

## 사포닌 전환 활성 *Stenotrophomonas rhizopilae* Strain GFC09 균주의 분리 동정 및 전환 사포닌의 주름 개선 효과

민진우<sup>†</sup> · 김혜진\* · 주광식\* · 강희철

(주)지에프씨 생명과학연구원, \*네오바이오연구소 기업부설연구소  
(2015년 9월 21일 접수, 2015년 9월 25일 수정, 2015년 9월 27일 채택)

### Isolation of *Stenotrophomonas rhizopilae* Strain GFC09 with Ginsenoside Converting Activity and Anti-wrinkle Effects of Converted Ginsenosides

Jin Woo Min<sup>†</sup>, Hye-Jin Kim\*, Kwang-Sik Joo\*, and Hee-Cheol Kang

Life Science Research Institute, GFC Co. Ltd., 1005, Yeongdeong-dong, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 16954, Korea  
\*Neobio R&D center, Gyeonggi-do 16954, Korea

(Received September 21, 2015; Revised September 25, 2015; Accepted September 27, 2015)

**요약:** 진세노사이드(인삼 사포닌)는 인삼의 대표적 약리성분 중의 하나로 생물학적 활성을 가진 배당체 화합물이다. 이들 사포닌은 가수분해 되어 저분자화 되었을 때, 항주름 및 항산화, 항암 등에 높은 약리효능효과를 나타낸다. 본 연구에서는 인삼 esculin 배지를 활용하여  $\beta$ -glucosidase 활성을 가진 균주를 분리하였고 인삼 사포닌 전환을 미생물을 이용하여 수행하였다. 본 균주들을 16S rRNA sequencing을 통하여 동정하여 본 결과 *Stenotrophomonas rhizopilae* strain GFC09로 확인되었다. 균주의 최적 활성 조건을 결정하기 위해 조효소 1 mM와 인삼사포닌 Rb<sub>1</sub>과 함께 배양한 후 생물학적 전환을 TLC, HPLC를 사용하여 확인하였다. 조효소에 의한 인삼 사포닌 Rb<sub>1</sub>의 전환 경로는 다음과 같다. LB: RbNeobio R&D center, Gyeonggi-do 16954, Korea → Rd → FNeobio R&D center, Gyeonggi-do 16954, Korea → compound K, TSB: Rb<sub>1</sub> → Rd → F<sub>2</sub>. 가수분해된 생성된 물질은 NMR로 구조 동정하였다. 전환 산물의 효능 분석결과, 콜라겐 생성을 농도 의존적으로 증가시키는 것이 관찰되었다. 이에 본 연구에서는 ginsenoside F<sub>2</sub>와 compound K 함유 인삼 전환 산물의 주름 개선 소재로서 활용가능성을 확인하였다.

**Abstract:** Ginsenosides (ginseng saponin) as the one of important pharmaceutical compounds of ginseng and is responsible for the pharmacological and biological activities. These ginsenoside produces diverse small molecules ginsenoside which have more pharmacological activities including anti-wrinkle, anti-cancer and anti-oxidant effects. In the present study, we isolated bacteria using esculin agar, to produce  $\beta$ -glucosidase, and we focused on the bio-transformation of ginsenoside. Phylogenetic tree analysis was performed by comparing the 16S rRNA sequences; we identified the strain as *Stenotrophomonas rhizopilae* strain GFC09. In order to determine the optimal conditions for enzyme activity, the crude enzyme was incubated with 1 mM ginsenoside Rb<sub>1</sub>. Bioconversion of ginsenoside Rb<sub>1</sub> were analyzed using TLC and HPLC. The crude enzyme hydrolyzed the ginsenoside Rb<sub>1</sub> along the following pathway: LB: Rb<sub>1</sub> → Rd → F<sub>2</sub> into compound K, TSB: Rb<sub>1</sub> → Rd → F<sub>2</sub>. The structure of the hydrolyzed metabolites were identified by NMR. The activity screening tests showed that the conversion product induced the production of type I procollagen in a dose-dependent manner. These results suggested that hydrolyzed ginseng product containing the ginsenoside F<sub>2</sub> and compound K could be useful as an active ingredient for wrinkle-care cosmetics.

