

## Ginsenoside 전환이 가능한 인삼 발효 미생물의 선별

김희규 · 김기연 · 차창준\*

중앙대학교 산업과학대학 생명공학과

오래전부터 약재로서 이용되어온 인삼(*Panax ginseng*)은 그 효능이 과학적으로 밝혀지면서 세계적으로 관심의 대상이 되고 있다. 그러나, 서양삼에 비해 점차 뒤쳐지고 있는 우리나라의 인삼산업의 경쟁력 확보를 위해 기능성 식품으로서의 인삼개발이 필요한 실정이다. 발효인삼은 유용한 미생물을 probiotic으로서 공급할 수 있을 뿐만 아니라, 미생물에 의해 인삼의 ginsenoside 성분이 특이적으로 전환되어 기능적으로 우수한 제품이 될 수 있다. 본 연구에서는 인삼분말만을 영양분으로 한 액체 배지에서 청국장에서 분리된 *Bacillus* 균주와 유산균의 성장능 및 인삼의 주요 ginsenoside의 전환능력을 알아보았다. 인삼 2.5% (w/v), 1% (w/v)의 인삼분말만을 영양분으로 한 액체배지에서 성장능과 발효 후 ginsenoside의 전환 여부를 확인하였다. 사용한 *Bacillus* 균주와 유산균 모두 인삼배지에서  $10^7$  CFU/ml을 초과하는 성장능을 보였고, *Bacillus*의 경우 ginsenoside Rg, Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc, Rd 간에 각 균주마다 특이적인 ginsenoside 전환 반응을 보였다. 따라서, 이 균주들은 발효인삼의 제조를 위한 접종균주로서 이용이 가능하리라 사료된다.

**Key words** □ *Bacillus*, biotransformation, ginseng, ginsenoside, lactic acid bacteria

인삼은 식물학적으로 오가과(*Araliaceae*), 인삼속(*Panax*)에 속하는 식물을 말하며 뿌리를 약용으로 이용하고 있다. 인삼은 한국과 중국을 비롯한 동양에서 오랫동안 이용된 약초로서 소련의 과학자 C. A. Meyer가 1843년에 만병을 치료한다는 뜻으로 학명을 *Panax ginseng* C. A. Meyer라고 명명하였다. 세계적인 인삼시장인 홍콩에서 고려인삼의 시장점유율을 살펴보면 1990년 22.9%에서 2002년에는 9.6%로 대폭 감소하여 인삼의 중주국으로서의 명성을 잃어가고 있다(4). 한국, 미국, 중국 등 6개 국가의 소비자들을 대상으로 한 조사에서 인삼의 품질이 향상되면 더 많은 비용을 지불하면서 인삼을 구입할 용의가 있다는 사실이 보고된 바 있다(5). 이에 본 연구에서는 유용한 미생물을 이용하여 일반 수삼을 발효하고, 미생물의 당 분해효소 등을 이용하여 인삼 사포닌(ginsenoside)을 전환하여 영양학적, 기능적 가치를 높이고자 한다.

최근 이슈화 되고 있는 인삼 사포닌(ginsenoside)은 Shibata 등의 연구(13, 14)에서 일찍이 그 구조가 밝혀졌고, 그 이후 많은 연구에서 ginsenoside의 항암작용과 같은 다양한 효능들이 밝혀지고 있다(8, 9). 발효인삼은 살아있는 유용한 미생물을 프로바이오틱(probiotic)으로 공급할 수 있는 장점과 배당체 구조인 ginsenoside의 당을 분해하여 ginsenoside의 구조를 전환하여 일반 수삼에서 섭취할 수 있는 사포닌보다 고효율의 사포닌을 섭취할 수 있다는 장점이 있다. 미생물에 의해 인삼의 ginsenoside의 전환이 일어남은 잘 알려진 사실이며(1, 2, 3, 10), *Bacillus*

속에서는 glucosidase와 같은 효소가 많이 생성된다는 사실은 이미 널리 보고가 되어 있다(6, 11, 12).

