

β -Glucosidase 생산 유산균주의 분리와 이를 이용한 팽화홍삼 추출액의 생물전환

심건섭¹ · 박귀근² · 박영서^{2*}

¹(주)그린바이오, ²가천대학교 식품생물공학과

Bioconversion of Puffed Red Ginseng Extract Using β -Glucosidase-producing Lactic Acid Bacteria

Kun-Sub Shim¹, Gwi-Gun Park², and Young-Seo Park^{2*}

¹Greenbio Co., Ltd.

²Department of Food Science and Biotechnology, Gachon University

Abstract

Lactic acid bacteria producing high levels of β -glucosidase were screened to convert the major ginsenosides into the minor ginsenosides in puffed red ginseng. A strain named YLB 8 isolated from doenjang showed the highest β -glucosidase activity and was identified as *Leuconostoc mesenteroides*. The optimum conditions for the maximum production of β -glucosidase, when *L. mesenteroides* YLB 8 was cultured in MRS medium, were as follows; glucose concentration of 1% (w/v), initial pH 8.0, culture temperature of 30°C, culture time of 16 h. When Puffed red ginseng extract was bioconverted using *L. mesenteroides* YLB 8, the optimum temperature and the concentration of Puffed red ginseng extract was 30°C and 12°Bx, respectively. As a result of bioconversion, the major ginsenosides Rb1 and Rb2 were converted into minor ginsenoside Rg3, and Re was converted into Rg3 and successively into Rh1 and Rh2 in part.

Key words: puffed red ginseng extract, bioconversion, β -glucosidase, lactic acid bacteria

서 론

인삼의 화학성분 함량은 일반적으로 사포닌이 3-6%(프로토파낙사다이올계 24 종, 프로토파낙사트리올계 사포닌 11 종, 올레아놀린산계 사포닌 1 종), 합질소화합물이 12-16%(단백질, 아미노산, 펩타이드, 핵산, 알칼로이드), 지용성 성분이 1-2%(지질, 지방산, 정유성분, 테페노이드, 폴리 아세틸렌 페놀화합물 등), 비타민이 0.05%, 탄수화물 60-70%, 회분 4-6% 등으로 이루어져 있다(Kim et al., 1987). 전통적인 홍삼의 제조공정은 수삼을 세척, 선별, 증자(90-100°C), 1 차 건조(수분함량 35-40%), 저장 숙성, 2 차 건조(수분함량 16% 내외), 정형을 거치면서 저장성의 향상과 더불어 특히 증자 열처리할 때 성분의 화학적 변화가 일어나 수삼이나 백삼에 존재하지 않는 새로운 생리활성물질의 생성과 기존 물질의 함량이 증가한다고 알려져 있다(Kim

et al., 1987).

사포닌의 화학구조는 크게 당부분(glycone)과 비당부분(aglycone)으로 구성된 배당체이며, 사포닌이 체내에서 흡수될 때는 사람의 장내에 있는 특유 미생물에 의해 분해되어 체내로 흡수된다(Kanaoka et al., 1994; Wakabayashi et al., 1997a; Wakabayashi et al. 1997b; Bae et al., 2000; Bae et al., 2002). 그러나 인삼 사포닌을 분해하는 장내 미생물은 사람의 체질에 따라 그리고 식습관 따라 그 존재의 유무와 보유하고 있는 정도가 다르며, 그로 인해 인삼의 복용 후 저마다 효능의 차이가 나타날 수 있는데 어떤 사람은 사포닌 중 diol 형태만을, 어떤 사람은 triol 형태만을, 어떤 사람은 전혀 흡수를 하지 못하는 것으로 알려져 있다(Wakabayashi et al., 1997a; Wakabayashi et al., 1997b; Hasegawa et al., 2000a; Hasegawa et al., 2000b).

최근 들어 인삼 사포닌 성분의 대사에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 가운데, Hasegawa 등(2000a)은 인삼 ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1 등의 주요 ginsenoside가 인체의 소화기관에서 거의 흡수되지 않으며, Rb1 성분의 체내 흡수율은 4.35%에 불과한 것으로 보고하고 있다. 또한 인삼 ginsenoside를 대사시키는 장내 미생물

*Corresponding author: Young-Seo Park, Department of Food Science and Biotechnology, Gachon University, Seongnam 461-701, Korea
Tel: +82-31-750-5378; Fax: +82-31-750-5273
E-mail: ypark@gachon.ac.kr
Received September 9, 2014; revised September 16, 2014; accepted September 17, 2014

을 동정한 결과 한국인의 약 37.5%가 사포닌을 분해할 수 있는 미생물이 존재하지 않는 것으로 보고되었으며, Akao 등(1998)에 의하면 Rb1은 위장에서 거의 흡수되지 않고 compound K의 형태로 대사되어 흡수된다고 보고하였다.

팽화(puffing)기법은 짧은 시간에 높은 온도를 처리함으로써 식품 중에 존재하는 전분의 호화, 단백질의 변성 및 조직화, 저장중 지질의 산패 등을 유발시키는 효소의 불활성화, 자연 발생적인 유해물질의 파괴, 원료성분의 탈취 및 변형과 같은 다양한 품질변화를 일으켜 제품의 품질 향상 및 원료 물질의 추출 효율을 증가시키기 위해 적용되는 기술이다. 홍삼의 팽화처리는 홍삼 고유의 흠뻑을 제거하는데 매우 효과적이며 추출효율을 증대시키기 때문에 일반적인 홍삼추출농축시간을 단축시킴으로써 쓴맛을 줄이는데 매우 효과적이다(Nam, 2005).

따라서 본 연구에서는 팽화홍삼의 ginsenoside를 분해할 수 있는 유용미생물을 탐색 분리한 후 이를 이용하여 팽화홍삼을 발효시킴으로써 홍삼에 다량 존재하는 ginsenoside의 당 부위를 제거하여 흡수가 잘되며 효능이 뛰어나다고 알려진 미량 ginsenoside로 구조를 전환시키고자 하였다.

재료 및 방법

시약

p-Nitrophenyl-β-D-glucopyranoside(pNPG)와 esculin은 Sigma-Aldrich(St. Louise, MO, USA) 제품을 사용하였고, 팽화홍삼 농축액(70°Bx)은 (주)그린바이오(Icheon, Korea)로부터 공급받았다. Ginsenoside의 표준품인 Rb1, Rb2, Rd, Re, F1, Rg1, Rg2, Rg3, Rh1, Rh2, compound K, PPD, PPT는 (주)엠보연구소(Daejeon, Korea)로부터 구입하여 1 μmol(in methanol)의 농도로 제조하여 사용하였다. L-Cystein, RNase A, lysozyme은 Sigma-Aldrich(USA) 제품을 사용하였고, agarose는 Bio-Rad사(Hercules, CA, USA), agarose gel로부터 DNA 단편의 용출에는 Bioneer사(Seoul, Korea)의 AccuPrep® Gel Purification Kit, PCR 산물의 정제에는 Bioneer사의 AccuPrep® PCR Purification Kit를 사용하였다.

