

## $\beta$ -Glucosidase 생성 효모 *Rhodotorula* sp. GYP-1의 분리 및 특성

노현수<sup>1,\*</sup> · 권민영<sup>1,2</sup> · 김솔비<sup>3</sup> · 조재은<sup>3</sup> · 한송이<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>목원대학교 미생물생명공학과, <sup>2</sup>서울대학교 식품바이오전공, <sup>3</sup>솔바이오(주)  
(2023년 8월 23일 접수: 2023년 10월 30일 수정: 2023년 10월 30일 채택)

Isolation and Characterization of  $\beta$ -Glucosidase-Producing Yeast, *Rhodotorula* sp. GYP-1

Hyun-Soo Roh<sup>1,\*</sup> · Min-Young Kwon<sup>1,2</sup> · Sol-Bi Kim<sup>3</sup> · Jae-Eun Cho<sup>3</sup> · Song-Ih Han<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbial Biotechnology, College of Mokwon University, Daejeon 35349, Korea,

<sup>2</sup>Department of Food Biotechnology, Graduate school of international agricultural technology,  
Seoul National University, Kangwon-do, 25354, Korea,

<sup>3</sup>SOLBIO Co., LTD, Chungbuk, 29023, Korea.

(Received August 23, 2023; Revised October 30, 2023; Accepted October 30, 2023)

**요약** : 인삼부산물 및 인삼밭 토양에서 분리한 9균주 중  $\beta$ -Glucosidase 생성 균주 GYP-1과 GYP-3-3 균주를 선발하였다. 선발된  $\beta$ -Glucosidase 생성 균주에 대하여 16S rRNA 유전자 염기서열과 ITS 염기서열을 기반으로 계통 분석을 실시한 결과, GYP-1 균주는 *Rhodotorula* 속에 속하며, GYP-3-3은 *Brachy bacterium* 속에 속하는 것으로 확인되었다. 특히, *Rhodotorula* sp. GYP-1 균주는 호기성 효모 종으로 biomass 생산량이 높아 최종 우수 균주로 선발하였다. *Rhodotorula* sp. GYP-1가 생성하는  $\beta$ -Glucosidase의 온도 및 pH에 따른 효소 활성 및 안정성을 검정한 결과, 30 °C에서 6.7 unit/ml로 가장 높은 활성을 나타내었고, 20 °C ~ 40 °C에서 효소 활성의 약 70 % 이상을 유지하는 것으로 확인하였다. pH에 따른 효소의 활성 및 안정의 경우, pH 5에서 6.8 unit/ml로 가장 높은 활성을 나타내었고 pH 5~pH 8까지 93.3 % 이상의 효소 활성을 유지하는 것으로 확인하였다. *Rhodotorula* sp. GYP-1가 생성하는  $\beta$ -Glucosidase는 ginsenoside Rb1 minor 진세노사이드로 분해하는 것으로 확인되었다. 또한, 인삼 뿌리 병원균(*Botrytis cinerea*)에 대해 항진균능을 갖는 것으로 확인되었다.

**주제어** :  $\beta$ -Glucosidase, *Rhodotorula* sp., 진세노사이드, 항진균활성, 효모

**Abstract** : Nine microbial strains were isolated from the byproduct of ginseng processing and field of ginseng cultivation. Two strains among them were confirmed. Phylogenetic analysis of these  $\beta$ -Glucosidase strains confirmed that strain GYP-1 belongs to the *Rhodotorula* and strain GYP-3-3 belong to genus *Brachy bacterium*. *Rhodotorula* sp. GYP-1 was finally selected due to its high biomass

†Corresponding author

(E-mail: h1882@mokwon.ac.kr)

production. The  $\beta$ -Glucosidase activity of *Rhodotorula* sp. GPY-1 was assessed at 30 °C, and Higher than 70% of the enzyme activity was maintained at the temperature range of 20–40°C. Although the optimum pH for the highest enzyme activity was pH 5.0, the enzyme was stable throughout the pH range of 5.0–8.0. In addition, *Rhodotorula* sp. demonstrated antifungal activity against the ginseng root rot disease caused by *Botrytis*.

*Keywords* : antifungal activity, ginsenoside,  $\beta$ -Glucosidase, *Rhodotorula* sp., yeast

## 1. 서론

고려인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 주성분이 진세노사이드으로 밝혀지고 인삼사포닌의 약리효능으로 항암작용, 면역기능 조절, 항당뇨, 간 기능 강화 등이 알려지면서 그 수요가 점차 증가되고 있다[1-3]. 그러나, 인삼은 그 세대기간이 4~6년으로 길며 연작이 불가능한 실정으로 원료공급에 지장을 초래할 가능성이 높다[2]. 인삼의 잎이나 줄기 등 부산물에 대한 유효성과 약리효능이 밝혀지면서 인삼부산물에 대한 관심이 높아지고 이에 관한 연구가 시도되면서 새로운 자원으로서 인삼부산물의 이용가치가 새롭게 평가되고 있다[4]. 인삼사포닌의 주요 진세노사이드의 경우, 생체 내 흡수율이 매우 낮아 저분자 진세노사이드로 전환이 요구된다[5-6]. 진세노사이드의 전환을 위해 화학적 처리와 열처리를 이용하고 있으며, 최근에는 미생물 발효 및 효소 반응과 같은 생물학적 전환을 통한 사포닌 대사체 생산에 관한 연구가 이루어지고 있다[7-9].