본 연구에서는 *Bacillus*와 유산균을 이용하여 인삼을 발효시켰으며, 발효여부를 확인하기 위하여 인삼만을 유일한 영양분으로 하는 인삼분말배지를 사용하였다. 인삼분말배지에서 발효 후 인삼의 사포닌을 추출하여 분석함으로써 ginsenoside의 전환여부를 확인하였다.

인삼분말배지에서의 성장능력과 ginsenoside의 전환능력을 측정할 *Bacillus* 균주들은 청국장에서 분리한 균주들이며, 표 1에 16S rRNA 서열의 유사성에 근거하여 가장 가까운 종을 표시하였다(Table 1). 유산균은 서울대학교 미생물연구소에서 분양받아서 사용하였다(Table 2). 인삼분말배지는 금산 4년근 인삼을 사용하였으며, 인삼을 오븐에서 건조한 후에 분쇄기로 분말화 하였다. 이렇게 얻은 분말 인삼은 멸균수와 혼합하여 액체배지(2.5%, w/v, 1%, w/v)를 만들었고, 121°C, 1.5기압, 15분간 멸균하였다.

인삼분말배지에서 균주의 성장능을 알아보기 위하여 *Bacillus*와 유산균을 전배양하고  $10^2$  CFU/ml로 희석하여 *Bacillus*는 2.5% (w/v) 인삼분말배지(50 ml)에, 유산균은 1%(w/v) 인삼분말배지(50 ml)에 접종하고 각각 37°C와 30°C, 200 rpm에서 배양하였다. 배양액은 일정시간 단위로 취하여 희석을 한 후에 *Bacillus* 균주는 LB (Conda, Spain) 고체배지에, 유산균은 MRS (Difco, France) 고체배지에 도말하고, 24시간 배양한 후 콜로니 수를 측정하였다.

인삼분말배지에서 72시간 생장이 진행된 후, saponin의 추출은 Shibata 등(14)의 방법에 따라 추출하였으며, 추출된 saponin을 이용하여 ginsenoside 분석을 시행하였다. 배양 상등액을 취하여 ethyl ether를 3회 처리하여 지용성 성분을 제거하고, 다시 수포

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 82-31-670-4706, Fax: 82-31-675-0432  
E-mail: cjcha@cau.ac.kr

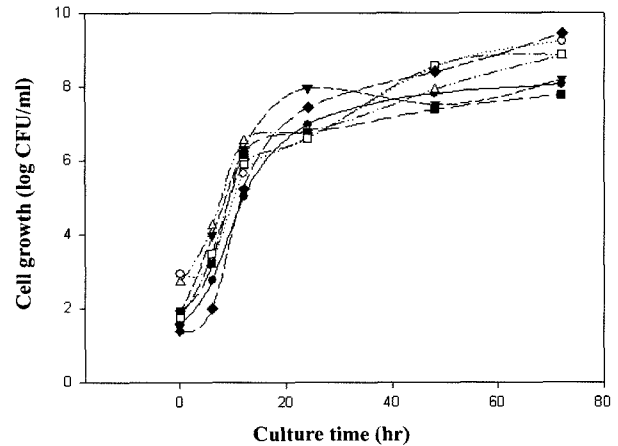
**Table 1.** *Bacillus* spp. used for ginseng fermentation and biotransformation

