

# 산삼 공생 미생물 *Weizmannia ginsengihumi* LGHNH의 특징 및 배양물의 항노화 효능

권민정, 이혜진, 이소영, 진무현\*  
LG 생활건강 기술연구원

Received: April 13, 2022 / Revised: July 20, 2022 / Accepted: July 21, 2022

## Characterization of *Weizmannia ginsengihumi* LGHNH from Wild-Ginseng and Anti-Aging Effects of Its Cultured Product

Minjung Kwon, Hyejin Lee, So Young Lee, and Mu Hyun Jin\*

LG Science Research Park, LG H&H Co., Ltd., Seoul 07795, Republic of Korea

In this study, we isolated *Weizmannia ginsengihumi* LGHNH (KCTC 14462BP) from 30-year-old wild *Panax ginseng* C.A. Meyer and elucidated the characteristics of the isolated bacterium and its industrial potential as an anti-aging material. *W. ginsengihumi* LGHNH was investigated to produce indole-3-acetic acid (IAA), a plant growth-promoting hormone (1.38 µg/ml to 2.22 µg/ml). We also confirmed the existence of bioconversion activity via the comparison of the ginsenoside content before and after fermentation. As for the converted minor ginsenoside, Rg2(R), Rg4, Rg6, Rg3(S), Rg3(R), Rk1, Rg5, Rh1(R), Rk3 and Rh4 are known to have high bioavailability and various skin effects. We measured mitochondrial membrane potential and ATP biosynthesis to elucidate *W. ginsengihumi* LGHNH cultured product (WCP) as an anti-aging material. As a result, the mitochondrial membrane potential in HaCaT cells with UVB decreased to 39.3% compared to the unirradiated group, but was recovered to 57.3% and 58.1% by 0.001% (v/v) and 0.01% (v/v) WCP, respectively. In addition, we measured mitochondrial ATP biosynthesis. It decreased to 94.3% compared to the unirradiated group with UVB, but was recovered to 105.3% and 105.7% by 0.001% (v/v) and 0.01% (v/v) WCP.

**Keywords:** Wild *Panax ginseng*, *Weizmannia ginsengihumi*, endophytes, anti-aging

## 서론

식물 공생 미생물(endophytes)은 기주 식물에 잠시 또는 오랜 기간 서식하면서 눈에 띄는 어떤 증상이나 해를 입히지 않는 세균, 곰팡이 등을 말한다[1]. 이러한 공생 미생물은 기주 식물뿐 아니라 외부 환경과 끊임없이 상호 작용하며 식물의 성장 촉진, 병원성 균에 대한 대항 작용, 면역력 증진, 대사체 생성 등의 역할을 한다[2–6]. 또한 농작물 생산량 증대, Taxol과 같은 약리 성분 생산, 피부 미생물을 조절하는 기능 등이 확인되어 다양한 산업적 활용 가능성이 제시되고 있다[7–9].

*Panax ginseng* C. A. Meyer (*P. ginseng*)는 수 세기 전부터 동북아시아와 유럽 등지에서 약용 식물로 사용되어 왔다. 현대에는 많은 연구 그룹이 면역력 향상, 심혈관 질환, 광노화 방지 및 콜라겐 합성 등과 같은 효능을 확인하였으며 이러한 효능의 주요 약리 성분이 진세노사이드임이 규명되었다[10–14]. 진세노사이드는 구조에 따라 고분자 진세노사이드와 저분자 진세노사이드로 나뉜다. 3개 이상의 당( $\beta$ -D-glucopyranosyl,  $\alpha$ -L-arabinopyranosyl,  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl)이 결합된 구조를 고분자 진세노사이드라 하며 2개 이하의 당이 결합된 구조는 저분자 진세노사이드라 한다. 고분자 진세노사이드에는 Rb1, Rb2, Rc, Rb3, Re, Ro, Rd가 있으며 저분자 진세노사이드에는 Rg4, Rg6, Rk1, Rg5, Rk3, Rh4 등이 있다. 고분자 진세노사이드는 *P. ginseng* 내 높은 함량을 차지하고 있으나 큰 분자량으로 인해 생체 이용률이 낮은 반면, 저분자 진세노사이드는 함량이 낮지만 생체 이용률이 높다고 알려져

### \*Corresponding author

Phone: +82-2-6980-1554, Fax: +82-2-6980-1602  
E-mail: mhjin@lghnh.com

저 있다[15]. 저분자 진세노사이드 함량을 높이기 위해 산, 열, 효소 및 미생물 등 다양한 전환 방법이 보고되고 있다[16].

귀한 약용 식물이자 재배가 어려운 *P. ginseng*에 대한 관심은 공생 미생물 연구로까지 확대되어 수행되고 있다. 그 결과, *P. ginseng*의 공생 미생물인 *Bacillus*, *Pseudomonas* 등이 식물 성장 호르몬을 분비하고 질소 고정화, 인산 가용화를 수행하여 생장을 도울 뿐 아니라 저분자 진세노사이드로 전환하거나 직접 진세노사이드를 생성하는 등의 기능이 확인되었다[17-20].

피부는 신체에서 가장 큰 기관이자 외부 환경으로부터 보호 역할을 하는 방어 기관이다. 피부의 노화는 기능적 가치 뿐 아니라 심미적 가치를 떨어트리며 유전, UV, 외부 오염, 미토콘드리아 기능 저하 등 내부 및 외부의 복합적 요인에 의해 발생한다. 이 중 미토콘드리아 기능 저하는 미토콘드리아의 주요 역할인 ATP 에너지 합성, autophagy, 산화 스트레스 조절, 세포 성장 조절 등의 기능 수행을 어렵게 해 노화를 가속화하고 다양한 질환 발병을 야기한다. 이에 많은 연구 그룹이 미토콘드리아의 기능 촉진 및 기능 회복을 통한 항노화 연구를 수행하고 있으며 *P. ginseng* 및 진세노사이드 등 다양한 천연 소재가 주목받고 있다[21-23].

