

## Ginsenoside Rg3의 함량증가를 위한 변환 기술

남기열\* · 최재을\* · 박종대\*\*†

\*충남대학교 농업생명과학대학, \*\*(재) 금산국제인삼약초연구소

### Transformation Techniques for the Large Scale Production of Ginsenoside Rg3

Ki Yeul Nam\*, Jae Eul Choi\* and Jong Dae Park\*\*†

\*Department of Crop Science, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea.

\*\*International Ginseng & Herb Research Institute, Geumsan 312-804, Korea.

**ABSTRACT:** Ginsenoside Rg3 (G-Rg3) contained only in red ginseng has been found to show various pharmacological effects such as an anticancer, antiangiogenetic, antimetastatic, liver protective, neuroprotective immunomodulating, vasorelaxative, antidiabetic, insulin secretion promoting and antioxidant activities. It is well known that G-Rg3 could be divided into 20(R)-Rg3 and 20(S)-Rg3 according to the hydroxyl group attached to C-20 of aglycone, whose structural characteristics show different pharmacological activities. It has been reported that G-Rg3 is metabolized to G-Rh2 and protopanaxadiol by the conditions of the gastric acid or intestinal bacteria, thereby these metabolites could be absorbed, suggesting its absolute bioavailability (2.63%) to be very low. Therefore, we reviewed the chemical, physical and biological transformation methods for the production on a large scale of G-Rg3 with various pharmacological effects. We also examined the influence of acid and heat treatment-induced potentials on for the preparation method of higher G-Rg3 content in ginseng and ginseng products. Futhermore, the microbial and enzymatic bio-conversion technologies could be more efficient in terms of high selectivity, efficiency and productivity. The present review discusses the available technologies for G-Rg3 production on a large scale using chemical and biological transformation.

**Key Words :** *Panax ginseng*, Ginsenoside Rg3, Acid Hydrolysis, Microbial, Enzymatic Transformation

## 서 론

인삼은 아시아에서 잘 알려진 한약재로서 많은 실험적, 임상적 연구를 통해 중추신경계, 내분비계, 면역계, 심혈관계, 그리고 노화 등에 대한 다양한 약리적, 치료적 효과가 보고되었다 (Kitts *et al.*, 2000; Nam, 2002; Liu and Xiao, 1992). 인삼의 주요 유효성분은 ginsenoside (G)로 불리어 지는 triterpene glycoside 이다. Ginsenoside는 항피로 및 항스트레스 효과를 비롯한 면역조절, 항산화, 항염증, 신경세포 보호, 그리고 항종양 효과 등 다양한 효과를 가지고 있는 것으로 보고되었다 (Attele *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2003; Shibata, 2001; Leung and Wong, 2010).

1960년대 후반부터 인삼사포닌의 화학적 특성이 밝혀지기

시작하여 지금까지 인삼 (*Panax ginseng* C. A. Meyer)으로부터 40여종 이상의 ginsenoside가 분리 동정되었고 (Cheng *et al.*, 2008), 최근 ginsenoside의 분리 및 분석방법의 진보를 통해 인삼 연구의 큰 진전이 이루어지고 있다 (Fuzzati, 2004; Qi *et al.*, 2011).

특히 ginsenoside들 가운데 ginsenoside-Rg3 (G-Rg3)는 G-Rg1과 G-Rb1에 이어 가장 많이 연구된 성분으로서 종양억제 (Shinkai *et al.*, 1996), 혈관신생억제 및 항종양전이 (Mochizuki *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2009), 항암 (Yun *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2005), 간 보호 (Lee *et al.*, 2005), 신경보호 (Tian *et al.*, 2005), 면역조절 (Wang and Meng, 1999), 혈관이완 (Kim *et al.*, 2003), 항당뇨 및 인슐린 분비 촉진 (Kang *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2008), 항산화 활성 (Lee *et al.*, 2008a) 등 다양한

†Corresponding author: (Phone) +82-41-750-1601 (E-mail) jdpark0901@ginherb.re.kr

Received 2013 August 28 / 1st Revised 2013 September 5 / 2nd Revised 2013 October 1 / 3th Revised October 15/ Accepted 2013 Revised October 16

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

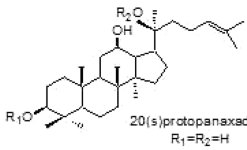
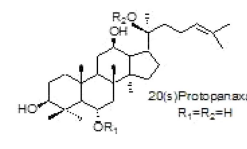
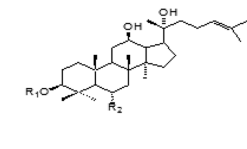
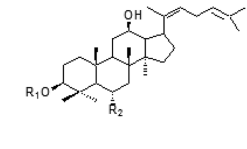
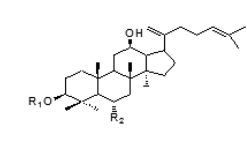
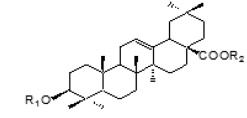
	Ginsenoside	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
 <p>20(s) protopanaxadiol R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H</p>	Ra1	Glc <sup>2</sup> -Glc	Glc <sup>6</sup> -Ara(p) <sup>4</sup> -Xyl
	Ra2	Glc <sup>2</sup> -Glc	Glc <sup>6</sup> -Ara(f) <sup>4</sup> -Xyl
	Ra3	Glc <sup>2</sup> -Glc	Glc <sup>6</sup> -Glc <sup>3</sup> -Xyl
	Rb1	Glc <sup>2</sup> -Glc	Glc <sup>6</sup> -Glc
	Rb2	Glc <sup>2</sup> -Glc	Glc <sup>6</sup> -Ara(p)
	Rb3	Glc <sup>2</sup> -Glc	Glc <sup>6</sup> -Xyl
	Rc	Glc <sup>2</sup> -Glc	Glc <sup>6</sup> -Ara(f)
	Rd	Glc <sup>2</sup> -Glc	Glc
	Rg3	Glc <sup>2</sup> -Glc	H
	Rh2	Glc	H
	Rs3	Glc <sup>2</sup> -Glc <sup>6</sup> -Ac	H
	M-Rb1	Glc <sup>2</sup> -Glc <sup>6</sup> -mal	Glc <sup>6</sup> -Glc
	M-Rb2	Glc <sup>2</sup> -Glc <sup>6</sup> -mal	Glc <sup>6</sup> -Ara(p)
	M-Rc	Glc <sup>2</sup> -Glc <sup>6</sup> -mal	Glc <sup>6</sup> -Ara(p)
M-Rd	Glc <sup>2</sup> -Glc <sup>6</sup> -mal	Glc	
 <p>20(s) Protopanaxatriol R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H</p>	Ginsenoside	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
	Rh1	Glc	H
	Rg1	Glc	Glc
	Rf	Glc <sup>2</sup> -Glc	H
	Rg2	Glc <sup>2</sup> -Rha	H
	Re	Glc <sup>2</sup> -Rha	Glc
F1	H	Glc	
 <p>20(R) Rg2 20(R) Rg3 20(R) Rh1 20(R) Rs3</p>	Ginsenoside	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
	20(R)Rg2	H	OGlc <sup>2</sup> -Rha
	20(R)Rg3	Glc <sup>2</sup> -Glc	H
	20(R)Rh1	H	OGlc
20(R)Rs3	Glc <sup>2</sup> -Glc <sup>6</sup> -Ac	H	
 <p>F4(Rg4) Rg5 Rh3 Rh4 Rs4</p>	Ginsenoside	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
	F4(Rg4)	H	OGlc <sup>2</sup> -Rha
	Rg5	Glc <sup>2</sup> -Glc	H
	Rh3	Glc	H
	Rh4	H	OGlc
Rs4	Glc <sup>2</sup> -Glc <sup>6</sup> -Ac	H	
 <p>Rg6 Rk2 Rk1 Rk3 Rs7 Rg5</p>	Ginsenoside	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
	Rg6	H	OGlc <sup>2</sup> -Rha
	Rk2	Glc	H
	Rk1	Glc <sup>2</sup> -Glc	H
	Rk3	H	OGlc
	Rs7	Glc <sup>6</sup> -Ac	OH
Rg5	Glc <sup>2</sup> -Glc <sup>6</sup> -Ac	H	
 <p>Ro</p>	Ginsenoside	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
	Ro	GlcUA <sup>2</sup> -Glc	Glc

Fig. 1. Chemical structures of ginsenosides (Kwok *et al.*, 2012).

\*Glc : Glucose, Ara : Arabinose, Xyl : Xylose, Rha : Rhamnose, mal : malonyl, Ac : Acetyl

약리효과가 보고되고 있다 (Cheng *et al.*, 2008). 더욱이 G-Rg3는 2000년에 중국에서 “Shen-Yi” Capsule이라고 부르는 새로운 항암제로 출시되어 “Class 1” 신약으로서 임상적으로 적용되고 있다 (Yue *et al.*, 2007; Shibata, 2001).

그러나 G-Rg3는 인삼 중 천연으로 존재하는 성분은 아니고 G-Rb1과 같은 Protopanaxadiol계 사포닌의 성분 변환에 의해 생성되는 prosapogenin으로 알려지고 있다 (Park, 1996). 따라서 G-Rg3는 다양한 약리활성을 나타내지만 수삼이나 백삼, 그리고 홍삼 중에는 거의 없거나 극히 미량으로 존재하기 때문에 다량의 G-Rg3를 생산할 수 있는 방법에 대해 많은 연구와 관심이 모아지고 있다.

따라서 본 연구는 ginsenoside의 구조와 관련된 화학적생리적 정보와 특히 G-Rg3의 화학적 구조와 특성 및 ginsenoside의 구조적 변환기술을 이용한 G-Rg3의 생성과 함량 증가 방법에 초점을 맞추어 고찰하였다.

## Ginsenoside 종류와 G-Rg3의 화학 구조 및 특성

### 1. Ginsenoside의 구조와 분류

사포닌은 스테로이드 혹은 트리테르펜의 비당부에 한 개 또는 그 이상의 당 분자가 붙어 있는 배당체이다. 인삼 사포닌은 인삼속 식물에서 발견되는 인삼 종 특이 성분으로서 인삼 배당체란 의미로서 진세노사이드 (ginsenoside) 라고 불리어 진다. Ginsenoside는 인삼의 주요 생리 활성성분으로 인삼제품 품질관리를 위한 지표성분으로 이용된다. Ginsenoside 구조는 일본의 Shibata 연구팀에 의해 처음 밝혀졌다 (Sanada *et al.*, 1974). Ginsenoside는 트리테르펜 골격과 그기에 부착된 수산기와 당분자의 수에 따라 분류된다. Ginsenoside는 그 종류에 따라 ginsenoside-Rx로 명명는데, 여기서 “R”는 Radix 혹은 Root 뿌리를 의미하고, X는 TLC 상의 시료점적 (spot)의 Rf 수치의 순서에 따라 아래에서부터 위로 향해 o, a, b, c, d, e, f, g, h 등의 순서로 이름을 붙인 것이다 (Shibata *et al.*, 1966).

Ginsenoside는 트리테르페노이드 (triterpenoid)계 사포닌으로서 담마란 (dammarane)계 사포닌과 올레아난 (oleanane)계 사포닌으로 구분된다. 담마란계 사포닌은 4환성의 담마란 골격을 가진 비당부 (aglycone)에 부착된 수산기 (-OH) 수에 따라 프로토파낙사디올 (protopanaxadiol : PPD)계 사포닌과 프로토파낙사트리올 (protopanaxatriol : PPT)계 사포닌으로 분류된다 (Matsuura *et al.*, 1984; De Smet, 2004).

