

人蔘 Saponin이 細菌 α -Amylase 活性에 미치는 影響

都在浩 · 金相達 · 朱鉉圭*

韓國人蔘煙草研究所

*建國大學校 農科大學

(1984년 11월 13일 수리)

Effect of Ginseng Saponin on Bacterial α -Amylase Activity

Jae Ho Do, Sang Dal Kim and Hyun Kyu Joo*

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute

*College of Agriculture, Konkuk University

(Received November 13, 1984)

In order to investigate the biological activity of ginseng saponins, the effects of ginseng saponins on the reaction catalyzed by bacterial α -amylase were studied and the results obtained were summarized as follows.

Bacterial α -amylase activity was increased by the addition of protopanaxadiol (diol), protopanaxatriol (triol) and total saponin. Preincubation of α -amylase with diol saponin at 40°C for 3 min increased α -amylase activity to the degree of 120%. In the protective effect on the heat denaturation of the enzyme, triol saponin protected the heat denaturation for 5 min at 60°C, but diol saponin accelerated the heat denaturation. The hydrolyzates of diol and triol saponin increased the enzyme activity more than the intact diol and triol saponin. In the catalysis system of bacterial α -amylase, the addition of diol and triol saponin reduced the substrate inhibition in the presence of high concentration of the substrate.

人蔘 saponin의 効能에 對해서는 細胞壽命延長効
果¹⁾, 血清 및 肝臟 cholesterol의 合成促進効果²⁻⁴⁾,
血清蛋白의 合成促進効果^{5,6)}, 核 RNA 合成促進効
果^{7,8)}等이 報告되었으며, 1960年代에는 生化學的
研究의 一環으로 生体内의 中間代謝와 密接한 關係
가 있는 酵素系에 미치는 影響에 對한 研究가 活氣
를 띠기 시작하였다. Wu⁹⁾는 人蔘뿌리의 水浸物이
動物組織에서 炭水化合物의 酵素的 加水分解를 促進
하였다고 報告하였으며, Hiai等¹⁰⁾은 protisol(人蔘
成分中의 한 物質)이 RNA polymerase活性을 50%
정도 增加시켰다고 報告하였다. 此外에도 glutamate
dehydrogenase¹¹⁾, alkaline phosphatase¹²⁾, lactate
dehydrogenase¹³⁾, aminoacyl-tRNA synthetase¹⁴⁾,
RNA polymerase¹⁵⁾, succinate dehydrogenase¹⁶⁾의
活性에 미치는 人蔘成分의 影響에 對해서 報告된
바 있으며 最近에는 ginsenoside Rb₁과 未確認物
質(ginsenoside Ra로 推定)¹⁾이 adenylyate cyclase의

活性을 促進시켰다고 報告하였다.¹⁷⁾

本 實驗에서는 人蔘 saponin의 生物學的 活性을
調査하기 위하여 bacterial α -amylase의 活性, 熱變
性, 基質沮害等에 미치는 影響을 調査하여 그 結果
를 報告하는 바이다.

재료 및 방법

α -Amylase

本 實驗에 使用된 α -amylase (from *Bacillus subtilis*, 18,000unit/g, diluted with starch)는 To-
kyo kasei kogyo Co. LTD에서 구입하여 使用하였
다.

人蔘 Saponin

人蔘 saponin은 紅尾蔘을 70% ethyl alcohol로 抽
出하여 농축한 다음 同量의 증류수를 加하고 pH를
中性으로 조절하였다. Benzene:water (1:1)로 3

