

인삼 토양 미생물 *Cellulosimicrobium* sp. Gsoil 235의 배지조성에 따른 Ginsenoside Rb₁ 전환

나주련 · 김유진 · 김세화 · 김호빈 · 심주선 · 김세영 · 양덕춘*
경희대학교 고려인삼명품화사업단 및 인삼유전자원소재은행

Conversion of Ginsenoside Rb₁ by Ginseng Soil Bacterium *Cellulosimicrobium* sp. Gsoil 235 According to Various Culture Broths. Na, Ju-Ryun, Yu-Jin Kim, Se-Hwa Kim, Ho-Bin Kim, Ju-Sun Shim, Se-Young Kim, and Deok-Chun Yang*. Korean Ginseng Center Most Valuable Products and Ginseng Genetic Resource Bank, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Korea – Ginseng saponins (a secondary metabolite, termed ginsenosides) are the principal bioactive ingredients of ginseng, and modification of the sugar chains may markedly change the its biological activity. One of soil bacteria having β -glucosidase (to transform ginsenoside Rb₁) activity was isolated from soil of a ginseng field in Daejeon. 16S rRNA gene sequence analysis revealed that the isolate belonged to the genus *Cellulosimicrobium*, with highest sequence similarity (99.7%) to *Cellulosimicrobium funkei* ATCC BAA-886^T. The strain, Gsoil 235, could transform ginsenoside Rb₁ into Rd, Rg₃ and 3 of un-known ginsenosides by the analyses of TLC, HPLC. By investigating its deglycosylation progress, the optimal broth for β -glucosidase was nutrient broth (In 48 hours, almost ginsenoside Rb₁ could be transformed into minor ginsenosides). On the contrary, the optimal broth for growth was determined as tryptic soy broth (TSB).

Key words : *Panax ginseng* C. A. Meyer, *Cellulosimicrobium* sp., conversion, ginsenoside Rb₁, ginsenoside Rg₃, TLC, HPLC

서 론

고려인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 오가과(Araliaceae)에 속하는 다년생 초본으로 한반도를 비롯한 아시아권 및 시베리아 동부에 걸쳐 자생하는 약용식물이다. 인삼의 주요 약리 성분인 인삼사포닌(ginsenoside)은 triterpenoid 계열의 dammarane 골격인 비당부분(aglycone)에 glucose, arabinose, xylose 및 rhamnose 등이 결합한 중성배당체로 비당부분의 수산기(-OH) 수에 따라 PPD(protopanaxadiol)과 PPT(protopanaxatriol)계 등의 사포닌으로 나누어진다. 각종 분리기술 및 기기분석의 발달로 다양한 ginsenoside의 분리가 가능하게 되었으며, 지금까지 약 40여종의 사포닌이 고려인삼에서 분리되었다[18]. 이를 이용하여 각각의 ginsenoside에 대한 다양한 효능이 밝혀짐에 따라서 산처리[4], 염기처리[2], 열처리[11], 미생물[5] 및 효소[22]를 사용하여 소량이지만 뛰어난 약리 효능을 가지고 있는 새로운 ginsenoside로 전환하여 인삼 및 인삼함유 제품을 제조함으로써 인삼을 고부가가치화 하는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 이 중 미생물, 효소를 이용한 생물학적 방법을 이용한

사포닌 전환은 에피머화(epimerization), 수산화반응(hydroxylation) 등과 같은 부반응 및 환경오염이 발생하지 않으며, Lee 등[13], Chi 등[3]의 연구에 따르면 미생물의 종류에 따라 사포닌의 전환산물 및 그 경로가 다양하여, 특정 사포닌을 선택적으로 생산하는데 있어 생물학적 방법이 매우 유용할 것으로 예상된다. Kim 등[8]은 배지 종류 및 저장 조건에 따른 부유 세균 시료의 채취 효율에 대한 연구를 수행한 바 있으며, Lee 등[14]은 *Propionibacteria*를 배양 시 Yeast extract의 첨가가 propionic acid의 생산 증대에 영향을 미친다고 하였다. 또한 Moon 등[17]은 공작고사리의 기내 포자 발아에 미치는 배지의 영향에 대하여 연구가 보고되고 있다.

이처럼 배지의 종류 및 성분에 의해 성장 및 생리활성의 변화가 관찰되는 바, 본 연구에서는 ginsenoside Rb₁의 글리코시드 결합을 끊는 β -glucosidase 활성을 가진 균주를 인삼토양에서 분리 및 동정하고, 다양한 배지를 이용하여 미생물의 성장 및 사포닌 전환활성을 조사하고자 수행하였던 바, 이에 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용한 ginsenoside Rb₁은 경기도 파주 연천의 6년근 인삼을 건조시킨 후 메탄올로 추출하였으며, standard

*Corresponding author
Tel: 82-31-201-2688, Fax: 82-31-202-2687
E-mail: dcyang@khu.ac.kr

로 사용한 Rb₁, Rd, Rg₃, Rh₂, compound-K는 (전) 한국인삼연구소에서 분양받아 사용하였으며, F₂는 본 실험실에서 분리하여 사용하였다. R2A, nutrient broth(NB), Luria-Bertani broth(LB) 및 tryptic soy broth(TSB)는 Difco Co. (USA)에서 구입하였으며, TLC는 Silica gel 60 F₂₅₄ plate (Merck Co., USA)를, HPLC는 Integrated NS 3000i HPLC System(FUTECS Co. Ltd.)을 이용하였으며, HPLC 용 acetonitrile과 water는 SK chemicals(Ulsan, Korea)에서 구입하였다. *p*-nitrophenol, *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside는 Sigma Chemical(USA)에서 구입하여 사용하였다.

