

*Rhizopus japonicus*가 생산하는 인삼 Saponin 전환효소의 정제

김상달^{1*}·서정훈²

¹영남대학교 응용미생물학과 ²경북대학교 미생물학과

Purification of the Convertible Enzyme of Ginseng Saponin from *Rhizopus japonicus*

Kim, Sang-Dal¹ and Jung-Hwn Seu²

¹Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Kyongsan 713-749, Korea

²Department of Microbiology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

The enzyme produced by *Rhizopus japonicus* was able to convert selectively ginsenoside-Rb₁ which is the most abundant ginseng saponin, into ginsenoside-Rd which was known to be superior to ginsenoside-Rb₁ pharmaceutically. The convertible enzyme was purified homogeneous from wheat bran culture of *Rhizopus japonicus* by ammonium sulfate fractionation and column chromatography of TEAE-cellulose, DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-150, Sepharose 2B. Specific activity of the purified enzyme was increased to a bout 96 folds and yield was appeared to be 11% of culture extract. Evidence for homogeneity was obtained from polyacrylamide and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Molecular weight of the enzyme was estimated about 88,000 daltons by Sephadex G-150 gel filtration and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and it did not consist of any subunit.

인삼의 약효성분인 인삼 saponin은 14종의 ginsenoside로 구성되어 있으며 분리된 각 ginsenoside별로 그 약리작용이 연구되어 있다(1). 이 연구중 그 조성비율이 가장 큰 ginsenoside Rb₁에 비해 조성비율은 적으나 구조가 유사한 ginsenoside Rd가 약효면에서 훨씬 우수하다는 사실이 plasma corticosteron 증가효과(2, 3), 단백질 생합성효과(4), 쥐의 학습효과증진(5) 등 많은 연구들에 의해 밝혀져 있다.

*Rhizopus japonicus*의 효소에 의해 ginsenoside Rb₁ 구조의 C-20위치의 β -1,6결합 glucose 1분자만을 가수분해하여 약효가 우수한 ginsenoside Rd로 선택적으로 전환시킬 수 있다는 사실을 여러가지 방법으로 확인한 바 있는데(6, 7) 본보에서는 *Rhizopus japonicus*의 고형 배양물로부터 인삼 saponin 전환효소를 순수하게 정제하고 그 분자량을 측정하여 보고한다.

재료 및 방법

균주 및 조효소 조제

부패인삼에서 분리선발된 인삼 saponin 전환효소 생산균주 *Rhizopus japonicus*를 사용하였다(6). 효소생산은 wheat bran 배지를 사용하였으며 30°C에서 5일간 배양한 후 5배의 M/100 acetate buffer (pH 5.0)로 4°C에서 5시간 추출하고 그 원침상정액에 ammonium sulfate 완전포화로 침전시켰다.

효소활성도 측정

기질은 전보의 방법(6)으로 얻은 인삼 saponin중 ginsenoside-Rb group saponin을 사용하였으며 40°C에서 12시간 반응시킨 후 dinitrosalicylic acid(DNS) 발색법(8)으로 측정하였고 glucose로 작성한 calibration curve로 환산하여 시간당 1 μ mol의 glucose 생성 효소량을 1 unit로 했다.

Key words: *Rhizopus japonicus*, ginseng saponin, ginsenoside-Rd, enzymatic conversion

* Corresponding author

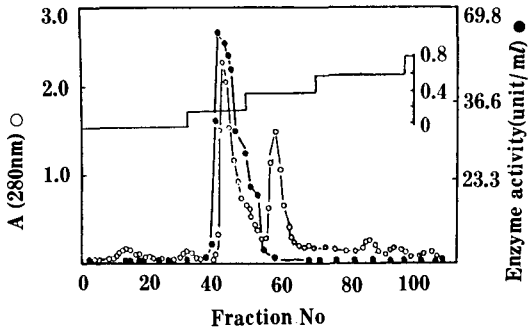


Fig. 1. Column chromatography of the enzyme on TEAE-cellulose.

Elution was carried out with a stepwise NaCl gradient (0 to 0.8M) in 70mM Tris-HCl buffer (pH 8.8): column 2.5 × 50 cm, flow rate 40 ml/hr, fraction 13 ml/tube.

단백질 정량

파장 280 nm에서 흡광도를 측정하고 bovine serum albumin을 사용한 standard curve로 환산하여 단백질의 양으로 나타내었다.

