

Rhizopus sp.가 生産하는 酵素에 依한 人蔘 Saponin의 轉換
(제 1 보) Ginsenoside-Rb₁에서 Ginsenoside-Rd로의
轉換確認

金相達·徐正埏*

韓國人蔘煙草研究所·*慶北大學校 食品加工學科
(1982년 9월 24일 수리)

Conversion of Ginseng Saponin with the Enzyme
Produced by *Rhizopus* sp.

(Part 1) Confirmation of Conversion of
Ginsenoside-Rb₁ to Ginsenoside-Rd

Sang-Dal Kim and Jung-Hwn Seu*

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute

*Dept. of Food Technology, Kyung-Pook National University

(Received September 24, 1982)

Abstract

Among 12 kinds of ginsenosides in ginseng saponin, ginsenoside-Rb₁ was contained the most abundantly. But ginsenoside-Rd which is similar to ginsenoside-Rb₁ in structure, was known to be superior to ginsenoside-Rb₁ pharmaceutically. In order to convert ginsenoside-Rb₁ into ginsenoside-Rd by microbial enzyme treatment, a *Rhizopus* sp. was selected among various strains of molds found in rotten ginseng roots. Enzyme was prepared from the extract of wheat bran koji culture by ammonium sulfate precipitation (1.0 sat'd) and succeeding ammonium sulfate fractionation method (0.6-0.9 sat'd).

For the purpose of use as substrate, saponins were purified by the several purification steps from alcohol extract of red ginseng roots. We obtained the total saponin which was composed of 36.5% of ginsenoside Rb₁, 12.2% of ginsenoside-Rd and other ginsenosides. For increase of ginsenoside-Rb₁ component ratio, we also obtained further purified ginsenoside-Rb group saponin containing 54.5% of ginsenoside-Rb₁, 1.1% of ginsenoside-Rd and other ginsenosides from purified the total saponin.

In the enzymatic reaction system including the total saponin or the ginsenoside-Rb group saponin, we confirmed the specific conversion of ginsenoside-Rb₁ to ginsenoside-Rd proportionally and no change of any other ginsenoside patterns by thin layer chromatography and high performance liquid chromatography.

緒 論

Garrigues¹⁾, 朝比奈²⁾, 近藤³⁾ 등에 의해 밝혀진 人蔘 saponin이 Petkov⁴⁻⁵⁾ 나 Brekhan⁶⁻⁷⁾ 에 의해 人蔘의 藥効成分이라고 확인된 후 Shibata 研究陣⁸⁻²⁰⁾ 에 의해 ginsenoside-Ro에서 ginsenoside-Rh까지 12種의 人蔘 saponin이 分離, 命名되어 그 構造까지 밝혀졌으며 Elyakov²¹⁻²⁶⁾ 등에 의해서도 比較確認되었다.

人蔘 saponin의 藥効面에 대해서는 수많은 報告가 있으나²⁷⁻²⁹⁾ 거의 total saponin³⁰⁻³¹⁾ 이나 diol-saponin, triol-saponin³²⁻³³⁾ 수준에서만 연구되어 오다가 수년전부터 Yamamoto³⁴⁾ 등에 의해 分離된 ginsenoside別로 연구되기 시작되었다. 單一物質로 分離된 各 ginsenoside들의 藥理作用에 대한 연구결과 중에서 人蔘 saponin 중 그 組成比率가 가장 큰 ginsenoside-Rb₁에 비해 구조가 유사한 ginsenoside-Rd가 藥理効能面에서 훨씬 우수하다는 事實이 plasma corticosteron의 增加³⁵⁻³⁶⁾ 蛋白質合成의 促進³⁷⁾ 神經成長 因자의 促進³⁸⁾ 學習効果의 增加³⁹⁾ 등 많은 研究⁴⁰⁾ 에서 밝혀졌다.

따라서 본인들은 微生物性 酵素를 이용하여 人蔘 saponin 중 가장 含量이 많은 ginsenoside-Rb₁을 saponin 구조의 C-20위치에 β-1,6 결합된 β-glucose 한 分子를 가수분해함으로써 藥効面에서 보다 우수한 ginsenoside-Rd로 轉換하고자 하였으며 본 연구에서는 人蔘腐敗菌중에서 선별된 *Rhizopus* 속의 한 菌株가 ginsenoside-Rb₁ 만을 선택적으로 ginsenoside-Rd로 轉換함을 확인하여 우선 발표하고자 한다.