본 연구에서는 기존에 산양삼과 인삼 위주였던 *P. ginseng*의 공생 미생물 연구를 최초로 산삼으로 수행하였다. 산삼의 공생 미생물 중 하나인 *Weizmannia ginsengihumi* LGHNH (*W. ginsengihumi* LGHNH)를 분리 및 동정하고 식물 성장 촉진능, 진세노사이드 생성능, 전환능을 확인하였다. 또한 산삼 공생 미생물 *W. ginsengihumi* LGHNH의 산업적 활용 가능성을 탐색하기 위해 배양물을 제조하여 세포 내 미토콘드리아 기능 저하 억제능을 확인하여 항노화 관련 생물 자원으로 제시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 산삼 공생 미생물 분리

30년근 이상으로 추정되는 산삼은 한국산삼중앙회(Korea)로부터 구매하였다. 산삼을 물로 세척한 후 표면 살균을 위해 70% (v/v) ethyl alcohol에 2분 침지, 2.5% (v/v) sodium hypochlorite에 5분 침지, 멸균 수 행균 과정을 3회 반복하였다[24]. 표면 살균 여부를 확인하기 위해 마지막에 사용한 멸균수 200  $\mu$ l를 Tryptic soy agar (TSA, Difco, USA) 배지에 도말하여 30°C에서 72시간 배양하였다. 멸균한 면도날로 세척한 산삼을 잘게 자른 후 인산 완충 식염수에  $10^{-1}$ - $10^{-3}$  수준으로 희석하여 Reasoner's 2A agar (R2A, Difco) 배지와 TSA 배지에 도말하여 35°C에서 72시간 배양하였다[25]. 배양된 공생 미생물은 자란 형태와 색깔로 구분하여 계대 배양을 통해 순수 분리하였다.

### 균주 동정 및 배양물 제조

순수 분리한 균주의 동정은 (주)바이오틱스(Korea)에 의뢰하여 16S rRNA 유전자 염기 서열 분석을 통해 확인하였다. 염색체 DNA 추출을 위해 Chelex 100 resin (Bio-Rad, USA)을 사용하여 95°C에 10분 동안 boiling하였다. 동정을 위해 사용한 프라이머는 27F (5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')이며 분리 균주의 유전자 증폭을 위해 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94°C, 5분 동안 초기 변성 반응 후 94°C 변성 단계 20초, 50°C 결합 단계 20초, 72°C 합성 단계 1분 30초를 25 cycles로 반복하였고 최종 합성 단계는 72°C에서 3분 동안 수행하였다. 생성된 PCR product는 BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystem, USA)를 사용하여 ABI3730XL DNA analyzer (Applied Biosystem)를 통해 시퀀싱 분석 후, 확보한 결과는 BLAST를 이용하여 유사한 염기서열을 검색하였다. 그 결과, 분리 균주는 *Bacillus ginsengihumi* strain Gsoil 114 (NR\_041378.1)와 97.08%의 상동성을 나타내었다. 이에 분리한 균주를 *B. ginsengihumi* LGHNH로 명명하여 한국생명공학연구원(Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KRIBB) 산하의 생물자원센터(Korea Collection for Type Cultures, KCTC)에 기탁하여 기탁 번호 KCTC 14462BP를 부여받았다. 분리 균주는 동정, 기탁 과정 중에 *Bacillus ginsengihumi*에서 *Weizmannia ginsengihumi*로 학명이 변경되었으며 이에 본 논문에서는 *W. ginsengihumi* LGHNH로 변경된 명칭을 기준으로 작성하였다[26]. 생장을 위한 배지 내 탄소원으로 dextrose (Difco, USA), 질소원으로 yeast extract (Difco)를 적당량 넣어준 후, 30°C에서 24-48시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후, 원심분리, 여과 과정 등을 거쳐 *W. ginsengihumi* LGHNH의 배양물(*W. ginsengihumi* LGHNH Cultured Product, WCP)을 제조하였다.

### 식물 성장 촉진 호르몬(Indole-3-Acetic Acid, IAA) 생성능 확인

공생 미생물의 IAA 생성능은 Brick 등(1991)의 방법에 따라 2.5 mM L-tryptophan이 첨가된 배지에 산삼 공생 미생물을 30°C에서 배양하여 확인하였다. 각각 1일, 3일, 5일에 획득한 배양액은 원심 분리(6,603 RCF, 10분)를 통해 얻은 상층액 100  $\mu$ l을 Salkowski's reagent (0.5 M ferric chloride of 35% (v/v) perchloric acid)와 동량 넣어 반응시킨 후, 암실에서 30분 동안 발색하였다. Epoch Microplate Spectrophotometer (Biotek Industries, USA)를 이용하여 실온에서 550 nm에서 흡광도를 측정한 후, 측정된 값을 IAA standard (Sigma-Aldrich, USA)와 비교하여 산삼 공생 미생물에 대한 IAA의 농도를 계산하였다[27].

### 진세노사이드 전환능과 생성능 확인

진세노사이드 전환능 확인을 위해 분말 형태의 산양삼 추출물 10% (w/v)가 포함된 TSB 배지를 이용하여 배양 전, 후의 진세노사이드 함량 변화를 분석하였다. 0.22 µm 멤브레인 필터(PVDF, Millipore membrane filters, Sigma-Aldrich)로 여과한 산양삼 추출물 배지에 전배양된 균 액을 동량 넣어준 후 30°C, 150 ×g으로 14일 동안 교반 배양하였다.

분리한 공생 미생물의 진세노사이드 생성능을 확인하기 위해 Yan 등(2019)의 배양 방법과 동일하게 수행하였다[17]. 사용한 배지 내 성분 중 sodium acetate는 진세노사이드 생성을 위한 전구체로 첨가하였으며, 배지 구성 성분은 다음과 같다. Sodium acetate 5.0 g/l, ammonium chloride 0.5 g/l, potassium phosphate dibasic 1.0 g/l, potassium phosphate monobasic 0.5 g/l, magnesium sulfate 0.25 g/l, yeast extract 1.0 g/l. 멸균된 배지 150 ml에 분리 균주를 접종한 후 30°C, 150 ×g으로 7일 동안 교반 배양하였다. 각 실험에서 확보한 배양액은 원심 분리(6,603 RCF, 10분)를 통해 얻은 상층액을 수포화부탄올 3회 반복 분획하고 감압 농축한 후 HPLC 용 methanol에 용해시킨 후 0.45 µm 멤브레인 필터(PVDF, Millipore membrane filters, Sigma-Aldrich)로 여과하여 분석 시료를 제조하였다.

