

김치에서 분리된 젖산균의 β -glucuronidase 활성 탐색

김은정¹, 신인웅¹, 권세영¹, 박은희¹, 이재형², 김명동^{1*}

¹강원대학교 바이오산업공학부

²강원도농업기술원 인삼약초연구소

Received: January 7, 2019 / Revised: February 2, 2019 / Accepted: February 27, 2019

Exploration of β -Glucuronidase Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from *Kimchi*

Eun-Jung Kim¹, In-Ung Shin¹, Se-Young Kwun¹, Eun-Hee Park¹, Jae-Hyoung Yi², and Myoung-Dong Kim^{1*}

¹Division of Food Biotechnology and Biosystems Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

²Ginseng and Medicinal Plant Research Institute, Gangwon Agricultural Research & Extension Services, Cheorwon 24054, Republic of Korea

Lactic acid bacteria (LAB) isolated from *kimchi* were studied for their β -glucuronidase activity. Among the 156 strains tested, 52 strains utilized glucuronic acid as a carbon source and their intracellular β -glucuronidase activities were significantly higher than their extracellular activities. *Leuconostoc mesenteroides* KFRI 73007 isolated from turnip *kimchi* exhibited the highest intracellular β -glucuronidase activity of 0.77 ± 0.01 U/mg protein, which was further increased to 1.14 ± 0.01 U/mg protein under optimized reaction conditions (pH 7, 37°C). The activity of β -glucuronidase was notably decreased by the addition of divalent cations, and glucuronic acid was the best carbon source to produce β -glucuronidase in *Leu. mesenteroides* KFRI 73007.

Keywords: β -Glucuronidase, *Kimchi*, Lactic acid bacteria, *Leuconostoc mesenteroides*

김치는 우리나라 고유의 전통발효 식품으로 섬유소, 비타민, 무기질 등의 공급원으로 알려져 있으며[1, 2], 배추, 무 등의 주재료와 고추, 파, 마늘 등의 향신료, 젓갈, 소금 등의 조미료, 기타 부재료를 원료로 사용하며 원료에 포함된 미생물에 의하여 발효된다[3, 4]. 김치 발효에서 중요한 역할을 수행하는 젖산균은 정상적인 장관 등에서 미생물 균총을 유지하고, 항암, 콜레스테롤 감소 및 면역 증진 등의 유익한 효능이 보고되었다[5–7]. 또한, 인삼의 진세노사이드[8], GABA (γ -aminobutyric acid) [9] 등 다양한 유용물질 생산을 위한 스타터 균주로서 개발된 바 있다[10].

생물전환은 미생물이 보유하고 있는 효소를 이용하여 기질로부터 목적하는 물질을 제조하는 기술을 의미하며[11], 유용물질 생산을 위한 방법으로서 상대적으로 안전성이 우수한 전통식품 유래의 미생물을 이용하는 연구가 증가하고 있다[12]. 곰팡이를 이용한 생물전환 연구로는 *Aspergillus usamii* KCTC 6954 균주를 이용하여 ginsenoside Rb1을

compound K로 전환한 연구[13]와 *Aspergillus niger* 균주의 hemicellulase계 효소를 이용한 자일로즈 생산[14]에 대한 연구 등이 보고되었다.

생물전환 균주로 젖산균을 사용하기 위하여 β -xylosidase [15], β -galactosidase[16], β -arabinofuranosidase [17], β -glucosidase [18] 등의 효소 활성에 대한 연구가 보고되었으며, 녹차 추출물을 *Leuconostoc mesenteroides* 균주로 생물전환하여 카테킨 함량을 증대시킨 연구[16]와 *Lactobacillus plantarum* 균주를 이용하여 GABA를 생산한 연구결과[9]가 보고되었다.

β -Glucuronidase (EC 3.2.1.31)는 동물, 식물, 미생물 등의 다양한 종에서 보고되었으며, β -형태 1번 탄소에 결합한 glucuronide 단위를 가수분해하는 효소이다[19]. 동물에서는 간장과 신장에서 주로 발견되며[19], 지용성 독성물질에 glucuronic acid, sulfuric acid와 같은 친수성 물질들을 포함시켜 소변으로 배출을 촉진시키는 것으로 알려져 있다[20]. 이때 배출되지 못한 독성물질이 β -glucoside 배당체와 glucuronic acid 화합물의 결합을 분해하여 암을 유발하는 것으로 알려져 있다[21].

암을 유발시키는 것과 관련이 있는 장내 미생물이 생산하

*Corresponding author

Tel: +82-33-250-6458, Fax: +82-33-259-5565

E-mail: mdkim@kangwon.ac.kr

© 2019, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

는 물질 중의 하나인 β -glucuronidase는 *Clostridium* spp.에서 활성을 보였으며, *Bifidobacterium* spp. 등에서는 활성을 나타내지 않았다[22]. 종양에서 β -glucuronidase는 염증세포에 의해 괴사 부위에서 세포 외로 분비되고 건강한 조직에서는 lysosome에서 활성이 보고되었다[23].