미생물의 종류에 따라 사포닌 전환산물 및 그 경로가 다양하다고 보고되면서 다양한 진세노사이드 전환 미생물들이 보고되어 왔다. 진균류인 *Rhizopus japonicus*, *Curvularia lunata*를 비롯하여 세균류인 *Bacillus* sp., *Leuconostoc fallax*, *Microbacterium esteraromaticum*, *Stenotrophomonas* sp. 등이 인삼의 사포닌을 전환시킬 수 있는 미생물로서 인삼에 직접 접목하는 연구들이 보고 되어왔다[10-12]. 본 연구에서는 인삼 부산물 및 인삼재배지 토양으로부터  $\beta$ -Glucosidase 생성 균주를 탐색하고 이들 균주의 의약, 제약, 식품분야의 유전자원으로 활용을 목적으로 생리 생화학적 특성 및 계통학적 특성을 밝히고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. $\beta$ -Glucosidase 생성 균주 분리

미생물이 생산하는  $\beta$ -Glucosidase의 활용을 위해 인삼 부산물(줄기, 열매) 및 인삼 밭 토양(36.193271, 127.468021)을 채취하였다. 채취된 시료는 10 g 정량한 후 멸균된 증류수 90 ml에 희석하고 sonicator(SUZUKI Co., Japan)를 이용하여 30 W, 2 분 30 초 동안 분산처리하였다. 분산처리된 시료는 9 ml 멸균수에 순차적으로 희석을 진행한 후 R2A 고체배지에 접종하고 28 °C에서 배양하였다. 도말한 고체배지에서 단일 colony를 1차 선발하였다. 순수 분리된 균주를 Esculin agar(Kisan Bio Co., Seoul, Korea)에 배지에 각각 접종하고 esculin을 가수분해하여 배지를 흑갈색으로 변색시키는 균주를  $\beta$ -Glucosidase 생성 균주로 판정하였다.

### 2.2. $\beta$ -Glucosidase 생성 균주의 계통분석

순수 분리된  $\beta$ -Glucosidase 생성 균주의 계통 분석을 위해 단일 콜로니로부터 분리된 genomic DNA를 주형으로 사용하여 16S rRNA 유전자와 ITS 유전자의 PCR 증폭을 수행하였다. 16S rRNA 유전자 PCR 증폭을 위해 *E. coli* 16S rRNA 유전자 부분의 conserved sequence를 기초로 한 universal primers인 27F(5'-AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG-3')와 1492R(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')을 이용하였다. PCR 조건은 2X Master Mix (Biofact, Korea), PCR buffer, 0.2  $\mu$ M primer로 하였다. 16S rRNA PCR 조건에 따라 95 °C에서 2 분, 94 °C에서 30 초, 54 °C에서 40 초, 72 °C에서 1 분, 16S rRNA 유전자 증폭을 30

cycle 반복하고 72 °C 5 분 처리하여 PCR 증폭을 하였다. ITS 증폭을 위해 universal primers인 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')와 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')를 이용하였다. PCR 조건은 2X Master Mix (Biofact, Korea), PCR buffer, 0.2  $\mu$ M primer로 하였다. ITS PCR 조건은 94 °C에서 3 분, 94 °C에서 1 분, 56 °C에서 1 분, 72 °C에서 2 분, ITS 증폭을 35 cycle 반복하고 72 °C 7 분 처리하여 PCR 증폭을 하였다. PCR 증폭 산물은 1.2 %의 agarose gel, 0.5X TAE buffer (0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTA)에서 100 V, 25 mA로 30 분 전기영동하고 PCR purification kit (Qiagen Inc., Germany)를 이용하여 정제한 후 염기서열 분석을 수행하였다. 결정된 16S rRNA 유전자 염기서열은 EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>)을 이용하고 ITS 유전자 염기서열은 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)을 이용하여 상동성을 검색하고 homology를 비교하였다[13]. 각 염기서열은 CLUSTAL W program으로 multiple sequence alignment한 후, MEGA 5.0[14]을 사용하여 분자 계통수를 작성하였다.

### 2.3. $\beta$ -Glucosidase의 효소 활성 측정

분리된 균주의  $\beta$ -Glucosidase 활성을 측정하기 위해 R2A broth에서 28 °C에서 3일간 배양한 후 15,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 상층액을 조효소액으로 사용하였다. 기질은 sodium acetate / acetic acid 완충액 (50 mM, pH 5.0)에 p-nitrophenyl- $\beta$ -p-glucopyranoside (Sigma Chemical, USA)의 농도가 5 mM이 되도록 용해시킨 후, 70  $\mu$ l의 조효소액에 기질 용액을 30  $\mu$ l 첨가하여 37 °C에서 10 분동안 반응하였다. 100  $\mu$ l 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>을 주입하여 반응을 종결시킨 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하여 p-nitrophenol 농도를 측정하였다. 효소 활성(unit)은 1 분동안 1  $\mu$ M의 p-nitrophenol을 생성하는 효소의 양으로 산출하였다[11,15].