균주 분리

인삼사포닌을 분해하는 미생물을 선별하기 위하여 인삼밭과 주변토양으로부터 시료를 채취하여 R2A 고체배지에 도말한 후 colony를 취하여 esculin agar[20]에 streaking하여 β -Glucosidase 활성을 가진 균주를 분리하였으며, 분리된 균주는 액체배양하여 1 mM의 ginsenoside Rb₁과 반응시켜 ginsenoside를 전환시킬 수 있는 균주를 Fig. 1과 같이 선별하였다.

Ginsenoside 변환 미생물의 유연관계 분석

미생물의 유연관계를 분석하기 위하여 16S rRNA sequencing을 제노텍(대전)에 의뢰하여 분석하였으며, NCBI database를 이용하여 분리된 균주와 type strain의 유사도(%)를 확인하였다. 균주들의 16S rRNA 염기서열을 Clustal X program[23]을 이용하여 일정하게 정렬하고 gap는 BioEdit program으로 편집하였다. 균주들의 진화과정을 추적하는 작업은 Kimura two-parameter model[10]을 이용하였고, MEGA

3 Program[12]의 neighbor-joining[21]방법으로 계통분류학적 위치를 결정하였다.

배지에 따른 선발균주의 성장곡선 확인

선발 균주의 colony를 취하여 멸균된 LB 액체배지에 24 시간 동안 배양하여 600 nm에서 O.D(Optical Density)값을 측정하고, LB, TSB, NB 50 mL에 이를 각각 500 μ L(1%, v/v)씩 접종한 후 160 rpm, 30°C incubator에서 4, 8, 12, 16, 24, 48시간마다 각각의 O.D.값을 측정하여 균주의 성장속도를 확인하였다.

β -Glucosidase활성 측정

β -glucosidase활성은 Peralta 등의 방법[19]을 사용하여 측정하였다. 24 시간 동안 Gsoil 235를 배양한 LB, TSB, NB 배양액을 원심분리하여 균체를 제거한 후 상층액을 조효소액으로 하여 β -Glucosidase 활성을 측정하였다. 효소액은 30°C 항온수조에서 5분간 활성화시켰다. 5 mM *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside를 함유한 25 mM 인산완충용액(pH 7.0) 50 μ L에 효소액 50 μ L을 가하여 30°C에서 5분간 반응시킨 후 100 μ L의 0.5 M sodium phosphate solution으로 반응을 중지시켜 유리되는 *p*-nitrophenol의 양을 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성 1단위(unit)는 반응시간 분당 생성되는 *p*-nitrophenol 1 nmole을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

Ginsenoside Rb₁의 전환

1 mM ginsenoside Rb₁을 0.2 μ m membrane filter로 여과하여 멸균한 후 실험에 사용하였다. LB에서 24시간 동안

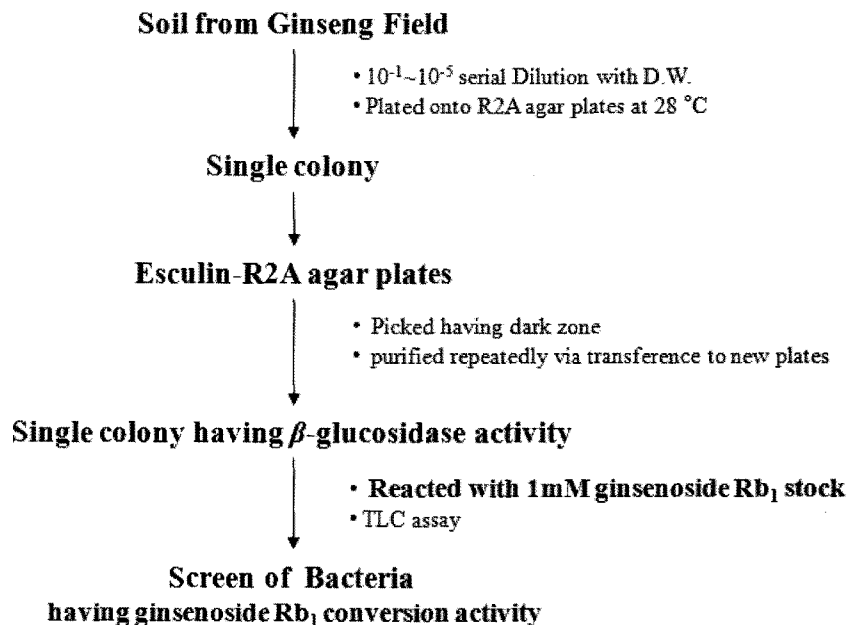


Fig. 1. The processes of screening the strain Gsoil 235 having ginsenoside conversion activity.