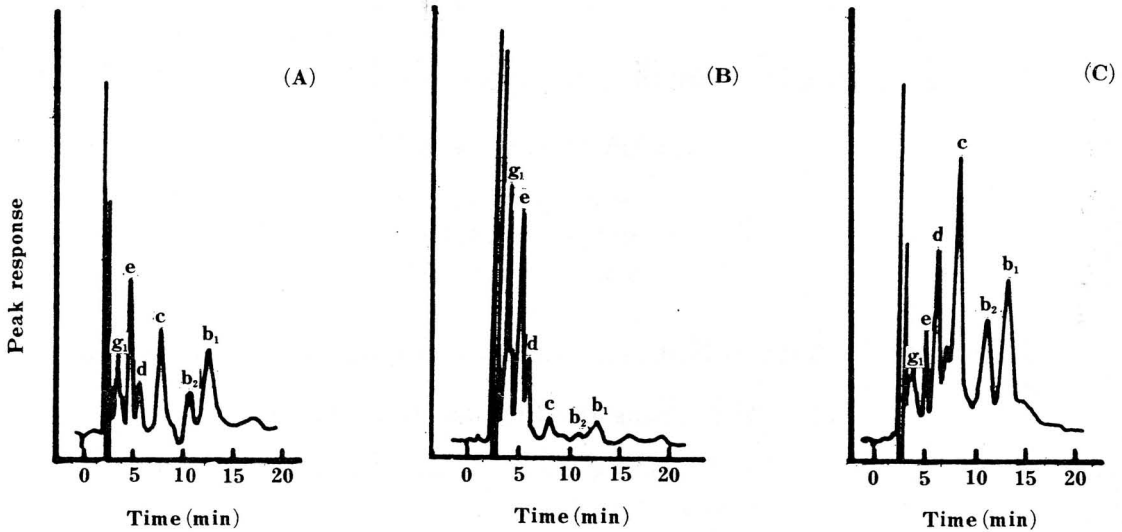


Fig. 1. HPLC chromatogram of ginsenosides of total (A), protopanaxatriol (B) and protopanaxadiol (C) saponin mixture.

Model: Waters Associate Model 244, Column: μ -Bondapak Carbohydrate analysis (3.9 mm \times 30cm), Solvent: Acetonitrile/H₂O/Butanol (80/20/15), Flow rate: 1.5ml/min Attenuation: 8X Detector: Reflective index, Chart speed: 1 cm/min, Sample: 20 μ l (5% methanol soln.)

回抽出하여 脂肪成分을 除去한 뒤 水層을 水飽和 butyl alcohol로 5回抽出하여 농축하였다. 이를 chloroform可溶性部分을 除去하고 活性炭으로 脱色시켜 total saponin으로 使用하였다. Protopanaxadiol (diol)系 및 protopanaxatriol (triol)系 saponin은 total saponin을 韓¹⁹⁾의 方法에 따라 分離하여 使用하였으며 total, diol 및 triol saponin의 HPLC chromatogram은 Fig. 1과 같다.

α -Amylase의 活性測定

α -Amylase活性은 0.1ml의 α -amylase溶液 (500 μ g/ml), 0.3ml의 McIlvaine buffer (pH 5.0), 0.5 ml의 soluble starch溶液 (1.0%), 0.1ml의 證류수 또는 0.1ml의 saponin溶液을 혼합하여 40 $^{\circ}$ C에서 3分間 反應시킨 후 DNS方法¹⁹⁾에 준하여 생성된 환원당을 540nm에서 optical density를 測定하였다.

人蔘 saponin의 酸加水分解物

Total, diol 및 triol saponin을 100, 50 및 50 μ g/ml의 濃度로 各各 調製한 後 1N-HCl을 加하여 pH를 1.5로 調整하여 37 $^{\circ}$ C에서 2時間 酸加水分解시켰다. 여기에 1N-NaOH를 加하여 中性으로 調整한 뒤 total, diol 및 triol saponin의 酸加水分解物로 使用하였다.

결과 및 고찰

α -Amylase의 活性에 미치는 人蔘 saponin의 影響

Total, diol 및 triol saponin이 α -amylase의 活性에 미치는 影響을 調査하기 위해서 各 saponin을 여러가지 濃度로 添加하여 酵素活性을 調査한 結果는 Fig. 2와 같다.

