

*Aspergillus oryzae*를 이용한 수삼으로부터 compound K로의 생물전환

김보혜 · 강주형 · 이선이 · 조효진 · 김영진 · 김윤진¹ · 안순철*

부산대학교 의과대학 미생물학 및 면역학 교실, ¹부산대학교 의과대학 가정의학과

Received January 23, 2006 / Accepted February 2, 2006

Biotransformation of Ginseng to Compound K by *Aspergillus oryzae*. Bo-Hye Kim, Ju-Hyung Kang, Sun-Yi Lee, Hyo-Jin Cho, Yeong-Jin Kim, Yun Jin Kim¹ and Soon-Cheol Ahn*. *Department of Microbiology and Immunology, College of Medicine, Pusan National University, Busan 602-739, Korea, ¹Department of Family Medicine, College of Medicine, Pusan National University, Busan 602-739* – Ginseng was fermented by *Aspergillus oryzae* to search metabolites on the basis of increased biological activity and modified structure. From this research, two biotransformed compounds (WG2-2-1 and WG2-2-2) were detected and isolated through several chromatographic techniques. WG2-2-2 was confirmed to biologically active compound K by TLC, HPLC, and mass spectroscopy, while WG2-2-1 was going to be identified until now. In biological activity, both WG2-2-1 and WG2-2-2 exhibit the cytotoxicity on PC-3 cells, but WG2-2-2 was more active than WG2-2-1. It is supposed that WG2-2-1 is an intermediate metabolite transforming to final WG2-2-2, compound K.

Key words – Ginseng, *Aspergillus oryzae*, compound K, biotransformation, cytotoxicity.

인삼은 생약의 형태로 한국, 중국, 일본 등의 아시아 국가에서 정신의학적, 신경계의 질병 및 당뇨병 등을 포함한 여러 가지 질병에 대해 사용되어 왔다[10]. 인삼의 화학성분과 약리효능은 현대 과학적인 연구를 통해 saponin이 주요 유효 성분으로 밝혀졌고, 항암작용, 면역기능 강화작용, 혈당강하 작용, 간 기능 강화작용, 혈압조절 및 동맥경화 예방작용, 항산화 작용 등의 주요 약리작용이 알려져 있다[8,13].

Saponin은 인삼의 약리 효능을 나타내는 주요 물질 중의 하나로 현재까지 30 종의 saponin이 인삼으로부터 분리되어 ginsenoside로 명명되어 그 화학구조가 밝혀져 있다[7]. 이러한 saponin은 당부분(glycone)과 비당부분(aglycone)으로 구성된 배당체로서 식물계에 널리 분포하고 있으며, ginsenoside는 비당부가 dammarane계 triterpene인 점이 특징적이고 인삼에서 발견되는 중요한 3 가지 형태의 ginsenoside는 protopanaxadiol계, protopanaxatriol계, 그리고 oleanolic acid이다[2,9,11]. 그러나 이러한 ginsenoside는 고분자 구성 성분과 연결되어 있어서 섭취 후 체내 흡수가 용이하지 않으므로 반드시 장내에 서식하는 미생물에 의해 분해가 되어야 저분자의 형태로 흡수된다[3,6,12]. 즉 여러 가지 당이 떨어져 나간, 분자량이 작은 ginsenoside 형태가 되어야만 인체에 잘 흡수된다고 볼 수 있다. 이에 대해 사람의 배설물을 표본 추출하여 장내 미생물의 ginsenoside Rb1의 가수분해 능력을 실험한 결과 표본 중 21%는 분해 능력이 없는 것으로 나타나, 이는 ginsenoside를 분해하는 미생물을 보유하지 않은 것을 의미하며, 분해미생물을 보유한 것으로 나타난 70%도

ginsenoside를 분해하는 능력에 있어서 저마다 차이를 보이는 것으로 알려졌다[4,5]. 또한 홍삼에만 함유되어 있는 ginsenoside Rh2와 같이 생리활성이 우수한 saponin의 경우 함량이 낮아 약리효능 연구에 필요한 시료의 공급이 제한되어 있어 연구 결과가 아주 적다[1].

