

CKDHC 0801과 CKDHC 0802 균주를 이용한 홍삼발효

신 용 서

중근당건강(주) 연구소

Fermentation of Red Ginseng using CKDHC 0801 and CKDHC 0802

Yong-Seo Shin

Chong Kun Dang Healthcare Corp. Research Center

Abstract

In this study, we isolated two species of bacteria for the powerful biotransformation of ginsenosides from Kimchi and human feces. Using biochemical tests and 16s rRNA sequencing, the selected strains were identified as *Lactobacillus plantarum* (CKDHC0801) and *Lactobacillus sakei* (CKDHC0802). Changes in cell growth and pH were examined in red ginseng. CKDHC 0801 and CKDHC 0802 reached their maximum growth phase after 24 hr and 48 hr, respectively, whereas the combined culture of CKDHC 0801 and CKDHC 0802 showed higher cell growth than bacterial strain alone. During fermentation of CKDHC 0801 and the combined culture, the pH values decreased from 5.2 to 4.2 after 24 hr, but CKDHC 0802 reached pH of 4.2 after 3day. The identities of ginsenosides were biotransferred from high molecular (Rg1 and Rb2) to low molecular (Rg3, Rg5, Rk1, PPD) by fermentation of both bacteria. Therefore, the results of this study demonstrate that CKDHC 0801 and CKDHC 0802 could be used to enhance to effects of red ginseng.

Key words: fermentation, red ginseng, biotransforming, *Lac. plantarum*, *Lac. sakei*

I. 서론

인삼은 동양에서 수천년 동안 식품과 의약적 가치로 널리 사용되어 왔다. 사포닌계열인 ginsenoside는 항암, 항염, 항스트레스 그리고 항산화 등 인삼의 다양한 효과를 나타내는 주요성분으로 알려져 있다(Park EK 등 2005, Cho WC 등 2006, Lee SH 등 2006). 최근 연구결과를 보면, ginsenoside의 약리효과가 치매와 항당뇨에 좋은 효과를 보였으며(Heo JH 등 2008, Vuksan V 등 2008), 소화기관 손상억제효과(Xia ZY 등 2005)와 관절염예방 효과(Kim KR 등 2010)를 나타내는 것으로 보고되었다.

구강으로 섭취된 대부분의 천연약물들은 대장에 존재하는 미생물에 의하여 생물학적 변환을 거치고 체내에 흡수되어 그 효능을 나타낸다(Akao T 등 1998). 따라서 인체의 장내 미생물들에 의한 천연물의 대사산물에 대한 연구는 천연물의 효능 규명에 있어서 매우 중요하다(Kim DH 등 1998).

연구보고에 의하면 인삼 사포닌인 ginsenoside가 소화 기관내의 효소, 산 그리고 장내미생물에 의해 전환이 일어남을 알 수 있으며, 이러한 전환을 통하여 ginsenoside 배당체가 분해되어 체내에 흡수되는 것으로 밝혀졌다(Hasegawa H 등 1996, Akao T 등 1998). 특히 인삼에 대하여 생물전환율이 높은 균주의 탐색에 대한 보고가 있다(Bae EA 등 2003, Rowe GE 등 2004, Chi H 등 2005). 발효인삼은 유익균주를 공급할 수 있는 장점과 동시에 ginsenosides 배당체의 당을 분해하여 고효율의 사포닌을 섭취할 수 있는 장점이 있다(Kim HG 등 2007). 우리나라의 대표적인 전통발효 식품인 김치는 발효에 관여하는 다양한 유용 유산균을 다량 함유하고 있다(Lee HJ 등 1993).

따라서, 본 연구에서는 유용한 미생물을 김치 및 사람의 분변에서 분리하고, 이를 이용하여 홍삼을 발효하여 사포닌의 생물학적 변환을 통하여 영양학적, 기능적 가치를 높이고자 한다.

