

원 저

人蔘 사포닌을 비롯한 界面活性劑가 胃腸管內의 蛋白質 加水分解酵素 反應에 미치는 影響

김영재¹, 이상직², 박기태³

국립 창원대학교 자연과학대학 미생물학과¹, 영남대학교 생화학과², 박기태한의원³

The Effects of Surfactants Including Ginseng Saponins on the Gastric Enzyme-Catalyzed Hydrolysis

Young-Jae Kim¹ Sang-Jik Lee², Ki-Tae Park³

Department of Microbiology, Changwon National University, Sarim-dong, Changwon, Kyungnam 641-773¹, Department of Biochemistry, Yeungnam University, Gyongsan 712-749², Ki Tae Park Korean Medicine Clinic, Sangnam-dong changwon, Kyungnam 641-773, Republic of Korea³

Objectives : This study was conducted to investigate the effects of ginseng saponins and commercial surfactants such as Triton X-100, sodium deoxycholate, and sodium dodecyl sulfate on the gastric enzyme-catalyzed hydrolysis.

Methods : Saponins (a surface-active plant component) from fresh ginseng root were extracted to examine its effect on the gastric enzyme-catalyzed hydrolysis. Commercial surfactants such as Triton X-100, sodium deoxycholate, and sodium dodecyl sulfate were also employed in the hydrolysis system to compare their effects with that of the ginseng saponins. The effects of surfactants on the gastric enzyme-catalyzed hydrolysis were measured by using a spectrophotometer. A spectropolarimeter was used to examine the conformational change of enzymes and substrates by the addition of ginseng saponins into the system.

Results : Both the tryptic and the peptic digestion of milk casein or eggalbumin were slightly improved with an increase in the amount of ginseng saponins in the system. Triton X-100 showed an effect similar to that of ginseng saponins, while sodium dodecyl sulfate and sodium deoxycholate diminished the hydrolysis. Circular dichroism spectra of enzymes and substrates was significantly changed by the addition of ginseng saponins into the system.

Conclusions : These results show that ginseng saponins affect positively the gastric enzyme-catalyzed hydrolysis, and suggest that the digestion of substrates by gastric enzymes is affected by the change of enzyme conformation by ginseng saponins.

Key Words: Ginseng saponins, surfactants, pepsin, trypsin.

緒 論

- 접수 : 2006년 6월 15일 · 논문심사 : 2006년 6월 15일
- 채택 : 2006년 6월 22일
- 교신저자 : 김영재, Department of Microbiology, Changwon National University, Sarim-dong, Changwon, Kyungnam 641-773, Republic of Korea (Tel: +82-55-279-7464, Fax: +82-55-279-7460, E-mail: yjkim@changwon.ac.kr)
- 본 논문은 2005년도 창원대학교 기획처 한방과제연구비의 지원을 받아 연구되었으며, 그 지원에 감사드립니다.

韓方에서 오랫동안 藥劑로 사용되어 온 韓國人蔘 (Panax ginseng C. A. Meyer)에 대한 關心이 높아짐에 따라 人蔘을 研究하는 여러 學者들에 의해 人蔘뿌리에 상당량 含有되어 있는 사포닌 및 그 밖의 有效成分의 生化學的·藥理學的 效果에

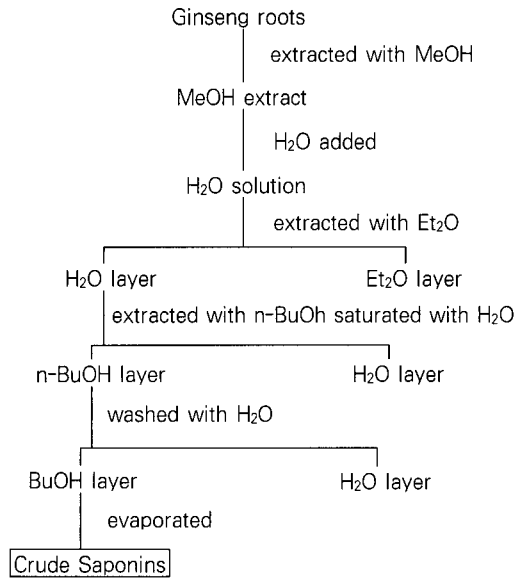


Fig. 1. Extraction procedure of crude saponins from fresh ginseng roots.

