韓藥作誌(Korean J. Medicinal Crop Sci.) 16(3) : 155 – 160 (2008)

Leuconostoc fallax LH3이 생산하는 효소에 의한 Ginsenoside Rd의 Ginsenoside F2로의 전환

전림호 · 성락금 · 나주련 · 김호빈 · 박민주 · 김세화 · 김명겸 · 양덕춘†

경희대학교 고려인삼명품화 사업단 및 인삼유전자원소재은행

Transformation of Ginsenoside Rd to Ginsenoside F2 by Enzymes of *Leuconostoc fallax* LH3

Lin Hu Quan, Le Qin Cheng, Ju Ryun Na, Ho Bin Kim, Min Ju Park, Se Hwa Kim, Myung Kyum Kim, and Deok Chun Yang†

Korean Ginseng Center for Most Valuable product and Ginseng Genetic Resource Bank, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Korea.

ABSTRACT: Ginsenosides have been regarded as the principal components, responsible for the pharmacological and biological activities of ginseng. Absorption of major ginsenosides at the gastrointestinal tract was extremely low, when ginseng taken orally. In order to improve the absorption and bioavailability, transformation of major ginsenosides into more active and valuable minor ginsenoside is much required. In this present study, We isolated a lactic acid bacteria *Leuconostoc fallax* LH3 from the Korean fermented food Kimchi, which have higher *β*-glucosidase activity. Using the ethanol precipitated curd enzyme of *Leuconostoc fallax* LH3, we investigated the biotransformation of ginsenoside Rd at different experimental condition to increase transformation. The maximum convertion was supported at 30℃ and decreased when temperatures increased. In order to optimize the effect of pH, the curd enzyme was mixed 20 mM sodium phosphate buffer (pH 3.5 to pH 8.0). Ginsenoside Rd was almost hydrolyzed between pH 7.0 and pH 9.0, but not hydrolyzed above pH 10.0. Ginsenoside Rd was hydrolyzed after 24 hrs incubation, but whereas the ginsenoside F2 was appeared from 36 hrs, and all ginsenoside Rd was transformed to F2 after the 60 hrs incubation. Based on this study, the curd enzyme of *Leuconostoc fallax* LH3 transformed the ginsenoside Rd at the 30℃ and the pH optimum of 7.0 to 9.0 after the 60 hrs incubation time.

Key Words **:** *Leuconostoc fallax* LH3, Ginsenoside Rd, F2, Transformation

서 언

고려인삼은 수 천년 전부터 동아시아 국가에서 사용되어 온 대표적인 약용작물의 하나이며 (Chuang & Shin, 2006; Kim *et al.*, 2006), 인삼에서 가장 중요한 성분인 인삼사포닌 즉 ginsenoside는 구조적으로 steroid 골격을 갖고 있는 triterpenoid에 glucose, arabinose, xylose, rhamnose 등 당이 결합되어 생성된 배당체로서 4환계 사포닌인 protopanaxadiol (PPD), protopanaxatriol (PPT) 및 5환계 사포닌인 oleanane계 사포닌으로 구분되며 주로 중추신경계에 대한 작용 (Benishin, 1992), 뇌기능에 대한 작용 (Saito & Nishiyama, 1988), 항발암과 항암작용 (Kikuchi *et al.*, 1991), 면역기능 조절작용 (Singh *et al.*, 1984), 항당뇨 작용 (Huo & Chen, 1998), 간기능 강화작용 (Oura & Hiai, 1973), 혈압 조절작용 (Kang & Kim, 1992), 심혈관장애 개선작용 (Kim *et al.*, 1992), 갱년기장애 조절작용 (Ogita & Samugawa, 1994), 항피로 작용 (Brekhman, 1976), 항산화 작용 (Mei *et al.*, 1994)과 항스트레스 작용 (Saito & Bao, 1984) 등 여러 면에서 우수한 활성을 나타낸다.

인삼을 경구투여 시 major 사포닌의 생체 내에서의 흡수는 매우 낮아 Rb_1, Rb_2는 위액에 의해 극소량이 oxygenation되는 외에 대체로 분해되기 어렵고 (Karikura *et al.*, 1991), 장내에서의 생물학적 이용가능성은 Rb_1이 0.1-4.4%, Rb_2가 3.7%, Rg_1이 1.9%-18.4%로 대부분은 소변을 통해 체외로 배출된다 (Takino, 1994; Tanizawa *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 2003). 인삼사포닌의 약효를 증대시키기 위해서 기존에 많이 존재하는

†Corresponding author: (Phone) +82-31-201-2688 (E-mail) deokchunyang@yahoo.co.kr
Received February 4, 2008 / Revised March 25, 2008 / Accepted June 3, 2008

major 사포닌을 상대적으로 흡수도 잘 되며 약효도 더 뛰어난 minor 사포닌으로의 전환이 요구된다. 현재 인삼사포닌의 전환연구는 여러 가지 방법이 있지만 효소에 의한 전환은 상온과 상압 및 중성에 가까운 pH에서 반응을 진행할수 있고 효소의 기질특이성으로 특정사포닌의 생산이 가능하여 많은 연구가 이루어졌다 (Chi & Ji, 2005a; Chi *et al.*, 2005b; Park *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001).

본 연구에서는 김치에서 분리한 유산균인 *Leuconostoc fallax* LH3의 β-glucosidase 활성을 이용하여 인삼의 major 사포닌을 minor 사포닌으로 전환하고자 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

인삼잎 사포닌은 중국 Fusong에서 구입하여 사용하였고, 배추김치는 경기도 10개 지역에서 수집하였다. 인삼 사포닌 지표물질 Rb1, F2, Rg3, compound K 및 Rh2는 인삼유전자소재은행에서 분양받아 사용하였고 Rd는 본 연구실에서 분리한 것을 사용하였으며 TLC plate는 60 F-254 Silica gel plate (Merck)를 사용하였고, HPLC 기기는 FUTECS Co., Ltd. NS 3000i system을 사용하였다.

