

자원식물로부터 미생물을 이용한 고부가가치 기능성 물질의 대량생산

양덕춘*, 김세화, 민진우, 인준교¹, 이범수¹, 김종학¹

경희대학교 한방재료가공학과 고려인삼명품화 사업단 및 인삼유전자원소재은행

(주)바이오피아 생명공학연구소¹

요 약

인삼은 재배적지에 대한 선택성이 매우 강한 식물이며, 기후 토양 등의 자연환경이 적당하지 않으면 인삼의 생육이 곤란하고, 생육이 가능하더라도 생산된 인삼의 형태, 품질 및 약효에서 현저한 차이를 나타내고 있다. 이러한 인삼의 식물학적 특성이 우리나라에서는 최적의 환경조건으로 인정되어 고려인삼은 세계적으로 최고의 품질로 높이 평가되는 이유이다. 하지만 실질적인 인삼의 생리활성물질에 대한 연구는 서구열강 및 일본에 의해 대다수 연구, 발표되었으며 또한 인삼의 우수성을 인정하여 넓은 영토와 수많은 과학적 지식으로 고려인삼의 우수한 품질을 앞서가려 하고 있는 것이 현실적이다. 특히 중국의 넓은 인삼재배면적에서 값싸게 생산된 인삼이 한국시장을 위협하고 있으며, 미국과 캐나다에서 수많은 연구비를 투자하여 자국삼인 화기삼의 홍보를 대대적으로 함으로서 전세계의 인삼시장의 변화를 유도하고 있고, 호주, 뉴질랜드에서도 청정인삼을 내세워 한국 및 전세계 인삼시장을 잠식해가고 있다. 이런 변화에 의하여 한때 인삼의 종주국으로 전세계의 인삼시장을 석권했던 한국의 고려인삼이 과거의 위상을 점차 잃어 가고 있는 실정이다.

따라서 인삼재배면적이 경쟁국과 비교해 상대적으로 열세인 한국의 고려인삼이 선택할수 있는 방법은 비록 생산은 적더라도 고부가가치인삼을 생산하여 명품화로 가야 할것으로 생각된다. 명품화를 위해서는 우선 고려인삼의 효능을 밝혀 고기능성을 입증해야하고, 재배생산단계에서부터 농약, 중금속등에 노출되지 않고 병에 자유로운 청정재배를 통해 명품화를 이룩해야 하며, 특히 제품의 생산 및 유통단계에서 표준화를 통해서 전세계의 소비자가 믿고 사용할수 있도록 해야 할것이다.

또한 인삼에만 함유된 인삼사포닌(ginsenoside)은 배당체로서 여러 미생물에 의하여 당사슬이 끊어짐으로서 새로운 사포닌이 등장하게 되는데 이러한 사포닌이 각종 함암, 면적, 치매, 관절등에 탁월한 효능을 보임으로서 많은 연구들이 진행중에 있으며, 특히 인삼에만 함유된 것으로 알고 있었던 ginsenoside가 돌외(한약재명 칠엽담)에도 함유되어 있고 일부 성분은 미생물을 통해서 변환시킴으로서 값비싼 인삼사포닌을 생장이 빠르면 비교적 값싼 돌외 사포닌으로부터 생산할수 있게 되었다.

본 세미나에서는 각종 미생물을 이용하여 인삼의 사포닌을 변환시키고 돌외 사포닌인 gypenoside를 ginsenoside로 변환시켜 대량생산할 수 있는 방법을 제시하고자 한다.

서 론

인삼은 오가과(*Araliaceae*) 인삼속(*Panax*) 식물에 속하는 다년생 초본으로서 수 천년전부터 동아시아 국가에서 신비의 영약으로 사용되어 왔다. 인삼의 다양한 성분들 중 인삼사포닌 즉 ginsenoside가

가장 중요한 성분으로 인정되고 있으며 항암(Im et al., 1995; Li et al., 2003), 항암전이(Mochizuki et al., 1995), 면역증강(Wang et al., 2005), 간기능보호(Lee et al., 2005), 혈관확장(Kim et al., 2003), 항피로(Wang et al., 1983), 항스트레스(Saito et al., 1974), 항당뇨(Xie et al., 2005), paraquat 유도 산화적 스트레스에 대한 항산화작용(Kim et al., 2004) 등 활성들이 보고되고 있다.

인삼의 성분으로는 사포닌, 페놀성 성분, 폴리아세틸렌 성분, 알카로이드성분, 다당체 등이 알려져 있다. 특히 사포닌 성분은 함량이 높으면서도 인삼 특이 성분으로 인삼의 생리활성물질 중 하나로 약효에 있어서 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 사포닌 이외의 다른 성분들은 함량이 너무 낮거나 인삼 이외의 다른 식물에도 존재하는 성분들인 경우가 많아 인삼 특유의 약효를 설명하기에는 다소 모자란 점이 있다. 인삼 사포닌은 인삼 건조량에 대하여 약 5% 정도를 차지하고 있는데, 굵은 뿌리 부분에는 약 3% 정도인 반면 생명현상이 활발한 가는 뿌리에 그 함량이 훨씬 높아 약 7%에 달한다.

화학적으로 인삼사포닌은 dammarane 골격에 3, 6, 또는 20번 위치에 당이 2~5개 붙어있는 배당체 구조로 보통 ginsenoside라고 불린다. 현재까지 40종 이상의 ginsenoside가 인삼으로부터 분리 보고되었다. 그러나 실제 인삼을 추출하여 분석할 때 상당한 양이 검출되는 인삼사포닌은 ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1의 6종이며, 백삼이나 홍삼을 추출하여 분석하는 경우 6종이며, 백삼이나 홍삼을 추출하여 분석하는 경우 이 6종이 전체 dammarane 사포닌의 90% 이상을 차지하고 있으며 나머지 사포닌 성분들은 그 함량이 낮다. 이 중 6번 위치에 수소가 결합되어 있는 Rb1, Rb2, Rc, Rd 등은 protopanaxadiol(PPD) 계열 사포닌이라 하고, 6번째 위치에 산소가 결합된 Re, Rg1 등은 protopanaxatriol (PPT) 계열 사포닌이라고 한다.