PPD계 사포닌은 수산기가 2개이고 (C-3번과 C-20번 위치), PPT계는 수산기가 3개 (C-3번, C-6번, C-20번 위치)인 것이 다르다 (Park *et al.*, 2010). 이들 사포닌은 수산기에 포도당 (glu), 람노스 (rham), 자일로스 (xyl), 아라비노스 (ara) 등과 같은 당류가 에스테르 (ester)결합을 하고 있다. PPD계 ginsenoside는 G-Ra1, -Ra2, -Ra3, -Rb1, -Rb2, -Rb3, -Rc,

-Rd, -Rs1, -Rs2, -Rs3, -Rg3, -Rh2 등이 있다. PPT계 ginsenoside는 G-Re, -Rf, -Rg1, -Rg2, -Rh1, -Rh4 등이 있다.

올레아난계 사포닌은 5환상 트리테르펜의 일종으로 올레아난의 기본골격을 갖는다. 올레아난계 사포닌은 oleanolic acid 사포닌이라고도 하는데 여기에는 G-Ro가 있다 (Namba *et al.*, 1986).

인삼 종류별 ginsenoside 조성을 보면 인삼 (*Panax ginseng*)의 경우 G-Rb1, -Rb2, -Rc, -Rd, -Re, -Rg1 등의 6종이 총 ginsenoside 함량의 80% 이상을 차지한다. 그러나 미국삼 (*Panax quinquefolius*)은 G-Rb1과 G-Re 2종이 총 함유 ginsenoside의 70% 이상을 차지한다. 지금까지 인삼 종 식물체 (뿌리, 잎, 줄기, 열매, 꽃 등)로부터 G-Rh5, G-Rg8, G-F1, G-F2, G-I, G-II 등을 포함한 150여종 이상의 천연으로 존재하는 ginsenoside가 발견되었다 (Christensen, 2009).

### 2. Ginsenoside 구조와 생리활성

인삼 사포닌의 생리활성은 당분자의 수와 수산기의 위치와 수, 그리고 입체 선택적 성질 (stereoselectivity)과 관련이 있다 (Qi *et al.*, 2010). ginsenoside는 양친매성 특성 (amphiphilic nature)을 가지고 있다. Ginsenoside의 스테로이드 골격에 부착된 수산기 (-OH)는 세포막의 인지질의 polar head와 cholesterol의  $\beta$ -OH와 상호작용을 하고, 반면 소수성인 스테로이드 골격은 콜레스테롤과 지방산 측쇄와 상호작용을 할 수 있다. 이러한 이화학적 상호작용은 각 ginsenoside의 극성을 띤 수산기의 위치와 수에 의해 결정된다 (Nag *et al.*, 2012). 예를 들면 여러 종류의 암세포에 대한 세포독성은 ginsenoside의 당 분자 수가 감소함에 따라 증가한다. G-Rb1, -Rd, -Re, -Rg2와 -Rg3 중에서 G-Rg3가 가장 강한 활성을 보였고 (Wang *et al.*, 2007a), 당잔기 2개를 가진 G-Rg3 보다 1개를 가진 G-Rh2가 항암활성이 강하고 당 잔기가 없는 PPD와 PPT가 더욱 강하다 (Yue *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2007a). 그러나 같은 수의 당 분자를 가지고 있지만 C-6 위치의 당분자의 존재는 입체적 장애를 증가시켜 C-3와 C-20 위치의 당분자 결합에 비해 항암활성이 감소된다 (Li *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2009).

수산기의 위치와 수의 차이도 약리학적 활성에 영향을 미친다. C-24, 25에 2중 결합의 제거와 C-25에 수산기 혹은 methoxyl의 부가는 ginsenoside 항암활성을 증가시킨다. 25-OCH<sub>3</sub>-PPD, 25-OH-PPD, 25-OH-PPT, PPD, G-Rh2, G-Rg3의 항암활성을 비교한 결과, 25-OCH<sub>3</sub>-PPD, 25-OH-PPD가 가장 강력한 세포증식억제, 세포사멸 촉진, 세포주기 조절과 in vivo 종양증식억제활성을 보여주었다 (Wang *et al.*, 2007b, 2008a, b, 2009a, b). C-20에 탈수는 ginsenoside 생리활성을 증가시킨다 (Kang *et al.*, 2006). Rg5는 G-Rg3와 비교한 경우 C-20에 수산기가 존재하는 것만이 차이가 있다. Rg5는 세포증식억제 활성이 Rg3보다 약 4배 정도 강하다

(Lee *et al.*, 1997; Shin *et al.*, 2006). 이러한 암세포에 대한 세포독성/항암활성은 ginsenoside의 화학 구조에 따른 ginsenoside의 선택적 세포 흡수 능력의 차이에 기인될 수도 있다고 본다 (Ha *et al.*, 2010).

G-Rg3는 강력한 항암활성을 나타내는 G-Rh2와 PPD의 전구체로 작용한다 (Bae *et al.*, 2002). 또한 G-Rg3는 비록 *in vitro*에서 G-Rh2와 G-Rg5, PPD 등의 저극성 (less polar) ginsenoside에 비해 암세포에 대한 직접적 세포독성은 약하지만 *in vivo*에서 항암제의 항암 활성을 증강시키고 생체이용률의 증가 (Yang *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010) 시키는 효과를 보였다. 특히 G-Rg3는 항암제의 내성억제 (Kim *et al.*, 2003; Kwon *et al.*, 2008)와 신생혈관형성의 억제 (Xu *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008)를 통한 암전이 억제 효과 (Mochizuki *et al.*, 1995; Shinkai *et al.*, 1996)를 가지고 있어 그 효능에 관심이 모아지고 있다.

### 3. G-Rg3의 화학구조와 입체이성체

G-Rg3는 C<sub>42</sub>H<sub>72</sub>O<sub>13</sub>의 분자식과 784의 분자량을 가진 홍삼으로부터 분리된 미량 화학 성분이다 (Chen *et al.*, 2008). 20(S)-Rg3, 20-S-protopanaxadiol-3[O-β-D-glucopyranosyl(1→2)-βglucopyranoside]는 PPD계 ginsenoside로 그 화학구조는 Fig.2에서와 같다. G-Rg3는 탄소-3번 위치에 2개의 포도당 분자가 붙어 있으나 탄소-20번 위치에는 당 분자가 없다. 이런 화학구조는 G-R와 상당히 유사하다. G-R는 C-6번에 2개의 포도당 분자가 붙어 있고, C-20번 위치에 당분자가 없다. G-Rg3는 한 쌍의 입체이성체가 존재한다. 이는 비당부의 C-20번 위치에 붙어있는 수산기의 위치에 따라 20(R)-Rg3와 20(S)-Rg3의 에피머 (epimer)로 구분된다 (Shoji, 1990; Lee BH and Nah SY, 2007). 이러한 20(S)/20(R)-ginsenoside 화합물은 C-20에 부착된 당 잔기의 제거 후 수산기의 선택적 공격에 의해 생성된다 (Kang *et al.*, 2006).

이성체들은 분자량이 같지만 서로 구조적 특성으로 인해 다른 물리적, 생물학적 특성을 나타낸다 (Lee and Nah, 2007; Ni *et al.*, 2005, Bae *et al.*, 2002). 20(S)-Rg3 이성체는

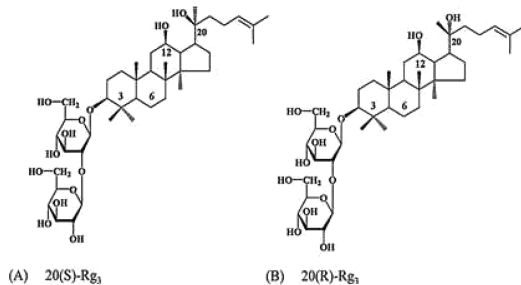


Fig. 2. Chemical structures of ginsenoside (A) 20(S)-ginsenoside Rg3 and (B) 20(R)-ginsenoside Rg3.

20(R)-Rg3 이성체 보다 더욱 수용성이고 생체이용률도 높다 (Chang *et al.*, 2009), 또한 녹는점 (melting point) 20(S)-Rg3는 248-250°C (dec.)이고, 20(R)-Rg3는 299-302°C (dec.)로 다르다 (Bae *et al.*, 2002). 이들은 약리활성에 차이가 있어 활용성도 다를 수 있다 (Wei *et al.*, 2012). 일반적으로 보다 수용성인 20(S)-Rg3의 약리활성이 강한 것으로 보고되었다. 20(S)-Rg3가 20(R)-Rg3보다 항산화 활성 (Kang *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008c)이 강하고, 전위 의존적 Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> or Na<sup>+</sup> 통로의 더욱 효율적 조절제로서 작용하였고 (Kang *et al.*, 2005), 보다 강한 세로토닌 제3형 수용체 F(5-HT(3A) receptor)의 길항제로 작용하였다 (Lee *et al.*, 2007). 또한 20(S)-Rg3가 20(R)-Rg3 보다 강한 세포독성을 보였다 (Popovich and Kitts, 2002; Qi *et al.*, 2010b), 그러나 20(R)-Rg3는 혈관신생억제를 통한 암세포의 침윤과 전이 억제 효과를 보였다 (Chen *et al.*, 2008b; Yue *et al.*, 2006). 면역 반응 촉진에 있어 면역 보강 효과는 20(R)-Rg3가 20(S)-Rg3 보다 더욱 강하였다 (Wei *et al.*, 2012). 이러한 관찰은 C-20의 수산기의 입체 구조가 ginsenoside의 생물학적 및 약리적 효과에 영향을 미친다는 것을 암시한다 (Yue *et al.*, 2006; Qi *et al.*, 2010b)

### 4. G-Rg3의 대사와 생체내 동태

Ginsenoside들은 경구투여 후 위, 장관에서 장내 세균이나 효소에 의해 대사되거나 위액 산성 조건에서 완전히 또는 부분적 가수분해를 통해 prosapogenin이나 비당체 (aglycone)으로 전환되어 흡수된다. 또한 이들 ginsenoside의 대사체나 가수 분해물은 원래 ginsenoside보다 강한 약리활성을 나타낸다고 보고되었다 (Hasegawa *et al.*, 1996, 1998; Wakabayashi *et al.*, 1998; Bae *et al.*, 2002a; Dong *et al.*, 2011).

Cai 등 (2003)은 *in vitro* 대사연구에서 인공위액조건 (0.1 N HCl)하에서 Rg3를 첨가하여 37°C에서 배양한 결과, G-Rg3

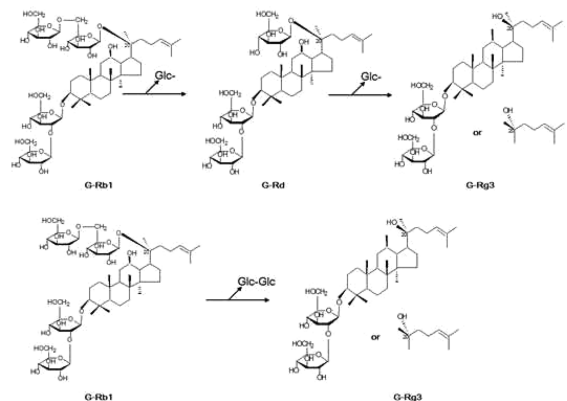


Fig. 3. Biotransformation pathway for production of ginsenoside Rg3 (Park *et al.*, 1996).