### 2.4. $\beta$ -Glucosidase의 효소학적 특성

#### 2.4.1. 온도에 따른 $\beta$ -Glucosidase 활성 및 안정성

온도에 따른  $\beta$ -Glucosidase의 활성을 조사하기 위해 4 °C, 10 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35

°C, 40 °C 그리고 50 °C까지 각각의 온도에서 배양된 배양액을 조효소액으로 하여 기질 용액에 첨가하고 37 °C에서 20 분간 반응 후 효소활성을 측정하였다. 온도 안정성은 가장 높은 활성을 보인 온도의 조효소액을 배양된 기질 용액에 넣고, 4 °C, 10 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C 그리고 50 °C에서 반응 시킨 후 효소 활성의 변화율을 확인하였다.

#### 2.4.2. pH에 대한 $\beta$ -Glucosidase 활성 및 안정성

pH에 따른  $\beta$ -Glucosidase의 활성을 조사하기 위해 pH 2~pH 9에서 배양된 배양액을 조효소액으로 하여 50 mM citrate-phosphate buffer (pH 2.0~6.0), 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0~8.0) 및 50 mM glycine-NaOH buffer (pH 9.0~11.0)의 pH 완충 용액에 조효소액을 넣고 최적 온도에서 활성 반응을 측정하였다. pH에 따른 안정성은 가장 높은 활성을 보인 pH의 추출된 조효소액을 배양된 기질 용액에 넣고 pH 2~pH 9까지 각각의 다른 pH에서 반응 시킨 후 안정성을 측정하였다.

#### 2.4.5. TLC (Thin Layer Chromatography) 분석

분리된 균주가 생성하는  $\beta$ -Glucosidase의 진세노사이드 Rb1 전환능을 확인하기 위하여 분리 균주의 배양액으로부터 추출된  $\beta$ -Glucosidase를 진세노사이드 Rb1 1 mM과 1:1로 혼합하고 30 °C에서 120 시간동안 반응시켰다. 반응액은 24 시간 간격으로 수포화 n-BuOH을 이용하여 사포닌 성분을 추출하고 TLC 분석하였다. TLC (60 F254 Silicagel, Merck)는 시료 당 간격을 1 cm로 점적하고, 전개 용매는 BuOH : Ethyl acetate : D.W (5 : 5 : 3, v/v/v 혼합 용매의 상층)를 사용하여 수행하였다. 전개한 TLC는 5 % 황산용액에 침지하고 105 °C에서 10 분간 방치하여 발색시켰다.

#### 2.4.6. 항진균 활성 조사

식물 병원성 진균에 대한 항진균활성은 탄저병 병원균(*Colletotrichum acutatum*), 시들음병 병원균(*Fusarium oxysporum*), 잣빛곰팡이 병원균(*Botrytis cinerea*), 감자역병 병원균(*Phytophthora infestans*) 그리고 잎마름병 병원균(*Rhizoctonia*

*solan*)을 대상으로 disc plate diffusion method에 의거하여 항진균 활성능을 확인하였다. 각 식물병원성 진균은 PDA (Kisan Bio Co., Seoul, Korea) 고체배지에 또는 PDA (Kisan Bio Co., Seoul, Korea) agar에 1 cm<sup>2</sup>의 크기로 잘라 접종하고 분리 균주를 대치배양하여(25 °C, 7일) 생육 저해대(inhibition zone)의 유무를 확인하였다[16].

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 $\beta$ -Glucosidase 생성 균주 분리

인삼 부산물 및 인삼 발 토양 시료를 R2A 고체배지에 접종하고 28°C에서 3일 동안 배양한 후 평판 배지 상에 형성된 colony 중 대표 콜로니 9 균주를 순수분리하였다. 이들 9균주의  $\beta$ -Glucosidase 생성능을 확인한 결과 2균주가  $\beta$ -Glucosidase를 생성하는 것으로 확인되었다(Fig 1).

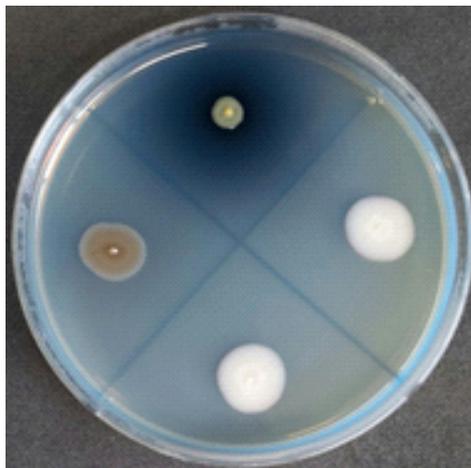


Fig. 1. Isolation of  $\beta$ -Glucosidase-producing strains.

