

인삼 근권 토양에서 분리한 *Stenotrophomonas* sp. 4KR4의 Ginsenoside Rb1 전환능 및 분류학적 특성

전인화¹ · 조건영¹ · 한송이¹ · 유선균² · 황경숙^{1,3*}

¹목원대학교 미생물나노소재학과, ²중부대학교 식품생명과학과, ³목원대학교 미생물생태자원연구소

Conversion of Ginsenoside Rb1 and Taxonomical Characterization of *Stenotrophomonas* sp. 4KR4 from Ginseng Rhizosphere Soil

In-Hwa Jeon¹, Geon-Yeong Cho¹, Song-Ih Han¹, Sun Kyun Yoo², and Kyung-Sook Whang^{1,3*}

¹Department of Microbial & Nano Materials, Mokwon University, Daejeon 302-741, Republic of Korea

²Department of Food Science & Biotechnology, Joongbu University, Geumsan 312-702, Republic of Korea

³Institute of Microbial Ecology and Resources, Mokwon University, Daejeon 302-741, Republic of Korea

(Received December 2, 2013 / Accepted December 19, 2013)

We isolated the β -glucosidase producing bacteria (BGB) in ginseng root system (rhizosphere soil, rhizoplane, inside of root). Phylogenetic analysis of the 28 BGB based on the 16S rRNA gene sequences, BGB from rhizosphere soil belong to genus *Stenotrophomonas* (3 strains), *Bacillus* (1 strain), and *Pseudoxanthomonas* (1 strain). BGB isolates from rhizoplane were *Stenotrophomonas* (16 strains), *Streptomyces* (1 strain) and *Microbacterium* (1 strain). BGB from inside of root were categorized into *Stenotrophomonas* (3 strains) and *Lysobacter* (2 strains). Especially, *Stenotrophomonas* comprised the largest portion (approximately 90%) of total isolates and *Stenotrophomonas* was a dominant group of the β -glucosidase producing bacteria. We selected strain 4KR4, which had high β -glucosidase activity (108.17 unit), could transform ginsenoside Rb1 into Rd, Rg3, and Rh2 ginsenosides. In determining its relationship on the basis of 16S rRNA sequence, 4KR4 strain was most closely related to *Stenotrophomonas rhizophila* e-p10¹ (AJ293463) (99.62%). Therefore, on the basis of these polyphasic taxonomic evidence, the ginsenoside Rb1 converting bacteria 4KR4 was identified as *Stenotrophomonas* sp. 4KR4 (=KACC 17635).

Keywords: *Stenotrophomonas* sp., ginsenoside Rb₁, ginsenoside Rh₂, Ginseng soil

인삼의 주요 약리성분인 인삼 사포닌 진세노사이드(ginsenoside)는 면역기능 조절작용(Singh *et al.*, 1984), 뇌 기능에 대한 작용(Saito and Nishiyama, 1988), 항암작용(Kikuchi *et al.*, 1991), 중추신경계에 대한 작용(Benishin, 1992), 항산화 작용(Mei *et al.*, 1994), AIDS 바이러스 증식 억제효과 및 단백질 합성능력의 촉진 활성(Lee and Do, 2005) 등의 우수한 생리활성을 나타내는 것으로 보고되어 있다. 현재, 약 50종의 인삼 사포닌이 알려져 있으며, 전체 인삼사포닌의 약 80%를 차지하는 major ginsenoside인 진세노사이드(ginsenosides Rb₁, Rb₂, Rc, Re 그리고 Rg₁)와 major ginsenoside의 가수분해를 통해 얻어지는 ginsenosides Rg₃, Rd, Rh₂, compound K 등의 minor ginsenosides로 구분할 수 있다(Kim *et al.*, 1987). 인삼을 경구 투여할 경우, 고분자 진세노사이드의 생체 내 흡수율이 매우 낮기에 체내 흡수율이 상대적으로 높은 저분자 진세노사이드로 전

환이 요구된다. 생체 내 흡수율을 높이기 위한 진세노사이드의 전환에 관한 연구는 주로 화학적 산 및 염기 처리(Han *et al.*, 1982; Chen *et al.*, 1987), 열을 이용한 물리적 처리(Kitagawa *et al.*, 1983)를 이용하여 대량으로 존재 하는 고분자 사포닌을 저분자화 하는 방법이 연구되어왔다. 하지만 화학적, 물리적 처리의 경우 기질 특이적 전환이 용이하지 않아 약리성분의 변성을 초래할 가능성이 매우 높다. 최근에는 미생물 발효 및 효소 반응과 같은 생물학적 전환을 통한 사포닌 대사체 생산에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

미생물의 종류에 따라 비당부분에 결합된 당을 떼어내는 사포닌의 전환산물 및 그 경로가 다양하다고 보고되면서 연구자들이 다양한 ginsenoside 전환미생물을 탐색해왔다(Lee *et al.*, 2002; Chi *et al.*, 2006). 진균류 *Rhizopus japonicus*가 생산하는 β -glucosidase에 의해 ginsenoside Rb₁이 Rd로 전환되는 연구를 시작으로 *Rhizopus stolonifer*와 *Curvularia lunata*가 ginsenoside Rb₁을 전환시키는 균주로 분리되었다(Kim and Seu, 1982; Dong *et al.*, 2003). 이외에도 청국장에서 분리한 *Bacillus* sp.와

*For correspondence. E-mail: kswang@mokwon.ac.kr; Tel.: +82-42-829-7593; Fax: +82-42-829-7599

김치에서 분리된 *Leuconostoc fallax* LH3은 인삼의 사포닌을 전환시킬 수 있는 미생물로서 인삼에 직접 접종하는 연구들이 보고되어왔다(Jang and Kim, 2010; Kim et al., 2007). 인삼 근권토양으로부터 ginsenoside Rb₁을 ginsenoside Rd로 전환시킬 수 있는 12균주를 분리 보고하였으며(Kim et al., 2005), 인삼 근권에서 분리한 *Microbacterium esteraromaticum* GS514 (Cheng, 2008)와 *Cellulosimicrobium* sp. Gsoil 235는 ginsenoside Rb₁을 ginsenoside Rg₃로 전환한다고 보고된바 있다(Na et al., 2009). 또한, *Burkholderia* sp. JYY, *Sphingopyxis wifflariensis* DSM 14551^T와 *Castellaniella caeni* Ho-11^T 균주들은 ginsenoside Rb₁을 ginsenoside Rd로 전환하며(Yeom, 2009; Kim, 2012), *Xanthomonas campestris* LMG 568^T 균주는 ginsenoside CK, ginsenoside Fe와 같은 저분자의 ginsenoside를 생성하는 것으로 보고하였다(Kim, 2012).

