



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년07월12일
(11) 등록번호 10-1164110
(24) 등록일자 2012년07월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 1/18 (2006.01) C07K 1/36 (2006.01)
C12P 19/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0052913
(22) 출원일자 2010년06월04일
심사청구일자 2010년06월04일
(65) 공개번호 10-2011-0133275
(43) 공개일자 2011년12월12일
(56) 선행기술조사문헌
US20030148962 A
KR1020010050186 A
KR100144130 B1
KR1020030091665 A

(73) 특허권자
건국대학교 산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 120, 건국대학교내 (화양동)
(72) 발명자
나승열
서울특별시 강남구 일원로 120, 샘터마을 105동 306호 (일원동)
표미경
서울특별시 광진구 아차산로 263, 수의과대학 317호 (화양동, 건국대학교)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유완식, 이은철

전체 청구항 수 : 총 10 항

심사관 : 손영희

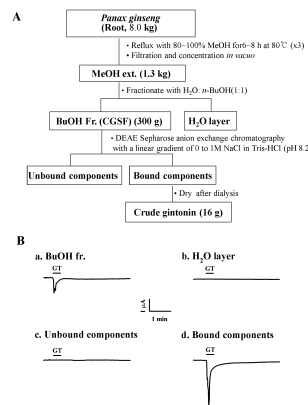
(54) 발명의 명칭 **인삼에 존재하는 당지질단백질 진토닌의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 인삼에 존재하는 당지질단백질 진토닌의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 인삼의 뿌리, 줄기 및 잎에서 동물 세포질 내 유리 칼슘(free Ca²⁺)을 동원(mobilization) 증가시키는 생리활성 작용을 지닌 당지질단백질(glycolipoprotein) 진토닌(gintonin)을 비교적 간단한 방법으로 높은 수율로 대량 분리할 수 있는 방법에 관한 것이다.

본 발명은 인삼뿌리, 줄기 및 잎의 부탄올 추출물로부터 음이온교환수지법을 이용하여 조진토닌을 분리하기 때문에 위해하지 않으며, 산업폐기물이 발생하지 않고, 시간과 비용을 절감할 수 있을 뿐만 아니라 폐자원 활용 효과가 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

신태준

서울특별시 서초구 서초동 신동아아파트 2동 701호

최선희

서울특별시 강동구 올림픽로70길 61, 706호 (천호동, 두산위브센터움)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R01-2008-000-10448-0

부처명 교육과학기술부

연구사업명 중견 연구자 지원사업

연구과제명 인삼의 새로운 glycopeptides 분리 및 신호 전달 연구

주관기관 건국대학교 산학협력단

연구기간 2008년 05년 01일 ~ 2011년 02월 28일

특허청구의 범위

청구항 1

- (1) 인삼 알코올 추출물을 제조하는 단계;
- (2) 상기 알코올 추출물을 물과 n-부탄올로 분획하는 단계; 및
- (3) 상기 물과 n-부탄올 분획물 중 n-부탄올 분획물(조총사포닌 분획물, CGSF)를 1 M NaCl이 함유된 pH 8.2의 20 mM Tris-HCl을 이용하여 음이온 교환수지 크로마토그래피를 수행하는 단계;를 포함하는 인삼에 존재하는 당지질단백질 진토닌의 제조방법.

청구항 2

- 제 1항에 있어서,
 상기 단계에 더하여,
 (4) 음이온 교환수지 컬럼에서 회수한 물질을 공극 크기(pore size) 6,000~8,000의 투석막에 넣고 투석하여 함유된 염을 제거하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 인삼에 존재하는 당지질단백질 진토닌의 제조방법.

청구항 3

- 제 2항에 있어서,
 상기 단계에 더하여,
 (5) 음이온 교환수지 크로마토그래피에서 얻어진 분획물을 0 내지 2 M NaCl이 함유된 7.2의 인산염 완충 식염수(PBS)에 용해하여 음이온 교환 크로마토그래피 및 겔 여과 크로마토그래피를 수행하여 2개의 분획으로 분리하는 단계; 및
 (6) 상기 2개의 분획물을 각각 100 내지 250 mM NaCl이 함유된 pH 8.2의 Tris-HCl와 150 내지 400 mM NaCl이 함유된 pH 7.2의 PBS를 이용하여 음이온 교환 크로마토그래피를 수행하여 개별 진토닌으로 분리하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 인삼에 존재하는 당지질단백질 진토닌의 제조방법.

청구항 4

- 제 1항에 있어서,
 상기 (1) 단계의 인삼 알코올 추출물은 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 또는 이들의 혼합용매로 추출하는 것을 특징으로 하는 인삼에 존재하는 당지질단백질 진토닌의 제조방법.

청구항 5

- 제 1항에 있어서,
 상기 (3) 단계의 음이온 교환수지 크로마토그래피는 물, 메탄올, 에탄올 또는 이들의 혼합용매를 포함하는 1 M NaCl이 함유된 pH 8.2의 20 mM Tris-HCl을 이용하는 것을 특징으로 하는 인삼에 존재하는 당지질단백질 진토닌의 제조방법.

청구항 6

- 제 1항에 있어서,
 상기 인삼은 산삼, 장뇌삼, 재배삼, 서양삼, 중국인삼, 홍삼, 수삼, 및 백삼으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 인삼에 존재하는 당지질단백질 진토닌의 제조방법.

청구항 7

- 제 1항에 있어서,

상기 인삼은 인삼의 뿌리, 잎, 줄기, 열매, 및 꽃에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 인삼에 존재하는 당지질단백질 진토닌의 제조방법.

청구항 8

- (a) 인삼의 잎 또는 줄기로부터 알코올 추출물을 제조하는 단계;
- (b) 상기 알코올 추출물을 물과 n-부탄올로 분획하는 단계;
- (c) 상기 물과 n-부탄올 분획물 중 n-부탄올 분획물(조총사포닌 분획물, CGSF)을 90% 메탄올 또는 에탄올과 헥산이 동량으로 혼합된 용매로 분획하는 단계; 및
- (d) 상기 90% 메탄올 또는 에탄올 분획물과 n-헥산 분획물 중 메탄올 또는 에탄올 분획물을 1 M NaCl이 함유된 pH 8.2의 20 mM Tris-HCl을 이용하여 음이온 교환수지 크로마토그래피를 수행하는 단계;를 포함하는 인삼에 존재하는 당지질단백질 진토닌의 제조방법.

청구항 9

- 제 8항에 있어서,
 상기 단계에 더하여,
 (e) 음이온 교환수지 컬럼에서 회수한 물질을 공극 크기(pore size) 6,000~8,000의 투석막에 넣고 투석하여 함유된 염을 제거하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 인삼에 존재하는 당지질단백질 진토닌의 제조방법.

