

*Rhizopus japonicus*의 酵素에 의한 人蔘 사포닌의 選擇的 轉換

金 相 達 · 徐 正 垣*

영남대학교 응용미생물학과 · 慶北大學校 微生物學科*

Specific Conversion of Ginseng Saponin by the Enzyme of *Rhizopus japonicus*

Sang-Dal Kim and Jung-Hwn Seu*

Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Kyongsan 632 and
Department of Microbiology, Kyung-Pook National University,* Taegu 635, Korea

Abstract: The enzyme produced by a strain of *Rhizopus japonicus* was able to covert selectively ginsenoside Rb₁ which was the most abundant ginseng saponin, into ginsenoside Rd which was known to be superior to ginsenoside Rb₁ pharmaceutically. This specific conversion of ginsenoside Rb₁ without any change of other ginsenoside patterns was confirmed by thin layer chromatography and high performance liquid chromatography quantitatively. The amount of ginsenoside Rd was increased to 4.8 and 34.7 folds by enzymatic conversion of ginsenoside Rb₁ in total saponin and ginsenoside Rb group saponin, respectively. The increased amount of ginsenoside Rd corresponded to total amount of released glucose and decreased amount of ginsenoside Rb₁ accurately.

Key words: *Rhizopus japonicus*, Ginsenoside Rb₁, Ginsenoside Rd, Enzymatic conversion.

인삼 사포닌의 약리효능에 관한 수 많은 보고 (Heu, 1985; Bae, 1975)가 있으나 최근 몇년 전부터 많은 연구자들에 의해 단리된 ginsenoside 별로 그 약리작용이 연구되고 있다.

이들 연구결과중 인삼 사포닌중 조성비율이 가장 큰 ginsenoside Rb₁에 비해서 구조가 유사한 ginsenoside Rd쪽이 그 약리 효능면에서 훨씬 우수하다는 사실이 plasma corticosteron량의 증가 효과에 관한 Hiai등 (1979, 1980)의 보고, 단백질 생합성 촉진에 관한 Oura 등(1975)의 보고, 쥐의 학습 효과 증진에 관한 Kaku 등의 보고(1975)를 위시한 많은 보고들에 의해 밝혀졌다.

이러한 ginsenoside별 효능 연구가 발표됨에 따라 보다 우수한 약리 작용을 갖는 특정 ginsenoside 함량 비율을 증가시킬 수 있는 방법이 요청되고 있다. 본인들은 *Rhizopus japonicus*의 한 균주가 생산하는 특정

효소를 이용하여 인삼 사포닌 중 그 함량이 가장 많은 ginsenoside Rb₁의 C-20 위치에 β -1,6 결합된 두 분자의 포도당 중 1분자의 포도당만을 가수분해함으로써 ginsenoside Rd로 선택적으로 전환시킬 수 있는 효소적 전환방법을 진보(김 등, 1982)에서 확인하였고 본보에서는 그 선택적 전환을 정량적으로 확인 하였다.

재료 및 방법

효소 조제 및 효소 처리

사용한 인삼 사포닌 전환효소는 *Rhizopus japonicus*로 동정된 한 균주로부터 진보(김 등, 1982)의 방법으로 분리 정제하였다. 효소 처리 조건 역시 진보의 방법에 준하였다.

인삼 사포닌

기질로 사용한 인삼 사포닌은 진보의 방법으로 분리

* 1981년 12월 경북대학교 대학원에 제출한 박사학위논문문의 일부임.

정제한 total saponin (ginsenoside Rb₁ 36.4%, ginsenoside Rd 13.2%) 및 ginsenoside-Rb group saponin (ginsenoside Rb₁ 54.5%, ginsenoside Rd 1.1%) 이었다.

사포닌 및 Ginsenoside의 분리정량

효소 처리된 각 기질 사포닌의 분리는 전보의 방법에 준하였으며, 각 ginsenoside의 함량도 전보와 같은 방법으로 Waters사 제품 high performance liquid chromatograph(HPLC)로 분석하였으며 standard ginsenoside들로 미리 작성한 calibration curve를 이용해 정량분석하였다.