의 주요 대사물은 G-Rh2와 protopanaxdiol (PPD)이었다고 하였다. 또한 사람의 분변 미생물과 함께 배양하여 G-Rg3의 장내세균 대사를 조사한 결과, 20(S,R)-Rg3는 빠르게 20(S,R)-Rh2 혹은 20(S,R)-PPD로 전환되었으며, 그 전환량은 S form의 G-Rh2 또는 PPD가 R form의 것보다 현저히 많았다 (Bae *et al.*, 2002b). 사람 분변 미생물총으로부터 분리된 *Bacteroides sp.*, *Eubacterium sp.*, *Bifidobacterium sp.*는 G-Rg3를 G-Rh2를 거쳐 PPD로 대사시켰으며, *Fusobacterium sp.*는 많은 양을 G-Rh2로 대사시켰다 (Bae *et al.*, 2002b, 2004).

Xie 등 (2005)은 rat를 이용하여 G-Rg3를 정맥 또는 경구 투여에 따른 동력학적 parameters를 조사하였다. G-Rg3의 정맥투여 (1 mg/kg)투여 후 혈중 반감기는  $T_{1/2\alpha} = 0.12 \pm 0.03$ (h),  $T_{1/2\beta} = 2.09 \pm 0.50$ (h)이었기 때문에 체순환계에 들어간 뒤, 각 조직, 장기에 분포하는데 다소 시간이 걸리는 것으로 볼수 있다. 경구투여(10 mg/kg)의 경우  $C_{max}$  (최고혈중농도) =  $104.07 \pm 59.95$  ng/ml,  $t_{max}$  (최고 혈중농도에 도달한 시간) =  $4.40 \pm 1.67$  h이었다. G-Rg3의 절대적 생체이용율 (absolute bioavailability)은 rat에서 2.63%로 매우 적었다. 이는 경구투여 후 대부분의 ginsenoside들은 대사체 형태로 흡수되어 혈액으로 순환되기 때문에 원형 형태의 약물을 기준으로 하면 그 흡수율은 낮게 된다. G-Rg3의 정맥투여 하였을 때 rat의 모든 혈액 중에서 G-Rh2는 미량 또는 PPD는 검출되지 않았으나, 경구투여 했을 때는 G-Rg3, G-Rh2, PPD가 검출되었으며, rat 개체별로 큰 차이를 보였다 (Xie *et al.*, 2005). 또한 Li 등 (2007)은 rat에서 Rg1, Rd, Re, Rb1의 절대적 생체이용율은 각각 6.06%, 2.36%, 7.06%, 1.18%로 보고하였다 (Li *et al.*, 2007).

그러나 Qian 등 (2005)은 LC-MS 분석법을 이용하여 rat에서 (20R)-Rg3의 생체동력학적 연구에서 G-Rg3의 정맥투여 후 평균 반감기는 18.5 min이었고, 1.5 시간 이후는 검출되지 않았다고 하였다. 더욱이 G-Rg3의 경구투여 경우는 혈장 중에서는 검출되지 않았으며, 분변 중에서는 투여량의 0.97-1.15%만이 검출되었다. 경구투여 후 채취된 분변시료 중에서 가수분해 및 산화된 대사물의 LC-MS와 MS-MS 분석법을 통해 rat 위장관에서 산소부가 (Oxygenation) 또는 포도당 이탈반응 (Deglycosylation)에 의한 G-Rg3의 주요 대사 경로가 밝혀졌다. 예를 들면 G-Rg3 (MW 784)로부터 C-3의 2개 포도당 분자 중 하나가 이탈되어 G-Rh2 (MW 622)로 전환되고, 다시 포도당 분자가 떨어져 G-Rg3의 비당부인 PPD (MW 460)으로 된다는 것이다. 또한 G-Rg3의 산소첨가 반응에 의해 mono-oxygenated Rg3 (MW 800) → dioxy-genated Rg3으로 되거나 또는 포도당 이탈 반응과 산소 부가 반응에 의해 mono-oxygenated PPD (MW 476) → dioxy-genated PPD (MW 492)로 대사되는 경로가 제시되었다 (Qian *et al.*, 2005).

한편, G-Rb1이나 G-Rb2가 경구투여 되면 위액 산성조건하에서 G-Rg3로 전환될 수 있다. 이러한 G-Rb1과 G-Rb2로부터

터 전환된 G-Rg3는 장내 세균에 의해 G-Rh2 또는 20(S)-PPD로 대사된다. 그러나 경구투여 된 G-Rb1과 G-Rb2가 위에서 G-Rg3로 변환되지 않으면 장내세균에 의해서 compound-K (IH 901) 혹은 20(S)-PPD로 대사되어 진다 (Bae *et al.*, 2002b). 따라서 G-Rg3는 화학구조로 보면 장내 세균에 의해 대사 되더라도 Compound-K로는 흡수될 수 없다. 따라서 일반적인 천연의 ginsenoside인 G-Rb1과 G-Rb2 같은 PPD계 사포닌의 경구투여 후 대부분 compound K로 흡수되지만 (Akao *et al.*, 1998; Bae *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2009a; Tawab *et al.*, 2003), G-Rg3의 주요 대사체는 PPD이므로 약리활성에도 차이가 있을 것으로 여겨진다. 그러나 이러한 효과의 차별성에 대해서는 연구가 이루어지지 않아 검토가 필요하다고 사료된다. 일반적으로 *in vitro* 구조 - 활성 관계에서 암세포 증식억제 활성은 ginsenoside의 당 분자가 감소할수록 (Nag *et al.*, 2012), 또는 저극성 화학구조를 가진 화합물일수록 암세포에 대한 보다 강한 세포독성을 보여주었다 (Dong *et al.*, 2011).

## 구조 변환기술을 이용한 G-Rg3의 생성과 함량 증대

### 1. Ginsenoside의 화학적 변환(산 가수분해 반응)

1960년대 초 일본의 Shibata 연구팀은 인삼 사포닌 혼합물을 실온에서 강한 염산 (conc. HCl)을 처리하여 얻은 산가수분해산물로서 panaxadiol과 panaxatriol (Shibata *et al.*, 1965, 1966), 그리고 진정 사포게닌 (genuine sapogenins) (Shibata *et al.*, 1963, 2001)의 화학구조를 처음으로 보고하였다.

또한 동연구자들에 의해 G-Rb1, -Rb2, -Rc 혼합물의 약한 초산의 가수분해 산물로서 상당히 양호한 수율의 3-O-(2-D-glucopyranosyl-D-glucopyranosyl) 20(S)-protopanaxadiol을 얻었는데 이는 후에 홍삼에서 분리된 G-Rg3와 동일한 성분으로 밝혀졌다 (Shibata *et al.*, 1966a, 2001).

G-Rb1, -Rb2, -Rc 혹은 -Rd 각 1.0 mg를 인공위액 산성조건인 0.1N HCl 0.2 mg를 가해, 37°C, 1시간 incubation 한 후 ginsenoside를 분석한 결과 이들 PPD계 사포닌은 20(S)-Rg3 혹은 20(R)-Rg3로 전환되었다. 변화되는 양은 다소 차이가 있었으며 20(S)-Rg3로 전환율이 높았다. G-Rb1 → Rg3 (S-form: 11.0%; R-form: 4.3%), G-Rb2 → Rg3 (S-form: 2.7%; R-form: 0.7%), G-Rc → Rg3 (S-form: 4.6%; R-form: 0.7%), G-Rd → Rg3 (S-form: 6.2%; R-form: 2.9%)이었다 (Matsuda *et al.*, 2000).

또한 Dong 등 (2011)은 에탄올 추출물을 인공위액 산성조건인 0.1 N HCl 하에서 37°C에서 2시간 incubation 한 결과 추출물의 산 가수 분해물 중 주요 성분은 G-Rg3(5.14 gm/g)를 비롯한 G-Rk1 (1.22 mg/g), G-Rg5 (3.84 mg/g)이었다.

인삼 사포닌의 산 가수분해 반응에 의해 G-Rg3가 생성된다. 연구결과를 바탕으로 인삼과 인삼사포닌 배당체를 이용하여 G-Rg3로 화학적으로 변환시키는 방법을 조사하였다.

수삼을 유기산 (acetic, ascorbic, citric acid 등)에 미리 침적한 후 증삼하여 제조한 홍삼은 무처리 홍삼에 비해 G-Rg3의 함량이 증가되었다. 유기산의 종류별 차이가 있어 citric acid 처리가 가장 우수하였다 (Kim *et al.*, 2010). 또한 citric acid 처리한 후 제조된 홍삼의 알코올 추출물의 경우에서도 G-Rg3의 현저한 증가와 함께 G-Rh2, -Rd 함량이 증가하고 상대적으로 G-Rb1, -Rc, -Re, -Rf, -Rg1 함량은 감소되었다 (Kong *et al.*, 2009).

인삼 물 추출물을 산성조건하에서 60°C에 두면 PPD계 ginsenoside는 G-Rg3로 변환된다. 그러나 중성조건하에서는 G-Rg3로 변환되지 않는다. 이들 ginsenoside의 G-Rg3로 변환은 incubation 온도와 시간이 증가할수록 증가되었으며, 최적 조건은 60°C에서 5시간 정도였다 (Bae *et al.*, 2004).

한편 미삼(tail root)을 양조식초 (pH 2.90)의 10배액으로 100°C에서 2~24시간 추출하여 제조된 농축액의 G-Rg3 함량은 1.47%로 2시간 1회 추출이 가장 높았다고 하였다. 또한 양조식초, 배양조식초, 감식초, 구연산 등 유기산 용액으로 백삼 농축액에 처리한 결과 배양조식초 (Twice brewing vinegar) (pH 2.3) 8배액으로 4~12시간 반응시킨 농축액의 경우 G-Rg3 함량은 4% 이상 (4.1-4.5%)를 얻을 수 있었다 (Ko *et al.*, 2005). 또한 미삼 농축액을 ascorbic acid 용액 (pH 2.0, 10배액)으로 80°C에서 9시간 처리한 결과 G-Rg3 함량은 3.4%로 현저한 증가를 보였다 (Ko *et al.*, 2008).

최근 연구결과에서는 80°C에서 3시간 동안 PPD 계의 G-Rb1, -Rb2, -Rc, -Rd를 신선한 레몬주스 (juice)로 가수분해시킨 결과 전환수율은 각각 92.9%, 90.0%, 96.9 %, 55.5% 이었고, 20(S)-Rg3와 20(R)-Rg3의 생성 수율은 각각 31.2%와 28.3%이었다고 보고하였다 (Sun *et al.*, 2012).

인삼 추출물 제조시 장시간 고온 추출하면 인삼에서 용출된 유기산에 의해 pH가 저하되고 ginsenoside 가수분해 반응으로 G-Rg3의 함량이 증가된다 (Li *et al.*, 2009). 산 가수분해 반응 시 ginsenoside의 구조전환은 물론 ginsenoside의 함량 증감에도 영향을 미침으로 인삼 제조과정 중 산 가수분해 반응에 대한 이해가 필요하다고 사료된다.