#### 3.2. $\beta$ -Glucosidase 생성 균주의 계통분석

인삼 부산물 및 인삼 발 토양에서 분리된  $\beta$ -Glucosidase를 생성하는 2균주의 계통 분석을 위해 16S rRNA 유전자 염기서열과 ITS 염기서열을 확인한 결과 세균 1균주, 진균 1균주로 확인되었다. 세균으로 확인된 GYP-3-3 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과 *Actinobacteria*문, *Actinomycetia*강, *Derma-*

*bacteriales*목, *Dermabacteraceae*과, *Brachybacterium* 속에 속하며, *Brachybacterium paraconglomeratum* LMG 19861<sup>T</sup>와 98.7 %, *Brachybacterium conglomeratum* NCIB 9859<sup>T</sup>와 98.55 %, *Brachybacterium saurashtrense* JG 06<sup>T</sup>와 98.27 %의 상동성을 나타내어 *Brachybacterium* sp.로 동정되었다.

진균으로 확인된 GYP-1 균주의 ITS 분석 결과 *Basidiomycota*강, *Microbotryomycetes*강, *Sporidiobolales*목, *Sporidiobolaceae*과, *Rhodotorula* 속에 속하며, *Rhodotorula glutinis* IFM 55305<sup>T</sup> 99.84 %, *Rhodotorula babjevae* CBS 7808<sup>T</sup> 99.83 %, *Rhodotorula graminis* CBS 2826<sup>T</sup> 99.02 %의 상동성을 나타내어 *Rhodotorula* sp.로 동정되었다.

*Rhodotorula* 속에 속하는 종들은 대수기 동안 glycogen을 생산하는 능력과 정지기 동안 많은 양의 지질 및 carotenoid 색소를 생성하는 독특한 대사 특성을 가진 호기성 효모이다[17]. *Rhodotorula* 종은 공기, 토양, phyllosphere(잎 표면)에서 발견되며, 우유와 치즈 제품에서도 발견된다[18-19]. *Rhodotorula*의 일부 종은  $\beta$ -carotene, torulene 및 torularhodin의 합성이 우수한 주요 카로티노이드 생산 미생물이다[19]. 또한 단백질, 지질 및 비타민의 좋은 공급원으로 널리 알려져 있다[20]. 그 중 *Rhodotorula glutinis*는 식품 산업에서 특히 중요하며, 화합물 중에서도 지질, carotenoid, 효소를 합성하는 이 점이 있으므로 산업적으로 매우 중요하다. 본 연구에서는 *Rhodotorula* sp. GYP-1 균주가 생성하는  $\beta$ -Glucosidase 특성을 확인하고 이들의 산업적 활용을 위해 기초 특성평가를 수행하고자 GYP-1 균주를 우수균주로 선발 하였다.

#### 3.3. *Rhodotorula* sp. GYP-1의

##### $\beta$ -Glucosidase의 효소학적 특성

선발된 *Rhodotorula* sp. GYP-1 균주가 생성하는  $\beta$ -Glucosidase의 온도 및 pH에 따른 효소 활성 및 안정성을 검정하였다. 온도에 따른  $\beta$ -Glucosidase 효소 활성을 측정된 결과, 30 °C에서 6.7 unit/ml로 가장 높은 활성을 나타내었고, 20 °C~35 °C의 범위에서 4.2~6.7 unit/ml의 효소 활성을 나타냈으며, 50 °C에서 효소 활성이 즉시 감소하는 것으로 나타났다. 온도에 따른  $\beta$ -Glucosidase효소의 안정성을 조사하기 위해 30 °C에서 배양된 조효소액을 4 °C~50 °C