*Corresponding author: Yong-Seo Shin, Chong Kun Dang Healthcare Corp. Research Center
Tel: 041-357-6699
Fax: 041-357-9474
E-mail: freemind@paran.com

II. 재료 및 방법

1. 균주 분리

가정에서 담근 잘 익은 배추김치와 건강한 성인 5명으로부터 분변을 수집하여 균일하게 교반한 후에 멸균 거르로 여과하였다. 여과액을 멸균수를 이용하여 단계적으로 희석한 후에 100 μ L를 취하여 MRS(Difco Laboratories, MI, USA)-BCP(Bromocresol Purple) 한천배지(1.5% agar)에 도말하여 30°C에서 배양하였다. 투명환을 나타내는 균들을 분리하여 재 배양하였다.

2. 홍삼첨가 배지 제조

홍삼분말을 첨가한 배지는 홍삼(금산, 6년근)을 사용하였으며, 홍삼을 수세한 후 70°C에서 건조한 후 분쇄기로 분말화 하였다. 이렇게 얻어진 홍삼분말은 멸균수와 혼합하여 액체배지(2.5%, w/v, 1%, w/v)를 만들었고, 121°C, 1.5기압, 15분간 멸균하였다.

3. 생균수 측정

생균수는 시료 1 mL를 멸균 생리식염수 9 mL에 희석하고 잘 섞은 후 단계별로 희석한 다음 1 mL을 취하여 glucose함량을 1%로 높인 표준한천배지에 접종하여 잘 혼합하여 도말한 후 혐기성 상자(BBL Gas Pak Anaerobic System)에 넣고 37°C에서 48시간 배양한 후 생성된 집락수를 계측하고 그 평균 집락수에 희석배수를 곱하여 배양액 mL 당 생균수를 산출하였다.

4. 발효홍삼 제조에 적합한 유산균주 선정

김치에서 분리된 유산균들(1.0×10^6 CFU/mL)을 이용하여 홍삼분말배지에 배양한 결과 생균수가 약 1.0×10^8 CFU/mL 이상인 균주들을 홍삼을 잘 이용할 수 있는 유산균주로 선정하였다.

5. 분리균주의 동정

발효홍삼배지에서 생육이 좋은 균주의 동정을 위하여 일차적으로 형태학적, 생화학적 특성을 조사하였다. 그람 염색 및 현미경 관찰과 API 50 CHL System(BioMerieux, Marcy l'Etoile, France)을 이용하여 당 발효능을 조사한 후에 균주 동정 프로그램을 이용하여 균주를 동정하였다. 분리 균주의 16S rRNA 염기서열은 프라이머 8F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG, 서열번호 3)와 1514R (AAGGAGGTGATCCAGCC, 서열번호 4)을 사용하여 PCR을 이용하여 증폭하고, 최종 동정하였다.

6. 선별된 균주를 이용한 홍삼 발효물 제조

홍삼분말 50 g에 물 450 mL를 가하고, 90°C에서 1시간 동안 멸균한 다음, 선별된 균주 2종을 약 5%의 농도로 접종한 후, 37°C에서 3일 동안 교반하면서 감압 배양하였다. 얻어진 배양액을 75°C에서 24시간 동안 숙성 및

멸균 처리하였다.

7. HPLC를 통한 ginsenoside 분석

사포닌 함량측정은 시료 5 g을 HPLC용 메탄올로 녹여낸 후 0.45 μ m의 필터로 여과하여 HPLC를 이용하여 사포닌 조성을 분석하였다. 이때 컬럼은 μ -Bondapak C18 Column(10 μ m, 3.9 \times 300 cm, Water)을 이용하였으며 다음과 같은 조건으로 수행하였다. 검출기는 Jasco UV detector(302 nm)를 사용하였다. 이동상으로는 물(A)과 acetonitrile(B)의 gradient system을 사용하였으며 A를 기준으로 80%(0분), 80%(20분), 70%(40분), 55%(60분), 20%(80분), 0%(90분), 20%(100분)이었다. 이동상의 유속은 분당 1.8 mL이었으며, 시료주입량은 10 μ L, 분석온도는 30°C이었다.

