

# 人蔘사포닌 및 人蔘水溶性 抽出物이 비둘기 가슴근육으로부터 分離된 Malate Dehydrogenase에 미치는 安定化效果

金斗河, 申文僖, 洪淳根  
韓國人蔘煙草研究所, 臨床研究室  
(1983년 6월 22일 접수)

## Stabilizing Effect of Ginseng Saponin and Water Extract on Malate Dehydrogenase from Pigeon Breast Muscle

Doo-Ha Kim, Moon-Hee Shin and Soon-Keun Hong  
*Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Laboratory of Clinical Research*

(Received June 22, 1983)

### Abstract

Studies were carried out to elucidate the protein stabilizing effect of ginseng. Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37) was used as a protein and the rate constant of the enzyme inactivation was determined under the heat denaturation condition. There was an optimum pH for the enzyme stability, the rate constant of the enzyme inactivation was minimum at pH 8.8. The rate constant was increased at lower and higher pH regions than the optimum pH. The inactivation reaction followed the Arrhenius law and the activation energy was measured as 36.8Kcal/mole. The reaction rate was not affected by the enzyme concentration and thus it was assumed to be unimolecular first order reaction. The water extract of red ginseng decreased the rate constant of Malate dehydrogenase under heat inactivation condition to stabilize the enzyme activity. Purified ginseng saponin also stabilized the enzyme against heat inactivation.

### I. 緒 論

人蔘은 여러가지 多様な 藥効를 나타내는 것으로 알려져 있으며<sup>1)</sup>, 民間에서 오랫동안 많이 使用되어 왔다. 또한 많은 研究者들에 의하여 人蔘의 신비한 効能이 現代科學의인 方法에 의하여 究明되고 있다. 특히 人蔘의 抗疲勞<sup>2)</sup> 및 抗스트레스<sup>3)</sup> 効果는 잘 알려져 있으며 다른 既存의 藥物과는 다른 次元에서 人蔘藥効의 特徵으로 看做된다.

本 研究에서는 人蔘의 이와같은 抗疲勞 및 抗스트레스 作用을 비롯한 여러가지 人蔘의 生理作用을 分子水準에서 그 作用樣相을 究明하기 위한 노력의 일환으로 酵素의 安定性에 미치는 人蔘의 影響을 究明하고자 하였다. 生體機能의 增加는 그 生體를 構成하는 個個의 細胞의 機能增加에 起因하는 것으로 생각할 수 있을 것이므로, 細胞의 非選擇的 酵素活性的 增加는 綜合的으로 細胞機能의 增加 및 나아가서는 生體機能의 增加로 나타날 것이 예상된다.

酵素를 비롯한 많은 種類의 蛋白質들은 DNA 遺傳情報에 의하여 生合成이 됨과 동시에 老朽化된 蛋白質分子는 蛋白分解酵素에 의하여 分解되어 없어지고 있으므로, 各酵素의 活性壽命을 延長시키면, 全体的인 酵素活性이 增加될 것으로 사료된다.

本 研究에서는 Malate dehydrogenase에 대하여 活性의 安定性を 測定함으로써, 人蔘成分이 蛋白質安定성에 미치는 效果를 究明하고자 하였다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 材 料

Malate dehydrogenase (EC 1,1,1,37 from pigeon breast muscle), oxalacetic acid, NADH 및 NAD는 Sigma社에서 구입하였다. DL-Malic acid는 Junsei chemical Co.에서 購入하였으며, 기타 一般試藥은 市販 特級을 사용하였다.

### 2. 人蔘成分의 精製

實驗에 使用한 紅蔘精은 專賣廳에서 製造하여 市販하고 있는 製品을 使用하였다. 人蔘사포닌은 常法에 따라서<sup>4)</sup> 人蔘의 에탄올 抽出物을 벤젠처리하여 脂溶性 物質을 除去한 後, 부탄올로 抽出하였고, 클로로포름으로 抽出한 후 증발 농축하고 다시 에탄올에 녹여 活性炭 칼럼에 통과하여 脫色하였다.