배지

유산균의 배양에는 MRS 배지(Difco Co., Detroit, MI, USA)를 사용하였으며, *Bifidobacterium* sp.의 배양에는 RCM(Reinforced clostridial medium, Oxoid, Basingstoke, England) 또는 Eugon 배지(Oxoid, England)를 사용하였다. 고체배지를 제조할 경우에는 액체배지에 agar를 1.5%(w/v)를 첨가하였다.

균주 분리

팽화 홍삼에 존재하는 ginsenosides를 생물전환시킬 수 있는 효소 생산 균주를 분리하기 위한 분리원으로는 신선

과채류와 유아분변 등을 사용하였다. 본 실험에 사용한 신선 과채류는 시중 슈퍼마켓에서 구입하였으며, 구입한 각각의 신선 과채류를 각 변이 2 cm인 정육면체가 되도록 칼로 절단한 후 10 g을 취하여 90 mL의 멸균된 Ringer 용액(Oxoid, Basingstoke, England)에 첨가한 후 homogenizer(HP-93F, Taitec Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 1,000 rpm으로 2분간 파쇄하였다. 파쇄액을 10진 희석법에 의해 10⁹까지 희석한 후 MRS 한천 고체배지에 도말하였으며 37°C에서 3일간 배양하여 균체를 생육시켰다. 유아분변은 1 g을 취하여 10 mL의 멸균된 Ringer 용액(Oxoid)에 첨가한 후 vortex하여 정지한 다음 상등액을 10진 희석법에 의해 10⁹까지 희석한 후 MRS 한천 고체배지에 도말하였다.

균주 1 차 screening

β-Glucosidase 활성을 가지는 균주를 선발하기 위하여 esculin agar법을 응용하여 esculin과 ferric ammonium citrate가 각각 0.5, 1.0%(w/v) 첨가된 esculin MRS agar를 제조한 후 분리원으로부터 분리된 균주의 single colony을 접종하여 black zone을 형성하는 균주를 1 차 선발하였다. Esculin은 균주의 β-glucosidase의 활성에 의해 분해가 이루어지며 이때 생성된 esculetin은 배지성분인 ferric ammonium citrate와 결합하여 배지 주위에 black complex을 형성하게 된다. 따라서 colony 주위에 black zone을 형성하는 균주를 β-glucosidase 활성을 가지는 균주로 판단하였다.

균주 2 차 screening

1 차 선발된 균주의 2 차 screening을 위하여 Kohchi 등(1985)의 방법을 응용하여 β-glucosidase 활성을 측정하였다. 1 차 선발된 균주들을 5 mL의 MRS 배지에 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양액을 13,000×g에서 5분간 원심분리한 다음 배양 상등액을 취하여 세포의 효소 분획으로 하였다. 침전된 세포는 50 mM sodium phosphate 완충용액(pH 7.0)으로 2 회 세척한 후 0.5 mL의 50 mM sodium phosphate 완충용액(pH 7.0)으로 현탁한 다음 초음파 발생기(VC 5510 R-DTM, Branson, Danbury, CT, USA)를 이용하여 200 W로 40 초 동안 초음파를 처리하여 세포를 파쇄하였다. 세포 파쇄액을 13,000×g에서 5 분 동안 원심분리한 후 상등액을 취하여 세포 내 효소 분획으로 하였다. 효소활성 측정은 100 μL의 1 mM pNPG(in 50 mM sodium phosphate 완충용액, pH 7.0)에 100 μL의 효소액을 첨가한 다음 37°C에서 20 분 동안 반응시키고, 0.4 M Na₂CO₃ 용액을 2 mL 첨가하여 넣어 반응을 정지시켰다. 반응액의 흡광도를 405 nm에서 측정하여 표준곡선으로부터 구한 식을 사용하여 효소활성을 계산하였다. 표준 곡선은 *p*-nitrophenol (농도범위: 0.1–1.0 mM)을 사용하여 작성하였고, 효소 1 unit은 주어진 조건에서 분당 1 mM의 *p*-nitrophenol을 유리시키는 효소의 양으로 정하였다.

선정 미생물의 생리학적, 분자유전학적 특성 분석과 균주 동정

(1) 형태학적 생리학적 특성

분리된 균주의 동정은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology에 기초하여 형태학적, 생리학적 특성을 조사하였다. 선정된 균주의 형태학적 특성을 분석하기 위하여 Gram 염색, catalase test, 3% KOH test, motility test를 실시하였다. 균주의 탄소원 이용도를 조사하기 위해서는 API 50CH kit(Biomriux, Marcy l'Etoile, France)를 사용하였다. 광학현미경 촬영은 Macrotec사(Seoul, Korea)의 Biological Microscope E100 현미경과 디지털 카메라(DCM130E digital camera for microscope 1.3 M pixels)를 이용하였고, 주사진자현미경은 서울대학교 농생명과학공동기기원(NICEM) 전자현미경실에서 JSM 5410LV(JEOL, Tokyo, Japan)을 이용하여 촬영하였다. 선정 균주의 생리학적 특성을 조사하기 위하여 포도당을 이용한 gas 생성유무와 포자형성유무, 다양한 환경 조건인 6.5% NaCl, 10°C, 45°C, pH 9.6, pH 4.4의 배지에서 37°C로 24시간 배양한 후 생육을 관찰하였다.

(2) 분자유전학적 특성

선정 균주의 16S rRNA의 유전자를 polymerase chain reaction(PCR)에 의해 cloning하기 위하여 518F(5'-CCAG CAGCCGCGGTAATACG-3')와 800R(5'-TA CCAGGGTA TCTAATCC-3')을 primer로 사용하였다. PCR은 AccuPower® PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 PCR sprint (Hybaid Ltd., London, UK)로 반응시켰다. 균주의 genomic DNA를 분리하여 template DNA로 사용하여 0.1 µg 이하가 되도록 첨가하였으며, primer의 농도는 각각 300 nM이 되도록 첨가하였다. PCR 조건은 94°C에서 2분간 DNA 변성을 하였고 다시 94°C 30 초, 60°C 1 분, 72°C 1 분씩 35 cycle을 수행한 후 72°C에서 7분간 반응시켰다. 얻어진 PCR 산물은 AccuPrep® PCR Purification Kit(Bioneer Co.)를 이용하여 정제하였다.

(3) 16S rRNA 유전자 염기서열 결정과 분석

PCR 산물의 염기서열 결정은 Macrogen사(Seoul, Korea)에 의뢰하여 Applied Biosystems사(Foster City, CA, USA)의 ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit를 사용하여 MJ Reserch사(Reno, NV, USA)의 PTC-225 Peltier Thermal Cycler와 ABI PRISM 3730 XL Analyzer를 이용하였다.