미생물에서는 *Asp. niger* [24], *Lactobacillus gasseri* [25], *Escherichia coli* 등에서 β -glucuronidase 효소가 보고되었으며[26], 감초와 대추의 분획물의 *Escherichia coli* HGU-3의 β -glucuronidase 활성에 대한 유의적인 저해효과가 보고되었다[27]. 또한 장내 미생물에 의한 대사산물 생성, 항산화 효소를 이용한 방어기전 생성 및 효소의 불활성화 등이 암 유발을 감소시키는 방안으로 보고된 바 있다[22].

체내 혈청에서 β -glucuronidase 활성의 범위는 0.8–2.3 U/l로 보고되었으며[28], 간암, 결장암 등에 의해 증가되는 것으로 나타나 종양마커로 활용될 수 있는 것으로 알려졌으며, 암의 조기 진단 및 임상요법의 효능을 평가하는 방법으로서 관련 연구가 지속되고 있다[29]. Jeffrey 등[30]의 연구에 따르면 linker drug는 효소에 의한 가수분해를 통해 항체-약물간 해리현상에 의해 타겟 암세포에 약효를 나타내는 것으로 보고되었다. β -Glucuronidase에 의해 가수분해 되는 glucuronide는 친수성이 커서 소수성의 성질이 높은 약물과 결합시키면 항체-약물 복합체의 용해도가 증가하는 것으로 보고되었다[30].

황금추출물을 원료로 사용한 기존 연구에서 곰팡이 유래의 β -glucuronidase를 이용하여 황금추출물의 성분인 baicalin, wogonoside를 비배당체인 baicalein, wogonin으로 전환시키는 내용이 보고되었으나[31], 세균 유래의 β -glucuronidase를 이용한 생물전환 연구는 충분하지 않다.

본 연구에서는 김치에서 분리된 젖산균의 β -glucuronidase 활성을 탐색하여 황금추출물 등 배당체 기질을 비배당체 생산물로 효율적으로 전환시키는 스타터 균주로서의 가능성을 평가하였다.

한국생명공학연구원 미생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC) 및 한국식품연구원(Korea Food Research Institute, KFRI)에 기탁되어 있는 김치에서 분리된 *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*속 등 156점의 균주를 분양받아 사용하였다.

균주는 -80°C 냉동고(Ilshin, Korea)에 보관하였고, MRS (BD Diagnostic Systems, USA) 배지에 접종한 후, 진탕배양기(Hanbaek Scientific Co., Korea)를 사용하여 30°C에서 10시간 배양하였다. 배양액의 흡광도(OD₆₀₀)를 측정하고 적정량의 배양액을 취한 후 원심분리(16,000 ×g, 4°C, 15분)하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포를 멸균 증류수로 2회 세척 후 glucuronic acid (Sigma-Aldrich, USA) 0.1% (w/v)가 첨가된 MRS 배지에 세포의 초기흡광도(OD₆₀₀)가 0.1이 되도록 접종하였다. 진탕배양기를 이용하여 세포흡광도(OD₆₀₀)

가 1이 될 때까지 30°C에서 배양한 후 원심분리하여 세포와 상등액을 확보하였다.

세포 외 β -glucuronidase 효소활성은 Kim 등[31]의 방법을 일부 수정하여 측정하였다. 세포를 파쇄한 후, 원심분리하여 상등액을 회수하고 조효소액으로 이용하였다. 기질은 p -nitrophenyl- β -D-glucuronide (Sigma-Aldrich)를 sodium acetate/acetic acid 완충액(50 mM, pH 5)에 5 mM이 되도록 용해시켜 사용하였다. 조효소액 70 μ l에 기질용액을 30 μ l 첨가하여 37°C에서 30분 동안 반응하였다. 효소반응은 0.5 M Na₂CO₃ (Korea) 100 μ l를 주입하여 종결하였다. 생성된 p -nitrophenol 농도는 405 nm에서 흡광도를 측정하고 표준선을 이용하여 결정하였다. 1 unit의 효소활성은 37°C, pH 5 조건에서 1분 동안 1 μ mole의 p -nitrophenol을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

세포 내 효소활성 측정을 위해 배양액을 원심분리하여 얻은 세포에 700 μ l의 sodium acetate/acetic acid 완충액(50 mM, pH 5)과 0.2 mm stainless beads (Nextadvance, USA)를 0.25 g을 주입한 후, 균질기(Nextadvance, USA)를 이용하여 3분 동안 파쇄하였다. 세포 파쇄물을 회수하고 원심분리(16,000 ×g, 4°C, 15분)하여 조효소액을 얻었다.

