

Trichoderma reesei 유래 산업효소를 이용한 인삼추출물로부터 Compound K 생산 최적화

한강 · 이남근* · 이유리* · 정은정* · 정용섭

전북대학교 식품공학과, *전북대학교 바이오식품소재개발 및 산업화연구센터

Optimization of Compound K Production from Ginseng Extract by Enzymatic Bioconversion of *Trichoderma reesei*

Gang Han, Nam Keun Lee*, Yu Ri Lee*, Eun-Jeong Jeong* and †Yong-seob Jeong

Dept. of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

*Research Center for Industrial Development of Biofood Materials, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

Abstract

Compound K(ginsenoside M1) is one of saponin metabolites and has many benefits for human health. This study was to investigate Compound K produced from ginseng crude saponin extract with commercial cellulolytic complex enzyme(cellulase, β -glucanase, and hemicellulase) obtained from *Trichoderma reesei*. The effect factors(temperature, pH, ginseng crude saponin extract and enzyme concentration, and reaction time) on production of Compound K from ginseng crude saponin extract were determined by one factor at a time method. The selected major factor variables were ginseng crude saponin extract of 2%(w/v), enzyme of 7%(v/v), reaction time of 48 hr. Based on the effect factors, response surface method was proceeded to optimize the enzymatic bioconversion conditions for the desirable Compound K production under the fixed condition of pH 5.0 and 50°C. The optimal reaction condition from RSM was ginseng crude saponin extract of 2.38%, enzyme of 6.06%, and reaction time of 64.04 hr. The expected concentration of Compound K produced from that reaction was 840.77 mg/100 g. Production of Compound K was 1,017.93 mg/100 g and 862.31 mg/100 g, by flask and bench-scale bioreactor(2.5 l) system, respectively.

Key words: Compound K, ginseng saponin, response surface methodology, *Trichoderma reesei*, enzymatic bioconversion

서 론

천연물에는 유익한 생리활성 성분들이 다양하게 함유되어 있으며, 많은 종류들이 생리활성물질과 당이 결합된 배당체로 존재한다. 배당체를 구성하는 당으로는 glucose, arabinose, galactose, rhamnose, xylose 등이 있다(Quan 등 2010). 대부분 활성물질들은 β -glucoside 결합으로 존재하므로 당 결합을 끊을 수 있는 β -glucosidase, pectinase, hemicellulase, lactase와 cellulase 등의 효소나 그 효소를 생산하는 미생물을 이용하여 천연물 내의 배당체 화합물을 활성 형태의 배당체 또는 무배

당체로 전환할 수 있으며, 유효물질의 양을 증가시키는 것이 가능하다(Vensisetty & Ciddi 2003).

*Trichoderma reesei*는 cellulase와 hemicellulase를 생산하는 우수한 곰팡이로 잘 알려져 있으며(Chahal DS 1985; Seidl 등 2009), cellulose을 이용한 당 전환 모델 시스템 균주이다. 최근에는 농업 부산물들로부터 biofuel을 생산하기 위한 연구(Seidl 등 2009)뿐만 아니라, 인삼과 마 등의 뿌리류 농산물 내에 존재하는 배당체 화합물들을 생리활성을 갖는 배당체 또는 무배당체로 전환하려는 연구가 시도되어지고 있다(Park 등 2010; Zhu 등 2010).

† Corresponding author: Yong-seob Jeong, Dept. of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea. Tel: +82-63-270-2571, Fax: +82-63-270-2572, E-mail: ysjeong@jbnu.ac.kr

인삼의 사포닌 함량은 3~6%가 존재하며(Kim 등 2008), triterpenoid계의 dammarane계 사포닌으로서 구조적으로 비당 화합물(aglycone), protopanaxadiol group(ginsenoside Ra, Rb, Rc, Rd, Rg3, Rh2 and Rs), protopanatriol group(ginsenoside Re, Rf, Rg1, Rg2 and Rh1)으로 분류된다(Chang HK 2003; Park 등 2010). Ginsenoside 중 protopanaxadiol type의 사포닌 즉, ginsenoside Rb1, Rb2, Rb3, Rc, Rd, F2 등은 장내 미생물에 의하여 최종적으로 Compound K(CK) 또는 20 (S)-protopanaxadiol로 전환된다. 그리고 대사산물로서 전환된 CK는 암세포 형성, 침입, 전이 억제효과가 있으며, 대사체 중 항암효과가 가장 큰 물질이라고 보고되었다(Bae 등 2002; Saiki I 2003; Kwon & Chung 2004). 이러한 이유로 미생물을 이용한 인삼 추출물과 protopanaxadiol group(Rb1, Rb2, Rb3, Rc)들로부터 CK로의 전환 연구가 보고되고 있으며, 이에 관련된 미생물로는 *Lactobacillus brevis*(Quan 등 2008), *Lactobacillus pentosus*(Quan 등 2010), *Bifidobacterium* sp.(Bae 등 2002), *Aspergillus* sp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium sacchari*, *Fusobacterium* sp., *Penicillium* sp., *Paecilomyces bainier*, *Pyrococcus furiosus*, *Sulfolobus acidocaldarius*와 *Sulfolobus solfataricus* 등이 있다(Park 등 2010; Yoo 등 2011). *Trichoderma* 종에 있어서는, *T. viride*와 *T. reesei*의 cellulase 효소를 이용하여 protopanaxadiol 혼합물과 ginseng 추출물로부터 Rd, Rg3, CK로의 전환이 보고되었다(Ko 등 2007; Park 등 2010).

