

당 분해효소를 이용한 백하수오 뿌리로부터 분리한 Pregnane Glycosides의 생전환

윤미영^{1,2} · 끄영 마이뉴엔¹ · 최경자¹ · 최용호¹ · 장경수¹ · 차병진² · 김진철^{1*}

¹한국화학연구원 친환경신물질연구그룹, ²충북대학교 식물외과

Biotransformation of Pregnane Glycosides from *Cynanchum wilfordii* Roots by β -Glucosidase

Mi-Young Yoon^{1,2}, Cuong Mai Nguyen¹, Gyung Ja Choi¹, Yong Ho Choi¹,
Kyoung Soo Jang¹, Byeongjin Cha² and Jin-Cheol Kim^{1*}

¹Eco-friendly New Materials Research Group, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-605, Korea

²Department of Plant Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

(Received on August 17, 2012; Revised on September 10, 2012; Accepted on September 12, 2012)

Biotransformation is an eco-friendly and efficient method for enhancing the bioavailability of biopesticide. To increase the antifungal activity of the crude extract of *Cynanchum wilfordii* roots against barely powdery mildew, we performed biotransformation of wilfoside C1G using β -glucosidase (cellobiase from *Aspergillus niger*). The mixture (G sample) of partially purified wilfoside C1G and cynauricuocide A (K1G) was treated with β -glucosidase to remove a glucopyranosyl moiety. The enzyme completely converted C1G to C1N and K1G to K1N. Optimal conditions for enzymatic biotransformation of G sample were determined to be 10% ethanol, 1,555 μ U β -glucosidase/ml, pH 5, and 45°C. In *in vivo* experiment, the G sample transformed by β -glucosidase showed stronger antifungal activity against barley powdery mildew than the non-treated G sample. These results suggest that β -glucosidase biotransformation can be applied to increase the antifungal activity of the crude extract of *C. wilfordii* roots against powdery mildews.

Keywords : Barley powdery mildew, Biotransformation, *Cynanchum wilfordii*, β -Glucosidase, Wilfoside

서 론

백하수오(*Cynanchum wilfordii*)는 박주과리과(Aselepidiaceae) 백미꽃속(*Cynanchum*)에 속하는 다년생 덩굴성 식물로서 은조롱, 큰조롱 등으로 불린다. 비대근으로 한국에서는 하수오에 준하여 약재로 쓰고 있으나 중국, 일본에서는 많이 쓰이지 않고 있다(Choi, 2003; Kim 등, 2002). 약리작용으로는 강심배당체가 함유되어 있어 심장의 피로를 강장시키고 조혈기능 및 진정작용, 피로회복, 노화방지, 동맥경화 방지, 보혈, 빈혈, 신경쇠약 등에 효과적이며, 신장 기능 증진 등의 생리적 작용을 가지고 있다(Chang 등, 1993; Choi 등, 2012; Lee 등, 1996).

백하수오의 화학적 구조에 대한 연구는 Hayashi 등(1975)과 Tsukamoto 등(1985a, b)에 의해 이루어졌는데 그들은 백하수오로부터 C/D-cis-polyoxy pregnane 유도체와 2,6-dideoxy-3-O-methyl sugar를 분리하였다(Hayashi와 Mitsuhashi, 1975; Tsukamoto 등, 1985a, b). 또한 Lin(1997), Hwang(1999b) 및 Yeo와 Kim(1999)은 cynandione A, 두 개의 acetophenone, benzoquinone을 분리하였다(Hwang 등, 1999b; Lin 등, 1997; Yeo와 Kim, 1999). 그 외에도 phosphatidyl choline, phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl inositol, cinnamic acid, benzophenone, cynanchol emodin, chrysophanol, wilfoside 등을 함유한 것으로 보고되어 있다(Hwang 등, 1999a; Lee 등, 1996; Mitsuhashi 등, 1966). Lee 등(2000)은 cynandione A가 강한 신경보호활성을 갖는다고 보고하였으며, Kim 등(2005)은 백하수오에서 분리한 wilfoside K1N의 높은 anti-angiogenic activity, anti-

*Corresponding author

Phone) +82-42-860-7436, Fax) +82-42-861-4913

Email) kjinc@kriict.re.kr

invasion activity 및 항종양활성을 보인다고 보고하였다. Wilfoside K1N과 같은 polyoxypregnane glycoside는 암세포에서 세포질 면역, 항암효과 및 세포독성활성과 연관되어 있다고 알려져 있다(Kim 등, 2005).

백하수오에는 polyoxypregnane type의 배당체 wilfoside 계열의 화합물들이 주를 이루고 있다. 배당체 화합물들은 함량과 분포상에서 가장 많은 천연물이며, 자연계에 존재하는 많은 배당체 화합물들은 그 자체의 활성보다 당을 분해하여야만 더 많은 약효를 발휘한다(Akao, 1992). 따라서 많은 연구자들은 효소전환을 통해 배당체의 비배당체화를 통하여 생물활성을 증가시키는 방법에 대한 연구를 활발히 진행하고 있다.