### 3. 實驗方法

酵素의 不活性化 速度常數는 알려진 方法에 의하여 漸近回歸法으로 測定하였다<sup>5)</sup> 즉 吸光度計의 cuvette內에서 酵素反應을 進행시키면서 熱에 의하여 酵素를 不活性化시킬 때, 吸光度가 增加되는 것을 연속적으로 기록한 후, 漸近回歸法에 의하여 그 不活性化 速度常數를 계산하였다. 이 酵素의 不活性化 反應이 單純 單分子 反應일 경우에는 反應시간 t에 대한 吸光度의 增加는 다음식과 같게 된다.

$$A = K_1 - K_2 e^{-kin t} \dots\dots\dots(1)$$

식 (1)에서 A는 吸光度를 나타내고, kin은 不活性化 速度常數를 의미한다. K<sub>1</sub> 및 K<sub>2</sub>는 常數이다. 實驗結果는 SHARP社製인 Pocket computer pc 1211을 利用하여 kin 값을 計算하였으며, 이때 kin 값을 計算하는 식은 다음과 같다.

$$kin = - \frac{1}{n} \ln \left( \frac{S_3 - S_2}{S_2 - S_1} \right) \dots\dots\dots(2)$$

식 (2)에서 n은 데이터의 갯수를 의미하고 있으며, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> 및 S<sub>3</sub>는 데이터를 순서대로 3等分하여 그 값을 합친 각각의 값을 의미한다. 이 實驗에서 吸光度의 增加가 曲線으로 나타나는 것은 酵素의 不活性化에 起因하며, 이 曲線의 휘어진 정도로부터 不活性化 速度常數를 計算하는 것이기 때문에 熱에 의한 不活性化에 의한 吸光度의 曲線의 增加 以外の 다른 要因에 의하여 吸光度가 增加하는 것을 防止하여야 한다. 따라서 室溫에서 酵素反應에 의한 吸光度 增加가 直線으로 나타나는 지를 먼저 확인하였다. 本 實驗에서는 0.5mM NAD 및 50mM DL-Malic acid를 基質로 사용할 때 吸光度 2.0이하에서는 直線의으로 나타남을 확인하였다. uv/vis spectrophotometer는 Schimadzu 190을 使用하였으며 TB 85 Thermo bath를 부착하여 cuvette의 溫度를 調節하였다.

### Ⅲ. 結果 및 考察

#### 1. 溫度 및 pH가 不活性化速度에 미치는 影響

生物學의 高分子 물질의 溫度에 대한 反應特性은 그 反應經路의 복잡성으로 인하여 一般적으로 豫測하기가 어렵다. 특히 酵素와 같이 分子量이 크면서 反應機轉이 複雑한 것은 溫度에 대한 反應이 간단하지가 않다. 따라서 酵素를 利用한 實驗에서는 基本的으로 反應速度와 反應溫度와의 關係를 究明하는 것이 一次的인 研究順序가 된다. 本研究에 있어서는 Malate dehydrogenase의 不活性化 反應速度에 미치는 溫度의 影響을 測定한 結果 58°C 에서부터 65°C에 이르는 溫度範圍에서는 反應速度는 單純增加하였으며 (Fig. 1), 活性化에너지는 36.8Kcal/mole이었다. 이것은 이미 알려진 Lipase 및 Amylase<sup>7)</sup>에서의 값과 비슷한 크기를 나타냄을 알 수 있었다.