材料 및 方法

使用菌株

腐敗된 貯藏水蔘에서 分離한 12種의 絲狀菌 중 ginsenoside-Rb₁에서 ginsenoside-Rd로의 轉換率이 강력한 *Rhizopus* 속의 한 菌株 (*Rhizopus japonicus* 로 同定) 를 선별하였다.

酵素의 調製

wheat bran培地를 사용하여 30℃에서 5일간 배양한 培養物을 5배 量의 M/100 acetate bu-

ffer(pH 5.0)로 4℃에서 5時間 抽出한 후 濾過, 遠沈하여 얻은 상등액을 ammonium sulfate 完全飽和로 침전시켜 8,540×g로 沈澱蛋白을 모았으며 0.02M acetate buffer(pH 6.0)로 dialysis한 후 다시 ammonium sulfate 分別沈澱法으로 粗精製하여 specific activity가 높은 0.6飽和에서 0.9飽和사이의 沈澱蛋白을 모아 같은 buffer로 dialysis한 후 酵素液으로 사용하였다.

基質 saponin의 精製

紅尾蔘을 70% EtOH로 65℃에서 4회 抽出한 후 減壓濃縮하여 얻은 수분함량 35% 정도의 紅蔘 extract를 材料로 하여 fig. 1과 같은 과정으로 정제하였다. 즉 紅蔘 extract에 同量의 증류수를 加하여 pH7.2로 조절한 후 同量의 benzene으로 4회 脫脂하고 그 水層을 同量의 n-butanol로 5회씩 추출한 후 butanol層을 합하여 증류수로 2회 洗滌하여 60℃에서 減壓濃縮

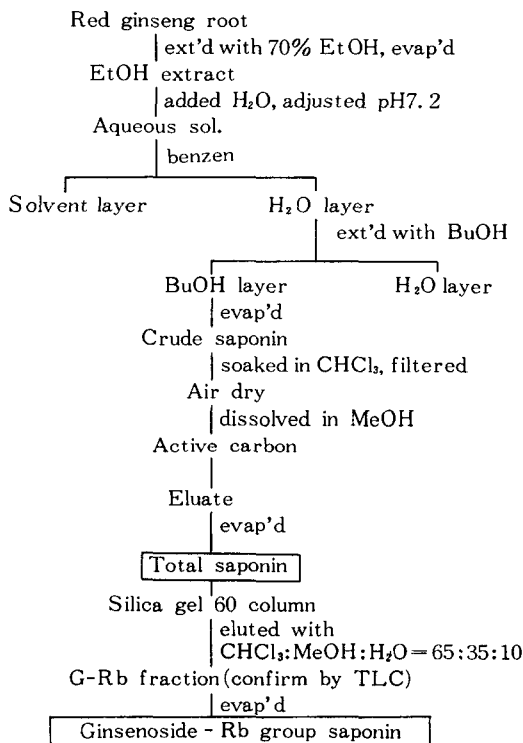


Fig 1. Purification Schem of the Total Saponin and the Ginsenoside-Rb group Saponin.

하므로써 황색의 粗 saponin을 얻었다. 이 粗 saponin을 chloroform으로 週 1회씩 4회 沈出, 濾過한 후 chloroform층을 제거하고 風乾시켰으며, 이 粉末을 다시 methanol에 용해시켜 活性炭 column에 통과시킨 후 감압농축하여 백색의 total saponin을 얻었다. 한편 진정한 基質인 ginsenoside-Rb₁의 組成比率를 增加시키기 위해서 더욱 精製한 ginsenoside-Rb group saponin은 上記의 total saponin을 chloroform:methanol:water=65:35:10(下層)의 용매 system으로 Shibata등¹¹⁾의 방법을 변형하여 silica gel 60 column chromatography로 fractionation하여 分離 精製하였다.

Ginsenoside의 定量

본 실험을 위해 精製한 基質 saponin의 各 ginsenoside別 含量을 조사하기 위해 HPLC를 이용하여 table 1과 같은 조건으로 chromatography한 후 얻은 chromatogram을 standard ginsenoside들로 미리 작성한 calibration curve에 의해 換算하였다.

Table 1. The Condition of HPLC* for Analysis of Ginsenosides in Ginseng Saponin.

