

## 홍삼 물추출물이 Trypsin 활성에 미치는 영향

이종원 · 김나미 · 도재호<sup>#</sup>

KT&G 중앙연구원 인삼연구소  
(2004년 6월 19일 접수, 2004년 8월 24일 수리)

### Effect of Red Ginseng Water Extract on Trypsin Activity

Jong-Won Lee, Na-Mi Kim and Jae-Ho Do<sup>#</sup>

Ginseng Research Group, KT&G Central Research Institute, Daejeon 305-805, Korea  
(Received June 19, 2004, Accepted August 24, 2004)

**Abstract :** This study was carried out to investigate the effect of red ginseng water extract (RGWE) on trypsin activity. After extraction of fat soluble and saponin component from red ginseng powder by methyl alcohol, the residue was extracted with distilled water, and manufactured to water extract. The extract was dialyzed with different molecular cut off membrane. Trypsin activity demonstrated the highest level at the RGWE concentration of  $9 \times 10^{-2} \%$  in reaction mixture, and also increased to 15% at  $2.9 \times 10^{-3} \%$ . Km value was decreased and Vmax was increased in the present of red ginseng water extract. Red ginseng water extract was partially purified by dialysis, Bio-Gel P-10 and DEAE-cellulose column chromatography. The active fraction demonstrated positive reaction to ninhydrin, DNS and folin reaction.

**Key words :** Red ginseng, water extract, trypsin activity

## 서 론

수삼에는  $\alpha$ -amylase,<sup>1)</sup> invertase,<sup>2,3)</sup> phenolase<sup>4)</sup> 등의 효소는 존재하나 지방가수분해효소인 lipase는 함유되어 있지 않다고 보고되어 있다.<sup>4)</sup> 이들 효소들은 홍삼을 제조하는 과정에서 열처리에 의해 불활성화 되어 변성단백질로 존재하게 될 것이다. 인삼 사포닌은 adenylate 및 guanylate cyclase의 활동성에 대한 조절작용, 지방산 대사효소, 간 aniline hydroxylase, 효모의 해당과정 관련효소, alcohol dehydrogenase, 쥐의 뇌 aldehyde dehydrogenase, 소의 간 미토콘드리아 aldehyde dehydrogenase, 세균  $\alpha$ -amylase 활성에 영향을 미치는 것으로 보고되었다.<sup>5-12)</sup> 사포닌 이외의 인삼성분으로는 ethylacetate 분획 및 petroleum ether 분획이 토끼 간의 효소,<sup>13)</sup> ethanol extract가 쥐의 뇌 lactate dehydrogenase-5,<sup>14)</sup> 지용성 성분이 인체 암세포의 여러 가지 효소,<sup>15)</sup> 쥐의 간 glucokinase<sup>16)</sup> 활성에 미치는 영향 등이 보고되었으

나, 지용성 분획이나 사포닌 분획 이외의 물 추출물 분획이나 성분을 이용하여 효소활성 특히 trypsin의 활성에 미치는 영향에 대해서는 거의 보고된 바 없다.

Trypsin[EC 3.4.21.4]은 endopeptidase이며 활성중심에 seryl 잔기를 가지고 있는 serine protease로서 췌장에서 분비되는 중요한 단백질 분해효소중의 하나이다. Trypsin은 소, 사람, 돼지, 양, 칠면조, 닭발상어, 폐어, 새우, 누에나방 및 2종의 *Streptomyces* 등에서 분리되었다. Trypsin은 생체 내에서 비활성 상태인 trypsinogen으로 분비되며, 산이나 pepsin에 의해서 활성화되지 않고 trypsin, enteropeptidase 및 microbial proteases에 의해서 활성화된다. 활성화될 때 trypsinogen의 N-terminal에서 hexapeptide(Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys)가 떨어져 나가 trypsin으로 전환된다. 지금까지 알려진 단백질분해 효소 중에서 trypsin은 bovine insulin의  $\beta$  chain의 절단부위가 2개(Arg-Gly, Lys-Ala)로 가장 적은 절단부위를 가진 효소이다.<sup>17-19)</sup> 그리고 trypsin은 가수분해 및 소화효소이면서도 항염증효소제로서 기관지염, 혈전성 정맥염 등에 흡입 또는 경구로 투여되는 의약품으로 이용된다.<sup>20,21)</sup>

