

최 종
연구보고서

인삼근권 토양미생물을 이용한 인삼
생리활성물질 ginsenoside Rg₃의 생산

Production of ginsenoside Rg₃-active
component of ginseng using convertive
method by soil-born microorganism

경희대학교

농림자료실



0013485

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “인삼근권 토양미생물을 이용한 인삼 생리활성물질 ginsenoside Rg3의 생산에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007 년 5 월 24 일

주관연구기관명 : 경희대학교

총괄연구책임자 :

교 수 : 양덕춘

연 구 원 : 박종산

연 구 원 : 김도완

연 구 원 : 성락금

연 구 원 : 이준원

연 구 원 : 김호빈

연 구 보 조 원 : 나주련

협동연구기관명 : KAIST

협동연구책임자 :

교 수 : 이성택

연 구 원 : 안동선

연 구 원 : 이창수

요 약 문

I. 제 목

인삼근권 토양미생물을 이용한 인삼 생리활성물질 Ginsenoside Rg3의 생산

II. 연구개발의 목적 및 필요성

인삼의 효능은 ginsenoside라고 불리는 인삼사포닌 때문에 나타난다. 인삼사포닌은 현재까지 50여종이 발견되었는데, 실제 인삼에는 major 사포닌이라고 불리는 몇 개 사포닌 즉 ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rg1, Re만이 대량으로 존재한다. 최근에 인삼의 효능이 major 사포닌이 가수 분해되어 생성된 소량의 minor 사포닌에 기인한다는 사실이 밝혀지면서 minor 사포닌의 뛰어난 생리 활성 확인과 생물전환기술에 관심이 모아지고 있다. 이러한 연구가 있기 오래 전부터 우리 선조들은 홍삼을 만들어 복용했는데, 인삼을 아홉 번 찌고 말리기를 거듭하면서 열에 의한 major 사포닌의 가수분해가 일어났을 것으로 예상된다. 현재까지 minor 사포닌 Rg3, Rh2, compound K, PPD(protopanaxadiol)가 주목받고 있다. Minor 사포닌 중에서 Rg3는 major 사포닌들(Rb1, Rb2, Rc, Rd)에서 당이 가수 분해되면서 생성된다. Rg3는 major 사포닌이 가지지 못했던 뛰어난 항암, 치매, 면역증강 등의 효과를 가진다. 마우스 내에서 tumor cell의 metastasis를 저해하고, in vitro에서 tumor cell의 invasion을 저해하며, 암세포 apoptosis 유발 효과, 신경세포의 치매 억제 효과, 혈관 확장을 통한 혈압 강하, catecholamine 분비 억제로 인한 신경안정제 효과, 진통제 활성이 확인되면서 인삼이 약효를 가지게 만드는 궁극적인 물질로 여겨지고 있다. Major 사포닌 (Rb1, Rb2, Rc, Rd)을 활성 minor 사포닌(Rg3, Rh2, PD)으로의 전환연구에서 가장 쉬운 방법은 acid를 이용한 가수 분해인데 선택성이 낮아 Rg3, Rh2, PPD외의 기타 부산물들이 많이 생성되고, 또한 S-form과 R-form의 racemic mixture가 형성되어 R-form과 S-form을 분리하는 번거로운 과정을 거쳐야 한다. 효소는 기질특이성으로 말미암아 정확히 S-form Rg3, Rh2, PPD 혹은 R-form Rg3, Rh2, PPD만을 생산 할 수 있다. 따라서 β

-glucosidase 활성을 가지는 다양한 균주를 스크리닝하고, 대량생산된 효소를 이용하여 각각의 major 인삼사포닌을 약리활성이 더욱 우수한 Rg3로 전환시키는 연구를 수행할 필요가 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

β -glucosidase 활성을 가지는 미생물을 200주 screening하여 인삼의 major 사포닌을 활성이 있는 minor 사포닌으로 전환하는 효소를 탐색한다. 미생물 발효를 통하여 사포닌 전환 효소를 대량 생산한 후, 홍삼보다 효능이 좋은 새로운 인삼제품을 생산할 수 있는 기술을 개발한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 전환대상 사포닌 결정 및 사포닌 전환효소 type 탐색

인삼사포닌은 구조적으로 steroid골격을 갖고 있는 triterpenoid에 glucose, arabinose, xylose, rhamnose 등 당이 결합되어 생성된 배당체로서 4환계 사포닌인 protopanaxadiol (PPD), protopanaxatriol (PPT), 및 5환계 사포닌인 oleanane계 사포닌으로 구분되며 지금까지 약 50여종이 분리되었다. 인삼사포닌 중 protopanaxadiol계 사포닌에 속하는 Rb1, Rb2, Rc, Rd 및 protopanaxatriol계 사포닌에 속하는 Rg1과 Re 등 6종 major 사포닌이 전체 사포닌의 90%이상을 차지하지만 인삼의 효능이 major 사포닌이 가수 분해되어 생성된 소량의 minor 사포닌에 기인한다는 사실이 밝혀지면서 minor 사포닌의 뛰어난 생리 활성 확인과 생물전환기술에 관심이 모아지고 있다. 본 연구는 protopanaxadiol계 중 함량이 가장 많고 Rd, F2, Rg3, Rh2, compound K로의 전환이 모두 가능한 Rb1을 실험 대상으로 하여 선정하였다.

인삼사포닌 전환능력이 있는 균주의 탐색을 효율화하기 위하여 시판되는 β -galactosidase, α -glucosidase, β -glucosidase (SIGMA사) 효소를 구입하여 Rb1을 대상으

로 예비실험을 한 결과 α -glucosidase, β -galactosidase는 사포닌 전환능력을 나타내지 못하였고 β -glucosidase에서만 ginsenoside Rd로의 사포닌전환 활성을 보여 β -glucosidase 발현 미생물에 초점을 두고 균주 스크리닝을 진행하였다.

나. 사포닌 전환 미생물 선별

경기도 연천 인삼밭으로부터 esculin방법을 이용하여 R2A배지에서 β -glucosidase 분비 미생물을 총 758개 screening하였고 그 중에서 β -glucosidase 분비 능력을 재검사하여 최종적으로 211개 균주를 확보하였으며 β -glucosidase분비 미생물로부터 DNA 추출, PCR 증폭 및 16S rDNA 염기서열 분석을 통하여 GeneBank에 있는 database와 계통학적 위치를 확인한 결과 8개의 주요한 계통군: *Proteobacteria* α -subdivision (28균주), *proteobacteria* β -subdivision (10균주), *proteobacteria* γ -subdivision (24균주), *Actinobacteria* (88균주), *Firmicutes* (28균주), *Bacteroidetes* (2균주)와 *Deinococcus-Thermus* (1균주) 등을 발견하였고, 신종인 *Sphingopyrix granuli* (1균주)도 발견하였다. 동정되지 않은 29개의 균주를 제외한 182개 균주들의 16S rDNA 염기서열의 계통학적 위치를 확인 한 결과, 52개 균주가 데이터베이스화된 참조균주와 90~97%의 상동성을 나타내어 신종 혹은 신속으로 제안하고 이들 균주 중 일부 균주들에 대한 세균학적 특성을 규명하여 분류학적 위치를 결정하였다. 또한 전국 각지에서 지역별, 종류별로 104개의 김치시료를 수집하여 MRS 배지를 이용하여 155개의 유산균을 분리하였으며, esculin agar plate에서 black complex를 형성한 균주, 즉 β -glucosidase 분비활성을 보이는 111개의 strain을 찾아내었다. 김치로부터 분리된 유산균 155개의 16S rDNA 염기서열 분석을 통하여 GeneBank에 있는 database와 계통학적 위치를 확인한 결과, *Lactobacillus* 속에 속하는 균주들이 가장 많았으며 (54%), 그 다음으로 *Leuconostoc* (27%), *Weissella* (11%), *Bacillus* (2%), *Pediococcus* (1%), 기타 (5%) 순으로 분포되어 있음을 알 수 있었다.

다. 사포닌전환 미생물선별

인삼 근권 토양으로부터 211개, 김치로부터 111개의 β -glucosidase 분비 미생물을 분리하

였으며 LB broth, nutrient broth 및 MRS broth에서 현탁 배양하여 major 사포닌 ginsenoside Rb1과 각각 반응시킨 후 전환산물은 TLC, HPLC 및 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR분석을 수행한 결과 각각 ginsenoside Rd, 20(S)-Rg3, F2, compound K 및 gypenoside XVII로 구조 동정이 되었다. 그중 *Serratia fonticola* FS6(2), *Paenibacillus kobensis* EM6(6)-a, *Terrabacter tumescens* DL6(1), *Paenibacillus amylolyticus* BB4(4)-b-1, *Frateuria aurantia* BB4(1)-b, *Streptomyces bikiniensis* BB5(7), *Streptomyces galilaeus* BB6(1), *Streptomyces olivochromogenes* BB6(2), *Paenibacillus amylolyticus* DB5(3), *Sphingomonas echinoides* BT4, *Sphingomonas echinoides* BT5, *Sphingomonas echinoides* BT9, *Sphingomonas echinoides* BT12, *Sphingomonas echinoides* BT14, *Streptomyces tauricus* BT5(6)-a, *Cellulomonas uda* T7-06, *Cellulosimicrobium cellulans* GS235, *Terrabacter tumescens* GS 462, *Microbacterium esteraromaticum* GS508, *Microbacterium esteraromaticum* GS514, *Terracoccus luteus* GS610, *Streptomyces ferralitis* GS614, *Terrabacter tumescens* GS653, *Microbacterium esteraromaticum* GS836, *Microbacterium esteraromaticum* GS844, *Microbacterium resistens* GS1184, *Lactobacillus brevis* KC-72, *Lactobacillus* sp. CS1 KC-102, *Bacillus subtilis* KC-103, *Lactobacillus* sp. KC-104, *Lactobacillus* sp. CS1 KC-105, *Lactobacillus* sp. CS1 KC-106, *Lactobacillus* sp. CS1 KC-107, *Bacillus subtilis* KC-150, *Lactobacillus* sp. CS1 KC-153, *Lactobacillus brevis* KC-154 등 균주들은 ginsenoside Rb1을 Rd로의 전환능력을, *Burkholderia stabilis* EM3(2)-a, *Terrabacter tumescens* GS342, *Microbacterium esteraromaticum* GS508, *Microbacterium esteraromaticum* GS514, *Terracoccus luteus* GS610, *Lactobacillus sakei* KC-01, *Leuconostoc pseudomesenteroides* KC-02, *Lactobacillus arizonensis* KC-03, *Leuconostoc mesenteroides* KC-04, *Lactobacillus arizonensis* KC-09, *Lactobacillus sakei* KC-14, *Lactobacillus plantarum* KC-16, *Lactobacillus brevis* KC-19, *Lactobacillus sakei* KC-20, *Lactobacillus sakei* KC-21, *Lactobacillus sakei* KC-22, *Leuconostoc mesenteroides* KC-28, *Lactobacillus brevis* KC-37, *Leuconostoc citreum* KC-38, *Leuconostoc mesenteroides* KC-39, *Weissella cibaria* KC-40, *Leuconostoc citreum* KC-41, *Lactobacillus sakei* KC-43, *Leuconostoc citreum* KC-50, *Lactobacillus sakei* KC-51, *Lactobacillus sakei* KC-52, *Lactobacillus sakei* KC-53, *Lactobacillus sakei* KC-57, *Lactobacillus sakei* KC-58, *Lactobacillus sakei*

KC-59, *Lactobacillus sakei* KC-60, *Lactobacillus sakei* KC-61, *Leuconostoc citreum* KC-62, *Leuconostoc mesenteroides* KC-63, *Lactobacillus brevis* KC-64, *Lactobacillus plantarum* KC-66, *Lactobacillus plantarum* KC-67, *Lactobacillus plantarum* KC-68, *Lactobacillus plantarum* KC-69, *Lactobacillus plantarum* KC-70, *Lactobacillus arizonensis* KC-78, *Lactobacillus plantarum* KC-79, *Leuconostoc pseudomesenteroides* KC-81, *Weissella cibaria* KC-82, *Weissella cibaria* KC-96, *Weissella cibaria* KC-97, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KC-100, *Lactobacillus plantarum* KC-143 등은 Rb1을 Rg3로의 전환능력을, *Paenibacillus kobensis* EM6(6)-a, *Frateuria aurantia* BB4(1)-b, *Sphingomonas yabuuchiae* BT1, *Caulobacter leidyia* BT3, *Sphingomonas echinoides* BT9, *Sphingomonas echinoides* BT14, *Streptomyces tauricus* BT5(6)-a, *Terrabacter tumescens* GS462, *Microbacterium esteraromaticum* GS508, *Terracoccus luteus* GS603, *Terracoccus luteus* GS 608, *Terracoccus luteus* GS 610, *Lactobacillus plantarum* KC-143 등 균주들은 F2로의 전환능력을, *Paenibacillus kobensis* EM6(6)-a, *Sphingomonas yabuuchiae* BT1, *Caulobacter leidyia* BT3, *Sphingomonas echinoides* BT9, *Sphingomonas echinoides* BT14, *Streptomyces tauricus* BT5(6)-a, *Terracoccus luteus* GS610 등 균주들은 compound K로의 전환활성을 보였고 *Burkholderia stabilis* EM3(2)-a, *Terrabacter tumescens* DL6(1), *Frateuria aurantia* BB4(1)-b, *Streptomyces galilaeus* BB6(1), *Caulobacter leidyia* BT3, *Streptomyces tauricus* BT5(6)-a, *Terrabacter tumescens* GS342, *Terrabacter tumescens* GS405, *Terrabacter tumescens* GS462, *Terrabacter tumescens* GS513, *Streptomyces lienomycini* GS516, *Terracoccus luteus* GS603, *Terracoccus luteus* GS608, *Terracoccus luteus* GS610, *Terrabacter tumescens* GS653 등 균주들이 gypenoside XVII로의 전환능력을 나타냈다.

균주에 의한 ginsenoside Rd, F2, Rh2, compound K로의 전환연구는 많이 보고되고 있지만 지금까지 ginsenoside Rg3로의 전환연구에 관한 보고는 없는 상황이다. Ginsenoside Rg3는 산을 처리하는 방법으로 쉽게 생산할 수 있어 산업체에서 많이 이루어지고 있지만 부산물이 많이 생성되고 중화과정을 거치면서 환경오염이 야기되며 S-form과 R-form 혼합물이 생성되어 S-form과 R-form의 순수 분리에 많은 어려움이 있다. 미생물이나 동식물의 효소를 이용한 인삼사포닌의 전환방법은 비교적 온화한 조건에서 반응시킬 수 있고 기

질특이성으로 인하여 원하는 사포닌만을 생산할 수 있을 뿐만 아니라 S-form 혹은 R-form만 생산이 가능하여 번거로운 S-form과 R-form의 분리과정을 거치지 않아 산처리에 비해 우월성을 나타내지만 사포닌의 20번 탄소의 입체장애로 인하여 효소의 접근이 어려워 효소에 의한 Rg3의 생산은 어렵다고 인정이 되었고 또한 지금까지 Rg3 생산효소에 관한 분리연구는 아직 이루어지지 않았다. 하지만 본 연구팀은 대량의 균 test를 통하여 처음으로 Rg3를 대량으로 생산할 수 있는 균주 *Microbacterium esteraromaticum* GS514를 분리하였고 또한 활성이 GS514 보다는 적지만 역시 Rg3의 생산 능력이 있는 유산균 *Lactobacillus plantarum* KHU100-109 를 분리하였다.

이중 Rg3로의 전환 활성이 뛰어난 *Microbacterium esteraromaticum* GS514균를 구조 동정한 결과 20(S)-Rg3로 확인이 되었다.

라. 인삼근권 토양으로부터 ginsenoside Rg3생산효소 분리 및 동정

Ginsenoside Rg3생산균주 *Microbacterium esteraromaticum* GS514 및 *Lactobacillus plantarum* KC-143의 최적 배양조건을 탐색하기 위하여 배지, 온도, pH 및 유도물질의 영향을 조사하였다. GS514균주를 각각 LB broth (LB), Tryptic soy broth (TSB), Nutrient broth (NB)에 접종하여 Shaking Incubator에서 같은 조건으로 배양하여 O.D₆₀₀을 측정하고 결과 LB와 TSB배지에서 가장 잘 자랐고 NB배지에서는 거의 자라지 않았으며 각각의 12 h 균주 배양액을 ginsenoside Rb1과 혼합하여 시간별로 반응시킨 결과 역시 LB와 TSB배지에서 양호한 Rg3생산활성을 나타냈고 NB에서는 Rd로의 전환활성만 보여주었다. GS514균주는 LB배지에 접종하여 22, 27, 32, 37°C 온도별로 배양한 후 O.D₆₀₀을 측정하고 결과 27°C에서 가장 빠른 성장속도를 보였고 37°C에서 가장 느린 성장속도를 보였으며 pH는 5.5 이하에서 느린 성장속도를 보인 외에 6.0에서 8.0까지 유사한 성장속도를 보여 pH의 영향을 크게 받지 않았다. KC-143균주의 경우에는 LB나 NB 등의 배지에서는 성장률이 극히 저조하였으나, MRS 배지에서는 매우 잘 자랐다. 또한 pH 6.5, 37°C에서 16시간 전후로 배양하였을 때 최적의 성장률을 보였다.

LB broth에서 유도물질을 첨가하지 않고 배양한 GS514균주 배양액을 control로, 홍삼농축액, 인삼 잎사포닌, 인삼분말을 첨가하여 배양한 GS514균주 배양액을 treatment로 하여 비교실험을 수행하였다. Control와 treatment의 균주 배양액을 원심분리하여 cell을 침전시

키고 상층액은 각각 ginsenoside Rb1과 반응시킨 결과 control에서는 ginsenoside Rd만 확인이 되고 treatment에서는 모두 ginsenoside Rg3가 확인이 되어 Rg3생산효소는 유도물질의 첨가로 인하여 생성되는 유도효소라는 것을 확인 하였다. 또한 인삼 잎사포닌과 인삼분말의 첨가구가 홍삼농축액 첨가구보다 좋은 Rg3생산효과를 나타내는 것을 확인하였다. 사포닌 함량이 높고 수용성이 좋은 인삼 잎사포닌을 유도물질로 선정하여 Rg3생산효소 최적 생산조건을 조사하였다. GS514균주를 LB broth배지에서 O.D₆₀₀값이 0.5~0.8이 되게 배양 후 LB배지의 1.2%를 첨가(많은 양의 인삼사포닌은 균생장을 억제)하여 24시간 배양 할 때 가장 많은 Rg3생산효소가 생산되며 배양시간을 더 증가시키면 Rg3분해효소의 대량 생성으로 Rg3분해를 야기 시켜 Rg3생산에 부적합하였다.

Ginsenoside Rb1으로부터 ginsenoside Rg3로의 전환은 Rb1의 20번 탄소에 연결된 두 개의 glucose 중 terminal glucose가 먼저 가수분해 되어 Rd가 생성되고 Rd에서 다시 20번 위치의 glucose가 가수분해 되어 Rg3가 생성되는 Rb1→Rd→Rg3로의 pathway를 결정하였고 ginsenoside Rd 및 Rg3생산효소의 사포닌전환 실험을 통하여 ginsenoside Rg3생산효소의 금속의존성 특성을 밝혔다. GS514균주를 유도물질 첨가 하에서 Rg3효소의 최적 생산조건으로 균을 배양하고 배양여액은 70% 황산암모늄 포화, dialysis를 통하여 조효소액을 조제한 후 DEAE 52 column으로 ginsenoside Rd생산효소를 분리하고 분자량을 측정하여 58.7kDa에 해당함을 확인하였다. 조효소액은 Mono Q column에 의한 ion exchange chromatography를 이용하여 효소를 분리하고 Rg3생산 활성이 가장 강하게 나타나는 fraction은 SDS-PAGE, 2-D PAGE 등의 방법으로 control과 비교하여 Rg3생산효소로 예상되는 spot 10개를 대전 기초지원연구소에 의뢰하여 MALDI-TOF MS/MS로 amino acid sequence 분석을 하였다. 확인된 peptide는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>에서 상동성 분석을 한 결과 이미 알려진 단백질과의 유사성이 매우 낮아 새로운 단백질로 추정된다.

마. Rg3 생산균주 조효소액에 의한 홍삼농축액, 인삼뿌리(잎) 조사포닌의 전환 및 사포닌 전환균주의 발효기 운전

GS514균주를 유도물질첨가 하에서 배양 후 산업화에 유리한 유기용매 침전법으로 단백질을 침전시키고 먼저 Rb1과 반응시켜 효소활성을 체크하였다. 알코올 침전에서는 Rd로의

전환활성만 일부분 남아있었고 Rg3로의 전환활성은 전부 소실이 되었으며 acetone침전에서는 Rg3생산 효소활성이 그대로 보존되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 단백질에 대한 acetone침전법은 염석방법에 비해 시간을 많이 단축시킬 수 있을 뿐만 아니라 acetone용매는 증류법을 통하여 회수하여 재활용할 수 있고 휘발성이 좋아 잔류가 거의 없는 장점을 가지고 있다. 따라서 acetone 침전법의 산업화 가능성을 고찰하기 위하여 고농도의 홍삼농축액(30 brix), 인삼뿌리사포닌(30 mg/ml) 및 인삼잎사포닌(30 mg/ml)과 각각 반응시키고 HPLC로 분석한 결과 ginsenoside Rg3만 특이적으로 많이 생성되는 좋은 생산효과를 나타냈다. 특히 인삼뿌리사포닌과 잎사포닌에 포함된 ginsenoside Rd는 100% Rg3로 전환되었고, Rb1은 각각 61.8%와 40.0% 전환되었으며 Rg3의 전체 양은 효소처리 전보다 각각 4.2배, 7.4배로 증가하여 높은 ginsenoside Rg3 생산성을 나타내었다.

GS514균주는 20L 배양기를 이용하여 대량배양 할 때 소량 배양에 비하여 균 성장속도가 유사할 뿐만 아니라 ginsenoside Rg3생산 활성도 소량배양과 유사하게 나타나 전체적으로 균 성장, ginsenoside Rg3생산효소의 활성이 모두 양호하였다. Ginsenoside Rg3생산효소는 acetone 침전법으로 쉽게 침전이 될 뿐만 아니라 효소활성을 그대로 유지시킴으로서 효소생산의 산업화에 용이하며 acetone 침전법으로 조제한 Rg3생산 효소는 인삼농축액, 뿌리사포닌 및 잎사포닌과의 반응에서 diol계 사포닌 중 Rb1, Rd뿐만 아니라 Rb2, Rc까지도 특이적으로 Rg3로 전환시킬 수 있는 Rg3생산효과를 나타냈다. 따라서 ginsenoside Rg3생산효소가 가격이 저렴하게 생산이 된다면 20(S)-Rg3 고 함유 인삼제품의 생산 및 순수한 20(S)-Rg3생산의 산업화에 있어서 큰 경제적 효과를 나타낼 것으로 사료된다.

2. 활용에 대한 건의

- 가. 본 연구로부터 분리된 Rg3생산 균주 *Microbacterium esteraromaticum* GS514는 특허 출원을 할 예정이다.
- 나. Rg3생산 균주 *Microbacterium esteraromaticum* GS514는 발효기를 이용해 활성 효소를 대량 생산하여 인삼의 major사포닌을 Rg3만 특이적으로 많이 함유하고 있는 물질로 전환시켜 신소재 인삼제품을 생산한다.
- 다. Rg3의 대량생산 기술이 완료되면 기업으로 이전하여 인삼을 대량으로 재배하는 지역에 공장을 확보하고 재배된 인삼을 원료로 건강기능성 식품, 의약품, 신소재 인삼제품

등으로 다양하게 사용할 수 있다.

- 라. 본 연구에서 Rg3생산효소는 유도물질 첨가 하에서 생산이 되는 유도효소로서 단가가 비교적 높다. 따라서 인슐린의 제조방법을 참조하여 Rg3생산효소의 proteomics 및 관련유전자를 확인하고 specific gene의 vector 재조합을 이용하여 대장균에 Rg3생산효소 관련 유전자를 형질전환 시켜 값 싸게 대량화 할 수 있는 방법이 요구되고 독성검사가 이루어져야 한다.

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title

Production of ginsenoside Rg3 using soil microorganisms from rhizosphere of ginseng root

II. Backgrounds

Ginseng (the root of *Panax ginseng*C.A. Meyer) is one of the most popular medicinal plants, and it has been used for strengthening immunity, providing nutrition and recovering from fatigue. Ginseng saponins (ginsenosides) have been recognized as responsible for the biological and pharmacological activities of ginseng. For example, many studies have focused on their anti-tumor effects (inhibition of tumor-induced angiogenesis and prevention of tumor invasion and metastasis), along with their anti-diabetic, anti-fatigue, anti-stress and anti-oxidative activities.

More than 40 ginsenosides have been isolated from ginseng roots, with five major ginsenosides (ginsenosides Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re and Rg₁) constituting more than 90% of total ginsenosides. In recent decades, many studies have focused on the pharmacological activities of the minor ginsenosides as their activities were found to be superior to those of the major ginsenosides. These minor ginsenosides are present in ginseng only in small percentages and can be produced by hydrolysis of the sugar moieties of the major ginsenosides. Therefore, many studies have aimed to

convert major ginsenosides to the more active minor ginsenosides with methods such as heating, acid treatment or enzymatic conversion. Heating and acid treatment, however, degrade other active minor ginsenosides and acidic polysaccharides by randomly hydrolyzing all glycosidic bonds, which deprive of the other pharmacological activities of ginseng. Therefore, enzymatic hydrolysis of appropriate sugar at a specific position is desirable for the production of active minor ginsenosides. This preference for enzymatic conversion has led to the development of biotransformation methods. Rb₁ is the most abundant compound (23%) of the ginsenosides, and its structure can be converted to 20(S)-PPD by hydrolyses of glucose moieties. Ginsenoside Rb₁ has a total of four glucose moieties at C-3 and C-20. The conversion of ginsenoside Rb₁ to PPD begins with cleavage of a terminal sugar moiety at either the C-3 or C-20 position leaving a hydroxyl group, and is followed by stepwise cleavage of the other sugars.

III. Research scope

We isolated 200 beta-galactosidase producing microorganisms from rhizosphere of ginseng root. Their Rb₁-converting activities were analyzed. And we tried to search the enzymes to convert major ginsenosides to minor ginsenosides. After mass production of saponin-converting enzymes, new technique may be developed to produce new product with quality better than red ginseng.

IV. Results and suggestions

1. Results

A. Enzyme types converting saponins

β -glucosidase (sigma) was purchased commercially, and its ginsenoside Rb₁-converting activity tested. 1U of β -glucosidase and 1mM of ginsenoside Rb₁ were dissolved in 1.5 ml of phosphate buffer (50 mM, pH 7.0). The reaction mixture was incubated for 24 hours at 30°C and analyzed by TLC, as below. Microorganisms were initially screened, using the Esculin-R2A agar, for their ability to produce β -glucosidase. The black colonies on the Esculin-R2A agar that showed β -glucosidase activity were picked and transferred to the fresh Esculin-R2A agar. Pure cultures were checked for shape, color and size of colonies.

B. Screening of saponin-converting microorganisms

All the isolated strains were identified using their 16S rRNA gene sequences. 16S rRNA partial sequences, with sizes around 700 bp, were blasted in the NCBI database, with the closest type strains discovered. Most strains are classified as Gram-positive *Actinobacteria*, *Bacilli* and *Proteobacteria*. More precisely, the isolated β -glucosidase-producing bacteria belonged to *Streptomyces*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Sphingomonas*, *Enterobacter* and *Escherichia* genera. The sequence similarity of their 16S rRNA genes to those of their closest type strains ranged from 96.0 to 100.0%. 8 major groups were found - *Proteobacteria* α -subdivision (28 isolates), *Proteobacteria* β -subdivision (10 isolates), *Proteobacteria* γ -subdivision (24 isolates), *Actinobacteria* (88 isolates), *Firmicutes* (28 isolates), *Bacteroidetes* (2 isolates), *Deinococcus-Thermus* (1 isolate) and

Sphingopyrix granuli (1 isolate).

C. Selection of saponin-converting microorganisms

From ginseng rhizosphere, 211 β -glucosidase producing bacteria were isolated and from kimchi, 111 bacteria were isolated. As a result of NMR analysis, the conversion products were ginsenoside Rd, 20(S)-Rg3, F2, compound K and gypenoside XVII.

Ginsenoside Rb1 was converted to Rd by *Serratia fonticola* FS6(2), *Paenibacillus kobensis* EM6(6)-a, *Terrabacter tumescens* DL6(1), *Paenibacillus amylolyticus* BB4(4)-b-1, *Frateuria aurantia* BB4(1)-b, *Streptomyces bikiniensis* BB5(7), *Streptomyces galilaeus* BB6(1), *Streptomyces olivochromogenes* BB6(2), *Paenibacillus amylolyticus* DB5(3), *Sphingomonas echinoides* BT4, *Sphingomonas echinoides* BT5, *Sphingomonas echinoides* BT9, *Sphingomonas echinoides* BT12, *Sphingomonas echinoides* BT14, *Streptomyces tauricus* BT5(6)-a, *Cellulomonas uda* T7-06, *Cellulosimicrobium cellulans* GS235, *Terrabacter tumescens* GS 462, *Microbacterium esteraromaticum* GS508, *Microbacterium esteraromaticum* GS514, *Terracoccus luteus* GS610, *Streptomyces ferralitis* GS614, *Terrabacter tumescens* GS653, *Microbacterium esteraromaticum* GS836, *Microbacterium esteraromaticum* GS844, *Microbacterium resistens* GS1184, *Lactobacillus brevis* KC-72, *Lactobacillus* sp. CS1 KC-102, *Bacillus subtilis* KC-103, *Lactobacillus* sp. KC-104, *Lactobacillus* sp. CS1 KC-105, *Lactobacillus* sp. CS1 KC-106, *Lactobacillus* sp. CS1 KC-107, *Bacillus subtilis* KC-150, *Lactobacillus* sp. CS1 KC-153 and *Lactobacillus brevis* KC-154.

Ginsenoside Rb1 was converted to Rg3 by *Burkholderia stabilis* EM3(2)-a, *Terrabacter tumescens* GS342, *Microbacterium esteraromaticum*

GS508, *Microbacterium esteraromaticum* GS514, *Terracoccus luteus* GS610, *Lactobacillus sakei* KC-01, *Leuconostoc pseudomesenteroides* KC-02, *Lactobacillus arizonensis* KC-03, *Leuconostoc mesenteroides* KC-04, *Lactobacillus arizonensis* KC-09, *Lactobacillus sakei* KC-14, *Lactobacillus plantarum* KC-16, *Lactobacillus brevis* KC-19, *Lactobacillus sakei* KC-20, *Lactobacillus sakei* KC-21, *Lactobacillus sakei* KC-22, *Leuconostoc mesenteroides* KC-28, *Lactobacillus brevis* KC-37, *Leuconostoc citreum* KC-38, *Leuconostoc mesenteroides* KC-39, *Weissella cibaria* KC-40, *Leuconostoc citreum* KC-41, *Lactobacillus sakei* KC-43, *Leuconostoc citreum* KC-50, *Lactobacillus sakei* KC-51, *Lactobacillus sakei* KC-52, *Lactobacillus sakei* KC-53, *Lactobacillus sakei* KC-57, *Lactobacillus sakei* KC-58, *Lactobacillus sakei* KC-59, *Lactobacillus sakei* KC-60, *Lactobacillus sakei* KC-61, *Leuconostoc citreum* KC-62, *Leuconostoc mesenteroides* KC-63, *Lactobacillus brevis* KC-64, *Lactobacillus plantarum* KC-66, *Lactobacillus plantarum* KC-67, *Lactobacillus plantarum* KC-68, *Lactobacillus plantarum* KC-69, *Lactobacillus plantarum* KC-70, *Lactobacillus arizonensis* KC-78, *Lactobacillus plantarum* KC-79, *Leuconostoc pseudomesenteroides* KC-81, *Weissella cibaria* KC-82, *Weissella cibaria* KC-96, *Weissella cibaria* KC-97, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KC-100 and *Lactobacillus plantarum* KC-143

Ginsenoside Rb1 was converted to F2 by *Paenibacillus kobensis* EM6(6)-a, *Frateruria aurantia* BB4(1)-b, *Sphingomonas yabuuchiae* BT1, *Caulobacter leidyia* BT3, *Sphingomonas echinoides* BT9, *Sphingomonas echinoides* BT14, *Streptomyces tauricus* BT5(6)-a, *Terrabacter tumescens* GS462, *Microbacterium esteraromaticum* GS508, *Terracoccus luteus* GS603, *Terracoccus luteus* GS 608, *Terracoccus luteus* GS 610 and *Lactobacillus*

plantarum KC-143.

Ginsenoside Rb1 was converted to compound K by *Paenibacillus kobensis* EM6(6)-a, *Sphingomonas yabuuchiae* BT1, *Caulobacter leidyia* BT3, *Sphingomonas echinoides* BT9, *Sphingomonas echinoides* BT14, *Streptomyces tauricus* BT5(6)-a and *Terracoccus luteus* GS610.

Ginsenoside Rb1 was converted to gypenoside XVII by *Burkholderia stabilis* EM3(2)-a, *Terrabacter tumescens* DL6(1), *Frateuria aurantia* BB4(1)-b, *Streptomyces galilaeus* BB6(1), *Caulobacter leidyia* BT3, *Streptomyces tauricus* BT5(6)-a, *Terrabacter tumescens* GS342, *Terrabacter tumescens* GS405, *Terrabacter tumescens* GS462, *Terrabacter tumescens* GS513, *Streptomyces lienomycini* GS516, *Terracoccus luteus* GS603, *Terracoccus luteus* GS608, *Terracoccus luteus* GS610 and *Terrabacter tumescens* GS653Y.

Major ginsenosides such as ginsenoside Rb1, Rb2, Rc and Rd can be easily converted into a mixture of 20(R)- and 20(S)-ginsenoside Rg3 by acid treatment or heating. But the isolation of each isomer from the racemic mixture is a time-consuming and complicated process. 20(S)-Rg3 has also been prepared by chemical synthesis from 20(S)-dammer-24-en-3a, 12 β , 20-triol (betulafolienetriol), but the synthetic steps were complicated and the overall yield was low.

The enzymatic conversion through sugar hydrolysis at a specific position of ginsenoside is desirable for the production of 20(S)-Rg3. Until now no one has reported the production of ginsenoside Rg3 by using microbial enzymes. In this study, we isolated β -glucosidase-producing microorganism GS514 from soil around ginseng roots in a field using esculin-R2A agar, investigated the activity transforming ginsenoside Rb1 into Rg3, and identified its related metabolites.

D. Isolation and identification of Rg3-converting crude enzyme

Growth of the strain GS514 was very slow in nutrient broth and the activity producing Rg3 was very weak. In order to compare the effect of various media, the strain GS514 was cultured in LB broth, tryptic soy broth and nutrient broth for 24 h. Samples were collected at 6, 12, 18 and 24 h, and O.D was measured at 600 nm. The O.D of LB broth, tryptic soy broth and nutrient broth samples at 24 h were 2.346, 2.849 and 0.910, respectively. The growth rates in LB broth and tryptic soy broth were significantly higher than in the nutrient broth. Each suspension culture of the strain GS514 at 12 h was mixed with the same volume of ginsenoside Rb1 and then incubated for 10 h in a shaking incubator. We observed that cultures in LB broth and tryptic soy broth converted ginsenoside Rb1 into Rg3, but the culture in nutrient broth only converted Rb1 to Rd. This suggested that LB broth and tryptic soy broth were suitable for the growth of the strain GS514 and also for production of Rg3. Therefore, LB broth, which costs low price than other media, was chosen for more study.

When the ginsenoside Rb1 was added to the culture broth of the strain GS514, the content of ginsenoside Rb1 and Rd gradually decreased and that of Rg3 gradually increased from 2 h to 8 h. This proved that metabolite Rd is a precursor of the ginsenoside Rg3. Similarly, when ginsenoside Rd was added to the culture broth of the strain GS514, the

Rg3 was also produced and the content of the Rg3 remarkably decreased after 4 h. Conversion of Rd into Rg3 was faster than conversion of Rb1 into Rg3. This suggested that Rb1 was converted by different enzymes secreted by the strain GS514 in the following sequence: Rb1→d→g3. The enzymes hydrolyzed the terminal glucose and consecutively inner glucose at the C-20 position. Interestingly, after 10 h, the content of the ginsenoside Rg3 rapidly decreased. This may have occurred due to the decrement of the precursors (Rb1 and Rd) converted to ginsenoside Rg3 so the rate of production of Rg3 was slower than the rate of degradation of Rg3.

2. Suggestions

- A. The Rg3 producing *Microbacterium esterarmaticum* GS514 will be applied to patent.
- B. The Rg3 producing *Microbacterium esterarmaticum* GS514 can be used to produce the active enzyme in mass production.
- C. After completing mass production, the production technique can be transferred to companies to produce functional food, medical product, etc.
- D. The Rg3-converting enzyme was induced by inducer. Applying gene transformation technique, more cheap method for the production of Rg3 should be developed.

CONTENTS

Part 1. The Outline for Research & Development

Chapter 1. The purpose for research & development

Chapter 2. The need for research & development

Chapter 3. The contents and limit for research & development

Part 2. The Present States of Technology and Development at Home and Abroad

Chapter 1. Current situation in domestic and foreign technology

Chapter 2. Future prospect

Chapter 3. Validity of technology

Part 3. The Results of Research & Development

Chapter 1. Introduction

Chapter 2. Decide on target ginsenoside and research of enzyme type transforming ginsenosides

1. Decide on target ginsenoside

2. Research of efficient extraction method for ginsenosides

3. Research of enzyme type transforming ginsenosides

Chapter 3. Screening of β -glucosidase-producing microorganism

1. Isolation and identification of β -glucosidase-producing microorganism from ginseng field
2. Isolation and identification of β -glucosidase-producing microorganism from kimchi

Chapter 4. Selection of microorganism transforming ginsenoside

1. Materials and Methods
2. Results and Discussion
 - 1) Decide on reaction time transforming ginsenoside
 - 2) TLC analysis of transformation of ginsenoside Rb1 by β -glucosidase-producing strains
 - 3) HPLC analysis of transformation of ginsenoside Rb1 by β -glucosidase-producing strains
 - 4) Structural identification of conversion product of ginsenoside Rb1 by NMR analysis

Chapter 5. Isolation and identification of the enzyme producing Ginsenoside Rg3

1. Materials and Methods
2. Results and Discussion

- 1) The optimum production condition of enzyme producing ginsenoside Rg3 by *Microbacterium esteraromaticum* GS514
- 2) Isolation of the enzyme producing ginsenoside Rd and Rg3
 - (1) Research of the pathway from ginsenoside Rb1 to Rg3
 - (2) Isolation of a enzyme producing ginsenoside Rd
 - (3) Isolation of a enzyme producing ginsenoside Rg3

Chapter 6. Transformation of ginseng extract and crude ginseng saponins by using a enzyme produced from *Microbacterium* GS 514 and operation of fermenter transforming ginsenosides

1. Materials and Methods

2. Results and Discussion

- 1) Mass production of a enzyme producing ginsenoside Rg3
- 2) Transformation of ginseng extract and crude ginseng saponins by using a enzyme produced from *Microbacterium* GS 514
- 3) Operation of 20L-fermenter

Part 4 Achievements of Purpose and Contribution for Relative Field

Chapter 1. Purpose of Research & Development and Achievement

Chapter 2. Contribution of for Relative Field

Part 5 Results of Research & Development and Application Plan

Part 6. Collection of Technology information

Part 7. References

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

제 2 절 연구개발의 필요성

제 3 절 연구개발의 내용 및 범위

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 기술개발 현황과 문제점

제 2 절 앞으로의 전망

제 3 절 기술도입의 타당성

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 서론

제 2 절 전환대상 사포닌 결정 및 사포닌 전환효소 type탐색

1. 연구대상 사포닌 결정

2. 효율적인 사포닌 추출방법 모색

3. 사포닌 전환효소 type 탐색

제 3 절 β -glucosidase 분비 미생물 선별

1. 토양에서 β -glucosidase 분비 미생물 분리 및 동정
2. 김치에서 β -glucosidase 분비 미생물 분리 및 동정

제 4 절 사포닌 전환 미생물 선별

1. 재료 및 방법
2. 결과 및 고찰

가. 인삼사포닌 전환 반응시간 설정

나. β -glucosidase 분비 미생물에 의한 ginsenoside Rb1의 전환 TLC 분석 결과

다. β -glucosidase 분비 미생물에 의한 ginsenoside Rb1의 전환산물 HPLC 분석 결과

라. NMR 분석에 의한 Rb1 전환산물의 구조 동정

제 5 절 인삼근권 토양으로부터 ginsenoside Rg3 생산효소 분리 및 동정

1. 재료 및 방법
2. 결과 및 고찰

가. *Microbacterium esteraromaticum* GS514 균주에 의한 ginsenoside Rg3 생산효소

의 생산 최적조건

나. Ginsenoside Rd, Rg3생산효소의 분리

1). Ginsenoside Rb1으로부터 Rg3로의 전환 pathway 탐색

2). Ginsenoside Rd생산효소 분리

3). Ginsenoside Rg3생산효소 분리

4). Ginsenoside Rg3생산효소를 이용한 ginsenoside Rb1전환율 측정

제 6 절 *Microbacterium esteraromaticum* GS514 조효소액에 의한 홍삼농축액, 조사포닌의 전환 및 사포닌 전환균주의 발효기 운전

1. 재료 및 방법

2. 결과 및 고찰

가. Rg3생산조효소 대량생산

나. *Microbacterium esteraromaticum* GS514 조효소액에 의한 홍삼농축액, 조사포닌의 전환

다. 2L, 5L, 20L-fermenter를 이용한 발효기 운전

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발의 목표달성도

제 2 절 관련분야에의 기여도 및 기대효과

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

인삼에는 질소화합물(단백질, 아미노산, 펩티드, 핵산, 알칼로이드 등), 지용성성분(지질, 지방산, 정유, 유기산, 페놀계화합물, 폴리아세틸렌 등), 사포닌, 탄수화물(다당류, 2당류, 3당류, 조섬유 펙틴 등), 비타민, 회분 등 성분이 광범위하게 포함되어 있지만 효능은 주로 ginsenoside라고 불리는 인삼사포닌 때문에 나타난다. 인삼사포닌은 현재까지 50여종이 발견되었지만 인삼의 효능은 major 사포닌이 가수 분해되어 생성된 소량의 minor 사포닌에 기인한다는 사실이 밝혀지면서 minor 사포닌의 뛰어난 생리 활성 확인과 생물전환기술에 관심이 모아지고 있으며 그중에서도 minor 사포닌 Rg3, Rh2, compound K, PPD(protopanaxadiol)가 주목받고 있다. Minor 사포닌 Rg3는 major 사포닌들(Rb1, Rb2, Rc, Rd)에서 20번 위치의 당이 전부 가수 분해되면서 생성되며 major 사포닌이 가지지 못했던 뛰어난 항암, 치매, 면역증강 등의 효과를 가진다. Ginsenoside Rg3생산은 지금까지 주로 산 가수분해 방법을 사용하였다. 하지만 산을 이용한 사포닌 가수 분해는 Rg3외의 기타 부산물들이 많이 생성되고, 또한 S-form과 R-form의 racemic mixture가 형성되어 R-form과 S-form을 분리하는 번거로운 과정을 거쳐야 하며 반응 후 염기중화과정을 거치면서 환경오염이 야기되는 등 문제가 있다. 효소반응은 비교적 온화한 조건에서 반응시킬 수 있고 기질특이성으로 인하여 S-form 혹은 R-form 만을 생산 할 수 있어 산처리에 비해 우월성을 나타내지만 지금까지 효소에 의한 Rg3생산의 어려움으로 아직 전문적인 연구가 되어있지 않고 산업화도 되어있지 않았다. 따라서 인삼근권토양미생물에 의한 ginsenoside Rg3 연구는 학문적 연구, 고부가가치인삼제품의 생산 및 의약품생산에 있어서 모두 중요한 가치를 가지고 있다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

가. 인삼을 복용하면 정신이 바짝 들고 (각성효과 arousal), 스테미나가 생기며, 각종

스트레스에 대한 저항성이 생긴다. 최근에는 생명과학기술을 이용한 인삼 사포닌의 tranquilizing (안정) 효과와 치매 치료 효과가 밝혀져서 21세기에도 변함없이 가치 있는 특용작물로 여겨지고 있다.

나. 1967년 소련의 약리학자인 Brekhman에 의해 인삼사포닌이 인삼의 유효성분이라고 암시한 이래 인삼사포닌에 대한 각종 약리활성에 대한 연구가 활발히 진행되었다. 특히 major 사포닌 대사산물인 ginsenoside Rg3, Rh2, compound K 등의 항암, 항암전이, 면역증강, 항피로 등 약리활성이 입증됨에 따라 major 사포닌에 대한 전환연구가 각별한 주목을 받고 있다. 홍삼의 특이성분으로 알려진 ginsenoside Rg3는 마우스 내에서 tumor cell의 metastasis를 저해하고, in vitro에서 tumor cell의 invasion을 저해하며 (Mochizuki *et al.* 1995, Shinkai *et al.* 1996), 암세포 apoptosis 유발 효과 (Liu *et al.* 2000), 신경세포의 치매 억제 효과 (Kim *et al.* 1998), 혈관 확장을 통한 혈압 강하 (Kim *et al.* 1999), catecholamine 분비 억제로 인한 신경안정제 효과 (Tachikawa *et al.* 2001, 1999), 진통제 활성 (Rhim *et al.* 2002)등을 나타낸다. Ginsenoside Rg3는 20번 탄소의 수산기 위치가 다름에 따라 R-form과 S-form이성질체로 나뉘며 어떤 면에서는 서로 다른 약리활성을 나타낸다. 예를 들면 수용성, 전류의존성 Ca^{2+} , K^{+} 및 Na^{+} 채널 억제효과(Jeong *et al.*, 2004), L1210 및 P388 tumor cell line의 in vitro에서의 세포독성(Bae *et al.*, 2002)은 모두 20(S)-Rg3가 20(R)-Rg3에 비해 높았다.

다. Ginsenoside Rg3의 R-form과 S-form은 서로 다른 기능을 하기 때문에 R-form과 S-form을 분리하여 각각의 효능에 맞게 사용하여야만 제일 큰 효과를 발휘할 수 있다. 지금까지 Rg3의 생산은 주로 열처리나 산처리에 의해 진행되어 왔지만 제일 큰 문제는 R-form과 S-form혼합물이 생성되어 번거로운 분리과정을 걸쳐야 한다.

라. 효소에 의한 minor 사포닌의 생산은 산처리나 열처리에 비해 반응조건이나 특정 사포닌 생산에서 우월성을 가지고 있으며 또한 미생물이 생산하는 β -glucosidase를 이용하여 Rb1으로부터 Rd, F2, compound K 등 사포닌으로의 전환연구는 많이 되어 있다. 하지만 효소에 의한 ginsenoside Rg3의 생산은 이론적으로 산처리에 비해 어려워 지금까지 Rg3생산효소의 분리 및 동정이 되어 있지 않았다. 따라서 20(S)-Rg3생산효소를 대량 생

산할 수 있는 균주의 개발, 경제적인 Rg3생산 효소의 대량생산 및 고부가가치 인삼제품 개발이 필요한 실정이다.

2. 경제·산업적 측면

가. 홍삼은 인삼보다 훨씬 높은 가격으로 거래가 된다. 인삼을 구증구포 (아홉번 찌고 말림)하는 번거로운 과정이 더해지기 때문이기도 하지만 무엇보다 홍삼이 인삼보다 약효가 뛰어나기 때문이다. 홍삼의 대표적인 성분인 minor 사포닌(Rg3)을 대량 함유한 기능성 인삼을 개발할 수 있다면, 홍삼보다 나은 약효를 가지면서 보다 저렴한 상품을 개발할 수 있다.

나. 우리나라 및 중국, 일본 등 해외에서 다양한 전환 방법 (열처리, 산처리등)을 이용하여 미량사포닌을 생산하는 연구 및 제품개발이 활발한 추세이다. 하지만 국내에 출시된 제품들은 ginsenoside Rg3가 5%이하로 소량 함유된 것이 대부분이며, 각각의 미량 사포닌이 주성분으로 들어있는 제품은 아직 확인된 바가 없다. 중국에서는 산처리를 이용하여 S-form과 R-form이 섞인 ginsenoside Rg3 다량함유 제품(參一胶囊)이 판매되고 있지만 아직 효소처리를 이용한 제품은 시중에 없는 것으로 알려져 있다. 또한 ginsenoside Rg3 및 Rh2가 주성분인 주사액이 판매되고 있다. Ginsenoside Rg3는 매우 고가로 거래되는 인삼성분 물질로 실제로 순도 99%의 Rg3는 1g당 2500달러에 달한다. 따라서 미생물 효소를 이용하여 홍삼의 대표적인 성분인 minor 사포닌(Rg3, Rh2), 혹은 compound K가 대량 함유한 기능성 인삼이나 고순도 제품을 개발할 수 있다면 국내의 인삼 산업의 시장을 넓혀줄 수 있고, 수출까지 가능하다. 나아가 인삼종주국으로서의 한국의 위상을 굳건히 하게 될 것이다.

3. 사회·문화적 측면

인삼은 약용식물 중에서 가장 다양한 효능을 가지고 있는 한국을 대표하는 작물 중의 하나이다. 한때 수출기간산업으로 많은 외화를 획득하였으나 현재는 제품이 표준화가 되지 않았고, 또한 저가의 중국, 미국, 캐나다 등의 인삼이 대량으로 생산됨으로서 한국인삼의 위기를 초래하고 있을 뿐 만 아니라 한국 못지않은, 어떤 면에서는 한국보다 앞선 인삼 연구가 이미 각국에서 이루어지고 있다. 따라서 다시 인삼의 종주국의 면모를 일신

하기 위해서는 고부가가치, 표준화 기능성 인삼제품의 생산이 절대적으로 필요하다. 따라서 프로테옴 기술을 이용하여 저가의 인삼사포닌을 변화시켜 고가의 인삼사포닌으로 변환시킬 수 있는 효소를 찾아 제품을 표준화함으로써 해외수출을 극대화 할 수 있을 것이다.

제 3 절 연구개발의 목표 및 범위

1. 연구개발의 목표

β -glucosidase 활성을 가지는 미생물을 screening하여 인삼의 major 사포닌을 활성이 있는 minor 사포닌 Rg3로 전환하는 효소를 탐색한다. 미생물 발효를 통하여 사포닌 전환 효소를 대량 생산한 후, 홍삼보다 효능이 좋은 새로운 인삼제품을 생산할 수 있는 기술을 개발한다.

2. 연구개발의 범위

가. 전환 대상사포닌 결정 및 사포닌 전환효소 type 탐색

- 1) Major사포닌 Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1 중 전환 대상사포닌 결정
- 2) Major사포닌의 효율적인 추출방법 모색
- 3) 시판효소 β -galactosidase, α -glucosidase, β -glucosidase를 이용하여 사포닌전환 활성을 분석하여 사포닌 분해효소 type설정

나. β -glucosidase분비 미생물 분리 및 동정

- 1) 인삼근권 토양으로부터 색소기질을 이용한 β -glucosidase 활성균주 200주 분리
- 2) β -glucosidase 활성을 가지는 미생물 균주동정
 - (1) DNA 추출 및 정제
 - (2) Molecular taxonomy: 16S rDNA G+C content, DNA-DNA hybridization

- (3) Chemotaxonomy: MIDI, Quinone
 - (4) Polyphasic taxonomy: Phenotypic test, API
 - (5) 계통도 작성
 - (6). β -glucosidase 활성 균주의 diversity 분석
- 3) 김치로부터 색소기질을 이용한 β -glucosidase 활성균주 100주 분리 및 동정

다. Ginsenoside Rg3로의 전환사포닌 선발

- 1) 인삼사포닌에 대한 β -glucosidase 분비미생물의 전환활성 확인
- 2) ¹H-NMR, ¹³C-NMR분석에 의한 전환사포닌 구조동정
- 3) Ginsenoside Rg3로의 전환균주 선발
- 4) Ginsenoside Rg3로의 전환균주 기질 특이성 분석
- 5) Ginsenoside Rb1으로부터 Rg3로의 전환 pathway결정

라. Ginsenoside Rg3생산효소 분리

- 1) Ginsenoside Rg3 전환미생물의 발효조건 확립
 - (1) 발효배지 결정
 - (2) 배양온도가 균 성장 및 ginsenoside Rg3생산에 미치는 영향
 - (3) pH조건이 균 성장 및 ginsenoside Rg3생산에 미치는 영향
 - (4) 유도물질의 첨가가 ginsenoside Rg3생산에 미치는 영향
- 2) 사포닌전환 활성효소분리
 - (1) ginsenoside Rd생산효소분리 및 동정
 - (2) ginsenoside Rg3생산효소 분리
 - (3) ginsenoside Rg3생산효소의 amino acid sequencing 및 동정
 - (4) ginsenoside Rg3생산효소를 이용하여 ginsenoside Rb1가수분해 전환율 측정

마. 사포닌 전환효소의 산업용정제방법 및 인삼농축액, 인삼조사포닌 전환

- 1) 사포닌전환효소의 산업용 정제방법

- (1) 에탄올에 의한 단백질 침전법
- (2) 아세톤에 의한 단백질 침전법
- 2) Rg3생산효소에 의한 홍삼농축액, 인삼조사포닌의 전환
 - (1) Rg3생산효소에 의한 홍삼농축액의 전환
 - (2) Rg3생산효소에 의한 인삼조사포닌의 전환
- 3) 2L, 5L, 15L fermenter를 이용한 발효기 운전

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내외 관련기술의 현황과 문제점

가. 국내외 관련기술의 현황

인삼사포닌의 다양한 효능을 확인하는 연구는 주로 한국, 일본, 중국, 미국에서 발표되며 항암(Im *et al.*, 1995), 항암전이(Mochizuki *et al.*, 1995), 면역증강(Wang *et al.*, 1999), 간기능 보호(Lee *et al.*, 2005), 혈관확장(Kim *et al.*, 2003), 항피로(Wang *et al.*, 1983), 항스트레스(Saito *et al.*, 1974), 항당뇨(Xie *et al.*, 2005), paraquat 유도 산화적 스트레스에 대한 항산화작용(Kim *et al.*, 2004) 등 여러 가지 다양한 약리활성이 입증되었다. 하지만 인삼을 경구투여 시 Rb1, Rb2는 위액에 의해 극소량이 oxygenation되는 외에 대체로 분해되기 어렵고(Karikura *et al.*, 1991) 장내에서의 생물학적 이용가능성은 Rb1이 0.1-4.4%, Rb2가 3.7%, Rg1이 1.9%-18.4%로 대부분은 소변을 통해 체외로 배출되어(Takino *et al.*, 1994; Tanizawa *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 2003) major 사포닌의 생체 내에서의 흡수는 아주 미비하다. 따라서 기존에 많이 존재하는 major사포닌을 상대적으로 잘 흡수될 수 있고 약효도 더 우월한 minor사포닌으로의 전환연구가 국내외에서 활발히 진행되고 있다. 인삼사포닌의 전환연구는 산처리(Han *et al.*, 1982), 염기처리(Im *et al.*, 1995), 열처리(Park *et al.*, 2004), 및 효소처리(Yu *et al.*, 2002; Ko *et al.*, 2003a, 2003b)에 의한 여러 가지 전환방법이 있지만 효소에 의한 전환이 다른 방법에 비해 비교적 온화한 조건에서 진행되고 효소의 기질특이성으로 특정사포닌의 생산이 가능하여 가장 많은 연구가 이루어졌으며(Chi *et al.*, 2005; Chi *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001) 그중, 미생물 효소를 이용한 minor 사포닌 전환 연구는 국내 연구가 전 세계에서 가장 앞서있고 Rb1에서 Rd를 거쳐 사포닌 K로 전환되는 연구도 국내에서 이루어졌다 (Park *et al.* 2001, Hasegawa *et al.* 1996).

나. 국내외 관련기술의 문제점

미생물 효소를 이용한 minor 사포닌 전환 연구들은 미생물 효소의 이용 가능성을 확인하는 데에 그쳤다. 원하는 β -glucosidase 활성을 가지는 균주들의 분리가 장내세균에 제한되어서 대규모의 스크리닝이 전문적으로 이루어지지 않았다. 실제로 토양이나 김치에

존재하는 젓산균과 그 외의 세균에서도 β -glucosidase 활성이 많이 나타나고 있다. 아직 이용 가능한 균주들이 묻혀있는 상태라고 할 수 있다. 더구나, Rb1을 Rg3로 전환하는 연구는 아직 발표된 바가 없어서 연구의 진행이 요구되고 있다.

2. 앞으로의 전망

본 연구를 추진하는 경희대학교와 KAIST의 전문 미생물 분리팀은 앞으로 다양한 종류의 β -glucosidase 생산 균주의 분리가 계속 이루어질 것이며, 이 중에서 β -glucosidase의 활성 정도와 효소 다양성에 따라서 원하는 기질 특이성을 가지는 효소의 선택이 가능할 것으로 전망되어 진다. 또한 vector 재조합기술을 이용하여 원하는 사포닌전환효소를 저렴한 가격으로 대량생산하여 고부가가치 인삼제품의 산업화를 추진하고 인삼 산업의 시장을 넓혀줄 수 있고, 나아가 인삼종주국으로서의 한국의 위상을 굳건히 하게 될 것이다.

3. 기술도입의 타당성

가. 미생물 효소에 의한 인삼사포닌의 전환연구, 특히 compound K에 대한 연구 및 사포닌 전환효소의 분리 동정 연구는 국내에서 이미 많이 이루어졌다.

나. “인삼근권 토양미생물을 이용한 인삼 생리활성물질 ginsenoside Rg3의 생산에 관한 연구”는 비록 처음 시도하는 연구이지만 본 연구실은 지금까지 인삼 성분과 유전자에 대한 연구를 수행해 왔고 사포닌 추출과 사포닌 전환 이후 분석에 대한 충분한 노하우가 있으며 KAIST의 환경 및 응용미생물연구실 (지도교수: 이성택)의 위탁연구를 통해 충분한 수의 미생물 균주 screening이 이루어질 것으로 예상되며 이 중에서 원하는 광범위한 기질 특이성과 목표 사포닌으로의 완전한 전환 활성을 갖는 균주를 선별하는 것이 가능하다고 여겨진다.

다. 미생물 효소를 이용한 인삼사포닌의 전환기술은 결코 어려운 것이 아니며, 균주의 충분한 스크리닝이 가장 크게 요구된다. 지금 한국의 생명과학기술로서 충분히 가능하며 현재 한국의 연구 결과가 전 세계적으로 가장 앞서고 있으므로 외국의 기술도입이 없이 경

희대학교 연구실과 KAIST의 연구실의 시설과 지금까지 쌓은 노하우로 실험을 수행하였다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 서 론

전 세계적으로 경제가 발전하고 국민소득이 증가함에 따라 건강증진에 관심을 모으고 있는 사람들이 점점 많아지고 있다. 인삼은 2000년 전부터 신비의 영약으로 동아시아 국가에서 광범위하게 사용되어 왔으며 지금은 아메리카, 유럽, 오세아니아(대양주) 등 여러지역에서도 널리 재배되고 인삼제품까지 많이 출시되고 있다. 인삼은 중추신경계에 대한 작용, 뇌기능 항진작용, 항발암작용과 항암작용, 항당뇨작용, 면역기능 조절작용, 간기능 항진작용, 심혈관 장애개선 및 항동맥경화작용, 혈압조절작용, 항스트레스 및 항피로작용, 항위궤양 및 항염증작용 등(남기열 등 1996) 많은 약리활성을 나타낸다. 1967년 소련의 약리학자인 Brekman에 의해 인삼사포닌이 인삼의 주요약효성분이라는 것을 제시한 이래 인삼사포닌에 대한 연구가 본격적으로 진행이 되었고 특히 최근에는 인삼의 약효는 major사포닌이 분해되어 생성된 minor사포닌에 기인한다는 사실이 밝혀지면서 major사포닌으로부터 minor사포닌으로의 전환연구가 활발히 진행되고 있다.

Minor 사포닌 Rg3는 major 사포닌Rb1, Rb2, Rc, Rd의 20번 위치의 당이 완전히 가수분해되면서 생성된 sapogenin으로서 최초 홍삼에서 분리 되었다. Rg3는 major 사포닌이 가지지 못했던 뛰어난 항암, 항암전이, 치매, 면역증강, 항피로 등 효과를 가진다. 마우스 내에서 tumer cell의 metastasis를 저해하고, in vitro에서 tumer cell의 invasion을 저해하며 (Mochizuki et al. 1995, Shinkai et al. 1996), 암세포 apoptosis 유발 효과 (Liu et al. 2000), 신경세포의 치매 억제 효과 (Kim et al. 1998), 혈관 확장을 통한 혈압 강하 (Kim et al. 1999; kim et al., 2003), catecholamine 분비 억제로 인한 신경안정제 효과 (Tachikawa et al. 2001, 1999), 진통제 활성화 (Rhim et al. 2002), 면역증강(Wang et al., 2005)등 활성이 보고되고 있다. Ginsenoside Rg3는 지금까지 주로 산이나 열처리에 의해 생산되었지만 사포닌전환에 많이 쓰이는 효소에 의한 생산은 아직 연구되지 않았다. 본 연구는 ginsenoside Rg3를 생산할 수 있는 효소에 target를 두고 인삼근권 토양미생물로부터 β -glucosidase 분비미생물을 screening하여 인삼사포닌 전환능력, 특히 ginsenoside Rg3로의 전환능력이 있는 균주를 선발하고 효소를 분리하여 최종적으로 Rg3 고함유 인삼제품의 생산을 시도하였다.