청구항 10

- 제 9항에 있어서,
 상기 단계에 더하여,
 (f) 음이온 교환수지 크로마토그래피에서 얻어진 분획물을 2 M NaCl이 함유된 인산염 완충 식염수(PBS)에 용해하여 음이온 교환 크로마토그래피 및 겔 여과 크로마토그래피를 수행하여 2개의 분획으로 분리하는 단계; 및
 (g) 상기 2개의 분획물을 각각 100 내지 250 mM NaCl이 함유된 pH 8.2의 Tris-HCl와 150 내지 400 mM NaCl이 함유된 pH 7.2의 PBS를 이용하여 음이온 교환 크로마토그래피를 수행하여 개별 진토닌으로 분리하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 인삼에 존재하는 당지질단백질 진토닌의 제조방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 인삼에 존재하는 당지질단백질(glycolipoprotein) 진토닌(gintonin)의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 인삼의 뿌리, 줄기 및 잎에서 동물 세포질 내 유리 칼슘(free Ca²⁺)을 동원(mobilization) 증가시키는 생리활성 작용을 지닌 당지질단백질 진토닌을 비교적 간단한 방법으로 높은 수율로 대량 분리하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인삼은 일반적으로 강장제(adaptogen) 또는 생명연장을 위한 강장제로서 이용되고 있으며, 스트레스, 피로, 질병, 암, 당뇨병에 대하여 생체기능을 향상시킨다. 이러한 인삼은 한국뿐만 아니라 중국과 일본에서도 몇 백년 동안 인삼을 사용해 왔으며, 최근 인삼은 세계에서 소비되는 약초로 가장 유명한 것 중 하나이다(Tyler, *J. Pharm. Technol.* **11**, 214-220, 1995).

[0003] 진세노사이드(Ginsenoside)는 1960년대 초반에 분리되어 특성화되었기 때문에 생리학적, 약리학적 연구에서 대표적인 성분으로 많이 이용되고 있다(Shibata, et al. *Tetrahedron Letters* **1962**, 1239-1245, 1963; Wagner-Jauregg and Roth, *Pharm Acta Helv* **37**, 352-357, 1962). 이외에도 최근 연구에서는 인삼에 다당류(polysaccharides), 폴리아세틸렌류(polyacetylenes), 단백질(proteins) 등 알려지지 않은 다른 성분들이 함

유되어 있는 것이 밝혀졌다(Nah, *Kor. J. Ginseng Sci.* **21**, 1-12, 1997).

- [0004] 인삼의 진세노사이드 성분은 양이 적고, 분리과정에 복잡하며, 순수한 진세노사이드의 경우에는 비싸기 때문에 인삼의 뿌리에서 부탄올 추출방법으로 얻어낸 조총사포닌 분획(crude ginseng total saponin fraction, CGSF)을 사용해 왔다(Kanzaki, et al. *Br J Pharmacol.* **125**(2), 255-262, 1998; Choi, et al. *Br J Pharmacol.* **132**, 641-648, 2001; Choi, et al., *J. Biol. Chem.* **276**, 48797-48802, 2001; Choi, et al. *Eur J Pharmacol* **468**, 83-92, 2003; Lee, et al, *J Biol Chem.* **279**, 9912-9921, 2004; Jeong, et al, *Br J Pharmacol.* **142**, 585-593, 2004; Reay, et al, *J Psychopharmacol.* **19**, 357-365, 2005; Lee, et al, *Arch Pharm Res* **28**, 413-420, 2005; Wei, et al *J Ethnopharmacol.* **111**, 613-618, 2007; Eriksson, et al *J Ethnopharmacol.* **119**, 17-23, 2008).
- [0005] 조총사포닌 분획(CGSF)은 세포막 신호 경로(signal pathway)를 통해 그 활성이 나타나는 것으로 알려져 있는데, 예를 들면, 최 등은 개구리알(*Xenopus oocytes*)에 조총사포닌 분획을 처리했을 때 PLC β -IP3에 연결되어 있는 PTX-insentive G $\alpha_{q/11}$ 단백질을 통해 칼슘 의존성 염소이온 채널(Ca²⁺ activated Chloride Channel, CaCC)이 활성화 되는 것을 밝혀냈다(Choi, et al., *J. Biol. Chem.* **276**, 48797-48802, 2001). 또한, 이 등은 개구리알(*Xenopus oocytes*)에서 조총사포닌 분획을 지속적으로 처리했을 때 조총사포닌 분획에 의해 활성화된 칼슘 의존성 염소이온 채널 전류(CaCC currents)가 자발적으로 감소하는 것을 보고하였다(Lee, et al, *J Biol Chem.* **279**, 9912-9921, 2004).
- [0006] 칼모듈린(Calmodulin)을 개구리알에 직접 주입을 하거나 세포 내 칼슘저장고를 고갈시켰을 때 조총사포닌 분획에 따른 칼슘 의존성 염소이온 채널의 활성이 사라진다 (Lee, et al, *Arch Pharm Res* **28**, 413-420, 2005). 게다가 개구리알에서 조총사포닌 처리시 SOCE(stored-operated Ca²⁺ entry)가 유발되며(Jeong, et al, *Br J Pharmacol.* **142**, 585-593, 2004), 이에 따라 세포 밖에서부터 또는 세포 내 칼슘 저장고에서 칼슘의 농도 증가가 야기되어 개구리알 내 CaCC가 활성화되는 것으로 알려져 있다(Dascal, *CRC Crit Rev Biochem* **22**, 317-387, 1987).
- [0007] 본 발명자들은 진세노사이드가 CaCC를 활성화시키는 것을 알아보기 위하여 조총사포닌 분획물(CGSF)로부터 순수한 진세노사이드를 분리하는 과정 중 CGSF 보다 진세노사이드가 풍부한 분획물의 경우 CaCC 활성화에 대한 그 효과가 급격하게 사라지거나 없어지는 것을 발견하였다. 즉, CGSF로부터 순수하게 분리된 진세노사이드의 경우, 개구리알 내에서 CaCC 활성화 효과가 없는 것을 밝혀내고, CGSF에는 개구리알 내에 존재하는 CaCC의 활성화에 영향을 미치는 진세노사이드 외에 신규한 당지질단백질이 존재하는 것을 확인하였으며, 상기 당지질단백질을 진토닌으로 명명하여 "인삼에서 분리동정한 신규한 당지질단백질 및 그 제조방법"을 출원한바 있다(특허출원 제2009-0110662호).
- [0008] 그러나, 상기의 방법은, 인삼의 부탄올 추출물(다시 말해, CGSF)로부터 1차로 클로로포름과 메탄올 및 물의 혼합용매를 이용하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 실시한 후, 2차로 에탄올과 에틸아세테이트 및 물의 혼합용매를 이용한 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 통해 조진토닌을 분리하고 있기 때문에, 식품의 제조 공정에 사용할 수 없는 해로운 유기용매를 사용함으로써 생산물을 식품 등에 적용하는데 제한이 있었다.
- [0009] 또한, 유기용매를 이용한 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 이용함에 따라 생산단가가 높고, 산업에 적용할 경우, 사용하고 남은 유기용매와 실리카겔의 재사용이 어려워 막대한 산업 폐기물이 발생할 수 있으며, 용매의 극성 차이를 이용하는 실리카겔 컬럼크로마토그래피는 1회의 컬럼에 로딩(loading)할 수 있는 물질의 양이 많지 않기 때문에 다량의 물질을 적용하는데 한계가 있고 물질의 분리에 많은 시간이 소요된다. 또한, 진토닌은 당지질단백질로서 실리카겔에 흡착되는 성질을 가지고 있으므로, 어떤 종류의 진토닌은 인삼의 부탄올 추출물(CGSF)의 주성분인 사포닌과 함께 이동하여 손실될 우려가 있었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 결국, 본 발명의 주된 목적은 인삼에서 새로운 생리활성 물질인 진토닌을 비교적 간단한 방법으로 높은 수율로 분리할 수 있는 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 인삼에 존재하는 새로운 생리활성물질로서 당지질단백질

(glycolipoprotein)인 진토닌(gintonin)을 높은 수율로 분리하는 방법을 제공한다.