반응조건이 효소활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 pH 3–9의 완충액(pH 3: sodium citrate/HCl, pH 4: sodium citrate/citric acid, pH 5: sodium acetate/acetic acid, pH 6, 7, 8: sodium phosphate, pH 9: Tris/HCl)을 사용하여 효소활성을 조사하고[15], 반응온도에 따른 효소활성을 측정하였다. 금속이온의 영향을 조사하기 위하여 반응액에 ZnCl₂, CaCl₂, CuCl₂, MnCl₂, MgCl₂, CoCl₂ 및 FeCl₂의 최종 농도가 각각 2 mM이 되도록 첨가하였다. 단백질 농도는 Bradford dye reagent (Bio-Rad, USA)를 사용하여 측정하였으며, 표준선은 bovine serum albumin (Bio-Rad)을 사용하여 작성하였다. 모든 측정은 5회 이상 반복하여 평균과 표준오차를 결정하였으며, 통계분석은 SigmaPlot (Ver. 14; SPSS Inc., USA)을 사용하였다.

MRS 배지에 포함된 포도당을 glucuronic acid로 대체하고 젖산균의 glucuronic acid 대사능을 조사하였다. 젖산균 156점 중 glucuronic acid를 탄소원으로 이용한 균주는 52점이었으며, 이들 균주 세포 내외의 β -glucuronidase 효소활성을 측정하였다(Fig. 1).

대부분의 젖산균들은 세포 외보다 세포 내 β -glucuronidase 효소활성이 상대적으로 높았다. *Lactobacillus* 속 젖산균 중에서 *L. brevis* 균주들의 세포내 β -glucuronidase 효소활성이 상대적으로 높게 나타났으며, *L. brevis* KFRI 200117, KFRI 62001, KFRI 200127의 균주들에서 0.21–0.24 U/mg protein의 효소활성을 나타냈다. 그러나, *Lactobacillus* 속 젖산균들은 *Leuconostoc* 속의 젖산균들보다 상대적으로 낮은