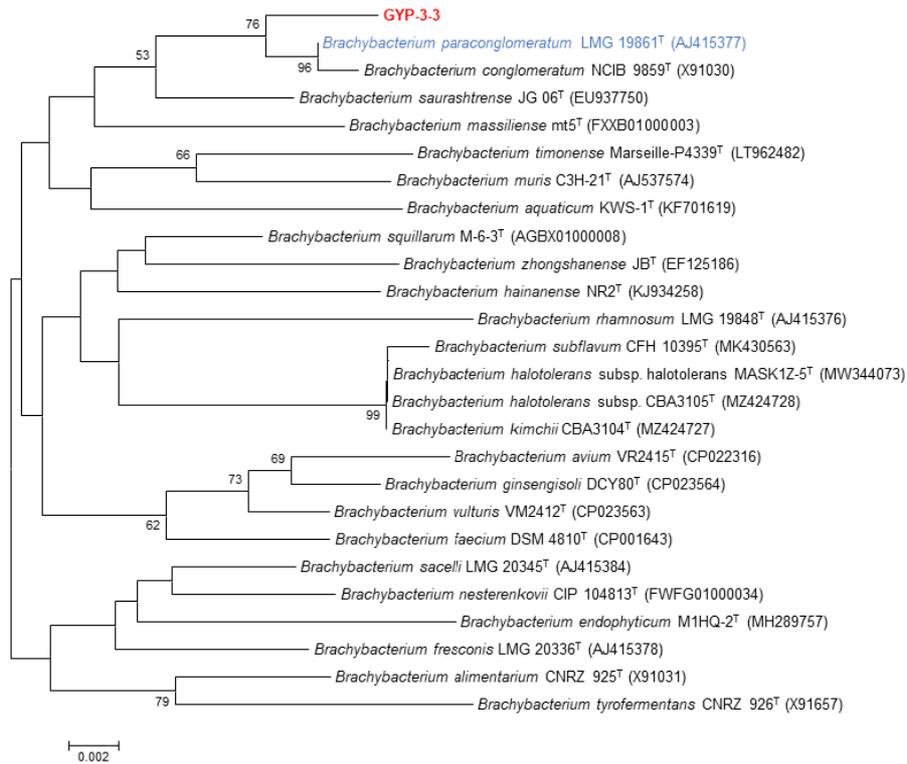


Fig. 2. Phylogenetic tree showing the location of bacterial strain GYP-3-3 in the phylum Actinobacteria based on 16S rRNA gene sequence analysis.

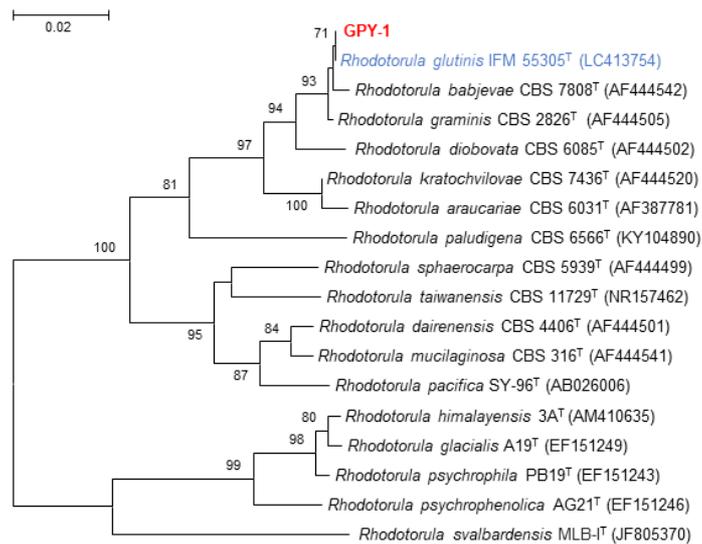


Fig. 3. Phylogenetic tree showing the location of yeast strain GYP-1 in the phylum Actinobacteria based on ITS sequence analysis.

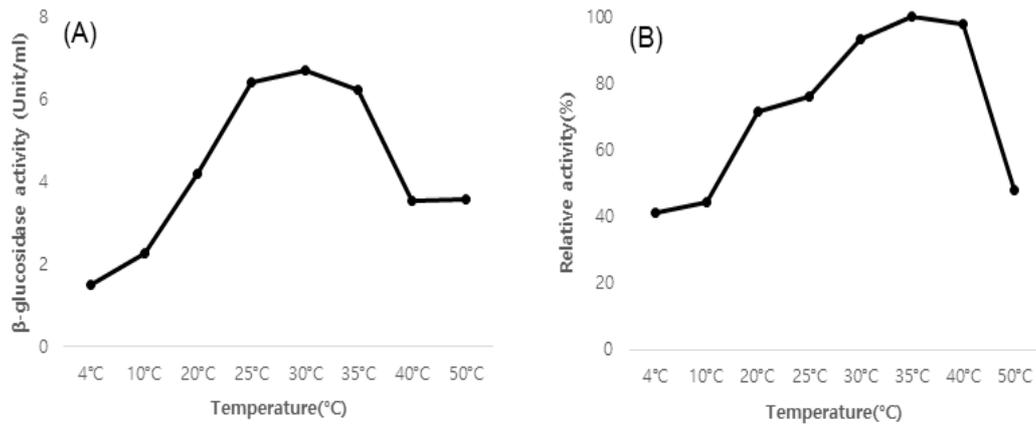


Fig 4. (A) Effect of temperature on  $\beta$ -Glucosidase activity, (B) Stability of  $\beta$ -Glucosidase enzyme according to temperature.

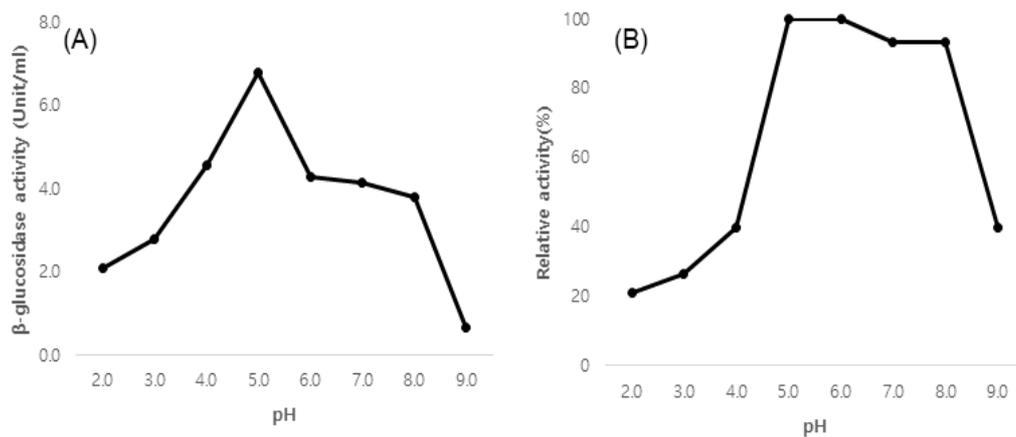


Fig 5. (A) Effect of pH on  $\beta$ -Glucosidase activity, (B) Stability of  $\beta$ -Glucosidase enzyme according to pH.