홍삼의 경우, 증숙과정(steaming process) 중 열처리(heating)에 의해 생성되는 minor ginsenoside로서 ginsenoside Rh₂, ginsenoside Rs₁, ginsenoside Rs₃, ginsenoside Rs₄, ginsenoside F₄, ginsenoside Rf₂, 20(S)-ginsenoside-Rg₃, 20(S)-ginsenoside-Rg₂, 20(S)-ginsenoside-Rh₁, Notoginsenoside-R₄, ginsenoside Rh₄, ginsenoside Rg₅, 그리고 ginsenoside Rg₆ 이 최근 알려지면서 생물학적 전환 연구가 주목 받고 있다.

본 연구에서는 인삼 근권토양으로부터 β-glucosidase 생성 균주를 탐색하고 ginsenoside Rb₁을 저분자의 ginsenoside 형태로 전환하는 균주를 선별하여 분류학적 특성을 밝히고자 한다.

재료 및 방법

토양시료의 채취 및 β-glucosidase 생성 균주 분리

인삼 토양으로부터 β-glucosidase 생성 균주를 선별하기 위하여 충청남도 금산지역(N36°03'05" E127°32') 의 일대에서 인삼과 인삼뿌리 주변의 토양을 약 30~50 cm 정도의 깊이로 채취하였다. 인삼 근계에서 채취한 시료는 polyethylene vinyl bag에 넣어 실험실로 운반하고 12시간 이내에 실험하였다. 인삼 근계로부터 채취한 시료는 근권, 근면 그리고 근내부로 구분하여 시료 처리를 하였다. 인삼 근권토양시료는 10 g씩 정량하고 90 ml의 멸균수를 넣고 초음파기(SONIC Vibra-Cell VCX750, USA)를 이용하여 30 W에서 2분간 분산처리하였다. 인삼 근면 시료는 인삼 표면에 부착된 토양을 붓으로 털어낸 후, 10 g씩 정량하고 90 ml의 멸균수를 넣고 초음파기(SONIC Vibra-Cell VCX750)를 이용하여 30 W에서 2분간 분산처리하였다. 근내부 시료는 무균적으로 표피 조직을 벗겨내고 내부 조직 10 g을 90 ml의 멸균수를 넣고 homogenizer (Nikon Seiki Co., Japan)를 이용하여 15,000 rpm에서 5분간 분산처리하였다. 분산처리된 각 시료는 9 ml 멸균수에 순차적으로 희석한 후, R2A 배지에 접종하고 28°C에서 7일간 배양하였다. 순수분리 된 토양세균을 esculin agar 배지(Difco Co., USA)에 각각 접종하고 esculin을 가수분해하여 배지를 흑갈색으로 변색시키는 세균을 β-glucosidase 생성 균주로 판정하였다.

β-Glucosidase 생성균주(BGB)의 계통해석

인삼 근계(근권, 근면, 근내부)로부터 분리한 BGB 생성 균주

의 계통학적 위치를 확인하기 위해서 16S rRNA 유전자 단편을 PCR 반응으로 증폭하여 염기서열을 결정했다. 16S rRNA 유전자의 PCR 증폭을 위해 universal primer인 27F (5'-AGAGTTT GATCMTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')을 이용하였다. PCR 반응은 1× EF-Taq buffer (Solgent, Korea), 2.5 unit의 EF-Taq polymerase (Solgent), 0.2 mM dNTP mix, 0.1 μM의 primer, 100 ng의 template DNA를 사용하였다. 95°C에서 5분간 반응한 다음 94°C에서 denaturation 40초, 55°C에서 annealing 40초, 72°C에서 extension 1분을 30회 반복 후, 72°C에서 final extension 7분간으로 PCR (GeneAMPR PCR System 9700, Applied Biosystems) 반응을 실시하였다. PCR 증폭산물은 0.8%의 agarose gel, 0.5× TAE buffer (0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTA)에서 100 V, 25 mA로 30분간 전기영동 한 후 ethidium bromide (EtBr)에 15분간 염색하여 UV (Mupid-21, Gel documentation system, Bio-Rad)하에서 증폭 여부를 확인하고 PCR purification kit (Qiagen Inc.)를 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 ABI 3730XL capillary DNA sequencer를 이용하여 염기서열을 분석하였다(Saitou and Nei, 1987). 결정된 16S rRNA 염기서열의 homology는 NCBI/RDP GenBank database의 BLAST program을 이용하여 비교하였다.

β-Glucosidase 활성 측정

분리된 β-glucosidase 생성 균주를 NB 배지에 접종하고 28°C에서 3일간 배양한 후 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 β-glucosidase의 활성을 측정하였다. 기질은 sodium acetate/acetic acid 완충액(50 mM, PH5)에 p-nitrophenyl-β-p-glucopyranoside (Sigma Chemical, USA)의 농도가 5mM이 되도록 용해 시킨 후, 70 μl의 조효소액에 기질용액을 30 μl 첨가하여 37°C에서 10분 동안 반응하였다. 100 μl 0.5 M Na₂CO₃를 주입하여 반응을 종결시킨 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하여 p-nitrophenol 농도를 측정하였다. 효소 활성(unit)은 1분 동안 1 μmole의 p-nitrophenol을 생성하는 효소의 양으로 산출하였다(Na et al., 2009 ; Jang and Kim, 2010).