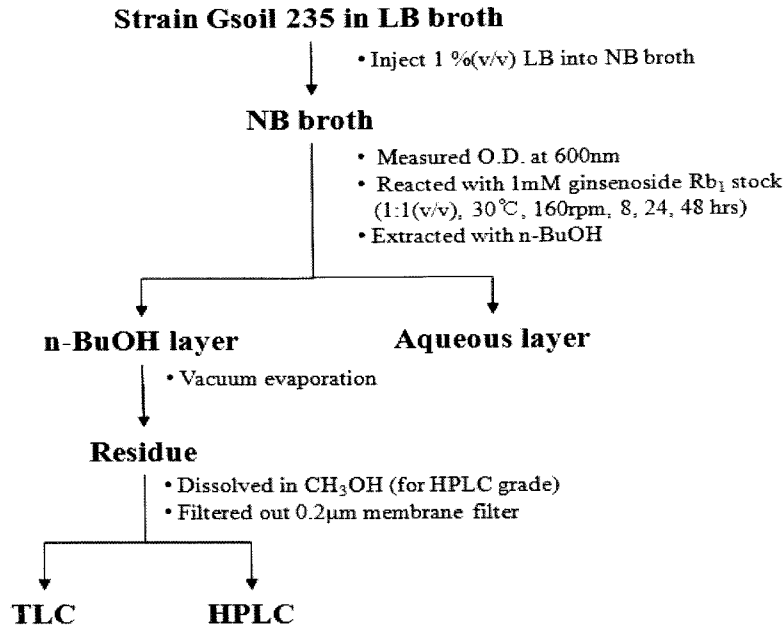


Fig. 2. The processes for preparation of converted ginsenosides from Rb₁.

현탁 배양한 균주를 다시 LB, TSB, NB 배지의 1%(v/v)를 접종하고, 24 시간 배양하였다. Ginsenoside Rb₁과 균배양액을 1:1로 혼합하여 30°C, 160 rpm의 incubator에서 8, 24, 48 시간 동안 반응시켰다. 반응액은 수포화 n-BuOH로 사포닌 성분을 추출하여 분석하였다(Fig. 2). TLC는 CHCl₃:CH₃OH:H₂O (65:35:10, v/v/v, 혼합용매의 하층) 용매로 전개한 후, 10% H₂SO₄를 분무하고 가열하여 발색시켰다. HPLC 분석에는 수포화 n-BuOH로 추출한 사포닌을 농축하여 CH₃OH(HPLC 용, SK 화학)에 용해한 후 0.2 µm membrane filter로 여과한 시료를 사용하였다. 컬럼은 C₁₈(250 × 4.6 mm, ID 5 µm) column을, 용리액은 (A): Acetonitrile(CH₃CN, 100%)와 (B): Water(H₂O, 100%)를 혼합하여 이성분 이동상으로 하였다. Gradient elution 비율(A:B)은 0-5, 5-25, 25-70, 70-72, 72-82, 82-84 및 84-100 min일 때 각각 15:85, 21:79, 58:42, 90:10, 90:10, 15:85 및 15:85로 조절하였다. 이동상의 유속은 1.6 mL/min이었으며, UV detector를 이용하여 203 nm에서 사포닌을 분석하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리

인삼발과 주변 토양으로부터 시료를 채취하여 멸균 증류수에 10⁻¹부터 10⁻⁵ 배수로 희석하여 R2A 고체배지에 도말한 후 colony를 취하여 균주를 선발하였다(Fig. 3-a). Ginsenoside 변환균주를 선발하기 위하여 esculin agar에 streaking하여 변색되는 균주를 재차 선발하였으며(Fig. 3-b), 이를 다시 28°C, R2A 고체배지에서 순수분리 될 때까지 계대배양 하였다. 분리된 균주를 이용하여, 1 mM의 gin-

senoside Rb₁과 반응시켜 ginsenoside를 전환시킬 수 있는 균주를 선택적으로 선발, 이중 strain Gsoil 235를 분리하였다(Fig. 3-c). Gsoil 235균주의 16S rRNA 염기서열을 sequencing한 후, NCBI genebank에서 가장 가까운 type strain을 결정하여 유연관계를 분석한 결과, *Cellulosimicrobium funkei* ATCC BAA-886^T(AY501364)와 99.7% 일치하는 것을 확인하였다(Fig. 4). 이를 통해 인삼 토양에서 분리한 균주 Gsoil 235는 그람양성균주로, species *funkei*, genus *Cellulosimicrobium*, family *Promicromonosporaceae*, phylum *Actinobacteria*에 속하는 것을 알 수 있었다. *Cellulosimicrobium funkei* Gsoil 235의 phylogenetic tree는 Fig. 4에서 확인할 수 있다.