인삼사포닌은 자연계에 존재하는 많은 배당체 화합물과 마찬가지로 aglycone에 연결된 당에 대한 선택적 가수분해를 통하여 만들어진 minor사포닌이 기존에 대량 존재하는 major사포닌에 비해 흡수나 약효 등 면에서 훨씬 뛰어난 효과를 나타내고 있다. 따라서 major 사포닌의 modification 연구는 인삼연구에서도 각광을 받고 있으며 물리적, 화학적, 효소학적, 미생물적인 방법들이 사용되고 있다. 예를 들면 물리적 방법으로 삼의 형태를 유지한 홍삼, 선삼, 흑삼 등의 제조, 미생물 발효를 이용한 발효홍삼, 효소를 이용한 인삼사포닌의 전환, 산이나 염기에 의한 인삼사포닌의 가수 분해 등 다양한 방법들이 보고되고 있다. 그중에서도 효소에 의한 사포닌의 modification이 다른 방법에 비해 비교적 온화한 조건에서 진행되고 효소의 기질특이성으로 특정사포닌의 생산이 가능하여 가장 많은 연구가 이루어졌다(Chi et al., 2005; Chi et al., 2005; Park et al., 2001; Zhang et al., 2001). 홍삼이나 백삼에는 지금까지 40여종 사포닌이 분리되었지만 major 사포닌 ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1 등 6종 사포닌이 총 사포닌의 90% 이상을 차지하며(Park, 2004) 그중에서도 protopanaxadiol계 사포닌 중에는 ginsenoside Rb1, protopanaxatriol계 사포닌에는 ginsenoside Re 함량이 가장 높다. Ginsenoside Rb1과 Re로부터 minor사포닌으로의 전환경로를 Fig. 1, 2에 나타냈다.

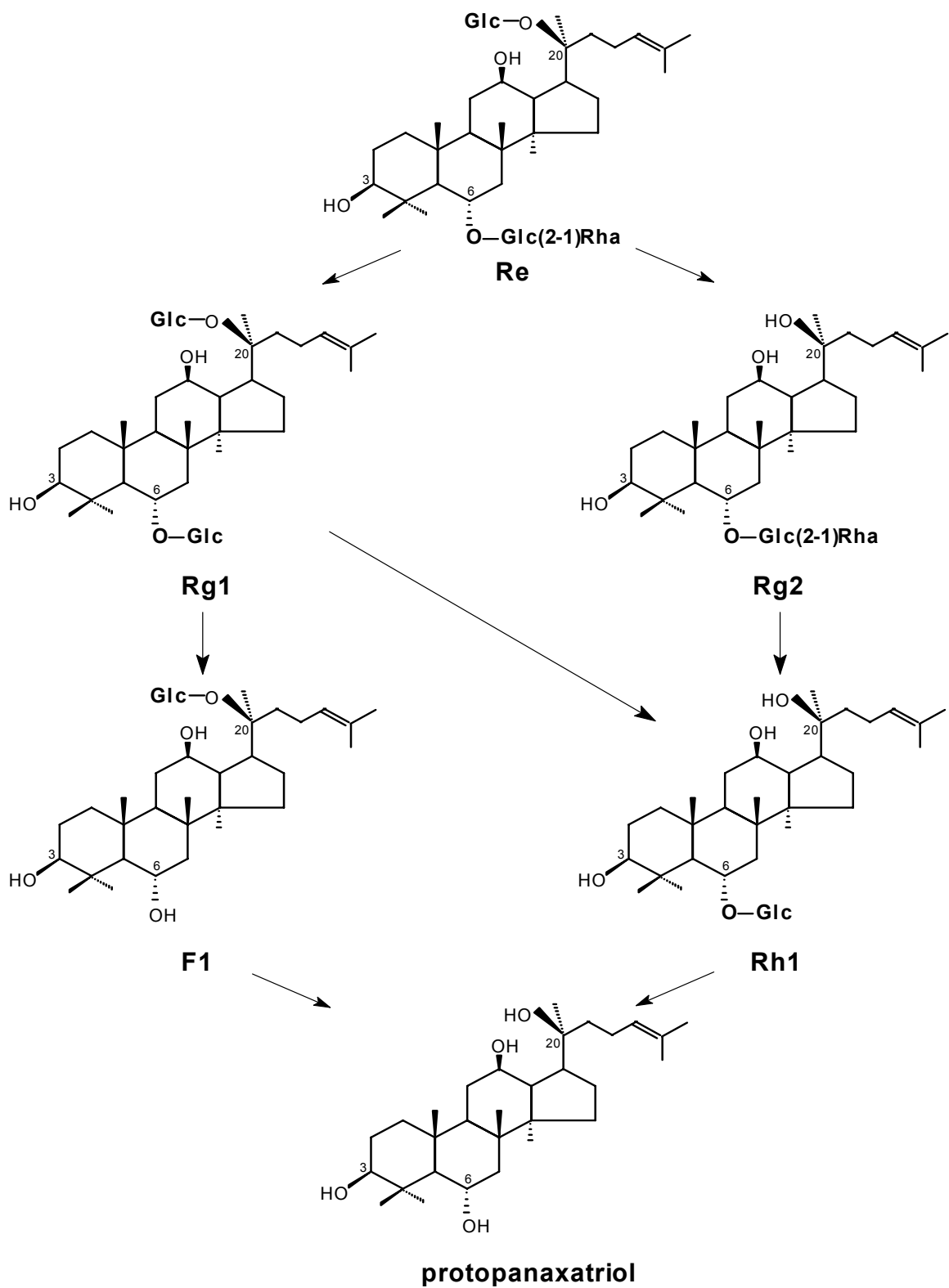


Fig. 2. Transformation pathway from Re to protopanaxatriol.

Fig. 1과 2의 전환경로를 통하여 ginsenoside Rb1과 Re는 각각 항암이나 항암전이에 효과가 좋은 minor ginsenoside Rg3, Rh2, compound k, Rh1과 같은 사포닌이 만들어진다는 것을 알 수 있다. 본 연구는 인삼근권 토양과 각종 김치로부터 esculin 발색법을 이용하여 분리한 β -glucosidase활성균주를 이용하여 ginsenoside Rb1과 반응시켜 사포닌 전환여부를 확인하고 그 중 compound K와 ginsenoside Rg3 생산균주에 대하여 전환 pathway를 조사하였다.

재료 및 방법

사포닌 변환을 통한 기능성화

재 료 : 실험에 사용한 ginsenoside Rb1은 *Panax quinquefolium*으로부터 분리하였고 standard Rb1, Rd, Rg3, compound K, Rh2는 경희대 인삼유전자원소재은행에서 분양받아 사용하였고 R2A, nutrient broth, LB broth (Luria-Bertani) 및 triptic soy broth배지는 Difco 회사의 제품을 구입하여 사용하였다. TLC plate는 60 F-254 Silica gel plate(Merck)를, column chromatography용 resin은 silica gel 60(70-230 mesh, Merck)을 사용하였고 HPLC기기는 UV/Vis detector과 gradient pump가 연결된 FUTECS Co., Ltd. NS 3000i system을 사용하였다.