따라서 본 연구에서는 다양한 종류의 분해 효소를 생산하는 미생물 생균제를 이용하여 인삼의 배당체 형태를 무배당체 형태로 전환시켜 특정 성분의 함량 증가 및 생리활성이 증가되거나 새롭게 생합성된 대사산물을 얻고자 하였다. 특히 기존의 방법과 비교하여 인삼의 ginsenoside 중 강력한 생리활성 성분으로 알려진 compound K의 수율을 더욱 높여 이를 분리 및 정제하는 방법을 고안하였으며 이를 통해 유효성분의 추출 증가와 함께 체내에서의 흡수 증대로 장내 미생물의 유무나 가수분해 능력의 차이로 인한 흡수와 효능의 차이를 제거할 수 있을 것으로 판단되었다.

재료 및 방법

수삼 재료 및 사용 균주

실험 재료인 6년근 수삼은 부산시장 인삼상가에서 구입하여 사용하였다. 대조균으로 사용된 compound K (IH901), Rh2, Rb1, Rg3는 경희대학교 약학대학 김동현 교수님으로부터 제공 받아 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 생균제는 *Aspergillus oryzae* KCTC6292, *Bacillus subtilis* KCTC1666, *Lactobacillus acidophilus* KCTC3155, *Lactobacillus plantarum* KCTC3108, *Saccharomyces cerevisiae* KCTC7919는 한국생명공학연구원(KRIBB)으로부터 분양 받아 사용하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-240-7735, Fax : +82-51-243-2259

E-mail : ahnsc@pusan.ac.kr

생균제를 이용한 수삼의 발효

10% 수삼을 멸균하여 생균제인 *A. oryzae* KCTC6292, *B. subtilis* KCTC1666, *L. acidophilus* KCTC3155, *L. plantarum* KCTC3108, *S. cerevisiae* KCTC7919를 10% 접종하여 37°C에서 150 rpm으로 5일간 진탕배양 한 다음, 각 배양액을 분석하여 수삼의 전환 활성이 가장 높은 *A. oryzae*를 선별하였다. *A. oryzae*를 이용하여 대량 배양하기 위해, 수삼 3 kg을 homogenizer로 분쇄하여 30 L potato dextrose broth (PDB; Difco, USA)와 함께 멸균한 후, 증배양한 *A. oryzae*를 10% 접종하여 50 L 발효조(Biotron, Korea)에 넣고 30°C에서 140 rpm으로 5일간 배양하였다. 배양기간 동안 0.5 g의 소포제 (LS-303, Dow-corning, Korea)를 2 회 첨가하여 saponin에 의해 생성되는 배양액의 기포를 제거하였다.

전환산물의 분석

전환된 배양물질을 확인하기 위하여 시료를 silica gel (60F₂₅₄, Merck, Darmstadt, Germany) thin layer chromatography (TLC)하였다. 전개용매로 chloroform/methanol/water (4/2/1, v/v/v)의 아래층을 사용하여 전개한 후, anisaldehyde sulfuric acid로 분무하고 110°C에서 약 10 분간 가온하여 발색하였다. 본 실험에 사용된 high performance liquid chromatography (HPLC)는 SCL-10A controller, SPD-M10A UV spectrophotometric detector, LC-10AT liquid chromatograph, FCV-10AL, DGU-14A (Shimadzu Scientific Co., Japan)로 구성되었다. 시료의 농도를 1 mg/ml로 맞추어 5 µl씩 주입하였으며, 이동상으로 0-5 분에는 30% CH₃CN, 5-40 분에는 30-80% CH₃CN, 40-50 분에는 80% CH₃CN으로하여 유속 0.5 ml/min, 고정상으로는 YMC-PACK C18 (Ø6.0x150 mm) column(YMC Co., Japan)을 사용하였다.