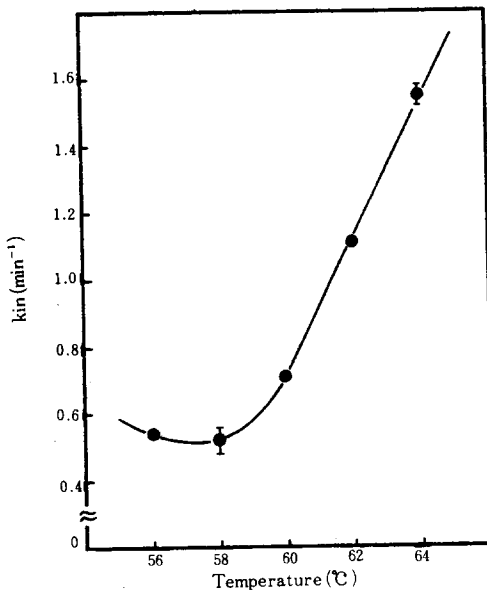


Fig. 1. The effect of temperature on the rate constant of malate dehydrogenase inactivation (Inactivation rate constant was measured at the given temperature in 0.1M sodium phosphate buffer pH 8.9. DL-malic acid and NAD was 50mM and 0.5mM respectively with 0.6u enzyme in the reaction volume of 3.0ml)

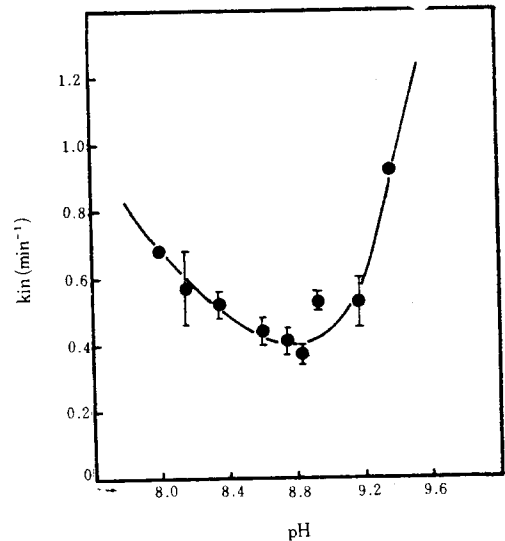


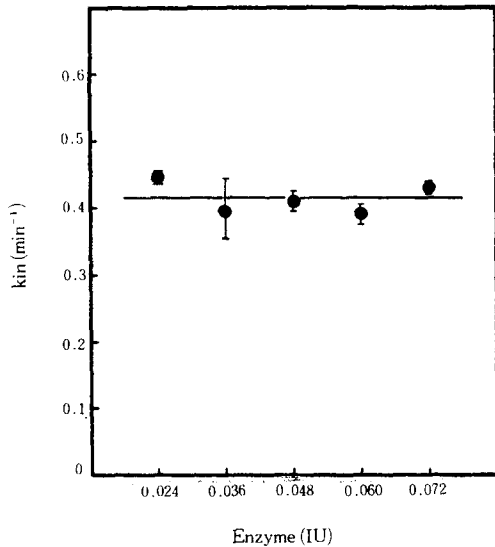
Fig. 2. The effect of pH on the rate constant of malate dehydrogenase inactivation (50mM DL-malic acid and 0.5mM NAD was used as the enzyme substrate with 0.1M sodium phosphate buffer, inactivation rate constant was measured by the asymptotic regression method described in the text. 1.2μ of enzyme was used in the reaction volume of 3ml at 55°C.)

Malate dehydrogenase의 不活性化에 미치는 pH의 影響을 조사한 結果는 Fig. 2와 같다. pH 8.8정도에서 가장 安定한 것을 볼 수 있고, 그 이상으로 pH가 增加하든가 또는 감소할 때는 不活性化 速度常數는 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이 酵素의 活性의 最適 pH가 8.3정도인 것을 감안할 때 立体構造의 安定性에 대한 最適 pH와 反應活性의 最適pH가 매우 근사한 값을 가지는 것을 알 수 있다. 또한 Fig. 2에서와 같은 모양의 pH곡선을 나타내는 것을 볼 때 최소한 3가지 이상의 電荷를 띤 酵素分子의 형태가 存在한다는 것을 의미하고 있다.