β -glucosidase활성균주의 선발 : β -glucosidase활성균주는 주로 인삼근권 토양과 각종 김치로부터 선발하였다. 인삼근권 토양은 경기도 연천 인삼밭에서 취하여 polyethylene vinyl bag에 넣은 후 실험실로 운반하였다. 시료는 4°C에서 보존하면서 6시간 이내에 실험되었다. 멸균수를 이용하여 $10^{-3} \sim 10^{-7}$ serial dilution 한 시료를 β -glucosidase활성을 확인할 수 있는 esculin agar plate(Kim et al., 2005)에 spreading 하여 28°C에서 배양하였다. Black complex를 형성한 single colony들은 R2A agar plate에서 같은 조건에서 순수배양 될 때까지 계대 배양하였다. 김치는 지역별, 종류별로 다양하게 수집하였다. 김치 시료를 원심분리하여 취한 상등액을 멸균수에 serial dilution 하여 유산균 분리에 적합한 MRS agar plate에 spreading 하여 37°C에서 배양하였다. 이후 colony를 esculin이 들어있는 MRS agar plate에 옮겨 β -glucosidase활성을 확인하였다.

Ginsenoside Rb1의 전환 : Esculin agar plate에서 black complex를 형성한 single colony들은 nutrient broth배지에 하루 현탁 배양 후 균주배양액과 미리 0.2 μ m filter로 멸균한 1 mM Rb1수용액을 같은 체적으로 혼합하여 30 °C, 160 rpm으로 shaking incubator에서 반응시켰다. 반응 48 h 후 수포화부탄올을 첨가하여 반응을 중지시키고 부탄올 층은 TLC plate에 점적하여 Rb1의 전환여부를 확인하였다. Spotting한 TLC는 chloroform/methanol/ water(65:35:10 하층) 혼합용매로 5.5 cm 전개한 후 10% H₂SO₄를 분무하여 가열을 통해 발색시켰다. Ginsenoside Rb1의 전환 pathway Ginsenoside Rb1 전환균주를 LB broth에서 현탁 배양 후 30 °C, 160 rpm shaking incubator에서 ginsenoside Rb1과 시간별로 반응시켰다. 반응물은 수포화부탄올로 추출한 후 농축하여 HPLC용 메탄올에 용해시켜 TLC 및 HPLC chromatography를 통하여 분석하였다. HPLC분석: HPLC분석 column은 C18(250 × 4.6 mm, ID 5 μ m)을, sample 주입량은 20 μ l, 이동상은 acetonitrile(solvent A)과 증류수(solvent B)의

gradient 조건을 이용하였고 유속은 1.6 ml/min, UV detector로 203 nm에서 측정하였다. Gradient 조건: solvent A/solvent B: 15/85, 21/79, 58/42, 90/10, 90/10, 15/85, 15/85; run time: 0-5, 5-25, 25-70, 70-72, 72-82, 82-84, 84-100 min. 결과 및 고찰 (Results and Discussion)

β -glucosidase활성균주의 선발 ginsenoside Rb1의 전환 : 인삼근권 토양으로부터 esculin방법을 이용하여 β -glucosidase활성 균주를 분리하고 각각의 균주들을 nutrient broth에 현탁 배양하여 ginsenoside Rb1과 반응시켜 사포닌 전환균주를 선발하였다(Table 1).

Table 1. Microorganisms used to screen for transfoamation of ginsenoside Rb1.

Names	Strains	Metabolite
<i>Arthrobacter methylothrophus</i>	GP34	-
<i>Bacillus megaterium</i>	GP11, GP74, GP78	-
<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	GP16	+
<i>Caulobacter leidyia</i>	GP45	+
<i>Escherichia fergusonii</i>	GP77	-
<i>Escherichia senegalensis</i>	GP87	+
<i>Frateuria aurantia</i>	GP33	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	GP81, GP83	-
<i>Kluyvera cochleae</i>	GP66	-
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	GP31, GP40, GP41	+
<i>Paenibacillus glycanilyticus</i>	GP02	+
<i>Paenibacillus macerans</i>	GP29	-
<i>Paenibacillus naphthalenovorans</i>	GP20, GP21	-
<i>Raoultella planticola</i>	GP80, GP82	-
<i>Serratia fonticola</i>	GP01	-
<i>Sphingomonas echinoides</i>	GP46, GP47, GP50, GP53	+
<i>Streptomyces galilaeus</i>	GP38	-
<i>Terrabacter tumescens</i>	GP22, GP28	-
<i>Arthrobacter stackebrandtii</i>	GS413	-
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	GS157	-
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	GS235	+
<i>Dermatophilus congolensis</i>	GS442	-
<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	GS514	+
<i>Streptomyces lienomycini</i>	GS506	-
<i>Terracoccus luteus</i>	GS603	+
<i>Arthrobacter stackebrandtii</i>	GS413	-
<i>Bacillus subtilis</i>	KC-150	+
<i>Lactobacillus brevis</i>	KC-72	+
<i>Lactobacillus brevis</i>	KC-154	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KC-30	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	KC-16	+
<i>Lactobacillus sakei</i>	KC-14	+
<i>Lactobacillus sakei</i>	KC-54	-
<i>Lactobacillus</i> sp. CS1	KC-102	+

'+' denotes metabolites of ginsenoside Rb1 detected and '-' no detected.

결과 및 고찰

1. 인삼 사포닌 변환을 통한 기능성화

1) 김치유산균 및 인삼근권미생물을 이용한 사포닌의 변환

인삼사포닌 중 90% 이상을 차지하고 있는 major 사포닌을 효능이 보다 우수한 minor 사포닌으로 전환시킬 수 있는 효소로 β -glucosidase, β -galactosidase, hesperidinase 및 naringinase 등을 들 수 있다. 본 발표에서는 이들 효소 중 β -glucosidase를 생산해 낼 수 있는 유산균을 김치 시료로부터 분리하고자 하였다. 김치 시료를 serial dilution하여 MRS 배지에 배양해 본 결과, 유산균뿐만 아니라 여러 가지 효모들도 plate 상에 많이 나타나는 것을 볼 수 있었다. 그 중 유산균은 대부분 흰색의 circular 형태의 colony로 나타났다. MRS agar plate 상에 나타난 colony들을 크기, 모양 및 색깔 등을 기준으로 구별하여 서로 다른 균주라고 생각되는 colony를 멸균된 이쑤시개를 이용하여 Esculin agar plate에 옮겨 배양하였다. Esculin 배지에서 유산균을 배양할 경우, 유산균으로부터 분리된 β -glucosidase에 의해 esculin 구조 내의 β -glucose가 탈락되고 이렇게 생성된 esculetin이 배지 내에 포함되어 있는 ferric ammonium citrate와 반응하여 plate상의 colony 주위에 black complex를 형성하게 된다 (Fig. 3). 따라서 esculin agar plate에서 black complex를 형성한 colony는 β -glucosidase 생산 균주라고 할 수 있다. 이들 colony만을 선별하여 MRS agar plate에 순수 배양될 때까지 계대하여 다시 한 번 esculin 배지에서 black complex 형성 여부를 확인한 후, 균주를 장기보관 하기 위해 glycerol stock solution을 만들어 deep freezer에 보관하였다. 104종의 김치로부터 MRS 배지에 의해 분리된 균주는 모두 127종이었으며, 이들 중 esculin agar plate에서 black complex를 형성한 균주, 즉 β -glucosidase 분비활성을 보인 유산균은 39 종으로 전체 균주의 약 31%로 나타났다.