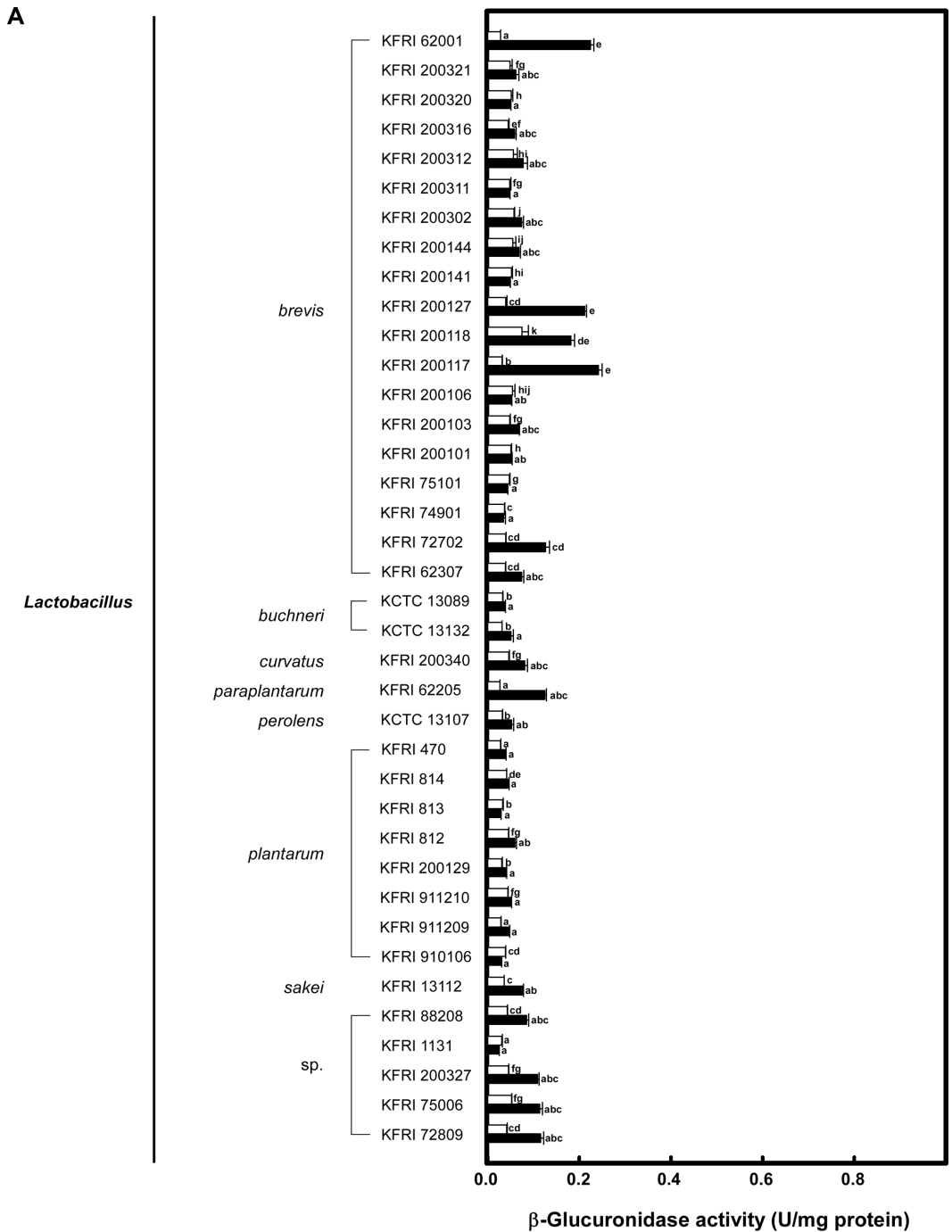


Fig. 1. β -Glucuronidase activities of LAB isolated from kimchi. Data for *Lactobacillus* strains are shown in panel A. Panel B shows data for *Leuconostoc* and *Pediococcus* strains. Averages and standard errors determined from five independent cultures grown in MRS medium at 30 °C to OD₆₀₀ = 1 were shown. The bars indicate extracellular-(Open, □) and intracellular-(Closed, ■) enzyme activity, respectively. Different letters indicate significant difference between averages.

효소활성을 나타냈다. *Leuconostoc* 속의 젓산균 중에서 *Leu. mesenteroides* 젓산균들의 세포내 β -glucuronidase 효소활성

이 높았으며, *Leu. mesenteroides* KFRI 73007 균주는 0.77 ± 0.01 U/mg protein으로 가장 높은 효소활성을 나타내

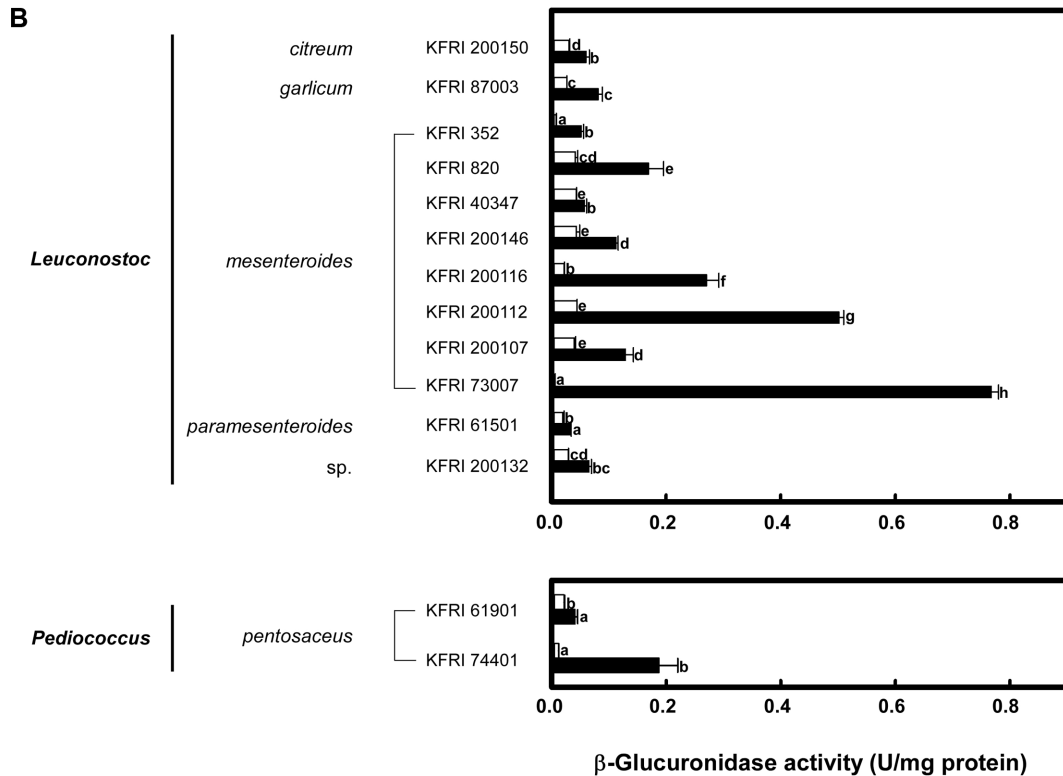


Fig. 1. Continued.