제 2 절 전환대상 사포닌 결정 및 사포닌 전환효소 type 탐색

1. 연구대상 사포닌 결정

인삼이 포함하고 있는 ginsenoside는 약 50여종에 이르며 그중 일반적으로 가장 많은 양을 차지하고 있는 사포닌은 protopanaxadiol계 사포닌인 Rb1, Rb2, Rc, Rd 및 protopanaxatriol계 사포닌인 Rg1과 Re 등 6종 사포닌이다. 인삼사포닌은 인삼의 재배 지역, 연근, 인삼사포닌의 추출방법 등에 따라 다소 차이가 있지만 대체로 유사한 양상을 나타냈다. 인삼뿌리에서 protopanaxadiol계 사포닌 Rb1, Rb2, Rc, Rd중 사포닌의 함량은 Rd (0.15%), Rb2 (0.34%), Rc (0.35%), Rb1 (0.63%)순으로 함량이 많이 존재하고 protopanaxatriol계 사포닌 Rg1과 Re중 Rg1 (0.40%)의 함량이 Re (0.35%) 보다 약간 많이 존재한다(김석창 등 1987). 본 연구는 “인삼근권 토양미생물을 이용한 인삼 생리활성물질 ginsenoside Rg3의 생산에 관한 연구”로서 protopanaxadiol계중에서 함량이 가장 많고 Rg3, Rh2, compound K로의 전환이 모두 가능한 Rb1(Fig. 1)을 실험 대상으로 선정하였다.

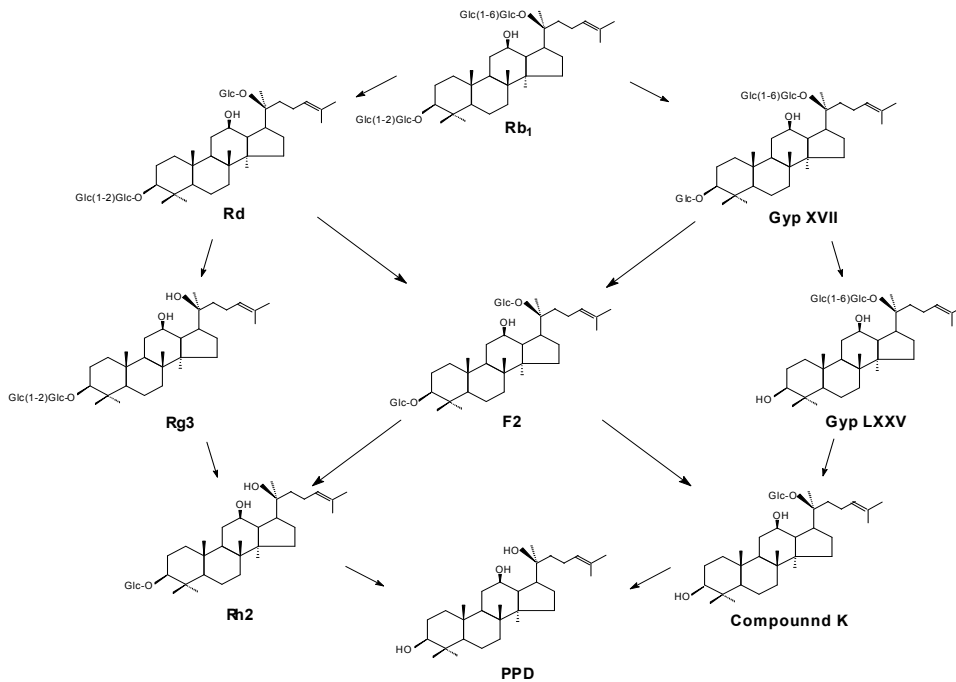
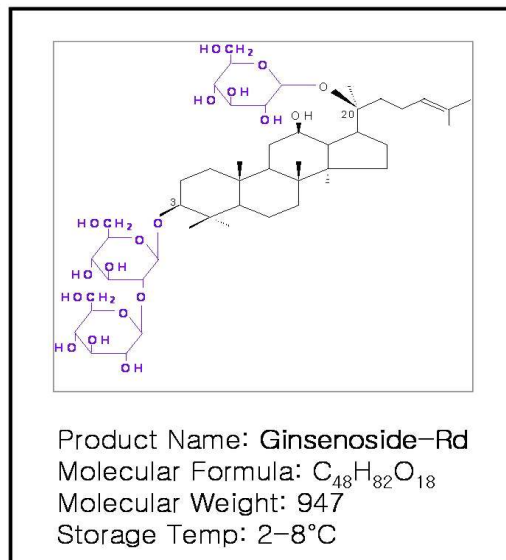
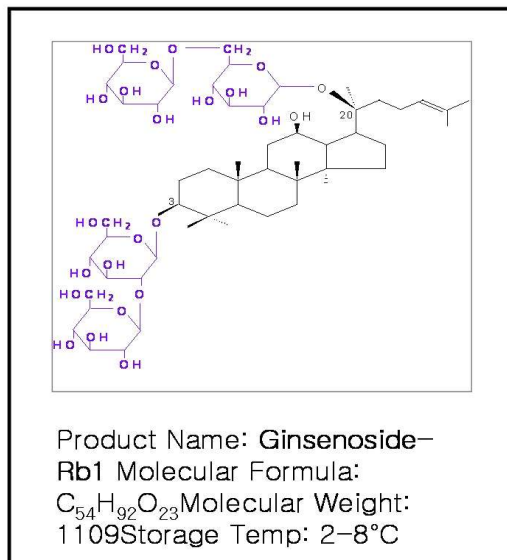
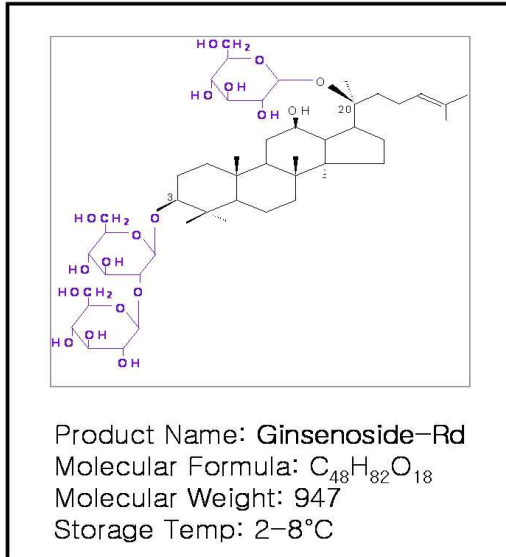
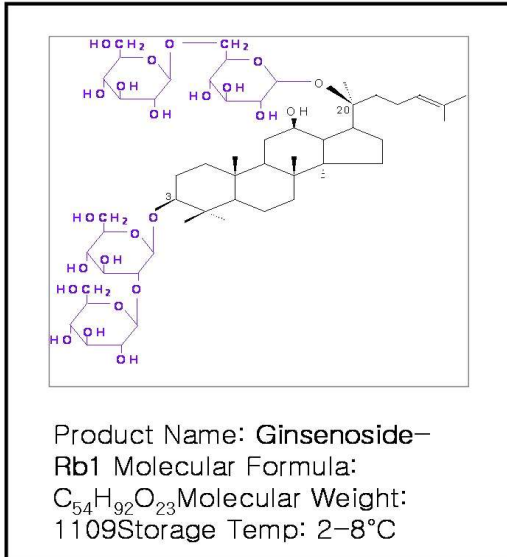


Fig. 1. Transformation pathway of ginsenoside Rb1 to protopanaxadiols.

Ginsenoside Rb1 및 주요전환 산물의 화학구조식과 분자식, 분자량은 Fig. 2에 표시하였다.



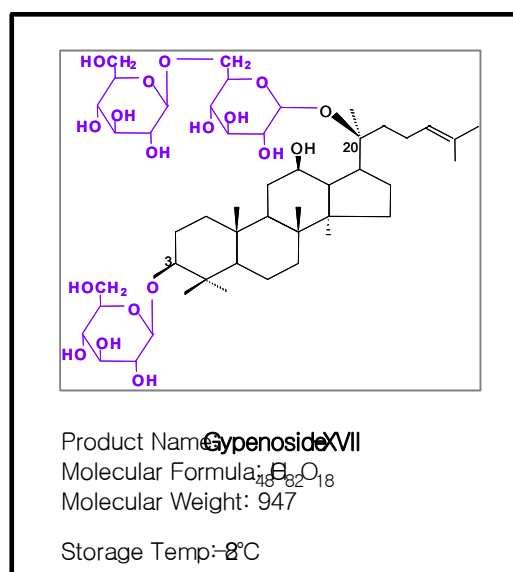
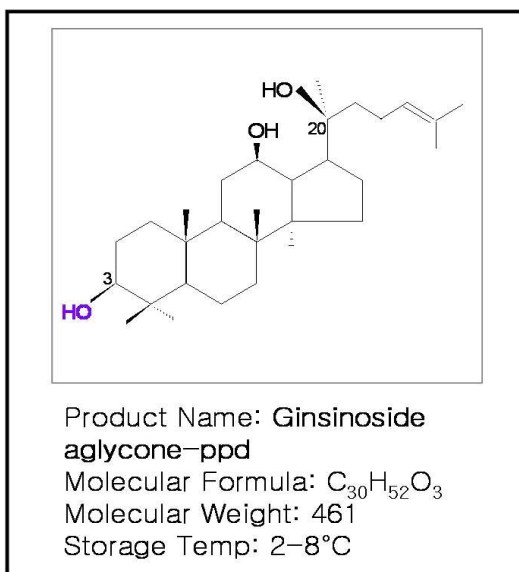
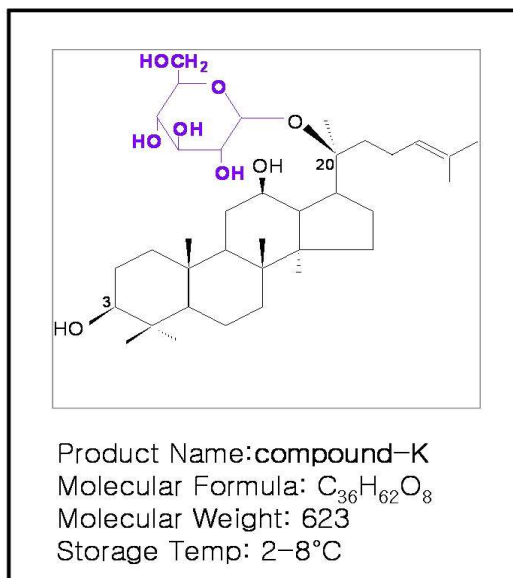
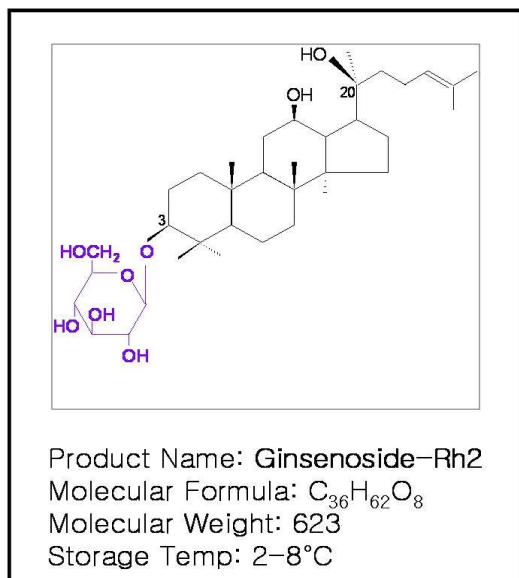


Fig. 2 The structure, molecular formula and molecular weight of ginsenoside Rb1 and main metabolites.

2. 효율적인 사포닌 추출방법 모색

인삼사포닌은 triterpenoid계의 dammarane계 사포닌으로 aglycone부분에 glucose, arabinose, xylose, rhamnose등 당이 결합되어 생성된 배당체로서 물이나 극성이 비교적 강한 에탄올, 메탄올에 잘 용해한다. 따라서 인삼사포닌의 추출에는 물, 에탄올, 메탄올, 부탄올 등 용매가 많이 사용되는데 추출과정에서 가열여부에 따라 상온추출(신지영 등 2001)과 가열추출(신지영 등 2001; 성종환 등 1985, 1986); 추출용매에 따라 물추출(주현규 등 1979; 성종환 한국식품영양과학회지등 1985), 에탄올추출(성종환 등 1985a, 1985b; 고성룡 등 1992), 메탄올추출(신지영 등 2001); 기기사용에 따라 초음파추출(Wu *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2006), 마이크로과추출(이세봄 등 1999; 권증호 등 1999), 초임계추출(오상오 등, 1989)과 Waring blender를 이용한 인삼사포닌화합물의 추출(곽이성 등 1997); 조사포닌 조제방법에 따라 부탄올추출(Shibata *et al.*, 1966), HP-20흡착법(김시관 등 1998; 김천석 등 1998; 신지영 등 2001), AG-50W흡착법(신지영 등 2001) 등 여러 가지 방법이 정립되어 보고되었다.

초음파추출, 마이크로과추출 및 초임계추출 방법은 기기원인과 단가 등의 원인으로 인하여 인삼사포닌의 대량 추출에는 사용하지 않고 물추출은 알코올추출에 비해 더 많은 양의 추출물을 얻을 수 있지만 사포닌 함량이 떨어진다. 따라서 인삼사포닌의 추출에는 에탄올 혹은 메탄올을 이용한 환류추출이 가장 많이 사용되는데 에탄올이나 메탄올 추출물에는 사포닌외의 기타성분 즉 유리당, 단백질, 아미노산, 지용성성분 등 여러 가지 잡 물질들이 상당량 포함되어 있어 에테르나 헥산으로 지용성물질과 같은 저극성 물질들을 추출한 후 다시 부탄올추출 혹은 HP-20수지 흡착법에 의해 조사포닌을 조제하고 최종으로 column을 이용하여 단일사포닌으로 분리한다. 본 연구에서는 부탄올추출과 HP-20수지 흡착법에 의한 조사포닌의 조제비교를 통해 효율적인 인삼사포닌 추출방법을 선정하였다.

부탄올추출과 HP-20흡착에 의한 인삼사포닌의 추출과정은 주로 Fig. 3과 같은 방법으로 진행한다. Fig. 3의 A는 부탄올추출에 의한 조사포닌의 조제방법이고 B는 HP-20수지에 의한 조사포닌의 조제방법이다.

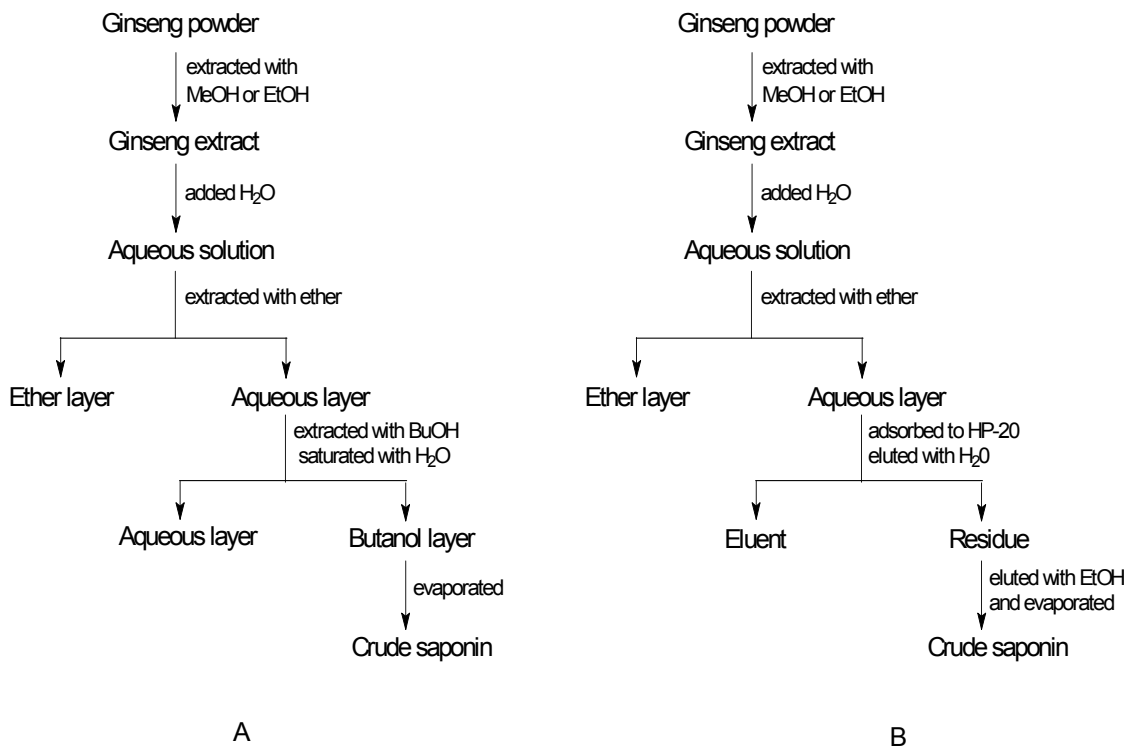


Fig. 3. Schematic representation for extraction of crude ginseng saponin (A: by BuOH extraction, B: by Diaion HP-20 adsorption).

부탄올추출과 HP-20수지 흡착법은 모두 인삼으로부터 메탄올이나 에탄올로 환류추출을 통해 인삼사포닌을 일차적으로 추출하고 감압 농축하여 엑기스를 조제한 후 다시 물에 용해시켜 에테르나 헥산으로 탈지 시킨다. 부탄올추출법은 탈지 시킨 인삼엑기스 수용액을 수포화부탄올로 반복 추출하여 조사포닌을 조제하지만 HP-20수지 흡착법은 인삼엑기스수용액을 HP-20수지에 흡착시켜 먼저 물로 elution하여 당과 같은 극성이 인삼사포닌보다 큰 물질들을 먼저 제거한 후 에탄올의 농도를 증가시키면서 elution하여 인삼사포닌을 triol계사포닌, diol계사포닌 순으로 분리하고 최종적으로 부탄올방법과 같은 방법으로 silica gel 칼럼 혹은 C18칼럼을 이용하여 단일사포닌을 분리 정제 한다.

인삼사포닌의 추출에 있어서 부탄올추출과 HP-20흡착법은 아래와 같은 특징을 갖고 있

다(Table 1).

Table 1. Comparison of extraction by butanol and adsorption of Diaion HP-20

부탄올추출법	HP-20수지 흡착법
조사포닌 수율은 높지만 순도가 떨어진다.	조사포닌 수율은 다소 떨어지지만 순도가 상대적으로 높다.
단백질, 유리아미노산의 함량이 비교적 상대적으로 낮다.	단백질, 유리아미노산의 함량이 상대적으로 높다.
유리당의 함량은 HP-20방법에 비해 40배 높다.	유리당이 거의 제거된다.
농축이 불완전하고 분말화하기가 어렵다.	사포닌 농축이 간편하고 분말화가 용이하다.
식용 혹은 약용으로 직접 이용할 수 없다.	식용 혹은 약용으로 직접 이용할 수 있다.

Diaion HP-20 흡착법은 부탄올추출법에 비해 조사포닌 수율이 다소 떨어지지만 사포닌 순도가 높고 농축이 간편하여 본 연구에서는 Diaion HP-20 흡착법에 의한 조사포닌 조제 방법을 선정하였다. 즉 메탄올이나 알코올에 의해 추출된 인삼엑기스를 에테르로 탈지시킨 후 증류수에 용해시켜 ethyl acetate로 극성이 낮은 사포닌을 따로 추출하고 극성이 높은 Rb1이 들어있는 물분획을 HP-20수지에 흡착시켜 알코올 농도별로 elution한 후 ptotopanaxatriol계 사포닌 Re와 Rg1이 제거된 Rb1분획을 다시 silica gel 칼럼을 이용하여 순수 분리하였다.

3. 사포닌전환효소 type 탐색

인삼사포닌 전환능력이 있는 균주의 탐색을 효율화하기 위하여 시중에 판매되는 효소를 사용하여 Rb1을 대상으로 예비실험을 진행하였다. 효소는 SIGMA사의 β -galactosidase, α -glucosidase, β -glucosidase를 이용하였고 table 2와 같은 조건으로 반응을 수행하였다.

Table 2. The reaction condition of enzyme on the market

효 소	unit	PH	반응온도	반응시간	buffer 조성
α -glucosidase	1	7.0	30℃	1시간	sodium phosphate
β -glucosidase	1	7.0	30℃	1시간	sodium phosphate
β -galactosidase	1	7.0	30℃	1시간	sodium phosphate

반응혼합물은 수포화부탄올로 추출한 후 40℃에서 감압농축하고 잔유물은 메탄올에 용해시켜 TLC에 점적하고 CHCl₃/MeOH/H₂O 혼합용매(65:35:10, v/v/v, 하층)로 5 cm 전개한 후 10% 황산을 분무하여 가열하는 방법으로 발색 시켰다 (Fig. 4).

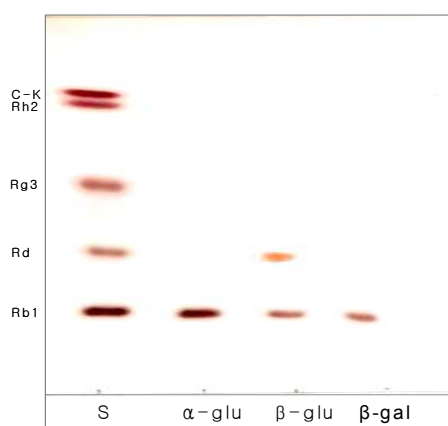


Fig. 4. TLC analysis of reaction between ginsenoside Rb1 and enzyme on the market.

실험결과 α -glucosidase, β -galactosidase 에서는 아무런 반응이 나타나지 않았고 β -glucosidase에서만 반응을 보였으면 반응 산물을 standard Rb1, Rd, Rg3, Rh2, Compound K와 비교분석한 결과 ginsenoside Rd로 확인되었다(Fig. 4). 따라서 균주 스크리닝을 β -glucosidase 발현 미생물에 초점을 두고 진행하였다.

제 3 절 사포닌 전환 미생물 선별

1. 토양 및 김치 시료로부터 β -glucosidase 분비 미생물 분리 및 동정

가. 재료 및 방법

1) Esculin Agar를 이용한 β -glucosidase 분비 미생물의 선별 원리

인삼근권 토양 및 김치에서의 β -glucosidase 분비 미생물의 분리는 table 3과 같은 esculin이 들어있는 agar plate를 이용하여 분리하였다(Atlas, 1993).

Table 3. The component and contents of esculin agar medium

Contents	Amount/L
Pancreatic digest of casein (Casamino acids)	13g
NaCl	5g
Yeast Extract	5g
Heart muscle, solids from infusion	2g
Esculin	1g
Ferric citrate	0.5g
Agar	15g

Esculin은 미생물이 분비하는 β -glucosidase에 의해 glucose와 esculetin으로 가수분해된다. 분해된 esculetin은 철이온과 반응하여 Fig. 5와 같이 colony 주위에 black complex를 형성하는데 검게 보이는 colony들만 선택하여 인삼사포닌의 전환실험에 사용하였다.

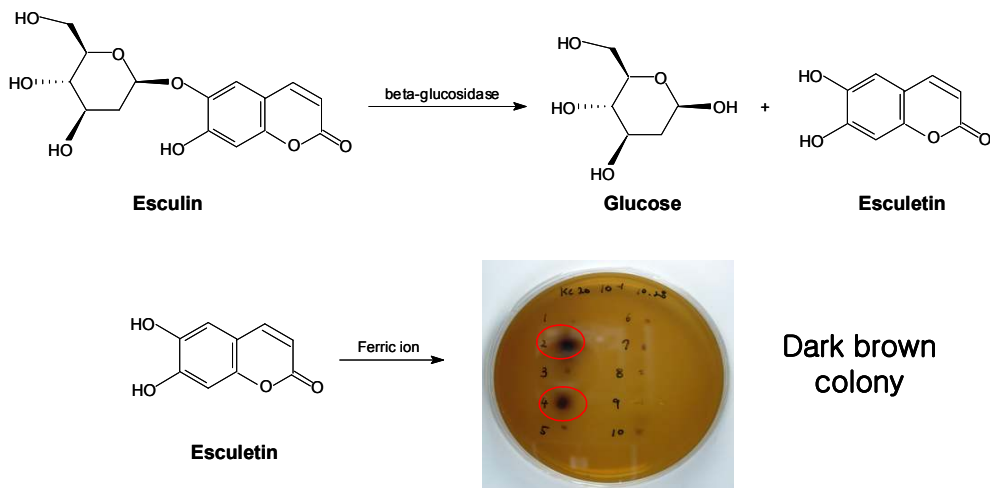


Fig. 5. The principle of esculin method.

2) β -glucosidase 분비 미생물의 분리방법

인삼근권의 토양은 경기도 연천 인삼밭에서 취하여 polyethylene vinyl bag에 넣은 후 실험실로 운반하였다. 시료는 4°C에서 보존하면서 6시간 이내에 실험되었다. 멸균수를 이용하여 $10^{-3} \sim 10^{-7}$ serial dilution 한 시료를 esculin agar plate에 spreading 하여 28°C에서 배양하였다. Black complex를 형성한 single colony들은 R2A agar plate에서 같은 조건에서 순수배양 될 때까지 계대 배양하였다.

유산균 분리를 위해 시료로 사용된 김치는 약 100여 종으로, 서울을 비롯한 경기, 충북, 충남, 경북, 전남 지역 등 전국 각지에서 배추김치, 총각김치, 깍두기, 열무김치, 갓김치 등 지역별·종류별로 다양하게 수집하였다. 김치 시료의 국물을 원심분리 하여 얻은 상등액은 멸균수를 이용하여 $10^{-1} \sim 10^{-3}$ 까지 serial dilution하여 유산균 분리에 적합한 MRS agar plate에 100 μ l씩 spreading 한 후 37°C incubator에서 48시간 배양하였다. Serial dilution한 김치 시료 각각의 MRS plate에 나타난 서로 다른 single colony를 10개씩 선택하여 멸균된 이쑤시개로 selection 후 esculin agar plate에 옮겨 색깔의 변화를 관찰하였다. Black complex를 형성한 single colony들을 MRS agar plate에서 같은 조건으로 순수 배양 될 때까지 계대 배양하였다. 최종적으로 순수배양 된 β -glucosidase 분비 균주들을 esculin agar plate에 streaking 함으로써 β -glucosidase 분비 능력을 다시 한 번 확인한

후 15% glycerol stock solution을 만들어 급속 냉각시켜 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 deep freezer에 보관하였다.

3) Polyphasic taxonomy를 이용한 β -glucosidase 분비 미생물의 동정방법

(1) DNA의 추출

Chromosomal DNA의 분리는 CoreOne bacterial DNA extraction kit (Coretech. Co. Ltd. Korea)을 이용하여 수행하였다. Plate에서 순수 배양된 균주를 1.5 ml tube에 현탁하여 일회 세척 후 사용하였다. 추출한 DNA는 전기영동으로 확인하였다.

(2) 16S rDNA의 PCR 증폭

(가) 16S rDNA 증폭을 위해서, Primer 9F(5'-GAGTTTGATCCTGGC TCAG-3')와 1512R(5'-ACGG(H)TACCTTGTTACGACTT-3'), Pre-Mix(Taq-polymerase + dNTP + 10X reaction buffer), 증류수를 사용하였다. 각 물질의 조성과 함량은 table 4에 나타냈다.

Table 4. The composition and contents of PCR materials

재료		양
Pre-Mix	Taq-polymerase(5 units/ μl)	2 units(0.4 μl)
	10 mM dNTP(2.5 mM/each)	5 μl
	10X reaction buffer	5 μl
Primers	9F(10 pmol/ μl)	5 μl
	1512R(10 pmol/ μl)	5 μl
Template DNA(10 ng/ml)		1-5 μm
증류수		25-29 μm

(나) Pre-Mix를 10 μl , Primer를 10 μl , Template DNA를 1-5 μl , 증류수를 31-35 μl 를 넣어서 총 부피를 50 μl 으로 맞춰준다.

(다) (나)에서 준비된 용액을 Programmable Thermal Controller (MJ Research Inc., USA)에서 증폭한다. 이 때 시행해야 할 cycle의 setting은 다음과 같다(Table 5).

Table 5. Cycle setting of PCR

과 정	온 도(°C)	시 간	
Pre-denaturation	94	5분	
Denaturation	94	1분	33 cycl e
Annealing	60	1분	
Polymerimerization	72	1분 30초	
Last Polymerization	72	7분	
Store	8	∞	

PCR로 증폭된 16S rDNA는 1% agarose gel에 전기영동을 하여 확인하였다.

(3) DNA 정제

DNA 정제를 위해서, PCR Purification Kit(Bioneer, Korea)을 이용하였다.

(4) 16s rDNA 염기서열 분석

DNA Purification을 통해 정제된 16s rDNA의 염기서열은 ABI Prism BigDye Terminator cycle sequencing ready reaction kit(Applied Biosystems)와 Automatic DNA sequencer(model 3700, Applied Biosystems)을 이용하여 분석하였다.

(5) 계통도 작성

GeneBank에 있는 자료를 이용하여 분리된 균주의 가장 가까운 type strain을 결정하였다. 분리된 균주의 계통수를 그리기 위해서, 균주들의 16S rDNA 염기서열을 Clustal X program (Thompson *et al*, 1994)을 이용하여 일정하게 정렬하였다. 염기서열을 정렬한 다음 생길 수 있는 Gap은 BioEdit program (Hall *et al*, 1999)을 이용하여 삭제하고 편집하였다. 균주들의 진화과정을 추적하는 작업은 Kimura two-parameter model (Kumar *et al*, 2001)을 이용하였고, MEGA 2 Program (Kimura *et al*, 1983)의 neighbor-joining 방법으로 환경토양과 김치로부터 분리된 β -glucosidase 분비 균주의 계통분류학적 위치를 결정하였다(Fig. 6).

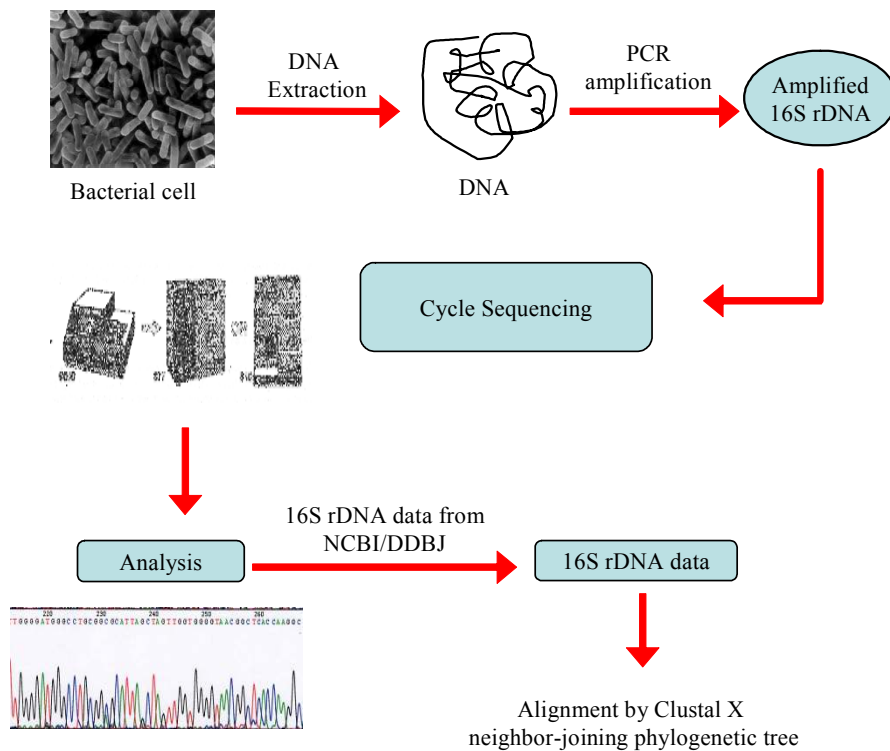


Fig. 6. The pathway of analyzing of 16S rDNA.

(6) Genomic DNA의 G + C mol% 측정

Genomic DNA는 Nuclease P1으로 분해하여 phosphatase처리를 하여 HPLC 방법으로 측정하였다.

(7) Whole cell fatty acid (총균 지방산 측정) 측정

총균 지방산 측정은 상용적으로 쓰이는 MIDI (Microbial Identification system)을 사용하였다.

(8) Quinone 분석

Chloroform과 methanol 혼합용액으로 전체 지방을 추출한 후, TLC에서 원하는 지질 (Ubiquinone 또는 Menaquinone)을 분리하여 굵어낸 후 HPLC로 측정하여 분석하였다.

(9) Peptidoglycan 아미노산 분석

Cell-wall을 부분 가수분해하여 생성된 아미노산을 TLC에 전개하여 standard와 비교하여 분석하였다.

(10) DNA-DNA hybridization test

Probe DNA에 photobiotin을 반응시킨 것과 96well 바닥에 붙은 target DNA의 붙는 정도를 streptavidin과 biotin의 특이성 결합 성질을 이용한 형광기질 발광반응을 이용한 방법을 이용하였다.

(11) 기질 테스트 및 각종 분류에 필요한 테스트

기질 test는 API 20NE 및 API ID 32GN 스트립 테스트나 일반미생물실험서에 있는 기본적인 방법을 이용하여 실험하였다.

나. 결과 및 고찰

1). Polyphasic taxonomy를 이용한 β -glucosidase 분비 미생물의 동정결과

본 연구에서는 인삼근권 토양으로부터 1차적으로 β -glucosidase 분비 미생물을 758개 screening하였고 그 중에서 β -glucosidase 분비 능력을 다시 한번 체크하여 최종적으로 211개 균주(1차년도 100주, 2차년도 111주)를 확보하였으며, 각종 김치로부터도 100개 이상의 β -glucosidase 분비 균주를 선발하였다(Table 6). 확보된 β -glucosidase분비 세균들의 DNA 추출, PCR 증폭 및 16S rDNA 염기서열 분석을 통하여 GeneBank에 있는 database와 계통학적 위치를 확인한 결과 인삼 근권 토양으로부터 분리한 균주들의 경우 8개의 주요한 계통군: *Proteobacteria* α -subdivision (28균주), *proteobacteria* β -subdivision (10균주), *proteobacteria* γ -subdivision (24균주), *Actinobacteria* (88균주), *Firmicutes* (28균주), *Bacteroidetes* (2균주)와 *Deinococcus-Thermus* (1균주) 등을 발견하였고, 신종인 *Sphingopyrix granuli* (1균주)도 발견되었다. 이외의 29개 균주는 아직 미 동정 상태이다.

동정되지 않은 29개의 균주를 제외한 182개 균주들의 16s rDNA 염기서열의 계통학적 위치를 확인한 결과, 52개 균주가 데이터베이스화된 참조균주와 90~97%의 상동성을 나타내어 신종 혹은 신속으로 제안하고 이들 균주 중 일부 균주들에 대한 세균학적 특성을 규명하여 분류학적 위치를 결정하였다.

또한 김치로부터 분리된 유산균 127개의 16S rDNA 염기서열 분석을 통하여 GeneBank에 있는 database와 계통학적 위치를 확인한 결과, *Lactobacillus* 속에 속하는 균주들이 가장 많았으며 (56%), 그 다음으로 *Leuconostoc* (25%), *Weissella* (10%), *Pediococcus* (4%), *Bacillus* (4%), *Arthrobacter* (1%) 순으로 분포되어 있음을 알 수 있었다 (Fig. 7).

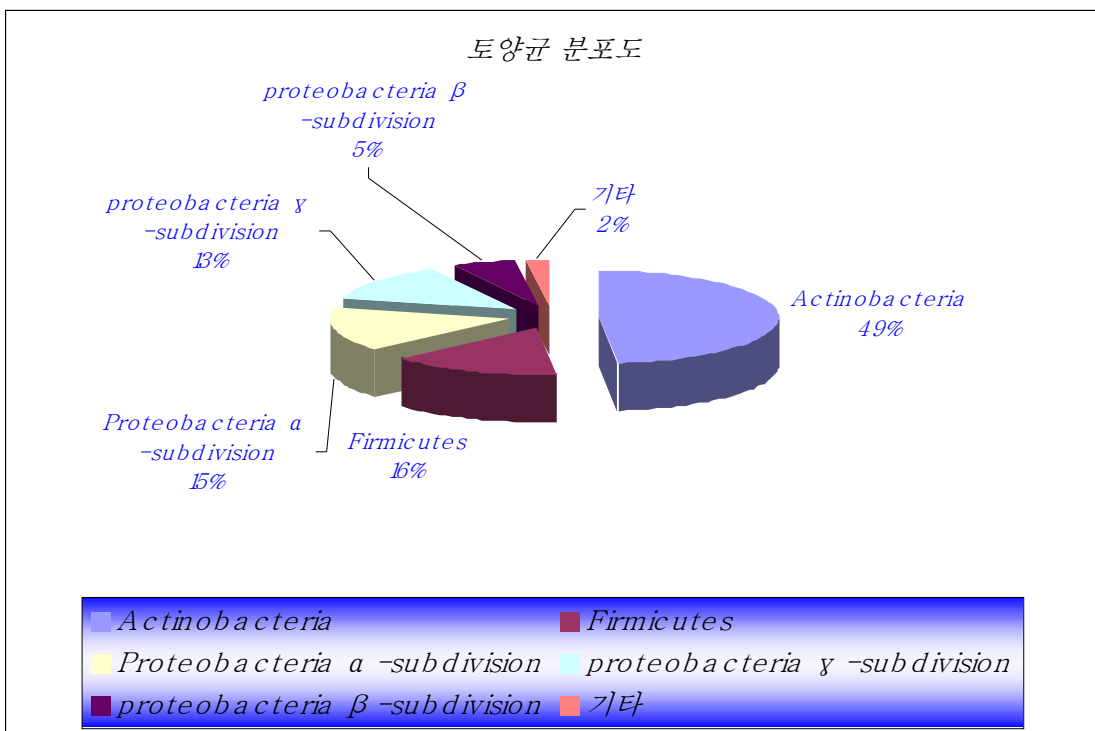


Fig. 7. Distribution of bacteria presented in ginseng soil.

또한 김치로부터 분리된 유산균 155개의 16S rDNA 염기서열 분석을 통하여 GeneBank에 있는 database와 계통학적 위치를 확인한 결과, *Lactobacillus* 속에 속하는 균주들이 가장 많았으며 (54%), 그 다음으로 *Leuconostoc* (27%), *Weissella* (11%), *Bacillus* (2%),

Pediococcus (1%), 기타 (5%) 순으로 분포되어 있음을 알 수 있었다 (Fig. 8).

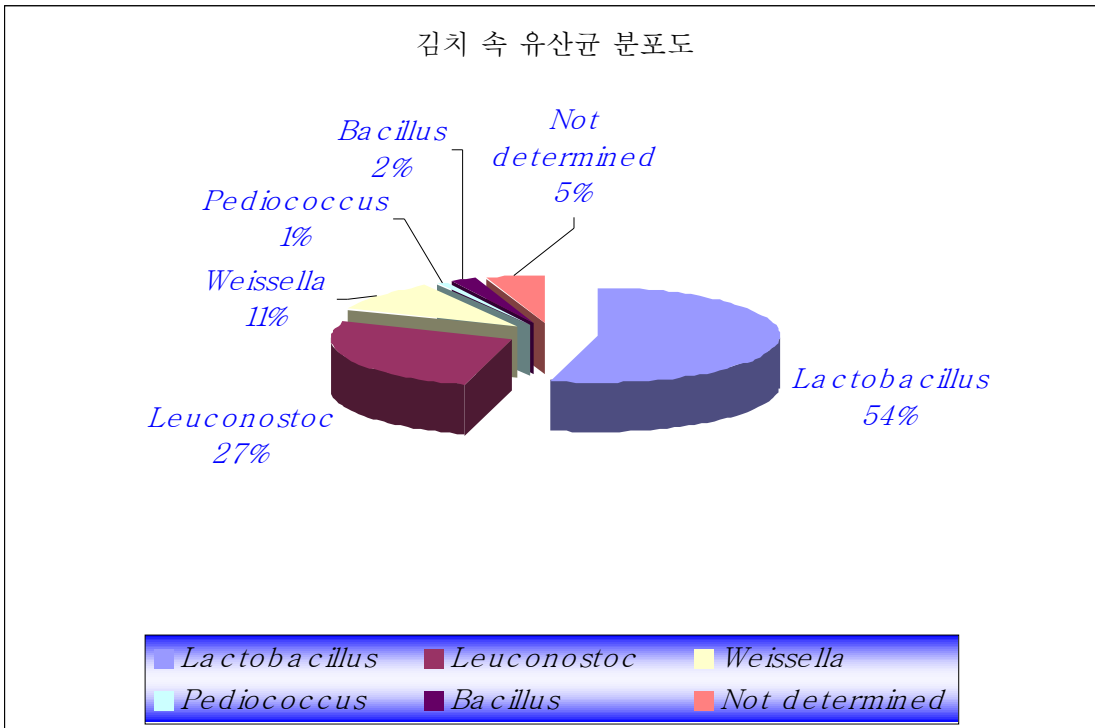


Fig. 8. Distribution of lactic acid producing bacteria presented in Kimchi.

Table 6. The list of β -glucosidase bacteria isolated from ginseng field.

	year	No	Sample Name	Blast search result high score	Similarity (%)
				cultured strain	
Soil bacteria	First year	1	FS6(2)	<i>Serratia fonticola</i> DSM 4576T	97.2
		2	FS6(6)	<i>Paenibacillus glycanilyticus</i> DS-1T	99.3
		3	FS5(4)	Not determined	
		4	FS5(2)	Not determined	
		5	FS5(7)	<i>Microbacterium resistens</i> DMMZ 1710T	98.0
		6	FS4(1)-a	<i>Bacillus subtilis</i> IAM 12118T	99.9

7	FS4(1)-b	<i>Buttiauxella izardii</i> DSM 9397	98.8
8	FS4(1)-b(1)	<i>Streptomyces galbus</i> DSM40089	97.6
9	FS4(1)-c-b	Not determined	
10	FS4(4)	Not determined	
11	EM6(1)	<i>Bacillus megaterium</i> IAM 13418T	99.2
12	EM6(2)-b	<i>Streptomyces lincolnensis</i> NRRL2936T	96.3
13	EM6(6)-a	<i>Paenibacillus kobensis</i> DSM 10249T	98.9
14	EM6(6)-b	<i>Paenibacillus kobensis</i> DSM 10249T	98.9
15	EM6(6)-c-1	<i>Paenibacillus kobensis</i> DSM 10249T	98.9
16	EM3(2)-a	<i>Burkholderia stabilis</i> LMG 14294T	99.7
17	EM4(1)	<i>Bacillus simplex</i> DSM1321T	99.8
18	EM4(2)	<i>Bacillus</i> sp. Fa29	99.8
19	EM5(2)-a	<i>Streptomyces lincolnensis</i> NRRL2936T	98.2
20	EM5(5)-b	<i>Paenibacillus naphthalenovorans</i> PR-N1T	91.1
21	EM5(6)-a	<i>Paenibacillus naphthalenovorans</i> PR-N1T	91.0
22	DL6(1)	<i>Terrabacter tumescens</i> DSM 20308T	99.1
23	DL6(4)	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> G2-1	99.0
24	DL6(6)	<i>Paenibacillus kobensis</i> DSM 10249T	97.9
25	DL6(6)-1	<i>Streptomyces nodosus</i> ATCC 14899T	97.5
26	DL5(4)	<i>Buttiauxella izardii</i> DSM 9397T	99.0
27	DL3(2)-a	<i>Bacillus megaterium</i> IAM 13418T	99.8
28	DL3(2)-b	<i>Terrabacter tumescens</i> DSM 20308T	98.7
29	BB4(1)-a	<i>Paenibacillus macerans</i> IAM 12467T	97.4
30	BB4(3)	<i>Streptomyces tauricus</i> JCM 4837T	98.4
31	BB4(4)-b-1	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> JCM 9906T	98.8
32	BB4(4)-b-2	<i>Paenibacillus pabuli</i> HSCC 492T	99.2
33	BB4(1)-b	<i>Frateuria aurantia</i> IFO 3245T	96.2
34	BB5(8)	<i>Arthrobacter methylotrophus</i> DSM 14008	98.9
35	BB5(7)	<i>Streptomyces bikiniensis</i> DSM40581T	96.8
36	BB5(5)	<i>Streptomyces tauricus</i> JCM 4837T	99.1
37	BB3	<i>Enterobacter asburiae</i> JCM6051T	98.9
38	BB6(1)	<i>Streptomyces galilaeus</i> JCM 4757T	98.5
39	BB6(2)	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> DSM 40451T	99.7

40	DB5(3)	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> JCM 9906T	98.9
41	DB4(1)	Not determined	
42	DB5(1)	<i>Cellulomonas flavigena</i> DSM 20109T	97.8
43	BT1	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i> GTC 868T	98.6
44	BT2	<i>Sphingomonas stygialis</i> SMCC B0712T	97.8
45	BT3	<i>Caulobacter leidyia</i> ATCC 15260T	100
46	BT4	<i>Sphingomonas echinoides</i> DSM 1805-T	99.6
47	BT5	<i>Sphingomonas echinoides</i> ATCC 14820T	99.7
48	BT7	<i>Sphingomonas echinoides</i> ATCC 14820T	99.7
49	BT8	<i>Sphingomonas echinoides</i> DSM 1805-T	99.4
50	BT9	<i>Sphingomonas echinoides</i> DSM 1805-T	99.1
51	BT10	<i>Sphingomonas stygialis</i> SMCC B0712T	97.8
52	BT11	<i>Sphingomonas echinoides</i> DSM 1805-T	99.6
53	BT12	<i>Sphingomonas echinoides</i> DSM 1805-T	99.4
54	BT14	<i>Sphingomonas echinoides</i> DSM 1805-T	99.4
55	BT6(1)	<i>Enterobacter asburiae</i> JCM6051T	98.7
56	BT6(2)	<i>Enterobacter asburiae</i> JCM6051T	98.7
57	BT6(5)	Not determined	
58	BT4(1)	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> JCM 9906T	99.1
59	BT4(1)-b	<i>Escherichia vulneris</i> ATCC 33821T	98.6
60	BT4(2)	<i>Escherichia vulneris</i> ATCC 33821T	98.6
61	BT4(2)-a	Not determined	
62	BT4(4)-a	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> DSM 40451T	99.7
63	BT4(4)-b	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> DSM 13468T	99.9
64	BT4(6)-b	<i>Paenibacillus validus</i> JCM 9077T	96.9
65	BT5(2)-a	<i>Planococcus antarcticus</i> CMS 26T	91.5
66	BT5(4)-a	<i>Kluyvera cochleae</i> ATCC 51609T	98.1
67	BT5(2)	<i>Paenibacillus validus</i> JCM 9077T	96.7
69	BT5(5)	<i>Enterobacter asburiae</i> JCM6051T	98.4
70	BT5(6)-a	<i>Streptomyces tauricus</i> JCM 4837T	97.3
71	BT5(6)-b	<i>Enterobacter asburiae</i> JCM6051T	98.7
72	BT5(7)	<i>Enterobacter asburiae</i> JCM6051T	98.9
73	BT5(9)	Not determined	

		74	S5(1)	Bacillus megaterium KL-197	99.7
		75	S3(2)	Bacillus subtilis KL-077	97.3
		76	S5(2)	Pseudomonas nitroreducens IAM1439 T	99.3
		77	ADS1	Escherichia fergusonii ATCC 35469T	99.8
		78	ADS2	Bacillus megaterium KL-197T	100
		79	GC1	Sphingomonas echinoides ATCC 14820T	99.6
		80	WT1	Raoultella planticola ATCC 33558T	99.7
		81	WT2	Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae ATCC11296T	98.2
		82	WT6	Raoultella planticola ATCC 33558T	98.9
		83	WT7	Klebsiella pneumoniae JCM1662T	99.0
		84	T5-08	Arthrobacter gandensis R5812T	98.9
		85	TR6-04	Flavobacterium mizutaii ATCC 33299T	96.1
		86	TR6-07	Arthrobacter gandensis R5812T	99.7
		87	T7-06	Cellulomonas uda DSM 20107T	98.5
		88	T7-09	Pseudoxanthomonas broegbernensis B1616/1 T	98.2
		89	Jip08	Starkeya novella IAM12100T	98.7
		90	Jip07	Bosea thiooxidans DSM 9653T	98.8
		91	Kw07	Sphingopyrix granuli (신종)	100
		92	DaeR-4	Deinococcus indicus Wt/1aT	93.4
		93	A.Slu04	Rhizobium galegae NBIMTC 2246	97.2
		94	Jip14	Flavobacterium mizutaii DSM 11724T	90.4
		95	A.Slu09	Rhizobium huautlense strain SO2 T	97.5
		96	Jip02	Roseomonas gilardii strain ATCC 49956T	93.4
		97	Chim01	Pseudomonas stutzeri strain DSM 5190T	99.5
		98	Ho-01	Sphingobacterium comitans	85.4
		99	BT6(9)	Cytophaga arvensicola IAM 12650T	95.6
		100	BT4(4)-c	Flexibacter sp. MDA2495	95.8
	second year	1	GS0157	Bradyrhizobium liaoningense LMG 18230 T	99.5
		2	GS0188	Brevibacterium epidermidis NCDO 2286 T	98.2
		3	GS0199	Streptomyces griseoaurantiacus DSM 40430T	99.8
		4	GS0203	Not determined	
		5	GS0206	Streptomyces griseoaurantiacus DSM 40430T	99.8
		6	GS0208	Streptomyces griseoaurantiacus DSM 40430T	99.8

7	GS0209	Not determined	
8	GS0216	Not determined	
9	GS0224	Streptomyces filipinensis NRRL 2437T	99.0
10	GS0229	Lentzea albida IFO16102 T	99.5
11	GS0235	Cellulosimicrobium cellulans	99.9
12	GS0240	Ochrobactrum tritici P61	100
13	GS318	Bradyrhizobium japonicum	99.8
14	GS334	Rhodanobacter lindaniclasticus	99.9
15	GS335	Dactylosporangium roseum DSM 43916T	99.6
16	GS341	Terrabacter tumescens DSM 20308T	98.6
17	GS342	Terrabacter tumescens DSM 20308T	97.5
18	GS404	Not determined	
19	GS405	Terrabacter tumescens DSM 20308T	99.3
20	GS413	Arthrobacter stackebrandtii CCM 2783T	96.1
21	GS414	Terrabacter tumescens DSM 20308T	98.8
22	GS442	Dermatophilus congolensis DSM 44180T	96.8
23	GS447	Dermatophilus congolensis DSM 44180T	96.8
24	GS461	Arthrobacter stackebrandtii CCM 2783T	96.1
25	GS462	Terrabacter tumescens DSM 20308T	98.0
26	GS464	Agreia pratensis P 229/10 T	96.5
27	GS505	Not determined	
28	GS506	Streptomyces lienomycini LMG 20091T	99.5
29	GS507	Bacillus luciferensis LMG 18422T	100
30	GS508	Microbacterium esteraromaticum DSM 8609T	99.0
31	GS510	Arthrobacter stackebrandtii CCM 2783T	96.1
32	GS513	Terrabacter tumescens DSM 20308T	98.8
33	GS514	Microbacterium esteraromaticum DSM 8609T	99.0
34	GS516	Streptomyces lienomycini LMG 20091T	99.5
35	GS519	Arthrobacter stackebrandtii CCM 2783T	96.1
36	GS520	Terrabacter tumescens DSM 20308T	98.8
37	GS521	Microbacterium esteraromaticum DSM 8609T	99.0
38	GS522	Streptomyces lienomycini LMG 20091T	99.5
39	GS529	Arthrobacter stackebrandtii CCM 2783T	95.6

40	GS537	<i>Kibdelosporangium aridum</i> DSM 43828 T	96.8
41	GS545	<i>Arthrobacter stackebrandtii</i> CCM 2783T	95.7
42	GS548	<i>Arthrobacter stackebrandtii</i> CCM 2783T	95.7
43	GS551	<i>Arthrobacter stackebrandtii</i> CCM 2783T	98.0
44	GS552	<i>Streptomyces lienomycini</i> LMG 20091T	99.5
45	GS577	<i>Curtobacterium herbarum</i> P 420/07T	94.0
46	GS601	<i>Burkholderia glathei</i> LMG14190 T	98.1
47	GS603	<i>Terracoccus luteus</i> DSM 44267T	98.8
48	GS607	<i>Terrabacter tumescens</i> DSM 20308T	98.6
49	GS608	<i>Terracoccus luteus</i> DSM 44267T	98.8
50	GS610	<i>Terracoccus luteus</i> DSM 44267T	98.8
51	GS612	<i>Terracoccus luteus</i> DSM 44267T	98.8
52	GS614	<i>Streptomyces ferralitis</i> SFOp68T	97.9
53	GS638	<i>Mycobacterium rhodesiae</i> DSM 44223T	98.3
54	GS652	<i>Burkholderia glathei</i>	98.6
55	GS653	<i>Terrabacter tumescens</i> DSM 20308T	99.3
56	GS668	<i>Mycobacterium moriokaense</i> DSM 44221 T	97.0
57	GS670	<i>Mycobacterium moriokaense</i> DSM 44221 T	98.3
58	GS810	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> A-6	98.4
59	GS812	<i>Arthrobacter stackebrandtii</i> CCM 2783T	95.6
60	GS814	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i> LMG 18230 T	99.7
61	GS836	<i>Microbacterium esteraromaticum</i> DSM 8609T	99.1 1111
62	GS838	<i>Microbacterium esteraromaticum</i> DSM 8609T	99.1
63	GS844	<i>Microbacterium esteraromaticum</i> DSM 8609T	99.0
64	GS849	<i>Variovorax paradoxus</i>	94.1
65	GS850	<i>Dyella japonica</i>	99.9
66	GS851	<i>Afipia broomeae</i>	99.1
67	GS852	<i>Dyella japonica</i>	98.6
68	GS858	<i>Pseudonocardia spinospora</i>	97.4
69	GS904	Not determined	
70	GS950	<i>Microbacterium phosphovorus</i> DSM 10555T	95.6
71	GS961	<i>Streptomyces scabrisporus</i>	99.4

72	GS963	Not determined	
73	GS967	<i>Actinoplanes aurantiacus</i>	93.4
74	GS970	Not determined	
75	GS972	<i>Mesorhizobium amorphae</i>	100
76	GS973	<i>Mesorhizobium amorphae</i>	100
77	GS1003	<i>Mesorhizobium amorphae</i>	100
78	GS1012	<i>Cupriavidus necator</i> ATCC 43291 T	98.1
79	GS1110	Not determined	
80	GS1119	Not determined	
81	GS1121	<i>Paenibacillus barcinonensis</i> BP-23 T	99.3
82	GS1162	<i>Mycobacterium mucogenicum</i> ATCC 49650 T	98.4
83	GS1177	<i>Streptomyces ferralitis</i> SFOp68T	97.9
84	GS1182	<i>Streptomyces avellaneus</i> NRRL B-3447T	97.6
85	GS1184	<i>Microbacterium resistens</i> DMMZ 1710T	99.5
86	GS1414	<i>Bacillus simplex</i> DSM1321 T	99.0
87	GS1418	<i>Kytococcus schroeteri</i> Muenster 2000T	94.6
88	GS1542	Not determined	
89	GS1543	<i>Cupriavidus necator</i> ATCC 43291 T	98.7
90	GS1546	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain S2	99.9
91	GS3007	<i>Streptomyces violaceolatus</i> DSM 40438T	99.8
92	GS3049	Not determined	
93	GS3055	<i>Arthrobacter oxydans</i> DSM 20119T	99.8
94	GS3060	<i>Streptomyces griseodotifer</i>	100
95	GS3061	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> A-6	98.4
96	GS3066	<i>Microbacterium esteraromaticum</i> DSM 8609T	99.0
97	GS3071	<i>Arthrobacter stackebrandtii</i> CCM 2783T	95.7
98	GS3072	<i>Arthrobacter tumbae</i> LMG 19501T	98.4
99	GS3099	<i>Bacillus luciferensis</i> LMG 18422T	100
100	M1-215	Not determined	
101	M1-213	Not determined	
102	8	Not determined	
103	M2-328	Not determined	
104	M3-221	Not determined	

		105	B13	Not determined	
		106	B12	Not determined	
		107	B9	Not determined	
		108	B8	Not determined	
		109	B6	Not determined	
		110	KCTC12	<i>Lactobacillus equi</i> KCTC13921	100
		111	KCTC27	<i>Lactobacillus reuteri</i> KCTC3594	100
Lactic acid bacteria	third year	1	KC-01	<i>Lactobacillus sakei</i>	99.0
		2	KC-02	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	99.0
		3	KC-03	<i>Lactobacillus arizonensis</i>	99.0
		4	KC-04	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99.0
		5	KC-05	Not determined	
		6	KC-06	Not determined	
		7	KC-07	Not determined	
		8	KC-08	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	99.0
		9	KC-09	<i>Lactobacillus arizonensis</i>	99.0
		10	KC-10	<i>Leuconostoc citreum</i>	99.0
		11	KC-11	<i>Leuconostoc citreum</i>	99.0
		12	KC-12	Not determined	
		13	KC-13	Not determined	
		14	KC-14	<i>Lactobacillus sakei</i>	99.0
		15	KC-15	<i>Weissella cibaria</i>	99.0
		16	KC-16	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.0
		17	KC-17	Not determined	
		18	KC-18	Not determined	
		19	KC-19	<i>Lactobacillus brevis</i>	99.0
		20	KC-20	<i>Lactobacillus sakei</i>	99.0
		21	KC-21	<i>Lactobacillus sakei</i>	99.0
		22	KC-22	<i>Lactobacillus sakei</i>	99.0
		23	KC-23	<i>Lactobacillus sakei</i>	99.0
		24	KC-24	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99.0
		25	KC-25	Not determined	
		26	KC-26	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99.0
		27	KC-27	Not determined	
		28	KC-28	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99.0

29	KC-29	Not determined	
30	KC-30	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99.0
31	KC-31	Not determined	
32	KC-32	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99.0
33	KC-33	Not determined	
34	KC-34	<i>Lactobacillus sakei</i>	99.0
35	KC-35	<i>Lactobacillus sakei</i>	99.0
36	KC-36	<i>Lactobacillus sakei</i>	100.0
37	KC-37	<i>Lactobacillus brevis</i>	99.0
38	KC-38	<i>Leuconostoc citreum</i>	99.0
39	KC-39	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99.0
40	KC-40	<i>Weissella cibaria</i>	99.0
41	KC-41	<i>Leuconostoc citreum</i>	99.0
42	KC-42	Not determined	
43	KC-43	<i>Lactobacillus sakei</i>	99.0
44	KC-44	<i>Lactobacillus sakei</i>	99.0
45	KC-45	<i>Leuconostoc citreum</i>	99.0
46	KC-46	<i>Leuconostoc citreum</i>	99.0
47	KC-47	Not determined	
48	KC-48	<i>Weissella cibaria</i>	99.0
49	KC-49	Not determined	
50	KC-50	<i>Leuconostoc citreum</i>	99.0
51	KC-51	<i>Lactobacillus sakei</i>	99.0
52	KC-52	<i>Lactobacillus sakei</i>	99.0
53	KC-53	<i>Lactobacillus sakei</i>	99.0
54	KC-54	<i>Lactobacillus sakei</i>	99.0
55	KC-55	Not determined	
56	KC-56	<i>Lactobacillus sakei</i>	99.0
57	KC-57	<i>Lactobacillus sakei</i>	99.0
58	KC-58	<i>Lactobacillus sakei</i>	99.0
59	KC-59	<i>Lactobacillus sakei</i>	99.0
60	KC-60	<i>Lactobacillus sakei</i>	99.0
61	KC-61	<i>Lactobacillus sakei</i>	99.0
62	KC-62	<i>Leuconostoc citreum</i>	99.0
63	KC-63	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99.0

64	KC-64	<i>Lactobacillus brevis</i>	99.0
65	KC-65	Not determined	
66	KC-66	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.0
67	KC-67	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.0
68	KC-68	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.0
69	KC-69	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.0
70	KC-70	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100.0
71	KC-71	Not determined	
72	KC-72	<i>Lactobacillus brevis</i>	99.0
73	KC-73	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.0
74	KC-74	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.0
75	KC-75	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.0
76	KC-76	Not determined	
77	KC-77	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.0
78	KC-78	<i>Lactobacillus arizonensis</i>	99.0
79	KC-79	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100.0
80	KC-80	Not determined	
81	KC-81	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	99.0
82	KC-82	<i>Weissella cibaria</i>	99.0
83	KC-83	Not determined	
84	KC-84	<i>Lactobacillus sakei</i>	99.0
85	KC-85	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99.0
86	KC-86	Not determined	
87	KC-87	<i>Lactobacillus sakei</i>	100.0
88	KC-88	<i>Weissella cibaria</i>	99.0
89	KC-89	<i>Weissella cibaria</i>	99.0
90	KC-90	<i>Leuconostoc garlicum</i>	99.0
91	KC-91	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	99.0
92	KC-92	<i>Leuconostoc citreum</i>	99.0
93	KC-93	<i>Leuconostoc citreum</i>	99.0
94	KC-94	<i>Weissella</i> sp. KLB9	99.0
95	KC-95	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	99.0
96	KC-96	<i>Weissella cibaria</i>	99.0
97	KC-97	<i>Weissella cibaria</i>	99.0
98	KC-98	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	98.0

99	KC-99	<i>Weissella cibaria</i>	100.0
100	KC-100	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	99.0
101	KC-101	Not determined	
102	KC-102	<i>Lactobacillus</i> sp. CS1	99.0
103	KC-103	<i>Bacillus subtilis</i>	99.0
104	KC-104	<i>Lactobacillus</i> sp.	99.0
105	KC-105	<i>Lactobacillus</i> sp. CS1	99.0
106	KC-106	<i>Lactobacillus</i> sp. CS1	99.0
107	KC-107	<i>Lactobacillus</i> sp. CS1	99.0
108	KC-108	Not determined	
109	KC-109	Not determined	
110	KC-110	Not determined	
111	KC-111	Not determined	
112	KC-112	Not determined	
113	KC-113	Not determined	
114	KC-114	Not determined	
115	KC-115	Not determined	
116	KC-116	Not determined	
117	KC-117	Not determined	
118	KC-118	Not determined	
119	KC-119	Not determined	
120	KC-120	Not determined	
121	KC-121	Not determined	
122	KC-122	Not determined	
123	KC-123	Not determined	
124	KC-124	Not determined	
125	KC-125	Not determined	
126	KC-126	Not determined	
127	KC-127	Not determined	
128	KC-128	Not determined	
129	KC-129	Not determined	
130	KC-130	Not determined	
131	KC-131	Not determined	
132	KC-132	Not determined	
133	KC-133	Not determined	

		134	KC-134	Not determined	
		135	KC-135	Not determined	
		136	KC-136	Not determined	
		137	KC-137	Not determined	
		138	KC-138	Not determined	
		139	KC-139	Not determined	
		140	KC-140	Not determined	
		141	KC-141	Not determined	
		142	KC-142	Not determined	
		143	KC-143	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100.0
		144	KC-144	Not determined	
		145	KC-145	Not determined	
		146	KC-146	Not determined	
		147	KC-147	Not determined	
		148	KC-148	Not determined	
		149	KC-149	Not determined	
		150	KC-150	<i>Bacillus subtilis</i>	99.0
		151	KC-151	Not determined	
		152	KC-152	Not determined	
		153	KC-153	<i>Lactobacillus</i> sp. CS1	99.0
		154	KC-154	<i>Lactobacillus brevis</i>	99.0
		155	KC-155	Not determined	
	Total	366			

그 중 인삼근권 토양으로부터 분리된 균주 BB4(1)-b와 균주 DB5(1)에 관해서 Genomic DNA의 G + C mol% 측정, Whole cell fatty acid (총균 지방산 측정) 측정, Quinone 분석, Peptidoglycan 아미노산 분석, DNA-DNA hybridization test, 기질 테스트 및 각종 분류에 필요한 테스트를 통하여 세균학적 특성 및 분류학적 위치를 결정하였다. 또한 김치로부터 분리된 유산균 *Lactobacillus plantarum* KC-143에 대해서 phylogenetic tree를 통해 분류학적 위치를 결정하였다.