전환산물의 분리

수삼의 배양물로부터 유용물질로 전환되었거나 신규 가능성이 있는 전환물질을 분리하기 위하여 먼저 발효산물과 전환산물을 methanol (MeOH)로 추출하고 상등액만을 농축하여 buthanol (BuOH) 추출을 하였다. BuOH 추출물의 산, 알카리 안정성, 수지에 대한 흡착성, 용매 이행성을 조사하여 정제하기 위하여 Diaion HP-20 흡착 chromatography, silica gel TLC와 column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, reverse phase (RP-18) column chromatography 그리고 HPLC를 통해 활성물질을 분리 및 정제하였다.

전환산물의 세포독성

실험에 사용된 세포주로는 PC-3 cell (1×10⁴ cells/250 µl/well)을 5% CO₂가 포함된 37°C 배양기에서 12 시간 배양한

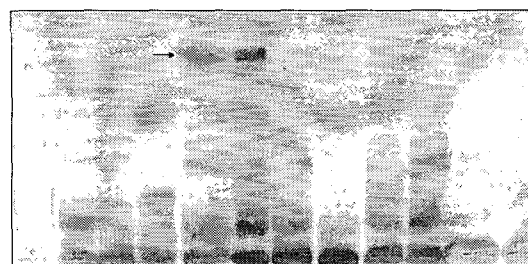
후, 측정시료를 처리하고 다시 48 시간 동안 배양하였다. MTT 용액을 0.5 mg/ml의 농도로 배양세포에 첨가한 후, 37°C에서 4 시간 동안 반응하고 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 처리하여 20 분간 shaking한 뒤, ELISA reader (VERSA, USA)를 사용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

생균제를 이용한 수삼의 배양

Compound K를 포함한 새로운 전환물질을 탐색하기 위하여 생균제로서 이용되고 있는 *B. subtilis* KCTC1666, *A. oryzae* KCTC6292, *S. cerevisiae* KCTC7919, *L. plantarum* KCTC3108, 및 *L. acidophilus* KCTC3155를 멸균된 수삼에 10%씩 각각 접종하여 37°C에서 150 rpm으로 5일간 배양하였다. 수삼 배양액을 MeOH로 추출, 건조하고 물에 현탁한 뒤, BuOH로 재추출 및 건조하여 MeOH에 녹여 10 mg/ml 농도의 시료로 만들어 대사산물의 변화를 TLC로 확인하였다.

새로운 전환물질을 확인하기 위하여 수삼배양물의 BuOH 추출물에 대해 TLC를 실시한 결과, Fig. 1에서와 같이 *A. oryzae* KCTC6292로 배양한 분획물의 Rf치 0.9 부근에서 새로이 생성된 것으로 예상되는 성분변화를 확인할 수 있었으나, *B. subtilis* KCTC1666, *L. acidophilus* KCTC3155, *L. plantarum* KCTC3108 및 *S. cerevisiae* KCTC7919를 첨가하여 배양한 수삼에서는 전환물질을 확인할 수 없었다. 90% MeOH을 전개용매로 한 RP-18 TLC 결과에서도 순상 TLC에서 확인된 물질로 추정되는 spot을 확인할 수 있었다(data not shown). 한편 수삼을 첨가하지 않고 *A. oryzae* KCTC6292의 증배양액만으로 배양한 분획물에서는 이러한 전환물질을 확인할 수 없었기 때문에 전환물질은 배양에 사용한 수삼에서 유래된 것으로 추정되었다.



BS* BS1 BS2 AO* AO1 AO2 G1 G2 SC1 SC2 LA LP

Fig. 1. TLC analysis of fermented ginseng by probiotics.

Silica gel 60F₂₅₄ TLC plate; chloroform/MeOH/H₂O (65/35/10, lower phase); BS, *Bacillus subtilis* only; BS1, 1st fermented ginseng; BS2, 2nd fermented ginseng; AO, *A. oryzae* only; AO1, 1st fermented ginseng; AO2, 2nd fermented ginseng; G1, autoclaved ginseng; G2, unautoclaved ginseng; SC1, 1st fermented ginseng; SC2, 2nd fermented ginseng; LA, fermented ginseng; LP, fermented ginseng.

