Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.
Vol. 17, No. 2, 126-130 (1989)

*Rhizopus japonicus*가 생산하는 인삼 Saponin 전환효소의 효소학적 특성

김상달[1]*·서정훈[2]

[1]영남대학교 응용미생물학과 [2]경북대학교 미생물학과

Enzymatic Properties of the Convertible Enzyme of Ginseng Saponin Produced from *Rhizopus japonicus*

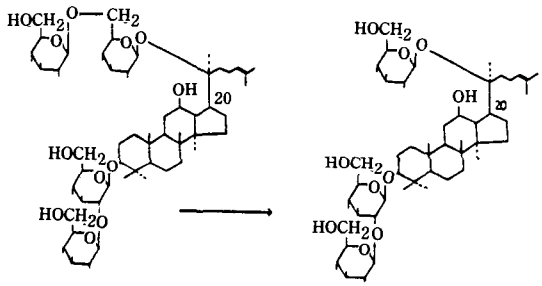
Kim, Sang-Dal[1]* and Jung-Hwn Seu[2]

[1]*Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Kyungsan 713-749, Korea*
[2]*Department of Microbiology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea*

In 14 kinds of ginsenosides in ginseng saponin, ginsenoside Rb_1 is contained the most abundantly. But ginsenoside Rd which is similar to ginsenoside Rb_1 in structure, was known to be superior to ginsenoside Rb_1 pharmaceutically. The convertible enzyme which can transform ginsenoside Rb_1 to ginsenoside Rd specifically among ginseng saponin, was purified homogeneously from *Rhizopus japonicus*. The optimal pH for the action of the enzyme was pH 4.8 to 5.0, and optimal temperature was 45°C. The enzyme was stable in the range of pH 4.0 to 9.0, and the half activity of enzyme was remained by the thermal treatment at 60°C for 2 hours. The enzyme activity was enhanced by addition of Mn^{2+} or Fe^{3+}, though inhibited by EDTA or *o*-phenanthroline. On the substrate specificity, the enzyme was able to hydrolyze gentiobiose, cellobiose, amygdalin and prunasin, but not to hydrolyze any other kinds of ginsenosides besides ginsenoside Rb_1. Km values of the enzyme for ginsenoside Rb_1, gentiobiose and amygdalin were 5.0mM, 4.8mM and 3.7mM, respectively.

인삼약효의 주성분인 인삼 saponin에 관한 수많은 연구(1)중 최근에는 단리된 ginsenoside 수준으로 연구되고 있다(2). 인삼 saponin중 조성비율이 가장 큰 ginsenoside Rb_1보다 구조가 유사한 ginsenoside Rd가 효능면에서 훨씬 우수하다는 사실이 많은 보고에 의해 입증되었다(3-6).

따라서 저자 등은 미생물성 효소를 이용해 목적하는 ginsenoside로의 전환을 시도하던중 인삼부패균 *Rhizopus japonicus*의 효소에 의해 ginsenoside Rb_1을 아래 그림과 같이 β-1,6 결합의 glucose 1분자를 분해함으로써 분해 전보다 약효면에서 훨씬 우수한 ginsenoside Rd로 선택적으로 전환시킬 수 있었다(7,8). 본보에서는 *Rhizopus japonicus*의 배양물로부터 순수한 단일단백질로 정제된 전환효소(9)를 대상으로 여러가지 효소학적 성질을 조사하여 보고한다.



Ginsenoside-Rb_1 Ginsenoside-Rd

Key words: *Rhizopus japonicus*, ginseng saponin, enzymatic conversion
*Corresponding author

재료 및 방법

균주 및 배양

전보(7)에서 보고한 바와 같이 ginsenoside Rb_1을 ginsenoside Rd로 선택적 전환할 수 있는 균주

*Rhizopus japonicus*를 사용했다. 인삼 saponin 전환효소를 생산하기 위해서는 wheat bran 배지에 30℃에서 5일간 배양하였다.

