

## Functional Characteristics of *Enterococcus faecium* SA5 and Its Potential in Conversion of Ginsenoside Rb1 in Ginseng

Eun-Ah Kim<sup>1</sup>, Gereltuya Renchinkhand<sup>2</sup>, Magsal Urgamal<sup>2</sup>, Young W. Park<sup>3</sup> and Myoung Soo Nam<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Seoul F&B Company, Hoengseong, Gangwon-do 25209, Korea

<sup>2</sup>Division of Animal Resources Science, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 32713, Korea

<sup>3</sup>Agricultural Research Station, Fort Valley State University, Fort Valley, GA, USA

Received August 23, 2016 / Revised January 3, 2017 / Accepted February 18, 2017

The fermentation of *Panax ginseng* can yield many compounds from ginsenosides that have a wide variety of biological functions. Lactic acid bacteria (LAB) strains are capable of converting ginsenosides. The purposes of this study were to: (1) characterize *Enterococcus faecium* SA5, an isolated LAB from Mongolian mare milk, (2) identify the existence of extracellular  $\beta$ -glucosidase activity in the milk, and (3) ascertain if the  $\beta$ -glucosidase has the capacity of converting ginsenoside in Korean ginseng. The results revealed that *E. faecium* SA5 was acid-resistant, bile salt-resistant, and has antibiotic activities against 4 pathogenic microorganisms (*Salmonella typhimurium* KCTC 3216, *Listeria monocytogenes* KCTC 3710, *Bacillus cereus* KCTC 1012, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621). In addition, *E. faecium* SA5 had tolerance against some antibiotics such as colistin, gentamycin and neomycin. It was also found that *E. faecium* SA5 possessed bile salt hydrolase activity, which could lower blood cholesterol level. When incubated in 10% (w/v) skim milk as a yogurt starter, *E. faecium* SA5 caused to decrease pH of the medium as well as increase in viable cell counts. Using TLC and HPLC analysis on the samples incubated in MRS broth, our study confirmed that *E. faecium* SA5 can produce  $\beta$ -glucosidase, which was capable of converting ginsenoside Rb<sub>1</sub> into new ginsenosides Rg<sub>3-s</sub> and Rg<sub>3-r</sub>. It was concluded that *E. faecium* SA5 possessed a potential of probiotic activity, which could be applied to yogurt manufacture as well as ginsenoside conversion in ginseng.

**Key words** :  $\beta$ -glucosidase , conversion, *Enterococcus faecium*, ginsenoside Rg<sub>3</sub>, probiotics

### 서 론

인간의 장내미생물 가운데 유산균은 대표적으로 가장 많이 이용되고 있는 probiotics로 장 운동 조절, 병원성 세균의 성장 억제, 소화 흡수의 촉진, 변비 설사 방지 등의 영양생리적인 건강 증진과 더불어 발효유제품, 자연발효식품, 가축의 사료 및 제약 분야에서 다양하게 사용되고 있으며[1] 유산균의 건강 증진 효과로 항암효과, 혈중 콜레스테롤 저하, 면역증강 효과 등의 효능이 보고되면서 광범위하게 연구가 진행되고 있다[7]. 최근 유산균을 이용한 ginsenoside 전환에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있는데, 유산균과 효소의 종류에 따라 ginsenoside 전환 경로와 그에 따른 유용 ginsenoside 산물을 다양하게 얻을 수 있고 특정한 ginsenoside만을 선택적으로 또는 다량으로 생산할 수 있는 장점이 있기 때문이다[10].

인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 식물 분류학상으로 오가피과 (Araliaceae)에 인삼 속(*Panax*)에 속하는 식물을 말하며 뿌리를 약용으로 이용한다. 여기서 “*Panax*”란 어원은 희랍어로 Pan (all)과 Axos (cure)의 복합어로 만병을 치료한다는 뜻이다[5]. 인삼의 가장 중요한 약리활성 성분인 ginsenoside는 최근까지 약 40여종의 성분이 분리되어 그 구조가 밝혀졌고, 비당부의 구조에 따라 protopanaxadiol (PPD)계, protopanaxatriol (PPT)계 및 oleanane계 saponin으로 분류된다. PPD계열의 ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc, Rd 및 PPT 계열의 Re, Rg<sub>5</sub>을 포함한 6종 major ginsenoside가 총 ginsenoside의 90%를 차지한다[20]. Ginsenoside가 갖는 약리작용은 매우 다양하여 항암작용[11], 항당뇨작용[17], 혈압조절기능[26], 항스트레스작용[15], 고지혈증 개선 작용[27], 알레르기 조절작용[31], 중추신경조절기능[12], 신경세포보호[13] 등이 보고되고 있다. 그러나 이러한 효능은 사람 개개인에 따라 다르게 나타나는 데, 이는 대장세균의 분포 및 활성이 사람마다 다르기 때문이다[11]. 이러한 장내 미생물의 차이로 나타날 수 있는 효능과 흡수율의 차이를 최소화하기 위해 ginsenoside를 미리 가수분해함으로써 체내 흡수력을 증진시키고, 효능을 나타낼 수 있는 연구가 필요하다.

유산균을 이용한 ginsenoside 전환에 대한 최근 연구로는

#### \*Corresponding author

Tel : +82-42-821-5782, Fax : +82-42-823-2766

E-mail : namsoo@cnu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*Lactobacillus brevis* LH8에 의한 ginsenoside Rd의 Compound K로 전환[23], 김치에서 분리한 *Lactobacillus brevis* THK-D57에 의한 ginsenoside의 전환[29], *Lactobacillus paralimentarius*을 이용한 ginsenoside Rb<sub>1</sub>의 Compound K로 전환[24], 김치에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* CRNB22에 의한 ginsenoside Rb<sub>1</sub>의 전환[25], 몽골 발효유인 Airag에서 분리한 *Enterococcus faecalis* CRNB-A3에 의한 Rb<sub>1</sub>의 전환[26] 등이 있다. 따라서 본 연구는 몽골 마유로부터 분리한 *Enterococcus faecium* SA5에 대한 이화학적 특성을 조사하고 *Enterococcus faecium* SA5가 생산하는 효소를 이용하여 ginsenoside 전환을 밝히고 이를 이용한 건강기능식품 소재 개발을 위한 기초자료를 제공하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 유산균 분리 및 Ginsenoside 전환능 조사

유산균 또는 SA5는 몽골 마유로부터 MRS agar를 이용하여 분리하였고, Perry 등[21]의 방법에 따라 MRS agar에서 배양한 colony를 Esculin iron agar (Sigma Aldrich, USA)에 streaking하여 37°C에서 24시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양 후 배지 내 갈색 또는 검은색 환의 형성여부를 확인하였다. 갈색 또는 검은색 환을 형성할 경우 β-glucosidase 활성을 나타내고 ginsenoside 전환능을 가지는 것으로 판단하였다.