2-1) 인삼근권 토양으로 분리된 균주의 세균학적 특성 및 분류학적 위치

(1) 균주 BB4(1)-b에 대한 연구결과

(가) Benzyl chloride 방법을 이용한 chromosomal DNA의 전기영동

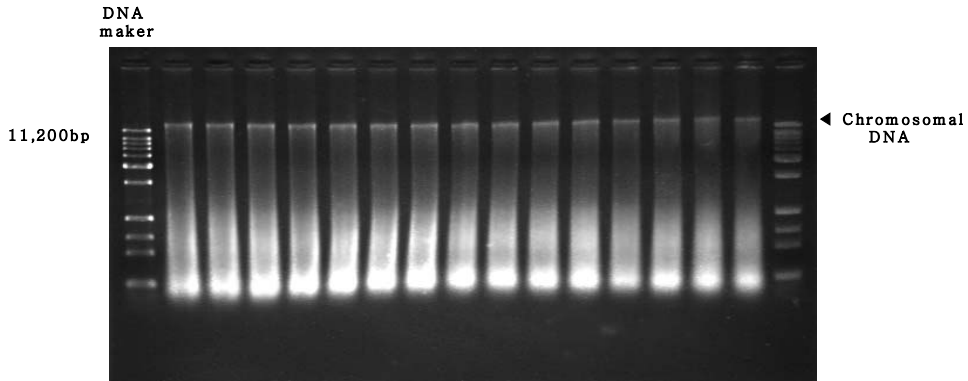


Fig. 9. Electrophoresis of chromosomal DNA by benzyl chloride method.

Benzyl chloride 방법을 이용하여 chromosomal DNA의 전기영동결과 11,200bp 위에 chromosomal DNA를 확인할 수 있었다.

(나) 16S rDNA의 증폭 및 전기영동결과

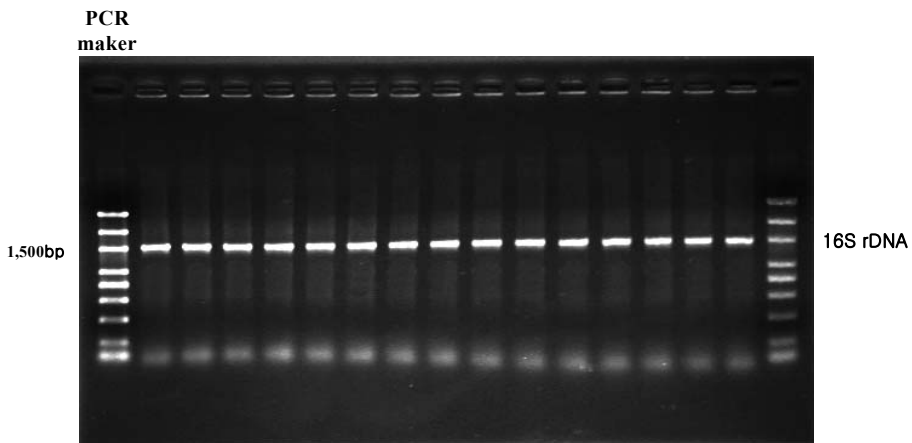


Fig. 10. Electrophoresis of 16S rDNA amplified.

Primer 9F(5'-GAGTTTGATCCTGGC TCAG-3')와 1512R(5'-ACGG(H)TACCTTGTTACGACTT-3')을 이용하여 16S rDNA를 증폭하고 전기영동을 수행한 결과 1,500bp에서 16S rDNA를 확인 할 수 있었다.

(다) 계통도 작성

균주 BB4(1)-b의 16S rDNA의 염기서열은 NCBI database를 이용하여 계통분류학적 위치를 결정하였다(Fig. 12).

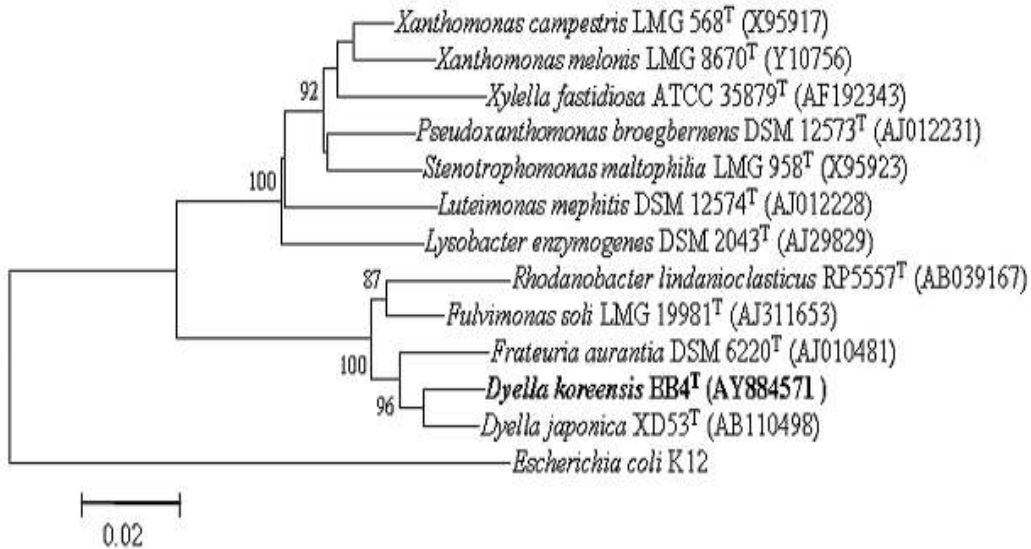


Fig. 11. Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequences, showing the phylogenetic relationships among strain BB4 producing β -glucosidase and related species in family Xanthomonadaceae.

균주 BB4(1)-b의 16S rDNA의 염기서열을 통하여 유연관계를 분석한 결과 BB4^T와 계통학적으로 가장 가까운 균주는 *Dyella Japonica* XD53^T이었고 97.6% 상동성을 나타내었다.

(라) 균주 BB4^T와 계통학적으로 인접한 "Xanthomonaceae"과 균주들 간의 특성비교 및 계통학적으로 가까운 균주들 간의 지방산 비교

Table 7과 table 8은 각각 BB4^T와 계통학적으로 인접한 "Xanthomonaceae"과 균주들 간의 특성비교 및 계통학적으로 가까운 균주들 간의 지방산 비교결과이다.

Table 7. Differential physiological characteristics of strain *Dyella koreensis* BB4^T and the type strain of recognized members of the related species in family *Xanthomonadaceae*.

Characteristic	1	2	3	4
Motility	+	+	+	+
Oxidase	+	+	-	+
Catalase	-	+	+	+
Acid from:				
D-Glucose	+	+	+	-
D-Ribose	-	-	+	-
D-Xylose	-	-	+	-
D-Galactose	-	-	+	-
D-Mannose	-	+	+	-
L-Arabinose	-	-	+	-
Fructose	-	+	+	-
Growth on:				
Maltose	+	+	+	+
<i>N</i> -Acetyl-glucosamine	+	W	-	-
D-Malate	+	-	-	-
D-Mannose	+	+	+	-
D-Sucrose	+	-	-	-
Acetate	+	-	-	+
L-Fucose	+	-	-	-
Valerate	+	-	-	-
Caprate	-	-	-	-
Citrate	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	+	-
D-Ribose	-	-	+	-
Hydrolysis of:				
Cellulose	+	-	-	+
Starch	-	-	-	+
Casein	+	-	-	+
DNA	+	+	+	+
Growth at 4% NaCl	W	-	-	+
Sensitive for Kanamycine (mg/ml)	1.0	0.9	0.7	0.6
Beta-glucosidase	+	W	-	+
Beta-galactosidase	+	-	-	+
Hydroxy fatty acid composition (3OH)	11:0 iso, 13:0 iso, 17:0 iso	11:0 iso, 13:0 iso 17:0 iso	12:0	11:0 iso, 13:0 iso, 12:0 iso
DNA G+ C content (mol%)	63.8	63.4-64.0	63.5	71.7

Strains: 1, *Dyella koreensis* BB4^T 2, *Dyella Japonica* XD53^T 3, *Frateruria aurantia* LMG 1558^T 4,

Fulvimonas soli LMG 19981^T [data for taxa 1-4 from Nalin *et al.* (1999)] +, Positive; -, negative. All strains were positive for assimilation of glucose and negative for assimilation gluconate and mannitol, and the production of urease.

Table 8. Cellular fatty acid profiles of strain *Dyella koreensis* BB4^T and the type strain of recognized members of the related species in family *Xanthomonadaceae*.

Fatty acid	1	2	3	4
11:0 iso	4.3-10.4	3.8	-	4.0-5.6
Unknown 11.798	1.4-4.4	1.9	0.5-2.0	2.6-3.5
11:0 iso 3OH	3.4-9.9	3.7	-	5.6-7.4
12:0	-	-	0.9-1.0	-
12:0 2OH	-	-	2.3-5.1	-
12:0 3OH	-	-	5.2-10.7	-
12:0 iso 3OH	-	-	-	0.6-1.4
13:0 iso 3OH	2.3-7.1	3.9	0.8-2.0	3.8-4.3
14:0	-	-	2.1-3.4	-
15:0 iso	18.2-22.6	23.6	38.2-54.7	25.8-31.2
15:0 anteiso	0.9-1.0	1.6	-	2.8-4.0
16:0 iso	2.1-2.8	4.9	-	3.7-13.2
16:0	3.2-6.4	1.5	3.8-5.6	0.4-2.2
17:1 iso 9c	21.3-28.1	25.6	2.3-2.5	15.8-21.7
17:0 iso	15.6-26.0	20	1.8-4.4	10.9-15.0
17:0 anteiso	-	0.7	-	0.6-1.1
17:0 iso 3OH	0.8-1.1	1.1	-	-
17:0 cyclo	-	-	2.2-6.3	-
17:1 6c	-	-	-	0.3-1.5
18:0	1.1-1.5	-	-	-
19:0 iso	1.6-1.8	0.7	-	-
Summed features 3	4.9-7.0	4.0	9.3-13.0	2.0-2.8

Strains: 1, *Dyella koreensis* BB4^T [data from this study] 2, *Dyella japonica* XD53^T [data from Xie *et al.*(2004)] 3, *Frateruria aurantia* LMG 1558^T [data from this study] 4, *Fulvimonas soli* LMG 19981^T [data from Mergaert *et al.* (2004)]. Unknown 11.798 은 11.798초때에 나타나는 Peak 임. 0.5%보다 적은 양의 지방산은 표시되지 않음. Summed features는 GLC로 분리가 되지 않는 두개나 세 개의 지방산 그룹. Summed feature 3은 iso-C15:0 2OH 이나 C16:1 7c 또는 둘다 포함함.

BB4^T와 계통학적으로 가까운 균주들인 *Dyella Japonica* XD53^T, *Frateruria aurantia* LMG 1558^T, *Fulvimonas soli* LMG 19981^T과의 지방산 비교분석을 통하여 15:0 anteiso과 17:1 iso 9c 지방산이 가장 많은 퍼센트 함량을 차지하고 *Dyella koreensis* BB4^T 균주의 세포막에 존재하는 지방산 조성은 *Dyella japonica* XD53^T와 유사하며 *Frateruria*와 다른 조성을 보이고 있는 것을 확인하였다. 따라서 *Dyella koreensis* BB4^T 균주가 *Dyella*에 속한다는 것을 확인할 수 있었다.

(2) DB5(1)에 대한 연구결과

(가) chromosomal DNA의 전기영동 및 16S-rDNA의 전기영동

BB4^T균주와 마찬가지로 Benzyl chloride 방법을 이용하여 chromosomal DNA의 전기영동을 수행한 결과 11,200bp 위에 chromosomal DNA를 확인할 수 있었고 Primer 9F(5'-GAGTTT GATCCTGGCTCAG-3')와 1512R(5'-ACGG(H)TACCTTGTTACGACT T-3')을 이용하여 16s rDNA를 증폭하고 전기영동을 수행하여 1,500bp에서 16s rDNA를 확인할 수 있었다(Fig. 9, Fig. 10).

(나) 계통도작성

DB5(1)의 16S rDNA의 염기서열을 NCBI database를 이용하여 계통분류학적 위치를 결정하였다(Fig. 11).

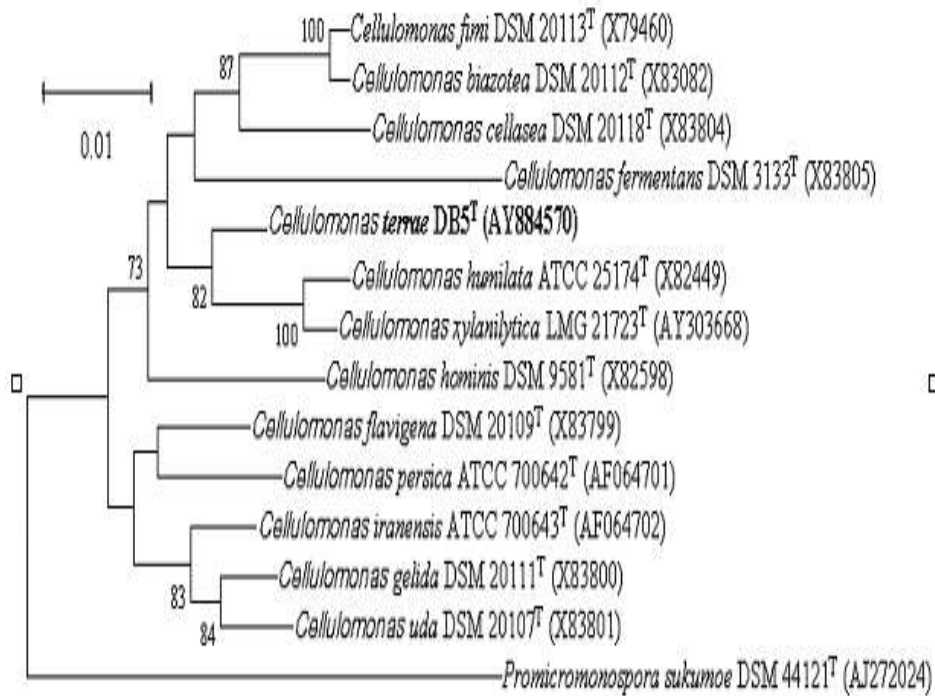


Fig. 13. Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequences, showing the phylogenetic relationships among strain DB5 producing β -glucosidase and related species in genus *Cellulomonas*.

유연관계를 분석한 결과 DB5(1)은 *Cellulomonas xylanilytica*와 가장 가까운 유연관계를 나타내었고 *C. xylanilytica* 균주와 98.3% 상동성을 나타내어 *Cellulomonas* 속으로 판정이 되었다.

(다) DB5^T와 계통학적으로 인접한 "*Cellulomonas* 속" 균주들 간의 특성 비교 및 계통학적으로 가까운 균주들 간의 지방산 비교

Table 9과 table 10은 각각 DB5^T와 계통학적으로 인접한 "*Cellulomonas*속" 균주들 간의 특성비교 및 계통학적으로 가까운 균주들 간의 지방산 비교결과이다.

Table 9. Differential physiological characteristics of strain *Cellulomonas terrae* DB5^T and the type strain of recognized members of the related species in genus *Cellulomonas*.

Characters	1	2	3	4	5	6	7
Catalase	-	+	-	+	+	+	+
Growth on:							
Acetate	-	-	-	+	+	-	ND
Lactose	+	+	+	-	+	+	+
Lactate	-	-	-	+	+	+	ND
Mannose	+	+	+	+	+	+	ND
Rhamnose	(+)	+	+	-	+	+	+
Hydrolysis of:							
Cellulose	+	+	+	+	+	+	ND
Xylan	+	+	+	ND	ND	ND	ND
Casein	-	-	-	ND	ND	ND	ND
Starch	+	+	-	ND	ND	ND	ND
Peptidoglycan composition	L-Orn-D-Glu	L-Orn-D-Glu	L-Orn-D-Glut	L-Orn-D-Glu	L-Orn-D-Glu	L-Orn-D-Glu	L-Orn
Cell-wall sugars*	Rha, Gla, Glu	Rha, Man, Fuc	Rha, Fuc, Glu	Rha, Man, 6-deoxy-Tal	Rha, Gluco, Gal, 6-deoxy-Tal	Rha, Fuc, Gluco, Glu	Others ND, NO Fuc
G+C content (mol%)	73.9	73	ND	75	71.5 - 75.6	71.3 - 72.0	76

균주들: 1, *C. terrae* sp. nov. DB5^T 2, *C. xylanilytica* 3, *C. humilata* (data for taxa 1-3 from this study) 4, *C. cellasea* [data from Rivas *et al.* (2004)] 5, *C. biazotea* [data from Rivas *et al.* (2004)] 6, *C. fimi* [data from Rivas *et al.* (2004)] 7, *C. hominis* [data from Rivas *et al.* (2004)]. +, Positive; (+), positive, week or delayed response; -, negative; ND, not defined.

Table 10. Cellular fatty acid profiles of strain DB5^T and the type strain of recognized members of the related species in genus *Cellulomonas*.

Fatty acid	1	2	3
C14:0	3.6-3.8	4.6-4.8	1.0-1.8
C16:0	8.0-9.5	9.5-10.6	11.2-12.8
C17:0	1.8-2.3	1.8-2.7	1.2-2.1
C18:0	7.1-8.2	10.7-13.0	0.8-1.8
C14:0 iso	5.1-5.9	7.7-9.6	7.8-8.9
C15:0 iso	15.2-18.5	18.6-22.1	10.9-12.2
C15:0 anteiso	44.5-45.6	40.1-45.5	32.8-44.9
C15:1 anteiso A	-	1.9-2.6	2.4-3.3
C16:0 iso	-	1.8-2.3	1.7-7.0
C17:0 iso	-	-	0.8-1.6
C17:0 anteiso	7.4-7.6	5.5-6.6	11.6-13.7
Unknown 14.258	2.9-3.4	3.0-3.3	1.2-2.7

분류군: 1, *C. terrae* DB5^T 2, *C. xylanilytica* 3, *C. humilata*. Unknown 14.258은 14.258초째 나타나는 peak 임. 0.5% 보다 적은 양의 지방산은 표시 되지 않음.

C. terrae DB5^T균주의 세포막에 존재하는 지방산 중에서 C15:0 anteiso 지방산이 가장 많은 %를 차지하는 것을 확인하였고, 이것은 다른 *Cellulomonas* 종들의 세포막 지방산 조

성과 유사한 조성을 보이는 것이며 *C. terrae* DB5^T가 *Cellulomonas*에 속한다는 것을 확인할 수 있다.

(라) 2차원 TLC (thin-layer chromatography)를 이용한 균주 DB5^T의 polar lipids 분석

Fig. 14는 2차원 TLC (thin-layer chromatography)를 이용한 균주 DB5^T의 polar lipids 분석으로서 A, B, C, D는 각각 5% ethanolic molibdatophosphoric acid, Periodate-Schiff, Ninhydrin, Zinzard reagent 로 사용하였다.

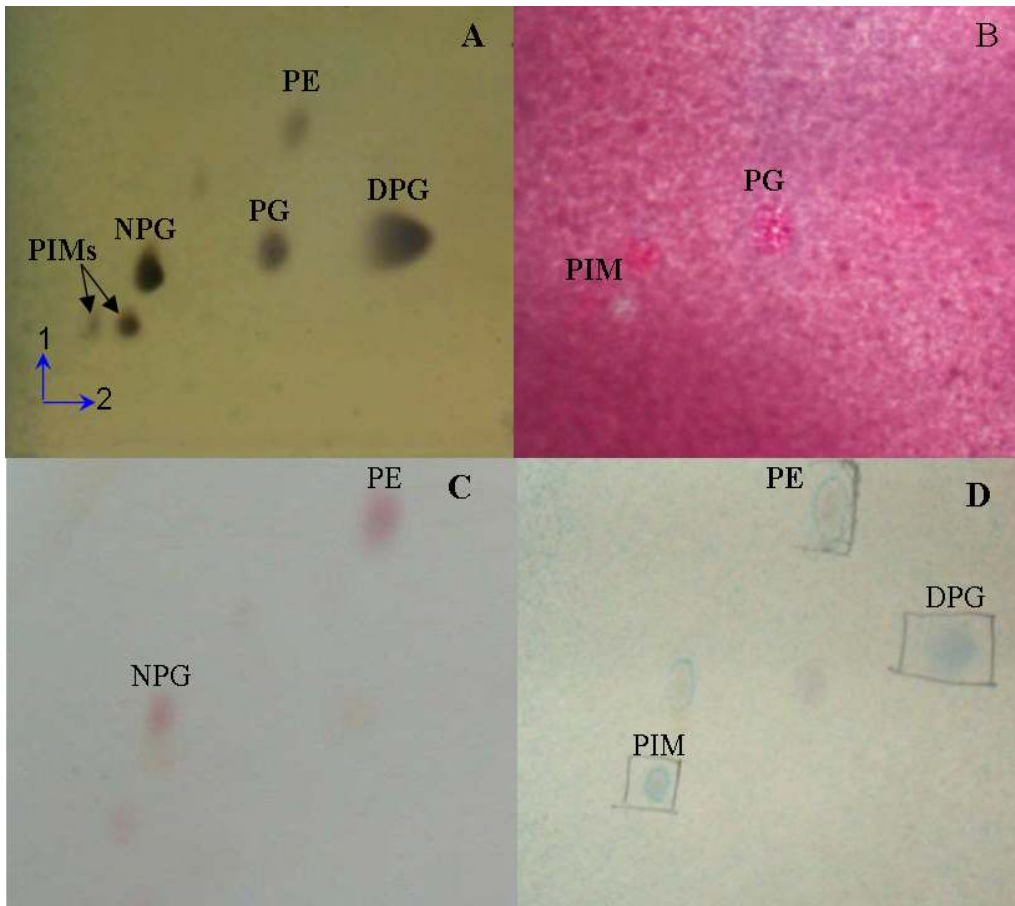


Fig. 14. Polar lipids analysis of strain DB5^T by two-dimensional TLC (thin-layer chromatography). First direction: Chloroform-methanol-water (65:25:4), second direction: chloroform-acetic acid-methanol-water (40:7.5:6:2)

Plates: A, 5% ethanolic molybdotophosphoric acid를 spray reagent로 사용 (모든 lipids 검출용) B, Periodate-Schiff를 spray reagent를 사용 (vicinal hydroxyl 그룹 검출용) C, Ninhydrin을 spray reagent로 사용 (free amino 그룹을 함유한 polar lipids 검출용); D, Zinzard reagent 를 spray reagent로 사용 (phosphorus polar lipids 검출용). 약자: DPG, diphosphatidylglycerol; NP, NPG, ninhydrin positive glycolipid PG, phosphatidylglycerol; PE, phosphatidylethanolamine; PIMs, phosphatidylinositol mannosids.

DB5^T 균주의 Polar lipid 분석 결과 DPG 함량이 가장 크게 나타났다. 이것은 DB5^T 균주가 *Cellulomonas* 종에 속한다는 것을 뒷받침하는 증거이다.

2-1) 김치로부터 분리된 유산균주의 세균학적 특성 및 분류학적 위치

(1) KC-143번 균주에 대한 연구결과

①. chromosomal DNA의 전기영동 및 16S-rDNA의 전기영동

Sequencing 결과 KC-143번 균주의 16S rDNA영역은 1355bp의 염기로 구성되어 있었으며 (Fig. 15), *Lactobacillus plantarum* DSM 20174^T (X52653)와 97.7% similarity를 보여 *Lactobacillus* 속에 속하는 균주로 확인되었다.