- [0012] 구체적으로, 본 발명은, (1) 인삼 알코올 추출물을 제조하는 단계; (2) 상기 알코올 추출물을 물과 n-부탄올로 분획하는 단계; 및 (3) 상기 분획물 중 n-부탄올 분획물(조총사포닌 분획물, CGSF)를 NaCl이 함유된 약알칼리성 완충액(20 mM Tris-HCl, pH 8.2)를 이용하여 음이온 교환수지(DEAE sepharose) 크로마토그래피를 수행하는 단계;를 포함하는 인삼에 존재하는 당지질단백질 진토닌의 제조방법을 제공한다.
- [0013] 본 발명에 따른 진토닌(gintonin)은 분자량이 약 67 kDa이고, 겔보기 분자량은 약 13 kDa인 오량체(pentamer)로서 인삼으로부터 분리 동정되는 당지질단백질로, 중성 또는 약 알칼리성 완충용액에서 음전하를 띠는 특징이 있다.
- [0014] 상기 진토닌은 인삼의 부탄올 추출물, 다시 말해 조총사포닌 분획물(CGSF)의 주성분인 인삼사포닌이 당과 트리테르페노이드(triterpenoids)로 구성되고 분자량이 1,000~2,000이며, 중성 또는 약 알칼리성 완충용액에서 전하를 띠 수 있는 관능기를 갖고 있지 않다는 점에서 인삼사포닌과 구별될 수 있다.
- [0015] 본 발명에서는 인삼의 조총사포닌 분획물(CGSF)로부터 조진토닌을 분리하기 위하여 중래 유기용매를 이용한 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 이용하는 대신 NaCl이 함유된 약 알칼리성을 띠는 완충액을 이용한 음이온 교환수지 컬럼을 이용하는 것이 특징이다.
- [0016] 이하, 본 발명을 각 제조 단계별로 상세히 설명한다.
- [0017] 제 1단계로서 본 발명의 인삼 알코올 추출물을 제조하기 위해서는, 먼저, 건조된 인삼 분말을 시료 중량의 약 1 내지 20배, 바람직하게는 약 1 내지 10배에 달하는 부피의 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 등과 같은 C1 내지 C4의 저급 알코올의 극성 용매 또는 이들의 약 1 : 0.1 내지 1 : 10의 혼합비를 갖는 혼합용매로, 바람직하게는 1 : 0.2 내지 1 : 5의 혼합비(v/v)를 갖는 물과 메탄올의 혼합용매로, 70 내지 120°C에서 약 0.1 내지 48 시간, 바람직하게는 5 내지 12시간 동안 교반추출, 열수추출, 냉침추출, 가온추출, 환류냉각추출 또는 초음파추출 등의 추출방법, 바람직하게는 환류냉각추출한 후 여과하여 상층액을 회수하고, 상기의 과정을 수회, 바람직하게는 2 내지 5회 반복 수행한 다음 상층액을 모아 감압농축하여 알코올 추출물을 수득한다.
- [0018] 그 다음으로, 제 2단계로서, 상기 알코올 추출물을 물과 n-부탄올이 동량으로 혼합된 혼합용매로 용매분획하여 물과 n-부탄올의 분획물을 수득한다.
- [0019] 제 3단계는, 상기 분획물 중 조총사포닌(CGSF) 분획물에 해당하는 n-부탄올 분획물을 20 mM Tris-HCl(pH 8.2)로 충전된 음이온 교환수지 크로마토그래피를 수행하여 음전하를 띠지 않는 진세노사이드 등과 기타 저분자 물질을 제거한 후 NaCl이 함유된 Tris-HCl(pH 8.2)를 통과시켜 음이온 교환수지 컬럼에 결합된 물질을 회수하고, 상기 컬럼에서 회수된 물질을 투석막(pore size 6,000~8,000)에 넣고 투석하여 함유된 염을 제거한 다음 동결 건조 또는 진공농축 하면 진토닌 조추출물을 수득할 수 있다.
- [0020] 또는, 상기 음이온 교환수지 크로마토그래피는 물, 메탄올, 에탄올 또는 이들의 혼합용매를 함유한 20 mM Tris-HCl(pH 8.2)로 충전된 음이온 교환수지 컬럼을 사용하여 수행할 수도 있다. 이때, 음전하를 띠지 않는 진세노사이드 등과 기타 저분자 물질을 제거한 후에는 NaCl이 함유된 물, 메탄올, 에탄올 또는 이들의 혼합용매 Tris-HCl(pH 8.2)를 통과시켜 음이온 교환수지 컬럼에 결합된 물질을 회수한다.
- [0021] 본 발명에서 진토닌의 제조를 위해 산삼, 장뇌삼, 재배삼, 서양삼 및 중국인삼 등의 인삼을 사용할 수 있고, 상기 인삼은 홍삼, 수삼, 백삼 등의 형태로 이용될 수 있으며, 이에 한정되지는 않는다. 바람직하게는 고려인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)으로 제조한 4 내지 6년근 홍삼을 사용하는 것이 좋으며, 인삼의 뿌리(root)는 물론 인삼의 잎(leaves), 줄기(stem), 열매 또는/및 꽃을 사용하는 것이 가능하다.
- [0022] 특히, 인삼의 잎이나 줄기로부터 진토닌을 분리하고자 할 경우에는 추출의 효율을 높이기 위해 n-부탄올 분획물(조총사포닌분획)을 90% 메탄올 또는 에탄올과 헥산이 동량으로 혼합된 용매로 한 번 더 분획한 후 메탄올 또는 에탄올 분획물에 대해 음이온 교환 크로마토그래피를 수행하는 것이 바람직하다.
- [0023] 또한, 상기와 같이 수득된 조진토닌은 NaCl이 함유된 인산염 완충 식염수(phosphate buffer saline, PBS)에 용해하여 음이온 교환 크로마토그래피 및 겔 여과 크로마토그래피를 수행하여 2개의 진토닌 분획물을 수득하고, 각각의 진토닌 분획물은 NaCl이 함유된 Tris-HCl(pH 8.2)와 NaCl이 함유된 PBS(pH 7.2)를 사용하여 단계기 음이온 교환 크로마토그래피를 수행하면 개별 진토닌을 수득할 수 있다.

[0024] 상기와 같은 방법으로 제조된 진토닌은 분자량이 약 67 kDa이고, 겔보기 분자량은 약 13 kDa인 오량체(pentamer)이며, 아미노산 조성성분으로 시스테인과 시스틴(cysteine and cystine), 아스파라긴과 아스파르트산(asparagine and aspartic acid), 글루타민과 글루탐산(glutamine and glutamic acid), 세린(serine), 글리신(glycine), 아르기닌(arginine), 트레오닌(threonine), 알라닌(alanine), 프롤린(proline), 발린(valine), 이소류신(isoleucine), 류신(leucine), 페닐알라닌(phenylalanine), 트립토판(tryptophan) 및 리신(lysine); 탄수화물 조성성분으로서 글루코오스(glucose), 갈락토오스(galactose), 갈락토사민(galactosamine), 글루쿠론산(glucuronic acid); 및 지질 조성성분으로 리놀레산(linoleic acid), 팔미트산(palmitic acid), 스테아르산(stearic acid)과 기타 소량의 다른 화합물을 포함하는 당지질단백질인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0025] 본 발명은 인삼에 존재하며 동물 세포질 내 유리 칼슘($free\ Ca^{2+}$)을 동원(mobilization) 증가시키는 생리활성 작용을 지닌 당지질단백질 진토닌(gintonin)을 높은 수율로 대량으로 분리하는 방법을 제공하는 효과가 있다.