본 연구실에서는 백하수오 추출물로부터 보리 흰가루병에 대하여 높은 활성을 보이는 6개의 물질을 분리하였고, 이들은 각각 wilfoside C1N, wilfoside K1N, cynauricoside A(K1G), wilfoside C1G 그리고 2개의 신물질 wilfoside K1GG와 wilfoside C1GG로 동정되었다(Yoon 등, 2011). 분리한 6개의 pregnane glycoside 물질 중에서 caudatin glycoside 계열의 3개 물질 즉, wilfoside C1N, wilfoside C1G 및 wilfoside C1GG는 모두 보리 흰가루병에 대하여 높은 활성을 보인 반면 kidjoranine glycoside 계열의 3개 물질 즉, wilfoside K1N, K1G 및 wilfoside K1GG는 효과가 전혀 없다는 사실을 발견하였다(Yoon 등, 2011). 또한 glucose의 수가 적을수록 보리 흰가루병에 대한 방제효과가 커진다는 것을 사실을 발견하였다.

따라서 본 연구에서는 상업적으로 판매되고 있는 β -glucosidase를 이용하여 백하수오에 함유되어 있는 wilfoside C1G와 K1G를 보다 활성이 강한 wilfoside C1N과 wilfoside K1N으로 전환시켜 이들 성분의 함량을 증가시키므로써 흰가루병에 대한 방제활성을 증가시키고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료. 본 실험에 사용한 시료는 2011년 10월, 대구광역시 소재의 한약방에서 구입하여 실험에 사용하였으며, 표본시료는 한국화학연구원에 보관되어 있다. 표준 용액의 조제 및 HPLC 분석시 사용한 용매 methanol은 Merck사(Darmstadt, Germany)의 HPLC급을 사용하였다. 시료의 추출 및 분획 시 사용한 methanol, ethyl acetate, chloroform 등은 (주)삼전화학(Pyeongtaek, Korea)의 GR급 용매를 사용하였다. 또한 실험에 사용된 시약 중 sodium azide, citrate buffer, phosphate buffer saline 등은 Sigma (St. Louis, USA)사에서 구입하였으며, β -glucosidase는 Novozyme 188(Novo Nordisk, Denmark)을 사용하였다.

백하수오로부터 pregnane glycoside계 물질의 분리 및 효소처리. 백하수오 뿌리 추출물로부터 wilfoside C1G와 K1G만을 함유하고 있는 시료(G 시료)와 wilfoside C1N과 wilfoside K1N만을 포함하고 있는 시료(N 시료)를 methanol 추출, ethyl acetate 분획 및 다양한 chromatography 방법을 이용하여 분리하였다(Yoon 등, 2011). 이와 같이 분리한 시료 1 mg을 10 μ l의 methanol로 용해한 후 1% sodium azide(44 μ l), 0.1 M citrate buffer(1,938 μ l)와 β -glucosidase (8 μ l: 2,488 μ U)를 첨가한 다음 50°C에서 150 rpm으로 교반하여 48시간 동안 반응하였다. 반응액에 동량의 ethyl acetate를 가한 다음 상층액을 취하여 질소가스로 농축하였고, methanol(100 μ l)에 용해한 다음 50 μ l의 시료를 취하고 450 μ l의 methanol을 첨가한 후 회석하여 TLC 분석과 HPLC 분석을 실시하였다. HPLC 분석조건으로는 Waters HPLC 기기(Waters, USA), Luna 5 μ C18(2) column (4.6 \times 150 mm, Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA) 및 Corona CAD charged Aerosol Detecotor(DIONEX Co., Sunnyvale, CA, USA), methanol과 H₂O를 이동상으로 하여 유속 1 ml/min의 속도로 흘려주었다. 70% methanol에서 100% methanol로 gradient system을 사용하였고, photodiode array(Waters, USA)가 장치된 검출기로 분석하였다.

최적 biotransformation 조건 확립. 백하수오로부터 상기와 같이 분리한 wilfoside C1G와 K1G 물질에 대하여 β -glucosidase를 이용한 최적 biotransformation 조건을 결정하기 위하여 반응시간, ethanol 농도, 효소처리 농도, pH 및 온도에 대한 반응을 조사하였다. 시료는 methanol로 100 mg/ml 수준으로 용해한 후 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

먼저 반응 시간에 따른 wilfoside C1G와 K1G 혼합물의 biotransformation 정도를 조사하였다. 두 화합물이 포함된 시료(1 mg/10 μ l)에 1% sodium azide(44 μ l), 0.1 M citrate buffer(1,938 μ l)와 β -glucosidase(8 μ l: 2,488 μ U)를 첨가한 후 50°C에서 150 rpm으로 교반하여 0, 2, 12 및 24시간 동안 반응하였다. Ethyl acetate 추출 후 상기와 같은 방법으로 HPLC 분석을 실시하였다.

Christakopoulos 등(1994)은 ethanol이 β -glucosidase의 활성을 증가시키는데 영향을 끼친다고 보고하였다. 따라서 β -glucosidase에 의한 wilfoside C1G와 K1G의 biotransformation에 대한 ethanol의 효과를 조사하기 위하여 시료 (1 mg/10 μ l)에 1% sodium azide(44 μ l)와 β -glucosidase (8 μ l: 2,488 μ U)를 첨가한 후, 0.1 M citrate buffer와 ethanol을 첨가량을 달리하여 최종적으로 ethanol의 함량이 0, 5, 10, 20 및 30%가 되도록 조절하였다. 용액의 최종 부피

는 2 ml이었으며, 50°C에서 150 rpm으로 교반하여 24시간 동안 반응하였다.

한편, 최적의 효소 처리량을 결정하기 위하여 β -glucosidase (311 U/g)를 각각 12440(40 μ l), 3110(10 μ l), 778(2.50 μ l), 194(0.625 μ l) 및 49 μ U(0.156 μ l)으로 조절하여 처리하였다. 시료(1 mg/10 μ l)에 ethanol(200 μ l: 최종농도 10%)과 1% sodium azide(44 μ l)를 첨가한 후, 0.1 M citrate buffer를 이용하여 최종 부피가 2 ml이 되도록 조절하였으며, 50°C에서 150 rpm으로 교반하여 24시간 동안 반응하였다.