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120
5_2_37 GTGTGTRCARRGGCCCGGARRCGTATTCCACGGGGCATGCTGATCCCGGATTTCIRGCGATTCCGACITTCATGTAAGGCGAGTTGCAGCCTTCARATCCGACCTGAGARTGGCTTIRAGAGAT 120
130     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240
5_2_37 TRGCTIRACTTCGCGAGTTCGCRACCTGCTGTGATCCATCCATTGTRGACAGTGTGTRGCCAGSTCATRAGGGGCATGATGATTGACGTCAATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGC 240
250     260     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360
5_2_37 AGTCTCACCRAGSTGCCARACTIRATGCTGCGRACCTGATATRAGGGTTGCGCTGTTGCGGGACTTRACCCACRATCTCACGACACGAGCTGACGACRACRATGACRACCCCTGTRTCCA 360
370     380     390     400     410     420     430     440     450     460     470     480
5_2_37 TGTCGCCGARRGGARRGCTCIRACTCTTRGATTTGCAITGTRGTRGTRCAGACCTGTRAGGTTCTTCGCGTRGCTTCGATTRAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAAT 480
490     500     510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
5_2_37 TCCTTTGATTTTCAGCCTTTCGCGCCCTTCCCGAGGCGGATGCTTIRATGCGTTRGCTGACGACCTGRRAGGGCGGARRCCCTCCRACACTTRGCTTTCATCTCGTTTACGGTTRGACTAC 600
610     620     630     640     650     660     670     680     690     700     710     720
5_2_37 CAGGGTATCTATCCCTGTTTGTCCACCTACTTTCGAGCCTCAGCGTCACTIRACGACRACRAGCCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCTTTCACCGCTACAGATG 720
730     740     750     760     770     780     790     800     810     820     830     840
5_2_37 GAGTTCACCTTCTCTTTCGCACTCAAGTTTCCAGTTTCGATGACCTTCTCGGTTGACCGARRAGCTTTCACATCAGACTTAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTTRAGCCCAATAAA 840
850     860     870     880     890     900     910     920     930     940     950     960
5_2_37 TCCGGACRACCGCTTCGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCGATGACCTTCTCGGTTGACCGARRAGCTTTCACATCAGACTTAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTTRAGCCCAATAAA 960
970     980     990     1000    1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080
5_2_37 ACAGGATTTTACGAGCCGARRCCCTTCTTCACTCAGCGGGCGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCATTTGRRAGATCCCTTCTGCTGCTCCCGTRGGAGTTTGGCCGCTGCTCAGTC 1080
1090    1100    1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
5_2_37 CCAATGTCGCGGATTCCTCTCAGTTCGGCTGCGTCTGCTTCCATGCCATGTRGCGGTTTCCCGCCCATCTGCTTATCAGCCCGGGGCCATCCARRAGTGTATGCGGRRGCGCATTTTC 1200
1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280    1290    1300    1310    1320
5_2_37 AACTCGGACCTTCCGCTCAGTGTGTRTGGGTTTGTGCTGCTGTTCCAGGTTGTRTCCCGGCTTCTGGGCGAGTTTCCACGTTTCTCACCAGTTCGCCRACCTCAACTCAATGT 1320
1330    1340    1350
5_2_37 AATCATGATGCRAGCCARATCAATCCAGATT 1355

```

Fig. 15. The nucleotide sequence of 16S rDNA of lactic acid producing strain KC-143.

②. 계통도작성

NCBI의 Blast search를 통해 *Lactobacillus* genus 내에 KC-143 균주와 유연관계가 가까운 species 들을 찾고 nucleotide sequence search를 통하여 type strain들의 염기서열을 조사하였다. Bioedit program (Hall, 1999)과 Clustal X program (Thompson et al, 1997) 이용하여 염기서열을 alignment (Fig. 16)한 후 similarity를 조사해 본 결과 *Lactobacillus plantarum* DSM 20174^T (X52653)와 97.7%, *Lactobacillus zymae* LMG 22198^T (AJ632157)와 93.5%, *Lactobacillus spicheri* LTH 5753^T (AJ534844)와 93.4%, *Lactobacillus brevis* DSM 20054^T (M58810)와 93.2% , *Lactobacillus acidifarinae* LMG 22200^T (AJ632158)와 93.2%의 상동성을 보였다 (Fig. 17). 109 균주의 계통학적 위치를 결정하는 일은 MEGA3 program (Kumar et al, 2004)의 neighbor-joining 방법으로 행하였으며, phylogenetic tree는 Fig. 17에 나타내었다.

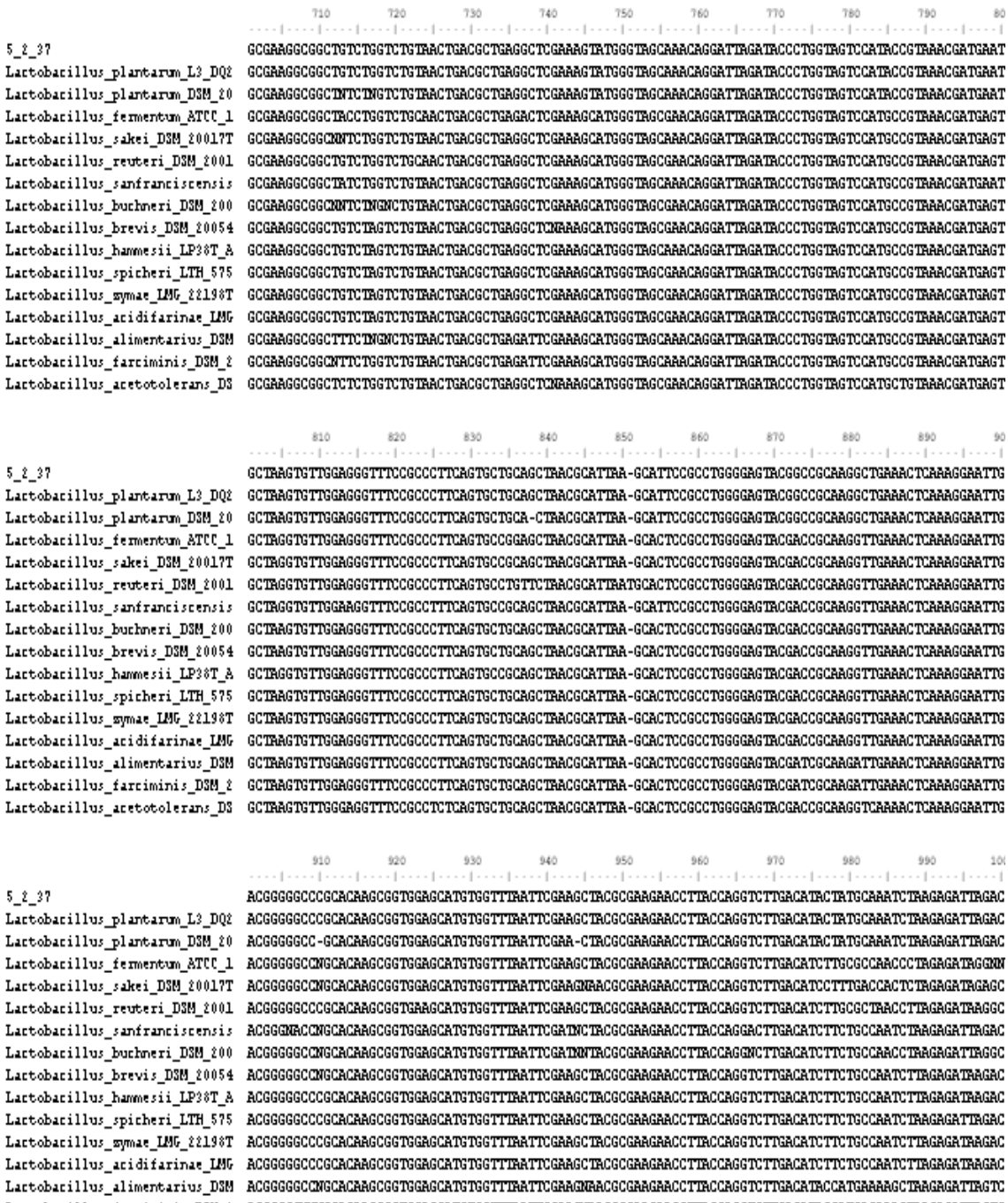
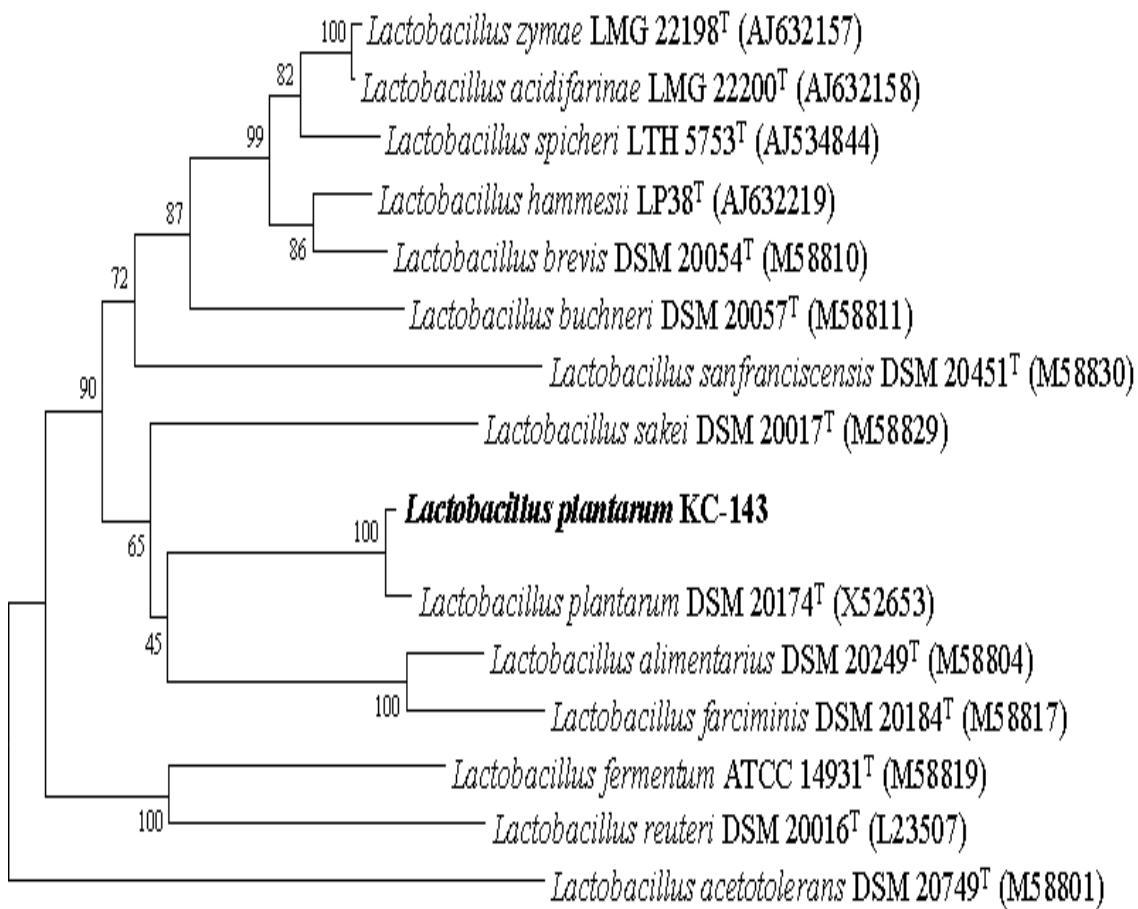


Fig. 16. Comparison of the KC-143 with other strain sequences were aligned using the CLUSTAL X program



0.01

Fig. 17. Phylogenetic tree of Rg3 producing strain KC-143 from Rb1.

KC-143번 균주의 16S rDNA의 염기서열을 GeneBank의 database와 유연관계를 분석한 결과 KC-143은 *Lactobacillus plantarum* DSM 20174^T와 가장 가까운 유연관계를 나타내어 *Lactobacillus* 속에 속하는 균주로 확인되었다.

제 3 절 사포닌전환 미생물선별

1, 재료 및 방법

가. 재료

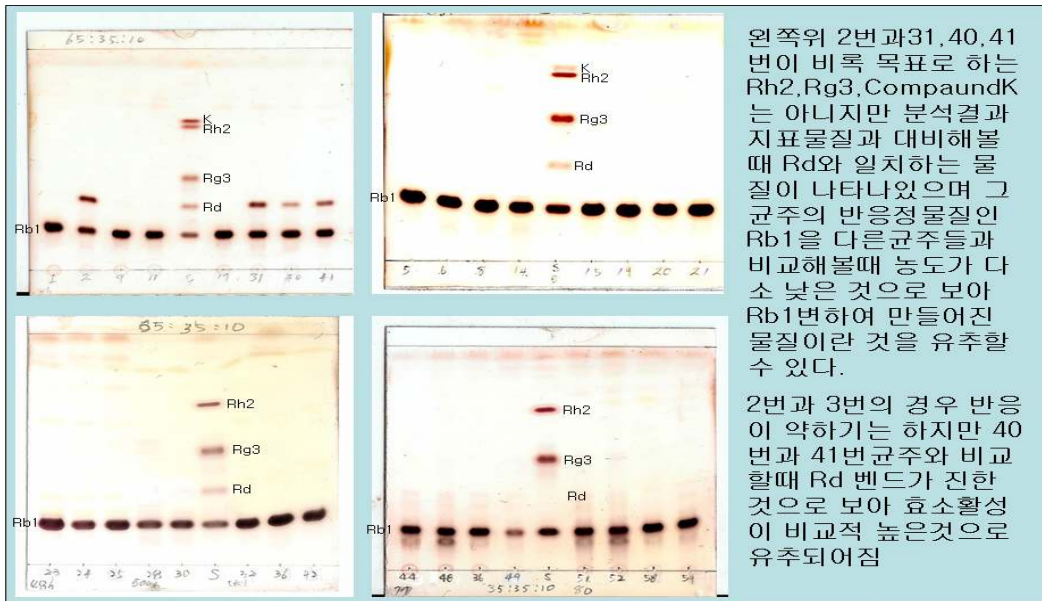
균은 Difco사의 nutrient media, trypticase soy media, Luria- Bertani media, R2A media 및 MRS 배지(조성 및 함량은 Table 11~15에 나타냈음)에서 배양하였다. 화기삼으로부터 분리한 ginsenoside Rb1은 반응기질용으로 사용하였고 KT&G로부터 분양받은 Rb1, Rd, Rg3, Rh2, C-K는 standard로 사용하였다.

Table 11. Approximate formular of Luria-Bertani (LB) media.

Contents	Amount(g/L)
Trypton	10g
NaCl	10g
Yeast Extract	5g
Distilled water	1000ml

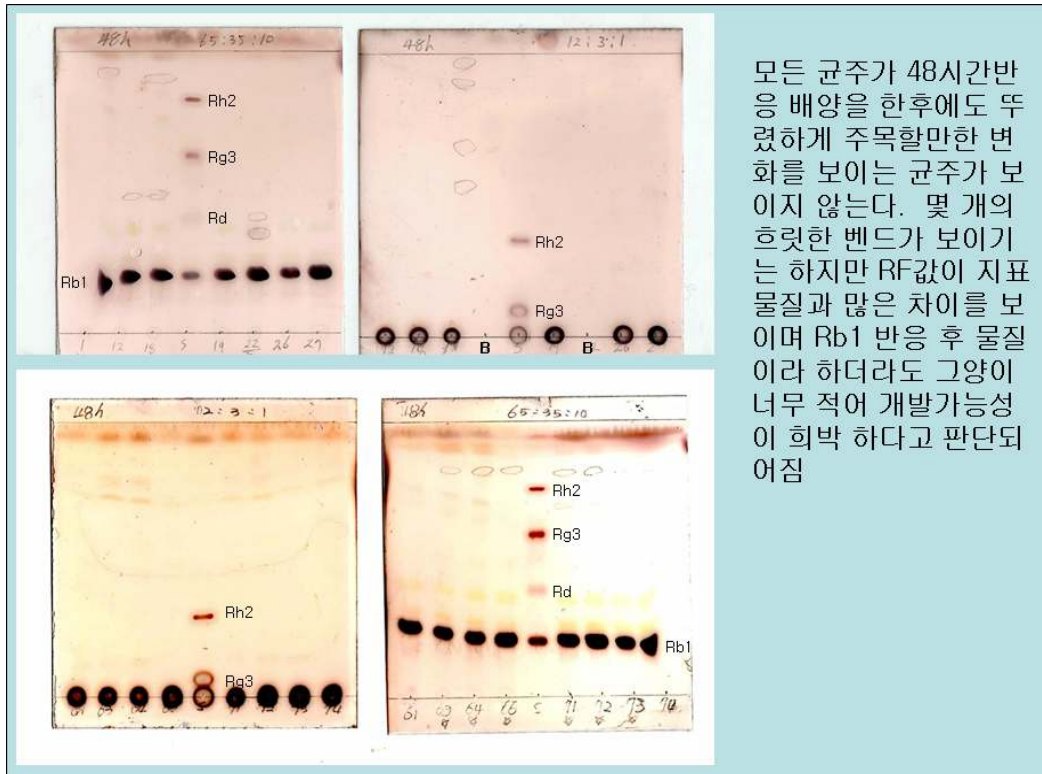
Table 12. Approximate formular of nutrient media.

Contents	Amount(g/L)
Peptone	5.0g
Beef extract	3.0g
Sodium chloride	8.0g
Distilled water	1000ml

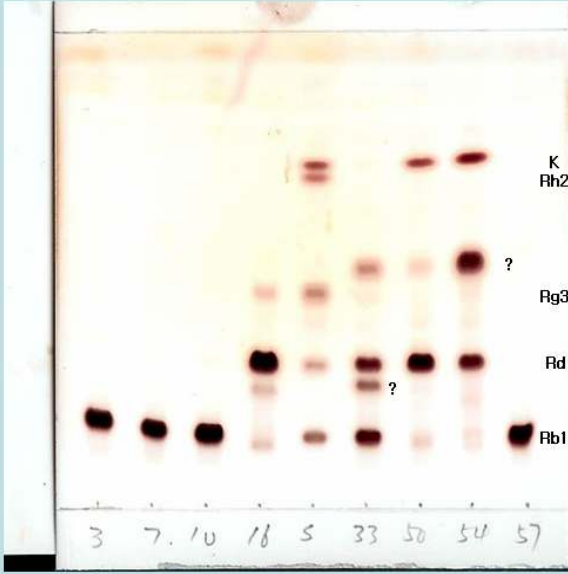


왼쪽위 2번과 31, 40, 41번이 비록 목표로 하는 Rh2, Rg3, Compound K는 아니지만 분석결과 지표물질과 대비해볼 때 Rd와 일치하는 물질이 나타나있으며 그 균주의 반응성물질인 Rb1을 다른 균주들과 비교해볼때 농도가 다소 낮은 것으로 보아 Rb1변하여 만들어진 물질이란 것을 유추할 수 있다.

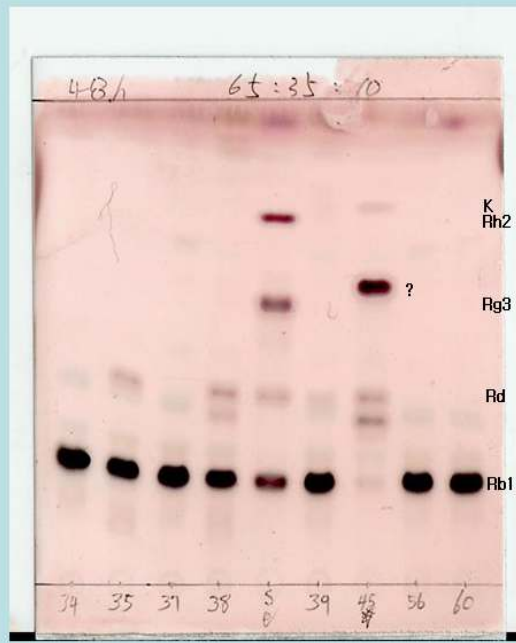
2번과 3번의 경우 반응이 약하기는 하지만 40번과 41번균주와 비교할때 Rd 밴드가 진한 것으로 보아 효소활성이 비교적 높은것으로 유추되어짐



모든 균주가 48시간반응 배양을 한후에도 뚜렷하게 주목할만한 변화를 보이는 균주가 보이지 않는다. 몇 개의 흐릿한 밴드가 보이는 하지만 RF값이 지표물질과 많은 차이를 보이며 Rb1 반응 후 물질이라 하더라도 그양이 너무 적어 개발가능성이 희박 하다고 판단되어짐



반응을 보인 4개의 균주들중 16번, 50번, 54번 균주가 Rb1을 거의 다 분해하여 효소활성이 아주 강한것을 나타내고있다. 특히 16번 균주는 우리가 목표로 하는 지표물질 Rg3와 일치하는 물질을 생산할 수 있는 능력이 있으며 54번은 CompoundK와 Rd, 미지 물질을 고르게 생산하고있다. 또한 50번은 Rd와 CompoundK를 위주로 생산하며, 33번은 16번, 50번, 54번 보다는 활성이 떨어지지만 Rb1을 분해하여 Rd와 그밖의 2가지 미지물질을 만들어내고 있음을 알 수 있다.



다음 8개의 균주들 중에 총4개의 균주가 반응을 보였으며 35번, 38번, 39번은 Rd로의 전환활성을 보였으나 반응이 미약하며 38번균주는 Rd보다 RF값이 낮은 미지물질을 생성시킨것을 알수있다. 위에서 특히 주목할만한 처리구는 45번균주로 대부분에 Rb1을 분해하고 지표물질 Rg3보다 극성이 약간 낮은 미지물질을 대량으로 만들었으며 미량의 CompoundK와 Rd등을 생산해내었다.

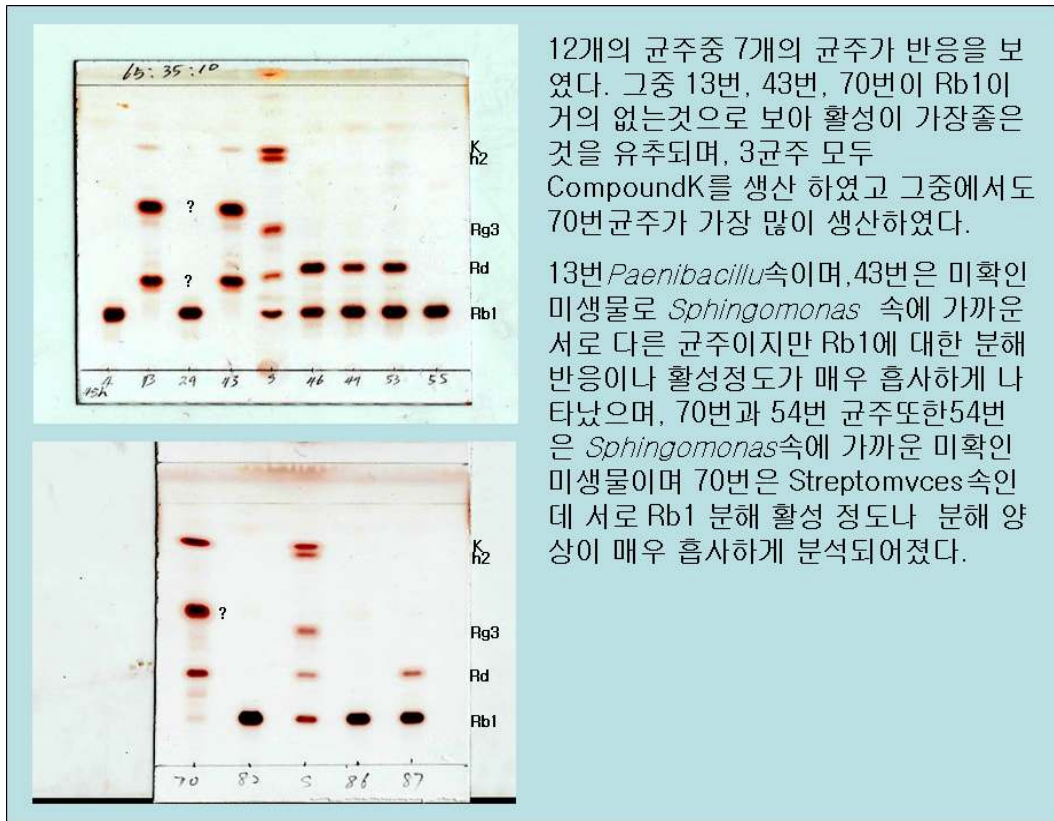


Fig. 21. TLC pattern of modified Rb1 by soil-born microorganisms isolated in ginseng field at first year.

Table 13. Approximate formular of tryptic soy media.

Contents	Amount(g/L)
Trypticase peptone	15.0g
Phytone poptone	5.0g
Sodium chloride	5.0g
Distilled water	1000ml

Table 14. Approximate formular of R2A media.

Contents	Amount(g/L)
Yeast Extract	0.5g
Protose Peptone	0.5g
Casamino Acids	0.5g
Dextrose	0.5g
Soluble starch	0.5g
Sodium Pyruvate	0.3g
Dipotassium Phosphate	0.3g
Magnesium Sulfate	0.05
Distillde water	1000ml

Table 15. Approximate formular of MRS media.

Contents	Amount(g/L)
Proteose Peptone No. 3	10.0
Beef Extract	10.0
Yeast Extract	5.0
Dextrose	20.0
Polysorbate 80	1.0
Ammonium Citrate	2.0
Sodium Acetate	5.0
Magnesium Sulfate	0.1
Manganese Sulfate	0.05
Di-potassium Phosphate	2.0

나. 방법

1) β -Glucosidase 분비 미생물에 의한 인삼사포닌의 전환 실험

(1) β -Glucosidase 분비 미생물의 액체배양 배지 선정

Esculin agar법을 이용하여 분리된 β -glucosidase 분비 미생물은 아래와 같은 방법으로 균을 배양하고 균주별로 가장 생장이 양호한 배지를 선정 하였다(Fig. 18).

배양방법

- (가) 고체배지에 균을 streaking 후 30°C Incubater 에서 배양한다.
- (나) colony가 확인되면 single colony를 멸균증류수 100 μ l에 희석한다.
- (다) 균체가 희석된 멸균수를 각각 nutrient media, trypticase soy media, Luria- Bertani media, R2A media 및 MRS media 각각의 배지에 동일한 량을 분주하여 30°C Shaking Incubater에서 현탁 배양한다.
- (라) 12h, 24h 배양 후 스펙트로 포토메터를 이용해 600nm에서 O.D값을 측정하여 흡광도가 높은 처리군의 배지를 반응실험용 배지로 사용하였다

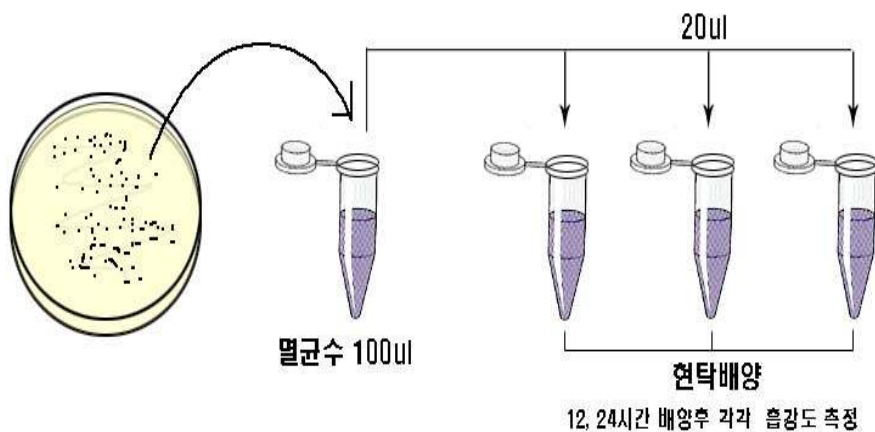


Fig. 18. Selection procedure of suitable media.

(2) 반응시간 설정

인삼사포닌전환 반응시간의 설정을 위한 예비실험은 DL3(2)-a 균주와 BB4(4)-b-1 균주를 이용하여 전 배양 후 ginsenoside Rb1과 동일량을 혼합한 후 각각 12h, 24h, 36h, 48h 반응을 시키고 수포화부탄올로 추출하여 TLC로 확인하고 반응이 일어난 균주의 시간별 반응 정도를 분석하여 적절한 반응시간을 설정하였다.

(3) 인삼사포닌의 전환

(가) 미생물에 의한 인삼사포닌 Rb1의 전환방법

색소기질을 이용해 분리한 β -glucosidase 분비미생물은 선발배지에서 현탁배양 후 (증식이 빠른 균주는 36시간, 중간정도인 균주는 3일, 늦은 균주들은 4일~5일간 배양하여 균 증식곡선의 대수기 말 정도에 반응을 시킨다) 배양액 200 μ l와 0.2 μ m filter 로 멸균한 1 mM 농도의 ginsenoside Rb1 수용액 200 μ l를 혼합하여 30 $^{\circ}$ C Shaking Incubater에서 48 h 동안 현탁 배양하였다. 반응혼합물은 200 μ l 수포화부탄올로 2회 반복 추출하고 감압농축한 후 MeOH에 용해시켜 TLC 분석에 사용하였다(Fig. 19).

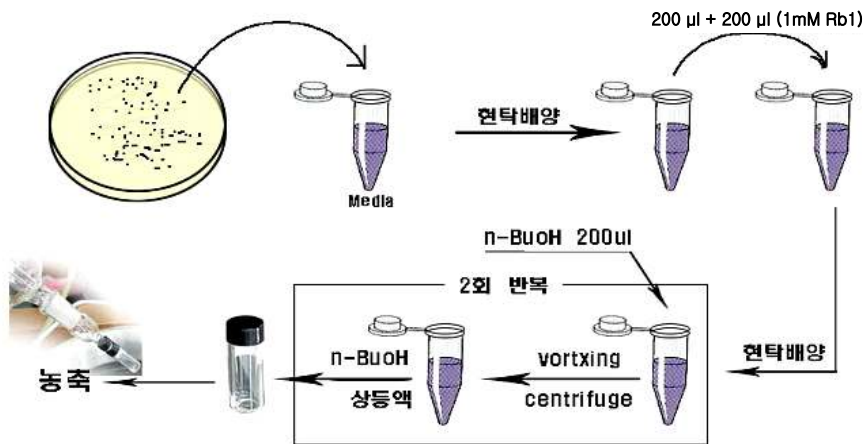


Fig. 19. Schematic representation for transformation of ginsenoside and extraction of reaction product.

(나) TLC분석

MeOH에 용해시킨 반응산물은 TLC plate에 일정량 점적하고 chloroform/methanol/water (65:35:10, by vol, 하층) 혼합용매로 전개한 후 10% H₂SO₄을 분무하여 110°C에서 10 min 가열하는 방법으로 발색시켰다.

(다) HPLC 분석

HPLC 분석은 순상과 역상 두 가지 방법으로 분석하였다.

① 순상 HPLC 조건 (ELSD detector를 이용한 HPLC 분석):

칼럼: Alltech Prevail Carbohydrate ES, 5 μ m, 250 \times 4.6mm

Flow rate: 0.8ml/min

ELSD detector

이동상조건은 Table 16에 나타냈다.

Table 16. The composition of mobile phase in HPLC analysis using ELSD detector

Time (min)	Solvent	
	ACN : H ₂ O : Prophanol 80 : 5 : 15	ACN : H ₂ O : Prophanol 80 : 20 : 15
0	70%	30%
20	0%	100%
55	0%	100%
65	70%	30%

② 역상 HPLC 조건(UV detector를 이용한 HPLC분석):

Column: C18 column (250 × 4.6 mm, ID 5 μm)

Flow rate: 1ml/min

UV detector: 203nm

이동상조건은 Table 17에 나타냈다.

Table 17. The composition of mobile phase in HPLC analysis using UV detector

Time (min)	Solvent	
	A: Acetonitrile (100%)	B: Water (100%)
0	15%	85%
5	15%	85%
25	21%	79%
65	45%	55%
75	90%	10%
85	90%	10%
87	15%	85%
100	15%	85%

(라) 전환사포닌의 구조 동정

TLC와 HPLC 분석을 통하여 인삼사포닌을 효율적으로 분해할 수 있는 균주에 의한 ginsenoside Rb1의 전환산물은 silica gel 60 column으로 순수 분리하여 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR을 통하여 화학적 구조를 동정하였다. NMR 분석기기는 FT-NMR spectrometer (Varion Inova AS 400, Varion USA. 400 MHz)를 사용하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 인삼사포닌의 전환 반응시간 설정

DL3(2)-a 균주(27번)와 BB4(4)-b-1 균주(31번)의 배양액과 ginsenoside Rb1을 시간별로 반응시킨 후 TLC로 분석한 결과를 Fig. 20에 나타냈다.

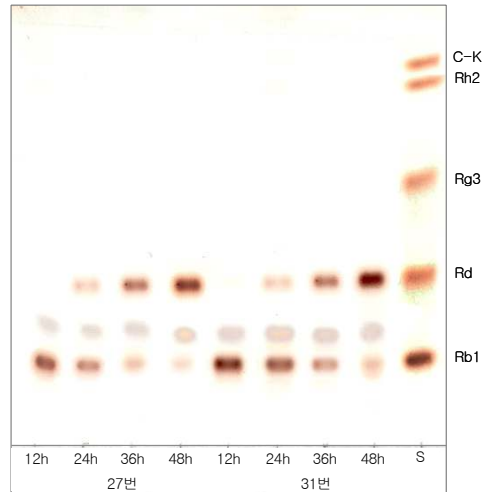


Fig. 20. TLC analysis of transformation of ginsenoside Rb1 by reaction time.

반응시간이 증가함에 따라 기질 Rb1의 함량은 감소하고 Rg3 함량은 증가하며 반응 48h에 Rb1이 대부분 가수분해 되는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 β -glucosidase 분비미생물과 ginsenoside Rb1의 반응시간을 24시간으로 설정하였다.

나. β -glucosidase 분비 미생물에 의한 ginsenoside Rb1의 전환 TLC 분석 결과

1) 1차년도 β -glucosidase 분비 미생물에 의한 ginsenoside Rb1의 전환 TLC분석

1차년도 인삼근권 토양으로부터 esculin배지를 이용하여 총 100주 분리된 β -glucosidase 분비 미생물을 각각 Rb1과 반응시킨 TLC분석 결과를 Fig. 21에 나타냈다.

TLC 분석을 통하여 ginsenoside Rd만으로는 전환활성을 갖는 균주는 FS6(6), BB4(4)-b-1, BB5(7), BB6(2), DB5(3), DB4(1), BT(4), BT(5), BB5(7), T7-06등 9 균주였으며, Rd 및 Rd 보다 R_f 값이 낮은 물질을 동시에 생산하는 균주는 DL6(1), BB6(1) 두 균주였다. Rd와 Compound K 및 Rg3보다 R_f 값이 조금 높은 물질(Rg3↑)을 동시에 생산하는 균주는 EM6(6)-a, BT1, BT9, BT14등 4 균주이며 이와 더불어 Rd보다 R_f 값이 조금 낮은 물질(Rd↓)을 동시에 생산하는 균주는 45번, 70번 균주이다. 또한 비록 적지만 Rg3와 Rd, 그리고 Rd보다 R_f 값이 조금 낮은 물질(Rd↓), (Rg3↑)을 생산하는 균주가 확인되었다 (Table 18). 균주는 이름대신 table 6의 1차년도 번호에 따라 사용하였으며 분석을 통하여 나타난 미지 물질은 R_f 값에 따라 근접 지표물질을 기준으로 화살표(↑↓)를 이용하여 구분하였다.

Table 18. The strains number converting ginsenoside Rb1

Secondary metabolite	Rd	Rd↓	Rg3	Rg3↑	Rh2	Compound K
Strain No.	2, 13, 16, 22, 31, 33, 35, 38, 39 40, 41, 46, 47, 50, 53, 54, 70, 87	16, 22, 33, 38,	16	13, 33, 43, 45, 50, 54, 70		13, 43, 45, 50, 54, 70

2) 2차년도 β -glucosidase 분비 미생물에 의한 ginsenoside Rb1의 전환 TLC분석

2차년도 인삼근권 토양으로부터 esculin배지를 이용하여 총 111주 분리된 β -glucosidase 분비 미생물을 각각 Rb1과 반응시킨 TLC분석 결과를 Fig. 22에 나타냈다.

TLC 분석결과 GS235, GS342, GS404, GS462, GS508, GS514, GS603, GS608, GS610, GS658, GS836, GS844, GS973, GS1184, GS3066, M2-328 등 균주들이 각각 Rg3, Rd, F2, Rh2, Compound-K 등의 반응을 보였으며, 이중 GS514 균주가 가장 뚜렷하게 Rd와 Rg3를 생성할수 있는 활성을 나타내었으므로 GS514 균주를 이용하여 Rg3를 생산하고자 실험을 진행하였다(Table 19). 균주는 이름대신 table 6의 2차년도 번호에 따라 사용하였으며 분석을 통하여 나타난 미지 물질은 R_f 값에 따라 근접 지표물질을 기준으로 화살표(↑↓)를 이용하여 구분하였다.

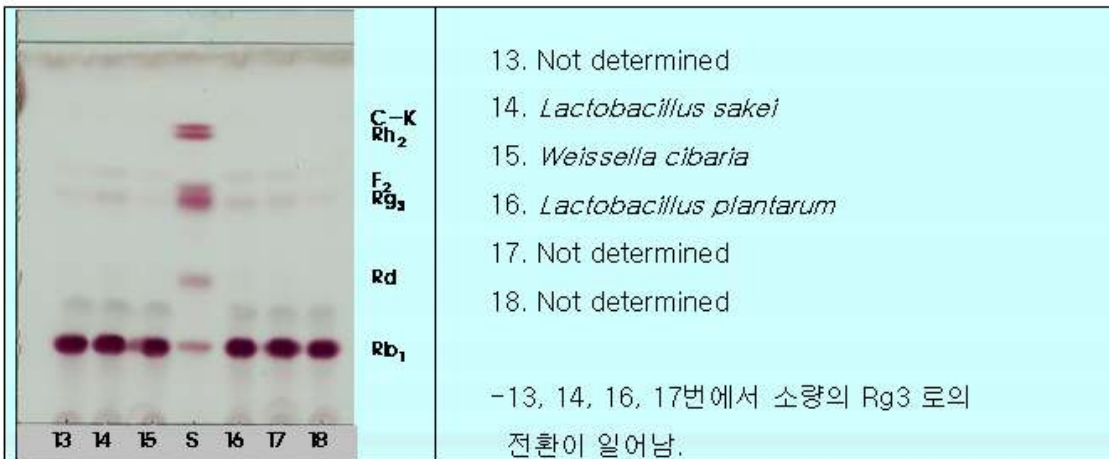
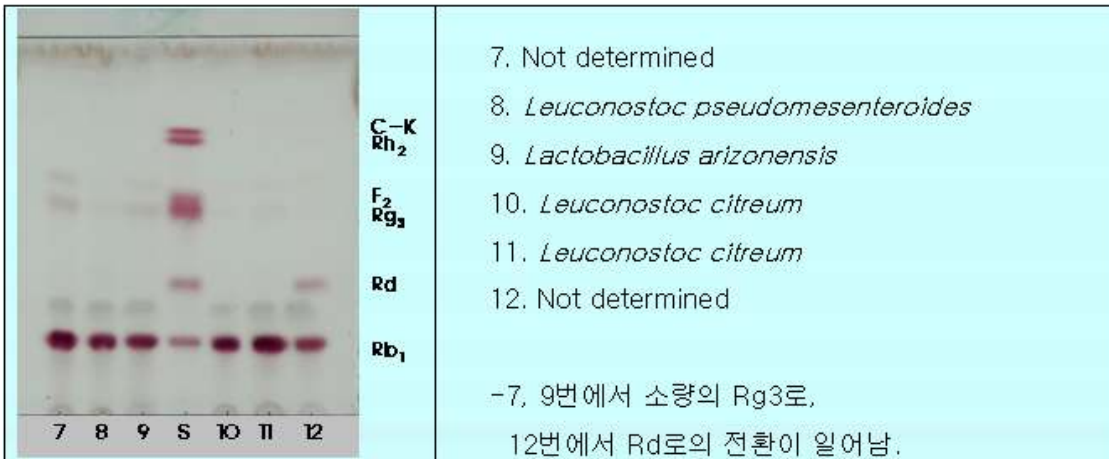
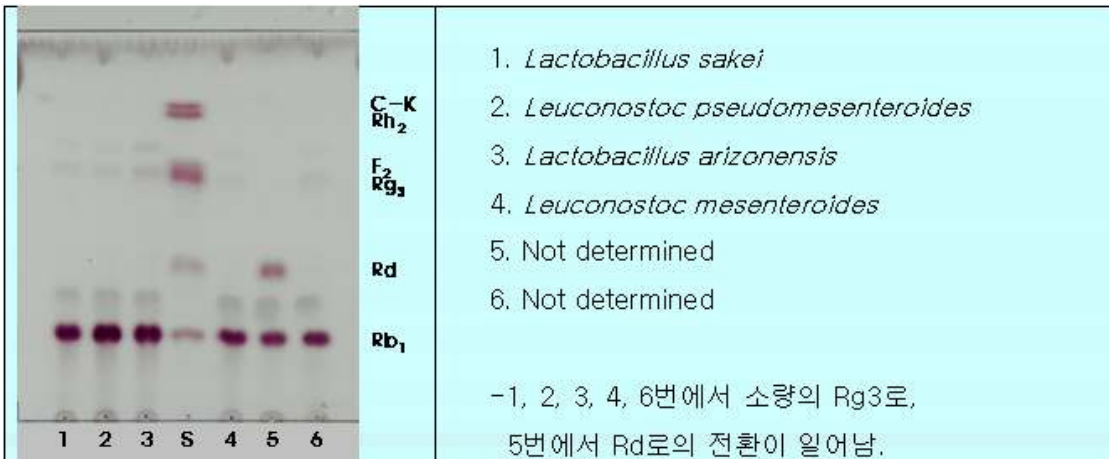
Table 19. The strains number converting ginsenoside Rb1

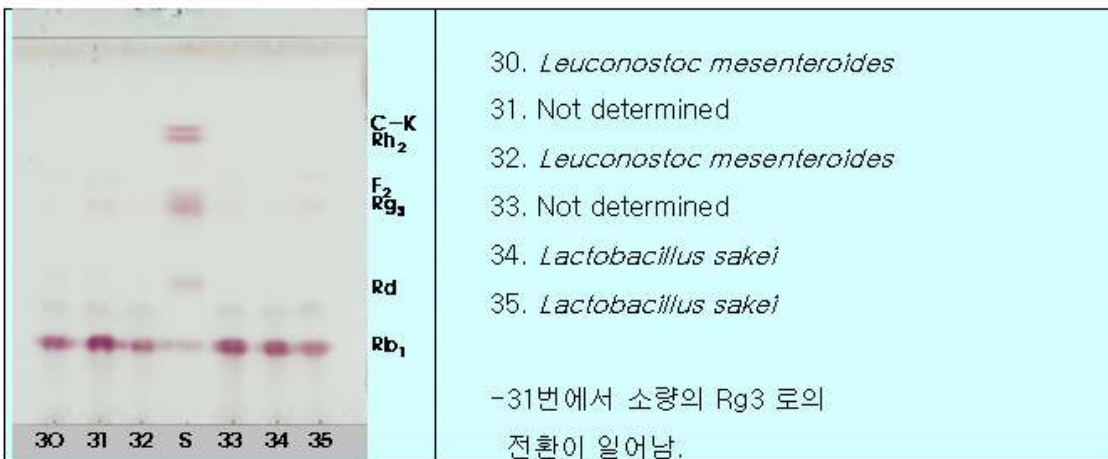
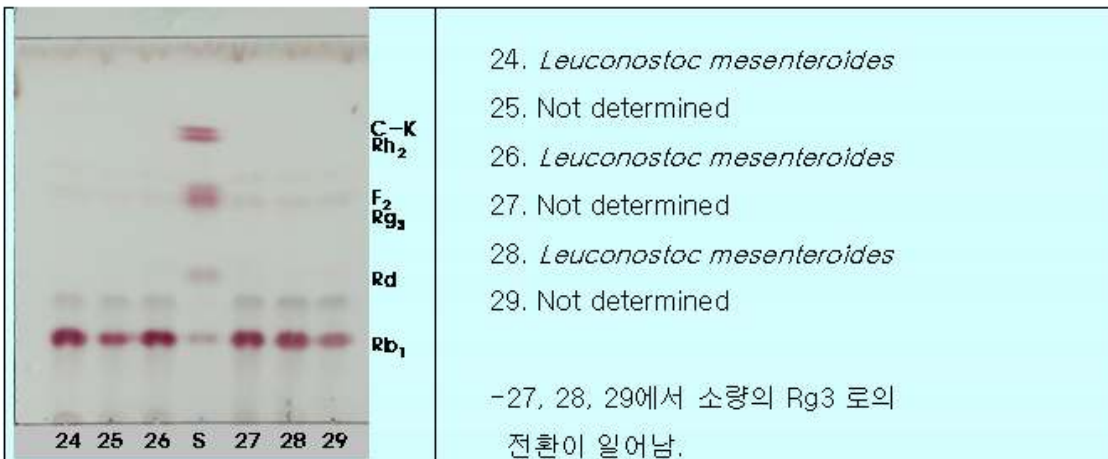
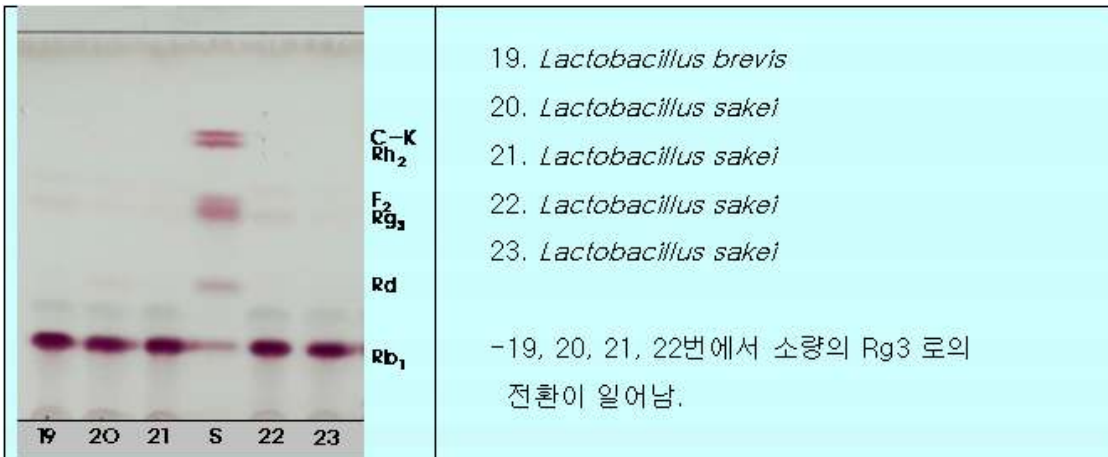
Secondary metabolite	Rd	Rd↓	Rg3	Rg3↑	Rh2	Compound K
Strain No.	11, 18, 25, 30, 33, 50, 52, 55, 61, 63, 85, 103	16, 19, 25, 32, 34, 47, 49, 50, 55, 77	17, 30, 33, 50	25, 30, 47, 49, 50		50

TLC 분석에서 ginsenoside Rb1을 Rd, Rg3, Rh2, C-K 및 Rg3보다 R_f 값이 조금 높은 물질(Rg3↑), Rd보다 R_f 값이 조금 낮은 물질(Rd↓) 등 유의 할 만한 처리구를 따로 취해 HPLC를 이용하여 정밀분석을 하였다.

(3). 3차년도 β -glucosidase 분비 미생물에 의한 ginsenoside Rb1의 전환 TLC분석 결과

3차년도 각종 김치 시료로부터 esculin배지를 이용하여 총 155주 분리된 유산균을 각각 Rb1과 반응시킨 TLC분석 결과를 Fig. 23에 나타내었다.







- 36. *Lactobacillus sakei*
- 37. *Lactobacillus brevis*
- 38. *Leuconostoc citreum*
- 39. *Leuconostoc mesenteroides*
- 40. *Weissella cibaria*
- 41. *Leuconostoc citreum*

- 36번에서 미지물질로, 37, 38, 39, 40, 41번에서 소량의 Rg3로, 38번에서 Rd로의 전환이 일어남.



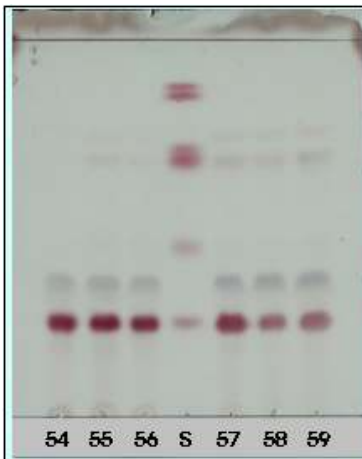
- 42. Not determined
- 43. *Lactobacillus sakei*
- 44. *Lactobacillus sakei*
- 45. *Leuconostoc citreum*
- 46. *Leuconostoc citreum*
- 47. Not determined

- 42, 43번에서 소량의 Rg3로의 전환이 일어남.



- 48. *Weissella cibaria*
- 49. Not determined
- 50. *Leuconostoc citreum*
- 51. *Lactobacillus sakei*
- 52. *Lactobacillus sakei*
- 53. *Lactobacillus sakei*

- 49, 50, 51, 52, 53번에서 소량의 Rg3로의 전환이 일어남.



C-K
Rh₂
F₂
Rg₃
Rd
Rb₁

- 54. *Lactobacillus sakei*
- 55. Not determined
- 56. *Lactobacillus sakei*
- 57. *Lactobacillus sakei*
- 58. *Lactobacillus sakei*
- 59. *Lactobacillus sakei*

- 55, 57, 58, 59번에서 Rg3로의 전환이
일어남.



C-K
Rh₂
F₂
Rg₃
Rd
Rb₁

- 60. *Lactobacillus sakei*
- 61. *Lactobacillus sakei*
- 62. *Leuconostoc citreum*
- 63. *Leuconostoc mesenteroides*
- 64. *Lactobacillus brevis*
- 65. Not determined

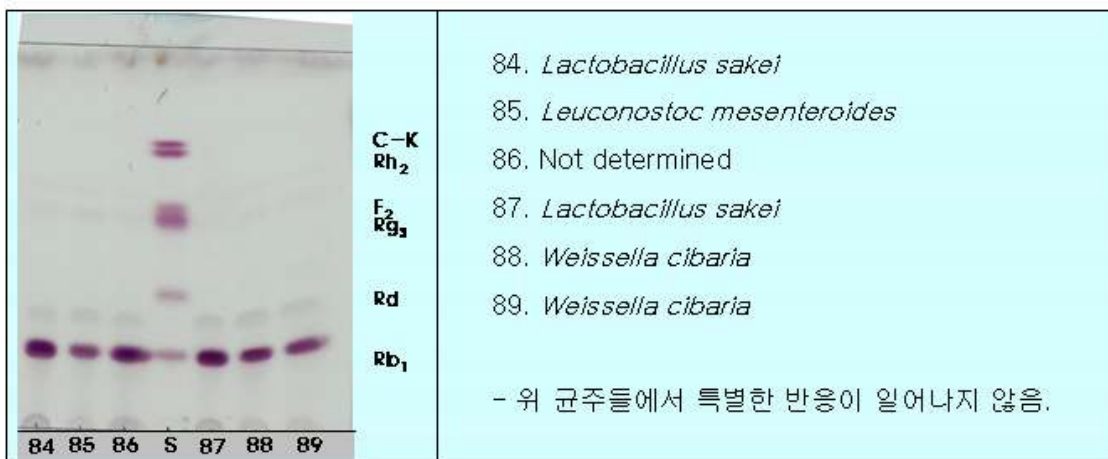
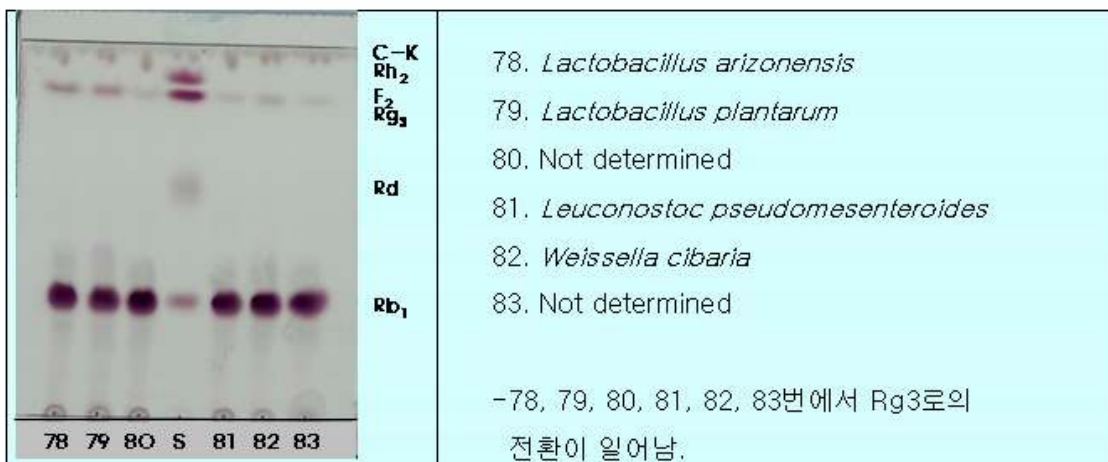
-60, 61, 62, 63, 64, 65번에서 소량의 Rg3
로의 전환이 일어남.

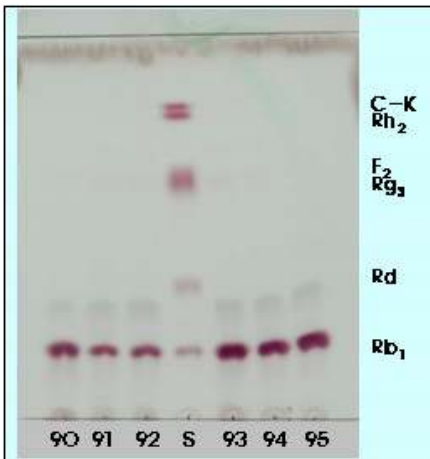


C-K
Rh₂
F₂
Rg₃
Rd
Rb₁

- 66. *Lactobacillus plantarum*
- 67. *Lactobacillus plantarum*
- 68. *Lactobacillus plantarum*
- 69. *Lactobacillus plantarum*
- 70. *Lactobacillus plantarum*
- 71. Not determined

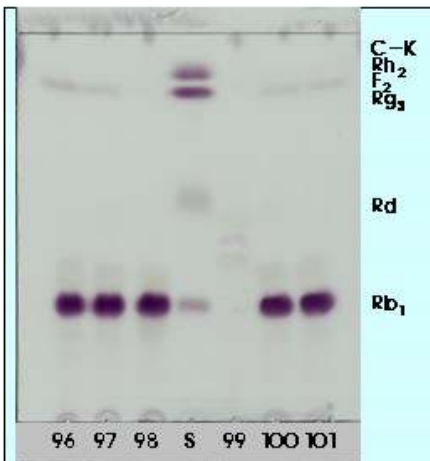
-66, 67, 68, 69, 70, 71번에서 소량의 Rg3
로의 전환이 일어남.





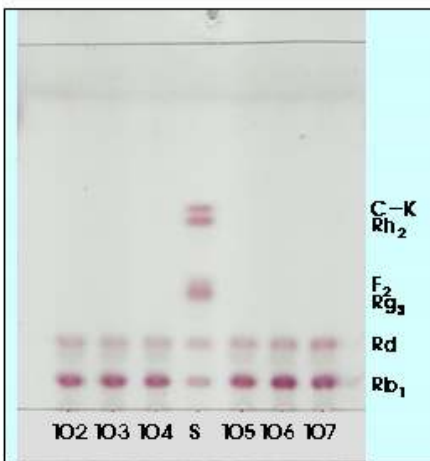
- 90. *Leuconostoc garlicum*
- 91. *Leuconostoc paramesenteroides*
- 92. *Leuconostoc citreum*
- 93. *Leuconostoc citreum*
- 94. *Weissella* sp. KLB9
- 95. *Lactobacillus paraplantarum*

- 위 균주들에서 특별한 반응이 일어나지 않음.



- 96. *Weissella cibaria*
- 97. *Weissella cibaria*
- 98. *Lactobacillus alimentarius*
- 99. *Weissella cibaria*
- 100. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*
- 101. Not determined

- 96, 97, 100, 101번에서 소량의 Rg3로의 전환이 일어남.



- 102. *Lactobacillus* sp. CS1
- 103. *Bacillus subtilis*
- 104. *Lactobacillus* sp.
- 105. *Lactobacillus* sp. CS1
- 106. *Lactobacillus* sp. CS1
- 107. *Lactobacillus* sp. CS1

-102, 103, 104, 105, 106, 107번에서 Rd로의 전환이 일어남.

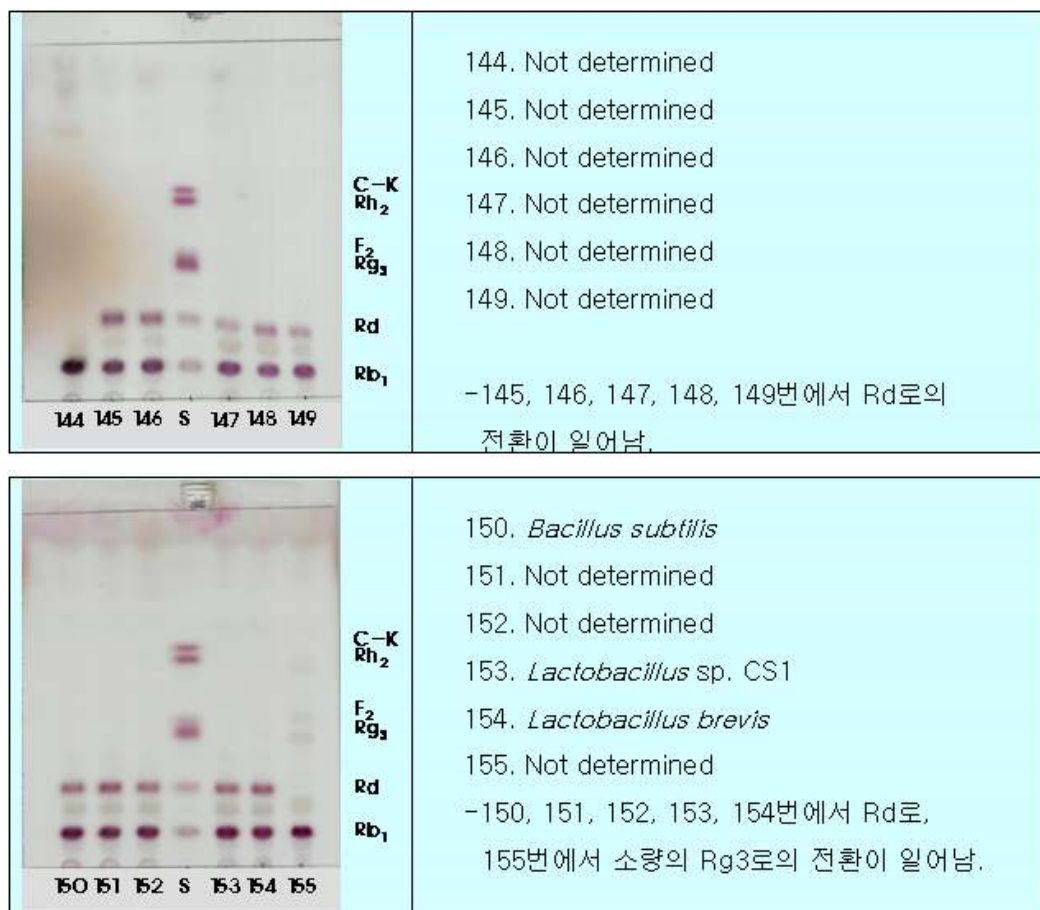
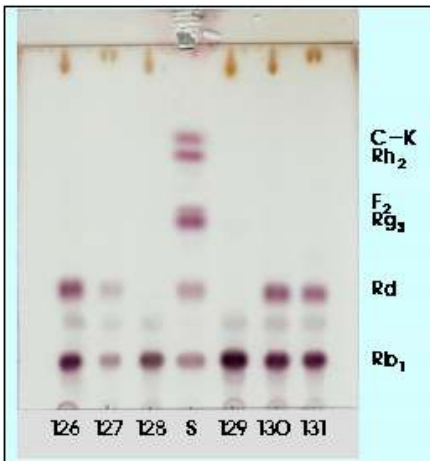


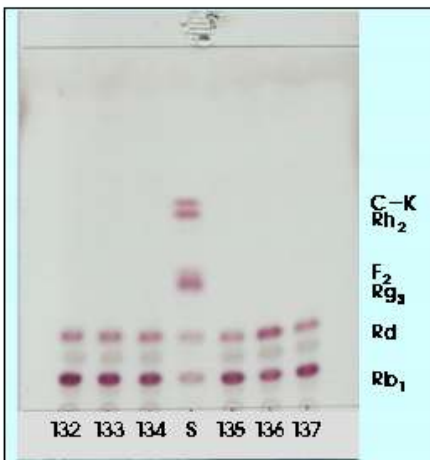
Fig. 23. TLC pattern of modified Rb1 by lactic acid bacteria isolated in Kimchi at third year.





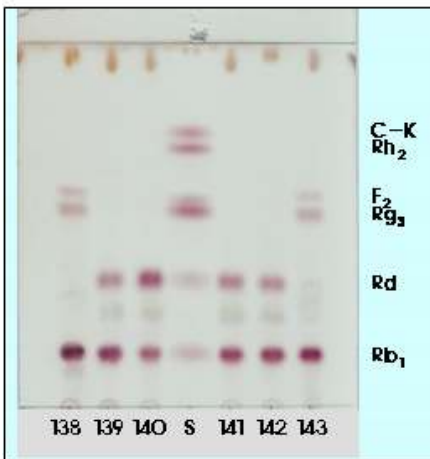
126. Not determined
 127. Not determined
 128. Not determined
 129. Not determined
 130. Not determined
 131. Not determined

-126, 127, 130, 131번에서 Rd로의 전환이 일어남.



132. Not determined
 133. Not determined
 134. Not determined
 135. Not determined
 136. Not determined
 137. Not determined

-132, 133, 134, 135, 136, 137번에서 Rd로의 전환이 일어남.



138. Not determined
 139. Not determined
 140. Not determined
 141. Not determined
 142. Not determined

143. *Lactobacillus plantarum*
 -138, 143번에서 Rg3 및 F2로,
 139, 140, 141, 142번에서 Rd로의 전환이 일어남.

TLC 분석결과 KC-68, KC-78, KC-79, KC-81, KC-82, KC-83, KC-138, KC-143 균주들이 특히 뛰어난 ginsenoside Rg3로의 전환 반응을 보였으며, 그 중 KC-143번 균주를 이용하여 Rg3를 생산하고자 시험을 진행하였다(Table 20).

Table 20. The strains number converting ginsenoside Rb1

Secondary metabolite	Rd	Rd↓	Rg3	Rg3↑	Rh2	Compound K
			1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 27, 28, 29, 31, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 49, 50, 51, 52, 53, 55, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 78, 79, 81, 82, 83, 96, 97, 100, 101, 113, 115, 123, 125, 138, 143, 155	1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 27, 28, 29, 31, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 49, 50, 51, 52, 53, 55, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 78, 79, 81, 82, 83, 113, 115, 123, 125, 138, 143, 155		
균주번호	5, 12, 72, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 124, 126, 127, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 139, 140, 141, 142, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154					

TLC분석에서 ginsenoside Rb1을 Rd, Rg3, Rh2, C-K 및 Rg3보다 R_f 값이 조금 높은 물질(Rg3↑), Rd보다 R_f값이 조금 낮은 물질(Rd↓) 등 유의할만한 처리구를 따로 취해 HPLC를 이용하여 정밀분석을 하였다.

다. β -glucosidase 분비 미생물에 의한 ginsenoside Rb1의 전환산물 HPLC분석 결과

TLC분석에서 ginsenoside Rb1을 Rd, Rg3, Rh2, C-K 및 Rg3보다 R_f 값이 조금 높은 물질(Rg3 \uparrow), Rd보다 R_f 값이 조금 낮은 물질(Rd \downarrow) 등 물질들로 전환시킬 수 있는 처리구를 다시 HPLC분석을 통하여 사포닌 분자구조를 확인하고자 하였다. HPLC 분석에서 각각의 인삼사포닌의 머무름 시간을 확인하기 위하여 11종 인삼사포닌(Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2, Rg3, Rh1, Rh2) 및 ginsenoside Rb1의 가능한 분해산물 Rd, Rg3, Rh2, compound K를 지표물질로 분석하였다.(Fig. 24, Fig. 25).

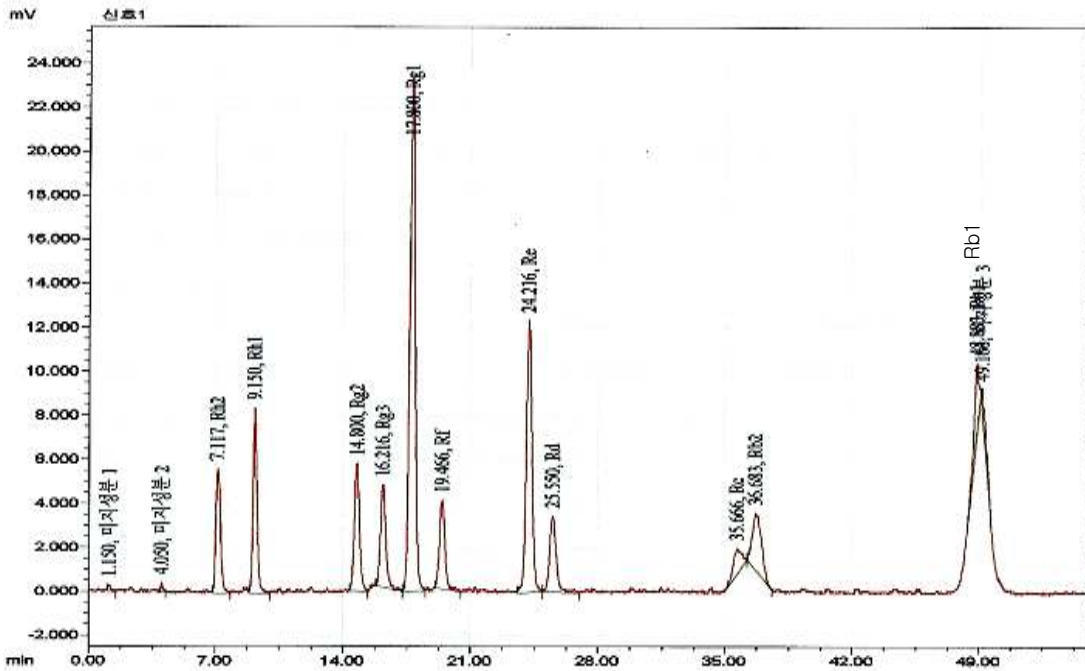


Fig 24. HPLC analysis of 11 kinds of ginsenoside standards (ELSD detector).

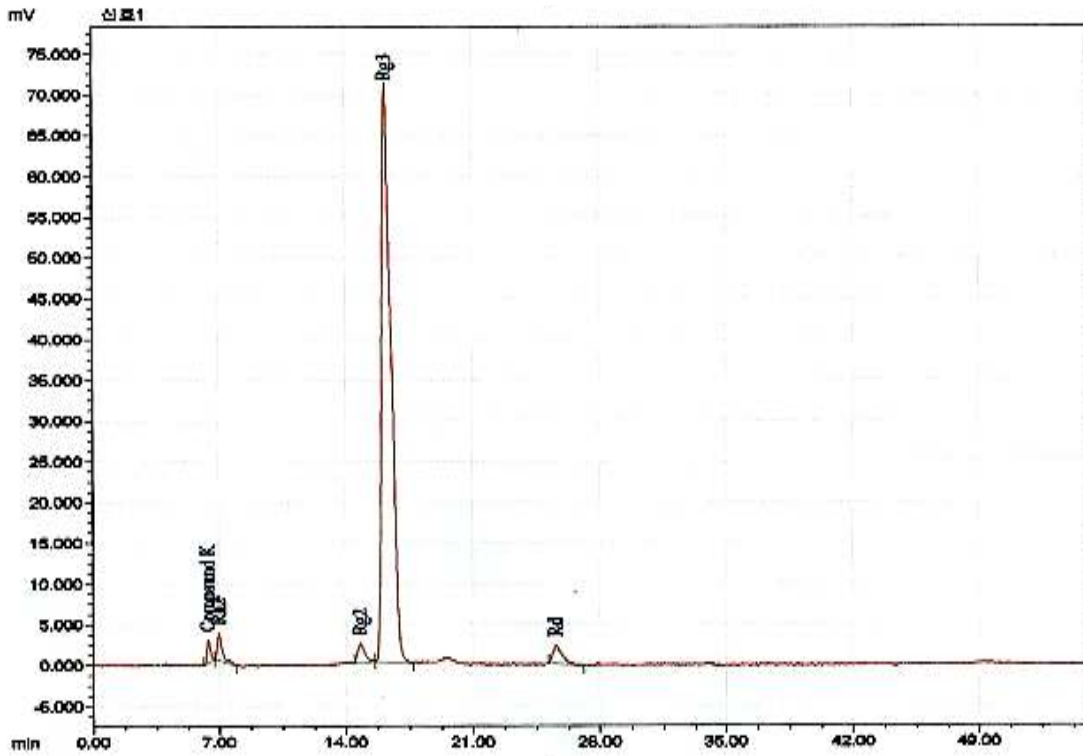


Fig. 25. HPLC analysis of standards Rg3, Rd, Rh2, compound K (ELSD detector).

Fig. 24과 Fig. 25는 ELSD detector를 이용한 인삼사포닌 지표물질의 HPLC분석으로서 11종 인삼사포닌에 compound K를 포함한 총 12종 사포닌의 머무름 시간을 table 21에 나타냈다.

Table 21. Retention time of 12 kinds of ginsenoside standards (ELSD detector)

Ginsenoside	Rb1	Rb2	Rc	Rd	Re	Rf	Rg1	Rg2	Rg3	Rh1	Rh2	C-K
Retention Time (min)	48.9	36.7	35.7	25.6	24.2	19.5	17.8	14.8	16.2	9.2	7.1	6.5

Fig. 26과 27은 UV detector를 이용한 인삼사포닌 지표물질에 대한 HPLC분석결과이다.

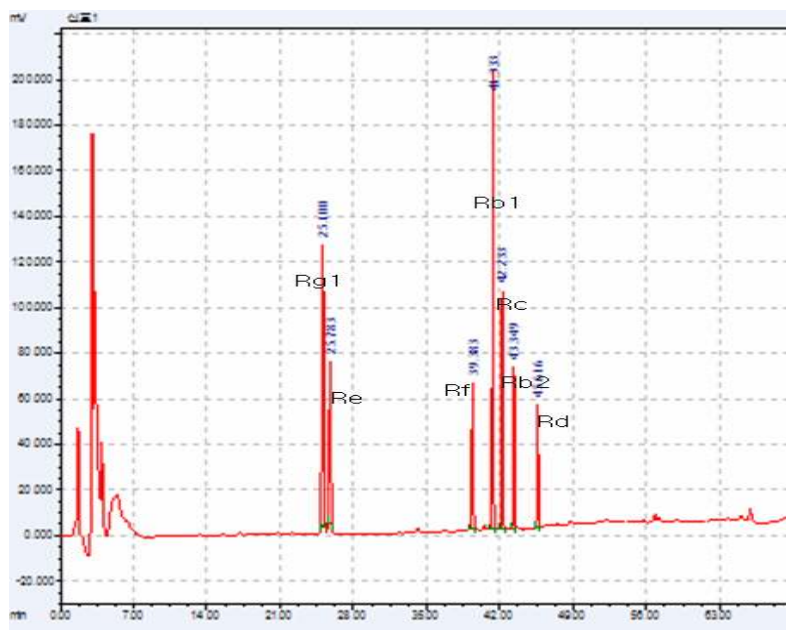


Fig 26. HPLC analysis of 7 kinds of ginsenosides including Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1 (UV detector).

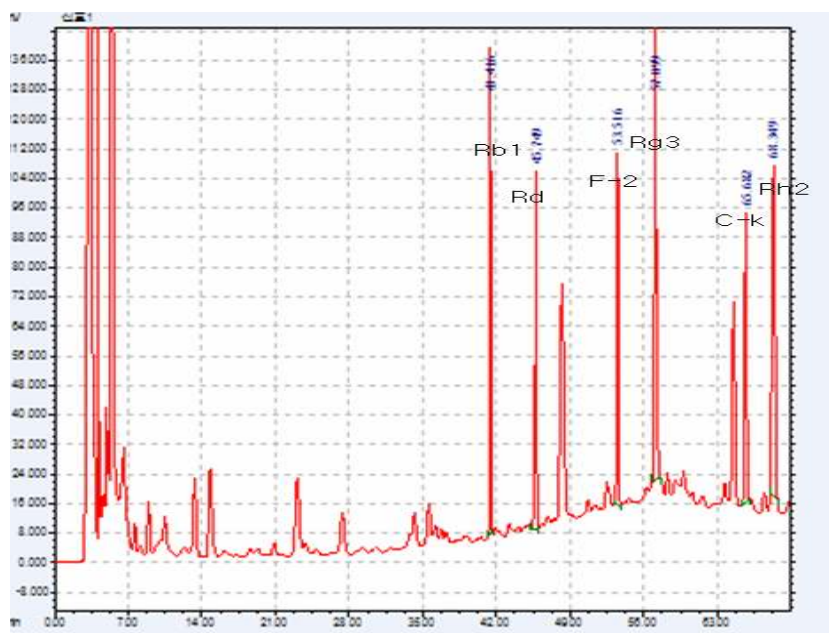


Fig. 27. HPLC analysis of ginsenoside Rb1, Rd, Rg3, F2, Rh2, C-K (UV detector).

각각의 머무른 시간은 Table 22와 같다.

Table 22. Retention time of 11 kinds of ginsenoside standards(UV detector)

Ginsenoside	Rb1	Rb2	Rc	Rd	Re	Rf	Rg1	Rg3	F2	Rh2	C-K
Retention Time (min)	41.4	43.3	42.2	45.7	25.8	39.4	25.1	57.9	53.5	68.3	66.7

균주 BT4 (Fig. 28), BT5(Fig. 29) 및 BT12 (Fig. 30)은 TLC분석(Fig. 18, 57번)에서 보
다시피 Rd 로만 특이적으로 전환된 처리구이다.

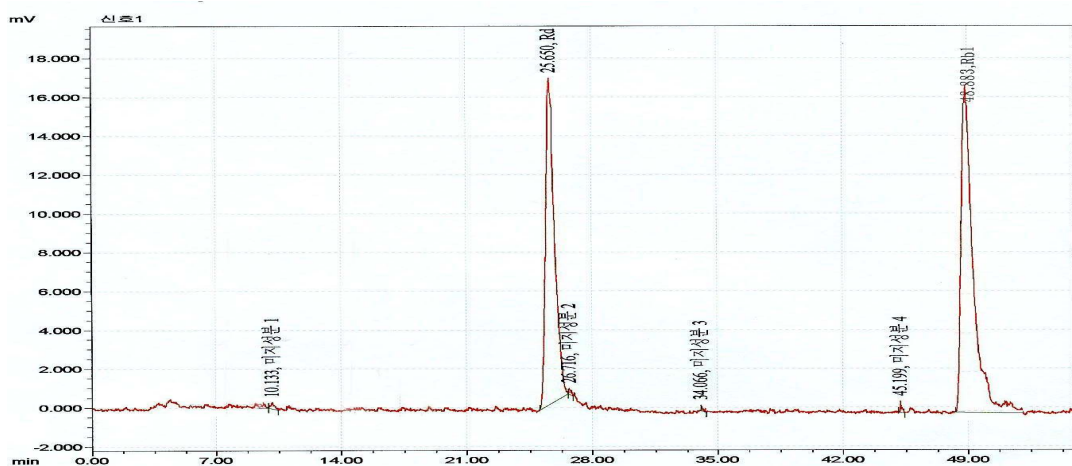


Fig. 28. HPLC analysis of the strain BT4 (ELSD detector).

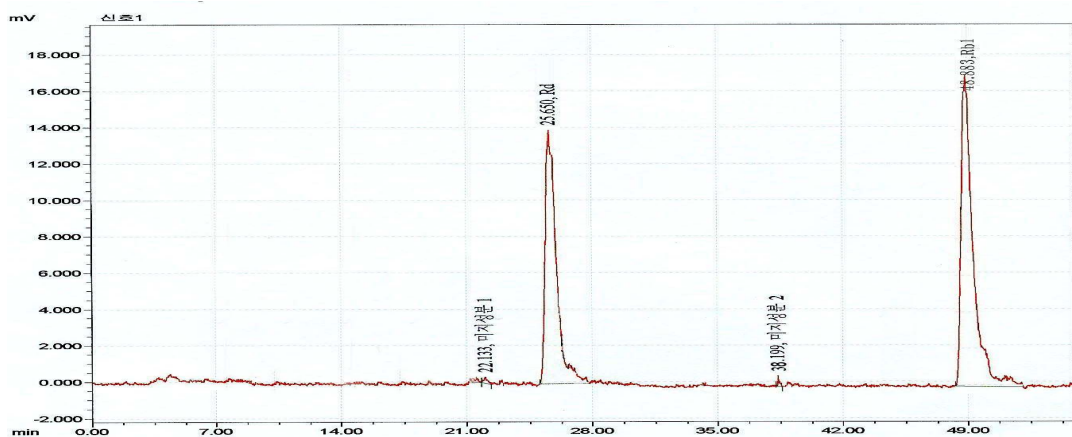


Fig. 29. HPLC analysis of the strain BT5 (ELSD detector).

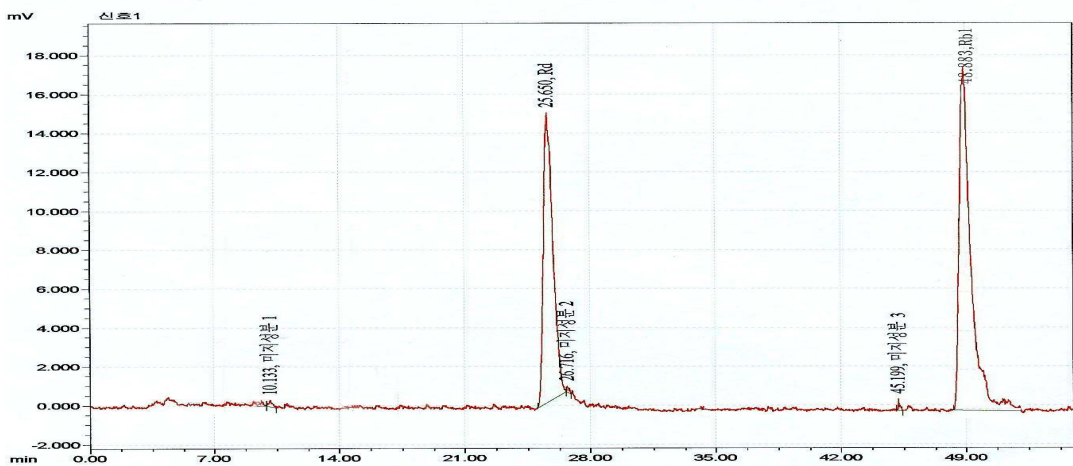


Fig. 30. HPLC analysis of the strain BT12 (ELSD detector).

HPLC 분석에서도 TLC 분석결과와 마찬가지로 머무름 시간 25.7min에 Rd peak가 나타나는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 28~30).

균주 EM6(6)-a과 BT3은 TLC 분석(Fig. 21-48번)에서 R_f 값이 Rd보다 약간 작은 물질과 Rg3보다 R_f 값이 약간 높은 미지 물질이 대량 검출된 처리구이다. HPLC 분석에서 머무름 시간 25.7 min과 26.2 min에 나타나는 peak는 ginsenoside Rd로, 14.9 min과 14.8 min에 나타나는 peak는 ginsenoside Rg2로 인식이 되었다(Fig. 31, Fig. 32).

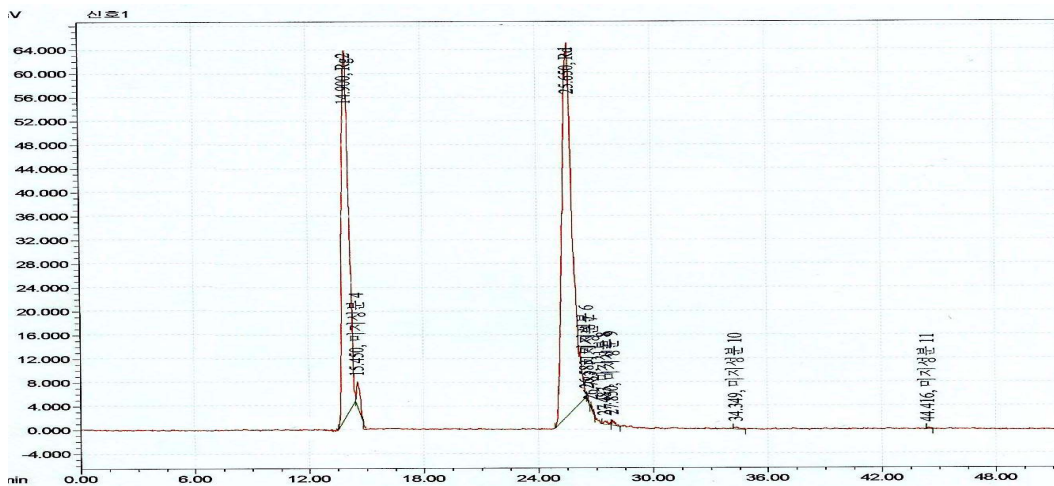


Fig. 31. HPLC analysis of the strain EM6(6)-a (ELSD detector).

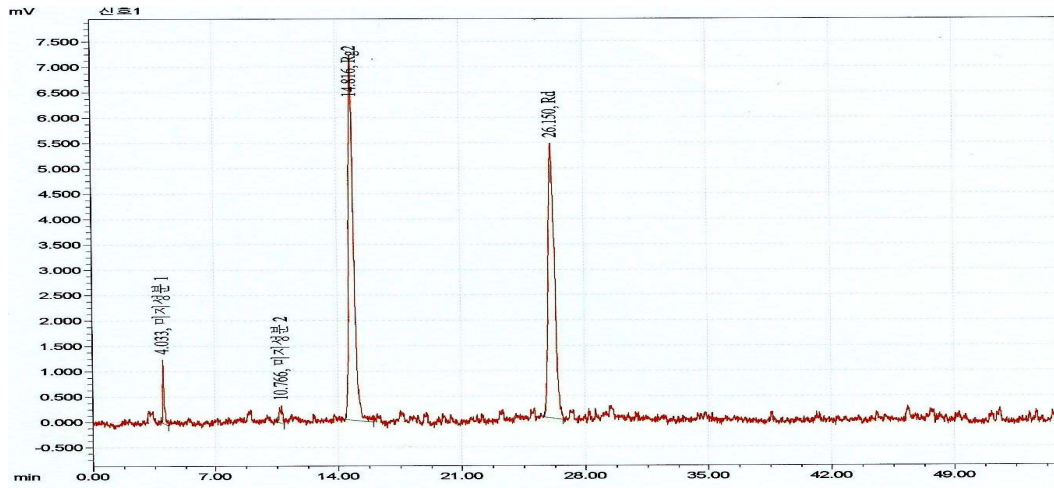
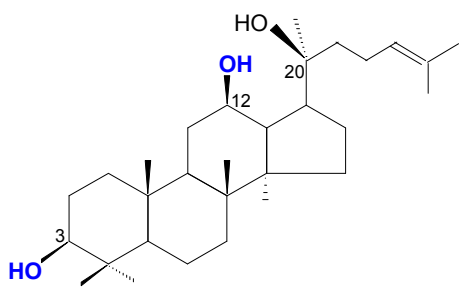
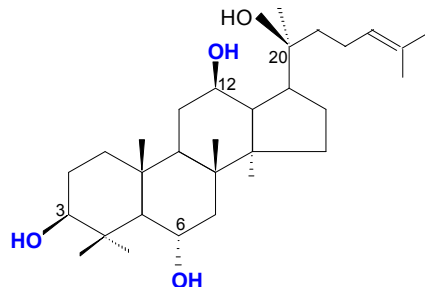


Fig. 32. HPLC analysis of the strain BT1 (ELSD detector).

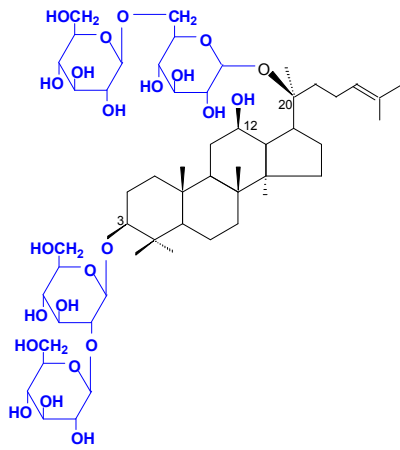
HPLC 결과를 TLC 분석결과(Fig. 21)와 비교하여 볼 때 ginsenoside Rd로 인식된 peak는 Rd가 아닌 극성이 유사한 물질 즉 gypenoside XVII로 추정된다. 또한 TLC 분석에서 Rg3보다 R_f 값이 약간 높게 나타난 미지물질은 HPLC분석에서 Rg2로 인식이 되어 나타났지만 Fig. 33에 나타낸 구조식을 보면 반응에 사용한 인삼사포닌은 aglycone의 3번과 12번에 OH기가 2개인 protopanaxadiol 계사포닌인 ginsenoside Rb1으로서 aglycone의 3번, 6번 및 12번에 OH기가 3개 결합되어 있는 protopanaxatriol계 사포닌인 ginsenoside Rg2가 될 가능성이 전혀 없다. 즉 HPLC 분석에서 Rg2로 인식되어진 것은 Rg2, Rg3가 다 아닌 극성이 유사한 F2로 사료된다.



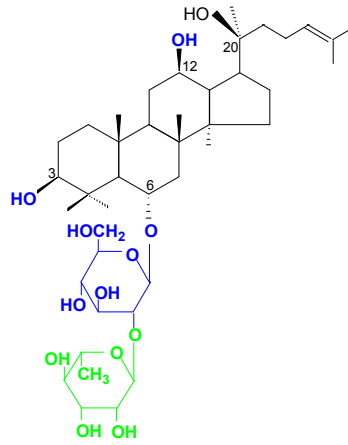
Aglycone-protopanaxadiol



Aglycone-protopanaxatriol



Ginsenoside Rb1



Ginsenoside Rg2

Fig. 33. The structure of aglycone-protopanaxadiol, aglycone-protopanaxatriol, ginsenoside Rb1 and ginsenoside.

BT3, BT9, BT14 균주는 TLC상에서 ginsenoside Rd, Rg3보다 R_f 값이 약간 높게 나타난 미지 물질 및 compound K가 동시에 나타난 처리구이다. BT9와 BT14 균주에서 머무

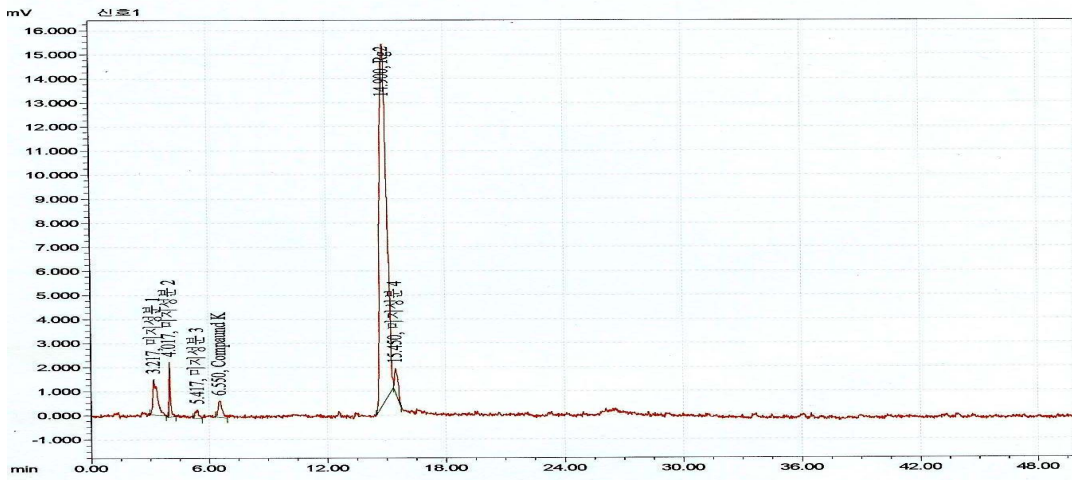


Fig. 34. HPLC analysis of the strain BT3 (ELSD detector).

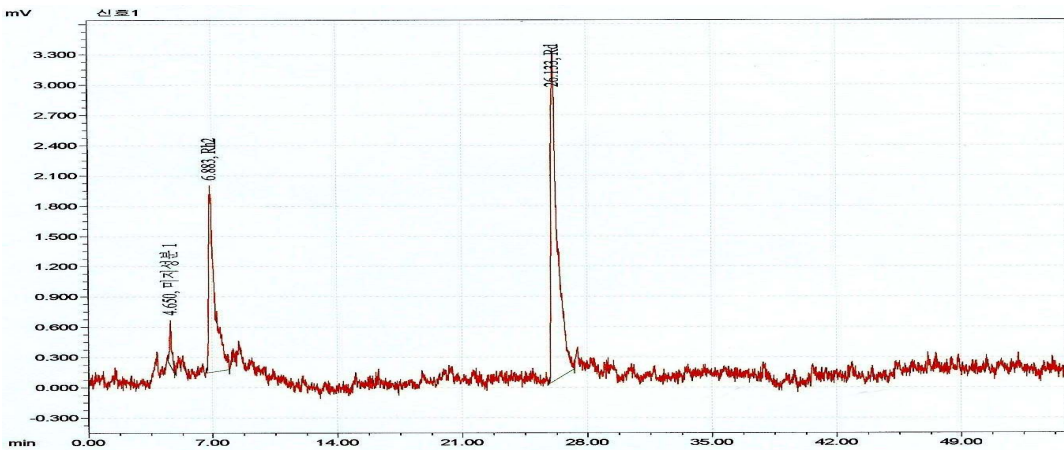


Fig.35. HPLC analysis of the strain BT9 (ELSD detector).

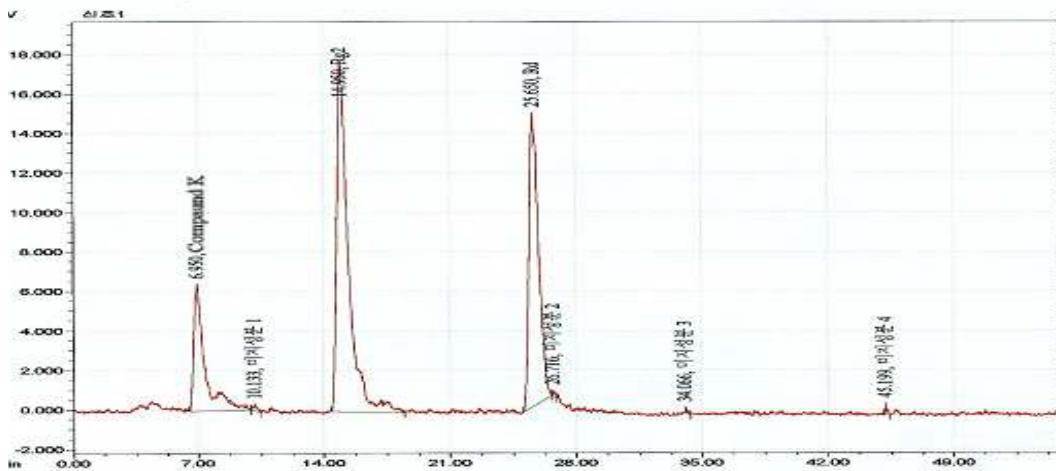