III. 결과 및 고찰

1. 김치 및 분변에서의 균주 분리 및 동정

수집된 시료를 도말한 MRS배지에서 유의한 수준의 집락이 형성될 때까지 24~48시간 동안 배양하였다. 단일 집락으로 구분 할 수 있도록 희석한 농도의 배지에서 균주 집락을 선별하였다. 이때 균주의 선별기준은 원래 배지의 색인 보라색이 균주의 젖산 형성을 통해 노란색의 집락 및 경계를 형성하는 것으로 하였다. 선택된 집락들은 다시 MRS-BCP 평판 배지에 계대배양하여 단일 집락임을 다시 확인하였다. 특히, 단일 집락으로 확인된 균주들 가운데 홍삼분말배지에서 생육이 높은 미생물 2종(CKDHC 0801 및 CKDHC 0802)을 선별하였다. CKDHC 0801은 사람의 장내에서 분리된 균주이고, CKDHC 0802는 김치액에서 분리된 균주이다.

최근 연구보고에 의하면(Park S 등 2006) 일부 유산균의 경우 인삼 또는 홍삼을 배지에 첨가하고 배양했을 때 농도의존적으로 생육이 더욱 촉진되는 균주가 있음이 확인되었다. 본 연구에서, 일반 MRS 배지에서 시험균주는 두 균주 모두가 24시간 이내에 성장의 최종점에 도달했으며, CKDHC 0801이 CKDHC 0802 보다 더 높은 성장률을 보였다(Fig. 1(a)). 반면, 홍삼배지에서는 CKDHC 0801이 24시간에 최고 생육도를 보였으나, CKDHC 0802 균주는 48시간에서 성장이 급속하게 높아지는 것을 확인하였다. 또한 두 균주를 혼합하여 배양한 경우에는 24시간 만에 높은 생육도를 나타냈다(Fig. 1(b)).

홍삼배지에서 두 균주의 생육도 차이는 당의 이용능에 대한 차이에 의해서 나타나는 것으로 사료된다. 즉, 선별된 2개의 균주에 대해서 API 50 CHL kit (BioMerieux, France)를 이용하여 49종의 당에 대한 발효 검사를 실시한 결과 CKDHC 0801의 균주가 발효에 이용되는 당이 더 많은 것으로 밝혀졌다(Table 1).