관한 많은 研究가 이루어져 왔다. 人蔘의 主要 生理活性物質로 人蔘사포닌 (ginsenosides), polyacetylenes, 酸性多糖體, 人蔘蛋白質, 페놀성 物質 등이 알려져 있다¹⁾. 이 가운데 人蔘사포닌의 界面活性的 役割은 生化學的 mechanism 糾明에 관한 研究에 있어서 가장 큰 關心事중의 하나가 되어 왔다.

人蔘의 사포닌 化合物은 1854년 Garriques³⁾가 Canada產 人蔘인 *Panax quinquefolim*에서 분자식 C₃₂H₅₆O₁₄의 사포닌을 分離하여 panaquilon 이라고 命名한 이래, Shibata 등⁴⁻¹¹⁾의 研究에 의해 그 化學的 研究가 시작되어 1980년대 초까지 거의 대부분의 構造가 밝혀지게 되었다. 人蔘사포닌은 分子構造상 親水性인 糖部分과 疏水性인 sapogenin 部分을 同時에 지니고 있는 양쪽성 (amphiphathic) 物質이다. Lee 등은 정제된 수삼사포닌의 界面活性的을 測定한 바 있는데 이들 사포닌 水溶液의 表面張力은 대개 72.0 erg/cm²에서 50 erg/cm²까지 내려갔었다¹²⁾. Joo 등은 人蔘사포닌이 cholesterol suspension을 맑게 하는 作用이 있으며 장강액 (intestinallumen fluid)의 脂質成分과 效果的으로

미셀구조를 形成함을 밝혔다¹³⁾. 이들은 또한 人蔘 사포닌이 쥐의 肝 미토콘드리아에 의한 脂肪酸 酸化와 사이토졸에 의한 脂肪合成을 다같이 促進 한 다고 報告하였다¹⁴⁾.

本 研究에서는 人蔘成分 중에서 사포닌 成分만을 抽出하여 이 食品(혹은 藥品)의 口腔投與시 이 成分이 第一次으로 접하는 胃腸管 (gastrointestinal tract)內에 存在하는 몇가지 蛋白質 消化酵素를 선정하여 그 消化酵素들과 基質 蛋白質과의 相互作用에 있어서 人蔘사포닌의 影響을 in vitro적으로 調査하고 이 影響과 사포닌의 界面活性的간의 相關性 有無를 논하고자 한다.

材料 및 方法

1. 人蔘사포닌의 抽出

本 實驗에 使用한 人蔘사포닌은 Fig. 1과 같은 過程으로 調製하였다. 4-5년생 水蔘 1.5 kg을 깨끗이 씻은 후 잘게 썰어 blender로 갈아 메탄올 (99%) 3.0 l로 室溫에서 하루동안 抽出 하였다. 이

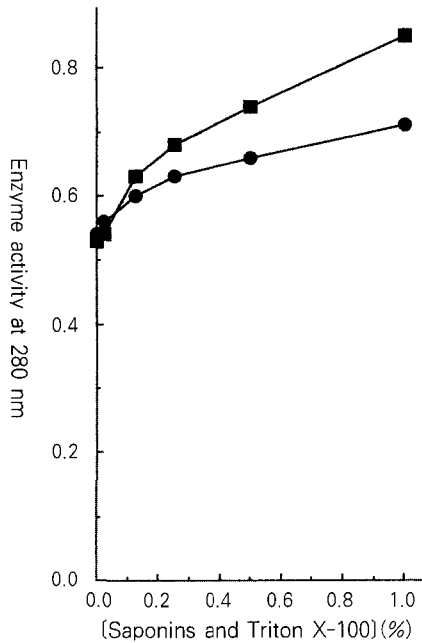


Fig. 2. Effects of ginseng saponins (●) and Triton X-100 (■) on the digestion of casein by trypsin.

것을 減壓濾過한 후 그 濾液을 rotatory evaporator (Tokyo Rikakikai Co.)로 40~50℃에서 減壓濃縮하였다. 이 減壓濃縮한 固形物을 蒸溜水 300 ml에 分散시키고, 脂溶性 物質을 除去하기 위하여 200 ml의 에테르로 4회 洗滌한 후 물로 飽和시킨 부탄올 200 ml로 5회 진탕분획 하였다.