## 2. 열처리에 의한 G-Rg3 생성(물리적 변환방법)

G-Rg3의 분리는 1980년 초에 홍삼으로부터 20(R)-ginsenoside Rg3가 처음 분리되었고 (Kasai *et al.*, 1983), 그 후 백삼과 홍삼의 성분 비교 연구를 통해 홍삼의 특유성분으로 20(S)-ginsenoside Rg3가 분리되었다 (Kitagawa *et al.*, 1983, 1987). 하지만 당시 인삼에서 분리된 ginsenoside들은 모두 20(S)-protopanaxadiol 혹은 20(S)-protopanaxatriol을 비

당부로 되어 있기 때문에 20(R)-Rg3가 백삼에서 분리 동정된 것은 예외적이었다. 20(S)-G-Rg3는 홍삼 특유 성분이지만 20(R)-Rg3는 백삼과 홍삼에 공통성분으로 존재하고 있으며 그 함량은 홍삼이 0.014%, 백삼은 0.0003%로 증삼 제조된 홍삼에서 함량이 많았다 (Kitagawa *et al.*, 1987). 그러나 전반적으로 홍삼 중 20(S)-G-Rg3와 20(R)-Rg3 함량은 주종 ginsenoside 보다 극히 미량이 함유되어 있다. 일반적으로 C-20 위치의 수산기의 공간적 배치는 처음에는 S-form이나 산 처리에 의해 R-form으로 변환된다 (Shibata, 2001).

20(S)-G-Rg3는 수삼을 수증기로 찌서 건조하여 제조하는 홍삼에서 주로 발견된다. 증삼과정에서 ginsenoside의 구조적 변화가 일어난다. G-Rb1, -Rc, -Rb2, -Rd와 같은 PPD계 ginsenoside는 C-20의 당쇄가 선택적으로 쉽게 제거되어 20(S)/(R)-Rg3가 생성된다. 생성된 20(S)-Rg3의 함량은 20(R)-Rg3보다 함량이 높다 (Sun *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2008, Nam, 2005).

특히 20(S)와 20(R)는 서로 에피머 (epimer)로서 C-20번 수산기의 위치에 따라 결정된다. 이러한 Epimer화 (epimerization)는 증삼과정 중 C-20에 당 잔기 (glycosyl residue)의 제거 후 선택적 수산기의 공격에 의해 생성된다 (Park, 1996).

G-Rg3와 같은 홍삼의 미량 ginsenoside는 관행적으로 홍삼 제조시 증삼온도 (98~100°C, 2~3시간)보다 고온 증삼 조건 (120°C, 3시간)에서 그 생성량이 증가된다 (Kwon *et al.*, 2001; Nam, 2005). 수삼(미삼)을 120°C에서 3시간 증삼 후 건조하여 제조한 가공삼 추출물의 ginsenoside 조성은 G-Rg3 6.1%, -Rk1 2.9%, -Rg5 3.3%, -Rs5 0.02%, -Rs4 0.03%로 특히 G-Rg3, -Rg5, -Rk1가 다량 생성된다고 하였다 (Park *et al.*, 2002). 고온 증삼한 가공삼은 저극성 ginsenoside의 함량 증가와 말톨 (maltol) 등 항산화물질의 증가로 백삼이나 홍삼보다 항산화 활성을 비롯한 항암, 혈관이완 및 항혈소판 작용이 더욱 강한 것으로 보고되었다 (Kim *et al.*, 2000; Kim, 2008; Keum *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2006; Yokozawa *et al.*, 2007).

한편 백삼으로 제조되는 미국삼에는 G-Rg3가 검출되지 않는다. 그러나 증삼온도와 시간 (100~120°C, 1시간, 120°C, 0.5~4시간)을 달리하여 제조된 미국삼에서는 G-Rg3가 발견되었다. 또한 7종의 ginsenoside (Rg1, Re, Rb1, Rc, Rb2, Rb3, Rd)함량은 감소되고 프로사포게닌인 5종의 ginsenoside (Rh1, Rg2, 20R-Rg2, Rg3, Rh2)은 증가되었다. 특히 Rg3는 120°C에서 증삼시간(0.5~3시간)이 증가할수록 유의하게 증가되었으나 총 ginsenoside 함량은 오히려 감소되었다 (Wang *et al.*, 2007). 관행적으로 홍삼제조 온도 (98~100°C)에서도 증삼 시간(0~3시간)이 증가할수록 G-Rg3 함량도 증가되었다 (Nam, 2005).

암세포 증식억제활성도 고온 증삼한 농축액에서 증가되었고,

120°C 1시간보다 2시간 증삼한 농축액에서 더욱 강한 항암 활성을 보였다. 대장암세포 증식억제활성은 5개 사포닌 (Rb1, Rd, Re, Rg2, Rg3) 중에서 Rg3가 가장 강력하였으며 (Wang *et al.*, 2007), 유방암세포의 증식억제 활성도 Rg3 함량이 증가될 때 강화되었다 (Wang *et al.*, 2008). 또한 증삼시간을 길게 한 시험에서도 (120°C, 2~24시간) 간암 세포주에 대한 증식억제활성은 24시간 증삼 시간까지 증가하였다 (Toh *et al.*, 2011). 따라서 증삼 시간이 증가할수록 G-Rg3 함량과 항암 활성 높아지는 것으로 사료된다.

흑삼의 제조과정에서 증삼 횟수에 따른 ginsenoside 조성 변화를 조사하였다. 증삼 횟수의 증가에 따라 PPT계의 G-Re와 G-Rg1의 감소가 현저하고 상대적으로 PPD계의 G-Rb1, G-Rb2, G-Rc, G-Rd는 감소하고, G-Rg3, G-Rk1는 현저한 증가를 보였다. 이는 홍삼에 일부 함유되어있는 Malonyl ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd가 분해되어 G-Rb1, G-Rb2, G-Rc, G-Rd로 전환되는 것으로 추정할 수 있다. 특히 9회 째 고 말리는 것을 9회 반복 제조 (구증구포)한 흑삼의 20(S)-Rg3와 20(R)-Rg3의 함량은 1회 증삼한 홍삼 0.46 mg/g의 18 배 높은 8.28 mg/g을 보였다. 이러한 결과는 Lee 등 (2006)과 Sun 등 (2009)이 보고한 증삼 횟수가 증가할수록 G-Rg3 함량이 증가된다는 연구결과와 일치하였다 (Nam *et al.*, 2012). 하지만 증삼 횟수 증가와 이에 상당하는 증삼 시간을 증가시키는 경우 거의 G-Rg3 생성량을 비롯한 유사한 ginsenoside 조성패턴을 보였으나 어느 쪽이 제품의 품질과 실용적 면에서 유리한지는 추후 검토가 필요하다고 사료된다.

반응표면분석법을 이용하여 흑삼제조 과정에서 G-Rg3와 폴리페놀, 산성다당체 함량을 증가시키고 열처리 과정에서 생길 수도 있는 벤조피렌(benzopyrene) 함량을 감소시키기 위한 최적의 증삼/건조 온도와 시간을 조사하였다. 백삼을 원료로 하여 최적화 가공조건은 증삼은 113.04°C에서 18시간, 건조는 100°C에서 8.03시간이었다. 이 조건하에서 G-Rg3 함량은 0.75 mg/g, 벤조피렌은 0.26 ppb (흑삼의 허용기준: 2 ppb)이었다 (Ban *et al.*, 2010). 또한 열처리 방법으로는 팽화 처리 (Kim *et al.*, 2008)와 고온/고압처리 (Yang *et al.*, 2006)에서도 G-Rg3의 함량 증가가 일어난다.

한편 G-Rg3는 강한 열처리 조건에서 당분자의 이탈로 G-Rh2로 변환되고 그 후 비당부 (aglycone)인 PPD로 되고 더욱 가혹조건하에서는 20-dehydr-PPD로 되기도 한다 (Qi *et al.*, 2011). G-Rg3는 증삼처리로 탈수반응(dehydration)에 의해 기화학적 이성체인 G-Rg5, -Rk1으로 더욱 전환될 수 있다. 생성된 Rk1과 Rg5는 C-20(21) 또는 C-20(22)에 2중 결합을 가진 위치이성체이다 (Sun *et al.*, 2011). 이처럼 열처리 방법은 온도와 처리시간에 따라 G-Rg3의 생성량이 달라지는 등 선택성은 좋지 못하다.

위 연구들을 종합하여 열처리에 의한 G-Rg3와 같은 홍삼의

미량 성분의 함량은 증삼온도와 증삼시간 또는 증삼 횟수의 증가, 그리고 팽화처리와 고온고압처리 방법에 의해 증가될 수 있다. 그러나 어떤 방법이 식품의학적산업적 측면에서 가장 효과적이고 안전한 방법인지에 대해서는 더욱 검토가 요망된다.

### 3. 미생물과 효소적 전환기술을 이용한 G-Rg3의 생성

주종 ginsenoside로부터 미량 ginsenoside로 전환을 위한 방법으로 전술한 산 가수분해와 열처리 이외에 미생물과 효소를 이용한 전환기술들이 이용되었다 (Park *et al.*, 2010).

토양에서 분리한 세균 (*Microbacterium sp.* GS514)은 G-Rb1으로부터 G-Rg3로 직접 전환시키거나 혹은 G-Rd를 경유하여 G-Rg3로 전환시키는 강력한 능력을 가지고 있다고 하였다 (Rb1 → Rd → Rg3). 이는 세균으로부터 분비되는 효소에 의해 G-Rb1의 C-20에 부착된 2개의 포도당 분자의 연속적 가수분해 반응에 의해 G-Rg3가 생성되었으며, 생산 수율은 41.4%로 유기합성 수율 (12.8%)보다 현저히 높았다 (Cheng *et al.*, 2008; Anufriev *et al.*, 1997).

인삼재배지 토양에서 분리된 *Microbacterium esteraromaticum*로부터 분리되어 재조합된 베타 글루코시다제 효소 (recombinant  $\beta$ -glucosidase enzyme: Bgp1)는 G-Rb1의 C-20 위치에 부착된 안쪽 및 바깥 쪽 포도당 분자를 순차적으로 가수분해 시켜 G-Rg3를 생성한다고 하였다 (Rb1 → Rd → 20(S)-Rg3) (Quan *et al.*, 2012). 또한 토양에서 분리된 *Paecilomyces bainier sp.* 229로부터 정제된  $\beta$ -D-glucosidase를 사용한 효소적 방법을 이용하여 G-Rb1으로부터 G-Rg3를 얻을 수 있었다. 그 효소에 의한 가수분해 경로는 Rb1 → Rd → Rg3로 밝혀졌다 (Yan *et al.*, 2008). G-Rg3는 G-Rb1의 C-20에 부착된 2개의 포도당 분자의 효소적 가수분해에 의해 생성된다. 하지만 분리된  $\beta$ -D-glucosidase는 C-3에 부착된  $\beta$ -(1 → 2) 글루코스 결합에는 작용하지 않아 특이적이고 효율적으로 G-Rb1을 G-Rg3로 변환시키는 효소로 여겨졌다 (Yan *et al.*, 2008). 또한 토양에서 분리된 미생물로서 *Absidia coerulea* (Chen *et al.*, 2007), *Acremonium strictum* (Chen *et al.*, 2008), *Fusarium sacchari* (Han *et al.*, 2007), *Rhizopus stolonier* (Dong *et al.*, 2003), *Paecilomyces bainier* (Zhou *et al.*, 2008), 그리고 *Bacillus megaterium* (Kim *et al.*, 2005), *Microbacterium sp.* (Cheng *et al.*, 2008)과 같은 세균, 그리고 *Sphingomonas echinoides* (Kim *et al.*, 2005) 등과 같은 진균들은 역시 ginsenoside의 변환 (transformation)을 위해 사용되었다. 이들 토양 미생물들은 값싼 배지에서도 빨리 자랄 수 있기 때문에 인체 장내 세균보다 ginsenoside 변환을 위해서는 더욱 경제적으로 실행 가능한 것으로 보인다. 하지만 상기 토양에서 분리된 미생물들은 GRAS (generally regarded as safe) 인정이 되어 있지 않고, 이들 미생물로부터 분리된 유전자 재조합 효소는 식품적용에는 안전성 문제가 있다 (Burdock and

Carabin 2004). 일반적으로 ginsenoside들의 미생물적 변환은 선택성과 수율 및 생산성이 낮은 점이 특징적이고, 변환에 관여하는 효소들은 아직 잘 알려져 있지 않았다. 따라서 효소적 변환은 선택성과 수율 및 생산성이 높기 때문에 가능성 있는 방법으로 제안되었다 (Ko *et al.*, 2007). *Penicillium* sp.로부터 분리된 상업용으로 사용되는 lactase 효소 조제품을 사용하여 PPD계 사포닌 혼합물(G-Rb1, -Rb2, -Rc 함유)로부터 G-Rg3를 비롯한 G-Rd, G-F2, compound-K를 얻을 수 있다고 보고하였다 (Ko *et al.*, 2007).