[0026] 본 발명은 인삼의 부탄을 추출물로부터 음이온교환수지법을 이용하여 조진토닌을 분리하기 때문에 위해하지 않으며, 산업폐기물이 발생하지 않을 뿐만 아니라 시간과 비용을 절감할 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명은 인삼 뿌리(ginseng root)는 물론, 통상적으로 인삼의 수확 후 버려졌던 인삼의 줄기나 잎에서도 진토닌을 분리할 수 있으므로 폐자원을 활용할 수 있으며, 진토닌의 제조비용을 감소시켜 가격 경쟁력을 가질 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1의 A는 인삼의 뿌리(root)에서 조진토닌을 분리하는 방법을 도식화 한 그림이며, B는 진토닌 분획물의 개구리알에서의 CaCC 활성을 확인한 크로마토그램이다.

도 2의 A는 인삼의 줄기(stem)에서 조진토닌을 분리하는 방법을 도식화 한 그림이며, B는 진토닌 분획물의 개구리알에서의 CaCC 활성을 확인한 크로마토그램이다.

도 3의 A는 인삼의 잎(leaves)에서 조진토닌을 분리하는 방법을 도식화 한 그림이며, B는 진토닌 분획물의 개구리알에서의 CaCC 활성을 확인한 크로마토그램이다.

도 4의 A는 인삼 뿌리, 줄기 및 잎에서 분리한 조진토닌의 SDS-PAGE 결과이고, B는 상기 조진토닌의 탄수화물 성분의 겔 염색 SDS-PAGE 결과이다(R: 뿌리; S: 줄기; L: 잎).

도 5는 겔 여과 크로마토그래피에 의한 인삼 뿌리(A), 줄기(B), 및 잎(C)에서 분리한 조진토닌의 용출 패턴을 나타낸 것이다.

도 6은 HPAED-PAD 크로마토그램에 의한 개별 진토닌의 탄수화물 성분 분석 결과로, A는 중성당(neutral sugar)의 성분 분석결과이고(표준물질: 1. L-과당; 2. L-람노스; 3. D-아라비노오스; 4. D-갈락토오스; 5. D-글루코오스; 6. D-만노스; 7. D-크실로오스), B는 아미노당(amino sugar)의 성분 분석결과이다(표준물질: 1. D-갈락토사민; 2. D-글루코사민).

도 7의 A는 인삼뿌리, 줄기, 및 잎에서 분리한 조진토닌 및 개별진토닌의 지질 성분의 GC-MS 스펙트럼 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0030] 실시예 1. 인삼 뿌리(root)에서 조진토닌(crude gintonin) 분리

[0031] 한국인삼공사(대전, 한국)에서 구입한 6년근 홍삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer) 분말 8 kg에 80~100%(w/v) 에탄올 또는 메탄올 16 ℓ 를 가하여 80℃에서 8시간 환류냉각추출 한 다음, 진공 여과하여 상층액을

회수하였다. 이 과정을 3회 반복하여 상층액을 모은 후 감압농축하고(에탄올/메탄올 추출물 각 1.3 kg 수득), 각각의 에탄올 및 메탄올 추출물에 대해 물과 n-부탄올의 혼합용매(1:1)(v/v)로 총 2회 용매 분획하여 얻은 물과 n-부탄올의 분획물 중 n-부탄올 분획물을 진공농축 하여 조중사포닌 분획(CGSF) 300 g씩을 수득하였다.

[0032] 상기 조중사포닌 분획은 50%(w/v) 에탄올 또는 메탄올을 함유한 20 mM Tris-HCl(pH 8.2) 또는 20 mM Tris-HCl(pH 8.2)에 용해한 후 동일한 용매로 미리 충전된 DEAE 세파로스(sepharose) CL-6B 컬럼이 장착된 음이온 교환 크로마토그래피(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)에 로딩하여 50%(w/v) 에탄올 또는 메탄올을 함유한 20 mM Tris-HCl(pH 8.2) 또는 20 mM Tris-HCl(pH 8.2)를 충분히 통과시켜 컬럼에 결합되지 않는 물질, 즉 음전하를 띠지 않는 진세노사이드(ginsenosides) 등과 기타 저분자 물질을 제거한 다음, 1 M NaCl이 함유된 50%(w/v) 에탄올 또는 메탄올 Tris-HCl(pH 8.2) 또는 1 M NaCl이 함유된 Tris-HCl(pH 8.2)를 통과시켜 음이온 교환수지 컬럼에 결합된 물질을 회수하였다.

[0033] 상기 컬럼에 회수된 물질은 투석막(pore size 6,000~8,000)에 넣고 투석하여 염을 제거한 후, 동결건조 또는 진공농축 하여 조진토닌을 16 g 수득하였다(수율 0.20%).

[0034]

[0035] **실시예 2. 인삼 줄기(stem)에서의 조진토닌 분리**

[0036] 인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer) 줄기 38 g에 대해, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 조중사포닌 분획(CGSF) 2.0 g을 수득한 후, 추가로 n-헥산과 90%(v/v) 메탄올 또는 에탄올(메탄올 또는 에탄올 : 물 = 9 : 1)이 동량으로 혼합된 용매로 2~3회 분획하여 n-헥산과 90%(v/v) 메탄올 또는 에탄올 분획물 중 90%(v/v) 메탄올 또는 에탄올 분획물을 감압농축하였다.

[0037] 상기 감압농축한 90%(v/v) 메탄올 또는 에탄올 분획물은 50%(v/v) 에탄올 또는 메탄올을 함유한 20 mM Tris-HCl(pH 8.2) 또는 20 mM Tris-HCl(pH 8.2)에 용해한 후 동일한 용매로 미리 충전된 DEAE 세파로스(sepharose) CL-6B 컬럼이 장착된 음이온 교환 크로마토그래피(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)에 로딩하여 50%(v/v) 에탄올 또는 메탄올을 함유한 20 mM Tris-HCl(pH 8.2) 또는 20 mM Tris-HCl(pH 8.2)를 충분히 통과시켜 컬럼에 결합되지 않는 물질, 즉 음전하를 띠지 않는 진세노사이드(ginsenosides) 등과 기타 저분자 물질을 제거하였다.

[0038] 마지막으로, 1 M NaCl이 함유된 50%(v/v) 에탄올 또는 메탄올 Tris-HCl(pH 8.2) 또는 1 M NaCl이 함유된 Tris-HCl(pH 8.2)를 통과시켜 음이온 교환수지 컬럼에 결합된 물질을 회수하고, 상기 컬럼에 회수된 물질은 투석막(pore size 6,000~8,000)에 넣고 투석하여 염을 제거한 후, 동결건조 또는 진공농축 하여 조진토닌을 0.11 g 수득하였다(수율 0.29%).

