

## 인삼근권토양으로부터 ginsenoside Rb1 전환균주 GP513의 분리 및 유연관계분석

1. 경희대학교 생명과학대학 한방재료가공학과 2. 바이오피아 생명공학연구소  
성락금<sup>1</sup>, 인준교<sup>2</sup>, 이연진<sup>1</sup>, 양덕춘<sup>1\*</sup>

### Isolation and Phylogenetic Relationships Analysis of strain GP513 Converting Ginsenoside Rb1 from Ginseng Field

1. Colleague of Life Science & Center for Oriental Medicinal Materials  
and processing, Kyung Hee University 2. Institute of Biotechnology, Biopia  
Le-Qin Cheng<sup>1</sup>, Jun-Gyo In<sup>2</sup>, Youn-Jin Lee<sup>1</sup>, Deok-Chun Yang<sup>1\*</sup>

#### 실험목적

인삼사포닌은 인삼에서 가장 중요한 이차대사산물로서 다양한 생리활성을 나타낸다. 1983년 일본 오사카 대학의 Kitagawa I.가 처음으로 고려홍삼으로부터 ginsenoside Rg3을 분리하였고 그 후 암세포증식억제, 암세포에 대한 전이억제작용, 혈관확장 작용, 면역증강 등 활성이 검증되고 compound K, Rh2와 같은 sapogenin의 항암 활성이 밝혀짐에 따라 기존에 다량 존재하는 major사포닌의 modification 연구가 각별히 각광을 받고 있다.

본 연구는 인삼의 근권 토양으로부터 esculin 발색법을 이용하여 분리한  $\beta$ -glucosidase활성을 가진 균주 GS513의 16S rDNA 염기서열 통하여 기타 균주와의 유연관계를 분석하고 ginsenoside Rb1과 반응시켜 사포닌 전환여부를 확인하였다.

#### 재료및방법

##### ○ 실험재료

실험에 사용한 ginsenoside Rb1은 경기도 파주연천에서 채굴한 6년근 인삼을 건조시켜 메탄올추출법으로 분리하였고 지표물질 Rb1, Rd, Rg3, compound K, Rh2는 인삼연초연구원에서 분양받아 사용하였고 F2는 본 연구실에서 분리한 것을 사용하였으며 R2A배지 및 nutrient broth배지는 Difco 회사의 제품을 구입하여 사용하였다. TLC plate는 60 F-254 Silica gel plate (Merck)를 사용하였다.

##### ○ 실험방법

$\beta$ -glucosidase 생산균주분리 및 동정: 인삼밭 토양으로부터 흙을 채취하여 멸균수로 희석한 후 esculin을 첨가한 R2A agar 배지에 계대하여 검게 발색되는 single colony들만 따서 순수배양 될 때까지 같은 agar배지에서 반복 계대 배양하였다. 16S rDNA의 sequencing은 대전 제노텍회사에 의뢰하였다

균주의 phylogenetic tree작성: GS513균주의 16S rDNA의 sequencing을 NCBI database를 이용하여 가장 가까운 type strain을 결정하고 균주들의 16S rDNA 염기

주저자 연락처 : 양덕춘

E-mail : dcyang@khu.ac.kr

Tel : 031-201-2688,

서열은 Clustal X program을 이용하여 일정하게 정렬한 다음 Gap는 BioEdit program을 이용하여 삭제하고 편집하였다. 균주들의 진화과정을 추적하는 작업은 Kimura two-parameter model을 이용하였고, MEGA 3.1 Program의 neighbor-joining 방법으로 계통분류학적 위치를 결정하였다.

ginsenoside Rb1의 전환 및 TLC 확인: 2ml 멸균된 centrifuge tube에 0.2 $\mu$ m filter로 멸균한 1mM Rb1수용액 100 $\mu$ l와 nutrient broth배지에 현탁 배양한 GS 513 균주배양액 100 $\mu$ l를 혼합하고 shaking incubator에서 30 $^{\circ}$ C, 160rpm에서 2일 반응시켰다. 반응산물은 수포화부탄올 200 $\mu$ l로 추출하고 TLC에 10 $\mu$ l 점적하여 chloroform/methanol/water (65:35:10 하층) 혼합용매를 사용하여 전개하고 10% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 을 분무한 다음 가열하여 발색시켰다.

### 결과및고찰

Esculin방법을 이용하여 인삼밭으로부터 분리한  $\beta$ -glucosidase활성 균주 GP513의 16S-rDNA염기서열을 NCBI database를 이용하여 유연관계계통수를 그린 결과를 Fig. 1의 A에 나타냈다.

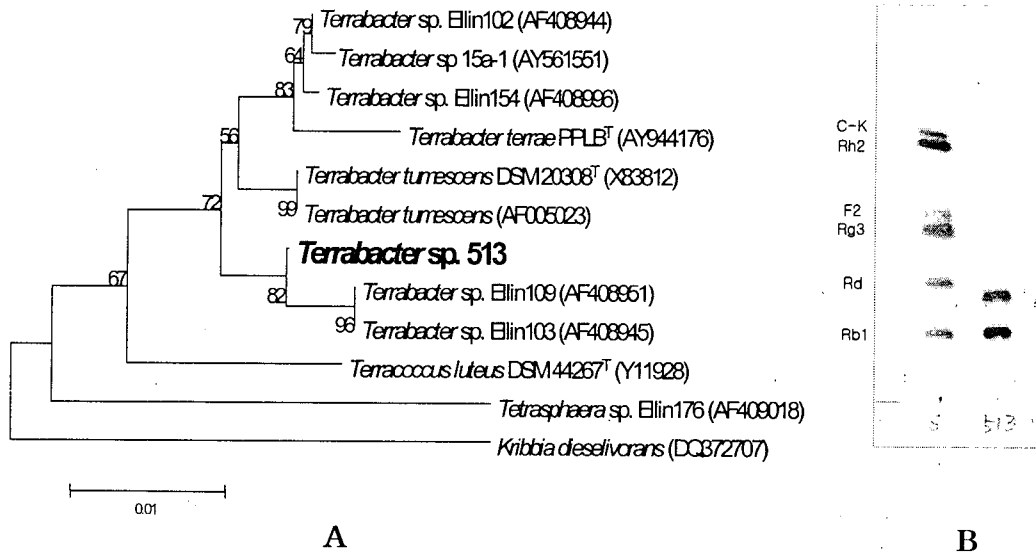


Fig. 1 A. Phylogenetic tree of  $\beta$ -glucosidase-producing microorganism GP 513; B. TLC of hydrolyzing ginsenoside Rb1 by GP 513, developing solvents: CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (65:35:10, v/v, lower phase)

Fig. 1의 A에서 GP 513균주는 *Terrabacter* genus균주들과 같은 그룹으로 묶여 *Terrabacter* genus에 속하는 균주로 확인할 수 있고 *Terrabacter tumescens* DSM 20308<sup>T</sup>와(X83812)과 98.8%상동성을 지녀 *tumescens* species에 속하는 균주로 추정할 수 있다.

Fig. 1의 B는 ginsenoside Rb1을 GP 513균주로 전환시켜 TLC로 분석한 결과이다. TLC분석을 통하여 ginsenoside Rb1은 ginsenoside Rd와 F2로 전환되는 것을 관찰할 수 있었고 대부분은 gypenoside XVII로 추정되는 사포닌으로 전환되는 것을 알 수 있다.