

人蔘 단백질성분의 生化學的性質에 관한 연구

김영중・정보섭・이강노・구향자・안상미・허 훈
서울대학교 약학대학

Studies on the Biochemical Nature of the Protein Constituents of *Panax Ginseng* Root

Young Choong Kim, Bo Sup Chung, Kang No Lee,
Hyang Ja Koo, Sang Mee Ahn, Hoon Huh
College of Pharmacy, Seoul National University

=ABSTRACT =

The biochemical nature of the protein constituents of six-year old fresh *Panax ginseng* root was studied. Total protein constituents were extracted with phosphate buffer of pH 7.4, ionic strength of 0.1 and fractionated by ultrafiltration using four different membranes which cut down the materials of molecular weight of 500, 1,000, 5,000 and 10,000, respectively. Each fraction was subjected to ion exchange chromatography using DEAE-cellulose to isolate component proteins.

The protein fraction larger than molecular weight of 10,000 was refractionated by the method of ammonium sulfate precipitation. The electrophoresis of the refractionated protein constituents was performed. The amino acid composition of the protein constituents was determined by gas-liquid chromatography. From the results, it could be summarized that eleven different protein constituents smaller than molecular weight of 10,000 were isolated from the fresh *Panax ginseng* root. At least eleven different protein constituents larger than molecular weight of 10,000 were identified from the electrophoretic patterns. These protein constituents seem to be compounded of all or some of five different subunits.

緒 論

人蔘은 韓國, 中國, 日本 등지에서 2,000 여년 전부터 貴重한 靈藥으로 밀어 사용되어왔고 東洋의 많은 古代醫書에서도 不老長生の 藥效를 가진 高귀한 藥으로

접수일자 : 1983. 5. 29.

로서 記載되어왔다. 최근에는 人蔘의 藥效가 世界적으로 인정을 받아 東洋은 물론 서양에서도 藥用으로 는 물론 健康食品으로서도 널리 알려져 사용되고 있는 추세이다.

人蔘의 成分에 대한 研究는 1854年 Garrigae가 美國産 人蔘, *Panax quinquefolium*에서 saponin을 얻어 panaquilon 이라고 命名, 報告한 이래로 東西

洋의 수많은 학자들에 의해 수행되어 왔던 바 그 대부분은 dammarane 系 triterpenoid 化合物, 즉 人蔘 saponin 에 대한 연구였다¹⁻⁵⁾. 그 결과 각각의 ginsenosides 의 분리방법, 구조등의 化學的 성질은 거의 규명되었다. 그러나 人蔘이 생체에 미치는 약리작용은 다양하여 생체내의 여러 생리작용에 관여한다고 알려져 왔으나⁶⁻¹¹⁾ 아직까지도 작용기전이 뚜렷이 밝혀진 것은 거의 없다.

지금까지 人蔘에 대한 많은 연구가 수행되었어도 dammarane 系 glycosides 이외의 성분에 대하여서는 거의 研究된 바 없으며 다만 최근에 人蔘의 anti-lipolytic activity 가 人蔘중의 peptide 에 기인한 것이라는 보고¹²⁾ 가 있으며 그동안 몇몇 학자들에 의하여 人蔘 단백질성분에 대한 연구가 시도 되었으나 극히 단편적인 것들이었다¹³⁾¹⁴⁾.

본 연구는 人蔘의 단백질성분이 생체에 미치는 영향에 대한 연구의 일환으로서 단백질성분을 人蔘에서 추출 분리하고 그 生化學的 성질을 규명하고자 수행되었다.