2. Ginsenoside Rd의 분리

Ginsenoside Rd는 C18 column과 silica gel 60 column을 사용하여 인삼잎 사포닌으로부터 분리하였다. 인삼잎 사포닌 1 g을 MeOH에 녹인 후 먼저 flash chromatography system (RP-18, 컬럼은 Discovery® supelco, Φ4.6 ㎜ × 25 ㎝)을 이용하여 acetonitrile과 HPLC용 증류수를 이동상으로 실온에서 아래와 같은 gradient 조건으로 분리하였다. 처음에 10% acetonitrile로 시작하여 20분까지는 30%로 순차적으로 늘려주었으며, 20분에서 30분까지는 30%를 유지시켰고, 30분에서 45분까지 45%로 순차적으로 늘려주었으며, 45분에서 50분까지 45%를 유지하였으며, 50분에서 60분까지는 52% acetonitrile로 순차적으로 늘려주었고, 유속은 분당 10 ㎖, 분액 당 10 ㎖씩 받았다. TLC 분석을 통하여 ginsenoside Rd가 함유된 분획들은 모아 감압 농축하고 잔여물은 silica gel 60 column (Φ5 × 50 ㎝)에 다시 흡착시켜 $CHCl_3/CH_3OH$ (7 : 3, v/v)인 혼합용매를 이동상으로 25 ㎖씩 분취한 후 ginsenoside Rd로 순수하게 분리된 분액만 감압 농축하여 반응기질로 사용하였다.

3. 유산균 분리

10개 지역에서 수집한 배추김치 시료를 멸균수로 10^{-1}~10^{-3} 희석하고 MRS agar plate에 100 ㎕씩 smear한 후 30℃에서 24 h 배양하여 유산균을 100주 분리하였다. 분리된 유산균들은 esculin agar법 (Wang *et al.*, 1983)을 이용하여 β-glucosidase 활성 균주를 선발하였다.

4. 효소의 조제

Esculin 방법을 이용하여 김치에서 분리한 β-glucosidase 활성 *Leuconostoc fallax* LH3균주를 MRS 배지를 사용하여 30℃, 190 rpm에서 현탁 배양하였다. 균배양액은 4℃에서 15,000 × g로 10분 원심분리 하여 세포를 제거하고 상층액은 4배의 냉각 EtOH을 첨가하여 충분히 혼합시킨 후 0℃에서 40분 방치하여 단백질을 침전시켰다. 위 용액은 4℃에서 10,000 × g로 40분 원심분리 후 상층액은 버리고 침전물은 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 용해시켜 조효소액으로 사용하였다.

5. Ginsenoside Rd의 전환

Leuconostoc fallax LH3 균주를 MRS broth에서 $O.D_{600}$ 값 (0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.00)별로 배양한 후 위와 같은 방법으로 조효소액을 조제하였다. 각각의 조효소액은 0.2 mM ginsenoside Rd와 1 : 2 (v/v)의 비율로 혼합하고 30℃, 190 rpm에서 60시간 반응시켰다. 반응과정 중 12시간 간격으로 반응혼합물을 1.5 ㎖씩 취하여 동량의 수포화부탄올로 추출하고 TLC plate에 점적하여 Rd의 전환여부를 확인하였다. 점적한 TLC plate를 $CHCl_3/CH_3OH/H_2O$ (65 : 35 : 10, v/v, 하층) 혼합용매로 5.5 ㎝ 전개한 후 10% H_2SO_4를 분무하여 가열을 통해 발색시켰다.

6. HPLC 분석

반응물의 수포화부탄올 추출용액은 감압농축한 후 HPLC용 메탄올에 용해하고 0.45 ㎛ membrane filter로 여과하여 분석용으로 하였다. HPLC 분석 column은 C18 (250 × 4.6 ㎜, ID 5 ㎛)을, 시료주입양은 25 ㎕, 이동상은 acetonitrile (solvent A)과 증류수 (solvent B)의 gradient 조건을 이용하였고 유속은 1.6 ㎖/분, UV detector로 203 ㎚에서 측정하였다. Gradient 조건은 solvent A/solvent B: 15/85, 21/79, 58/42, 90/10, 90/10, 15/85, 15/85; run time: 0-5, 5-25, 25-70, 70-72, 72-82, 82-84, 84-100 분으로 하였다.

결과 및 고찰

1. β-glucosidase 생산균주의 동정

Esculin 방법을 이용하여 김치에서 분리한 β-glucosidase 활성을 가진 strain LH3 균주의 16S-rRNA 염기서열 분석결과는 Fig. 1에 나타냈다. LH3 균주의 16S rRNA sequence를 NCBI에서 BLAST를 이용하여 등록된 균주들과의 상동성을 비교한 결과 *Leuconostoc*과 가장 높은 상동성을 나타내었다.

Leuconostoc genus 내에 속해있는 모든 species들의 type strain의 16S rRNA gene 염기서열을 조사하여 Bioedit program과 Clustal X program을 이용하여 alignment한 후 MEGA3 program으로 phylogenetic tree를 그려 본 후, 이들 중 LH3 균주와 가까운 유연관계에 있는 species들을 선별하여 다시 phylogenetic tree를 작성하였다 (Fig. 2). LH3 균주는 *Leuconostoc fallax* DSM 20189^T (S63851)와 99% 상동성을 나타내어 *Leuconostoc fallax* LH3으로 동정하였다.

2. TLC 분석에 의한 ginsenoside pattern 조사

Leuconostoc fallax LH3 균주를 MRS broth에서 호기성 조건하에서 30℃, 190 rpm에서 배양하면서 균의 생장 정도를 관찰하였다 (Fig. 3A). *Leuconostoc fallax* LH3 균주를 MRS broth에서 각각 $O.D_{600}$ 값 (0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0)별로 배양한 후 조효소액을 조제하여 0.2 mM ginsenoside Rd와 60시간 반응시켜 TLC로 분석한 결과 대부분 ginsenoside F2로의 전환을 확인할 수 있었다 (Fig. 3B). 특히 $O.D_{600}$값 1.25~1.75 사이에서 가장 높은 ginsenoside F2의 생산 활성을 관찰할 수 있었다. 따라서 ginsenoside Rd에서 ginsenoside F2로의 전환효소의 최적 활성 조건은 대수기 후기 상태, 즉 $O.D_{600}$값이 1.25~1.75 범위에서 효소를 조제하는 것이 적합할 것으로 사료된다.

