

Rhizopus japonicus 에 의한 Ginsenoside Rb₁ 전환효소의 생산조건

김 상 달

영남대학교 농축산대학 응용미생물학과

Production of the Convertible Enzyme of Ginsenoside Rb₁ by *Rhizopus japonicus*

Sang-Dal Kim

Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Kyungsan 713-749, Korea

ABSTRACT : 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. A strain of *Rhizopus japonicus* is able to produce the convertible enzyme which can convert selectively ginsenoside-Rb₁ to ginsenoside-Rd without the change of any other ginsenoside. The strain can produce the most enzyme after 5 day-culture on wheat bran medium. The enzyme production was promoted best efficiently by addition of red ginseng powder in ginseng products, xylose in sugars, laminarin in polysaccharides, naringin in flavonoids, and potassium nitrate in nitrogen substrates.

KEYWORDS : *Rhizopus japonicus*, Ginseng saponin, Ginsenoside Rb₁, Enzymatic conversion

인삼약효의 주성분인 인삼 saponin 은 14종의 ginsenoside 로 구성되어 있으며 최근에는 단리된 각각의 ginsenoside 별로 그 약리작용이 연구되어 있다 (Heu, 1985). 이 연구중에서 인삼 saponin 중 그 조성비율이 37% 정도로 가장 많이 함유되어 있는 ginsenoside Rb₁ 보다는 조성비율이 적으나 구조가 유사한 ginsenoside Rd 가 약효면에서는 훨씬 더 우수하다는 사실이 많은 연구에서 입증되었다 (Hiai 등, 1979, 1989 ; Oura, 1975 ; Kaku, 1975).

미생물성 효소에 의해 목적하는 ginsenoside 로의 전환을 시도하던중 ginsenoside Rb₁ 만으로부터 β -1,6 결합의 glucose 1분자를 분해함으로써 약효 우수한 ginsenoside Rd 로 선택적 전환시킬 수 있는 *Rhizopus japonicus* 의 한 균주를 선발할 수 있었으며 (김 등, 1982 ; 김 등, 1986), 이 균주로부터 ginsenoside Rb₁ 의 glucose 유리효소 즉 ginsenoside Rb₁ 전환효소를 분리 정제하였으며 (김 등, 1988) 정제된 효소의 효소학적 성질도 조사되었다. 정제된 효소는 methyl- β -glucoside 나 cellobiose

등보다는 ginsenoside Rb₁ 과 함께 amygdalin 을 훨씬 더 잘 분해하는 β -1,6-glucosidase 인 것으로 추정되며 almond-glucosidase 등의 일반적인 β -glucosidase 로는 ginsenoside Rb₁ 을 분해하지 못하는 것으로 보아 기존의 β -glucosidase 와는 그 성질이 상이한 mold 성 β -1,6-glucosidase 인 것 같다 (김 등, 1989).

본 실험에서는 *Rhizopus japonicus* 에 의한 saponin 전환효소의 생산성에 미치는 각종 첨가물질의 영향을 조사하였다.

材料 및 方法

사용균주 및 효소생산

인삼 saponin 중 조성비율이 가장 큰 ginsenoside Rb₁ 을 약효면에서 보다 우수한 ginsenoside Rd 로 선택적 전환할 수 있는 *Rhizopus japonicus* 의 한 균주를 전보 (김 등, 1982 ; 김 등 1986)에서 선발하였는데 본 실험에서는 이 균주를 대상으로 실험하였다.

효소의 생산은 wheat bran 배지를 이용하여 30°C에서 5일간 배양하였으며 배양물에 5배량의 M/100 acetate buffer (pH 5.0)로 4°C에서 5시간 추출한 후 여과 침전하여 그 상등액을 효소액으로 사용하였다.

효소활성도 측정

기질로 사용한 인산 saponin은 전보(김 등, 1982)의 정제방법으로 얻은 ginsenoside Rb group saponin(ginsenoside Rb₁ 54.5%, ginsenoside Rd. 1%)을 사용하였으며 40°C에서 12시간 반응시킨 후 전보(김 등, 1986)와 같이 dinitrosalicylic acid (DNS) 발색법으로 측정하여 시간당 1 μmol의 glucose 생성 효소량을 1 unit로 환산한 후 비교하여 상대치로 나타내었다.

結果 및 考察

배양일수에 따른 효소생성변화

효소생성이 가장 많은 배양시간을 알기위해 wheat bran 배지를 이용하여 30°C에서 6일까지 시간별로 배양시키면서 생성된 효소의 활성도를 측정해 본 결과 Fig.1과 같이 배양 5일째에 가장 많은 효소가 생성되었다.