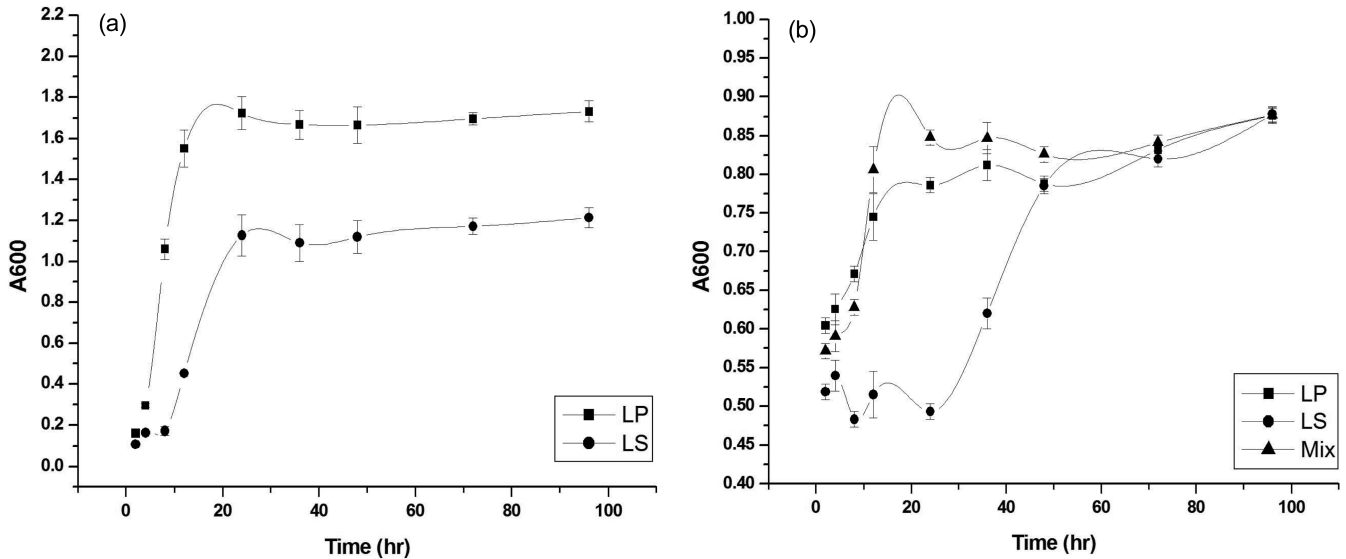


Fig. 1. Growth of *Lactobacillus plantarum* (CKDHC 0801, LP) and *Lactobacillus sakei* (CKDHC 0802, LS) in MRS broth (a) or red ginseng broth (b). All values were mean±S.D. (n=3).

Table 1. Carbohydrate utilization profile of the CKDHC 0801 & 0802 isolate, as determined using the API 50 CHB system

Characteristics	CKDHC		Characteristics	CKDHC	
	0801	0802		0801	0802
Glycerol	-	-	Salicin	+	-
Erythritol	-	-	D-Cellobiose	+	-
D-Arabinose	-	-	D-Maltose	+	+
L-Arabinose	+	+	D-Lactose	+	-
D-Ribose	+	+	D-Melibiose	+	+
D-Xylose	-	-	D-Saccharose	+	+
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	-	-
α-Methyl-D-Mannoside	+	-	D-Arabitol	-	-
α-Methyl-D-Glucoside	-	-	L-Arabitol	-	-
N-Acetylglucosamine	+	+	Potassium Gluconate	-	-
Amygdalin	+	-	Potassium 2-Ketogluconate	-	-
Arbutin	+	-	Potassium 5-Ketogluconate	-	-
Esculin ferric citrate	-	-			

+, positive; -, negative.

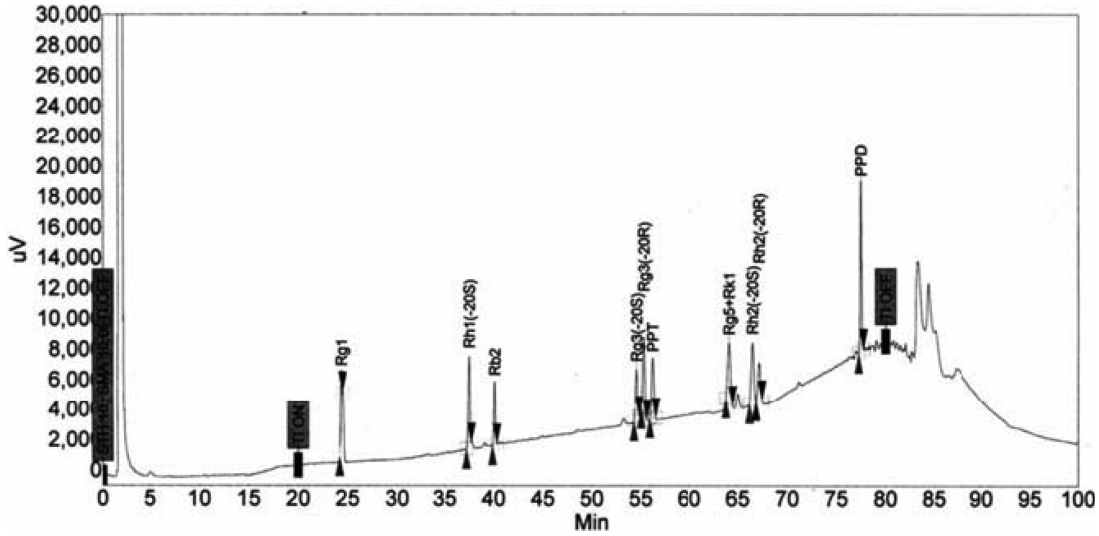


Fig. 3. HPLC chromatogram of the ginsenoside standards.