2. 酵素溶液의 調製

Trypsin 溶液은 crystalline trypsin을 0.1 M 磷酸緩衝溶液 (pH 7.7)에 10 mg/ml의 濃度로 녹인 것을 使用하였으며, pepsin 溶液은 crystalline pepsin을 0.1 M HCl-KCl 緩衝溶液 (pH 1.5)에 5 mg/ml의 濃度로 녹인 것을 使用하였다.

3. 氣質溶液의 調劑

Trypsin 反應系에서는 casein 1 g을 0.1 M 磷酸緩衝溶液 (pH 7.7) 100 ml에 懸濁시켜 끓는 물에 약 15 분간 加熱溶解시켜 使用하였으며 pepsin 反應系에서는 casein 1 g을 0.1 M HCl-KCl 緩衝

液(pH 1.5) 100 ml에 懸濁시켜 끓는 물에 약 15분간 加熱溶解시켜 使用하였다. 또한, pepsin 反應系에서는 egg albumin 0.5 g을 0.1 M HCl-KCl 緩衝溶液 (pH 1.5) 100 ml에 懸濁 溶解시켜 使用하였다.

4. 酵素活性 測定

Trypsin 加水分解 反應은 Kunitz¹⁵⁾의 方法을 수정하여 다음과 같이 測定하였으며, pepsin 加水分解 反應은 trypsin의 測定法과 類似的한 方法으로 測定하였다. 反應系 0, 1, 2, 3, 4, 5에서 사포닌의 濃度는 서로 다르게 하였고, 基質과 酵素의 量은 같게 하였다. 反應系 0~5에서 사포닌 濃度는 각각 0, 0.025, 0.125, 0.25, 0.5 및 1.0%로 하였다. 反應系 0, 1, 2, 3, 4, 5와 더불어 公시험계 0', 1', 2', 3', 4', 5'도 同時에 竝行하였다. 公시험계는 trypsin 反應系의 경우 trypsin 溶液을 0.1 M 磷酸緩衝溶液(pH 7.7)으로 代치한 것이며, pepsin 反應系의 경우에는 pepsin 溶液을 0.1 M HCl-KCl 緩衝溶液(pH 1.5)으로 代치한 것이다. 첫 단계로

milk casein(혹은 egg albumin)과 saponin(혹은 Triton X-100 등의 界面活性劑)을 混合하여 37℃로 維持시켜 놓고 별도로 같은 溫度에 두었던 酵素溶液을 가함으로써 反應을 始作하였다. 反應始作 20분 後에 反應系에 trichloroacetic acid를 10%의 濃度로 添加하여 反應을 신속히 停止시켰다. 沈澱된 蛋白質은 遠心分離하여 除去하고, 상정액의 吸光度를 spectrophotometer (Hitachi 320)를 이용하여 280 nm에서 測定하였다.

5. 蛋白質 定量

蛋白質 定量은 Lowry 등¹⁶⁾의 方法을 따랐다.

結 果

1. 인삼사포닌 및 기타 界面活性劑가 trypsin 및 pepsin 加水分解 反應에 미치는 影響
Trypsin과 pepsin 反應系에서 酵素活性은 사포

닌의 濃度가(0~1%) 增加함에 따라 促進되었다. Trypsin 反應系에서 1% 사포닌 존재하서의 酵素活性은 사포닌이 存在하지 않을 때와 比較하여 약 1.4배 促進되었다(Fig. 2). Pepsin 反應系의 경우, 2가지 基質 milk casein과 egg albumin을 사용하였는데 양쪽 모두 1%의 사포닌 濃度에서 酵素活性이 약 1.1배 增加하였다(Fig. 3). Trypsin의 경우에는 milk casein 하나만을 基質로 사용하였는데 그 이유는 egg albumin속에 trypsin inhibitor가 不純物로 含有되어 있었기 때문이다. 이상의 結果로 볼 때 酵素活性에 있어서 trypsin 反應系가 pepsin 反應系보다 인삼사포닌에 더 큰 影響을 받고 있음을 알 수 있다.