효소의 정제

배양물 추출액의 ammonium sulfate 완전포화 침전을 투석한 후 ammonium sulfate fractionation, TEAE-Cellulose, DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-150, Sepharose 2B column chromatography 순으로 정제하여 사용하였다(9). 이때 정제된 효소는 polyacrylamide disc gel electrophoresis에 의해 monomer인 단일단백질임을 확인하였고 Sephadex G-150 gel filtration 및 SDS-PAGE에 의해 분자량이 88,000 정도라는 것을 알았다. 효소 정제과정중 효소회수율 yield는 10.9%이었으며 specific activity는 288.3unit/mg이었다(9).

효소활성도 측정

기질로 사용한 인삼 saponin은 전보의 방법(7)으로 정제하였다. 정제된 total saponin에는 ginsenoside Rb_1이 36.4%이고 ginsenoside Rd는 12.2%로 조성되어 있었으며 ginsenoside Rb group saponin중에는 ginsenoside Rb_1이 54.5%, ginsenoside Rd가 1.1%로 각각 조성되어 있었다.

전환효소의 활성도 측정은 ginsenoside Rb_1이 전환됨과 동시에 가수분해되어 생성되는 1분자의 glucose를 dinitro salycilic acid(DNS) 발색법으로 측정하여 1μmol glucose 생성 효소량을 1 unit로 표시하였다. 이때 일반적으로 40℃에서 12시간 효소반응시켰다.

결과 및 고찰

효소활성에 미치는 온도 및 pH의 영향

정제된 전환효소의 작용 최적 pH를 알기 위해 McIlvaine buffer를 사용하여 반응액의 pH를 조절하고 40℃에서 12시간 반응시켜 본 결과 Fig. 1과 같이 pH 4.8에서 5.0 사이에서 그 활성도가 가장 높았으며 pH 3.0 이하나 7.0 이상에서는 그 활성도가 50% 정도로 저하되기 시작했다. 작용최적온도는 45℃이었으며 55℃에서도 86%의 활성도로 나타났다. 이 결과는 *Penicillium*성 β-1,6-glucosidase의 최적 pH 6.7과(10) *Aspergillus*성 phenol-β-glycosidase의 3.0(11) 이외에는 대부분의 β-glucosidase의 작용 최적 pH가 4.5에서 5.8사이라는 보고들(12-14)과 잘 일치한다. 또한 flavonoid 배당체 분해효소인 *Aspergillius*성 β-glucosidase의 60℃(15) 이외에는 일반적인 β-glucosidase들(16, 17)의 최적반응온도가 40~50℃라는 보고들과 일치하였다.

효소의 온도 및 pH 안정성

본 효소의 pH에 대한 안정성을 조사하기 위해 각 pH별 buffer에 효소를 가해 30℃에서 5시간 preincubation 시킨 후 그 잔존활성도를 측정하였는데 Fig. 2와 같이 pH 3.0에서 9.0까지 비교적 넓은 영역에서 안정하였다. 열에 대한 안정성은 pH 5.0의 McIlvaine buffer에 용해한 효소를 온도별로 9시간까지 경시적으로 전처리하여 조사하였는데 Fig. 2와 같이 60℃에서 2시간 열처리로 약 50%의 활성도가 실활되었으나 40℃에서는 9시간 처리하여도 30% 정도 밖에 실활되지 않았다. 이 결과는 *Geotrichum*성 β-glucosidase가 60℃에서 3시간 열처리로 50%의 활성도가 잔존하고(18) *Mucor*성 β-glucosidase가 pH 2.5에서 10까지 안정하고 95℃에서 5분간 열처리로 56% 잔존활성이 있다는 결과

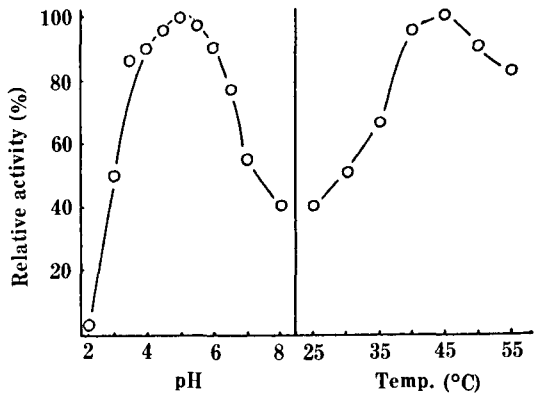


Fig. 1. Effect of pH and temperature on the enzyme activity.