었다(Fig. 1B). 그러나 *Leu. mesenteroides* KFRI 73007 균주의 세포의 β-glucuronidase 효소활성은 0.01 ± 0.00 U/mg protein으로 52점의 젖산균 중에서 가장 낮은 활성을 나타냈다. *Leu. mesenteroides* KFRI 73007 균주는 β-glucuronidase 효소를 생산하지만 세포 외부로 분비하는 능력이 낮은 것으로 판단되었다. 효소활성이 가장 높은 균주로서 *Leu. mesenteroides* KFRI 73007 균주를 선발하고, 효소활성의 특성에 대하여 조사하였다.

효소활성이 가장 높은 *Leu. mesenteroides* KFRI 73007 균주를 이용하여 반응 조건에 따른 효소활성의 변화를 조사하였다(Fig. 2). 반응용액의 pH에 대한 *Leu. mesenteroides* KFRI 73007 균주의 β-glucuronidase의 활성은 pH 7에서 1.03 ± 0.01 U/mg protein으로 가장 높았으며, pH 5-7 범위에서 효소활성이 전반적으로 높게 나타났다(Fig. 2A). 그러나 pH 4 이하와 pH 8 이상에서는 효소활성이 0.2 U/mg protein 이하로 나타났다.

L. gasseri ADH 유래의 β-glucuronidase 효소는 pH 5에서 가장 높은 활성을 나타냈으며, pH 6 이상에서는 활성이 감소하는 경향을 나타냈다[32]. 곰팡이인 *Asp. niger* 유래의 β-glucuronidase는 pH 3-4에서 가장 높은 효소활성을 나타냈으며[33], *Streptococcus equi* subsp. *zooepidermicus* 균

주의 β-glucuronidase는 pH 5.6에서 가장 높은 활성을 나타냈다[34].

효소활성이 가장 높았던 pH 7에서 반응온도에 따른 β-glucuronidase 효소활성의 변화를 조사하였다(Fig. 2B). *Leu. mesenteroides* KFRI 73007 균주는 37°C에서 1.14 ± 0.01 U/mg protein으로 가장 높은 β-glucuronidase 효소활성을 나타냈으며, 반응온도가 증가함에 따라서 효소의 활성이 유의적으로 감소하였다. 반응온도 50°C에서는 37°C에서 측정된 β-glucuronidase 효소활성의 약 50% 수준인 0.64 ± 0.01 U/mg protein으로 나타났으며, 60°C에서는 0.47 ± 0.01 U/mg protein으로 더 낮은 활성을 나타냈다. 따라서, β-glucuronidase 효소의 최적 반응조건을 pH 7, 반응온도 37°C로 판단하였다.

L. brevis 유래의 β-glucuronidase를 대장균에서 발현하였을 때 37°C에서 가장 높은 활성을 나타냈으며[31], 유전자 조작을 통하여 *L. gasseri* ADH 균주 유래의 β-glucuronidase가 65°C의 고온에서도 활성을 나타내도록 개량한 연구 결과가 보고된 바 있다[25].

금속이온에 대한 *Leu. mesenteroides* KFRI 73007 균주의 β-glucuronidase 효소활성 변화를 조사하기 위해 pH 7로 조정된 반응액을 이용하여 금속이온을 각각 첨가한 후 37°C에