한편 界面活性劑 Triton X-100이 使用될 경우, trypsin 反應系에서 酵素活性은 1%의 濃度에서 Triton X-100이 없는 反應系와 比較하여 약 1.6배 增加하였다(Fig. 2). 그러나 pepsin 反應系에서 酵素活性은 0.25%의 濃度에서 Triton X-100이 없는

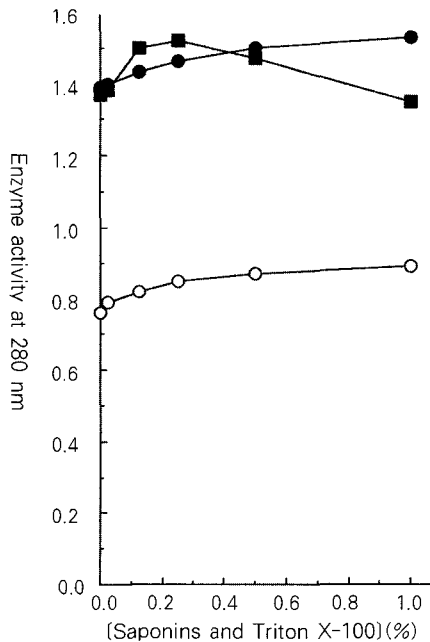


Fig. 3. Effects of ginseng saponins (●, ○) and Triton X-100 (■) on the digestion of casein (closed circles) and albumin (open circles) by pepsin.

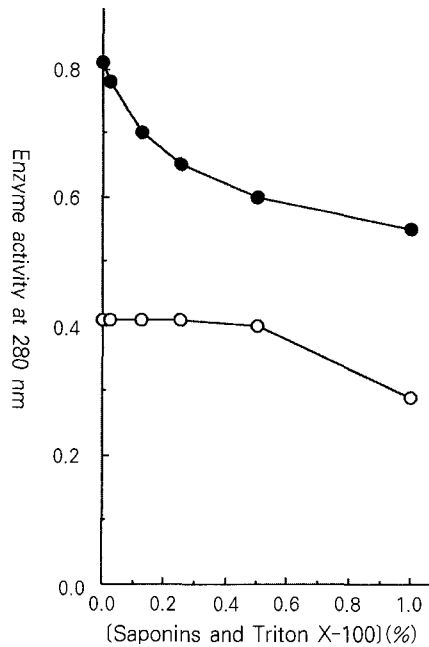


Fig. 4. Effects of Sodium deoxycholate (●) and Sodium dodecyl sulfate (■) on the digestion of casein by trypsin.

反應系와 比較하여 약 1.1배로 增加하였으나 그以後 酵素活性이 계속 減少되어 1%의 濃度에서는 Triton X-100이 없는 反應系 보다 오히려 酵素活性이 減少되었다(Fig. 3). Sodium deoxycholate와 sodium dodecyl sulfate와 같은 界面活性劑는 酵素活性을 阻害하였다(fig. 4).

2. 人蔘사포닌 및 기타 界面活性劑에 의한 酵素蛋白質 및 基質蛋白質의 Circular Dichroism Spectra(CD spectra)의 變化

人蔘사포닌과 Triton X-100이 蛋白質 構造에 어떤 影響을 미치는가에 대한 實驗으로 酵素蛋白質과 基質蛋白質에 人蔘사포닌 및 Triton X-100을 가하여 spectropolarimeter (Jasco J-500 C)로 이들 蛋白質의 構造의 變化를 觀察하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 實驗界에 人蔘사포닌을 添加하면 trypsin과 pepsin의 構造가 變化함을 알 수가 있다. 또한 milk casein이나 egg albumin에 人蔘사포닌을 添加하여도 Circular dichroism spectra가

변하였다 (data not shown). 實驗界에 人蔘사포닌 대신 Triton X-100을 가하여도 비슷한 結果가 얻어졌다 (data not shown).