Model	: Waters Associate Model 244
Column	: μ Bondapak carbohydrate analysis (4mmx30cm)
Solvent	: Acetonitril:H ₂ O:BuOH (80:20:15)
Detector	: Differential Refractometer (R401)
Sensitivity	: 8X
Flow rate	: 1.5ml/min
Chart speed	: 1cm/min
Inj. Vol.	: 25 μ l

*High Performance Liquid Chromatography

酵素處理 및 Ginsenoside 轉換確認

Saponin을 酵素處理함으로써 일어나는 各 ginsenoside 含量의 변화를 조사하기 위해 pH5.0의 McIlvaine buffer에 용해한 2% total saponin 또는 ginsenoside-Rb group saponin을 基質로 하여 同量의 酵素液과 40°C에서 14時間 酵素作用시킨 후 fig 2와 같은 방법으로 試料 saponin을 抽出하였으며 이 saponin용액을 thin layer chromatography(TLC)와 high performance liquid chromatography(HPLC)를 이용하여 table 2 및 table 1과 같은 조건으로 chromatography하였다.

nin 또는 ginsenoside-Rb group saponin을 基質로 하여 同量의 酵素液과 40°C에서 14時間 酵素作用시킨 후 fig 2와 같은 방법으로 試料 saponin을 抽出하였으며 이 saponin용액을 thin layer chromatography(TLC)와 high performance liquid chromatography(HPLC)를 이용하여 table 2 및 table 1과 같은 조건으로 chromatography하였다.

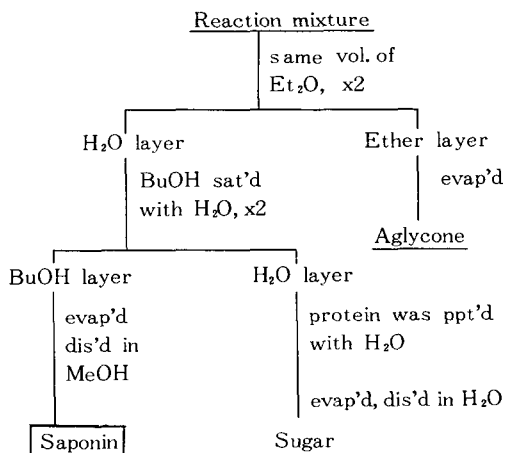


Fig 2. Schematic Diagram for Extraction of Saponin from Reaction Mixture.

Table 2. The Condition of TLC* Scanning for Analysis of Ginsenosides in Ginseng Saponin.

TLC	
Plate	: Silica gel 60 (Merck) 0.25mm, 20x20cm
Solvent	: CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (65:35:10)
Coloring reagent	: 10% H ₂ SO ₄
Heating	: 130°C, 5min.
Densitometry	
Model	: Shimadzu Dual-Wavelength TLC Scanner (CS-910)
Wave length	: λ_s ; 530nm λ_R ; 780nm
Mode	: Reflection Linear Scanning
Scanning speed	: 40mm/min
Chart speed	: 48mm/min
Sensitivity	: 2X

*Thin Layer Chromatography

蛋白質 定量

酵素蛋白質의 定量은 280 nm의 紫外部 吸收測定法으로 측정한후 bovine serum albumin 으로 作成한 calibration curve로 換算하였다.

試 藥

標準ginsenoside들은 日本 Shoji 教授가 分離精製한 純品ginsenoside를, acetonitril등 HPLC용 溶媒는 Mallinckrodt社의 LC용 試藥을 사용하였으며 HPLC용 試料應過는 Waters社의 Millipore여과장치를 이용했다.

結果 및 考案

人蔘Saponin의 Ginsenoside別 組成比率

실험의 基質로 사용하기 위해 精製한 total saponin 및 ginsenoside-Rb group saponin의 各 ginsenoside別 組成比率를 알기 위해 HPLC를 이용해 얻은 chromatogram의 ginsenoside別 peak area를 calibration curve로 換算하여 table 3과 같은 결과를 얻었다.

Table 3. Composition Ratio* of Ginsenosides in the Purified Ginseng Saponin.