β -Glucosidase에 의한 wilfoside C1N과 K1G의 biotransformation에 대한 최적 pH 조건을 결정하기 위하여 서로 다른 pH 조건하에서 반응을 실시하였다. 기존 반응에 사용된 citrate buffer의 pH가 4.5이므로 1 M HCl과 1 M NaOH를 이용하여 pH 3, 4, 5 및 6으로 조절한 뒤, β -glucosidase를 1,555 μ U/ml을 처리하여 50°C에서 24시간 동안 교반하면서 효소반응을 유도하였다.

또한 biotransformation의 최적 온도 조건을 조사하기 위하여, 상기 실험과정에서 결정된 조건, 즉 10% ethanol, 1,555 μ U β -glucosidase/ml 및 pH 5 조건으로 시료를 처리한 후 서로 다른 온도 조건, 즉 30°C, 37°C, 45°C 및 50°C 조건으로 반응을 실시하였다.

Biotransformation된 물질의 흰가루병 방제활성. 상기와 같이 결정한 최적 조건으로 biotransformation된 시료를 반응전의 시료와 비교하여 보리 흰가루병에 대한 방제활성을 조사하였다. wilfoside C1N과 K1G 물질이 포함된 시료를 최종농도 1 mg/ml 수준으로 조절한 후 10% ethanol, 1,555 μ U β -glucosidase/ml, pH 5 및 45°C 조건으로 24시간 반응을 하였으며, 무처리구는 처리구와 모든 조건은 동일하지만 β -glucosidase를 넣지 않고 대신 citrate buffer를 더 첨가한 후 시료와 마찬가지로 24시간 처리하였다. 7 ml vial을 사용하였으며, 각각의 vial에 최종 부피는 2 ml

이었다. 2반복으로 실시하였으며, 24시간 후에 Tween 20이 250 μ g/ml 수준으로 포함하고 있는 용액으로 10배, 20배 및 40배로 희석하여, 접종 1일 전 보리 흰가루병의 방제 효과를 조사하였다. 실험에 사용한 보리는 지름 4.5 cm의 플라스틱 포트에 원예용 상토를 70% 정도 채운 후, 종자를 파종하여 25 \pm 5°C의 온실에서 1주간 재배하였다. 시료 처리 1일 후에 1엽기의 보리에 병원균을 접종하여 20°C의 항온항습실에서 발병을 유도하였고, 8일 후에 발병도를 조사하였다(Cho 등, 2006; Kim 등, 2001). 각각의 실험은 3반복으로 실시하였고, 이로부터 얻은 병반면적을 이용하여 다음과 같은 식에 따라 방제율을 계산하였다.

$$\text{방제율(\%)} = \frac{[(\text{무처리구 발병도} - \text{처리구 발병도}) / \text{무처리구 발병도}] \times 100}{}$$

통계처리. 모든 결과는 PROC GLM procedure(SAS institute, Cary, NC)를 사용하여 통계 처리하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균치로 표시하였고, 통계적 유의성 검정은 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 한 후 F 값을 구하고 Duncan's multiple range test($P=0.05$)를 이용하여 대조군과 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다.

결과 및 고찰

β -Glucosidase 처리에 의한 백하수오 유래 pregnane glycoside계 물질의 biotransformation. 백하수오 뿌리로부터 획득한 두 개의 시료, wilfoside C1G와 K1G를 포함한 G 시료와 wilfoside C1N과 wilfoside K1N을 포함한 N 시료를 β -glucosidase를 처리한 후 TLC 분석을 실시하였다. TLC 분석 결과, β -glucosidase를 처리하지 않은 N시료에서는 wilfoside C1N과 wilfoside K1N 물질이 Rf value

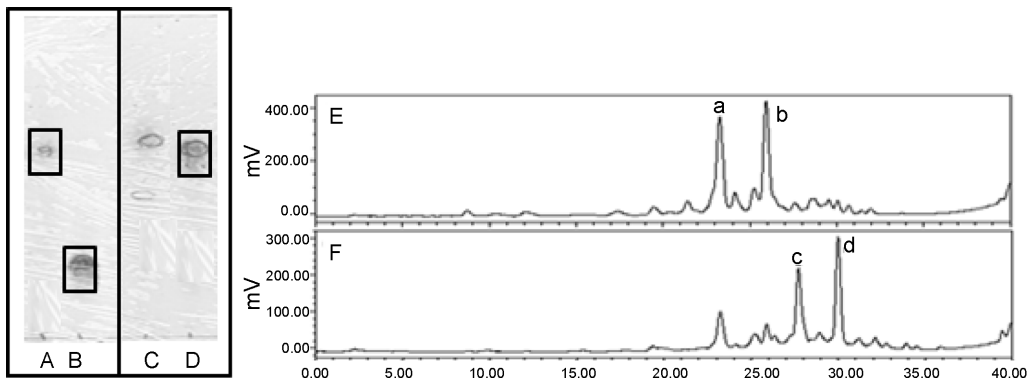


Fig. 1. TLC and HPLC analyses of pregnane glycosides transformed by β -glucosidase. (A) non-treated N sample containing wilfoside C1N and K1N. (B & E) non-treated G sample containing wilfoside C1G and cynauricoside A. (C) β -glucosidase-treated N sample. (D & F) β -glucosidase-treated G sample, a: cynauricoside A, b: wilfoside C1G, c: wilfoside K1N, and d: wilfoside C1N.