따라서 본 연구에서는 인삼성분 중에서 양적으로 가장 많은

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 042-866-5428; (팩스) 042-866-5419  
(E-mail) jhdo@ktng.com

비중을 차지하는 수용성 물질이 trypsin의 활성화에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 홍삼분말을 methyl alcohol로 추출하여 지용성 성분 및 대부분의 사포닌 성분을 제거한 다음 그 잔사에 정제수를 가하여 열탕함으로써 물 추출물을 조제하였다. 이 물 추출물이 trypsin 활성화에 미치는 영향을 조사하였으며 물 추출물을 부분 정제한 결과를 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 홍삼 물 추출물 분획의 조제

홍삼분말(2 mm sieve 통과 분말)을 methyl alcohol로 60°C에서 8시간씩 5회 환류추출하고 난 뒤 잔사에 증류수를 가하여 다시 60°C에서 5회 추출하였다. 물 추출액은 4°C에서 8,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상정액을 50°C 이하에서 51.5°Bx 가 되도록 감압농축하여 4°C에서 보관하면서 사용하였다.

### 2. 물 추출물의 투석

물 추출물의 부분정제를 위하여 투석막을 이용하여 4°C에서 1일 1회씩 3회 투석하였으며, 이 때 사용된 투석막(M.W. cut off 12,000)은 Sigma 회사(St. Louis, Missouri, USA) 및 분자량이 작은 물질을 분획하기 위한 투석막(M.W. 500~12,000)은 Spectrum Medical Industries, Inc. 회사(Houston, Texas, USA)제품을 사용하였다.

### 3. Trypsin 활성측정

인삼성분이 trypsin 활성화에 미치는 영향은 Nakadai 등의 방법을 이용하여 측정하였다.<sup>22)</sup> 즉 0.1 M phosphate buffer 용액 0.3 mL, 물 추출물 및 trypsin 용액 0.1 mL를 혼합하여 37°C에서 10분간 전처리하고 나서 1% hammarsten casein 용액 0.5 mL를 가하여 10분간 반응시킨 뒤 0.44 M trichloroacetic acid 1.0 mL를 가하여 반응을 정지시켰다. 30분간 반응액을 정지하여 단백질을 침전시키고 원심분리한 뒤 상정액을 취해서 0.55 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액과 2배 희석한 Folin 시약을 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시켜 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 활성비교는 (S-C/C-TC)×100과 같은 방법으로 계산하여 인삼성분의 첨가유무에 따른 trypsin 활성을 상대비교 하였다. 여기에서 S는 trypsin과 홍삼 물추출물을 혼합했을 때, C는 trypsin 및 TC는 trypsin을 첨가하지 않았을 때의 활성을 나타낸다.

### 4. Bio-Gel P-10 column chromatography

물 추출물 중에서 투석막을 이용하여 분자량 500~12,000

사이의 분획을 얻어 Bio-Gel P-10 column(1.2×77cm)에서 증류수를 전개용매로 하여 10 mL/hr의 유속으로 2 mL씩 분취한 후 254 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 5. DEAE-cellulose column chromatography

Bio-Gel P-10 column chromatography에서 얻은 활성분획을 다시 DEAE-cellulose column(1.0×10cm)에서 0.01 M Tris-HCl(pH 7.2) buffer 용액에 NaCl 용액(0~0.2 M)을 이용한 농도 구배법으로 20 mL/hr의 유속으로 2 mL씩 분취한 후 254 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. Trypsin 활성화에 미치는 홍삼 물 추출물의 영향