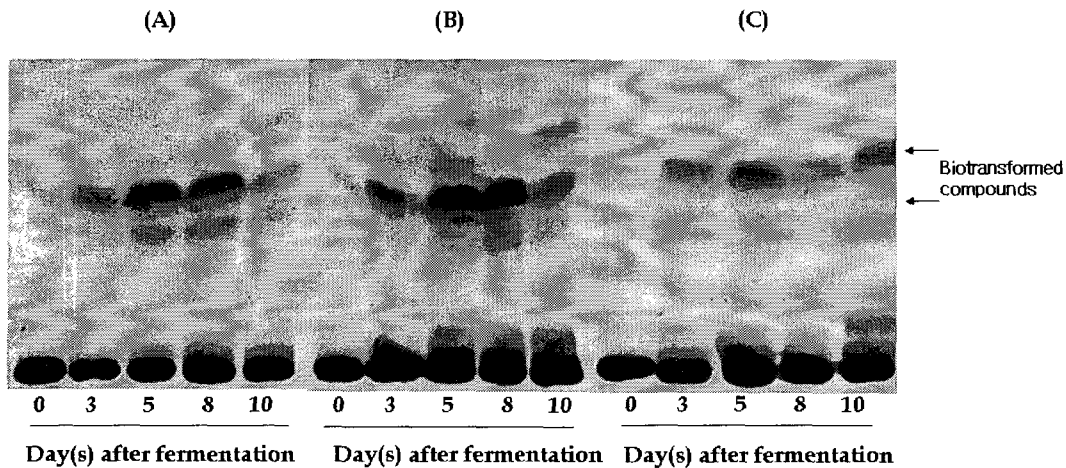


Fig. 2. Culture profiles of fermented ginseng by *A. oryzae* KCTC6292. Silica gel 60F₂₅₄ TLC plate; chloroform/MeOH/H₂O (4/2/1, lower phase) (A) 5% ginseng, (B) 10% ginseng, (C) 20% ginseng.

A. oryzae KCTC6292에 의한 수삼의 대량 배양

Fig. 1에 나타난 Rf치 0.9의 대사산물의 생성 양상을 검토하기 위하여 수삼의 양과 배양 일자를 달리하여 실험하였다. 종배양액은 10% *A. oryzae* KCTC6292로 고정하고 수삼의 양을 각각 5%, 10%, 20%로 하였으며, 배양 0, 3, 5, 8, 10 일째 배양액을 회수하였다. 그 결과, 전환물질이 3 일째부터 생성되기 시작하여 배양 후 5~8 일째에서 최대로 전환되었고 특히 10% 수삼을 사용했을 때 최대로 생성되는 것을 확인하였다(Fig. 2).

전환물질의 대량 생산 및 분리를 위하여 PDB에 6년근 수삼을 첨가하고 *A. oryzae* KCTC6292 종배양액을 10% 접종하여 30℃에서 140 rpm의 속도로 교반하면서 5 일간 배양하였다. *A. oryzae* KCTC6292의 접종 시 배양액의 pH는 4.91에서 2 일째 pH 6.6, 4 일째는 pH 6.96, 배양이 끝나는 5 일째 pH는 7.67로 상승하였다. 0, 2, 4, 5 일째 배양액을 회수하여 MeOH로 추출하고 HPLC를 실시하였다. Fig. 3과 같이 표준물질로서 수삼의 protopanaxdiol ginsenoside인 Rb1은 24 분대에 확인이 되었고, Rb1에서 포도당이 1개 분해되어 제거된 Rg3는 33 분대와 36 분대에서 확인할 수 있었다. 또한 Rb1에서 포도당이 2개 분해되어 제거되거나 Rg3에서 포도당이 1개 분해되어 제거된 Rh2의 경우, 43.5 분에 확인할 수 있었다. 한편 protopanaxatriol ginsenoside로서 포도당이 2개 분해되어 제거된 compound K의 경우, Rh2와 유사하게 43.0 분에서 peak를 보였다. 배양 날짜에 따른 배양액 내의 전환물질의 양을 비교한 결과, compound K로 추정되는 물질이 배양 2일부터 검출되기 시작하여 배양 기간에 따라 점점 증가하여 배양 5일째 최대로 생성되는 것을 확인하였다(Fig. 4).