반응시간에 따른 ginsenoside Rd의 전환을 Fig. 4에 나타내었다. 반응 24시간 이후부터 ginsenoside Rd는 ginsenoside F2로 전환되기 시작하였으며 60시간 이후 ginsenoside Rd는 전부 분해되어 대부분 ginsenoside F2로 전환되는 것을 관찰할 수 있었다.

3. HPLC에 의한 ginsenoside Rd의 전환

Leuconostoc fallax LH3이 생산하는 효소에 의한 ginsenoside Rd의 전환을 HPLC를 이용하여 확인하였다. Fig. 5의 A,

```
   1  CGACGAACAC  AAGAGGCTCG  TCCGAAGTTA  CCCCCGGCTT  TGGGTGTTAC  AAACTCTCAT
  61  GGTGGTGAGG  GGCGGTGTGT  ACAAGACCCG  GGAACGTATT  CACCGCGGCA  TGCTGATCCG
 121  CGATTACTAG  CGATTCCGAC  TCATGTAGTC  GAGTTGCAGA  CTACAATCCG  AACTGAGACG
 181  TACTTTAAGA  GATTAGCTTA  CCGTCGCCGG  TTCGCAACTC  GTTGTATACG  CGGTTTGTCA
 241  CCGGCAGTCT  GTCTAGAGTG  CCCAACTAAA  TGCTGGCAAC  TAAACATAAG  GGTTGCGCTC
 301  GTTGCGGGAC  TTAACCCAAC  ATCTCACGAC  ACGAGCTGAC  GACGACCATG  CACCACCTGT
 361  CACTTTGTCT  CCGAAGAGAA  CAATATTATC  TCTAACATCT  TCAAAGGATG  TCAAGACCTG
 421  GTAAGGTTCT  TCGCGTTGCT  TCGAATTAAA  CCACATGCTC  CACCGCTTGT  GCGGGTCCCC
 481  GTCAATTCCT  TTGAGTTTCA  ACCTTGCGGT  CGTACTCCCC  AGGCGGAGTG  CTTAATGCGT
 541  TAGCTCCGGC  ACTAAGAGGC  GGAAACCTCC  TAACACCTAG  CACTCATCGT  TTACGGTGTG
 601  GACTACCAGG  GTATCTAATC  CTGTTTGCTA  CCCACACTTT  CGAGCCTCAA  CGTCAGTTAC
 661  AGTCCAGCAA  GCCGCCTTCG  CCACTGGTGT  TCTTCCATAT  ATCTACGCAT  TCCACCGCTA
 721  CACATGGAGT  TCCACTTGCC  TCTACTGCAC  TCAAGTTCGC  CAGTTTCCAA  AGCCATTCCA
 781  CAGTTGAGCT  GTGGGCTTTC  ACTTCAGACT  TAACGAACCG  TCTGCGCTCG  CTTTACGCCC
 841  AATAAATCCG  GATAACGCTC  GGGACATACG  TATTACCGCG  GCTGCTGGCA  CGTATTTAGC
 901  CGTCCCTTTC  TGGTATGGTA  CCGTCACATT  AATATCATTT  CCTACATTAA  CTATTCTTCC
 961  CATACAACAG  TGCTTTACGA  CCCGAAAGCC  TTCATCACAC  ACGCGGCGTT  GCTCCATCAG
1021  GCTTGCGCCC  ATTGTGGAAA  ATTCCCTACT  GCAGCCTCCC  GTAGGAGTTT  GGGCCGTGTC
1081  TCAGTCCCAA  TGTGGCCGAT  CAGTCTCTCA  ACTCGGCTAT  GCATCATCGT  CTTGGTAAGC
1141  CTTTACCTCA  CCAACTAACT  AATGCACCGC  GGATCCATCT  CTAAGTGAGG  CCGAAGCCCC
1201  TTTTAAACAC  ACTTCATGCG  AATGTGTTGT  TATACGGTAT  TAGCATCTGT  TTCCAAATGT
1261  ATCCCCTGCT  TAGAGGCAGG  TTGTCCACGT  GTTACTCACC  CGTTCGCCAC  TCTAGCCATA
1321  TGCTTTACGT  CTCACCGAAG  TGATCAGGTC  CGCGACTAGC  GTCGACTGCA  TTTTTGCGCC
1381  GCCTT
```

Fig. 1. 16S rRNA gene sequence of strain LH3.

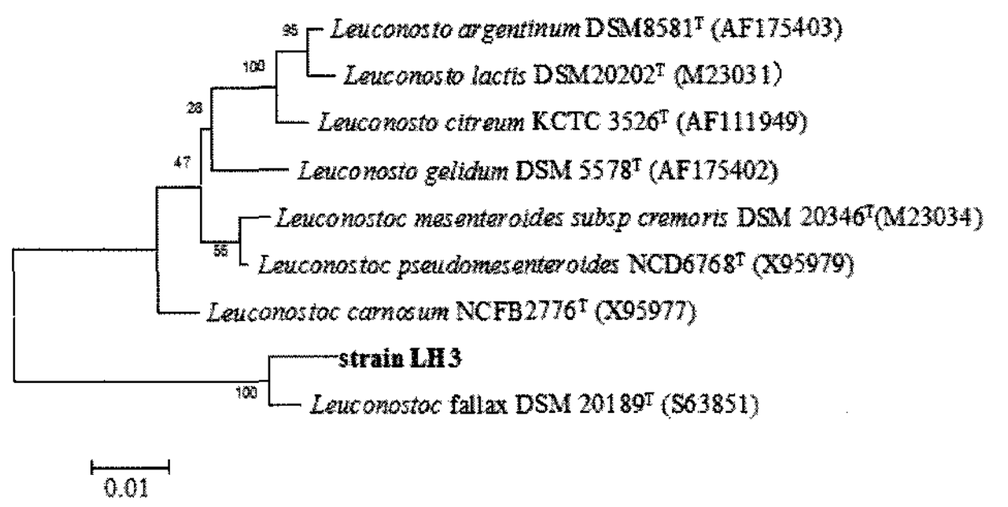

Fig. 2. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence, showing the phylogenetic relationships between strain LH3 and related species.