Ginsenoside	M. W.	Composition Ratio(%)	
		T. S.**	G-Rb. S.**
-Ro	957	3.2	7.3
-Ra	1237	1.5	7.1
-Rb ₁	1117	36.4	54.5
-Rb ₂	1087	11.1	21.3
-Rc	1087	14.2	7.7
-Rd	955	12.2	1.1
-Re	955	11.2	0.9
-Rf	809	1.8	0
-Rg ₁	809	7.6	0.2
-Rg ₂	793	1.3	0

* Composition amount was determined by calibration curve of standard ginsenosides from chromatogram of HPLC

** T. S.:the total saponin

G-Rb. S.:the ginsenoside-Rb group saponin

이 結果에서 보는 바와 같이 total saponin의 경우 진정한 基質인 ginsenoside-Rb₁의 含量이 36.4%로써 가장 높은 組成比率이라는 점이나 다른 ginsenoside들의 含量比率도 人蔘saponin의 各 ginsenoside 含量을 조사한 洪⁴⁰⁾의 보고나 紅蔘 extract의 HPLC pattern을 조사한 成⁴¹⁾의 보고와 거의 동일한 전형적인 total saponin을 얻었다. 더욱이 ginsenoside-Rb group saponin의 경우에는 ginsenoside-Rb₁의 組成比率이 54.5%까지 增加되어 본 연구의 목적을 위한 基質로써는 아주 적합한 ginsenoside-Rb₁ 高含量의 saponin을 얻을 수 있었다. 한편 ginsenoside-Rd의 組成比率은 total saponin에서는 12.2% 이었으나 ginsenoside-Rb group saponin에서는 불과 1.1 %밖에 함유되어 있지 않았다.

TLC에 의한 Ginsenoside pattern 調査

人蔘 saponin에 本 酵素를 濃度별로 處理할 경우 基質로 사용한 total saponin 및 ginsenoside-Rb group saponin의 各 ginsenoside別 pattern이 어떻게 변화되는가를 thin layer chromatography로 調査하여 본 결과 total saponin의 변화는 fig 3과 같고 ginsenoside-Rb group saponin의 경우는 fig 4와 같다.

Fig 3, fig 4에서 보는 바와 같이 total saponin 및 ginsenoside-Rb group saponin 모두 ginsenoside-Rb₁과 ginsenoside-Rd를 제외한 다른 ginsenoside pattern에는 酵素使用濃度の 증가에도 불구하고 아무런 변화가 없고 오직 ginsenoside-Rb₁만이 酵素濃度 增加에 따라 점차 減少하였고 반면에 ginsenoside-Rd의 含量은 점차 增加하였다. 따라서 β -1,6 glucosidase의 일종인 本 酵素는 人蔘 saponin 구조의 C-20 위치에 결합된 β -1,6 결합의 glucose 한 分子를 선택적으로 분해함으로써 ginsenoside-Rb₁만을 ginsenoside-Rd로 轉換함을 확인할 수 있었다.

人蔘saponin의 酵素分解에 對한 研究는 지금까지 거의 없는 실정이며 다만 Yosioka⁴²⁾나 Kohda⁴³⁾ 등에 의해 細菌自體나 市販 粗 pecti-

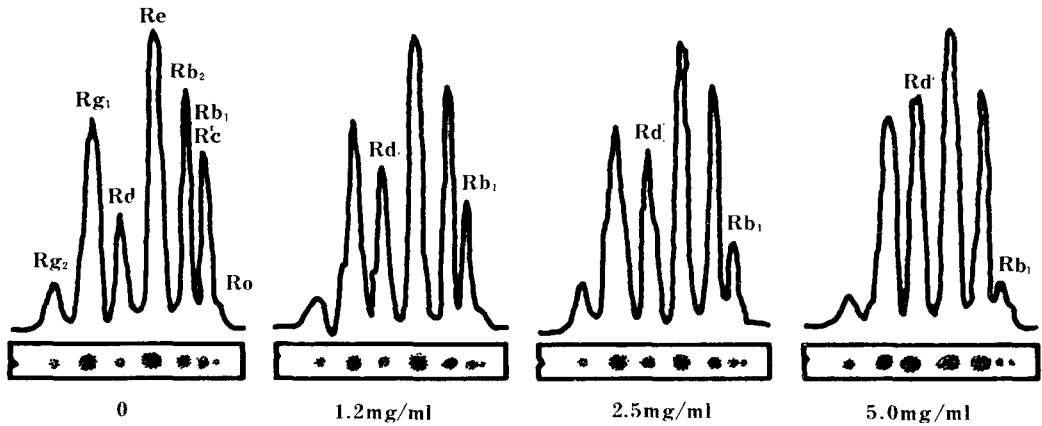


Fig 3. TLC Densitogram of the Total Saponin after Treatment of various Concentrations of the Enzyme.

