

## 비피도박테리움 CBT BG7, BR3, BL3의 진세노사이드 전환능

최지원<sup>†</sup>, 권창<sup>†</sup>, 김종원, 정명준, 윤종현\*, 임상현\*  
(주)셀바이오텍 세포공학연구소

Received: August 7, 2022 / Revised: September 6, 2022 / Accepted: September 7, 2022

### Bioconversion of Ginsenosides by *Bifidobacterium* CBT BG7, BR3 and BL3

Jiwon Choi<sup>†</sup>, Chang Kwon<sup>†</sup>, Jong Won Kim, Myung Jun Chung, Jong Hyun Yoon\*, and Sanghyun Lim\*  
R&D Center, Cell Biotech Co., Ltd., Gimpo 10003, Republic of Korea

In this study, we identified that the fermentation of Korean indigenous probiotics and red ginseng produced ginsenoside compound K (CK) from major ginsenosides. Based on whole genome sequencing of 19 probiotics species,  $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -arabinofuranosidase,  $\beta$ -xylosidase, and  $\alpha$ -rhamnosidase related to bioconversion of ginsenosides are identified in the genome of 19 species, 3 species, 6 species, and 8 species, respectively. Among the 19 probiotics species, *Bifidobacterium longum* CBT BG7 converted from ginsenoside Rb1 to CK, and both *B. breve* CBT BR3 and *B. lactis* CBT BL3 converted ginsenoside Rb1 to Rd. The final concentration and yield of ginsenoside F2 and CK were higher in the fermentation with the nondisrupted cells than with disrupted cells. The combination of both CBT BG7 and BL3, and CBT BG7 and BR3 showed higher amounts of F2 than CBT BG7 only. CBT BG7 with adding  $\alpha$ -amylase increased the amounts of F2. In this study, we identified that the fermentation of both Korean indigenous probiotic bacteria CBT BG7, BR3 and BL3, and red ginseng is able to produce CK, a bioactive compound that promotes health benefits.

**Keywords:** Korean indigenous probiotics, Red ginseng, bioconversion, ginsenosides, compound K

## 서 론

인삼은 오가과(Araliaceae), 인삼속(*Panax*)에 속하는 식물로 한국과 중국을 비롯한 동양에서 뿌리를 약용으로 이용하고 있다. 인삼은 소련의 과학자 C. A. Meyer가 1843년에 만병을 치료한다는 뜻으로 학명을 *Panax ginseng* C. A. Meyer라고 명명하였다. 인삼은 면역증강, 항염 작용, 항산화 작용, 기억력 개선, 피로회복, 혈행 개선 등의 기능성이 보고되었다[1–3]. 인삼의 주요한 생리활성물질로 인삼사포닌, 페놀성 물질, 폴리사세틸렌, 알칼로이드, 다당체 등이 알려져 있으며[4, 5], 동물실험과 임상연구를 통해 인삼사포닌으로 알려진 진세노사이드는 중요한 약리활성 성분으로 인정받고

있다[6].

인삼을 가공한 홍삼은 진세노사이드가 풍부하여 인삼보다 생리활성이 더 크다[7]. 홍삼의 주 생리활성물질은 진세노사이드로 피로회복, 혈행개선, 면역력강화, 기억력개선의 효능이 있다[2]. 진세노사이드는 당(glucose)이 다수 결합된 배당체 구조이며 인삼과 홍삼 속에는 진세노사이드의 90% 이상이 Rb1, Rb2, Rc, Re 등과 같은 분자량이 큰 형태로 존재하고 분자량이 작은 F2, Rg3, Rh2, compound K (CK)와 같은 진세노사이드가 미량 함유되어 있다[6, 8].

분자량이 큰 진세노사이드는 장관 투과성 및 생체 이용률이 낮은 반면 분자량이 작은 진세노사이드는 생체 흡수율이 높는데, 이는 장내미생물에 의해 당 가수분해가 일어나서 Rb1이 CK로 전환되어 흡수된다고 알려져 있다[8–11]. 분자량이 작거나 당이 하나만 결합된 CK와 같은 진세노사이드는 체내 흡수율이 높고, 분자량이 큰 주요 진세노사이드와 비교하여 약효 면에서 우수하다[3, 12]. CK의 약리작용은 항암, 항염, 항노화, 간기능강화 작용 등이 확인되었고[3, 13, 14], 진세노사이드 Rb1보다 항암 및 항염 효과가 높은 것으로 알려져 있다[14, 15].

### \*Corresponding authors

J. H. Yoon

Phone: +82-31-987-6205, Fax: +82-31-987-6216

E-mail: jhyoon1@cellbiotech.com

S. Lim

Phone: +82-31-987-6205, Fax: +82-31-987-6216

E-mail: shlim@cellbiotech.com

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

진세노사이드의 흡수율과 약효효과를 높이기 위하여 배당체의 당 결합을 끊을 수 있는 방법으로는 화학적, 물리적, 생물학적 방법 등이 있으나, 화학적 방법이나 물리적 방법은 환경오염물질 생성 및 에너지나 비용이 많이 드는 단점이 있다[16, 17]. 최근에는 생물학적 방법인 미생물 발효나 이들이 생산하는 효소를 활용한 연구가 이루어지고 있다[18, 19]. 진세노사이드 생물전환능을 가지는 미생물은 토양균, 곰팡이, 유산균 등이 있으나, 식품에 사용하기 위해서는 일반적으로 안전하다고 알려진 GRAS (generally recognized as safe) 미생물이고, 배양이 쉬워야 한다[6, 8]. 프로바이오틱스는 이러한 조건을 만족하는 대표적 미생물이다. 최근에  $\beta$ -glucosidase 활성이 높은 다양한 유산균을 이용하여 고분자 진세노사이드를 흡수율이 뛰어나고 생리활성이 높은 저분자 진세노사이드인 CK로 전환시키는 연구가 진행되고 있다[6]. 김치로부터 분리한 *Lactobacillus brevis* 균주를 인삼 발효하였을 때 CK가 생성되는 것을 확인하였고[20],  $\beta$ -glucosidase 활성이 높은 유산균이 진세노사이드 전환율이 높은 것으로 보고되었다[21].