[0039] **실시예 3. 인삼 잎(leaves)에서의 조진토닌 분리**

[0040] 인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)의 잎 37.3 g에서 상기 실시예 2와 동일한 방법에 따라 조진토닌 0.3 g을 수득하였다(수율 0.81%).

[0041] **실시예 4. 개별 진토닌 분리**

[0042] 조진토닌에서 개별 진토닌들을 분리하기 위하여, 상기 실시예 1~3에서 수득한 조진토닌을 인산염 완충 식염수(phosphate buffer saline, PBS)(pH 7.2)에 용해하여 DEAE 세파로스 CL-6B 컬럼이 장착된 음이온 교환수지 크로마토그래피(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)를 수행하고, 2개의 주된 첨두(major peak)를 얻었다. 이때, 용매는 0 내지 2 M NaCl이 PBS에 녹아있는 것을 사용하였으며, 1 ml/분의 유속으로 280 nm에서 모니터링 하면서 선형 기울기(linear gradient) 방식으로 분리하여 얻은 2개의 주된 첨두를 각각 진토닌 E(early eluted gintonin)와 진토닌 L(late eluted gintonin)로 명명하였다.

[0043] 또한, 상기 진토닌 E와 진토닌 L 분획물은 CentriVap DNA 진공 농축기(Labconco, Missouri, USA)로 농축한 후 PBS(pH 7.2)를 용리액으로 하고, 슈퍼덱스(Superdex) 75 겔 여과 컬럼을 이용해 0.5 ml/분의 유속으로 280 nm에서 모니터링 하면서 크로마토그래피를 수행하여 분자량이 큰 주첨두(major peak)와 부첨두(minor peak)를 얻었다.

[0044] 이렇게 얻어진 진토닌 E와 진토닌 L은 개구리알에서 CaCC 활성을 나타내는 것을 확인한다. 먼저 진토닌 E 분

획물을 다시 100, 150, 200, 250 mM NaCl이 함유된 20 mM Tris-HCl(pH 8.2)을 사용하여 단계 기울기(step gradient) DEAE 음이온 교환 컬럼(anion exchange column: HiTrap™ DEAE FF, 1 ml)에 1 ml/분의 유속으로 로딩하여 4개의 첨두를 얻었으며, 이 중 100, 150, 및 200 mM NaCl 용액의 분획물을 대량 투석(extensive dialysis)과 농축한 후 다시 0 내지 1 M NaCl이 함유된 20 mM Tris-HCl(pH 8.2)을 사용하여 단계 기울기 DEAE 음이온 교환 컬럼 크로마토그래피를 수행한 다음 최종적으로 수퍼텍스 75 겔 여과 크로마토그래피를 수행하여 최종 분획물(개별 진토닌)을 얻었다.

[0045] 다음, 진토닌 L 분획물은 150, 200, 250, 300, 350 mM 및 400 mM NaCl이 함유된 PBS(pH 7.2)를 이용하여 상기와 동일한 방법으로 최종 분획물(개별 진토닌)을 수득하였다.

[0046] **실시예 5. 진토닌의 분자량 결정**

[0047] 표준단백질들을 이용하여 결정한 진토닌을 전기영동(SDS-PAGE)한 결과, 6개의 진토닌이 폭은 넓지만(broad) 단일한 주 밴드(single major band)를 나타내었으며, 이의 겔보기 분자량(apparent molecular weight)는 약 13 kDa인 것으로 확인되었다(도 6A 참조).

[0048] **실시예 6. 진토닌의 아미노산 조성 분석**

[0049] 일반 아미노산(general amino acid) 분석을 위해, 진토닌 30 µg을 진공 하(*in vacuo*)에서 6 N HCl로 110°C에서 24시간 동안 가수분해 하였다. 또한, 시스테인(cysteine)의 분석을 위해서는, 진토닌을 과산화(peroxidation) 후 6 N HCl로 110°C에서 24시간 동안 가수분해 후 포름산 : 과산화수소(10 : 1)(v/v) 용액으로 처리하였으며, 트립토판(tryptophan)의 분석을 위해서는, 진토닌은 4 M 메탄설폰산(methanesulfonic acid)로 가수분해 후 4 M KOH를 가했다.

[0050] 또한, 페닐이소티오시아네이트(phenylisothiocyanate, PITOC) 유도체에 숨겨진 아미노산은 대전에 소재한 한국기초과학지원연구원에 의뢰하여 워터스 노바-팩 C18 컬럼(Waters Nova-Pak C18 column: 3.9*300 mm)이 장착된 HPLC(Hewlett Packard 1100 Series)로 분석하였다.

[0051] 단백질 성분은 표준으로 소혈청알부민(BSA)를 사용한 브래드포드(Bradford)법(Bradford, M. M., *Anal. Biochem.* **72**, 248-254, 1976)으로 결정하였다.

[0052] 그 결과, 진토닌에서 소수성 아미노산(hydrophobic amino acid)은 친수성 아미노산(hydrophilic amino acid)보다 더 많았으나, 히스티딘(His)과 티로신(Tyr) 및 메티오닌(Met)은 검출되지 않았다. 이 중에서 메티오닌은 진토닌의 N-말단이 블로킹 되어 검출되지 않은 것으로 판단된다.

표 1

[0053]

Contents(%)	뿌리	줄기	잎
CYA*	5.36	8.74	10.31
ASX**	11.26	4.98	6.71
GLX***	7.15	5.20	5.24
Ser	5.46	4.60	5.17
Gly	10.99	15.83	18.93
His	0.00	0.00	0.00
Arg	2.57	1.32	1.38
Thr	4.46	1.76	2.25
Ala	6.71	3.87	3.86
Pro	6.48	5.14	5.24
Tyr	1.31	0.99	0.84
Val	5.06	4.70	3.49
Met	0.89	1.19	0.70
Ile	5.39	8.15	6.78
Leu	7.98	5.39	5.34
Phe	11.45	17.42	14.89

Trp	1.10	1.86	1.65
Lys	6.38	8.85	7.22

[0054]

[0055] 단, 상기에서 CYA*는 시스테인과 시스틴의 합계이며, ASX**는 아스파라긴과 아스파르트산의 합계이고, GLX***는 글루타민과 글루탐산의 합계이다.

[0056] **실시예 7. 진토닌의 탄수화물 조성 분석**

[0057] 도 6A에서 나타난 바와 같이, SDS-PAGE에서 진토닌의 밴드(band)는 단일(single) 하지만 broad 하였으며, Coomassie Brilliant blue staining으로 강하게 염색되지 않았기 때문에 탄수화물을 포함하고 있을 가능성이 있다.

[0058] 본 발명에서는 진토닌의 탄수화물 조성을 확인하기 위하여, 진토닌을 2 M 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid)으로 100℃에서 4시간 동안 가수분해한 후 중성당(neutral sugar)를 얻었으며, 또한 진토닌을 유리 앰플(ampule)에서 6 N HCl로 100℃에서 4시간 동안 가수분해하여 아미노당(amino sugar)과 산성당(acid sugar)을 얻었다.