Microorganism	Closest species based on 16S rRNA similarity
<i>Bacillus</i> sp. B1	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Bacillus</i> sp. B2	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Bacillus</i> sp. B3	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Bacillus</i> sp. B7	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Bacillus</i> sp. B8	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Bacillus</i> sp. B10	<i>Bacillus olivae</i>
<i>Bacillus</i> sp. B11	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Bacillus</i> sp. B1-1	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Bacillus</i> sp. B1-2	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Bacillus</i> sp. B1-3	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Bacillus</i> sp. B1-4	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Bacillus</i> sp. B1-5	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Bacillus</i> sp. B2-1	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Bacillus</i> sp. B2-2	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Bacillus</i> sp. B2-3	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Bacillus</i> sp. B2-4	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Bacillus</i> sp. B2-5	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Bacillus</i> sp. B3-1	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Bacillus</i> sp. B3-2	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Bacillus</i> sp. B3-3	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Bacillus</i> sp. B3-5	<i>Bacillus subtilis</i>

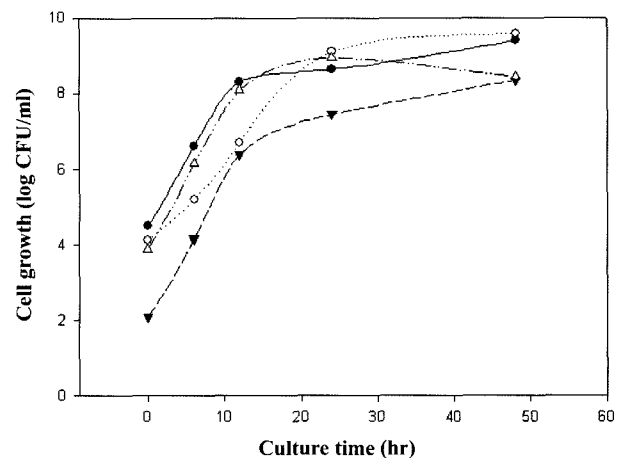
**Table 2.** Lactic acid bacteria used for ginseng fermentation and biotransformation

Microorganism
<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Lactobacillus sakei</i>
<i>Leuconostoc mensenteroides</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Leuconostoc citreum</i>
<i>Leuconostoc citreum</i> KM20
<i>Weissella kimchii</i> CHJ30
<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Leuconostoc kimchii</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Leuconostoc gelidum</i>

화 n-Butanol로 3회 처리한 후 얻은 Butanol 층을 Rotary evaporator (Model N-1000, EYELA, Japan)를 사용하여 감압 농축하였다. 이렇게 얻은 saponin은 40% acetonitrile에 용해하여 HPLC 분석 샘플을 만들었다. 분석에 사용한 HPLC 기기는



**Fig. 1.** Growth of *Bacillus* sp. in ginseng powder broth. Each curve represents the average of two independent experiments. Symbols: ●, *Bacillus* sp. B1; ▾, *Bacillus* sp. B8; ▼, *Bacillus* sp. B11; △, *Bacillus* sp. B1-3; ■, *Bacillus* sp. B2-1; □, *Bacillus* sp. B2-4; ◆, *Bacillus* sp. B3-5



**Fig. 2.** Growth of lactic acid bacteria in ginseng powder broth. Each curve represents the average of two independent experiments. Symbols: ●, *Lactococcus lactis*; ○, *Lactobacillus plantarum*; ▼, *Leuconostoc gelidum*; △, *Streptococcus pyogenes*