따라서, 본 연구에서는 식품으로 사용 가능하고 마늘, 양파, 생강, 고추 등의 향신료에서 성장력이 높은 프로바이오틱스 10종[22]을 포함한 한국형 프로바이오틱스 19종이 홍삼의 주성분인 진세노사이드 전환에 미치는 영향을 조사하였다. 19종 프로바이오틱스 유전체분석을 통하여 저분자 진

세노사이드로 전환시킬 수 있는 효소들을 확인하였고, 배양 조건 최적화를 통해 CK로 생물전환능이 높은 균주를 선별하였다. 또한 선별된 균주를 혼합 배양 또는 효소처리 병행하여 CK 전환율이 높은 조건을 알아보려고 한다.

## 재료 및 방법

### 프로바이오틱스 종류 및 배양

본 연구는 (주)셀바이오텍이 한국인 분변 및 발효식품으로부터 분리한 프로바이오틱스 19종을 사용하였다(Table 1). *Lactobacillus* 종인 CBT LA1, LC5, LG1, LGA1, LH5, LPC5, LP3, LU4 및 LR5는 De Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) 배지(BD Difco, USA)에서 37°C에서 18시간 동안 호기적으로 배양했다. *Bifidobacterium* 종인 CBT BF3, BR3, BL3, BG7과 BT1은 glucose Bood Live (BL) 배지(KisanBio, Korea)에서 37°C에서 18시간 동안 혐기적으로 배양했다. *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium*를 제외한 CBT EFL2, EF4, SL6, SL4과 ST3는 37°C에서 18시간 동안 MRS 배지에서 호기적으로 배양했다.

진세노사이드 전환을 확인하기 위해서는 포도당을 제거한 MRS, BL 배지와 modified M9 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  7.52 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g/l, NaCl 0.5 g/l,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.5 g/l, glucose 4 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.236 g/l,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.044 g/l) 배지와 포

**Table 1. Probiotics species used in the study of ginsenoside bioconversion.**

Species	KCTC No.	Origin
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CBT LA1	11906BP	Korean human feces
<i>Lactobacillus casei</i> CBT LC5	12398BP	Korean human feces
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> CBT LG1	11864BP	Korean human milk
<i>Lactobacillus gasseri</i> CBT LGA1	12936BP	Korean human milk
<i>Lactobacillus helveticus</i> CBT LH5	12670BP	Korean human feces
<i>Lactobacillus paracasei</i> CBT LPC5	12451BP	Korean fermented food, Jeotgal
<i>Lactobacillus plantarum</i> CBT LP3	10782BP	Korean fermented vegetable product, kimchi
<i>Lactobacillus reuteri</i> CBT LU4	12397BP	Korean human feces
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CBT LR5	12202BP	Korean human feces
<i>Bifidobacterium bifidum</i> CBT BF3	12199BP	Korean infant feces
<i>Bifidobacterium breve</i> CBT BR3	12201BP	Korean infant feces
<i>Bifidobacterium lactis</i> CBT BL3	11904BP	Korean infant feces
<i>Bifidobacterium longum</i> CBT BG7	12200BP	Korean infant feces
<i>Bifidobacterium longum</i> ssp. <i>infantis</i> CBT BT1	11859BP	Korean infant feces
<i>Enterococcus faecalis</i> CBT EFL2	12394BP	Korean human feces
<i>Enterococcus faecium</i> CBT EF4	12450BP	Korean human feces
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CBT SL6	11865BP	Korean human feces
<i>Pediococcus pentosaceus</i> CBT SL4	10297BP	Korean fermented vegetable product, kimchi
<i>Streptococcus thermophilus</i> CBT ST3	11870BP	Korean human feces

도당을 제거한 modified M9 배지에 홍삼농축액분말20(충북 인삼농협고려인삼창 제공)을 10 g/l가 되도록 하여 사용하였다. 모든 데이터는 독립된 3번의 실험에서 나온 것이다.

### 미생물 파쇄

미생물을 24시간 배양하여 OD 범위가 4.2–4.9임을 확인한 후 배양액을 3220 ×g, 10분 간 원심분리해서 상등액을 버리고 균체만 모았다. Cell pellet에 멸균수나 PBS를 넣고 균질하게 섞은 후 나누어 받은 미파쇄용으로, 나머지 받은 파쇄용으로 사용하였다. 미생물 파쇄를 위해 사용한 초음파 처리(sonication) 조건은 10초 on, 10초 off, 60% amplitude, 180 sec이다.

파쇄한 균질액과 파쇄하지 않은 균질액을 25%, 50%, 100%의 농도별로 배양액에 접종하여, 37°C에서 48시간 배양하였다. 홍삼농축액분말20이 10 g/l가 되도록 추가했다. 샘플링은 5, 24, 48시간에 했고, 샘플을 이용해서 OD, pH와 진세노사이드의 농도를 분석했다.

### 균주 혼합 및 효소 혼합

CBT BG7 균주에 BL3, BR3와 LA1을 각각 혼합하여, 균주 접종량은 1% (v/v)으로 사용하였다.

효소 혼합을 위해 (주)셀바이오텍의 듀오자임 제품에 사용 중인  $\alpha$ -amylase (Fungamyl® Ultra WF G, Novozymes, Denmark)와 protease (Neutrase® 5.0 BG, Novozymes)를 본 연구에 사용하였다. CBT BG7과 효소 혼합 실험 조건에서 CBT BG7 배양액은 1% (v/v), 효소는 0.1 g/l로 혼합하여 사용하였다.