Ginsenoside Rb₁의 전환능

분리된 β-glucosidase 생성 균주의 ginsenoside Rb₁의 전환능을 확인하기 위하여 각 균주를 NB 배지에서 3일간 배양한 후, 배양액을 ginsenoside Rb₁ 1 mM과 1:1로 혼합하고 30°C에서 12시간, 24시간, 48시간 동안 반응시켰다. 반응액은 수포화 n-BuOH로 사포닌 성분을 추출하여 분석하였다. TLC (60 F254 Silica gel, Merck)는 시료당 간격은 1 cm로 점적하고, 전개 용매는 BuOH : Ethyl acetate : water (5:5:3,v/v/v, 혼합용매의 하층)를 사용하여 수행하였다. 전개한 TLC은 5% 황산용액에 침지하고 105°C dry oven에서 10분간 발색시켰다. 전환 사포닌의 정성 및 정량분석은 HPLC 분석을 이용하여 수행하였다. 컬럼은 C₁₈ (250 × 4.6 mm, ID 5 μm)을 이용하고 용매는 (A) acetonitrile (CH₃CN)와 (B): water (H₂O, 100%)를 혼합하여 성분 이동상으로 하였다. 이동상의 유속은 1.6 ml/min이었으며, UV detector를 이용하여 203 nm에서 사포닌을 분석하였다(Shibata et al., 1966).

Table 1. Phylogenetic analysis of β -glucosidase producing bacteria based on 16S rRNA gene sequence

Source	Strain No.	β -Glucosidase activity (unit)	Closest microorganisms (Accession no.)	Base pair (bp)	Homology (%)
RS	4KR4	108.17	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 ^T (AJ29346)	736	99.36
RS	4KR10	52.21	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 ^T (AJ29346)	628	99.41
RS	4KR11	36.35	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 ^T (AJ29346)	527	99.24
RS	PKR5	49.04	<i>Pseudoxanthomonas yeongjuensis</i> GR12-1 ^T (DQ438977)	617	99.02
RS	5KR3	5.19	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22 ^T (JX009142)	779	99.87
RP	3MR8	9.81	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 ^T (AJ29346)	565	99
RP	3MR13	64.9	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 ^T (AJ29346)	692	99.11
RP	3MR16	69.52	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 ^T (AJ29346)	687	98.87
RP	4MR1	27.4	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 ^T (AJ29346)	636	99.37
RP	4MR6	34.9	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 ^T (AJ29346)	667	99.85
RP	5MR3	12.12	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 ^T (AJ29346)	668	99.1
RP	5MR5	69.23	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 ^T (AJ29346)	769	99.35
RP	5MR7	4.04	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 ^T (AJ29346)	736	99.32
RP	5MR9	23.37	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 ^T (AJ29346)	736	99.32
RP	5MR13	86.83	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 ^T (AJ29346)	784	99.36
RP	5MR15	131.25	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 ^T (AJ29346)	648	99.32
RP	5MR17	15.58	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 ^T (AJ29346)	667	99.25
RP	5MR19	87.12	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 ^T (AJ29346)	599	99
RP	5MR24	124.33	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 ^T (AJ29346)	666	99.24
RP	5MR25	17.02	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 ^T (AJ29346)	610	99.18
RP	PMR6	15.29	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 ^T (AJ29346)	634	99.52
RP	1MR8	3.52	<i>Streptomyces psammoticus</i> NBRC 13971 ^T (AY999862)	744	98.8
RP	4MR7	7.39	<i>Microbacterium maritopicum</i> DSM 12512 ^T (AJ853910)	784	99.74
IR	1NR1	119.71	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 ^T (AJ29346)	626	99.52
IR	1NR15	31.15	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 ^T (AJ29346)	519	100
IR	4NR6	3.17	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 ^T (AJ29346)	734	98.36
IR	1NR3	7.56	<i>Lysobacter capsici</i> YC 5194 ^T (EF488749)	681	100
IR	5NR11	7.79	<i>Lysobacter capsici</i> YC5194 ^T (EF488749)	647	100

RS, rhizosphere soil; RP, rhizoplane; IR, inside of root.

Ginsenoside Rh2 전환세균의 분류학적 특성 조사

분리 균주는 R2A 배지에서 3일간 배양한 후 광학현미경 (Nikon Eclipse 80i)을 이용하여 세포형태와 운동성을 관찰하였다 (Bernardet *et al.*, 2002). 생리학적 및 생화학적 특성 조사를 위해 catalase 활성은 3%의 과산화수소에 의해 bubble 발생 유무를 확인하였고, oxidase 활성은 1%의 tetramethyl p-phenylenediamine에 의한 색깔 변화를 확인하였다. 당 이용능, 유기산 생성능을 조사는 API 20NE, API 50 CHB Kit (bioMérieux, France)를 이용하였으며, 효소반응은 API ZYM을 이용하였다. 균체지방산 조성 분석을 위하여 TSA배지에 균체를 접종하고 28°C에서 3일간 배양한 후 대수기의 균체를 회수하였다. 회수한 균체 약 50 mg (wet weight)을 teflon-lined screw cap tube (13×100 mm, pyrex)에 옮긴 후, Ikemoto & Miyagawa의 방법에 의해 균체 지방산을 methyl ester화 시켜 추출하였다. 지방산 methyl ester의 분석에는 Microbial Identification System (MIDI; Microbial ID, Inc., USA)을 이용하여 분석하였다(Hadden and Black, 1986; Lee and Hwang, 2002).