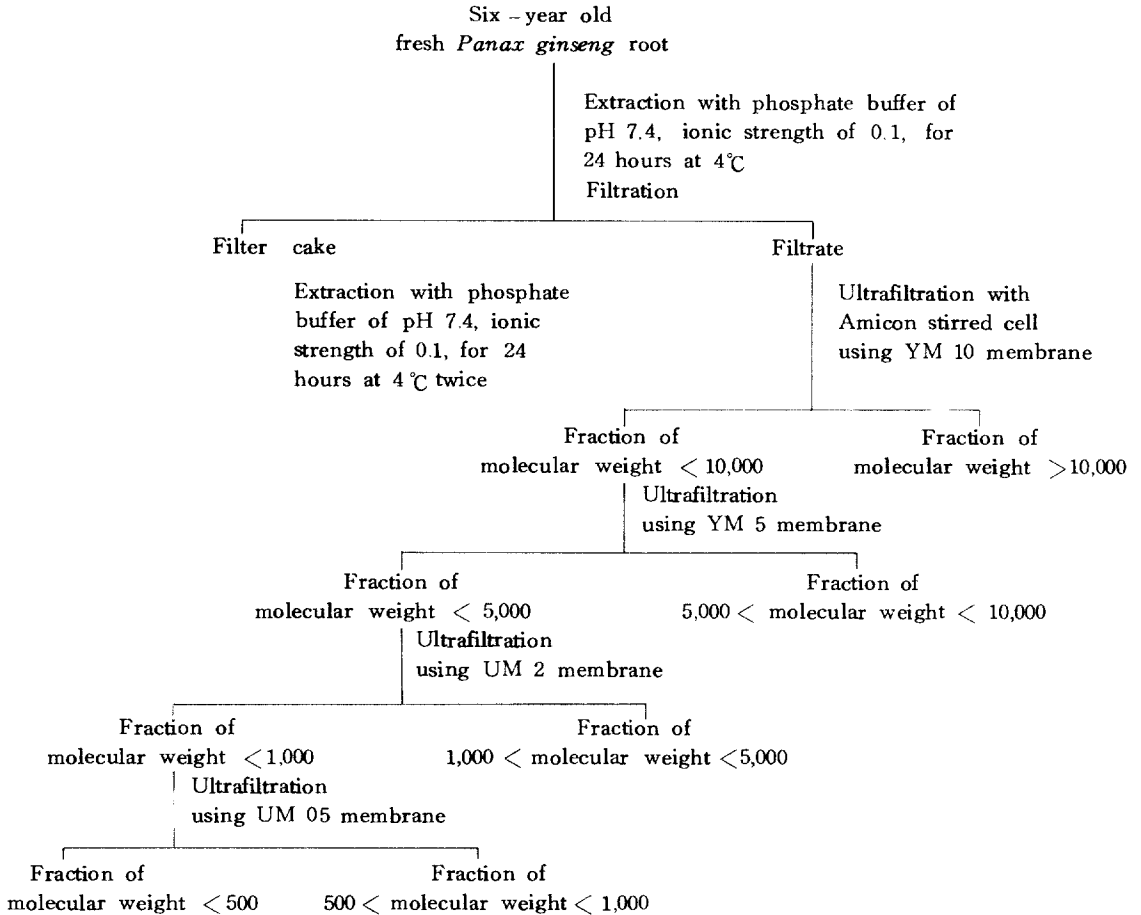
實驗材料 및 方法

본 실험에 사용된 人蔘은 따로 記述하지 않는 한 강화産 6年根 水蔘이며, 시약은 Kanto, Wako, Hanawa 회사의 특급시약과 Sigma Chemical Company 제품이였다.

단백질 정량

시료의 단백질 함량은 Lowry 方法¹⁵⁾에 의하여 bovine serum albumin 을 표준품으로 하여 定量하였다.

단백성분의 추출 분획



Scheme 1. Extraction and fractionation of protein constituents of fresh *Panax ginseng* root.

○ 단백질의 추출

수삼을 증류수로 잘 씻은다음 잘게 부수어 Okuda 등의 방법¹²⁾을 약간 수정하여 4℃ 이하에서 인산완충액 (pH 7.4, ionic Strength 0.1)을 사용하여 계속 교반하면서 24 시간동안 추출한 다음 여과하였다. 여과시킨후의 잔사는 다시 상기와 같은 방법으로 2 회 더 추출하여 여과한 다음 여액을 모두 합하였다.

○ 限外濾過法 (ultrafiltration)에 의한 총단백성분의 분획

수삼 추출액을 ultrafiltration apparatus (Amicon stirred cells, model 202)를 이용하여 분자량 500 (UM 05), 1,000 (UM 2), 5,000 (YM 5), 10,000 (YM 10)을 분획할 수 있는 각각의 ultrafiltration membrane을 사용하여 질소 gas 상에서 scheme 1 과 같이 분획하였다. 분자량이 10,000 이상인 분획물은 다시 ammonium sulfate 침전법으로 scheme 2 와 같이 분획하였다.

○ Ion-exchange column chromatography에 의한 단백질의 분리

분획된 각각의 단백질 성분을 인산완충액으로 평형시킨 Diethylaminoethyl (DEAE)-cellulose column을 사용하여 크로마토그래피 하였다. 양이온으로 荷電된 단백질을 먼저 인산완충액으로 유출시킨후 NaCl 0~0.5M까지의 linear salt gradient를 형성시켜 이온교환수지에 부착되었던 음이온으로 하전된 단백

성분들을 차례로 유출시켰다. 유출된 각분획물은 UV-spectrophotometer (Pye - Unicam Sp 1750)로 파장 280 nm에서 흡광도를 測定하였다.

Polyacrylamide gel 電氣泳動

분자량이 10,000 이상인 수삼단백성분은 Davis法¹⁸⁾을 약간 수정하여 5% -polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동하였다. 전기영동한 gel은 10% -trichloroacetic acid로 10分間 처리하여 단백질을 고정시키고 0.2% coomassie brilliant blue R로 착색한 다음 acetic acid-ethanol-H₂O (7.5:40:52.5, v/v/v) 용액으로 gel을 탈색시켰다. 한편 Weber et al.의 방법¹⁹⁾을 이용하여 Sodium dodecyl sulfate (SDS)를 함유하는 10% -polyacrylamide gel로 전기영동하였다. gel의 착색과 탈색은上記와 동일한 방법으로 실시 하였으며 표준품으로는 M.W-SDS-70 kit (Sigma)를 사용하였다. 각각의 단백질 성분의 relative mobility (R_m)은 다음식에 의해 산출하였다.