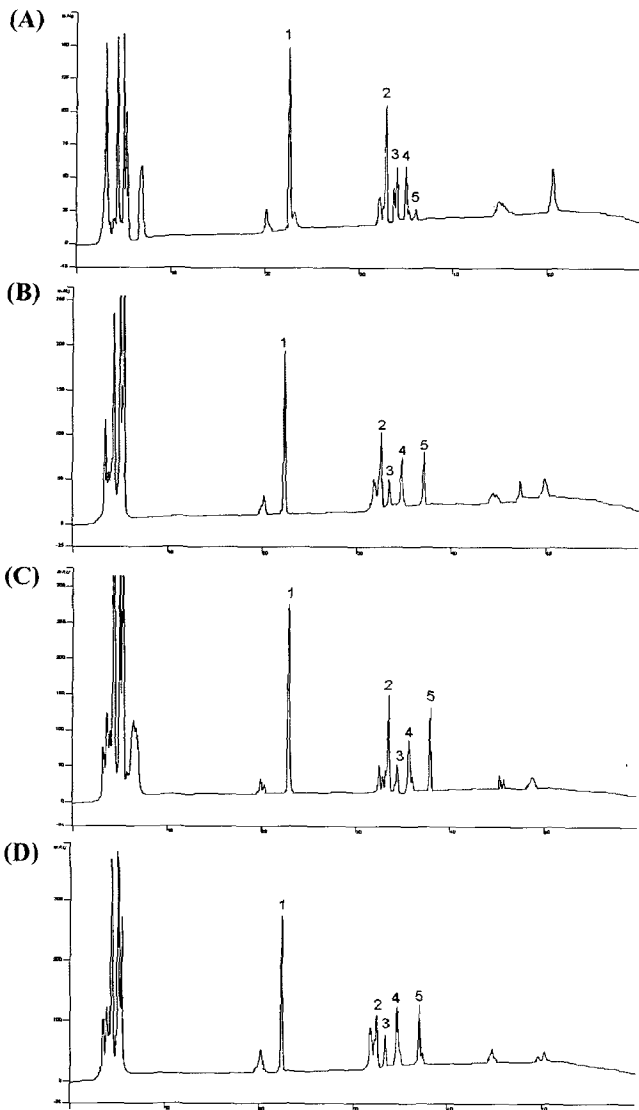
ProStar 335 system (Varian, USA)이고, column은 Atlantis dC18 (Waters, 4.6×250 mm, USA)을 사용하였다. Mobile phase는 HPLC용 증류수와 acetonitrile (HPLC grade, J.T. Baker, USA)을 사용하였으며, gradient 조건은 17% ACN으로 시작하여 30분 40% ACN, 50분 80% ACN, 55분 17% ACN, 60분 17% ACN 이었고, 유속은 0.8 ml/min 이었다. 검출은 UV 203 nm에서 측정하였다.

실험에 사용된 *Bacillus* 21종과 유산균 12종 모두 인삼분말배지에서 10<sup>7</sup> CFU/ml 이상의 성장능을 보였다. 그림 1과 그림 2는 성장능력이 뛰어난 *Bacillus* 7종과 유산균 4종의 성장곡선을 보여준다. *Bacillus*의 경우 유도기가 거의 없었으며, 24시간 동안에 10<sup>6</sup> CFU/ml 이상 성장하였고, 그 이후에는 완만한 성장 혹은 정

지기를 보였다(Fig. 1). 유산균의 경우 *Bacillus*와 거의 비슷한 성장곡선을 나타내었지만 10<sup>6</sup> CFU/ml 이상 성장하는 시간이 12시간 정도로 *Bacillus*보다 짧았다(Fig. 2). 사용된 유산균들은 2.5% (w/v) 인삼분말배지에서는 생장을 보이지 않았는데 이는 인삼분말에 함유된 사포닌이나 다른 성분들에 의해 생장이 저해된 것으로 생각된다. 유산균 중에서는 *Lactococcus lactis*와 *Lactobacillus plantarum*이 가장 높은 생장을 나타내었다.

인삼분말배지에서 72시간 동안 생장이 일어난 후 사포닌의 변화를 분석하기 위해 Shibata 방법(14)에 따라 시료를 만든 후에 HPLC 분석을 진행하였다. 그림 3은 3종류의 *Bacillus*에 대한 ginsenoside의 변화를 보여주는 HPLC profile이다(Fig. 3). 그림에서 negative control은 균을 접종하지 않고 다른 샘플들과 같은