결과 및 고찰

β -Glucosidase 생성균주(BGB)의 분리과 계통학적 특성

인삼 근권토양으로부터 61균주, 근면으로부터 75균주, 그리고 근내부로부터 71균주, 총 207균주를 순수분리하였다. 분리된 균주를 esculin agar 배지에 배양하여 흑갈색으로 변색시키는 균주를 β -glucosidase 생성균주(BGB; β -glucosidase producing bacteria)로 판정하고, 변색의 크기가 지름 5-7.5 cm인 28균주를 β -glucosidase 생성 균주로 선발하였다. 인삼 근계로부터 분리된 BGB의 계통학적 특성을 검토하기 위하여 16S rRNA 유전자 염기서열 해석 결과, 근권(RS)으로부터 분리된 BGB는 *Stenotrophomonas* 속(3균주), *Pseudoxanthomonas* 속(1균주), *Bacillus* 속(1균주)이었다. 근면(RP)로부터 분리된 BGB는 *Stenotrophomonas* 속(16균주), *Streptomyces* 속(1균주), *Microbacterium* 속(1균주)으로 확인되었으며, 근내부(IR)로부터 분리된 BGB는 *Stenotrophomonas* 속(3균주), *Lysobacter* 속(2균주)로 나타났다. 이상의 결과로부터 인삼 근계로부터 분리된 BGB균주의 약

Table 2. Conversion of ginsenoside Rb1 by *Stenotrophomonas* sp.

Strain	Rb1	Rd	Rg3	Rh2
1NR1	+	+	-	-
5MR15	+	+	-	-
5MR24	+	+	-	-
4KR4	+	+	+	-

90%가 *Stenotrophomonas* 계통군에 속하는 특징을 나타내었다.

상기의 BGB 28균주에 대하여 β -glucosidase 효소활성을 비교하였다. 근권으로부터 분리된 *Stenotrophomonas* sp. 4KR4 (108.17 unit), 근면으로부터 분리된 *Stenotrophomonas* sp. 5MR15 (131.25 unit), *Stenotrophomonas* sp. 5MR24 (124.33 unit) 그리고 근내부에서 분리된 *Stenotrophomonas* sp. 1NR1 (119.71 unit) 균주가 100 unit 이상의 높은 활성을 나타냈다. 지금까지 인삼 근권토양으로부터 분리된 BGB 균주로 *Cellulosimicrobium funkei* GS235와 *Microbacterium esteraromaticum* GS514이 각각 0.55 unit과 0.09 unit의 β -glucosidase 효소 활성능을 나타낸다고 보고된 바 있다(Cheng, 2008; Na et al., 2009). 반면, *Stenotrophomonas* 계통군에 속하는 BGB에 관한 보고는 매우 미흡하여 본 연구에서 β -glucosidase 활성이 강한 *Stenotrophomonas* 속 균주의 분리는 BGB 다양성 확보에 큰 의미가 있는 것으로 판단되었다.

Ginsenoside Rb1의 전환능

상기의 효소 활성이 높게 평가된 1NR1, 4KR4, 5MR15 그리

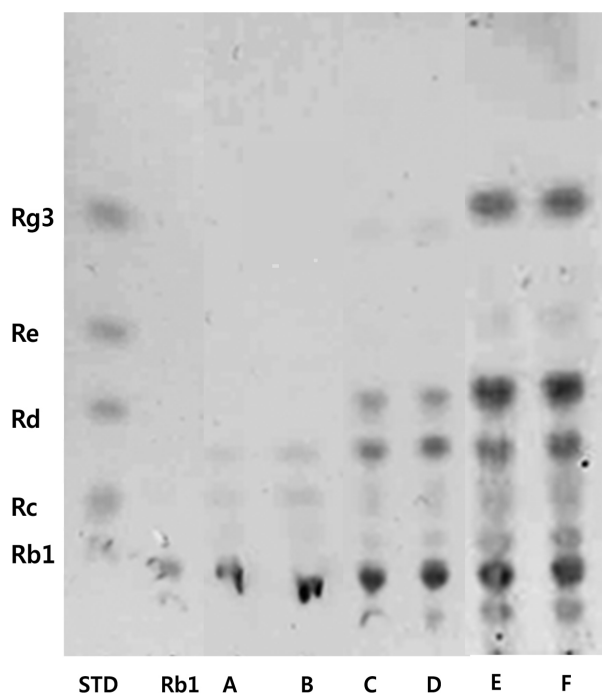


Fig. 1. Profile of converted ginsenoside Rb1 by *Stenotrophomonas* sp. 4KR4. A, TLC analysis of time-course transformation. STD, standard; A, B, 12 h transformation; C, D, 24 h transformation; E, F, 48 h transformation.

고 5MR24균주에 대하여 ginsenoside Rb1의 전환능을 TLC 방법으로 검토하였다. 시험 균주 중 1NR1, 5MR15 그리고 5MR24 균주는 48시간 후 ginsenoside Rb1을 ginsenoside Rd로 전환시켰으며, 4KR4균주는 ginsenoside Rd와 ginsenoside Rg3로 전환하여 1NR1, 5MR15, 5MR24균주에 비해 더 작은 ginsenoside 분자로 전환시키는 minor ginsenoside 전환 세균으로 1차 선발되었다(Table 2 and Fig. 1).

선발된 4KR4균주의 전환 사포닌의 성분 및 정량 분석을 위하여 배양액과 표준 시료 ginsenoside Rb1을 혼합하여 n-BuOH로 추출하고 HPLC로 정량 정성 분석한 결과, Rb1은 Rd (26.02 mg/kg), Rg3 (9.28 mg/kg) 그리고 Rh2 (5.44 mg/kg)로 전환되는 것으로 검출되었다(Fig. 2). 상기의TLC검출법으로 확인되지 않았던 minor ginsenoside Rh2가 검출되었다. 이상의 결과로부터 4KR4균주는 배양 48시간 후에, ginsenoside Rb1을 Rd, Rg3를 거쳐 Rh2의 minor ginsenoside로 전환시키는 것으로 최종 확인되었다.