### 유산균 SA5의 16S rDNA분석

DNA를 PCR로 확보하였고, DNA 염기서열 분석 및 이를 바탕으로 한 동정은 BIOFACT Co. (Daejeon, Korea)에 의뢰하여 수행하였다. 사용한 primer는 27F: 5'-AGAGTTTGATCAC TGGCTCAG-3'와 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'를 사용하였다.

### 내산성 측정

MRS broth에 *E. faecium* SA5를 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양한 배양액을 1N HCl로 보정하여 pH 2.0, pH 3.0, pH 4.0로 조정된 MRS broth에 각각 2% 첨가하여 37°C에서 4시간 배양하였다. 1시간 간격으로 각각의 배양액을 1 ml씩 무균적으로 채취하여 0.85% NaCl 용액 9 ml에 분주하고 10진 희석법으로 희석하여 MRS agar에 접종한 뒤, 37°C에서 24시간 배양하고 생균수를 측정하여 내산성을 조사하였다.

### 내담즙성 측정

MRS broth에 *E. faecium* SA5를 2% 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 배양액을 0.1%, 0.2%, 0.3% oxgall bile salt (Oxoid, UK)를 첨가한 MRS broth에 각각 2% 첨가하여 37°C에서 4시간 배양하였다. 배양 1시간 간격으로 각각의 배양 시료를 1 ml씩 무균적으로 채취하여 0.85% NaCl 용액 9 ml에 분주하고

10진 희석법으로 희석하여 MRS agar에 접종한 뒤, 37°C에서 24시간 배양 후 생균수를 측정하여 내담즙성을 조사하였다.

### 항균활성 조사

*Salmonella typhimurium* KCTC 3216, *Listeria monocytogenes* KCTC 3710, *Bacillus cereus* KCTC 1012, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621의 병원성 미생물을 KTCT, *Escherichia coli* KCCM 11234 (Daejeon, Korea)로부터 분양 받았고 paper disc agar diffusion method [7]를 이용하여 항균활성을 수행하였다. 각각의 병원성 미생물은 tryptic soy broth (Oxoid, UK)에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하여 사용하였고 *E. faecium* SA5는 MRS broth에 접종하여 37°C에서 48시간 배양한 배양액을 원심분리(6,000× g, 10 min)하고 상등액을 0.2 μm syringe filter (Satorius Stedin Biotech, Germany)로 여과한 여과액과 원심분리 후 0.1N NaOH로 pH 7.0으로 조정된 상등액을 0.2 μm syringe filter로 여과 후 시료로 사용하였다. 각각의 병원성 미생물을 tryptic soy agar 배지에 접종하고 tryptic soy agar 배지에 부어 굳힌 후 멸균한 paper disc (8 mm)를 배지 위에 올려놓고 시료를 50 μl씩 주입하고 각각의 병원성 미생물의 배양 조건에서 48시간 동안 배양한 다음 clear zone의 형성 여부를 확인하였다.

### 항생제 감수성 조사

MRS broth에 *E. faecium* SA5를 접종하고 37°C에서 24시간 배양한 배양액 1%를 MRS agar 배지에 접종한 후 MRS agar에서 굳힌 뒤 항생제가 포함되어 있는 paper disc (Sensi-Disc, BBLTM, BD, USA)를 배지 위에 올려놓고 37°C에서 24시간 배양하여 disc 주변에 환 형성 여부를 확인하였다. 항생제의 종류 및 용량은 ampicillin 10 ug, colistin 10 ug, erythromycin 15 ug, gentamycin 10 ug, neomycin 30 ug, tetracycline 30 ug이었다.

### Bile Salt Hydrolase 활성 조사

0.5% bile salt (Oxoid, UK)와 0.035% CaCl<sub>2</sub>를 첨가한 MRS agar에 *E. faecium* SA5와 음성 대조구 *E. coli* KCCM 11234를 각각 streaking하고 anaerobic system (Anaerocult®, MERCK, Germany)을 이용하여 37°C에서 72시간 배양한 다음 colony 주변에 불투명한 물질이 생성될 경우 bile salt hydrolase 효소 활성이 있는 것으로 판단하였다.

### *Enterococcus faecium* SA5 배양

*E. faecium* SA5를 MRS broth에 접종하여 37°C에서 18시간 배양한 후 10% (w/v) skim milk 배지에 배양하여 0, 4, 12, 24, 48, 72시간간의 산도 및 pH, 생균수를 측정하였다. 적정산도는 phenolphthalein을 지시약으로 0.1N NaOH로 pH 8.3까지 중화시키는 데 소비된 0.1N NaOH의 양(ml)을 lactic acid로

환산하여 측정하였으며 pH 측정에는 Orion pH meter (3 star plus, Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하였다. 생균수는 배양 시료 1 ml를 무균적으로 채취하여 0.85% NaCl 용액 9 ml에 분주하고 10진 희석법으로 희석하여 MRS agar에 접종한 뒤, 37°C에서 48시간 배양하여 측정하였다.

**효소 활성 확인**

*E. faecium* SA5를 MRS agar에 평판도말한 후 37°C에서 18 시간 배양 후 균체를 취하여 API ZYM enzyme system (Bio Merieux, France)의 API Suspension medium (2 ml, Bio Merieux, France)에 5.0~6.0 McFarland standard (Bio Merieux, France)로 탁도를 맞추었다. API ZYM 스트립 각각의 큐플에 Suspension medium을 65 µl씩 분주하고 37°C에서 4시간 동안 배양하였다.