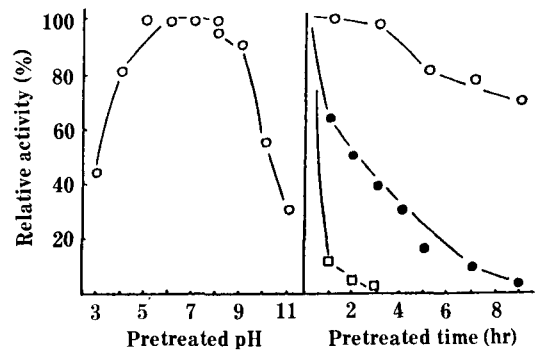


Fig. 2. pH and thermal stability of the enzyme.

Table 1. Effect of metal salts on the enzyme reaction.

Metal salts	Relative activity (%)	Metal salts	Relative activity (%)
$MnSO_4$	187.7	$MaSO_4$	92.3
$FeCl_3$	153.8	$BaCl_2$	84.6
$CoCl_2$	138.5	LiCl	84.6
$ZnCl_2$	123.1	$SnCl_2$	69.2
Na_2MoO_4	115.4	$HgCl_2$	61.5
$AlCl_3$	107.7	$CuSO_4$	53.8
$CaCl_2$	96.2	$AgNO_3$	30.7
		none	100.0

Table 2. Effect of some enzyme inhibitors on the enzyme reaction.

Inhibitors	Remaining activity (%)	
	1.0mM	0.1mM
Thiourea	70.6	92.2
SDS	84.3	100
ε-Amino-*n*-caproic acid	80.4	100
EDTA-2Na	62.7	84.3
o-phenanthroline*	62.7	96.0
L-cysteine	76.5	105.9
Sodium fluoride	98.0	92.2
2,4-DNP	94.1	100
p-CMB	88.2	92.2
Sodium azide	101.9	92.2
Iodo acetate	98.0	100
H_2O	100.0	100.0

* soluble in 20% EtOH

(19)보다는 뒤지지만 *Humicola*(17)나 *Flavobacterium*의 β-glucosidase보다는 훨씬 더 안정하였다.

효소활성에 미치는 금속이온의 영향

금속이온이 본 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 pH 5.0으로 조절한 각 금속염 용액을 최종농도 5.6×10^{-4} M되도록 첨가한 후 활성도를 측정해본 결과 Table 1과 같이 Mn^{++}, Fe^{+++}은 촉진작용을 하였으나 Ag^{+}, Cu^{++} 등은 저해하였다. 특히 Mn^{++}은 최종농도 3.2×10^{-2} M 정도까지 농도에 비례해서 촉진이 되었고 70℃에서 Mn^{++} 존재하에 열변성을 시켜본 결과 Mn^{++}을 첨가함으로써 40% 정도의 열보호작용이 있었다(도표생략). 이는 Cu^{++}이 *Humicola*의 β-glucosidase를, Hg^{++}, Cu^{++}, Ag^{+}이 *Flavobacterium*의 β-1, 6-glucosidase를, Hg^{++}와 Cu^{++}이 *Penicillium*의 β-glucosidase를 저해한다는 보고(16)와 유사한 결과이었다.

Table 3. Substrate specificity of the enzyme on sugars.

Sugars	Linkage	Relative activity (%)
Maltose	α-1.4	0
Isomaltose	α-1.6	0
Trehalose	α-1.1	0
Cellobiose	β-1.4	83.3
Gentiobiose	β-1.6	233.3
Sucrose	α-1.2	0
Turanose	α-1.3	0
Melibiose	α-1.6	0
Lactose	β-1.4	0
Maltotriose	α-1.4	0
Isomaltotriose	α-1.6	0
Raffinose		0
Stachyose		0
Total saponin		100.0

효소 저해제에 대한 영향

각종 효소 저해제가 본 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 최종농도 1.0 mM, 0.1 mM 되게 효소 용액과 혼합하여 35℃에서 15분간 전처리한 후 그 잔존활성도를 측정하였다. 그 결과 Table 2와 같이 EDTA-2Na와 phenanthroline이 가장 크게 저해하였는데 이는 본 효소 구조중에 금속이온이 약하게 결합되어 있는 metallic enzyme인 것으로 추측되어진다.