### 진세노이드 함량 분석

배양 여액을 4,255 ×g으로 10분간 원심분리한 뒤 상등액을 0.22  $\mu$ m PTFE membrane syringe filter (13 mm diameter, Agilent Technologies, USA)로 여과하여 검체로 사용하였다.

표준 물질로 사용한 진세노사이드 Rb1, Rd 그리고 CK는 Sigma-Aldrich (USA), 진세노사이드 F2는 Chem Faces (China)에서 구입하여 사용하였다. 진세노사이드 함량 분석은 한국건강기능식품협회에서 발간한 건강기능식품공전 II의 진세노사이드 분석법을 변형하여 실시하였다[23]. UV-detector가 부착된 UPLC (1290 Infinity, Agilent Technologies)를 사용하였고, 역상 column은 ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 (2.1 × 100 mm, 1.8  $\mu$ m, Agilent Technologies)를 사용하였다. Column oven 온도는 40°C, injection volume은 1  $\mu$ l, UV wavelength는 203 nm로 수행하였다. 이동상은 증류수 (A)와 acetonitrile (B)를 0.3 ml/min 유속으로 농도 구배를 주어 분석하였으며, 비율은 B 20% (0분), 20%

(0.1분), 80% (12분), 100% (13분), 100% (17분), 20% (18분), 20% (20분)로 실시하였다.

진세노사이드 대사체는 한국기초과학지원연구원 (KBSI, Republic of Korea)의 LC/mass spectrometry quadrupole time-of-flight (MS Q-TOF) (G6550A, Agilent Technologies) electrospray ionization (ESI)를 이용하여 확인하였다.

### 결과 및 고찰

#### 프로바이오틱스 19종의 유전체 분석 기반 진세노사이드 전환효소 확인

한국형 프로바이오틱스 19종의 유전체 분석 결과를 통해 모든 균주에서 고분자 진세노사이드 Rb1에서 저분자 진세노사이드 CK로 전환할 수 있는  $\beta$ -glucosidase 효소가 존재하는 것을 확인하였다. 세 가지 균주(CBT BL3, BG7 및 EF4)에서 진세노사이드 Rc에서 Rd로 전환될 때 필요한 효소인  $\alpha$ -arabinofuranosidase를 확인했고, 8종의 균주에서 Re와 Rg2에서 Rg1과 Rh1 전환 효소  $\alpha$ -rhamnosidase를 확인했고, 6종의 균주에서 Rb3에서 Rd로 전환되는  $\beta$ -xylosidase를 확인하였다(Table 2). 미생물에 의한 진세노사이드 전환 연구에서  $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -arabinofuranosidase,  $\alpha$ -arabinopyranosidase,  $\alpha$ -rhamnosidase 등의 효소활성이

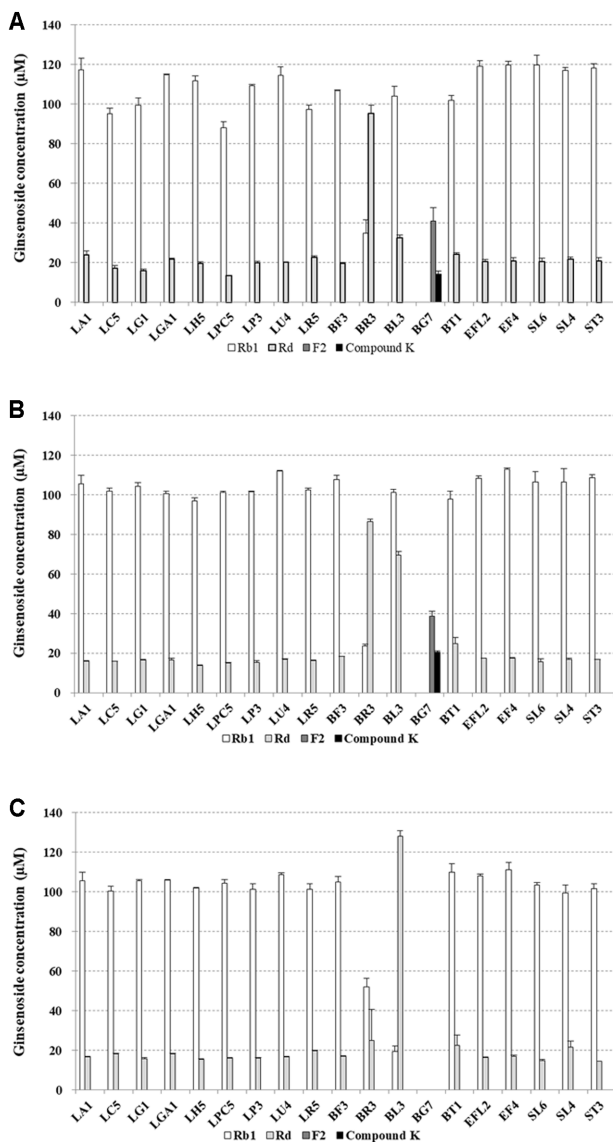
**Table 2. CBT probiotics species encoding enzymes related to the bioconversion of ginsenosides.**

Enzyme	Species
$\alpha$ -rhamnosidase	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CBT LA1
	<i>Lactobacillus casei</i> CBT LCS
	<i>Lactobacillus gasseri</i> CBT LGA1
	<i>Lactobacillus plantarum</i> CBT LP3
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CBT LR5
	<i>Bifidobacterium lactis</i> CBT BL3
	<i>Bifidobacterium longum</i> CBT BG7
	<i>Lactobacillus reuteri</i> CBT LU4
	<i>Enterococcus faecalis</i> CBT EFL2
	$\alpha$ -arabinofuranosidase
<i>Bifidobacterium longum</i> CBT BG7	
<i>Enterococcus faecium</i> CBT EF4	
$\beta$ -xylosidase	<i>Lactobacillus casei</i> CBT LCS
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> CBT LG1
	<i>Bifidobacterium lactis</i> CBT BL3
	<i>Bifidobacterium longum</i> CBT BG7
	<i>Enterococcus faecium</i> CBT EF4
$\beta$ -glucosidase	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CBT SL6
	All CBT 19 species

높으면 저분자 진세노사이드로 전환이 잘 일어난다고 알려져 있다[21, 24].