당의 분석

기질 사포닌을 효소 처리함으로써 가수분해되어 생성되는 당을 전보의 방법으로 분리한 후 그 수층에 냉각 에탄올을 80%(v/v)되게 첨가하여 단백침전시키고 10,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 그 상등액을 감압농축한 후 2 ml의 LC용 H₂O에 용해하여 Millipore 여과 하였다. 이 여액을 전보의 방법으로 HPLC로 chromatography하였으며 한편으로 Tokyo Kasei제 microcrystalline cellulose TLC plate를 사용하여 isopropyl alcohol:water=4:1의 용매조건으로 thin layer chromatography 하였으며 Merck제 Anilin phtalate spray reagent로 분무하여 100°C에서 5분간 가온 발색 하였다.

Sapogenin의 검색

기질 사포닌을 산이나 효소로 가수분해시킴으로써 생성되는 aglycon 즉 sapogenin을 검색하기 위해 전보의 사포닌 분리 방법중 에틸층을 별도로 감압 농축시

킨 후 소량의 아세톤에 용해시켰다. 이를 Merck제 silica gel 60 TLC plate에 spot하여 aceton:ether=1:1 용액으로 ascending chromatography하였으며 10% H₂SO₄로 분무하여 130°C에서 5분간 가온 발색시켰는데 이 때 사용한 standard aglycon은 protopanaxadiol, protopanaxatriol, oleanolic acid이었다.

결과 및 고찰

선택적 Ginsenoside 전환의 정량적 확인

*Rhizopus japonicus*의 한 균주가 생산하는 효소가 인삼 사포닌중 다른 ginsenoside 함량에는 아무런 변화없이 ginsenoside Rb₁ 만을 ginsenoside Rd로 전환시킨다는 사실을 전보에서 TLC densitogram과 HPLC로 확인을 하였다. 따라서 이러한 선택적 전환을 HPLC를 이용하여 정량적으로 확인하기 위해 total saponin과 ginsenoside-Rb group saponin을 기질로 하여 *Rhizopus japonicus*의 효소를 40°C에서 14시간 농도별로 처리한 후 전보의 방법에 의해 효소전환된 사포닌을 분리하였다. 그 결과로 얻은 HPLC chromatogram으로 부터 각 ginsenoside 함량변화를 정량해본 결과 Table I 과 같이 total saponin이나 ginsenoside-Rb group saponin의 경우 공히 ginsenoside Rb₁ 만이 효소의 농도와 비례적으로 ginsenoside Rd로 정확하게 전환됨을 정량적으로 확인하였다. 즉 각 ginsenoside 함량변화를 분석한 결과에서 total saponin을 기질로 했을 경우 ginsenoside Rb₁의 함량이 효소 무처리구에서 216 µg이었던 것이 Table II와 같이 0.8 mg/ml의 효소처리구에서

Table I. Change of ginsenoside amount in ginseng saponin by enzymatic conversion.

Ginsenosides	Total saponin				Ginsenoside-Rb group saponin			
	Enzyme(mg/ml)				Enzyme(mg/ml)			
	0	0.8	2.0	4.0	0	1.2	2.5	5.0
Ginsenoside-Ro	25	25	25	25(µg)	39	39	39	39(µg)
-Ra	9	9	9	9	38	38	39	38
-Rb ₁	216	87	44	38	291	118	78	56
-Rb ₂	72	72	72	72	114	114	115	114
-Rc	90	90	91	90	41	41	42	41
-Rd	40	147	183	190	6	154	186	208
-Re	78	78	78	78	5	5	5	5
-Rf	11	11	11	11	0	0	0	0
-Rg ₁	44	44	44	44	1	1	1	1
-Rg ₂	8	8	9	8	0	0	0	0
Total	593	571	566	565	535	510	505	502

Table II. Conversion rate of ginsenoside-Rd from ginsenoside-Rb₁ in total saponin by enzymatic treatment.