0.6에서 물질이 검출되었다(Fig. 1A). 효소가 처리되지 않은 G시료에서는 wilfoside C1G과 K1G 물질이 Rf value 0.4에서 검출되었다(Fig. 1B). 이에 비하여 β -glucosidase를 처리한 두 시료 모두에서는 Rf value 0.6에서만 물질이 검출되었기 때문에 wilfoside C1G와 K1G에서 D-glucopyranose가 가수분해로 떨어져 나와 두 물질이 각각 wilfoside C1N과 wilfoside K1N으로 전환되었다는 것을 알 수 있었다(Fig. 1C, D). HPLC 분석을 수행한 결과 β -glucosidase를 첨가하지 않은 대조구에서는 wilfoside C1N과 wilfoside K1N이 분해되지 않고 그대로 남아 있는 반면에(Fig. 1E), wilfoside C1G와 K1G에 β -glucosidase를 첨가한 처리구에서는 기지 물질의 양이 줄어들었다는 사실을 알 수 있었다. 이에 따라 wilfoside C1N과 wilfoside K1N의 함량이 증가된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1F).

현재 많은 연구자들은 자연계에 존재하는 배당체 화합물로부터 그 자체의 활성보다 당을 분해하여 더 우수한 약효를 확인하는 연구를 수행하고 있다. 예를 들면 Park 등(2012)은 토양으로부터 ginsenoside 전환이 가능한 균주를 선발하였고, 이 균주를 이용한 생물학적 전환으로 얻어진 compound K[20-O- β -D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol]

은 모발형성세포 증식에 유의적인 효과가 있음을 확인하였다. Kang 등(2008)은 길경으로부터 crude platycodin을 얻은 후 *Aspergillus niger*를 이용하여 당 사슬 부분을 일부 가수분해하여 얻어진 물질이 반응 전의 물질보다 더 높은 항산화 활성과 항암활성을 나타낸다고 보고하였다. 뿐만 아니라 Jeon 등(2009)은 대황으로부터 추출한 rhapontin을 β -glucosidase로 가수분해하여 rhapontigenin를 얻었고, tyrosinase 활성저해 및 멜라닌 생성 억제능을 비교해 본 결과 rhapontin을 가수분해하여 생성된 rhapontigenin이 미백능이 월등히 우수한 것으로 나타났다고 보고하였으며, Dreessen 등(1981)은 대황에 들어있는 senmoside는 사하작용이 없지만, 장내 β -glucosidase에 의해 분해된 대사산물인 rheinanthron은 아주 강한 사하작용을 나타낸다고 보고하였다. 따라서 본 실험 결과에서도 알 수 있듯이 β -glucosidase를 이용하여 wilfoside C1G와 K1G를 활성이 우수한 wilfoside C1N과 wilfoside K1N으로 전환되는 것을 확인하였으므로 향후 다양한 효능 연구 및 생물농약 발전에 의미 있는 기초 자료가 될 것으로 사료된다.

Fig. 2는 wilfoside C1G와 K1G 뿐만 아니라 wilfoside C1GG와 wilfoside K1GG도 β -glucosidase에 의해 wilfoside