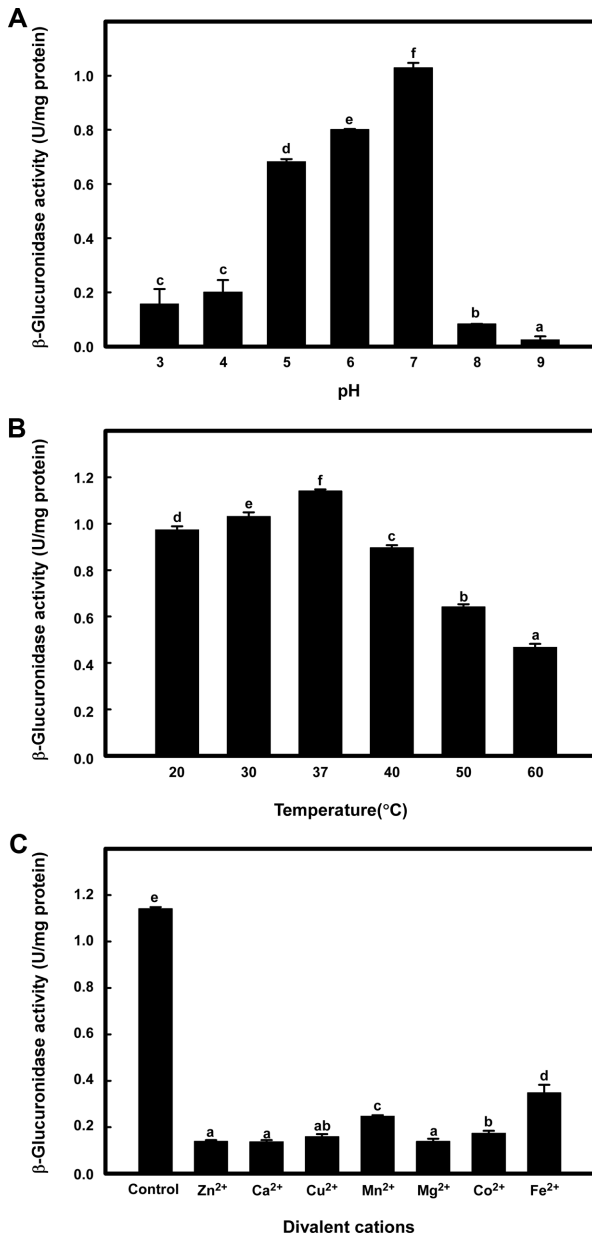


Fig. 2. Effect of pH (A, 30 °C), temperature (B, pH 7), and divalent cations (C, pH 7, 37 °C) on intracellular β -glucuronidase activity of *Leu. mesenteroides* KFRI 73007. Each cation was added to the reaction mixture at final concentration of 2 mM. Averages and standard errors determined from five independent experiments are shown. Different letters indicate significant difference between averages.

서 효소활성을 측정하였다(Fig. 2C). 금속이온이 첨가된 경우, 효소의 활성이 감소하는 경향을 나타냈으며, Zn²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺을 첨가한 효소반응에서 대조구와 비교하여 약 87% 감소하였다.

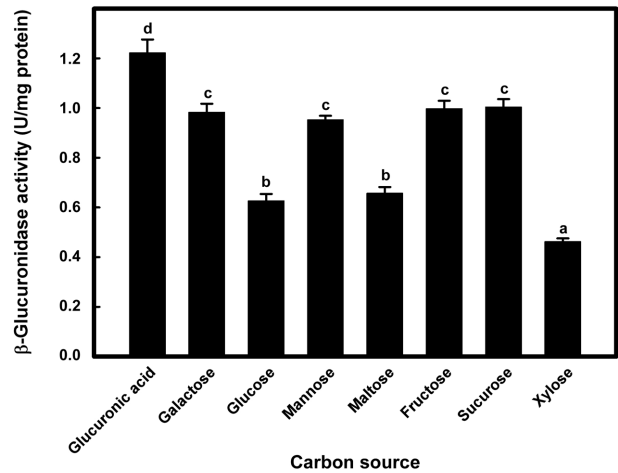


Fig. 3. Intracellular β -glucuronidase activity of *Leu. mesenteroides* KFRI 73007 grown in different carbon sources. Each carbon source was added to glucose-free MRS medium at a concentration of 2% (w/v) except glucuronic acid (0.1%). Enzyme activities were assayed at pH 7 and 37 °C. Averages and standard errors determined from five independent measurements are shown. Different letters indicate significant difference between averages.

장내에서 분리된 *E. coli* HGU-3 유래의 β -glucuronidase 효소는 Mg²⁺ 이온과 Ca²⁺ 이온을 첨가한 경우, 각각 24.8%, 14.8%의 효소활성 감소를 나타낸 것으로 보고되었다[35]. *Aspergillus terreus* 유래의 β -glucuronidase 효소는 Na⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Al³⁺ 등의 금속이온에 의한 효소활성이 유의적으로 감소하였다[36].

다양한 탄소원을 사용하여 배양한 *Leu. mesenteroides* KFRI 73007 균주의 β -glucuronidase의 효소활성을 조사하였다(Fig. 3). 실험에 사용한 8가지의 탄소원 중에서 glucuronic acid를 탄소원으로 배양한 후 확보한 균체의 세포내 β -glucuronidase 효소활성은 pH 7, 반응온도 37°C에서 측정하였을 때 1.22 ± 0.05 U/mg protein으로서 가장 높았다. 그러나 탄소원으로 갈락토스, 만노스, 과당 및 설탕을 사용한 경우는 효소활성의 유의적인 차이가 없었으며, 자일로스를 탄소원으로 사용한 경우 0.46 ± 0.01 U/mg protein으로 가장 낮은 효소활성을 나타냈다.

Lee 등[20]의 연구에 따르면 장내 유해 효소인 β -glucuronidase의 활성이 김치 섭취 시 약 20% 감소하였다. 이러한 연구결과는 발암과 관련된 인자로 알려진 β -glucuronidase가 김치와 같은 발효식품에 포함된 젖산균에 의해 영향을 받은 것으로 추정된다.