### 진세노사이드 분석

진세노사이드 함량 분석은 (주)피캠프코리아(Korea)에 의뢰하여 확인하였다. Electro Spray Ionization (ESI)가 장착된 LC-MS/MS (Acquity TQ detector, Waters, USA)를 이용해 Acquity UPLC BEH C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 µm, Waters) 컬럼으로 수행하였으며 이동상 용매 A는 0.1% (v/v) formic acid, 용매 B는 acetonitrile로 설정하여 0–0.1 min, 80% A; 0.1–2 min 68% A; 2–7 min 67% A; 7–20 min 48% A; 20–23 min 47% A; 23–26 min 20% A; 26–26.9 min 100% B; 26.9–30 min 80% A의 조건에서 분석하였다. 이동상의 유속은 0.3 ml/min이며 시료는 2 µl 주입하였다. 분석 성분의 이온화법으로 사용한 ESI는 positive & negative ion mode로 사용하였으며 capillary voltage 3.3 kV, source 온도 120°C, desolvation 온도 300°C, desolvation gas flow 600 l/h, cone gas flow 50 l/h의 조건으로 수행하였다. 정량화를 위해 multiple reaction monitoring (MRM) 방법을 사용하였으며 모든 데이터는 MassLynx software (Milford, USA)에 의해 수집 및 분석되었다.

### In vitro 세포 모델에서의 UV 노출

사람의 각질형성세포주인 HaCaT 세포 (Human keratinocyte)를 10% (v/v) FBS (Gibco), 1% (v/v) penicillin-streptomycin,

0.01 mM calcium chloride를 첨가한 DMEM 배지(Gibco, USA)를 사용하여 37°C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub> 조건의 세포 배양기에서 배양하였다. HaCaT 세포를 96 well plate (BD Falcon, USA)에 10<sup>4</sup> cells/well 농도로 분주 및 배양한 후, UV 조사를 위해 배지를 제거하고 PBS 50 µl를 넣어 준 상태에서 Bio-Sun UV 조사기(Vilber Lourmat, France)로 312 nm의 파장에서 UVB를 50 mJ/cm<sup>2</sup>의 세기로 조사하였다. 해당 UV 조사기는 UVA, UVB의 선택적 조사 및 조사 세기를 선택할 수 있는 기기이다. UVB 조사 직후에 FBS를 포함하지 않은 배지에 WCP를 농도 별로 포함하여 교체하고 24시간 동안 배양 한 후 조건에 맞게 각 분석을 수행하였다.

### 세포 생존율 확인

WCP가 세포 생존에 끼치는 영향을 확인하기 위하여 농도 별 세포 생존율을 확인하였다. HaCaT 세포를 10% (v/v) FBS, 1% (v/v) penicillin-streptomycin, 0.01 mM calcium chloride가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. HaCaT 세포를 96 well plate에 10<sup>4</sup> cells/well 농도로 분주 및 배양한 후, UVB자극을 주기 위해 50 mJ/cm<sup>2</sup>의 UVB를 1회 조사하였다. FBS가 첨가되지 않은 DMEM에 WCP를 농도 별로 처리하여 24시간 동안 배양 후 Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Donjido, Japan)을 이용하여 측정하였다.

### 미토콘드리아 막전위(Mitochondrial membrane potential, Δψm) 측정

WCP를 처리한 미토콘드리아 막전위(Δψm)를 측정하기 위해 HaCaT 세포를 96 well black-clear bottom plate (Corning, USA)에 10<sup>4</sup> cells/well 농도로 분주하고 37°C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub> 조건에서 overnight 배양하였다. UVB 자극 조건에는 50 mJ/cm<sup>2</sup>의 UVB를 1회 조사하였다. 세포 생존율에 영향을 끼치지 않은 WCP의 실험 농도 중 최솟값과 최댓값인 0.001% (v/v)와 0.01% (v/v)를 선정하여 FBS가 첨가되지 않은 DMEM에 처리하여 24시간 동안 추가 배양하였다. 배양 종료 후 1 µM JC-1 시약(JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit, Abcam, USA)으로 염색 후 Victor 3 Plate Reader (Perkin Elmer, USA)를 이용하여 JC-1 aggregate 및 monomer의 형광 강도 수치를 측정하고, aggregate/monomer의 비율로 상대적 미토콘드리아 막전위를 나타내었다. 형광 이미지는 EVOS™ FL Auto2 Imaging system (Thermo Fisher Scientific, USA)을 이용하여 촬영하였다. JC-1 aggregate와 monomer의 형광 강도는 각각 590 nm (535 nm excitation) 및 530 nm (475 nm excitation) 조건에서 측정하였다.

**미토콘드리아 ATP 합성량 측정**

WCP를 처리한 미토콘드리아 내 ATP 합성량을 측정하기 위해 HaCaT 세포를 미토콘드리아 막전위 측정 실험과 동일한 방법으로 배양하였다. UVB 자극 조건에는 50 mJ/cm<sup>2</sup>의 UVB를 1회 조사하였다. FBS가 첨가되지 않은 DMEM에 WCP를 0.001% (v/v)와 0.01% (v/v)를 처리하여 24시간 동안 추가 배양하고 CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay (Promega, USA)를 이용하여 ATP 합성량을 측정하였다.

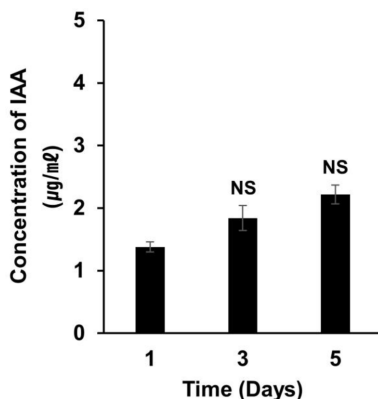
**통계 처리**

본 연구에서 실험은 3회 이상 반복하였고 실험군 간의 통계적 유의성 검증은 one-tailed, unpaired student's t-test로 시행하였다. 결과값은 mean ± standard deviation (S.D.)으로 나타내었다. p 값이 0.05 이하일 경우 \* 또는 #, 0.01 이하일 경우 \*\* 또는 ##, 0.001 이하일 경우 \*\*\* 또는 ###으로 통계적 유의성을 표시하였다.