Chang 등 (2009)은 역시 식품에 안전하게 사용되어 온 상업용 효소를 이용하여 인삼사포닌 배당체의 20(S)-Rg3로 변환을 조사하였다. G-Rg3의 생성량은 여러 가지 상업용 효소 중에서 Cellulase-12T 효소가 가장 효율적이었다. G-Rg3 최적화 효소적 조건은 Cellulase-12T 3.67%와 백삼 농축액 1.67%를 50°C에서 72시간 처리 조건이었다. Cellulase-12T 백삼 농축액의 G-Rg3 함량은 시판 백삼 농축액 보다 4배 많았다 (Chang *et al.*, 2009).

그러나 보통 정제된 효소는 상대적으로 높은 특이성과 정제 수율 (0.112%)를 가지지만 세포 발현이 상당히 낮고 정제 과정이 복잡하다 (Andreea Neculai *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2007). 여러 정제 과정을 통해 ginsenoside를 변환시키는 정제된 효소는 산업적 사용에 적용하기는 비효율적이다.

또한 GRAS 미생물의 세포추출물에 의한 ginsenoside의 변환은 식품을 함유한 ginsenoside에 적용이 용이하지만 변환 생산성은 상당히 낮다. 유전자 재조합 효소들은 천연의 효소보다 여러 가지 장점을 가지고 있다. 이는 정제가 용이하고 효소량이 많고, 대규모 생산이 용이한 점 등의 이점이 있다 (Park *et al.*, 2010). 이와 관련하여 높은 생산성과 저비용의 효과적인 ginsenoside 변환을 위해서 고온성 미생물로부터 유전자 재조합된 열내성 (recombinant thermo-stable)  $\beta$ -D-glycosidases의 사용이 제안되었다 (Noh and Oh 2009; Noh *et al.*, 2009; Yoo *et al.*, 2011). 하지만 이들은 G-Rb1을 주로 F2, compound K, aglycon PPD로 변환시켰으며, G-Rg3로 변환은 보고되지 않았다. 열내성 효소들은 초기 높은 속도, 오염방지 능력, 높은 기질특이성, 그리고 긴 반감기 등 때문에 높은 가수분해 수율을 입증해 준다 (Haki and Rakshit 2003). 따라서 이들 열내성 가수분해 효소 유전자를 GRAS 인정 기주에 도입의 필요성이 강조되고 있다 (Park *et al.*, 2010).

#### 4. Ginsenoside 생합성과 G-Rg3 화학적 합성

Ginsenoside는 인삼의 2차 대사산물로서 트리테르펜 사포닌 화합물이다. 스테롤과 트리테르펜의 생합성 경로는 2,3-oxidosqualene 형성까지는 동일하고, 그 후 고리화 반응 (cyclization)단계에서 갈라진다.

Ginsenoside 생합성 과정을 보면 ginsenoside들은 2,3-

oxidosqualene으로부터 고리화반응, 수산화반응, 그리고 당화반응의 연속적 과정을 거쳐 생합성된다 (Tansakul *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2008). Isoprenoid pathway를 거쳐 생합되는 2,3-Oxidosqualene는 dammaranediol II synthase를 매개하여 담마란 골격의 고리로 변환된다. 담마란 골격은 12-hydroxylase를 사용한 수산화 반응을 통해 PPD 비당부로 전환되고 그 다음에 6-hydroxylase 효소작용에 의해 비당부 PPT로 전환된다 (Yue *et al.*, 2008). Glycosyltransferases는 aglycon PPD와 aglycon PPT의 당화반응을 경유하여 ginsenosides으로 변환시킨다 (Yue and Zhong, 2005).

현재 ginsenoside 생합성 경로에서 sequalene synthase (SS)를 비롯하여, 특히 dammarane 골격형성에 관여하는 dammaranediol II synthase (DS)가 가장 중요한 효소로 강조되고 있다. 특히 인삼으로부터 분리된 SS효소의 PgSS1 유전자의 과량 발현이 SS 효소 활성을 증대시켜 ginsenoside의 함량을 증가시킨다는 것이 실험적으로 확인되었다 (Liang *et al.*, 2008). 그러나 인삼의 ginsenoside 생합성에서 담마란트리테르펜 골격형성에 중요한 역할을 하는 DS를 비롯한 oxidosqualene cyclases (OSCs)의 완전한 cDNA 클로닝은 이루어지지 않았다. 더욱이 지난 10여년 동안 인삼의 ginsenoside 생합성 연구에 많은 진전이 있었으나 아직 실용적인 ginsenoside 생산성 제고에는 기여하지 못하고 있다. 앞으로 유전공학적대사공학적인 방법을 이용한 ginsenoside의 생합성 기전의 해명이 더욱 요망된다. 나아가 ginsenoside의 생합성에 관여하는 유용한 유전자의 클로닝과 유전자발현의 극대화를 위한 생산 환경 조건의 구명 등 ginsenoside 생산성 향상을 위한 연구발진이 기대된다.

한편 20(S)-Rg3는 자작나무 잎으로부터 분리된 20(S)-dammer-24-en-3a, 12b,20-triol (betulafolienetriol)으로부터 화학적 합성에 의해 제조되었으나, 합성단계가 복잡하고 전체 제조수율이 낮아 실용성이 없었다 (Anufriev *et al.*, 1997). 따라서 최근 항암 활성 증대를 위해 panaxadiol (PPD)의 유도체들의 합성이 시도되었다. C-3의 수산화기의 단순 아실화 (acylation)에 의한 합성된 PPD 유도체는 in vitro에서 G-Rg3와 PPD보다 강한 암세포 증식억제 활성을 보였다 (Liu *et al.*, 2011). 25-hydroxyprotopanaxadiol (25-OH-PPD)로부터 반 합성된 여러 종류의 유도체들은 정상세포에는 독성이 낮지만 암세포에는 더 강한 세포독성을 나타내는 것으로 평가되었다 (Wang *et al.*, 2012).

## 고찰

많은 실험적 연구를 통해 홍삼의 G-Rg3 성분을 비롯한 미량 ginsenoside들은 다양한 약리활성을 가지고 있고, 주종 ginsenoside들 보다 그 활성이 강하다는 것이 구조-활성과의



관계에서 밝혀졌다 (Nag *et al.*, 2012). 또한 당분자가 결합된 주종 ginsenoside들 (예: G-Rb1, -Rb2, -Rc, -Rd)은 위장관에서 흡수가 좋지 못하다 (Tawab *et al.*, 2003). 이와는 대조적으로 당분자가 이탈된 미량 ginsenoside들은 보다 쉽게 혈류로 들어가서 활성물질로 기능을 할 수 있다 (Karikura *et al.*, 1991).

지금까지 G-Rg3 제조를 위한 ginsenoside의 구조적 변환 방법으로 화학적, 물리적, 생물학적 방법이 이용되었다 (Ko *et al.*, 2005; Bae *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2008, Park *et al.*, 2010). 하지만 화학적 방법은 일반적으로 선택성이 약하고, 에피머 (epimer)화, 수화작용, 수산화작용 (epimerization, hydration, and hydroxy lation)과 같은 부반응 (side reactions)을 일으키고 환경적 공해를 야기시킬 수도 있다 (Park *et al.*, 2010).

G-Rb1, -Rb2는 열처리에 의해 G-Rg3, -Rg5, -Rk1 (Kang *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008)로 전환될 수 있고, Rg3는 열처리과정의 진행에 따라 더욱 Rz1, Rg5, Rk1 으로 전환될 수 있다 (Lee *et al.* 2009). 이들 ginsenoside의 생성량은 상대적으로 적고, 선택성이 적고 열처리 온도와 처리시간에 따라 달라진다. 더욱이 열처리에 의한 물리적 방법은 처리 온도와 처리시간에 따라 G-Rg3 함량이 달라지는 등 매우 선택성이 좋지 못하고, 바람직하지 못한 부반응을 일으킬 수 있다 (Ko *et al.*, 2005). 특히 흑삼과 같이 오랜 제조단계와 더욱이 고온 처리의 경우 전문적으로 설계된 장치를 필요로 한다.

현재 건강기능식품공전 (Health Functional Food Code, 2012)의 백삼과 홍삼의 지표성분의 함량 기준은 백삼의 경우 G-Rg1과 G-Rb1의 함량의 합으로 0.8~34 mg/g, 증삼가공 과정을 거쳐 제조된 홍삼은 G-Rg1, G-Rb1, 20(S)-Rg3의 함량의 합으로 0.2~34 mg/g으로 기준을 정하고 있다. 따라서 인삼의 효능효과의 기능성 확보를 위해서는 인삼제품의 품질 표준화의 중요성이 강조된다. 이와 관련하여 열처리하여 제조하는 홍삼흑삼, 그리고 이들 농축액 제품의 경우는 열처리/가공온도와 그 시간에 따라 ginsenoside의 증감이 일어나고 지표성분의 함량증가와 품질관리를 위해서는 홍삼 및 홍삼농축액의 최적화 제조 조건의 설정이 요구된다.

Betulafolienetriol로부터 화학적 합성에 의해 G-Rg3가 제조되었으나, 합성단계가 복잡하고 전체 제조수율이 낮아 실용성이 없었다. 그러나 최근 항암 활성 증대를 위해 panaxadiol (PPD)의 유도체 합성이 시도되었다. C-3의 수산화기의 단순 아실화 (acylation)에 의한 합성된 PPD유도들이 *in vitro*에서 G-Rg3와 PPD보다 강한 암세포 증식억제 활성을 보였다 (Liu *et al.*, 2011). 25-hydroxyprotopanaxadiol (25-OH-PPD)로부터 반 합성된 여러 종류의 유도체들은 정상세포에는 독성이 낮지만 암세포에는 보다 강한 세포독성을 나타내는 것으로 평가되었다 (Wang *et al.*, 2012). 그러나 합성 원료 물질의 안정적이고 경제적 공급이 문제가 된다. 금후 뿌리보다 저렴한 인삼

지상부 사포닌 (G-F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>) 등을 이용한 보다 저비용의 화학적생화학적 합성 기술을 이용한 보다 생리활성이 강한 사포닌 대사체의 합성이 기대된다.