이는 CKDHC 0801이 당에 대한 이용율이 높아 생육에 있어서 CKDHC 0802 보다 먼저 최고 생육도에 이르는 것을 알 수 있다. CKDHC 0802의 경우에는 pH에 민감하다는 보고가(Leroy F 등 2001) 있어 두 균주의 생육에 따른 pH 변화를 관찰한 결과 CKDHC 0801과 두 균주를 혼합하여 배양한 경우에는 24시간만에 pH의 급감이 나타나 4.5 이하로 낮아진 반면에, CKDHC 0802의 균주는 배양 후 48시간 후에야 pH 4.5로 낮아짐을 알 수 있었다(Fig. 2).

이 결과는 박 등이 유산균을 이용한 백삼 및 홍삼을 첨가한 발효에 의해 pH가 배양 후 24시간에서 3.42~4.30으로 낮아진다는 보고와 일치한다(Park S 등 2006).

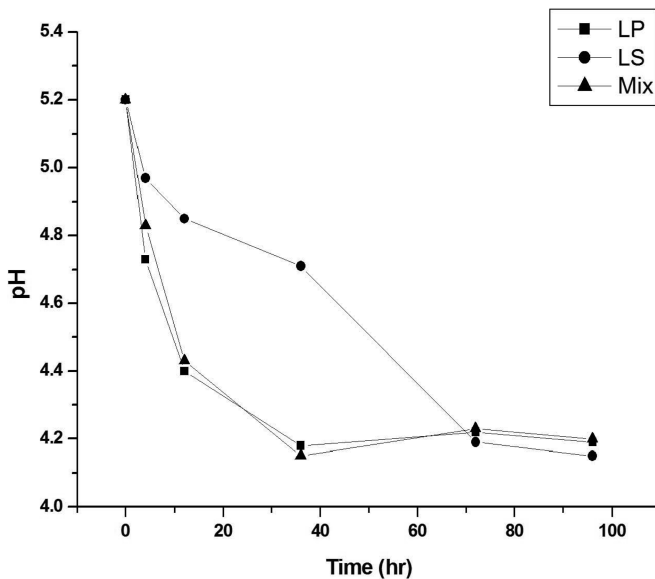


Fig. 2. pH of CKDHC 0801 and CKDHC 0802 in red ginseng broth.

2. 16S rRNA 유전자 염기 서열 분석에 의한 분리 균주의 동정

CKDHC 0801 및 CKDHC 0802의 16S rRNA 서열을 결정하여 각각 1,474 bp 및 1,455 bp로 이를 GenBank에 등록된 표준균주(type strain)나 참고균주(reference strain)의 16S rRNA gene 염기서열들과 상동성을 비교하였다. 그 결과 CKDHC 0801 균주는 *Lactobacillus plantarum*에 속하고, CKDHC 0802 균주는 *Lactobacillus sakei*에 속하는 새로운 균주로 판명되었다. 판명된 두 균주는 한국미생물보존센터에 기탁하고, 기탁번호 KFCC 11434P 및 KFCC 11435P를 부여받았다.

3. 분리 균주를 이용한 홍삼발효 후 ginsenoside 전환

분리된 미생물을 이용하여 홍삼 추출물 10 g에 물 90 mL를 가하고, 85°C에서 멸균한 다음, 미생물을 약 5%의 농도로 접종한 후, 37°C에서 2일 동안 배양하였다. 얻어진 배양액을 85°C에서 24시간 동안 숙성 및 멸균 처리한 다음, HPLC로 ginsenoside의 전환양상을 분석하였다. HPLC로 11종의 사포닌 표준품을 이용하여 확인하였으며(Fig. 3), 발효전과 발효후의 사포닌 함량을 분석한 결과 Rg1, Rh1, Rb1, Rb2 등과 같은 고분자의 사포닌들은 감소하고, Rh1, Rg3, Rg5+Rk1, PPD 등 저분자의 대사체 사포닌은 증가함을 확인하였다(Table 2).