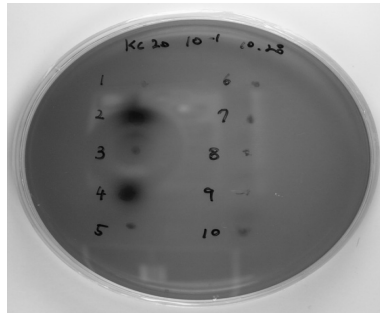


Fig. 3. Screening of lactic acid bacteria producing β -glucosidase.

Esculin 배지를 이용하여 선별한 β -glucosidase 생산 균주들은 고분자의 인삼사포닌 중의 서로 다른 위치의 glucose를 떼어내어 저분자 사포닌으로 전환시킬 수 있는 능력을 지니고 있을 것이라 사료된다. 앞서 설명하였듯이, 인삼에 다량 존재하는 고분자 사포닌인 ginsenoside Rb₁ 또는 ginsenoside Rg₁ 등에 비하여 이들의 당 일부가 탈락되어 만들어지는 저분자 사포닌인 ginsenoside Rg₃, ginsenoside Rh₂, compound K 등이 그 약리 효능 면에 있어서 더욱 뛰어나다. 따라서 본 연구에서는 β -glucosidase 생산 균주들을 이용하여 고분자 인삼사포닌인 ginsenoside Rb₁을 저분자 사포닌으로 전환시키고자 하였다. β -glucosidase 생산 균주들의 사포닌 전환 능력을 알아보기 위하여 유산균 배양액과 1 mM의 Rb₁ 수용액을 혼합하여 shaking incubator에서 48 시간 동안 현탁 배양하여 반응시킨 후 수포화 부탄올로 사포닌을 추출하였다.

TLC 분석을 위한 전개용매로는 CHCl₃-MeOH-H₂O를 65:35:10의 부피비로 섞은 하층용매가 가장 적합하였다. TLC 분석 결과, 대부분의 균주들이 ginsenoside Rb₁을 분해하지 못하거나 ginsenoside Rd로만 전환시키는 것을 볼 수 있었다. 각각의 균주마다 그 성장 속도나 그에 따른 효소 생성 능력에 차이가 있을 것인데, 본 실험에서는 배양 시간 또는 반응 시간 등의 조건들을 일괄적으로 통일하였기 때문에 성장 속도가 느린 여러 균주들이 미처 자라지 못한 상태에서 인삼사포닌 전환 반응 유도를 위한 실험에 들어갔을 경우 유산균들이 인삼사포닌을 전환시키지 못하였을 것이라 생각해 볼 수 있다. 또한 ginsenoside Rb₁에 붙어 있는 C-20위치의 glucose 하나가 탈락되었을 경우 ginsenoside Rd가 생성되는데, 이 ginsenoside Rd로부터 어느 위치의 당이 떨어지느냐에 따라 ginsenoside Rg₃, ginsenoside Rh₂, ginsenoside F₂, 또는 compound K 등이 생성될 수 있다. 즉, 반응 시간을 더 길게 해 주었을 경우, 보다 많은 minor ginsenoside를 얻을 수 있을 것이라 생각된다. 인삼사포닌의 전환 연구에 사용된 토양미생물과 김치유산균은 전부 esculin에 대한 β-glucosidase활성을 가진 균주들이지만 ginsenoside Rb₁의 전환에서 모두 당 가수분해 활성을 나타내는 것은 아니었다. Ginsenoside Rb₁과 각각의 균주배양액과의 부분적인 반응결과를 Fig. 4에 나타냈다.

Ginsenoside Rb₁으로부터 ginsenoside Rd, F₂, compound K로의 미생물에 의한 전환은 비교적 많이 연구되어 있지만 ginsenoside Rg₃로의 전환연구는 거의 되어있지 않았고 또한 효소에 의한 Rg₃의 생산은 aglycone의 C-20의 입체장애로 인하여 C-3이나 C-6위치의 당 가수분해보다 어려운 것으로 알려져 있다. *M. esteraromaticum* GS514균주의 발견은 순수한 20(S)-Rg₃의 생산에 있어서 아주 중요한 것이다.

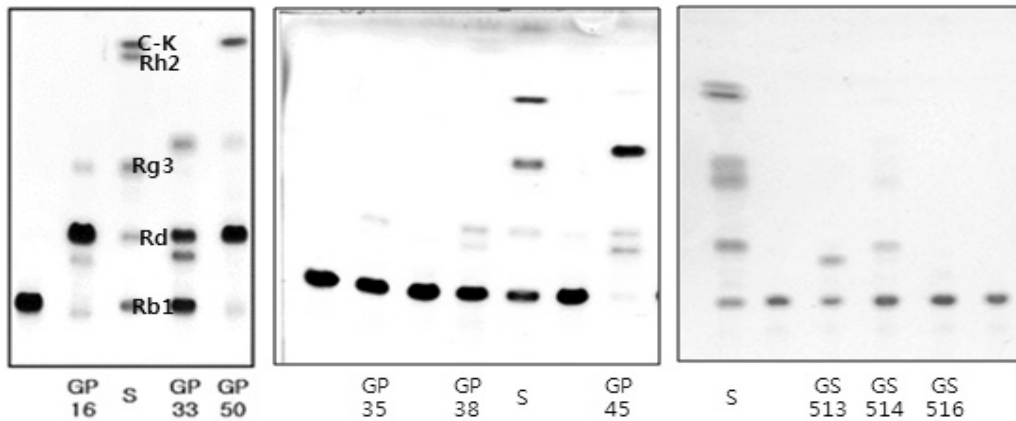


Fig. 4a. Transformation of ginsenoside Rb₁ by soil microorganisms.

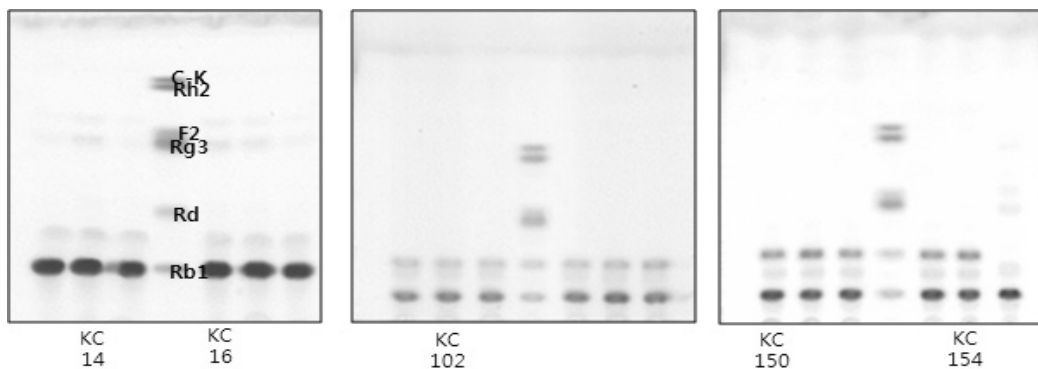


Fig. 4b. Transformation of ginsenoside Rb₁ by lactic acid bacteria isolated from Kimchi.