DNA 염기서열의 분석은 InfoMax Inc.(Bethesda, MD, USA)의 Vector NTI Suite 7.1 program을 사용하여 수행하였으며 DNA 염기서열의 homology 분석은 BLASTN online program(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)을 이용하였다. Phylogenetic tree는 MEGA4 program(Center for Evolutionary Functional Genomics, The Biodesign Institute, Tempe, AZ, USA)을 이용하여 작성하였다.

(4) 균주로부터 genomic DNA의 분리

분리 균주의 16S rRNA 염기서열을 이용한 동정을 수행하기 위하여 균주로부터 genomic DNA를 아래와 같이 분리하여 template DNA로 사용하였다. MRS 배지에 균체를 접종한 다음 37°C에서 혐기적 조건으로 하룻밤 정치배양시켰다. 원심분리에 의해 균체를 수확한 후 1 mL의 TEN 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl)으로 세척한 다음 500 µL의 SET 완충용액(20% sucrose, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 50 mM EDTA)에 현탁시켰다. 여기에 50 µL의 lysozyme(60 mg/mL)과 3 µL의 RNase A 용액을 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 200 µL의 TEN 완충용액, 25 µL의 25% SDS를 넣고 조심스럽게 혼합하여 세포를 용해시켰다. 이 반응액에 25 µL의 pronase 용액을 첨가하고 1시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 100 µL의 5 M NaCl을 첨가하였다. 동량의 phenol:chloroform:isoamyl alcohol(25:24:1)을 처리하여 단백질을 제거한 후 동량의 isopropanol을 첨가하여 0°C에서 15분간 정치한 다음 13,500×g에서 원심분리를 15분간 실시하였다. 침전된 DNA는 70% ethanol로 세척한 후 건조시킨 뒤 적당량의 3 차 증류수에 녹여 사용하였다.

(5) Agarose gel 전기영동 및 사진촬영

전기영동 완충용액으로는 0.5 배의 TAE 완충용액(40 mM Tris-acetate, pH 8.0, 1 mM EDTA)을 사용하였으며 0.5 µg/mL의 ethidium bromide를 첨가한 0.8%(w/v)의 agarose 수평 gel을 사용하여 시료의 1/10 배량의 10×gel loading 완충용액(0.25% bromophenol blue, 40%(w/v) sucrose)을 가한 DNA 용액을 100 V에서 30-40분간 전기영동한 후 254 nm 파장의 자외선 조명하에서 관찰하였다. 사진촬영은 UV-filter와 orange filter가 장착된 디지털카메라(Olympus C4040Z, Tokyo, Japan)를 이용하였다.

(6) Agarose gel로부터 DNA 단편의 회수

Agarose gel 전기영동을 실시한 후 gel로부터 DNA 단편을 회수하기 위하여 Bioneer사의 Agarose Gel Purification Kit를 사용하여 제조사의 manual에 따라 수행하였다.

생물전환 산물의 TLC 분석

0.22 µm PVDF membrane filter로 여과하여 멸균한 홍삼 추출물(1%, w/v)을 첨가한 MRS 배지에 2 차 선별된 균주 중에서 β-glucosidase 활성이 우수한 균주의 종배양액을 5%(v/v) 접종하여 37°C에서 3일간 배양하였다. 배양액을 8,000×g에서 5분간 원심분리한 후 배양 상등액 3 mL를 취하여 수포화 *n*-butanol로 2분간 추출하였다. 추출액은 진공 농축기를 사용하여 농축시킨 후 methanol에 용해하여 TLC 분석을 위한 시료로 사용하였다. 시료는 TLC plate에 0.7 cm 간격으로 1 cm 점적하여 CHCl₃:CH₃OH:H₂O(65:35:10, v/v/v)

용매로 전개한 후 10% H₂SO₄를 분무하고 5분간 가열건조하여 발색시켜 spot을 확인하였다.

환원당 함량 측정

생물전환 산물의 환원당 함량은 Somogyi-Nelson의 방법으로 측정하였다. 일정 농도로 희석된 발효액 0.5 mL에 0.4 mL의 alkaline copper reagent를 첨가한 후 100°C에서 10분간 가열한 다음 찬물로 냉각하였다. 0.4 mL의 Nelson's reagent를 첨가한 후 2.6 mL의 증류수를 첨가한 다음 520 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 환원당 함량은 0-1.0 mol의 D-glucose로 작성한 표준곡선을 이용하여 흡광도를 mol로 환산하여 구하였다.

미생물 생균수 측정

시료의 유산균 생균수는 표준한천배양법으로 측정하였으며, 시료를 0.9%(w/v) NaCl 용액을 이용하여 10⁹까지 십진 희석하여 고체배지에 1 mL씩 분주하였다. 시료를 25 mL의 MRS agar 배지에 1 mL씩 분주한 후 37°C에서 24-72시간 배양하였다. 배양 후 colony 수가 100-300 개인 평판을 택하여 colony 수를 측정하고 희석배수를 곱하여 단위부피당 생균수(CFU/mL)를 산출하였다.

결과 및 고찰

팽화 홍삼 ginsenoside의 생물전환 효소 생산 균주의 탐색과 선정

팽화 홍삼에 존재하는 ginsenoside를 생물전환할 수 있는 균주를 탐색하기 위하여 대표적인 생물전환효소인 β-glucosidase를 생산하는 균주를 신선 과채류 등으로부터 탐색하였다. 균주의 1차 screening은 esculin agar법을 이용하였으며, 신선 과채류 등으로부터 분리한 213주의 균주에 대한 β-glucosidase 생산 여부를 조사하였다. Esculin agar 배지에서 생육한 colony 주위에 black zone이 형성되면 β-glucosidase 생산이 가능한 후보 균주로 1차 선정하였고, 이들 균주들을 대상으로 pNPG를 기질로 이용하여 β-glucosidase 효소 활성을 측정함으로써 2차 선별을 수행하