배지에 따른 균주의 성장

고체 배지의 순수 분리된 colony를 취하여 멸균된 LB에 24시간 배양하여(O.D.₆₀₀; 1.378), LB, TSB, NB 배지 50 ml에 1%(v/v)씩 접종한 후 일정 시간마다 O.D.₆₀₀값을 측정하여 균주의 성장속도를 확인한 결과(Fig. 5), 대체적으로 모든 배지에서 배양 후 8시간부터 대수 증식기에 접어들어 24 시간 후에 최대 증식을 나타내었다. 흡광도는 접종 후 24시간까지 균이 급격하게 자라는 대수기를 보이며, 그 이후에는 일정한 양상을 보였다. TSB에서 Gsoil 235의 생장은 접종 후 8시간부터 다른 배지에 비해 빠르게 자라며, 특히 NB보다 2배 정도 생장이 뛰어난 것으로 확인되었다. 배양 24시간의 O.D.₆₀₀ 값은 LB에서 1.99, TSB에서 2.46, 그리고 NB에서 1.21로 배지에 따른 균의 증식은 TSB>LB>NB의 순으로 잘 자라는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같이 배지 종류에 따라 생장이 다른 것은 세 종류의 배지가 함유하고

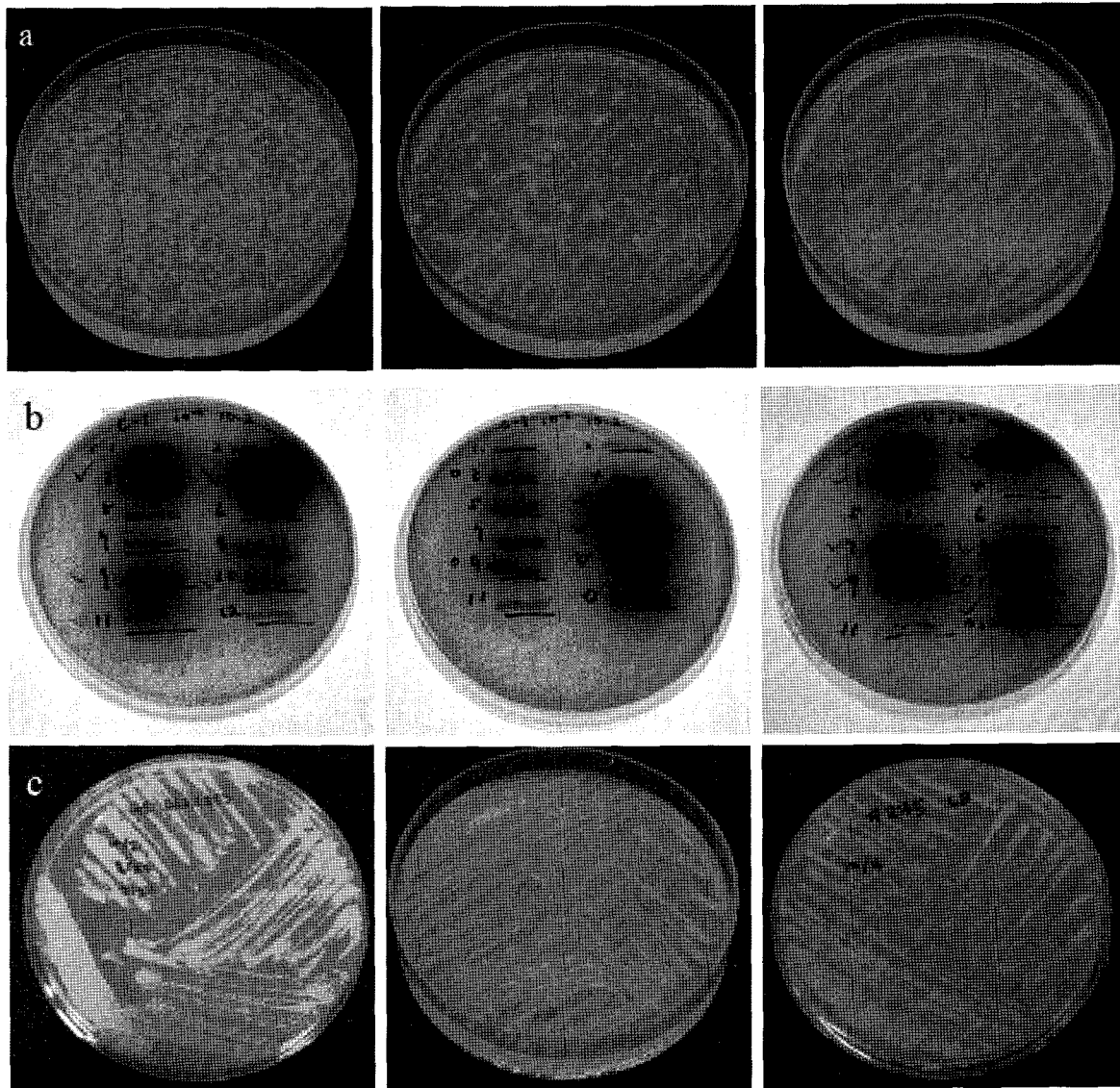


Fig. 3. The agar plates for screening bacteria from ginseng soil. (a) R2A agar smeared ginseng soil sample serially diluted; (b) Transferred strain from (a) to Esculin-R2A agar to check β -glucosidase activity; (c) The purified colonies transforming ginsenoside Rb₁.

있는 탄소원과 질소원의 함유량에 따른 것으로 사료된다. 1 L broth에 용해되는 무기물질 이외의 영양원은 TSB 22.5 g, LB 20 g, NB 8 g으로 함유량에 따라 균주의 생장에 영향을 주는 것으로 사료된다.