천연유기물의 첨가효과

효소생산을 더욱 증가시키기 위해 인삼잎 등 인삼 부산물이나 대두박 등 배지첨가제로 자주 이용되는 천연유기물을 wheat bran 배지에 20%되게 첨가하

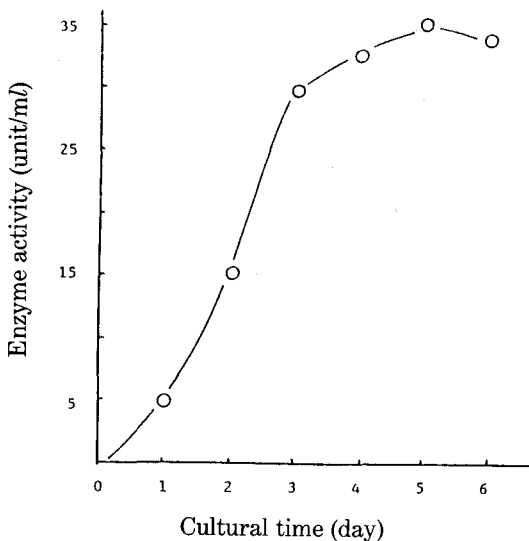


Fig.1. Time course of the ginsenoside convertible enzyme production on wheat bran medium.

Table I. Effect of various natural additive sources on the ginsenoside convertible enzyme production

Sources*	Growth	Relative activity(%)
Ginseng leaves	+++	94.7
Ginseng peelings	+++	98.5
Ginseng residue	+++	73.7
Red ginseng powder	++++	110.5
White ginseng powder	++++	105.3
Cow bone powder	+++	105.3
Soybean residue	+++	73.7
Coffee cake	+++	63.2
Rape seed cake	+++	110.5
Only wheat bran	+++	100.0

* 1g of additive sources was added into 4g of wheat bran medium.

여 배양한 후 효소활성도를 측정해 본 결과 Table I과 같이 홍삼분말이나 지평자박을 첨가할 경우 비교적 효소생성이 촉진되었으나 인삼잎이나 대두박 등 나머지 천연유기물은 별다른 효과가 없거나 오히려 감소되었다.

저급당류의 첨가효과

Glucose 등 저급당을 배지에 첨가했을 경우 어떠한 효과가 일어나는가를 조사하기 위해 5g의 wheat bran에 5 ml의 1% 당용액을 첨가하여 배양후 그 효소생성을 측정해본 결과 Table II와 같이 xylose 이외에는 오히려 저해작용을 한 것 같다. 이는 glucose가 함유된 당류가 β-glucosidase의 일종인 본 효소의 생성을 억제한 것으로 추측되는데 이는 galactosidase나 isoamylase 생성에 미치는 탄소원의 영향보고(A.Kaji 등 1969; K. Yonobayashi 등, 1968)와 유사한 결과이다.

다당류의 첨가효과

Xylan 등의 다당류가 본 효소의 생산성에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하기 위해 wheat bran에 20%되게 각종 다당류를 첨가하여 배양한 후 그 효소생산성을 조사해 본 결과 Table III과 같이

laminarin, dextrin 처럼 β -1, 6 이나 α -1, 6 결합된 다당류의 경우에 효소생성이 비교적 증가되는 경향이였다. 이는 기질과 유사한 결합방식의 다당류가 해당 효소의 생산을 증가시킨다는 보고(S. Ueda 등, 1967)와 유사한 결과이였다.

Table II. Effect of sugars on the ginsenoside convertible enzyme production

Sugars*	Growth	Relative activity(%)
Xylose	+++	105.3
Glucose	+++	57.9
Lactose	+++	42.1
Sucrose	+++	86.8
Maltose	+++	68.4
Cellobiose	+++	52.6
Raffinose	+++	84.6
None	+++	100.0

* 5 ml of sugar solution per 5g of wheat bran.

Table III. Effect of polysaccharides on the ginsenoside convertible enzyme production

Polysaccharides*	Growth	Relative activity(%)
Xylan	++	110.5
α -Cellulose	+++	131.6
CM-Cellulose	+++	97.4
Laminarin	+++	136.3
Dextrin	+++	131.6
Inulin	+++	94.7
Mannan(yeast)	++	126.3
Chitin	++	110.5
Chitosan	+++	97.4
Arabinogalactan	+++	105.3
Pectin	+++	68.4
Alginic acid	+++	115.8
Gum, xanthan	+++	115.8
Potato starch	+++	94.7
Amylose(potato)	+++	84.2
Amylopectin	+++	78.9
Only wheat bran	+++	100.0

* 1g of polysaccharides was added into 4g of wheat bran.