Ginsenoside Rg3, Rh2 및 compound K는 인삼사포닌 중에서 가장 주목을 받는 minor사포닌이다. Ginsenoside F2는 C-20과 C-3의 당 가수분해를 통하여 각각 ginsenoside Rh1과 compound K를 생성할 수 있다. 따라서 ginsenoside F2로의 전환 활성이 양호한 *C. leidyia* GP45균주와 Rg3생산균주 *M. esteraromaticum* GS514를 ginsenoside Rb1의 전환연구에 사용하였다.

2) *C. leidyia* GP45균주에 의한 Ginsenoside Rb1의 전환

TLC분석결과를 통하여 ginsenoside Rb1은 여러 가지 다양한 사포닌으로 변환되는 것을 관찰할 수 있으며 특히 *Caulobacter leidyia* GP45에 의하여 ginsenoside F2로, *Sphingomonas echinoides* GP50에 의하여 compound K로, *Lactobacillus brevis* KC-154균주에 의하여 ginsenoside Rd로, *Microbacterium esteraromaticum* GS514균주에 의하여 미약하지만 ginsenoside Rg3로 전환되는 것을 발견하였다(Fig. 5). Ginsenoside Rb1은 *C. leidyia* GP45균주의 배양액과 각각 12시간 간격으로 총 96시간 반응시켰다 (Fig. 5).

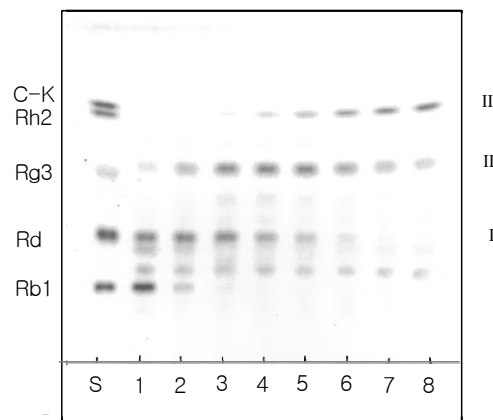


Fig. 5. TLC analyses of time-course transformation of ginsenoside Rb1 by *Caulobacter leidyia* GP45. Developing solvent: CHCl₃/MeOH/H₂O (65:35:10, by vol., lowerphase). S: saponin standards

TLC상에서 ginsenoside Rb1은 반응 36시간에 대부분 분해가 되었고 ginsenoside Rd와 R_f값이 standard Rd보다 약간 위인 NMR 스펙을 통하여 동정이 된 ginsenoside F2 (no data)는 그 함량이 점차적으로 많아졌다가 감소하였으며 compound K는 반응 48시간부터 지속적인 증가를 보여주었다. HPLC분석에서도 같은 결과를 나타냈다(Fig. 6).

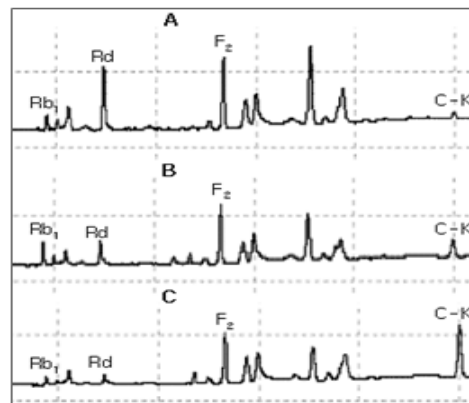


Fig. 6. HPLC profiles of metabolites of ginsenoside Rb1 by *Caulobacter leidyia* GP45 A: 36 h; B: 60 h; C: 84 h.

Ginsenoside Rb1, Rd, F2 및 compound K의 규칙적인 양적인 변화는 ginsenoside Rb1은 *C. leidyia* GP45 균주에 의해 Rb1→Rd→F2→compound K의 순으로 분해되는 것을 말해준다.

3) *M. esteraromaticum* GS514 균주에 의한 Rb1의 전환

인삼에는 사포닌, 단백질, 아미노산, 알칼로이드, 지질, 정유, 유기산, 페놀계 화합물, 폴리사세칠렌, 다당류, 조섬유, 비타민 등 다양한 성분들이 존재하지만 그 중에서도 인삼사포닌이 인삼의 가장 중요한 약리활성 성분으로 인정되고 있으며 항발암과 항암, 항피로, 면역기능 조절작용, 간기능 보호, 항당뇨, 항스트레스, 뇌기능 항진 등 활성들이 보고되고 있다. 인삼사포닌은 자연계에 존재하는 많은 배당체 화합물과 마찬가지로 aglycone에 연결된 당에 대한 선택적 가수분해를 통하여 만들어진 minor 사포닌이 기존에 대량 존재하는 major 사포닌에 비해 흡수나 약효 면에서 훨씬 뛰어난 효과를 나타내고 있다. 따라서 기존에 대량 존재하는 major 사포닌으로부터 효능이 더욱 뛰어난 minor 사포닌으로의 전환연구가 활발히 진행되고 있으며 물리적, 화학적, 효소학적, 미생물적인 다양한 방법들이 사용되고 있다. 본 연구에서는 인삼근권 토양과 각종 발효된 김치에서 esculin 발색법을 이용하여 β -glucosidase 활성 균주를 분리하고 ginsenoside Rb1과 반응시켜 사포닌 전환균주를 선발하였으며 TLC분석을 통하여 ginsenoside Rb1을 각각 Rd, F2, Rg3, compound K 및 gypenoside XVII 등 사포닌으로의 전환능력을 확인하였다. 그중 인삼근권 토양에서 분리한 *Caulobacter leidyia* GP45 균주와 *Microbacterium esteraromaticum* GS514 균주는 ginsenoside Rb1을 compound K와 ginsenoside Rg3로 전환시켰으며 HPLC분석을 통하여 Rb1→Rd→F2→compound K 및 Rb1→Rd→Rg3의 순으로 분해되는 것을 확인하였다. Ginsenoside Rb1은 *M. esteraromaticum* GS514균주의 배양액과 2시간 간격으로 총 10시간 반응시켰다 (Fig. 7).