Ginsenoside-Rg3 (G-Rg3)는 홍삼 중에서 발견되는 미량 생리활성 성분으로, 종양억제, 혈관신생억제 및 항종양전이, 항암, 간 보호, 신경보호, 면역조절, 혈관이완, 항당뇨 및 인슐린 분비 촉진, 항산화 활성 등 다양한 약리효과를 가지고 있다.

G-Rg3는 비당부의 C-20번 위치에 붙어 있는 수산기의 위치에 따라 20(R)-Rg3와 20(S)-Rg3의 에피머 (epimer)인 한 쌍의 입체이성체가 존재한다. 이러한 입체구조적 특성에 따라 약리활성에 차이를 나타낸다. 생체 내 대사연구를 통해 G-Rg3는 위액산성조건이나 장내세균에 의해 G-Rh2와 protopanaxadiol 대사되어 흡수되는 것으로 밝혀졌으며, 이로써 절대적 생체이용률 (2.63%)은 매우 적은 것으로 보고되었다.

더욱이 이 고찰 논문은 다양한 약리 효능을 가진 홍삼의 미량 성분인 G-Rg3의 함량 증대와 다량 제조를 위한 화학적, 물리적, 생물적 방법을 논하였다.

산 처리에 의한 화학적 방법과 열처리에 의한 고온 증삼과 증삼시간의 증가로 인삼과 인삼제품 중 G-Rg3의 함량 증대 방법으로 활용이 될 수 있다. 그러나 G-Rg3를 다량 생산을 위해서는 미생물적효소적 생물전환기술이 고도의 선택성, 효율성, 생산성의 측면에서 상당한 우위성이 있다고 본다. 식품학적 안전성이 입증되고 보다 생산성이 높고 저비용의 효과적인 ginsenoside 변환 기술의 확립이 요망된다.

## LITERATURE CITED

- Akao T, Kida H, Kanaoka M, Hattori M and Kobashi K. (1998). Intestinal bacterial hydrolysis is required for the appearance of compound K in rat plasma after oral administration of ginsenoside Rb1 from *Panax ginseng*. *Journal of Pharmacology*. 50:1155-1160.
- Andreea Neculai M, Ivanov D and Bernards MA. (2009). Partial purification and characterization of three ginsenoside-metabolizing beta-glucosidases from *Pythium irregulare*. *Phytochemistry*. 70:1948-1957
- Anufriev VP, Malinovskaya GV, Denisenko VA, Uvarova NI, Elyakov, GB, Kim SI and Baek NI. (1997). Synthesis of ginsenoside Rg3, a minor constituent of *Ginseng* radix. *Carbohydrate Research*. 304:179-182.
- Attele AS, Wu JA and Yuan CS. (1999). *Ginseng* pharmacology: Multiple constituents and multiple actions. *Biochemical Pharmacology*. 58:1685-1693.
- Bae EA, Park SY and Kim DH. (2000). Constitutive beta-glucosidases hydrolyzing ginsenoside Rb1 and Rb2 from human intestinal bacteria. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 23:1481-1485.
- Bae EA, Choo MK, Park EK, Park SY, Shin HY and Kim DH. (2002a). Metabolism of ginsenoside Rc by human intestinal bacteria and its related antiallergic activity. *Biological*

- and Pharmaceutical Bulletin. 25:743-747.
- Bae EA, Han MJ, Choo MK, Park SY and Kim DH.** (2002b). Metabolism of 20(S)- and 20(R)-ginsenoside Rg3 by human intestinal bacteria and its relation to *in vitro* biological activities. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 25:58-63.
- Bae EA, Han MJ, Kim EJ and Kim DH.** (2004). Transformation of ginseng saponins to ginsenoside Rb2 by acids and human intestinal bacteria and biological activities of their transformants. *Archives of Pharmacal Research*. 27:61-67.
- Ban YJ, Yang BW, Baik MY, Hahm YT and Kim BY.** (2010). Optimization of the manufacturing process for black ginseng. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 53:71-77
- Burdock GA and Carabin IG.** (2004). Generally recognized as safe (GRAS): history and description. *Toxicology Letters*. 150:3-18.
- Chang KH, Jee HS, Lee NK, Park SH, Lee NW and Paik HD.** (2009). Optimization of the enzymatic production of 20(S)-ginsenoside Rg3 from white ginseng extract using response surface methodology. *New Biotechnology*. 26:181-186.
- Chen G, Yang M, Lu Z, Zhang J, Huang H, Liang Y, Guan S, Song Y, Wu L and Guo DA.** (2007) Microbial transformation of 20(S)-protopanaxatriol-type saponins by *Absidia coerulea*. *Journal of Natural Products*. 70:1203-1206.
- Chen GT, Yang M, Song Y, Lu ZQ, Zhang JQ, Huang HL, Wu LJ and Guo DA.** (2008). Microbial transformation of ginsenoside Rb1 by *Acremonium strictum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 77:1345-1350.
- Chen J, Peng H, Ou-Yang X and He X.** (2008). Research on the antitumor effect of ginsenoside Rg3 in B16 melanoma cells. *Melanoma Research*. 18:322-329.
- Chen JY, Chung TY, Li FY, Lin NH and Tzen JT.** (2009). Effect of sugar positions in ginsenosides and their inhibitory potency on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity. *Acta Pharmacological Sinica*. 30:61-69.
- Cheng LQ, Kim MK, Lee JW, Lee YJ and Yang DC.** (2006). Conversion of major ginsenoside Rb1 to ginsenoside F2 by *Caulobacter leidyia*. *Biotechnology Letters*. 28:1121-1127.
- Cheng LQ, Na JR, Bang MH, Kim MK and Yang DC.** (2008). Conversion of major ginsenoside Rb1 to 20(S)-ginsenoside Rg3 by *Microbacterium* sp. GS514. *Phytochemistry*. 69:218-224.
- Cheng LQ, Na JR, Kim MK, Bang MH and Yang DC.** (2007). Microbial conversion of ginsenoside Rb1 to minor ginsenoside F2 and gypenoside XVII by *Intrasporangium* sp. GS603 isolated from soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 17:1937-1943.
- Christensen LP.** (2009). Ginsenosides chemistry, biosynthesis, analysis, and potential health effects. *Advances in Food and Nutrition Research*. 55:1-99.
- De Smet PA.** (2002). Herbal remedies. *The New England Journal of Medicine*. 347:2046-2056.
- Dong A, Ye M, Guo H, Zheng J and Guo D.** (2003). Microbial transformation of ginsenoside Rb1 by *Rhizopus stolonifer* and *Curvularia lunata*. *Biotechnology Letters*. 25:339-344.
- Dong H, Bai LP, Wong VK, Zhou H, Wang JR, Liu Y, Jiang ZH and Liu L.** (2011). The *in vitro* structure-related anticancer activity of ginsenosides and their derivatives. *Molecules and Cells*. 16:10619-10630.
- Fuzzati N.** (2004). Analysis methods of ginsenosides. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 812:119 - 833.
- Ha YW, Ahn KS, Lee JC, Kim SH, Chung BC and Choi MH.** (2010). Validated quantification for selective cellular uptake of ginsenosides on MCF-7 human breast cancer cells by liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 396:3017-3025.
- Haki GD and Rakshit SK.** (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. *Bioresource Technology*. 89:17-34.
- Han Y, Sun B, Hu X, Zhang H, Jiang B, Spranger MI and Zhao Y.** (2007). Transformation of bioactive compounds by *Fusarium sacchari* fungus isolated from the soil-cultivated ginseng. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55:9373-9379.
- Hasegawa H, Sung JH., Matsumiya S and Uchiyama M.** (1996). Main ginseng saponin metabolites formed by intestinal bacteria. *Planta Medica*. 62:453-457.
- Hasegawa H and Uchiyama M.** (1998). 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.
- Kang KA, Lee KH, Chae S, Kim JK, Seo JY, Ham YH, Lee KH, Kim BJ, Kim HS, Kim DH and Jin WH.** (2006). Inhibition of telomerase activity in U937 human monocytic leukemia cells by compound K, a ginseng saponin metabolite. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 11:7-12.
- Kang KS, Kim HY, Baek SH, Yoo HH, Park JH and Yokozawa T.** (2007). Study on the hydroxyl radical scavenging activity changes of ginseng and ginsenoside-Rb2 by heat processing. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 30:724-728.
- Kang KS, Kim HY, Pyo JS and Yokozawa T.** (2006). Increase in the free radical scavenging activity of ginseng by heat-processing. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 29:750-754.
- Kang KS, Kim HY, Yamabe N and Yokozawa T.** (2006). Stereospecificity in hydroxyl radical scavenging activities of four ginsenosides produced by heat processing. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 16:5028-5031.
- Kang KS, Yamabe N, Kim HY, Park JH and Yokozawa T.** (2010). Effects of heat-processed ginseng and its active component ginsenoside 20(S)-Rg3 on the progression of renal damage and dysfunction in type 2 diabetic otsuka long-evans tokushima fatty rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 33:1077-1081.
- Kang DI, Lee JY, Yang JY, Jeong SM, Lee JH, Nah SY and Kim Y.** (2005). Evidence that the tertiary structure of 20(S)-ginsenoside Rg(3) with tight hydrophobic packing near the chiral center is important for Na<sup>+</sup> channel regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 333:1194-1201.
- Kang KS, Yamabe N, Kim HY, Okamoto T, Sei Y and Yokozawa T.** (2007). Increase in the free radical scavenging activities of American ginseng by heat processing and its safety evaluation. *Journal of Ethnopharmacology*. 113:225-232.
- Kang, KS, Yokozawa T, Yamabe N, Kim HY and Park JH.**