Ginsenoside Rb₁의 전환 분석

LB에서 현탁 배양한 균주를 LB, TSB, NB 배지에 1%(v/v)씩 접종하고, 일정 시간 배양한 후 ginsenoside Rb₁과의 반응 및 β -glucosidase의 활성을 측정하였다. 이때의 O.D.₆₀₀값은 TSB; 1.959, LB; 1.770, NB; 1.097이었으며, β -glucosidase의 활성은 LB와 TSB에서 0.18, NB에서 0.15 unit이었다(Data not shown). Fig. 6은 각 배지에서 키운 Gsoil 235와 ginsenoside Rb₁의 시간별 반응을 분석한 TLC로, Rb₁의 분해 및 minor ginsenoside의 생성을 통해 ginseno-

side 전환 능력을 확인한 결과 NB>LB>TSB 순으로 뛰어난 것을 확인하였다. 측정된 β -glucosidase 활성과 다른 결과로 나타났는데 효소의 활성도를 측정 시 균체를 제거한 상층액을 이용하여 측정을 하였으나 ginsenoside Rb₁과의 반응 시에는 균체를 포함한 균주배양액을 이용하여 전환능력을 확인하였다. 균체를 제거한 상층액과 액체질소를 이용하여 cell을 파쇄한 후 얻어낸 세포질 성분을 이용하여 β -glucosidase 활성을 측정된 결과 세포질성분에서 0.55, 상층액에서 0.34 unit으로 확인되었으며 ginsenoside Rb₁과의 반응을 확인한 결과, 효소 활성을 측정된 결과와 같았음을 확인하였다(data not shown). 이는 균체 내의 세포질에 존재하는 β -glucosidase가 세포 외로 분비되면서 ginsenoside 전환에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

균주의 생장이 가장 좋았던 TSB에서의 Rb₁ 전환은 반응

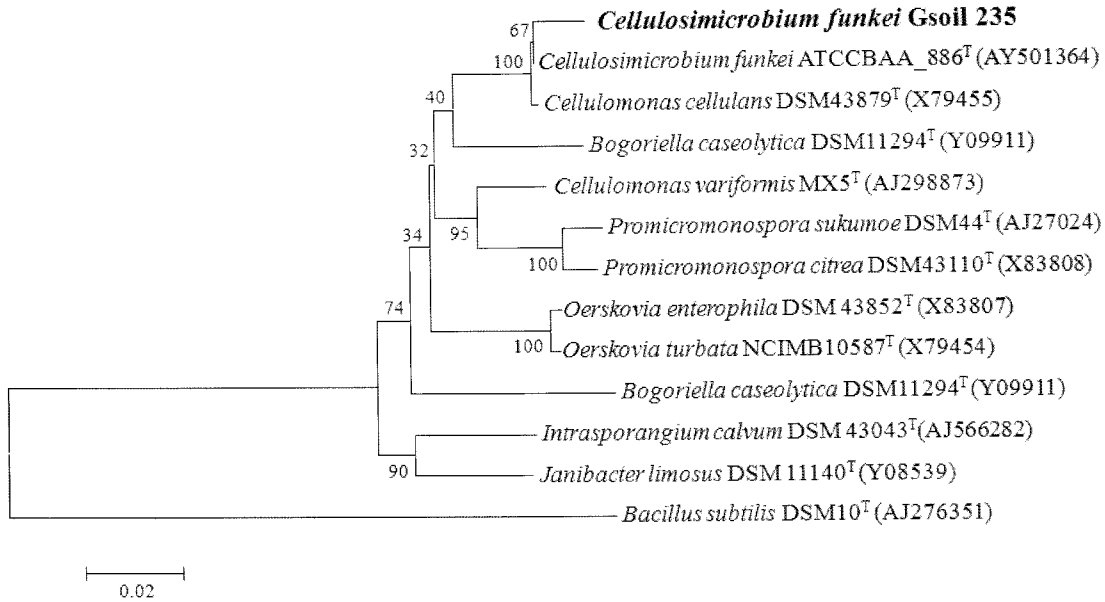


Fig. 4. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence showing by the phylogenetic relationships between strain Gsoil 235 and related genus. The neighbour-joining method was used. Bar; 0.02 substitutions per nucleotide position.

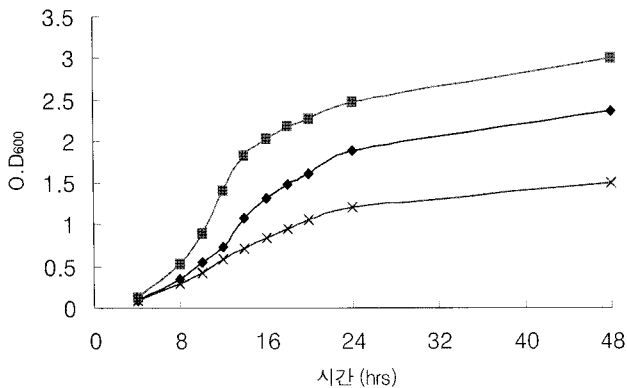


Fig. 5. The Growth Curve of strain Gsoil 235. -◆-, LB; -■-, TSB; -x-, NB.