[0059] 진토닌의 탄수화물 조성은 서울 소재의 세종대학교 탄수화물 소재 연구소에 의뢰, PAS 염색(periodic acid-schiff based staining) 기법을 사용하여 염색한 다음 CarboPac™ PA1 컬럼이 장착된 HPAEC-PAD 시스템(high performance anion exchange chromatography-plused amperometric detection system: Dionex, California, USA)을 사용하여 분석하였으며, 단당류의 몰중량(molar weight)은 첨두의 면적(peak area)으로부터 계산하였다.

[0060] 또한, 탄수화물 함량은 중성당의 경우, 페놀-설펜산 방법(Hounsell, E.F., Davies, M.J., and Smith, K.D., *Protein protocol handbood, Humanna press, Totawa, 803-804, 1997*)으로 결정하고, 산성당은 Anthrone 방법으로 결정하였다(Scott, T.A., and Melvin, E.H., *Anal. Biochem.*, **25**, 1656-1660, 1953).

[0061] 그 결과, 진토닌은 글루코오스(glucose), 갈락토오스(galactose) 등 2개 종류의 중성당과, 갈락토사민(galactosamine)과 같은 1개 종류의 아미노당, 글로쿠론산(glucuronic acid)과 같은 1개 종류의 산성당으로 구성된 것이 확인되었다.

표 2

[0062]

Carbohydrate contents(%)	뿌리	줄기	잎
GalN	3.59	1.66	1.89
Gal	19.72	12.13	53.09
Glc	70.74	79.43	45.02
Glu	5.95	6.78	-

[0063] **실시예 8. 진토닌의 지질 성분 분석**

[0064] 본 발명의 진토닌은 n-부탄을 추출에 의해 진세노사이드와 같은 분획에 있었기 때문에 진토닌 역시 지질 모이어티(lipid moiety)를 함유하고 있을 것으로 예상된다.

[0065] 이를 확인하기 위하여, 진토닌을 6 N HCl로 4시간 동안 100℃에서 가수분해하거나 또는 지질단백질 리파아제(lipoprotein lipase)에 소화시켜 지질 및 소수성 모이어티(hydrophobic moiety)를 확인하였다.

[0066] 구체적으로, 조총사포닌 분획(CGFS)을 산 가수분해 또는 소화시킨 것을 농축하여 다시 물과 n-헥산으로 더 분획한 후, n-헥산 분획물을 DB5-MS 모세관 컬럼(capillary column: 30 cm×250 μm×0.25 μm)이 장착된 Agilent 6890N GC-MS 시스템(California, USA)을 이용하여 한국기초과학지원연구원서 지질 및 소수성 모이어티를 분석하였다. 이때, GC(6890N)는 불꽃 이온화 검출기(flame ionization detector)와 분리 주입 시스템(split injection system)이 장착되었으며, supelo SPB-1 모세관 컬럼(내경: 15 m×0.32 mm/두께: 0.25 m)을 고정하였다.

[0067] 그 결과, 표 3 및 도 7에 나타난 바와 같이, 본 발명의 진토닌은 지질 조성 성분으로 리놀레산(linoleic acid), 팔미트산(palmitic acid), 스테아르산(stearic acid)과 기타 소량의 다른 화합물 등을 함유하는 것으로 확인되었다.

[0068] 상기와 같은 결과를 종합해 보면, 본 발명의 진토닌은 당지질단백질(glycolipoprotein)이라는 것을 시사한다.

표 3

Lipids Content(%)	뿌리	줄기	잎
Palmitic acid(C16:0)	38.79	35.78	40.33
Stearic acid(C18:0)	2.29	2.077	2.33
Linoleic acid(C18:2)	52.66	57.34	57.34
Others	6.26	4.81	-

[0070]

[0071] **측정에 1. *Xenopus laevis* oocytes에서 CaCC 활성 측정**

[0072] 1-(1). Oocyte 준비

[0073] *Xenopus* I(Ann Arbor, MI, USA)로부터 얻은 *Xenopus laevis*를 최상의 규격지침에 따라 보관 및 처리하고, oocytes(난자)를 분리하기 위해 개구리를 2-아미노벤조산에틸에스테르(3-amino benzoic acid ethyl ester)의 통기용액(aerated solution)으로 마취시켜 수술한 후 콜라게나제(collagenase)로 처리한 다음, 82.5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 2.5 mM 피루브산 나트륨(sodium pyruvate), 100 units/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신이 포함된 칼슘 유리(Ca²⁺ free) 배지에서 2시간 동안 교반하여 분리하였다.

[0074] V-VI 단계의 난자를 수집하여 겐타마이신(gentamicin) 50 µg/ml를 추가한 ND96(96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 및 5 mM HEPES; pH 7.4)에서 보관하였으며, 상기 난자를 포함하는 용액은 연속적으로 가법계 진탕하면서 18 °C로 유지하고, 매일 교환하였다.

[0075] 1-(2). CaCC의 측정

[0076] 2-전극 전압고정(two-electrode voltage clamp) 기록은 소형 플렉시글라스(plexiglass) 네트 챔버(5 ml)에 놓인 개별적인 난자로부터 얻었으며, 전기생리학 실험(electrophysiological experiments)은 3 M KCl로 채운 마이크로전극(저항: 0.2~0.7 MΩ)과 난자고정증폭기(Oocyte Clamp amplifier; OC-725C, Warner Instrument, CT, USA)를 사용하여 실온에서 진행한 후 CaCC를 -80 mV 지지전위(holding potential)에서 기록하였다.

[0077] 또한, 진토닌은 이 등의 방법(Lee, J. H., Jeong, S. M., Lee, B. H., Noh, H. S., Kim, B. K., Kim, J. I., Rhim, H., Kim, H. C., Kim, K. M., and Nah, S. Y., *J Boi Chem* **279**, 9912-9921, 2004)에 따라 개구리 난자에 처리하였다.

[0078] **실험예 1. *Xenopus laevis* oocytes에 내인성으로 존재하는 CaCC 활성화에 대한 진토닌 효과 확인**

[0079] 개구리알(*Xenopus laevis* oocytes)에 내인성으로 존재하는 CaCC 활성화에 대한 조진토닌 및 개별 진토닌의 효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 1 내지 3에서 얻은 조진토닌 및 상기 조진토닌으로부터 분리한 개별 진토닌을 상기 측정예 1의 방법에 따라 CaCC의 활성 증가로 기록되는 지지전위를 측정하였다.