Table 1에서 보듯이 분자량 약 1,000 이하의 분획은 약 10% 정도, 그 외의 분획은 30% 이상의 trypsin 활성을 촉진시켰다. 물 추출물 중에서 trypsin의 활성을 가장 크게 증가시킨 분자량 1,000~12,000 사이 물질 분획의 농도에 따른 trypsin 활성화에 대한 영향을 조사한 결과는 Table 2와 같이 2.9×10<sup>-3</sup>%에서도 약 15% 정도 trypsin 활성을 증가시켰으며, 물 추출물의 농도가 높아질수록 trypsin의 활성도 증가하다가 최종농도가 0.90 mg/mL(0.09%)일 때 trypsin의 활성이 가장 크게 나타났으며 그 이상의 농도에서는 급격히 낮아졌다. 이와 같은 결과는 물질의 농도에 있어서 차이는 있지만 사포닌 성분이나 지용성 성분이 효소활성에 미치는 영향을 조사한 결과와 유사한 경향이였다.<sup>6,8,9,11,14,16)</sup>

**Table 1.** Effect on trypsin activity by various fractions from red ginseng water extract

Fractions	Relative activity(%)
None	100.0
Water extract	131.0
M.W. over 12,000	134.0
M.W. 1,000~12,000	135.1
M.W. below 1,000	111.7

Final concentration of each fraction in the reaction mixture was mg/mL.

**Table 2.** Effect on trypsin activity by concentration of the M.W. 1,000~12,000 fraction from water extract

Final concentrations (μg/mL)	Relative activity (%)
0	100.0
29	115.0
57	124.8
113	133.6
225	135.4
450	136.6
900	152.1
1,800	117.6

2. 기질과의 친화성

물 추출물 분획이 trypsin과 기질인 casein과 반응할 때 기질 친화력에 미치는 영향을 조사하기 위하여 분자량 1,000~12,000 사이의 물 추출물 분획을 사용하여 casein 농도와 반응 속도에 대한 double reciprocal plot은 Fig. 1과 같으며, Table 3에 나타난 바와 같이 홍삼 물 추출물 분획은 Km값을 감소시키고 Vmax를 증가시켰다. Km값은 물 추출물의 존재하에서 약 30% 정도가 낮아졌으며 Vmax는 약 40%정도 증가시켰으며 기질에 대한 친화력을 나타내는 Vmax/Km은 약 2배 정도 증가하여 trypsin이 casein과 반응할 때 기질 친화력을 높여 주는 것이 확인되었다. 이와 같은 결과는 김 등<sup>11)</sup>이 인삼사포닌이 소의 간 미토콘드리아 aldehyde dehydrogenase 활성에 미치는 연구와 유사한 형태의 결과라고 사료된다. 지금까지 인삼 성분 특히 사포닌성분과 효소활성과의 관계에 있어서, 대부분의 효소는 인삼 사포닌 분획의 농도가 10<sup>-5</sup>% 내외일 때 최고의 반응속도를 나타내며, 이와 같은 비특이성은 화학적 특성이 아니라 인삼 사포닌은 계면활성과 같은 물리적 특성에 기인될 가능성이 크다고 하였다.<sup>4)</sup> 그러나 본 실험에서는 홍삼

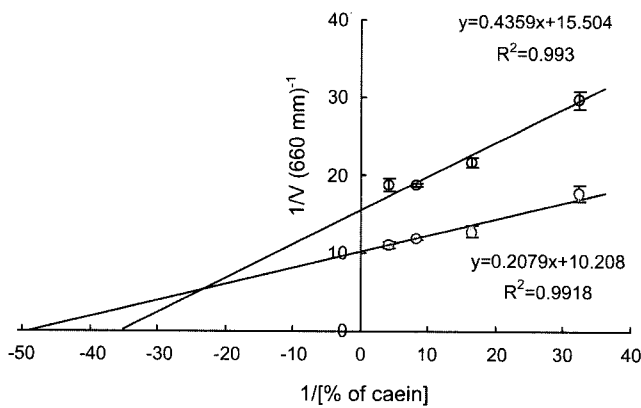


Fig. 1. Double reciprocal plots of casein hydrolysis by trypsin in the presence or absence of red ginseng water extract. The reaction mixture was consisting of 0.3 mL of 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.4), 0.1 mL of red ginseng water extract solution (2 mg/mL), 0.1 mL of trypsin solution (5 mg/mL) and 0.5 mL of the various concentration of hammarsten casein. The enzyme reaction was carried out at 37°C for 10 min. ○—○; without water extract, ●—●; with water extract.