Fig. 36. HPLC analysis of the strain BT14 (ELSD detector).

름 시간 26.1 min과 25.7 min에 ginsenoside Rd peak가 나타났고 BT3과 BT14 균주에서 머무름 시간 14.9 min에 Rg2로 감지된 Rg3보다 R_f 값이 약간 높게 나타난 미지 물질의 peak가 나타났으며 BT3, BT9와 BT14 균주에서 머무름 시간 6.5 min, 6.9 min과 6.3 min에서 compound K의 peak가 나타났다(Fig. 34-36). BT9 균주에서 Rd 및 compound K의 peak는 BT3과 BT14 균주에 비해 약간 높게 나타냈는데 이것은 peak가 전체적으로 약간 뒤로 미루어진 원인으로 볼 수 있다.

EM3(2)-a 균주는 1차년도 균주들 중 유일하게 TLC상에서 Rg3가 확인이 된 균주이다. EM3(2)-a 균주의 HPLC 분석결과 TLC (Fig. 21)에서와 마찬가지로 상당량의 Rd가 감

지되었다(Fig. 37).

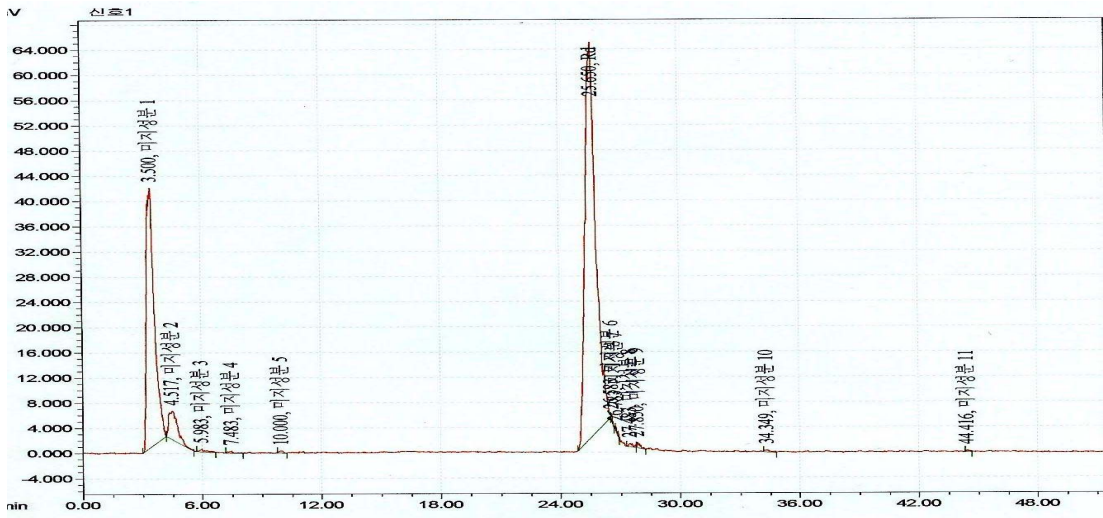


Fig. 37. HPLC analysis of the strain EM3(2)-a (ELSD detector).

앞부분의 3.5min에서 적지 않은 물질이 감지되었지만 극성이 매우 낮은 것으로 보아 ginsenoside PPD 일가능성도 배제 할 수 없지만 당 한 분자 차이에 따른 극성차이가 너무 크기 때문에 단정 지을 수 없으며 지표물질과의 비교가 요구되어 진다.

Fig. 38는 GS 514의 HPLC 분석 결과이다. TLC 분석 결과(Fig. 22-37)에서 ginsenoside Rg3의 농도가 작아 반응시간을 연장시켜 HPLC 분석을 수행하였다.

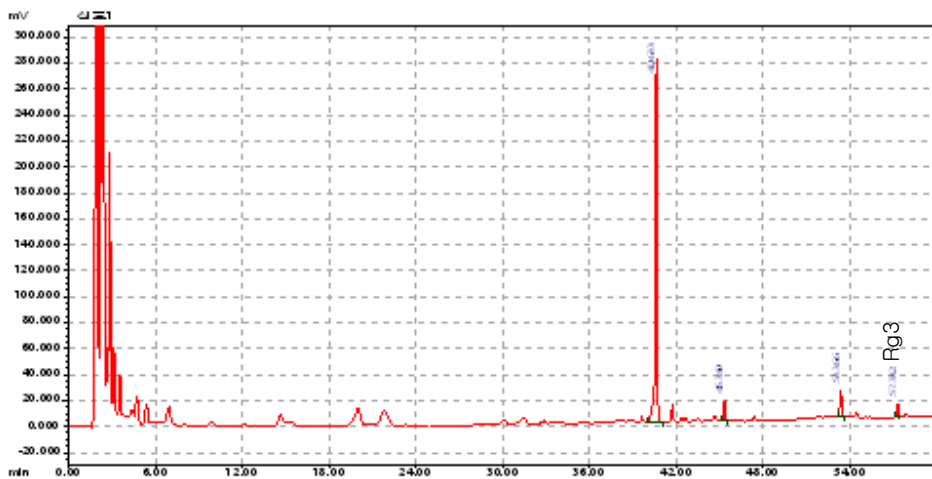


Fig. 38. HPLC analysis of the strain GS514 (UV detector).

HPLC 분석에서 비록 peak는 아주 작지만 머무름 시가 57.382 min에 ginsenoside Rg3를 확인 할 수 있었다.

대부분의 HPLC 분석은 TLC 분석 결과와 비교하였을 때 유사한 결과를 나타냈다. 하지만 ginsenoside Rg3보다 R_f 값이 조금 높게 나타난 물질과 ginsenoside Rd보다 R_f 값이 조금 낮게 나타난 미지 물질은 HPLC 분석에서 각각 극성이 유사한 ginsenoside Rg2, ginsenoside Rd로 감지되었다. 따라서 이미 확정이 되었다고 판정되는 물질, TLC 상에서나 HPLC 분석에서 확정이 되지 않은 미지 물질들, 나아가서 ginsenoside Rg3와 같이 20번 수산기의 위치가 다름에 따라 R-form과 S-form의 Rg3로 구분되는 물질들의 더욱 정확한 구조 동정을 위하여 NMR분석을 수행하였다.

라. NMR분석에 의한 Rb1전환산물 구조 동정

1) Ginsenoside Rd, F2, Compound K의 구조동정

BT3 균주를 LB배지에서 배양한 후 ginsenoside Rb1과 시간별로 반응시켜 TLC (Fig. 39)로 확인한 후 각각의 전환산물을 silica gel column을 이용하여 분리하였다.

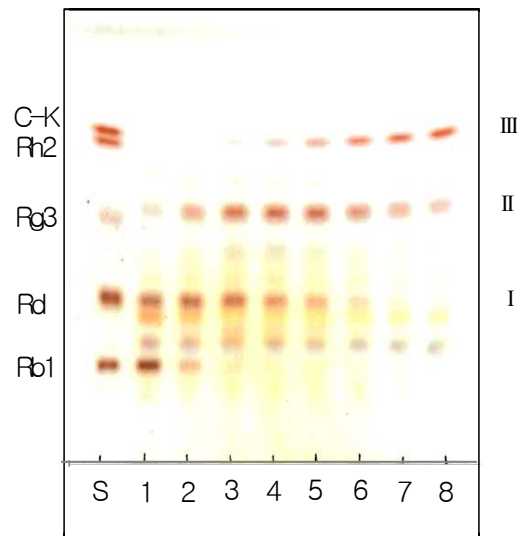


Fig. 39. TLC analysis of reaction between strain BT3 and ginsenoside Rb1 by reaction time.

(1) Ginsenoside Rd 구조동정

Fig. 40과 41은 각각 BT3 균주와 ginsenoside Rb1의 반응전환산물 I (standard Rd와 같은 R_f값에 나타남)의 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR 분석이다.

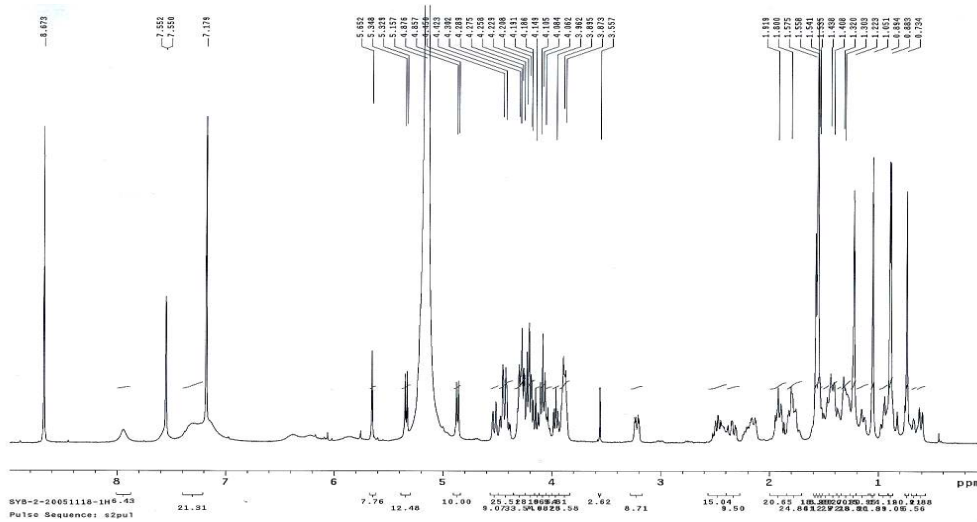


Fig. 40. ¹H-NMR analysis of metabolite I converting ginsenoside Rb1 by strain BT3. 400 MHz; solvent, pyridine-d₅.

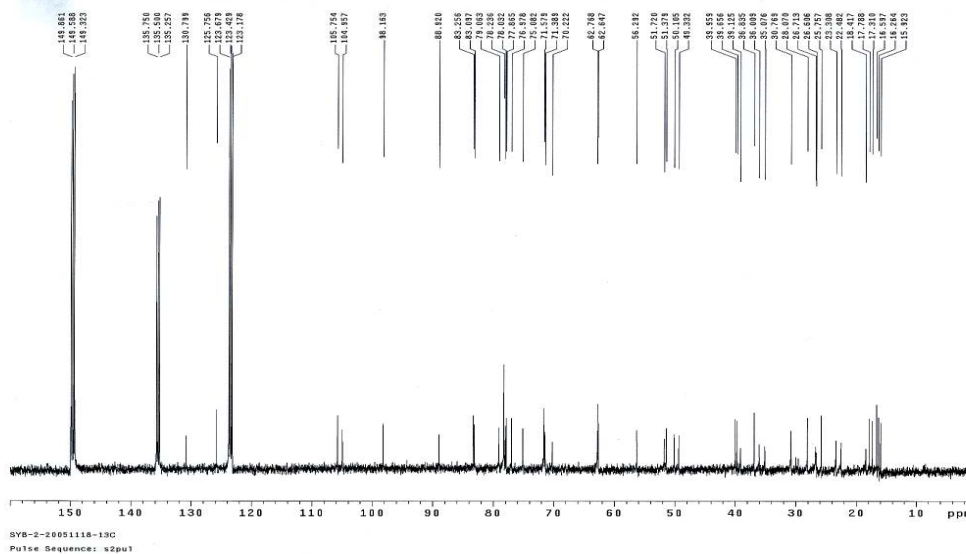


Fig. 41. ¹³C-NMR analysis of metabolite I converting ginsenoside Rb1 by strain BT3. 100 MHz; solvent, pyridine-d₅

전환산물 I : white powder; mp.: 204~206 °C; $^1\text{H-NMR}$ (pyridine- d_5 , 400 MHz, δ): 0.73 ppm (3H, s, H-19), 0.88 ppm (3H, s, H-30), 0.89 ppm (3H, s, H-18), 1.05 ppm (3H, s, H-29), 1.22 ppm (3H, s, H'-28), 1.56 ppm (6H, s, H-26, H-27), 1.58 ppm (3H, s, H-21), 4.87 ppm [1H, d, $J=7.6\text{Hz}$, H'-1], 5.14 ppm [1H, d, $J=7.6\text{Hz}$, H'''-1], 5.34 ppm [1H, d, $J=7.6\text{Hz}$, H''-1]. $^{13}\text{C-NMR}$ (pyridine- d_5 , 100 MHz, δ): 39.1 (C-1), 26.6 (C-2), 88.9 (C-3), 39.7 (C-4), 56.3 (C-5), 18.4 (C-6), 35.1 (C-7), 40.0 (C-8), 50.1 (C-9), 36.8 (C-10), 30.8 (C-11), 70.2 (C-12), 49.3 (C-13), 51.4 (C-14), 30.8 (C-15), 26.7 (C-16), 51.7 (C-17), 16.3 (C-18), 15.9 (C-19), 83.3 (C-20), 22.5 (C-21), 36.0 (C-22), 23.3 (C-23), 125.8 (C-24), 130.8 (C-25), 25.8 (C-26), 17.8 (C-27), 28.1 (C-28), 16.6 (C-29), 17.3 (C-30), 105.0 (C'-1), 83.1 (C'-2), 77.9 (C'-3), 71.6 (C'-4), 78.2 (C'-5), 62.6 (C'-6), 105.8 (C''-1), 77.0 (C''-2), 79.1 (C''-3), 71.4 (C''-4), 78.0 (C''-5), 62.6 (C''-6), 98.2 (C'''-1), 75.1 (C'''-2), 78.2 (C'''-3), 71.6 (C'''-4), 78.2 (C'''-5), 62.8 (C'''-6).

BT3 균주와 ginsenoside Rb1의 반응전환산물 I의 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 분석 결과는 ginsenoside Rd의 NMR data (Dong *et al.* 2003)와 유사한 위치에서 나타나 ginsenoside Rd로 구조 동정 되었다.

(2) Ginsenoside F2 구조 동정

Fig. 42과 43은 각각 BT3 균주와 ginsenoside Rb1의 반응전환산물 II (standard Rg3보다 R_f 값이 약간 높게 나타난 미지 물질)의 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 분석이다.

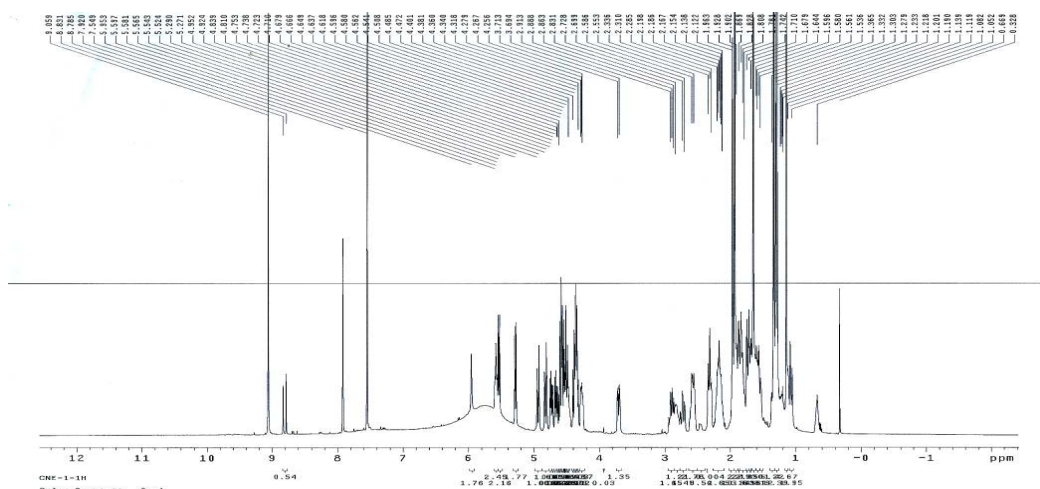


Fig. 42. ^1H -NMR analysis of metabolite II converting ginsenoside Rb1 by strain BT3. 400 MHz; solvent, pyridine- d_5 .

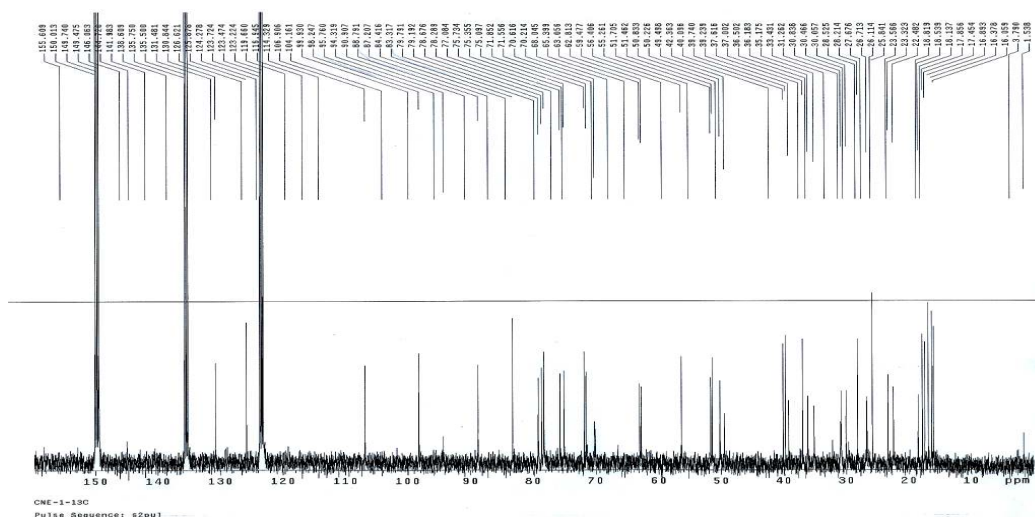


Fig. 43. ^{13}C -NMR analysis of metabolite II converting ginsenoside Rb1 by strain BT3. 100 MHz; solvent, pyridine- d_5 .

전환산물 II: white powder; mp.: 184~186 °C; ^1H -NMR (pyridine- d_5 , 400 MHz, δ): 0.81 ppm (3H, s, H-19), 0.95 ppm (3H, s, H-30), 0.97 ppm (3H, s, H-18), 1.00 ppm (3H, s, H-29), 1.31 ppm (3H, s, H-28), 1.60 ppm (3H, s, H-26, H-27), 1.63 ppm (3H, s, H-21),

4.95 ppm (1H, d, J=7.6Hz, H'-1), 5.20 ppm (1H, d, J=7.6Hz, H'''-1).

¹³C-NMR (pyridine-d₅, 100 MHz, δ): 39.2 (C-1), 26.8 (C-2), 88.8 (C-3), 39.9 (C-4), 56.4 (C-5), 18.5 (C-6), 35.2 (C-7), 40.1 (C-8), 50.2 (C-9), 37.0 (C-10), 30.8 (C-11), 70.1 (C-12), 49.5 (C-13), 51.5 (C-14), 31.0 (C-15), 26.7 (C-16), 51.7 (C-17), 16.4 (C-18), 16.0 (C-19), 83.3 (C-20), 22.5 (C-21), 36.2 (C-22), 23.3 (C-23), 126.6 (C-24), 131.5 (C-25), 25.8 (C-26), 17.8 (C-27), 28.2 (C-28), 16.9 (C-29), 17.4 (C-30), 106.9 (C'-1), 75.7 (C'-2), 78.7 (C'-3), 71.6 (C'-4), 78.3 (C'-5), 62.8 (C'-6), 98.2 (C'''-1), 75.1 (C'''-2), 79.2 (C'''-3), 71.8 (C'''-4), 78.4 (C'''-5), 63.0 (C'''-6).

BT3 균주와 ginsenoside Rb1의 반응전환산물Ⅱ의 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR분석 결과는 ginsenoside F2의 NMR data(Dou *et al.* 1997)와 유사한 위치에서 나타나 ginsenoside F2로 구조동정 되었다.

(3). Compound K의 구조동정

Fig. 44과 45는 각각 BT3 균주와 ginsenoside Rb1의 반응전환산물Ⅲ(standard compound K와 같은 R_f 값에 나타남)의 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR 분석이다.

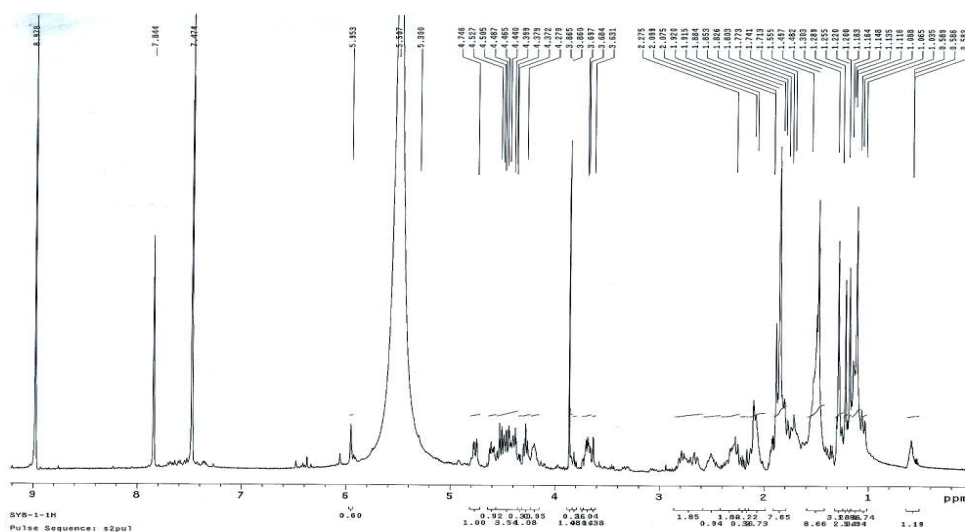


Fig. 44. ¹H-NMR analysis of metaboliteⅢ converting ginsenoside Rb1 by strain BT3. 400 MHz; solvent, pyridine-d₅.

2) Gypenoside XVII의 구조동정

GS 603 균주를 LB배지에서 배양한 후 ginsenoside Rb1과 48h 반응시켜 TLC로 확인한 후 각각의 전환산물을 silica gel column을 이용하여 분리하였다 (Fig. 46).

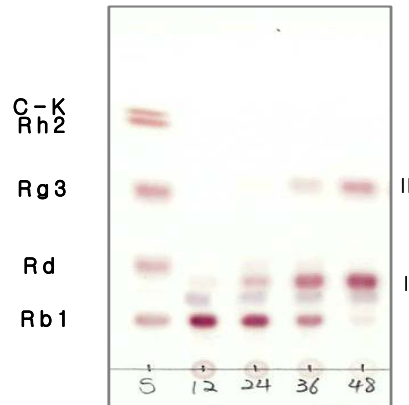


Fig. 46. TLC analysis of reaction between strain GS603 and ginsenoside Rb1 by reaction time.

Fig. 47와 48는 각각 GS603 균주와 ginsenoside Rb1의 반응전환산물 I (standard ginsenoside Rd보다 Rf값이 약간 낮게 나타난 미지 물질)의 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 분석이다. 분해산물 II는 이미 위에서 ginsenoside F2로 동정이 되었다(Fig. 42, Fig. 43).

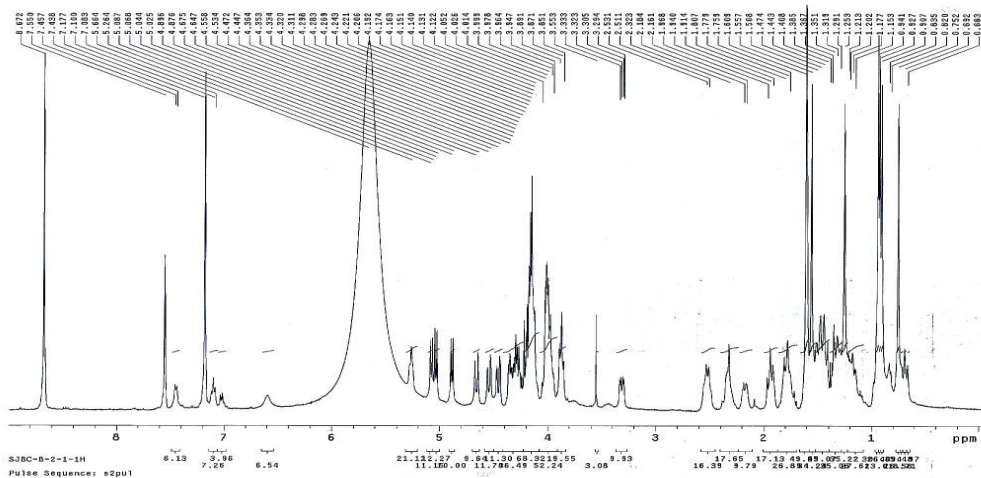


Fig. 47. $^1\text{H-NMR}$ analysis of metabolite I converting ginsenoside Rb1 by strain GS603. 400 MHz; solvent, pyridine- d_5 .

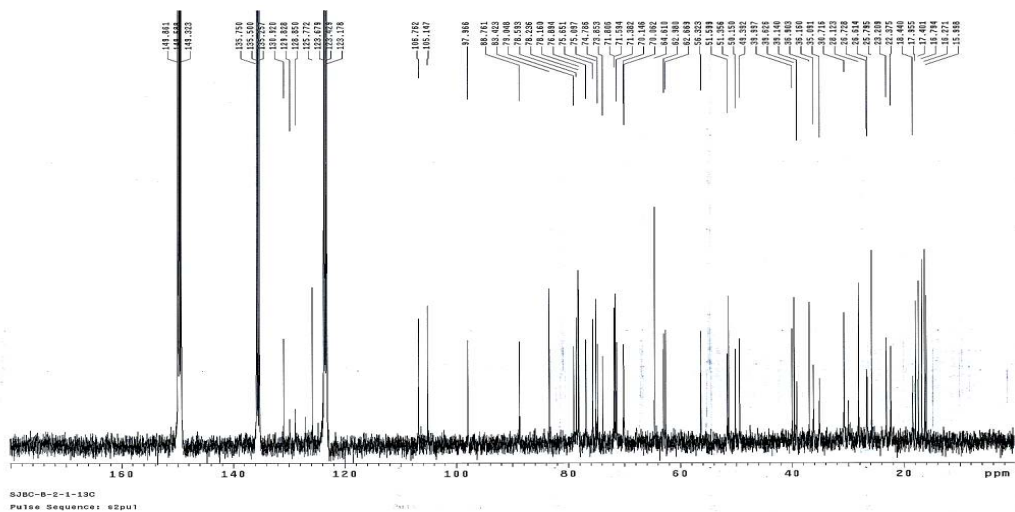


Fig. 48. ^{13}C -NMR analysis of metabolite I converting ginsenoside Rb1 by strain GS603. 100 MHz; solvent, pyridine- d_5 .

분해산물 I : ^1H -NMR (pyridine- d_5 , 400MHz, δ): 0.75ppm(3H, s, H-19), 0.91ppm(3H, s, H-18), 0.93ppm(3H, s, H-30), 0.94ppm(3H, s, H-29), 1.25ppm(3H, s, H-28), 1.56ppm(3H, s, H-26), 1.61ppm(3H, s, H-21), 1.61ppm(3H, s, H-27), 4.89ppm[1H, d, $j=8.0$ Hz, H'-1], 5.03ppm[1H, d, $j=7.6$ Hz, H''-1], 5.08ppm[1H, d, $j=7.6$ Hz, H'''-1]. 그중 H-21번 메틸기의 3개수소의 signal은 H-27번 메틸기의 3개 수소의 signal에 겹쳐 나타났다.

^{13}C -NMR (pyridine- d_5 , 100 MHz) :39.1 (C-1), 26.6 (C-2), 88.8 (C-3), 39.6 (C-4), 56.3 (C-5), 18.4 (C-6), 35.1 (C-7), 40.0 (C-8), 50.1 (C-9), 36.9 (C-10), 30.7 (C-11), 70.1 (C-12), 49.4 (C-13), 51.3 (C-14), 30.7 (C-15), 26.7 (C-16), 51.6 (C-17), 16.0 (C-18), 16.3 (C-19), 83.4 (C-20), 22.4 (C-21), 36.2 (C-22), 23.2 (C-23), 125.8 (C-24), 130.9 (C-25), 25.8 (C-26), 17.9 (C-27), 28.1 (C-28), 16.8 (C-29), 17.4 (C-30), 106.8 (C'-1), 75.6 (C'-2), 78.6 (C'-3), 71.8 (C'-4), 78.2 (C'-5), 63.0 (C'-6), 98.0 (C''-1), 74.8 (C''-2), 79.0 (C''-3), 71.4 (C''-4), 76.9 (C''-5), 70.1 (C''-6), 105.13 (C'''-1), 75.1 (C'''-2), 78.2 (C'''-3), 71.6 (C'''-4), 78.2 (C'''-5), 62.7 (C'''-6).

GS603 균주와 ginsenoside Rb1의 반응전환산물 I의 ^1H -NMR과 ^{13}C -NMR분석 결과는 gypenoside XVII의 NMR data(Teng *et al.* 2002)와 유사한 위치에서 나타나 gypenoside XVII로 구조동정이 되었다.

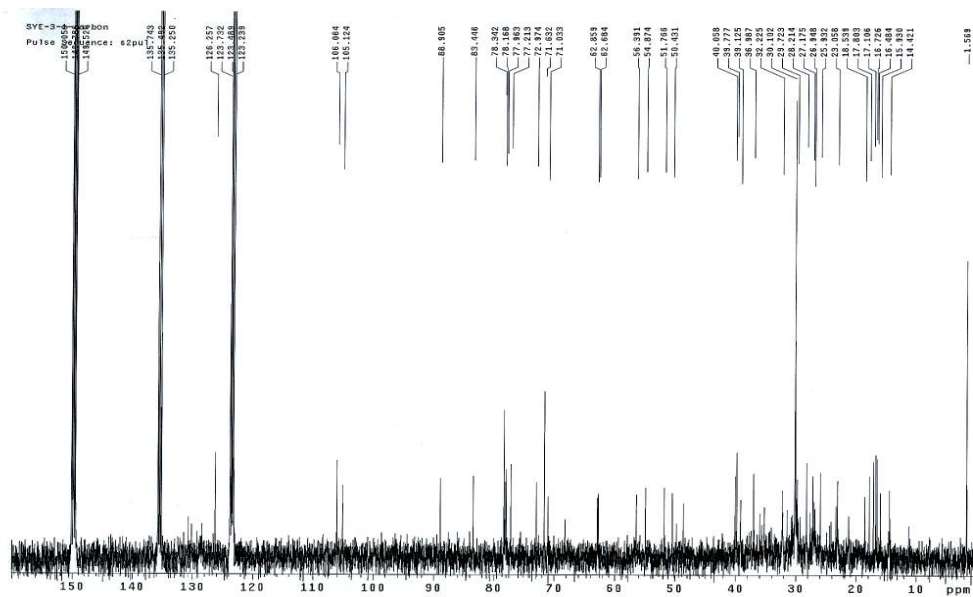


Fig. 51. ^{13}C -NMR analysis of metabolite converting ginsenoside Rb1 by strain GS514. 100 MHz; solvent, pyridine- d_5 .

분해산물: ^1H -NMR (pyridine- d_5 , 400 MHz, δ): 0.77 ppm (3H, s, H-19), 0.93 ppm (6H, s, H-18, H-30), 1.08 ppm (3H, s, H-29), 1.26 ppm (3H, s, H-28), 1.44 ppm (3H, s, H-21), 1.59 ppm (3H, s, H-27), 1.62 ppm (3H, s, H-26), 4.91 ppm [1H, d, $J=6.8\text{Hz}$, H'-1], 5.36 ppm [1H, d, $J=7.2\text{Hz}$, H''-1].

^{13}C -NMR (pyridine- d_5 , 100 MHz)는 Table 23에 나타냈다.

Table 23. ^{13}C -NMR Chemical shift of material Rg3 (100 MHz, solvent: pyridine- d_5).

Carbon site	20(R)-Rg3 (ppm)*	20(S)-Rg3 (ppm)*	sample (ppm)	Carbon site	20(R)-Rg3 (ppm)*	20(S)-Rg3 (ppm)*	sample (ppm)
Aglycone moiety				Aglycone moiety			
C-1	39.2	39.2	39.1	C-27	17.7	17.1	17.1
C-2	26.7	26.8	26.9	C-28	28.2	28.2	28.2
C-3	89.0	89.0	88.9	C-29	16.6	16.7	16.7
C-4	39.8	39.8	39.8	C-30	17.4	17.8	17.8
C-5	56.4	56.5	56.4	sugar			

C-6	18.5	18.5	18.5	moiety			
C-7	35.2	35.3	35.2	C'-1	105.2	105.2	105.1
C-8	40.0	40.1	40.1	C'-2	83.5	83.5	83.4
C-9	50.4	50.5	50.4	C'-3	78.0	78.0	78.0
C-10	37.0	37.0	37.0	C'-4	71.8	71.8	71.6
C-11	32.2	32.1	32.2	C'-5	78.1	78.3	78.3
C-12	70.9	71.0	71.0	C'-6	62.9	62.9	62.8
C-13	49.3	48.7	48.7	C''-1	106.1	106.1	106.1
C-14	51.9	51.8	51.8	C''-2	77.2	77.2	77.2
C-15	31.5	31.4	31.5	C''-3	78.4	78.4	78.3
C-16	26.8	26.9	27.2	C''-4	71.7	71.7	71.6
C-17	50.7	54.9	54.9	C''-5	78.3	78.2	78.2
C-18	15.9	15.9	15.9	C''-6	62.8	62.8	62.7
C-19	16.4	16.4	16.5				
C-20	73.0	73.0	73.0				
C-21	22.8	28.2	27.2				
C-22	43.3	36.0	36.0				
C-23	22.7	23.1	23.0				
C-24	126.1	26.4	126.3				
C-25	130.8	130.8	130.8				
C-26	25.9	25.9	25.9				

Ginsenoside Rg₃는 Fig. 52와 같이 20번 탄소의 OH기 위치가 다름에 따라 R-form과 S-form으로 나뉘며 R-form과 S-form은 ¹³C-NMR에서 C-17, 21, 22위치에서 큰 차이를 나타낸다(Teng *et al.*, 2000). 즉 C-17과 C-21의 signal은 S-form이 R-form에 비해 훨씬 저자장에서 나타나고 C-22의 signal은 S-form이 R-form에 비해 훨씬 고자장에서 나타난다.

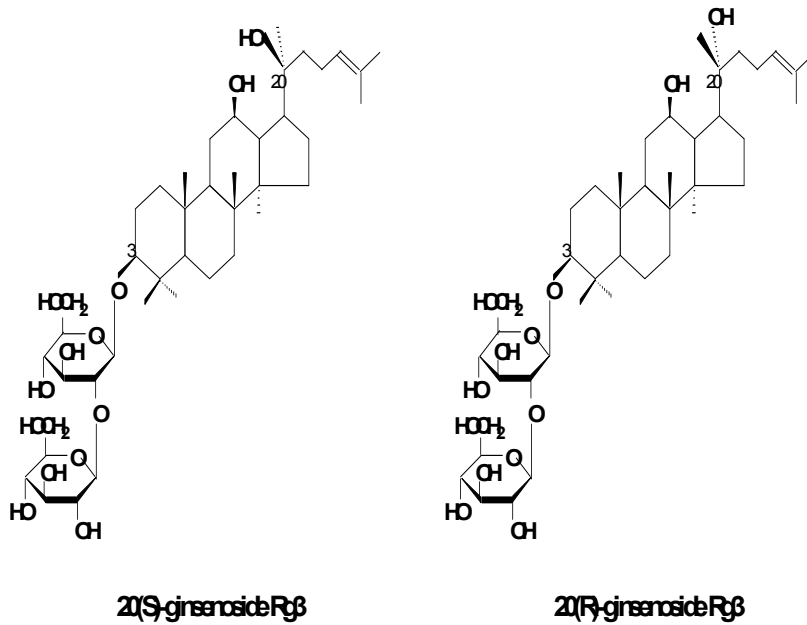


Fig. 52. The structure of 20(S) and 20(R)-ginsenoside Rg₃

Ginsenoside Rb1과 β -glucosidase 활성균주와의 반응에서 생성된 Rg₃는 Table 23에서 보다시피 C-17, 21, 22위치의 탄소 signle이 S-form과 완전히 일치하였다. 따라서 이 대사 산물은 20(S)-ginsenoside Rg₃로 구조 동정 하였다.

제 4 절 인삼근권 토양으로부터 ginsenoside Rg₃생산효소 분리 및 동정

Ginsenoside Rb1과 esculin방법으로 분리한 β -glucosidase 분비미생물의 반응을 통하여 ginsenoside Rd, Rg₃, F2, compound K 및 gypenoxide XVII등 사포닌으로의 전환능력을 TLC, HPLC 및 NMR분석을 통하여 확인하였다. 본 연구과제는 “인삼근권 토양미생물을 이용한 인삼 생리활성물질 ginsenoside Rg₃의 생산에 관한 연구”로서 GS 514균주에서 ginsenoside Rg₃생산효소의 분리에 초점을 두었다.

1. 재료 및 방법

가. 재료

균은 Difco사의 Nutrient media, trypticase soy media, Luria-Bertani media 배지(조성 및 함량은 표 11~15에 나타냄)에서 배양되었다. 화기삼으로부터 HP-20수지 흡착법을 이용하여 분리한 ginsenoside Rb1은 반응기질용으로 사용하였고 KT&G에서 분양받은 Rb1, Rd, Rg3, Rh2, C-K는 standard로 사용하였다. 유도물질로 사용된 홍삼엑기스는 정관장을, 인삼분말은 부여홍삼을, 잎사포닌은 중국 Fusong에서 구입하여 사용하였고 2-D용 IPG Buffer(pH 3-11 NL)은 Amersham Biosciences의 제품을 구입하여 사용하였다. TLC (Thin Layer Chromatography, 60 F-254 Silica gel plate)는 Merck사의 것을 구입하여 사용하였고 효소분리에 사용한 DEAE-cellulose DE-52수지는 Whatman사, Mono Q column은 Pharmacia사, gel chromatography에는 superdex 200(No. 9636019)FPLC기기는 Pharmacia LKB-Programmer GP-250 Plus 모델, 단백질 전기영동 기기는 Amersham Biosciences SE 250 Mini-format Vertical Unit for two gels 및 Amersham Biosciences US/80-6485-08 Ettan DALT Six large Vertical system을 사용하였고 silver염색은 (주)바이오세상의 EZ-Silver Staining Kit for protein을 사용하였다.

나. 방법

1) GS514균주에 의한 ginsenoside Rg3생산효소의 생산 최적조건

(1) 배지선별

GS514 균주를 nutrient agar에 배양한 후 single colony를 5ml씩 culture 한 후 LB, SB, NB, PY(Pepton + yeast + NaCl) 액체배지에 접종하고 27°C, 150rpm조건으로 Shaking Incubator에서 48 h 배양하였다. 균배양액은 spectrophotometer로 600nm에서 0.5, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48 h 간격으로 O.D값을 측정하여 균의 성장속도를 비교하고 12h 배양액은 각각 ginsenoside Rb1과 반응시켜 ginsenoside Rg3생산여부를 확인하였다.

(2) 배양온도가 균 생장에 미치는 영향

GS 514 균주를 LB broth에 같은 조건으로 접종 후 각각 22, 27, 32, 37℃에서 24시간 배양하고 600nm에서 O.D값을 측정하여 적절한 균배양온도를 확립하였다.

(3) PH조건이 균 생장에 미치는 영향

LB broth를 HCl과 NaOH수용액으로 각각 PH 5.5, 6.0, 6.25, 6.5, 6.75, 7.0, 7.5, 8.0으로 조절한 후 27℃에서 48시간 배양하고 600nm에서 O.D값을 측정하여 적절한 pH조건을 확립하였다.

(4) 유도물질의 첨가가 Rg3생산효소 생산에 미치는 영향

LB broth에 균을 일정량 접종 후 각각 LB배지양의 1.5, 1.75, 2.0, 2.25, 2.5% (w/w, E1~E5) 홍삼농축액, 5, 6%(w/w, P1, P2)) 인삼분말, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8%(w/w, C1~C5) 잎조사포닌을 첨가하여 27℃와 32℃에서 48 h 배양하였다. 균이 자란 처리구는 10000 g에서 5분간 원심분리 한 후 ginsenside Rb1과 반응시켜 TLC 분석을 통하여 Rg3생산효소 활성을 확인하였다.

(5) 균주배양 시 O.D값에 따른 유도물질의 첨가시기가 Rg3생산효소 생산에 미치는 영향

LB broth에 균을 일정량 접종 후 27℃, 160 rpm에서 시간별로 배양하여 O.D₆₀₀값을 측정하고 O.D값별로 유도물질 잎사포닌을 LB배지양의 0.6~0.8% 양으로 첨가하여 24 h 배양하였다. 균배양액은 10000 g에서 5분간 원심분리 한 후 ginsenside Rb1과 반응시켜 TLC 분석을 통하여 Rg3생산효소활성을 확인하였다.

(6) 균주배양 시 유도물질의 첨가 함량 및 유도물질 첨가 후 균주배양시간이 Rg3생산효소 생산에 미치는 영향

LB broth에 균을 일정량 접종 후 27°C, 160 rpm에서 O.D₆₀₀값이 0.5~0.8정도로 배양 후 유도물질 잇사포닌을 LB배지양의 0.6, 0.8, 1.0, 1.2% 양으로 첨가하여 각각 24, 36, 48 h 배양하였다. 균배양액은 10000 g 에서 5분간 원심분리 한 후 ginsenside Rb1과 반응시켜 TLC 분석을 통하여 Rg3생산효소활성을 확인하였다.

(7) Ginsenoside Rb1과 GS 514 균주 배양여액과의 반응산물에 대한 HPLC분석

GS 514 균주를 LB배지에서 O.D₆₀₀값이 0.5~0.8정도로 배양 후 유도물질 잇사포닌을 LB 배지양의 1.2%를 첨가하고 24 h 배양하였다. 균배양액은 10000 g에서 5분간 원심분리 한 후 배양여액은 ginsenside Rb1과 반응시킨 후 수포화부탄올로 2회 반복 추출하고 감압농축하였다. 잔여물은 HPLC용 MeOH에 용해시키고 아래와 같은 분석조건으로 HPLC 분석을 수행하였다(Table 24).

HPLC 분석 조건:

HPLC기기: Waters-2695, 2996 DAD

Column: Hypersil ODS2 (250*4.6 mm, 5 μm)

Flow rate: 1.0ml/min

Mobiler phase: A-acetonitrile (Merck); B-water (MiliQ)

Table 24. The composition of mobile phase in HPLC analysis

Time (min)	A(%)	B(%)
0.01	20.0	80.0
20.00	20.0	80.0
31.00	32.0	68.0
40.00	43.0	57.0
70.00	100.0	0
80.00	100.0	0

2) Ginsenoside Rg3생산효소의 분리

(1) Ginsenoside Rb1으로부터 Rg3로의 전환 pathway

(가) Rg3생산균주 조효소액의 조제

① 균주 배양여액조제

GS514 균주를 앞서 언급한 “GS514균주에 의한 ginsenoside Rg3생산효소의 생산 최적조건, (7) Ginsenoside Rb1과 GS 514 균주 배양여액과의 반응산물에 대한 HPLC분석”의 배양방법으로 유도물질을 처리하여 LB배지에서 1L 배양한 후 9000 g, 4℃에서 1 h 원심분리하였다. 상층액은 조심히 1L 삼각플라스크에 넣고 4℃에서 방치하여 배양여액을 만든다. 배양여액은 ginsenoside Rb1과 반응시켜 Rg3생산효소활성을 체크한다.

② 염석

활성이 체크된 배양여액 1L에 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 472 g을 stirring하면서 4℃환경에서 조심히 첨가하여 70% 포화용액을 만든다. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 가 완전히 용해되면 냉장고의 냉장실(4℃)에서 overnight하여 단백질을 침전시킨다.

③ 투석

70% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 포화용액의 단백질 침전은 4℃에서 10000 g로 1시간 원심분리하여 상층액은 버리고 침전단백질은 소량의 20mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 용해시킨다. 단백질 용액은 MWCO 3000 membrane을 이용하여 1L의 20mM sodium phosphate buffer에 2일 투석하여 염과 작은 분자량의 펩티드를 제거한다 (투석과정중 20mM sodium phosphate buffer를 4번 교체해준다). 투석액은 원심분리를 통하여 불용성물질을 제거하고 0.45 μm membrane filter로 여과하여 column 분리용 조효소액으로 하였다.

(나) Mono QTM column에 의한 조효소의 분리

염석과 투석을 통한 조효소액은 Mono QTM column을 이용하여 아래와 같은 조건으로 FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)를 수행하였다.

FPLC 분석조건:

Column: Mono Q™

Elution buffer:

A: 20mM Tris-HCl, PH 8.0

B: 20mM Tris-HCl, PH 8.0, 1M NaCl

Flow rate: 1ml/min

Detector: UV, 280nm

ABS Unit: 1

Injection volume: 0.5ml

Fraction volume : 1ml

Table 25. The composition of mobile phase in HPLC analysis

Time (min)	A(%)	B(%)
0-5	100	0
5-25	0	100
25-30	0	100
30-35	100	0

(다) Ginsenoside Rb1으로부터 Rg3로의 전환 pathway 탐색

Mono Q™ column을 통하여 받은 각각의 분액은 각각 ginsenoside Rb1 및 Rd와 반응시키고 TLC 분석을 통하여 Rg3생산효소를 확인하고 ginsenoside Rb1으로부터 Rg3로의 전환 pathway를 결정하였다.

(2) Ginsenoside Rd생산효소의 분리

(가) Ginsenoside Rd생산효소의 생산

GS 514 균주를 “ginsenoside Rb1으로부터 Rg3로의 전환 pathway 결정 ①균주 배양여액조제”와 같은 방법으로 조효소액을 조제한다.

(나) Ginsenoside Rd생산효소의 분리

조효소액은 DEAE-cellulose DE-52 column에 흡착시키고 아래와 같은 조건으로 효소를 분리한다.

효소분리 조건:

Column: DEAE-cellulose DE-52 column (ϕ 1.8 X 10 cm)

Elution buffer:

A: 20mM NaOAc-HAc, PH 5.0

B: 60, 120, 180, 240, 300, 400, 500 mM KCl의 20mM sodium acetate buffer

Flow rate: 1ml/min

Detector: UV, 280nm

Injection volume: 12 ml.

Fraction volume: 5 ml.

80 ml의 20mM NaOAc-HAc (pH 5.0) buffer로 먼저 elution한 후 각각 45 ml의 60, 120, 180, 240, 300, 400, 500, 600 mM KCl(20mM NaOAc-HAc, pH 5.0을 포함한) buffer를 순차적으로 elution한다. fraction collector를 이용하여 분취한 짝수번호의 fraction(5 ml)은 ginsenoside Rb1과 반응시켜 Rd생산효소 활성을 체크한다.

(다) Ginsenoside Rd생산효소 분자량 측정

DEAE-cellulose DE-52 column을 통하여 분취한 각각의 fraction에서 ginsenoside Rd생산효소활성이 가장 강하게 나타나는 fraction에 대해 15% SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis, 5% stacking gel)를 실시하고 ginsenoside Rd생산효소의 분자량을 측정하였다.

SDS-PAGE에 사용되는 acrylamide stock solution (solution A), 4×separating gel buffer (solution B); 4×stacking gel buffer (Solution C), 10% ammonium persulfate (APS), electrophoresis buffer), 5×sample buffer, staining solution 및 destaining solution은 Protein Methods (Daniel *et al.* 1996)를 참고하여 조제하였다.

(3) Ginsenoside Rg3생산효소 분리

GS514 균주는 ginsenoside Rb1을 Rd뿐만 아니라 Rg3로까지 전환시킬 수 있는 능력을 나타냈다. Ginsenoside Rg3생산효소는 유도물질의 첨가 하에서 생성된 효소로서 유도물질을 첨가하지 않은 처리구를 대조구로 하여 Fig. 53과 같은 방법으로 Rg3생산효소를 찾았다.

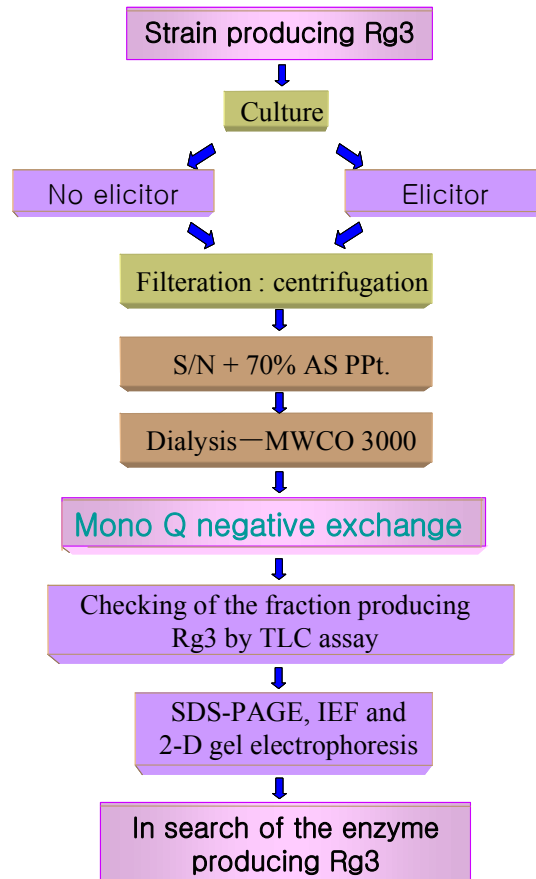


Fig. 53. Schematic representation for isolation of enzyme producing Rg3.

(가) Ginsenoside Rg3생산효소의 생산

“Ginsenoside Rb1으로부터 Rg3로의 전환 pathway결정에서의 ①균주 배양여액조제”와 같은 방법으로 유도물질을 첨가하여 균을 배양하고 염석, 투석을 거쳐 조효소액(이후

treatment로 대체)을 조제하고 동일한 조건에서 유도물질을 첨가하지 않고 균을 배양하여 조효소액(이후 control로 대체)을 조제하였다.

(나) Ion exchange chromatography에 의한 ginsenoside Rg3생산효소의 분리

대부분의 단백질은 음이온 차질을 띄고 있다. 따라서 ginsenoside Rg3생산효소의 분리는 Mono Q™ column을 통하여 분리하였다. Mono Q™ column에 의한 효소의 분리조건은 위의 “ginsenoside Rb1으로부터 Rg3로의 전환 pathway결정에서의 ②염석”의 분리조건으로 하였다.

Treatment와 control에서 Mono Q™ column을 통하여 분취한 각각의 fraction은 ginsenoside Rb1 및 Rd와 반응시켜 활성 fraction을 찾고 ginsenoside 전환활성이 가장 다양하고 강한 fraction은 gel chromatography로 다시 효소분리 하였다.

(다) Gel chromatography 에 의한 Rg3 생산효소 분리

위의 활성 fraction은 아래와 같은 조건으로 gel filtration chromatography를 수행하였다.
분석조건:

column: superdex 200(No. 9636019)

elution buffer: 10mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, PH 7.0;

flow rate: 0.4ml/min;

detector: UV, 280nm; ABS Unit: 2

injection volume: 0.5ml.

각각의 fraction은 Rb1 및 Rd와 반응시켜 활성효소를 체크하였다.

(라) 전기영동에 의한 Rg3생산효소의 분리

① PAGE 영동 및 slice반응

TLC 분석을 통하여 활성이 보이는 분액은 10% PAGE(16×18cm)를 수행하였다. PAGE

에 사용되는 acrylamide stock solution (solution A), 4×separating gel buffer (solution B); 4×stacking gel buffer (Solution C), 10% ammonium persulfate (APS), electrorrhesis buffer), 5×sample buffer, staining solution 및 destaining solution은 Protein Methods (Daniel *et al.* 1996)를 참고하여 조제하였다.

전기영동이 완료 후 separating gel은 0.5 cm간격으로 slice를 만들어 20mM sodium phosphate buffer(PH 7.0)로 분리된 단백질을 추출한 후 Rb1, Rd와 반응시켜 Rg3생산효소의 native상태의 분자량 위치를 판정하였다.

② 2-Dimensional gel electrophoresis

Mono Q column을 통하여 분취한 Rg3생산효소 활성이 가장 큰 fraction은 투석을 거쳐 염을 제거한 후 centricon으로 농축(150 mg/ml)하여 2-D 전기영동 sample로 하였다.

1차원 전기영동(IEF: Isoelectric focusing):

100 µl sample에 250 µl 재수화 용액(rehydration buffer)을 잘 혼합하고 깨끗한 strip hold에 조심스럽게 주입한다. Nonlinear gradient strip(18 cm, pH 3~11) 은 붙어있는 필름을 제거한 후 sample 혼합액이 골고루 묻도록 위에 부착시키고 미네랄 oil로 덮어준다. Strip hold는 뚜껑을 덮은 후 상온에서 over night(약 16시간)하고 IPGphor를 이용하여 각각 500V 1시간, 1000V 1시간, 8000V 6시간 focusing을 실시한다.

2차원 전기영동

12.5% SDS-PAGE (20×26 cm)를 만든다. pH조정용액 I (IPG Buffer 10ml + DTT 0.1 g)을 제조하여 focusing이 끝난 strip이 담겨있는 tube에 5 ml씩 첨가하여 10분간 천천히 교반하여준다. pH조정용액 I 을 버리고 pH 조정용액 II (IPG Buffer 10ml + iodoacetamide 0.25 g)를 조제하여 strip tube에 5 ml씩 첨가하여 10분 천천히 교반하여준다. Strip은 3차 증류수에 세척하여 이미 만들어 진 gel판 위에 올리고 기포를 제거한다. 단백질 marker를 흡수시킨 filter paper를 올리고 밀폐 agar를 천천히 주입하여 strip을 고정시킨 후 Gel 전

기영동을 실시하고 silver염색법으로 염색한다.

Treatment와 control의 2-D전기영동에서 차이나는 spot를 picking하여 amino acid sequencing을 하였다.

(4) Ginsenoside Rg3생산효소를 이용한 ginsenoside Rb1전환율 측정

1 mM Ginsenoside Rb1수용액 72 ml에 “Ginsenoside Rb1으로부터 Rg3로의 전환 pathway 탐색, (가) Rg3생산균주 조효소액의 조제”방법으로 조제한 ginsenoside Rg3생산균주 조효소액 10 ml과 5 M NaCl 용액 5 ml을 혼합하고 30 °C, 160 rpm에서 12 h 반응시켰다. 반응혼합물은 동량의 수포화부탄올로 반복 3 회 추출하고 추출액은 40 °C에서 감압농축한 후 silica gel 60 column을 이용하여 분해산물을 각각 분리하고 분해산물의 전환율을 측정하였다.

2. 결과 및 고찰

가. GS 514균주에 의한 ginsenoside Rg3생산효소의 생산 최적조건

1) 배지선별

GS514 균주를 각각 LB broth (LB), Tryptic soy broth (TSB), Nutrient broth (NB) 에 접종하여 Shaking Incubator에서 배양하여 O.D₆₀₀을 측정한 결과 table 26와 같이 LB와 TSB배지에서 가장 잘 자랐고 NB배지에서는 거의 자라지 않았다.

Table 26. Value of O.D by spectrophotometer for detection of cell growth according to cultured media

Time (h)	LB	TSB	NB	PY
0.5	0.028	0.027	0.020	0.015
4	0.051	0.053	0.029	0.035
8	0.240	0.305	0.090	0.156

12	0.613	0.656	0.095	0.451
16	1.076	0.951	0.089	0.827
24	1.481	1.387	0.093	1.208
48	2.046	2.046	0.021	1.620

각각의 배지에서 12 h 배양액을 ginsenoside Rb1과 같은 체적으로 혼합하여 시간별로 반응시킨 결과는 Fig. 54와 같다.