	Enzyme(mg/ml)			
	0	0.8	2.0	4.0
Ginsenoside Rb ₁				
Amount before enzyme treatment	216	87	44	38(μ g)
Decreased amount after treatment	0	129	172	178
Ginsenoside Rd				
Amount before enzyme treatment	40	147	183	190
Increased amount after treatment	0	107	143	150
Released Glucose (DNS method)		20.4	26.8	27.8
Decrease rate of ginsenoside Rb ₁	100	40.3	20.4	17.5(%)
Increase rate of ginsenoside Rd	100	367.5	457.5	475.0

Table III. Conversion rate of ginsenoside-Rd from ginsenoside-Rb₁ in ginsenoside-Rb group saponin by enzymatic treatment

	Enzyme(mg/ml)			
	0	1.2	2.5	5.0
Ginsenoside Rb ₁				
Amount before enzyme treatment	291	118	78	56(μ g)
Decreased amount after treatment	0	173	213	235
Ginsenoside Rd				
Amount before enzyme treatment	6	154	186	208
Increased amount after treatment	0	148	180	202
Released Glucose (DNS method)		24.5	32.0	34.0
Decrease rate of ginsenoside Rb ₁	100	40.5	26.8	19.2(%)
Increase rate of ginsenoside Rd	100	2567	3100	3467

87 μ g으로 2.0 mg/ml 처리구에서 44 μ g으로, 4.0 mg/ml 처리로써는 38 μ g까지 감소하였다. 반면에 ginsenoside Rd의 함량은 효소 무처리구에서 40 μ g이던 것이 효소 사용량이 증가함에 따라 147, 183, 190 μ g으로 ginsenoside Rb₁의 감소량에 비례해서 점차 증가되었다.

또한 ginsenoside-Rb group saponin을 기질로 사용했을 경우에도 Table III과 같이 ginsenoside-Rb₁의 함량이 291 μ g에서부터 118, 78, 56 μ g까지 그 함량이 감소하는 반면에 ginsenoside Rd는 효소 무처리구에서 6 μ g이던 것이 154, 186, 208 μ g으로 점차 비례적으로 증가되었다. 그러나 ginsenoside Rb₁ 및 ginsenoside Rd 이외의 다른 ginsenoside 함량은 효소 처리전의 함량과 전혀 변화가 없었으며, 각 ginsenoside 함량의 합계는 ginsenoside Rb₁이 전환되면서 가수분해되어가는 1 분자씩의 포도당량 만큼만 감소되었다.

이 결과로 미루어 보아 ginsenoside Rb₁의 감소된 양이 ginsenoside Rd의 증가량과 유리당으로 측정된

포도당의 양을 합산한 함량과 거의 유사한 함량수치이므로 ginsenoside Rb₁구조내에서 1 분자의 포도당만 가수분해되어 ginsenoside Rd로 전환되었으며 ginsenoside Rd가 계속해서 가수분해되지 않았다는 것을 확인할 수 있었다. 한편 ginsenoside Rd의 전환율은 total saponin의 경우 4.8배, ginsenoside-Rb group saponin의 경우는 34.7배나 증가되어 인삼 사포닌 중 그 함량이 가장 많은 ginsenoside Rb₁을 약효면에서 보다 우수한 ginsenoside Rd만으로 대량 선택 전환할 수 있는 선택적 효소전환 방법을 개발했다고 생각되어진다.