본 연구에서 산업에 적용되고 있는 당 전환 모델 시스템 균주인 *T. reesei*의 효소를 이용하여 인삼 조사포닌 추출물로부터 CK를 생산하고자 하였으며, 이에 따라 온도, pH, 인삼 조사포닌 추출물 농도, 효소 농도와 반응시간에 따른 CK의 전환 조건을 선정하고, 최종적으로 반응표면분석법을 적용하여 생산 최적화를 하기 위한 조건들을 결정하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용된 인삼 조사포닌은 전라북도 진안군에서 생산된 인삼(2010년 6년근)으로부터 얻어진 조사포닌 분말을 (주)글로엔엠(Wanju, Korea)에서 제공받아 사용하였다. 성분분석을 위하여 ginsenoside는 PPD(Protopanaxadiol)계 ginsenoside인 Rb1(Wako, 98.0%), Rc(Wako, 98.0%), Rb2(LKT Laboratories, Inc., 99.0%), Rd(Wako, 99.0%), Rg3(LKT Laboratories, Inc., 99.0%), Rh2(LKT Laboratories, Inc., 99.0%)와 Compound K (Ambo Institute, 98%) 표준품을 구입하여 사용하였다. *T. reesei*의 cellulolytic 복합 효소는 AB Enzymes(Rohment CL, GmbH, Darmstadt, Germany)의 제품을 사용하였다.

2. 온도 및 pH 조건별 효소반응

T. reesei 효소의 온도 변화에 따른 인삼 조사포닌 추출물로부터 CK의 생성량을 알아보기 위하여 2%(w/v) 인삼 조사포닌 추출물 수용액과 9%(v/v) 효소액을 50 ml가 되도록 한 후 온도 조건을 40°C에서 60°C까지 5°C 간격으로 설정하고 각각 120 rpm에서 24 hr 동안 반응시켰다. 그리고 다양한 pH 영향은 1 N HCl과 1 N NaOH를 이용하여 인삼 조사포닌 추출물의 pH를 3.0에서 7.0까지 pH 1.0의 간격으로 조정 한 후, 각각의 2%(w/v) 인삼 조사포닌 추출물 수용액과 9%(v/v) 효소액을 50 ml가 되도록 한 후, 50°C 인큐베이터에서 120 rpm으로 24 hr 반응시켰다. 효소반응을 정지를 위하여 비등 수욕조에서 10 min 동안 가열한 후 냉각하고, 이것을 여과(ADVENTEC filter paper No.2)하여 분석용 시료로 사용하였다.

3. 인삼 조사포닌 추출물 및 효소 농도에 따른 반응

인삼 조사포닌 추출물의 농도별 CK의 생성량을 알아보기 위하여 인삼 조사포닌 추출물 수용액을 1%에서 5%(w/v)까지 1% 농도 차이로 만든 후, 각각의 인삼 조사포닌 추출물 수용액과 9%(v/v) 효소액을 50 ml가 되도록 한 후, 50°C 인큐베이터에서 120 rpm으로 24 hr 반응시켰다. 그리고 효소처리 농도에 따른 영향은 2%(w/v) 인삼 조사포닌 추출물 수용액과 1%에서 9%(v/v)까지 2% 간격으로 준비된 각각의 효소액을 50 ml가 되도록 한 후 50°C 인큐베이터에서 120 rpm으로 24 hr 반응시켰다. 효소반응 정지 및 분석용 시료 준비는 온도 및 pH 조건별 효소반응에서 수행된 방법과 동일하게 진행하였다.

4. 시간별 효소반응

온도, pH, 인삼 조사포닌 추출물 농도와 효소 농도 조건에 따른 실험 결과(50°C, pH 5.0, 2%(w/v)인삼 조사포닌 추출물, 9%(v/v) 효소)를 기준으로 시간별 효소반응에 따른 CK로의 전환 정도를 측정하였으며, 반응은 120 rpm에서 12 hr 간격으로 96 hr 동안 진행하였다. 효소반응 정지 및 분석용 시료 준비는 온도 및 pH 조건별 효소반응에서 수행된 방법과 동일하게 진행하였다.

5. Ginsenoside 분석

효소 반응 후의 시료를 0.2 μ l membrane filter(Chrom Tech, Inc., MN, USA)로 여과한 후, HPLC(Waters HPLC system, USA)를 이용하여 ginsenoside들을 분석하였다. 컬럼은 YMC-triart C18 S column(5 μ m, 4.6×250 mm, 12 nm)이었으며, PDA detector (waters 2998, Waters, USA)를 이용하여 265 nm에서 검출하였다. 이동상은 water(A)와 acetonitrile(B)를 사용하였으며, time program은 0~10 min(20% B), 10~42 min(20~29% B), 42~67 min(29~41% B), 67~70 min(41~47% B), 70~90 min(47~

71% B), 90~95 min(71% B), 95~95.01 min(71~20% B)과 95.01~115.01 min(20% B)이었다. 유속과 시료 1회 주입량은 각각 1.2 mL/min과 10 μ l이었다.