Gel electrophoresis

Polyacrylamide disc gel electrophoresis 는 Davis 법(9)에 의해 7.5% polyacrylamide gel로 pH 8.3에서 행하였다. 영동조건은 gel당 2mA로 실온에서 2시간 영동시켰으며 0.5% amido black 10B로 염색하고 acetic acid로 탈색했다.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis는 Weber와 Osborn의 방법(10)에 의해 정제효소단백과 표준단백을 SDS와 mercaptoethanol 함유 phosphate buffer(pH 7.0)에 용해시켜 37°C에서 4시간 incubation시킨 후 gel당 8mA로 영동하고 coomassie blue로 염색했다.

분자량 추정

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis와 gel filtration으로 추정했다. Gel filtration은 Andrew 방법(11)에 의해 phosphate buffer(pH 7.0)로 equilibration시킨 Sephadex G-150 column(1.2 × 140 cm)에서 행하였다.

결과 및 고찰

Ammonium sulfate fractionation

Dialysis된 조효소액을 분별침전법으로 조정제하기 위해 소정량의 (NH₄)₂SO₄를 용해하여 침전단백질을 모으고 그 상등액에 다시 소정포화농도의 (NH₄)₂

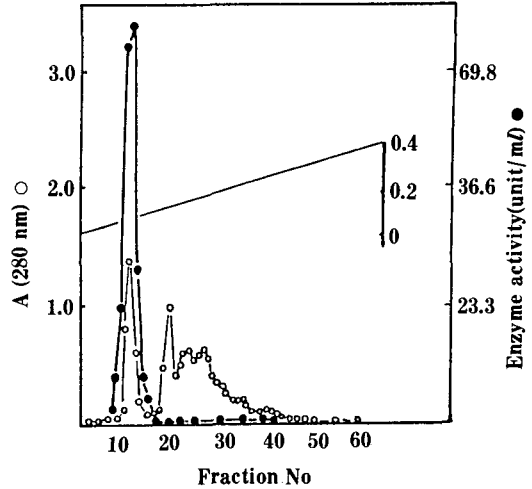


Fig. 2. Column chromatography of the enzyme on DEAE-Sephadex A-50.

Elution was carried out with a linear NaCl gradient (0 to 0.4M) in 70 mM Tris-HCl buffer (pH 8.4): column 2 × 38 cm, flow rate 25 ml/hr, fraction 12 ml/tube.

SO₄를 첨가하는 연속침전법으로 fractionation한 결과 ammonium sulfate 60% 포화와 90% 포화 사이의 침전단백질에서 가장 specific activity가 높았다. 따라서 (NH₄)₂SO₄ 100% 포화로 얻은 조효소액 120 ml에 (NH₄)₂SO₄를 60% 포화침전시킨 후 그 원심상등액에 90% 포화침전시킨 침전단백을 0.02M acetate buffer(pH 6.0)로 dialysis시켰다.

TEAE-cellulose chromatography

Dialysis한 상기의 부분정제효소액 54 ml를 pH 8.8 Tris-HCl buffer로 equilibration시킨 TEAE-cellulose column(2.5 × 50 cm)에 charge한 후 시간당 40 ml 유속으로 fraction당 13 ml씩 NaCl 농도를 0.8M까지 0.2M씩 stepwise로 증가시키며 elution시켰다. 그 결과 Fig.1과 같이 NaCl 0.2M elution 때에 모든 효소활성부분을 얻을 수 있었으며 약 절반 정도의 불순단백질을 제거할 수 있었다.

DEAE-Sephadex A-50 chromatography

TEAE-cellulose chromatography의 활성 fraction (No. 42~54) 189 ml를 Diafilter 05-T membrane을 사용한 ultrafiltration으로 약 5 ml까지 농축하여 pH 8.4 Tris-HCl buffer로 equilibration시킨 DEAE-Sephadex A-50 column(2 × 38 cm)에 charge하였다. 동일 buffer를 사용하여 NaCl 농도 0에서 0.4M까지 linear gradient로 증가시키며 시간당 25 ml, fraction당 12 ml씩 elution시켰다. 그 결과 Fig.2와 같

이 NaCl 농도 0.1 M 부근에서 1개의 활성 peak를 얻었으며 대부분의 비활성 단백질을 제거할 수 있었다.

Sephadex G-150에 의한 gel filtration

DEAE-Sephadex A-50 chromatography 의 활성 fraction (No. 9~14)을 3 ml로 ultrafiltration시킨 후 pH 7.0 phosphate buffer로 평형화한 Sephadex G-150 column (1.5×50 cm)에 charge하였으며 시간당 10 ml, fraction당 9 ml씩 elute하여서 Fig. 3과 같이 거의 정제된 peak를 얻을 수 있었다.

Sepharose 2B에 의한 gel filtration

1차 filtration으로 얻은 활성 fraction (No. 11~18)을 2 ml로 ultrafiltration하고 pH 7.0 phosphate buffer로 씻은 Sepharose 2B column (1.5×50 cm)에 charge한 후 시간당 5.5 ml fraction당 6 ml씩 elute시켰다. 그 결과 Fig. 4와 같이 효소활성도와 단백질의 peak가 대칭적으로 일치하는 순수하게 정제된 효소단백을 얻을 수 있었다.