사포닌의 산 가수분해

본 효소의 선택적 ginsenoside 전환에 반해서 산 처리시 각 ginsenoside pattern이 어떻게 변화하는가를 조사하기 위하여 total saponin을 pH 1.0에서 10.0까지 각 pH별로 40°C에서 14시간 처리시킨 후 TLC와 HPLC로 그 변화된 ginsenoside pattern을 측정하였다. Fig. 1의 TLC chromatogram 결과에서 pH 3.0 이상의 처리

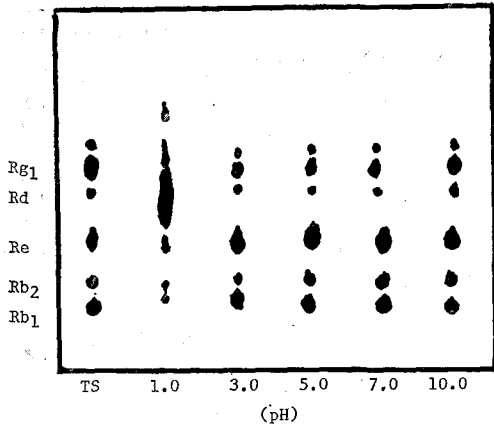


Fig. 1. TLC chromatogram of total saponin after acidic hydrolysis. TS: total saponin.

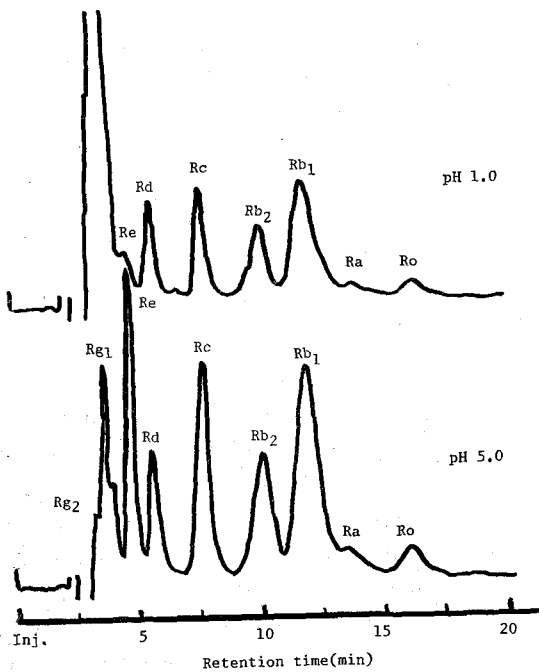


Fig. 2. HPLC chromatogram of total saponin after acidic hydrolysis.

구에서는 ginsenoside pattern 상에 별다른 변화가 없었으나 pH 1.0 처리구에서는 대부분의 ginsenoside가 선택성이 없이 부분별하게 가수분해되었음을 알 수 있었으며, 또한 Fig. 2의 HPLC의 chromatogram에서도 pH 1.0 처리구에서는 대부분의 ginsenoside가 비선택적으로 가수분해되었음이 확인되었고 그 중에서도 ginsenoside Re가 가장 많이 가수분해 되었음을 알 수 있었다. 이

결과로 미루어보아 효소분해 방법이 아닌 산 분해 방법은 선택적 ginsenoside 전환이 불가능함을 알 수 있었다.

당의 확인

본 효소를 사포닌에 처리했을 경우 사포닌 구조에 결합되어 있는 당 중에 glucose 이외의 당이 가수분해되어 유리되어 나올 수 있는가의 여부를 조사하기 위하여 total saponin 및 ginsenoside-Rb group saponin을 기질로 하여 농도별로 효소를 처리시킨 후 전보의 방

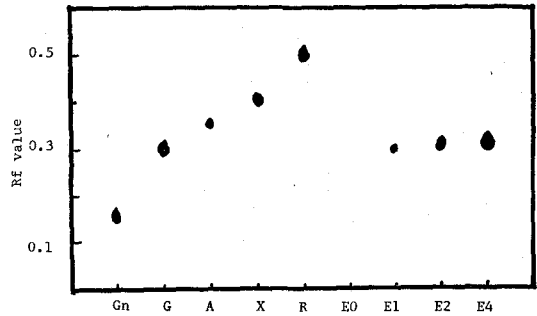


Fig. 3. TLC chromatogram of released sugar from total saponin by enzymatic hydrolysis. Gn: gentibiose, G: β -glucose, A: arabinose, X: xylose, R: rhamnose, E₀: treated without enzyme, E₁: treated with enzyme (0.8 mg/ml), E₂: treated with enzyme (2.0 mg/ml), E₄: treated with enzyme (4.0 mg/ml)