- (2007). ESR study on the structure and hydroxyl radical-scavenging activity relationships of ginsenosides isolated from *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 30:917-921.
- Karikura M, Miyase T, Tanizawa H, Taniyama T and Takino Y.** (1991). Studies on absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. VII. Comparison of the decomposition modes of ginsenoside-Rb1 and -Rb2 in the digestive tract of rats. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 39:2357-2361.
- Kasai R, Besso H, Tanaka O, Saruwatari Y and Fuwa T.** (1983). Saponins of red ginseng. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 31:2120-2125.
- Keum YS, Park KK, Lee JM, Chun KS, Park JH, Lee SK, Kwon HJ and Surh YJ.** (2000). Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng. *Cancer Letters*. 150:41-48.
- Kim JH, Ahn SC, Choi SW, Hur NY, Kim BY and Baik MY.** (2008). Changes in effective components of ginseng by puffing. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 51:188-193
- Kim MH, Hong HD, Kim YC, Rhee YK, Kim KT and Rho JH.** (2010). Ginsenoside changes in red ginseng manufactured by acid impregnation treatment. *Journal of Ginseng Research*. 2:93-97.
- Kim MK, Lee JW, Lee KY and Yang DC.** (2005). Microbial conversion of major ginsenoside Rb1 to pharmaceutically active minor ginsenoside Rd. *Journal of Microbiology*. 43:456-462.
- Kim ND.** (2008). Ginsenosides-mediated vascular relaxation and its molecular mechanism. *Journal of Ginseng Research*. 32:89-98.
- Kim, ND, Kim EM, Kang KW, Cho MK, Choi SY and Kim SG.** (2003). Ginsenoside Rg3 inhibits phenylephrine-induced vascular contraction through induction of nitric oxide synthase. *British Journal of Pharmacology*. 140:661-670.
- Kim SM, Lee SY, Cho JS, Son SM, Choi SS, Yun YP, Yoo HS, Yoon do Y, Oh KW, Han SB and Hong JT.** (2010). Combination of ginsenoside Rg3 with docetaxel enhances the susceptibility of prostate cancer cells via inhibition of NF-kappa B. *European Journal of Pharmacology*. 631:1-9.
- Kim SW, Kwon HY, Chi DW, Shim JH, Park JD, Lee YH, Pyo S and Rhee DK.** (2003). Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by ginsenoside Rg(3). *Biochemical Pharmacology*. 65:75-82.
- Kim WY, Kim JM, Han SB, Lee SK, Kim ND, Park MK, Kim CK and Park JH.** (2000). Steaming of ginseng at high temperature enhances biological activity. *Journal of Natural Products*. 63:1702-1704.
- Kitagawa I, Taniyama T, Shibuya H, Noda T and Yoshikawa M.** (1987). Chemical studies of crude drug precession V. On the constituents of ginseng radix rubra (2): Comparison of the constituents of white ginseng and red ginseng prepared from the same *Panax ginseng* root. *Yakugaku Zasshi*. 107:495-505.
- Kitagawa I, Yoshikawa M, Yoshihara M, Hayashi T and Taniyama T.** (1983). Chemical studies of crude drug precession(I). On the constituents of ginseng radix rubra (1). *Yakugaku Zasshi*. 103:612-622.
- Kitts DD, Wijewickreme AN and Hu C.** (2000). Antioxidant properties of a north American ginseng extract. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 203:1-10.
- Ko SK, Cho OS, Bae HM, Sohn UD, Im BO, Cho SH, Yang BW, Chung SH, Shin WS and Lee BY.** (2008). Ginsenoside composition changes in ginseng extracts by different ascorbic acid treatments. *Food Science and Biotechnology*. 17:883-887.
- Ko SK, Lee HK, Hong JK, Kang SA, Sohn UD, Im BO, Han ST, Yang BW, Chung SH and Lee BY.** (2005). Change of ginsenoside composition in ginseng extract by vinegar process. *Food Science and Biotechnology*. 14:509-513.
- Ko SR, Suzuki Y, Suzuki K, Choi KJ and Cho BG.** (2007). Marked production of ginsenosides Rd, F2, Rg3, and compound K by enzymatic method. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 55:1522-1527.
- Kong YH, Rho JH, Cho CW, Kim MH, Lee YC, Kim SS, Lee PJ and Choi SY.** (2009). Variation of phenolic ingredient and ginsenoside content in red ginseng extract by acid treatment. *Journal of Ginseng Research*. 33:194-198.
- Kwok HH, Guo GL, Lau JK, Cheng YK, Wang JR, Jiang ZH, Keung MH, Mak NK, Yue PY and Wong RN.** (2012). Stereoisomers ginsenosides-20(S)-Rg3 and -20(R)-Rg3 differentially induce angiogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Biochemical Pharmacology*. 83:893-902
- Kwon HY, Kim EH, Kim SW, Kim SN, Park JD and Rhee DK.** (2008). Selective toxicity of ginsenoside Rg3 on multidrug resistant cells by membrane fluidity modulation. *Archives of Pharmacial Research*. 31:171-177.
- Lee BH and Nah SY.** (2007). GinsenotologyII: Chemical structure-biological activity relationship of ginsenoside. *Journal of Ginseng Research*. 31:69-73.
- Lee BH, Lee JH, Yoon IS, Lee JH, Choi SH, Shin TJ, Pyo MK, Choi WS, Lee SM, Lim Y, Rhim H and Nah SY.** (2007). Mutations of arginine 222 in pre-transmembrane domain I of mouse 5-HT(3A) receptor abolish 20(R)- but not 20(S)-ginsenoside Rg(3) inhibition of 5-HT-mediated ion currents. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 30:1721-6.
- Lee HU, Bae EA, Han MJ and Kim DH.** (2005). Hepatoprotective effect of 20(S)-ginsenosides Rg3 and its metabolite 20(S)-ginsenoside Rh2 on tert-butyl hydroperoxide-induced liver injury. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 28:1992 - 1994.
- Lee J, Lee E, Kim DH, Lee J, Yoo J and Koh B.** (2009a). Studies on absorption, distribution and metabolism of ginseng in humans after oral administration. *Journal of Ethnopharmacology*. 122:143-148.
- Lee JH, Shen GN, Kim EK, Shin HJ, Myung CS, Oh HJ, Kim DH, Roh SS, Cho W, Seo YB, Park YJ, Kang CW and Song GY.** (2006). Preparation of black ginseng and its antitumor activity. *Korean Oriental Physiology and Pathology*. 20:951-956.
- Lee KY, LeeYH, Kim SI, Park JH and Lee SK.** (1997). Ginsenoside-Rg5 suppresses cyclin e-dependent protein kinase activity via up-regulating p21(Cip/WAF1) and down-regulating cyclinE in SK-HEP-1cells. *Anticancer Research*. 17:1067-1072.
- Lee SM, Shon HJ, Choi CS, Hung TM, Min BS and Bae KH.** (2009). Ginsenosides from heat processed ginseng. *Chemical*

- and Pharmaceutical Bulletin. 57:92-94.
- Lee YJ, Kim HY, Kang KS, Lee JG, Yokozawa T and Park JH.** (2008). The chemical and hydroxyl radical scavenging activity changes of ginsenoside-Rb1 by heat processing. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 18:4515-4520.
- Lee YJ, Kim HY, Kang KS, Lee JG, Yokozawa T and Park JH.** (2008a). The chemical and hydroxyl radical scavenging activity changes of ginsenoside-Rb-1 by heat processing. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 18:4515-4520.
- Leung KW and Wong AS.** (2010). Pharmacology of ginsenosides: A literature review. *Chinese Medicine*. 11:5-20.
- Liang Y and Zhao S.** (2008). Progress in understanding of ginsenoside biosynthesis. *Plant Biology*. 10:415-421.
- Liu CX and Xiao PG.** (1992). Recent advances on ginseng research in China. *Journal of Ethnopharmacology*. 36:27-38.
- Liu TG, Huang Y, Cui DD, Huang XB, Mao S H, Ji LL, Song HB and Yi C.** (2009). Inhibitory effect of ginsenoside Rg3 combined with gemcitabine on angiogenesis and growth of lung cancer in mice. *BMC Cancer*. 9:250.
- Li W, Liu Y, Zhang J W, Ai CZ, Xiang N, Liu HX and Yang L.** (2009). Anti-androgen-independent prostate cancer effects of ginsenoside metabolites in vitro: Mechanism and possible structure-activity relationship investigation. *Archives of Pharmacial Research*. 32:49-57.
- Li X, Han JS, Park YJ, Kang SJ, Kim JS, Nam KY, Lee KT and Choi JE.** (2009). Extracting conditions for promoting ginsenoside contents and taste of rad ginseng water extract. *Korean Journal of Medical Crop Science*. 54:287-293.
- Li X, Wang G, Sun J, Hao H, Xiong Y, Yan B, Zheng Y and Sheng L.** (2007). Pharmacokinetic and absolute bioavailability study of total panax notoginsenoside, a typical multiple constituent traditional chinese medicine (TCM) in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 30:847-51.
- Matsuda H, Kubo T and Kubo M.** (2000). Chemical changes of ginsenoside- Rb1 in stomach and improving effects of product, 20(S)-ginsenoside-Rg3 on a peripheral circulation disorder. *The Ginseng Review*. p.12-15.
- Matsuura H, Kasai R, Tanaka O, Saruwatari Y, Kunihiro K and Fuwa T.** (1984). Further studies on the dammarane-saponins of ginseng roots. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 32:1188-1192.
- Mochizuki M, Yoo YC and Matsuzawa K.** (1995). Inhibitory effect of tumor metastasis in mice by saponins, ginsenoside Rb2, 20(R)- and 20(S)-ginsenoside Rg3, of red ginseng. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 18:1197-1202.
- Nag SA, Qin JJ, Wang W, Wang MH, Wang H and Zhang R.** (2012). Ginsenosides as anticancer agents: In vitro and in vivo activities, structure-activity relationships, and molecular mechanisms of action. *Frontiers in Pharmacology*. 3:25.
- Nam KY.** (2002). Clinical applications and efficacy of Korean ginseng(*Panax ginseng* C. A. Meyer). *Journal of Ginseng Research*. 26:111-131.
- Nam KY, Lee NR, Moon BD, Song GY, Shin HS and Choi JE.** (2012). Changes of ginsenosides and color from black ginsengs prepared by steaming-drying cycles. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 20:27-35.
- Nam KY.** (2005). The Comparative understanding between red ginseng and white ginsengs, processed ginseng(*Panax ginseng* C. A. Meyer). *Journal of Ginseng Research*. 29:1-18.
- Namba T, Matsushige K, Morita T and Tanaka O.** (1986). Saponins of plants of *Panax* species collected in central Nepal and their chemotaxonomical significance. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 34:730-738.
- Ni JS, Xin Y, Wang XR, Shi B, Chen D, Tian K and Wu JX.** (2005). Effect of 20(S)-ginsenoside Rg3 combined with cytotoxic agents on sarcoma 180 of mice. *Journal of Jilin University of Medicine Edition*. 31:705-708.
- Noh KH and Oh DK.** (2009). Production of the rare ginsenosides compound K, compound Y, and compound Mc by a thermostable betaglycosidase from *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 32:1830-1835.
- Noh KH, Son JW, Kim HJ and Oh DK.** (2009). Ginsenoside compound K production from ginseng root extract by a thermostable betaglycosidase from *Sulfolobus solfataricus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 73:316-321.
- Park CS, Yoo MH, Noh KH and Oh DK.** (2010). Biotransformation of ginsenosides by hydrolyzing the sugar moieties of ginsenosides using microbial glycosidases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87:9-19.
- Park EK, Choo MK, Kim EJ, Han MJ and Kim DH.** (2003). Antiallergic activity of ginsenoside Rh2. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 26:1581-1584.
- Popovich DG and Kitts DD.** (2004). Generation of ginsenosides Rg3 and Rh2 from north American ginseng. *Phytochemistry*. 65:337-44.
- Park IH, Piao LZ, Kwon SW, Lee YJ, Cho SY, Park MK and Park JH.** (2002). Cytotoxic dammarane glycosides from processed ginseng. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 50:538-40.
- Park JD.** (1996). Recent studies on the chemical constituents of Korean ginseng(*Panax ginseng* C. A. Meyer). *Journal of Ginseng Research*. 20:389-415.
- Park MW, Ha JH and Chung SH.** (2008). 20(S)-Ginsenoside Rg3 enhances glucose-stimulated insulin secretion and activates AMPK. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 31:748-751.
- Popovich DG and Kitts DD.** (2002). Structure-function relationship exists for ginsenosides in reducing cell proliferation and inducing apoptosis in the human leukemia(THP-1) cell line. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 406:1-8.
- Qi LW, Wang CZ and Yuan CS.** (2011). Ginsenosides from American ginseng: Chemical and pharmacological diversity. *Phytochemistry*. 72:689-99.
- Qi LW, Wang CZ and Yuan CS.** (2010b). American ginseng: Potential structure-function relationship in cancer chemoprevention. *Biochemical Pharmacology*. 80:947-54.
- Qi LW, Wang CZ and Yuan CS.** (2011). Isolation and analysis of ginseng: advances and challenges. *Natural Product Reports*. 28:467-95.
- Qian TX, Cai ZW, Wong R N.S, Mak NK and Jiang ZH.** (2005). In vivo rat metabolism and pharmacokinetic studies of ginsenoside Rg3. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 25:223-32.
- Quan LH, Min JW, Yang DU, Kim YJ and Yang DC.** (2012). Enzymatic biotransformation of ginsenoside Rb1 to 20(S)-Rg3

