



- (51) 국제특허분류:
A01H 3/04 (2006.01) A01G 7/06 (2006.01)
A01H 4/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/001846
- (22) 국제출원일: 2014년 3월 6일 (06.03.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0039328 2013년 4월 10일 (10.04.2013) KR
- (71) 출원인: (주)아모레퍼시픽 (AMOREPACIFIC CORPORATION) [KR/KR]; 140-777 서울시 용산구 한강대로 106, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김승훈 (KIM, Seung Hun); 446-729 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시픽기술연구원, Gyeonggi-do (KR). 김완기 (KIM, Wan Gi); 446-729 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시픽기술연구원, Gyeonggi-do (KR). 강현미 (KANG, Hyun Mi); 135-773 서울시 강남구 언주로 21 시영아파트 3동 502호, Seoul (KR). 신아름 (SHIN, A Reum); 360-804 충청북도 청주시 상당구 안덕별로 69 번길 4 삼일주택 5동 306호, Chungcheongbuk-do (KR).

(74) 대리인: 김순영 (KIM, Sun-young); 110-727 서울시 종로구 종로 5길 58 석탄회관빌딩 10층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

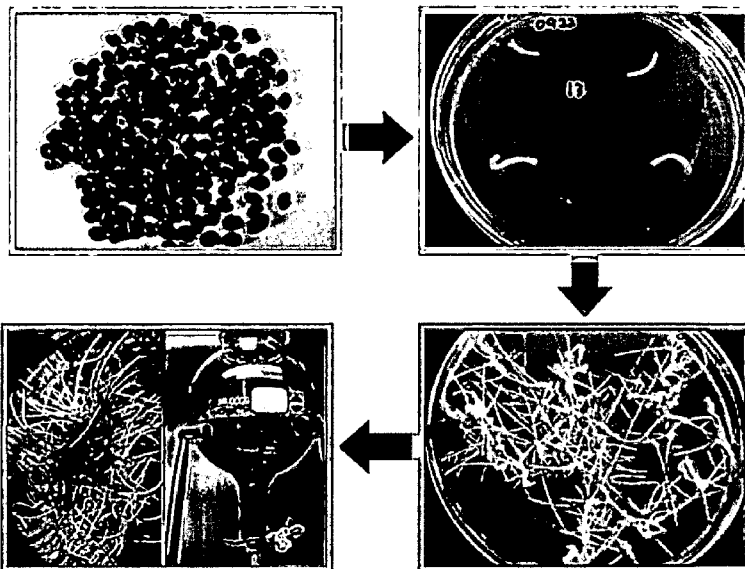
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: METHOD FOR MASS-PRODUCING ASTRAGALI RADIX ADVENTITIOUS ROOTS HAVING INCREASED ASTRAGALOSIDE IV CONTENT

(54) 발명의 명칭 : 아스트라갈로사이드 IV의 함량이 증가된 황기 부정근의 대량생산방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for mass-producing Astragali Radix adventitious roots, comprising the steps of: (a) sterilizing Astragali Radix seeds; (b) inducing the germination of the sterilized Astragali Radix seed; (c) inducing adventitious roots from the germinated Astragali Radix by using a plant hormone; (d) liquid culturing the induced adventitious roots; and (e) treating the cultured adventitious roots with an elicitor and culturing the same in a bioreactor, thereby enabling mass production of Astragali Radix adventitious roots having remarkably increased Astragaloside IV content.

(57) 요약서: 본 발명은 황기 부정근의 대량생산방법에 관한 것으로서, (a) 황기 종자를 멸균하여 무균화하는 단계; (b) 상기 무균화된 황기 종자의 발아를 유도하는 단계; (c) 발아된 황기로부터 식물호르몬을 사용하여 부정근을 유도하는 단계; (d) 상기 유도된 부정근을 액체배양하는 단계; 및 (e) 상기 배양된 부정근을 엘리시터(Elicitor)로 처리하고 생물반응기(Bioreactor)에서 배양하는 단계를 포함함

으로써 아스트라갈로사이드 IV(Astragaloside IV)의 함량을 현저히 증가시킨 황기 부정근을 대량으로 생산할 수 있다.

【명세서】

【발명의 명칭】

아스트라갈로사이드 IV의 함량이 증가된 황기 부정근의 대량생산방법

【기술분야】

- <1> 본 명세서에 기재된 내용은 식물조직배양기술을 이용한 황기 부정근의 대량 생산 방법에 관한 것이다.

【배경기술】

- <2> 황기(Astragali Radix)는 콩과(Leguminosae)에 속하는 다년생 초본식물인 단너삼(Astragalus membranaceus Bunge)의 주피를 벗겨 뿌리를 건조한 것으로, 외부가 담갈색 또는 황갈색이고 내부는 황백색으로 부드럽고 단 향기가 있다. 또한 신농본초경에서는 노인에게 특히 효과가 있으며 수명을 연장시키는 작용이 있어서 황기라 부르며(노승현, 황인형, TV 본초강목, p332, 1999; 배기환, 민간요법과 한방요법에 따른 건강지침서 원색도감, p445, 2003), 우리나라에서는 예부터 민간에서 강장제로써 인삼 다음의 보기약으로 쓰이고 있다(현대생약학, 생약학연구회, 학창사, 2000; 본초학, 계축문화사, 2000; 생약학, 생약학교재편찬위원회, 동명사, 2001). 황기가 들어있는 처방으로는 황기건중탕, 황기계지오물탕, 십전대보탕, 방기황기탕 등이 있으며, 생리활성으로는 혈압강하작용, 이뇨작용, 강장작용, 면역증강작용, 항염작용 등이 보고된 바 있다(중약대사전, 상해과학기술출판사, vol.1, 1985; Hikino, H. 등, Planta Med., 30:297-302, 1976; Tomoda, M. 등, Phytochemistry, 31(1): 63-66, 1992; Zang, Y. 등, Acta. Pharm. Sin., 19:333-337, 1994).
- <3> 황기는 환경부에서 정한 멸종위기동식물 II급 속하는 종인데, 이것은 자연적 또는 인위적 위협요인으로 개체수가 현저하게 감소되고 있어 현재의 위협요인이 제거되거나 완화되지 아니할 경우 가까운 장래에 멸종위기에 처할 우려가 있는 야생식물임을 뜻한다.
- <4> 식물조직배양기술은 식물 고유의 전형성능(Totipotency)을 이용하여 식물체를 세포나 조직의 형태로 형성하거나 식물체를 다시 재생시킬 수 있는 방법으로써, 조직배양이라는 특수한 환경에서 배지에 영양분, 성장호르몬, 온도 등의 조절함으로써 실험자의 목적에 맞는 다양한 실험을 실시할 수 있다. 이 기술을 이용하여 식물이 갖는 고유의 유효성분을 생산하기 위해서는 대량배양 기술이 필요하며, 여기에 생물반응기가 사용된다.
- <5> 또한 식물조직배양은 우량한 개체의 대량증식과 무병주의 생산을 통한 식물

재료의 생산에 효과적인 방법으로 알려져 있고, 이러한 방법은 기본적으로 환경적, 시간적 제한없이 식물재료를 생산하기 때문에 약리적 효능이 인정된 식물의 생산에 많이 사용되고 있다.

<6> 종래 형질전환된 황기 모상근으로부터 아스트라갈로사이드 I, II, III를 효율적으로 생산하기 위한 연구가 이루어진바 있다(Korean J. Biotechnol., Vol 21, No. 2). 그러나 상기의 방법은 식물의 상처부위를 통해 식물세포의 게놈 안으로 삽입된 아그로박테리움 리조젠스(*Agrobacterium rhizogenes*)의 T-DNA에 의해 유도되는 유전자변형된 모상근의 형태로, 식품원료로 사용하는데 제한적이다.