24시간에서 Rd가 소량 생성되는 것에 비해 NB에서는 8시간 만에 많은 양의 Rd가 생기며, 24시간에는 Rb₁이 거의 분해되어 다른 배지의 것에 비해 Rb₁ band가 희미해지며, minor saponin인 Rg₃와 동일한 R_f 값을 갖는 사포닌을 생성하는 것을 쉽게 확인할 수 있었다. LB에서 자란 균주 또한 24시간에서 Rg₃를 생산하지만 NB의 것에 비해 크게 미치지 못하는 것을 알 수 있었다. NB에서 Rb₁의 전환은 시간이 경과함에 따라, Rd를 거쳐, Rd와 Rg₃의 사이에 있는 미지의 ginsenoside(R_f=0.36)와 Rg₃(R_f=0.42)로, 마지막으로 compound-K보다 조금 더 큰 R_f 값(0.71)을 갖는 미지의 ginsenoside로 전환되는 것을 확인할 수 있다. LB에서의 반응은 NB에 비해 느리지만 Rd를 거쳐 Rg₃를 생성하는 비슷한 경향을 보이며, TSB에서의 반응은 Rd만 확인되어 비교하기 어려운 것으로 보인다. Ginsenoside Rd는 C-20 위치에

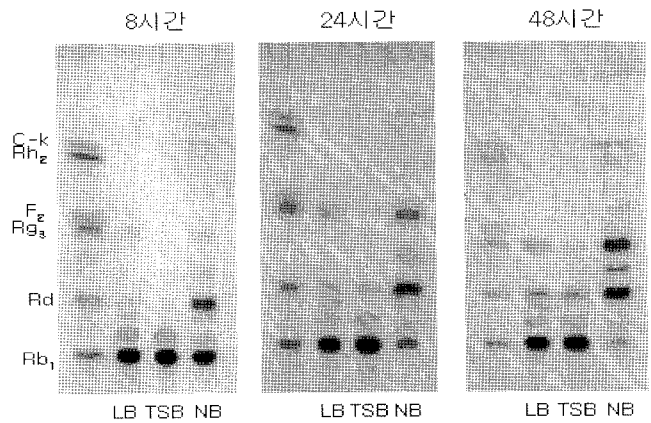


Fig. 6. TLC separation of Rb₁ and converted ginsenosides. Developing solvent system the lower layer of chloroform:methanol:water (65:35:10).

2개, C-3 위치에 1개의 glucose를 가지고 있으며, ginsenoside Rg₃는 C-20 위치에 2개의 glucose를 가지고 있다. 이러한 전환 사포닌은 ginsenoside Rb₁에 결합되어 있는 C-3 위치의 β-1,6 결합과 C-20 위치의 β-1,2 결합이 끊어지면서 생성되는 ginsenoside로 미생물이 가지고 있는 β-glucosidase에 의한 전환이라 볼 수 있다.

전환 사포닌을 보다 정확하게 확인하기 위하여 HPLC로 분석하였다. LB, TSB, NB 중 가장 반응이 뛰어난 NB에서 키운 균주를 Rb₁과 48시간 반응시킨 후, 전환 사포닌을 수포화 n-BuOH로 추출하고 농축하였다. 잔여물은 HPLC용 CH₃OH 200 μL에 녹인 후 0.2 μm membrane filter로 여과하여 HPLC용 시료로 사용하였으며, 분석 결과는 다음과 같다(Fig. 7). 39.533 min의 Rb₁(peak 1)이 Gsoil 235에 의해

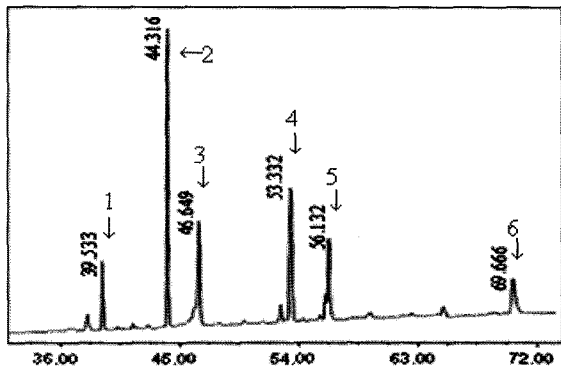


Fig. 7. HPLC chromatograms of Rb₁ and converted ginsenosides. 1, Rb₁; 2, Rd; 3, un-known; 4, un-known; 5, Rg₃; 6, un-known.

Rd(peak 2; 44.3 min), Rg₃(peak 5; 56.1 min)를 포함하여 미지의 사포닌(peak 3; 46.6 min, peak 4; 53.3 min 및 peak 6; 69.7 min)등의 minor ginsenoside로 전환되는 것을 확인하였다. 위의 결과는 TLC와 비슷하게 ginsenoside Rb₁이 거의 분해되고, 많은 양의 Rd와 Rg₃가 생성되는 것을 확인할 수 있다. 또한 R_f이 0.36인 미지의 ginsenoside는 peak 3 또는 4로 짐작되는 바, 추후 연구를 통하여 미지 사포닌의 분리 및 구조 동정을 필요로 한다. 배지 종류에 따른 ginsenoside Rb₁의 TLC 및 HPLC 분석을 정리하면 Fig. 8과 같다. 이를 통해 균주의 성장과 ginsenoside Rb₁을 전환시키는 효소 활성이 일치하지 않으며, 반응시간이 증가할수록 minor saponin의 생성이 증가하며, 특히 다른 배지에 비해 균주 성장속도가 상대적으로 낮은 NB는 48시간 후 Rb₁이

거의 분해되어 *Cellulosimicrobium* sp. Gsoil 235의 강한 효소 활성을 확인할 수 있었으며 인삼사포닌 Rb₁을 Rd를 거쳐 Rg₃로 변환시킨 것을 확인할 수 있었다. 또한 ginsenoside Rg₃는 열에 의해 소량으로 만들어지는 홍삼 특유의 미량 사포닌으로, 항암효과[6, 7, 16, 24], 혈소판 응집억제[15], 신경독성 억제[9] 등의 약리효능이 밝혀져, 이를 이용한 ginsenoside Rg₃의 생산 및 이용 가치가 클 것으로 예상된다.