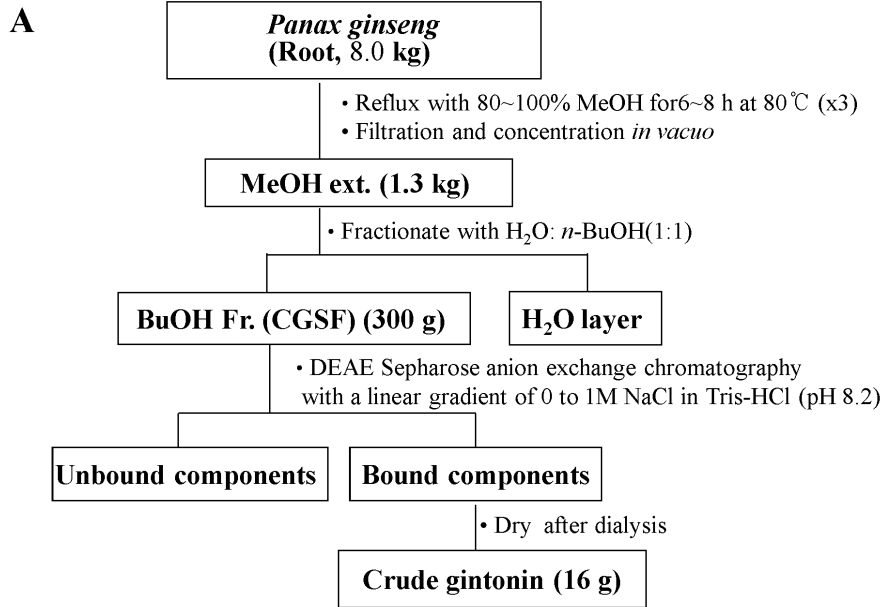
[0080] 그 결과, 조진토닌을 처리한 군에서는 -80 mV 지지전위에서 내향성 Cl⁻ 전류를 유도하였다(도 1B, 도 2B 및 도 3B 참조).

[0081]

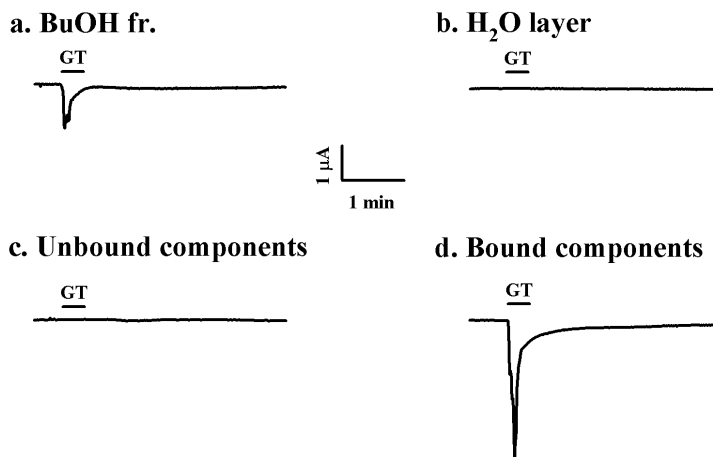
이상, 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1

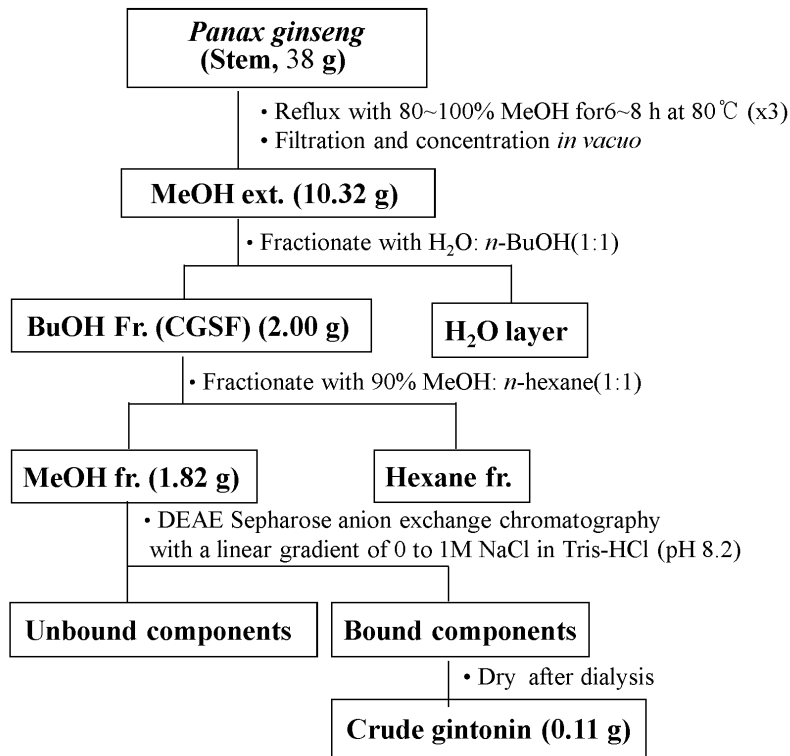


B

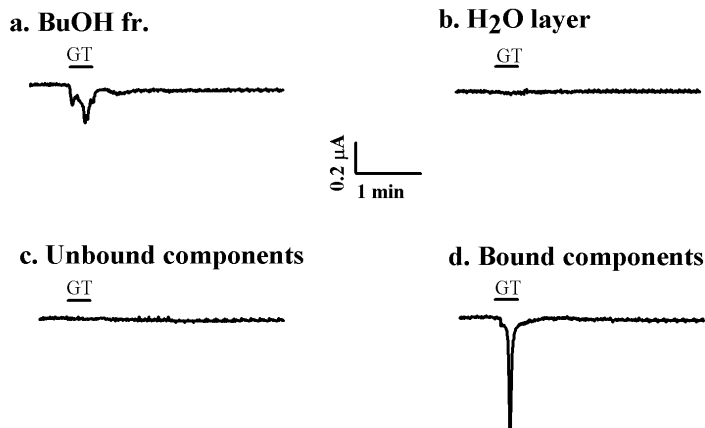


도면2

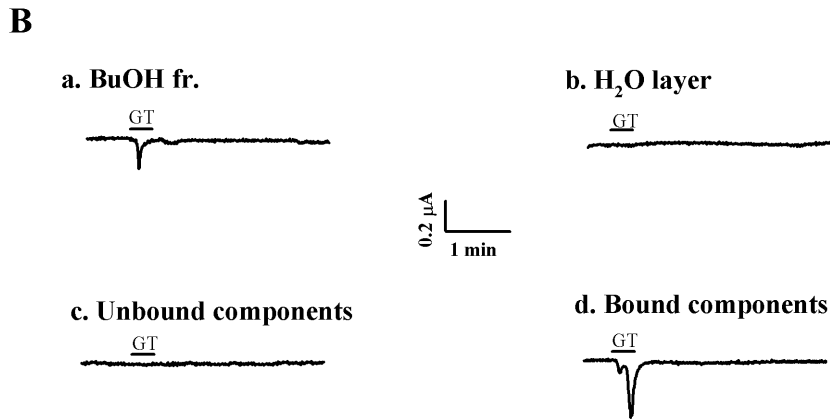
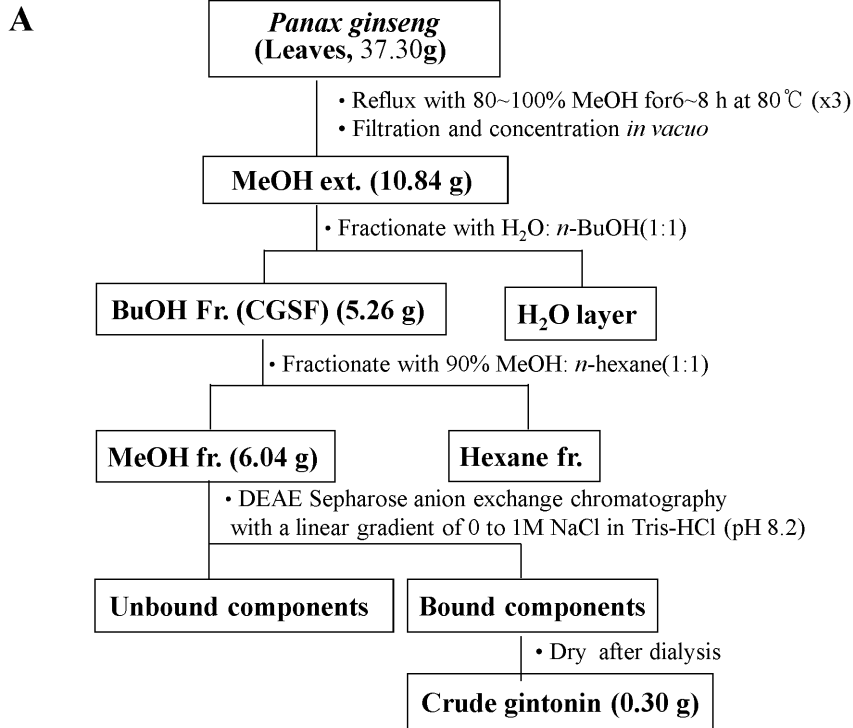
A