<7> 이에 본 발명자들은 보다 안전성이 확보된 방법으로써 안전한 식물호르몬만으로 뿌리조직을 유도하여 유전자 변형없는 황기 부정근을 생산하여 아스트라갈로사이드 IV를 대량으로 생산하는 방법을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

<8> [선행기술문헌]

<9> [비특허문헌]

<10> TV 본초강목, p332, 노승현, 황인형, 1999

<11> 민간요법과 한방요법에 따른 건강지침서 원색도감, p445, 배기환, 2003

<12> 현대생약학, 생약학연구회, 학창사, 2000;

<13> 본초학, 계축문화사, 2000;

<14> 생약학, 생약학교재편찬위원회, 동명사, 2001

<15> 중약대사전, 상해과학기술출판사, vol.1, 1985;

<16> Hikino, H. et al, *Planta Med.*, 30:297-302, 1976;

<17> Tomoda, M. et al, *Phytochemistry*, 31(1): 63-66, 1992;

<18> Zang, Y. et al., *Acta. Pharm. Sin.*, 19:333-337, 1994

<19> *Korean J. Biotechnol.*, Vol 21, No.2, 2006

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

<20> 본 발명은 황기의 종자로부터 발아된 특정부위를 이용하여 부정근의 유도조건을 확립하고 액체배양을 통한 최적 성장조건을 규명한 후, 유효 사포닌인 아스트라갈로사이드 IV의 함량을 높이기 위한 최적 배양조건을 설정함으로써 유전자 변형이 없어 안전하면서도 아스트라갈로사이드 IV의 함량이 증가된 황기 부정근을 대량으로 생산할 수 있는 방법을 제공하고자 한다.

【기술적 해결방법】

<21> 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 실시예는

- <22> (a)황기 종자를 멸균하여 무균화하는 단계;
- <23> (b)상기 무균화된 황기 종자의 발아를 유도하는 단계;
- <24> (c)발아된 황기로부터 식물호르몬을 사용하여 부정근을 유도하는 단계;
- <25> (d)상기 유도된 부정근을 액체배양하는 단계; 및
- <26> (e)상기 배양된 부정근을 엘리시터(Elicitor)로 처리하고 생물반응기(Bioreactor)에서 배양하는 단계를 포함하는 아스트라갈로사이드 IV(Astragaloside IV)의 함량이 증가된 황기 부정근의 대량생산방법을 제공한다.

【유리한 효과】

- <27> 본 발명에 따르면, 황기의 종자발아체를 이용하여 부정근을 유도함으로써 식물체를 이용하는 것보다 오염률을 현저히 낮출 수 있다. 또한, 유도된 부정근을 이용하여 대량으로 생산할 수 있다. 특히 아스트라갈로사이드 IV의 함량이 증가된 황기 부정근의 대량생산이 가능하므로, 궁극적으로 아스트라갈로사이드 IV를 대량생산할 수 있다.
- <28> 이로써, 본 발명에 따른 황기 부정근의 대량생산방법은 화장품 또는 산업 등 다양한 산업분야에 활용될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

- <29> 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 황기 부정근의 대량생산 과정을 나타내는 도이다.
- <30> 도 2a 내지 도 2d는 아스트라갈로사이드 IV의 함량 분석그래프로서, 도 2a는 대조군으로서 아스트라갈로사이드 IV의 피크, 도 2b는 황기 뿌리 내 아스트라갈로사이드 IV의 함량, 도 2c는 비교예 1인 황기부정근 내 아스트라갈로사이드 IV의 함량, 도 2d는 본 발명의 일 실시예에 따라 생산된 황기 부정근 내 아스트라갈로사이드 IV의 함량을 각각 분석하여 나타낸 그래프이다.

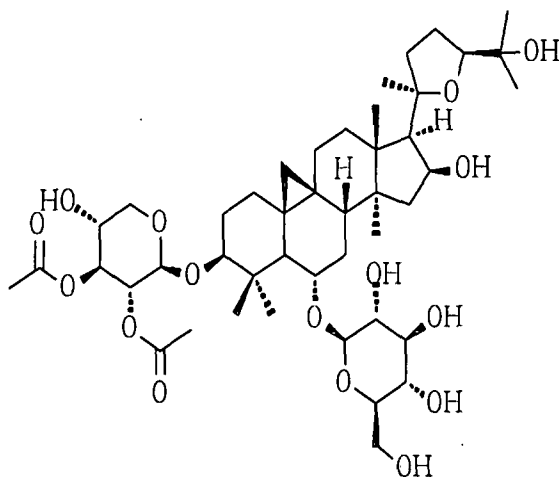
【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

- <31> 본 명세서에서 "부정근"이라 함은, 줄기에서 2차적으로 발생하는 뿌리를 의미하는 것으로서, 원뿌리 이외의 부분이라면 발생장소 및 발생원인, 형태를 불문하는 최광의의 개념이다.
- <32>
- <33> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <34> 황기는 아스트라갈로사이드류(Astragalosides)의 사포닌과 아스트라갈란(Astragalin) 계통의 다당류, 캄페롤, 퀘르세틴, 이소람네틴, 갈리코신, 포르모노넨, 람노시트린, 쿠마타게닌 등의 플라보노이드, 아스파라긴, 글루탐산, 프롤린,

β -아미노뷰티르산, 아르기닌, 알라닌 등의 아미노산을 함유하고 있다(Kitagawa, I. et, Chem. Pharm. Bull., 31(2):709-722, 1983).

<35> 또한, 황기는 시클로알탄 트리테르펜 글리코사이드(cycloartane triterpene glycosides)인 아스트라갈로사이드 I~VII를 포함하고 있는데, 아글리콘(aglycone)인 시클로아스트라제놀(cycloastragenol)에 3-, 6-, 그리고 25-번 위치에 1~3개의 당이 결합된 구조를 지니고 있다(하기 화학식 1 내지 4참조).

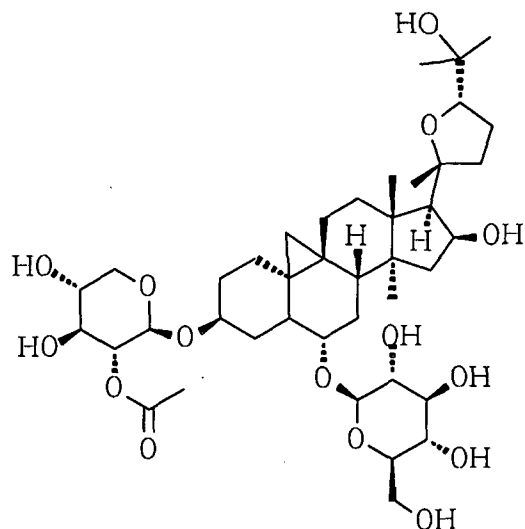
<36> 【화학식 1】



Astragaloside I

<37>

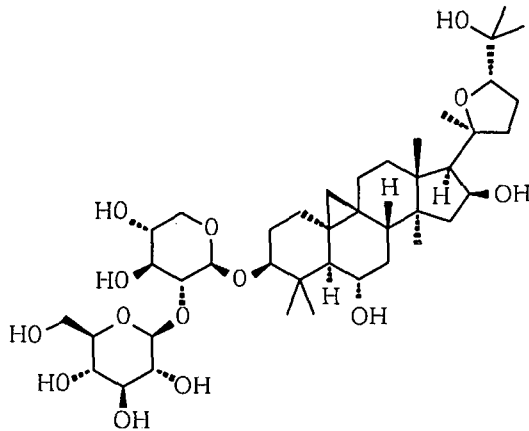
<38> 【화학식 2】



Astragaloside II

<39>

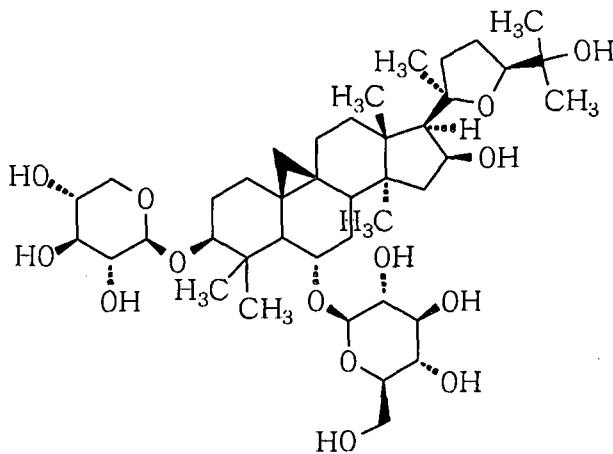
<40> 【화학식 3】



Astragaloside III

<41>

<42> 【화학식 4】



Astragaloside IV

<43>

<44>

이 중에서도 아스트라갈로사이드 IV는 황기의 대표적인 사포닌의 일종으로 항암(anti-cancer), 항피로(anti-fatigue), 항고혈압(anti-hypertension), 양성변력작용(positive inotropic action), 항염(anti-inflammation), 경색억제(anti-infarction) 등 다양한 활성을 나타낸다(Biol. Pharm. Bull. 33(4), 641-646, 2010). 그러나 황기의 재배년도에 따른 아스트라갈로사이드의 함량은 재배년도가 증가할수록 총 아스트라갈로사이드의 양이 감소하고, 전체적으로 아스트라갈로사이드 IV가 I~III보다 함량이 적다(Korean J. Medicinal Crop Sci. 20(5): 372-380, 2012). 따라서, 이를 실질적으로 이용하기 위하여는 황기 자체 내에 함유된 아스트라갈로사이드 IV만을 사용하는 것으로는 한계가 있으므로 대량으로 생산할 필요성이 있다.

