

고려인삼과 미국삼 뿌리 중심부의 단백질 패턴 비교

박 훈 · 권택현¹ · 김경현¹

한국인삼연초연구원 유전생리부, ¹고려대학교 생물공학과
(1996년 3월 3일 접수)

Comparison of Protein Patterns of the Root Pith from *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium*

Hoon Park, Taek Hon Kwon¹ and Kyung Hyun Kim¹

Division of Genetics and Physiology, Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Science Town,
Taejon 305-345, ¹Department of Biotechnology, Korea University, Jochiwon, Chungnam 339-800, Korea

(Received March 3, 1996)

Abstract : The purpose of this study was to analyze the electrophoretic patterns of soluble proteins from ginseng roots and to compare the protein patterns from Korean ginseng and American quinquifolium. The size difference was found in the major protein bands of a molecular weight of about 27,000 between Korean ginseng and American quinquifolium. The protein band of a molecular weight of 22,000 showed a quantitative difference in its amount. The major 27 K proteins appeared to form a complex heterodimer of 66,000 and to have internal disulfide bonds, from band shifting studies under non-denaturing conditions. Three peaks appeared when the protein extract from root homogenates was purified using gel filtration and DEAE ion exchange chromatography. The examination of physiological activity and further purification of these fractions are underway.

Key words : *Panax ginseng*, protein extraction, SDS-PAGE gel electrophoresis.

서 론

수천년 동안 고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 아무런 해독이나 습관성 부작용을 유발하지 않는 완전한 자연건강식품으로 알려져 왔고, 또한 한방 약재로 복용되어 왔다. 이에따라 인삼성분의 약효에 대한 연구가 활발하게 되었고, 화학성분의 추출 분리 및 구조 분석 기술의 도움으로 생체 기능조절 및 효능 작용기작의 연구는 주로 사포닌 및 다당체를 중심으로 이루어져 왔다.¹⁾ 최근에 보고되고 있는 인삼의 약리효능은 호르몬 분비계, 암이나 AIDS의 유발에 관여하는 면역계, 신경계, 순환기계 및 소화기계 등 광범위해지고 있으며,²⁾ 이러한 추세에 비한다면 인삼에서의 효소를 포함하는 단백질 및 펩타이드에 대한

연구는 지극히 미흡한 실정이다.

인삼 단백질에 대한 연구로, 아미노산의 성분 분석, 생리활성을 보이는 펩타이드와 단백질에 대한 분리 정제, 그리고 펩타이드 sequence 정보에 관한 내용이 최근에 잇달아 발표되고 있다.³⁻⁷⁾ 인삼내 성분 중 단백질의 생리활성 내지 약리효능과의 상관관계를 정확히 알아내기 위해서는 단백질 및 펩타이드의 순수분리, 정확한 구조분석 및 구조결정을 통한 작용기작에 대한 연구가 이루어져야 하며, 이러한 과학적 연구가 뒷받침 된다면 고려인삼의 세계적인 우수성을 입증할 수 있는 좋은 사례가 될 것이다.

미국삼은 현재 중국에서 많이 재배되어 중국, 홍콩 및 동남아 지역에서 판매되고 있는데, 1992년 기준으로 홍콩에서의 수입물량은 고려인삼에 비해 거의

3배에 달하고 있다. 최근 고려인삼과 미국삼은 홍콩 시장을 비롯한 국제시장에서 판매경쟁이 심화되고 있고, 중국에서 대량 재배되어 저가와 대량물량 공세를 해오고 있는 미국삼의 거센 도전에 직면하고 있는 상황에서, 수출전략에도 많은 타격을 주고있어 대비책이 강구되어야 할 시점에 있다." 미국삼은 *Panax quinquefolium* L.로서 형태적으로는 고려인삼과 유사하나 약효에 있어서 뚜렷한 차이를 보이고 있다. 고려인삼과 미국삼의 생화학적 성분 함량을 비교해 보면, 고려인삼의 경우 단백질, 조섬유, 및 당질의 함량이 월등히 높고, 지방질 성분과 아미노산의 함량에 있어서도 다소 높은 것으로 나타나 있다." 이러한 성분 함량의 차이 뿐만 아니라 실제 약효의 차이를 가져오는 성분상의 차이점을 연구하여, 고려인삼의 제품의 품질을 높이고 더욱 우수한 약리효능을 밝히는 연구가 절실히 필요한 실정이다.

인삼내 생리활성 펩타이드를 탐색하고, 품질지표로서 단백질 및 펩타이드의 가능성 모색, 그리고 제품성분의 비교를 통한 약리효능과 인삼 성분의 상관관계를 규명하려는 장기적인 목표아래 생화학적 연구 초기단계로서 본 연구를 수행하였다. 고려인삼에서의 생리활성 단백질 및 펩타이드의 연구를 위하여 고려인삼과 미국삼에서의 수용성 펩타이드와 단백질의 패턴 등을 비교 두 삼간의 차이점을 분석하였다.