Table 3. Activation of trypsin by red ginseng water extract

Red ginseng water extract* (μg/mL)	Km (% casein)	Vmax (Abs at 660 nm)	Vmax/Km
0	0.029(100.0)	0.065(100.0)	2.24(100.0)
200	0.020( 70.0)	0.090(138.5)	4.50(200.9)

\*Final concentration in reaction mixture

에 함유되어 있는 사포닌 성분이나 지용성 분획을 제거한 물 추출물에서 trypsin 활성을 증가시켰기 때문에 이것은 사포닌의 효과와 같은 물리적인 특성이 아니라 어떠한 효소에 대하여 특이적으로 저해를 하는 inhibitor가 존재하듯이 activator로서 작용했을 가능성도 배제할 수 없다고 사료된다. Activators중에서도 activator의 부재하에서는 매우 제한된 활성을 나타내는 금속류의 경우와 같은 essential activator가 아니라 activator가 효소나 기질 또는 두 가지 모두에 결합하여 효소 활성을 증가시키는 non-essential activator로서<sup>17)</sup> 반응계에 영향을 미칠 수 있다고 사료된다.

3. 물 추출물의 부분정제

가. Bio-Gel P-10 column chromatography 분획물의 특성  
홍삼분말을 methyl alcohol로 5회 추출하고 난 뒤 그 잔사에 다시 증류수를 가하여 5회 추출하여 추출액을 농축하였으며, 투석막을 사용하여 분자량 500~12,000 사이의 분획을 Bio-Gel P-10 column chromatography에 의해 분리하였을 때 분리 패턴은 Fig. 2와 같다. 여기에서 peak의 상태를 고려하여 분획 I~V로 구분하여 일정한 부피로 농축하여 여러 가지 성질 및 trypsin 활성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 분획 III이 분획 II보다 420 nm에서의 흡광도, DNS 양성물질, folin 양성물질의 양이 훨씬 컸으나 trypsin 활성에 미치는 영향은 분획 II에 비해서 낮았다. 그 외 분획 I, IV 및 V는 trypsin 활성에 영향을 미치지 않았다.

나. DEAE-cellulose column chromatography 분획물의 특성  
Bio-Gel P-10 column chromatography에 의해 분획한

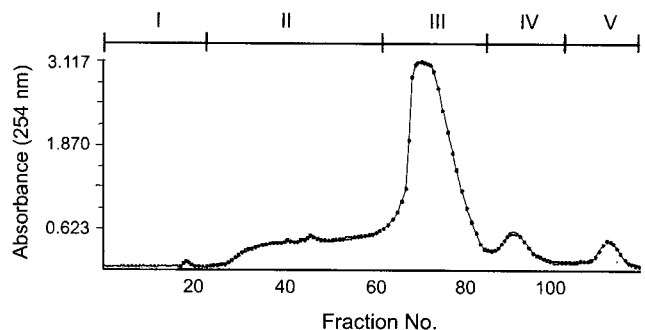


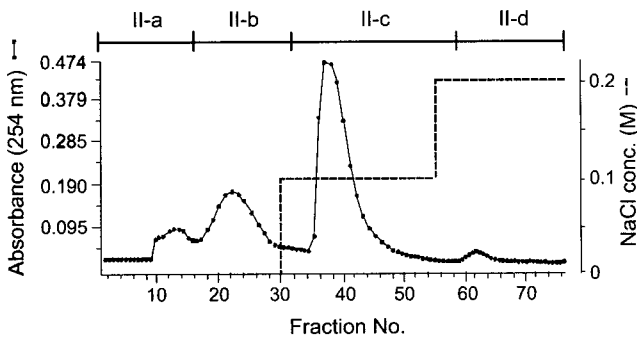
Fig. 2. Bio-Gel P-10 column chromatography of 80% methanol soluble part from water extract containing compounds M.W. 500~12,000. Water extract fraction was obtained from red ginseng powder. Red ginseng powder was extracted with methanol by 5 times, and then residue was extracted with distilled water by 5 times. The extract was evaporated and dialyzed against distilled water. The column(1.2×77cm) was eluted with distilled water. Fractions of 2 mL were collected at a flow rate of 10 mL/hr and absorbance of aliquots were determined at 254 nm.