<45>

<46>

따라서, 본 발명은 상기와 같이 인체에 유용한 활성을 나타내는 성분인 아스트라갈로사이드 IV를 대량생산하기 위하여, 이를 다량 함유하는 황기 부정근을 대량 생산하기 위한 방법을 제공한다.

<47>

<48>

본 발명의 일 실시예는 황기 부정근의 대량생산방법으로서,

<49>

(a)황기 종자를 멸균하여 무균화하는 단계;

<50>

(b)상기 무균화된 황기 종자의 발아를 유도하는 단계;

<51>

(c)발아된 황기로부터 식물호르몬을 사용하여 부정근을 유도하는 단계;

<52>

(d)상기 유도된 부정근을 액체배양하는 단계; 및

<53>

(e)상기 배양된 부정근을 엘리시터(Elicitor)로 처리하고 생물반응기(Bioreactor)에서 배양하는 단계를 포함하는 아스트라갈로사이드 IV(Astragaloside IV)의 함량이 증가된 황기 부정근의 대량생산방법을 제공한다. 도 1은 실제로 본 발명의 일 실시예에 따라 황기 부정근을 대량생산한 과정을 사진촬영하여 나타낸 것이다.

<54>

본 발명의 일 실시예로 상기 (a)단계에서 구체적으로 황기종자는 발아 촉진을 위해 물에 침지된 다음 클린벤치(Clean bench, 무균상)에서 70% 에탄올과 2% 차염소산나트륨을 이용하여 표면살균함으로써 멸균하여 무균화 될 수 있다. 이때, 표면살균 후 황기의 표면에 묻어있는 차염소산나트륨으로 인해 종자가 상하는 것을 방지하기 위하여, 멸균된 증류수로 수세하여 사용한다.

<55>

본 발명의 일 실시예로 상기 (B)단계에서는 황기 종자의 발아를 유도하기 위하여, 상기 (a)단계에서 표면살균되어 무균화된 황기 종자를 슈크로스(sucrose)가 첨가된 MS(Murashige & Skoog)배지에 치상함으로써 황기 종자의 발아를 유도할 수 있다. 구체적으로 25±3℃의 온도조건에서 암(暗)상태로 배양시킴으로써 발아시킬 수 있으며, 이때 슈크로스는 20~30g/L 또는 30g/L의 농도로 첨가할 수 있다. 슈크로스가 과량으로 첨가될 경우 배지의 삼투압을 증가시켜 부정근의 분화를 억제할 수 있기 때문이다.

<56>

본 발명의 일 실시예로 상기 (c)단계에서는 발아된 황기로부터 부정근을 유도하기 위하여, 부정근의 유도부위로는 발아된 황기의 줄기 부위를 사용할 수 있다. 그리고 이 발아된 황기의 줄기 부위를 식물호르몬인 인돌-3-부티르산(indole-3-butyric acid, IBA), 또는 인돌-3-부티르산과 키네티(Kinetin)를 포함하고 슈크로스가 첨가된 MS 배지 위에 치상함으로써 부정근을 유도할 수 있다. 구체적으로,

부정근의 유도율을 높이기 위하여 인돌-3-부티르산은 3~5ppm 또는 5ppm, 키네티ンは 0.5~3ppm의 비율로 첨가될 수 있다.

<57>

본 발명의 일 실시예로 상기 (d)단계에서는 유도된 부정근을 액체배양한다. 액체배양은 새로운 배지 및 영양원의 첨가, 배지의 교체, 배양조직의 계대, 배양 중 시료채취 등이 용이하며 배양체의 생장 또한 빠른 장점이 있다. 구체적으로 본 발명의 일 실시예로서 유도된 부정근을 인돌-3-부티르산 3~5ppm, 슈크로스 20~30g/L가 첨가된 MS배지 또는 SH(Schenk & Hildebrandt)배지에서 4~5주간 액체 배양할 수 있다. 이때 액체배양은 부정근 세포에 물리적 자극을 줌으로써 아스트라갈로사이드 IV의 생장량 및 생합성을 촉진하기 위하여 배지를 교반시키면서 배양을 실시할 수 있으며, 이때 교반속도는 구체적으로 120~140rpm, 보다 구체적으로 130rpm의 조건으로 교반시키면서 실시될 수 있다. 또한 접종량 역시 부정근의 생장에 중요한 요소가 되는데, 접종량은 액체배지 100ml 당 유도된 부정근 0.5~2g, 0.8~1.5g 또는 1g의 비율로 할 수 있다.

<58>

본 발명의 일 실시예로 상기 (e)단계에서는 (d)단계에서 배양된 황기 부정근을 대량생산하기 위하여 생물반응기(Bioreactor)에서 배양할 수 있다. 이때 아스트라갈로사이드 IV의 함량을 증가시키기 위하여 엘리시터로 엘리시테이션(Elicitation)을 실시한 후 생물반응기에서 배양할 수 있다. 엘리시터를 처리하기 전까지의 시기는 황기 부정근의 생장을 위한 시기이고, 엘리시터 처리 후 1주간 더 배양하는 것은 2차 대사산물인 아스트라갈로사이드 IV의 함량을 증가시키기 위한 시기이다. 엘리시터로는 키토산, 효모추출물 또는 MeJA(Methyl Jasmonate) 등을 사용할 수 있으며, 보다 구체적으로 MeJA를 사용할 수 있다. 그리고 인돌-3-부티르산 3~5mg/L, 슈크로스 20~30g/L가 첨가된 SH 배지에 MeJA(Methyl Jasmonate)로 처리된 부정근을 접종하여 암상태로 4~5주간 배양함으로써 실시될 수 있다. 또한, 아스트라갈로사이드 IV 함량을 효율적으로 증가시키기 위해서 상기 배지에서 4~5주간 배양된 황기 부정근에 80~120, 90~110 또는 100 μ M의 MeJA를 처리하고, 6~8일, 즉 1주간 더 배양하는 것을 포함할 수 있다.

<59>

또한, 본 발명의 일 실시예에 따른 황기 부정근의 대량생산방법에 사용되는 MS 배지는 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, KNO_3 , NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, Na_2-EDTA , $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, KI, H_3BO_3 , $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 슈크로스, 미오이노시톨(myo-Inositol), 니코틴산(Nicotin Acid), 피리독신하이드로클로라이드(Pyridoxine-HCl), 티아민하이드로클로라이드(Thiamin-HCl), 글리신(glycine) 및 아가(Agar)를 포함할 수 있고, pH는 5.7~5.8일 수 있다. 그리고 SH 배지는

MgSO₄·7H₂O, NH₄H₂PO₄, CaCl₂·2H₂O, KNO₃, FeSO₄·7H₂O, Na₂-EDTA, MnSO₄·4H₂O, ZnSO₄·7H₂O, CuSO₄·5H₂O, CoCl₂·6H₂O, KI, H₃BO₃, Na₂MoO₄·2H₂O, 슈크로스, 미오이노시톨(myo-Inositol), 니코틴산(Nicotin Acid), 피리독신하이드로클로라이드(Pyridoxine-HCl), 티아민하이드로클로라이드(Thiamin-HCl) 및 아가(Agar)를 포함할 수 있고, pH는 5.7~5.8일 수 있다.