이상의 각 정제과정을 요약한 Table 1에서 보는

바와 같이 최종회수율은 10.9%로, 효소 비활성도는 96배 정도로 증가할 수 있었다.

정제효소의 순도

정제된 효소가 순수한 단일단백질로 정제되었는가

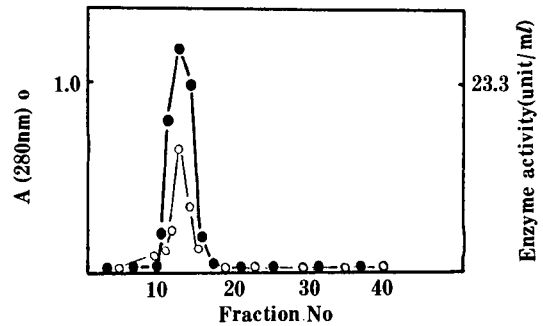


Fig. 4. Second gel filtration on Sepharose 2B.

The concentrated enzyme was filtered with 50 mM phosphate buffer (pH 7.0): 1.5 × 50 cm, 5.5 ml/hr, 6 ml/fraction.

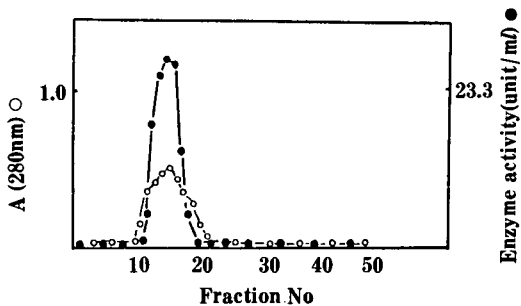


Fig. 3. First gel filtration on Sephadex G-150.

The concentrated enzyme was filtered with 50 mM phosphate buffer (pH 7.0): 1.5 × 50 cm, 10 ml/hr, 9 ml/fraction.

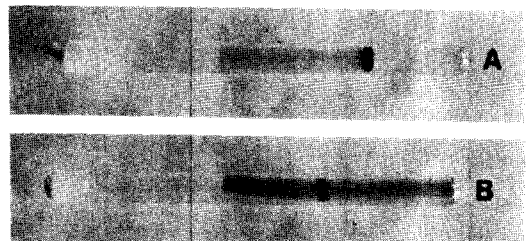


Fig. 5. Polyacrylamide disc gel electrophoresis of purified enzyme.

(A) 80 μg of enzyme was applied to a 7.5% polyacrylamide gel with 2mA per column for 2 hrs. (B) 50 μg of enzyme incubated with 1% SDS and 1% mercaptoethanol at 37 °C for 4 hrs was run under 8mA per column for 4 hrs. Protein were stained with 0.5% amido black 10B.

Table 1. Summary of the enzyme purification

Purification step	Total volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)
Crude extract	1040	9225	28132	3.0	100.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ , 1.0 sat'd	120	5688	27916	4.9	99.2
(NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.6-0.9 sat'd	54	935.3	25125	26.9	89.3
TEAE-cellulose	189	400.5	24622	61.5	87.5
DEAE-Sephadex A-50	78	62.1	11376	183.6	40.4
Sephadex G-150	75	30.0	6979	232.6	24.8
Sepharose 2B	33	10.5	3074	288.3	10.9

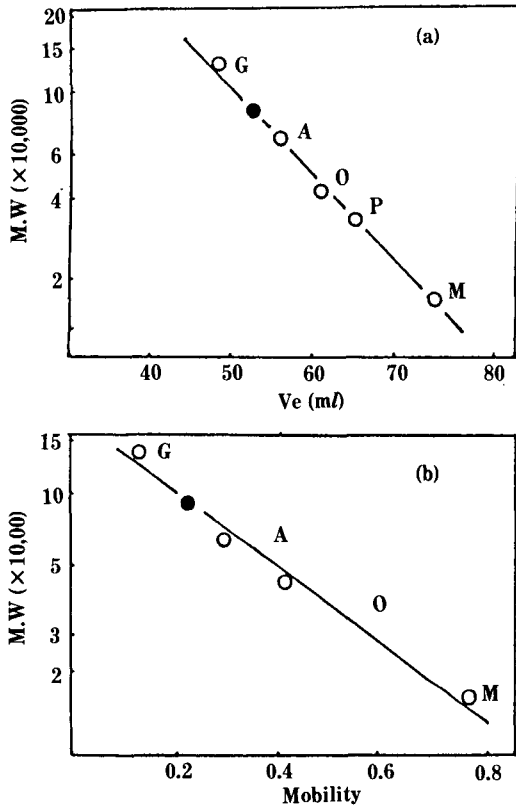


Fig. 6. Estimation of molecular weight by Sephadex G-150 gel filtration (a) and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (b).