**Keywords:** *Stenotrophomonas rhizopilae* strain GFC09, ginsenoside compound K, anti-wrinkle, bioconversion

† 주 저자(e-mail: hero304@khu.ac.kr)  
call: 070)4192-9363

## 1. 서 론

인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 오가과(Araliaceae)에 속하는 다년 다년생 숙근초로서 우리나라를 대표하는 약재로 활용되어 왔다[1]. 인삼의 대표적인 약리성분인 인삼사포닌 즉 ginsenoside는 구조적으로 triterpenoid dammarane 골격의 aglycone에 glucose, arabinose, xylose, rhamnose 등의 당이 결합되어 생성된 배당체로서 인삼의 가장 중요한 약리활성성분으로 인정되고 있다[2]. 특히, 항암작용[3], 항당뇨[4], 항스트레스[5], 항산화[6], 항알러지 및 면역 기능 강화[7]에 뛰어난 효과가 있음이 과학적으로 증명되면서 합성물질을 대체할 수 있는 천연물로 크게 주목받고 있다. 인삼 사포닌은 트리테르페노이드계의 담마란(dammarane)계 사포닌으로서 인삼 속 식물에만 주로 존재하는 특유의 사포닌으로, 비당부분에 따라 4환성의 담마렌계 사포닌과 5환성의 올레아난계 사포닌의 2종류로 구별된다. 담마렌계 사포닌은 다시 비당부분에 붙어있는 수산기(-OH)의 수에 따라 2개인 경우 protopanaxadiol (PPD)계 사포닌, 3개인 경우 protopanaxatriol (PPT)계 사포닌으로 나누어진다[8]. 현재까지 인삼 사포닌은 약 40여 종이상이 보고되어 있으며, 당의 결합의 위치나 종류에 따라 효능 활성이 각기 다른 특성을 지니고 있다[9,10]. 특히, 자연계에 존재하는 이러한 배당체 화합물인 major 사포닌의 당 가수분해에 의하여 만들어진 minor 사포닌이 major 사포닌에 비하여 흡수나 약효 등면에서 훨씬 뛰어난 효과를 나타낸다고 보고[11]되어 이를 생산하고자 하는 노력이 지속적으로 이루어지고 있다. 특히 protopanaxadiol계 사포닌에 속하는 인삼사포닌 Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc, Rd 등의 대사산물인 compound K (20-O-β-D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol)는 암 세포의 침입을 억제함으로써 악성종양의 생성이나 암의 전이를 막을 수 있는 뛰어난 항암활성이 확인[12]되어 주목받고 있으며, 최근에는 주름 억제와 같은 피부 노화 억제 효과가 보고[13]된 바 기능성 화장품 소재로서의 이용 가치 및 수요 또한 증가하고 있다. 하지만, 지금까지의 사포닌 전환의 전환연구는 주로 장내세균 *Bifidobacterium minimum* KK-1, *B. cholerae* KK-2, *B. sp.* Int57, *Bifidobacterium. sp.*[14, 15], 곰팡이[15], 토양균[14] 등 미생물에 의해 이루어졌으나 대부분 기존에 분리되어진 균주의 활용이나 수입된 효소를 이용하는

수준이다. 따라서 이의 효능을 가지는 새로운 균주를 분리하고 이를 이용하여 compound K를 대량으로 생산할 수 있는 기술을 개발하는 것은 중요한 의의를 지닌다고 할 수 있다. 이에 본 연구에서는 새로운 미생물을 분리하고 이를 통해 인삼사포닌 변환기술을 개발하여 기능성 화장품 소재로 활용할 수 있는 compound K를 생산하고 이의 항주를 활성에 대하여 연구하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 재료

균주의 분리를 위하여 인삼 근권 토양을 경기도 10개 지역에서 수집하였다. 인삼 사포닌 지표물질 Rb<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, Rg<sub>3</sub>, compound K 및 Rh<sub>2</sub>는 인삼소재은행에서 분양받아 사용하였으며, TLC plate는 60 F-254 silica gel plate (Merck)를 사용하였고, HPLC 기기는 Futecs Co., Ltd. NS 3000i system을 사용하였다.

### 2.2. 사포닌 전환 활성 균주의 분리

시료를 멸균수로 10<sup>-1</sup>에서 10<sup>-3</sup>까지 희석하고 R2A agar plate에 100 μL씩 smear한 후 30 °C에서 24 h 배양하여 균주를 100주 분리하였다. 분리된 균들은 esculin agar법[16]을 이용하여 β-glucosidase 활성 균주를 선별하였다.