의 효소 활성을 측정된 결과, GYP-1가 생산하는  $\beta$ -Glucosidase는 20 °C~40 °C에서 효소 활성의 약 70 % 이상을 유지하는 것으로 확인되었다. 고온인 50 °C에서는 효소 활성이 급격히 감소하는 것으로 나타났다(Fig 4). pH에 따른 효소 활성을 측정된 결과, pH 4~pH 8의 범위에서 3.8~6.8 unit/ml의 효소 활성을 나타냈으며, pH 5에서는 6.8 unit/ml로 가장 높은 활성을 나타내었고, 반면에 pH 9에서는 효소 활성이 1 이하로 급격히 감소하는 것으로 나타났다. pH에 따른  $\beta$ -Glucosidase 효소의 안정성을 조사하기 위해 온도 30 °C, pH 5에 배양된 조효소액을 pH 2

~pH 9까지의 효소 활성을 측정하여 안정성을 확인한 결과, GYP-1가 생산하는  $\beta$ -Glucosidase는 pH 5~pH 8까지 93.3 % 이상의 효소 활성을 유지하는 것으로 확인되었다.

### 3.4. *Rhodotorula* sp. GYP-1의 진세노사이드 생물전환능 분석

주요 진세노사이드는 의학적 치료 가능성이 크지만 분자량이 커서 혈액 순환에 잘 흡수되지 않아 생체 이용률이 낮다. 반면 저분자의 진세노사이드는 분자량이 작아 세포막 투과성이 높아 주요 진세노사이드 보다 높은 약리작용을 보인다

[21]. 주요 진세노사이드는 aglycone 구조에 따라 dammarane과 oleanane로 나뉜다. dammarane-type 진세노사이드는 protopanaxadiol(PPD)과 protopanaxatriol(PPT)로 분류되며, ocotillol-type 진세노사이드는 oleanolic acid 전구체(화합물)에서 파생된다[22]. 선발된 *Rhodotorula* sp. GYP-1가 생성하는  $\beta$ -Glucosidase의 진세노사이드의 Rb1 전환능은 TLC 방법으로 확인한 결과, *Rhodotorula* sp. GYP-1가 생성하는  $\beta$ -Glucosidase는 Rb1을 저분자의 진세노사이드로 분해하는 것으로 확인되었다. 본 연구에서 *Rhodotorula* sp. GYP-1 균주는 진세노사이드를 활용하여 저분자의 진세노사이드로 생물전환 하는 것으로 확인되어 추후 저분자의 진세노사이드의 정성, 정량 분석을 수행하여, 의약, 식품, 화장품 등 생명산업의 기능성 원료로 개발할 필요가 있다고 판단된다.

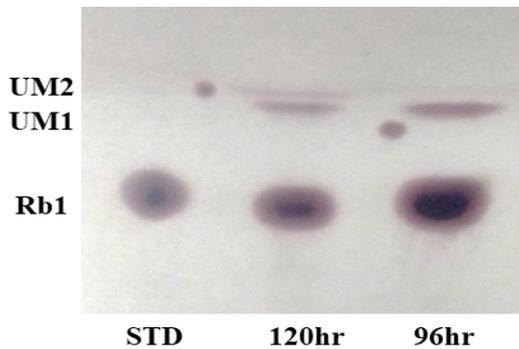


Fig. 6. TLC profile of conversion of 진세노사이드 Rb1 by *Rhodotorula* sp. GYP-1. TLC analysis of time-course transformation (STD, standard, UM, Unknown Minor 진세노사이드).

### 3.5. *Rhodotorula* sp. GYP-1의 생리·생화학적 특성

선발된  $\beta$ -Glucosidase 생성 효모 *Rhodotorula* sp. GYP-1의 생리·생화학적 특성을 확인하기 위해 API 20E, 50CHB kit (bioMerieux)를 사용하여 당 발효·이용능을 조사하였다. *Rhodotorula* sp. GYP-1 균주는 L-arginine, urea, L-tryptophan(tryptophan deaminase), L-tryptophan(indole production), D-glucose, L-rhamnose, D-sucrose, amygdalin

를 이용하는 것으로 확인되었으며, glycerol, D-arabinose, D-ribose, D-xylose, D-adonitol, D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, L-sorbose, L-rhamnose, inositol, D-mannitol, D-sorbitol, arbutin, esculin ferric citrate, salicin, D-saccharose, D-raffinose, D-lyxose, L-fucose, D-arabitol, potassium 5-ketogluconate을 이용하여 발효가 가능한 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과는 추후, *Rhodotorula* sp. GYP-1의 대량배양의 기초 자료로 활용 가능하리라 판단된다.