考 察

우리나라의 人蔘은 2000年前의 東洋最古의 本草書인 “神農本草經”에 上品의 補氣劑로 紹介된 以來로 世界 最高의 生藥健康補助食品의 名聲을 오늘까지 이어오고 있다. 人蔘의 主要한 生理活性 物質로서 人蔘사포닌(ginsenosides), polyacetylenes, 酸性多糖體, 人蔘蛋白質, 페놀성 物質 등이 알려져 있다¹⁾. 이 가운데 人蔘사포닌은 抗糖尿 活性¹⁷⁾을 비롯하여 抗癌作用¹⁸⁾, 抗酸化作用¹⁹⁾, 動脈硬化 및 高血壓의 豫防^{20,21)}, 肝機能 促進 및 宿醉除去 效果²²⁾, 抗 疲勞 및 抗 스트레스 作用^{23,24)}, 抗炎活性²⁵⁾, 알레르기성 疾患治療, 蛋白質 合成能力의 促進²⁶⁾ 등이 報告 되었다. 本 實驗에서는 韓國產 人蔘의 有效成分으로 指目되고 있는 人蔘사포닌

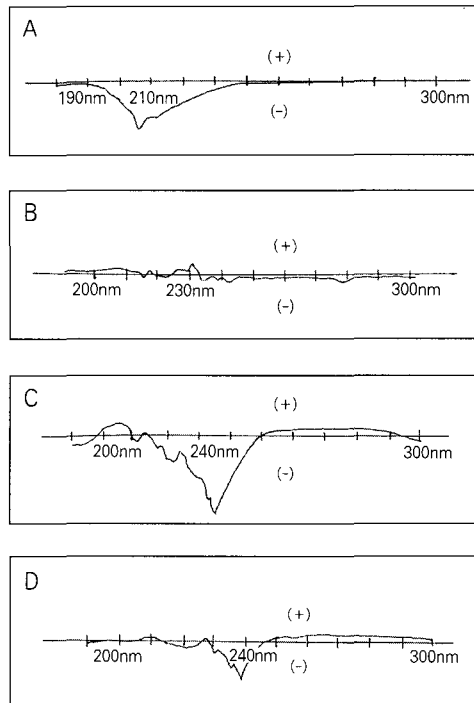


Fig. 5. Circular dichroism spectra.

(A) a spectrum of 1.0% trypsin (B) a spectrum of 1.0% trypsin in the presence of 0.5% saponins (C) a spectrum of 1.0% pepsin (D) a spectrum of 1.0% trypsin in the presence of 0.5% saponins

및 기타 界面活性劑가 胃腸管內에 存在하는 蛋白質 加水分解酵素인 trypsin과 pepsin이 基質 蛋白質(milk casein과 egg albumin)의 消化에 어떤 影響을 미치는지를 試驗管內에서 調査하였다. 人삼사포닌의 存在下에 trypsin과 pepsin은 牛乳와 飴飴 內에 多量 含有되어 있는 營養素인 milk casein과 egg albumin의 消化에 肯定的인 影響을 미쳤다. 즉 反應系에 人삼사포닌의 濃度가 增加함에 따라 酵素活性이 促進되었다. 人삼사포닌이 酵素活性에 미치는 影響은 pepsin 反應系에서 보다 trypsin 反應系에서 더 컸다. 또한 界面活性劑인 Triton X-100도 trypsin과 pepsin의 酵素活性을 促進시켰다. 그러나 Triton X-100에 의한 酵素活性의 促進은 人삼사포닌에 의한 그것과는 조금 달랐다. 즉, trypsin 反應系에서 Triton X-100은 1%의 濃도에

서 酵素活性을 약 1.6배 促進시켰지만 pepsin 反應系에서는 0.25% 濃度에서 酵素活性은 Triton X-100이 없는 反應系와 比較하여 약 1.1배로 增加하였고, Triton X-100의 濃度가 增加함에 따라 酵素活性이 계속 減少되어 1%의 濃度에서는 Triton X-100이 없는 反應系보다 오히려 酵素活性이 減少되었다. 한편 sodium deoxycholate와 sodium dodecyl sulfate와 같은 界面活性劑는 酵素活性을 오히려 阻害하였다. 위의 실험적 事實들을 綜合하여 보면, 一般的으로 trypsin과 pepsin의 蛋白質 加水分解 機能은 適當한 濃度의 人삼사포닌 共存下에서 促進된다는 것을 알 수 있으며, trypsin 反應系에서 人삼사포닌과 Triton X-100의 作用 類似點으로 보아 人삼사포닌이 蛋白質 加水分解反應에 미치는 影響은 그의 界面活性에 基因하는 것으로 推

測할 수 있다. 한편, 인삼사포닌이나 界面活性劑가 蛋白質(基質 및 酵素)의 CD spectra를 크게 變化시키는 것은 이들이 蛋白質의 形態를 變化시키기 때문임은 물론이다. 이 形態 變化에 수반하여 蛋白質 加水分解反應이 促進되거나 沮害되는 結果가 招來되는 것으로 볼 수 있다.