<60>

<61>

본 발명의 일 실시예로서 상기와 같은 (a)~(e)단계를 포함하는 방법에 의하면 황기 부정근을 유전자 변형없이도 안전하게 대량으로 생산할 수 있다. 특히 본 발명의 일 실시예에 따르면 아스트라갈로사이드 IV의 함량이 황기 부정근 총 중량에 대하여 5~15, 7~12 또는 9~10중량%로 함유된 황기 부정근을 생산할 수 있다. 이는 기존 황기의 뿌리 또는 엘리시터를 처리하지 않은 황기 부정근보다 아스트라갈로사이드 IV가 3배 이상으로 현저히 많이 함유된 황기 부정근의 생산이 가능함을 의미한다.

【발명의 실시를 위한 형태】

<62>

이하, 본 발명을 하기의 실시예 및 시험예를 통하여 설명한다. 이는 본 발명을 보다 상세히 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 하기의 실시예 및 시험예의 범위로 제한되는 것은 아니다.

<63>

또한, 이 기술분야의 통상의 지식을 가진 자이면 누구나 이 발명의 기술 사상의 범주를 이탈하지 않고 첨부한 특허청구범위 내에서 다양한 변형 및 모방이 가능함은 명백한 사실이다.

<64>

<65>

[실시예 1 내지 20] 황기부정근의 생산

<66>

본 발명의 일 실시예에 따른 방법으로 아스트라갈로사이드 IV가 다량 함유된 황기 부정근을 하기와 같이 생산하였다.

<67>

<68>

황기의 종자를 이용한 발아

<69>

황기 종자는 아람종묘에서 구입한 국내산 황기 종자를 사용하였다. 본 실험에 사용한 모든 배지와 기구는 121℃, 1.5기압으로 20분간 고온, 고압 멸균하여 페트리디쉬(Petri-dish)에 각각 30 ml씩 분주하여 사용하였다.

<70>

먼저, 황기 종자의 발아를 촉진하기 위하여 황기 종자를 수돗물에 24시간 침지시켰다. 침지된 종자를 클린벤치에서 70% 에탄올에 약 1분, 2% 차염소산나트륨에 약 15분 동안 각각 표면살균한 후, 표면에 묻어있는 차염소산나트륨으로 인해 종자

가 상하는 것을 방지하기 위하여 멸균된 증류수로 3회 수세하였다. 표면살균된 종자는 슈크로스가 30g/L 첨가된 하기 표 2의 조성을 갖는 MS 고체배지에 치상하여 발아를 유도하였으며, $25\pm3^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 암상태로 배양실에서 배양하였다.

<71> 그 결과, 배양 후 5일부터 황기 종자가 발아하기 시작하였고 줄기가 신속하게 신장되었다.

<72>

<73> 부정근 유도

<74> 발아 후 자라난 줄기 부위를 약 1~2 cm로 절단하여 부정근 유도를 위한 재료로 사용하였다.

<75> 절편은 하기의 표 1과 같이 인돌-3-부티르산과 키네티를 각각 0.5, 1, 3, 5mg/L의 조합으로 MS배지에 첨가하여 페트리디쉬당 6개씩, 총 12개씩 각각 치상하였고, $25\pm3^{\circ}\text{C}$, 암상태로 배양실에서 배양하면서 부정근 유도 양상을 조사하였다. 부정근 유도에 사용된 MS 배지의 조성은 하기 표 2의 조성과 동일하다.

<76> 【표 1】

실시예	인돌-3-부티르산(ppm)	키네티(ppm)
1	0.5	-
2	1	-
3	3	-
4	5	-
5	0.5	0.5
6	1	0.5
7	3	0.5
8	5	0.5
9	0.5	1
10	1	1
11	3	1
12	5	1
13	0.5	3
14	1	3
15	3	3
16	5	3
17	0.5	5
18	1	5
19	3	5
20	5	5

<77>

<78> 황기 부정근의 액체배양

<79> 황기 부정근을 하기 표 2와 같은 조성을 가지는 MS 배지와 SH 배지에 인돌-

3-부티르산 1mg/L, 슈크로스 30g/L를 첨가하여 액체배양을 하였다.

<80> 이때 고체배지에서 유도된 부정균(실시예 12)을 1g 취하여 100 ml 배지가 들어있는 250ml 삼각플라스크에 접종하여 4주간 130rpm으로 교반하여 액체배양하였다.

<81> 【표 2】

성분	MS(단위: mg/L)	SH(단위: mg/L)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	380
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	300
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	200
KNO ₃	1900	2500
NH ₄ NO ₃	1650	-
KH ₂ PO ₄	170	-
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	15
Na ₂ -EDTA	37.3	20
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	10
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.2
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.1
KI	0.83	1
H ₃ BO ₃	6.2	5
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.1
Sucrose(설탕)	30g/L	30g/L
myo-Inositol	100	100
Nicotin Acid	0.5	5
Pyridoxine-HCl	0.5	0.5
Thiamin-HCl	0.1	5
Glycine	2	-
Agar	8g/L	8g/L
pH	5.7~5.8	5.7~5.8

<82>

<83> 황기 부정균의 생물반응기 배양

<84> 황기 사포닌 분석 및 제품화를 위해서는 많은 양의 건조상태의 부정균이 필요하므로, 생물반응기를 이용하여 배양하였다.

<85> 인돌-3-부티르산 1mg/L, 슈크로스 30g/L가 첨가된 2L의 SH 배지가 들어있는 5L의 생물반응기에 부정균 65g을 접종하여 암상태로 5주간 배양하였다. 이때 황기

부정근의 아스트라갈로사이드 IV 함량 증가를 위하여 4주 배양된 황기 부정근에 100 μ M MeJA를 처리하고, 1주간 더 배양하여 부정근을 생산하였다.

<86>

<87> [비교예 1] 엘리시터 처리하지 않은 황기 부정근

<88> 생물반응기 배양에 있어서 엘리시터인 MeJA를 처리하지 않고 5주간 배양한 것을 제외하고는 상기 실시예 2와 동일한 조건 및 방법으로 비교예 1의 황기 부정근을 생산하였다.

<89>

<90> [시험예 1] 호르몬 구성에 따른 부정근 유도율

<91> 상기 부정근 유도단계에서 실시예 1~20의 배양조건 중, MS 배지에 포함된 인돌-3-부티르산과 키네티ن 농도에 대한 부정근의 유도율(%)을 분석하여 하기의 표 3에 나타내었다.

<92> 이때 부정근의 유도율(%)은 하기 수학적 식 1과 같이 계산하였으며, 부정근이 유도된 절편수는 캘러스(callus)와 부정근이 같이 유도된 조직도 포함하여 계산하였다.

<93> 【수학적 식 1】

$$\text{유도율}(\%) = \frac{\text{부정근유도된절편수}}{\text{치상한절편수}} \times 100$$

<94>

<95> 【표 3】

		인돌-3-부티르산			
		0.5ppm	1ppm	3ppm	5ppm
키네티ن	0ppm	12.5	50	50	87.5
	0.5ppm	12.5	25	75	100
	1ppm	12.5	37.5	87.5	100
	3ppm	12.5	50	87.5	100
	5ppm	25	37.5	50	87.5

<96>

(단위: %)

<97>

<98> 상기 표 3에서 확인되는 바와 같이 인돌-3-부티르산이 3~5ppm, 키네티ن 0.5~3ppm일 때 부정근의 유도율이 높게 나타났으며, 특히 인돌-3-부티르산이 5ppm 이고, 키네티인이 0.5~3ppm인 경우에는 유도율이 100%로 나타났다.

<99>

<100> [시험예 2] 호르몬 농도에 따른 부정근 성장량

<101> 상기 부정근 유도단계에서 실시예 1~20의 배양조건 중, MS 배지에 포함된 호르몬 중 인돌-3-부티르산의 농도에 따른 부정근 성장량(g)을 측정하여, 그 결과를 하기의 표 4에 나타내었다.

<102> 이때 부정근의 성장량은 배지를 제거한 상태의 성장완료 후의 부정근의 무게에서 초기에 접종한 고체배지에서 유도된 부정근의 무게를 뺀 생체량으로 계산하였다.