재료 및 방법

1. 인삼 뿌리 중심부에서의 단백질 추출

정상수삼 6년근의 주피부분을 오려낸 뒤 중심부분을 약 1 cm 입방면체의 크기로 잘게 썰은 다음, 100 g의 인삼 뿌리부분을 완충용액과 함께 분쇄하였다. 분쇄한 homogenate를 cheese cloth를 이용하여 여과한 뒤 25,000 g에서 약 40분간 원심분리하여 그 상등액을 펩타이드 및 단백질 분리에 사용하였다. 상등액에 ammonium sulfate를 가하여 25% 포화용액이 되도록 한 다음 25,000 에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리된 상등액에 최종 ammonium sulfate 80% 포화용액이 되도록 ammonium sulfate solid를 천천히 가한 다음 약 1시간 정도 평형을 이루도록 하였다. 위와 같은 조건에서 다시 원심분리 하였고 이번에는 pellet을 완충용액을 이용하여 최소 부피에 용해시켜 하루동안 투석한 다음, microfibre filter로 여과한 용

액을 다음 단계에 이용하였다.

2. 단백질 분리 및 패턴비교

질소 공기하에서 membrane을 이용한 diafiltration을 통해 여과용액을 농축시킨 다음 crude단백질 용액으로 사용하였다. 주요 단백질의 분리를 위해 Bio-gel P-100을 이용하여 size별로 단백질을 분획하였다. 이 때 유출되는 속도는 peristaltic pump를 이용하여 50 ml/hr로 하였고 분획된 부분중 280 nm를 흡수하는 부분만을 모아 농축시킨 다음, DEAE Sepharose CL-4B를 이용한 ion exchange chromatography를 0~2 M NaCl gradient를 이용하여 단백질을 분획하였다. 단백질들의 분리정도와 순도를 Laemmli 방법¹⁰⁾에 따라 SDS-PAGE를 통해 측정하였으며, 10% 혹은 12% polyacrylamide gel을 실온에서 수행하였고, staining은 Coomassie brilliant blue R-250을 이용하였다.

결과 및 고찰

1. 인삼 뿌리 중심부에서의 단백질 패턴 비교

고려인삼과 미국삼 6년근의 중심부를 입방 1 cm의 크기로 잘게 썰어 균질화한 다음, ammonium sulfate fractionation을 이용하여 단백질 부분을 침전시켰다. 침전물을 용해, 투석을 수행하고, 농축하여 얻은 용액을 crude 단백질의 시료로 사용하였다. Crude 단백질의 SDS-PAGE 전기영동 패턴이 Fig. 1에 나타나 있다. 고려인삼과 미국삼 공통적으로 5가지(이하 A, B, C, D, E라 명명함; Fig. 1 참조)의 단백질 밴드가 관찰되었으며, 단백질 분자량은 대략 20,000에서 66,000 사이의 분포를 보이고 있다. 특히 평균 분자량 27,000 부근에서 관찰되는 두 단백질은 major band(B와 C)로서 고려인삼과 미국삼의 구별 없이 수삼에서의 주요 단백질로 보인다. 그러나 두 인삼간의 단백질 차이는 B, C 밴드와 20,000 부근의 D, E 밴드에서 뚜렷이 확인되었다. B와 C 단백질의 경우, 고려인삼은 미국삼의 단백질보다 약간 분자량이 작은 것으로 나타났고, D와 E 단백질의 경우, 고려인삼은 미국삼의 단백질보다 분자량이 작을 뿐만 아니라 정량적인 양에 있어서도 차이를 보이고 있다 (밴드 E).

단백질 시료의 SDS 처리시 끓이는 과정을 변화시켰을 때의 band shifting이 관찰됨으로써 66,000 부근

에서 발견되는 단백질 밴드 A는 밴드 B와 C로 이루어진 oligomer임이 확인되었다. 따라서 수삼 단백질의 경우 주요 단백질은 분자량 약 66,000의 oligomer로 사료되며 native gel electrophoresis를 통해 확인되었다(Fig. 2). Broad한 밴드의 모습이 66 K 단백질의 heterogeneous한 특성을 나타내 주고 있지만, 고려인삼과 미국삼의 차이가 SDS-PAGE의 패턴비교의 경우보다 훨씬 잘 나타나 있음을 알 수 있었다. 고려인삼의 66 K 주요 단백질이 미국삼의 경우보다 분자량이 작은 것이 관찰되었고, 다만 밴드 B와 C의 평균 분자량이 약 27 K인 점에 비추어, 밴드 A는