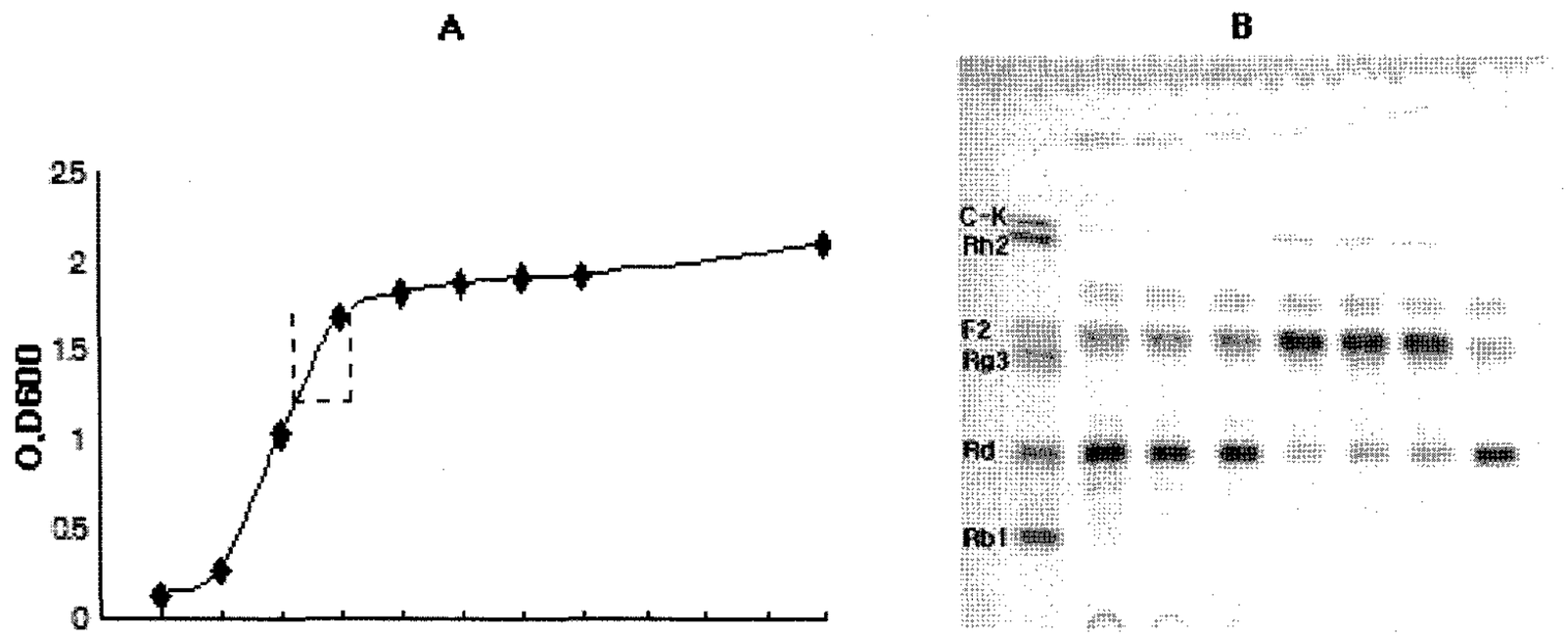

Fig. 3. Growth curve and its enzymatic transformation of ginsenoside Rd to ginsenoside F2 by *Leuconostoc fallax* LH3. A: growth curve of *Leuconostoc fallax* LH3 measured at $O.D_{600}$; B: TLC analysis of transformed ginsenoside F2 using the enzymes from *Leuconostoc fallax* LH3 incubated various $O.D_{600}$. Developing solvent: $CHCl_3/CH_3OH/H_2O$ (65:35:10, by vol., lower phase). S: saponin standars.