**Table 4.** Effect on trypsin activity of fractions obtained by Bio-Gel P-10 column chromatography

Fractions	Absorbance (420 nm)	Ninhydrin reaction	DNS reaction (540 nm)	Folin reaction (750 nm)	Relative trypsin activity (%)
I	0.022	-	0.035	0.032	100.9
II	0.539	+	0.255	0.442	119.1
III	1.325	+	2.316	1.761	108.6
IV	0.090	-	0.039	0.112	96.3
V	0.036	-	0.035	0.055	102.9

**Table 5.** Effect on trypsin activity of fractions obtained by DEAE-cellulose column chromatography

Fractions	Absorbance (420 nm)	Ninhydrin reaction	DNS reaction (540 nm)	Folin reaction (750 nm)	Relative trypsin activity (%)
II-a	0.028	+	0.178	1.079	116.5
II-b	0.061	-	0.127	1.097	108.6
II-c	0.158	-	0.084	1.308	93.7
II-d	0.032	-	0.030	0.659	88.3



**Fig. 3.** DEAE-cellulose column chromatography of active fraction II. The column(1.0×10cm) was charged with active substance obtained from Bio-Gel P-10 column chromatography and eluted with a stepwise of NaCl solution from 0.0 M to 0.2 M in 0.01 M Tris-HCl buffer solution (pH 7.2). Flow rate was adjusted to 20 mL/hr and every 2 mL was fractionated. Each fraction was subjected to UV absorption determination.

trypsin 활성화 분획 II를 모아서 DEAE-cellulose column chromatography한 결과는 Fig. 3과 같이 4개의 peak(II-a, b, c 및 d)를 얻었다. 이들 분획에 대해서도 여러 가지 성질 및 trypsin 활성화에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 5와 같다. 4개의 분획 중에서 II-a 분획만이 ninhydrin에 대해서 양성반응을 나타내었고 trypsin 활성도 가장 많이 촉진시켰다. 이상의 결과에서 홍삼 물 추출물 분획 중에서 trypsin 활성을 촉진시키는 물질은 DEAE-cellulose column chromatography에서 흡착되지 않으며 ninhydrin 반응에 양성을 띄는 것으로 보아 합질소 화합물이라고 판단된다.

## 요 약

홍삼 물 추출물이 효소활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 먼저 홍삼분말에 methyl alcohol을 가하여 지용성 성분

과 사포닌 성분을 추출하여 제거하였다. 그 잔사에 정제수를 가하여 추출한 뒤 물 추출물을 제조하였고, 투석막을 이용하여 분자량 크기별로 분획한 뒤 trypsin의 활성화에 미치는 영향을 조사하였다. 몇 가지 분획 중에서 분자량 1,000~12,000 사이의 분획이 trypsin 활성을 가장 강하게 증가시켰다. 분자량 1,000~12,000 사이의 분획을 여러 가지 농도별로 첨가하여 trypsin 활성화에 미치는 영향을 조사한 결과  $2.9 \times 10^{-3}\%$ 에서 15% 정도 촉진되었으며, 농도가 높아질수록 trypsin 활성도 증가하여  $9 \times 10^{-2}\%$ 에서 최고의 활성을 보이다가 그 이상의 농도에서는 감소하였다. Trypsin의 casein 분해에 있어서 물 추출물은 Km 값을 낮게하고 Vmax 값은 증가시켰다. 물 추출물을 부분 정제하여 몇 가지 특성을 조사한 결과 ninhydrin, DNS 및 Folin시약에 양성반응을 나타내는 것으로 보아 합질소 화합물이라고 판단된다.