6. Response Surface Method(RSM)에 의한 효소반응 최적화

선행 실험의 결과를 근거로 Design Expert pro S/W ver. 1.0 (Stat-Ease, Inc. Minneapolis, MN, USA)을 이용하여 반응표면 분석(RSM)을 수행하였다. 인삼 조사포닌 추출물 농도, 효소 농도와 반응 시간을 요인변수로 각각의 center point를 2%, 7%와 48 hr으로 설정하고, pH 5와 50°C로 고정한 다음 120 rpm에서 선정된 조건으로 실험을 수행하였다.

7. 생물반응기에서의 효소반응

반응표면분석 방법에 의하여 측정된 최적 조건을 바탕으로 2.5 l의 생물반응기(Kobio Tech Co. Ltd. Seoul, Korea)에서 반응액을 1.5 l로 유지하며 반응을 수행하였다. 반응기간 동안 교반속도와 pH는 각각 120 rpm과 pH 5.0로 조절하였으며, 12 hr마다 시료를 취하여 효소반응을 정지시킨 후 HPLC 분석을 통해 ginsenoside의 변화를 관찰하였다. 그리고 동시에 플라스크에서도 반응을 수행하여 결과를 비교하였다.

결과 및 고찰

1. 인삼 조사포닌 추출물의 Ginsenoside 분석

제공 받은 인삼 조사포닌 추출물로부터 PPD계와 PPT계 ginsenoside를 포함한 12종을 분석한 결과, 총 ginsenoside는

33,871.32 mg/100 g으로 이는 보고된 ginsenoside의 함량보다는 높게 나타났다(Chio 등 2010). 인삼 조사포닌 추출물의 ginsenoside 중 PPT 계열인 Re의 함량이 12,862.39 mg/100 g으로 가장 높았으며, CK의 전구체들인 PPD계열 ginsenoside Rd, Rb2, Rc도 각각 9,373.25 mg/100 g, 5,557.31 mg/100 g, 2,309.17 mg/100 g으로 총 ginsenoside 함량의 45% 이상을 포함하고 있었으며, CK는 검출되지 않았다(Fig. 1).

2. 반응온도와 pH가 CK 생성에 미치는 영향

*T. reesei*의 cellulolytic 복합 효소를 이용한 인삼 조사포닌 추출물 내 ginsenoside들로부터 반응온도에 따른 CK 전환에 있어서, 반응온도가 40°C일 때 CK 함량은 416.99 mg/100 g, 45°C일 때 CK 함량은 573.52 mg/100 g, 50°C일 때 CK 함량은 691.51 mg/100 g, 55°C일 때 595.41 mg/100 g, 그리고 60°C일 때 528.03 mg/100 g이었다(Fig. 2 a). pH 조건에 따른 CK의 함량은 pH 조건이 pH 3일 때 676.44 mg/100 g, pH 4일 때 700.42 mg/100 g, pH 5.0일 때 701.88 mg/100 g, pH 6.0일 때 697.90 mg/100 g, pH 7.0일 때 671.67 mg/100 g으로 각 pH 간의 큰 차이는 보이지 않았다(Fig. 2 b). 본 연구에서 인삼 조사포닌 추출물 내 ginsenoside들의 CK 전환에 대한 최적 온도와 pH 조건은 각각 50°C와 pH 5.0로 나타났으며, 이는 *A. niger*의 산업용 pectinase를 이용한 CK 전환 조건과 동일하였다(Kim 등 2006).

3. 인삼 조사포닌 추출물과 효소 농도에 따른 CK 생성

인삼 조사포닌 추출물과 *T. reesei*의 cellulolytic 복합 효소 반응에서 인삼 조사포닌 추출물의 농도가 1%(w/v)일 때 CK

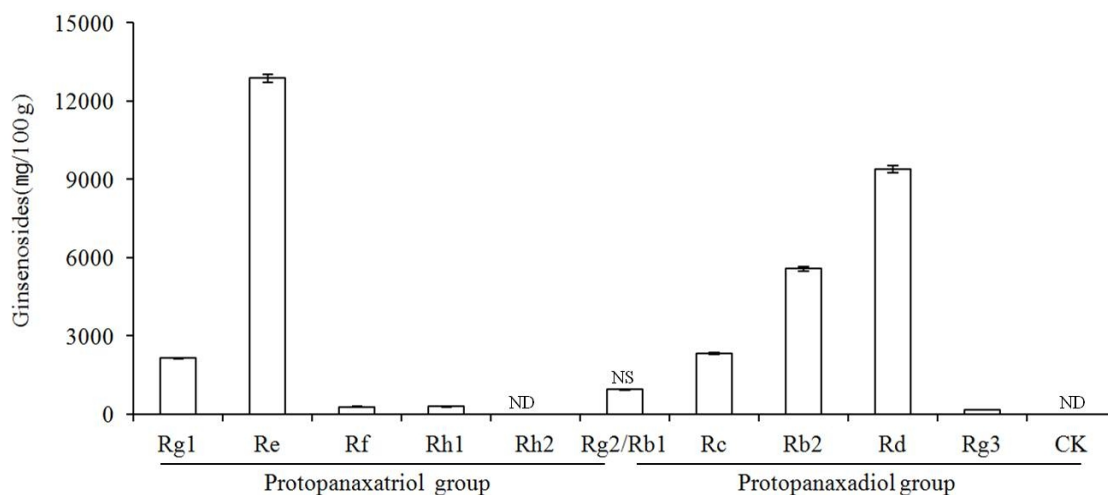


Fig. 1. Ginsenoside contents of ginseng crude saponin extract. ND, not detected on HPLC; NS, not separated on HPLC; CK, Compound K on HPLC.