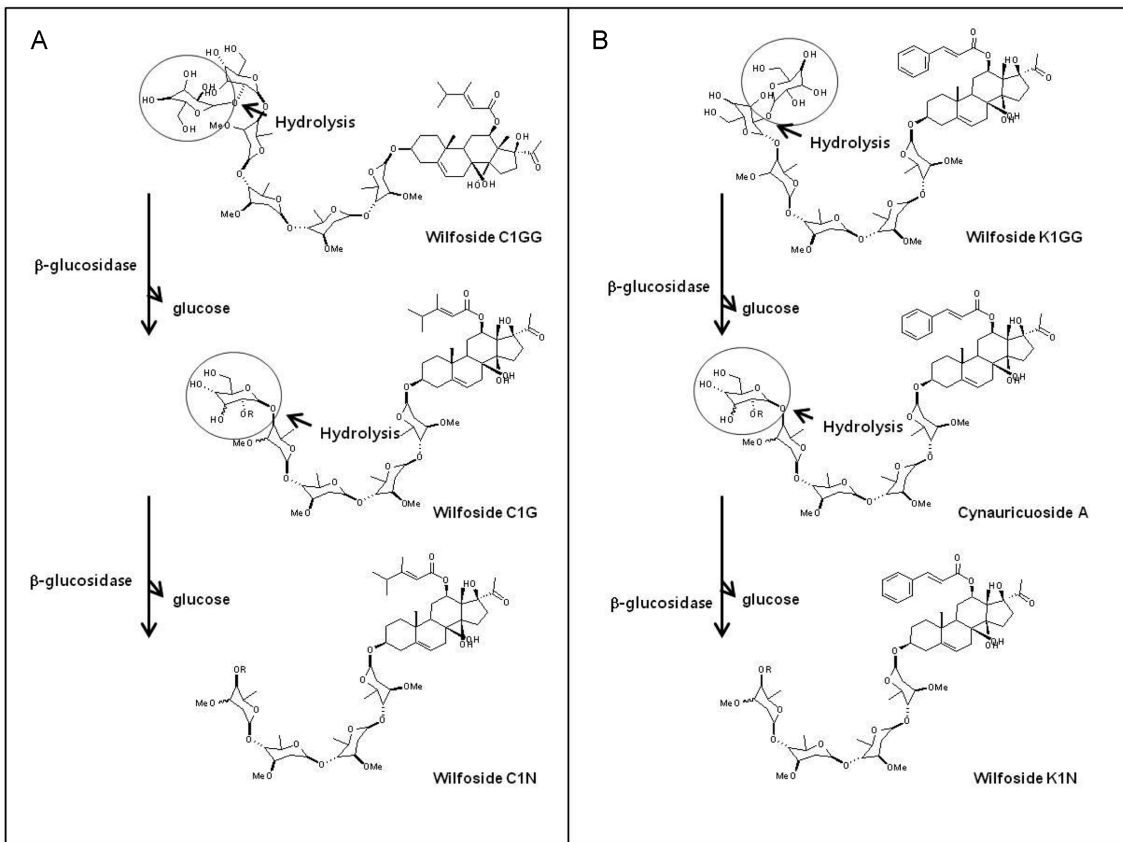


Fig. 2. Proposed biotransformation pathway changing from wilfoside C1GG to wilfoside C1N (A) and from wilfoside K1GG to wilfoside K1N (B) by β -glucosidase.

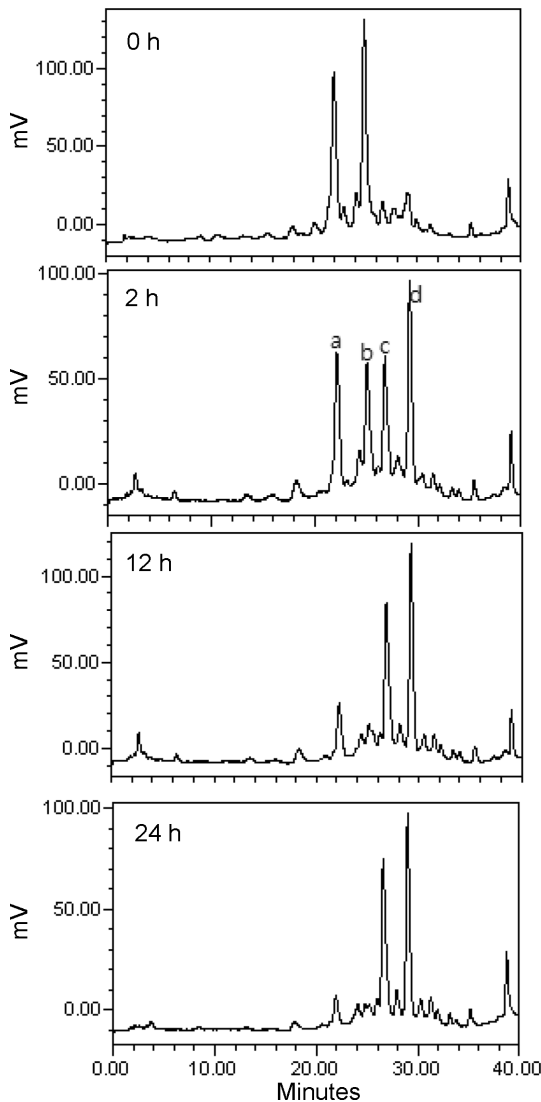


Fig. 3. Time course HPLC analysis of wilfoside C1G and cynauricuoside A transformed by β -glucosidase. **a:** cynauricuoside A, **b:** wilfoside C1G, **c:** wilfoside K1N, and **d:** wilfoside C1N.

C1N과 wilfoside K1N으로 전환될 수 있다는 것을 나타낸 것이다.

β -Glucosidase에 의한 wilfoside C1G와 K1G의 최적 biotransformation 조건. wilfoside C1G와 K1G를 포함하고 있는 G 시료를 가지고 β -glucosidase에 의한 최적 biotransformation 조건을 조사하였다. 10% ethanol, pH 4.5, β -glucosidase 처리시 시간이 지남에 따라 wilfoside C1G와 K1G의 함량이 감소하고 wilfoside C1N과 wilfoside K1N의 함량이 증가하는 경향을 보였다. 24시간 반응 시 wilfoside C1G와 K1G가 wilfoside C1N과 wilfoside K1N으로 완전히 전환되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

한편, β -glucosidase의 활성에 대한 최적 ethanol 함량을

조사한 결과, Fig. 4A에서와 같이 10% ethanol을 처리하였을 때 wilfoside C1N과 wilfoside K1N의 함량이 가장 높은 것을 확인할 수 있었다. 또한 최적의 효소량을 조사한 결과, β -glucosidase의 함량이 24부터 97, 389 및 1,555 μ U β -glucosidase/ml로 올라갈수록 wilfoside C1N과 wilfoside K1N의 함량이 증가하였지만, 6,220 μ U β -glucosidase/ml에서는 더 이상 증가하지 않고 오히려 약간 감소하는 경향을 보여 최적의 효소량으로 1,555 μ U β -glucosidase/ml로 결정되었다(Fig. 4B).

또한 최적의 pH를 조사한 결과 Fig. 4C에서 보는 바와 같이 pH 4.0과 5.0에서 거의 비슷한 수준으로 높은 함량의 wilfoside C1N과 wilfoside K1N의 함량을 보였지만, pH 5.0에서 가장 높은 수치를 보였기 때문에 최적의 pH로 5.0을 결정하였다. 또한 반응 온도에 대한 영향을 조사한 결과 30°C부터 50°C 사이에서는 거의 비슷한 결과를 보였지만, 45°C에서 가장 높은 수치를 보였기 때문에 최종적으로 반응 온도를 45°C로 결정하였다(Fig. 4D). 이상의 연구결과로서 백하수오로부터 분리한 wilfoside C1G와 K1G를 β -glucosidase를 이용하여 wilfoside C1N과 wilfoside K1N으로 전환되는 최적의 조건으로 10% ethanol, 1,555 μ U β -glucosidase/ml, pH 5 및 45°C로 결정하였다.