**진세노사이드 전환 균주 선별**

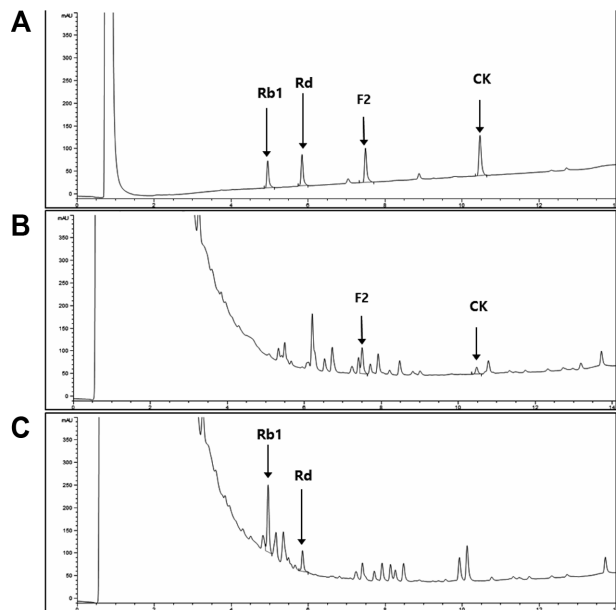
프로바이오틱스와 홍삼 발효여액에서 진세노사이드 Rb1, Rd, F2와 CK 함량을 측정하여 진세노사이드 전환 균주를 선별하였다. 포도당이 없는 BL 배지에서 CBT BR3와 BL3는 Rb1을 Rd로 전환시켜 Rd의 함량이 각각 95.3과 32.4 μM로 증가하였고, CBT BG7은 Rb1과 Rd를 전량 소모하여,



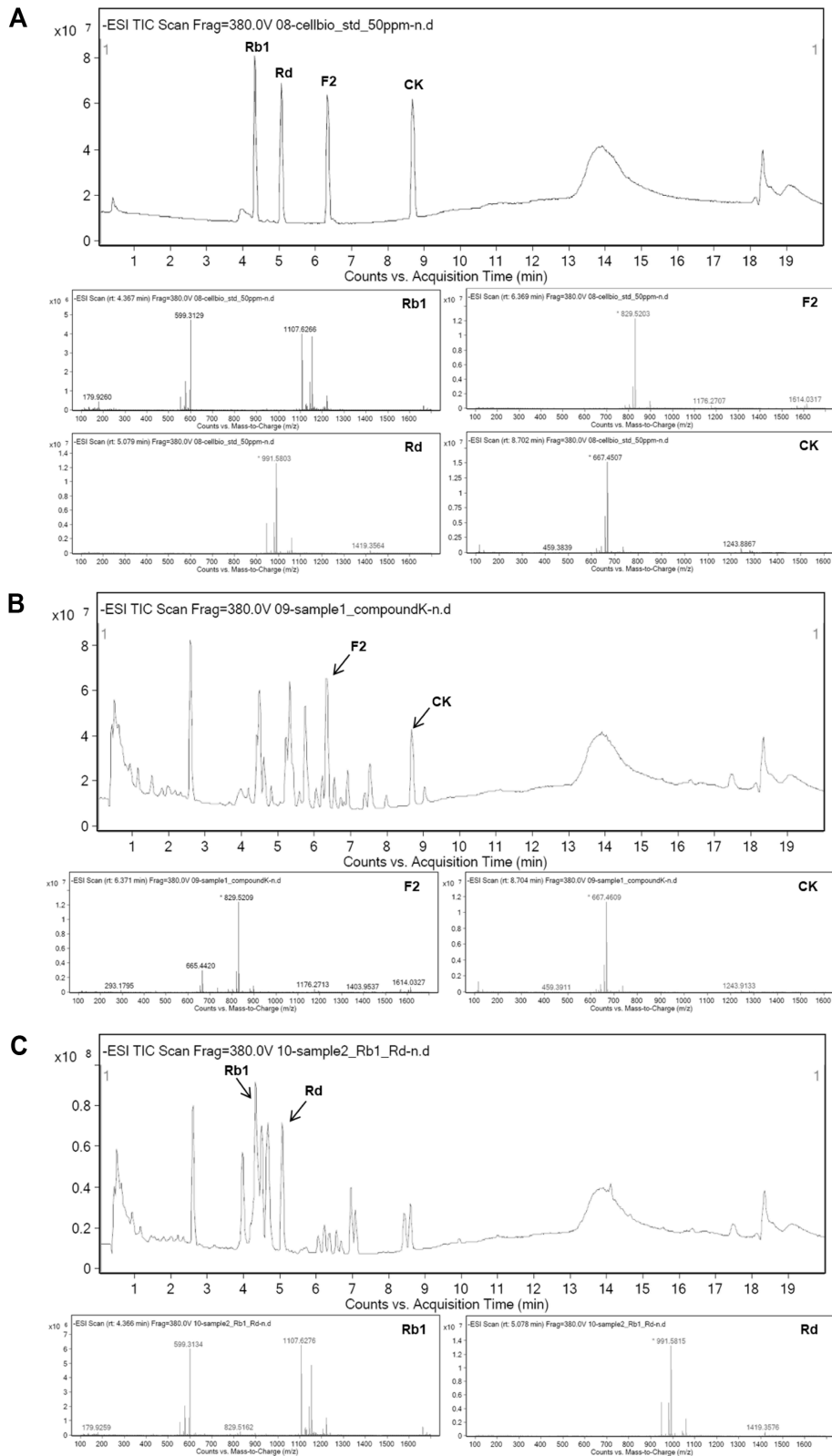
**Fig. 1. The concentration of ginsenosides 3 days after fermentation of CBT probiotics and red ginseng.** (A) Either MRS or BL broth without glucose, (B) Modified M9 broth, (C) Modified M9 broth without glucose.