요 약

인삼 근권에 존재하는 토양 미생물중 esculin agar법을 이용하여 β-glucosidase를 생산하는 균주를 분리하고, 다시 ginsenoside Rb₁을 선택적으로 분해하는 균주 Gsoil 235를 선발 및 동정하였다. 16S rRNA 염기서열을 sequencing 한 후, genbank에서 가장 가까운 type strain을 결정하여 유연관계를 분석한 결과 *Cellulosimicrobium* 속의 *funkei* ATCC BAA-886^T(AY501364)와 99.7% 일치하는 균주임을 확인하였다. TSB, LB, NB 등 3 종류의 배지에서 균의 생장은 접종 후 12-24 시간에서 가장 잘 자라며, TSB>LB>NB의 순으로 잘 자라는 것을 알 수 있었다. ginsenoside Rb₁과 8, 24, 48시간 동안 반응시킨 후 TLC로 분석한 결과 NB>LB>TSB 순으로 Rb₁ 분해 활성이 뛰어나 배지의 성장과 대조적인 결과를 얻었다. 반응시간이 증가할수록 Rd를 포함한 minor ginsenoside의 생성이 증가하였으며, 특히 다른 배지에 비해 균주 성장속도가 상대적으로 낮은 NB는 48시간 후 Rb₁을 거의 분해하여 강한 효소 활성을 확인할 수 있었다.

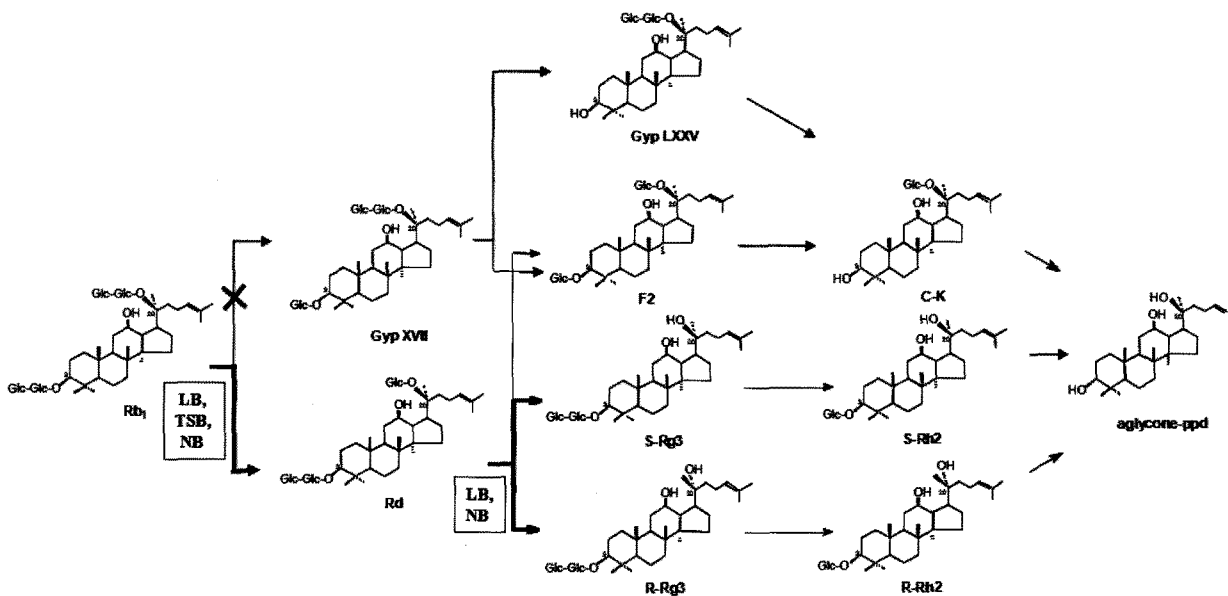


Fig. 8. The Conversion Pathway of ginsenoside Rb₁ by strain Gsoil 235 incubated in various culture media (LB, TSB and NB). Gsoil 235 incubated in LB and NB could convert Rb₁ to Rd, Rg₃ and other minor ginsenosides. But in TSB, Rd is only one product converted from Rb₁. It couldn't converted Rb₁ to GypXVII.