Ginsenoside Rh2 전환 균주 4KR4균주의 분류학적 특성

Ginsenoside Rb1을 ginsenoside Rh2로 전환하는 4KR4 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열(1,412 bp)을 결정하여 NCBI/RDP/ GenBank의 database와 상동성 비교하였다. 각 염기서열은 CLUSTAL W algorithm를 이용하여 alignment하고 근린 결합법에 의거한 MEGA4.0 program을 이용하여 계통수를 작성한 결과 *Stenotrophomonas* 속의 *Stenotrophomonas rhizophila* e-p10^T (AJ293463), *Stenotrophomonas panacihumi* MK06^T (GQ856217), *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637^T (AB008509), *Stenotrophomonas pavanii* ICB 89^T (FJ748683)와 *Stenotrophomonas chelatiphaga* LPM-5^T (EU573216) 균주들과 97.81–99.65%의 상

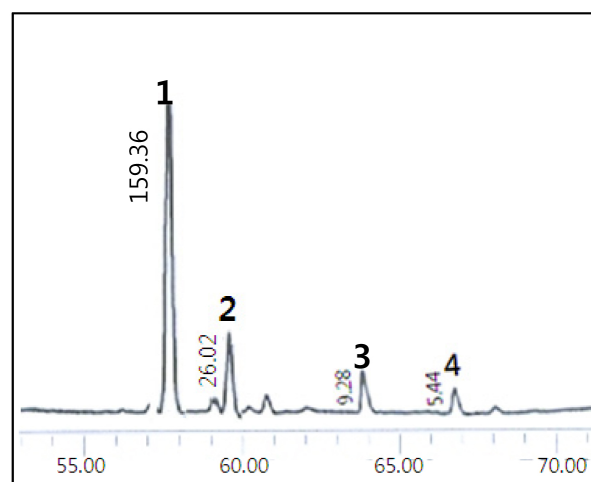


Fig. 2. HPLC profile of ginsenoside Rb1 converted by strain 4KR4. Suspension culture of the strain 4KR4 in LB broth was mixed with 1 mM ginsenoside Rb1 and then incubated for 48 h, extracted by n-BuOH, evaporated vacuo and analyzed by HPLC after dissolved in MeOH. 1, ginsenoside Rb1; 2, ginsenoside Rd; 3, ginsenoside Rg3; 4, ginsenoside Rh2.

동성을 나타내었다. 특히, *Stenotrophomonas rhizophila* e-p10^T (AJ293463)와 99.65%의 높은 상동성을 나타내었다(Fig. 3).

Stenotrophomonas 속에 속하는 균주의 균체 지방산은 분지형 지방산을 포함하는 특징을 나타낸다고 보고되어 있다(Wolfe et al., 2002). 분리 균주 4KR4의 균체지방산을 분석한 결과, 주요 지방산으로 anteiso C_{15:0} (18.16%), iso C_{15:0} (15.66%) 그리고 iso C_{11:0} (10.42%)을 포함하였으며, C_{11:0} iso, C_{13:0} iso, C_{14:0} iso, C_{15:0} anteiso, C_{15:0} iso, C_{15:1} iso F, C_{16:0} iso 그리고 C_{17:0} iso의 다양한 분지형 지방산과 C_{11:0} 3OH, C_{11:0} iso 3OH, C_{13:0} iso 3OH를 포함한 다양한 hydroxy기를 포함하였다. 분리균주 4KR4는 근연종인 *Stenotrophomonas rhizophila* e-p10^T와 유사한 균체 지방산 특성을 나타내었다(Table 3).

분리 균주 4KR4를 R2A 배지에서 3일간 배양한 후 콜로니 형태를 관찰한 결과, 노란색 원형 콜로니를 형성하고, 세포는 1 μm 이상의 막대 모양을 나타내었고, 비운동성으로 관찰되었다. Catalase 활성은 양성반응을 나타냈고, oxidase 활성은 음성 반응을 나타내었다. API 20NE, 50CHB kit (bioMérieux)를 사용하여 당 이용능을 조사한 결과, 4KR4균주는 esculin, ferric citrate, D-maltose, D-glucose, urea, D-mannose, N-acetyl-glucoamine를 이용하는 것으로 확인되었다. 또한, esterase lipase, lipase, β-glucosidase (esculin hydrolysis) 효소를 생성하는 것으로 확인되었다(Table 3). bioMérieux (<http://industry.biomerieux-usa.com/industry/watertesting/api/api-web.htm>, USA) 회사 홈페이지에서 제공하는 Apiweb (<https://apiweb.biomerieux.com>)에 의거하여 분석한 결과, *Stenotrophomonas* 속에 속하는 균주들과 94.3%~98.8%의 상동성을 나타내었다. 본 연구에서 분리된 ginsenoside 전환세균 4KR4균주의 계통학적 위치와 표현형적 특징, 균체 지방산 조성, 생리·생화학적 특성을 검토한 결과, *Stenotrophomonas*

속에 속하며 *Stenotrophomonas rhizophila*와 높은 유연관계를 갖는 균주임이 확인되었다. 현재 유전자정보은행 RDP (RDP Release 11, Update 1, October 2013)에 *Stenotrophomonas rhizophila*로 분리 보고된 균주는 58균주로 유채, 감자, 토마토, 코코넛 등 다양한 식물의 근권, 잎, 줄기로부터 분리되었다. 표준 균주 *Stenotrophomonas rhizophila* e-p10^T의 경우, ginsenoside 전환능에 대하여 보고된 바 없다. 본 연구에서 인삼 근권토양으로부터 *Stenotrophomonas* sp. 4KR4 균주의 분리는 ginsenoside 전환 미생물의 다양성 확보차원에 큰 의의가 있는 것으로 판단되었다.

고분자 ginsenoside가 미생물의 종류에 따라 다양하게 전환된다고 보고되면서 ginsenoside 전환 균주의 다양성 확보에 관한 연구가 진행되어 왔다. 인삼 근권토양에서 분리한 ginsenoside 전환 균주에 관한 연구 보고를 조사한 결과, *Cellulosimicrobium* sp. Gsoil 235균주는 ginsenoside Rb₁을 Rc, Rg₃으로 전환하며 (Na et al., 2009), *Leifsonia* sp. GAL45균주는 ginsenoside Rb₁를 Rc, Rd, Re, 그리고 Rg₁으로 전환하고(Choi, 2010), *Ramlibacter ginsenosidimutans* BXN5-27^T는 ginsenoside Rb₁을 Rc, Rd로 전환하였으며(Wang et al., 2012), *Burkholderia* sp. JYY균주, *Spinigopyxis witflariensis* DSM 14551^T와 *Castellaniella caeni* Ho-11^T균주 등은 Rb₁을 Rd로 전환한다고 보고한 바 있다 (Yeom, 2009; Kim, 2012). 본 연구에서 인삼 근권토양으로부터 분리된 *Stenotrophomonas rhizophila* 4KR4는 ginsenoside Rg₃와 ginsenoside Rh₂로 전환능을 갖고 있었으며, 인삼 근권 토양에서 분리한 ginsenoside 전환 균주 보다 더 작은 분자의 ginsenoside로 전환하는 것을 확인하였다. 홍삼에 존재하는 ginsenoside 중 ginsenoside Rg₃은 혈소판 응집억제 효과(Lee et al., 1997), 신경 독성 억제(Kim et al., 1998), 혈관확장작용(Kim