Fig. 2에서 보는바와 같이 diol系 saponin은 最終 濃度 0.01%에서 α -amylase의 活性이 約 30% 增加했으며 그 以上の 濃度에서는 오히려 酵素活性이 減少되었다. 그리고 total saponin은 0.0025%에서 約 13%, triol系 saponin은 0.005%에서 12% 정도 증가시켰으며 그 以上の 濃度에서는 減少되었다. 이 結果는 흰쥐 血清內的 alkaline phosphatase (ALP), serum glutamicoxaloacetic transaminase (sGOT), serum glutamicpyruvic transaminase (sGPT) 및 lipase의 活性을 diol系 saponin이 增加시켰으며 total saponin은 ALP, lipase의 活性을 增加시킨 반면 sGOT, sGPT, creatine phosphokinase 活性을 減少시켰고 또 triol系 saponin은 sGOT以外에 ALP, sGPT, creatine phosphokinase, lactate dehydrogenase 및 lipase의 活性을 增加시켰다는 Lim 등²⁰⁾의 報告와 마찬가지로 本 實驗에서도 α -amylase의 活性을 diol, triol, total saponin이 增加시켰다. Adenylate cyclase 活性에 대해서는 diol系 saponin에 속하는 ginsenoside Rb₁이 433%, 未確認 saponin (ginsenoside Ra로 推定)이 280%程度로 酵素 活性을 增加시켰으나 그의 다른 saponin은 adenyl-

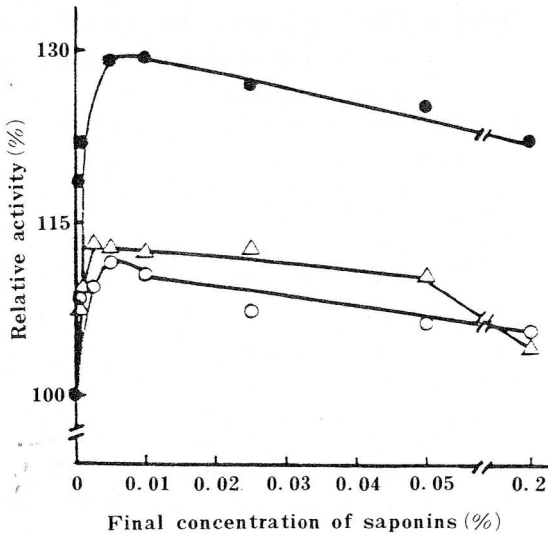


Fig. 2. Effect of concentration of saponins on bacterial α -amylase activity.

The reaction mixture of 0.1ml of saponin solution and 0.1ml of enzyme solution (500 μ g/ml) and 0.3ml of McIlvaine buffer (pH 5.0) was preincubated at 40°C for 5min and added 0.5ml of soluble starch solution (1%). The enzyme reaction was carried out at 40°C for 3 min. The enzyme activity was determined by DNS method.

●—●; protopanaxadiol,
 △—△; protopanaxatriol,
 ○—○; total saponin

ate cyclase의 활성을低下시켰다는報告²¹⁾와는相異하나 diol系 saponin에 속하는 ginsenoside Rb₁이 酵素活性을 가장 많이增加시켰다는結果와는類似하다.

人蔘 saponin의 前處理時間이 α -Amylase의 活性에 미치는影響

人蔘 saponin과 α -amylase와 前處理時間이 酵素作用에 어떤影響을 미치는가를 調査하기 위해서 0.1ml의 protopanaxadiol系 saponin 용액 (0.1%), 0.3ml의 McIlvaine buffer (pH 5.0) 및 0.1ml의 α -amylase 용액 (500 μ g/ml)을 혼합하여 40°C에서 10분까지 前處理시킨 後 酵素反應을 시킨 結果 Fig.3에 나타난 바와같이 3분동안 前處理시켰을 때 酵素作用을 20% 정도 促進시켰으며 그 以上에서는 減少하였다.