**결과 및 고찰**

**산삼 공생 미생물 *W. ginsengihumi* LGHNH의 IAA 생성능**

분리한 미생물의 tryptophan 무첨가 조건에서 IAA 생성량을 측정하여 식물 성장 촉진 호르몬의 분비 여부를 확인한 결과, 분리 미생물은 1일 차에 1.38 ± 0.08 µg/ml, 3일 차에 1.66 ± 0.04 µg/ml, 5일 차에 2.22 ± 0.15 µg/ml IAA를 생성하였다. 일차 별 통계적 유의차는 없었다(Fig. 1). Vendan 등(2010)이 연구한 인삼 줄기 공생 미생물의 경우, 미검출 또는 13.93 µg/ml의 IAA 생성양이 확인되었으며, Um 등(2014)이 연구한 인삼 종자 공생 미생물 또한 미검출 또는 1.09 µg/ml의 IAA를 생성한다고 보고된 바 있다[28,



**Fig. 1. Concentration of indole-3-acetic acid (IAA) produced by *W. ginsengihumi* LGHNH.** The concentrations of IAA produced were estimated according to a standard curve using pure IAA (Sigma-Aldrich). Each column represents mean ± S.D. (n = 3). There were no significant (NS) difference among samples.

29]. 이러한 결과와 비교하였을 때, *W. ginsengihumi* LGHNH은 미량의 IAA를 생성하는 것으로 확인하였으며 식물 성장 촉진 호르몬인 IAA 생성을 통해 성장, 뿌리 신장, 꽃과 열매의 발달 등의 촉진을 도울 것으로 기대된다[30].

**산삼 공생미생물 *W. ginsengihumi* LGHNH의 진세노사이드 전환능과 생성능**

*W. ginsengihumi* LGHNH를 접종한 산양삼 추출물의 진세노사이드 변화를 측정한 결과, 고분자 진세노사이드는 감소한 반면, 저분자 진세노사이드는 증가하였다. 10% (w/v) 산양삼 추출물 내의 발효에 따른 진세노사이드 함량 변화는 Table 1과 같다. 3개 이상의 당이 결합한 고분자 진세노사이드인 Rb1, Rb2, Rc, Rb3, Re, Ro, Rd 등은 함량이 감소한 반면 2개 이하의 당이 결합한 저분자 진세노사이드인 Rg2(R),

**Table 1. Contents change of ginsenoside by *W. ginsengihumi* LGHNH.**

Ginsenoside	Unfermented (mg/kg)	Fermented (mg/kg)
Rb1	3293.27 ± 695.25	2865.47 ± 551.01
Rb2 *	1546.73 ± 288.74	1279.33 ± 337.32
Rc	1832.60 ± 279.22	1552.40 ± 429.01
Rb3	452.99 ± 153.12	299.83 ± 138.92
Re	2459.53 ± 259.83	1962.93 ± 170.50
Ro	3012.40 ± 1266.75	2297.67 ± 1164.45
Gyp17	95.23 ± 0.52	77.02 ± 3.30
Rd *	567.21 ± 78.97	455.53 ± 66.16
Rf *	624.59 ± 61.03	488.62 ± 65.20
Rg2(S)	142.24 ± 5.45	126.77 ± 6.66
Rg2(R)	0.35 ± 0.03	0.99 ± 0.33
Rg4	0.69 ± 0.18	1.38 ± 0.67
Rg6	2.31 ± 0.35	6.34 ± 3.11
C-Mc1	28.07 ± 3.56	22.29 ± 3.22
C-MX1	1.77 ± 0.44	1.49 ± 0.24
F2	11.68 ± 1.84	9.41 ± 0.98
Rg3(S)	5.85 ± 0.49	8.79 ± 2.76
Rg3(R)	0.51 ± 0.08	2.65 ± 1.48
C-Mc	0.55 ± 0.04	0.41 ± 0.05
Rk1	1.01 ± 0.27	2.27 ± 1.19
Rg5	1.40 ± 0.29	4.08 ± 1.99
Rh1(S)	3.55 ± 0.44	3.22 ± 0.69
Rh1(R)	0.82 ± 0.29	1.34 ± 0.25
F1	1.38 ± 0.20	1.17 ± 0.08
Rk3	0.33 ± 0.08	1.07 ± 0.58
Rh4	1.58 ± 0.28	11.45 ± 6.53

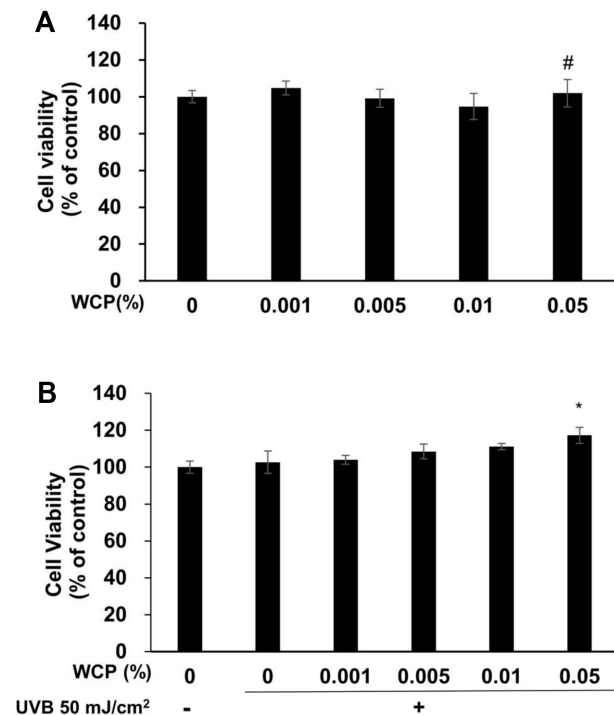
All values are mean ± S.D. (n=3). \*, p < 0.05 compared to the unfermented.