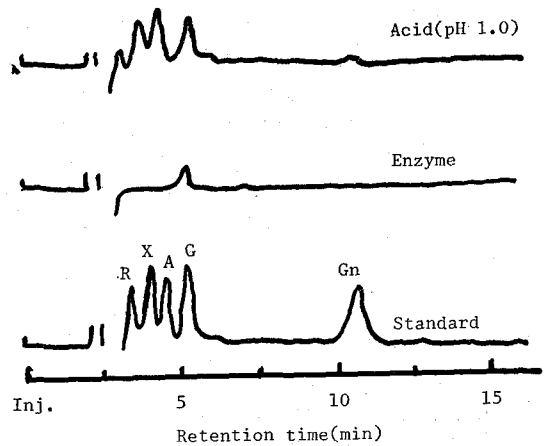


Fig. 4. HPLC chromatograms of released sugars from total saponin by enzymatic or acidic hydrolysis. R: rhamnose, X: xylose, A: arabinose, G: glucose, Gn: gentibiose

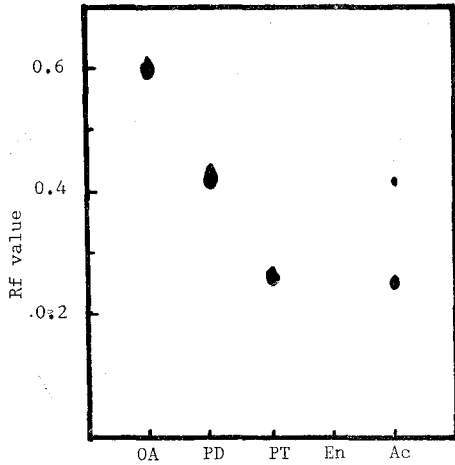


Fig. 5. TLC chromatogram of released aglycon from total saponin by enzymatic hydrolysis. OA: oleanolic acid, PD: protopanaxadiol, PT: protopanaxatriol, En: enzyme hydrolysis, Ac: acid hydrolysis (pH 1.0)

법에 의해 가수분해된 당을 분리 정제하여 분석하였으며 그 결과 Fig. 3의 TLC결과 및 Fig. 4의 HPLC 결과에서 보는 바와 같이 포도당이외의 당은 전혀 검출되지 않았음을 알았다(ginsenoside-Rb group saponin의 경우도 같은 결과이었으므로 total saponin 처리구만 제시). 이러한 결과들로 미루어 보아 본 효소는 ginsenoside Rb₁이외의 ginsenoside들은 전혀 분해시키지 않았음을 확인할 수 있었고 특히 ginsenoside Rb₁의 경우에도 C-20위치에서 포도당의 β-1, 6 결합인 gentiobiose 단위로는 분해되지 않고 1분자의 포도당 단이 가수분해 된다는 것을 간접적으로 추정할 수 있었다.

Sapogenin의 확인

본 효소를 사포닌에 처리시켰을 경우 각 ginsenoside의 모든 결합당이 순차적으로 가수분해되어 aglycon인 sapogenin 구조까지 가수분해되지 않는가를 검색하기 위하여 전보의 방법으로 추출한 에틸층을 TLC로 분석하였으며, 그 결과는 Fig. 5에서와 같이 산 처리구는 결합당이 모두 분해되어 protopanaxadiol 및 protopanaxatriol의 sapogenin이 검출된 결과에 반해서 효소 처리구는 어느 sapogenin도 전혀 검출되지 않았다. 이로 미루어보아 인삼 사포닌을 산이나 효소로 가수분해하면 aglycon 구조까지 분해된다는 Shibata등(1962, 1966)의 보고나 Yosioka 등(1972)의 보고들과 비교해 보면 본 효소는 ginsenoside Rb₁의 C-20 위치의 1분자

의 포도당만 가수분해하여 ginsenoside Rd 만으로 특이적 전환시키는 효소라는 것을 알 수 있다.