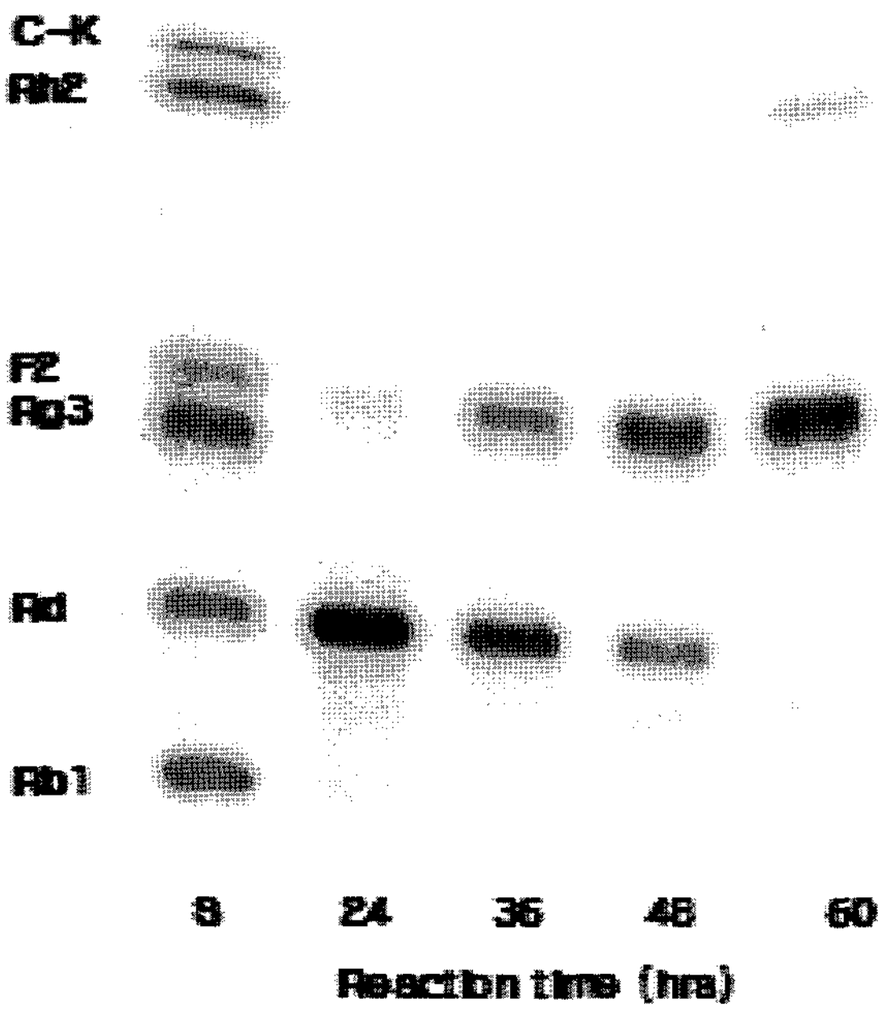

Fig. 4. TLC of time-course transformation of ginsenoside Rd by the crude enzyme of *Leuconostoc fallax* LH3 at 30℃; pH 7.0. Developing solvent: $CHCl_3/CH_3OH/H_2O$(65:35:10, by vol., lower phase). S: saponin standards.

B, C는 각각 반응 24시간, 반응 48시간, 반응 60시간의 HPLC 분석 결과로, 시간이 경과될수록 ginsenoside Rd (retention time 46분)의 peak가 감소하여 retention time이 53분인 사포닌으로 전환되기 시작하였다. Retention time 53분에 나타난 peak의 분해산물은 ginsenoside F2이며, Fig. 5C에서 반응 60시간 이후에는 ginsenoside Rd는 대부분 ginsenoside F2로 전환되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 *Leuconostoc fallax* LH3이 생산하는 효소는 ginsenoside Rd의 C-3위치에 결합되어 있는 2분자의 glucose 중 terminal glucose를 분해하여 ginsenoside F2로 전환하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 6).

4. 효소활성에 미치는 온도의 영향

Ginsenoside Rd의 F2로의 전환효소의 최적 반응 온도를 알

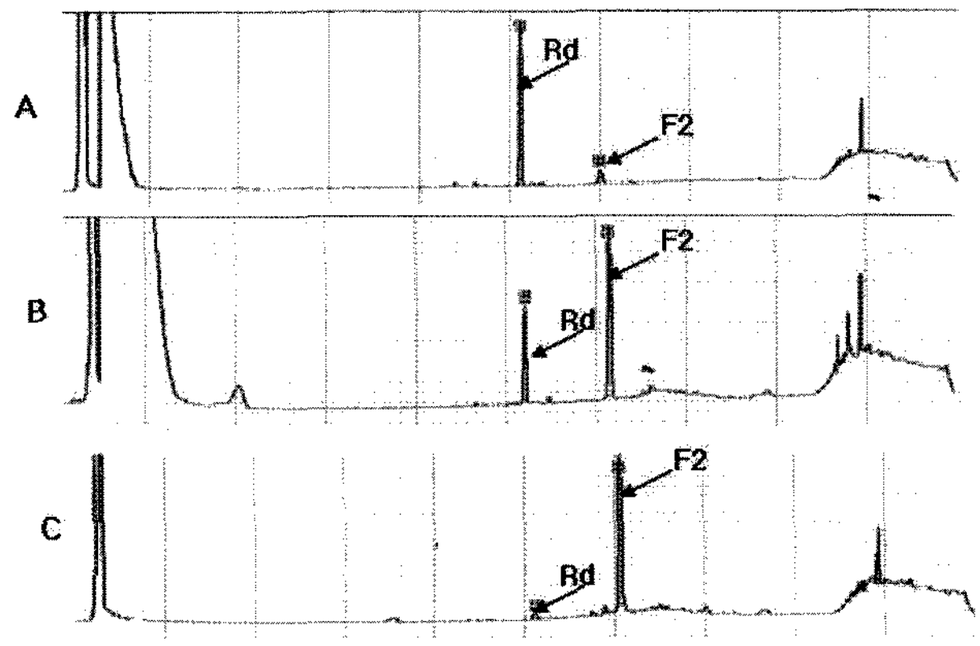

Fig. 5. HPLC profile of the metabolites of ginsenoside Rd transformed by *Leuconostoc fallax* LH3. *Leuconostoc fallax* LH3 crude enzyme with 0.2 mM ginsenoside Rd and then incubated for 24 h (A), 48 h (B) and 60 h (C) extracted by n-BuOH, evaporated vacuo and analyzed by HPLC after dissolved in MeOH.

기 위해 온도 별로 (25℃, 30℃, 35℃, 40℃, 50℃, 60℃) 60시간 반응시켜 그 결과를 확인하였다(Fig. 7). *Leuconostoc fallax* LH3의 조효소액과 Rd의 반응은 Fig. 7에서 보다시피 온도의 영향을 크게 받는다. TLC분석에서 LH3의 조효소액의 활성은 30℃에서 가장 뛰어나며, 25℃와 35℃ 이상의 온도에서는 효소의 활성이 급격히 저하되는 것을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 7A). 효소에 의한 반응은 일반 화학반응에 비해 활성화 에너지가 매우 크다. 따라서 온도가 낮으면 반응에 필요한 에너지의 부족으로 인하여 효소가 제대로 촉매작용을 할 수 없으며 높은 온도에서는 효소가 열변성이 일어나 활성을 잃게 된다.

