

생물반응기를 이용한 인삼사포닌 전환 생리활성물질 대량생산  
한방바이오(주) : 인준교\*, 이범수, 김은정, 최광태, 민진우<sup>1)</sup>, 양덕춘<sup>1)</sup>

### Mass Production of Physiological Active Compounds by Bioconversion using Bioreactor

HanbangBio Co., Ltd., <sup>1)</sup>KyungHee University

Jun Gyo In\*, Bum Soo Lee, Eun Jeong Kim, Kwang Tae Choi, Jin Woo Min, Deok Chun Yang

#### 실험목적 (Objectives)

인삼 사포닌은 뛰어난 임상적 생리활성을 가지고 있다. 인삼사포닌은 구조적으로 steroid골격을 갖고 있는 triterpenoid에 glucose, arabinose, xylose, rhamnose 등 당이 결합되어 생성된 배당체로서 4단계 사포닌인 protopanaxadiol(PPD), protopanaxatriol(PPT), 및 5단계 사포닌인 oleanane계 사포닌으로 구분된다. 항암, 항암 전이, 면역증강, 간기능보호, 혈관확장, 항피로, 항스트레스, 항당뇨, paraquat 유도 산화적 스트레스에 대한 항산화작용 등 여러 면에서 우수한 활성을 나타낸다. 본 연구에서는  $\beta$ -glucosidase활성을 나타내는 미생물을 이용하여 Rg3, Rh2, compound K 등 생리활성이 뛰어난 minor saponin을 고순도로 생산하는 것을 목적으로 생물반응기(bioreactor)를 이용하여 대량생산을 위한 기초자료를 획득하기 위하여 수행하였다.

#### 재료 및 방법 (Materials and Methods)

##### ○ 실험재료

- 사포닌 전환을 위하여 사용한 홍삼엑스(고형분 65% 이상, 조사포닌 함량 70 mg 이상)는 30% 주정으로 추출한 것을 사용하였음.

##### ○ 실험방법

- 유산균의 배양배지인 MRS나 일반 미생물 배양배지인 LB 배지를 사용하여 18L bioreactor에서 배양을 하였음.
- Bioreactor에서 반응시킨 산물의 정성분석을 위해서 반응산물을 160 ml 수포화 부탄올로 3회 반복 추출하고, 45°C에서 감압 농축한 후 잔여물은 소량의 이동상으로 용해하여 silica gel column (5×28 cm)에 흡착시키고  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  (9:3:1, v/v, 하층) 혼합용매를 이동상으로 20~25 ml씩 분취하여 사용하였음.
- TLC plate에 0.6 cm 간격으로 spotting하고  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  (65:35:10, v/v, 하층) 혼합용매로 5.5 cm 전개한 후 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 을 분무하여 110°C에서 가열하여 발색시켜 관찰하였음.
- HPLC분석은 C18(250×4.6 mm, ID 5  $\mu\text{m}$ ) column을 사용하고 이동상은 acetonitrile (solvent A)과 증류수(solvent B)를 사용하여 분리함. 시료 주입량은 20  $\mu\text{l}$ , 유속은 1.6 ml/min, UV detector로 203 nm에서 측정하였음.

저자 연락처 (Corresponding author) : 인준교 E-mail : jgin@ibiopia.com Tel : 031-281-3054

- NMR분석을 통한 구조분석 : TLC분석을 통하여 순수하게 표준품 ginsenoside Rg<sub>3</sub>와 동일한 R<sub>f</sub>값을 가지는 사포닌으로 분리된 분획만 모아 감압농축하고 pyridine-d<sub>5</sub>에 용해시켜 <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR를 수행하고 기존의 문헌 data와 비교하여 구조동정을 하였음.

### 실험결과 (Results)

- 사포닌 전환 균주의 생물반응기 시운전
  - 유산균의 배양배지인 MRS나 일반 미생물 배양배지인 LB 배지를 사용할 경우 비용이 많이 들기 때문에 전환 사포닌 원료의 경제성이 떨어진다. 본 연구에서는 최소 영양분과 당성분을 이용하여 18L bioreactor에서 홍삼농축액과 공동배양을 하여 균주의 성장을 검토하였다.
  - 경제성이 있는 배양배지 선발을 위해서 다양한 당원을 사용하여 실험하여 최적 당밀배지를 선발하였으며, 최적 배양조건 및 성장량을 조사를 지속적으로 반복실험을 통하여 재현성을 확인하고 있다. 또한 working volume 1,000 L 이상의 bioreactor 시스템 시운전을 실시하였다.
- Bioreactor를 이용한 인삼전환사포닌의 발효 생산성 분석
  - 18 L Bioreactor에서 미생물과 반응시킨 산물의 사포닌 전환 정성분석을 위해서 반응산물을 160 ml 수포화 부탄올로 3회 반복 추출하고, 45°C에서 감압 농축한 후 잔여물은 소량의 이동상으로 용해하여 silica gel column (5×28 cm)에 흡착시키고 CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (9:3:1, v/v, 하층) 혼합용매를 이동상으로 20~25 ml씩 분취하여 사용하여 TLC와 HPLC분석을 실시하였다. 그 결과 ginsenoside-Rg<sub>3</sub>, -Rd, F<sub>2</sub>의 사포닌 전환반응이 관찰되었다.
- 전환산물의 NMR분석을 통한 구조분석
  - 미생물효소 전환산물 중 ginsenoside Rb<sub>3</sub>의 구조분석을 위해서 <sup>13</sup>C-NMR분석을 실시한 결과 105.1 ppm과 106.1 ppm에서 C-3에 연결된 inner-β-D-glucose와 outer-β-D-glucose의 anomeric 탄소 signal이 관측이 되었고 126.2 ppm와 130.7 ppm에서 측쇄 부분의 C-24와 C-25의 olefinic carbon의 signal이 관측이 되었으며, C-3의 signal은 88.9 ppm, C-20의 signal은 73.0 ppm에서 관측이 되어 전환산물 중에 20(S)-ginsenoside Rg<sub>3</sub>가 존재함을 확인하였다.