적 요

*Rhizopus japonicus*의 한 균주가 생산하는 효소에 의해 인삼 사포닌의 ginsenoside 중 조성비율이 가장 큰 ginsenoside Rb₁을 약리 효능면에서 보다 우수한 ginsenoside Rd로 선택적으로 전환할 수 있음을 TLC 및 HPLC로 정량적으로 확인하였다. Total saponin을 기질로 사용하였을 경우 ginsenoside Rb₁은 그 함량의 82.5%까지 ginsenoside Rd로 전환되어 ginsenoside Rd의 함량을 원래 함량에 비해 4.75배까지 증가시킬 수 있었으며, ginsenoside-Rb group saponin 기질의 경우는 80.8%의 ginsenoside Rb₁이 ginsenoside Rd로 전환되어 ginsenoside Rd의 함량을 34.7배까지 처리효소의 농도에 비례해서 증가시킬 수 있었다. 한편 다른 ginsenoside 함량변화 없이 오직 ginsenoside Rb₁에서 ginsenoside Rd만으로 선택적 전환을 한다는 사실이 당이나 sapogenin의 검출로도 증명되었다.

문 헌

Bae, H.W. (1975): *Abstracts of Korean Ginseng Studies*, The Research Institute of Monopoly, Republic of Korea, 95-217.

Heu, I. (1985): *Abstract of Korean Ginseng Studies (1981-1983)*, *World-Wide Collected Bibliography*, Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, 11: 145-264.

Hiai, S., Yokoyama, H., Oura, H. and Yano, S. (1979): Adrenocorticotropin and corticosterone secretion by ginseng saponin. *Endocrino.* 26:661-665.

Hiai, S., Yokoyama, H. and Oura, H. (1980): Stimulation of pituitary-adrenocortical system by ginseng saponin. *Proceeding of the 3rd International Ginseng Symposium*, Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, pp.77-80.

Kaku, T., Miyata, T., Sakai, I. and Kinoshita, A. (1975): Chemico-pharmacological studies on sponin of *Panax*. *Arzneimittel-Forschung* 25:539-547.

Oura, H., Hiai, S. and Odaka, Y. (1975): Studies on the biomedical action of ginseng saponin (1). *Pur-*

- ification from ginseng extract of the active component stimulating serum protein biosynthesis. *J. Biochem.* **77**: 1057-1065.
- Shibata, S., Fujita, M. and Iokawa, H. (1962): The structure of panaxadiol. A saponin of ginseng. *Tetrahedron Lett.* **10**:419-422.
- Shibata, S., Ando, T. and Tanaka, O. (1966): Chemical studies on oriental plant drugs. XVII. Pro-sapogenin of the ginseng saponin (ginsenoside-Rb₁, Rb₂ and Rc). *Chem. Pharm. Bull.* **14**:1157-1161.
- Yosioka, I., Imai, K and Kitagawa, I. (1972): Soil bacterial hydrolysis leading to genuine aglycon. V. On ginsenoside-Rb₁, Rb₂ and Rc of the ginseng root saponins. *Chem. Pharm. Bull.* **19**:2418-2421.
- 김상달, 서정훈 (1982): *Rhizopus* sp.가 생산하는 효소에 의한 인삼 saponin의 전환(제 1 보), Ginsenoside-Rb₁에서 Ginsenoside-Rd로의 전환확인. 한국산업미생물학회지 **10**:267-273.

<Received April 7, 1986; Accepted May 19, 1986>