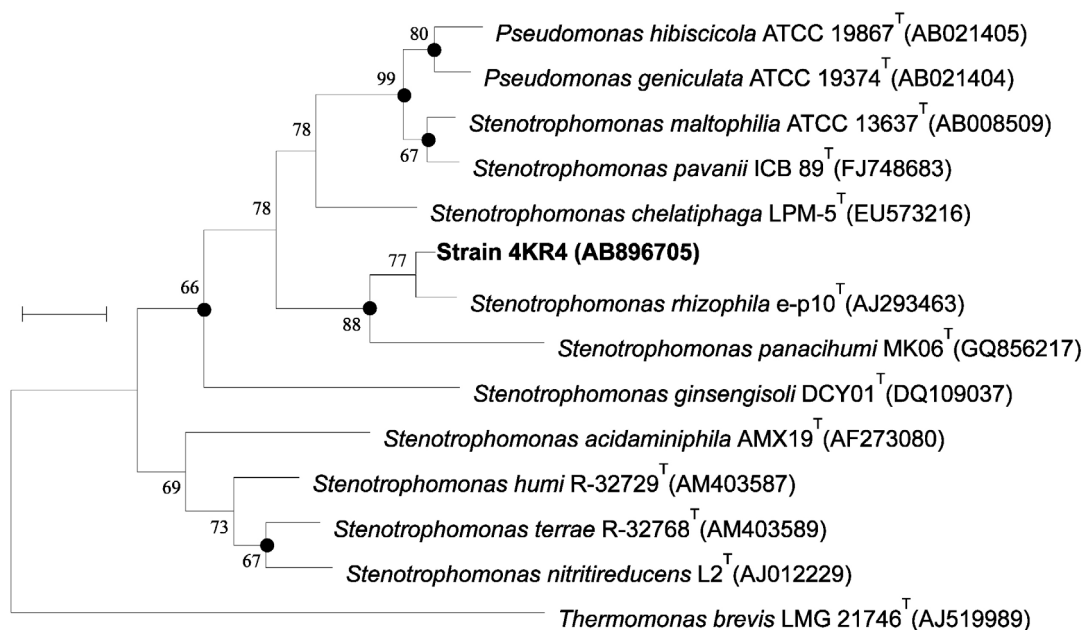


Fig. 3. Phylogenetic relationships of strain 4KR4 and genera *Stenotrophomonas* based on similarities of 16S rRNA. The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method. Bootstrap values are shown at nodes. Scale bar, 1 nucleotide substitutions in 500 bases.

Table 3. Cellular fatty acid profiles of strain 4KR4 and related *Stenotrophomonas* species
Strain: 1, 4KR4; 2, *S. rhizophila* e-p10^T, data from Wolf et al. (2002), Yi et al. (2010); 3, *S. panacihumi* MK06^T, data from Yi et al. (2010); 4, *S. maltophilia* DSM 50170^T, data from Finkmann et al. (2000), Wolf et al. (2002). -, negative.

Fatty acids	1	2	3	4
Saturated				
C _{10:0}	2.2	-	1.6	-
C _{11:0}	0.06	-	4.5	-
C _{14:0}	1.91	2.4	3.3	-
C _{16:0}	4.06	4.6	6.1	6.5
C _{17:0}	0.06	1.2	-	-
Unsaturated				
C _{16:1} ω9c	2.37	-	2.2	3.7
C _{17:1} iso ω9c	0.1	7.8	8.6	4.5
Branched chain				
C _{11:0} iso	10.42	10.6	-	3.4
C _{13:0} iso	0.35	1.8	-	-
C _{14:0} iso	1.47	3.5	-	4.5
C _{11:0} anteiso	1.05	-	-	-
C _{15:0} anteiso	18.16	3.8	12.6	7
C _{15:0} iso	15.66	30.9	41.1	36.7
C _{15:1} iso F	2.33	8.8	-	7.3
C _{16:0} iso	1.36	3.6	-	3.6
C _{17:0} iso	1.08	2.6	-	3.1
Hydroxy				
C _{13:0} 2OH	3.1	-	-	-
C _{11:0} 3OH	0.28	1.6	-	-
C _{12:0} 3OH	4.3	-	1.9	3
C _{11:0} iso 3OH	5.75	1.2	3.3	1.7
C _{12:0} iso 3OH	1.25	-	-	-
C _{13:0} iso 3OH	4.52	2.6	4.3	3.5
C _{17:0} cyclo	0.88	1	-	-
Summed feature				
1; C _{15:1} iso H / C _{13:0} 3OH	0.88	0.6	-	4.4
3; C _{16:1} ω7c / C _{16:1} ω6c	8.21	-	-	-
7; C _{18:1} ω7c / ω9t / ω12t	-	2.6	-	2.2
9; C _{17:1} iso ω9c	4.17	-	-	-

et al., 2003), 향주름 효과(Kim et al., 2004) 등의 약리효능이 밝혀졌으며, 홍삼에서 검출되는 ginsenoside Rh₂는 항암제의 항암 활성 증대 와 암세포의 능동적 세포 사멸을 유도하는 다양한 항암효과를 가지고 있다(Kikuchi et al., 1991; Lee et al., 1996; Park et al., 1997).

본 연구는 열에 의해 미량 생산되는 ginsenoside Rg₃와 ginsenoside Rh₂를 전환하는 *Stenotrophomonas* sp. 4KR4 (KACC 17635) 균주를 이용한 ginsenoside Rg₃와 ginsenoside Rh₂의 생산에 이용 가치가 매우 클 것으로 기대된다.