최근에 연구된 많은 보고에 의하면, ginsenoside가 체 내에서 장내의 미생물에 의해서 전환되어지고, 이 과정에서 저분자화된 구조들이 흡수되어 그 효능을 나타내는 것을 알려져 있다(Odani T 등 1983, Strombom J 등 1985, Karikura M 등 1990, Hasegawa H 등 1996, Akao T 등 1998). 본 연구는 김치 및 인체분변에서 홍삼 이용율이 높은 균주를 분리동정하였고, 이들 균주를 이용하여 홍

Table 2. The change of content ginsenoside in Red ginseng and Fermented red ginseng

Compound	Red ginseng		Fermented red ginseng	
	Area(uV.min)	Concentration(mg/g)	Area(uV.min)	Concentration(mg/g)
Rg1	12,909	11.21	821	0.71
Re	-	-	441	0.11
Rh1(S)	1,976	1.27	2,124	1.36
Rh1(R)	7,957	-	586	-
Rb1	4,324	5.30	1,146	1.40
Rb2	2,970	3.54	-	-
Rg3(S)	549	0.44	4,674	3.75
Rg3(R)	1,202	0.87	6,883	4.97
Rk1	1,204	0.911	6,100	14.64
Rg5	753		12,109	
PPD	3,828	0.50	5,678	0.75

삼을 발효한 결과 홍삼의 알려진 주요활성 성분, ginsenoside가 저분자로 전환되는 것을 확인하였다. 따라서 이들 균주를 이용한 발효 홍삼은 체내에 흡수되기 쉬운 형태로써 홍삼의 효능을 증진시킬 수 있을 것으로 기대된다.

IV. 요약

김치와 사람의 분변에서 ginsenoside 전환이 높은 균주 2종을 분리하였다. 분리된 균주는 형태학적, 생화학적 특성 조사와 16S rRNA 염기서열 결정을 통한 균주 동정 결과 *Lactobacillus plantarum*과 *Lactobacillus sakei*로 밝혀졌고 이를 각각 CKDHC 0801 및 CKDHC 0802로 명명하였다. 두 균주의 홍삼배지에서의 생육도를 관찰한 결과 CKDHC 0801은 24시간에 CKDHC 0802는 48시간에 최고 성장도를 보였다. 특히 두 균주를 혼합하여 홍삼배지에 배양시 더욱 높은 성장률을 나타냄으로써 홍삼을 발효하기에 적합한 균주임을 확인하였다. 당 이용율을 살펴본 결과 CKDHC 0801이 더 높게 나타났다. pH변화 측정결과 CKDHC 0801과 두 개의 균주를 혼합 배양한 경우에는 배양 후 24시간에서 48시간사이에 5.2에서 4.2로 낮아졌으나, CKDHC 0802는 배양 후 3일후에야 pH 4.2 수준으로 낮아졌다. 이 균주들을 이용한 홍삼발효는 ginsenoside의 조성이 고분자인 Rg1, Rb1 등에서 저분자인 Rg3, Rg5+Rk1 등으로 전환되어지는 것을 확인하였다. 이를 통해서 이 두 가지의 균주를 이용한 발효홍삼은 홍삼의 효능을 증진시킬 수 있는 좋은 사용예가 될 것으로 사료된다.

참고문헌

Akao T, Kanaoka M, Kobashi K. 1998. Appearance of com-

pound K, a major metabolite of ginsenoside Rb1 by intestinal bacteria, in rat plasma after oral administration-measurement of compound K by enzyme immunoassay. *Biol. Pharm. Bull.* 21(3):245-249

Bae EA, Kim NY, Han MJ, Choo MK, Kim DH. 2003. Transformation of ginsenosides to compounds K (IH-901) by lactic acid bacteria of human intestine. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13:9-14

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

Cho WC, Chung WS, Lee SK, Leung AW, Cheng CH, Yue KK. 2006. Ginsenoside Re of *Panax ginseng* possesses significant antioxidant and antihyperlipidemic efficacies in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 550: 173-179

Hasegawa H, Sung J-H, Matsumiya S, and Uchiyama M (1996) Main ginseng matabolites formed by intestinal bacteria. *Planta. Med.* 62:453-455