조건하(37°C, 200 rpm)에서 전배양시킨 인삼의 사포닌에 대한 HPLC 크로마토그램이다. Ginsenoside의 분석은 Rg<sub>1</sub>, Rb<sub>1</sub>, Rc, Rb<sub>2</sub>, Rd의 5가지 성분을 분석하였다. 인삼배지에서 사포닌을 추출하는 과정에서 수율이 일정하지 않았고, 사포닌 외의 다른 물질들이 많이 존재하기 때문에 정량적인 분석에 어려움이 있었다. 따라서, 5 종류의 사포닌에 대해서 전체 사포닌 총량에 대한 특정 사포닌의 비율(ratio)의 변화로서 성분의 증감을 비교하였다(Table 3). *Bacillus*의 경우 5가지 성분들 간의 변화가 뚜렷하게 있었지만, 유산균에서는 특이적인 변화를 찾아볼 수가 없었다. *Bacillus* 결과에서 HPLC 크로마토그램의 양상을 살펴보면, 모든 샘플에서 Ginsenoside Rc의 함량이 감소하는 것을 확인할 수 있고, Ginsenoside Rd의 경우 많은 샘플에서 그 함량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 Ginsenoside Rc에서 Rd로의 전환을 의심해 볼 수 있으며, ginsenoside- $\alpha$ -arabinofuranase 효소가 전환에 관련된 것으로 생각된다(15). 그림3의 D의 경우 앞의 두 profile과는 다른 양상을 보이는데, ginsenoside Rc와 Rb<sub>1</sub>의 함량이 줄어들었고 Rd의 함량이 증가하였다. 이는 ginsenoside- $\alpha$ -arabino-furanase에 의해 Rc가 분해된 것과  $\beta$ -glucosidase에 의해 Rb<sub>1</sub>의 당이 분해되어 Rd로 전환된 것을 의심해 볼 수 있다. 따라서 실험에서 사용된 *Bacillus* 균주들에 의한 인삼의



**Fig. 3.** HPLC profiles of transformation of ginsenoside Rg<sub>1</sub>, Rb<sub>1</sub>, Rc, Rb<sub>2</sub> and Rd by *Bacillus* strains. (A), negative control (B), *Bacillus* sp. B8 (C), *Bacillus* sp. B1-4 (D), *Bacillus* sp. B2-4, Ginsenosides; 1, Rg<sub>1</sub>; 2, Rb<sub>1</sub>; 3, Rc; 4, Rb<sub>2</sub>; 5, Rd

**Table 3.** Transformation of Ginsenoside Rg<sub>1</sub>, Rb<sub>1</sub>, Rc, Rb<sub>2</sub>, and Rd by *Bacillus* spp.

Strain	Rg <sub>1</sub>	Rb <sub>1</sub>	Rc	Rb <sub>2</sub>	Rd
B1	-	+	-	+	+
B2	-	+	-	-	+
B3	-	+	-	+	+
B7	+	+	-	-	-
B8	+	-	-	-	-
B10	+	-	-	-	+
B11	-	+	-	-	+
B1-1	-	+	-	+	+
B1-2	-	+	-	-	-
B1-3	ND	-	-	+	+
B1-4	+	-	-	-	ND
B1-5	-	+	-	+	+
B2-1	+	-	-	-	-
B2-2	+	-	-	+	+
B2-3	-	-	-	+	+
B2-4	+	-	-	+	+
B2-5	+	-	-	-	+
B3-1	ND	-	-	+	+
B3-2	ND	-	-	+	+
B3-3	ND	-	-	-	+
B3-5	ND	+	-	ND	+