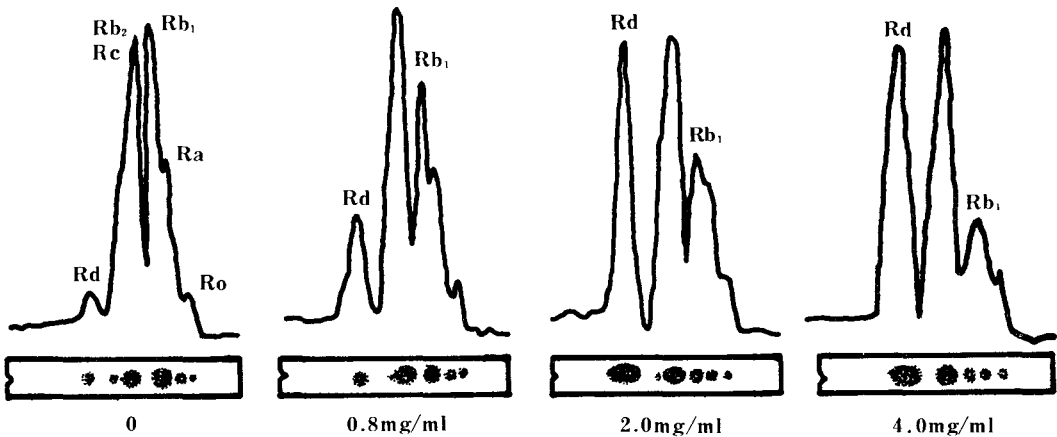


Fig 4. TLC Densitogram of the Ginsenoside-Rb group Saponin after Treatment of Various Concentrations of the Enzyme.

nase를 사용하여 saponin에 결합된 糖의加水分解가 시도되었으나 이는 모두 saponin 구조연구를 위한 aglycon의 생성을 목적으로 한 실험에 불과할 뿐 이 실험에서와 같이 saponin의 특정部位 결합糖을 특이적으로 가수분해함으로써 다른 종류의 saponin으로 전환하고자 한 報告는 전무하다. 더욱이 乳酸菌이나 酵母 등의 培養으로도 人蔘 saponin의 ginsenoside pattern에 전혀 변화가 없었다는 梁⁴⁶, 朴⁴⁵, 成⁴¹의 報告등에 미루어 볼 때 이 결과는 人蔘 saponin을 酵素處理함으로써만 가능한 선택적 전환의 첫 시도인 것이라 볼 수 있다.

HPLC에 의한 ginsenoside 전환의 確認

本 酵素가 total saponin 및 ginsenoside-Rb group saponin의 각 ginsenoside 含量 중 ginsenoside-Rb₁이나 ginsenoside-Rd 이외의 다른 ginsenoside pattern에도 변화를 일으키는 가를 더욱 분명히 확인하기 위하여 HPLC를 이용해 調査한 결과는 다음 fig.5와 fig.6과 같이 buffer만을 사용한 酵素無處理에 비해 ginsenoside-Rb₁ 含量만이 선택적으로 減少되고 반면에 ginsenoside-Rd만이 비례적으로 增加되었을 뿐 다른 ginsenoside 含量은 거의 변화가 없음

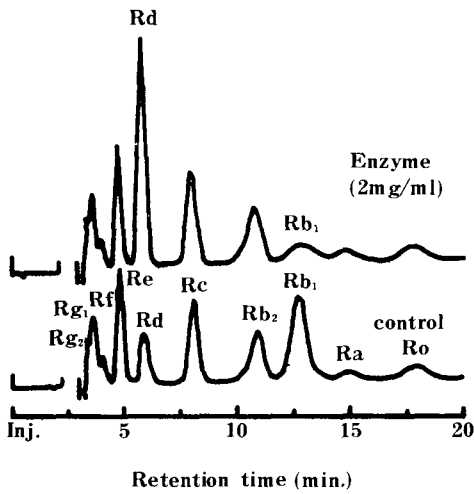


Fig 5. Change of Ginsenosides pattern in the Total Saponin by the Enzyme Treatment.