<103> 【표 4】

인돌-3-부티르산(ppm)	성장량(g)
0.5	3.82
1	5.43
3	5.21
5	4.74

<104> 상기 표 4에서 확인되는 바와 같이 인돌-3-부티르산의 농도가 1ppm일 때 가장 높은 성장량을 보였다. 그러나, 그 이상 과량으로 첨가되는 경우에는 부정근이 성장하였지만 캘러스화 되는 비정상적인 생장이 나타나는 문제점이 있었다.

<105>

<106> [시험예 3] 배지에 따른 부정근 성장량

<107> 상기 황기 부정근(실시예 2)의 액체배양단계에서의 배지의 종류에 따른 부정근 성장량을 측정하였으며, 그 결과를 하기의 표 5에 나타내었다.

<108> 이때 부정근의 성장량은 배지를 제거한 상태의 성장완료 후의 부정근의 무게에서 초기에 접종한 고체배지에서 유도된 부정근의 무게를 뺀 생체량으로 계산하였다.

<109> 【표 5】

배지	성장량(g)
MS	5.12
SH	5.85

<110> 상기 표 5에서 확인되는 바와 같이 성장량에 큰 차이는 없었으나, SH 배지에서 보다 높은 성장량을 나타내었다.

<111>

<112> [시험예 4] 슈크로스 농도에 따른 부정근 성장량

<113> 상기 고체배지에서 유도된 부정근(실시예 8)을 1g씩 총 4g 취하고, 슈크로스가 1, 3, 5, 7%의 농도, 즉 슈크로스가 10, 30, 50, 70 g/L첨가된 것을 제외하고는 각각 표 2와 동일한 조성인 SH배지가 100ml, 인돌-3-부티르산이 1mg/L 들어있는 250ml의 삼각플라스크에 접종하여, 4주간 130rpm로 교반하여 액체배양을 하였다.

<114> 그리고 상기 황기 부정근의 액체배양단계에서의 슈크로스 농도에 따른 부정근 생장량을 측정하였으며, 그 결과를 하기의 표 6에 나타내었다.

<115> 이때 부정근의 생장량은 배지를 제거한 상태의 생장완료 후의 부정근의 무게에서 초기에 접종한 고체배지에서 유도된 부정근의 무게를 뺀 생체량으로 계산하였다.

<116> 【표 6】

슈크로스 농도(%)	생장량(g)
1	4.63
3	6.02
5	5.34
7	4.15

<117> 상기 표 6에서 확인되는 바와 같이 농도가 3%인 슈크로스 배지 처리구에서 높은 생장량을 나타내었고 과량으로 첨가되는 경우 생장이 억제되었다.

<118>

<119> [시험예 5] 교반속도에 따른 부정근 생장량

<120> 상기 고체배지에서 유도된 부정근(실시에 8)을 1g씩 총 3g 취하고, 표 2와 동일한 조성인 SH배지가 100ml, 인돌-3-부티르산이 1mg/L 들어있는 250ml의 삼각플라스크에 접종하여 4주간 100, 130, 150rpm으로 각각 달리 교반하여 액체배양을 하였다.

<121> 그리고 상기 황기 부정근의 액체배양단계에서의 교반속도에 따른 부정근 생장량을 측정하였으며, 그 결과를 하기의 표 7에 나타내었다.

<122> 이때 부정근의 생장량은 배지를 제거한 상태의 생장완료 후의 부정근의 무게에서 초기에 접종한 고체배지에서 유도된 부정근의 무게를 뺀 생체량으로 계산하였다.

<123> 【표 7】

교반속도(rpm)	생장량(g)
100	4.46
130	5.90
150	4.63

<124> 상기 표 7에서 확인되는 바와 같이 교반속도가 130rpm인 처리구에서 높은 생장량을 나타내었고 이보다 낮거나 높은 교반속도에서는 생장량이 다소 감소하였다.

<125>

<126> [시험예 6] 초기 접종농도에 따른 부정근 생장량

<127> 상기 고체배지에서 유도된 부정근(실시에 8)을 각각 0.5, 1, 2g씩 취하고, 표 2와 동일한 조성인 SH배지가 100ml, 인돌-3-부티르산 1mg/L가 들어있는 250ml의

삼각플라스크에 접종하여 4주간 130rpm으로 교반하여 액체배양을 하였다.

<128> 상기 황기 부정근의 액체배양단계에서의 액체배지 100ml 당 초기 접종농도에 따른 부정근 성장량을 측정하였으며, 그 결과를 하기의 표 8에 나타내었다.

<129> 이때 부정근의 성장량은 배지를 제거한 상태의 성장완료 후의 부정근의 무게에서 초기에 접종한 고체배지에서 유도된 부정근의 무게를 뺀 생체량으로 계산하였다.

<130> 【표 8】

초기 접종 농도(g)	성장량(g)
0.5	3.69
1	5.78
2	8.24

<131> 상기 표 8에서 확인되는 바와 같이 초기 접종농도가 1g인 처리구에서 접종량 대비 보다 높은 성장량을 나타내었고 이보다 적거나 많은 접종농도에서는 성장량이 다소 감소하였다.

<132>

<133> [시험예 7] 엘리시터 종류에 따른 부정근 성장량

<134> 상기 황기 부정근(실시예 2)의 생물반응기 배양단계에서, 엘리시터를 각각 키토산, 효모 추출물 또는 MeJA를 처리하여 엘리시터의 종류에 따른 부정근 성장량을 측정하였다. 그리고 부정근내 함유된 아스트라갈로사이드 IV의 함량(%)를 측정하여, 그 결과를 하기의 표 10에 나타내었다.

<135> 이때 부정근의 성장량은 배지를 제거한 상태의 성장완료 후의 부정근의 무게에서 초기에 접종한 고체배지에서 유도된 부정근의 무게를 뺀 생체량으로 계산하였다.

<136> 또한, 부정근내 함유된 아스트라갈로사이드 IV의 함량은 하기와 같이 측정하였다.

<137> 상기 서로 다른 엘리시터를 처리하여 생산된 부정근을 각각 건조한 후 균일하게 분쇄하여 50호 체를 통과시킨 후 분말 0.5g을 취하였다. 메탄올 20mL을 넣고 30분간 초음파 추출을 한 후 여과한 후, 잔류물에 메탄올 20mL을 첨가해 위의 과정을 두 번 반복 추출하였다. 여과액을 모두 모아 감압농축하고, 농축물을 메탄올 10mL에 녹인 후 이 중 10 μ l를 취하여 검액으로 하였으며, 하기 표 9에 기재된 조건으로 HPLC분석하였다.

<138> 【표 9】

Instrument	Agilent HPLC 1200 series
Column	Zorbax Eclipse C18 4.6×250mm, 5μ
Elution mode	Mobile Phase
Mobile phase	Mobile Phase A : 2%Acetic acid (in DW) Mobile Phase B : Acetonitrile 92 : 8 ~ 10 : 90, Gradient
Detector	DAD detector, 230nm
Flow rate	0.5mL/min
Column Temperature	25℃
Injection Volume	1μl
Retention Time	5.0 min
End Time	30 min

<139>

<140>

그 결과 각 엘리시터 처리 황기 부정근 총 중량에 대한 분리된 아스트라갈로사이드 IV의 함량(%)을 하기 표 10에 나타내었다.

<141>

【표 10】

엘리시터	생장량(g)	아스트라갈로사이드 IV 함량(%)
키토산	441	7.29
효모 추출물	438	5.76
Methyl Jasmonate(MeJA)	452	9.41

<142>

상기 표 10에서 확인되는 바와 같이 엘리시터 MeJA 처리구에서 보다 높은 생장량을 나타내었을 뿐만 아니라, 부정근내 함유된 아스트라갈로사이드 IV의 함량(%)도 가장 높게 나타났다.

