

*Terrabacter tumescens*가 생산하는 β -glucosidase에 의한 Ginsenoside Rb1의 전환

경희대학교 한방재료가공학과, 바이오피아 생명공학연구소¹⁾
박민주, 김호빈, 인준교¹⁾, 이범수¹⁾, 양덕춘*

Microbial Conversion of Ginsenoside Rb1 with the β -glucosidase Produced by *Terrabacter tumescens*

Dept. Oriental Medicinal Materials and Processing, Kyung Hee University

¹⁾Institute of Biotechnology, Biopia Co., Ltd

Min-Ju Park, Jun-Gyo In¹⁾, Bum-Soo Lee¹⁾, Deok-Chun Yang*

연구목적

인삼은 예부터 한방에서 널리 사용되어져 온 대표적인 약용식물 중의 하나로서, 인삼의 대표적인 유효성분으로는 인삼 saponin인 ginsenoside로 현재까지 38종이 밝혀져 있다. 이 중 5종의 major ginsenosides (ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc, Re, Rg₁)가 전체 ginsenoside의 80% 이상을 차지하고 있지만, 최근 수십 년간 Rd, Rg₃, Rh₂ 그리고 compound-K 등의 minor ginsenoside의 뛰어난 약리효능이 밝혀지고 있다. 이러한 연구결과가 발표됨에 따라 보다 우수한 약리 작용을 갖는 특정 ginsenoside의 함량 비율을 증가시킬 수 있는 방법이 요구되고 있으며 지금까지 산처리, 열처리, 효소처리 등의 방법이 행해져왔다. 이들 중 효소처리 방법은 다른 처리들과는 달리 특정 위치의 sugar-hydrolysis에 의한 minor ginsenoside를 생산하기 때문에 보다 효율적인 방법이라 하겠다. 따라서 본 연구에서는 인삼의 근권토양으로부터 선발한 토양미생물 중 β -glucosidase를 분비하는 균주를 이용하여 ginsenoside Rb₁의 전환 양상을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

○ 실험재료

- 균주 : 인삼토양으로부터 Esculin Agar법을 이용하여 β -glucosidase를 분비하는 미생물을 선발, 분리하여 실험에 사용하였다.
- ginsenoside Rb₁ : 멸균 증류수에 ginsenoside Rb₁ (M.W.=1109)을 넣어 1000ppm의 농도로 만든 후 0.2 μ m filter로 여과멸균 하여 Rb₁용액을 얻었다.

○ 실험방법

- 균주의 배양 : Nutrient Agar Plate에서 29 $^{\circ}$ C, 48h 배양한 후, 새로운 Plate에 계대하여 single colony를 유도하였다. 이 single colony를 Nutrient Broth에 옮겨 shaking incubator에서 29 $^{\circ}$ C, 24h 동안 배양하였다.
- 균주의 동정 : 16S rDNA 증폭을 위해서 9F와 1512R primer를 이용하였다. Sequencing 후에, GenBank에 있는 data base를 이용하여 분리된 균주와 가장 가까운 type strain을 결정하였다. 또한, phylogenetic tree를 그리기 위해 분리된 균주와 가까운 species들의 Type strain의 16S rDNA 염기서열을 Clustal X program을 이용하여 alignment하였다. Alignment 후 생기는 Gap은 BioEdit program을 이용하여 삭제하고

주저자 연락처 : 양덕춘

E-mail : dcyang@khu.ac.kr

Tel : 031-201-2688

편집하였다. 균주들의 진화과정을 추적하는 작업은 Kimura two-parameter model을 이용하였고, MEGA 3 Program의 neighbour-joining 방법으로 계통분류학적 위치를 결정하였다.

- ginsenoside Rb₁의 전환 반응 : 1.5ml microtube에 균주배양액 200μl와 ginsenoside Rb₁ 용액 200μl를 혼합하여 넣은 후, 29°C Shaking incubator에서 48h 동안 현탁배양 하였다. 반응 48h후, 수포화 BuOH로 반응액을 2회 세척하여 상층액만 따서 농축한 다음, 다시 MeOH로 용해하였다.

- TLC 분석 : TLC는 silica gel 60F₂₅₄ plate (Merck)를, 전개용매로는 CHCl₃/MeOH/H₂O (65:35:10 v/v/v, lower phase)를 사용하였다. 반응액을 spotting하여 전개한 후 10% H₂SO₄ 용액에 담갔다가 구워 결과를 얻었다.

- HPLC 분석 : TLC 결과에 이어 좀 더 확실한 물질분석을 위해 HPLC (FUTECS) 분석을 시행하였다.

결과 및 고찰

인삼의 근권토양으로부터 분리된 β-glucosidase 생산균주 (GS653)는 동정 결과 *Terrabacter tumescens* DSM 20308^T와 98.4%의 similarity를 보여 *Terrabacter tumescens*에 속하는 strain으로 밝혀졌다 (Fig. 1). 이 균주를 ginsenoside Rb₁과 반응시켜 전환유무를 실험해 본 결과, 어떤 minor ginsenoside로도 전환시키지 못한 GS522 균주와는 달리, GS653 균주는 ginsenoside Rb₁을 minor ginsenoside인 Gypenoside-XVII, ginsenoside Rd, F₂, compound-K 등으로 전환시킨다는 것이 확인되었다 (Fig. 2).

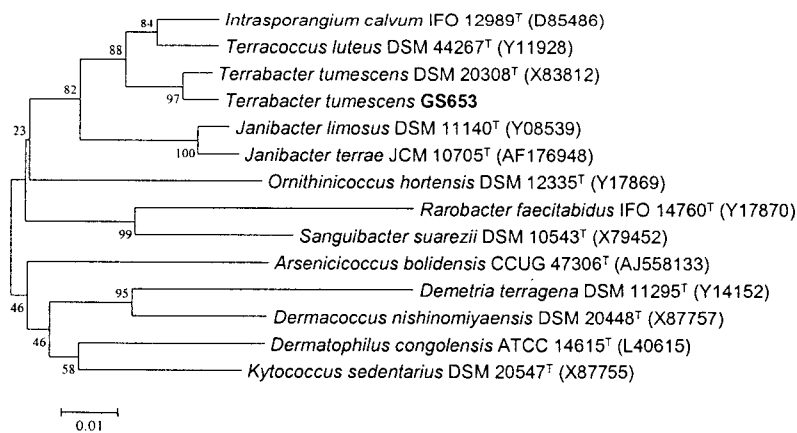


Fig. 1. Phylogenetic tree of Rb₁-converting strain, *Terrabacter tumescens* GS653.

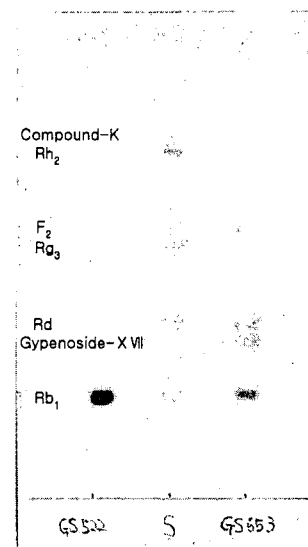


Fig. 2. TLC chromatogram of the ginsenoside-Rb₁ metabolites formed by β-glucosidase producing bacterium, strain GS653.