- by recombinant  $\beta$ -glucosidase from *Microbacterium esteraromaticum*. Applied Microbiology and Biotechnology. 94:377-84.
- Sanada S, Kondo N, Shoji J, Tanaka O and Shibata S.** (1974). Studies on the saponin of ginseng. I. Structures of ginsenoside-Ro, -Rb1, -Rc, and -Rd. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 22:421-428.
- Shibata S, Ando T and Tanaka O.** (1966a). Chemical studies on the oriental plant drugs. XVII. The prosapogenin of the ginseng saponins(ginsenosides-Rb1, -Rb2, and -Rc). Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 14:1157-61.
- Shibata S, Tanaka O, Ando T, Sado M, Tsushima S and Ohsawa T.** (1966). Protopanaxadiol: a genuine sapogenin of ginseng saponins. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 14:595-600.
- Shibata S, Tanaka O, Soma K, Iida Y, Ando T and Nakamura H.** (1965). Studies on saponins and sapogenins of ginseng: The structure of panaxatriol. Tetrahedron Letters. 21:207-213.
- Shibata S.** (2001). Chemistry and cancer preventing activities of ginseng saponins and some related triterpenoid compounds. Journal of Korean Medical Science. 16:28-37.
- Shibata S, Tanaka O, Sado M and Tsushima S.** (1963) On genuine sapogenin of ginseng. Tetrahedron Letters. 19:795-800.
- Shin YW, Bae EA, Han MJ and Kim DH.** (2006). Metabolism of ginsenoside Rg5, a main constituent isolated from red ginseng, by human intestinal microflora and their anti-allergic effect. Journal of Microbiology and Biotechnology. 16:1791-1798.
- Shinkai K, Akedo H, Mukai M, Imamura F, Isoai A, Kobayashi M and Kitagawa I.** (1996). Inhibition of in vitro tumor cell invasion by ginsenoside Rg3. Japanese Journal of Cancer Research. 87:357-362.
- Shoji J.** (1990). Recent advances in ginseng studies. Hirokawa Publishing. Tokyo, Japan. p.11-31.
- Su JH, Xu JH, Lu WY and Lin GQ.** (2006). Enzymatic transformation of ginsenoside Rg3 to Rh2 using newly isolated *Fusarium proliferatum* ECU2042. Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic. 38:113-118.
- Sun BS, Gu LJ, Fang ZM, Yang CY, Wang Z and Sung CK.** (2009). Determination of 11 ginsenosides in black ginseng developed from *Panax ginseng* by high performance liquid chromatography. Food Science and Biotechnology. 18:561-564.
- Sun CP, Gao WP, Zhao BZ and Cheng LQ.** (2012). Conversion of protopanaxadiol type saponins to ginsenoside Rg3 by lemon. Natural Product Communications. 7:1155-6.
- Sun S, Qi LW, Du GJ, Mehendale SR, Wang CZ and Yuan CS.** (2011). Red notoginseng: higher ginsenoside content and stronger anticancer potential than Asian and American ginseng. Food Chemistry. 125:1299-1305.
- Tansakul P, Shibuya M, Kushiro T and Ebizuka Y.** (2006). Dammarenediol-II synthase, the first dedicated enzyme for ginsenoside biosynthesis, in *Panax ginseng*. FEBS Letters. 580:5143-5149.
- Tawab MA, Bahr U, Karas M, Wurglics M and Schubert-Zsilavecz M.** (2003). Degradation of ginsenosides in humans after oral administration. Drug Metabolism and Disposition. 31:1065-1071.
- Tian JW, Fu FH, Geng MY, Jiang YT, Yang JX, Jiang WL, Wang CY and Liu K.** (2005). Neuroprotective effect of 20(S)-ginsenoside Rg3 on cerebral ischemia in rats. Neuroscience Letters. 374:92-97.
- Toh DF, Patel DN, Chan EC, Teo A, Neo SY and Koh HL.** (2011). Anti-proliferative effects of raw and steamed extracts of *Panax notoginseng* and its ginsenoside constituents on human liver cancer cells. Chinese Medicine. 24:6-14.
- Wakabayashi C, Murakami K, Hasegawa H, Murata J and Saiki I.** (1998). An intestinal bacterial metabolite of ginseng protopanaxadiol saponins has the ability to induce apoptosis in tumor cells. Biochemical and Biophysical Research Communications. 246:725-730.
- Wang CZ, Aung HH, Ni M, Wu JA, Tong R, Wicks S, He TC and Yuan CS.** (2007a). Red American ginseng : Ginsenoside constituents and antiproliferative activities of heat-processed *Panax quinquefolius* roots. Planta Medica. 73:669-674.
- Wang CZ, Aung HH, Zhang B, Sun S, Li XL, He H, Xie JT, He TC, Du W and Yuan CS.** (2008). Chemopreventive effects of heat-processed *Panax quinquefolius* root on human breast cancer cells. Anticancer Research. 28:2545-2552.
- Wang CZ, Li XL, Wang Q F, Mehendale SR, Fishbein AB, Han AH, Sun S and Yuan CS.** (2009a). The mitochondrial pathway is involved in American ginseng-induced apoptosis of SW-480 colon cancer cells. Oncology Reports. 21:577-584.
- Wang P, Bi XL, Guo YM, Cao JQ, Zhang SJ, Yuan HN, Piao HR and Zhao YQ.** (2012). Semi-synthesis and anti-tumor evaluation of novel 25-hydroxyprotopanaxadiol derivatives. European Journal of Medicinal Chemistry. 55:137-45.
- Wang W, Rayburn ER, Hao M, Zhao Y, Hill DL, Zhang R and Wang H.** (2008a). Experimental therapy of prostate cancer with novel natural product anti-cancer ginsenosides. The Prostate. 68:809-819.
- Wang W, Rayburn ER, Hang J, Zhao Y, Wang H and Zhang R.** (2009b). Anti-lung cancer effects of novel ginsenoside 25-OCH(3)-PPD. Lung Cancer. 65:306-331.
- Wang W, Wang H, Rayburn ER, Zhao Y, Hill DL and Zhang R.** (2008b). 20(S)-25-methoxyl-dammarene-3 $\beta$ ,12 $\beta$ ,20-triol, a novel natural product for prostate cancer therapy: activity in vitro and in vivo and mechanisms of action. British Journal of Cancer. 98:792-802.
- Wang W, Zhao Y, Rayburn ER, Hill DL, Wang H and Zhang R.** (2007b). In vitro anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated from fruits of *Panax ginseng*. Cancer Chemotherapy and Pharmacology. 59:589-601.
- Wei X, Chen J, Su F, Su X, Hu T and Hu S.** (2012). Stereospecificity of ginsenoside Rg3 in promotion of the immune response to ovalbumin in mice. International Immunology. 24:465-71.
- Wei X, Su F, Su X, Hu T and Hu S.** (2012). Stereospecific antioxidant effects of ginsenoside Rg3 on oxidative stress induced by cyclophosphamide in mice. Fitoterapia. 83:636-642.
- Xie HT, Wang GJ, Sun JG, Tucker I, Zhao Xc, Xie YY, Li H, Jiang XL, Xu MJ and Wang W.** (2005). High performance liquid chromatographic- mass spectrometric determination of ginsenoside Rg3 and its metabolite in rat plasma using solid-phase extraction for pharmacokinetic studies. Journal of

- Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. 818:167-173.
- Xu TM, Xin Y, Cui MH, Jiang X and Gu LP.** (2007). Inhibitory effect of ginsenoside Rg3 combined with cyclophosphamide on growth and angiogenesis of ovarian cancer. *Chinese Medical Journal*. 120:584-8.
- Yan Q, Zhou W, Li X, Feng M and Zhou P.** (2008a). Purification method improvement and characterization of a novel ginsenosidehydrolyzing beta-glucosidase from *Paecilomyces bainier* sp. 229. *bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 72:352-359.
- Yang LQ, Wang B, Gan H, Fu ST, Zhu XX, Wu ZN, Zhan DW, Gu RL, Dou GF and Meng ZY.** (2012). Enhanced oral bioavailability and anti-tumour effect of paclitaxel by 20(s)-ginsenoside Rg3 *in vivo*. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*. 33:425-36.
- Yang SJ, Jeong KS, Yoo JS, Kang TS, Noh YH, Lee JS and Jeong HS.** (2006). Change of Korean ginseng components with high temperature and pressure treatment. *Korean Society of Food Science and Technology*. 38:521-525.
- Yokozawa T, Kang KS, Yamabe N and Kim HY.** (2007). Therapeutic potential of heat-processed *Panax ginseng* with respect to oxidative tissue damage. *Drug Discoveries & Therapeutics*. 1:30-44.
- Yoo MH, Yeom SJ, Park CS, Lee KW and Oh DK.** (2011). Production of aglycon protopanaxadiol via compound K by a thermostable  $\beta$ -glycosidase from *Pyrococcus furiosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 89:1019-1028.
- Yu H, Zhang C, Lu M, Sun F, Fu Y and Jin F.** (2007). Purification and characterization of new special ginsenosidase hydrolyzing multiglycosides of protopanaxadiol ginsenosides, ginsenosidase type I. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 55:231-23.
- Yu Y, Zhou Q, Hang Y, Bu X and Jia W.** (2007a). Antiestrogenic effect of 20S- protopanaxadiol and its synergy with tamoxifen on breast cancer cells. *Cancer*. 109:2374-2382.
- Yue CJ and Zhong JJ.** (2005). Purification and characterization of UDPG: Ginsenoside Rd glucosyltransferase from suspended cells of *Panax notoginseng*. *Process Biochemistry*. 40:3742-3748.
- Yue CJ, Zhou X and Zhong JJ.** (2008). Protopanaxadiol 6-hydroxylase and its role in regulating the ginsenoside heterogeneity in *Panax notoginseng* cells. *Biotechnology and Bioengineering*. 100:933-940.
- Yue PY, Mak NK, Cheng YK, Leung KW, Ng TB, Fan DT, Yeung HW and Wong RN.** (2007). Pharmacogenomics and the Yin/Yang actions of ginseng: Anti-tumor, angiomodulating and steroid-like activities of ginsenosides. *Chinese Medicine*. 15:2-6.
- Yue PY, Wong DY, Wu PK, Leung PY, Mak NK, Yeung HW, Liu L, Cai Z, Jiang ZH, Fan TP and Wong RN.** (2006). The angiosuppressive effects of 20(R)-ginsenoside Rg(3). *Biochemical Pharmacology*. 72:437-445.
- Yun TK, Lee YS, Lee YH, Kim SI and Yun HY.** (2001). Anticarcinogenic effect of *Panax ginseng* C. A. Meyer and identification of active compounds. *Journal of Korean Medical Science*. 16:6-18.
- Zhou W, Yan Q, Li JY, Zhang XC and Zhou P.** (2008). Biotransformation of *Panax notoginseng* saponins into ginsenoside compound K production by *Paecilomyces bainier* sp. 229. *Journal of Applied Microbiology*. 104:699-706.