이상의 結果로부터 人蔘의 有效成分인 사포닌은 口腔投與時 胃腸管內 消化酵素인 trypsin과 pepsin의 活性에 影響을 미치며, 界面活性劑 Triton X-100이 인삼사포닌과 類似한 結果를 나타낸 것으로부터 인삼사포닌의 蛋白質 加水分解反應에 대한 効果는 그의 界面活性에 기인한 것으로 推測된다.

結 論

韓國産 人蔘의 有效成分으로 指目되고 있는 인삼사포닌과 기타 界面活性劑가 胃腸管內的 酵素인 trypsin과 pepsin이 milk casein 및 egg albumin의 消化에 어떤 影響을 미치는지를 조사하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. Trypsin과 pepsin의 酵素活性은 인삼사포닌의 濃度(0~1%)가 增加함에 따라 增加하였다. 인삼사포닌이 酵素活性에 미치는 影響은 pepsin 反應系에서 보다 trypsin 反應系에서 더 컸다.

2. Trypsin 反應系에서 nonionic surfactant Triton X-100은 인삼사포닌과 비슷한 影響을 나타낸 반면 sodium dodecyl sulfate와 sodium deoxycholate는 인삼사포닌과 相異한 反應을 나타내었다.

3. 蛋白質 加水分解酵素인 trypsin과 pepsin에 사포닌과 Triton X-100을 가하여 spectropolarimeter로 觀察하여 본 결과 이들 酵素의 構造가 變化하였음을 알 수 있었다. 이 結果로 부터 인삼사포닌과 Triton X-100은 酵素와 基質의 相互作用이 容易하도록 酵素의 conformation을 變化시켰으며, 반면에 sodium dodecyl sulfate와 sodium deoxycholate 존재하에서 酵素들은 活性이 減少되므로 酵素와

基質의 相互作用이 不利하도록 酵素의 conformation이 變化된 것으로 推測된다.

4. 상기의 여러 가지 實驗的 事實로 미루어 볼 때, 인삼사포닌은 口腔投與時 胃腸管內 消化酵素인 trypsin과 pepsin의 活性에 肯定的인 影響을 미치며, 인삼사포닌의 蛋白質 加水分解反應에 대한 效果는 그의 界面活性에 基因한 것으로 推測된다.

參考文獻

1. Namba T. The Encyclopedia of Wakan-Yaku with Color Pictures. Hoikusha, Osaka, Japan. 1980.
2. 박종대. 고려인삼의 화학적성분에 관한 고찰, 고려인삼학회지. 1977; 20(4): 389-396.
3. Garrques D. Übex das panaquilon, einen neuen pflanzenstoff. Ann. Chem. Pharm. 1854; 90: 231.
4. Shibata S, Fujita M, Itokawa H, The structure of panaxadiol. A sapogenin of ginseng. Tetrahedron Lett. 1962; 10: 419-422.
5. Fujita M, Itokawa H, Shibata S. Chemical studies on ginseng. I. (Studies on saponin-bearing drugs. IV.). Isolation of saponins and sapogenins from Radix Ginseng, Yakugaku Zasshi. 1962; 82: 1634-1638.
6. Shibata S, Fujita M, Itokawa H, Tanaka O, Ishii T. Constituents of Japaness and Chinese crude drugs. XI. Panaxadiol, a sapogenin of ginseng roots (I). Chem. Pharm. Bull. 1963 ; 11: 759-761.
7. Shibata S, Tanaka O, Nagai M, Ishii T. Constituents of Japanese and Chinese crude drugs. XII. Panaxadiol, a sapogenin of ginseng root (2). Chem. Pharm. Bull. 1963; 11: 762-766.
8. Shibata S, Tanaka O, Sado M, Tsuchima S. The genuine sapogenin of ginseng, Tetrahedron Lett. 1963; 12: 795-800.
9. Nagai N, Ando T, Tanaka N, Tanaka O,