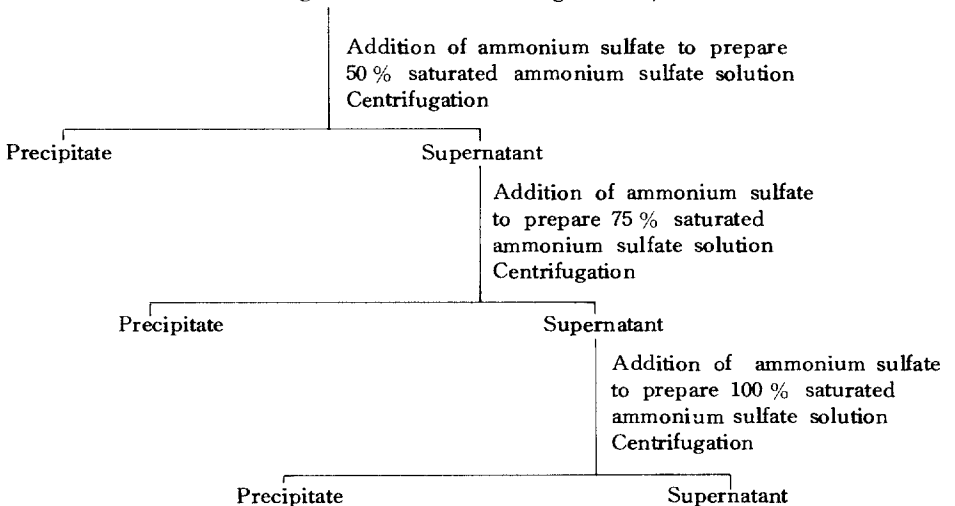
$$R_m = \frac{\text{단백성분의 이동거리}}{\text{혼색액의 이동거리}}$$

Gas-liquid chromatography에 의한 구성 아미노산의 분리 확인

○ 단백질의 가수분해²⁰⁾

냉동건조시킨 시료 10mg을 마개가 부착된 시험관

Protein constituents fraction larger than molecular weight of 10,000



Scheme 2. Ammonium sulfate fractionation of protein constituents of fresh *Panax ginseng* root which are larger than molecular weight of 10,000.

Table 1. Analytical conditions for amino acid analysis by Gas-liquid chromatography

Model	Pye Unicam Chromatograph	
Column	3 % OV - 17 (80 - 100 mesh shimalite)	0.5 % EGA (80 - 100 mesh A. W. chromosorb W)
	3 mm × 1.5 m borosilicate glass column	
Detector	flame ionization detector	
Temperature	injector port ; 250 °C column ; 80 °C - 230 °C 5 °C / min.	230 °C 80 °C - 200 °C 5 °C / min.
	detector ; 270 °C	250 °C
Flow rate	N ₂ ; 2 Kg / cm ² H ₂ ; 1.4 Kg / cm ² air ; 0.6 Kg / cm ²	
Attenuation	8 × 10 ²	
Chart speed	0.5 cm / min.	

에 취한 후 6N-HCl 3 ml 를 첨가하고 시험관속의 공기를 질소 gas 로 치환한 후 밀폐시켜 110 ± 1 °C 에서 24 시간 동안 가수분해하였다.

○ 휘발성 아미노산 N-trifluoroacetyl butyl ester (N-TFA butyl ester) 의 제조^{21) 22)}

가수분해물은 6N-HCl 을 감압농축하여 제거하고 3N-HCl in butanol 5 ml 를 가하여 butyl ester 로 만든 다음 trifluoroacetic anhydride (TFAA) 0.5 ml 와 CH₂ Cl₂ 1.5 ml 를 가하여 N-TFA butyl ester 를 제조하였다. 표준품으로서 20 種의 아미노산을 혼합하여 상기와 同一한 方法으로 휘발성의 아미노산 유도체를 만들었다. Gas-liquid chromatography 의 분석조건은 Table 1 과 같다. Gas-liquid chromatogram 에서 조성아미노산의 정량은 다음식에 의거하였다.

$$\mu\text{mole of amino acid} = \frac{\text{a. a. area} \times \text{I. S.}^* \text{ Wt}}{\text{RRF} \times \text{I. S. area}} \times 100$$

R. R. F $\frac{\text{area/mole of standard a.a}}{\text{area/mole of I. S.}^*}$
(relative response factor)

* I. S. (internal standand) 로는 hydroxy proline 을 사용하였다.

結果 및 考察

수상중의 총단백성분을 인산완충액 (pH 7.4, ionic strength 0.1) 으로 抽出한 후 限外濾過장치 (Amicon ultrafiltration apparatus) 를 이용하여 scheme 1 에서와 같이 분획하였다. 즉 분자량에 따라 분자량 < 500, 500 < 분자량 < 1,000, 1,000 < 분자량 < 5,000, 5,000 < 분자량 < 10,000, 분자량 > 10,000 등의 5 群으로 크게 분획하였다.

분자량이 10,000 이상인 분획물은 다시 scheme 2 에서와 같이 ammonium sulfate 침전법에 의하여 분획물을 ammonium sulfate 로 100 % 까지 점차적으로 포화시키면서 중간단계인 50 %, 75 %, 100 % 포화용액에서 생성되는 침전을 각각 분획하였다.