온도 별 반응산물을 HPLC를 통하여 정량분석을 수행한 결과 TLC 분석과 유사한 경향을 나타내었다 (Fig. 7B). 즉 효소의 활성은 30℃에서 가장 높은 활성을 보였고 25℃ 이하 및 35℃ 이상의 온도에서는 활성이 급격히 낮아지는 것을 알 수 있었다. 이는 인삼사포닌의 가수분해효소인 *Rhizopus japonicas* 유래 β-glucosidase의 최적온도는 45℃ (Kim & Seu, 1989), *Aspergillus niger* 48 g 및 *A. niger* 848 g 유래

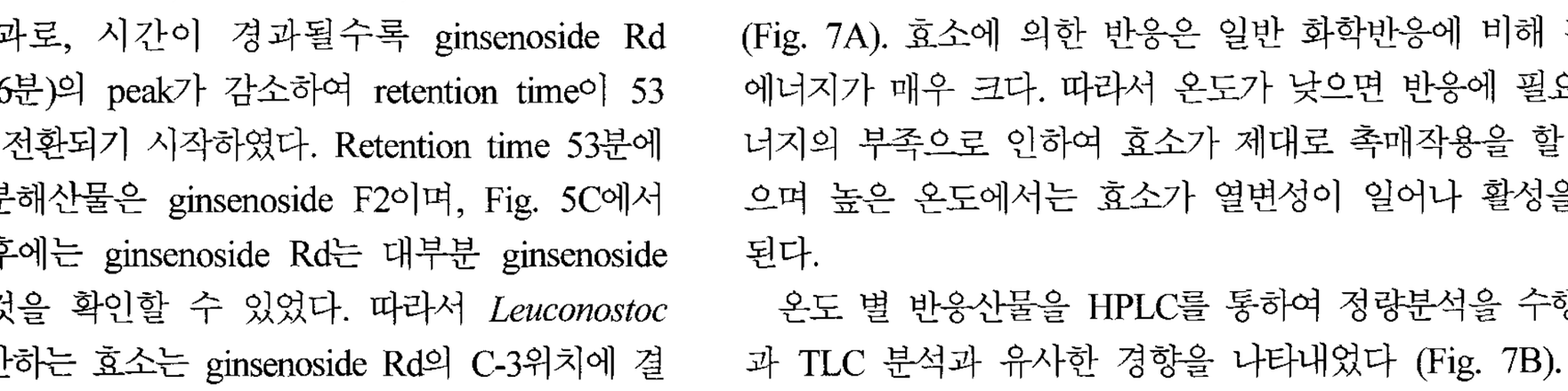

Fig. 6. Proposed transformation pathway of ginsenoside Rd to F2 by the crude enzyme of *Leuconostoc fallax* LH3.

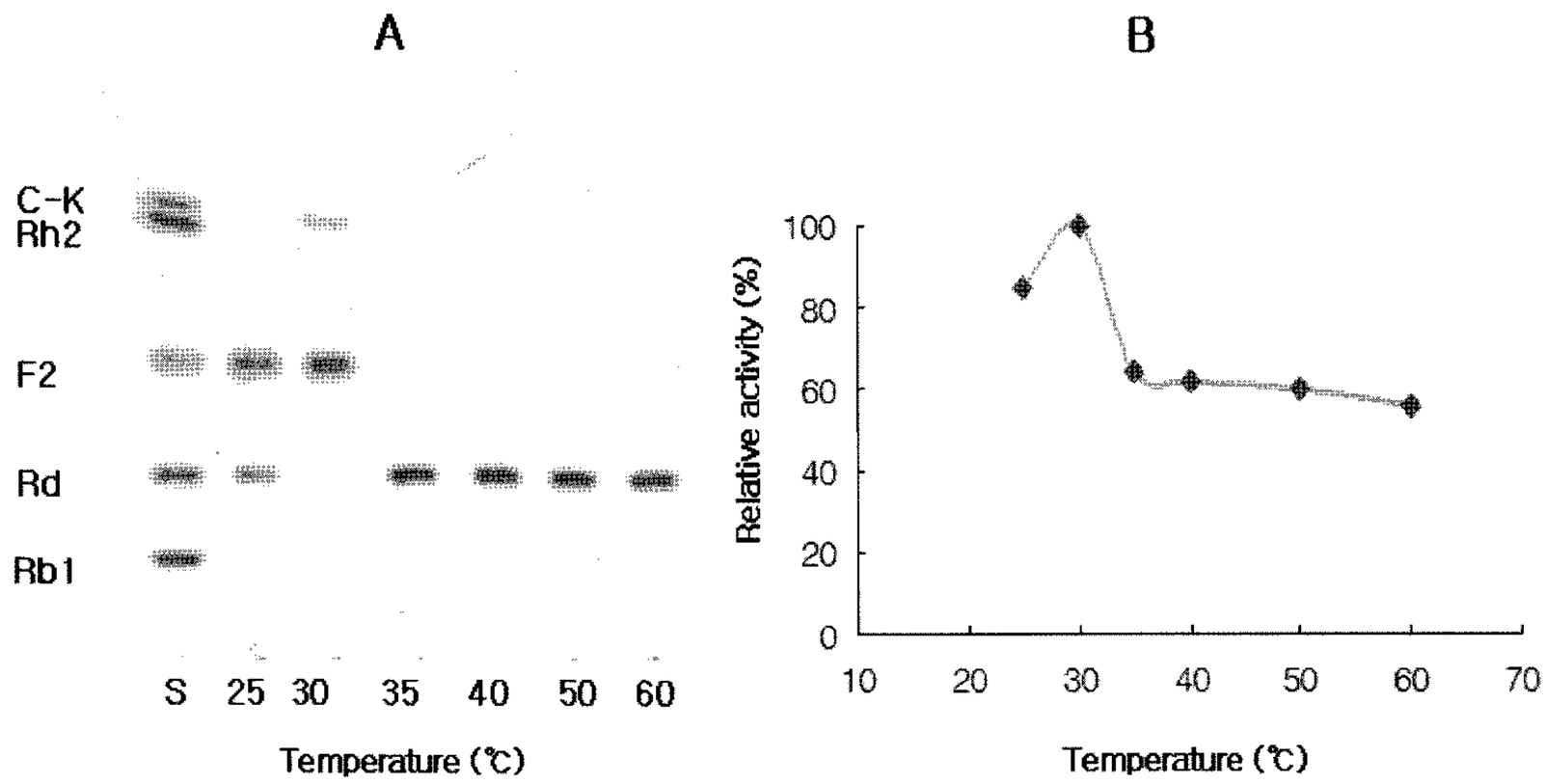

Fig. 7. Effects of incubation temperature on the enzyme activity of producing ginsenoside F2 (A), and relative activity of an enzyme producing ginsenoside F2 at different temperatures (B).