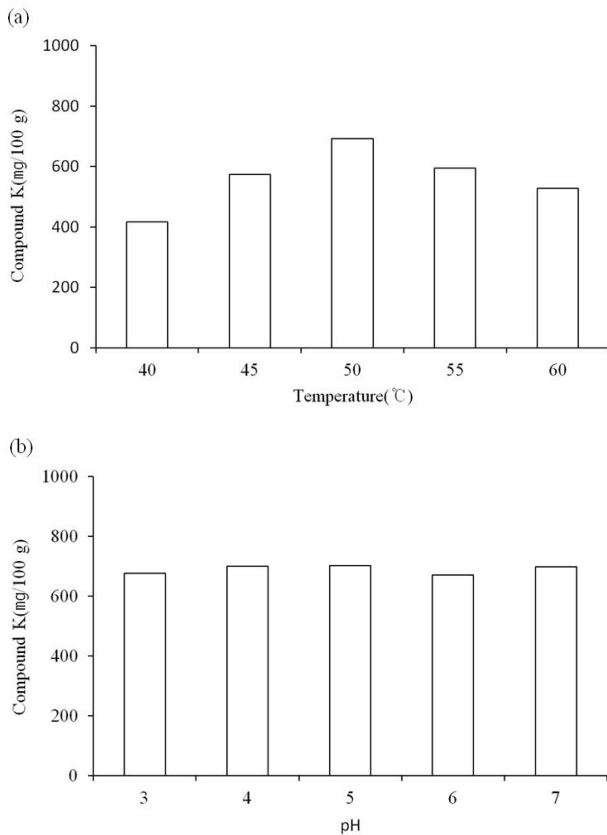


Fig. 2. The effects of temperature(a) and pH(b) on the production of Compound K from ginseng crude saponin extract.

함량이 475.98 mg/100 g, 2%일 때 678.82 mg/100 g, 3%일 때 669.76 mg/100 g, 4%일 때 569.05 mg/100 g, 5%일 때 483.812 mg/100 g으로 측정되었으며, 인삼 조사포닌 추출물 2%(w/v) 일 때 CK로의 전환이 가장 높게 나타났음을 확인할 수 있었다(Fig. 3a).

*T. reesei*의 cellulolytic 복합 효소(27,000 CU/g) 농도에 따른 CK 함량은 효소농도가 1%일 때의 CK 함량이 194.87 mg/100 g, 3%일 때 503.58 mg/100 g, 5%일 때 658.73 mg/100 g, 7%일 때 683.05 mg/100 g, 그리고 9%일 때 691.51 mg/100 g으로 나타났으며(Fig. 3b), 효소농도 9%일 때 인삼 조사포닌 추출물로부터 가장 높은 CK 생산량을 보였다.

4. 효소 반응시간이 CK 생성에 미치는 영향

선행 실험 결과에 따라 온도 50°C, pH 5.0, 인삼 조사포닌 추출물 2%와 효소농도 9%에서 효소 반응시간에 따른 CK로의 전환을 측정하여 나타내었다(Fig. 4). 그 결과, 24시간(680.94 mg/100 g)까지 급격히 증가하다가 48시간(763.39 mg/100 g) 이후부터는 CK로의 전환하는 속도가 상대적으로 매우 늦어지

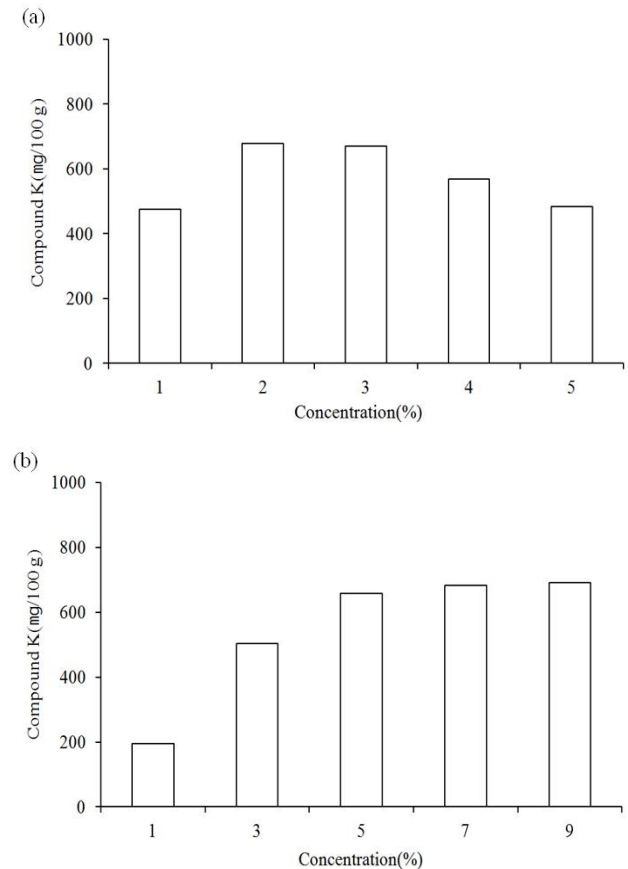


Fig. 3. The effect of concentrations of ginseng crude saponin extract and cellulolytic complex enzyme of *T. reesei* on the production of Compound K. (a) ginseng crude saponin extract (GE); (b) cellulolytic complex enzyme of *T. reesei*(Rohament).