였다. 그 결과 대부분의 colony들이 esculin agar 배지에서 black zone을 형성하였으나 black zone을 형성한 colony들 중에서 상당수가 β-glucosidase 활성을 나타내지 않았다(결과 미제시). 한편 균체를 배양한 후 세포를 파쇄한 세포 내 효소분획과 배양 상등액인 세포 외 효소분획의 β-glucosidase 활성을 측정한 결과 세포 외 효소분획에서는 β-glucosidase 활성이 측정되지 않았다. Esculin agar 배지에서 black zone을 크게 나타내는 48균주를 선정하여 균주의 세포 내 효소분획의 β-glucosidase 활성을 조사한 결과 유아분변 유래의 IF 5-29와 IF 5-35에서 97.9 AU/mL의 높은 활성을 나타내었으며 유아분변 유래의 IF 5-20과 된장 유래의 YLB 8 균주도 95.7 AU/mL의 높은 활성을 나타내었으며 유아분변 유래의 IF 5-17과 IF 5-38, 양파 유래의 ON 179 균주도 92.4 AU/mL의 비교적 높은 활성을 보여주었다(결과 미제시). β-Glucosidase 활성이 우수한 균주 중에서 IF 5-17, IF 5-20, IF 5-29, IF 5-35, IF 5-38, YLB 8, ON 179 균주 등 7균주를 선정하여 팽화홍삼 농축액을 14°Bx가 되도록 희석한 희석액에 접종한 후 30°C에서 20시간 배양한 다음 세포 내 효소분획의 β-glucosidase 활성과 세포의 생육도 및 비활성을 측정하였다. 그 결과 Table 1에 나타난 바와 같이 β-glucosidase 활성은 YLB 8이 140.8 AU/mL으로 가장 높았으며 그 다음으로 ON 179와 IF 5-38의 순으로 높았다. 생균수의 경우 YLB 8이 8.89 Log CFU/mL로 가장 높았고 그 다음으로 IF-5-35, IF 5-17의 순으로 높았다. 효소의 비활성을 계산한 결과 IF 5-29가 16.3 AU/Log CFU로 가장 높았고 그 다음으로 ON179와 YLB 8, IF 5-38이 각각 15.9, 15.8, 15.7 AU/Log CFU으로 높았다. 효소의 비활성은 IF 5-29가 가장 좋았지만 효소활성과 생육도가 ON179나 YLB 8과 비교하여 낮았기 때문에 팽화홍삼의 생물전환에는 적합하지 않은 것으로 판단되었다. 팽화홍삼 추출액의 희석액을 배지로 하여 효소활성과 생육도를 측정한 본 결과로부터 팽화홍삼에 존재하는 영양성분만을 이용하여 높은 효소활성과 생육도를 나타내는 YLB 8이 팽화홍삼추출액의 생물전환에 가장 적합할 것으로 판단되어 본 연구의 최종 균주로 선정하였다.

Table 1. β-Glucosidase activity and viable cell number of selected strains on the puffed red ginseng extract diluted with d-H₂O to make 14°Bx

Strain	β-Glucosidase activity (AU/mL)	Viable cell number (Log CFU/mL)	Specific β-glucosidase activity (AU/Log CFU)
IF 5-17	101.2±1.54 ^{D1)}	8.28±0.22 ^B	12.2
IF 5-20	96.8±0.66 ^E	6.34±0.14 ^E	15.3
IF 5-29	112.2±1.54 ^C	6.89±0.27 ^D	16.3
IF 5-35	103.4±0.99 ^D	8.87±0.18 ^A	11.7
IF 5-38	119.9±1.76 ^C	7.62±0.10 ^C	15.7
ON 179	127.6±1.43 ^B	8.02±0.27 ^B	15.9
YLB 8	140.8±2.31 ^A	8.89±0.18 ^A	15.8

¹⁾Means with different superscript are significantly different at p < 0.05.

Table 2. Morphological and physiological characteristics of strain YLB 8

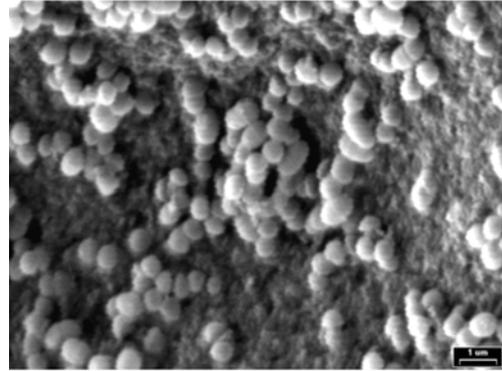
Form	Spherical, pair
Gram stain	+
3% KOH test	-
Motility	-
Spore stain	-
Catalase test	-
Gelatinase test	-
Gas production from glucose	+
Growth	
Facultative anaerobic	+
pH 4.4	+
pH 9.6	+
10°C	+
45°C	+
6.5% NaCl	+

선정 균주의 특성과 동정

상기 실험을 통하여 된장으로부터 분리한 YLB 8균주를 생물전환을 위한 가장 적합한 균주로 최종 선정하고 균주의 동정을 실시하였다. 균주의 동정을 위하여 형태학적, 생리학적 특성을 관찰한 결과는 Table 2에 나타내었다. YLB 8 균주는 Gram 염색과 3% KOH test를 통하여 Gram 양성세균임을 확인하였다. 또한 운동성이 없으며 catalase test에서 음성 반응을 나타내었다. 포자염색에서는 음성반응으로 나타나 무포자균으로 확인되어 전형적인 유산균의 형태적, 생리학적 특징을 지니고 있었다. 또한 YLB 8 균주는 포도당을 이용하여 gas를 생성하여 이상유산발효(hetero lactic acid fermentation)를 하는 것으로 확인되었고, 통성 혐기성이며 pH 4.4와 9.6에서 생육이 가능하였으며 10°C와 45°C, 6.5%의 NaCl 존재 하에서 생육이 가능하였다. 한편 본 균주는 주사전자현미경(Fig. 1)을 이용하여 관찰한 결과 직경 1 µm 이하의 쌍구균으로 관찰되었다.

한편 균주의 생리학적 특성을 보기 위하여 Biomriux의 API 50CHL Kit를 이용하여 탄소원 이용성을 조사하였으며 그 결과를 Table 3에 나타내었다. YLB 8은 L-arabinose, D-ribose, D-xylose, D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, D-cellobiose, D-maltose, D-melibiose, D-saccharose, D-trehalose, D-raffinose 등을 탄소원으로 이용하여 산을 생성할 수 있었으며, glycerol, erythritol, D-arabinose, L-rhamnose, D-mannitol, D-sorbitol, xylitol, D-fucose 등을 이용하지 못하였다. Table 3의 결과를 API database를 이용하여 동정을 실시한 결과 YLB 8은 *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum*으로 동정되었으며 identity는 99.9%로 계산되었다.