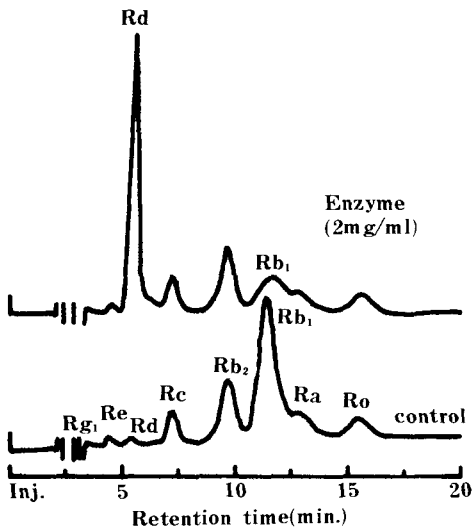


Fig 6. Change of Ginsenosides pattern in the Ginsenoside-Rb group saponin by Enzyme Treatment.

을上記 TLC결과에 이어 확인할 수 있었다.

要 約

微生物性 酵素를 이용하여 人蔘 saponin 中 組成比率이 가장 큰 ginsenoside-Rb₁을 藥効面에서 보다 우수한 ginsenoside-Rd로 轉換하고자 人蔘腐敗菌 中 *Rhizopus* 屬의 한 菌株를 選定

하여 이 菌株에서 얻은 酵素를 ammonium sulfate 分別沈澱法으로 粗精製하여 사용하였다.

基質로 사용하기 위해 紅尾蔘 extract로 부터 ginsenoside-Rb₁이 36.4%, ginsenoside-Rd 가 12.2% 等の 組成比率을 갖인 total saponin 을 精製하였고 이어 ginsenoside-Rb₁의 含量을 增加시키기 위해 더욱 精製한 결과 ginsenoside-Rb₁이 54.5%, ginsenoside-Rd가 1.1%인 ginsenoside Rb group saponin을 얻었다.

이들 基質 saponin에 本 酵素를 作用시켜 본 결과 두 基質 모두 다른 ginsenoside pattern 에는 變化없이 ginsenoside-Rb₁만이 선택적으로 減少하고 반면에 ginsenoside-Rd의 含量이 비례적으로 增加됨을 TLC 및 HPLC의 方法으로 調查하였으며 이로써 酵素에 依한 人蔘 saponin의 선택적轉換 可能性을 確認하였다.

參 考 文 獻

- 1) Garriques, S. S. : *Ann. Chem. Pharm.*, **90**, 231 (1854)
- 2) 朝比奈泰彦, 田口文太 : *日本藥學雜誌*, **26**, 549 (1906)
- 3) 近藤平三郎, 天野梅太郎 : *日本藥學雜誌*, **35**, 779 (1920)
- 4) Petkov, W. : *Arzneim. Forsch.*, **9**, 305 (1959)
- 5) Petkov, W. : *Arzneim. Forsch.*, **11**, 418 (1961)
- 6) Brekhman, I. I. : *Med. Sci. Service*, **4**, 17 (1967)
- 7) Brekhman, I. I. and Dardymov, I. V. : *Ann. rev. of Pharm.*, **9** (1967)
- 8) Shibata, S., Fujita, M. and Itokawa, H. : *Tetrahedron Lett.*, **10**, 419 (1962)
- 9) Shibata, S., Tanaka, O., Nagai, M. and Ishii, T. : *Chem. Pharm. Bull.*, **11**, 762 (1963)
- 10) Shibata, S., Tanaka, O., Soma, K., Iida, Y., Ando, T., and Nakamura, H. : *Tetrahedron Lett.*, **3**, 207 (1965)
- 11) Shibata, S., Tanaka, O., Ando, T., Sado, M., Tsushima S. and Ohsawa, T. : *Chem. Pharm Bull.*, **14**, 595 (1966)
- 12) Shibata, S., Ando, T. and Tanaka, O. : *Chem. Pharm. Bull.*, **14**, 1157 (1966)