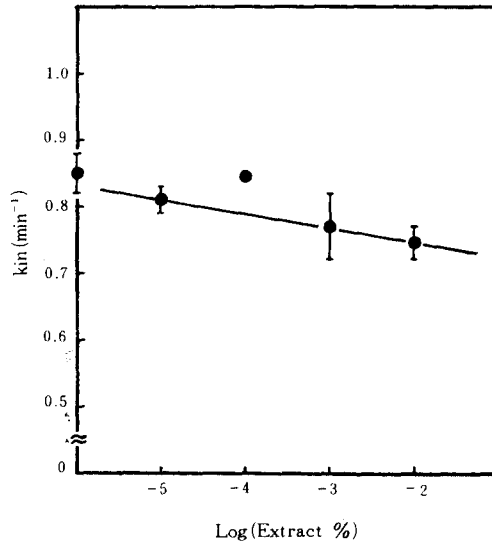
#### 2. 酵素濃度가 不活性化 反應速度에 미치는 影響

化學物質의 反應速度와 그 物質의 濃度와의 關係는 그 反應의 機轉에 의하여 結定된다. 즉 그

反應이 單純 單分子反應일 때는 濃도에 상관없이 一定한 값을 갖게 되지만, 單分子反應보다 복잡한 反應에 있어서는 反應의 겉보기反應 速度는 그 物質의 濃도에 따라서 그 값이 변하게 된다. 實驗結果 Malate dehydrogenase에 있어서는 單分子 反應으로 나타났다(Fig. 3). 또한 不活性化 反應의 經時變化도 식 (1)에 매우 잘 一致하는 것을 볼 때, 이 酵素의 不活性化 反應은 單純單分子 反應인 것으로 추정된다.



**Fig. 3. The effect of pH on the rate constant of malate dehydrogenase inactivation** (The apparent rate constant of inactivation was measured against the enzyme concentration. Unimolecular first order reaction mechanism may be suggested from this data. The apparent rate constant was determined with 50mM DL-malic acid and 0.5mM NAD in 0.1M sodium phosphate buffer pH 7.6 at 60°C.)



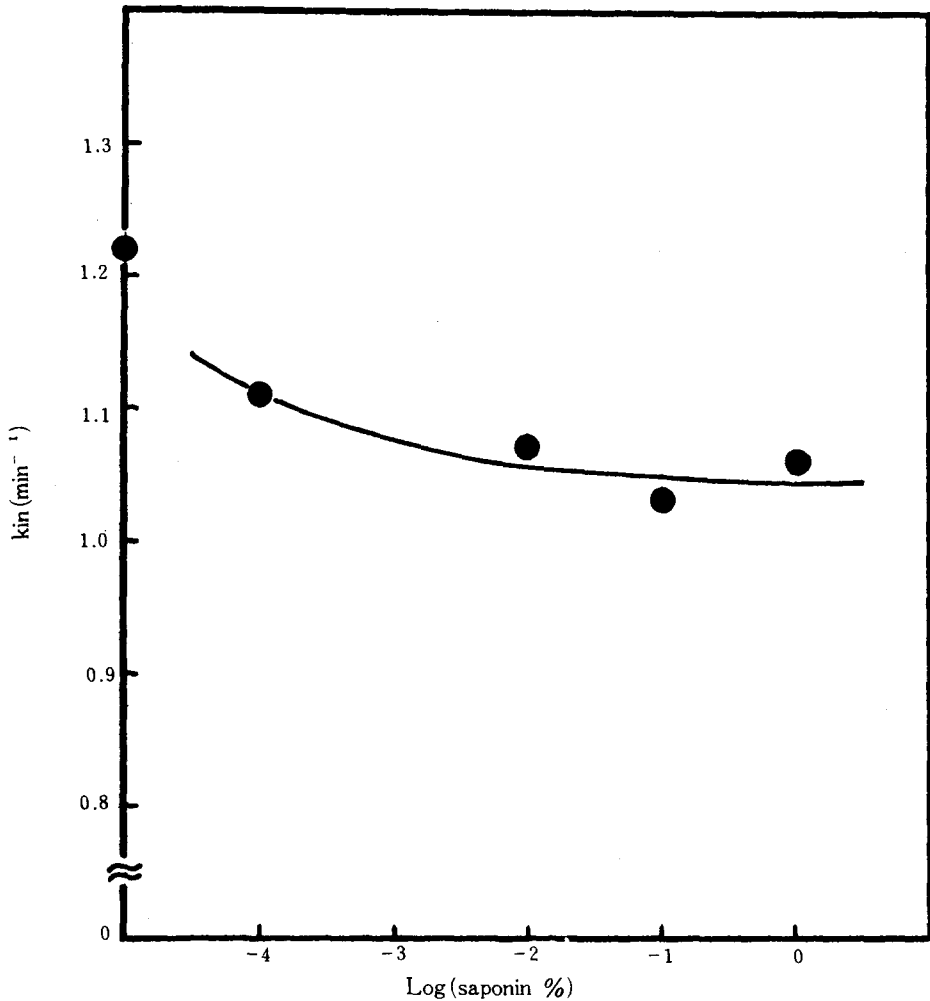
**Fig. 4. The effect of water extract of red ginseng on the stability of malate dehydrogenase.** (0.6u of enzyme was inactivated in 92mM DL-malic acid and 0.18mM NAD with 3.0 ml of 0.1M potassium phosphate buffer pH 7.7 at 65°C.)