α -Amylase의 熱變性에 미치는 人蔘 saponin의 影響

α -Amylase의 熱變性에 미치는 人蔘 saponin의 影響을 調査하기 위하여 α -amylase와 人蔘 saponin을

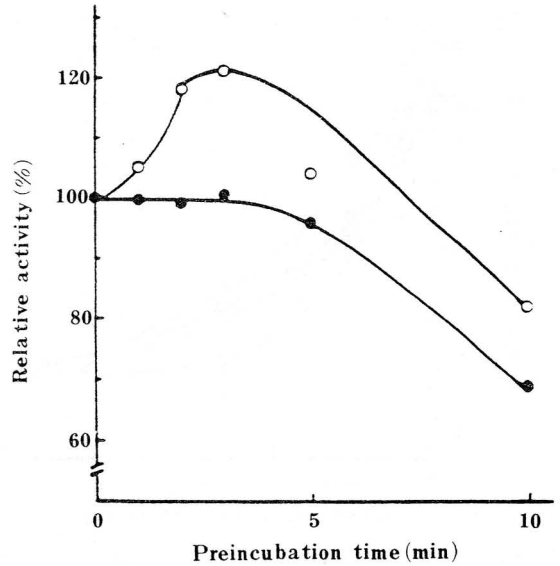


Fig. 3. Effect of preincubation time of α -amylase with protopanaxadiol saponin on the α -amylase activity.

The reaction mixture of 0.1ml of protopanaxadiol saponin (0.1%) solution and 0.1 ml of enzyme (500 μ g/ml) solution and 0.3 ml of McIlvaine buffer (pH 5.0) was preincubated at 40°C for various periods of time. The enzyme activity was determined by DNS method. ○—○; with protopanaxadiol, ●—●; without protopanaxadiol saponin

40°C에서 3分間 前處理시킨 後 60°C에서 10分間 熱處理하여 α -amylase의 殘存活性을 調査한 結果는 Fig. 4와 같다.

Fig. 4에서 보는바와 같이 本 實驗에 使用된 α -amylase의 熱變性에 對한 人蔘 saponin의 影響은, total saponin은 熱變性에 影響을 미치지 않았으며 酵素活性을 크게 增加시키는 protopanaxadiol系 saponin은 오히려 熱變性을 促進시켰다. 그리고 protopanaxatriol系 saponin은 本 酵素의 熱變性을 초기에는 約 20% 정도 막아 주었으나 60°C에서 5分以上의 熱處理는 本 酵素의 熱變性에 別 影響을 미치지 않았다. β -D-galactosidase의 熱變性에 미치는 人蔘 saponin의 影響을 調査한 實驗에서 diol 및 triol saponin이 모두 熱變性을 막아주었으며 c-factor로 使用되는 Mg^{++} 과 triol saponin을 함께 酵素反應系에 첨가시켰을 때 Mg^{++} 단독 첨가시켰을 때보다 half life가 증가되었다는 結果²¹⁾와 같이 triol saponin은 酵素의 熱變性을 막아준다는 것이

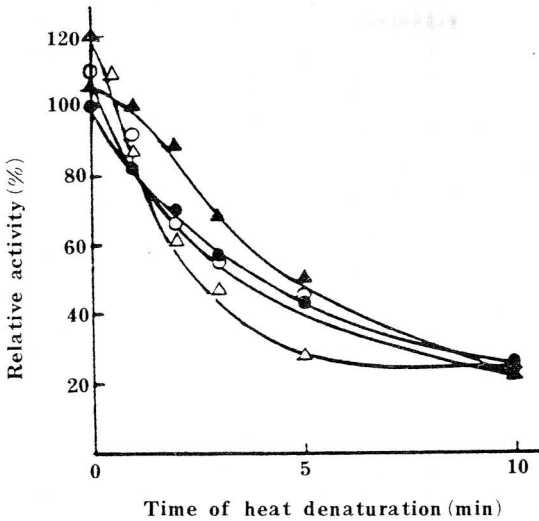


Fig. 4. Effect of ginseng saponins on heat denaturation of bacterial α -amylase.

0.3ml of McIlvaine buffer (pH 5.0), 0.1ml of enzyme solution (500 μ g/ml) and 0.1ml of saponin solution (1mg/ml) was preincubated at 40°C for 3min and heat-treated at 60°C for various periods of time, and then the remaining enzyme activity was determined by DNS method.