Rg4, Rg6, Rg3(S), Rg3(R), Rk1, Rg5, Rh1(R), Rk3, Rh4 등이 증가함을 확인하였다. 고분자, 저분자 진세노사이드 모두 항산화, 피부 광노화 방지, 상처 회복, 항염, 미백, 콜라겐 합성 등 다양한 피부 효능이 알려져 있지만 고분자 진세노사이드의 경우, 큰 분자 크기로 인해 피부 흡수율, 장 내 이용률이 낮다는 한계가 있다[31-37]. 또한 저분자 진세노사이드의 종류는 다양한 반면, 전체 진세노사이드 함량의 30%에 그친다[38]. 이에 *W. ginsengihumi* LGHNH를 활용해 피부 흡수율이 높고 희소한 저분자 진세노사이드의 생산이 가능할 것으로 판단된다.

*W. ginsengihumi* LGHNH의 진세노사이드 생성능을 확인하기 위해 전환능과 동일한 진세노사이드 종류에 대해 분석한 결과, 모두 검출되지 않았다. *W. ginsengihumi* LGHNH는 진세노사이드 생성능이 없는 것으로 확인되었다.

***W. ginsengihumi* LGHNH 배양물(WCP)의 세포 생존율 측정**  
WCP를 0.001-0.05% (v/v) 범위의 농도로 HaCaT 세포에

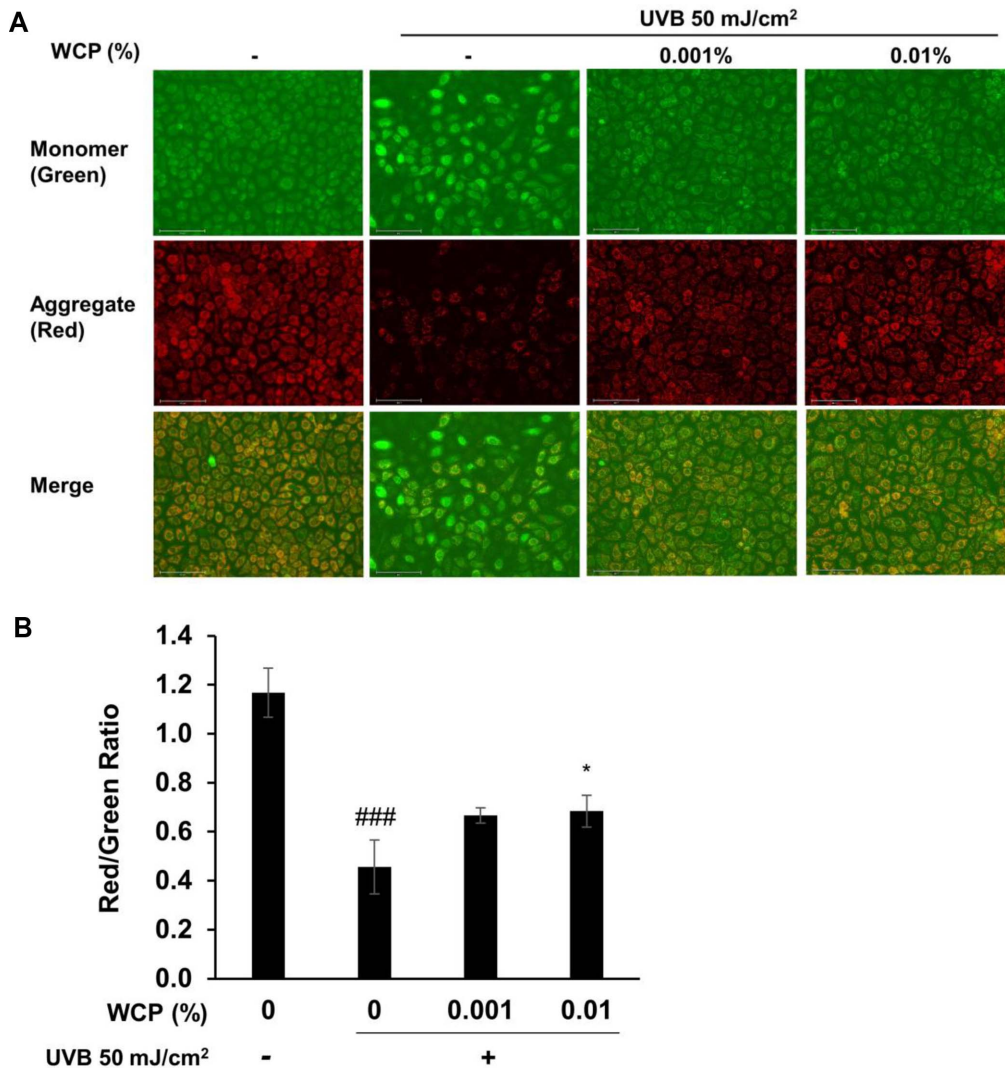


**Fig. 2. Cell viability of *W. ginsengihumi* LGHNH cultured product (WCP) in HaCaT cells.** (A) Cell viability was measured with CCK-8 assay after treated with various concentrations of WCP (0.001, 0.005, 0.01 and 0.05% (v/v)) for 24 h. (B) Cells were irradiated with 50 mJ/cm<sup>2</sup> UVB before treatment of WCP. After UVB irradiation, various concentrations of WCP were treated for 24 h. Data represent mean ± S.D. (n = 3). #, *p* < 0.05 compared to non-treated control and \*, *p* < 0.05 compared to UVB-treated control.