### 3. 紅蔘의 水溶性 抽出物이 不活性化 反應速度에 미치는 影響

紅蔘의 물 抽出物이 Malate dehydrogenase의 不活性化 反應에 미치는 影響을 究明하기 위하여 紅蔘抽出物의 濃度別로 酵素의 不活性化 速度常數를 測定하였다. 그 結果 Fig. 4에서 알 수 있는 바와같이 抽出物의 濃度가 增加함에 따라서 不活性化 速度常數의 값이 감소하는 것을 알 수 있었다. 그러나 抽出物 中の 어떤 成分이 安定化 效果를 나타내는지 또는 어떠한 作用樣相으로 酵素分子가 安定化되는 것인지는 알 수 없으므로 우선 有效成分을 分離하여 그 자세한 機構을 究明하는 것이 필요한 것으로 사료된다.

### 4. 人蔘사포닌이 Malate dehydrogenase의 不活性化 反應速度에 미치는 影響

人蔘成分이  $\beta$ -D-galactosidase의 安定性을 增加시켰다는 報告가 있으며<sup>4</sup>, 前項에서도 紅蔘의 물 抽出物이 Malate dehydrogenase의 安定性을 增加시킨 것을 알 수 있었다. 따라서 本研究에서는 抽出物 中에서 사포닌 만을 精製하여 그 影響을 究明하고자 하였으며, 사포닌의 濃度別로



**Fig. 5. The effect of ginseng saponin on the stability of malate dehydrogenase** (The enzyme stock solution was dialyzed 24 hours at 0°C and diluted. 50 $\mu$ l of the enzyme was added to 2.95ml of 92mM DL-malic acid and 0.28 mM NAD in 0.1M potassium phosphate buffer pH 7.5 and incubated at 65°C.)

安定성에 미치는 영향을測定하였다. 그結果 Fig. 5에서 알 수 있는 바와 같이 사포닌濃도가增加함에 따라서 不活性化速度常數가 감소하는 것을 알 수 있었다. Malate dehydrogenase는分子량이大略 60,000에서 70,000에 이르고 있으며<sup>9-10)</sup> 2개의 subunit로 이루어진 Dimer로構成되어 있다. 이 酵素가 活性을 잃는 것은 Dimer에서 monomer로 解離하면서 일어나고 있으며<sup>9)</sup> NAD 및 NADH에 의해서 Dimer의 解離가 防止되는 것이 알려져 있다. 그 외에도 L-Malate, citrate 및 alloisocitrate는 酵素의 解離를 防止하며<sup>11)</sup> D-fructose 1,6-diphosphate는 오히려 解離를 促進하는 것으로 알려져 있다.<sup>12)</sup> 따라서 이상의 사실로 미루어 짐작하면 人蔘사포닌 또는 人蔘사포닌 試料中の 미량의 不純物이 酵素分子에 作用하여, 酵素分子의 解離를 防止 함으로써 活性의 消失을 防止하고, 그結果 酵素의 安定化 效果가 나타나는 것으로 믿어지는바 앞으로 계획적인 연구가 필요한 것으로 사료된다. Malate dehydrogenase는 構成 아미노산의 配列 및 三