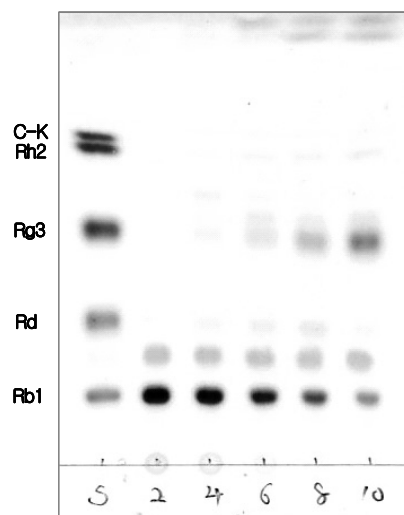


Fig. 7. TLC analyses of time-course transformation of ginsenoside Rb1 by *M. esteraromaticum* GS514. Developing solvent: CHCl₃/MeOH/H₂O (65:35:10, by vol., lowerphase). S: saponin standards.

Ginsenoside Rb1은 *M. esteraromaticum* GS514균주에 의하여 신속하게 분해되었다. TLC분석을 통하여 ginsenoside Rb1은 주로 ginsenoside Rd, Rg3, F2 및 R_g값이 매우 큰 aglycone으로 추정되는 물질로 전환되는 것을 관찰할 수 있었으며 그중에서도 상당량의 Rg3를 생성하는 것을 관찰할 수 있었다.

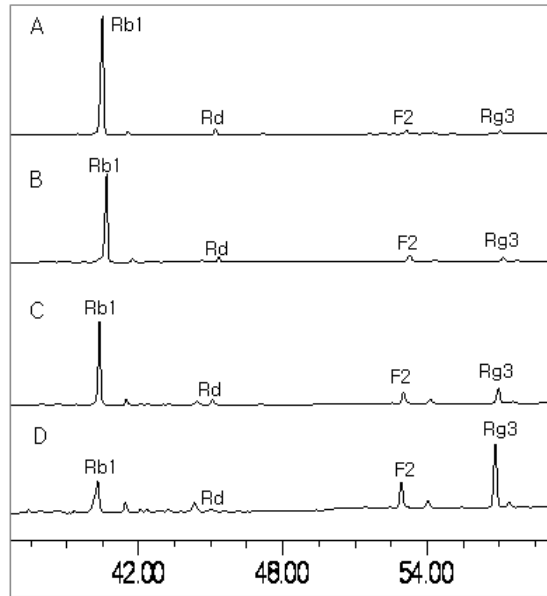


Fig. 8. HPLC profiles of metabolites of ginsenoside Rb1 by *M. esteraromaticum* GS514. A: 2 h; B: 4 h; C: 6 h; D: 8 h.

반응시간에 따른 HPLC분석(Fig. 8)에서 TLC분석결과와 마찬가지로 주로 반응기질 Rb1외에 분해산물 Rd, F2 및 Rg3 peak를 관찰할 수 있었으며 Rb1의 전환은 주로 Rb1→Rd→Rg3의 순으로 분해되는 것을 알 수 있다.

미생물에 의한 major사포닌의 modification은 많은 연구가 되었지만 ginsenoside Rg3에 대한 연구는 아주 미비하였다. 본 연구팀은 많은 균주의 screening을 통하여 ginsenoside Rg3 생산균주 *M. esteraromaticum* GS514를 분리하였고 ginsenoside Rb1에 대한 전환 pathway를 규명하였으며 NMR분석을 통하여 Rg3는 20(S)-Rg3(no data)임을 밝혔다. Ginsenoside Rg3 생산균주 *M. esteraromaticum* GS514의 분리는 고순도 20(S)-Rg3의 생산에 있어서 중요한 가치를 가질 것으로 사료된다.

2. 돌의의 사포닌 변환을 통한 고기능 인삼사포닌의 생산

1) *Aspergillus* 속 효소를 이용한 돌의 사포닌 gypenoside V의 변환

여러 다양한 식물들이 사포닌을 가지고 있지만 인삼의 사포닌으로 잘 알려진 triterpenoid dammrane 계열의 사포닌은 인삼 이외의 식물에서는 거의 찾아볼 수 없다고 알려져 있다. 하지만 돌외라는 식물에는 gypenoside라고 불리는 triterpenoid dammarane 계열의 사포닌이 존재하며 본 연구에서는 돌외에 함유되어진 protopanaxadiol계의 사포닌을 기질로 여러 미생물로부터 유래한 효소를 이용해 고부가가치의 인삼사포닌으로 변환을 하고자 하였다. TLC분석 결과를 통해 gypenoside V가 다양한 사포닌으로 변화 되는 것을 확인 할 수 있다. gypenoside V는 돌외사포닌의 대표적인 major사포닌으로 그 구조는 인삼의 ginsenoside Rb1과 매우 유사하다. *Aspergillus*속 미생물 효소를 통해 gypenoside V가 비록 미약하지만 Rd로 변환되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 9). HPLC분석(Fig. 10)에서도

TLC분석결과와 마찬가지로 주로 반응기질 Gypenoside V가 → Rd 분해되는 것을 알 수 있었다. 이는 *Aspergillus*속 미생물 효소가 gypenoside V가 가지고 있는 Rhamnose를 분해하는 활성을 가지고 있다고 추측되어진다. Gypenoside V의 경우 C-20위치에 Glu-Rha가 결합되어 있어 ginsenoside Rd로의 변환을 위해서는 반드시 α -L-Rhamnosidase활성이 있어야 할 것으로 판단되어진다.

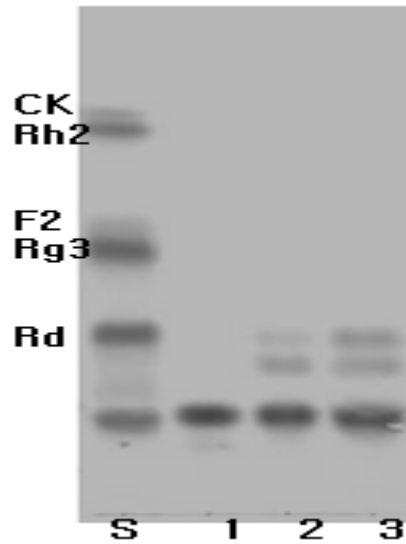


Fig. 9. TLC analyses of time-course transformation of Gypenoside by crude enzyme Developing solvent: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:35:10, by vol., lowerphase). S: saponin standards. 1:1h, 2:12h, 3:24h.