**Thin Layer Chromatography 분석**

Ginsenoside Rb<sub>1</sub>을 0.2 mg/ml 첨가하고 MRS broth에 *E. faecium* SA5를 접종하고 30°C 배양기에서 7일 동안 반응시켜 TLC (thin layer chromatography)를 수행하였다. 배양액을 취해 원심분리 (6,000×g, 3 min)한 상등액 500 µl와 1-butanol 500 µl를 충분히 혼합한 후 다시 원심분리 (6,000×g, 10 min)한 상등액을 시료로 사용하여 TLC plate (TLC silicagel 60 F254, Merck, Germany)에 3 µl 점적하고 TLC plate를 mobile phase (n-butanol : ethylacetate : H<sub>2</sub>O = 5 : 1 : 4, upper layer)로 전개시키고 건조한 다음 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액으로 발색시켰다.

**High Press Liquid Chromatography 분석**

Ginsenoside Rb<sub>1</sub> 용액이 첨가된 MRS broth에 *E. faecium* SA5를 접종하고 30°C 진탕 배양기에서 7일 동안 반응시킨 배양액을 시료로 HPLC (high press liquid chromatography) (LC-6AD, Shimadzu, Japan)를 수행하였다. ProntoSIL 120-5-C18 ACE-EPS column을 사용하였으며, 이동상으로 사용한 용매 A는 CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O=20:80, 용매 B는 CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O=80:20이었다. 용매는 gradient elution system으로 0분(0% B), 0-10분(5% B), 10-30분(15% B), 30-60분(35% B), 60-70분(50% B), 70-95분(100% B), 95-140분(100% B), 140-142분(0% B), 142-150분(0% B)으로 조절하였다. 전개온도는 40°C로 유지하였고 유속은 1.5 ml/min이었으며, 시료는 0.5 µm의 acrodisc syringe filter (Gelman Laboratory, Ann Arbor, MI, USA)를 통하여 주입하였고, column의 흡광도는 UV detector (Shimadzu, Japan)를 사용하여 205 nm에서 판독하였다.

**결과 및 고찰**

**유산균 SA5의 분리 동정**

몽골 마유에서 분리된 SA5의 16S rDNA 염기서열을 1,400

개를 분석한 결과는 *E. faecium* D01과는 99%의 상동성을 나타내어 *E. faecium* SA5로 명명하였다(Fig. 1).

**내산성**

*E. faecium* SA5를 섭취하였을 때 위의 낮은 pH에서 생존할 수 있는 능력을 확인하기 위하여 생균수를 측정하여 내산성을 조사한 결과는 Fig. 2A에 나타난 바와 같다. *E. faecium* SA5는 pH 2.0에서 배양 1시간째 생균수는 2.2×10<sup>4</sup> CFU/ml로 배양 0시간에 1.4×10<sup>7</sup> CFU/ml에 비해 급격히 떨어졌고 이후 배양 시간에는 유산균을 확인할 수 없었다. pH 3.0에서는 배양 0시간에 1.5×10<sup>7</sup> CFU/ml이었고 배양 1, 2, 3, 4시간까지 생균수의 증감에 변화없이 일정한 수준으로 유지하였다. pH 4.0에서는 배양 2시간까지는 생균수가 대조군과 pH 3.0과 유사하였고 배양 3, 4시간째는 대조군과 동일한 경향으로 생균수가 3.2×10<sup>8</sup> CFU/ml로 증가하였다(Fig. 1). 따라서 *E. faecium* SA5는 pH 3.0과 4.0의 조건에서 잘 성장함을 알 수 있었다. Martini 등[18]에 따르면 섭취된 음식물의 완충 작용으로 인하여 위의 pH가 3.0이나 그 이상으로 다소 높아지기 때문에 pH 3.0에서의 생존율이 중요하다고 하였다. 따라서 음식물이 위에서 체류되는 시간인 1~4시간 동안 *E. faecium* SA5의 생존이 가능하다고 판단되었다.

**내담즙성**

식품과 함께 섭취된 유산균이 효과적으로 작용하기 위해서는 위액에 대한 내성뿐만 아니라 장내 담즙에 대한 내성도

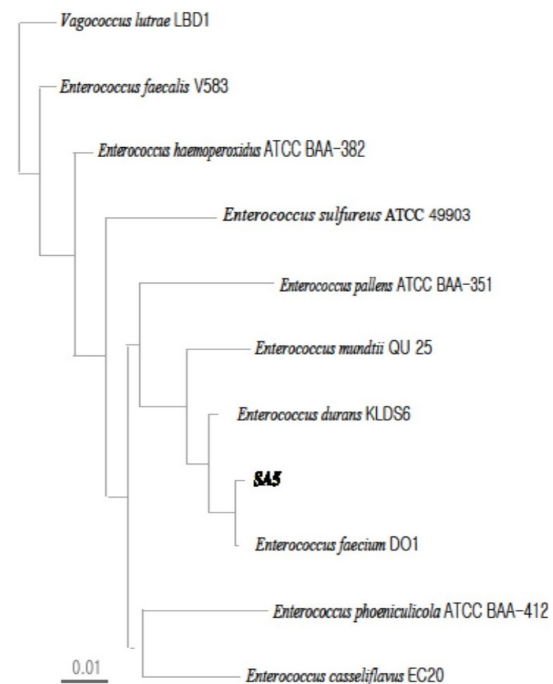


Fig. 1. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the position of strain SA5.