적요

인삼 근계(근권, 근면, 근내부)로부터 ginsenoside Rb1 전환

효소인 β-glucosidase 생산 균주(BGB)를 분리하였다. 인삼 근계로부터 분리된 BGB 28균주의 계통학적 특성을 확인한 결과, 근권에서 *Stenotrophomonas* 속(3균주), *Pseudoxanthomonas* 속(1균주), *Bacillus* 속(1균주)로 확인되었다. 근면로부터 분리된 BGB는 *Stenotrophomonas* 속(16균주), *Streptomyces* 속(1균주), *Microbacterium* 속(1균주)이며, 근내부는 *Stenotrophomonas* 속(3균주), *Lysobacter* 속(2균주)를 포함하는 다양한 계통군이 확인되었다. 특히 인삼 근계로부터 분리된 BGB 균주의 90%가 *Stenotrophomonas* 계통군에 속하는 특징을 나타내었다. 근면으로부터 분리된 4KR4 균주는 108.17 unit의 β-glucosidase 활성을 나타내었으며, ginsenoside Rb1을 Rd, Rg₃ 그리고 minor ginsenoside Rh₂로 전환되었다. 4KR4 균주는 *Stenotrophomonas rhizophila* e-p10^T (AJ293463)와 99.65%의 높은 상동성을 나타

Table 4. Some characteristics of strain 4KR4 and related *Stenotrophomonas* species.

Strain: 1, 4KR4; 2, *S. rhizophila* e-p10^T, data from Wolf *et al.* (2002), Yi *et al.* (2010); 3, *S. panacihumi* MK06^T, data from Yi *et al.* (2010); 4, *S. maltophilia* DSM 50170^T, data from Finkmann *et al.* (2000), Wolf *et al.* (2002).

All strains characterized in this study are positive for catalase, alkaline phosphatase, trypsin, acid phosphatase and glucose fermentation. All are negative for α -glucosidase, α -mannosidase, α -fucosidase, indole production, assimilation of caprate, adipate, phenyl acetate, glycerol, 2-ketogluconate and potassium 5-ketogluconate. +, positive; -, negative; nd, not determined.

Characteristic	1	2	3	4
Motility	-	-	-	+
Colony color	yellow	yellow	plate yellow	plate yellow
Oxidase activity	-	-	+	-
Fermentation test (50CHB)				
Esculin citrate	+	+	-	nd
D-Maltose	+	+	-	nd
Assimilation test (20NE)				
D-Glucose (fermentation)	+	+	-	-
Urea	+	-	-	+
Esculin ferric citrate/hydrolysis	+	+	-	nd
4-Nitrophenyl β -D-galactopyranoside (β -galactosidase)	+	-	-	-
D-Glucose	+	+	+	-
D-Maltose	+	-	-	+
Enzyme activities				
Esterase Lipase	+	+	-	+
Lipase	+	-	-	-
β -Glucosidase (esculin hydrolysis)	+	+	-	+

내었다. 본 연구에서 분리된 ginsenoside 전환세균 4KR4 균주의 계통학적 위치와 표현형적 특징, 균체 지방산조성, 생리·생화학적 특성을 검토한 결과, *Stenotrophomonas* sp. 4KR4 (=KACC 17635) 균주로 확인되었다.

감사의 말

이 논문은 2013년도 목원대학교 연구년 지원에 의하여 연구되었습니다.

참고문헌

Benishin, C.G. 1992. Actions of ginsenoside Rb1 on choline uptake in central cholinergic nerve endings. *Neurochem. Int.* **21**, 1–5.
Bernardet, J.F., Nakagawa, Y., and Holmes, B. 2002. Proposed minimal standards for describing new taxa of the family *Flavobacteriaceae* and emended description of the family. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 1049–1070.
Chen, Y.J., Nose, M., and Ogihara, Y. 1987. Alkaline cleavage of ginsenoside. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 1653–1655
Cheng, L.Q., Na, J.R., Bang, M.H., Kim, M.K., and Yang, D.C. 2008. Conversion of major ginsenoside Rb1 to 20(S)-ginsenoside Rg3 by *Microbacterium* sp.GS514. *Phytochemistry* **69**, 218–224
Cheng, L.Q. 2008. Isolation and characterization of β -glucosidase active *Microbacterium esteraromaticum* GS514 and production of 20(S)-ginsenoside Rg3. Unpublished master's thesis, Kyunghee University.

Choi, M.J. 2010. Biotransformation of ginsenosides by *Leifsonia* sp. GAL45 isolated from ginseng field in Anseong, Korea. Unpublished master's thesis, Chungang University.
Chi, H., Lee, B.H., You, H.J., Park, M.S., and Ji, G.E. 2006. Differential transformation of ginsenoside from *Panax ginseng* by lactic acid bacteria. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 1629–1633.
Dong, A.M., Guo, Y.H., Zheng, J., and Guo, D. 2003. Microbial transformation of ginsenoside Rb1 by *Rhizopus stolonifer* and *Curvularia lunata*. *Biotechnol. Lett.* **25**, 339–344.
Finkmann, W., Alterdorf, K., Stackebrandt, E., and Lipski, A. 2000. Characterization of N₂O-producing *Xanthomonas*-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegbernensis* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 273–282.
Hadden, J.F. and Black, L.L. 1986. The status of ripe rot in Louisiana peppers. National Pepper Conferences. 14.
Han, B.H., Park, M.H., Han, N., Woo, K., Sankawa, U., Yanara, S., and Tanaka, O. 1982. Degradation of ginseng saponins under mild acidic conditions. *Planta Med.* **44**, 146–149.
Jang, M.H. and Kim, M.D. 2010. Exploration of β -glucosidase activity of lactic acid bacteria isolated from Kimchi. *Food Engineer. Prog.* **14**, 243–248.
Kikuchi, Y., Sasa, H., Kita, T., Hirata, J., and 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**, 63–67.
Kim, D.J., Seong, G.S., Kim, D.W., Go, S.L., and Jang, J.C. 2004. Antioxidative effects of red ginseng saponins on paraquat-induced oxidative stress. *Korean J. Ginseng Res.* **28**, 5–10.