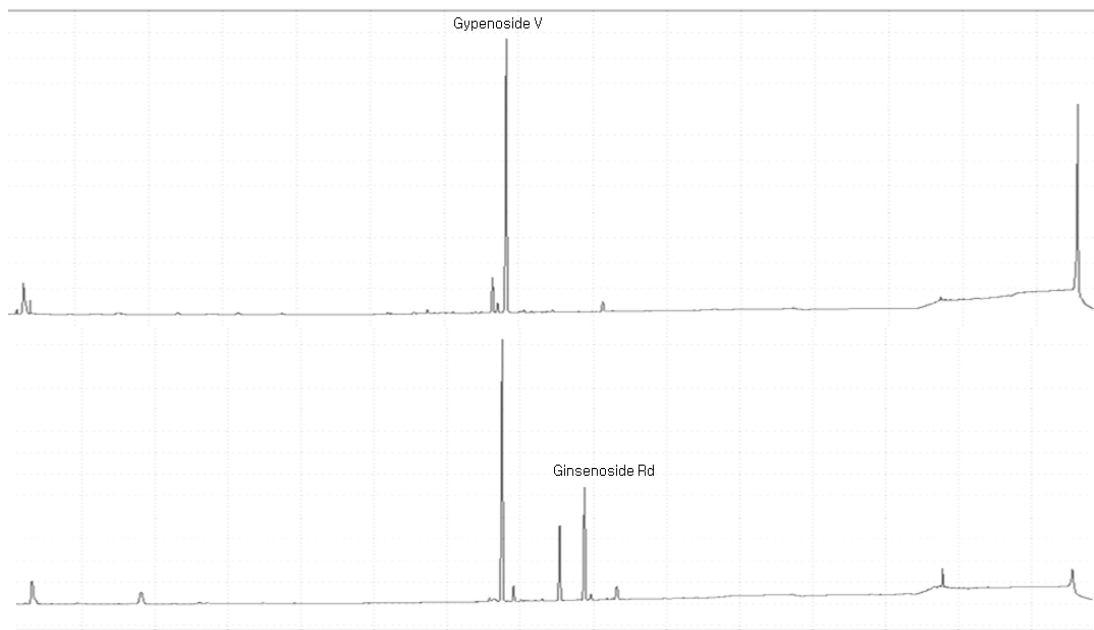


Fig. 10. HPLC analysis of metabolites of gypenoside V Crude enzyme.

2) *Aspergillus* 속 효소를 이용한 돌의 사포닌 gypenoside XVII의 변환

Gypenoside XVII는 인삼의 ginsenoside Rd와 유사한 구조를 가진 사포닌으로 C-3에 Glu 한 분자와 C-20에 Glu 두 분자가 결합한 구조를 가지고 있다. 따라서 3번과 20번 위치에 결합한 glucose의 분해를 통해 minor ginsenoside를 생성할 수 있다. 본 연구에서는 강한 β -glucosidase활성을 가진 것으로 알려진 *Aspergillus* 속 미생물 효소를 이용하여 Gy XVII를 변환 시켰다. 이를 TLC 및 HPLC로 확인한 결과 Gypenoside XVII는 ginsenoside F2를 거쳐 인삼의 최종 대사산물 중 하나로 알려진 Compound K로 변환되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 11).

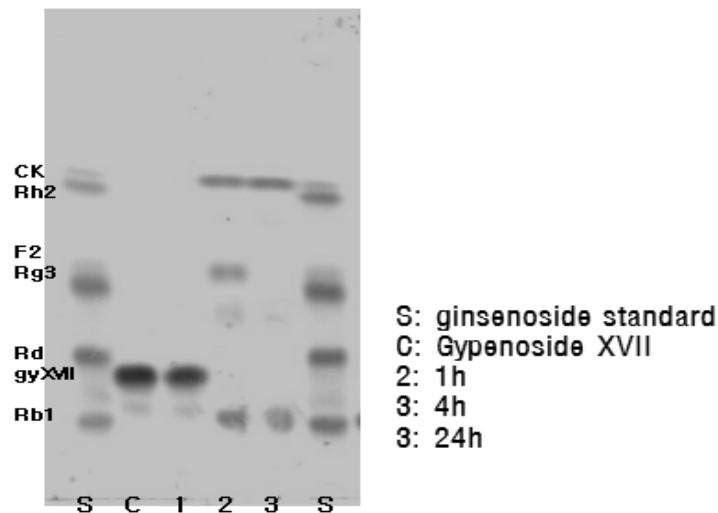


Fig. 11. TLC analyses of time-course transformation of Gypenoside XVII by crude enzyme Developing solvent: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:35:10, by vol., lowerphase).

3) *M. esteraromaticum* GS514균주에 의한 gypenoside V의 전환

GS514 균주는 인삼의 ginsenoside Rb1을 Rg3로 바꾸는 특이적인 활성을 가진 균주이다. 돌의 사포닌은 인삼의 ginsenoside와 유사하기 때문에 GS514 균주자체의 활성이 gypenoside에도 영향이 있을 것이라고 추측되어 연구를 진행 하였다. 앞서 설명한 것과 같이 gypenoside V를 Rd로 분해하기 위해서는 α -L-Rhamnosidase이 필요하다. 따라서 GS514균주를 배양하면서 효소를 유도하기 위해 유도물질로 단당류를 첨가하였으며 그 결과 Rhamnose를 첨가한 처리구에서의 반응에서 gypenoside V가 gypenoside가 Rd로의 변환됨을 확인 할 수 있었다. 또한 사전연구를 통하여 GS514 균주가 염에 특이적인 활성을 가지는 것이 보고되어 NaCl의 첨가를 통하여 효소활성을 증가시켜 반응을 시켜 본 결과 GS514균주를 통해 최종적으로 ginsenoside Rg3가 생성되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 12). 이 결과는 인삼의 ginsenoside Rb1이 Rg3로 변환되는 것과 유사한 반응이라고 보여진다. 더불어 GS514균주는 강한 glucosidase 및 rhamnosidase활성을 가지고 있고 인삼의 사포닌 분해 외에도 돌의 사포닌을 인삼의 minor사포닌으로 분해 시키는 것으로 판단되어 향후 인삼사포닌을 생산하는데 유용할 것으로 보인다.

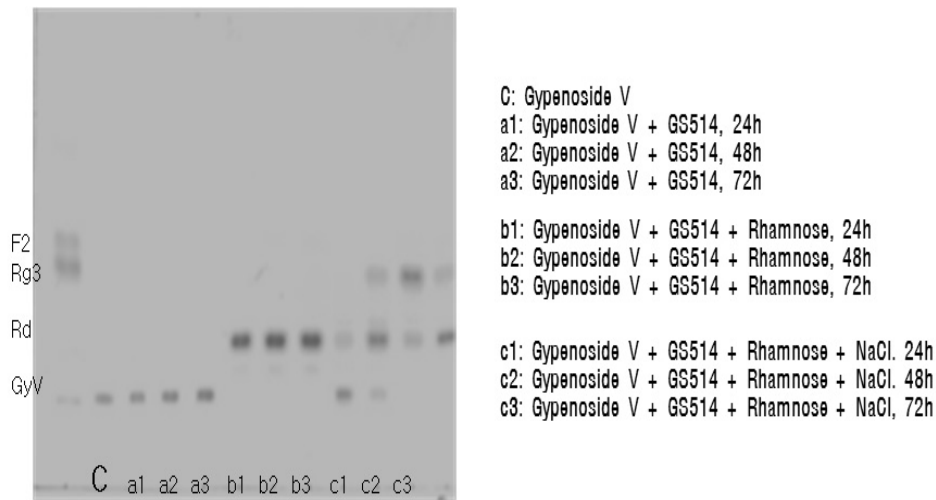


Fig. 12. TLC analyses of time-course transformation of Gypenoside by GS514 Developing solvent: CHCl₃/MeOH/H₂O (65:35:10, by vol., lowerphase).