次構造가 완전히 究明되어 있으며, NAD 및 NADH의 結合部位도 明確히 밝혀져 있다.<sup>12)</sup> 위에서 記述한 바와같이 酵素活性的 安定化 効果는 NAD 및 NADH의 結合에 의하여 나타나고 있으며, 이와같은 安定化 効果를 나타내는 成分은 酵素分子와 이들 核酸塩基와의 給合力을 增加시키는 性質이 있는 物質이라는 사실은 人蔘成分에 의한 安定化 効果의 樣相을 究明하는데 참고가 될 것으로 보인다. 螢光光度計를 利用하여 Malate dehydrogenase와 이들 核酸塩基와의 結合常數를 測定한 研究報告가 있으며<sup>13)</sup>, 人蔘사포닌에 있어서도, 이 方法에 準하여 核酸塩基와 酵素의 結合常數에 미치는 影響을 究明하는 것이 필요할 것으로 사료된다. 本 研究에서도 이를 시도하였으나, 형광광도계의 기계적 제약으로 인하여 성공할 수 없었다. 그러나 Stopped flow apparatus를 부착하면 측정이 가능할 것으로 믿어지므로, 계속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

#### IV. 要 約

人蔘成分에 의한 蛋白質 安定化 効果를 究明하고자 하였다. Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)의 熱變性에 대한 人蔘의 防禦 効果를 究明하기 위하여, 이 酵素의 不活性化 速度常數에 미치는 人蔘成分의 效果를 測定하였다. 酵素의 熱에 대한 安定性에는 最適pH가 存在하였으며, 그 값은 8.8이었다. pH 8.8에서 이 酵素의 不活性化 反應速度는 最低값을 나타내었다. 이 酵素의 不活性化 反應은 Arrhenius法則을 따랐으며, 反應의 活性化에너지는 36.8 Kcal/mole이었다. 不活性化 反應速度는 濃度에는 無關하였으며, 이로부터 이 酵素의 不活性化 反應은 單純單分子 反應임을 알 수 있었다. 紅蔘의 水溶性 抽出物은 熱變性으로부터 이 酵素를 安定化 시켰으며, 人蔘의 精製사포닌도 마찬가지로 熱變性으로부터 이 酵素를 安定化 시켰다.

#### 參 考 文 獻

1. 韓國人蔘耕作組合聯合會 韓國人蔘史 下卷, (1980)
2. Brekhman, I. I. et al., *Ann. Rev. Pharmacol.* 9, 419 (1969)
3. 許創龍, 金 喆: 카톨릭大學醫學部論文集, 12, 49 (1967)
4. D. H. Kim, Y. Hahn, S. K. Hong, *Arch. Pharm. Res.* 5, 45 (1982)
5. D. H. Kim, Y. Hahn, S. K. Hong, *Korean J. Biochem.* 15, 26 (1982)
6. Tanford, C., *Adv. Protein Chem.* 24, 1 (1970)
7. Sugiura M., Kurobe, M. and Tamura, S., *Chem. Pharm. Bull.* 29, 2096 (1981)
8. Murphy, W. H., Kitto, G. B., Everse, J. and Kaplan, N. O., *Biochemistry*, 6, 603 (1967)
9. Yoshida, A., *J. Biol. Chem.* 240, 1113 (1965)
10. Consiglio, E., Varrone, S., and Covelli, I., *Eur. J. Biochem.* 17, 408 (1970)
11. Cassman, M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53, 666 (1973)
12. Banaszak, L. J., Bradshaw, R. A., "The Enzymes," ed. Boyer, P. D. p. 369-396, Academic Press, N. Y. (1975)
13. Shore, J. D., Evans, S. A., Holbrook, J. J. and Parker, D. M., *J. Biol. Chem.* 254, 9059 (1979)