Biotransformation된 시료의 보리 흰가루병에 대한 방제활성. 백하수오 뿌리추출물로부터 분리한 wilfoside C1G와 K1G를 β -glucosidase를 이용하여 biotransformation한 후 보리 흰가루병에 대하여 접종 1일전 방제효과를 조사한 결과, Fig. 5에서와 같이 방제효과가 증가하는 것으로 나타났다. 10배 희석액의 경우 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았지만 20배와 40배 희석배수에서는 biotransformation 전보다 후에 활성이 증가하는 하는 것으로 나타났다.

이상의 실험 결과는 식물 등으로부터 추출한 물질의 경우 효소나 효소를 생산하는 미생물을 이용하여 biotransformation을 통한 구조변화를 통하여 효과를 증진시킬 수 있음을 나타낸다. β -Glucosidase를 생산하는 균주로는 *Lactobacillus* 속, *Bifidobacterium* sp(Yeo 등, 1993), *Sporotrichum cellulophilum*(Kim과 Nam, 1984), *Aspergillus niger*(Sung 등, 1997), *A. nidulans*(Jung 등, 1983) 등이 보고되어 있으며, 이들이 생산하는 β -glucosidase가 이소플라본 배당체의 가수분해에 관여 한다고 보고되었다. 생리활성을 증진시키기 위한 비배당화 방법 중 미생물에 의한 biotransformation은 epimerization, hydration, hydroxylation과 같은 부가반응이 적은 장점이 있다. 따라서 비배당화 미생물을 생물농약에 응용한다면 천연물의 활성을 증진시킬 수 있는 가능성이 높을 것으로 판단된다.

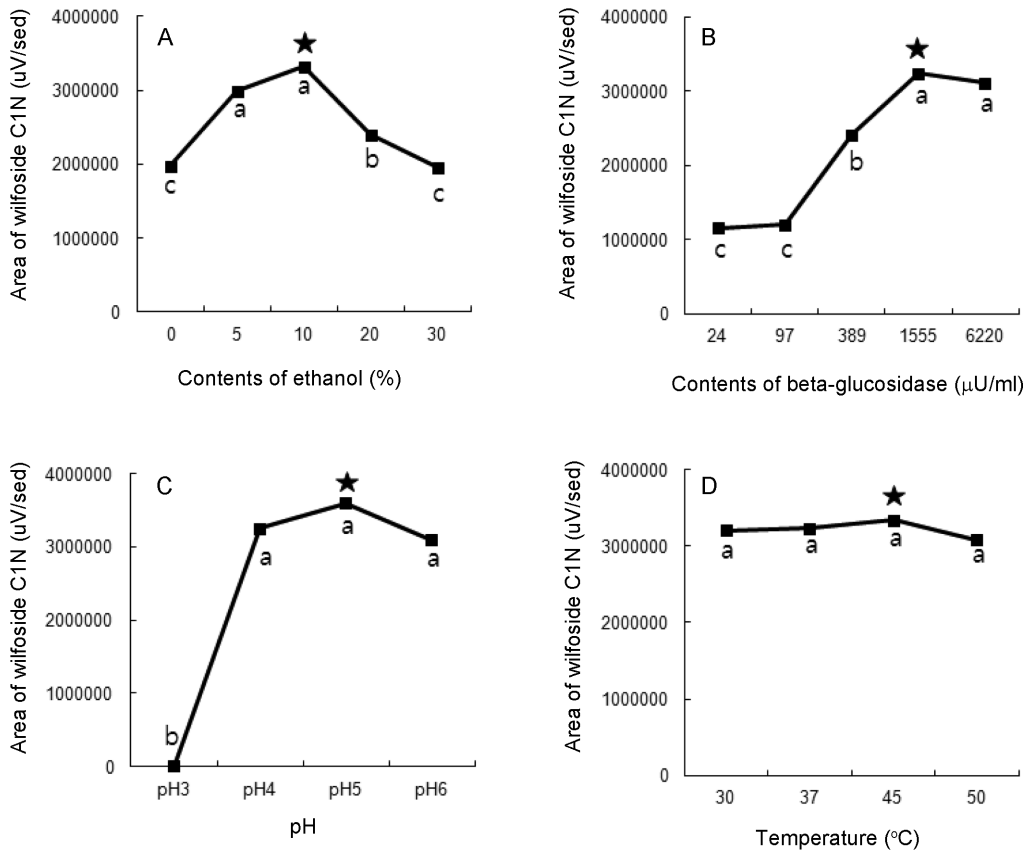


Fig. 4. Optimal conditions for enzymatic biotransformation of G sample containing wilfoside C1G and cynauricuside A. The letters indicate values that are not significantly different ($P = 0.05$) from other values with the same letter, according to Duncan's multiple range test. (A) Effect of the ethanol concentration on biotransformation of wilfoside C1G and cynauricuside A. 2,488 μU β -glucosidase/ml, pH 4.5, 24 h, 50°C. (B) Effect of the β -glucosidase contents on biotransformation of wilfoside C1G and cynauricuside A. 10% Ethanol, pH 4.5, 24 h, 50°C. (C) Effect of pH on biotransformation of wilfoside C1G and cynauricuside A. 10% Ethanol, 1,555 μU β -glucosidase/ml, 24 h, 50°C. (D) Effect of temperature on biotransformation of wilfoside C1G and cynauricuside A. 10% Ethanol, 1,555 μU β -glucosidase/ml, 24 h, pH 5.