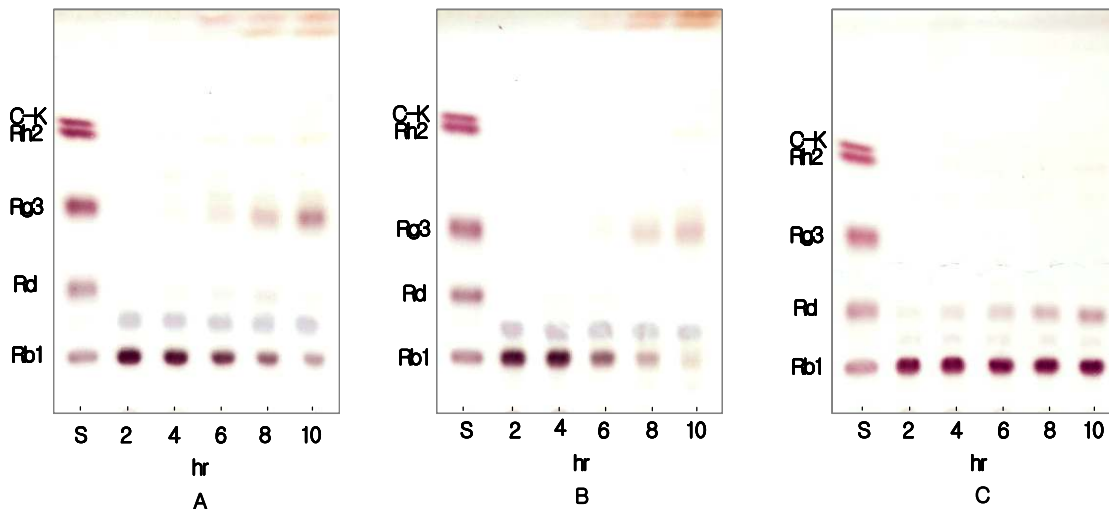


Fig. 54. TLC analysis of transformation of ginsenoside Rb1 by strain GS514 cultured in different media, (a) LB broth, (b) Tryptic soy broth and (c) Nutrient broth. Developing solvent: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:35:10, by vol., lower phase). S: saponin standards.

GS514 균주는 LB배지와 SB배지에서 생장이 양호할 뿐만 아니라 ginsenoside Rb1과의 반응 TLC분석에서 standard Rg3와 같은 Rf값 위치에 Rg3 band를 명확히 확인할 수 있었지만 NB배지에서는 다만 ginsenoside Rd band만 확인이 되고 Rg3 band는 나타나지 않았다. 이것은 GS514 균주가 NB배지에서 잘 자라지 않은 원인으로 추정 된다. 따라서 Rg3 생산효소에 적합한 배지로는 LB배지와 SB배지선택이 적합하지만 LB배지의 가격이 더욱 저렴하기 때문에 GS514 균주배양은 LB배지를 선정하였다.

2) 배양온도가 균 성장에 미치는 영향

GS514 균주를 LB배지에서 22, 27, 32, 37°C 온도별로 배양한 후 O.D₆₀₀ 값을 측정하여 배양온도가 균 성장에 미치는 영향을 조사하였다(table 27).

Table 27. Value of O.D by spectrophotometer for detection of cell growth according to cultured temperature and media

Temp. (°C)	22	27	32	37
O.D ₆₀₀	1.240	1.953	1.616	0.125

실험결과 GS514 균주는 37°C에서 성장속도가 가장 느리고 27°C에서 가장 빠른 성장속도를 보였다. 따라서 GS514 균주의 온도배양조건을 25~28°C로 선정하였다.

3) pH조건이 균 성장에 미치는 영향

LB배지의 pH를 6.0에서 8.0까지 조절한 후 27°C에서 같은 조건으로 배양하고 600nm에서 O.D 값을 측정하였다.

Table 28. Value of O.D₆₀₀ by spectrophotometer for detection of cell growth according to cultured pH, temperature and media

LB배지	5.5	6.0	6.25	6.5	6.75	7.0	7.5	8.0
27°C	1.327	1.988	2.124	2.029	1.843	2.045	2.157	2.159

Table 28에서 보듯이 pH 5.5에서 균생장이 약간 떨어질 뿐 기타 pH조건에서는 O.D₆₀₀ 값이 2.00~2.15사이로서 유사한 성장속도를 보였다. 따라서 LB배지의 pH는 조절하지 않고 자체의 pH조건(pH 7.0 ± 0.2)을 직접 사용하였다.

4) 유도물질의 첨가가 Rg3생산효소 생산에 미치는 영향

GS 514 균주를 LB배지에서 27°C, 160 rpm조건으로 36 h 배양 후 균배양액을 10000 g에서 5분간 원심분리 하여 배양여액과 동량의 1mM Rb1수용액과 12 h 반응시켰다. 반응혼합물은 수포화부탄올로 추출한 후 TLC plate에 점적하고 chloroform/methanol/water (65:35:10, by vol., 하층) 혼합용매로 전개한 후 10% H₂SO₄을 분무하여 110°C에서 10 min 가열하여 발색시켰다(Fig. 54).

GS 514 균주의 배양여액과 ginsenoside Rb1의 반응결과(Fig. 55)는 배양여액과

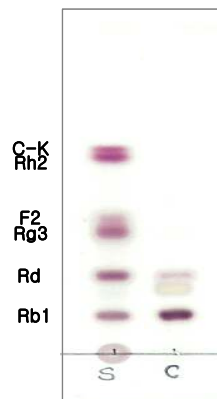


Fig. 55. TLC analysis of transformation of ginsenoside Rb1 by culture filtrates of strain GS514. C: control(no elicitor).

ginsenoside Rb1의 반응결과(Fig. 49)와 서로 다른 양상을 보였다. Fig. 49에서 보듯이 균배양액과 ginsenoside Rb1의 반응에서 명확히 Rg3 band가 나타났고 NMR분석을 통하여 20(S)-Rg3로 화학구조가 동정되어 GS 514 균주의 ginsenoside Rg3의 생산능력 즉 Rg3생산효소를 분비할 수 있는 능력을 확인하였다. 하지만 Rb1과 균배양여액과의 반응에서는 예상과는 달리 ginsenoside Rg3는 생성되지 않았고 약간의 ginsenoside Rd만 생성되어 Rg3생산효소가 존재하지 않거나 혹은 극히 적게 존재하는 것으로 사료된다. GS 514 균주 배양액 및 배양여액의 Rb1과의 반응에서 나타난 이러한 모습은 GS 514 균주가 생산한 Rg3생산효소는 인삼사포닌 Rb1의 첨가로 인해 유발된 효소로서 유도효소라고 인정할 수 있다. 즉 GS 514 균주의 배양액과 Rb1의 반응에서 균주는 Rb1을 영양원으로 하기 위하여 Rb1의 glucose를 분해하는 효소 (Rg3생산효소 포함)를 분비하여 Rg3를 생산할 수가 있었고 GS 514 균주 배양여액에서는 배양과정에서 Rb1의 첨가가 없었기 때문에 Rg3생산효소

를 생산할 수 없어 Rg3가 생성되지 않은 것으로 사료된다. GS 514 균주가 Rg3생산효소를 많이 발현하게 하기 위하여 LB배지에 홍삼농축액, 인삼분말, 인삼잎사포닌 등 유도물질을 첨가하여 배양하고 다시 균배양여액과 ginsenoside Rb1을 반응시켰다. 인삼사포닌의 균 성장억제작용(곽이성 등, 2002)으로 인하여 홍삼농축액, 인삼분말, 인삼사포닌의 첨가는 그 함량이 증가함에 따라 균 성장억제작용이 증가하여 조사포닌을 0.7과 0.8% (C4, C5)첨가하였을 때 균이 자라지 않았고 홍삼농축액의 경우에서도 2.0, 2.25, 2.5%를 첨가하였을 때 균이 늦게 자라는 것을 관찰 할 수 있었다. 균이 자라지 않은 처리구 C4, C5를 제외한 기타 처리구를 원심분리를 통하여 cell를 제거한 후 Rb1과 반응시킨 TLC분석결과를 Fig. 56에 나타냈다.

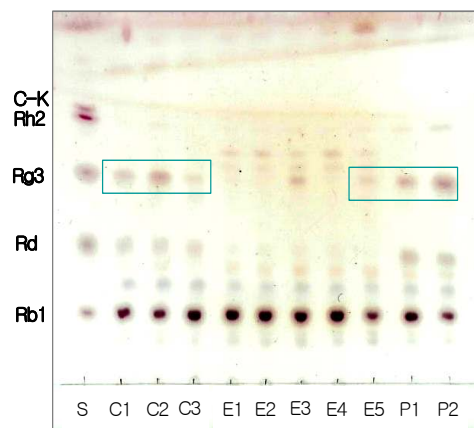


Fig. 56. TLC analysis of transformation of ginsenoside Rb1 by culture filtrates of strain GS514. C1~C3: 0.4, 0.5 and 0.8% of crude saponin was added to LB broth; E1~E5: 1.5, 1.75, 2.0, 2.25 and 2.5% of red ginseng extract was added to LB broth; P1~P2: 5 and 6% of ginseng powder was added to LB broth.

TLC분석을 통하여 홍삼농축액, 인삼분말 및 조사포닌 첨가 처리구에서 모두 ginsenoside Rg3 band를 확인 할 수 있었다. 이것은 홍삼농축액, 인삼분말, 조사포닌은 모두 Rg3생산효소를 유발할 수 있는 능력을 가지고 있다는 것을 말해주며 그 중 조사포닌과 인삼분말의 유도효과가 홍삼농축액에 비해 강하게 나타남을 관찰할 수 있었다. 조사포닌의 첨가 중 0.5% 첨가하였을 때 Rg3가 가장 많이 생성되고 0.6% 첨가하였을 때 Rg3가 적게 생성된 것은 0.6% 첨가구에서 인삼사포닌의 함량 증가로 인한 균의 성장억제효과가 더욱

강하게 나타나 균 생장이 많이 저해된 원인으로 사료된다. 조사포닌은 인삼분말에 비해 수용성이 좋고 사포닌 함량이 많아 적게 넣어도 월등히 좋은 유도효과를 나타낼 수 있어 조사포닌을 Rg3생산효소 유도물질로 선정하였다.

5) 균배양액의 O.D값에 따른 유도물질의 첨가시기가 Rg3생산효소 생산에 미치는 영향

균 배양시 유도물질의 첨가는 GS 514 균주로 하여금 Rg3생산효소를 유발시킨다. 균 배양초기 조사포닌을 유도물질로 첨가하면 인삼사포닌의 항균작용으로 말미암아 LB배지 양의 0.6% 첨가구에서 균 생장이 이미 많이 억제 된다. 따라서 더욱 많은 양의 유도물질을 첨가하여 더욱 많은 양의 Rg3생산효소를 생산하고자 균배양액의 O.D₆₀₀값에 따른 유도물질의 첨가시기를 고찰하였다. LB배지에 GS 514 균주를 접종하고 O.D₆₀₀값이 0.111, 0.417, 1.387, 1.745가 되게 키운 후 각각 LB배지양의 0.6%, 0.8%의 일조사포닌을 첨가하여 24 h 배양하였다. Cell를 제거한 균 배양여액은 ginsenoside Rb1과 반응시킨 후 TLC분석을 통하여 Rg3생산효소를 확인하였다(Fig. 57) .

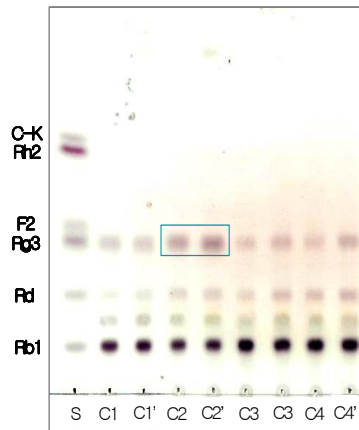


Fig. 57. TLC analysis of transformation of ginsenoside Rb1 by culture filtrates of strain GS514. C1, C1': 0.6 and 0.8% of crude saponin was added to suspension culture (O.D₆₀₀: 0.111); C2, C2': 0.6 and 0.8% of crude saponin was added to suspension culture (O.D₆₀₀: 0.417); C3, C3': 0.6 and 0.8% of crude saponin was added to suspension culture (O.D₆₀₀: 1.387); C4, C4': 0.6 and 0.8% of crude saponin was added to suspension culture (O.D₆₀₀: 1.745).

Fig. 57에서 보듯이 균 배양액의 O.D₆₀₀값이 0.417일때 유도물질을 첨가하면 다른 시기에 첨가하는 것보다 ginsenoside Rg3가 많이 생성되는 것을 관찰할 수 있었고 조사포닌의 첨가량은 0.8% 첨가구가 0.6% 보다 Rg3생산효소를 더 많이 유도시키는 것을 관찰할 수 있었다. 이들 결과로부터 유도물질의 첨가 시기는 O.D₆₀₀값이 0.5~0.8사이가 적합하다는 것과 균을 일정한 O.D₆₀₀값으로 배양 후 유도물질을 첨가하면 더욱 많은 유도물질의 첨가가 가능하여 더욱 많은 Rg3생산효소를 생산할 수 있음을 알 수 있다.

6). 균주배양 시 유도물질의 첨가 함량 및 유도물질 첨가 후 균주배양시간이 Rg3생산효소 생산에 미치는 영향

유도물질의 첨가함량은 Rg3생산효소의 생산량에 직접적인 영향을 준다. GS 514 균주를 LB배지에서 O.D₆₀₀값이 0.606이 되게 배양 한 후 인삼 잎조사포닌을 LB배지양의 0.6%, 0.8%, 1.0%, 1.2%를 각각 첨가하여 각각 24, 36, 48 h배양하였다. 균 배양여액은 ginsenoside Rb1과 각각 반응시키고 TLC분석을 수행하였다.

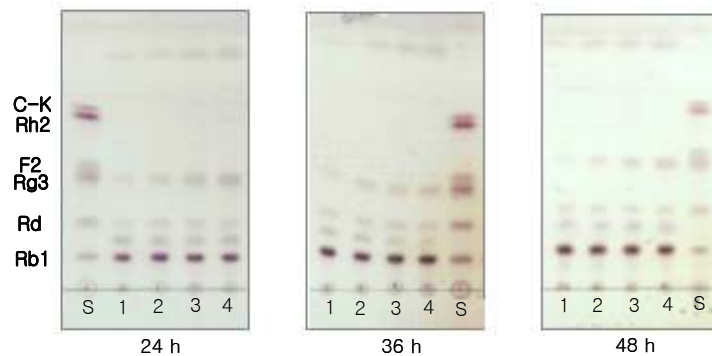


Fig. 58. TLC analysis of transformation of ginsenoside Rb1 by culture filtrates of strain GS514. 1~4: 0.6, 0.8, 1.0, 1.2% of crude saponin was added to suspension culture (O.D₆₀₀: 0.606).

Fig. 58에서 보듯이 유도물질 조사포닌의 첨가함량이 증가할수록 ginsenoside Rg3의 생산량은 증가하여 첨가 1.2%에서 가장 많은 Rg3가 생성이 되고 유도물질 첨가 후 배양 시간은 24시간이 적합한 걸로 나타났다.

7) Ginsenoside Rb1과 GS 514 균주 배양여액과의 반응산물의 HPLC분석

(1) 지표물질 F2, 20(R)-Rg3, compound K, 20(S)-Rh2 및 20(R)-Rh2의 HPLC분석

Fig. 59는 standard F2, 20(R)-Rg3, compound K, 20(S)-Rh2 및 20(R)-Rh2의 HPLC 분석결과이다.

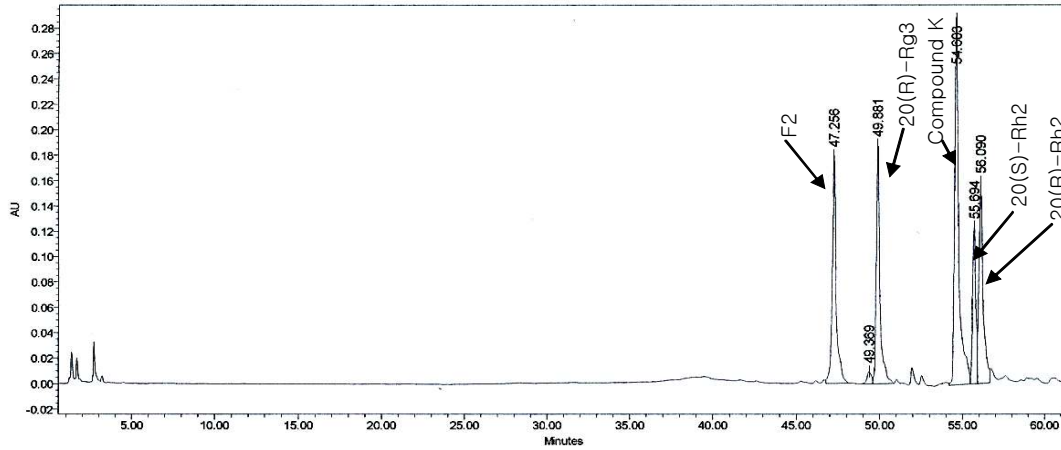


Fig. 59. The HPLC analysis of standard F2, 20(R)-Rg3, compound K, 20(S)-Rh2 and 20(R)-Rh2.

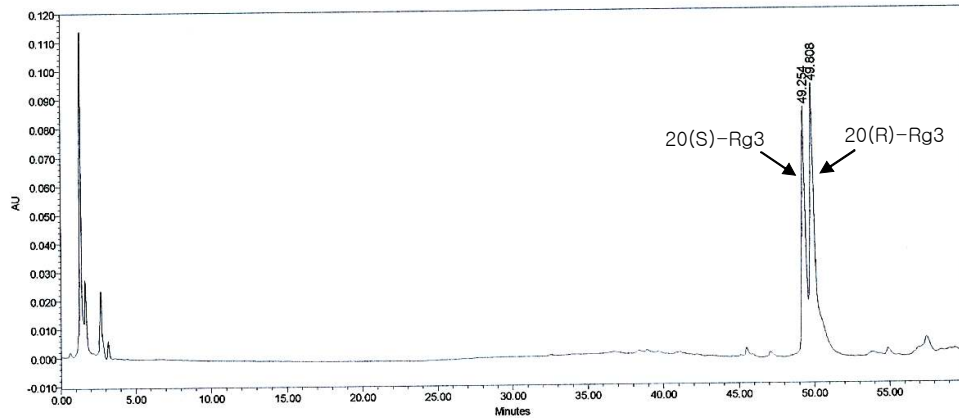


Fig. 60. The HPLC analysis of standard 20(S)- and 20(R)-ginsenoside Rg3.

Ginsenoside F2, 20(R)-Rg3, compound K, 20(S)-Rh2 및 20(R)-Rh2의 머무름 시간은 각각 47.3 min, 49.9 min, 54.6 min, 55.6 min 및 56.1 min에 peak가 나타난다.

(2). 지표물질 20(S)-Rg3, 20(R)-Rg3 의 HPLC분석

20(S)-Ginsenoside Rg3와 20(R)-ginsenoside Rg3는 Fig. 52에서 보듯이 다만 탄소20번 위치에 연결되어있는 OH기와 CH₃기의 공간위치가 바뀌어서 이루어진 이성질체로서 TLC분석에서 구분이 되지 않는다. 본 HPLC분석 조건에서는 S-form과 R-form Rg3가 구별되며 머무름 시간은 각각 49.3 min과 49.8 min에 나타났다(Fig. 60).

(3) GS 514 균주 배양여액과 ginsenoside Rb1의 반응산물 HPLC분석

GS 514 균주를 LB배지에서 배양 후 배양액을 직접 ginsenoside Rb1과 반응 시키면 20(S)-Rg3가 생성이 되었다(Fig. 50~51). LB배지에 유도물질을 처리하여 균을 배양하고 다시 원심분리를 통해 균을 제거한 후 ginsenoside Rb1과 반응시켰을 경우 TLC분석을 통하여 Rg3를 확인하였지만 R-form과 S-form의 구별은 불가능 하였다. 따라서 R-form과 S-form Rg3구분이 가능한 HPLC분석을 수행하였다(Fig. 61). HPLC분석을 통하여 ginsenoside Rb1은 주로 ginsenoside Rd (머무름 시간 41.8 min) 및 20(S)-ginsenoside Rg3 (머무름 시간 49.2 min, standard S-Rg3의 머무름 시간: 49.3 min)로 확인이 되었다.

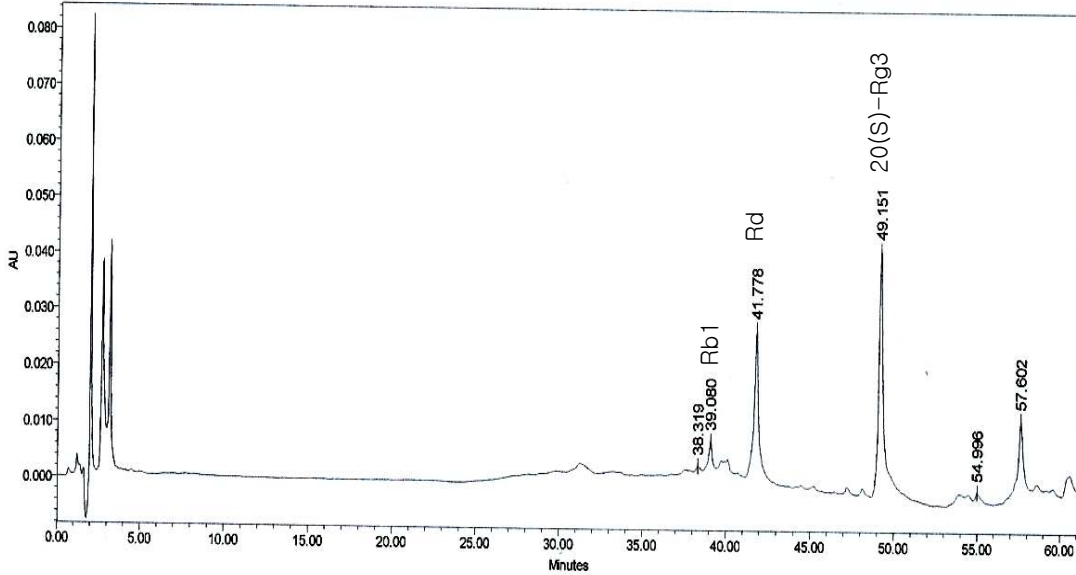


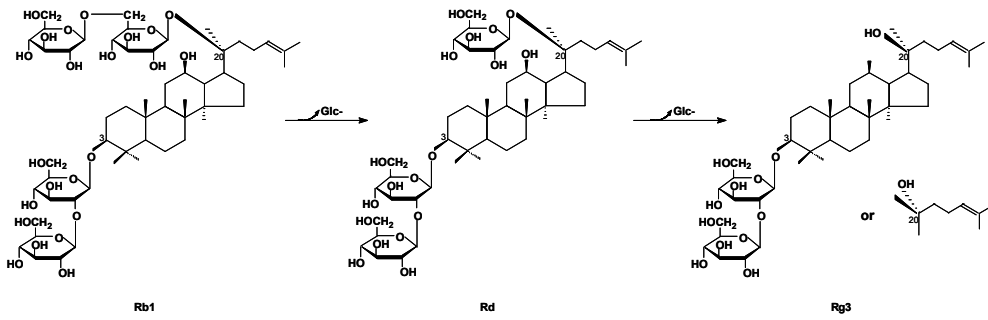
Fig. 61. The HPLC analysis of reaction mixture of ginsenoside Rb1 and culture filtrates of strain GS514 (added elicitor).

따라서 GS514 균주는 유도물질 조사포닌의 첨가로 인하여 ginsenoside Rb1을 20(S)-Rg3로 전화시킬 수 있는 효소를 발현하는 것을 알 수 있다.

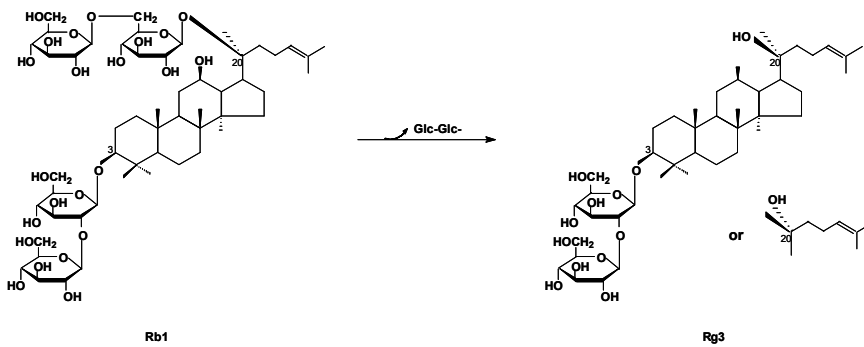
나. Rg3생산효소의 분리

1) Ginsenoside Rb1으로부터 Rg3로의 전환 pathway 탐색

Ginsenoside Rb1으로부터 ginsenoside Rg3로의 전환은 아래와 같은 두 가지 경로가 존재한다(Fig. 62).



Pathway A



Pathway B

Fig. 62. Biotransformation pathway for production of ginsenoside Rg3 from Rb1. Pathway (A) is that ginsenoside Rg3 was produced after forming ginsenoside Rd and pathway (B) is that ginsenoside Rg3 produced directly.

Pathway A는 ginsenoside Rb1의 탄소 20번 위치에 결합되어 있는 두 개의 glucose중에서 terminal glucose가 먼저 가수분해 되어 Rd가 생성되고 다시 Rd로부터 20번 탄소의 glucose를 가수분해 하여 Rg3를 생성하는 경로이고 pathway B는 ginsenoside Rb1의 20번 탄소의 두 개의 glucose를 동시에 가수분해 하여 Rg3를 생성하는 경로이다. GS514균주가 ginsenoside Rb1을 20(S)-Rg3로 전환시킬 수 있는 능력을 지니고 있음은 이미 TLC, HPLC 및 NMR분석을 통하여 확인하였다. Rg3생산효소가 Rd를 Rg3로 전환시키는 효소인지 아니면 Rb1을 직접 Rg3로 전환시키는 효소인지 확인하기 위하여 유도물질을 처리하여 균을 대량 배양한 후 염석, 투석을 거쳐 조효소액을 조제하고 Mono Q column을 이용하여 FPLC 분석을 하였다(Fig. 63). 각각의 fraction은 ginsenoside Rb1 및 Rd와 10 h 반응시키고 TLC분석을 통하여 Rg3생산효소 활성을 확인하였다.

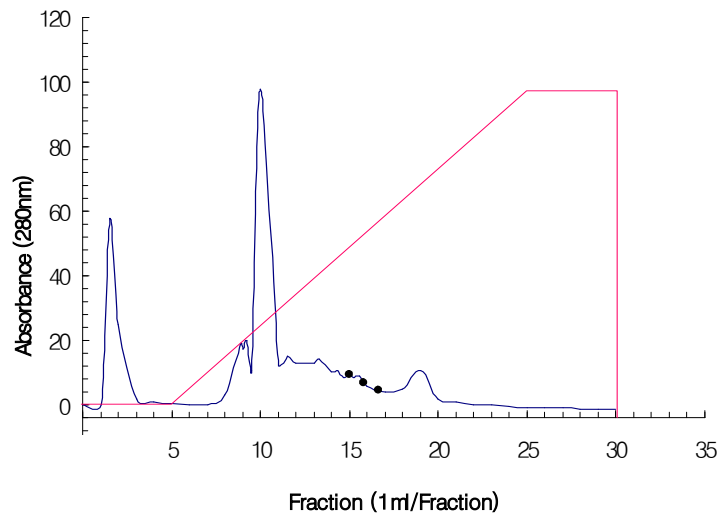


Fig. 63. Purification of β -glucosidase on Mono Q Column.

FPLC분석에서 2번 fraction에 나타난 큰 peak는 column에 흡착되지 못하고 직접 세척되어 나온 단백질들이고 fraction 8번부터 fraction 20번까지가 분리된 단백질 fraction들이다. 따라서 ginsenoside Rg3생산효소 확인 실험은 2번, 8~20번 fraction을 선택하여 수행하였다.

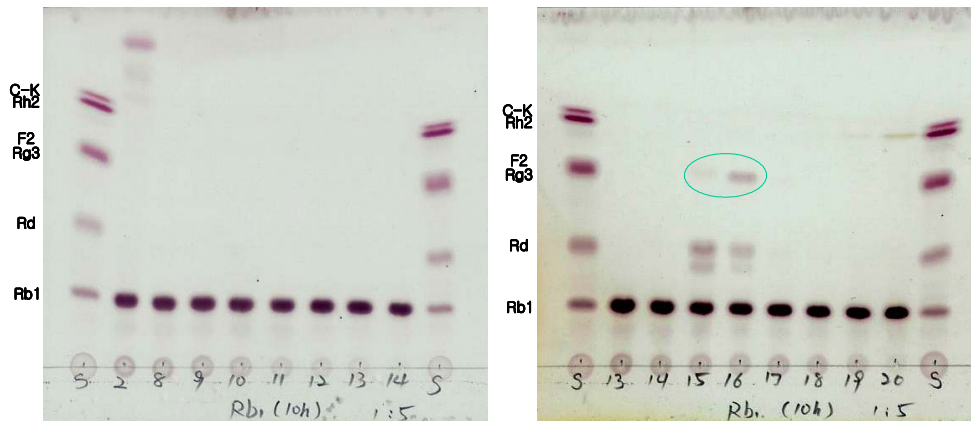


Fig. 64. TLC analysis of reaction between ginsenoside Rb1 and fraction collected from Mono Q column.

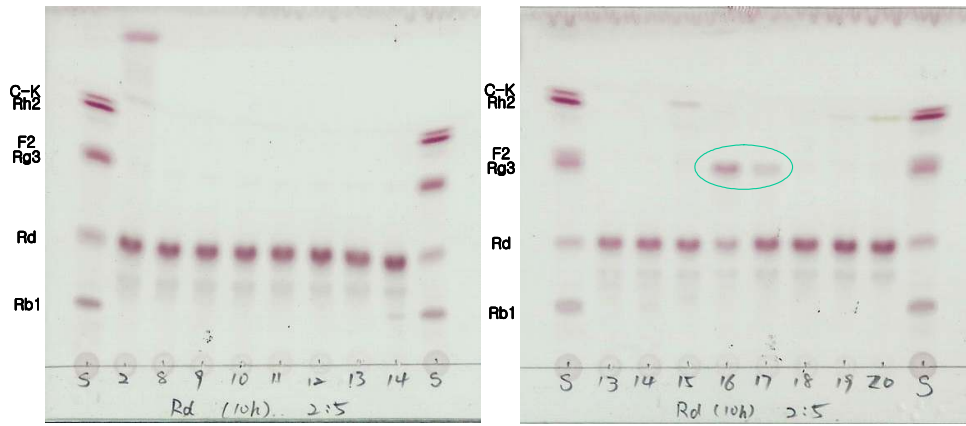


Fig. 65. TLC analysis of reaction between ginsenoside Rd and fraction collected from Mono Q column.

Fig. 64과 Fig. 65에서 보듯이 분리가 되지 않은 2번 fraction을 제외한 기타 fraction에서 15, 16, 17번에서만 β -glucosidase 활성을 나타내었다. Ginsenoside Rb1과의 반응에서는 15번과 16번 fraction에서 활성을 나타냈고 그 중 15번 fraction은 ginsenoside Rb1을 주로 ginsenoside Rd 및 gypenoside XVII로 전환시킨 것 외에 약간의 ginsenoside Rg3를 생성하였으며 16번 fraction에서는 세 가지 사포닌 중 Rg3를 가장 많이 생성하였다. Ginsenoside Rd와의 반응에서는 16번과 17번 fraction에서 ginsenoside Rg3 band를 확인할 수 있었고 그 중 16번 fraction에서 가장 강한 Rg3생산효소 활성을 확인할 수 있었다. Fig. 64과 Fig. 65을 종합하여 분석하면 15번 fraction에는 ginsenoside Rb1을 Rd, Rg3, gypenoside XVII로 전환시키는 효소가 모두 존재하고 그 중 ginsenoside Rd로의 전환효소가 가장 많이 존재하며 16번 fraction에는 15번과 마찬가지로 ginsenoside Rb1을 Rd, Rg3, gypenoside XVII로 전환시키는 효소가 모두 존재하지만 15번 fraction에 비해 ginsenoside Rg3로의 전환효소가 더욱 많이 존재하고 17번 fraction은 Rb1과의 반응에서 Rb1외의 band가 나타나지 않은 것으로 보아 ginsenoside Rb1을 Rd 및 gypenoside XVII로의 전환효소는 존재하지 않거나 극히 소량 존재하고 다만 ginsenoside Rd를 Rg3로 전환시키는 효소만 소량 존재한다는 것을 알 수 있다.

17번 fraction의 Rd와의 반응에서 Rg3 band가 나타나고 Rb1과의 반응에서 Rg3 band가 나타나지 않았다는 사실은 GS 514 균주가 발현한 ginsenoside Rg3생산효소는 Rd를 Rg3로 전환시킬 수 있지만 Rb1을 Rg3로 전환시킬 수 없다는 것을 말해주며 ginsenoside

Rb1에서 Rg3로의 전환은 Rd를 통한 pathway 1과정이라는 것을 판단할 수 있었다.

따라서 인삼에서 가장 많이 존재하는 protopanaxadiol계열 사포닌 Rb1을 Rg3로 전환시키려면 Rg3생산효소 뿐만 아니라 Rd생산효소도 필요로 한다는 것을 확인할 수 있었다.

2) Ginsenoside Rd생산효소의 분리

(1) Ginsenoside Rd생산효소의 분리

조효소액은 DEAE-cellulose DE-52 column을 통하여 총 79개 fraction을 분취하였다. Fraction과 Rd와의 반응 TLC분석결과를 Fig. 66에 나타냈다.

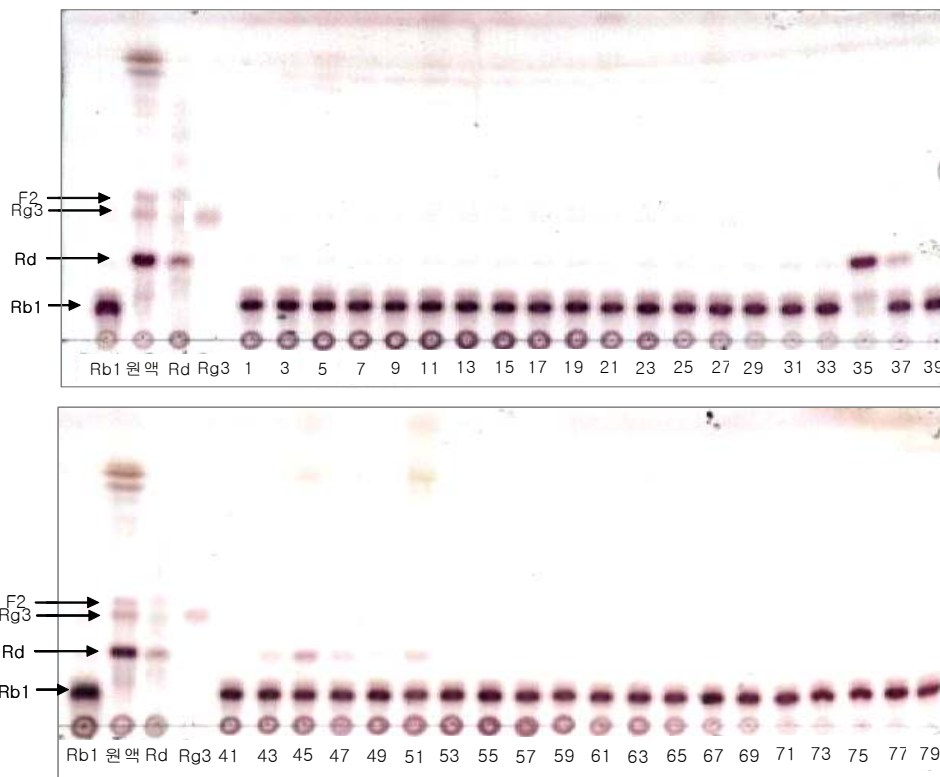


Fig. 66. TLC analysis of reaction between ginsenoside Rd and fraction collected from DEAE-cellulose DE-52 column.

Fraction과 ginsenoside Rb1의 반응결과, fraction 35번에서 Rd생산효소 활성이 가장 강

하게 나타났고 fraction 45번과 51번에서 약간의 활성이 나타났다. Ginsenoside Rd생산효소 활성이 가장 강하게 나타난 35번 fraction을 중심으로 양쪽 옆으로 fraction 순서대로 33번 부터 37번 fraction 까지 Rb1과 반응시켰다. 반응결과 Fig. 67과 같이 35번과 36번 fraction 에서 가장 강한 활성을 보였다.

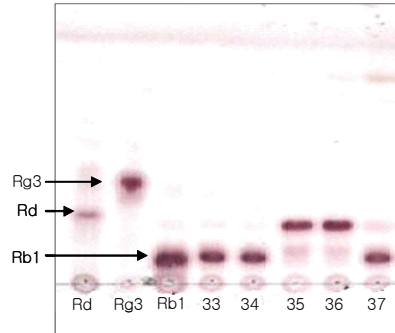


Fig. 67. TLC analysis of reaction between ginsenoside Rd and fraction from No. 33 to 37 collected from DEAE-cellulose DE-52 column.

35번 fraction과 36번 fraction은 SDS-PAGE에서 유사한 결과를 나타냈다(Fig. 68). 각각 분자량 66.2 kDa과 45.0 kDa사이에 두 개의 뚜렷한 band를 나타냈다. 따라서 본 연구에서는 35번 fraction을 분자량측정 전기영동 sample로 하였다.

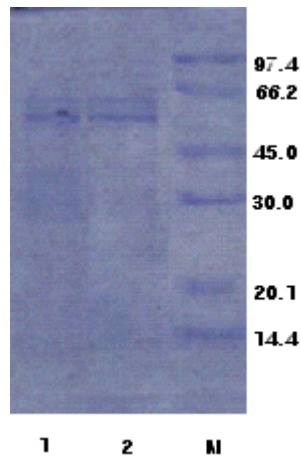


Fig. 68. 15% SDS-PAGE of fraction 35 and 36 collected from DEAE-cellulose DE-52 column.

1, No. 36 fraction; 2, No. 35 fraction, M, protein marker (97.4 kDa, phosphorylase b; 66.2 kDa, albumin; 45 kDa, ovalbumin; 30kDa, carbonic anhydrase; 20.1 kDa, trypsin inhibitor; 14.4 kDa, α -lactalbumin).

(2) Rd생산효소 분자량측정

Fig. 68의 SDS-PAGE를 통하여 35번 fraction에서 두 개의 단백질 band를 확인할 수 있었다. 두 개의 band 중 ginsenoside Rd생산효소의 band를 확인하기 위하여 35번 fraction에 대해 PAGE를 실시하고 일부분은 CBB (Coomassie Gel Stain Stock)염색을 하고 기타 부분은 발색된 band의 위치에 근거하여 gel을 자른다. Slice는 buffer로 단백질을 추출한 후 Rb1과 각각 반응시켜 활성을 체크하는 동시에 SDS-PAGE를 수행하였다.

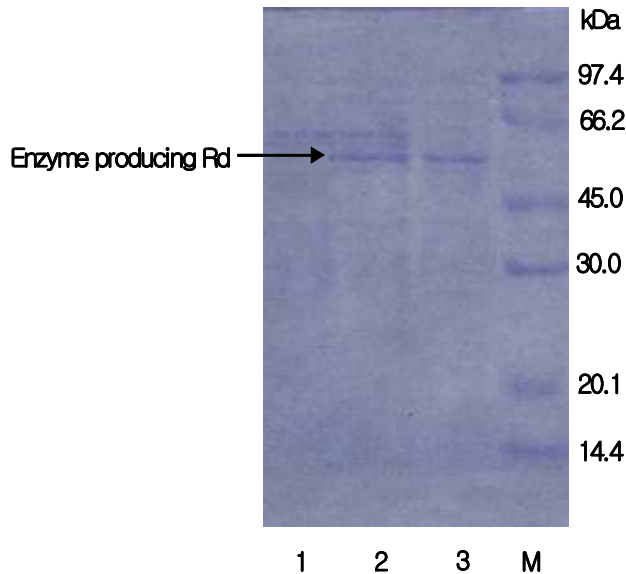


Fig. 69. 15% SDS-PAGE of gel slice of PAGE of fraction 35 collected from DEAE-cellulose DE-52 column.

1, Slice 1; 2, No. 35 fraction, 3, Slice 2; M, protein marker (97.4 kDa, Phosphorylase b; 66.2 kDa, Albumin; 45 kDa, Ovalbumin; 30kDa, Carbonic anhydrase; 20.1 kDa, Trypsin inhibitor; 14.4 kDa, α -Lactalbumin).

Rb1과의 반응에서 활성을 보이지 않은 slice 추출액(Fig 69-1번 line), DEAE-cellulose DE-52 column을 통해 받은 35번 fraction(Fig 69-2번 line), 활성을 보인 slice 추출액(Fig 69-3번 line) 및 단백질 marker순으로 15% SDS-PAGE를 수행하였다. Fig. 69에서 보다시피 ginsenoside Rd생산 활성을 보인 3번 line에서 단백질은 하나의 band로 나타났으며 35번 fraction의 두 개의 band 중 아래쪽 band임을 확인할 수 있었다.

Fig. 69의 단백질 전기영동 결과에 근거하여 단백질 marker의 Rf값(Table 29)과 분자량

에 근거하여 단백질 분자량 curve (Fig. 70)를 작성하였다.

Table 29. R_f value of protein marker in 15% SDS-PAGE

Protein	Phosphorylase b	Albumin	Ovalbumin	Carbonic anhydrase	Trypsin inhibitor	Trypsin inhibitor
M.W(kDa)	97.4	66.2	45.0	30.0	20.1	14.4
R_f	0.133	0.217	0.383	0.500	0.717	0.817

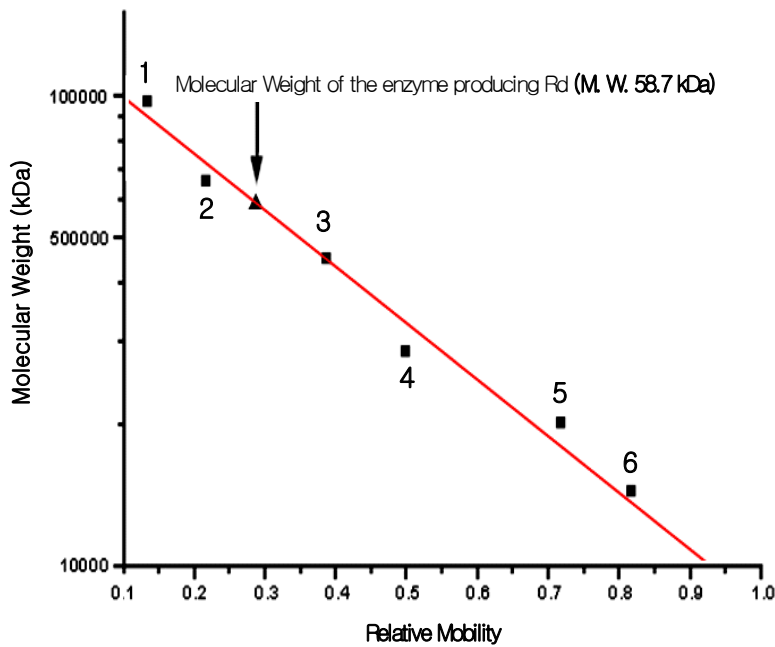


Fig. 70. Molecular weight of the enzyme producing ginsenoside Rd on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

1, phosphorylase b (97.4 kDa); 2, albumin (66.2 kDa); 3, ovalbumin (45 kDa); 4, carbonic anhydrase (30kDa); 5, trypsin inhibitor (20.1 kDa); 6, □-lactalbumin (14.4 kDa).

Ginsenoside Rd생산효소의 R_f 값은 0.233으로서 분자량 측정결과 58.7kDa에 해당하였다.

3) Ginsenoside Rg3생산효소의 분리

(1) Treatment와 control 조효소액의 Rg3생산효소 활성 확인

(가) Treatment와 control 배양여액의 Rg3생산효소 활성 확인

유도물질을 첨가한 treatment와 유도물질을 첨가하지 않은 control의 GS514 균주의 LB 배지 배양액을 원심분리 하여 cell을 제거하고 동량의 ginsenoside Rb1과 반응시킨 결과를 Fig. 71에 나타냈다.

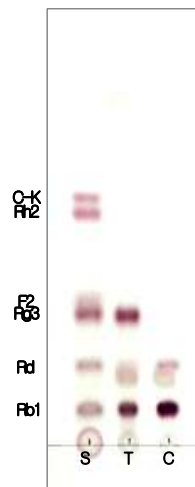


Fig. 71. TLC assay of reaction between ginsenoside Rb1 and culture filtrates of strain GS514. T, treatment; C, control.

TLC분석결과 treatment에서는 ginsenoside Rg3가 생성이 되고 control에서는 약간의 Rd만 생성이 되고 Rg3는 생성이 되지 않았다.

(나) Treatment와 control 조효소액의 Rg3생산효소 활성 확인

GS 514 균주 배양여액은 염석(황산암모늄으로 70% 포화), 투석을 거쳐(MWCO 3000 투석막) 30배 농축하고 다시 ginsenoside Rb1과 반응시켜 ginsenoside Rg3생산효소활성을 체크하였다(Fig. 72).

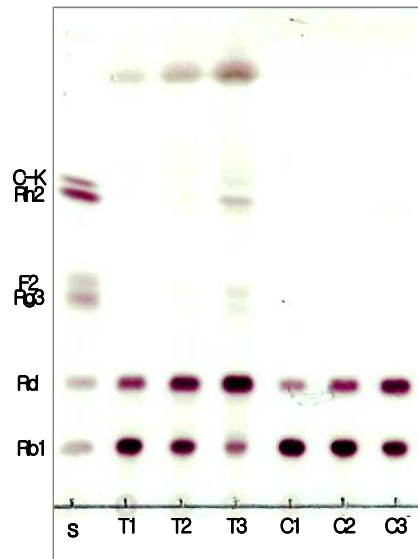


Fig. 72. TLC assay of reaction between ginsenoside Rb1 and dialysis solution of strain GS514.

T, treatment; C, control; 1~3, volume of dialysis solution (1, 5 μ l; 2, 10 μ l; 3, 20 μ l)

Treatment와 control 각각의 1, 2, 3은 1mM Rb1수용액 100 μ l에 투석액을 각각 5, 10, 20 μ l(각각 배양여액의 1.5배, 3배, 6배)를 첨가하여 반응시킨 것으로서 투석액의 증가에 따라 treatment와 control에서 ginsenoside Rd의 함량이 증가되는 경향을 관찰할 수 있었으나 treatment의 배양여액에서 원래 확인되었던 ginsenoside Rg3의 band는 T1, T2에서는 나타나지 않았고 T3에서만 약간 나타났다. 이것은 Rg3생산효소가 염석과정에서 침전되지 않았거나 염석 및 투석과정에서 변성이 되었을 가능성이 크다는 것을 말해준다. 따라서 70% 황산암모늄 염석과정에서 Rg3생산효소의 침전여부 및 효소 변성여부를 확인하기 위하여 황산암모늄으로 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 포화하고 4 $^{\circ}$ C에서 overnight한 다음 원심 분리하여 침전물을 20mM pH 7.0인 sodium phosphate buffer에 용해하여 Rb1과 반응시켜 Rg3생산효소의 활성을 체크하였다(Fig. 73).

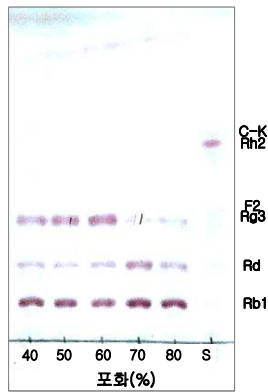


Fig. 73. The effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on precipitation of enzyme producing Rg3.

TLC분석결과 40%~80%포화에서 모두 Rg3 band가 확인이 되고 60%포화에서 가장 많은 양의 Rg3가 생성되었다. 이것은 Rg3생산효소는 70% 황산암모늄 염석과정에서 충분히 침전이 되었으며 변성이 되지 않았다는 것을 말해준다(70%, 80%에서 Rg3함량이 떨어지는 원인은 황산암모늄염의 농도증가로 인하여 더욱 많은 단백질이 침전이 되고 따라서 같은 양의 buffer에 용해되는 Rg3생산효소의 양이 적어져 Rg3생산량이 감소되었다고 사료된다). 따라서 투석액에서 Rg3생산효소활성이 나타나지 않은 원인은 투석과정에서 일어난 어떤 변화에 의해 일어난 것으로 확인 할 수 있다. 염석을 통한 단백질용액 중 각종 무기염, 사포닌 분해산물, 분자량이 작은 peptide등 물질들이 동시에 존재하는데 분자량이 3000($\pm 20\%$)보다 작은 저분자 물질들은 농도차이로 인한 확산작용에 의해 투석막을 통하여 빠져 나가게 된다. 만약 투석과정 중 4°C 온도의 영향(이 온도에서 Rg3생산효소 안정), pH의 영향(pH 7.0인 20 mM sodium phosphate buffer에 투석, 균주 배양 pH조건과 유사)을 배제하면 MWCO 3000 투석막에 의한 영향으로서 한 가지 원인은 Rg3생산효소는 단백질이 아니고 분자량이 3000좌우인 peptide이거나 또 다른 한 가지 원인은 Rg3생산효소는 염, 확실하게 말하면 금속에 의존하는 효소일 가능성이 크다. 지금까지 알려진 β -glucosidase 분자량은 대부분 몇 십kD에 달하는 단백질들이고 또한 저 농도 황산암모늄 포화에서 효소가 침전이 되었다는 것은(Fig. 73) Rg3생산효소는 peptide가 아니라는 것을 말해준다. 따라서 Rg3생산효소의 금속의존성을 확인하기 위하여 투석액을 ginsenoside Rb1과 반응 시키고 NaCl을 처리하여 반응시켰다(Fig. 74).

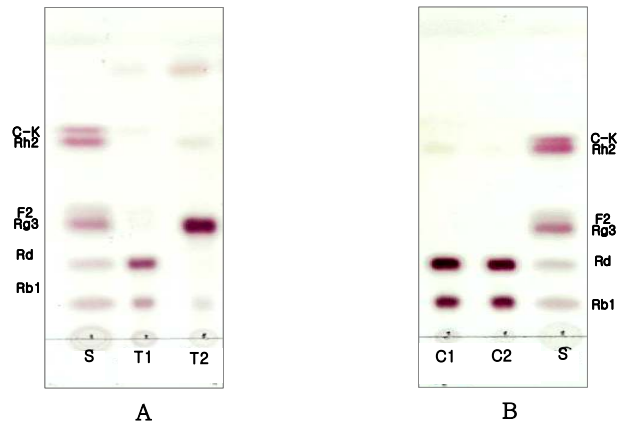


Fig. 74. The effect of NaCl on activity of enzyme producing Rg3.

A, Treatment (T1, not added NaCl; T2, added NaCl); B, Control(C1, not added NaCl; C2,added NaCl).

균배양시 유도물질을 첨가하지 않은 control의 투석액은 NaCl의 첨가와 무 첨가에서 별 차이가 없는 것으로 보아 ginsenoside Rd생산효소는 금속에 의존하지 않는다는 것을 말해주고 유도물질을 첨가하여 배양한 treatment의 투석액은 NaCl의 첨가와 무 첨가에서

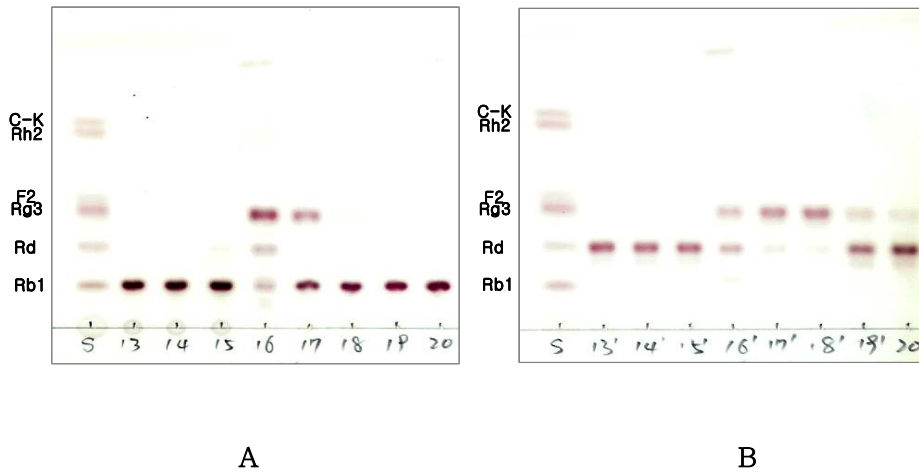


Fig. 75. TLC analysis of reaction between ginsenosides and fraction (treatment) collected from Mono Q column. A, Rb1 as substrate ; B, Rd as substrate.

큰 차이가 나타났다. 즉 NaCl의 무첨가에서는 Rd만 생성이 되었지만 NaCl의 첨가에서는 Rg3가 대량 생성되었다. 이러한 실험결과는 ginsenoside Rg3생산효소는 금속의존성 효소라는 것을 말해준다.

(다) Rg3 생산효소 분리

① Mono Q column에 의한 Rg3 생산효소 분리

활성이 체크된 투석액은 Mono Q column을 통하여 gradient 조건(A buffer, 20mM Tris-HCl, pH 8.0; B buffer, 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 1M NaCl)으로 elution 하여 총 30개의 fraction을 받고 13번 fraction부터 20번 fraction까지 ginsenoside Rb1, Rd와 반응시켜 활성 fraction을 찾았다(Fig. 75, Fig. 76).

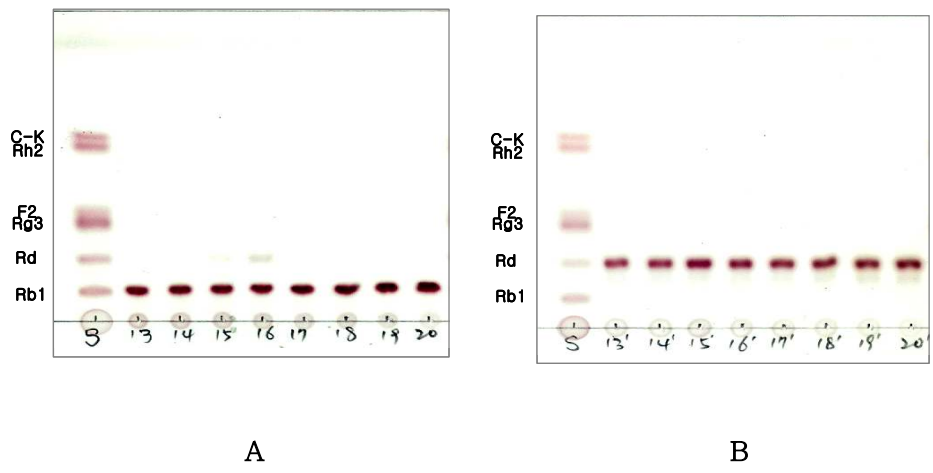


Fig. 76. TLC analysis of reaction between ginsenosides and fraction (control) collected from Mono Q column. A, Rb1 as substrate; B, Rd as substrate.

실험결과 Rb1과의 반응에서 treatment(유도물질 첨가)의 16번 fraction이 가장 강한 Rg3 생산 활성을 나타냈고 Rd와의 반응에서는 17번과 18번 fraction에서 가장 강한 Rg3생산 활성을 나타내었으며 control(유도물질 무 첨가)에서는 16번 fraction에서만 Rb1과의 반응

시 약간의 Rd가 생성이 되었다. 이것은 ginsenoside Rd 생산효소는 주로 16번 fraction에 집중되었다는 것을 말해주고 Rg3생산효소는 주로 17번과 18번 fraction에 집중되었다는 것을 말해준다. Rb1과의 반응에서 treatment의 16번 fraction이 17번보다 더욱 강한 Rg3생산 활성을 보여준 것은 역시 Rd의 생산효소가 17번보다 16번 fraction에 더욱 많이 집중되어 있기 때문에 16번 fraction은 17번 보다 더욱 많은 Rd를 생산할 수 있었고 따라서 더욱 많은 Rg3를 생산할 수 있었다고 해석할 수 있다.

② Gel chromatography 에 의한 Rg3 생산효소 분리

Treatment(유도물질 첨가)의 활성이 가장 다양하게 나타난 16번 fraction 및 control의 16번 fraction은 Centricon으로 농축한 후 gel chromatography를 수행하여 총 80개 fraction을 받았다(Fig. 77).

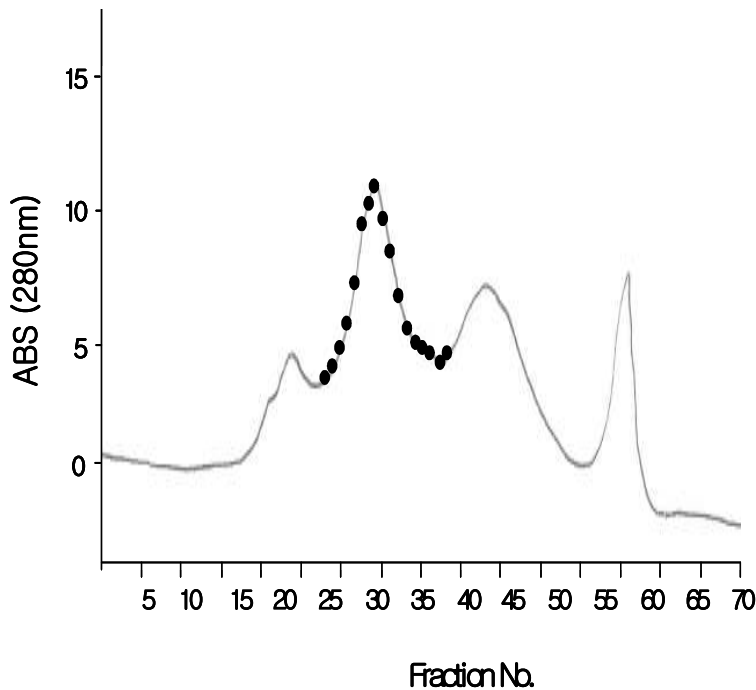


Fig. 77. Purification of β -glucosidase on superdex 200.

18번 fraction부터 60번 fraction까지 Rb1, Rd와 반응시켜 활성이 보이는 부분을 Fig. 78,

Fig. 79에 나타냈다.

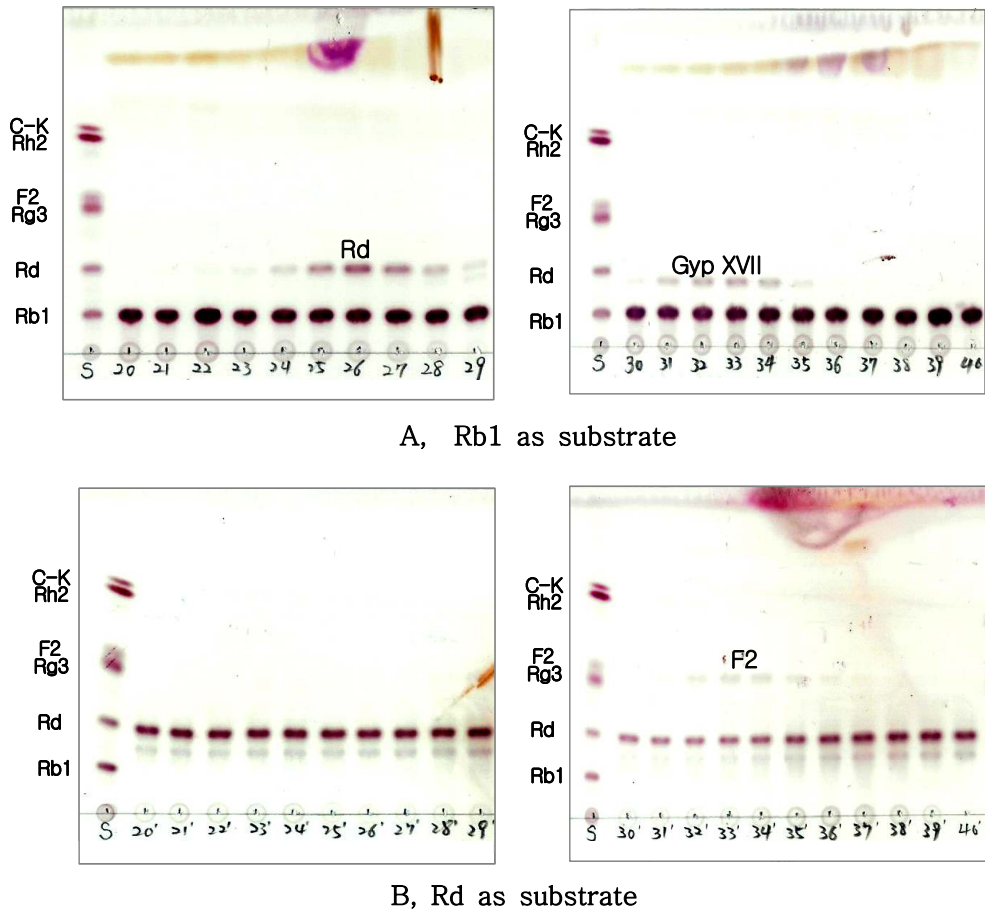
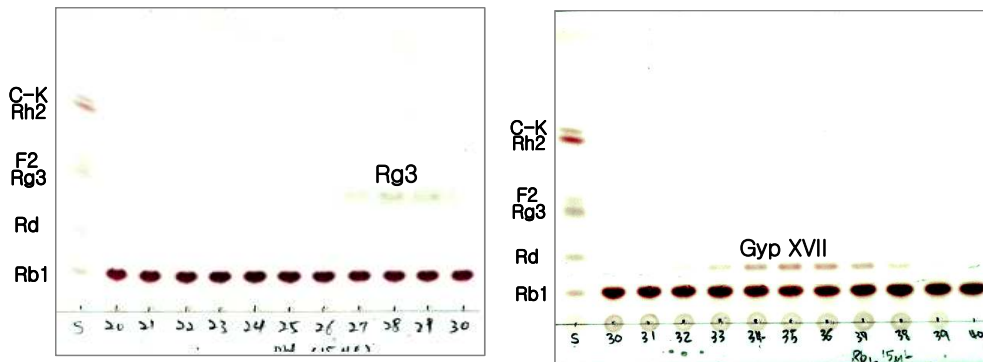
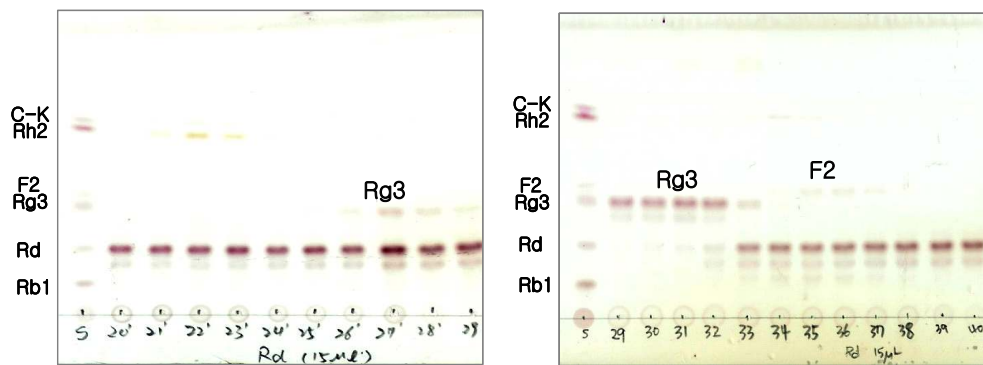


Fig. 78. TLC analysis of reaction between ginsenosides and fraction (treatment) collected from superdex 200. A, Rb1 as substrate ; B, Rd as substrate.

Fig. 78는 NaCl을 첨가하지 않고 직접 Rb1, Rd와 반응시킨 후 TLC로 분석한 결과이다. Fraction 23번부터 30번까지 ginsenoside Rd band, 30번부터 35번까지 gypenoside XVII band, 31번부터 38번까지 약간의 F2의 band를 관찰할 수 있었으나 superdex 200으로 분리하기 전 활성이 가장 강하게 보였던 Rg3 band는 확인되지 않았다. superdex 200은 분자량의 크기에 따라 분리하는 gel chromatography로서 염과 같은 저분자 물질들은 초기에 대부분 분리되어 금속의존성 Rg3생산효소의 활성에 영향을 주었다고 사료되어 NaCl을 첨가하여 다시 반응시켰다(Fig. 79).



A, Rb1 as substrate



B, Rd as substrate

Fig. 79. TLC analysis of reaction between ginsenosides, sodium chloride and fraction (treatment) collected from superdex 200. A, Rb1 as substrate ; B, Rd as substrate.

NaCl을 첨가한 후 각각의 fraction과 Rb1, Rd 반응결과는 NaCl을 첨가하기 전과 큰 차이를 나타냈다. NaCl 첨가 전에는 Rd의 band가 나타났지만 Rg3의 band가 나타나지 않았고 NaCl첨가 후에는 Rg3의 band가 나타났지만 Rd의 band가 나타나지 않았다. 따라서 ginsenoside Rg3생산 효소는 금속이온 보조인자(cofactor)를 필요로 하는 효소임을 재확인할 수 있었고 Rd band가 나타나지 않은 원인은 ginsenoside Rd생산효소에 의해 생성된 Rd가 ginsenoside Rg3생산 효소에 의해 다시 전부 Rg3로 전환되었다는 것을 말해준다. Rg3생산 활성을 나타낸 fraction 및 control의 fraction은 10% PAGE를 수행하였다(Fig. 77).

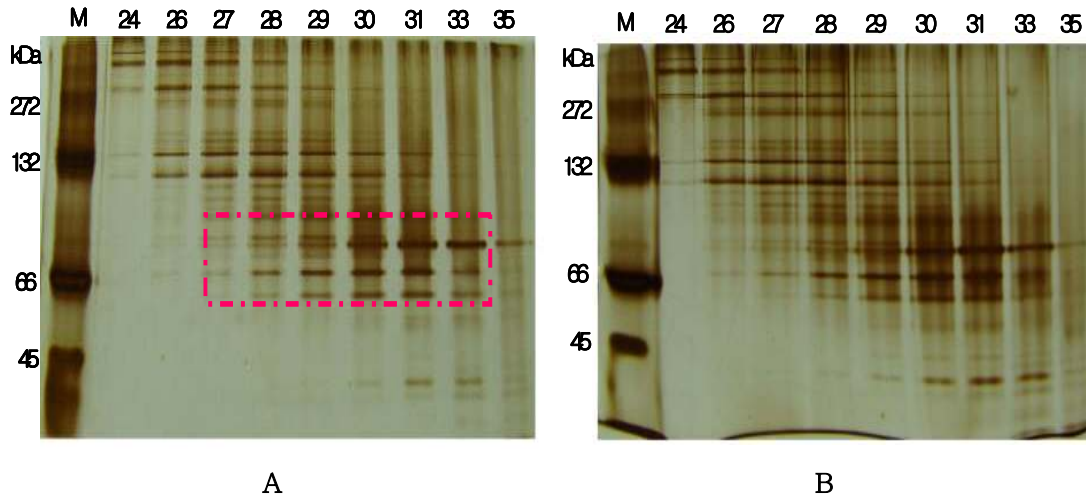


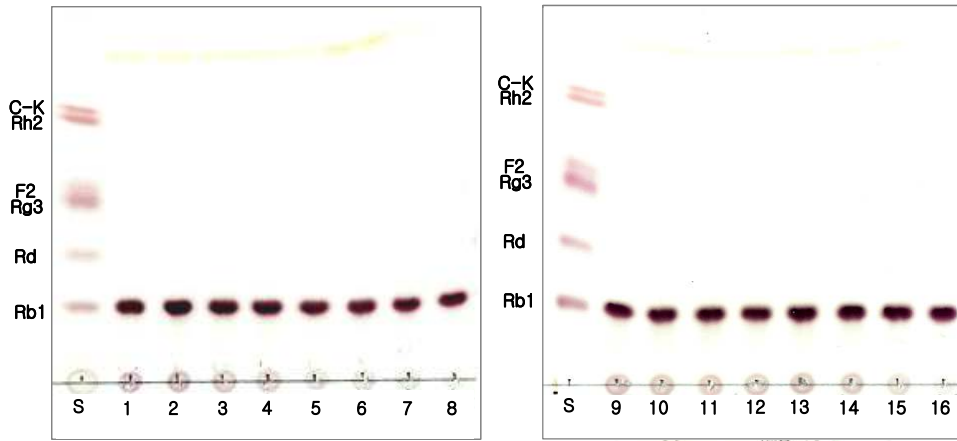
Fig. 80. 10% PAGE of fraction collected from superdex 200.

A, treatment; B, control. M, protein marker (272 kDa, urease trimer; 132kDa, albumin dimer, 66.0 kDa, albumin; 45 kDa, ovalbumin).

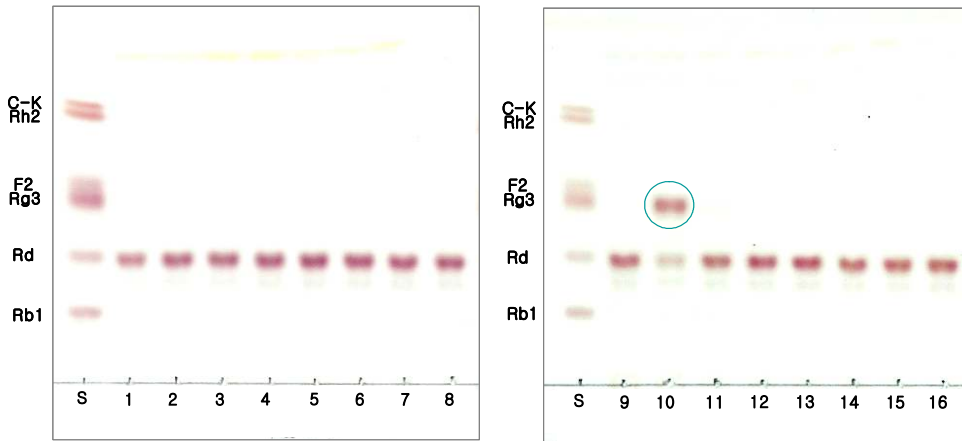
Treatment와 control에서 단백질 band의 pattern은 매우 유사하게 나타났으며 유의할만한 band 차이가 나타나지 않았다. Rg3생산효소 활성이 29번부터 32번 fraction에서 가장 강하게 나타난 것을 감안하면 Rg3생산효소는 분자량 marker 132와 45사이 존재한다는 것을 알 수 있다.

③. 전기영동에 의한 Rg3생산 효소의 분리

정확한 Rg3생산효소의 위치를 파악하기 위하여 Rg3생산효소 활성이 가장 강하게 나타난 17번 fraction에 대해 10% PAGE(16×18 cm)를 수행하고 separating gel은 아래위로 활성이 없는 부분 2 cm씩을 제외하고 0.5 cm간격으로 gel을 자른 후 buffer로 추출하여 Rb1 및 Rd와 반응시켰다(Fig. 81).



A, Rb1 as substrate.



B, Rd as substrate.