선정된 YLB 8 균주에 대한 분자유전학적 특성에 의한 동정을 위해 16S rRNA 유전자의 염기서열을 결정된 후 분석을 수행하였다. YLB 8 균주의 16S rRNA 유전자의 염기

**Fig. 1. Scanning electron microscopy of strain YLB 8 (×10,000).****Table 3. Carbon source utilization of strain YLB 8 by API 50CHL kit**

Carbohydrate	Reaction	Carbohydrate	Reaction
Glycerol	- ¹⁾	Salicin	+
Erythritol	-	D-Cellobiose	-
D-Arabinose	-	D-Maltose	+
L-Arabinose	+	D-Lactose (bovine origin)	-
D-Ribose	+	D-Melibiose	+
D-Xylose	+	D-Saccharose (sucrose)	+
L-Xylose	-	D-Trehalose	+
D-Adonitol	-	Inulin	-
Methyl-β-D-xylopyranoside	-	D-Melezitose	-
D-Galactose	+	D-Raffinose	+
D-Glucose	+	Amidon (starch)	-
D-Fructose	+	Glycogen	-
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	-	Gentiobiose	-
L-Rhamnose	-	D-Turanose	+
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	-
D-Mannitol	-	D-Fucose	-
D-Sorbitol	-	L-Fucose	-
Methyl-α-D-mannopyranoside	-	D-Arabitol	-
Methyl-α-D-glucopyranoside	+	L-Arabitol	-
N-Acetyl glucosamine	+	Potassium gluconate	-
Amygdalin	-	Potassium 2-ketogluconate	-
Arbutin	-	Potassium 5-ketogluconate	-
Esculin ferric citrate	+		

¹⁾+: positive, -: negative

배열순서를 BLAST의 16S rRNA 유전자 염기배열순서의 database를 이용하여 조사한 결과 *Leuconostoc mesenteroides* IMAU:10232(accession no. GU138560.1), *Leuconostoc*

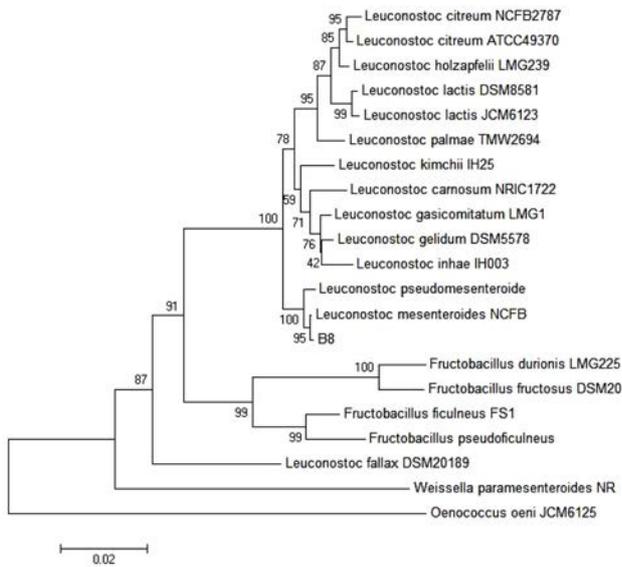


Fig. 2. Dendrogram of 16S rRNA gene from strain YLB 8.

mesenteroides strain PC13(accession no. EF579730.1), *Leuconostoc mesenteroides* strain kimchi001(accession no. FJ655776.1)의 16S ribosomal RNA 유전자 염기서열과 각각 99%의 identity를 나타내었다. YLB8 균주의 16S rRNA 유전자의 염기배열순서를 BLAST의 16S rRNA 유전자 염기배열순서의 database를 이용하여 phylogenetic tree를 작성한 결과 *Leuconostoc mesenteroides*와 가장 유사성이 높은 것으로 확인되었다(Fig. 2). 이상의 형태학적, 생리학적, 분자유전학적 동정 결과로부터 YLB 8을 *Leuconostoc mesenteroides*로 동정하였다.

현재까지 β-glucosidase를 생산하는 유산균으로는 *Lactobacillus casei*(Coulon et al. 1998)와 *Lactobacillus brevis*(Michlmayr et al. 2010)가 세포내 효소로, *Lactobacillus plantarum*이 세포외 효소로(Sestelo et al. 2004) 생산하는 것으로 보고되고 있으며, *Lactobacillus brevis*가 생산하는 β-glucosidase는 *Oenococcus oeni*(Endo & Okada, 2006)가 생산하는 β-glucosidase와 아미노산 서열이 매우 유사한 것으로 분석된 바 있다.

생물전환 균주의 최적 배양 조건

팽화 홍삼 ginsenoside의 생물전환을 위해 선정된 *L. mesenteroides* YLB 8 균주의 최적 배양조건을 조사하였다. *L. mesenteroides* YLB 8 균주를 MRS에서 배양하면서 생육도와 β-glucosidase 활성을 측정하여 Fig. 3에 나타내었다. 세포는 배양 8시간까지 대수증식한 후 이후 일정한 균수를 유지하였다. β-Glucosidase 활성은 배양 초기부터 16시간까지 급격히 증가한 다음 28시간까지 지속적으로 감소하는 것으로 나타나 β-glucosidase 활성의 최대값은 배양 16시간째에 나타남을 확인하였다.

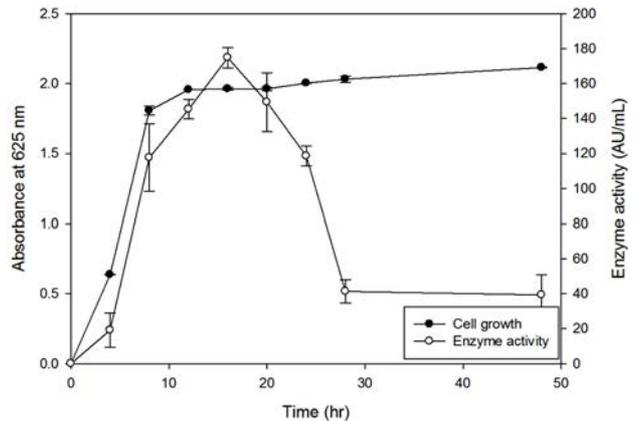


Fig. 3. Time course of the cell growth and the β-glucosidase activity of *L. mesenteroides* YLB 8 in MRS broth.

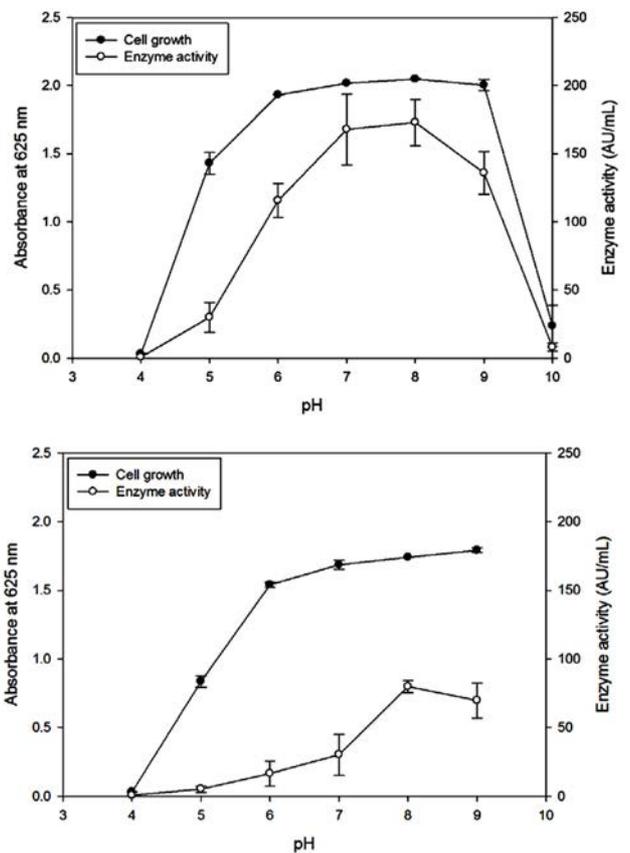


Fig. 4. Effect of initial pH on the cell growth and the β-glucosidase activity of *L. mesenteroides* YLB 8 during cultured in MRS broth (upper panel: at 30°C, lower panel: at 37°C).