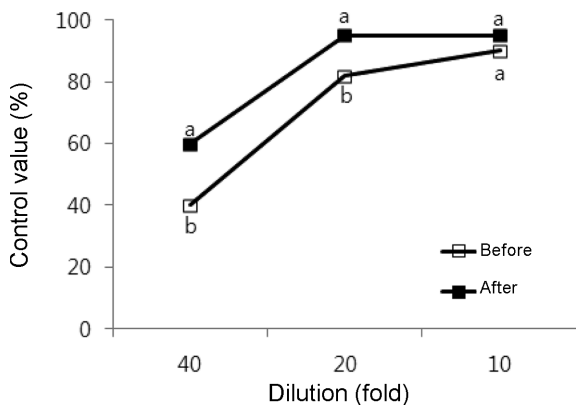


Fig. 5. *In vivo* antifungal activity of the G sample transformed by β -glucosidase against barley powdery mildews. The letters indicate values that are not significantly different ($P = 0.05$) from other value in each dilution with the same letter, according to Duncan's multiple range test. Before: before biotransformation and After: after biotransformation.

당 연구실에서는 현재 β -glucosidase를 생산하는 젓산균주의 선발에 대한 연구를 진행하고 있으며, 추후 이 균주를 이용하여 백하수오 유래 pregnane glycoside의 biotransformation을 통한 백하수오 조추출물의 흰가루병에 대한 방제효과 증진에 대한 연구를 추진할 예정이다.

요약

생물전환은 친환경적이며 생물이용성을 증가시킬 수 있는 효과적인 방법이다. 백하수오 추출물을 이용해 보리 흰가루병에 대한 항균활성을 증진시키기 위하여 본 연구자들은 β -glucosidase를 이용하여 wilfoside C1G의 생물전환을 수행하였다. Wilfoside C1G와 cynauricuside A(K1G)가 포함된 G 시료로부터 glucopyranosyl moiety를 분해하기 위하여 β -glucosidase를 처리하였다. 효소반응을 통해

wilfoside C1G와 K1G는 각각 wilfoside C1N과 wilfoside K1N으로 완전히 전환되었다. G 시료를 이용한 생물전환의 최적 조건은 에탄올 10%, 1,555 μ U β -glucosidase/ml, pH 5 및 45°C로 결정되었다. 최적조건을 통해 생물전환을 실시한 후 흰가루병에 대한 방제효과를 조사한 결과, β -glucosidase에 의해 생물전환된 G 시료는 β -glucosidase가 처리되지 않은 G 시료보다 보리 흰가루병에 대해 우수한 방제효과를 나타냈다. 따라서 β -glucosidase를 이용한 생물전환은 흰가루병 방제 효과가 있는 백하수오 추출물의 항균활성을 증가시키는데 유용한 기술로 적용이 가능할 것으로 추정된다.

Acknowledgement

This study was carried out with the support of Cooperative Research Program for Agricultural Science & Technology Development (Project No.: 200901OFT102966197), Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