41.0 μM의 F2와 14.4 μM의 CK로 전환시켰다(Fig. 1A). 균주 선별을 위하여 사용한 M9 배지에서는 CBT BR3와 BL3가 Rb1을 Rd로 전환시켜 Rd의 함량이 포도당 첨가 배지에서는 86.6과 69.7 μM, 포도당이 없는 배지에서는 39.6과 128.3 μM로 증가하였다(Fig. 1B, C). CBT BG7에 의한 F2와 CK로의 전환은 포도당이 있는 M9 배지에서 각각 39.0과 20.7 μM로 확인되었으며, 포도당이 없는 M9 배지에서는 검출되지 않았다(Fig. 1B, C). 포도당이 없는 M9 배지에서 CBT BG7은 1시간만에 진세노사이드 Rb1, Rd를 F2로 전환시킨 것이 확인되었지만, 1-3일째 배양액에서는 탐색한 4가지 진세노사이드들이 모두 검출되지 않았다(Fig. 1C). 이는 최소배지인 M9에 당이 없는 조건에서 보다 빠르게 Rb1, Rd가 소모되어 CK로 변환되었을 것으로 추정되었고, 유기용매인 부탄올을 사용하여 추출하였을 때 CK가 검출되었다(data not shown). MRS, BL 및 M9 배지에서 CBT BG7, BR3와 BL3 외 다른 균주들의 진세노사이드 전환능은 확인되지 않았다(Fig. 1).

장내미생물에 의해 진세노사이드가 전환되는 과정을 제안한 문헌에서 *Bifidobacterium* 균주가 주도적인 역할을 했는데, CBT 프로바이오틱스 19종 가운데 진세노사이드 전환 효과를 보여주는 균주들은 모두 *Bifidobacterium* 종이었다[25]. 진세노사이드의 전환은 HPLC로 확인하였고, LC/MS를 사용하여 진세노사이드 4종을 다시금 확인하였다(Figs. 2 and 3).



**Fig. 2. HPLC analysis of ginsenoside Rb1, Rd, F2, and CK in the media fermented by the probiotics and red ginseng.** (A) Standard samples, (B) CBT BG7, (C) CBT BL3.



**Fig. 3.** LC/MS analysis of ginsenosides Rb1, Rd, F2, and CK in the media fermented by the probiotics and red ginseng. (A) Standard samples, (B) CBT BG7, (C) CBT BL3.

**미생물 파쇄물에 의한 진세노사이드 전환율**

미생물을 파쇄하여 세포 내 효소로 인하여 진세노사이드 전환율을 증대하는지를 확인하기 위해서 진세노사이드 전환율을 확인한 CBT BR3, BL3, BG7과 전환능이 없는 CBT LA1을 각각 파쇄하였다. CBT BR3, BL3, BG7 각각의 파쇄물과 미파쇄물을 25%, 50%, 100% 농도로 전환율을 비교했을 때 미파쇄 조건에서 진세노사이드 전환율이 파쇄 조건보다 높았으며, 농도 의존적으로 전환율이 높았다(Table 3). 같은 농도에서 파쇄물과 미파쇄물의 전환율에 대해 통계적으로 유의한 차이가 보였다. CBT BG7의 Rb1으로부터 F2와 CK로의 전환율(mol/mol)은 각각 61.8%와 12.7%였다(미파쇄물 100%). CBT BR3와 BL3의 Rb1으로부터 Rd로의 전환율은 각각 86.9%와 61.2%를 보였으나, 두 균주 모두 F2, CK로의 전환능은 보이지 않았다(미파쇄물 100%). CBT BG7의

**Table 3. The yields of ginsenoside bioconversion by either nondisrupted cells or disrupted cells of CBT BR3, BL3, BG7, and LA1.** (A) Rd Yield (mol Rd/mol Rb1 + Rd), (B) F2 Yield (mol F2/mol Rb1 + Rd), (C) CK Yield (mol CK/mol Rb1 + Rd)

A					
Rd Yield (mol/mol)	Cell content	BR3	BL3	BG7	LA1
Nondisrupted cells	25%	40.3%	27.4%	0.0%	-0.4%
	50%	45.0%	45.8%	0.0%	-0.7%
	100%	86.9%	61.2%	0.0%	-0.7%
Disrupted cells	25%	32.2%	9.0%	0.0%	-0.9%
	50%	32.3%	13.3%	0.0%	-1.6%
	100%	50.2%	14.5%	0.0%	-1.9%