L. mesenteroides YLB 8 균주를 MRS 배지에서 30°C와 37°C에서 배양할 경우 배지의 초기 pH에 따른 생육도와 β-glucosidase 활성을 측정하였다(Fig. 4). *L. mesenteroides* YLB 8을 30°C에서 배양하였을 경우 초기 pH 4와 10에서는 균의 생육이 거의 관찰되지 않았으며, pH 6-9에서 균

의 생육도가 높음을 알 수 있었다(Fig. 4, upper panel). β -Glucosidase 활성도 균의 생육 패턴과 동일하게 나타나 초기 pH 7-8에서 가장 높은 활성을 나타내었다. *L. mesenteroides* YLB 8을 37°C에서 배양하였을 경우 초기 pH가 증가함에 따라 균의 생육도와 효소활성이 증가하여 pH 8에서 가장 높은 효소활성을 나타내었다(Fig. 4, lower panel). 본 연구 결과는 Gueguen 등(1997)이 *L. mesenteroides* 균주의 효소 활성을 위한 최적 pH가 7-8이라고 보고한 것과 일치하였으나, Romero-Segura 등(2009)이 β -glucosidase의 효소활성을 위한 최적 pH가 5.5라고 한 것이나 Ng 등(2010)의 최적 pH는 5라는 보고와는 상이하였다.

L. mesenteroides YLB 8 균주를 MRS 배지에서 배양하면서 배양온도에 따른 생육도와 효소활성을 측정한 결과 Fig. 5(upper panel)와 같이 30°C에서 배양하였을 경우 균의 생육도와 효소활성이 최대값을 나타내었다. 배양 온도를 30°C 이상으로 하였을 경우에는 생육도와 효소 활성이 급격히 감소하여 50°C에서는 생육과 효소활성이 소실됨을 알 수 있었다. 한편 MRS 배지에 glucose를 여러 농도로 첨가한 후 *L. mesenteroides* YLB 8 균주의 생육과 β -glucosidase

활성을 측정한 결과 Fig. 5(lower panel)에 나타난 바와 같이 glucose 농도가 1%(w/v)까지 증가함에 따라 생육과 효소활성이 증가하였으며 균의 생육은 glucose 1%(w/v) 이상에서도 일정한 값을 유지한 반면, 효소활성은 glucose 1% 이상에서는 감소하는 경향을 나타내었다. 이상의 결과로부터 *L. mesenteroides* YLB 8을 MRS 배지에서 배양하였을 경우 최대의 β -glucosidase 효소 활성을 나타내기 위한 최적 배양 조건은 glucose 첨가량 1%(w/v), 초기 pH 8.0, 배양 온도 30°C, 배양시간 16시간인 것으로 확립하였다.

일부 연구자들이 빵 반죽으로부터 β -glucosidase를 생산하는 *Leuconostoc mesenteroides*에 대하여 보고한 바 있으나(Zotta et al., 2007) 된장으로부터 분리된 *Leuconostoc mesenteroides*로부터 β -glucosidase를 생산하는 것에 대한 연구는 본 보에서 처음으로 보고하는 것이다.

선정 균주를 이용한 생물전환공정의 최적화

팽화홍삼 추출액을 이용하여 홍삼 내에 존재하는 ginsenoside의 생물전환 최적화를 위하여 MRS에 첨가되는 팽화홍삼 추출액의 최적 농도를 결정하고자 하였다. 이를 위하여 팽화홍삼 추출액을 여러 농도로 MRS 배지에 첨가한 후 선정 균주인 *L. mesenteroides* YLB 8 균주를 배양하여 생균수와 배양액의 환원당 함량을 측정하였다. 그 결과 생균수는 팽화홍삼 추출액의 농도가 증가할수록 증가하는 경향을 나타내었으며 12°Bx에서 가장 높은 생균수를 보여주었다(Fig. 6, upper panel). 환원당 함량도 홍삼 추출액의 농도가 증가함에 따라 증가하는 경향을 나타내었으며(Fig. 6, middle panel), 배양액의 pH도 홍삼 추출액의 농도가 증가할수록 증가함을 알 수 있었다(Fig. 6, lower panel). 이상의 결과로부터 팽화홍삼 추출액을 이용하여 홍삼 내에 존재하는 ginsenoside를 생물전환하기 위한 배지 조건으로는 MRS에 팽화홍삼 추출액을 14°Bx가 되도록 첨가하는 것이 적합한 것으로 확인되었다.

생물전환 온도에 따른 배양액의 pH, 환원당 함량, 생균수를 조사한 결과, 배양액의 pH는 40°C에서 4.27로 가장 높은 값을 나타내었으며, *L. mesenteroides* YLB 8의 생균수는 30°C에서 4.7×10^8 CFU/mL로 가장 높았다. 환원당의 경우에는 35°C에서 가장 낮은 환원당 함량을 나타내었다(Table 4). 이상의 결과로부터 균주의 생육도와 환원당 함량 등을 고려하여 생물전환을 위한 최적온도는 30°C로 결정하였다.

최적조건에서의 생물전환

본 연구에서 선정한 생물전환균주인 *L. mesenteroides* YLB 8을 이용하여 팽화 홍삼을 최적조건에서 발효시킴으로써 팽화홍삼에 존재하는 ginsenoside의 생물전환산물을 TLC를 사용하여 확인하였다. YLB8을 최적조건에서 3일간 배양한 후 배양 전후의 배양액을 이용하여 TLC를 실시한