Flavonoids의 첨가영향

Saponin 구조와 유사한 배당체인 flavonoid 화합물의 첨가가 본 효소생성에 어떤 영향을 미치는가를 조사하기 위해 5g의 wheat bran에 5ml의 2% flavonoid 용액을 첨가 배양한 후 효소생산성을 측정하였는데 그 결과는 다음 Table IV와 같이 naringin이 비교적 크게 증가시켰으며 그외에는 별다른 영향이 없거나 오히려 감소되었다.

Table IV. Effect of flavonoids on the ginsenoside convertible enzyme production

Flavonoids*	Growth	Relative activity(%)
Hesperidin	+++	110.5
Naringin	+++	136.8
Rutin	+++	89.5
Quercetin	+	73.7
Tannic acid	+++	73.7
None	+++	100.0

* 5 ml of 2% flavonoid solution per 5g of wheat bran.

Table V. Effect of nitrogen sources on the ginsenoside convertible enzyme production

N-sources*	Growth	Relative activity(%)
Peptone	++++	121.1
Casamino acid	+++	115.8
Beef extract	+++	136.8
Malt extract	++++	102.6
Yeast extract	++++	105.3
Albumin(bovine)	+++	97.4
(NH ₄) ₂ SO ₄	+++	89.5
NH ₄ NO ₃	+++	121.1
NH ₄ Cl	+++	84.2
(NH ₂) ₂ CO	+++	105.2
NaNO ₃	+++	131.6
KNO ₃	+++	142.1
None	+++	100.0

* 5 ml of 2% nitrogen source solution per 5g of wheat bran.

질소원의 첨가영향

Peptone 등 유기질소화합물과 KNO_3 등 무기질소 화합물이 본 효소의 생산성에 어떤 영향을 미치는가를 조사하기 위해 5g의 wheat bran에 5ml의 2% 질소원 용액을 첨가하여 배양한 후 생산된 효소활성도를 측정해본 결과 Table V와 같이 beef extract나 KNO_3 를 첨가할 경우 효소생산성이 크게 증가되었다. 이는 inulin 분해 효소생산성을 조사한 보고(권, 1980)와 일부 유사한 결과이었다.

배지조성이 미지인 천연고체배지를 기본배지로 하였으므로 각 첨가물질의 정확한 효과는 알 수 없으나 이상의 결과를 종합한다면 최선의 배양조건을 알 수 있다고 생각되어진다.

摘 要

인삼 saponin 중 조성비율이 가장 큰 ginsenoside Rb1 만을 약효면에서 보다 우수한 ginsenoside Rd로 선택적 전환시킬 수 있는 *Rhizopus japonicus*를 대상으로 해서 인삼 saponin 전환효소의 최적생산조건을 검토하였다. Wheat bran 배지를 기본으로 할 경우 배양 5일에 가장 많은 효소가 생산되었으며, 인삼류의 천연유기물중에는 홍삼분말을, 저급당류중에는 xylose를, 다당류중에는 laminarin을 flavonoids 중에는 naringin을, 질소원중에는 beef extract와 KNO_3 를 첨가할 경우 인삼 saponin 전환효소가 가장 많이 생산되었다.

參考文獻

Harada, T., Yonobayashi, K. and Misaki, A. (1968): Formation of Isoamylase by *Pseudomonas*. *Appl. Microbio.* **16**: 1439-1444.

- Heu, I. (1985): *Abstract of Korean Ginseng Studies, World-Wide Collected Bibliography. Korean Ginseng Tobacco Reserch Institute* **11**: 145-264.
- Kaji, A. and Ichimi, T. (1969): Production and properties of Galactosidases from *Corticium rolfsii*. *Appl. Microbio.* **18**: 1036-1040.
- Kim, S.D. and Seu, J.H. (1982): Conversion of Ginseng Saponin with the Enzyme Produced by *Rhizopus* sp. *Kor. J. Appl. Microbio. Bioeng.* **10**: 267-273.
- Kim S.D. and Seu, J.H. (1986): Specific conversion of Ginseng Saponin by the Enzyme of *Rhizopus japonicus*. *Kor. J. Mycology.* **14**: 195-200.
- Kim S.D. and Seu, J.H. (1988): Purification of the Convertible Enzyme of Ginseng Saponin from *Rhizopus japonicus*. *Kor. J. Appl. Microbio.* **16**: 438-442.
- Kim, S.D. and Seu, J.H. (1989): Enzymatic Properties of Convertible Enzyme of Ginseng Saponin produced from *Rhizopus japonicus*. *Kor. J. Appl. Microbio. Bioeng.* In press
- Kwon, T.J. (1980): Studies on the Inulin Hydrolyzing Enzyme from *Aspergillus* sp. (C-58). *Study Repts. Kon-Kuk Univ.* **4**: 63-79.
- Ueda, S. and Nanri, N. (1967): Production of Isoamylase by *Escherichia intermedia*. *Appl. Microbio.* **15**: 492-496.

Accepted for Publication 23 February 1989