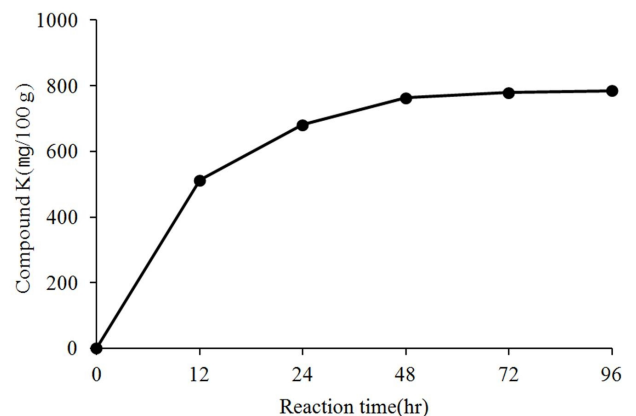


Fig. 4. The effect of reaction time on the production of Compound K in the flask culture. Condition of culture is ginseng crude saponin extract of 2%, cellulolytic complex enzyme of 9%, 120 rpm, pH 5, and 50°C.

는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 반응실험 최대 시간인 96 hr(784.97 mg/100 g)에서 CK의 함량이 가장 높게 나타났다. Ginsenoside들로부터 CK로의 전환을 연구한 보고들에 의하면 *Lactobacillus*, *Aspergillus*, *Fusobacterium*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Sulfolobus* 등의 최적 CK 전환 반응시간은 12~72시간이었다 (Park 등 2010; Quan 등 2008). 이에 따라 *T. reesei*의 cellulolytic 복합 효소를 이용한 CK 전환 반응시간은 48시간에서 96시간 이면 충분한 시간이라 사료된다.

5. 반응표면분석법(RSM)에 의한 CK 전환 조건 최적화

Table 1. Concentration of the respective reaction conditions at each level(central composite design for the response surface method)

Xn	Independent variables	Level				
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
X1	GE (% W/W)	0.37	1	2	3	3.63
X2	Rohament (% W/W)	3.74	5	7	9	10.26
X3	Time (hour)	8.93	24	48	72	87.07

α : 1.682, GE: ginseng crude saponin extract,

Rohament: cellulolytic complex enzyme of *T. reesei*,

Time: reaction time.

인삼 조사포닌 추출물부터 CK로의 전환 효소반응의 조건을 최적화하기 위하여 RSM을 수행하였다. 실험계획법으로는 중심합성계획법(Central composite design, CCD)을 이용하였으며, 선행된 각 요인별 실험 결과를 토대로 인삼 조사포닌 추출물의 농도, 효소의 농도와 반응시간을 중요 요인으로 선택하였다. 그리고 인삼 조사포닌 추출물의 농도, 효소의 농도와 반응시간 세 가지 요인을 최적화 하고자 $-\alpha$, -1, 0, 1과 α 다섯 단계로 부호화 하였다. 본 실험에서는 3개의 요인에 대하여 선행실험의 결과로부터 적절한 중점을 선택하였으며, α 값은 1.682이었다(Table 1). 또한 CCD 설계법을 적용한 총 17가지의 제시된 실험조합(Table 2)에 대해 3반복을 통하여 51개 실험구가 수행되었다. 독립변수에 영향을 받는 종속변수(Y)는 CK로 회귀분석에 사용되었으며, 회귀분석에 의한 모델식의 예측을 위해 Design Expert pro S/W ver. 1.0을 사용하였다. 이상의 실험결과를 통계처리 하였으며, 분산분석표(Analysis of variance, ANOVA)를 통한(Table 3) 전체적인 실험 모델의 p -value는 0.0001로 0.05보다 작으므로 매우 유의성이 있는 것으로 확인되었다. 특히 인삼 조사포닌 추출물 농도와 효소반응 시간이 *T. reesei*의 cellulolytic 복합 효소를 이용한 인삼 조사포닌 추출물로부터 CK 생산에 매우 크게 기여하고 있음을 확인할 수 있었다. 그리고 R-square(결정계수)가 0.9774로 1에 가까운 값으로 반응모형이 신뢰할 수 있음을 판단할

Table 2. Experimental matrix for the central composite design experiment and determined Compound K production