기질특이성

Ginsenoside-Rb_1의 C-20 위치에 결합된 2분자의 glucose 간의 결합방식 및 glycoside 결합방식과 유사한 당류, glycoside, ginsenoside 들을 기질로 함으로써 정제된 본 효소의 가수분해 특이성을 조사해 보았다. 이때 saponin은 0.5% 이고 그외는 최종농도 5 mM 되게 기질로 사용하였다.

먼저 glucose를 주 구성단위로 하는 몇가지 oligo 당을 기질로 해본 결과 Table 3과 같이 β결합이 아니거나 glucose 끼리만 결합된 당이 아니면 전혀 분해되지 않았으며 β결합 중에서도 1, 4 결합보다 1, 6 결합이 훨씬 더 특이성이 있었다. Saponin의 분해

Table 4. Substrate specificity of the enzyme on glycosides.

Glycosides	Relative activity (%)
Methyl- -glucoside	0
Methyl- -glucoside	14
Arbutin	100
Salicin	114
ONPG	55
PNPG	157
Prunasin	1117
Amygdalin	3571
Stevioside	0
Digitonin*	0
Digitonin*	0
Digoxin*	0
Triol-saponin	0
Diol-saponin	100
Total saponin	71

*Soluble in 20% MeOH
ONPG: *o*-Nitrophenyl- -galactoside
PNPG: p-Nitrophenyl- -galactoside

Table 5. Kinetics of the enzyme for various substrates.

Substrates	K_m	V_{max}[a)]
Amygdalin	3.77	4.55 (mM)
Gentiobiose	4.8	0.67
Saponin (Total)	5.0	0.3
Saponin (Rep group)	5.0	0.33

a): as glucose amount/hr/m*l*

도가 상대적으로 낮아보이는 것은 사용한 기질의 농도가 낮을 뿐더러 1분자의 ginsenoside-Rb_1에서 glucose가 차지하는 비율이 적기 때문이다.

두번째 glycoside 결합방식이 유사한 각종 glycoside들의 기질특이성을 조사해본 결과 Table 4와 같이 ginsenoside-Rb_1의 결합당 구조와 똑같은 amygdalin이 가장 크게 가수분해 되었다. 그외에도 *salicin*이나 *prunasin*과 같은 aryl *glycoside*들도 가수분해 할 수 있는 비교적 특이성이 넓은 효소인 것 같았으나 methyl-β-glucoside와 같은 alkyl glycoside는 거의 분해할 수 없었다.

Ginsenoside 구조중에는 ginsenoside-Rb_1의 C-20 위치에 결합되어 있는 2분자의 glucose중 β-1, 6 결합의 마지막 1분자의 glucose만 분해될 뿐 타 ginsenoside들의 β-1, 6 결합 glucose나 β-1, 2 결합의 arabinose, xylose, rhamnose는 전혀 분해할 수가 없었다(도표생략). 그러나 다른 aryl-β-glucosidase는 약하게나마 분해할 수 있는데 ginsenoside-Rd의 C-20 위의 나머지 glucose 1분자를 가수분해하지 못함은 명확히 설명할 수 없으나 이는 aglycon 부분의 복잡한 특이성에 기인한 것으로 추정해 볼 수 있다. 아울러 *feline kidney*의 *β-glucosidase*가 *amygdalin*의 terminal glucose만 가수분해 할 수 있다는 보고를 미루어 볼 때 본 효소는 ginsenoside-Rb_1의 β-1, 6 결합된 2분자의 glucose중 terminal glucose 1분자만을 가수분해하는 β-1, 6-glucosidase인 것으로 추측된다.