<143>

<144>

[시험예 8] 엘리시터 처리시기에 따른 부정근 생장량

<145>

상기 황기 부정근(실시에 2)의 생물반응기 배양단계에서의 엘리시터 처리시기에 따른 부정근 생장량과 아스트라갈로사이드 IV 함량을 측정하였다. 2, 3, 4, 5주간 각각 배양한 후 엘리시터를 처리하고, 그 후 각각 1주년을 더 배양하여 함량을 측정하였다. 이때 엘리시터를 처리하기 전까지의 시기는 황기 부정근의 생장을 위한 시기이고, 엘리시터 처리 후 1주간 더 배양하는 것은 2차 대사산물인 아스트라갈로사이드 IV의 함량을 증가시키기 위한 시기이다.

<146>

그리고 엘리시터의 처리시기를 달리하였을 때의, 결과를 하기의 표 11에 나타내었다.

<147>

이때 부정근의 생장량은 배지를 제거한 상태의 생장완료 후의 부정근의 무게에서 초기에 접종한 고체배지에서 유도된 부정근의 무게를 뺀 생체량으로 계산하였다.

<148>

또한, 부정근내 함유된 아스트라갈로사이드 IV의 함량(%)은 상기의 시험예 7

에서 사용된 방법과 동일한 방법으로 HPLC를 이용하여 분석하였다.

<149> 【표 11】

처리시기	생장량(g)	아스트라갈로사이드 IV 함량(%)
2주	128	4.08
3주	319	7.22
4주	446	9.55
5주	457	9.61

<150> 상기 표 11에서 확인되는 바와 같이 배양 4-5주 후에 MeJA를 처리한 경우가 부정근 생장량과 아스트라갈로사이드 IV 함량이 높은 것으로 나타났으며, 그 차이는 크지 않았다. 따라서 엘리시터 처리의 최적시기는 4주후 MeJA를 처리한 경우가 가장 효율적이라 판단된다.

<151>

<152> [시험예 9] 황기 부정근의 아스트라갈로사이드 IV 분석

<153> 황기 뿌리, 상기 비교예 1 및 상기 실시예 2에서 생산된 부정근을 건조한 후 균일하게 분쇄하여 50호 체를 통과시킨 후 분말 0.5g을 취하였다. 메탄올 20mL을 넣고 30분간 초음파 추출을 한 후 여과한 후, 잔류물에 메탄올 20mL을 첨가해 위의 과정을 두 번 반복 추출하였다. 여과액을 모두 모아 감압농축하고, 농축물을 메탄올 10mL에 녹인 후 이 중 10 μ l를 취하여 검액으로 하였으며, 상기 표 9에 기재된 조건과 같은 조건으로 HPLC분석하였다. 그 결과 분리된 아스트라갈로사이드 IV의 함량(%)을 도 2a 내지 도2d 및 하기 표 12에 나타내었다. 이때 아스트라갈로사이드 IV의 함량%의 기준은 각각 황기뿌리, 미처리 황기부정근, MeJA 처리 황기부정근의 총 중량이다.

<154> 【표 12】

	황기 뿌리	비교예 1	MeJA 처리 황기 부정근(실시예 2)
아스트라갈로사이드 IV(%)	2.79	2.23	9.68

<155> 상기 표 12 및 도 2a 내지 도2d에서 확인되는 바와 같이, 본 발명의 방법에 따라 생산된 황기 부정근은 3배 ~ 4배 이상의 아스트라갈로사이드 IV의 함량을 나타냄을 확인할 수 있었다.

【청구의 범위】

【청구항 1】

(a) 황기 종자를 멸균하여 무균화하는 단계;
 (b) 상기 무균화된 황기 종자의 발아를 유도하는 단계;
 (c) 발아된 황기로부터 식물호르몬을 사용하여 부정근을 유도하는 단계;
 (d) 상기 유도된 부정근을 액체배양하는 단계; 및
 (e) 상기 배양된 부정근을 엘리시터(Elicitor)로 처리하고 생물반응기(Bioreactor)에서 배양하는 단계를 포함하는 아스트라갈로사이드 IV(Astragaloside IV)의 함량이 증가된 황기 부정근의 대량생산방법.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 (b)단계는 무균화된 황기 종자를 슈크로스(sucrose)가 첨가된 MS(Murashige & Skoog)배지에 치상하여 발아를 유도하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 아스트라갈로사이드 IV의 함량이 증가된 황기 부정근의 대량생산방법.

【청구항 3】

제 2 항에 있어서, 상기 MS 배지는 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, KNO_3 , NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, Na_2-EDTA , $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, KI , H_3BO_3 , $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 슈크로스, 미오이노시톨(myo-Inositol), 니코틴산(Nicotin Acid), 피리독신하이드로클로라이드(Pyridoxine-HCl), 티아민하이드로클로라이드(Thiamin-HCl), 글리신(glycine) 및 아가(Agar)를 포함하고, pH가 5.7~5.8인 것을 특징으로 하는 아스트라갈로사이드 IV의 함량이 증가된 황기 부정근의 대량생산방법.

【청구항 4】

제 2 항에 있어서, 상기 (b)단계에서 슈크로스는 20~30g/L로 첨가되는 것을 특징으로 하는 아스트라갈로사이드 IV의 함량이 증가된 황기 부정근의 대량생산방법.

【청구항 5】

제 1 항에 있어서, 상기 (c)단계는 발아된 황기의 줄기 부위를 식물호르몬으로 인돌-3-부티르산(indole-3-butyric acid, IBA) 또는 인돌-3-부티르산과 키네티ن(Kinetin)을 포함하고 슈크로스가 첨가된 MS(Murashige & Skoog) 배지 위에 치상하여 부정근을 유도하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 황기 부정근의 대량생산

방법.

【청구항 6】

제 5 항에 있어서, 상기 (c)단계에서 인돌-3-부티르산과 키네티ンは 3~5ppm:0.5~3ppm의 비율로 첨가되는 것을 특징으로 하는 아스트라갈로사이드 IV의 함량이 증가된 황기 부정근의 대량생산방법.

【청구항 7】

제 1 항에 있어서, 상기 (d)단계는 유도된 부정근을 인돌-3-부티르산이 3~5ppm, 슈크로스가 20~30g/L 첨가된 MS(Murashige & Skoog)배지 또는 SH(Schenk & Hildebrandt) 배지에서 120~140rpm의 조건으로 교반시키면서 4~5주간 액체배양하는 것을 특징으로 하는 아스트라갈로사이드 IV의 함량이 증가된 황기 부정근의 대량생산방법.

【청구항 8】

제 7 항에 있어서, 상기 SH 배지는 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $NH_4H_2PO_4$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, KNO_3 , $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, Na_2-EDTA , $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, KI , H_3BO_3 , $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 슈크로스, 미오이노시톨(myo-Inositol), 니코틴산(Nicotin Acid), 피리독신하이드로클로라이드(Pyridoxine-HCl), 티아민하이드로클로라이드(Thiamin-HCl) 및 아가(Agar)를 포함하고, pH가 5.7~5.8인 것을 특징으로 하는 아스트라갈로사이드 IV의 함량이 증가된 황기 부정근의 대량생산방법.

【청구항 9】

제 7 항에 있어서, 상기 MS 또는 SH 배지에 대한 유도된 부정근의 접종량은 배지 100ml당 유도된 부정근 0.5~2g의 비율임을 특징으로 하는 아스트라갈로사이드 IV의 함량이 증가된 황기 부정근의 대량생산방법.

【청구항 10】

제 1 항에 있어서, 상기 (e)단계에서 상기 엘리시터는 MeJA(Methyl Jasmonate)인 것을 특징으로 하는 아스트라갈로사이드 IV의 함량이 증가된 황기 부정근의 대량생산방법.

【청구항 11】

제 10 항에 있어서, 상기 (e)단계는 인돌-3-부티르산 3~5mg/L, 슈크로스 20~30g/L가 첨가된 SH 배지에 MeJA로 처리된 부정근을 접종하여 4~5주간 배양하는 것을 특징으로 하는 아스트라갈로사이드 IV의 함량이 증가된 황기 부정근의 대량생산방법.

【청구항 12】

제 11 항에 있어서, 상기 4~5주간 배양된 황기 부정균에 80~120?의 MeJA를 처리하고 6~8일간 더 배양하는 것을 특징으로 하는 아스트라갈로사이드 IV의 함량이 증가된 황기 부정균의 대량생산방법.