분자량 10,000 이상의 분획물으로써 50 %, 75 %, 100% 포화 ammonium sulfate 용액에서 생성된 각각의 분획물이 몇 종류의 단백질성분으로 구성되어 있는지를 밝히기 위하여 5 % polyacrylamide gel 을 사용하여 전기영동한 결과는 Fig. 1 과 같으며 각 band 의 Rm 값은 Table 2 와 같다.

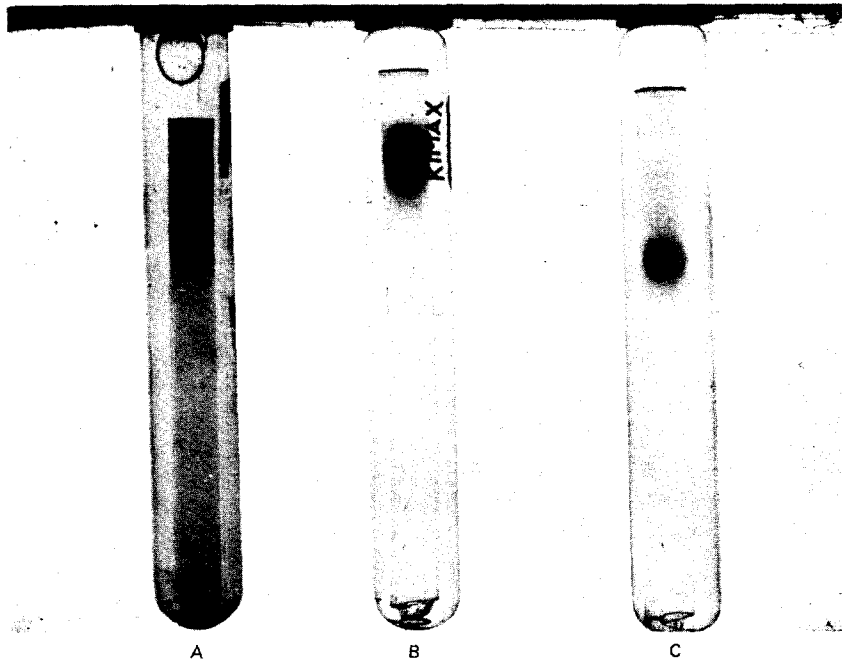


Fig. 1. Polyacrylamide gel electrophoresis of protein constituents of fresh *Panax ginseng* root. Polyacrylamide gel electrophoresis was performed according to the modified procedure of Davis¹⁸⁾. Picture A, B, C show the electrophoretic patterns of precipitates of 100 %, 75 % and 50 % saturated ammonium sulfate solution, respectively.

Table 2. The relative mobility value of protein constituents fraction larger than molecular weight of 10,000

Protein fraction	Rm value
ppt from 50 % sat. (NH ₄) ₂ SO ₄ soln	0.01 0.06 0.14 0.16 0.33
ppt from 75 % sat. (NH ₄) ₂ SO ₄ soln	0.23 0.50 0.61
ppt from 100 % sat. (NH ₄) ₂ SO ₄ soln	0.01 0.09 0.28

Rm ; relative mobility
ppt ; precipitate
sat ; saturated
soln ; solution

또한 50 %, 75 %, 100 % 포화 ammonium sulfate 용액에서 분리된 분자량 10,000 이상의 각각의 분획물을 SDS polyacrylamide gel 을 사용하여 전기영동하여 표준곡선 (Fig 2) 으로부터 추정된, 각각의 ba-

nd의 분자량은 Table 3과 같다. Table 3에서 보는 바와 같이 50 %, 75 %, 100 % 포화 ammonium sulfate 용액에서 침전되는 각각의 분획물들은 SDS로 분해시켰을때 거의 동일한 분자량, 25,000과 19,000인 단백질성분 분해물을 공동으로 가지는 것을 알 수 있다. 따라서 분자량 10,000인 각각의 수삼 단백질성분들은 분자량이 59,000, 25,000, 19,000, 12,000, 10,800의 5 종류의 단백질분해물 (subunit) 전부 또는 이중 일부가 각기 다른 조합으로 결합되어 11 종류의 서로 다른 단백질성분을 형성 하는듯 하다. 이러한 추정을 뒷받침하기 위하여는 polyacrylamide gel 에서 분리된 11 종류의 단백질성분을 순수하게 각각 분리하여 이 단백질성분들이 균일한 단백질인 것을 증명하여야 하겠다.

분자량 10,000 이하인 분획물 즉, 분자량 < 500, 500 < 분자량 < 1,000, 1,000 < 분자량 < 5,000 5,000 < 분자량 < 10,000인 4群的 분획물들은 각각 몇 종류의 단백질성분으로 구성되어 있는지를 밝히고 그 구성 단백질성분을 분리하기 위하여 음이온 교환수지인 DEAE-cellulose를 사용하여 ion exchange chromatography를 하였다. 그 결과 얻은 chromatogram은 Fig.