24시간 동안 처리한 결과, 0.05% (v/v) 미만의 농도 구간에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다. 0.05% (v/v) WCP 처리 시, 미조사군 대비 109.8%의 세포 생존율을 보였고 이는 통계적으로 유의차가 있어 0.05% (v/v) 이상의 농도에서는 WCP에 의한 세포 생존율 증가를 예측해볼 수 있다(Fig. 2A). 또한 UVB 50 mJ/cm<sup>2</sup> 조사가 세포 생존율에 영향을 끼치는지 실험한 결과, 미조사군 대비 세포 생존율은 102.8%이며 통계적 유의차가 없어 영향을 끼치지 않음을 확인하였다. 동일 조건의 UVB 조사 후 WCP를 0.001-0.05% (v/v) 범위의 농도로 24시간 동안 처리한 결과, 0.05% (v/v)를 제외한 나머지 농도에서 UVB 미조사군과 비교해 유의미한 차이가 없는 세포 생존율을 확인하였다. 0.05% (v/v) 농도에서는 세포 생존율이 통계적으로 유의하게 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 2B). 이를 통해 세포의 독성 및 활성 등 생존에 직접적인 영향을 주지 않지만 세포 내 미토콘드리아 기능 저하와 회복을 확인할 수 있는 UVB 조사량 및 WCP 농도를 선정하였다.

***W. ginsengihumi* LGHNH 배양물(WCP)의 UVB에 의한 미토콘드리아 기능 저하 억제능**

WCP 0.001% (v/v)와 0.01% (v/v)가 UVB 조건 하에 미토콘드리아 기능 회복을 실험한 결과, 상대적 막전위 및 ATP 생합성량 저하를 막아 미토콘드리아 기능 저하 억제능이 있음을 확인하였다. UVB는 피부 세포에 자극 시 hydrogen peroxide, superoxide, hydroxyl radical과 같은 활성 산소종(Reactive Oxygen Species, ROS)을 생성한다. 적당한 ROS는 세포 간 신호 전달 체계에서 메신저 역할을 함으로써 세포 내 항상성을 유지하는 데 도움이 되지만 그 이상으로 증가한 ROS는 피부 노화의 주요 원인으로 세포 소기관 및 세포막 등에 손상을 입힌다[39]. 더욱이 과도한 ROS는 미토콘드리아 구조 변화나 막전위 감소 등의 손상을 주게 되는데 이는 apoptosis의 초기 신호로 미토콘드리아 기능 저하를 발생시킨다[40]. JC-1-Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit 내의 JC-1은 세포 투과성 염료로 막전위의 변화를 측정에 사용되며 낮은 막전위 상태에서 JC-1은 Green fluorescence를 띠는 monomer 형태로 주로 존재한다. 반면에 높은 막전위에서 JC-1은 선택적으로 미토콘드리아 막을 투과하여 aggregates 형태로 Red fluorescence를 띠는데, Red/Green 비율로 미토콘드리아의 상대적 막전위를 나타낼 수 있다. UVB를 조사하지 않을 때 1.17이었던 Red/Green 비율은 UVB 조사로 Green fluorescence는 증가, Red fluorescence는 감소하여 0.46의 비율을 나타내었다(Fig. 3A). UVB 50 mJ/cm<sup>2</sup> 조사 후 WCP를 0.001% (v/v)와 0.01% (v/v) 처리한 군에서는 Red/Green 비율이 각각 0.67, 0.68로 UVB 조사 후 무처리 대조군에 비해 미토콘드리아의 상대적 막전



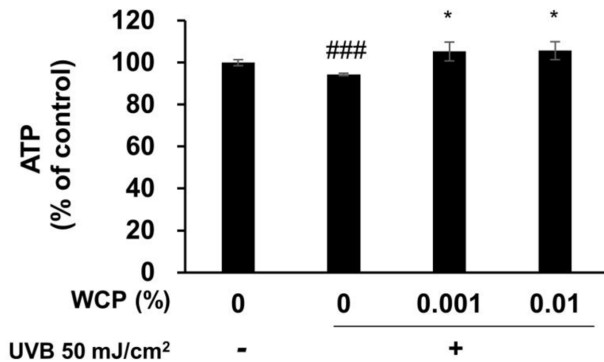
**Fig. 3. Effect of *W. ginsengihumi* LGHNNH cultured product (WCP) on UVB induced decrease of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) in HaCaT cells.** (A) Decrease and recovery of mitochondrial membrane potential were visualized with JC-1 staining following treatment with UVB and/or of WCP. Cells were irradiated 50 mJ/cm<sup>2</sup> UVB and treated with WCP as indicated concentration 0.001 and 0.01% (v/v). Then, the cells cultured for 24 h. Images were taken by fluorescent microscopy. (B) Relative  $\Delta\psi_m$  represented with Red/Green fluorescence ratio. Data represent mean  $\pm$  S.D. (n = 3). ###,  $p < 0.001$  compared to non-treated control and \*,  $p < 0.05$  compared to UVB-irradiated control.

위가 높아짐을 확인하였고 WCP가 UVB에 의한 미토콘드리아 기능 저하를 억제 할 수 있음을 확인하였다(Fig. 3B).

WCP의 UVB에 의한 미토콘드리아 기능 저하 억제 효능을 추가로 확인하기 위해 미토콘드리아에 의해 생성되는 ATP의 양을 측정하였다. UVB 자극에 의해서 ATP 합성량은 무자극 대비 약 94.3% 수준의 합성량을 보여 약 6% 감소하였다. 이는 통계적으로  $p < 0.001$  수준으로 매우 유의함을 확인하였다. UVB 조사와 WCP를 0.001% (v/v), 0.01% (v/v) 처리한 군에서는 각각 UVB 조사 후 무처리 대비 약 11.0%,

11.4% ATP 합성량 증가로 UVB에 의한 ATP 합성량 감소를 억제하는 모습을 확인하였다(Fig. 4). 통계적으로도 UVB 조사 대조군과 비교해  $p < 0.05$  수준으로 유의함을 확인하였다. 이는 무자극 대비 각각 105.3%, 105.7% 수준의 ATP 합성량을 나타내며, WCP는 미토콘드리아 기능을 UVB 자극 전의 수준으로 회복하는 데 도움을 줄 수 있다고 판단된다.

따라서 WCP는 UVB에 의한 HaCaT 세포 내 미토콘드리아 막전위 저하 및 ATP 생합성 저하를 억제하여 자외선과 같은 외부 스트레스로부터 미토콘드리아 보호하고 ATP에



**Fig. 4. Effect of *W. ginsengihumi* LGHNH cultured product (WCP) on UVB induced decrease of ATP synthesis in HaCaT cells.** Decrease and recovery of ATP synthesis following treatment with UVB and/or of WCP. Cells were irradiated 50 mJ/cm<sup>2</sup> UVB and treated with WCP as indicated concentration 0.001 and 0.01 % (v/v). Then, the cells cultured for 24 h, analyzed with CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay. Data represent mean  $\pm$  S.D. (n = 3). ###,  $p < 0.001$  compared to non-treated control and \*,  $p < 0.05$  compared to UVB-irradiated control.