본 연구에서는 김치에서 분리된 젖산균의 β -glucuronidase의 효소활성 탐색을 통해 배당체 기질을 효율적으로 분해하여 부가가치가 높은 비배당체 소재를 경제적으로 생산할 수

있는 공정을 활용하기 위한 기반을 확보하였다.

요약

전통발효식품인 김치에서 분리된 젖산균으로부터 β-glucuronidase 효소활성이 높은 균주를 선발하였다. 김치에서 분리된 156점의 젖산균 중 52점의 균주가 glucuronic acid를 탄소원으로 대사하였으며, 대부분의 젖산균은 세포내 β-glucuronidase 활성이 세포외 활성보다 유의적으로 높았다. 순무김치에서 분리된 *Leu. mesenteroides* KFRI 73007 균주가 0.77 ± 0.01 U/mg protein로서 가장 높은 세포내 β-glucuronidase 효소활성을 나타내었다. 최적 반응조건은 pH 7, 37°C이었으며 1.14 ± 0.01 U/mg protein의 효소활성을 나타냈다. 양이온 금속이온은 β-glucuronidase 효소활성을 약 70% 이상 저해하였으며, 균주 배양에 사용한 탄소원 중 β-glucuronidase 생산을 위한 최적의 탄소원은 glucuronic acid이었다.

Acknowledgments

This research was financially supported by the Ministry of Trade, Industry, and Energy (MOTIE), Korea, under the "Regional Specialized Industry Development Program" (reference number P0002815) supervised by the Korea Institute for Advancement of Technology (KIAT).

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Cheigh HS, Park KY. 1994. Biochemical, microbiological, and nutritional aspects of kimchi (Korean fermented vegetable products). *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **34**: 175-203.
- Son KH. 1991. Types and usage of kimchi. *J. Korean Soc. Food Cult.* **6**: 503-520.
- Lee EH, Lee MJ, Song YO. 2012. Comparison of fermentation properties of winter kimchi stored for 6 months in a kimchi refrigerator under ripening mode or storage mode. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **41**: 1619-1625.
- Lee CH. 1986. Kimchi; Korean fermented vegetable foods. *Korean J. Diet Cult.* **1**: 395-402.
- Shon MY, Nam SH, Lee SW. 2007. Antioxidant, anticancer activities and nitric oxide production of *Euphoria longana* fermented with lactic acid bacteria and *Bacillus subtilis*. *Korean J. Food Preserv.* **14**: 531-537.
- Kim MJ, Kim GR. 2006. *In vitro* evaluation of cholesterol reduction by lactic acid bacteria extracted from kimchi. *Culi. Sci. Hos Res.* **12**: 259-268.
- Lee HY, Lee JS, Kim DH, Lee SG, Lee YJ, Kim MD. 2012. Extraction methods influence inhibitory effects of *Agrimonia pilosa* on the growths of meat-poisoning lactic acid bacteria. *Food Eng. Prog.* **16**: 180-184.
- Park B, Hwang H, Lee J, Sohn SO, Lee SH, Jung MY, et al. 2017. Evaluation of ginsenoside bioconversion of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *J. Ginseng. Res.* **41**: 524-530.
- Park EJ, Lee SO, Lee SP. 2017. Development of natural fermented seasoning with *Flammulina velutipes* powder fortified with γ-aminobutyric acid (GABA) by lactic acid fermentation. *Korean J. Food Preserv.* **24**: 237-245.
- Jin HS, Kim JB, Yun YJ, Lee KJ. 2008. Selection of *Kimchi* starters based on the microbial composition of *Kimchi* and their effects. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **37**: 671-675.
- Jung BH, Hong SG, Sung MH. 1995. Research status of bio-transformation technology and industrial utilization technology. *Korean Soc. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 4057-4067.
- Lee JH, Jo EH, Hong EJ, Kim KM, Lee IH. 2014. Safety evaluation of filamentous fungi isolated from industrial *doenjang koji*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 1397-1404.
- Jo MN, Jung JE, Yoon HJ, Chang KH, Jae HS, Kim KT, et al. 2014. Bioconversion of ginsenoside Rb1 to the pharmaceutical ginsenoside compound K using *Aspergillus usarii* KCTC 6954. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 347-353.
- Han MH, Choi YD, Park MO. 1983. Studies on hemicellulase system in *Aspergillus niger*. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **11**: 193-199.
- Jang MH, Kim MD. 2011. β-1,4-Xylosidase activity of *Leuconostoc* lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Korean J. Food Sci. Technol.* **43**: 169-175.
- Choi CY, Park EH, Ju YW, Kim MD. 2016. Increase of epigallocatechin in green tea extract by lactic acid bacteria fermentation. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **44**: 62-67.
- Marcolongo L, Ionata E, La Cara F, Amore A, Giacobbe S, Pepe O, et al. 2014. The effect of *Pleurotus ostreatus* arabinofuranosidase and its evolved variant in lignocellulosic biomasses conversion. *Fungal Genet. Biol.* **72**: 162-167.
- Jang MH, Kim MD. 2010. Exploration of β-glucosidase activity of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Food Eng. Prog.* **14**: 243-248.
- Oh EH, Park JM, Kim SH, Song IG, Han NS. 2012. Biological activities of *Phellinus linteus* mycelium culture with cassiae semen extract on β-glucuronidase inhibitory activity. *Korean J. Food Nutr.* **25**: 620-628.
- Lee KE, Choi UH, Ji GE. 1996. Effect of *kimchi* intake on the composition of human large intestinal bacteria. *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**: 981-986.
- Nanno M, Morotomi M, Takayama H, Kuroshima T, Tanaka R, Mutai M. 1986. Mutagenic activation of biliary metabolites of benzo(a)pyrene by β-glucuronidase-positive bacteria in human faeces. *J. Med. Microbiol.* **22**: 351-355.
- Myung DS, Joo YE. 2012. Gut microbial influence and probiot-