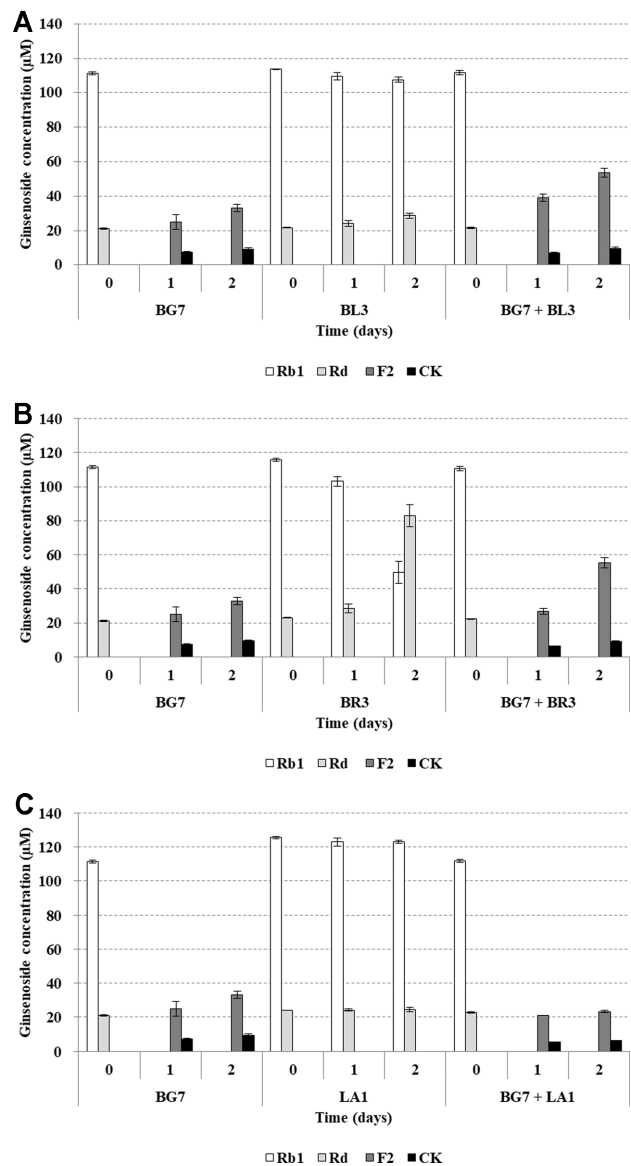
B					
F2 Yield (mol/mol)	Cell content	BR3	BL3	BG7	LA1
Nondisrupted cells	25%	0.0%	0.0%	37.5%	0.0%
	50%	0.0%	0.0%	46.5%	0.0%
	100%	0.0%	0.0%	61.8%	0.0%
Disrupted cells	25%	0.0%	0.0%	25.9%	0.0%
	50%	0.0%	0.0%	28.6%	0.0%
	100%	0.0%	0.0%	29.7%	0.0%

C					
CK Yield (mol/mol)	Cell content	BR3	BL3	BG7	LA1
Nondisrupted cells	25%	0.0%	0.0%	6.7%	0.0%
	50%	0.0%	0.0%	8.5%	0.0%
	100%	0.0%	0.0%	12.7%	0.0%
Disrupted cells	25%	0.0%	0.0%	5.0%	0.0%
	50%	0.0%	0.0%	4.8%	0.0%
	100%	0.0%	0.0%	4.6%	0.0%

경우에 미생물 파쇄 조건에 의한 전환율이 미파쇄 조건보다 낮은 것은 진세노사이드를 분해하는 효소의 활성이 미생물 미파쇄 조건에서 더 잘 유지가 되는 것으로 추정된다. 이러한 실험결과는 *L. rhamnosus* GG의 파쇄는  $\beta$ -glucosidase 활성을 감소시켜 미파쇄 미생물보다 Rb1에서 Rd로 전환이 낮다는 이전 보고와 유사하다[26].

이전 연구에서 당이 제거되지 않은 MRS 배지에서 배양된 *B. longum* RD47은 Rd까지만 전환하는 결과를 보여주었다 [27]. 하지만 CBT BG7은 Rd를 거쳐서 CK까지 전환이 가능했다. 이 결과는 CBT BG7 균주의 효소 활성이 높거나 효소



**Fig. 4. The concentration of ginsenosides by either single species or the combination of two probiotics species.** (A) CBT BG7 and BL3, (B) CBT BG7 and BR3, (C) CBT BG7 and LA1.

**Table 4. The yields of ginsenoside bioconversion by either single species or combination of two species.**

Yield (mol/mol)	Rd	F2	CK
BG7	0.0%	24.8%	7.0%
BR3	43.4%	0.0%	0.0%
BL3	5.2%	0.0%	0.0%
LA1	0.4%	0.0%	0.0%
BG7 + BR3	0.0%	41.7%	6.9%
BG7 + BL3	0.0%	40.2%	7.3%
BG7 + LA1	0.0%	17.4%	4.8%

활성을 극대화할 수 있는 조건에서 확인하였기 때문에 추정된다.

**균주 혼합에 의한 진세노사이드 전환율**

진세노사이드 CK로의 전환율을 보인 CBT BG7과 CBT BL3, BR3, LA1 중 하나를 혼합할 때 진세노사이드 전환율이 증가하는지 실험했다. CBT BG7 + BL3과 CBT BG7 + BR3 두 조건 모두 진세노사이드 F2의 전환율이 각각 41.7%, 40.2%로 CBT BG7 단독 배양 전환율 24.8%보다 높게 나타

**Table 5. The yields of ginsenoside bioconversion by adding enzymes.**

Yield (mol/mol)	Rd	F2	CK
BG7	0.0%	25.0%	7.1%
$\alpha$ -Amylase	32.9%	0.0%	0.0%
Protease	-1.5%	0.0%	0.0%
BG7 + $\alpha$ -Amylase	0.0%	61.5%	5.2%
BG7 + Protease	0.0%	20.5%	6.1%

났다(Fig. 4, Table 4).