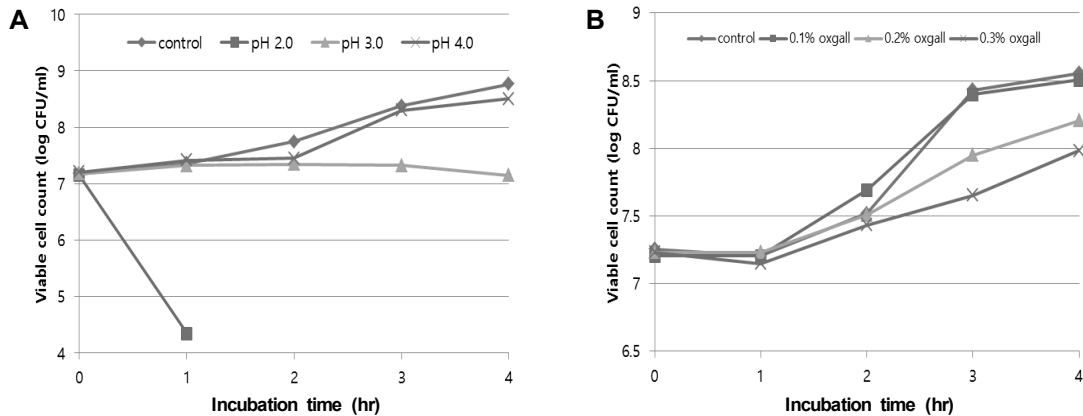


Fig. 2. Viable cell count of *Enterococcus faecium* SA5 in MRS broth. A; acidic pH, B; oxgall bile salt

있어야 한다. *E. faecium* SA5의 담즙 내성을 확인한 결과는 Fig. 2B에 나타내었다. Oxgall bile salt 첨가량이 낮을수록 대조구와 유사한 수준의 생균수를 나타냈으나 처리구 모두 배양 2시간 이후에는 배양 0시간 보다 생균수가 증가하였다. 0.1% oxgall을 처리한 경우는 배양 4시간 동안 대조구와 동일한  $3.2 \times 10^8$  CFU/ml를 나타내었고 0.3% oxgall의 경우도 0.1% oxgall처리 보다는 생균수가 낮았으나 배양 4시간째에  $9.6 \times 10^7$  CFU/ml로 나타나 담즙산에 대해 내성이 있는 것으로 확인되었다. Erkki 등[4]에 의하면, 장내의 oxgall의 농도는 다양하지만 소화관 내에서 저항성이 있는 probiotics 균주 선별에 이용되는 담즙의 농도는 0.3% 정도라고 알려져 있다. 따라서 *E. faecium* SA5는 실제 소장을 통과할 때, 담즙산에 크게 영향을 받지 않고 소장을 통과하여 대장에 도달할 수 있을 것이라 사료되었다.

**항균 활성**

*E. faecium* SA5를 배양하여 얻은 상등액과 중화 상등액을 각각 적하한 paper disc에서 *B. cereus*에 대해 강한 항균활성을 나타냈으며, *L. monocytogenes* KCTC 3710에 대해서는 약한 항균활성을 나타내었다. 그러나 *Salmonella typhimurium* KCTC 3216 와 *Staphylococcus aureus* KCTC 1621에 대해서는 항균활성이 없는 것으로 나타났(Fig. 3). Kaur 등[9]은 유기산, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 등의 과산화물질, 박테리옌 등의 2차 대사산물을 통해 유해한 균, 특히 병원성 미생물을 저해한다고 보고하고 있다. *E. faecium* SA5는 중화시키지 않은 상등액 뿐만 아니라 pH 7.0의 중화 상등액 에서도 항균활성을 나타내는 것으로 보아 유기산 이외의 박테리옌과 같은 항균 활성을 갖는 대사산물을 생성하는 것으로 판단되었다.

**항생제 감수성**

항생제 ampicillin, colistin, erythromycin, gentamycin, neomycin, tetracycline에 대한 *E. faecium* SA5의 감수성을 확인한 결과, *E. faecium* SA5는 colistin, gentamycin, neomycine에

내성을 나타내었다(Fig. 4A). 항생물질 colistin은 장염 및 이질, 요로감염증, 호흡기감염증 치료 등에 사용되고 gentamycin은 기관지염, 수막염, 세균에 의한 피부 감염 등에 사용된다. Neomycin은 미생물에 의한 피부 및 점막감염에 국소도포제로써 광범위하게 사용되는 광범위 항생제이다.

**Bile salt hydrolase 활성**

Bile salt hydrolase (BSH) 효소 활성이 없는 것으로 알려진 *E. coli* KCCM 11234와 *E. faecium* SA5를 비교하여 실험을 수행한 결과, *E. faecium* SA5의 colony 주변에 불투명한 물질이 생성됨을 확인하였는데, 이러한 결과는 bile salt hydrolase 효소

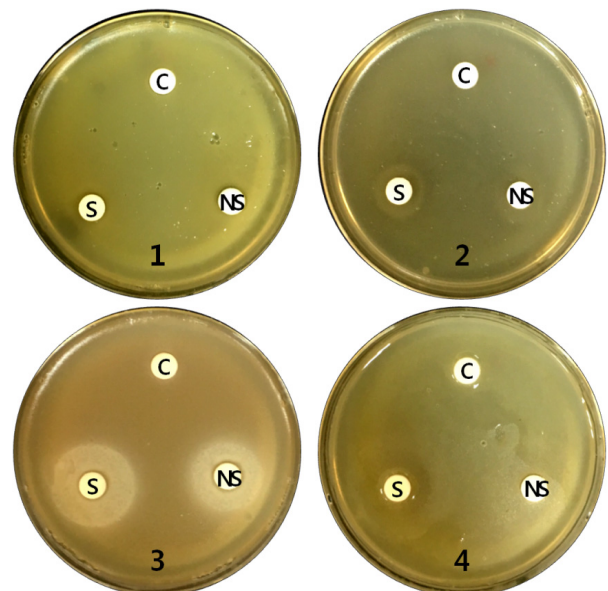


Fig. 3. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* SA5 against *Salmonella typhimurium* KCTC 3216 (1), *Listeria monocytogenes* KCTC 3710 (2), *Bacillus cereus* KCTC 1012 (3), *Staphylococcus aureus* KCTC 1621 (4). C: control, S: supernatant of *Enterococcus faecium* SA5, NS: neutralized supernatant of *Enterococcus faecium* SA5.