G: β-galactosidase (130,000), A: bovine serum albumin (68,000), O: ovalbumin (45,000), P: pepsin (35,000), M: myoglobin (17,000).

를 조사하기 위해 polyacrylamide gel electrophoresis해 본 결과 Fig. 5와 같이 단일단백질이 분명하였으며 아울러 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis에 의해서도 역시 단일 band로 나타났으므로 본 효소는 monomer인 순수한 단일단백질이라고 생각된다.

분자량의 추정

정제된 효소의 분자량을 측정하기 위해 Sephadex G-150의 gel filtration과 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis로 추정해본 결과 Fig. 6과 같이 약 88,000 dalton 정도이었다.

Ginsenoside Rb₁ 구조중 C-20에 있는 β-1,6 결합의 glucose 1분자를 분해함으로써 ginsenoside Rd로 전환하는 본 효소의 성질과 비슷한 β-1,6-glucosidase 등의 분자량과 비교해 볼 수 있다. *Flavobacterium*

의 β-1,6-glucosidase가 분자량 59,000의 monomer 이고(12), 고양이 콩팥의 β-glucosidase가 분자량 32,000 이고(13), *Acinetobaoter*의 endo β-1,6-glucosidase가 50,000 정도이라는 보고(14) 등을 미루어 볼 때 다소 큰 분자량이라고 생각되어 지나 *Aspergillus oryzae*의 exo-β-glycosidase가 218,000 인 dimer 이고(15) *Humicola insolens*의 β-glucosidase가 250,000이라는 보고(16)보다는 훨씬 적은 분자량이라고 할 수 있다.

요 약

인삼 saponin중 그 조성비율이 가장 큰 ginsenoside Rb₁으로부터 약효성분이 가장 뛰어난 ginsenoside Rd로 선택적으로 전환시킬 수 있는 인삼 saponin 전환효소를 *Rhizopus japonicus*의 고체 배양물로부터 단일단백질로 순수하게 정제하였다. Ammonium sulfate fractionation, TEAE-cellulose, DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-150, Sepharose 2B column chromatography 등에 의해 순차적으로 정제하여 비활성도가 96배 증가되게, 회수율은 10.9%까지 정제할 수 있었으며 정제된 효소는 polyacrylamide 및 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis에 의해 subunit로 구성되어 있지 않는 monomer 단백질로 판단되었다. 한편 Sephadex G-150 gel filtration과 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis로 정제효소의 분자량을 추정해 본 결과 약 88,000 정도이었다.

참고문헌

1. Heu, I.: *Abstract of Korean Ginseng Studies*, KGTRI, 11, 145-264 (1985).
2. Hiai, S., H. Yokoyama, H. Oura and S. Yano: *Endocrinol.*, 26, 661-665 (1979).
3. Hiai, S., H. Yokoyama and H. Oura: *Proc. 3rd Int'l Ginseng Symposium*, KGTRI, 77-80 (1980).
4. Oura, H., S. Hiai and Y. Odaka: *J. Biochem.* 77, 1057-1065 (1975).
5. Kaku, T., T. Miyata, I. Sakai and A. Kinoshita: *Arzneimittel-Forschung*, 25, 539-547 (1975).
6. Kim, S.D. and J.H. Seu: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 10, 267-273 (1982).
7. Kim, S.D. and J.H. Seu: *Kor. J. Mycol.*, 14, 195-200 (1986).
8. Miller, G.L.: *Analytical Chemistry*, 31, 426 (1959).
9. Davis, B.J.: *Gel electrophoresis*, Ann. New York Acad. Sci., 121, 404-427 (1964).

10. Weber, A.K. and M. Osborn: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969).
11. Andrew, P.: *Biochem. J.*, **91**, 222-233 (1964).
12. Sano, K., A. Amemura and T. Harada: *Biochem. Biophys. Acta.*, **377**, 410-420 (1975).
13. Freese, A., R.O. Brady and A.E. Gal: *Arch. Biochem. Biophys.*, **201**, 363-368 (1980).
14. Kotohda, S., F. Suzuki and S.K. Sato: *Agr. Biol. Chem.*, **43**, 2029-2034 (1979).
15. Mega, T. and Y. Matsushima: *J. Biochem.*, **85**, 335-341 (1979).
16. Yoshioka, H. and S. Hayashida: *Agr. Biol. Chem.*, **44**, 1729 (1980).

(Received September 7, 1988)