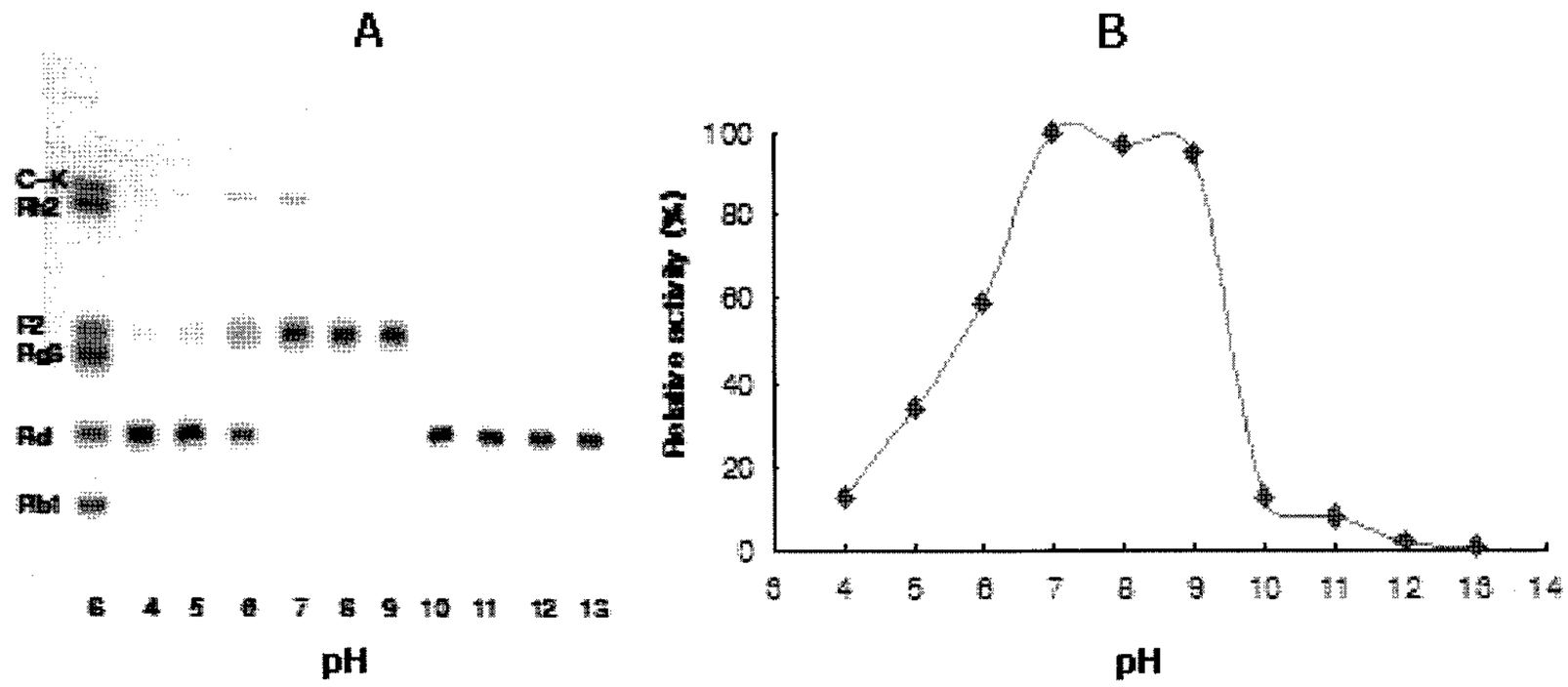

Fig. 8. Effects of pH (4~13) on the enzyme activity producing ginsenoside F2 (A), and relative activity of an enzyme producing ginsenoside F2 on different pH (B).

β-glucosidase의 최적온도는 40℃ (Zhang *et al.*, 2003), 그리고 일반적인 β-glucosidase들의 최적반응온도가 40~50℃인 기존의 보고들 (Sano *et al.*, 1975; Yoshioka & Hayashida, 1980)과 달리 약간 낮은 온도를 나타내었다.

5. 효소활성에 미치는 pH의 영향

Fig. 8A는 LH3의 조효소액의 활성에 대한 pH의 영향으로 TLC상에서 pH 7.0에서 9.0 사이에서 그 활성도가 가장 좋았다. pH별 반응산물을 정량 분석하여 상대적인 활성으로 환산하여 Fig. 8B에 나타냈다. LH3의 조효소액은 pH 7.0-9.0에서 높은 활성을 나타내었고 그중 pH 7.0 가장 높은 ginsenoside F2로의 전환활성을 나타내었으며, pH 6.0 이하 및 pH 9.0 이상에서는 활성도가 60% 이하로 떨어지는 것을 관찰할 수 있었다. 이것은 이미 알려진 인삼사포닌 가수분해효소인 *Aspergillus niger* 48 g 및 *A. niger* 848 g 유래 β-glucosidase의 최적 pH는 5.0 (Zhang *et al.*, 2003), *Rhizopus japonicas* 유래 β-glucosidase의 최적 pH는 4.8에서 5.0 (Kim & Seu, 1989), *Fusobacterium* K-60유래 β-glucosidase의 최적 pH는 6.0 (Park *et al.*, 2001), 및 인삼유래 β-glucosidase의 최적 pH는 5.0 (Zhang *et al.*, 2001) 등의 연구결과와는 차이를 나타내었다.

적 요

인삼사포닌 ginsenoside는 인삼의 주요한 약리성분으로 인삼을 경구투여 시 major 사포닌의 생체 내에서의 흡수는 매우

낮아 인삼사포닌의 약효를 증대시키기 위해서 기존에 많이 존재하는 major 사포닌을 상대적으로 흡수도 잘 되며 약효도 더 뛰여난 minor 사포닌으로의 전환이 요구된다. 본 연구는 김치에서 분리한 β-glucosidase 활성균주 *Leuconostoc fallax* LH3이 분비하는 효소를 이용하여 ginsenoside Rd를 F2로 전환시켰다. *Leuconostoc fallax* LH3의 조효소액은 반응 온도 30℃에서 효소활성이 가장 좋았고 35℃ 이상에서는 활성이 급격히 저하되었으며, pH 7.0~9.0 사이에서 효소활성이 가장 좋았으며 pH 6.0 이하 및 pH 9.0 이상에서는 활성도가 떨어지는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 ginsenoside Rd는 반응 24시간부터 ginsenoside F2로 전환되기 시작하였으고, 반응시간 60 h 이후에는 대부분 ginsenoside F2로 전환되었다.