감사의 글

본 연구는 21세기 프론티어연구개발사업 자생식물이용기술개발사업(code #PF06222-00)의 지원으로 수행된 것으로, 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Benishin, C. G. 1992. Actions of ginsenoside Rb₁ on cholin uptake in central cholinergic nerve endings. *Neurochem. Int.* **21(1)**: 1-5.
- Chen, Y. J., M. Nose, and Y. Ogihara. 1987. Alkaline cleavage of ginsenosides. *Chem. Pharm. Bull.* **35(4)**: 1653-1655.
- Chi, H., B. H. Lee, H. J. You, M.S. Park, and G.E. Ji. 2006. Differential Transformation of Ginsenoside From *Panax ginseng* by Lactic Acid Bacteria. *J. Microbiol. & Biotechnol.* **16(10)**: 1629-1633.
- Han, B. H., M. H. Park, Y. N. Han, L. K. Woo, U. Sankawa, S. Yahara, and O. Tanaka. 1982. Degradation of ginseng saponins under mild acidic conditions. *Planta Med.* **44**: 146-149.
- Hasegawa, H., J. H. Sung, S. Matsumiya, and M. Uchiyama. 1995. Main Ginseng Saponin Metabolites Formed by Intestinal Bacteria. *Planta Med.* **62**: 453-457.
- Iishi, H., M. Tatsuta, M. Baba, H. Uebara, A. Nakaizumi, and K. Shinkai. 1997. Inhibition by ginsenoside Rg₃ of bombesin-enhanced peritoneal metastasis of intestinal adenocarcinomas induced by azoxymethane in Wistar rats. *Clin. Exp. Metastasis* **15**: 603-611.
- Kim, H. S., E. H. Lee, S. R. Ko, K. J. Choi, and J. H. Park. 2004. Effects of ginsenosides Rg₃ and Rh₂ on the proliferation of prostate cancer cells. *Arch. Pharm. Res.* **27**: 429-435.
- Kim, K. Y., G. Y. Jang, J. B. Park, C. N. Kim, and K. J. Lee. 2007. Evaluation of Impactor's collection efficiency on airborne bacteria by type of agar media and storage condition. *Kor. J. Env. Hlth.* **33(2)**: 145-149.
- Kim, Y. C., S. R. Kim, G. J. Markelonis, and T. H. Oh. 1998. Ginsenoside Rb₁ and Rg₃ attenuate glutamate-induced Neurotoxicity in Primary Cultures of rat cortical cells. *Korean J. Ginseng Sci.* **9**: 47-56.
- Kimura, M. 1983. *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Kitagawa, I., M. Yoshikawa, M. Yoshihara, T. Hayashi, and T. Taniyama. 1983. Chemical studies on crude drug procession. I. On the constituents of ginseng radix rubra (I). *Yakugaku Zasshi* **103**: 612-622.
- Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. 2004. *MEGA3*: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* **5**: 150-163.
- Lee, D. S., Y. S. Kim, C. N. Ko, K. H. Cho, H. S. Bae, K. S. Lee, J. J. Kim, E. K. Park, and D. H. Kim. 2002. Fecal metabolic activities of herbal components to bioactive compounds. *Arch. Pharm. Res.* **25**: 165-169.
- Lee, J. H., M. S. Yun, and S.K. Lee. 2007. Effect of Whey broth's sterilization method and yeast extract on growth characteristics of *pronionibacterium freudenreichii* KCCM 31227. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **50(1)**: 6-11.
- Lee, S. R., J. H. Park, K. J. Choi, and N.D. Kim. 1997. Inhibitory effect of ginsenoside Rg₃ on platelet aggregation and its mechanism of action. *Korean J. Ginseng Sci.* **21(2)**: 132-140.
- Mochizuki, M., Y. C. Yoo, K. Matsuzawa, K. Sato, I. Saito, and S. Tonooka. 1995. Inhibitory effect of tumor metastasis in mice by saponin, ginsenoside Rb₂, 20(R)- and 20(S)-ginsenoside Rg₃, of red ginseng. *Biol. Pharm. Bull.* **18**: 1197-1202.
- Moon, Y. D. and C. H. Lee. 2007. Effect of culture media on in vitro spore germination of *adiantum pedatum* L. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **25(1)**: 143.
- Park, J. H. 2004. Sun ginseng - a new processed ginseng with fortified activity. *Food Ind. Nutr.* **9**: 23-27.
- Peralta, R. M., M. K. Kadowaki, H. F. Terenzi, and J. A. Jorge. 1997. A highly thermostable β -glucosidase activity from the thermophilic fungus *humicola-grisea* var. *thermopodia*: purification and biochemical characterization. *FEMS Microbiol. Let.* **146**: 291-295.
- Pollock, J. R. A. and R. Stevens. 1965. *Dictionary of organic compounds*. Eyre & Spottiswoode Publishers, London.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Bio. Evol.* **4**: 406-425.
- Suzuki, Y., S. R. Ko, K. J. Choi, K. Uchida, Y. G. Lee, and Y. H. Kim. 1998. Enzymatic glycosylation and hydrolysis of ginseng saponins, pp. 373-374. *Proc. 7th Int. Ginseng Symp.*, Seoul.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**: 4876-4882.
- Zhang, Q., X. Kang, and W. Zhao. 2006. Antiangiogenic effect of low dose cyclophosphamide combined with ginsenoside Rg₃ on Lewis lung carcinoma. *Biochen. Biophys. Res. Commun.* **342**: 824-828.

(Received Feb. 25, 2009/Accepted March 9, 2009)