Fig. 81. TLC analysis of reaction between ginsenosides, sodium chloride and slices of 10% PAGE of

TLC분석결과 gel slice의 buffer 추출액은 Rb1을 전혀 전환시키지 못하였지만 10번 gel slice(Fig. 82)는 Rd에서 Rg3로 전환시키는 것을 관찰할 수 있었다. 즉 Rg3생산효소는 Rd를 Rg3로 전환시킬 수 있는 능력이 있지만 Rb1을 Rg3로 전환시킬 수 없다는 것을 말해주며 10% PAGE gel에서 분자량 약 57~58 kDa에 위치한다는 것을 확인할 수 있었다.

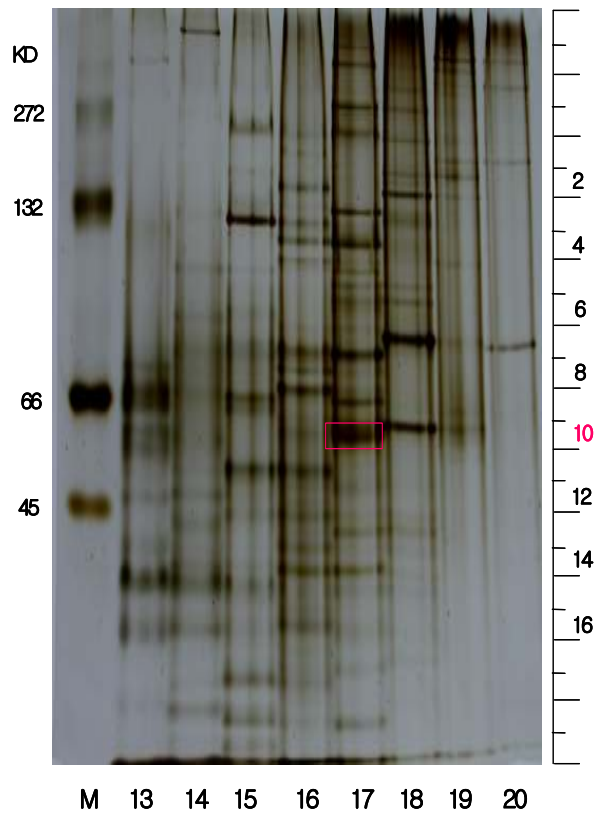


Fig. 82. 10% PAGE of fraction collected from Mono Q column.

13~20, fraction number of treatment; M, protein marker (272 kDa, urease trimer; 132kDa, albumin dimer, 66.0 kDa, albumin; 45 kDa, ovalbumin.)

조효소액은 Mono Q column에 의한 ion exchange chromatography 및 superdex 200에 의한 gel chromatography를 거치면서 많이 희석이 된다. gel Slice 반응을 통하여 Rg3생산 효소의 대략 위치를 파악한 후 Rg3생산효소의 농도를 확보하기 위하여 Mono Q column을 통하여 분취한 treatment와 control의 17번 fraction을 직접 2-D(IPG strip, 18 cm, PI 3-11NL) 전기영동 하였다(Fig. 83).

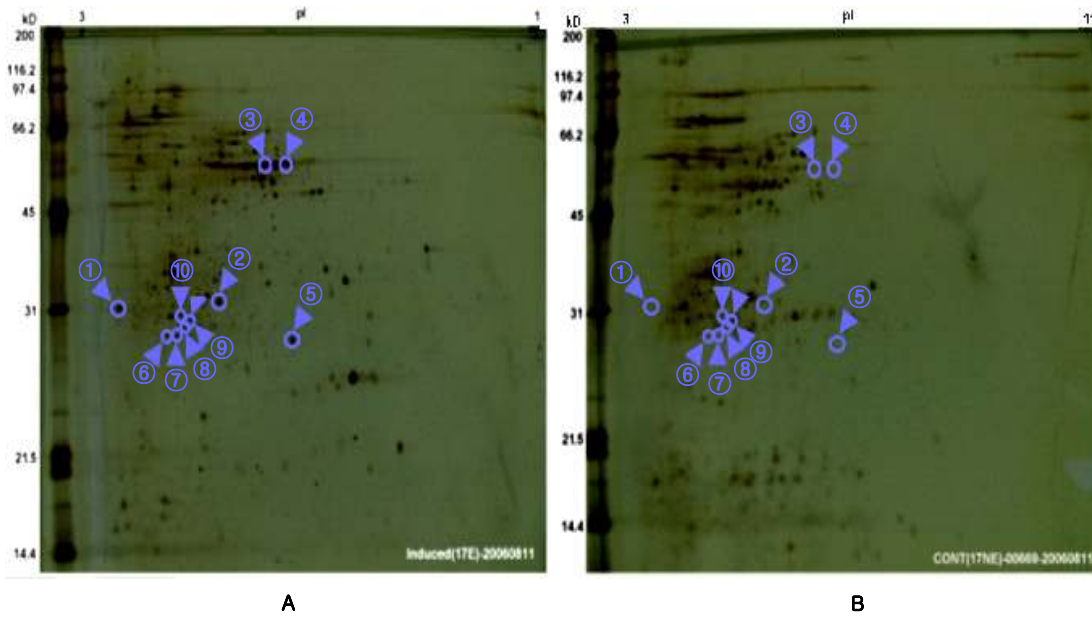


Fig. 83. 2-Dimensional gel electrophoresis of No. 17 fraction collected from Mono Q column. A, treatment; B, control.

Protein marker: 200kDa, Albumin trimer; 97.4 kDa, Phosphorylase b; 66.7 kDa, Albumin; 45 kDa, Ovalbumin; 30kDa, Carbonic anhydrase; 20.1 kDa, Trypsin inhibitor; 14.4 kDa, □-Lactalbumin

2-D 전기영동은 1-D 전기영동과 달리 treatment와 control에서 spot 상의 차이가 많이 나타났다. Treatment의 PAGE 전기영동에서 Rg3 생산 효소는 분자량 약 57~58 kDa에 위치한다는 것을 확인한 후 2-D 전기영동에서 monomer와 dimer인 경우를 감안하여 단백질 분자량 60과 30을 중심으로 차이나는 spot를 10개 선정하여 대전 기초지원연구소에 의뢰하여 TOF-MS/MS로 amino sequencing을 수행하였다(부록1). spot 6과 10은 양이 적어 결과를 얻을 수 없었고 기타 단백질 spot는 내부서열분석만 이루어졌다. 확인된 peptide를 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>에서 Search for short, nearly exact matches로 상동성 분석을 하였지만 이미 알려진 단백질과의 비교에서 유사성이 매우 낮아 단백질의 동정을 할 수 없었다. Rg3 생산 효소를 생산하는 분 미생물은 데이터베이스가 구축된 것이 없고 기타 미생물과의 연관성도 적어 효소의 분리 동정에 큰 어려움을 주었다. 따라서 보다 많은 Rg3 생산 효소의 정제 과정을 거쳐 fraction의 농축을 통하여 단백질의 동정이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

4) Ginsenoside Rg3생산효소에 의한 ginsenoside Rb1의 Rg3로의 전환율 측정

Ginsenoside Rg3생산 조효소액과 ginsenoside Rb1의 반응산물에 대한 TLC분석 결과를 Fig. 84에 나타냈다.

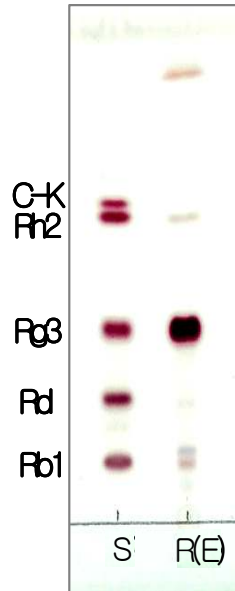


Fig. 84. TLC analysis of reaction between ginsenosides and crude enzyme producing ginsenoside Rg3.

TLC분석을 통하여 Rg3생산 조효소에 의하여 대부분의 ginsenoside Rb1이 Rg3로 전환되고 소량만이 Rh2 및 aglycone으로 추정되는 물질로 전환됨을 관찰 할 수 있었다. 반응산물의 부탄올추출물은 농축 후 silica gel 60 column (\varnothing 4.5×22 cm)에 흡착하여 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:35:10, v/v, 하층) 혼합용매로 20 ml씩 elution하여 각각의 전환산물을 분리한 결과, ginsenoside Rg3는 48.3 mg (85.24%), Rh2는 3.32 mg (7.38%) 이 생성되어 높은 Rg3생산 효과를 나타냈다. 이것은 유기합성방법(12.8%, Anufriev et al., 1997)이나 산처리에 의한 Rg3 생산(42.4%, Bae et al., 2002)보다 훨씬 높은 수율을 나타냈다.

제 5 절 GS 514 균주 조효소액에 의한 홍삼농축액, 조사포닌의 전환 및 사포닌 전환균주의 발효기 운전

1. 재료 및 방법

가. 재료

홍삼농축액은 정관장사의 시판되는 제품을, 잎사포닌과 뿌리사포닌은 중국 Fusong사의 것을 구입하여 사용하였다.

나. 방법

1) 유기용매에 의한 Ginsenoside Rg3생산 조효소 조제

1L LB broth배지에 O.D₆₀₀값이 1이 되게 배양한 GS 514 균주배양액을 10 ml 접종하여 25 °C, 160 rpm에서 배양한다. 균 배양액이 O.D₆₀₀ 0.5~0.8이 될 때 유도물질로 잎사포닌을 LB배지 양의 1.2%를 첨가하여 같은 조건에서 하룻동안 배양한다. 균주 배양액은 10000 g에서 원심분리하여 cell를 버리고 상등액은 냉각 후 4배의 acetone을 혼합하여 단백질을 침전시킨다. 침전된 단백질은 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 용해하여 조효소액으로 하였다.

2) 홍삼농축액, 조사포닌의 전환

홍삼농축액, 잎사포닌, 뿌리사포닌을 각각 30 brix, 30 mg/ml, 30 mg/ml의 농도로 만든 후 Rg3생산효소가 함유된 GS 514 균주 조효소액과 반응시키고 TLC와 HPLC분석을 통하여 Rg3생산성을 확인하였다.

3) 20L 발효기 운전

20L fermenter에 10L LB broth를 넣고 Autoclave를 이용하여 121°C 온도에서 30 min 멸균 후 O.D₆₀₀값이 1이 되게 배양한 GS514균주 배양액을 1%(100 ml) 접종하여 25 °C에서 배양하였다. 균주배양액의 O.D₆₀₀값이 0.5~0.8일 때 유도물질로 인삼 잎사포닌 stock(10 mg/ml)을 300 ml 첨가하여 같은 조건에서 하룻동안 배양하였다. 균주 배양액은 원심분리를 통하여 cell를 제거하고 상층액은 Rb1과 1:1로 혼합하여 30 °C에서 12 h 반응시켜 대량 배양 시 Rb1에 대한 Rg3로의 전환활성을 확인하였다.

2. 결과 및 고찰

가. Rg3생산조효소 대량생산

GS 514 균주가 유도물질 첨가하에서 균 배양시 Rb1을 Rd로 전환시킬 수 있는 효소를 생산하는 것은 이미 확인하였다. 앞의 연구에서 균 배양여액은 황산암모늄으로 염석하고 다시 투석을 거치는 번거로운 과정을 거쳐 조효소액을 조제하였다. 조효소 생산 단가를 낮추기 위하여 유기용매 침전법을 시도하였다. 4°C로 냉각된 균 배양여액에 각각 유기용매인 에탄올과 acetone(-20°C)을 1:4의 비율로 섞은 후 4°C에서 30분간 방치한다. 용액은 원심분리하여 상층액은 다시 감압증류를 통하여 회수하고 침전단백질은 20 mM sodium phosphate buffer에 용해하여 조효소액으로 하였다.

Fig. 85은 조효소액과 Rb1, Rd의 반응결과이다.



Fig. 85. TLC analysis of reaction between ginsenosides and crude enzyme. 1, precipitated by ethanol; 2, precipitated by acetone.

실험결과, 에탄올 침전에서는 약간의 Rd생산 활성만 나타내고 Rg3생산 활성을 상실하였지만 acetone침전에서는 ginsenoside Rg3생산 활성을 그대로 유지하는 것을 관찰 할 수 있었다. Acetone 침전법은 황산암모늄 염석법에 비해 시간이 많이 단축될 뿐만 아니라 조작이 간편하고 증류법으로 acetone을 회수하여 반복 사용이 가능하여 단가도 낮출 수 있다. 따라서 acetone침전법에 의한 조효소의 생산은 산업적으로 가능하다고 사료된다.

나. GS 514 균주 조효소액에 의한 홍삼농축액, 조사포닌의 전환

1) 홍삼농축액의 전환

정관장에서 시판하고 있는 홍삼농축액은 이미 증숙과 건조과정 및 가열추출과정을 거친 인삼제품으로서 이미 많은 양의 diol계사포닌이 분해되어 Rg3가 생성되었다(Fig. 84). 30 Brix 홍삼농축액 50 μ l를 각각 acetone침전법으로 조제한 조효소액(50배 농축) 10(fig. 86-1번), 25(fig. 86-2번), 50(fig. 86-3번), 75(fig. 86-4번), 100(fig. 86-5번), 125 μ l(fig. 86-6번)과 반응시킨 결과를 Fig. 86에 나타냈다.

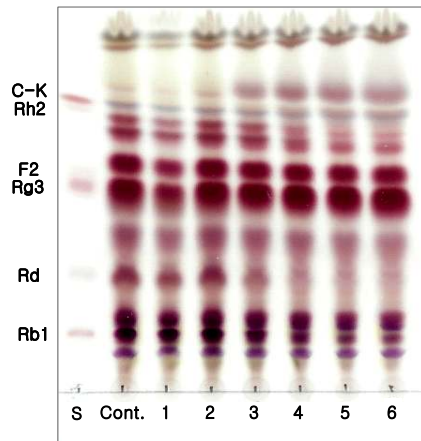
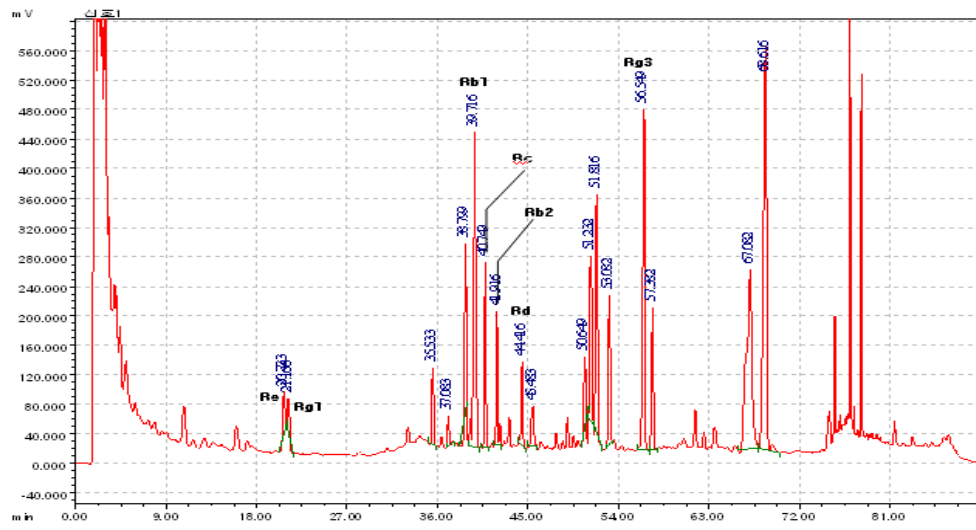


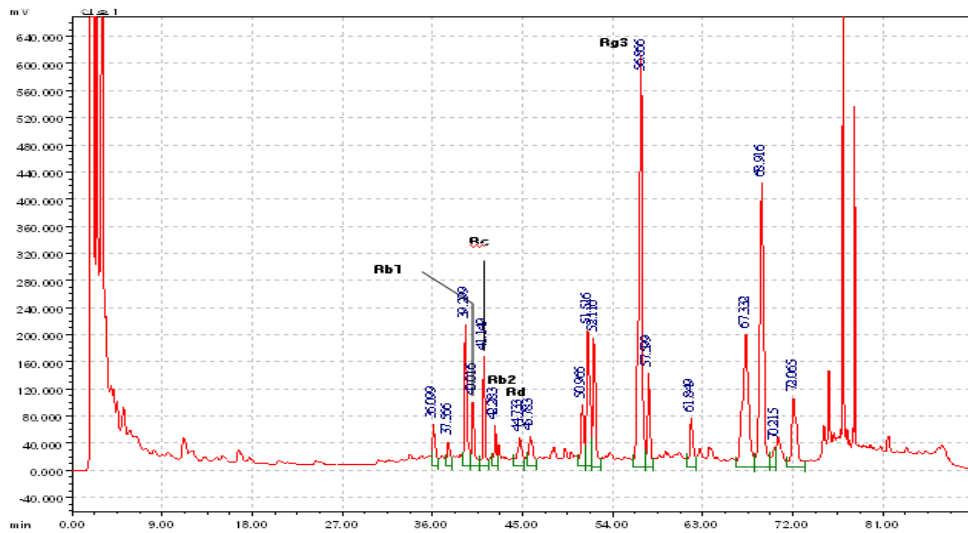
Fig. 86. TLC analysis of reaction between red ginseng extract and crude enzyme. S, standard; cont., control.

홍삼농축액에는 여러 가지 극성이 유사한 사포닌 성분들이 많이 들어 있어 한 가지 전 개용매로는 각각의 사포닌을 모두 분리하기는 어렵다. 하지만 TLC분석을 통하여 조효소와 반응을 시키지 않은 control과 비교 시 조효소 양의 증가에 따라 standard Rg3 아래쪽에 있는 band들, 특히 Rb1, Rd, Rb2, Rc등의 양이 많이 감소하는 것을 관찰 할 수 있고 Rg3 및 compound K 위쪽에 위치한 미지의 사포닌들이 많이 생성되는 것을 관찰할 수 있었다.

Fig. 87는 홍삼농축액의 control과 조효소와의 반응산물의 HPLC분석 결과이다. 반응산물은 Control에 비해 triol계사포닌인 Re, Rg1은 다 분해가 되고 diol계 사포닌인 Rb1, Rb2, Rc, Rd등이 많이 감소되는 동시에 ginsenoside Rg3 peak가 현저하게 증가되는 것을 관찰 할 수 있었다.



A



B

Fig. 87. HPLC analysis of reaction mixture of red ginseng extract and crude enzyme.

2) 뿌리사포닌의 전환

30 mg/ml 농도로 증류수에 용해시킨 뿌리사포닌 50 μ l에 각각 acetone침전법으로 조제

한 조효소액(50배 농축) 10(Fig. 88-1), 25(Fig. 88-2), 50(Fig. 88-3), 75(Fig. 88-4), 100(Fig. 88-5) μ l를 혼합하여 반응시킨 결과를 Fig. 88에 나타냈다.

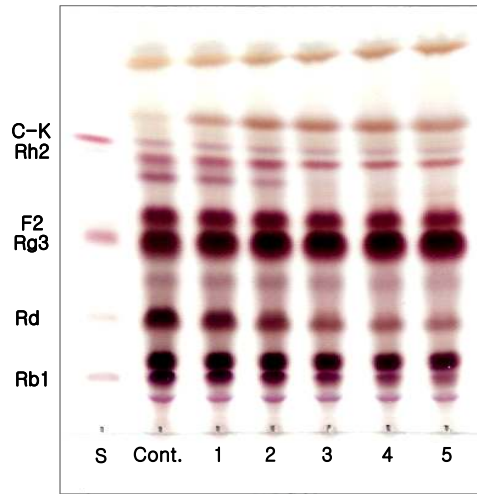
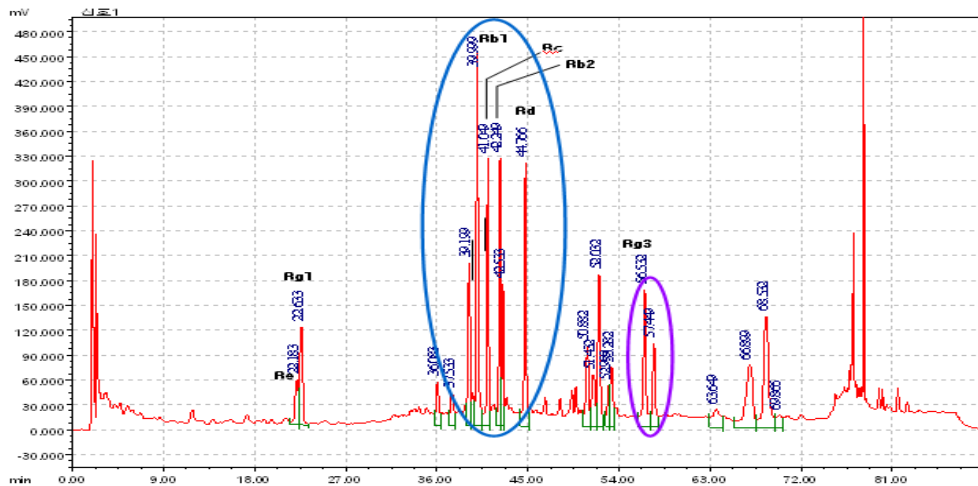
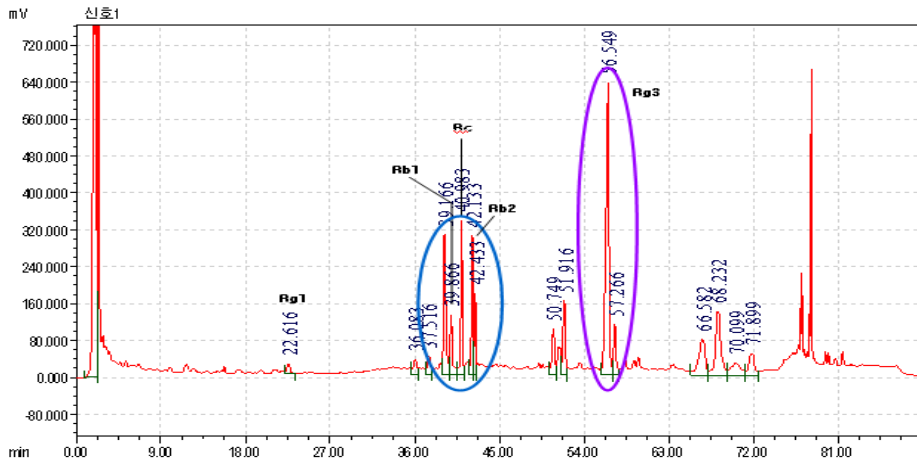


Fig. 88. TLC analysis of reaction between root crude saponins and crude enzyme. S, standard; Cont., control.

뿌리사포닌과 조효소와의 반응은 조효소의 증가에 따라 Rb1, Rd, 및 standard Rh2 아래 쪽에 나타난 Rh1으로 추정되는 사포닌이 현저하게 감소되고 Rg3 band가 현저하게 증가하는 것을 관찰할 수 있다. Fig. 89의 A, B는 뿌리사포닌 및 조효소로 전환시킨 뿌리사포닌의 HPLC 분석결과이다.



A



B

Fig. 89. HPLC analysis of reaction mixture of root saponins and crude enzyme.

Fig. 89 의 A에서 보다시피 뿌리사포닌은 이미 가열과정을 거쳐 추출하였기에 일정한 양의 Rg3가 함유되어 있는 상태이다. A와 B의 비교에서 triol계 사포닌 Rg1 및 Re는 대부분 분해되었고 diol계사포닌 Rb1과 Rd는 현저하게 감소되는 동시에 Rg3가 현저하게 증가하였다. 뿌리사포닌에 함유되어 있는 사포닌을 100%로 보면 Rb1은 61.8%, Rd는 100% 전부 분해되었고 Rg3는 원래의 4.2배로 증가하였다.

Fig. 90는 뿌리사포닌의 반응전과 반응후의 비교분석 그래프로써 Rg3와 Rh1외에 기타 peak의 증가가 보이지 않았다. 따라서 triol계 사포닌인 ginsenoside Re, Rg1은 분해되어 Rh1으로 전환되고 diol계 사포닌인 Rb1, Rd등은 분해되어 대부분 새로운 사포닌 Rg3로 전환되었다는 것을 알 수 있다.

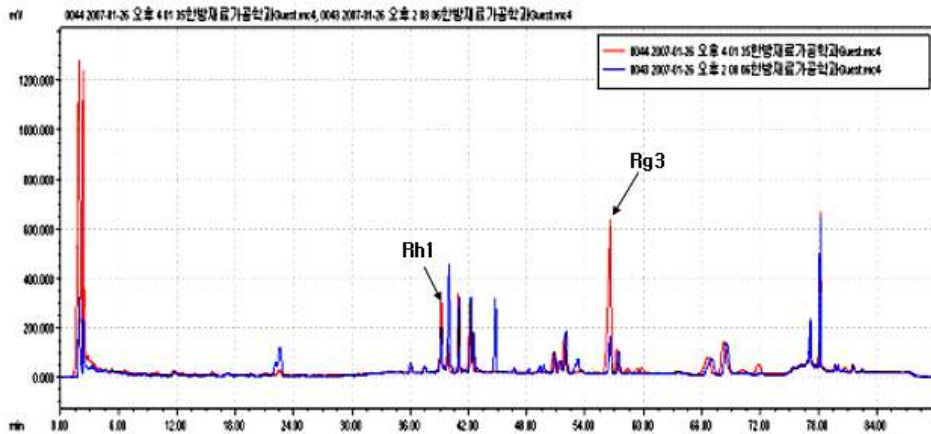


Fig. 90. Comparison of root saponin with the root saponin converted by enzyme.
Blue colour, root saponin; Red colour, root saponin converted by enzyme

3) 잎사포닌의 전환

30 mg/ml 농도로 증류수에 용해시킨 잎사포닌 50 μ l에 각각 acetone침전법으로 조제한 조효소액(50배 농축) 10(Fig. 91-1), 25(Fig. 91-2), 50(Fig. 91-3), 75(Fig. 91-4), 100(Fig. 91-5) μ l를 혼합하여 반응시킨 결과를 Fig. 91에 나타냈다.

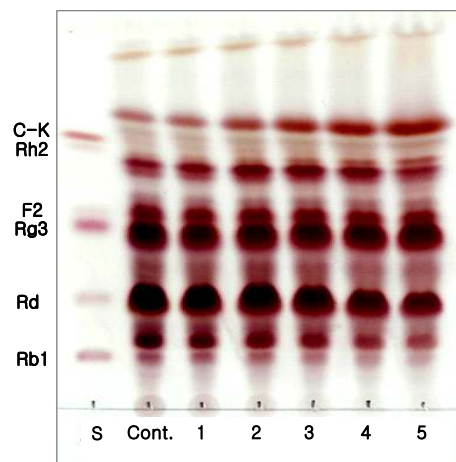


Fig. 91. TLC analysis of reaction between leaf crude saponins and crude enzyme. S, standard; Cont., control.

잎사포닌은 뿌리사포닌에 비해 Rb1이 적고 Rd, Rg1, Re가 많이 들어있다. 잎사포닌과 조효소의 반응은 조효소의 증가에 따라 standard Rg3 아래쪽에 위치한 사포닌의 band 색상이 점차적으로 열리는 경향을 관찰 할 수 있지만 잎사포닌에 대량 함유되어 있는 Re(TLC에서 Rd위치), Rg1(TLC에서 Rg3위치)의 영향으로 뿌리사포닌에 비해 변화되는 경향을 적게 나타냈다.

Fig. 92의 A, B는 잎사포닌 및 조효소로 전환시킨 잎사포닌의 HPLC분석결과이다.

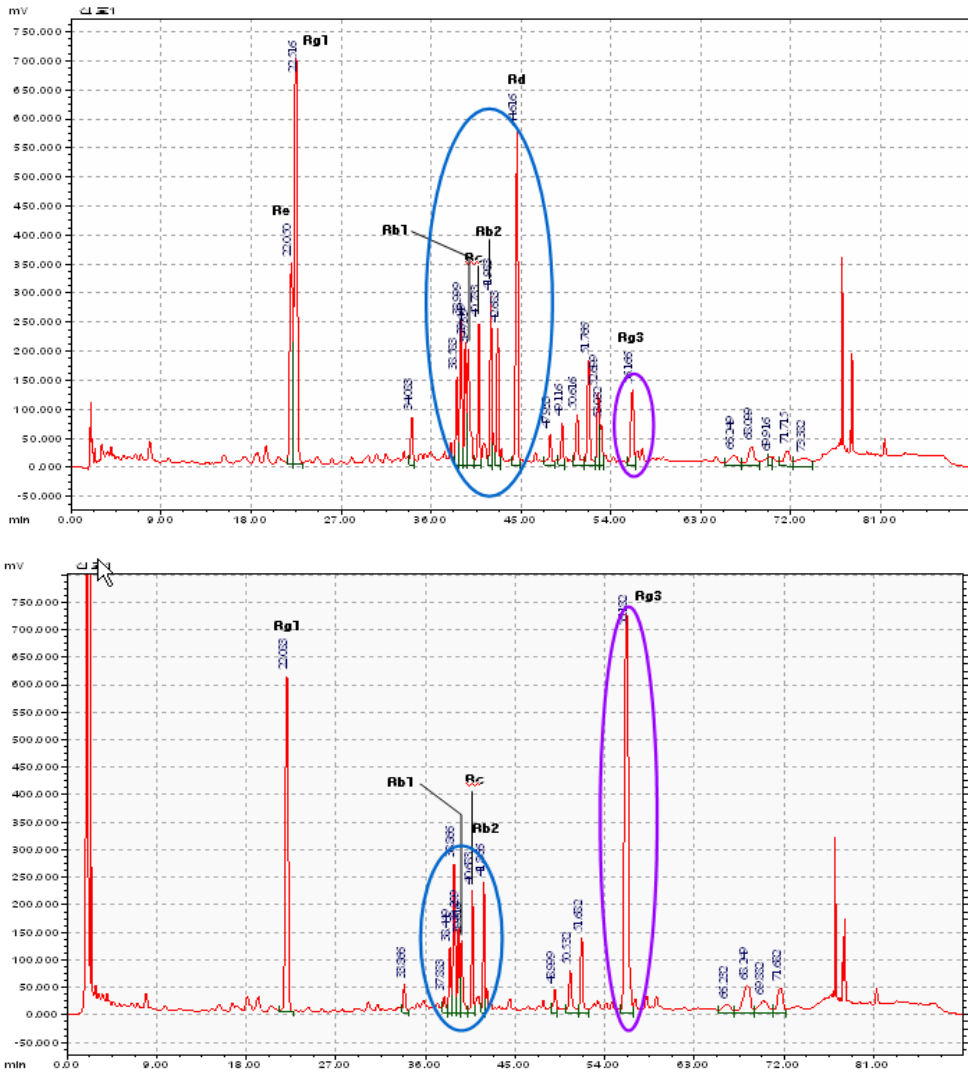


Fig. 92. HPLC analysis of reaction mixture of leaf saponins and crude enzyme.

Fig. 92 의 A에서 보다시피 잎사포닌에는 뿌리사포닌에 비해 다량의 Rd, Rg1이 함유되어 있다. A와 B의 비교에서 triol계 사포닌 Re는 모두 분해되어 Rg1으로 전환되었고 diol계 사포닌 Rb1과 Rd, 특히는 Rd가 전부 분해된 동시에 Rg3가 대폭 증가하였다. 잎사포닌에 함유되어 있는 사포닌을 100%로 보면 Rb1은 40.0%, Rd 100%, Re 100%, Rg1은 19.6% 분해되었고 Rg3는 원래의 7.4배로 증가하였다.

Fig. 93은 잎사포닌의 반응전과 반응후의 비교분석 그래프로서 diol계 사포닌 Rb1, Rd 등이 분해되어 새로운 사포닌 Rg3로 전환되었다는 것을 알 수 있다.

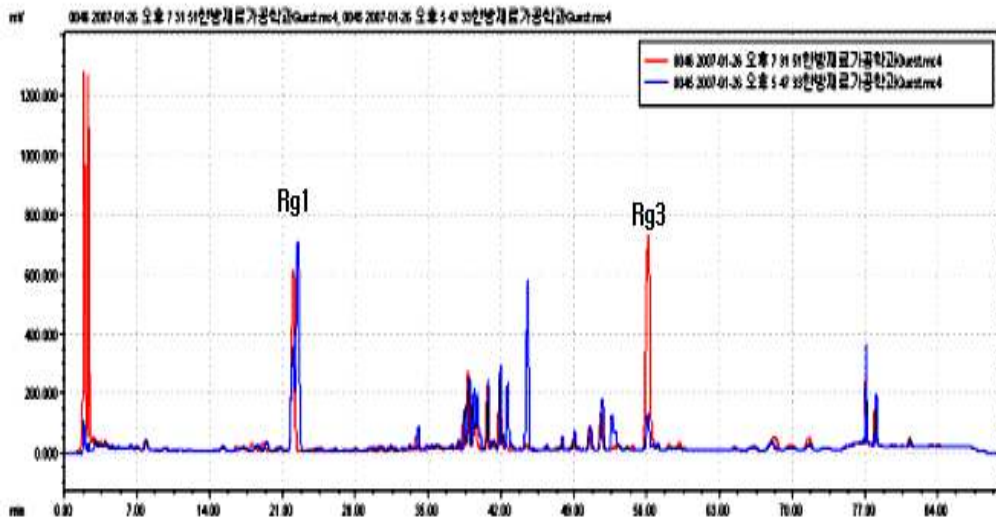


Fig. 93. Comparison of leaf saponins with the leaf saponins converted by enzyme.

Blue colour, leaf saponins; Red colour, leaf saponins converted by enzyme.

위의 HPLC분석을 통하여 GS 514 균주에 의해 생산되는 효소는 인삼농축액, 뿌리사포닌 및 잎사포닌과의 반응에서 diol계 사포닌 중 Rb1, Rd 뿐만 아니라 Rb2, Rc까지도 모두 특이적으로 Rg3로만 전환시키는 아주 좋은 Rg3생산 효과를 나타냈다.

Ginsenoside Rg3생산효소는 acetone침전법으로 쉽게 침전이 될 뿐만 아니라 효소활성을 그대로 유지시킴으로서 효소생산의 산업화에 용이하다. 또한 가격이 저렴한 인삼 잎사포닌이나 미삼을 원료로 acetone침전법으로 조제한 Rg3생산 효소를 이용한 20(S)-Rg3 고 함유 인삼제품의 생산 및 순수한 20(S)-Rg3생산의 산업화에 큰 경제적 효과를 나타낼 것으로 사료된다.

나. 20L-fermenter를 이용한 발효기 운전

20L-fermenter는 하부에 공기를 공급할 수 있는 스파자 부분과 상부에는 공기가 배출될 수 있는 밴트 시스템으로 구성되었으며 공기이동시에는 모두 membrane filter를 사용하여 잡균의 오염을 제거할 수 있는 매우 간단한 형태로 만들어진 발효기이다. 20L-fermenter를 사용하면 대규모의 균주 배양 및 효소생산을 쉽게 할 수 있다.

Fig. 94은 working volume 20L 대형발효기를 사용하여 균주를 배양한 모습이다.



A

Fig. 94. Mass culture of strain GS514 by 20L fermenter.

GS514 균주는 20L fermenter에서 배양 시 삼각플라스크에서의 소량 배양에 비해 균 성장속도가 다소 떨어졌다. 주요한 원인은 거품의 대량 생성으로 인하여 aeration속도를 늦추어준 원인으로 사료된다. 20L fermenter에서 발효시킨 균 배양액을 원심분리하고 배양여액을 Rb1과 반응시킨 결과를 Fig. 95에 나타냈다.

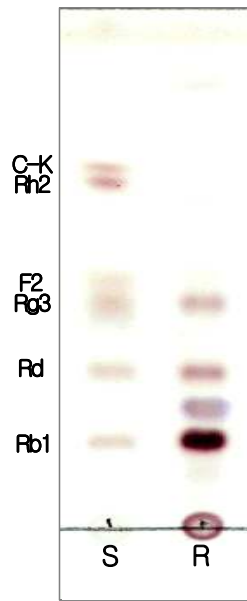


Fig. 95. TLC analysis of reaction between ginsenoside Rb1 with crude enzyme producing mass culture.

Fermenter에서의 대량배양은 소량배양과 마찬가지로 역시 Rb1을 Rd, Rg3로의 전환활성을 보여주었으며 균주 성장속도의 저하로 인하여 전환활성이 소량배양에 비해 역시 약간 떨어지는 것으로 나타났다. 따라서 균주의 대량배양 시 aeration속도를 높여 균주의 성장속도를 증가시키기 위하여 antifoamer 실리콘(40 ppm)의 첨가 하에서 대량배양을 시도하였다.

Table 30은 GS514균주를 100 ml와 10 L LB배지에서 16 h 배양 및 유도물질 인삼 잎사포닌을 1.2% 첨가하여 15 h 배양 후 측정된 O.D₆₀₀값 수치이다.

Table 30. O.D₆₀₀ detection of 0.1L and 10 L culture.

Culture volume	Culture for 16 h	Culture for 15 h after adding inducer
100 ml	1.069	1.718
10 L	0.999	1.752



A



B

**Fig. 96. Mass culture of 33 strain by 20L fermenter.
A: 0.1L culture; B: 10L culture**

Antifoamer의 첨가한 후 GS514균주의 10 L 대량배양과 0.1L 소량배양의 O.D₆₀₀값을 측정한 결과, 유도물질 첨가전·후의 대량배양은 소량배양과 유사한 균의 성장속도를 나타냈다.

Fig. 96은 GS514균주를 0.1L LB배지와 10 L LB배지에서 유도물질 첨가 후 15 h 배양한 사진으로 소포제 첨가전(Fig. 96)보다 많이 균이 잘 성장한 것을 관찰 할 수 있었다.

0.1L 소량배양과 1 L 대량 배양의 Rg3생산 활성을 비교하기 위하여 cell을 제거 후 각각의 균배양액을 acetone침전하여 동량의 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0에 용해하고 1 mM ginsenoside Rb1수용액과 30 °C에서 12 h 반응시켰다. Fig. 97와 Fig 98은 반응전환산물에 대한 TLC 및 HPLC 분석결과 이다.

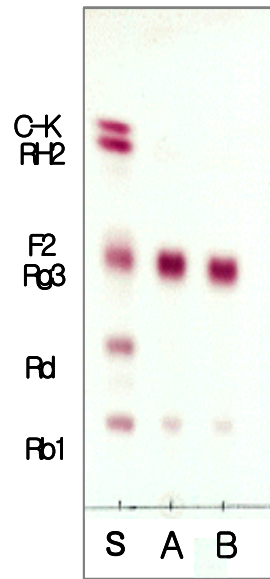
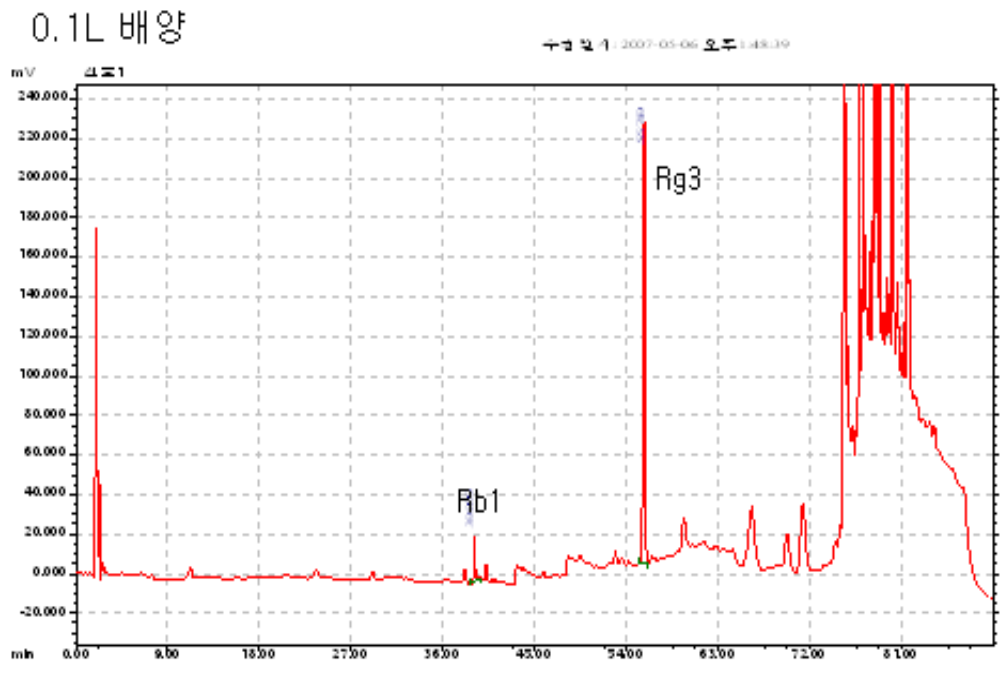
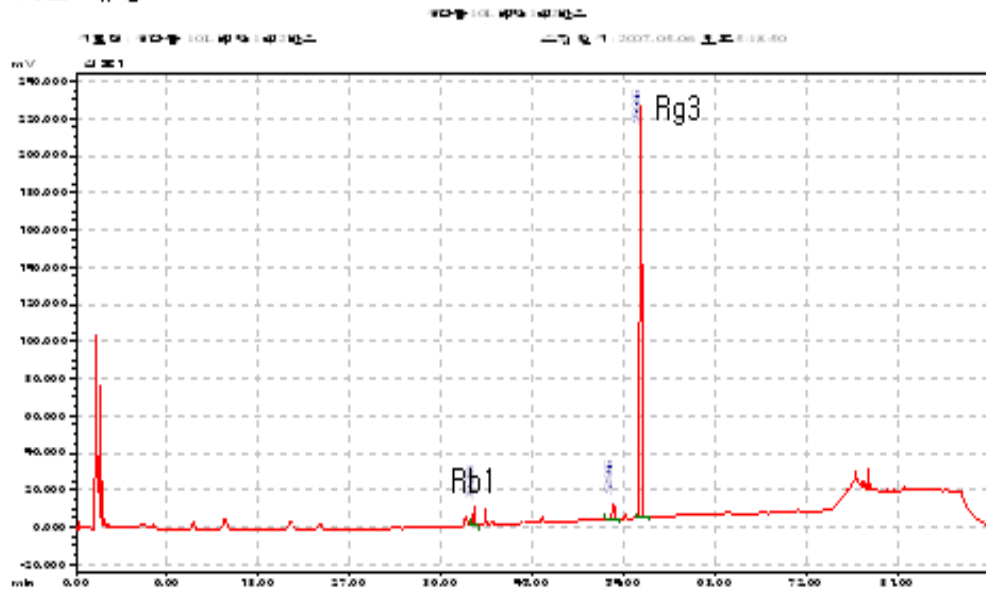


Fig. 97. TLC analysis of reaction between ginsenoside Rb1 with crude enzyme.
 A: 0.1L culture; B: 10L culture



A

10L 배양



B

Fig. 98. HPLC analysis of reaction mixture of ginsenoside Rb1 and crude enzyme. A: 0.1L culture; B: 10L culture

TLC와 HPLC분석에서 소량배양(0.1L)이나 대량배양(10L)이나 대부분의 Rb1이 Rg3로 전환되어 모두 높은 Rg3생산 활성을 나타내었다. 이것은 Rg3생산균주 GS514는 대량배양이 가능하며 소량배양과 마찬가지로 높은 Rg3로의 전환활성을 나타내는 것을 알 수 있다.

결론

본 과제는 3년간의 연구수행을 통하여 인삼근권 토양으로부터 β -glucosidase 분비 미생물을 758개 screening하였고 그 중에서 β -glucosidase 분비 능력을 재 체크하여 최종적으로 211개 균주(1차년도 100주, 2차년도 111주)를 확보하였으며 β -glucosidase분비 미생물들의 DNA 추출, PCR 증폭 및 16S rDNA 염기서열 분석을 통하여 GeneBank에 있는

database와 계통학적 위치를 확인한 결과 8개의 주요한 계통군: *Proteobacteria* α -subdivision (28균주), *proteobacteria* β -subdivision (10균주), *proteobacteria* γ -subdivision (24균주), *Actinobacteria* (88균주), *Firmicutes* (28균주), *Bacteroidetes* (2균주)와 *Deinococcus-Thermus* (1균주) 등을 발견하였고, 신종인 *Sphingopyrix granuli* (1균주)도 발견하였다. 동정되지 않은 29개의 균주를 제외한 182개 균주들의 16s rDNA 염기서열의 계통학적 위치를 확인한 결과, 52개 균주가 데이터베이스화된 참조균주와 90~97%의 상동성을 나타내어 신종 혹은 신속으로 제안하고 이들 균주 중 일부 균주들에 대한 세균학적 특성을 규명하여 분류학적 위치를 결정하였다. 또한 전국 각지에서 지역별, 종류별로 104개의 김치시료를 수집하여 MRS 배지를 이용하여 유산균을 분리하였으며, esculin agar plate에서 black complex를 형성한 균주, 즉 β -glucosidase 분비활성을 보이는 127개의 strain을 찾아내었다. 김치로부터 분리된 유산균 127개의 16S rDNA 염기서열 분석을 통하여 GeneBank에 있는 database와 계통학적 위치를 확인한 결과, *Lactobacillus* 속에 속하는 균주들이 가장 많았으며 (56%), 그 다음으로 *Leuconostoc* (25%), *Weissella* (10%), *Pediococcus* (4%), *Bacillus* (4%), *Arthrobacter* (1%) 순으로 분포되어 있음을 알 수 있었다.

분리된 211개 β -glucosidase 분비 미생물은 전부 major사포닌 ginsenoside Rb1과 반응시킨 후 TLC로 분석한 결과 ginsenoside Rb1을 각각 Rd, Rg3, F2, Rh2, compound K, gypenoside XVII 및 미지 사포닌으로 전환할 수 있는 능력을 확인하였고 HPLC분석과 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 분석을 통하여 ginsenoside Rd, 20(S)-Rg3, F2, compound K 및 gypenoside XVII의 구조를 동정하였다.

Ginsenoside Rg3는 구조적 특징으로 말미암아 산처리 에 의해 major 사포닌(Rb1, Rb2, Rc, Rd)이 쉽게 가수분해 되어 생성이 되지만 효소처리에 의해서는 20번 탄소의 입체장애가 커서 효소의 접근이 어려워지는 원인으로 인하여 지금까지 Rg3생산효소의 분리에 관한 연구가 보고되어 있지 않다(김천석 등, 1998). 본 연구팀은 과제를 수행하는 과정에서 대량의 균 test를 통하여 Rg3생산효소를 발현하는 균주를 찾아내었고 효소발현 최적조건 및 활성조건을 탐색하였으며 효소의 금속의존성 특성을 밝혔다. 여러 가지 실험을 통하여 ginsenoside Rg3생산효소는 Rb1을 직접 Rg3로 전환시키는 것이 아니라 Rb1이 먼저 다른 효소에 의해 Rd로 전화되고 다시 Rg3생산효소에 의해 Rg3로 전환되는 즉 Rb1→Rd→Rg3

의 전환경로를 밝혔고 ion exchange chromatography, gel chromatography 등 방법을 이용하여 Rd생산 효소를 분리하였으며 PAGE, SDS-PAGE, 2-D 등 방법을 이용하여 Rg3생산 효소로 예상되는 spot를 대전 기초지원연구소에 의뢰하여 amino acid sequencing을 하였다.

GS 514 균주는 2L, 5L, 20L배양기를 이용하여 배양 시 소량 배양과 마찬가지로 균 생장, ginsenoside Rg3생산 활성이 모두 양호하였다. Ginsenoside Rg3생산효소는 acetone 침전법으로 쉽게 침전이 될 뿐만 아니라 효소활성을 그대로 유지시킴으로서 효소생산의 산업화에 용이하며 acetone 침전법으로 조제한 Rg3생산 효소는 인삼농축액, 뿌리사포닌 및 잎사포닌과의 반응에서 diol계 사포닌 중 Rb1, Rd뿐만 아니라 Rb2, Rc까지도 모두 특이적으로 Rg3로만 전환시키는 아주 좋은 Rg3생산효과를 나타냈다. 따라서 ginsenoside Rg3생산효소가 가격이 저렴하게 쉽게 생산이 된다면 20(S)-Rg3 고 함유 인삼제품의 생산이 가능할 것이며 상대적으로 가격이 저렴하고 Rd가 많이 함유되어 있는 인삼 잎사포닌을 원료로 사용한다면 순수한 20(S)-Rg3생산에 있어서 큰 경제적 효과를 나타낼 것으로 사료된다.

GS 514 균주에 의해 생산되는 Rg3생산효소는 인삼사포닌 유도물질을 첨가함으로 발현하는 유도효소로서 Rg3생산효소의 생산에 있어서 산업화하기가 어렵다. 따라서 인슐린의 제조방법을 참조하여 Rg3생산효소의 proteomics 및 관련유전자를 확인하고 specific gene의 vector제조합을 이용하여 대장균 *E. Coli*에 Rg3생산효소 관련 유전자를 형질전환 시켜 저렴하게 대량화 할 수 있는 방법이 요구 된다.

Rg3생산효소를 생산하는 본 미생물은 데이터베이스가 구축된 것이 없고 기타 미생물과의 연관성도 적어 Rg3생산효소의 proteomics 및 관련유전자의 확인에 상당한 어려움을 주었다. Rg3생산효소의 분리 동정은 세계적으로 처음으로 이루어지는 연구로서 학문적으로나 경제적으로나 모두 큰 가치를 가지며 더욱 많은 시간과 연구비를 바탕으로 지속적인 연구가 필요하다고 생각 된다.

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표의 달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
1차년도 (2004. 05~ 2005. 05)	○ 사포닌 전환 효소 type 다양성을 몇 가지인가?	20
	○ β-gal 효소 활성 균주를 100주 분리했는가?	30
	○ 사포닌 전환 균주를 10주 이상 분리했는가?	50
2차년도 (2005. 05~ 2006. 05)	○ 사포닌 전환 균주의 발효기 운전인자를 도출했는가?	30
	○ 사포닌 전환 효소의 분리방법을 찾았는가?	40
	○ 사포닌 전환효소의 정제 기술을 확립했는가?	10
3차년도 (2006. 05~ 2007. 05)	○ β-gal 효소 활성 균주를 100주 분리했는가?	30
	○ 산업용 미생물 발효기를 운전했는가?	30
	○ 사포닌 전환효소를 대량 정제했는가?	30
	○ 새로운 사포닌의 개발 및 사포닌 성분 분석	30
최종평가	○ 사포닌 전환 활성 균주 확보	30
	○ 미생물 반응기 운전 및사포닌 전환 효소의 대량생산	40
	○ 새로운 사포닌함유 신제품이 개발되었는가?	

제 2 절 관련분야의 기여도

가. 기술적 측면

1. 효소에 의한 ginsenoside Rg3의 생산은 산처리나 열처리에 비해 반응조건이나 특정사포닌 생산에서 우월성을 가지고 있으나 지금까지 Rg3생산효소의 분리 및 동정이 되어 있지 않다. 따라서 20(S)-Rg3생산효소를 생산할 수 있는 균주의 발견은 Rg3생산, 특히 20(S)-Rg3생산에 있어서 획기적인 역할을 가지고 있으며 학문적으로 아주 중요한 가치를 가지고 있다.

2. 20(S)-Rg3 생산효소에 대한 특성 및 효소발현 최적조건을 확립하였다.
3. 20(S)-Rg3 생산효소에 대한 산업용 조제방법을 확립하였다.
4. 인삼농축액, 인삼 잎사포닌, 인삼 뿌리사포닌으로부터 Rg3로의 전환방법을 확립하였다.
5. 20L fermenter를 이용한 Rg3생산균주의 배양방법을 확립하였다.
6. 지금까지 Rg3에 대한 약리활성에 대한 연구는 주로 R-form과 S-form의 혼합물에 대한 연구가 대부분이었다. 20(S)-Rg3생산균주의 발견으로 인하여 효소에 의한 20(S)-Rg3의 생산이 용이함으로 R-form과 S-form 각각의 약리활성에 대한 연구가 활성화되리라고 기대된다.

나. 경제산업적 측면

1. Rg3 함유제품은 국내에서 주로 ginsenoside Rg3가 5% 이하로 소량 함유, 및 R-form과 S-form이 혼입된 것이 대부분이다. Rg3생산균주의 발견과 Rg3 생산효소의 대량생산은 20(S)-Rg3성분이 고농도로 함유되어 있는 기능성 인삼제품 및 의약품의 산업화가 가능하다.
2. 국내 인삼 산업의 시장을 넓혀줄 수 있고, 수출까지 가능케하여 인삼산업을 한층 더 활성화시킬 수 있다. 또한 인삼재배농민들의 수득을 높일 수 있다..

제5장 연구개발결과의 활용계획

가. *Microbacterium esteraromaticum* GS514 균주에 의해 생산되는 Rg3생산효소는 인삼 사포닌을 유도물질로 첨가함으로써 발현하는 유도효소로서 Rg3생산효소의 생산에 있어서 단가가 높아 산업화에 불리한 점이 있다. 따라서 인슐린의 제조방법을 참조하여 Rg3생산효소의 proteomics 및 관련유전자를 확인하고 specific gene의 vector재조합을 이용하여 대장균 *E. Coli*에 Rg3생산효소 관련 유전자를 형질전환시켜 저렴하게 대량 생산할 수 있는 방법이 필요하다.

나. Rg3생산효소를 만드는 본 미생물은 유전자 데이터베이스가 구축된 것이 없고 기타 미생물과의 연관성도 적어 Rg3생산효소의 proteomics 및 관련유전자의 확인에 상당한 어려움이 있었다. Rg3생산효소의 분리 동정은 처음으로 이루어지는 연구로서 학문적으로나 경제적으로나 모두 중요한 가치를 가지고 있으며 더욱 많은 시간과 연구비를 바탕으로 지속적인 연구가 필요하다고 생각 된다.

다. Rg3의 대량생산 기술이 완료되면 기업으로 이전하여 인삼을 대량으로 재배하는 지역에 공장을 확보하고 재배된 인삼을 원료로 Rg3가 특이적으로 많이 함유되어있는 건강기능성 식품, 의약품, 신소재 인삼제품 등을 생산한다.

라. 본 연구에서 Rg3생산효소를 발현하는 *Microbacterium esteraromaticum* GS514 균주는 인삼근권 토양으로부터 분리한 토양미생물로서 GS514 균주뿐만 아니라 앞으로 대장균 *E. Coli*에 Rg3생산효소 관련 유전자가 형질전환이 되면 *E. Coli*까지 독성검사가 이루어져야 할 것이다.

마. 20(S)-Rg3성분 고함유 제품이 개발되면 20(S)-Rg3와 20(R)-Rg3의 각종 약리활성에 대한 비교연구가 다양하게 이루어 질 것으로 사료된다.

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당사항 없음

제7장 참고문헌

Anufriev V. P., Malinovskaya G. V., Denisenko V. A., Uvarova N. I., Elyakov G. B., Kim S. I., Baek N. I., 1997. Synthesis of ginsenoside Rg3, a minor constituent of Ginseng radix. *Carbohydr Res.* 304, 179-182.

Atlas, R. M. (1993). *Handbook of Microbiological Media*. Edited by L. C. Parks. Boca Raton, FL: CRC Press.

Bae EA, Han MJ, Choo MK, Park SY, Kim DH (2002), Metabolism of 20(S)- and 20(R)-ginsenoside Rg3 by human intestinal bacteria and its relation to in vitro biological activities. *Biol. Pharm. Bull.* 25(1), 58-63.

Bae EA, Park SY, Kim DH (2000), Constitutive β -glucosidases hydrolyzing ginsenoside Rb1 and Rb2 from human intestinal bacteria. *Biol Pharm Bull* 23(12), 1481-1485.

Chi H, Ji G. E., (2005). Transformation of ginsenosides Rb1 and Re from Panax ginseng by food microorganisms. *Biotechnol Lett.* 27(11):765-771.

Chi H, Kim D. H., Ji G. E., (2005). Transformation of ginsenosides Rb2 and Rc from Panax ginseng by food microorganisms. *Biol Pharm Bull.* 28(11):2102-2105.

Daniel M. B., Michael D. R., Stuart J. E. (1996). *Protein Methods*. 2nd ed. Wiley-

Liss, Inc., 605 Third Avenue, New York. p111–112.

Dong A, Ye M, Guo H, Zheng J, Guo D (2003) Microbial transformation of ginsenoside Rb₁ by *Rhizopus stolonifer* and *Curvularia lunata*. *Biotechnol. Lett.* 25: 339–344.

Dou D. Q., Wen Y. Weng M. H., Pei Y. P., Chen Y. J. (1997), Studies on the minor saponins from leaves of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Zhongguo Zhongyaozhazhi* 22(1): 35–37, 62.

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user–friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41, 95–98.

Han BH, Park MH, Han YN (1982) Degradation of ginseng under mild acidic condition. *Plant Med.* 44: 146–149.

Hasegawa H, Sung JH, Matsumiya S, Uchiyama M (1996), Main ginseng saponin metabolites formed by intestinal bacteria. *Planta Med* 62(5), 453–457.

Im KS, Chung HY, Park SH, Je NK (1995) Anticancer effect of the hydrolyzed monogluco–ginsenoside of total saponin from ginseng leaf. *Korean J. Ginseng Sci.*, 19: 291–294.

Jeong S. M., Lee J. H., Kim J. H., Lee B. H., Yoon I. S., Lee J. H., Kim D. H., Rhim H., Kim Y., Nah S. Y., 2004. Stereospecificity of ginsenoside Rg3 action on ion channels. *Mol. Cells* 18, 383–389.

Karikura M, Miyase T, Tanizawa H, Taniyama T, Takino Y. (1991). Studies on

absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. VI. The decomposition products of ginsenoside Rb2 in the stomach of rats. *Chem Pharm Bull* (Tokyo). 39(2):400-4.

Kim D. J., Seong G. S., Kim D. W., Go S. L., Jang J. C., 2004. Antioxidative Effects of Red Ginseng Saponins on Paraquat-induced Oxidative Stress. *Korean J. Ginseng Res.* 28(1): 5-10.

Kim ND, Kang SY, Kim MJ, Park JH, Schini-Kerth VB (1999). The ginsenoside Rg3 evokes endothelium-independent relaxation in rat aortic rings: role of K⁺ channels. *Eur J Pharmacol* 367(1): 51-57.

Kim N. D., Kim E. M., Kang K. W., Cho M. K., Choi S. Y., Kim S. G., 2003. Ginsenoside Rg3 inhibits phenylephrine-induced vascular contraction through induction of nitric oxide synthase. *Brit. J. Pharmacol.* 140, 661-670.

Kimura, M. (1983). The Neutral Theory of Molecular Evolution. *New Scientist*, pp. 41-46.

Kim YC, Kim SR, Markelonis GJ, Oh TH (1998) Ginsenosides Rb1 and Rg3 protect cultured rat cortical cells from glutamate-induced neurodegeneration. *J Neurosci Res* 53(4): 426-432.

Ko SR, Choi KJ, Suzuki K, Suzuki Y (2003), Enzymatic preparation of ginsenosides Rg2, Rh1, and F1. *Chem Pharm Bull* 51(4), 404-408.