사 사

본 연구는 21세기 프론티어연구개발사업 자생식물이용기술개발사업(code #PF06222-00)의 지원으로 수행된 것으로, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Cheng L. Q., Kim M. K., Lee J. W., Lee Y. J., Yang D. C., 2006. Conversion of Major Ginsenoside Rb(1) to Ginsenoside F(2) by *Caulobacter leidyia*. *Biotechnol. Lett.* 28, 1121-1127.
- Chi H, Ji G. E., (2005). Transformation of ginsenosides Rb1 and Re from *Panax ginseng* by food microorganisms. *Biotechnol Lett.* 27(11):765-771.
- Chi H, Kim D. H., Ji G. E., (2005). Transformation of ginsenosides Rb2 and Rc from *Panax ginseng* by food microorganisms. *Biol Pharm Bull.* 28(11):2102-2105.
- Dong A. L., Ye M., Guo H. Z., Zheng J. H., Guo D., 2003. Microbial transformation of ginsenoside Rb₁ by *Rhizopus stolonifer* and *Curvularia lunata*. *Biotechnol. Lett.* 25, 339-344.
- Im KS, Chung HY, Park SH, Je NK (1995) Anticancer effect of the hydrolyzed monoglucoginsenoside of total saponin from ginseng leaf. *Korean J. Ginseng Sci.*, 19: 291-294.
- Joo C. N., Kwak H. S., (1988). The Effect of Ginseng Saponin Fraction on Antioxidant Activity of α -Tocopherol. *Korean J. Ginseng Sci.* 12(2):128-134.
- Karikura M, Miyase T, Tanizawa H, Taniyama T, Takino Y. (1991). Studies on absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. VI. The decomposition products of ginsenoside Rb2 in the stomach of rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 39(2):400-4.

- Kim D. J.), Seong G. S., Kim D. W., Go S. L., Jang J. C., 2004. Antioxidative Effects of Red Ginseng Saponins on Paraquat-induced Oxidative Stress. *Korean J. Ginseng Res.* 28(1): 5-10.
- Kim N. D., Kim E. M., Kang K. W., Cho M. K., Choi S. Y., Kim S. G., 2003. Ginsenoside Rg3 inhibits phenylephrine-induced vascular contraction through induction of nitric oxide synthase. *Brit. J. Pharmacol.* 140, 661-670.
- Lee H. U., Bae E. A., Han M. J., Kim D. H., 2005. Hepatoprotective effect of 20(S)-ginsenosides Rg3 and its metabolite 20(S)-ginsenoside Rh2 on tert-butyl hydroperoxide-induced liver injury. *Biol Pharm Bull.* 28, 1992-1994.
- Li x, Wan H. G. Lu D. Q, Wei P.(2003). Advance of Research on Antitumour Activity of Ginsenosides. *Chinese J Bioproc Eng.* 1(2): 13-17
- Mochizuki M., Yoo Y. C., Matsuzawa K., 1995. Inhibitory Effect of Tumor Metastasis in Mice by Saponins, Ginsenoside Rb2, 20(R)- and 20(S)-Ginsenoside Rg3, of Red ginseng. *Biol. Pharm. Bull.* 18, 1197-1202.
- Park J. H. (2004) Sun ginseng-A new processed ginseng with fortified activity. *Food Industry and Nutrition.* 9: 23-27.
- Park S. Y., Bae E. A., Sung J. H., Lee S. K., Kim D. H. (2001), Purification and characterization of ginsenoside Rb1-metabolizing β -glucosidase from *Fusobacterium* K-60, a human intestinal anaerobic bacterium. *Biosci Biotechnol Biochem.* 65(5):1163-1169.
- Saito H, Yoshida Y, Takagi K. (1974). Effect of Panax Ginseng root on exhaustive exercise in mice. *Jpn J Pharmacol.* 24(1):119-27.
- Shibata, S., Ando, T., Tnaka, O. (1966). Chemical studies on the oriental plant drugs. XVII. The prosapogenin of the ginseng saponins (ginsenosides-Rb1, -Rb2, and -Rc). *Chem. Pharm. Bull.* 14(10): 1157-1161.
- Tanizawa H., Karikuma M., Miyase T., Takono Y. (1993). Studies on the metabolism and/or decomposition and distribution of ginsenoside Rb2 in rats. *Proc. 6th Int. Ginseng Symp.* Seoul: p.187-194.
- Takino Y. (1994). Studies on the pharmacodynamics of ginsenoside-Rg1, -Rb1 and -Rb2 in rats. *Yakugaku Zasshi.* 114(8):550-564.
- Teng R. W., Li H. Z., Wang D. Z., He Y. N., Yang C. R. (2002). NMR Complete Assignments of Three Protopanaxadiol Bisdesmosides. *Chinese J. Magn. Reson.* 19(1):25-32.
- Wang BX, Cui JC, Liu AJ, Wu SK. (1983). Studies on the anti-fatigue effect of the saponins of stems and leaves of panax ginseng (SSLG). *J Tradit Chin Med.* 3(2):89-94.
- Wang T. F., Meng M. Z., 1999. Experiment for Immunity Effects of Ginsenoside Rg 3. *Zhong Guo Yao Ke Da Xue Xue Bao* 2, 55-57.
- Xie J. T., Mehendale S. R., Li X, Quiqq R, Wang X, Wang C. Z., Wu J. A., Aung H. H., A Rue P, Bell G. I., Yuan C.S., (2005). Anti-diabetic effect of ginsenoside Re in ob/ob mice. *Biochim Biophys Acta.* 1740(3):319-25.
- Xu Q. F., Fang X. L., Chen D. F. (2003). Pharmacokinetics and bioavailability of ginsenoside Rb1 and Rg1 from *Panax notoginseng* in rats. *J Ethnopharmacol.* 84:187-192
- Zhang C. Z., Yu H. S., Bao Y. M., An L. J., Jin F. X.,(2001). Purification and Characterization of Ginsenoside- β -Glucosidase from Ginseng. *Chem. Pharm. Bull.* 49(7):795-798.