너지 생성 등과 같은 기능을 정상적으로 할 수 있도록 도와주는 효과를 나타낸다.

## 결론

본 연구에서는 최초로 산삼의 공생 미생물 연구를 수행하여 *W. ginsengihumi* LGHNH (KCTC 14462BP)를 분리 및 동정하여 특징을 확인하였다. 그 결과, 식물 성장 촉진 호르몬 중 하나인 IAA의 생성능과 진세노사이드 전환능을 확인하였다. 또한 *W. ginsengihumi* LGHNH의 배양 및 공정 등을 통해 제조한 배양물이 세포의 활성화에 영향을 끼치지 않고 미토콘드리아를 보호하고 기능 저하를 억제하는 것을 확인하여 항노화 소재로서 그 가능성을 확인하였다. 본 연구를 통해 식물 공생 미생물이 다양한 효능을 지닌 동시에 산업적 활용 가치가 뛰어난 자원으로 제시되길 기대한다.

## 요약

식물 공생 미생물은 기주 식물과 함께 공생하는 미생물로 성장 촉진, 면역력 증진, 대사체 생성 등의 역할을 수행하며 식물 발달에 영향을 준다. 본 연구를 통해 30년근 산삼에서 분리 동정한 미생물인 *W. ginsengihumi* LGHNH (KCTC 14462BP)은 식물 성장 촉진 호르몬인 indole-3-acetic acid (IAA)을 1.38  $\mu$ g/ml에서 2.22  $\mu$ g/ml 수준으로 분비함을 확인하였다. 또한 발효 전, 후의 진세노사이드 함량 비교를 통해 진세노사이드 전환능이 있음을 확인하였다. 전환된 저분자

진세노사이드인 Rg2(R), Rg4, Rg6, Rg3(S), Rg3(R), Rk1, Rg5, Rh1(R), Rk3, Rh4 등은 생체 이용률이 높고 다양한 피부 효능을 갖는다고 알려져 있다. 배양물로 제조한 *W. ginsengihumi* LGHNH (*W. ginsengihumi* LGHNH Cultured product, WCP)의 항노화 소재로서 가능성을 탐색하기 위해 미토콘드리아의 막전위와 ATP 생합성량을 측정하여 기능 저하 억제 여부를 확인하였다. 노화를 발생시키는 인자인 UVB를 조사한 HaCaT 세포 내 미토콘드리아 막전위 값을 측정된 결과, 미조사균 대비 39.3%로 감소하나 WCP 0.001% (v/v), 0.01% (v/v)에 의해 각각 57.3%, 58.1% 수준까지 회복함을 확인하였다. 또한 미토콘드리아의 ATP 생합성량 측정 결과, UVB 조사에 의해 미조사균 대비 94.3% 수준으로 감소하나 WCP를 0.001% (v/v), 0.01% (v/v) 처리한 군에서 각각 105.3%, 105.7%로 증가하여 미토콘드리아 기능을 정상으로 회복하는데 도움을 줄 수 있다고 판단된다. 따라서, 본 연구를 통해 확보한 30년근 산삼의 공생 미생물은 항노화 관련 생물 자원으로 산업적 활용 가능성이 높다.

## Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

## References

- Wilson D. 1998. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* **73**: 274-276.
- Sessitsch A, Coenye T, Sturz AV, Vandamme P, Barka EA, Salles JF, et al. 2005. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 1187-1192.
- Bokhari A, Essack M, Lafi FF, Andres-Barrao C, Jalal R, Alamoudi S, et al. 2019. Bioprospecting desert plant *Bacillus* endophytic strains for their potential to enhance plant stress tolerance. *Sci. Rep.* **9**: 18154.
- Calvo-Garrido C, Roudet J, Aveline N, Davidou L, Dupin S, Fermaud M. 2019. Microbial antagonism toward *Botrytis* bunch rot of grapes in multiple field tests using one *Bacillus ginsengihumi* strain and formulated biological control products. *Front. Plant Sci.* **11**: 105.
- Khan MA, Asaf S, Khan AL, Jan R, Kang SM, Kim KM, et al. 2020. Thermotolerance effect of plant growth-promoting *Bacillus cereus* SA1 on soybean during heat stress. *BMC Microbiol.* **20**: 175.
- Song X, Wu H, Yin Z, Lian M, Yin C. 2017. Endophytic bacteria isolated from *Panax ginseng* improves ginsenoside accumulation in adventitious ginseng root culture. *Molecules* **22**: 837.
- Gao Y, Liu Q, Zang P, Li X, Ji Q, He Z, et al. 2015. An endophytic bacterium isolated from *Panax ginseng* C. A. Meyer enhances growth, reduces morbidity, and stimulates ginsenoside biosynthesis. *Phytochem. Lett.* **11**: 132-138.
- Subramanian M, Marudhamuthu M. 2020. Hitherto unknown