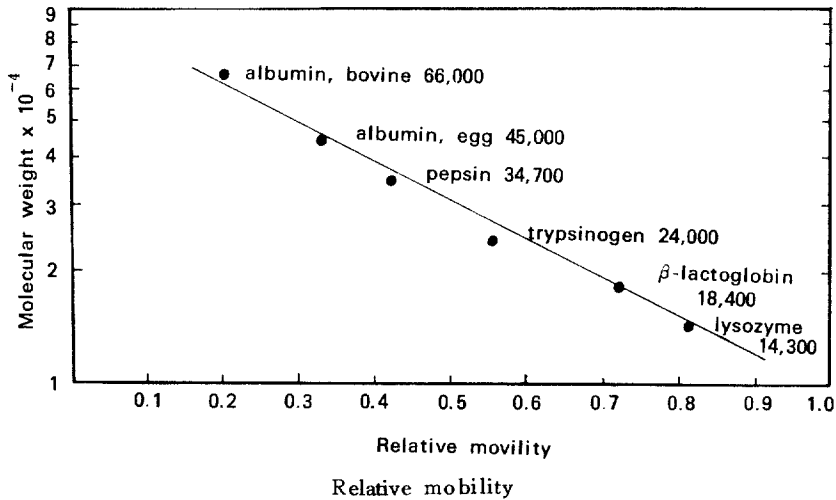


Fig. 2. Standard curve for molecular weight determination by SDS - polyacrylamide gel electrophoresis. Experimental conditions were the same as those described for materials and methods section.

Table 3. Molecular weight and relative mobility of the protein constituents fraction larger than molecular weight of 10,000

Protein fraction	Relative mobility					Molecular weight (dalton)				
ppt from 50 % sat. $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ soln	0.23	0.57	0.69	0.91	0.97	59,000	25,000	19,000	12,000	10,800
ppt from 75 % sat. $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ soln	0.25	0.58	0.70	0.93		56,000	24,800	18,500	11,700	
ppt from 100 % sat. $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ soln	0.56	0.69				25,500	19,000			

ppt : precipitate, sat. : saturated, soln : solution

3, 4, 5, 6 과 같다. Fig. 3 의 chromatogram 에서 보는 바와 같이 분자량 500 이하의 분획물은 모두 3 종의 단백질성분으로 구성되어 있음을 알 수 있다.

Peak I 과 Peak II 는 DEAE-cellulose column 에 부착되지 않고 그대로 流出되는 것으로 미루어 pH 8.0 에서 양이온으로 하전된 단백질성분이며 Peak III 은 염농도구배를 형성시켜준 후에 流出되는 점으로 미루어 음이온으로 하전된 단백질성분을 알 수 있다. 분자량 500 에서 1,000 사이의 분획물도 Fig. 4 에서 볼 수 있듯이 pH 8.0 에서 양이온으로 하전된 단백질성분 2 종, 음이온으로 하전된 단백질성분 1 종, 모두 3 종의 단백질성분으로 구성되어 있음을 알 수 있다. 분자량 1,000 에서 5,000 사이, 5,000 에서 10,000 사이의 경우에서도 Fig. 5, 6 에서 보는바와 같이 각각 양이온으로 하전된 단백질성분 1 종, 음이온으로 하전된 단백질성분 1 종 모두 2 종의 단백질성분으로 구성되어 있음과 양이온으로

하전된 단백질성분 2 종, 음이온으로 하전된 단백질성분 1 종 등 모두 3 종의 단백질성분으로 구성되어 있음을 알 수 있다. 이상의 ion-exchange chromatography 에 의하여 얻은 결과를 종합하여 볼 때 분자량이 10,000 이하의 분획물은 모두 11 종의 다른 단백질성분으로 구성되어 있음을 알 수 있다.

수삼의 단백 분획물의 아미노산 조성을 밝히기 위하여 각각의 분획물을 산으로 가수분해시킨 후 휘발성유도체를 만들어 Gas-liquid chromatography 를 하여 얻은 결과는 Table 4 와 같다.

분자량 500 이하의 분획물은 산으로 가수분해시 파괴되는 tryptophan 의 존재유무를 배제할 경우 단지 isoleucine, glutamic acid, tyrosine, lysine, cystine 만으로 구성되어 있는 것을 알 수 있다. 그외의 다른 단백질분획물들은 대부분의 아미노산을 고르게 함유하고 있고 아미노산중 tyrosine 을 비교적 다량 함유하고 있