## 인용문헌

- Kim, B. M., Park, S. H. and Chung, D. S. : Studies on  $\alpha$ -amylase from Korean ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer)-Separation of crude ginseng  $\alpha$ -amylase and its some properties. *J. Seoul Woman's College*, vol. VIII, 337 (1979).
- Kim, B. M. : Studies on invertase from Korean ginseng, *Panax ginseng* C. A. Meyer I. Separation and properties of crude invertase. *Korean J. Food Sci. Technol.* 12, 1-5 (1980).
- Kim, B. M. and Chae, S. K. : Studies on invertase from Korean ginseng, *Panax ginseng* C.A. Meyer II. Purification and physico-chemical properties of ginseng invertase. *Korean J. Food Sci. Technol.* 14, 1-5 (1982).
- 朱忠魯 : 紅蓼의 神秘. 문경출판사, 대전 (1995).
- Seo, K. L., Moon, J. G., Cha, M. K., Lee, K. S., Lee, S. Y., Lee, Y. Y. and Park, I. W. : The action mechanism of several ginsenosides in their regulatory action on the activities of

- adenylate cyclase and guanylate cyclase. *Korean J. Ginseng Sci.* **7**, 148-155 (1983).
6. Rhee, Y. O. and Jung, N. P. : Effect of ginseng extracts on the activities of fatty acid metabolism enzymes. *Korean J. Ginseng Sci.* **9**, 112-118 (1985).
  7. Huh, K., Lee, S. I., Park, J. M., Lim, S. K. and Choi, C. W. : Effect of ginseng butanol fraction on ethanol-induced hepatic aniline hydroxylase activity in rat. *Korean J. Ginseng Sci.* **9**, 135-145 (1985).
  8. Kang, C. H. and Joo, C. N. : The effect of ginseng saponin fraction on several glycolytic enzymes of yeast cell. *Korean J. Ginseng Sci.* **10**, 200-208 (1986).
  9. Kim, J. W. and Joo, C. N. : The effect of ginseng saponin on yeast alcohol dehydrogenase. *Korean J. Ginseng Sci.* **10**, 148-155 (1986).
  10. Lee, Y. D. and Joo, C. N. : The effect of saponins of *Panax ginseng* C. A. Meyer on brain aldehyde dehydrogenase activity of ethanol administrated rat. *Korean J. Ginseng Sci.* **18**, 1-9 (1994).
  11. Kim, S. J., Lee, H. B. and Joo, C. N. : Effect of ginsenosides on bovine liver mitochondria aldehyde dehydrogenase activity. *Korean J. Ginseng Sci.* **18**, 10-16 (1994).
  12. Do, J. H., Kim, S. D. and Joo, H. K. : Effect of ginseng saponin on Bacterial  $\alpha$ -amylase activity. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **13**, 7-11 (1985).
  13. Kwon, Y. E. and Jung, N. P. : Effect of ethyl acetate fraction and petroleum ether fraction of ginseng on the activities of several enzymes in rabbit liver. *Korean J. Ginseng Sci.* **8**, 15-21 (1985).
  14. Park, Y. S., Kim, T. U. and Cho, Y. D. : Effect of ginseng ethanol extract on lactate dehydrogenase-5 in rat brain with age. *Korean J. Ginseng Sci.* **9**, 72-85 (1985).
  15. Hwang, W. I. and Oh, S. K. : Effects of petroleum ether extract of ginseng root on some enzyme activity in human colon cancer cells. *Korean J. Ginseng Sci.* **10**, 27-35 (1986).
  16. Joo, C. N. and Kim, S. J. : Effect of ginseng components(ginsenosides and fat soluble fraction) on rat liver glucokinase activity. *Korean J. Ginseng Sci.* **18**, 17-24 (1994).
  17. Malcolm, D. and Edwin, C. W. : Enzymes. 3rd ed. Longman Group Limited, London (1979).
  18. Gerald, R. : Enzymes in food processing. 2nd ed. Academic Press, New York (1975).
  19. Belitz, H. D. and Grosch, W. : Food chemistry. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg (1987).
  20. 馬場 茂明, 和田 博, 北村 元任, 奥田 潤 : 臨床酵素 핸드ブック, 講談社 (株), 東京 (1989).
  21. 山村 雄一 : 酵素療法 핸드ブック, 講談社(株), 東京 (1974).
  22. Nakadai, T., Nasuno, S. and Iguchi, N. : Purification and properties of alkaline proteinase from *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.* **37**, 2685-2708 (1973).