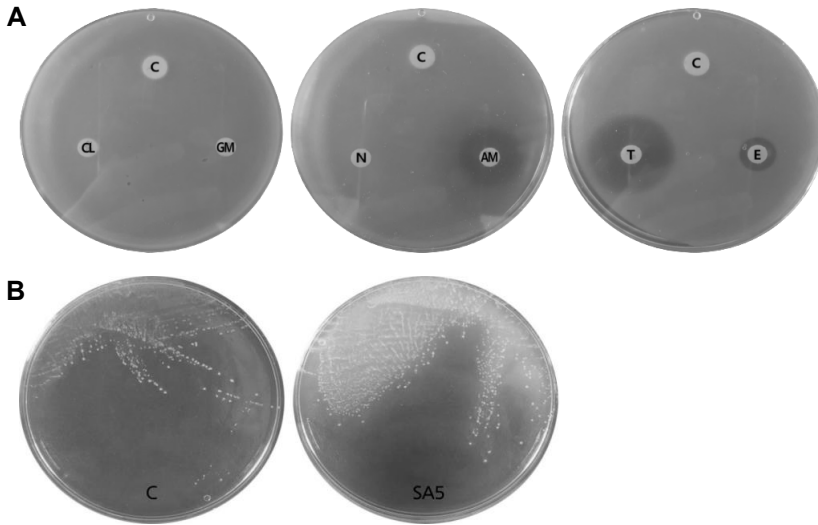


Fig. 4. Antibiotic susceptibility test and bile salt hydrolase activity of *Enterococcus faecium* SA5. A ; C: control, α: colistin 10 μg, GM: gentamycin 10 μg, N: neomycin 30 μg, AM: ampicillin 10 μg, T: tetracycline 30 μg, E: erythromycin 15 μg; B; C: control (*Escherichia coli* KCCM 11234), SA5: *Enterococcus faecium* SA5

활성이 있는 것으로 판단되었다(Fig. 4B). 간에서 콜레스테롤로부터 만들어진 담즙산은 glycine 또는 taurine과 결합되어 십이지장으로 배출된다. 담즙으로 분비되는 담즙산은 소화장관의 전역에서 흡수되거나 회장 하부로부터 재흡수되어 간장으로 돌아오는 간문맥순환계를 통한 장간순환(entero hepatic circulation, EHC)을 하는데, Begley 등[2]은 담즙산의 97%가 이 경로로 재흡수 된다고 보고하였다. Bile salt hydrolase의 작용에 의해 분리된 유리형 담즙산은 물에 대한 용해도가 떨어지고 장간순환에 의하여 재흡수되기 보다는 주로 분변으로 배출된다[3]. McAuliffe 등[19]에 따르면 체내에는 일정량의 담즙산이 유지되어야 하기 때문에 분변으로 배출된 양 만큼의 담즙산 생성이 필요하고, 이 때 담즙산의 전구체인 콜레스테롤을 이용하게 되므로 장내 미생물의 bile salt hydrolase 활성은 혈중 콜레스테롤 수치를 낮추는 역할을 할 수 있다고 보고하였다. 따라서 bile salt hydrolase 효소 활성을 나타내는 *E. faecium* SA5의 섭취를 통해 혈중 콜레스테롤 수치를 낮출 수 있을 것으로 사료되었다.

**유산균의 성장**

10% skim milk에 *E. faecium* SA5 2%를 접종하여 72시간 배양 후 산도 및 pH, 생균수를 측정한 결과, 산도는 배양 시작 때는 0.18%, 4시간째는 0.23%, 12시간째는 0.33%, 24시간째는 0.43%, 48시간째는 0.50%, 종료시점인 72시간째는 산도는 0.57%까지 증가하였으며, pH는 배양 시작 때는 6.6, 4시간째는 6.4, 12시간째는 5.9, 24시간째는 5.5, 48시간째는 5.1, 종료시점인 72시간째는 4.9까지 낮아짐을 확인하였다(Fig. 5A). 생균수는 배양 시작때는  $4.25 \times 10^6$  CFU/ul, 4시간째는  $1.46 \times 10^8$  CFU/ul, 12시간째는  $3.06 \times 10^8$  CFU/ul, 24시간째는  $3.20 \times 10^8$  CFU/ul, 48시간째는  $3.44 \times 10^8$  CFU/ul로 증가하였으며 이후 서서히 감소하여 배양 종점인 72시간째는  $2.07 \times 10^8$  CFU/ul을 확인할 수 있었다(Fig. 5B). 따라서 *E. faecium* SA5는 스타터로 이용이 가능하다고 판단되었다.

**효소 활성**

Table 1과 같이 *E. faecium* SA5는 β-glucosidase 외에도 10종의 효소활성이 있는 것으로 관찰되었다. 지방 분해에 관여

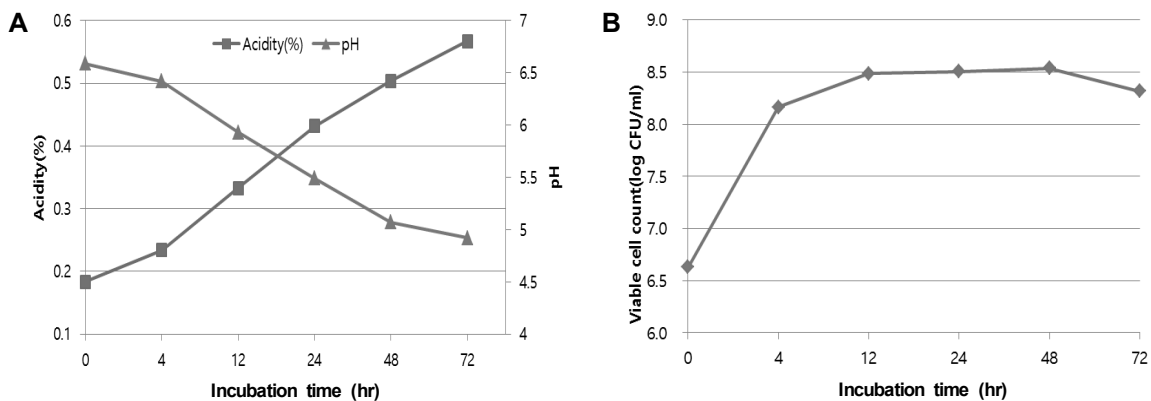


Fig. 5. Fermentation properties by *Enterococcus faecium* SA5 in 10% fermented skim milk. A; titratable acidity and pH, B; viable cell count