Exp. No.	Reaction condition			CK (mg/100 g)	
	GE (% W/W)	Rohament (% W/W)	Time (hour)	Predicted value	Experimental value
1	-1(1)	-1(5)	-1(24)	478.26	471.12
2	+1(3)	-1(5)	-1(24)	481.96	482.29
3	-1(1)	+1(9)	-1(24)	534.57	576.34
4	+1(3)	+1(9)	-1(24)	641.32	635.98
5	-1(1)	-1(5)	+1(72)	730.11	739.66
6	+1(3)	-1(5)	+1(72)	818.16	780.60
7	-1(1)	+1(9)	+1(72)	622.53	626.41
8	+1(3)	+1(9)	+1(72)	813.62	824.98
9	$-\alpha$ (0.37)	0(7)	0(48)	508.49	481.00
10	$+\alpha$ (3.63)	0(7)	0(48)	337.25	688.39
11	0(2)	$-\alpha$ (3.74)	0(48)	730.06	753.42
12	0(2)	$+\alpha$ (10.26)	0(48)	772.25	742.55
13	0(2)	0(7)	$-\alpha$ (8.93)	457.28	441.11
14	0(2)	0(7)	$+\alpha$ (87.07)	802.97	812.80
15	0(2)	0(7)	0(48)	782.74	784.53
16	0(2)	0(7)	0(48)	782.74	780.98
17	0(2)	0(7)	0(48)	782.74	784.89

GE: ginseng crude saponin extract, Rohament: cellulolytic complex enzyme of *T. reesei*, Time: reaction time.

Table 3. Analysis of variance(ANOVA) for response surface quadratic model

Source	Sum of squares	DF	Mean square	F value	Prob>F	
Model	2.809E+005	9	31,214.66	33.77	<0.0001	Significant
A	31,565.41	1	31,574.61	34.16	0.0006	
B	2,233.03	1	2,230.38	2.41	0.1643	
C	1.407E+005	1	1.497E+005	161.96	<0.0001	
AB	5,309.65	1	5,309.65	5.74	0.0477	
AC	3,557.46	1	3,557.46	3.85	0.0906	
BC	13,429.97	1	13,429.97	14.53	0.0066	
A ²	56,055.95	1	56,055.95	60.65	0.0001	
B ²	1,472.53	1	1,472.53	1.59	0.2473	
C ²	34,379.82	1	34,379.82	37.20	0.0005	
Residual	6,470.07	7	924.30			
Lack of fit	6,460.73	5	1,292.15	276.69	0.0036	Significant
Pure error	9.34	2	4.67			
Cor total	2.874E+005	16				
Std Dev	30.40		R-Squared	0.9775		

A: ginseng crude saponin extract(GE), B: cellulolytic complex enzyme of *T. reesei*(Rohament), C: reaction time

수 있었다. 모수 추정에 의한 2차 회귀식은 다음과 같이 분석되었다.

$$\text{Compound K} = -262.93 + 209.74 * A + 63.29 * B + 18.21 * C \\ + 12.88 * AB + 0.88 * AC - 0.85 * BC - 73.35 \\ * A^2 - 2.97 * B^2 - 0.10 * C^2$$

A: ginseng crude saponin extract, B: enzyme, C: time

주어진 데이터에 대한 정확한 최적점을 찾기 위하여 모수 추정에 의한 2차 회귀식을 바탕으로 능선분석을 하였으며, 최종적으로 반응표면분석을 통하여 CK 전환에 가장 영향을 주는 세 가지 인자의 최적 조건을 찾을 수 있었다(Fig. 5). 완벽한 최적점을 찾기 위하여 point prediction을 이용하여 840.77 mg/100 g의 CK의 예상 값을 측정할 수 있었으며, 그 때의 최

적 조건은 Table 4에 나타내었다.

6. 플라스크와 생물반응기를 이용한 최적조건에서의 효소 반응

RSM을 통해 얻은 최적조건에서 플라스크와 생물반응기에서 효소반응을 실행하여 12 hr 간격으로 시료를 취하여 분석하였다. RSM 최적조건인 64.04 hr일 때의 CK 함량을 살펴본 결과 플라스크 반응에서 1,017.93 mg/100 g의 Compound K가 생성되어 예측값인 840.77 mg/100 g보다 1.2배 가량 높은 값을 나타내었고, 생물반응기에서는 862.31 mg/100 g의 CK가 생성되어 예측값과 유사한 양이 생성되었음을 알 수 있었다(Fig. 6).

요 약

인삼 조사포닌 추출물 내의 ginsenoside를 CK로 전환을 하기 위하여 *T. reesei* 유래 cellulolytic 복합 효소를 사용하였다. 온도, pH, 인삼 조사포닌 추출물 농도, 효소 농도와 반응시간 별 *T. reesei* 효소의 인삼 조사포닌 추출물로부터 CK 전환에 대한 적정조건을 살펴본 결과, 온도는 50°C에서 691.51 mg/100 g으로, pH는 조건별 큰 차이는 보이지 않았지만 pH 5.0일 때 701.88 mg/100 g으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 인삼 조사포닌 추출물과 효소 농도에 있어서는 각각 2%(w/v) 농도(678.82 mg/100 g)와 9%(v/v) 농도(691.51 mg/100 g)일 때 가장 높은 CK 농도를 보였다. 온도 50°C, pH 5.0, 인삼 조사포닌