- Shibata S. Chemical studies on the oriental plant drugs. XXVIII. Saponins and sapogenins of ginseng. Stereochemistry of the sapogenin of ginsenosides-Rb₁, -Rb₂, and Rc. Chem. Pharm. Bull. 1972; 20: 1212-1216.
10. Ohsawa T, Tanaka N, Tanaka O, Shibata S. Chemical studies on the oriental plant drugs. XXIX. Saponins and sapogenins of ginseng. Further study on the chemical properties of the side chain of dammarane type triterpenes. Chem. Pharm. Bull. 1972; 20: 1890-1897.
11. Snata S, Kondo N, Shoji J, Tanaka O, Shibata S. Studies on the saponins of ginseng. I. Structure of ginsenoside-Rb₀, Rb₁, Rb₂, Rc and Rd. Chem. Pharm. Bull. 1974; 22: 421-428.
12. Lee SJ, Lee MH, Lee KJ. Surface Activities of Ginseng saponins and their Interactions with Biomolecules (I). Korean Biochem. J. 1981; 14(1): 1-9.
13. Joo CN, Lee SJ. Biochemical Studies on Ginseng Saponin (IX). Determination of Critical Concentration of the Saponin of Korean Ginseng Roots and its Effect on Lipid Dispersion and Enzyme reactions. Korean Biochem. J. 1977; 10(2): 59-69.
14. Joo CN, Lee BH, Kim DS (X). Biochemical Studies on Ginseng Saponin (X). The Effect of Ginseng Saponins on Lipid Metabolism. Korean Biochem. J. 1977; 10(2): 71-84.
15. Laskowski M. Trypsinogen and Trypsin. In: Sidney PC, Nathan OK, eds. Method in Enzymology volume 2, 3rd ed. London: Academic Press Inc. 1963; 26-36.
16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 1951; 193: 265-275.
17. Yokozawa T, Kobayashi T, Oura H, Kwashima Y. Studies on the mechanism of the hypoglycemic activity of ginsenoside-Rb₂ in streptozotocin-diabetic rats. Chem. Pharm. Bull. 1985; 33: 869-872.
18. Mochizuki M, Yoo YC, Matsuzawa K, Sato K, Saiki I, Tonooka S, Samukawa K, Azuma I. Inhibitory effect of tumor metastasis in mice by saponins, ginsenoside-Rb₂, 20(R)- and 20(S)-ginsenoside-Rg₃, of red ginseng. Biol. Pharm. Bull. 1995; 18: 1197-1202.
19. Jeong CS, Hyun JE, Kim YS. Anti-oxidative effect of ginsenoside Rb₁ on the HCl · ethanol-induced gastric tissue in rats. Korean J. Pharmacogn. 2002; 33: 252-256.
20. Jung IS, Cho YD. Effect of ginseng saponin fraction of absorption of cholesterol and serum lipid components. Korean J. Ginseng Sci. 1985; 9: 232-239.
21. Yoon SH, Joo CN. Study on the preventive effect of ginsenosides against hypercholesterolemia and its mechanism. Korean J. Ginseng Sci. 1993; 17: 1-12.
22. Matsuda H, Samukawa K, Kubo M. Anti-hepatic activity of ginsenoside Ro. Planta Med. 1991; 57: 523-526.
23. Wang BX, Cui JC, Liu AJ, Wu SK. Studies on the anti-fatigue effect of the saponins of stems and leaves of panax ginseng (SSLG). J. Tradit. Chin. Med. 1983; 3: 89-94.
24. Saito H, Yoshida Y, Tagaki K. Effects of Panax ginseng root on exhaustive exercise in mice. Jpn J. Pharmacol. 1974; 24: 119-126.
25. Matsuda H, Samukawa K, Kubo M. Anti-inflammatory activity of ginsenoside Ro. Planta Medica. 1990; 56: 19-23.
26. Park JD. Recent studies on the chemical constituents of Korean Ginseng (Panax ginseng C.A. Meyer). Korean J. Ginseng Sci. 1996 ; 20: 389-415.