Table 1. Enzyme activities of *Enterococcus faecium* SA5

No.	Enzyme Assayed For	Substrate	Result *
1	Control		0
2	Alkaline phosphatase	2-naphthyl phosphate	0
3	Esterase(C4)	2-naphthyl butyrate	3
4	Esterase Lipase(C8)	2-naphthyl caprylate	2
5	Lipase(C8)	2-naphthyl myristate	0
6	Leucine arylamidase	L-leucyl-2-naphthylamide	3
7	Valine arylamidase	L-valyl-2-naphthylamide	1
8	Cystine arylamidase	L-cystyl-2-naphthylamide	2
9	Trypsin	N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide	0
10	$\alpha$ -chymotrypsin	N-glutaryl-phenylalanine-2-naphthylamide	1
11	Acid phosphatase	2-naphthyl phosphate	2
12	Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	Naphthol-AS-BI-phosphate	1
13	$\alpha$ -galactosidase	6-Br-2-naphthyl- $\alpha$ D-galactopyranoside	0
14	$\beta$ -galactosidase	2-naphthyl- $\beta$ D-galactopyranoside	5
15	$\beta$ -glucuronidase	Naphthol-AS-BI- $\beta$ D-glucuronide	1
16	$\alpha$ -glucosidase	2-naphthyl- $\alpha$ D-glucopyranoside	0
17	$\beta$ -glucosidase	6-Br-2-naphthyl- $\beta$ D-glucopyranoside	2
18	N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase	1-naphthyl-N-acetyl- $\beta$ D-glucosaminide	0
19	$\alpha$ -mannosidase	6-Br-2-naphthyl- $\alpha$ D-mannopyranoside	0
20	$\alpha$ -fucosidase	2-naphthyl- $\alpha$ L-fucopyranoside	0

\*Quantity of hydrolysed substrate, 0, 0 nmol; 1, 5 nmol; 2, 10 nmol, 3, 20 nmol; 4, 30 nmol; 5, 40 nmol.

하는 Esterase, Esterase lipase와 펩타이드 가수분해 효소인 Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Cystine arylamidase,  $\alpha$ -chymotrypsin 등에서 5~20 nmol의 활성을 나타내었다. 유당 분해에 관여하는  $\beta$ -galactosidase는 가장 높은 40 nmol의 활성을 나타내었으며, ginsenoside 전환에 필요한  $\beta$ -glucosidase의 활성은 10 nmol로 확인되었다. 이는 *E. faecium* SA5의 ginsenoside 전환능을 확인하기 위해 esculin iron agar로 실험한 결과 colony 주변에 갈색이 형성(Fig. 6)됨에 따라  $\beta$ -glucosidase 활성이 나타난 결과를 뒷받침하고 있다.

#### Ginsenoside Rb1의 전환

*E. faecium* SA5에 의한 ginsenoside Rb1의 전환을 확인하기 위하여 MRS broth에 ginsenoside Rb1과 *E. faecium* SA5를 접종하고 7일 동안 반응시킨 배양액을 시료로 TLC를 수행한 결과는 Fig. 6A, HPLC를 수행한 결과는 Fig. 6B에 나타난 바와

같다. Fig. 7A의 TLC에 나타난 바와 같이 *E. faecium* SA5가 생산하는 조효소로 처리한 Rb1의 단일 물질은 Rg3 s/r로 전환되었음을 알 수 있었다. Fig. 7B의 HPLC를 수행한 결과는 Rb1 단일 물질 B(a)에서 분리시간 28분에 Rb1 단일 peak가 나타났고 B(b)에서는 Rb1 peak와 52분과 54분 사이에 Rg3-s/r의 peak가 나타남을 알 수 있었다. 이는 ginsenoside Rg3가 종양 억제 효과[28], 항암 효과[32], 항당뇨 및 인슐린 분비 촉진[8], 항산화 활성[22] 등의 다양한 약리효과가 있는 성분으로 *E. faecium* SA5를 이용하여 생산이 가능하다고 판단된다. 한편 ginsenoside의 분해는 한국인 중 37%는 체내에 분해할 수 있는 효소가 아예 없거나, 효소성분 중 일부가 결여되어 ginsenoside를 제대로 분해할 수 없고, 나머지 63%는 ginsenoside를 분해할 수 있는 효소는 있지만, 효소의 양이 차이가 있는 것으로 보고하였다[20]. Quan 등[22]에 의하면  $\beta$ -glucosidase는 ginsenoside Rb1의 C-20 위치에 부착된 안쪽 및 바깥 쪽

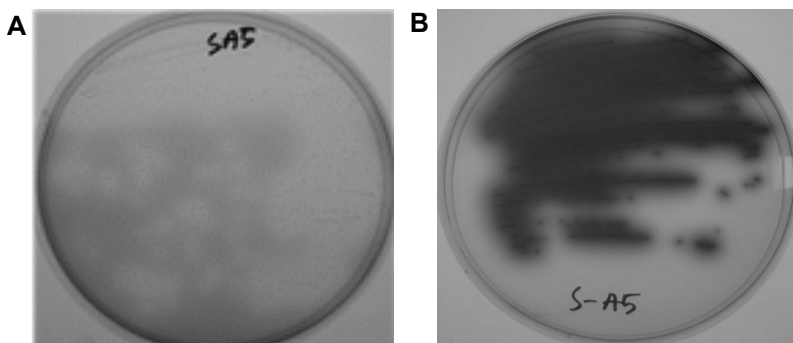


Fig. 6.  $\beta$ -glucosidase activity test in Esculin agar of *Enterococcus faecium* SA5. A; *Enterococcus faecium* SA5 in BCP agar, B; *Enterococcus faecium* SA5 in Esculin agar.