### 3.6. *Rhodotorula* sp. GYP-1의 항진균 활성

본 연구에서 선발된  $\beta$ -Glucosidase 생성 효모 *Rhodotorula* sp. GYP-1을 대상으로 식물 병원성 진균에 대한 항진균능을 검정하였다. Disc plate diffusion method를 이용하여 식물 병원성 진균에 대한 *Rhodotorula* sp. GYP-1의 항진균능을 확인한 결과, 탄저병 병원균(*Colletotrichum acutatum*), 시들음병 병원균(*Fusarium oxysporum*), 잭빛곰팡이 병원균(*Botrytis cinerea*), 잎마름병 병원균(*Rhizoctonia solani*)에 대해 항진균능을 갖는 것으로 확인되었다. 특히, 잭빛곰팡이병 병원균(*Botrytis cinerea*)은 인삼의 잎, 줄기, 열매, 뿌리 등 모든 조직에서 병을 일으키는 균으로 추후, *Rhodotorula* sp. GYP-1을 이용한 병 방제가 가능하리라 사료된다.

## 4. 결론

본 연구에서는 인삼 부산물 및 인삼 발 토양으로부터  $\beta$ -Glucosidase 생성 균주를 분리하고 이들의 계통을 해석한 결과, *Brachybacterium* sp. 과 *Rhodotorula* sp. 속에 속하는 균주로 확인되었다. 특히, *Rhodotorula* sp. GYP-1 균주는 호기성 효모 중으로 biomass 생산량이 높은 특징을 가지고 있어, 우수균주로 선발하였다. *Rhodotorula* sp. GYP-1 균주가 생산하는  $\beta$ -Glucosidase 효소의 온도 활성 및 안정성을 확인한 결과, 30 ° C에서 6.7 unit/ml로 가장 높은  $\beta$ -Glucosidase 활성을 나타내었으며, 20 ° C~40 ° C에서는 효소 활성의 약 70 % 이상을 유지하는 것으로 확인되었다. 또한 GYP-1 균주가 생산하는  $\beta$ -Glucosidase 효소의 pH 따른 활성 및 안

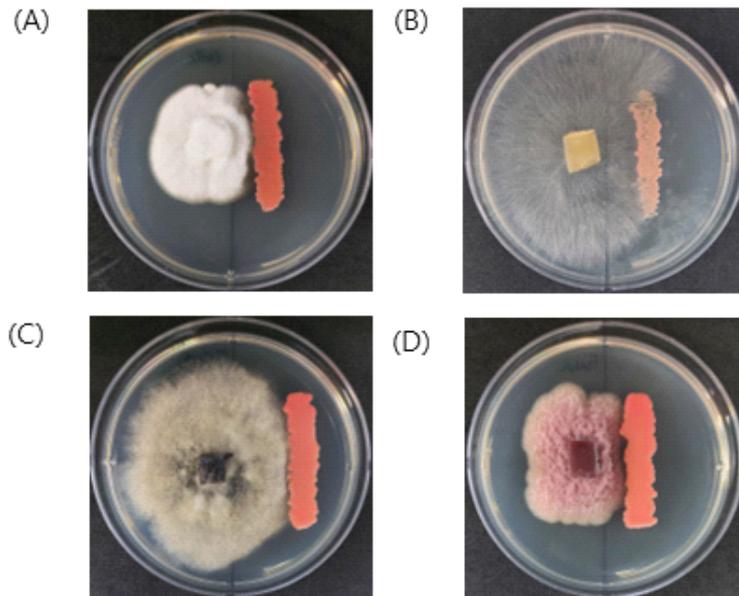


Fig 7. (A) Antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*, (B) Antifungal activity against *Rhizoctonia solani*, (C) Antifungal activity against *Botrytis cinerea*, (D) Antifungal activity against *Fusarium oxysporum*

정성을 확인한 결과, pH 5에서 6.8 unit/ml로 가장 높은  $\beta$ -Glucosidase 활성을 나타내었고, pH 5~pH 8까지 93.3 % 이상의 효소 활성을 유지하는 것으로 확인되었다. 최적의  $\beta$ -Glucosidase 활성을 나타내는 조건에서 생산된 효소는 진세노사이드 Rb1을 minor 진세노사이드로 생물전환 시키는 것으로 확인되었다. 또한 식물 병원성 진균 5종에 대해 항진균능을 검정한 결과 탄저병 병원균(*Colletotrichum acutatum*), 시들음병 병원균(*Fusarium oxysporum*), 꺾꽂이 병원균(*Botrytis cinerea*) 그리고 잎마름병 병원균(*Rhizoctonia solani*)에 대한 항진균능을 확인할 수 있었다. 이에, 본 연구에서 분리된 *Rhodotorula* sp. GYP-1가 생성하는  $\beta$ -Glucosidase는 의약품, 식품 그리고 화장품 등의 기능성 원료로 활용 가능하며, *Rhodotorula* sp. GYP-1가 생성하는 항균활성물질은 인삼 병방제제로 이용 가능하리라 사료된다.