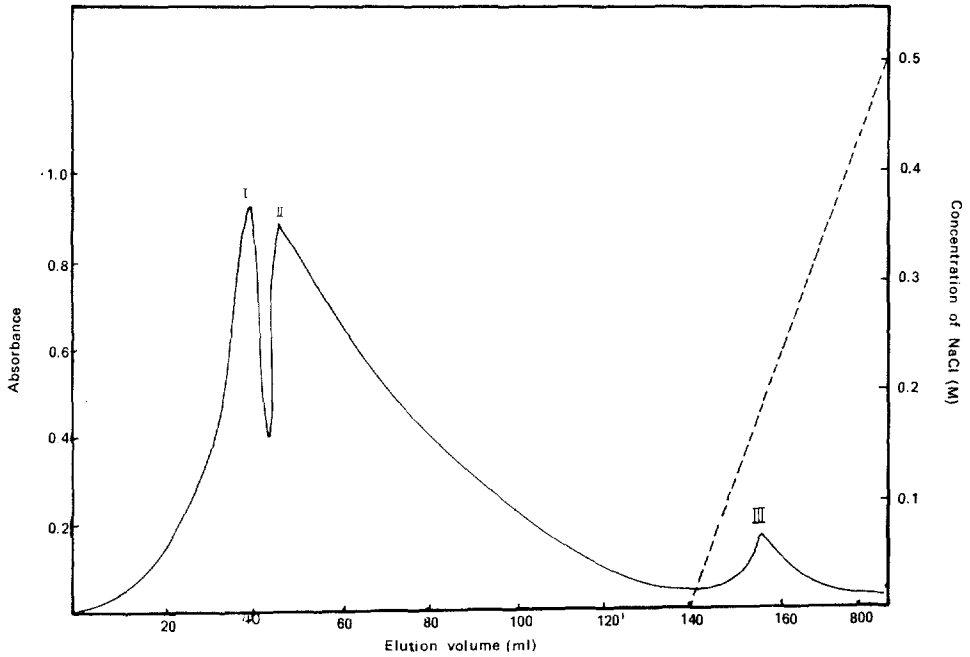


Fig. 3. Ion exchange column chromatogram of fresh *Panax ginseng* root smaller than molecular weight 500. The sample was fractionated on a DEAE-cellulose column (0.7 × 40 cm : flow rate, 10 ml / hour : in cold room). The column was equilibrated with a solution of phosphate buffer of pH 8.0, ionic strength of 0.05 and was eluted with a linear gradient of NaCl from 0 to 0.5 M.

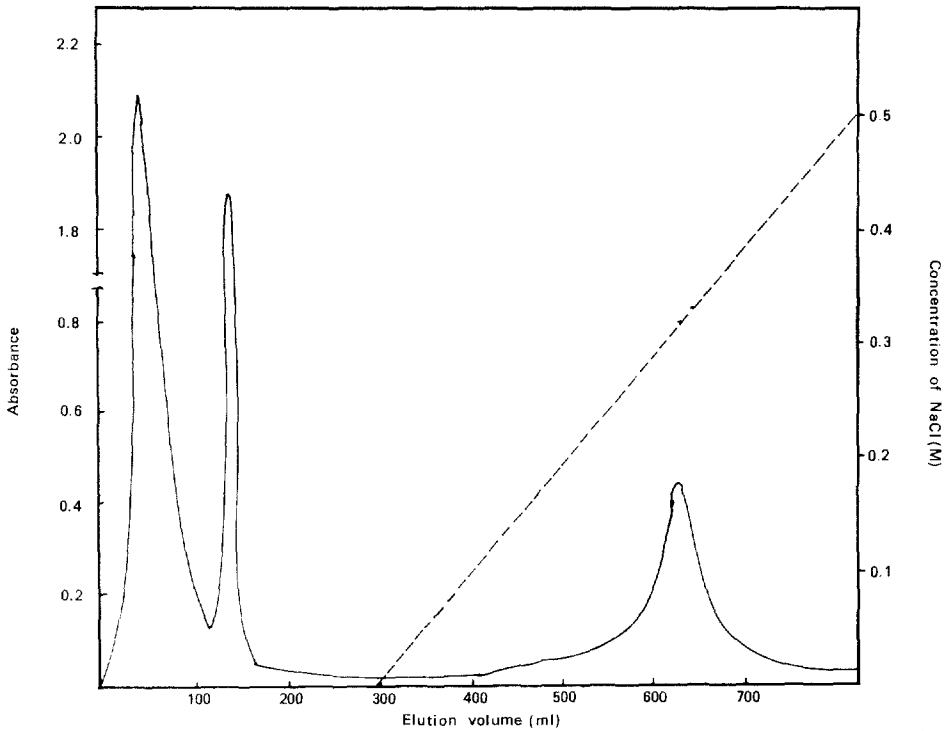


Fig. 4. Ion exchange column chromatogram of fresh *Panax ginseng* root which have the molecular weight range of 500 to 1,000. The experimental conditions were the same as those described for Fig. 3.