- ; without saponin,
- △—△; protopanaxadiol,
- ▲—▲; protopanaxatriol,
- ; total saponin

확실하다고 생각된다.

人蔘 saponin의 酸加水分解物이 酵素活性에 미치는 影響

人蔘 saponin (total, diol系 및 triol系)과 이들 saponin의 酸加水分解物이 α -amylase의 活性에 미치는 影響을 調査한 結果는 Table 1에서 보는 바와 같이 diol系, triol系 saponin을 酸加水分解 시킴으로서 α -amylase의 活性을 더 높일 수 있었으며 total saponin의 酸加水分解物은 별 影響을 미치지 않았다.

人蔘 saponin이 基質親和力에 미치는 影響

人蔘 saponin이 α -amylase의 基質親和力 즉 反應速度에 어떠한 影響을 미치는 가를 Lineweaver-Burk's plot를 利用하여 k_m 值를 測定하여 調査한 結果는 Fig. 5와 같다. 一般的으로 酵素는 高濃度의 基質이 存在할 때 基質阻害를 받으나²⁾ diol系 및 triol系 saponin의 경우 最終濃度 1.0%의 基質濃度에서 基質阻害를 감소시켰으나 total saponin의 경우는 별 影響을 미치지 않았다. 그러므로 bacte-

Table 1. Effect of ginseng saponins and acid hydrolyzates of ginseng saponins on α -amylase activity.

Saponin	Relative activity (%)
None	100
Total saponin	106.8
Hydrolyzate of total saponin	99.5
Protopanaxadiol	120.5
Hydrolyzate of protopanaxadiol	125.5
Protopanaxatriol	111.5
Hydrolyzate of protopanaxatriol	120.3

The reaction mixture was incubated at 40°C for 3 min and the enzyme activity was determined by DNS method.

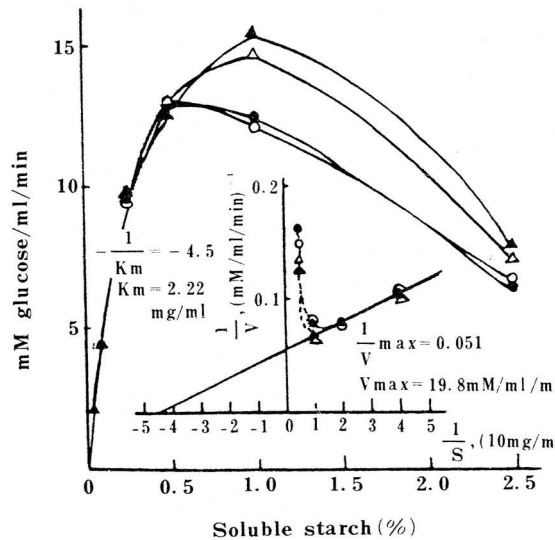


Fig. 5. Lineweaver - Burk's plots of starch hydrolysis by bacterial α -amylase with and without ginseng saponin.

The reaction mixture contained 0.5ml of soluble starch solutions of various concentrations, 0.3ml of McIlvaine buffer (pH 5.0), 0.1ml of enzyme solution (1 mg/ml), 0.1ml of saponin solution (total; 100 μ g/ml, triol; 50 μ g/ml, diol; 50 μ g/ml). The enzyme reaction was carried out at 40°C for 3 min and enzyme activity was determined by DNS method.

- ; without saponin
- ▲—▲; protopanaxadiol
- △—△; protopanaxatriol
- ; total saponin

rial α -amylase의 작용에 있어서 人蔘 saponin의 添加는 反應速度에는 별 影響을 미치지 않았으나 diol 및 triol saponin의 添加는 高濃度の 基質이 存在할 때 基質阻害를 막아주는 效果가 있다고 생각되어 진다.

이상의 結果로부터 人蔘 saponin은 bacterial α -amylase의 酵素反應을 促進한다기 보다는 基質阻害를 막아준다고 생각되며 이것은 人蔘 saponin의 特性中의 하나인 界面活性이 重要的 生理的意義를 갖는다고 생각된다.^{23,24)}

요 약

人蔘 saponin의 生物學的 活性을 調查하기 위하여 細菌 α -amylase의 作用에 미치는 人蔘 saponin의 影響을 調查한 結果를 要約하면 다음과 같다.