- Kim, D.H.** 2012. Isolation and identification of the ginsenoside converting bacteria and analysis of saponin from products. Unpublished master's thesis, Wonkwang University.
- Kim, M.K., Lee, J.W., Lee, K.Y., and Yang, D.C.** 2005. Microbial conversion of major ginsenoside Rb₁ to pharmaceutically active minor ginsenoside Rd. *J. Microbiol.* **43**, 456–462.
- Kim, M.W., Ko, S.R., Choi, K.J., and Kim, S.C.** 1987. Distribution of saponin in various sections of *Panax ginseng* root and changes of its contents according to root age. *Korean J. Ginseng Sci.* **11**, 10–16.
- Kim, N.D., Kim, E.M., Kang, K.W., Cho, M.K., Choi, S.Y., and Kim, S.G.** 2003. Ginsenoside Rg₃ inhibits phenylephrine-induced vascular contraction through induction of nitric oxide synthase. *Br. J. Pharmacol.* **140**, 661–670.
- Kim, S.D. and Seu, J.H.** 1982. Conversion of ginseng saponin with the enzyme produced by *Rhizopus* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **10**, 267–273.
- Kim, Y.C., Kim, S.R., Markelonis, G.J., and Oh, T.H.** 1998. Ginsenoside Rb₁ and Rg₃ attenuate glutamate-induced neurotoxicity in primary cultures of rat cortical cells. *Korean J. Ginseng Sci.* **9**, 47–56.
- Kim, H.G., Kim, K.Y., and Cha, C.J.** 2007. Screening for ginseng-fermenting microorganisms capable of biotransforming ginsenosides. *Kor. J. Microbiology.* **43**, 142–146.
- Kikuchi, Y., Sasa, H., Kita, T., Hirata, J., Tode, T., and Nagata, I.** 1991. Inhibition of human ovarian cancer cell proliferation *in vitro* by ginsenoside Rh₂ and adjuvant effects to cisplatin *in vivo*. *Anticancer Drugs* (England). **2**, 63–67.
- Kitagawa, I., Yoshikawa, M., Yoshihara, M., Hayashi, T., and Taniyama, T.** 1983. Chemical studies on crude drug procession. I. On the constituents of ginseng radix rudura (I). *Yakugaku Zasshi.* **103**, 612–622.
- Lee, D.S., Kim, Y.S., Ko, C.N., Cho, H.K., Bae, H.S., Lee, K.S., Kim, J.J., Park, E.K., and Kim, D.H.** 2002. Fecal metabolic activities of herbal components to bioactive compounds. *Arch. Pharm. Res.* **25**, 165–169.
- Lee, J.Y. and Hwang, B.K.** 2002. Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol.* **48**, 407–417.
- Lee, J.W. and Do, J.H.** 2005. Market trend of health functional food and the prospect of ginseng market. *J. Ginseng Res.* **29**, 206–214.
- Lee, K.Y., Park, J.A., Chung, E., Lee, H.H., Kim, S.I., and Lee, S.K.** 1996. Ginsenoside-Rh₂ blocks the cell cycle of SK-HEP-1 cells at the G₁/S boundary by selectively inducing the protein expression of p27Kip1. *Cancer Lett.* **110**, 193–200.
- Lee, S.R., Park, H.J., Choi, K.J., and Kim, N.D.** 1997. Inhibitory effect of ginsenoside Rg₃ on platelet aggregation and its mechanism of action. *Kor. J. Ginseng Sci.* **21**, 132–140.
- Mei, B., Wang, Y.E., Wu, J.X., and Chen, W.Z.** 1994. Protective effect of ginsenoside on oxygen free radical induced damages of cultured vascular endothelial cells *in vitro*. *Yao. Hsueh Hsueh Pao.* **29**, 801–808.
- Na, J.R., Kim, Y.J., Kim, S.H., Kim, H.B., Snim, J.S., Kim, S.Y., and Yang, D.C.** 2009. Conversion of ginsenoside Rb₁ by ginseng soil bacterium *Cellulosimicrobium* sp. Gsoil 235 according to various culture broths. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 55–61.
- Park, J.A., Lee, K.Y., Oh, O.I., and Kim, S.I.** 1997. Activation of caspase-3 protease via a Bcl-2-insensitive pathway during the process of ginsenoside Rh₂-induced apoptosis. *Cancer Lett.* **121**, 73–81.
- Saito, H. and Nishiyama, N.** 1988. Effect of ginseng and its saponins on experimental amnesia in mice and on cell cultures of neurons, pp. 92–98. Proc. 5th Int'l. Ginseng Symp. Seoul, Korea.
- Saitou, N. and Nei, N.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425.
- Shibata, S., Tanaka, T., Ando, T., Sado, M., Tsushima, S., and Ohsawa, T.** 1966. Chemical studies on oriental plant drugs (XIV). Protopanaxadiol, a genuine saponin of ginseng saponins. *Chem. Pharm. Bull.* **14**, 595–600.
- Singh, V.K., Agarwal, S.S., and Gupta, B.M.** 1984. Immunomodulatory activity of *Panax ginseng* extract, pp. 225–232. Proc. 4th Int'l. Ginseng Symp. Seoul, Korea.
- Wang, L., An, D.S., Kim, S.G., Jin, F.X., Kim, S.C., Lee, S.T., and Im, W.T.** 2012. *Ramlibacter ginsenosidimutans* sp. nov., with ginsenoside converting activity. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 311–315.
- Wolf, A., Fritze, A., Hagemann, M., and Berg, G.** 2002. *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 1937–1944.
- Yeom, J.H.** 2010. Conversion of ginsenoside Rb₁ by bacterium isolated from ginseng cultivation soil. Unpublished master's thesis, Joongbu University.
- Yi, H., Srinivasan, S., and Kim, M.K.** 2010. *Stenotrophomonas panacihumi* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. *J. Microbiol.* **48**, 30–35.