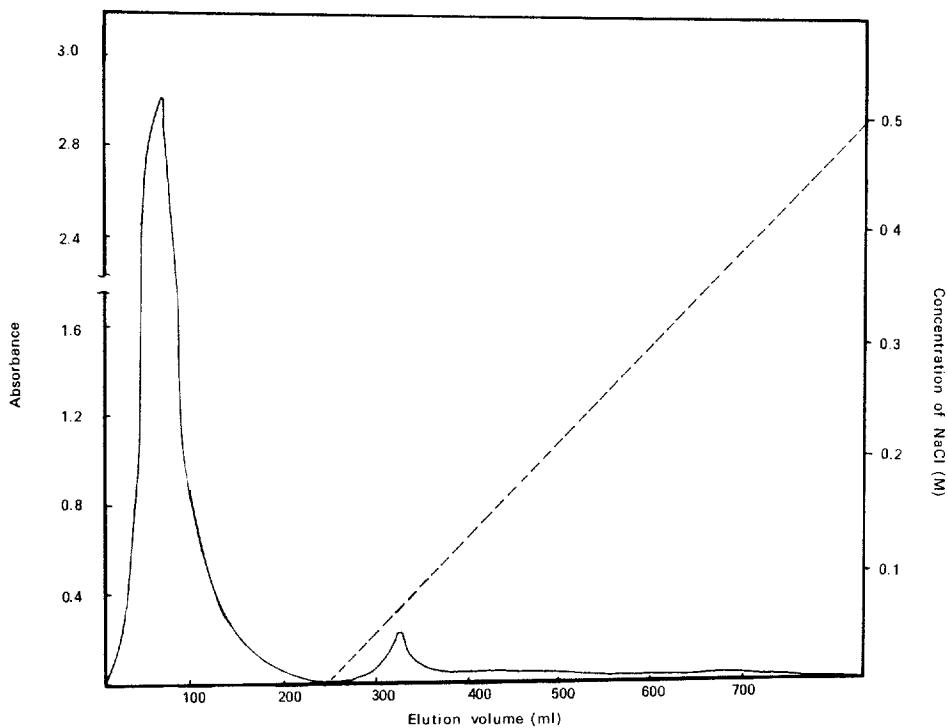


Fig. 5. Ion exchange column chromatogram of fresh *Panax ginseng* root which have the molecular weight range of 1,000 to 5,000. The experimental conditions were the same as those described for Fig. 3.

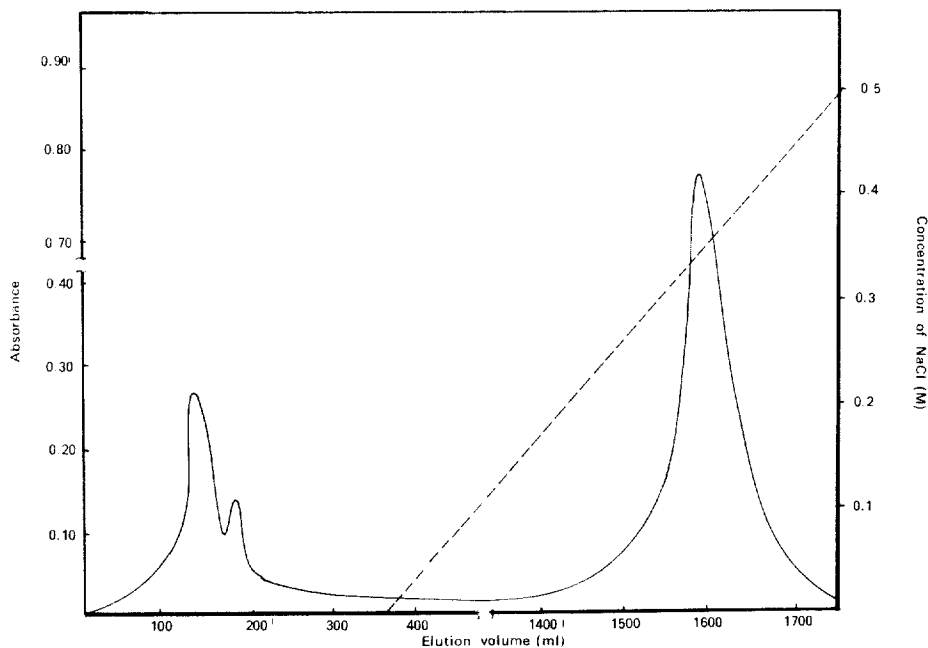


Fig. 6. Ion exchange column chromatogram of fresh *Panax ginseng* root which have the molecular weight range 5,000 to 10,000. The experimental conditions were the same as those described for Fig. 3.

Table 4. Amino acid composition of the protein constituents of fresh *Panax ginseng* root

(μ mole/10mg sample)

Amino acid	Protein fraction						
	Molecular weight						III**
	< 500	500-1,000	1,000-5,000	5,000-10,000	> 10,000		
				I	II		
Ala	-	0.52	0.69	0.16	0.38	0.33	
Val	-	0.23	0.39	0.05	0.49	0.18	
Ile	4.47	0.35	4.80	0.15	0.36	0.50	
Gly	-	0.42	0.28	0.05	0.40	0.19	
Leu	-	0.12	0.21	0.06	0.22	0.30	
Thr	-	0.26	0.13	0.13	0.28	0.29	
Pro	-	0.06	0.23	0.03	0.07	0.11	
Ser	-	0.80	18.05	0.21	1.27	1.72	
Cys	-	0.33	0.92	0.36	-	0.07	
Hypro	-	0.23	0.21	0.04	0.08	-	
Met	-	-	0.03	0.10	0.31	-	
Phe	-	0.12	0.16	0.05	0.02	0.21	
Asp	-	1.27	2.98	0.55	0.75	0.53	
Glu	0.55	0.61	2.77	0.21	0.45	0.64	
Tyr	1.90	1.07	0.56	0.54	0.87	0.26	
Lys	0.25	0.12	0.49	0.25	0.21	0.18	
Arg	-	0.72	1.40	0.22	0.06	0.71	
His	-	0.10	0.52	0.02	0.11	0.31	
Cys -	0.10	0.05	0.01	0.02	0.01	0.01	
* Trp							

I : precipitate from 50 % saturated ammonium sulfate solution

II : precipitate from 75 % saturated ammonium sulfate solution

III : precipitate from 100 % saturated ammonium sulfate solution

* Tryptophan seems to be destroyed during acid hydrolysis of protein constituents.