Protopanaxadiol系, triol系 및 total saponin 모두 α -amylase의 活性을 25, 12, 13%程度 促進시켰다. Diol系 saponin 添加경우 40°C에서 3分間 前處理함으로서 α -amylase의 活性을 20%程度 促進시켰으며 酵素의 熱變性에 대한 保護作用은 protopanaxatriol系 saponin은 60°C에서 5分까지는 保護作用이 있었으나 protopanaxadiol系 saponin은 오히려 熱失活을 促進하는 경향이였다.

Diol 및 triol系 saponin의 酸加水分解物이 α -amylase의 活性을 diol 및 triol系 saponin보다 더 促進시켰으며 diol, triol系 saponin의 添加는 高濃度の 基質이 存在할 때 基質阻害를 막아주었다.

참고문헌

1. 庄司順三 : 化学の領域, 35, 414 (1981)
2. Sakakibara, K., Y. Shibata, T. Higashi, S. Sanada, and J. Shoji: *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 1009 (1975)
3. Gommori, K., F. Miyamoto, Y. Shibata, T. Higashi, S. Sanada and J. Shoji: *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 2985 (1976)
4. Ikehara, M., Y. Shibata, T. Higashi, S. Sanada and J. Shoji: *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 2844 (1978)
5. Shibata, Y., T. Nozaki, T. Higashi, S. Sanada and J. Shoji: *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 2818 (1976)
6. Shibata, Y., Y. Natsuno and T. Higashi: *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 3822 (1978)
7. Iijima, M., T. Higashi, S. Sanada and J. Shoji: *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 2400 (1976)
8. Iijima, M. and T. Higashi: *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 2130 (1979)
9. Wu, Y.J.: *The 1st Conference of the Society of Chinese Physiological Science (Abstracts)*, Yao P. 38 (1956)
10. Hiai, S., H. Oura, K. Tsukada and Y. Hirai: *Chem. Pharm. Bull.*, **19**, 1956 (1971)
11. 김태봉, 이근배, 이희성, 방진성, 최병호 : 科学技術處 研究報告書, R 73-81 (1973)
12. 鄭魯八 : 大韓生理学会誌, 7, 1 (1973)
13. Shin, Y.C. and S.W. Kim: *Seoul Uidae Chapchi*, **13**, 71 (1972)
14. Chang, S.H., I.W. Park, Y.Y. Lee and Y.J. Kim: *Korean J. Ginseng Sci.*, **1**, 19 (1976)
15. Chang, S.H., I.W. Park, Y.Y. Lee and J.S. Park: *Korean J. Ginseng Sci.*, **1**, 25 (1976)
16. Chang, S.H., I.W. Park, Y.Y. Lee and J.S. Park: *Korean J. Ginseng Sci.*, **1**, 29 (1976)
17. Seo, G.L., M.L. Koh, Y.Y. Lee, S.H. Chang, I.W. Park and S.Y. Lee: *Korean Biochem. J.*, **15**, 95 (1982)
18. 韓秉勳 : 人蔘試驗研究用役報告書, 專賣技術研究所 (1977)
19. Colowick, S.P. and N.O. Kaplan: *Methods in Enzymology I*, p.149, Academic Press Inc., New York (1955)
20. Lim, C.J., D.K. Rhee, E.H. Park and S.K. Hong: *Korean J. Ginseng Sci.*, **5**, 49 (1981)
21. Kim, D.H., Y.H. Hahn, S.K. Hong: *Arch. Pharm. Res.*, **5**, 45 (1982)
22. Dixon, M., E.C. Webb: *Enzymes*, P. 126-133, 3rd ed., Longman Group Limited, London (1979)
23. Joo, C.N., T.Y. Kim: *Korean Biochem. J.*, **10**, 13 (1977)
24. Joo, C.N., S.J. Lee: *Korean Biochem. J.*, **10**, 59 (1977)