【청구항 13】

아스트라갈로사이드 IV의 함량이 황기 부정균 총 중량에 대하여 5~15 중량%로 함유된 황기 부정균.

【청구항 14】

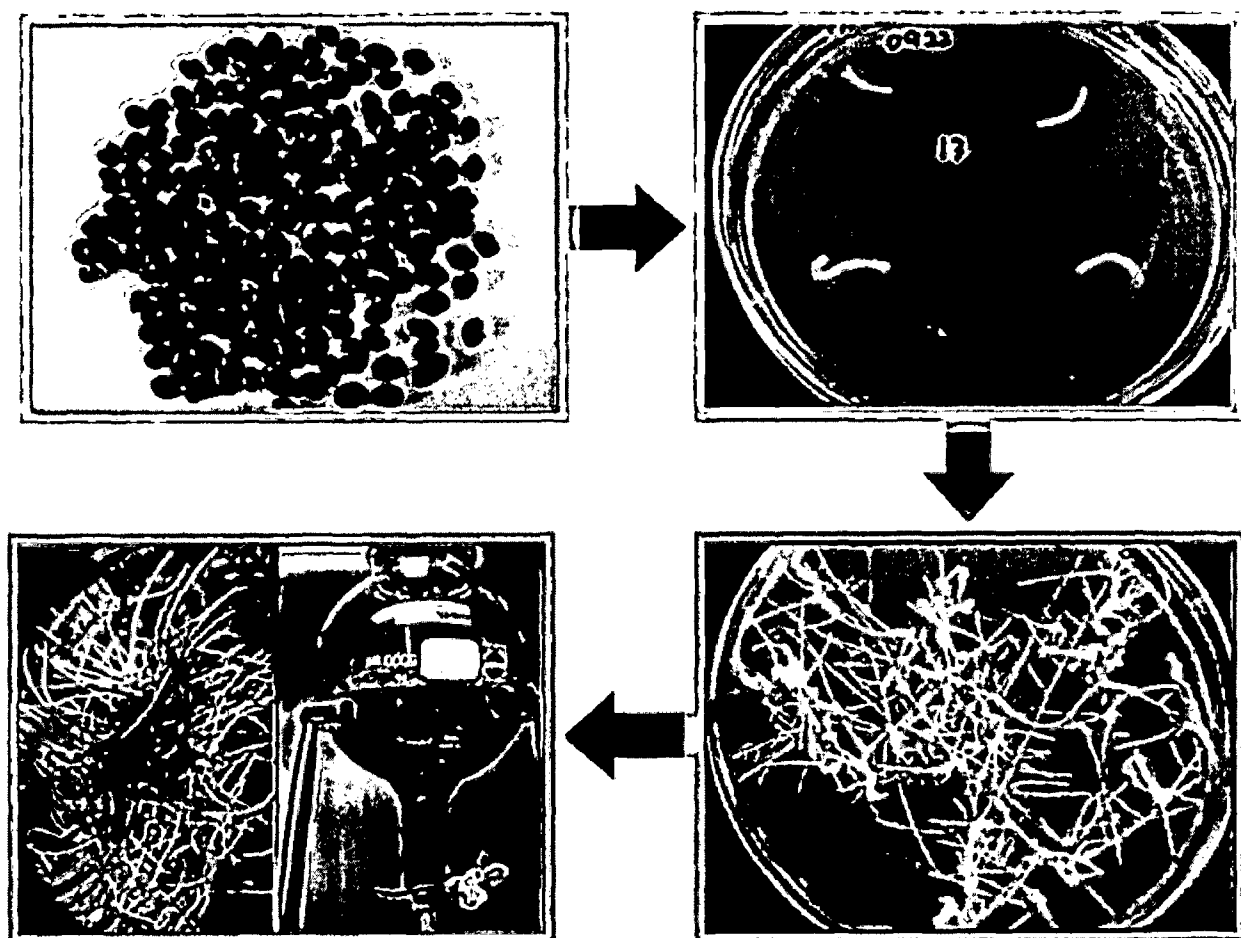
제 13 항에 있어서, 상기 황기 부정균은 제 1항 내지 제 12항 중 어느 하나의 항의 방법에 의해 생산된 것인 황기 부정균.

【청구항 15】

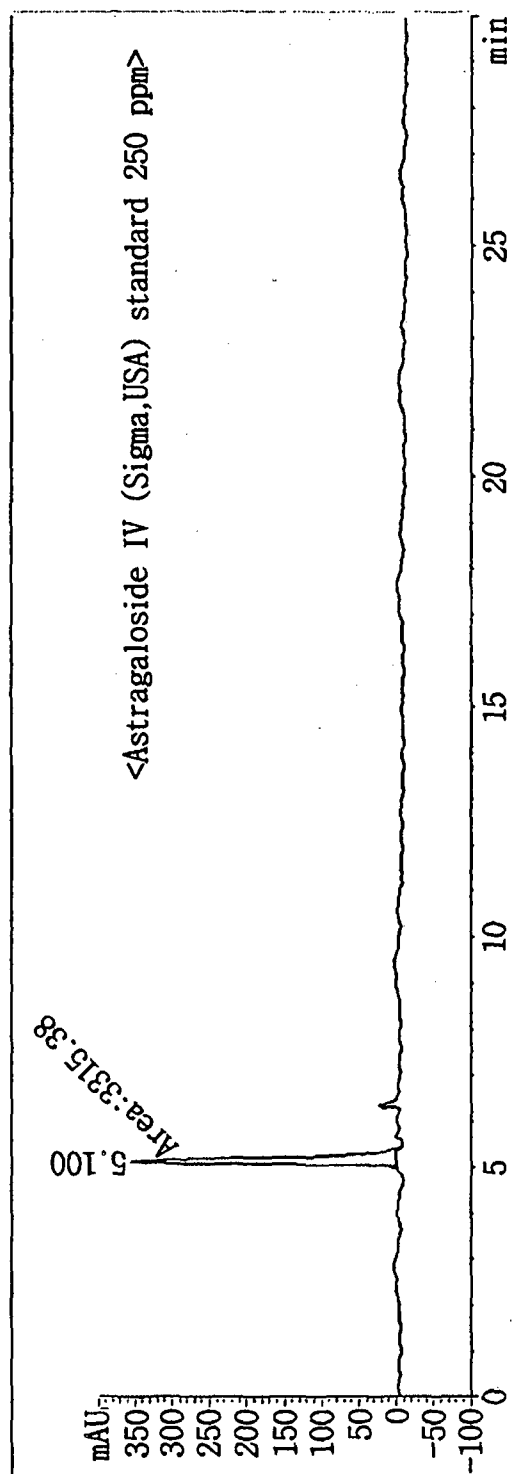
제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 하나의 항의 방법에 의해 생산된 황기 부정균.