사 사

본 연구는 경희대학교 고려인삼명품화 사업단 및 인삼유전자원소재은행의 지원으로 수행되었습니다. 이에 감사합니다.

LITERATURE CITED

Benishin CG (1992) Actions of ginsenoside Rb1 on choline uptake in central cholinergic nerve endings. Neurochem. Int. 21(1):1-5.

Brekhman II (1976) Ancient ginseng and pharmacology. In:Proc. Symp. Gerontology, Lugano, Switzerland., p. 6.

Chi H, Ji GE (2005a) Transformation of ginsenosides Rb1 and Re from *Panax ginseng* by food microorganisms. Biotechnol Lett. 27(11):765-771.

Chi H, Kim DH, Ji GE (2005b) Transformation of ginsenosides Rb2 and Rc from *Panax ginseng* by food microorganisms. Biol Pharm Bull. 28(11):2102-2105.

Chung CM, Shin JS (2006) Comparison of quality on the raw and red ginseng in Korean and American ginseng. Korean J. Medicinal Crop Sci. 14(3):183-187.

Huo Y, Chen Y (1998) The effect of *Panax ginseng* extract(GS) on insulin and corticosteroid receptors. J. Traditional Chinese Medicine. 8(4):293-295.

Kang SY, Kim ND (1992) The antihypertensive effect of red ginseng saponin and the endothelium-derived vascular relaxtion. Korean J. Ginseng Sci. 18:175-182.

Karikura M, Miyase T, Tanizawa H, Taniyama T, Takino Y (1991) Studies on absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. VI. The decomposition products of ginsenoside Rb2 in the stomach of rats. Chem Pharm Bull (Tokyo). 39(2):400-404.

Kikuchi Y, Sasa H, Kita T, Hirata J, Tode T (1991) Inhibition of human ovarian cancer cell proliferation *in vitro* by ginsenoside-Rh2 and adjuvant effects of cisplatin *in vivo*. Anticancer Drugs(England). 2(1):63-67.

Kim CS, Jang DS, Che SY (2006) Histological characteristics of Korean red ginseng in steaming processes. Korean J. Medicinal Crop Sci. 14(1):36-40.

Kim HY, Chen X, Gillis CN (1992) Ginsenosides protect pulmonary vascular endothelium against free radical induced injury. Biochem. Biophys. Res. Comm. 189(2):670-676.

Kim SD, Seu JH (1989) Enzymatic properties of the convertible enzyme of ginseng asaponin produced from *Rhizopus japonicus*. Kor. J. App. Microbiol Bioeng. 17(2):126-130.

Mei B, Wang YE, Wu Jx, Chen WZ (1994) Protective effect of ginsenosides on oxygen free radical induced damages of cultured vascular endothelial cells *in vitro*. Yao Hsueh Hsuuh Pao. 29(11):801-808.

Ogita S, Samugawa K (1994) Clinical effectiveness of Korea ginseng on patients with climacteric disturbances. The Ginseng Review. 18:95-97.

Oura H, Hiai S (1973) Physiological chemistry of ginseng. Metabolism Disease. 10:564-569.

Park SY, Bae EA, Sung JH, Lee SK, Kim DH (2001) Purification and characterization of ginsenoside Rb1-metabolizing beta-glucosidase from *Fusobacterium* K-60, a human intestinal anaerobic bacterium.. Biosci Biotechnol Biochem. 65(5):1163-1169.

Saito H, Nishiyama N (1988) Effect of ginseng and its saponins on experimental amnesis in mice and on cell cultures of neurons. In: Proc. 5th Int'l. Ginseng Symp. Seoul, Korea., p. 92-98.

Saito H, Bao TT (1984) Effect of red ginseng on mice exposed to various stress. In: Proc. 4th Int'l. Ginseng Symp. Seoul, Korea., p. 97-105.

Sano K, Amemura A, Harada T (1975) Purification and properties of a beta-1,6-glucosidase from *Flavobacterium*. Biochim. Biophys. Acta. 377(2):410-420.

Singh VK, Agarwal SS, Gupta BM (1984) Immunomodulatory activity of *Panax ginseng* extract. In: Proc. 4th Int'l. Ginseng Symp. Seoul, Korea., p. 225-232.

Takino Y (1994) Studies on the pharmacodynamics of ginsenoside-Rg1, -Rb1 and -Rb2 in rats. Yakugaku Zasshi. 114(8):550-564.

Tanizawa H, Karikuma M, Miyase T, Takono Y (1993) Studies on the metabolism and/or decomposition and distribution of ginsenoside Rb2 in rats. Proc. 6th Int. Ginseng Symp. Seoul., p. 187-194.

Wang BX, Cui JC, Liu AJ, Wu SK (1983) Studies on the anti-fatigue effect of the saponins of stems and leaves of *Panax ginseng* (SSLG). J Tradit Chin Med. 3(2):89-94.

Xu QF, Fang XL, Chen DF (2003) Pharmacokinetics and bioavailability of ginsenoside Rb1 and Rg1 from *Panax notoginseng* in rats. J Ethnopharmacol. 84(2-3):187-192.

Yoshioka H, Hayashida S (1980) Purification and properties of β-glucosidase from *Humicola insolens* YH-8. Agr. Biol. Chem. 44:1729-1735.

Zhang C, Yu H, Bao Y, An L, Jin F (2001) Purification and characterization of ginsenoside-beta-glucosidase from ginseng. Chem Pharm Bull. 49(7):795-798.

Zhang D, Liu YP, Yu HS, Jin FX, Chen GX (2003) Purification of ginsenoside β-glucosidase hydrolase and its characteristics. Ying Yong Yu Huan Jing Sheng Wu Xue Bao. 9(3):259-262.