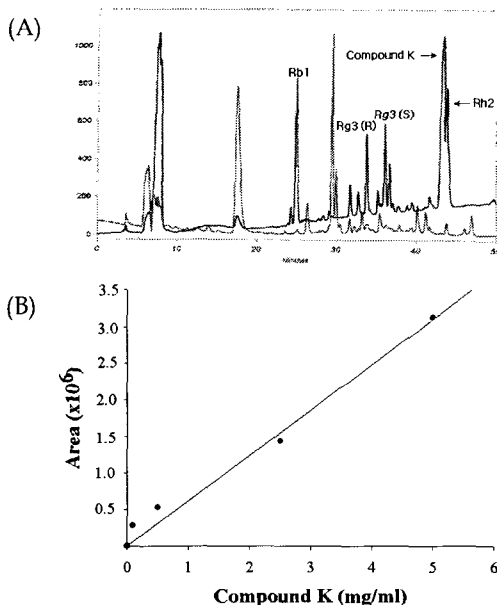


Fig. 3. Quantitative analysis of compound K. (A) Representative HPLC chromatogram of authentic ginsenosides as standards. YMC-Pack C18, Ø6.0x150 mm; A, H₂O; B, CH₃CN; 0-5 min, 30% C; 5-40 min, 30-80% C; 40-50 min, 80% C; 0.5 ml/min. (B) Standard curve of compound K by HPLC.

전환물질의 분리 및 정제

A. oryzae KCTC6292를 이용하여 얻은 배양액으로부터 compound K를 포함한 새로운 전환물질을 분리하기 위하여 배양액을 5,000 rpm으로 원심분리하고, 침전물은 30 L의 MeOH로 2 일간 추출하였다. 증류수에 현탁한 수삼의 MeOH 추출물을 ethylacetate (EtOAc)로 3회 추출하여 농축시킨 분획을 chloroform으로 충전한 silica gel column에서 chloroform과 methanol의 비율을 단계적으로 증가시키는 stepwise 용출법(chloroform : methanol=50 : 1 → 10 : 1, v/v)으로 전개하여 WG1, WG2, WG3를 분리하였다 (Fig. 5). 이 중 전환물질이 포함된 WG2를 선택하여 2차 silica gel

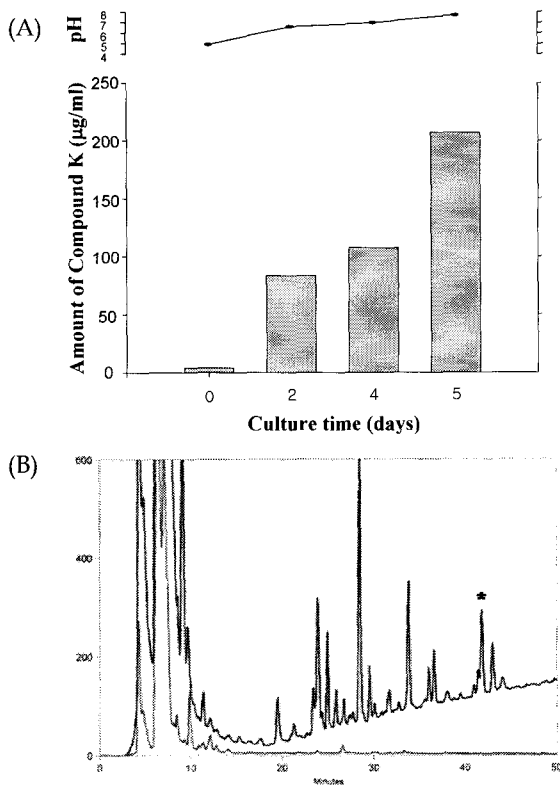


Fig. 4. Cultural profile of undried ginseng by *A. oryzae* KCTC6292.