## References

1. Y. Kikuchi, H. Sasa, T. Kita, J. Hirata, T. Tode, I. Nagata, "Inhibition of human ovarian cancer cell proliferation in vitro by ginsenoside-Rb2 and adjuvant effects of cisplatin in vivo", *Anticancer Drug*, Vol.2, pp. 63-67, (1991).
2. H. Oura, S. Hiai, T. Nakajima, "Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid", *Planta Medica*, Vol.29, pp. 116-122, (1976).
3. J. H. Han, S. J. Park, C. N. Ahn, J. J. Wee, K. Y. Kim, S. H. Park, "Nutritional composition, ginsenoside content and fundamental safety evaluation with leaf and stem extract of *Panax ginseng*", *Journal of Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, Vol.33, No.5 pp. 778-784, (2004).

4. D. C. Yang, H. Y. Choi, Y. H. Kim, K. Y. Yun, D. C. Yang, "Growth and ginsenosides production of hairy root via light energy", *Journal of Ginseng Research*, Vol.20, No.3 pp. 318-324, (1996).
5. H. K. Chang, "Effect of processing methods on the saponin contents of *Panax ginseng* leaf-tea", *The Korean Journal of Food And Nutrition*, Vol.16, No.1 pp. 46-53, (2003).
6. J. W. Lee, J. H. Do, "Antioxidative activity of ethanol extraction fraction from the Korean red tail ginseng", *Korean J Food Sci Technol*, Vol.33, No.4 pp. 497-500, (2001).
7. H. Kitazawa, T. Harata, J. Uemura, T. Saito, T. Kaneko, T. Itoh, "Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*", *Int. J. Food Microbiol*, Vol.40, No.3 pp. 169-175, (1998).
8. Y. J. Chen, M. Nose, Y. Ogihara, "Alkaline cleavage of ginsenoside", *Chem. Pharm. Bull*, Vol.35, No.4 pp. 1653-1655, (1987).
9. H. Chi, B. H. Lee, H. J. You, M. S. Park, G. E. Ji, "Differential transformation of ginsenoside from *Panax ginseng* by lactic acid bacteria", *J. Microbiol. Biotechnol*, Vol.16, No.10 pp. 1629-1633, (2006).
10. H. G. Kim, K. Y. Kim, C. J. Cha, "Screening for ginseng fermenting microorganisms capable of biotransforming ginsenosides", *Kor. J. Microbiology*, Vol.43, No.2 pp. 142-146, (2007).
11. M. H. Jang, M. D. Kim, "Exploration of  $\beta$ -Glucosidase activity of lactic acid bacteria isolated from Kimchi", *Food Engineering Progress*, Vol.14, No.3 pp. 243-248, (2010).
12. I. H. Jeon, G. Y. Cho, S. I. Han, S. K. Yoo, K. S. Whang, "Conversion of ginsenoside Rb1 and taxonomical characterization of *Stenotrophomonas* sp. 4KR4 from ginseng rhizosphere soil", *Korean Journal of Microbiology*, Vol.49, No.4 pp. 369-376, (2013).
13. O. S. Kim, Y. J. Cho, K. Lee, S. H. Yoon, M. Kim, "Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species", *Microbiology*, Vol.62, pp.716-721, (2012).
14. K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar, "MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0", *Molecular Biology and Evolution*, Vol.30, No.12 pp. 2725-2729, (2013).
15. J. R. Na, Y. J. Kim, S. H. Kim, H. B. Kim, J. S. Snim, S. Y. Kim, D. C. Yang, "Conversion of ginsenoside Rb1 by ginseng soil bacterium *Cellulosimicrobium* sp. Gsoil 235 according to various culture broths", *Kor. J. Microbiol. Biotechnol*, Vol.37, No.1 pp. 55-61, (2009).
16. S. Loqman, E. A. Barka, C. Clément, Y. Ouhdouch, "Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol.25, No.1 pp. 81-91, (2009).
17. B. Dworecka-Kaszak, M. Kizerwetter-Swida, "Pseudomycelium forming *Rhodotorula* - unusual picture of biofilm", *Food Bioscience*, Vol.5 pp. 64-72, (2014).
18. E. Reiss, H. Jean, G. Marshall-Lyon, "Fundamental medical mycology", *Wiley-Blackwell*, pp. 656, (2012).
19. I. Marova, M. Carnecka, A. Halienova, M. Certik, T. Dvorakova, A. Haronikova, "Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production", *Journal of Environmental Management*, Vol.95 pp. S338-S342, (2012).
20. M. Roadjnakamolson, W. Suntornsuk, "Production of  $\beta$ -carotene-enriched rice bran using solid-state fermentation of *Rhodotorula glutinis*", *Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol.20, No.3 pp. 525-531, (2010).

21. Y. Ke, L. Huang, Y. Song, Z. Liu, L. Liang, L. Wang, T. Wang, "Preparation and pharmacological effects of minor ginsenoside nanoparticles: a review", *Front Pharmacol*, Vol.13, pp. 974274, (2022).
22. B. K. Shin, S. W. Kwon, J. H. Park, "Chemical diversity of ginseng saponins from *Panax ginseng*", *Journal of Ginseng Research*, Vol.39, No.4 pp. 287-298, (2015).