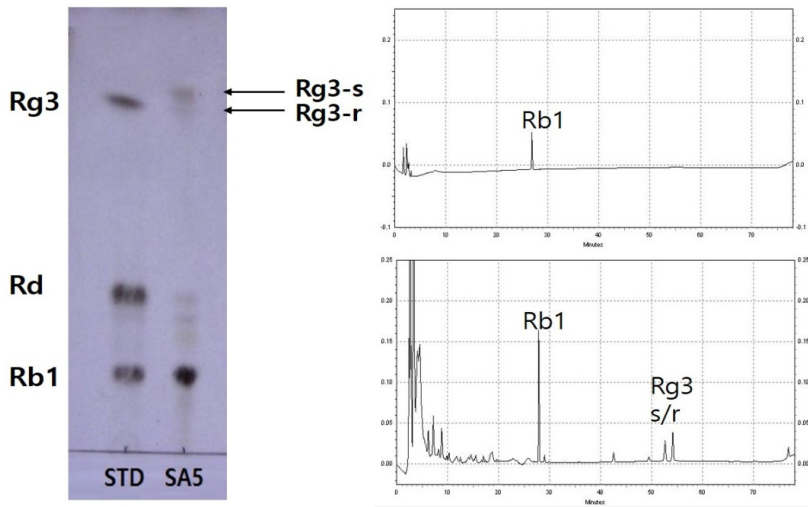


Fig. 7. TLC and HPLC analysis of the conversion of ginsenoside Rb<sub>1</sub> by crude enzyme from *Enterococcus faecium* SA5. A ; Rb<sub>1</sub> : ginsenoside Rb<sub>1</sub> standard, SA5 : *Enterococcus faecium* SA5. B ; (a) : ginsenoside Rb<sub>1</sub> standard, (b) : conversion of Rb<sub>1</sub>.

포도당 분자를 순차적으로 가수분해 시켜 ginsenoside Rg<sub>3</sub>를 생성한다고 하였다. 그러나 Yan 등[30]은 β-D-glucosidase는 C-3에 부착된 β-glucose 결합에는 작용하지 않고 특이적이고 효율적으로 ginsenoside Rb<sub>1</sub>을 Rg<sub>3</sub>로 전환시킬 수 있다고 하였다.

References

- Ann, Y. G. 2011. Health supplement food and probiotics. *Kor. J. Food Nutr. Winter Season Conference*. pp. 32-43.
- Begley, M., Hill, C. and Gahan, C. G. 2006. Bile salt hydrolyase activity in probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 1729-1738.
- De Smet, I., Hoorde, L. V., Saeyer, N. D. E., Woestyne, M. V. and Verstraete, W. 1994. *In vitro* study of bile salt hydrolyase (BSH) activity of BSH isogenic *Lactobacillus plantarum* 80 strains and estimation of cholesterol lowering through enhanced BSH activity. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* **7**, 315-329.
- Erkki, S. and Petaja, E. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Sci.* **55**, 297-300.
- Hu, S. Y. 1976. The genus *Panax* (Ginseng) in Chinese medicine. *Econ. Bot.* **30**, 11-28.
- Hyun, M. S., Hur, J. M., Shin, Y. S., Song, B. J., Mun, Y. J. and Woo, W. H. 2009. Comparison study of White Ginseng, Red Ginseng, and fermented Red Ginseng on the protective effect of LPS-induced inflammation in RAW 264.7 cells. *J. Appl. Biol. Chem.* **52**, 21-27.
- Ji, G. E. 2011. Development of evidence based probiotic *Bifidobacterium* for the improvement of human health. *Kor. J. Food Nutr. Winter Season Conference*. pp. 77-89.
- Kang, K. S., Yamabe, N., Kim, H. Y., Park, J. H. and Yokozawa, T. 2010. Effects of heat-processed ginseng and its active component ginsenoside 20(S)-Rg<sub>3</sub> on the progression of renal damage and dysfunction in type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Biol. Pharm. Bull.* **33**, 1077-1081.
- Kaur, I. P., Chopra, K. and Saini, A. 2002. Probiotics; potential pharmaceutical applications. *Eur J. Pharm Sci.* **15**, 1-9.
- Kim, J. Y. 2013. Probiotic Characteristics of *Lactobacillus gasseri* 3B2 and Its Use for Red Ginseng Fermentation. Master's Thesis of Bioresources & Technology. Yonsei Uni. Wonju. Korea
- Kim, H. S., Lee, E. H., Ko, S. R., Cho, K. J., Park, J. H. and Im, D. S. 2004. Effects of ginsenosides Rg<sub>3</sub> and Rh<sub>2</sub> on the proliferation of prostate cancer cells. *Arch. Pharm. Res.* **27**, 429-35.
- Kim, Y. C., Lee, J. H., Kim, M. S. and Lee, N. G. 1985. Effect of the saponin fraction of *Panax ginseng* on catecholamines in mouse brain. *J. Arch. Pharm. Res.* **8**, 45-49.
- Kong, Y. H., Lee, Y. C. and Choi, S. Y. 2009. Neuroprotective and anti-inflammatory effects of phenolic compounds in *Panax ginseng* C.A. Meyer. *J. Ginseng Res.* **33**, 111-114.
- Lee, Y. J., Kim, H. Y., Kang, K. S., Lee, J. G., Yokozawa, T. and Park, J. H. 2008. The chemical and hydroxyl radical scavenging activity changes of ginsenoside Rb<sub>1</sub> by heat processing. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 4515-4520.
- Lee, M. J., Kim, E. H. and Rhee, D. K. 2008. Effects of *Panax ginseng* on stress. *J. Ginseng Res.* **32**, 8-14.
- Liu, W. K., Xu, S. X. and Che, C. T. 2000. Anti-proliferative effect of ginseng saponins on human prostate cancer cell line. *Life Sci.* **67**, 1297-1306.
- Ma, S. W., Benzie, I. F., Chu, T. T. W., Fok, B. S. P., Tomlinson, B. and Critchley, L. A. H. 2008. Effect of *Panax ginseng* supplementation on biomarkers of glucose tolerance, antioxidant status and oxidative stress in type 2 diabetic subjects: results of a placebo-controlled human intervention trial. *Diabetes Obes. Metabol.* **10**, 1125-1127.
- Martini, M. C., Bolweg, G. L., Levitt, M. D. and Savaiano, D. A. 1987. Lactose digestion by yoghurt β-galactosidase: Influence of pH and microbial cell integrity. *Am. J. Clin. Nutr.* **45**, 432-437.
- McAuliffe, O., Cano, R. J. and Klaenhammer, T. R. 2005. Genetic analysis of two bile salt hydrolyase activity in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**,