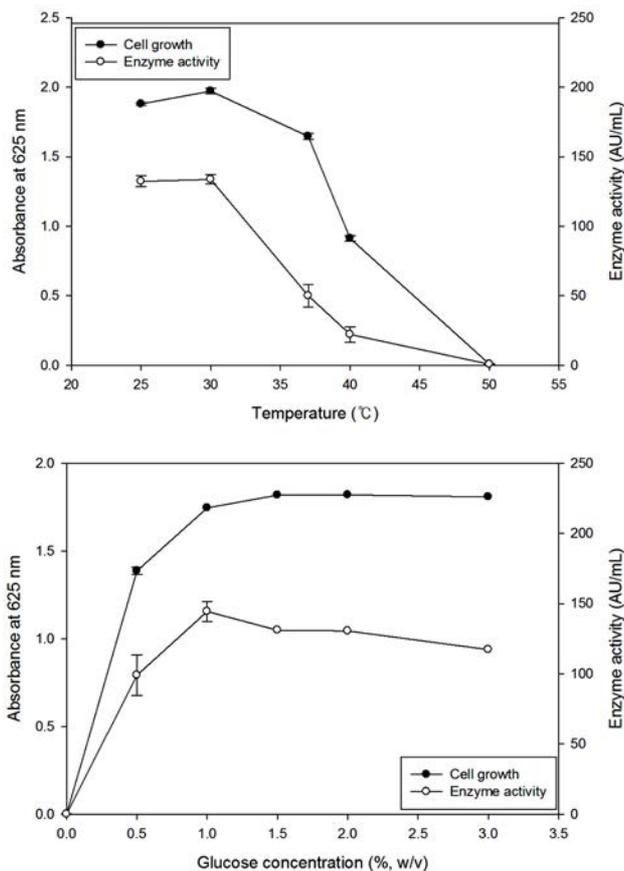


Fig. 5. Effect of fermentation temperature and glucose concentration on the cell growth and the β -glucosidase activity of *L. mesenteroides* YLB 8 during cultured in MRS broth (upper panel: temperature, lower panel: glucose concentration).

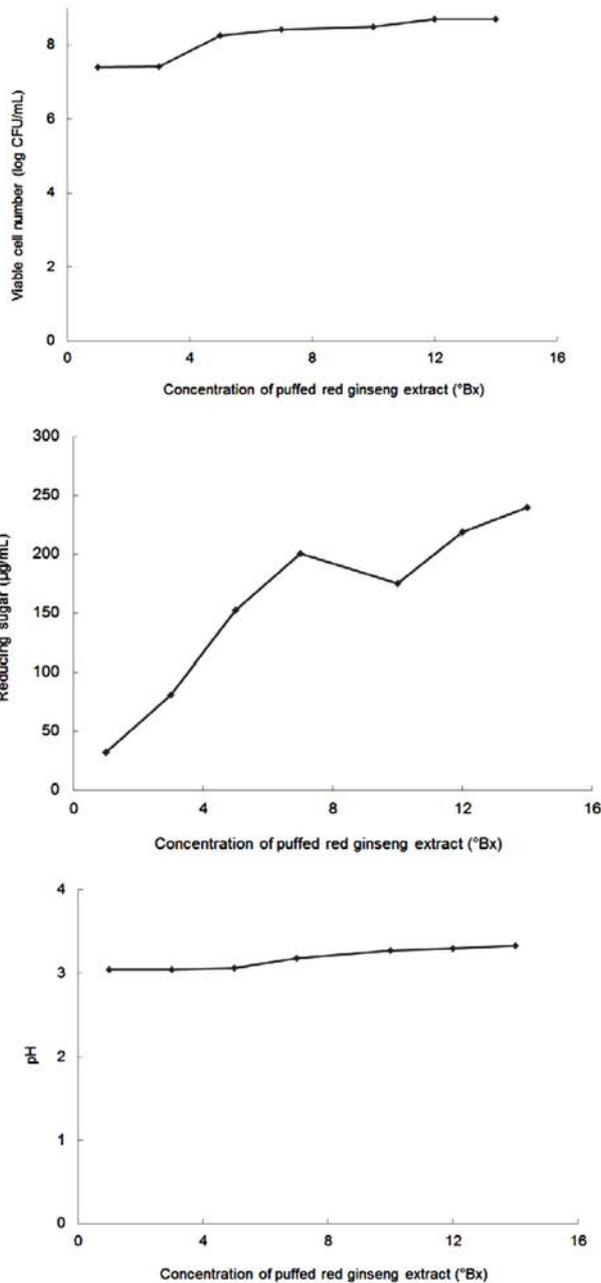


Fig. 6. Effect of concentration of puffed red ginseng extract on the viable cell number (upper panel), reducing sugar content (middle panel), and pH (lower panel) of fermented broth.

결과 Fig. 7에서와 같이 생물전환에 의해 Rb1과 Rb2가 약간 감소하고 Re가 상당한 수준으로 감소한 반면, Rg1, Rg2, Rg3의 함량이 증가함을 알 수 있었다. 또한 생물전환하기 전에는 존재하지 않았던 Rh1과 Rh2도 미량 생성된 것을 확인할 수 있었다.

여러 연구자들의 ginsenoside 대사경로에 관한 연구 결과를 보면, ginsenoside Rb1이나 Rb2는 glucose 또는 arabinose 잔기가 β-glucosidase 등의 효소작용에 의해 제거

Table 4. Effect of bioconversion temperature on the pH, reducing sugar content and viable cell number

Strain	Bioconversion temperature (°C)	pH	Reducing sugar (mM)	Viable cell number (CFU/mL)
YLB 8	30	3.90	279.81	4.7×10 ⁸
	35	3.87	261.27	8.0×10 ⁷
	40	4.27	282.34	ND

¹⁾ND: not determined

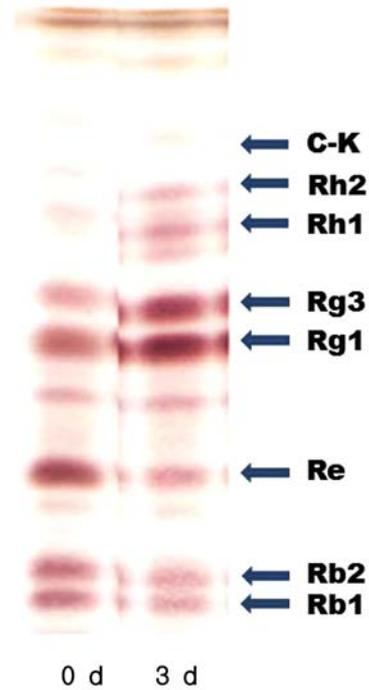


Fig. 7. Thin layer chromatogram of ginsenosides in *L. mesenteroides* YLB 8 culture at optimum bioconversion condition.

되어 Rd로 전환되고, Rd는 추가적인 glucose 잔기의 제거에 의해 Rg3로 전환된다고 보고하고 있다. 또한 Re는 rhamnose 잔기가 제거될 경우 Rg1으로 전환되고 추가적인 glucose 잔기의 제거에 의해 Rh1으로 제거되며, Rg2는 rhamnose 잔기가 제거에 의해 Rh1으로 전환된다고 하였다 (Tawab et al., 2003; Ko et al., 2007; Ng et al., 2010; Zhao et al., 2012; Park et al., 2013).