Heo JH, Lee ST, Chu K, Oh MJ, Park HJ, Shim JY, Kim M. 2008. An open-label trial of Korean red ginseng as an adjuvant treatment for cognitive impairment in patients with Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurol.* 15(8):865-868

Karikura M, Miyase T, Tanizawa H, Takino Y, Taniyama T, Hayashi T. Studies on absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. V. The decomposition products of ginsenoside Rb2 in the large intestine of rats. *Chem. Pharm. Bull.* 1990 38(10):2859-2861

Kim KR, Chung TY, Shin H, Son SH, Park KK, Choi JH, Chung WY. 2010. Red Ginseng Saponin Extract Attenuates Murine Collagen-Induced Arthritis by Reducing Pro-inflammatory Responses and Matrix Metalloproteinase-3 Expression. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 33(4):604-610

Kim DH, Yu KW, Bae EA, Park HJ, Choi JW. 1998. Metabolism of kalopanaxsaponin B and H by human intestinal

- bacteria and antidiabetic activity of their metabolites. *Biol. Pharm. Bull.* 21(4):360-365
- Kim HG, Kim KY, Cha CJ. 2007. Screening for ginseng-fermenting microorganisms capable of biotransforming ginsenosides. *Kor. J. Microbiol.* 43(2):142-146
- Lee HJ, Baek JH, Yang M, Han HU, Ko YD, Kim HJ. 1993. Characterizations of lactic acid bacterial community during kimchi fermentation by temperature downshift. *Kor. J. Microbiol.* 31:346-353
- Lee SH, Jung BH, Kim SY, Lee EH, Chung BC. 2006. The antistress effect of ginseng total saponin and ginsenoside Rg3 and Rb1 evaluated by brain polyamine level under immobilization stress. *Pharmacol. Res.* 54(1):46-49
- Leroy F, Luc DV. 2001. Growth of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* strain CTC 494 in MRS broth is strongly induced nutrient exhaustion: a nutrient depletion model for the growth of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiol.* 67:4407-4413
- Odani T, Tanizawa H, Takino Y. 1983. Studies on the absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. II. The absorption, distribution and excretion of ginsenoside Rg1 in the rat. *Chem. Pharm. Bull.* 31(1):292-298
- Park EK, Shin YW, Lee HU, Kim SS, Lee YC, Lee BY, Kim DH. 2005. Inhibitory effect of ginsenoside Rb1 and compound K on NO and prostaglandin E2 biosyntheses of RAW264.7 cells induced by lipopolysaccharide. *Biol. Pharm. Bull.* 28(4):652-656
- Park S, Kim DH, Paek NS, Kim SS. 2006. Preparation and quality characteristics of the fermentation product of ginseng by lactic acid bacteria (FGL). *J. Ginseng Res.* 30:88-94
- Rowe GE, Margaritis A. 2004. Enzyme kinetic properties of α -1,4-glucosidase in *Bacillus thuringiensis*. *Biochemical Engineering Journal.* 17(2):121-128
- Strömbom J, Sandberg F, Denckér L. 1985. Studies on absorption and distribution of ginsenoside Rg-1 by whole-body autoradiography and chromatography. *Acta. Pharm. Suec.* 22(3):113-22
- Vuksan V, Sung MK, Sievenpiper JL, Stavro PM, Jenkins AL, Di Buono M, Lee KS, Leiter LA, Nam KY, Armason JT, Choi M, Naeem A. 2008. Korean red ginseng (*Panax ginseng*) improves glucose and insulin regulation in well-controlled, type 2 diabetes: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled study of efficacy and safety. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 18(1):46-56
- Xia ZY, Liu XY, Zhan LY, He YH, Luo T, Xia Z. 2005. Ginsenosides compound (shen-fu) attenuates gastrointestinal injury and inhibits inflammatory response after cardiopulmonary bypass in patients with congenital heart disease. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 130(2):258-264

2010년 7월 16일 접수; 2010년 8월 13일 심사(수정); 2010년 8월 13일 채택