+: positive, -: negative, ND: not detected

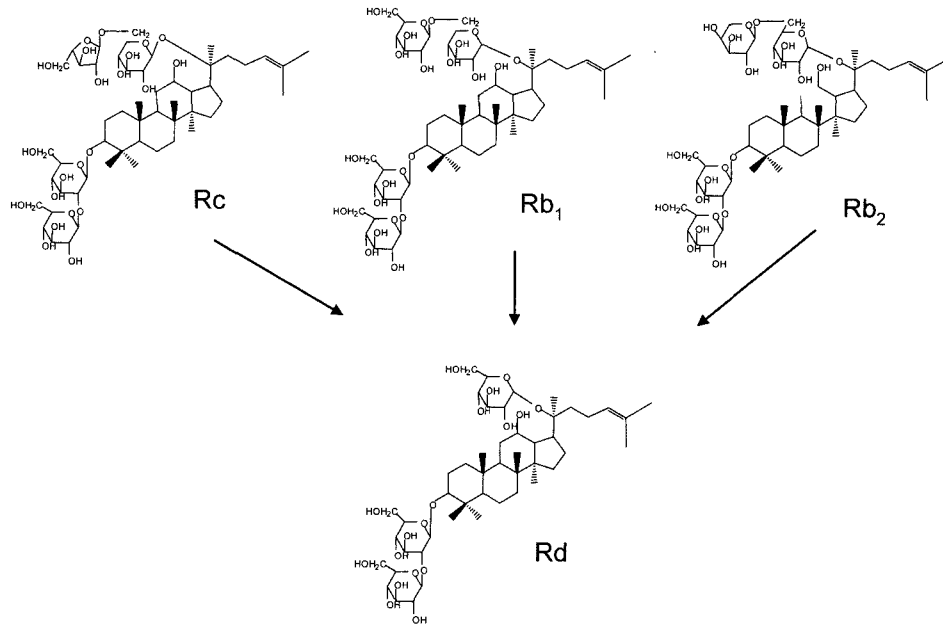


Fig. 4. Proposed pathway of ginsenoside transformation by *Bacillus* spp.

ginsenoside 성분의 전환은 그림 4와 같이 경로를 예상해 볼 수 있다(Fig. 4)

위의 결과를 종합해 볼 때 인삼분말만을 유일한 영양분으로 한 발효에서 21종의 *Bacillus*와 12종의 유산균은 모두 좋은 생장능을 보였으므로, 생식을 할 경우 probiotic으로서의 이점에 대한 가능성을 엿볼 수 있다. 더욱이 *Bacillus*의 경우 균주마다 ginsenoside를 전환하는 활성을 보였으므로, 영양적인면 뿐만이 아니라, 기능적인 측면까지도 다양한 이점이 있을 것이라 사료된다. 유산균의 경우 probiotic으로서의 연구가 많이 진행되고 있는 바, 인삼분말배지에서 좋은 생장능력을 보인 결과를 참고하여, ginsenoside의 당에 대한 분해활성이 높은 균주와 혼합배양을 할 경우 probiotic 이상의 가치가 있을 것으로 판단된다.

### 감사의 말

이 논문은 2006년도 중앙대학교 학술연구비(일반연구비) 지원에 의한 것임.