- 4925-4929.
20. Park, J. H. 2004. Sun ginseng-a new processed ginseng with fortified activity. *Food Ind. Nutr.* **9**, 23-27.
  21. Perry, J. D., Morris, K. A., James, A. L., Oliver, M. and Gloud, F. K. 2007. Evaluation of novel chromogenic substrates for the detection of bacterial  $\beta$ -glucosidase. *J. Appl. Microbiol.* **102**, 410-415.
  22. Quan, L. H., Min, J. W., Yang, D. U., Kim, Y. J. and Yang, D. C. 2012. Enzymatic biotransformation of ginsenoside Rb<sub>1</sub> to 20(S) Rg<sub>3</sub> by recombinant  $\beta$ -glucosidase from *Microbacterium esteraromaticum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**, 377-384.
  23. Quan, L. H., Liang, Z., Kim, H. B., Kim, S. H., Kim, S. Y., Noh, Y. D. and Yang, D. C. 2008. Conversion of ginsenoside Rd to compound K by crude enzymes extracted from *Lactobacillus brevis* LH8. *J. Ginseng Res.* **32**, 226-231.
  24. Quan, L. H., Kim, Y. J., Li, G. H., Choi, K. T. and Yang, D. C. 2013. Microbial transformation of ginsenoside Rb<sub>1</sub> to compound K by *Lactobacillus paralimentarius*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 1001-1007.
  25. Renchinkhand, G., Park, Y. W., Cho, S. H., Song, G. Y., Bae, H. C., Choi, S. J. and Nam, M. S. 2015. Identification of  $\beta$ -glucosidase activity of *Lactobacillus plantarum* CRNB22 in Kimchi and its potential to convert ginsenoside Rb<sub>1</sub> from Panax ginseng. *J. Food Biochem.* **39**, 155-163.
  26. Renchinkhand, G., Park, Y. W., Song, G. Y., Cho, S. H., Urgamal, M., Bae, H. C., Choi, J. W. and Nam, M. S. 2016. Identification of  $\beta$ -glucosidase activity of *Enterococcus faecalis* CRNB-A3 in Airag and its potential to convert ginsenoside Rb-1 from Panax ginseng. *J. Food Biochem.* **40**, 120-129.
  27. Shinkai, K., Akedo, H., Mukai, M., Imamura, F., Isoai, A., Kobayashi, M. and Kitagawa, I. 1996. Inhibition of *in vitro* tumor cell invasion by ginsenoside Rg<sub>3</sub>. *Jap. J. Cancer Res.* **87**, 357-362.
  28. Stavro, P. M., Woo, M., Heim, T. F., Leiter, L. A. and Vuksan, V. 2005. North American ginseng exerts a neutral effect on blood pressure in individuals with hypertension. *Hypertension* **46**, 406-411.
  29. Trinh, H. T., Han, S. J., Kim, S. W., Lee, Y. C. and Kim, D. H. 2007. Bifidus fermentation increases hypolipidemic and hypoglycemic effects of red ginseng. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 1127-1133.
  30. Yan, Q., Zhou, W., Li, X., Feng, M. and Zhou, P. 2008. Purification method improvement and characterization of a novel ginsenosidehydrolyzing beta-glucosidase from *Paecilomyces bainier* sp. 229. *Biosci. Biotech. Biochem.* **72**, 352-359.
  31. Yi, E. J., Lee, J. M., Yi, T. H., Cho, S. C., Park, Y. J. and Kook, M. C. 2012. Biotransformation of Ginsenoside by *Lactobacillus brevis* THK-D57 Isolated from Kimchi. *Kor. J. Food Nutr.* **25**, 629-636.
  32. Yun, T. K., Lee, Y. S., Lee, Y. H., Kim, S. I. and Yun, H. Y. 2001. Anticarcinogenic effect of Panax ginseng C. A. Meyer and identification of active compounds. *J. Kor. Med. Sci.* **16**, 6-18.
  33. Zhang, R., Jie, J., Zhou, Y., Cao, Z. and Li, W. 2009. Long-term effects of Panax ginseng on disposition of fexofenadine in rats *in vivo*. *Am. J. Chin. Med.* **37**, 657-667.

### 초록 : *Enterococcus faecium* SA5의 기능적 특성과 인삼 ginsenoside Rb1의 전환

김은아<sup>1</sup> · 랜친핸드<sup>2</sup> · 어르가말 막살<sup>2</sup> · 박영우<sup>3</sup> · 남명수<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>서울F&B, <sup>2</sup>충남대학교 농업생명과학대학 동물자원과학부, <sup>3</sup>포트벨리 주립대학교 농업연구본부)

본 연구는 몽골 마유로부터 분리한 유산균 *Enterococcus faecium* SA5의 이화학 특성을 파악하고 유산균 *E. faecium* SA5의  $\beta$ -glucosidase의 활성과 이를 통한 ginsenoside 전환을 확인하는 것을 목표로 진행되었다. *E. faecium* SA5는 내산성, 내담즙성을 나타내었으며 4종의 병원성 미생물(*Salmonella typhimurium* KCTC 3216, *Listeria monocytogenes* KCTC 3710, *Bacillus cereus* KCTC 1012, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621)에 항균 활성을 가질 뿐만 아니라 항생물질 colistin, gentamycin, neomycin에 내성을 나타내었다. 또한, *E. faecium* SA5는 bile salt hydrolase 활성을 나타내어 혈액 내 콜레스테롤 수준 감소 효과가 있다고 사료되며 10% skim milk에서 배양하였을 때, pH가 감소하고 산도 및 생균수가 증가하는 것으로 보아 발효유 스타터로써의 활성을 갖는 것으로 판단되었다. 또한 *E. faecium* SA5의  $\beta$ -glucosidase에 의해 ginsenoside Rb<sub>1</sub>이 ginsenoside Rg<sub>3-s</sub>와 Rg<sub>3-r</sub>으로 전환되었음을 TLC 분석을 통해 확인하였다. 따라서 *E. faecium* SA5는 잠재적인 probiotics로 이를 이용하여 발효유 제조 및 ginsenoside 전환 관련 건강기능식품 개발에 응용할 수 있을 것으로 사료된다.