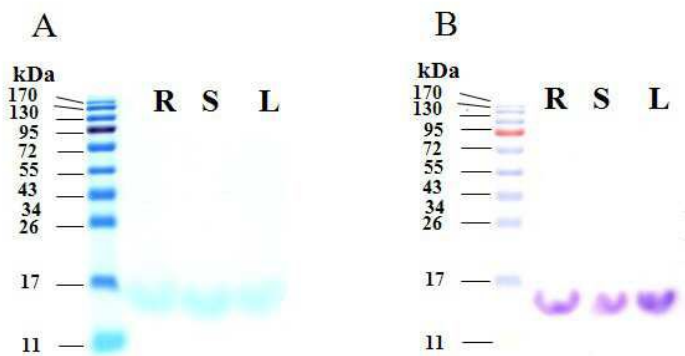
B



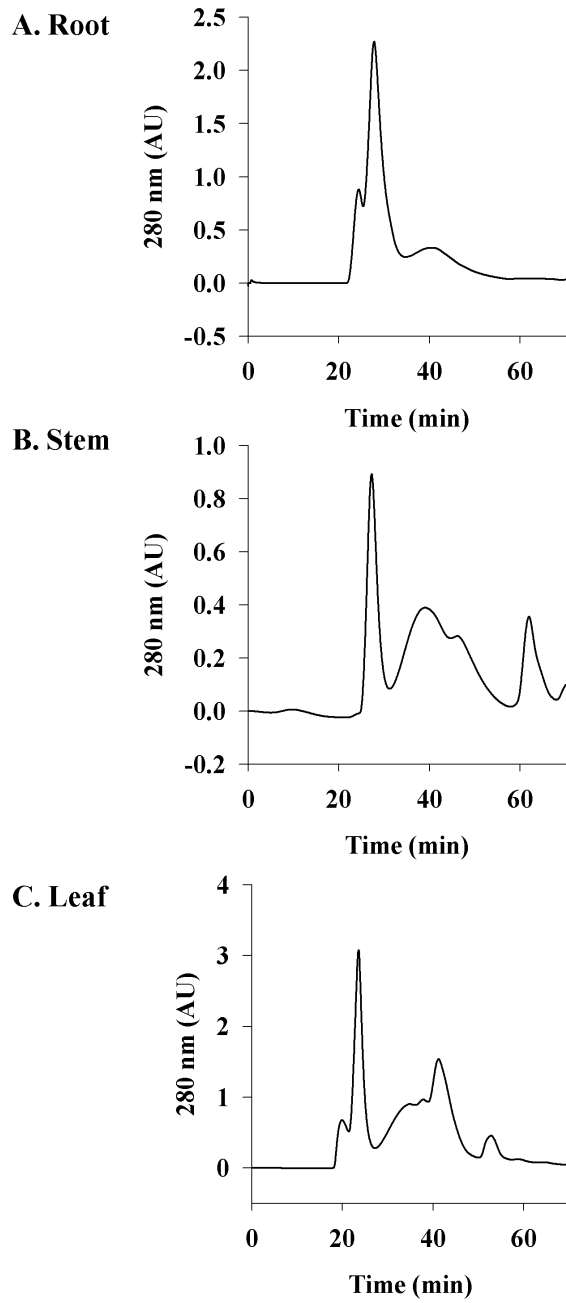
도면3



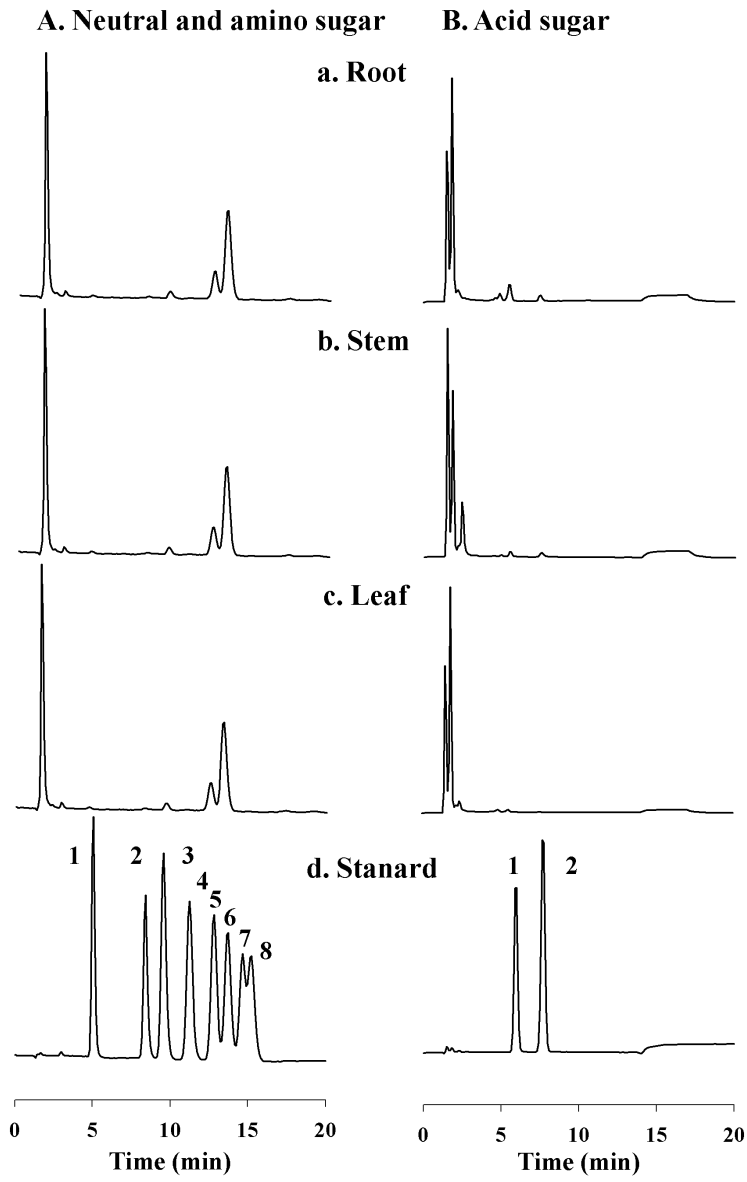
도면4



도면5



도면6



도면7