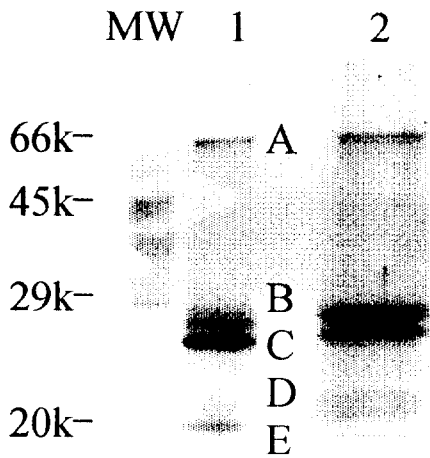


Fig. 1. SDS-PAGE patterns of the crude protein extract from ginseng roots. Lane MW: molecular weight markers; Lane 1: Korean ginseng; Lane 2: American ginseng; A, B, C, D, E: each represents a protein band next to it.



Fig. 2. Native gel electrophoretic patterns of the crude protein extract. Lane 1: Korean ginseng; Lane 2: American ginseng.

hetero dimer일 가능성과, 당이나 지방과의 복합 단백질의 가능성이 있다고 본다. 또한 화학적 혹은 효소적 분해의 기능성도 배제할 수 없다.

2. Gel filtration 및 ion exchange를 이용한 단백질 분리

고려인삼의 주요 단백질로 보이는 66 K 단백질을 분리 정제하기 위하여 Bio-gel P-100(분자량 범위 40,000~100,000)을 이용한 gel filtration chromatography를 수행하였다. 재료 및 방법에서 기술된 바와 같은 조건에서 void volume 이후부터 유출되는 분획은 280 nm에서의 높은 absorbance를 보이는 커다란 peak와, elution 거의 마지막 단계에서 낮은 absorbance를 보이는 작은 peak의 2가지 peak로 구분되었다. 각 peak에서의 fraction을 일정하게 선택한 뒤 Amicon membrane을 이용 농축하여 전기영동을 수행하였으나, gel filtration column 유출 시간에 관계없이 크기별로 분획된 단백질들의 전기영동 패턴은 차이가 없음이 발견되었다. 즉, 크기별로 분리된 모든 분획에서 Fig. 1과 똑같은 5가지의 밴드가 관찰되었다. 66 K 주요단백질의 aggregation에 의한 거대 분자 형성 가능성이나, 또는 단백질이 탄수화물, 지방 성분 혹은 다른 화합물과 complex를 이루어 분자량이 큰 분획으로 유출되었을 가능성이 있다고 하겠다. 첫번째 peak에서 얻어진 분획을 다시 ion exchange를 수행한 뒤 0~2 M NaCl gradient를 이용하여 얻은

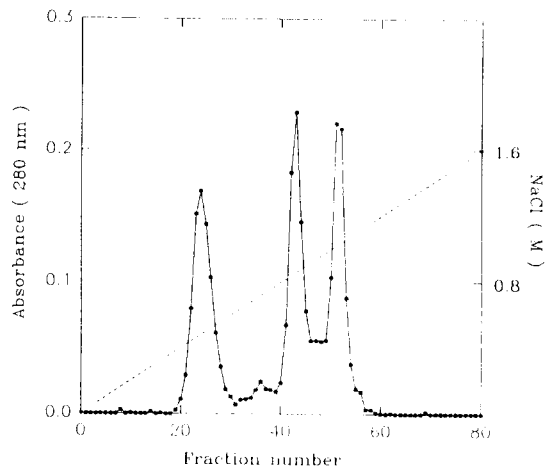


Fig. 3. An ion exchange chromatography elution profile of proteins obtained from ginseng roots, on DEAE-Sepharose CL-6B. Protein absorbance was measured at 280 nm.

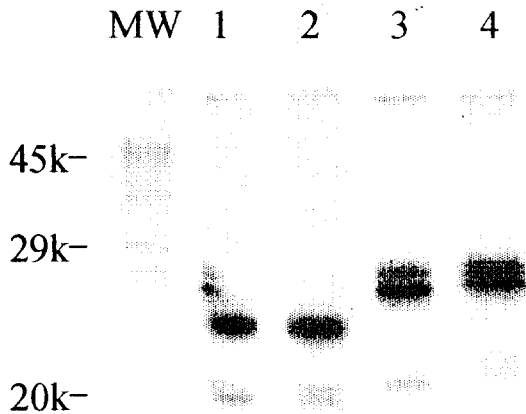


Fig. 4. SDS-PAGE patterns of the crude protein extract from ginseng roots. Lanes are the same as shown in Fig. 1, but Lanes 1~2 under the non-reducing condition without β -mercaptoethanol and Lanes 3~4 under the reducing condition.