본 연구결과 팽화홍삼의 ginsenoside를 *L. mesenteroides* YLB 8로 생물전환하였을 경우 Rb1의 3번 위치와 20번 위치에 존재하는 glucose가 제거되고, 또한 Rb2의 3번 위치와 20번 위치에 존재하는 glucose와 arabinose가 제거되어 Rd를 경우하여 Rg3로 전환되었으며, Re의 6번 위치에 존재하는 rhanose가 제거되어 Rg1으로 전환되고 Re의 20번 위치에 존재하는 glucose가 제거되어 Rg2로 전환되었으며, 이중 일부가 glucose 잔기의 추가적인 제거에 의해 Rh1 또는 Rh2로 전환되었다고 판단된다.

요 약

팽화홍삼에 존재하는 major ginsenoside를 minor ginsenoside로 생물전환하기 위하여 β -glucosidase 활성이 높은 유산균주를 탐색하였다. 된장으로부터 분리한 YLB 8 균주가 β -glucosidase 활성이 가장 높았으며 *Leuconostoc mesenteroides*로 동정되었다. *L. mesenteroides* YLB 8을 MRS 배지에서 배양하였을 경우 최대의 β -glucosidase 효소 활성을 나타내기 위한 최적 배양 조건은 glucose 첨가량 1%(w/v), 초기 pH 8.0, 배양온도 30°C, 배양시간 16시간이었다. *L. mesenteroides* YLB 8을 이용하여 팽화홍삼 추출액을 생물전환하였을 경우 최적 온도는 30°C였으며, 팽화홍삼 추출액의 농도는 12°Bx이었다. 팽화홍삼 추출액 내에 존재하는 major ginsenoside인 Rb1과 Rb2는 minor ginsenoside인 Rg3로 전환되었으며, Re는 Rg1으로 전환되었으며, 이 중 일부는 Rh1과 Rh2로 전환되었다.

감사의 글

본 연구는 2010년도 중소기업청에서 시행한 중소기업기 술혁신개발사업의 지원으로 수행되었습니다.

References

- Akao T, Kida H, Kanaoka M, Hattori M, Kobashi K. 1998. Intestinal bacterial hydrolysis is required for the appearance of compound K in rat plasma after oral administration of ginsenoside Rb1 from *Panax ginseng*. *J. Pharm. Pharmacol.* 50:1155-1160.
- Bae EA, Park SY, Kim DH. 2000. Constitutive β -glucosidases hydrolyzing ginsenoside Rb1 and Rb2 from human intestinal bacteria. *Biol. Pharm. Bull.* 23: 1481-1485.
- 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: 58-63.
- Coulon S, Chemardin P, Gueguen Y, Arnaud A, Galzy P. 1998. Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Appl. Biochem. Biotechnol. A.* 1998; 105-114.
- Endo A, Okada S. 2006. *Oenococcus kitaharae* sp. nov., a non-acidophilic and non-malolactic-fermenting oenococcus isolated from a composting distilled shochu residue. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2345-2348.
- Gueguen Y, Chemardin P, Labrot P, Arnaud A, Galzy P. 1997. Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from a new strain of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from cassava. *J. Appl. Microbiol.* 82: 469-476.
- Hasegawa H, Lee KS, Nagaoka T, Tezuka Y, Uchiyama M, Kadota S, Saiki I. 2000a. Pharmacokinetics of ginsenoside deglycosylated by intestinal bacteria and its transformation to biologically active fatty acid esters. *Biol. Pharm. Bull.* 23: 298-304.
- Hasegawa H, Suzuki R, Nagaoka T, Tezuka Y, Kadota, S, Saiki I. 2000b. Prevention of growth and metastasis of murine melanoma through enhanced natural-killer cytotoxicity by fatty acid conjugate of protopanaxatriol. *Biol. Pharm. Bull.* 25: 861-866.
- Kanaoka M, Akao T, Kobashi K. 1994. Metabolism of ginseng saponins, ginsenosides, by human intestinal bacteria. *J. Tradit. Med.* 11: 241-245.
- Kim MW, Ko SR, Choi KJ, Kim SC. 1987. Distribution of saponin in various sections of *Panax ginseng* root and changes of its contents according to root age. *Korean J. Ginseng Sci.* 11: 10-16.
- Ko SR, Suzuki Y, Suzuki K, Choi KJ, Cho BG. 2007. Marked production of ginsenosides Rd, F2, Rg3, and compound K by enzymatic method. *Chem. Pharm. Bull.* 55: 1522-1527.
- Michlmayr H, Schuemann C, Barreira Braz da Silva N, Kulbe KD, del Hierro AM. 2010. Isolation and basic characterization of a β -glucosidase from a strain of *Lactobacillus brevis* isolated from a malolactic starter culture. *J. Appl. Microbiol.* 108: 550-559.
- Nam KY. 2005. The comparative understanding between red ginseng and white ginsengs processed ginsengs (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *J. Ginseng Res.* 29: 1-18.
- Ng IS, Li CW, Chan SP, Chir JL, Chen PT, Tong CG, Yu SM, Ho TH. 2010. High-level production of a thermoacidophilic β -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. *Bioresour. Technol.* 101: 1310-1317.
- Park HR, Ghafoor K, Lee D, Kim S, Kim SH, Park J. 2013. β -Glycosidase-assisted bioconversion of ginsenosides in purified crude saponin and extracts from red ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). *Food Sci. Biotechnol.* 22: 1629-1638.
- Romero-Segura C, Sanz C, Perez AG. 2009. Purification and characterization of an olive fruit β -glucosidase involved in the biosynthesis of virgin olive oil phenolics. *J. Agr. Food Chem.* 57: 7983-7988.
- Sestelo ABF, Poza M, Villa TG. 2004. β -Glucosidase activity in a *Lactobacillus plantarum* wine strain. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 633-637.
- Tawab MA, Bahr U, Karas M, Wurglics M, Schubert-Zsilavecz M. 2003. Degradation of ginsenosides in humans after oral administration. *Drug Metab. Dispos.* 31: 1065-1071.
- Wakabayashi C, Hasegawa H, Murata J, Saiki I. 1997a. *In vivo* antimetastatic action of ginseng protopanaxadiol saponins is based on their intestinal bacterial metabolites after oral administration. *Oncol. Res.* 9: 411-417.
- Wakabayashi C, Hasegawa H, Murata J, Saiki I. 1997b. The expression of *in vivo* anti-metastatic effect of ginseng protopanaxatriol saponins is mediated by their intestinal bacterial metabolites after oral administration. *J. Trad. Med.* 14: 180-185.
- Zhao X, Gao J, Song C, Fang Q, Wang N, Zhao T, Liu D, Zhou Y. 2012. Fungal sensitivity to and enzymatic deglycosylation of ginsenosides. *Phytochemistry* 78: 65-71.
- Zotta T, Ricciardi A, Parente E. 2007. Enzymatic activities of lactic acid bacteria isolated from Cornetto di Matera sourdoughs. *Int. J. Food Microbiol.* 115: 165-172.