- ics on colorectal cancer. *Korean J. Gastroenterol.* **60**: 275-284.
23. Tranoy-Opalinski I, Legigan T, Barat R, Clarhaut J, Thomas M, Renoux B, *et al.* 2014. β -Glucuronidase-responsive prodrugs for selective cancer chemotherapy: an update. *Eur. J. Med. Chem.* **74**: 302-313.
24. Kuroyama H, Tsutsui N, Hashimoto Y, Tsumuraya Y. 2001. Purification and characterization of a β -glucuronidase from *Aspergillus niger*. *Carbohydr. Res.* **333**: 27-39.
25. Russell WM, Klaenhammer TR. 2001. Identification and cloning of *gusA*, encoding a new β -glucuronidase from *Lactobacillus gasseri* ADH. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1253-1261.
26. Tryland I, Fiksdal L. 1998. Enzyme characteristics of β -D-galactosidase- and β -D-glucuronidase-positive bacteria and their interference in rapid methods for detection of waterborne coliforms and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1018-1023.
27. Rhee YK, Kim DH, Han MJ. 1998. Inhibitory effect of *Zizyphi fructus* on β -glucuronidase and tryptophanase of human intestinal bacteria. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**: 199-205.
28. Falkenbach A, Wigand R, Unkelbach U, Jorgens K, Martinovic A, Scheuermann EH, *et al.* 1993. Cyclosporin treatment in rheumatoid arthritis is associated with an increased serum activity of β -glucuronidase. *Scand. J. Rheumatol.* **22**: 83-85.
29. Baharudin MS, Taha M, Imran S, Ismail NH, Rahim F, Javid MT, *et al.* 2017. Synthesis of indole analogs as potent β -glucuronidase inhibitors. *Bioorg. Chem.* **72**: 323-332.
30. Jeffrey SC, Andreyka JB, Bernhardt SX, Kissler KM, Kline T, Lenox JS, *et al.* 2006. Development and properties of β -glucuronide linkers for monoclonal antibody-drug conjugates. *Bioconjug. Chem.* **17**: 831-840.
31. Kim HS, Kim JY, Park MS, Zheng H, Ji GE. 2009. Cloning and expression of β -glucuronidase from *Lactobacillus brevis* in *E. coli* and application in the bioconversion of baicalin and wogonoside. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 1650-1655.
32. Callanan MJ, Russell WM, Klaenhammer TR. 2007. Modification of *Lactobacillus* β -glucuronidase activity by random mutagenesis. *Gene* **389**: 122-127.
33. Konishi T, Kotake T, Soraya D, Matsuoka K, Koyama T, Kaneko S, *et al.* 2008. Properties of family 79 β -glucuronidases that hydrolyze β -glucuronosyl and 4-O-methyl- β -glucuronosyl residues of arabinogalactan-protein. *Carbohydr. Res.* **343**: 1191-1201.
34. Krahulec J, Krahulcova J. 2007. Characterization of the new β -glucuronidase from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**: 1016-1022.
35. Kim DH, Jin YH, Jung EA, Han MJ, Kobashi K. 1995. Purification and characterization of β -glucuronidase from *Escherichia coli* HGU-3, a human intestinal bacterium. *Biol. Pharm. Bull.* **18**: 1184-1188.
36. Xu Y, Liu Y, Rasool A, E W, Li C. 2017. Sequence editing strategy for improving performance of β -glucuronidase from *Aspergillus terreus*. *Chem. Eng. Sci.* **167**: 145-153.