Table 4. Optimum conditions for enzyme reaction determined by RSM

Contents	Conditions
Temperature(°C)	50
pH	5
Ginseng crude saponin extract concentration(GE)(%)	2.38
Cellulolytic complex enzyme concentration of <i>T. reesei</i> (Rohament)(%)	6.07
Reaction time(hour)	64.04

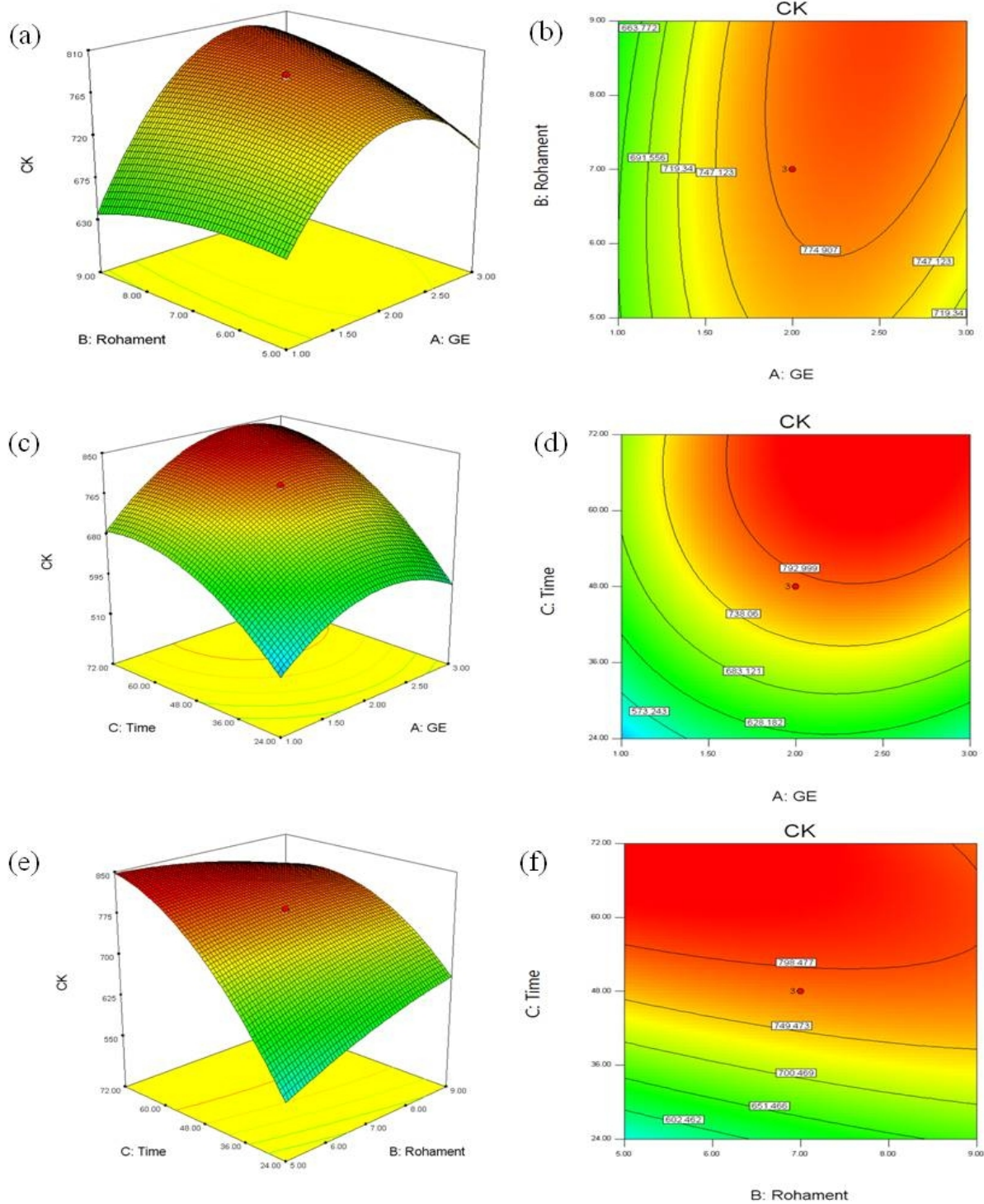


Fig. 5. Effect of ginseng crude saponin extract(GE) concentration, cellulolytic complex enzyme(Rohament) concentration of *T. reesei*, and reaction time on Compound K(CK) production. (a) and (b), 3-D response surface and contour plot as a function of the concentration of ginseng crude saponin extract and cellulolytic complex enzyme of *T. reesei*; (c) and (d), 3-D response surface and contour plot as a function of the concentration of ginseng crude saponin extract and reaction time(hour); (e) and (f), 3-D response surface and contour plot as a function of the concentration of cellulolytic complex enzyme of *T. reesei* and reaction time(hour).

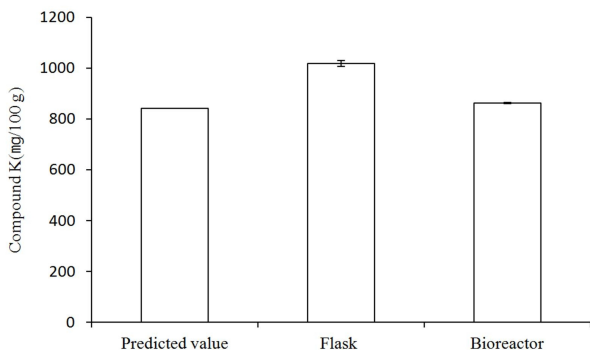


Fig. 6. Production of Compound K using flask(250 mL) and bioreactor(2.5 l) under optimal conditions obtained from RSM.