Ko SR, Choi KJ, Uchida K, Suzuki Y. (2003), Enzymatic preparation of ginsenosides Rg2, Rh1, and F1 from protopanaxatriol-type ginseng saponin mixture. *Planta Med* 69(3), 285-286.

Ko SR, Suzuki Y, Choi KJ, Kim YH (2000), Enzymatic preparation of genuine prosapogenin, 20(S)-ginsenoside Rh1 from ginsenosides Re and Rg1. *Biosci Biotechnol Biochem* 64(12), 2739-2743.

Kumar, S., Tamura, K., Jacobsen, I. B. & Nei, M. (2001). Mega2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17, 1244-1245.

Lee H. U., Bae E. A., Han M. J., Kim D. H., 2005. Hepatoprotective effect of 20(S)-ginsenosides Rg3 and its metabolite 20(S)-ginsenoside Rh2 on tert-butyl hydroperoxide-induced liver injury. *Biol Pharm Bull.* 28, 1992-1994.

Liu WK, Xu SX, Che CT(2000) Anti-proliferative effect of ginseng saponins on human prostate cancer cell line. *Life Sci* 67(11), 1297-1306.

Mergaert, J., Cnockaert, M. C. & Swings, J. (2002). *Fulvimonas soil* gen. nov., sp. nov., a -proteobacterium isolated from soil after enrichment on acetylated starch plastic. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 1285-1289.

Mochizuki M, Yoo YC, Matsuzawa K, Sato K, Saiki I, Tono-oka S, Samukawa K, Azuma I (1995), Inhibitory effect of tumor metastasis in mice by saponins, ginsenoside-Rb2, 20(R)- and 20(S)-ginsenoside-Rg3, of red ginseng. *Biol. Pharm. Bull.* 18(9), 1197-1202.

Nalin, R., Simonet P., Vogel T. M. & Normand P. (1999). *Rhodanobacter lindaniclasticus* gen. nov., sp. nov., a lindane-degrading bacterium. *Int J Sys Bacteriol* 49, 19-23.

Park JH (2004) Sun ginseng—A new processed ginseng with fortified activity. *Food Industry and Nutrition*. 9: 23–27.

Park S. Y., Bae E. A., Sung J. H., Lee S. K., Kim D. H. (2001), Purification and characterization of ginsenoside Rb1-metabolizing β -glucosidase from *Fusobacterium* K-60, a human intestinal anaerobic bacterium. *Biosci Biotechnol Biochem*. 65(5):1163–1169.

Rhim H, Kim H, Lee DY, Oh TH, Nah SY (2002), Ginseng and ginsenoside Rg3, a newly identified active ingredient of ginseng, modulate Ca^{2+} channel currents in rat sensory neurons. *Eur J Pharmacol* 436(3): 151–158.

Rivas, R., Trujillo, M. E., Mateos, P. F., Molina, E. M. & Velzquez, E. (2004). *Cellulomonas Xylanilytica* sp. nov., a cellulolytic and xylanolytic bacterium isolated from a decayed elm tree. *Int J Syst Evol Microbio* 54, 533–536.

Saito H, Yoshida Y, Takagi K. (1974). Effect of Panax Ginseng root on exhaustive exercise in mice. *Jpn J Pharmacol*. 24(1):119–27.

Shibata S., Tanaka O., Ando, T., Sado M, Tsushima S (1966), Protopanaxadiol a genuine saponin of ginseng saponins. *Chem. Pharm. Bull*. 14: 595–600

Shinkai K, Akedo H, Mukai M, Imamura F, Isoai A, Kobayashi M, Kitagawa I (1996), Inhibition of in vitro tumor cell invasion by ginsenoside Rg3. *Jpn. J. Cancer Res*. 87(4), 357–362.

Sung J. H. , Hideo Hasegawa ,Satoshi Matsumiya , Masamori Uchiyama , Ha J. Y., Lee M. S. Huh J. D. (1995), Metabolism of Ginseng Saponins by Human Intestinal

Bacteria. Kor. J. Pharmacogn. 26(4): 360–367.

Tachikawa E, Kudo K, Nunokawa M, Kashimoto T, Takahashi E, Kitagawa S (2001). Characterization of ginseng saponin ginsenoside-Rg3 inhibition of catecholamine secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Biochem Pharmacol* 62(7): 943–951.

Takino Y. (1994). Studies on the pharmacodynamics of ginsenoside-Rg1, -Rb1 and -Rb2 in rats. *Yakugaku Zasshi*. 114(8):550–564.

Tanizawa H., Karikuma M., Miyase T., Takono Y. (1993). Studies on the metabolism and/or decomposition and distribution of ginsenoside Rb2 in rats. Proc. 6th Int. Ginseng Symp. Seoul: p.187–194.

Teng R. W., Li H. Z., Wang D. Z., He Y. N., Yang C. R. (2002). NMR Complete Assignments of Three Protopanaxadiol Bisdesmosides. *Chinese J. Magn. Reson.* 19(1):25–32.

Teng R. W., Li H. Z., Wang D. Z., He Y. N., Yang C. R., 2000. NMR Complete Assignments of Three Protopanaxadiol Monodesmosides. *Bo Pu Xue Za Zhi* 17, 461–468.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W; improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* Vol. 22, pp. 4673–4680.

Wakabayashi C, Hasegawa H, Murata J, Saiki I(1997), In vivo antimetastatic action of ginseng protopanaxadiol saponins is based on their intestinal bacterial metabolites after oral administration. *Oncology Res* 9(8), 411–417.

Wakabayashi C, Murakami K, Hasegawa H, Murata J, Saiki I(1998), An intestinal bacterial metabolite of ginseng protopanaxadiol saponins has the ability to induce apoptosis in tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 246(3), 725–730.

Wang BX, Cui JC, Liu AJ, Wu SK. (1983). Studies on the anti-fatigue effect of the saponins of stems and leaves of panax ginseng (SSLG). *J Tradit Chin Med*. 3(2):89–94.

Wang T. F., Meng M. Z., 1999. Experiment for Immunity Effects of Ginsenoside Rg 3. *Zhong Guo Yao Ke Da Xue Xue Bao* 2, 55–57.

Wu J, Lin L, Chau FT (2001), Ultrasound–assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. *Ultrason Sonochem.*, 8(4): 347–352.

Xie, C. H., Yokota, A. (2004). *Dyella japonica* gen. nov., a *–Proteobacteria* isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* Papers in Press, doi:10.1099/ijss.0.63377-0.

Xie J. T., Mehendale S. R., Li X, Quiq R, Wang X, Wang C. Z., Wu J. A., Aung H. H., A Rue P, Bell G. I., Yuan C.S., (2005). Anti-diabetic effect of ginsenoside Re in ob/ob mice. *Biochim Biophys Acta*. 1740(3):319–25.

Xu Q. F., Fang X. L., Chen D. F. (2003). Pharmacokinetics and bioavailability of ginsenoside Rb1 and Rg1 from *Panax notoginseng* in rats. *J Ethnopharmacol*. 84:187–192.

Yu H, Gong J, Zhang C, Jin F (2002) Purification and characterization of ginsenoside- α -L-Rhamnosidase. *Chem. Pharm. Bull.* 50: 175–178.

Zhang C. Z., Yu H. S., Bao Y. M., An L. J., Jin F. X.,(2001). Purification and Characterization of Ginsenoside- β -Glucosidase from Ginseng. Chem. Pharm. Bull. 49(7):795-798.

Zhang S, Chen R, Wu H, Wang C. (2006), Ginsenoside extraction from *Panax quinquefolium* L. (American ginseng) root by using ultrahigh pressure. J Pharm Biomed Anal., 41(1): 57-63.

고성룡, 김석창, 최강주(1992). 홍삼의 알콜 농도별 추출액스의 수율과 사포닌 함량. 생약학회지, 23(1): 24-28.

김석창, 최강주, 고성룡, 주현규(1987). 인삼의 근, 잎 및 경의 일반성분, 용매별 엑기스 및 사포닌함량 비교. 고려인삼학회지, 11(2): 118-122.

김시관, 광이성, 김세원, 황석연, 고영수, 유종명(1998). 인삼조사포닌의 조제 방법 개선. 고려인삼학회지, 22(3): 155-160.

김천석, 정승일, 이용구(1998). 벤젠 에틸렌 수지 흡착에 의한 인삼의 Panaxadiol과 Panaxatriol의 신속한 분리, 고려인삼학회지, 22(3): 211-215.

광이성, 김미주, 김은희, 김영애(1997). 인삼사포닌 화합물의 신속한 추출. 한국식품과학회지, 29(6): 1327-1329.

광이성, 이종태, 여운형(2002). 오염된 인삼으로부터 분리된 *Enterobacter* sp의 동정 및 인삼사포닌의 균 생육억제효과. 한국식품위생안전성학회지, 17(1):26-30.

권증호, 김경은(1999). 상압조건의 마이크로파 공정과 현행 방법에 의한 인삼근 유용성분의 추출효율 비교 연구. 한국식품영양과학회지, 28(3): 586-592.

성중환, 양차범(1985). 추출용매 에탄올의 농도가 홍삼엑기스의 사포닌조성에 미치는 영향. 한국식품과학회지, 17(3): 227-231.

성중환, 양차범, 김유정(1985). 추출온도 및 시간이 홍삼엑기스의 사포닌 조성에 미치는 영향. 한국식품과학회지, 17(4):265-270.

성중환, 양재원(1986). 열처리가 인삼사포닌의 안정성에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지, 15(1):22-26.

신지영, 최언호, 위재준(2001). 인삼조사포닌의 새로운 분리 방법. 한국식품과학회지, 33(2): 166-172.

신지영, 최언호, 위재준(2001). 추출 및 분획조건에 따른 인삼 조사포닌 중 ginsenoside 조성 차이. 한국식품과학회지, 33(3):282-287

이세봄, 이기동, 인증호(1999). 가압형 마이크로웨이브 추출장치를 이용한 가용성 인삼 성분의 추출조건 최적화. 한국식품영양과학회지, 28(2): 409-416.

오상오, 석희영(1989). 초임계 암모니아 유체에서의 인삼 사포닌 추출. 대한화학지, 34(6): 663-372.

주현규, 조규성(1979). 추출조건에 따른 인삼중의 Ginseng Extract 와 Saponin 함량변화에 관한 연구. 고려인삼학회, 3(1):40-53.

Appendix 1

Table 31. Amino acid sequencing analysis of the enzyme

Spot No.	Mr & pI	Identified proteins (Accession No.)	gi. no of related protein	de novo Sequence analysis
SP1	28.02, 7.02	hemolysin	gi:42521830 & <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> HD100	KTEGCLLS
SP2	96.4&5.87	phosphorylase	gi:33862157 <i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. pastoris str. CCMP1986	SSKNEPFNLR
	81.2&5.60	cyanophycin synthetase	gi:71908877 <i>Dechloromonas aromatica</i> RCB	
	120.2&4.86	carbamoyl-phosphate synthase large subunit	gi:85373966 <i>Erythrobacter litoralis</i> HTCC2594	
	34.6&5.84	NTP-binding protein	gi:85374998 & <i>Erythrobacter litoralis</i> HTCC2594	
	120.2&4.98	similar to ASPIC	gi:32475808 & <i>Rhodopirellula baltica</i> SH 1	
	86.6&4.73	hybrid sensory histidine Kinase	gi:84701751 & <i>Parvularcula bermudensis</i> HTCC2503	
	48.4&5.26	hypothetical protein JNB_06804	gi:84494485 & <i>Janibacter</i> sp. HTCC2649	
	88.9&5.22	PAS	gi:77683561 & <i>Alkaliphilus metalliredigenes</i> QYMF	
SP3	60.1&5.45	protein kinase	gi:113942216 <i>Herpetosiphon aurantiacus</i> ATCC 23779	ELTNYRLE
	90.5&6.07	CRISPR-associated helicase Cas3, core	gi:77686296 <i>Alkaliphilus metalliredigenes</i> QYMF	
	84.4&5.79	aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase, a/b hammerhead: aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase, molybdopterin binding	gi:110598935 & <i>Geobacter</i> sp. FRC-32	
	84.7&5.77	aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase, molybdopterin binding	gi:78223343 & <i>Geobacter metallireducens</i> GS-15	
	67.0&5.10	histidine kinase	gi:109645667 <i>Desulfotobacterium hafniense</i> DCB-2	FGEFYF
SP4	63.5&5.05	response regulator receiver domain protein (CheY-like)	gi:78485383 & <i>Thiomicrospira crunogena</i> XCL-2	DVFLSSV
	62.5&4.74	putative orphan protein	gi:88795022 & <i>Alteromonas macleodii</i> 'Deep ecotype'	
	63.5&5.96	N-utilization substance protein A	gi:71894695 & <i>Mycoplasma synoviae</i> 53	
	112.9&5.39	efflux transporter, HAE1 family, inner membrane component	gi:108761223 & <i>Myxococcus xanthus</i> DK 1622	SSEDQP
	112.7&6.65	hypothetical protein Ldb0196	gi:104773395 & <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. bulgaricus ATCC 11842	
	67.7&7.21	ABC efflux transporter, permease/ATP-binding protein	gi:104780980 & <i>Pseudomonas entomophila</i> L48	
	92.9&5.56	DNA gyrase, subunit A	gi:92088880 & <i>Lactobacillus reuteri</i> 100-23	
	51.2&5.26	Aldehyde dehydrogenase	gi:91770439 & <i>Psychrobacter</i> sp. PRwf-1	
	189.0&5.91	1,4-beta-glucanase	gi:2437819 & <i>Anaerocellum thermophilum</i>	
SP5	79.0&6.52	peptidase S9, prolyl oligopeptidase active site region	gi:113947368 <i>Shewanella baltica</i> OS195	SFLYPG

SP7	59.9&4.37	hypothetical protein V12B01_19291	gi:84386810 <i>Vibrio splendidus</i> 12B01	LSLTVTLLDL
	37.9&4.31	di-haem cytochrome c peroxidase	gi:71281825 <i>Colwellia psychrerythraea</i> 34H	
	63.2&4.82	sensor histidine kinase ChvG	gi:114767167 <i>Roseovarius</i> sp. HTCC2601	LLQQVD
	45.2&4.98	hypothetical protein Daro_0985	gi:71906624 <i>Dechloromonas aromatica</i> RCB	
	59.1&4.46	Endonuclease I	gi:88861432 <i>Pseudoalteromonas tunicata</i> D2	
SP8	60.9&4.77	conserved hypothetical protein	gi:68546927 <i>Shewanella amazonensis</i> SB2B	LLSGWQATK
	45.2&4.07	putative sugar ABC transporter solute-binding protein	gi:88854862 marine actinobacterium PHSC20C1	
SP9	28.4&4.94	histidinol-phosphate phosphatase, putative, inositol monophosphatase	gi:73541458 <i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	LGVLDQPR
	64.4&4.70	malto-oligosyltrehalose trehalohydrolase	gi:83814076 <i>Salinibacter ruber</i> DSM 13855	LLRLDATHK
	41.3&4.89	acyl-CoA dehydrogenase	gi:69297920 & <i>Silicibacter</i> sp. TM1040	
	50.2&4.79	trigger factor	gi:91977365 & <i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB5	

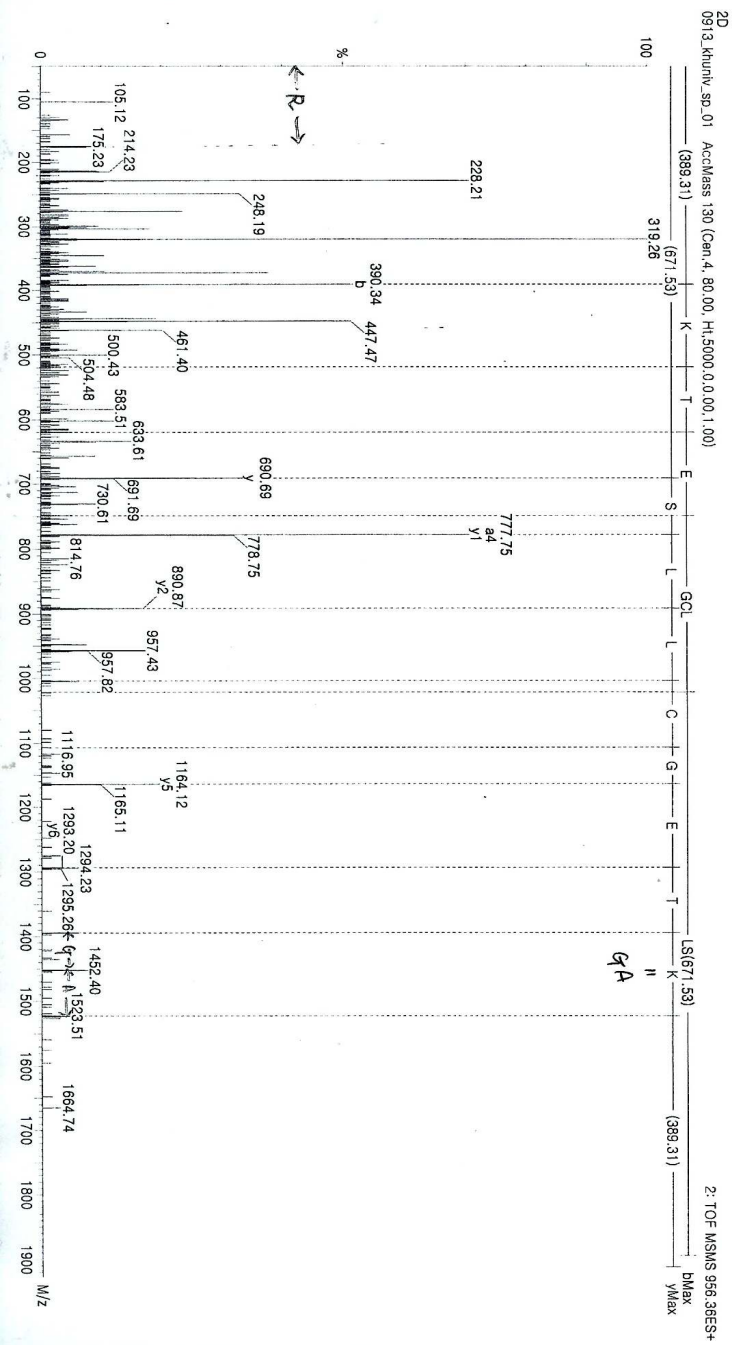
Appendix 2. Amino acid sequencing analysis(sp 1)

BioLyinx - Peptide Sequencing Report
 PepsSeq file: C:\wheeler\onlinhw\MSupport\data\W2006W0609W0913W0913_KHUniv_sp1_956.psq
 Printed: Thu Sep 14 11:25:58 2006

Page 2

Observed MW: 1910.6971 Precursor ion charge state: 2
 M/Z tolerance: 0.30 Intensity threshold: 0 (0.200%)

Label	M/Z	Intensity	Charge State
a	382.32	490.42	591.47
b	590.32	516.41	619.46
z	1894.67	1505.98	1377.27
y	1911.70	1522.40	1384.30



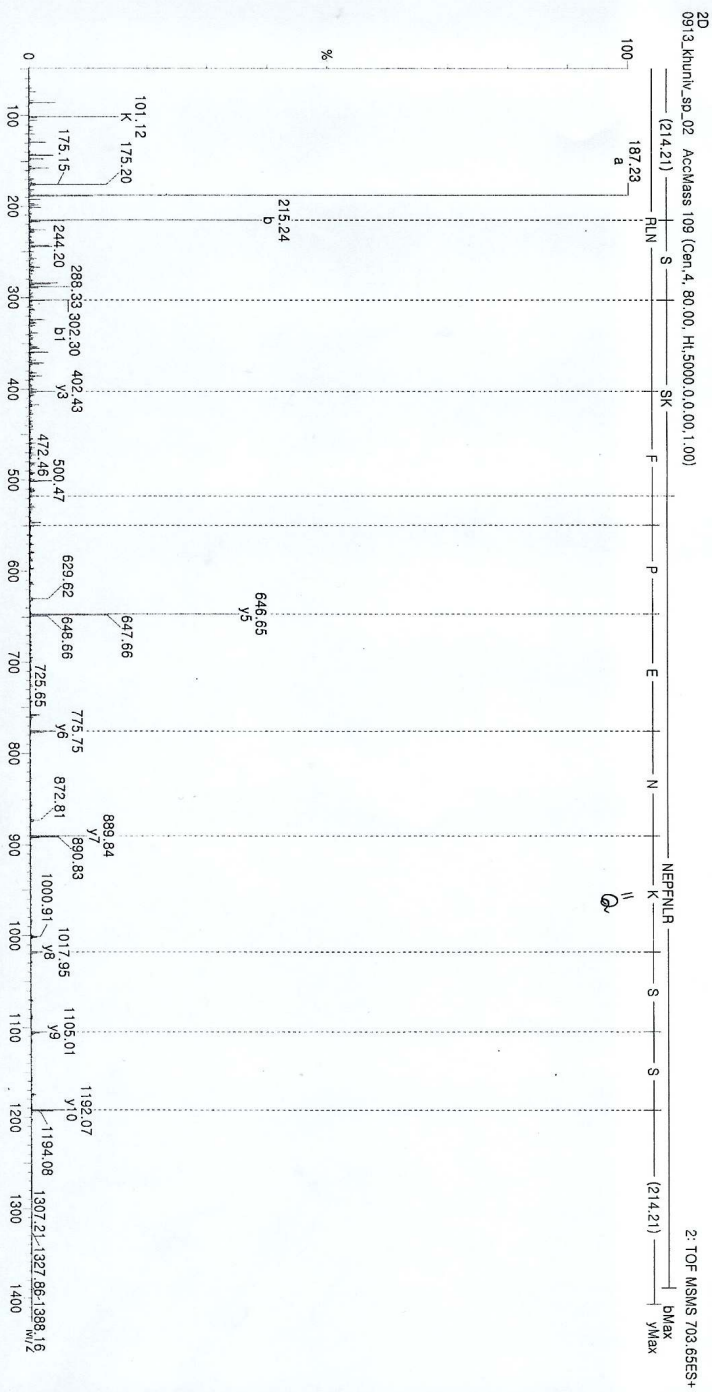
Appendix 2. Amino acid sequencing analysis(sp 2)

BioLytx - Peptide Sequencing Report
 Peptide file: C:\w\leleopdmw\support_data\W2006W0609W0913W0913_KHUniv_spp2_703.psq
 Printed: Thu Sep 14 11:35:48 2006

Page 2

Observed MW: 1405.2793 Precursor ion charge state: 2
 M/z tolerance: 0.30 Intensity threshold: 1 (0.200%)

	187.23	274.26	361.29	489.38	603.43	732.47	829.52	976.59	1090.63	1203.72	1359.82
a	187.23	274.26	361.29	489.38	603.43	732.47	829.52	976.59	1090.63	1203.72	1359.82
b	0.00	0.04	399.28	517.38	631.42	760.46	857.52	1004.59	1118.63	1231.71	1387.81
z	215.22	302.25	399.28	517.38	631.42	760.46	857.52	1004.59	1118.63	1231.71	1387.81
	-0.02	-0.09	---	-0.11	---	---	---	---	---	---	---
	214.21	Ser	Ser	Lys	Asn	Glu	Pro	Phe	Asn	Leu	Arg
y	1406.29	1192.07	1105.04	1018.01	888.92	775.87	646.83	549.78	402.71	288.67	175.58
	0.00	0.04	0.04	0.06	0.08	0.12	0.18	0.22	0.28	---	---
	1389.26	1175.04	1088.01	1000.98	872.89	758.84	629.80	532.75	385.68	271.84	158.55
	---	-0.01	---	0.07	0.08	---	0.18	0.24	0.29	---	---



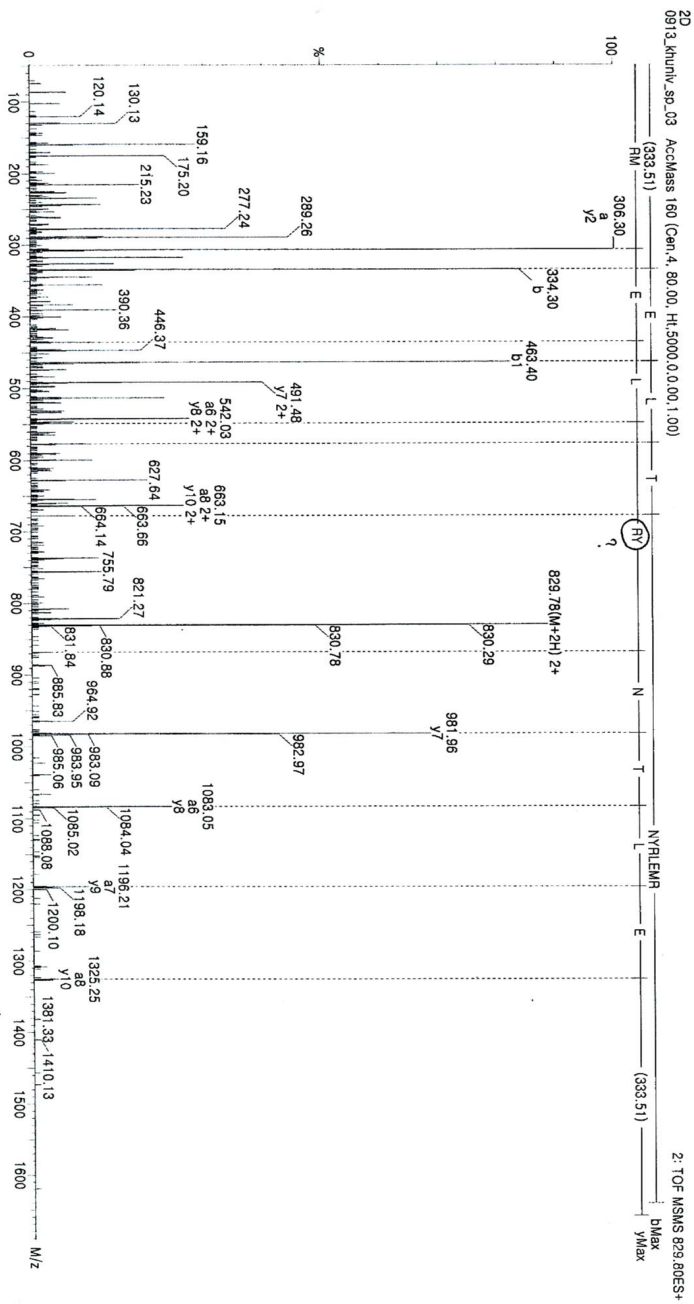
Appendix 2. Amino acid sequencing analysis(sp 3)

BioLyinx - Peptide Sequencing Report
 PepSeq file: C:\wheieonhpw\support_data\W2006W0609W0913W0913_KHUniv_sp3_830.psq
 Printed: Thu Sep 14 14:01:22 2006

Page 2

Observed MW: 1657.5758 Precursor ion charge state: 2
 M/z tolerance: 0.30 Intensity threshold: 0 (0.200%)

	306.52	435.56	548.65	646.69	793.74	926.80	1082.90	1195.99	1325.03	1456.07	1612.17
a	0.22	0.17	0.08	0.08	0.08	-0.05	-0.15	-0.22	-0.22	-0.26	---
b	334.51	483.56	576.64	677.69	791.73	954.80	1110.90	1223.98	1353.02	1484.08	1640.16
	0.21	0.16	0.12	0.08	---	---	---	---	---	---	---
	333.51	GIU	Leu	Thr	Asn	Tyr	Arg	Leu	GIU	Met	Arg
y	1658.59	1325.08	1198.03	1082.95	981.90	867.86	704.80	548.70	435.61	306.57	175.53
	-0.17	-0.18	-0.10	-0.10	-0.08	0.02	0.13	0.13	0.22	0.27	---
z	1641.55	1308.05	1179.00	1085.92	984.87	850.83	687.77	531.66	416.56	289.54	158.50
	-0.20	---	-0.10	-0.09	-0.09	-0.07	---	0.21	0.29	---	---



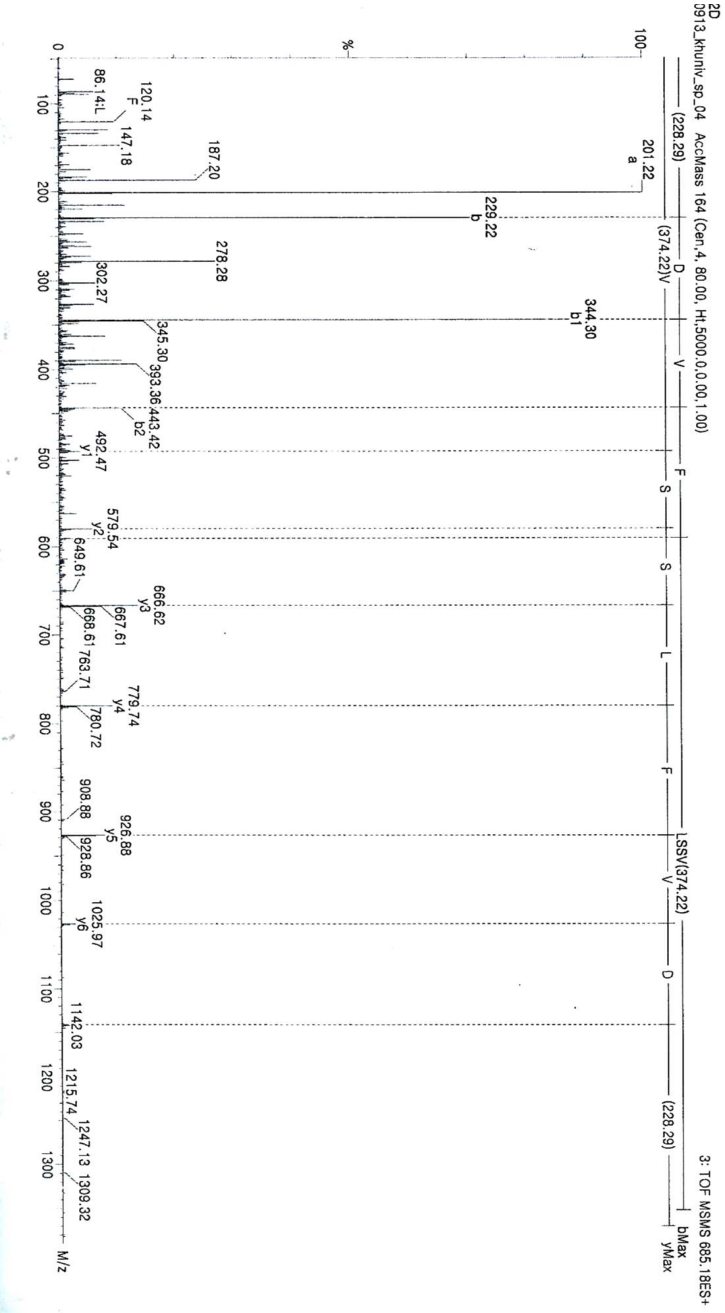
Appendix 2. Amino acid sequencing analysis(sp 4)

Biolynx - Peptide Sequencing Report
 Peptide file: C:\weeeleonghwaw\Support_data\W2006W0609W091_3W0913_KHUniv_sp4_685.psq
 Printed: Thu Sep 14 14:32:45 2006

Page 2

Observed MW: 1368.3444 Precursor ion charge state: 2
 M/Z tolerance: 0.30 Intensity threshold: 0 (0.200%)

		Val	Phe	Leu	Ser	Ser	Val
a	201.30	316.33	415.39	562.46	675.55	762.58	849.61
	0.08	-0.02	-0.08	-0.08	-0.21	-0.21	-0.21
b	229.29	344.32	443.39	590.46	703.54	790.57	877.61
	0.07	0.02	-0.03	-0.07	-0.07	-0.07	-0.07
	228.29	Asp	Val	Phe	Leu	Ser	Ser
y	1369.35	1141.07	1026.04	926.97	779.90	666.82	579.79
	0.10	0.07	0.08	0.16	0.20	0.25	0.29
z	1352.32	1124.04	1009.01	909.94	762.87	649.79	562.76
					0.17	0.21	0.26



Appendix 2. Amino acid sequencing analysis(sp 4)

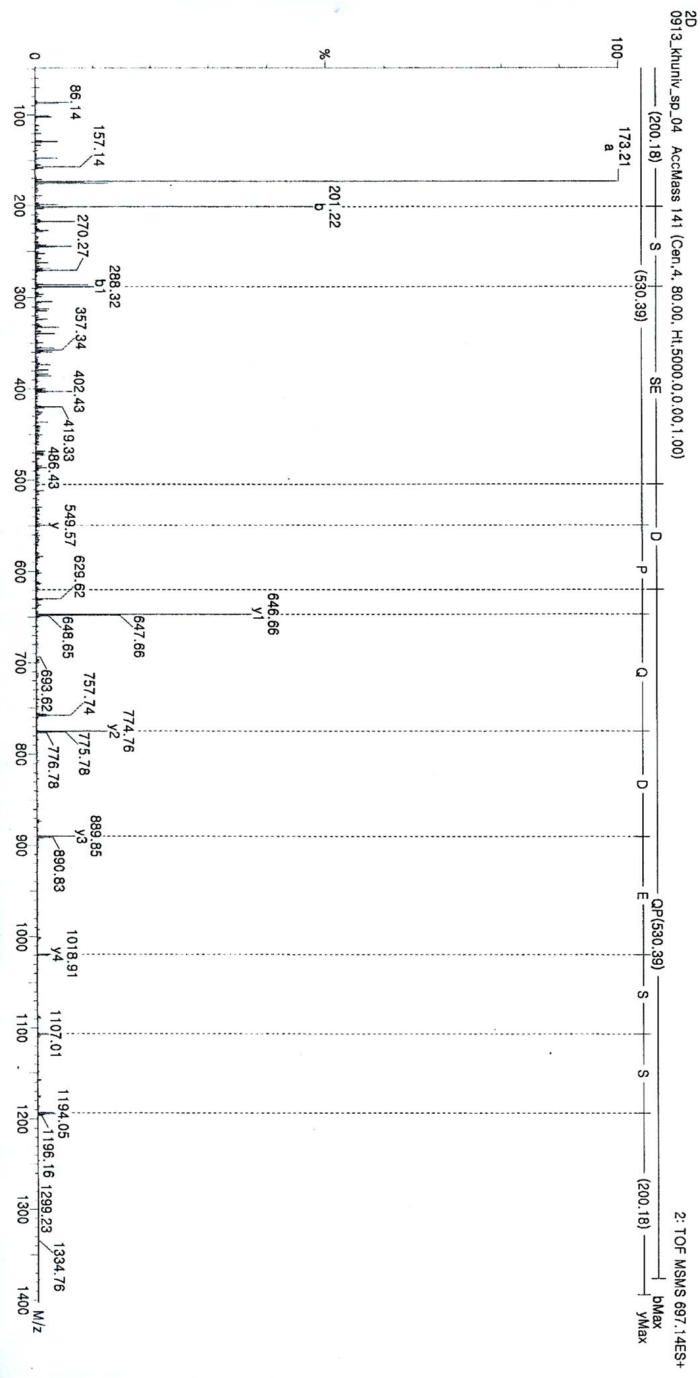
BiOLynx - Peptide Sequencing Report
 Peptide file: C:\w\eejeonghw\support_data\2006\0609\0913\KHUniv_sp4_697.psq
 Printed: Thu Sep 14 14:42:34 2006

Page 2

Observed MW: 1392.2649 Precursor ion charge state: 2
 M/z tolerance: 0.30 Intensity threshold: 0 (0.200%)

Label	Residue	Observed MW	Calculated MW	Delta
a	173.20	280.23	347.28	476.30
		-0.02		-0.18
b	201.19	288.22	375.25	504.30
		-0.03		-0.19
z	1376.24	1176.06	1099.03	1002.00
				0.07

Residue	Observed MW	Calculated MW	Delta
200.18	1393.27	1106.08	1019.03
y	1393.27	1106.08	1019.03
		0.06	0.12
z	1376.24	1176.06	1099.03
			0.07



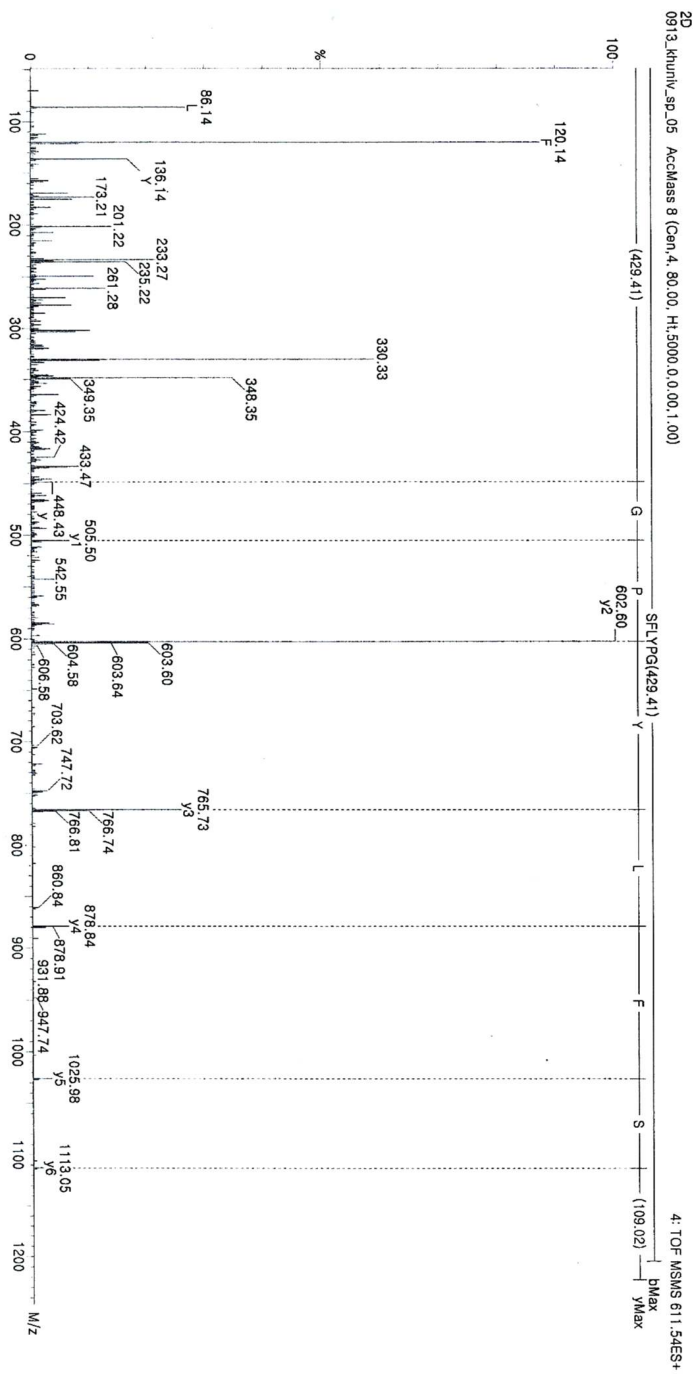
Appendix 2. Amino acid sequencing analysis(sp 5)

Biolytix - Peptide Sequencing Report
 Peptide file: C:\wilejeong\HWASupport_data\w2006w0609w0913w0913_KHUUniv_sp5_611.psq
 Printed: Thu Sep 14 14:51:54 2006

Page 2

Observed MW: 1221.0604 Precursor ion charge state: 2
 M/z tolerance: 0.30 Intensity threshold: 0 (0.200%)

	a	b	z						
	82.03	169.08	316.13	429.22	592.28	689.33	746.35	1176.06	
	-0.11	197.06	344.13	457.21	620.27	717.33	774.35	1204.06	
	110.03								
	109.02	Ser	Phe	Leu	Tyr	Pro	Gly	429.41	
Y	1222.07	1113.05	1026.02	878.95	785.87	602.80	505.75	448.73	
	0.00	0.04	0.11	0.13	0.21	0.25	0.30	0.30	
Z	1205.04	1098.02	1008.99	861.92	746.84	585.77	489.72	431.70	



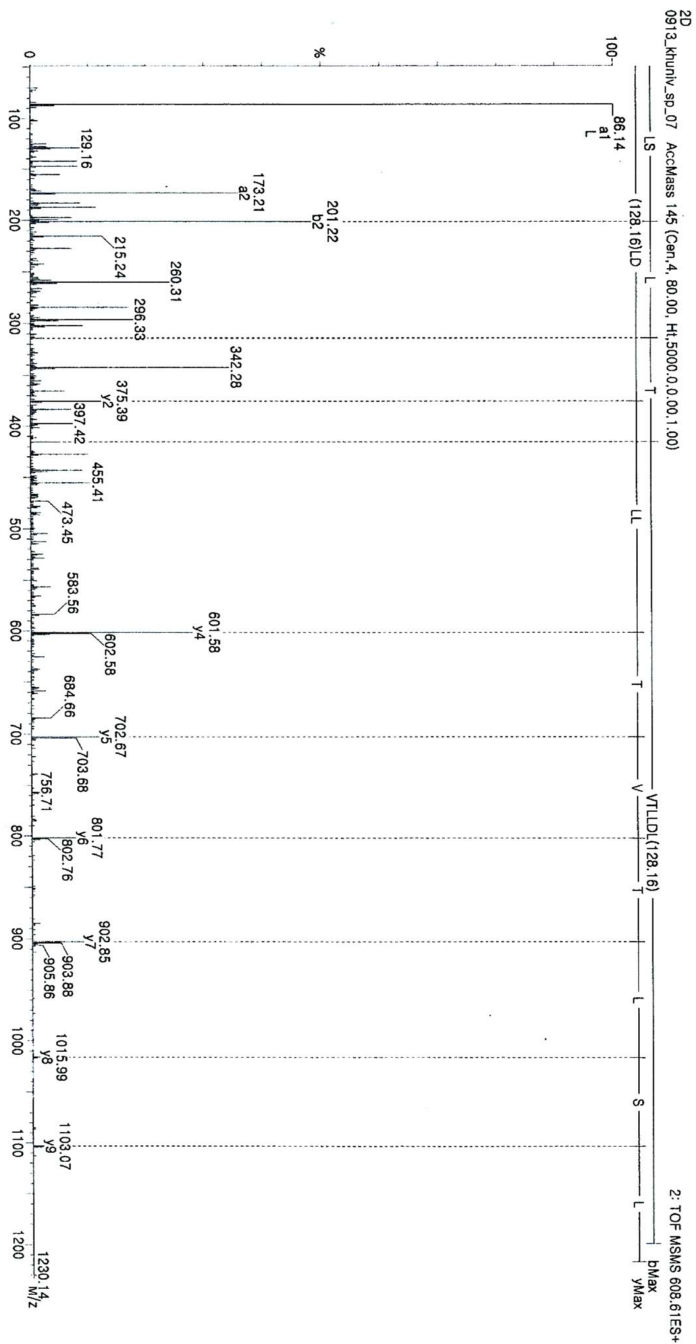
Appendix 2. Amino acid sequencing analysis(sp 7)

BioLynx - Peptide Sequencing Report
 Peptide file: C:\Wise\iongen\waw\support_data\w2006\w0609\w0913\KHUnlv.sp7_609.psq
 Printed: Thu Sep 14 15:34:24 2006

Page 2

Observed MW: 1215.1995 Precursor ion charge state: 2
 M/z tolerance: 0.30 Intensity threshold: 0 (0.200%)

Label	Residue	Mass	Charge	Mass	Charge	Mass	Charge	Mass	Charge	Mass	Charge
a	86.10	173.13	286.21	387.28	486.33	587.38	700.46	813.54	928.57	1041.66	1170.20
	-0.04	-0.08									
b	114.09	201.12	314.21	415.28	514.32	615.37	728.46	841.54	956.57	1069.65	1198.20
	-0.09	-0.13									
Leu	Ser	Leu	Thr	Val	Thr	Leu	Leu	Asp	Leu	Leu	128.18
y	1216.21	1103.12	1016.09	903.01	801.96	702.89	601.84	488.76	375.68	280.55	147.56
	0.05	0.10	0.16	0.19	0.23	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28
z	1193.18	1080.09	989.08	885.98	784.93	685.88	584.81	471.73	358.65	245.52	130.53



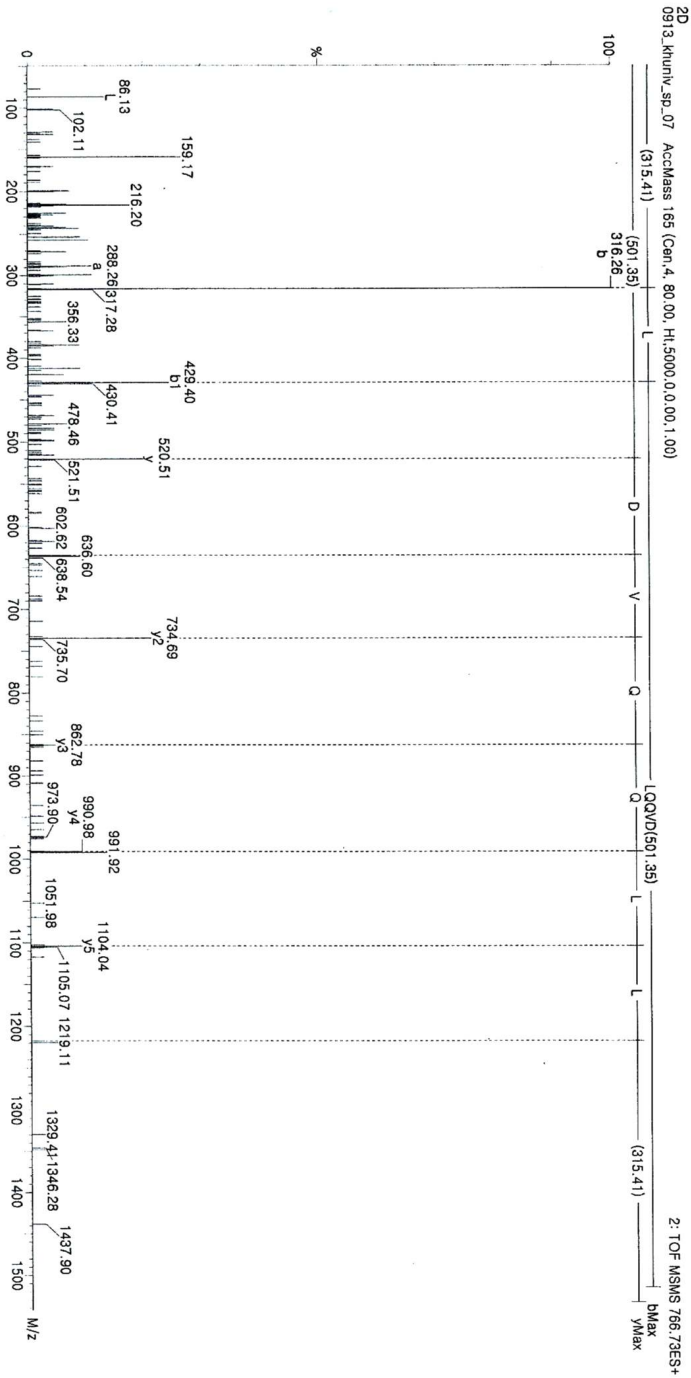
Appendix 2. Amino acid sequencing analysis(sp 7)

Biolynx - Peptide Sequencing Report
 Peptide file: C:\wheeler\ghwa\MSUPPOT_data\W2006W0609W0913W\0913_KHUniv_sp7_767.psq
 Printed: Thu Sep 14 15:39:21 2006

Page 2

Observed MW: 1531.4445 Precursor ion charge state: 2
 M/Z tolerance: 0.30 Intensity threshold: 0 (0.200%)

		Leu	Gln	Gln	Val	Asp
a	288.42	401.51	514.59	642.65	770.71	889.78
	0.17	0.01	-0.08	0.03	0.07	0.08
b	315.42	429.50	542.59	670.65	798.70	926.77
	0.16	0.10	-0.06	0.03	0.07	0.08
y	1532.45	1217.04	1103.96	990.87	882.81	794.76
	0.00	0.00	-0.10	0.03	0.07	0.08
z	1515.42	1200.01	1086.93	973.94	845.78	717.73
	0.00	0.00	-0.06	0.03	0.07	0.11



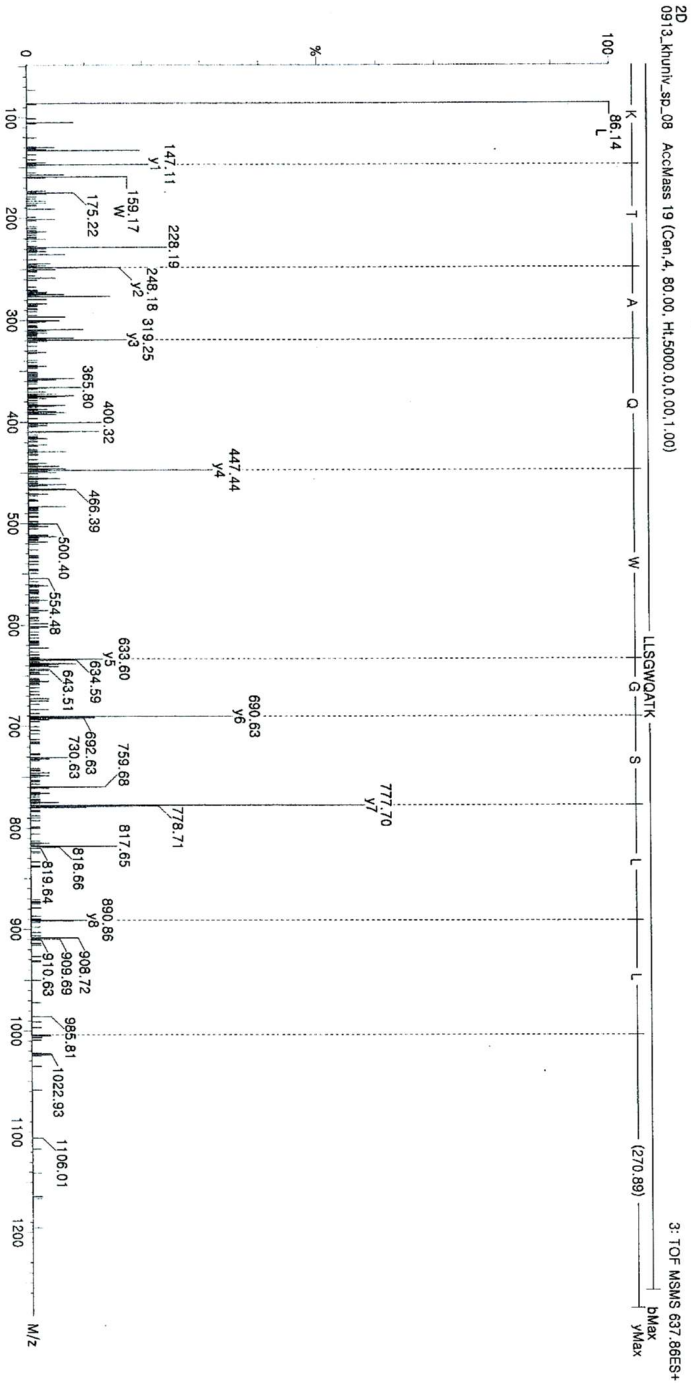
Appendix 2. Amino acid sequencing analysis(sp 8)

Biolyx - Peptide Sequencing Report
 Peptide file: C:\wbi\pep\lghw\wv\supp\l_data\W2006W0609W0913W0913_KHUniv_sp8_638.psq
 Printed: Thu Sep 14 15:52:28 2006

Page 2

Observed MW: 1273.6985 Precursor Ion charge state: 2
 M/z tolerance: 0.30 Intensity threshold: 0 (0.750%)

	Lau	Lau	Ser	Gly	Trp	Gln	Ala	Thr	Lys
a	243.90	356.99	470.07	557.10	614.12	800.20	928.26	999.30	1100.35
b	271.90	384.98	498.07	585.10	642.12	828.20	956.26	1027.29	1128.34
270.89	Lau	Lau	Ser	Gly	Trp	Gln	Ala	Thr	Lys
y	1274.71	1003.82	890.73	777.65	690.62	633.59	447.52	319.46	248.42
	0.00	-0.13	-0.05	-0.02	0.07	0.01	0.21	0.24	0.26
z	1257.68	986.79	873.70	760.62	673.59	616.56	430.49	302.43	231.39
	0.20								

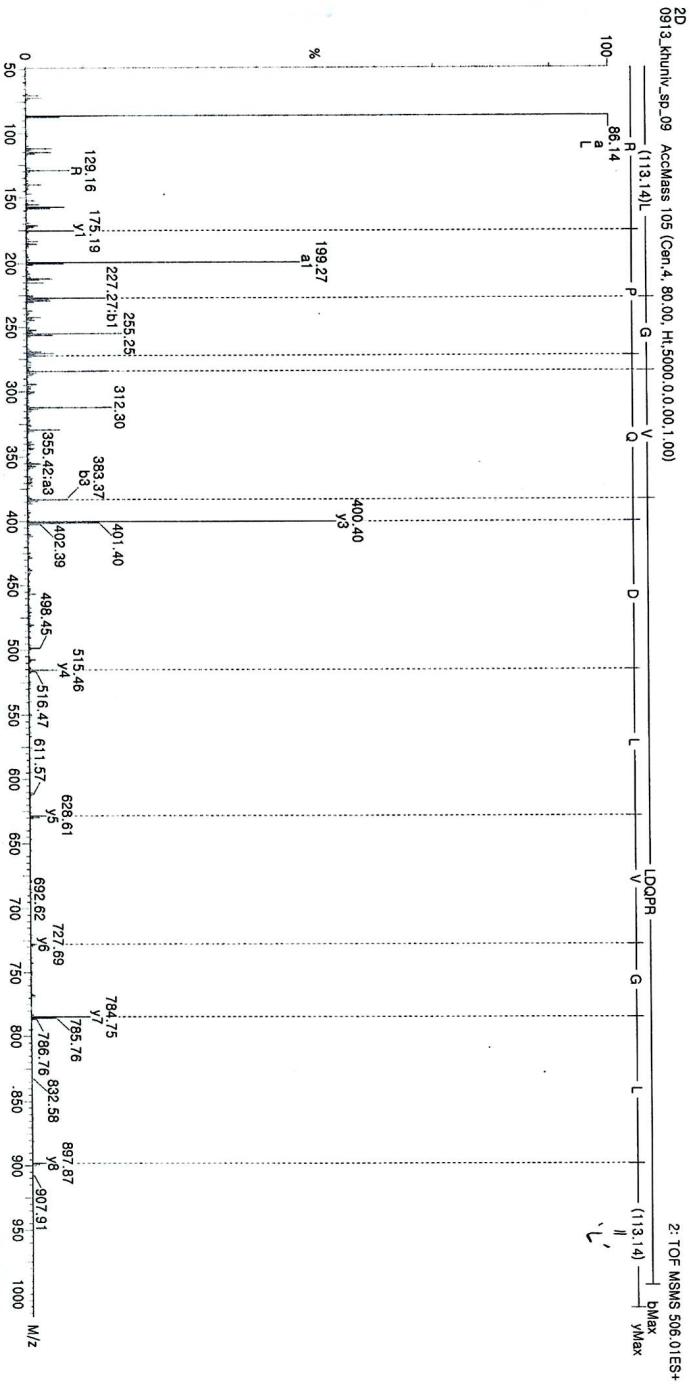


Appendix 2. Amino acid sequencing analysis(sp 9)

BiOLynx - Peptide Sequencing Report
 Peptide file: C:\wle\jeonh\w\support_data\W2006\W0609\W0913\W0913_KHUniv_sp9_506.psq
 Printed: Thu Sep 14 16:15:47 2006

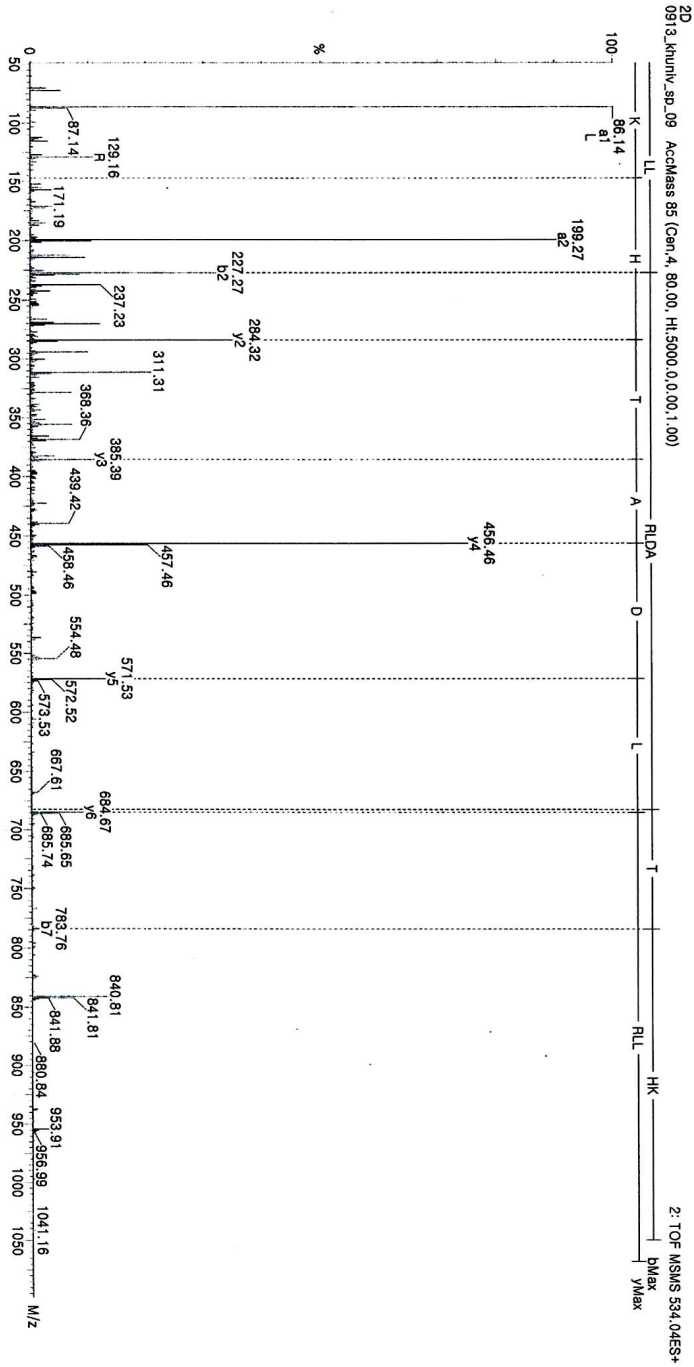
Observed MW: 1010.0055 Precursor ion charge state: 2
 M/z tolerance: 0.30 Intensity threshold: 0 (0.200%)

		Leu	Gly	Val	Leu	Asp	Gln	Pro	Arg
a	96.16	199.24	256.28	355.33	469.41	583.44	711.50	808.55	964.65
	0.02	-0.02	-0.08	-0.08	-0.08	-0.08	-0.08	-0.08	-0.08
b	114.15	227.24	284.28	383.33	486.41	611.44	739.49	836.55	992.65
	-0.03	-0.03	-0.05	-0.05	-0.05	-0.05	-0.05	-0.05	-0.05
	113.14	Leu	Gly	Val	Leu	Asp	Gln	Pro	Arg
y	1011.01	897.87	794.79	727.76	628.70	515.61	400.58	272.53	175.47
	0.00	0.03	0.07	0.09	0.15	0.19	0.24	0.28	0.28
z	993.98	880.84	767.76	710.73	611.67	499.58	383.55	255.50	138.44
	0.01	0.01	0.01	0.14	0.16	0.16	0.24	0.24	0.24



Observed MW: 1066.0715 Precursor Ion Charge state: 2
 M/Z tolerance: 0.30 Intensity threshold: 0 (0.200%)

Label	Leu	Leu	Arg	Leu	Asp	Ala	Thr	His	Lys
a	86.10	199.18	355.28	468.37	583.39	654.43	755.48	892.54	1020.63
	-0.04	-0.08	-0.13	496.36	611.39	682.43	783.47	920.53	1046.63
b	114.09	227.18	383.28			0.14	-0.28		
	-0.10								
y	1066.64	953.55	840.47	684.37	571.28	456.26	385.22	294.17	147.11
			-0.30	-0.24	-0.20	-0.17	-0.14	-0.06	
z	1049.61	936.52	823.44	667.34	554.25	439.23	368.19	267.14	130.08
			-0.30	-0.27	-0.23	-0.20	-0.17		



Appendix 2. Amino acid sequencing analysis(sp 9)