【도면】

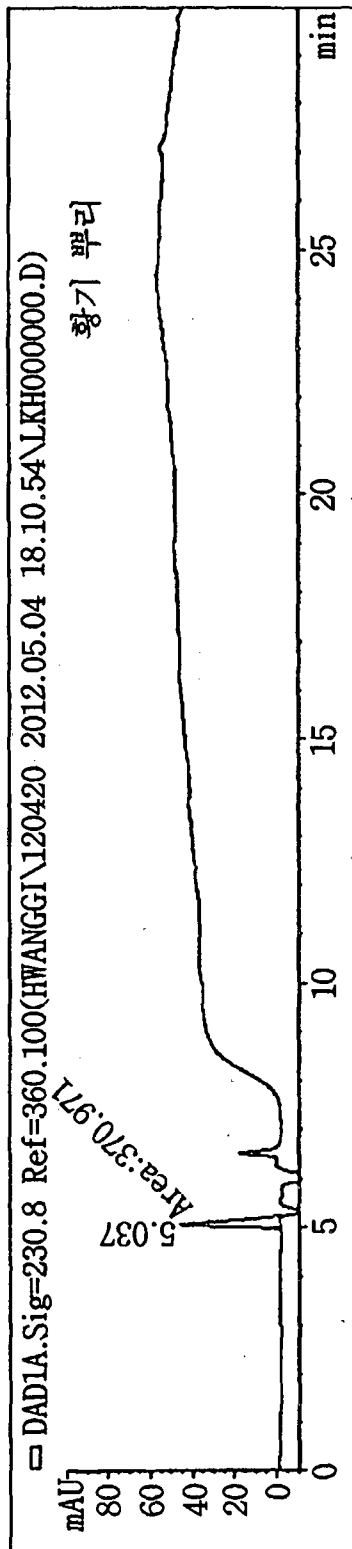
【도 1】



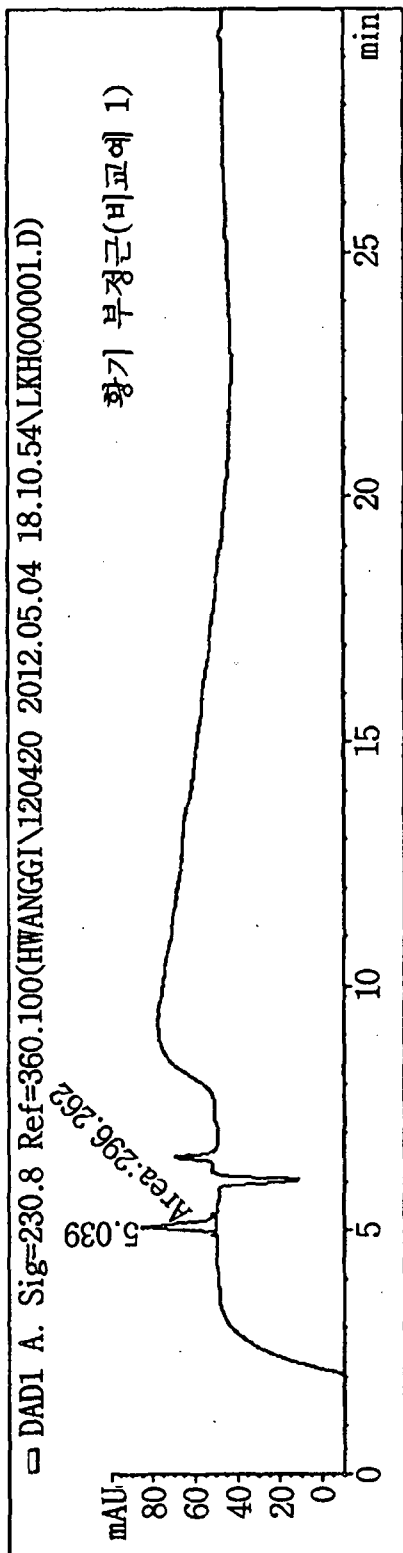
【도 2a】



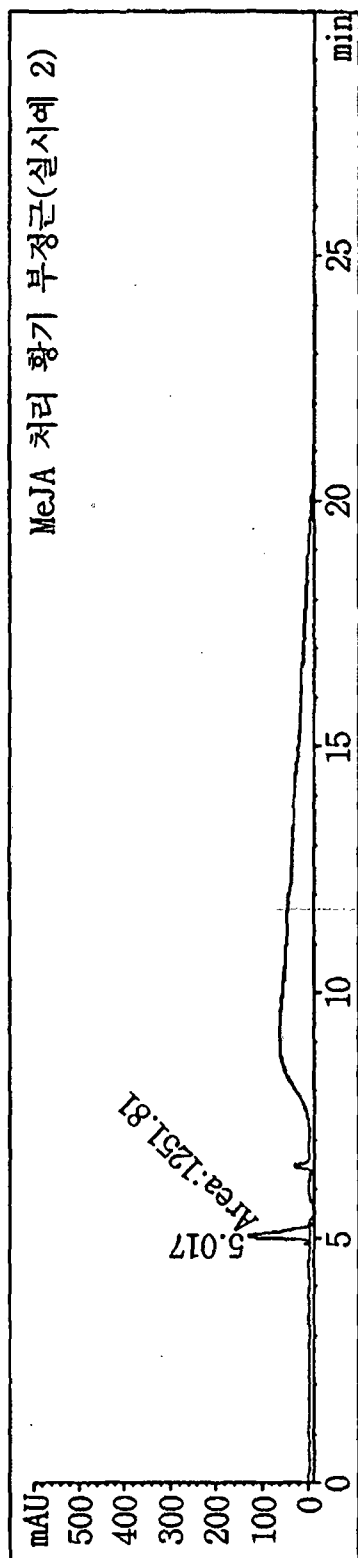
【도 2b】



【화 2c】



【도 2d】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/001846

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01H 3/04(2006.01)i, A01H 4/00(2006.01)i, A01G 7/06(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01H 3/04; A61K 36/481; A61P 17/00; A01H 4/00; A01G 7/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: astragaloside, astragali radix, adventitious root, elicitor, bioreactor, plant hormone, indole-3-butyric acid

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	THWE, A. A. et al., "Production of astragaloside and flavones from adventitious root cultures of <i>Astragalus membranaceus</i> var. <i>mongholicu</i> ", <i>Plant Omics Journal</i> , September 2012, vol. 5, no. 5, pp. 466-470. See abstract; pages 467-478; figures 1-3 and 5.	1-15
Y	PAEK, K. Y. et al., "Increase of Saponin Contents via Elicitor Treatments in Bioreactor Culture of Ginseng (<i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer) Adventitious Roots", <i>ISHS Acta Horticulturae</i> 679, 2005, pp. 145-148. See abstract; page 146, lines 4-19.	1-15
Y	WU, S. Q. et al., "Bioreactor application on adventitious root culture of <i>Astragalus membranaceus</i> ", <i>In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant</i> , December 2011, vol. 47, no. 6, pp. 719-724. See abstract; pages 720-721; figures 1-3.	1-15
A	DU, M. et al., "Astragaloside IV and polysaccharide production by hairy roots of <i>Astragalus membranaceus</i> in bioreactors", <i>Biotechnology Letters</i> , November 2003, vol. 25, no. 21, pp. 1853-1856. See abstract; page 1854; figures 1-2; table 1.	1-15
A	KR 10-2013-0002068 A (AMOREPACIFIC CORPORATION) 07 January 2012 See claims 1-4.	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 JUNE 2014 (27.06.2014)

Date of mailing of the international search report

27 JUNE 2014 (27.06.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

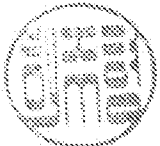
Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/001846

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2013-0002068 A	07/01/2013	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A01H 3/04(2006.01)i, A01H 4/00(2006.01)i, A01G 7/06(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A01H 3/04; A61K 36/481; A61P 17/00; A01H 4/00; A01G 7/06 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 아스트라갈로사이드, 황기, 부정근, 엘리시터, 생물반응기, 식물호르몬, 인돌-3-부티르산		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	THWE, A. A. 외 10명, `Production of astragaloside and flavones from adventitious root cultures of Astragalus membranaceus var. mongholicu`, Plant Omics Journal, 2012.09., 5권, 5호, 466-470 페이지. 요약; 페이지 467-478; 도면 1-3 및 5 참조.	1-15
Y	PAEK, K. Y. 외 1명, `Increase of Saponin Contents via Elicitor Treatments in Bioreactor Culture of Ginseng (Panax ginseng C.A. Meyer) Adventitious Roots`, ISHS Acta Horticulturae 679, 2005, 145-148 페이지. 요약; 페이지 146, 라인 4-19 참조.	1-15
Y	WU, S. Q. 외 4명, `Bioreactor application on adventitious root culture of Astragalus membranaceus`, In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 2011.12., 47권, 6호, 719-724 페이지. 요약; 페이지 720-721; 도면 1-3 참조.	1-15
A	DU, M. 외 5명, `Astragaloside IV and polysaccharide production by hairy roots of Astragalus membranaceus in bioreactors`, Biotechnology Letters, 2003.11., 25권, 21호, 1853-1856 페이지. 요약; 페이지 1854; 도면 1-2; 테이블 1 참조.	1-15
A	KR 10-2013-0002068 A ((주)아모레퍼시픽) 2012.01.07. 청구항 1-4 참조.	1-15
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2014년 06월 27일 (27.06.2014)		국제조사보고서 발송일 2014년 06월 27일 (27.06.2014)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150 

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0002068 A	2013/01/07	없음	