** Assay can not be performed because of insufficient amount of sample.

음을 알 수 있다. 분자량 1,000에서 5,000 사이의 단백질 분획물은 다른 분획물에 비하여 특히 serine을 다른 어느 아미노산 보다도 많이 함유하고 있는것은 주목할 만하다.

본 연구로 수삼 단백질추출물은 적어도 총 22 종류의 단백질성분으로 구성되어 있음을 알았으나 아직도 규명하여야 할 과제가 많다. 본 연구실에서는 수삼 단백질성분 중에서 특히 분자량이 10,000 이하인 단백질성분이 chick embryo 의 뇌, 근육세포의 발달을 촉진시키는 것을 관찰한바 있어 수삼 단백질성분을 구성하고 있는 개

개의 단백질성분을 분리 정제하여 그 구조 및 분자량 결정등의 생화학적 성질은 물론 그 약리작용을 밝히기 위한 연구를 수행하고 있다.

結 論

수삼 단백질성분을 인산완충액 (pH 7.4, ionic strength 0.1) 으로 추출한 다음 ultrafiltration 法으로 분자량 500, 1,000, 5,000 및 10,000 인 물질을 분리시킬 수 있는 4 종류의 ultrafiltration membrane 을 사용하여 분자량

에 따라 분획하였다. 분자량 10,000 이하의 각각의 단백 분획물은 다시 DEAE-cellulose를 사용하여 ion-exchange chromatography로 모두 11 종류의 단백성분을 분리할 수 있었다. 분자량 10,000 이상인 단백분획물도 ammonium sulfate 침전법으로 재분획한 다음 각각의 분획물을 전기영동하였을때 11 종류의 단백성분으로 구성되어 있음을 인지할 수 있었다. 이들 11 종류의 단백성분들은 5 종류의 subunits 전부 혹은 이중 일부가 각기 다른 조합으로 결합되어 있는 듯 하다. 각각의 단백분획물의 아미노산 조성을 Gas-liquid chromatography로 분석한 결과 분자량 500 이하의 분획물을 제외하고는 비교적 모든 아미노산을 고르게 함유하고 있었다.

이 연구는 大宇文化福祉財團의 學術研究費의 일부로 수행된 것이며 이에 同財團에 깊이 감사한다.

REFERENCES

- 1) I. M. Popov and W. J. Coldwag : *Korean Ginseng Studies, Itwha Co., Ltd, Seoul, Korea, Vol. 1, pp. 328, 1977.*
- 2) J. Y. Kim and E. J. Staba : *ibid, Vol. 1, pp. 1, 1977.*
- 3) B. H. Han and L. K. Woo : *ibid., Vol. 1, pp. 22, 1977.*
- 4) K. Takagi, H. Saito and H. Nabata : *Japan J. Pharmacol., 22 : 245, 1972.*
- 5) K. Takagi, H. Saito and M. Tsuchiya : *ibid., 22 : 339, 1972.*
- 6) T. Yokozawa, H. Semo and H. Oura : *Chem. Pharm. Bull., 23 : 3095, 1975.*
- 7) T. Yokozawa, H. Oura : *Chem Pharm. Bull., 24 : 987, 1976.*
- 8) H. Oura, S. Nakanishima, K. Tsukada and Y. Ohta : *Chem. Pharm. Bull., 20 : 980, 1972.*
- 9) *Korean Ginseng Research Institute, Republic of Korea, Korean Ginseng, pp. 173, 1978.*
- 10) *Korean Ginseng Research Institute, Republic of Korea, Korean Ginseng pp. 116, 1978.*
- 11) H. Saito, Y. Yoshida and K. Takagi : *Japan J. Pharmacol., 24 : 119, 1974.*
- 12) T. Ando, T. Muraoka, N. Yamasaki and H. Okuda : *Plan. Medi., 38 : 18, 1980.*
- 13) D. S. Han : *J. Pro. W. P. Acad., 4 : 241, 1976.*
- 14) F. Gstirner and H. J. Vogt *Arch. der Pharm., 299 : 936, 1966.*
- 15) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Rondall : *J. Biol. Chem., 193 : 265, 1964.*
- 16) H. N. Baker, R. L. Jackson, A. M. Gotto : *Biochem., 12 : 3866, 1966.*
- 17) C. Edelstein, C. T. Lim and A. M. Scanu : *J. Biol. Chem., 247 : 5842, 1972.*
- 18) B. J. Davis, : *Ann. N. Y. Acad. Sci. 121 : 404, 1964.*
- 19) K. Weber and M. Osborn : *J. Bio. Chem., 244 : 4406, 1969.*
- 20) D. Roach and C. W. Gehrke : *J. Chromatog., 53 : 303, 19170.*
- 21) P. Husek and K. Macek : *J. Chromatog., 113 : 139, 19174.*
- 22) R. F. Adams, : *J. Chromatog., 95 : 189, 1974.*