- Akao, T. 1992. Metabolic activation of crude drug components by intestinal bacterial enzymes. *Med. Pharm. Soc.* 9: 1–13.
- Chang, K. C., Chung, S. Y., Chong, W. S., Suh, J. S., Kim, S. H., Noh, H. K., Seong, B. W., Ko, H. J. and Chun, K. W. 1993. Possible superoxide-radical induced alteration of vascular reactivity in aortas from streptozotocin-treated rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266: 992–1000.
- Cho, J.-Y., Choi, G. J., Lee, S.-W., Lim, H. K., Jang, K. S., Lim, C. H., Cho, K. Y. and Kim, J.-C. 2006. *In vivo* antifungal activity against various plant pathogenic fungi of curcuminoids isolated from *Curcuma longa* L. rhizomes. *Plant Pathology J.* 22: 94–96.
- Choi, H. S., Zhu, M. F., Kim, C. S. and Lee, J. H. 2003. Studies of name and herbal origins of Ha-Soo-Oh. *Korean J. Oriental Medicine* 9: 81–89.
- Choi, J., Lee, H., Kim, Y., Kim, B., Kim, I. and Lee, C. 2012. Effect of *Cynanchum wilfordii* Radix effects on lipid compositions and blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 41: 345–350. (In Korean)
- Christakopoulos, P., Goodenough, P. W., Kekos, D., Macris, B. J., Claeysens, M. and Bhat, M. K. 1994. Purification and characterisation of an extracellular beta-glucosidase with transglycosylation and exo-glucosidase activities from *Fusarium oxysporum*. *Eur. J. Biochem.* 224: 379–385.
- Dressen, M., Eyssen, H. and Lemli, J. 1981. The metabolism of sennosides A and B by the intestinal microflora: *in vitro* and *in vivo* studies on the rat and the mouse. *J. Pharm. Pharmacol.* 33: 679–681.
- Hayashi, K. and Mitsuhashi, H. 1975. Studies on the constituents of Asclepiadaceae plants. XXXII. Aglycones from *Cynanchum wilfordii* Hemsley. *Chem. Pharma. Bulletin* 23: 139–143.
- Hwang, B.-Y., Kim, S. E., Kim, Y.-H., Kim, H. S., Hong, Y. S., Ro, J.-S., Lee, K.-S. and Lee, J.-J. 1999a. Pregnane glycoside multidrug-resistance modulators from *Cynanchum wilfordii*. *J. Nat. Prod.* 62: 640–643.
- Hwang, B.-Y., Kim, Y.-H., Ro, J.-S., Lee, K.-S. and Lee, J.-J. 1999b. Acetophenones from the root of *Cynanchum wilfordii* Hemsley. *Arch. Pharm. Res.* 22: 72–74.
- Jeon, M., Lee, K. M., Lim, Y.-H. and Kim, J. K. 2009. Rhapontigenin production by bioconversion and inhibition of melanin synthesis. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 37: 49–54. (In Korean)
- Jung, J. S., Hah, Y. C. and Hong, S. W. 1983. Enzymatic property and action of β -glucosidase from *Aspergillus nidulans* FGSC 159. *Korean Biochem. J.* 16: 165–173. (In Korean)
- Kang, J. H., Uk, J. G., Jung, W. H. and Hwang, I. K. 2008. The transformation of saponin *Platycodi Radix* by *Aspergillus niger* and anti-oxidation evaluation of the transformed metabolites. *Korean J. Food Cookery Sci.* 24: 729–734. (In Korean)
- Kim, J. H. and Nam, D. H. 1984. Purification and properties of β -glucosidase from *Sporotrichum cellulophilum*. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 12: 21–26. (In Korean)
- Kim, J.-C., Choi, G. J., Park, J.-H., Kim, H. T. and Cho, K. Y. 2001. Activity against plant pathogenic fungi of phomalactone isolated from *Nigrospora sphaerica*. *Pest Manag. Sci.* 57: 554–559.
- Kim, M. J., Kim, I. J., Nam, S. Y., Lee, C. H. and Song, B. H. 2002. Effects of sowing method and planting density on growth and root yield of *Cynanchum wilfordii* Hemsley. *Korean J. Crop Sci.* 47: 418–421.
- Kim, M. S., Baek, J. H., Park, J. A., Hwang, B. Y., Kim, S. E., Lee, J. J. and Kim, K. W. 2005. Wilfoside K1N isolated from *Cynanchum wilfordii* inhibits angiogenesis and tumor cell invasion. *Intl. J. Oncol.* 26: 1533–1539.
- Lee, D. U., Shin, U. S. and Huh, K. 1996. Inhibitory effects of gagaminine, a steroidal alkaloid from *Cynanchum wilfordii*, on lipid peroxidation and aldehyde oxidase activity. *Planta Med.* 62: 485–487.
- Lee, D.-U., Shin, U.-S. and Huh, K. 1996. Inhibitory effects of gagaminine, a steroidal alkaloid from *Cynanchum wilfordii* on lipid peroxidation and aldehyde oxidase activity. *Planta Med.* 62: 485–487.
- Lee, M. K., Yeo, H. S., Kim, J. W., Markelonis, G. J., Oh, T. H. and Kim, Y. C. 2000. Cynandione A from *Cynanchum wilfordii* protects cultured cortical neurons from toxicity induced by H₂O₂, L-Glutamate, and Kainate. *J. Neurosci. Res.* 5: 259–264.
- Lin, C. N., Huang, P. L., Lu, C. M., Yen, M. M. and Wu, R. R.

1997. Revised structure for five acetophenones from *Cynanchum taiwanianum* *Phytochem.* 44: 1359–1363.
- Mitsuhashi, H., Sakurai, K. and Nomura, T. 1966. Constituents of Asclepiadaceae plants. *Chem. Pharm. Bull.* 14: 712–717.
- Park, S.-H., Yang, J.-E., Shin, H.-S. and Lee, J. M. 2012. Effects of ginsenoside enriched in compound K by biotransformation on HHDPC and HaCaT cell growth. *J. Invest. Cosmetol.* 8: 99–106. (In Korean)
- Sung, C. K., Lee, S. W., Park, S. K., Park, J. R. and Moon, I. S. 1997. Purification and characterization of β -glucosidase from *Aspergillus niger* SFN-416. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25: 44–50. (In Korean)
- Tsukamoto, S., Hayashi, K. and Mitsuhashi, H. 1985a. Studies on the constituents of Asclepiadaceae plants. LX: Further studies on glycosides with a novel sugar chain containing a pair of optically isomeric sugars, D- and L-cymarose, from *Cynanchum wilfordii*. *Chem. Pharmaceut. Bulletin.* 33: 2294–2304.
- Tsukamoto, S., Hayashi, K. and Mitsuhashi, H. 1985b. Studies on the constituents of Asclepiadaceae plant-L VII: The structures of six glycosides, wilforside C1N, C2N, C3N, C1G, C2G and C3G, with novel sugar chain containing a pair of optically isomeric sugars. *Tetrahedron* 41: 927–934.
- Yeo, H. S. and Kim, J. W. 1999. A benzoquinone from *Cynanchum wilfordii*. *Phytochem.* 46: 1103–1105.
- Yeo, N. I., Lee, S. K. and Ji, G. E. 1993. Characterization of α -galactosidase from *Bifidobacterium* sp. Int-57. *Korean J. Food Sci. Technol.* 25: 689–693. (In Korean)
- Yoon, M.-Y., Choi, N. H., Min, B., Choi, G. J., Choi, Y. H., Jang, K. S., Han, S.-S., Cha, B. and Kim, J.-C. 2011. Potent *in vivo* antifungal activity against powdery mildews of pregnane glycosides from the roots of *Cynanchum wilfordii*. *J. Agric. Food Chem.* 59: 12210–12216.