### 참고문헌

- Bae, E.-A., N.-Y. Kim, M.J. Han, M.-K. Choo, and D.-H. Kim. 2003. Transformation of ginsenosides to compounds K (IH-901) by lactic acid bacteria of human intestine. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13, 9-14.
- Chi, H., D.-H. Kim, and G.-E. Ji. 2003. Transformation of ginsenosides Rb2 and Rc from *Panax ginseng* by food microorganisms. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 2102-2105.
- Chi, H. and G.-E. Ji. 2005. Transformation of ginsenosides Rb1 and Re from *Panax ginseng* by food microorganisms. *Biotechnol. Lett.* 27, 765-771.
- Im, B.O., S.K. Ko, H.B. Jeong, and Y.D. Kim. 2005. Marketing strategy of ginseng product used tree analysis in domestic market. *Food Marketing Research* 22, 19-43.
- Jeong, H.B., S.H. Park, S.K. Ko, S.H. Cho, and B.O. Im. 2005. Actual consumption conditions and consumer perception of ginseng in the major countries. *J. Ginseng Res.* 29, 152-158.
- Kelly, C.T., F. O'Reilly, and W.M. Fogarty. 1983. Extracellular  $\alpha$ -glucosidase of an alkalophilic microorganism, *Bacillus* sp. ATCC 21591. *FEMS Microbiol. Lett.* 20, 55-59.
- Kim, M.K., J.W. Lee, K.Y. Lee, and D.-C. Yang. 2005. Microbial conversion of major ginsenoside Rb1 to pharmaceutically active minor ginsenoside Rd. *J. Microbiol.* 43, 456-462.
- Kim, S.W., H.Y. Kwon, D.W. Chi, J.H. Shim, J.D. Park, Y.H. Lee, S.E. Pyo, and D.K. Rhee. 2002. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by ginsenoside Rg3. *Biochem. Pharmacol.* 65, 75-82.
- Liu, W.K., S.X. Xu, and C.T. Che. 2000. Anti-proliferative effect of ginseng saponins on human prostate cancer cell line. *Life Sciences* 67, 1297-1306.
- Luan, H.W., X. Liu, X.H. Qi, Y. Hu, D.C. Hao, Y. Cui, and L. Yang. 2006. Purification and characterization of a novel stable ginsenoside Rb1-hydrolyzing  $\beta$ -D-glucosidase from China white jade snail. *Proc. Biochem.* 41, 1974-1980.
- Pajni, S., N. Dhillon, D.V. Vadehra, and P. Sharma. 1989. Carboxymethyl cellulase,  $\beta$ -glucosidase and xylanase production by *Bacillus* isolates from soil. *Int. Biodeterior.* 25, 1-5.
- Rowe, G.E. and A. Margaritis. 2004. Enzyme kinetic properties of  $\alpha$ -1,4-glucosidase in *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Engin. J.* 17, 121-128.
- Sanata, S., N. Kondo, J. Shoji, O. Tanaka, and S. Shibata. 1974. Studies on the saponins of ginseng. I. Structure of ginsenoside-R0, Rb1, Rb2, Rc and Rd. *Chem. Pharm. Bull.* 22, 421-428.
- Shibata, S., T. Tanaka, T. Ando, M. Sado, S. Tsushima, and T. Ohsawa. 1966. Chemical studies on oriental plant drugs (XIV). Protopanaxadiol, a genuine sapogenin of ginseng saponins. *Chem.*

*Pharm. Bull.* 14, 595-600.

15. Zhang, C., H. Yu, Y. Bao, L. An, and F. Jin. 2002. Purification and characterization of ginsenoside- $\alpha$ -arabinofuranase hydrolyzing ginsenoside Rc into Rd from the fresh root of *Panax ginseng*. *Pro-*

*cess Biochem.* 37, 793-798.

(Received June 7, 2007/Accepted June 13, 2007)

---

**ABSTRACT: Screening for Ginseng-Fermenting Microorganisms Capable of Biotransforming Ginsenosides**

**Hee-Gyu Kim, Ki-Yeon Kim, and Chang-Jun Cha\*** (Department of Biotechnology, Chung-Ang University, Ansong 456-756, Republic of Korea)

*Panax ginseng* has been drawing world-wide attention since it was used for medicinal purposes and its effects was discovered in scientific manners. However, it is necessary to develop new ginseng products as functional foods to compete with western ginseng. Fermented ginseng could be an excellent solution, where useful probiotics are provided and ginsenosides are specifically transformed to functional forms. In this study, we investigated the growth and ginsenoside biotransformation by 21 *Bacillus* strains isolated from Chongkukjang and 12 lactic acid bacteria. 2.5% (w/v) and 1% (w/v) of ginseng were used in culture media containing only ginseng powder as a sole nutrient source, and their biotransformation abilities were tested after the growths were checked. All used *Bacillus* strains and lactic acid bacteria were able to grow well in ginseng powder media at higher levels than  $10^7$  CFU/ml. Most of *Bacillus* strains displayed ginsenoside transformation in a strain-specific manner. Therefore, the results of this study demonstrated that the strains tested in this study could be used as potential starters for the ginseng fermentation.