추출물 농도 2%(w/v)와 효소농도 9%(v/v)에서 반응시간에 따른 CK 생산을 분석한 결과, 반응 48시간까지 급격히 증가하다가 그 이후에는 반응속도가 현저하게 느려지는 경향을 보였지만, 반응 96시간에 784.97 mg/100 g으로 가장 높은 CK 농도를 나타내었다. 이러한 결과를 토대로 인삼 조사포닌 추출물의 농도 2%(w/v), 효소 농도 7%(v/v)와 반응 시간 48 hr를 CK 생산에 중요 요인변수로 선정하여 pH 5.0와 온도 50°C에서 반응표면분석법 실험을 진행하였다. 그 결과, 인삼 조사포닌 추출물 농도 2.38%, 효소농도 6.07%와 효소반응 시간 64.04 hr를 최적조건으로 설정하였으며, CK 생산 예측 값은 840.77 mg/100 g이었다. 반응표면분석법으로 선정한 최적조건에서 플라스크와 생물반응기를 이용하여 효소반응을 수행한 결과 플라스크에서는 CK 생산 예측 값 보다 약 1.2배 높은 1,017.93 mg/100 g이 생성되었고, 생물반응기에서는 예측 값과 비슷한 862.31 mg/100 g의 CK가 생성되었다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부와 한국산업기술진흥원의 지역산업 기술개발사업으로 수행된 연구 결과입니다.

참고문헌

Bae EA, Choo MK, Park EK, Park SY, Shin HY, Kim DH. 2002. Metabolism of ginsenoside Rc by human intestinal bacteria and its related antiallergic activity. *Biol Pharm Bull* 25:743-747

Chahal DS. 1985. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Appl Environ Microbiol* 49:205-210

Chang HK. 2003. Effect of processing methods on the saponin contents of *Panax ginseng* leaf-tea. *Korean J Food & Nutr* 16:46-53

Choi JE, Nam KY, Li X, Kim BY, Cho HS, Hwang KB. 2010. Changes of chemical compositions and ginsenoside contents of different root part of ginsengs with processing method. *Korean J Medicinal Crop Sci* 18:118-125

Kim AJ, Han MR, Joung KH, Cho JC, Park WJ, Han CW, Chang KH. 2008. Physiological evaluation of Korea ginseng, Deoduk and Doragi pickles. *Korean J Food & Nutr* 21:443-447

Kim BH, Lee SY, Cho HJ, You SN, Kim YJ, Park YM, Lee JK, Baik MY, Park CS, Ahn SC. 2006. Biotransformation of Korean *Panax ginseng* by pectinex. *Chem Pharm Bull* 29:2472-2478

Ko SR, Suzuki Y, Suzuki K, Choi KJ, Cho BG. 2007. Marked production of ginsenosides Rd, F₂, Rg₃, and Compound K by enzymatic method. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 55:1522-1527

Kwon OS, Chung YB. 2004. Solubilization of IH-901, a novel intestinal metabolite of ginseng saponin, in aqueous solution. *J Kor Pharm Sci* 34:358-391

Park CS, Yoo MH, Noh KH, Oh DK. 2010. Biotransformation of ginsenosides by hydrolyzing the sugar moieties of ginsenosides using microbial glycosidases. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:9-19

Quan LH, Cheng LQ, Kim HB, Kim JH, Son NR, Kim SY, Jin HO, Yang DC. 2010. Bioconversion of ginsenoside Rd into Compound K by *Lactobacillus pentosus* DC101 isolated from Kimchi. *J Ginseng Res* 34:288-295

Quan LH, Liang Z, Kim HB, Kim SH, Kim SY, Noh YD, Yang DC. 2008. Conversion of ginsenoside Rd to Compound K by crude enzymes extracted from *Lactobacillus brevis* LH8. *J Ginseng Res* 32:226-231

Saiki I. 2003. Anti-metastatic effect of ginseng saponins and its molecular mechanism. *J Ginseng Res* 27:151-157

Seidl V, Seibel C, Kubicek CP, Schmoll M. 2009. Sexual development in the industrial workhorse *Trichoderma reesei*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:13909-13914

Vensissety RK, Ciddi V. 2003. Application of microbial biotransformation for the new drug discovery using natural drug as substrates. *Curr Pharm Biotechnol* 4:153-162

Yoo MH, Yeom SJ, Park CS, Lee KW, Oh DK. 2011. Production of aglycon protopanaxadiol via Compound K by a

thermostable β -glycosidase from *Pyrococcus furiosus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:1019-1028

Microbiol Biotechnol 85:1409-1416

Zhu YL, Huang W, Ni JR, Liu W, Li H. 2010. Production of diosgenin from *Dioscorea zingiberensis* tubers through enzymatic saccharification and microbial transformation. *Appl*

접 수 : 2012년 8월 13일
최종수정 : 2012년 8월 27일
채 택 : 2012년 8월 29일