- terpene synthase organization in Taxol-producing endophytic bacteria isolated from marine macroalgae. *Curr. Microbiol.* **77**: 918-923.
9. Kim H, Myoung K, Lee HG, Choi E-J, Park T, An S. 2020. *Lactoabacillus plantarum* Apsulloc 331261 fermented products as potential skin microbial modulation cosmetic ingredients. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **46**: 23-29.
  10. Wen J, Plunkett GM, Mitchell AD, Wagstaff SJ. 2001. The evolution of Araliaceae: A phylogenetic analysis based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Syst. Bot.* **26**: 144-167.
  11. Kang S, Min H. 2012. Ginseng, the "immunity boost": The effects of *Panax ginseng* on immune system. *J. Ginseng Res.* **36**: 354-368.
  12. Lee CH, Kim JH. 2014. A review on the medicinal potentials of ginseng and ginsenosides on cardiovascular diseases. *J. Ginseng Res.* **38**: 161-166.
  13. Kim YG, Sumiyoshi M, Sakanaka M, Kimura Y. 2009. Effects of ginseng saponins isolated from red ginseng on ultraviolet B-induced skin aging in hairless mice. *Eur. J. Pharmacol.* **602**: 148-156.
  14. Lee J, Jung E, Lee J, Huh S, Kim J, Park M, et al. 2007. *Panax ginseng* induces human Type I collagen synthesis through activation of Smad signaling. *J. Ethnopharmacol.* **109**: 29-34.
  15. Park S, Na C, Yoo S, Seo S, Son H. 2017. Biotransformation of major ginsenosides in ginsenoside model culture by lactic acid bacteria. *J. Ginseng Res.* **41**: 36-42.
  16. Yi EJ, Lee JM, Yi TH, Cho SC, Park YJ, Kook MC. 2012. Biotransformation of ginsenoside by *Lactobacillus brevis* THK-D57 isolated from kimchi. *Korean J. Food Nutr.* **25**: 629-636.
  17. Yan H, Jin H, Fu Y, Yin Z, Yin C. 2019. Production of rare ginsenosides Rg3 and Rh2 by endophytic bacteria from *Panax ginseng*. *J. Agric. Food Chem.* **67**: 8493-8499.
  18. Wu H, Yang H, You X, Li Y. 2012. Isolation and characterization of saponin-producing fungal endophytes from *Aralia elata* in Northeast China. *Int. J. Mol. Sci.* **13**: 16255-16266.
  19. Kim WJ, Song HG. 2012. Interactions between biosynthetic pathway and productivity of IAA in some rhizobacteria. *Korean J. Microbiol.* **48**: 1-7.
  20. Fu Y, Yin ZH, Yin CY. 2017. Biotransformation of ginsenoside Rb1 to ginsenoside Rg3 by endophytic bacterium *Burkholderia* sp. GE 17-7 isolated from *Panax ginseng*. *J. Appl. Microbiol.* **122**: 1579-1585.
  21. Huang Q, Gao S, Zhao D, Li X. 2021. Review of ginsenosides targeting mitochondrial function to treat multiple disorders: Current status and perspectives. *J. Ginseng Res.* **45**: 371-379.
  22. Shin EJ, Jo S, Choi S, Cho CW, Lim WC, Hong HD, et al. 2020. Red ginseng improves exercise endurance by promoting mitochondrial biogenesis and myoblast differentiation. *Molecules* **25**: 865.
  23. Kong D, Tian X, Li Y, Zhang S, Cheng Y, Huo L, et al. 2018. Revealing the inhibitory effect of ginseng on mitochondrial respiration through synaptosomal proteomics. *Proteomics* **11**: e1700354.
  24. Huang Y. 2019. Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity of four *Allium* species. *Sci. Rep.* **9**: 15271.
  25. Lee SA, Kim Y, Kim JM, Chu B, Joa J-H, Sang MK, et al. 2019. A preliminary examination of bacterial, archaeal, and fungal communities inhabiting different rhizocompartments of tomato plants under real-world environments. *Sci. Rep.* **9**: 9300.
  26. Gupta RS, Patel S, Saini N, Chen S. 2020. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **70**: 5753-5798.
  27. Ambrosini A, Passaglia LM. 2017. Plant growth-promoting bacteria (PGPB): isolation and screening of PGP activities. *Curr. Protoc. Plant. Biol.* **2**: 190-209.
  28. Kim WJ, Song HG. 2012. Interactions between biosynthetic pathway and productivity of IAA in some rhizobacteria. *Korean J. Microbiol.* **48**: 1-7.
  29. Vendan RT, Yu YJ, Lee SH, Rhee YH. 2010. Diversity of endophytic bacteria in ginseng and their potential for plant growth promotion. *J. Microbiol.* **48**: 559-565.
  30. Um Y, Kim BR, Jeong JJ, Chung CM, Lee Y. 2014. Identification of endophytic bacteria in *Panax ginseng* seeds and their potential for plant growth promotion. *Korean J. Crop Sci.* **22**: 306-312.
  31. Wang L, Lu AP, Yu RN, Wong RN, Bian ZX, Kwok HH, et al. 2014. The melanogenesis-inhibitory effect and the percutaneous formulation of ginsenoside Rb1. *AAPS PharmSciTech.* **15**: 1252-1262.
  32. Choi S. 2002. Epidermis proliferative effect of the *Panax ginseng* ginsenoside Rb 2. *Arch. Pharm. Res.* **25**: 71-76.
  33. Kang HJ, Oh Y, Lee S, Ryu IW, Kim K, Lim CJ. 2015. Antioxidative properties of ginsenoside Ro against UV-B-induced oxidative stress in human dermal fibroblasts. *Biosci. Biotech. Biochem.* **79**: 2018-2021.
  34. Jin Y, Baek N, Back S, Myung C-S, Heo K-S. 2018. Inhibitory effect of ginsenosides Rh1 and Rg2 on oxidative stress in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *J. Bacteriol. Virol.* **48**: 156-165.
  35. Wan S, Liu Y, Shi J, Fan D, Li B. 2021. Anti-photoaging and anti-inflammatory effects of ginsenoside Rk3 during exposure to UV irradiation. *Front. Pharmacol.* **12**: 716248.
  36. Kim S-W, Jeong J-H, Jo B-K. 2004. Anti-wrinkle effect by Ginsenoside Rg3 derived from ginseng. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **30**: 221-225.
  37. Jin Y, Kim JH, Hong HD, Kwon J, Lee EJ, Jang M, et al. 2018. Ginsenosides Rg5 and Rk1, the skin-whitening agents in black ginseng. *J. Funct. Foods* **45**: 67-74.
  38. 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.
  39. Dunnill C, Patton T, Brennan J, Barrett J, Dryden M, Cooke J, et al. 2017. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *Int. Wound J.* **14**: 89-96.
  40. Abdul-Muneer PM, Chandra N, Haorah J. 2015. Interactions of oxidative stress and neurovascular inflammation in the pathogenesis of traumatic brain injury. *Mol. Neurobiol.* **51**: 966-979.