- 13) Tanaka, O., Nagai, M., Ohsawa, T., Tanaka, N., and Shibata, S.: *Tetrahedron Lett.* **5**, 391 (1967).
- 14) Iida, Y., Tanaka, O., and Shibata, S.: *Tetrahedron Lett.* **52**, 5449 (1968).
- 15) Ando, T., Tanaka, O., and Shibata, S.: *Shoyakugaku Zasshi*, **25**, 28 (1971).
- 16) Nagai, M., Tanaka, O., and Shibata, S.: *Chem. Pharm. Bull.*, **19**, 2349 (1971).
- 17) Nagai, M., Ando, T., Tanaka, N., Tanaka, O., and Shibata, S.: *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 1212 (1972).
- 18) Ohsawa, T., Tanaka, N., Tanaka, O., and Shibata, S.: *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 1890 (1972).
- 19) Tanaka, O., Nagai, M., Ohsawa, T., Tanaka, N., and Shibata, S.: *Chem. Pharm. Bull.* **20**, 1204 (1972).
- 20) Sanada, S., Kondo, N., Shoji, J., Tanaka, O., and Shibata, S.: *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 421, 2407 (1974).
- 21) Elyakov, G. B., Strigina, L. I., Uvarova, N. I., Dzizenko, A. K., and Kochetkov, N. K.: *Tetrahedron Lett.*, **48**, 3591 (1964).
- 22) Elyakov, G. B., Uvarova, N. I., and Gorshkova R. P.: *Tetrahedron Lett.*, **51**, 4669 (1965).
- 23) Elyakov, G. B., Dzizenko, A. K. and Elkin, Y. N.: *Tetrahedron Lett.*, **1**, 141 (1966).
- 24) Dzizenko, A. K., Elkin, Y. N., Shapkina, E. V., Strigina, L. I., and Elyakov, G. B.: *Dokl. Akad. Nauk. USSR*, **173**, 1080 (1967).
- 25) Elyakov, G. B., Strigina, L. I., Shapkina, E. V. and Dzizenko, A. K.: *Tetrahedron Lett.*, **24**, 5483 (1968).
- 26) Shaposhnikova, G. I., Uvarova, N. I. and Elyakov, G. B. *Carbohydr. Res.*, **15**, 319 (1970).
- 27) Popov, I. M., and William, J. G.: *Am. J. of Chinese Med.*, **1**, 263 (1973).
- 28) Bae, H. W., *Abstracts of Korean Ginseng Studies*, The Research Institute, Office of Monopoly ROK, 95~217 (1975).
- 29) 韓國人蔘史編纂委員會, 韓國人蔘史(下), 韓國人蔘耕作組合, 185~580 (1980).
- 30) Hiai, S., Oura, H., Tsukada, K., and Hirai, Y.: *Chem. Pharm. Bull.*, **19**, 1656 (1971).
- 31) Nabata, H., Saito, H. and Takagi, K.: *Japan J. Pharmacol.*, **23**, 29 (1973).
- 32) Takagi, K., Saito, H., and Nabata, H.: *Japan J. Pharmacol.*, **22**, 245 (1972).
- 33) Takagi, K., Saito, H. and Tsuchiya, M.: *Japan J. Pharmacol.*, **22**, 339 (1972).
- 34) Yamamoto, M., Kumagai, A., and Yamamura, Y.: *Proc. Int'l. Ginseng Symposium*, Office of Monopoly, 129 (1974).
- 35) Hiai, S., Yokoyama, H., and Oura, H.: *Proc. 3rd. Int'l. Ginseng Symposium*, Korea Ginseng Research Institute, 77 (1980).
- 36) Hiai, S., Yokoyama, H., Oura, H., and Yano, S.: *Endocrinol.*, **26**, 661 (1979).
- 37) Oura, H., Hiai, S., and Okada, Y.: *J. Biochem.*, **77**, 1057 (1975).
- 38) Saito, H., and Lee, Y.: *Proc. 2nd. Int'l. Ginseng Symposium*, Korea Ginseng Research Institute, 109 (1978).
- 39) Kaku, T., Miyata, T., Uruno, T., Sako, I. and Kinoshita, A.: *Arzneim. Forsch.*, **25**, 539 (1975).
- 40) 洪淳根, 朴恩侁, 李春寧, 金明運: *藥學會誌* **23**, 181 (1979).
- 41) 成絢淳, 南相烈, 金奇哲: *韓農化誌*, **23**, 228 (1980).
- 42) Yosioka, I., Sugawara, T., Imai, K., and Kitagawa, I. *Chem. Pharm. Bull.*, **19**, 2418 (1972).
- 43) Kohda, H. and Tanaka, O.: *Yakugaku Zasshi*, **95**, 246 (1975).
- 44) 梁宰源, 劉太鍾: *高麗人蔘學會誌*, **3**, 113 (1979).
- 45) 朴世浩, 劉太鍾, 李錫健: *高麗人蔘學會誌* **6**, 17 (1982).