경과 후의 상태를 비교 실험하였다.

비교 실험 후의 산삼배양근의 생산량은 pH와 영양분을 조절하지 않은 경우의

산삼배양근 생산수거량은 750g이었고, pH 조절과 영양분을 투입한 경우의 산삼배양근 생산수거량은 850g으로서, pH 조절 및 영양분 투입방법이 13.3% 증가추세를 보였다.

<표7> 5~6주 배양 후 pH조절한 경우의 수거된 산삼배양근의 생산량 비교

pH	실험수량(통)	성장기간(주)	성장방법	생산수량(g/통)	비교(%)
조절하지 않음	30	8	6주까지 성장후 멈춤	750	-
pH조절, 영양분투입	30	8	8주까지 지속적으로 성장	850	13.3%

급속배양통에서 8주 배양한 후에 산삼배양근을 꺼내어 수세하고 배양배지를 제거하여 포장단위별 용기에 포장하고 건조기에서 동결건조 또는 열풍건조한다.

**발명의 효과**

이상 설명한대로 산삼배양근을 배양함에 있어서 본 발명은 산삼시료의 철저한 오염방지와 배양 중 신선한 O<sub>2</sub> 및 영양분의 적기 보충을 통하여 인삼사포닌 함량이 높고 품질도 우수한 양질의 산삼배양근을 대량으로 생산할 수 있다.