Kinetic constant

정제된 본 효소의 몇가지 기질에 대한 친화력을 조사하기 위해 Lineweaver-Burk plot로 Km치를 조사해본 결과 Table 5와 같이 total saponin 및 ginsenoide Rb group saponin 기질 공히 ginsenoside Rb_1으로 환산한 바 5.0 mM이며 gentiobiose, amygdalin순 이었다. 효소반응의 maximum velocity(V_{max})는 시간당 m*l* 당 glucose 생성량이 total saponin의 경우 0.3 mM이었다.

요 약

인삼 *saponin* 중에서 조성비율이 가장 큰 ginsenoside-Rb1을 약효면에서 훨씬 우수한 ginsenoside-Rd로 선택적 전환할 수 있는 전환효소를 *Rhizopus japonicus* 배양물로부터 순수하게 정제한 후 그 효소학적 특성을 조사하였다. 본 효소는 pH 4.8~5.0, 45℃에서 그 활성도가 가장 높았으며 pH 4~9의 범위에서 안정하였고, pH 5.0에서 60℃ 열처리할 경우 50% 실활하는데 2시간이 소요되었다. Mn^{++}, Fe^{++}에 의해 효소활성이 촉진되었으며 Cu^{++}, Ag^{+}에 의해서는 저해되었다. 효소 저해제중에는 EDTA, *o*-phenanthroline 등에 의해 저해되기도 했다. 본 효소는 당류중에는 gentiobiose, cellulose만을, glycoside 중에서는 amygdalin, purnasin, salicin 등을 분해할 수 있었으며 *ginsenoside-Rb₁* 이외의 다른 ginsenoside는 전혀 분해할 수 없었다. 본 효소의 Km치는 total saponin 기질 및 ginsenoside Rb *group saponin* 기질은 *ginsenoside* Rb_1으로서 5.0 mM 이었으며, gentiobiose는 4.8 mM, amygdalin은 3.7 mM 이었다.

참 고 문 헌

1. Bae, H.W.: *Abstracts of Korean Ginseng Studies,* RIM, 95-217 (1975).
2. Heu, I.: *Abstracts of Korean Ginseng Studies,* KGTRI, Vol. II, 145-264 (1985).
3. Hiai, S., H. Yokoyama, H. Oura and S. Yano: *Endocrinol.* **26,** 661 (1979).
4. Hiai, S., H. Yokoyama and H. Oura: *Proc. of 3rd Int'l Ginseng Sym.* KGTRI, 77 (1980).
5. Kaku, T., T. Miyata and A. Kinoshita: *Arzneimmittel-Forschung,* **25,** 537 (1975).
6. Oura, H., S. Hiai and Y. Odaka: *J. Biochem.,* **77,** 1057 (1975).
7. Kim, S.D. and J.H. Seu: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.,* **10,** 267 (1982).
8. Kim, S.D. and J.H. Seu: *Kor. J. Mycol.* **14,** 195 (1986).
9. Kim, S.D. and J.H. Seu: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.,* **16,** 438 (1988).
10. Nakamura, N. and O. Tanabe: *Agr. Biol. Chem.,* **27,** 80 (1963).
11. Niwa, K.: *J. Biochem.,* **38,** 109 (1951).
12. Mega, T. and Y. Matsushima: *J. Biochem.,* **85,** 335 (1979).
13. Robinson, D., R.G. Price and N. Dance: *J. Biochem.,* **102,** 525 (1967).
14. Heyworth, R. and P.G. Walker: *J. Biochem.,* **83,** 331 (1962).
15. 岡田茂孝：日農化學誌 **38,** 242(1964).
16. Sano, K., A. Amemura and T. Harada: *Biochem. Biophy. Acta.,* **377,** 410 (1975).
17. Yoshioka, H. and S. Hayashida: *Agr. Biol. Chem.,* **44,** 1729 (1980).
18. Kozlovskaya, L.N. and A.M. Bezborodov: *Appl. Biochem. Microbio.,* **16,** 34 (1980).
19. Yoshioka, H. and S. Hayashida: *Agr. Biol. Chem.,* **44,** 2817 (1980).

(Received February 15, 1989)