(A) Profiles of compound K and pH during fermentation of undried ginseng. (B) HPLC of undried ginsengs fermented by *Aspergillus oryzae*. YMC-Pack C18, Ø 6.0x150 mm, 0-5min, 30% CH₃CN; 5-40min, 30-80% CH₃CN; 40-50min, 80% CH₃CN, 0.5 ml/min. Asterisk symbol represents a peak of compound K.

column chromatography를 실시하였으며, 이 때 chloroform/MeOH/water (65/35/10, lower phase)를 전개용매로 사용하여 WG2-1과 WG2-2의 분획을 분리하였다. WG2-2 분획물을 80% MeOH을 전개용매로 RP-18 column chromatography하여 WG2-2를 분리하였으며 HPLC (3 ml/min, 70% acetonitrile ; 고정상, YMC C18 column, 20.0x150 mm; detector, PDA)를 이용하여 나머지 분획으로부터 WG2-2-1을 분리하였다.

전환물질의 동정

A. oryzae KCTC6292에 의해 전환되어 분리된 WG2-2-1과 WG2-2-2는 HPLC, TLC 분석, UV 흡수 및 발색반응을 통해 ginsenoside 화합물로 추정되었다. WG2-2-1의 경우, 분리된 시료의 양이 기기분석에 충분하지 못하여 더 이상의 분석이 불가능하였으며 WG2-2-2의 경우, compound K와 동일한 것으로 예상되어 이를 확인하기 위하여 compound K의 표준 물질과 분리한 WG2-2-2와 함께 LR-MS를 수행하여 분절된

분자이온(fragmented molecular ion) peak를 비교하였다. 기존에 알려진 compound K의 분자량은 621로서 135, 207, 341, 425 등에서 분절된 분자이온 peak를 확인할 수 있었으며 WG2-2-2의 분절양상이 compound K와 동일한 것으로 보아 전환물질 WG2-2-2가 compound K임을 확인할 수 있었다 (Fig. 6).

전환물질의 세포독성

WG2-2 분획물의 PC-3 전립선 암세포에 대한 세포독성을 측정된 결과, 최종적으로 분리된 전환물질 WG2-2-1과 WG2-2-2는 PC-3 세포에 대하여 농도 의존적으로 강력히 세포 독성을 보였다(Fig. 7). 또한 compound K인 것으로 동정된 WG2-2-2는 WG2-2-1과 비교하여 세포독성 활성이 더 강했으며, 이런 결과는 비배당체 ginsenoside가 배당체 ginsenoside 보다 생물활성이 강하다는 기존의 보고[2,5]를 통해 WG2-2-1은 WG2-2-2로 전환되는 중간 단계의 대사산물일 것으로 추정된다. 따라서 WG2-2-1의 구조 분석에 대한 추가 연구를 통해 WG2-2-2의 생물 전환과정에서의 전환물질과 생물활성과의 연관성을 규명하고 자 한다.

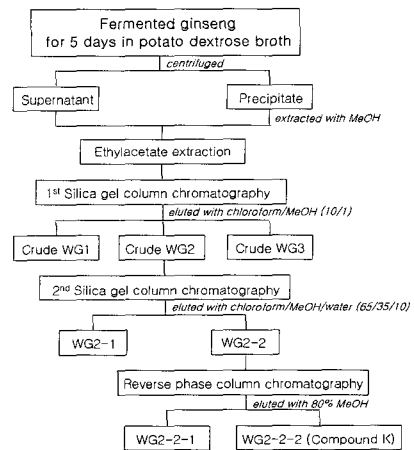


Fig. 5. Purification scheme of WG2-2-1 and WG2-2-2 from fermented undried ginseng.

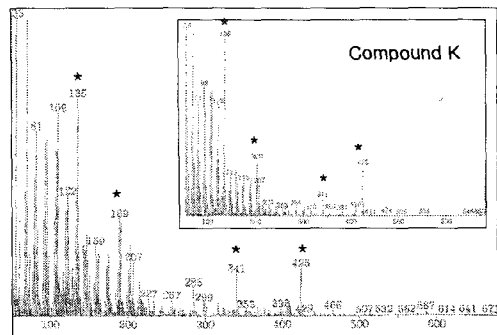


Fig. 6. LR-MS spectrum of WG2-2-2 and compound K. Asterisk symbols represent characteristic fragmented molecular ion peaks of sample.