elution profile이 Fig. 3에 나타나 있다. 그림에서 보는 바와 같이 3가지 peak가 발견되고 있고 이들에 대한 단백질 패턴 연구를 수행하고 있으며, gel filtration 수행에서 얻어진 두번째 peak 역시 ion exchange를 이용하여 분리하고 있다. Kong 등¹⁰⁾은 수삼 4년근에서 mitogenic activity를 보유하는 단백질의 분리를 gel filtration 및 DEAE ion exchange chromatography를 이용하여 4 개의 peak를 얻었음을 보고하였다. 이들 peak 중 대략 600 K 이상의 거대 분자량을 갖는 당단백질을 분리함으로써 human blood lymphocyte의 T와 B cell의 mitogen임을 밝혀내었다. 또한 홍삼으로부터 추출한 소수성 단백질 분획이 항암활성을 갖고 있음이 김 등¹¹⁾에 의해서 보고된 바 있다. 본 연구팀은 현재 이들 단백질 분획 중 2~3개 분획에 대해 생리활성 및 약리효능 연구를 의뢰 수행할 계획이다.

3. 인삼 뿌리 주요 단백질의 생물물리적 특성

SDS-PAGE 수행시 단백질 시료에 β -mercaptoethanol(β -me)을 제외함, 즉 non-reducing 조건과 β -me를 처리한 reducing 조건에서 나타난 밴드는 특히 B, C의 경우 큰 변화를 보여 주었다(Fig. 4). Reducing 조건에서 밴드 B와 C는 단일 밴드로 합쳐졌을 뿐만 아니라 분자량의 크기도 감소되었음이 발견되었다. Reducing 조건과 non-reducing 조건에서 시간에 따른 이들 단백질 밴드의 변화에 대한 연구를

통해, 평균 분자량 27,000의 주요 단백질들은 non-reducing 조건에서 internal disulfide bond에 의해 partially fold된 형태로 존재하는 것으로 사료된다. 최 등¹²⁾에 의하면 인삼 6년근의 아미노산 조성에서 cysteine의 함량이 매우 낮은 것으로 나타났다고 보고하였으나(trace amount), 단백질 분자내 disulfide bridge를 갖고 있는 점은 흥미로우며, chemical modification에 의한 확인 실험을 계획하고 있다.

요 약

고려인삼에서의 단백질 및 펩타이드의 생화학적 연구 초기 단계로서 고려인삼과 미국삼의 수용성 펩타이드와 단백질의 비교를 통해 두 인삼간의 차이점을 분석하였다. 전기영동에 나타난 단백질 패턴 비교 분석을 통해서 특이 단백질 및 펩타이드의 분리 정제를 수행하였고, 이들 단백질에 대한 생물리적 특성을 알아보았다. 고려인삼과 미국삼에서의 27 K 주요 단백질은 분자량에 있어 차이를 보이고 있으며, 20 K 단백질은 정량적인 차이를 보였다. 특히 27 K 단백질은 66 K 크기를 갖는 hetero dimer를 형성하는 복합 단백질일 것으로 보이며, internal disulfide bond를 보유함이 확인되었다. Crude 단백질 용액으로부터 gel filtration과 DEAE ion exchange chromatography를 수행하여 3가지 peak를 얻어 단백질을 분리하였고, 이들의 순수분리 정제, 생리활성 및 약리효능 연구를 계획하고 있다.

감사의 말씀

한국 인삼연초연구원 유전생리 3실 윤중혁 박사님, 이미자 박사님, 이미경 박사님, 조병구 박사님, 그리고 이종률 선생님의 도움에 감사드립니다.

인 용 문 헌

1. 한국인삼연초연구원 : 고려인삼 (1994).
2. 박상욱 : 숙명여자대학교 박사학위 논문 (1995).
3. 김영중, 정보섭, 이강노, 구향자, 안상미 : 한국영양학회지 **16**(2), 115 (1983).
4. 최 청, 윤상홍, 배만중, 안봉진 : 한국농화학회지 **28**(2), 88 (1985).

5. 김수일, 라지영, 이춘영 : 한국농화학회지 **30**(1), 88 (1987).
6. 김춘미 : 고려인삼학회지 **14**(2), 279 (1990).
7. Jin, Z., Hongying, Z., Wenyum, D., Dawei, W., BenXiang, W., Min, Y., Yulian, J., Zhiyong, C. and Yan, W. : *Korean J. Ginseng Sci.* **14**(2), 285 (1990).
8. 정열영, 정찬문, 고성룡, 최광태 : 고려인삼학회지 **19**(2), 160 (1995).
9. Laemmli, U. K. : *Nature* **227**, 680 (1970).
10. Kong, Y., Fong, W., Song, M., Ng, K., Ho, D. and Ng, P. : *Proc. Int. Sym. on Korean Ginseng*, Korea Ginseng Res. Inst., Seoul, Korea, p. 79 (1990).
11. 김창환, 이명섭, 이경호 : 고려인삼학회지 **19**(1), 27 (1995).