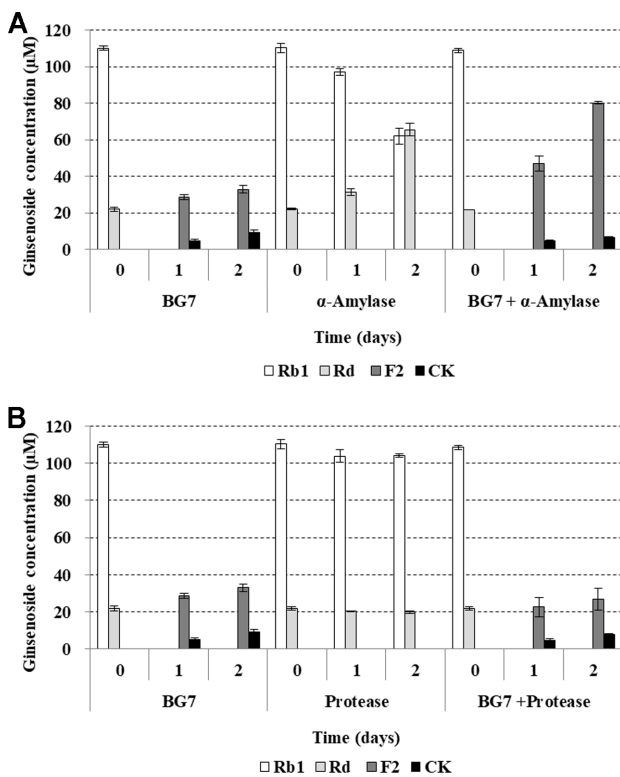
이전 연구에서 *L. helveticus* KII13과 *Pediococcus pentosaceus* KID7의 혼합으로 3일째 Rg3가 나타나고, 5일째 Rh2, Rh1으로 전환을 보였다[28]. 이 결과와 비교하면, CBT BG7 + BL3, BG7 + BR3, 및 BG7 세가지 균주 조합 모두에서 1일째부터 F2와 CK로의 빠른 전환이 확인되었다. CBT BG7 균주 내 생물전환과 관련된 효소의 활성이 높은 것으로 추정된다(Fig. 4).

**프로바이오틱스와 효소 혼합에 의한 진세노사이드 전환율**

본 연구에서는  $\alpha$ -amylase와 protease에 의한 진세노사이드 전환율을 확인하였다.  $\alpha$ -amylase는 배양시간 의존적으로 Rd의 생산량을 증가시켜 48시간에서는 Rb1 (62.0  $\mu$ M)과 Rd (65.6  $\mu$ M)의 함량이 거의 동일하게 되었고, 0시간 대비 Rd 전환율을 32.9%로 증가시켰다. 반면 protease는 진세노사이드 분해에 영향을 주지 않았다(Fig. 5, Table 5). CBT BG7 단독 배양시 F2 함량은 33.0  $\mu$ M로 0시간 대비 25%의 전환율을 나타냈고, BG7과  $\alpha$ -amylase를 함께 첨가하여 배양시 F2 함량은 80.2  $\mu$ M로 0시간 대비 61.5%의 전환율을 나타내었다. 따라서, BG7 단독 배양보다  $\alpha$ -amylase 첨가 배양시 F2 전환율이 증가됨을 확인하였다(Fig. 5A, Table 5). 이전 연구를 보면,  $\alpha$ -amylase로 인해 진세노사이드가 분해되어서 나온 포도당이 프로바이오틱스의 성장에 사용되었다[28, 29]. 따라서,  $\alpha$ -amylase 첨가로 홍삼분말에서 유리된 포도당이 CBT BG7의 성장과 진세노사이드 전환율 증가에 도움을 주는 것으로 사료된다.

**요 약**

본 연구에서는 한국형 프로바이오틱스와 홍삼을 발효하여 저분자 진세노사이드인 compound K (CK)로 생물전환되는지를 확인하였다. 프로바이오틱스 19종의 유전체 분석결과, 진세노사이드 Rb1에서 CK로 전환에 관련된  $\beta$ -glucosidase 유전자는 3종의 균주,  $\beta$ -xylosidase는 6종 균주,  $\alpha$ -rhamnosidase는 8종의 균주에서 확인되었다. 이 중 *B. longum* CBT BG7



**Fig. 5. The concentration of ginsenosides by CBT BG7 or CBT BG7 with enzymes. (A) Addition of  $\alpha$ -amylase, (B) Addition of protease.**

는 Rb1으로부터 CK까지 전환시켜, CK 함량을 증가시켰다. 또한, *B. breve* CBT BR3와 *B. lactis* CBT BL3은 Rb1을 Rd로 전환시켰다. 균체를 파쇄 또는 미파쇄하여 진세노사이드 전환 반응을 비교했을 때 미파쇄물이 F2와 CK로의 높은 전환량과 수율을 보였다. CBT BG7 + BL3와 BG7 + BR3 혼합 균주는 CBT BG7 단독보다 진세노사이드 F2의 함량을 증가시켰다. CBT BG7과  $\alpha$ -amylase 효소를 함께 반응하였을 때 F2 함량이 증가되었다. 본 연구는 한국형 프로바이오틱스인 CBT BG7, BR3, BL3와 홍삼을 함께 섭취할 경우, 건강에 도움을 주는 생리활성물질인 CK의 생산을 확인하였다. 추후 부탄올 등 다양한 추출용매를 활용하여 생물전환 효율 및 CK로의 전환율에 대한 추가 연구가 필요해 보인다.

## Acknowledgments

This work was supported by the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through the High Value-added Food Technology Development Program, funded by the Ministry of Agriculture, Food AND Rural Affairs (321036051HD040).

## Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

## References

- Park SY, Park JH, Kim HS, Lee CY, Lee HJ, Kang KS, et al. 2018. Systems-level mechanisms of action of Panax ginseng: a network pharmacological approach. *J. Ginseng Res.* **42**: 98-106.
- Park YC, Lim JD, Kim JB, Lee S. 2012. Review of red ginseng in terms of mechanisms for pharmacodynamics and toxicity. *J. Korean Orient. Med.* **33**: 200-230.
- Yang XD, Yang YY, Ouyang DS, Yang GP. 2015. A review of bio-transformation and pharmacology of ginsenoside compound K. *Fitoterapia* **100**: 208-220.
- Ganesan P, Ko HM, Kim IS, Choi DK. 2015. Recent trends of nano bioactive compounds from ginseng for its possible preventive role in chronic disease models. *RSC Adv.* **5**: 98634-98642.
- Christensen LP, Jensen M. 2009. Biomass and content of ginsenosides and polyacetylenes in American ginseng roots can be increased without affecting the profile of bioactive compounds. *J. Nat. Med.* **63**: 159-168.
- Park H. 2019. The role of gut microbiota in ginsenoside metabolism and biotransformation of ginsenoside by lactic acid bacteria. *Curr. Top. Lact. Acid Bact. Probiotics* **5**: 1-12.
- Shibata S. 2001. Chemistry and cancer preventing activities of ginseng saponins and some related triterpenoid compounds. *J. Korean Med. Sci.* **16**: Suppl: S28-S37.
- Han MH, Moon GS. 2019. Bioconversion of ginseng using microorganisms. *J. Biotechnol. Bioind.* **7**: 5-11.
- Akao T, Kanaoka M, Kobashi K. 1998. Appearance of compound a major metabolite of ginsenoside Rb<sub>1</sub> by intestinal bacteria, in rat plasma after oral administration measurement of compound K by enzyme immunoassay. *Biol. Pharm. Bull.* **21**: 245-249.
- Kim DH. 2009. Metabolism of ginsenosides to bioactive compounds by intestinal microflora and its industrial application. *J. Ginseng Res.* **33**: 165-176.
- Lee J, Lee E, Kim D, Yoo J, Koh B. 2009. Studies on absorption, distribution and metabolism of ginseng in humans after oral administration. *J. Ethnopharmacol.* **122**: 143-148.
- Santangelo R, Silvestrini A, Mancuso C. 2019. Ginsenosides, catechins, quercetin and gut microbiota: Current evidence of challenging interactions. *Food Chem. Toxicol.* **123**: 42-49.
- Bai L, Gao J, Wei F, Zhao J, Wang D, Wei J. 2018. Therapeutic potential of ginsenosides as an adjuvant treatment for diabetes. *Front. Pharmacol.* **9**: 423.
- Yao H, Wan JY, Zeng J, Huang WH, Sava-Segal C, Li L, et al. 2018. Effects of compound K, an enteric microbiome metabolite of ginseng, in the treatment of inflammation associated colon cancer. *Oncol. Lett.* **15**: 8339-8348.
- Wang CZ, Du GJ, Zhang Z, Wen XD, Calway T, Zhen Z, et al. 2012. Ginsenoside compound K, not Rb<sub>1</sub>, possesses potential chemopreventive activities in human colorectal cancer. *Int. J. Oncol.* **40**: 1970-1976.
- Chang KH, Jo MN, Kim HT, Paik HD. 2014. Evaluation of glucosidases of *Aspergillus niger* strain comparing with other glucosidases in transformation of ginsenoside Rb<sub>1</sub> to ginsenosides Rg3. *J. Ginseng Res.* **38**: 47-51.
- Quan K, Liu Q, Wan J, Zhao Y, Guo RZ, Alolga RN, et al. 2015. Rapid preparation of rare ginsenosides by acid transformation and their structure activity relationships against cancer cells. *Sci. Rep.* **5**: 8598.
- Kim MY, Lee JW, Lee KY, Yang DC. 2005. Microbial conversion of major ginsenoside Rb(1) to pharmaceutically active minor ginsenoside Rd. *J. Microbiol.* **43**: 456-462.
- Kim CK. 2012. Ginseng sponins processing by using bio-conversion technology. *J. Ginseng Res.* **6**: 3-13.
- Yoo JM, Lee JY, Lee YG, Baek S, Kim MR. 2018. Enhanced production of compound K in fermented ginseng extracts by *Lactobacillus brevis*. *Food Sci. Biotechnol.* **28**: 823-829.
- 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.
- Kim JH, Shin MJ, Chung MJ, Kim SH. 2021. Identification of spices promoting the growth of lactic acid bacteria and modulation of tight junction protein at mRNA level by the fermented product of red pepper (*Capsicum annuum* L.) in HT-29 cell. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **50**: 16-28.
- Korea Health Supplements Association. 2022. *Health Functional Foods Code II*, pp. 351-355. KHAS, Seongnam, Gyeonggi,



Republic of Korea.

24. Ku S, You HJ, Park MS, Ji GE. 2015. Effects of ascorbic acid on  $\alpha$ -l-arabinofuranosidase and  $\alpha$ -l-arabinopyranosidase activities from *Bifidobacterium longum* RD47 and its application to whole cell bioconversion of ginsenoside. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **58**: 857-865.
25. Bae EA, Park SY, Kim DH. 2000. Constitutive beta-glucosidases hydrolyzing ginsenoside Rb1 and Rb2 from human intestinal bacteria. *Biol. Pharm. Bull.* **23**: 1481-1485.
26. Ku S, You HJ, Park MS, Ji GE. 2016. Whole-cell biocatalysis for producing ginsenoside Rd from Rb1 using *Lactobacillus rhamnosus* GG. *J. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 1206-1215.
27. Ku S, You HJ, Park MS, Ji GE. 2015. Effects of ascorbic acid on  $\alpha$ -l-arabinofuranosidase and  $\alpha$ -l-arabinopyranosidase activities from *Bifidobacterium longum* RD47 and its application to whole cell bioconversion of ginsenoside. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **58**: 857-865.
28. Kim JK, Choi MS, Jeung W, Ra J, Yoo HH, Kim DH. 2020. Effects of gut microbiota on the pharmacokinetics of protopanaxadiol ginsenosides Rd, Rg3, F2, and compound K in healthy volunteers treated orally with red ginseng. *J. Ginseng Res.* **44**: 611-618.
29. Kim NM, Lee JS, Lee BH. 2000. Effect of  $\alpha$ -amylase on the qualities of red ginseng extract. *J. Ginseng Res.* **24**: 153-156.