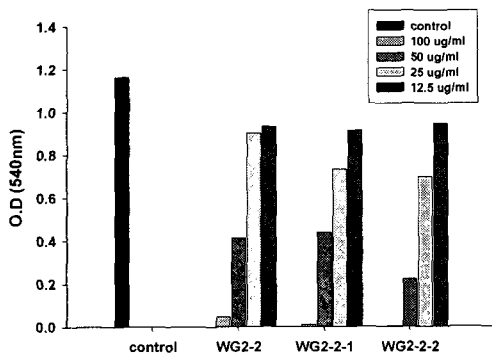


Fig. 7. Cytotoxicity of WG2-2, WG2-2-1 and WG2-2-2 on PC-3 cells.

감사의 글

이 연구는 농림부 농림기술개발사업 (과제번호105062-3)의 지원으로 수행되었습니다.

참고 문헌

- Baek, N. I., D. S. Kim, Y. H. Park, D. J, S. Y. Jung, C. B. Lee and S. I. Kim. 1995. Complete Assignment ¹H- and ¹³C-NMR Signals for (20S)- and (20R)-ginsenoside Rh₂ by 2D-NMR techniques. *Agricultural Chemistry and Biotechnology* **38**(2), 184-189.
- Hasegawa, H. 2004. Proof of the mysterious efficacy of ginseng: basic and clinical trials: metabolic activation of ginsenoside: deglycosylation by intestinal bacteria and esterification with fatty acid. *J. Pharmacol. Sci.* **95**, 153-157.
- Hasegawa, H., J. H. Sung, S. Matsumiya and M. Uchiyama. 1996. Main Ginseng Saponin Metabolites Formed by Intestinal Bacteria. *Planta Medica*. **62**, 453-457.
- Hasegawa, H., J. H. Sung and Y. Benno. 1997. Role of human intestinal *Prevotella oris* in hydrolyzing ginseng saponins. *Planta Medica* **63**(5), 436-440.
- Hasegawa, H and M. Uchiyama. 1998. Antimetastatic efficacy of orally administered ginsenoside Rb₁ in dependence on intestinal bacterial hydrolyzing potential and significance of treatment with an active bacterial metabolite. *Planta Medica* **64**, 696-700.
- Karikura, M., T. Miyase, H. Tanizawa, T. Taniyama and Y. Takino. 1991. Studies on absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. VI. The decomposition products of ginsenoside Rh₂ in the stomach of rats. *Chem. Pharm. Bull.* **39**(2), 400-404.
- Kim, J. H., S. Y. Nah. 2005. Effect of ginsenoside total saponins on experimental irritable bowel syndrome in rat. *J. Ginseng Res.* **29**(2), 94-99.
- Kitts, D. D and C. Hu. 2000. Efficacy and safety of ginseng. *Public Health Nutrition* **3**(4A), 473-485.
- Ko, S. R., Y. Suzuki, K. J. Chei and Y. H. Kim. 2000. Enzymatic preparation of genuine prosapogenin, 20(S)-ginsenoside Rh₁, from ginsenosides Re and Rg₁. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**(12), 2739-2743.
- Kwon, O. S and Y. B. Chung. 2004. Solubilization of IH-901, a novel intestinal metabolite of ginseng saponin, in aqueous solution. *J. Kor. Pharm. Sci.* **34**(5), 385-391.
- Park, E. K., Y. W. Shin, H. U. Lee, S. S. Kim, Y. C. Lee, B. Y. Lee and D. H. Kim. 2004. Inhibitory effect of ginsenoside Rb₁ and compound K on NO and prostaglandin E₂ biosyntheses of RAW264.7 cells induced by lipopolysaccharide. *Biol. Pharm. Bull.* **28**(4), 652-656.
- Tawab, M. A., U. Bahr, M. Karas, M. Wurglice and M. Schubert-Zsilavec. 2003. Degradation of ginsenosides in humans after oral administration. *Drug Metab. Dispos.* **31**(8), 1065-1071.
- 박채규, 전병선, 양재원. 2003. 고려인삼의 화학성분. *식품산업과 영양* **8**(2), 10-23.