### 2.3. 균주의 동정

분리 균주의 16S rRNA gene 염기서열은 (주)제노텍(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 BigDye terminator를 이용한 cycle sequencing 방법으로 Applied Biosystems 3730xl DNA Analyser 기기를 통해 분석하였다. 분리 균주의 phylogenetic tree를 그리기 위해서 GenBank에 등록되어 있는 sequence data를 이용하여 분리 균주와 가까운 위치에 있는 여러 species들의 type strain의 16S rRNA gene 염기서열을 조사하고 이들의 염기서열을 Bioedit program과 Clustal X program을 이용하여 alignment 하였다. 균주들의 진화과정을 추적하는 작업은 Kimura two-parameter model을 이용하였고[17], MEGA 3 program의[18] neighbor-joining 및 maximum parsimony 방법으로 계통분류학적 위치를 결정하였다.

## 2.4. 균주 조효소액의 생산

Esculin 방법을 이용하여 분리한  $\beta$ -glucosidase 활성을 가진 strain GFC09의 균주의 성장 조건에 따른 사포닌 전환을 비교하기 위하여 LB broth, nutrient broth, tryptic soy broth 배지를 각각 이용하여 30 °C, 190 rpm에서 48 h 동안 현탁 배양하였다. 균배양액은 4 °C에서 15,000 × g로 10 min 원심분리 하여 세포를 제거하고 상층액은 4배의 냉각 에탄올을 첨가하여 충분히 혼합시킨 후 0 °C에서 40 min 방치하여 단백질을 침전시켰다. 위 용액은 4 °C에서 10,000 × g로 40 min 원심분리 후 상층액은 버리고 침전물은 20 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0)에 용해시켜 조효소액으로 사용하였다.

## 2.5. Ginsenoside의 전환

Strain GFC09 균주로부터 조효소액을 조제한 후 1 mM ginsenoside Rb<sub>1</sub>와 혼합하고 30 °C, 190 rpm에서 72 h 반응시켰다. 반응과정 중 24 h 간격으로 반응혼합물을 1.5 mL씩 취하여 동량의 수포화부탄올로 추출하고 TLC plate에 점적하여 Rd의 전환여부를 확인하였다. 점적한 TLC plate를 CHCl<sub>3</sub> / MeOH / H<sub>2</sub>O (65 : 35 : 10, v/v, 하층) 혼합용매로 5.5 cm 전개한 후 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 분무하여 가열을 통해 발색시켰다.

## 2.6. HPLC 분석

반응물의 수포화부탄올 추출용액은 감압농축한 후 HPLC용 메탄올에 용해하고 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과하여 분석용으로 하였다. HPLC 분석 column은 C18 (250 × 4.6 mm, ID 5  $\mu$ m)을, sample 주입량은 25  $\mu$ L, 이동상은 acetonitrile (solvent A)과 증류수(solvent B)의 gradient 조건을 이용하였고 유속은 1.6 mL/min, UV detector로 203 nm에서 측정하였다. Gradient 조건은 solvent A / solvent B : 15 / 85, 21 / 79, 58 / 42, 90 / 10, 90 / 10, 15 / 85, 15 / 85; run time : 0 - 5, 5 - 25, 25 - 70, 70 - 72, 72 - 82, 82 - 84, 84 - 100 min으로 하였다.

## 2.7. 변환 사포닌의 분리 및 NMR을 통한 구조 동정

Strain GFC09 균주로부터 조효소액과 10 mL를 1 mM ginsenoside Rb<sub>1</sub> 100 mL 용액과 반응시켰다. 변환 산물은 100 mL의 수포화 부탄올로 3번 반복 추출하여 40 °C에서 감압 농축하였다. 농축 잔여물은 소량의 이동상으로 용해하여 Shibata법에 따라 silica gel column

chromatography를 이용하여 1차 분리하였다. Silica gel column (50 mm × 280 mm)에 농축 잔여물을 흡착시킨 후, CHCl<sub>3</sub> : CH<sub>3</sub>OH : H<sub>2</sub>O (65 : 35 : 10, v/v/v, lower phase) 혼합용매를 이동상으로 하여 분리를 진행하였다. 용출액은 20 mL씩 총 30개의 분획으로 받아 TLC 분석을 통하여 확인하였다. 그중 5번 분획물로부터 ginsenoside compound K로 추정되는 변환 산물을 좀 더 순수하게 얻기 위하여 RP-18 flash column chromatography를 이용하여 2차 분리하였다. 2차 분리를 위한 기기로 flash column chromatography system (Biomechatronic, USA)을 이용하였으며, acetonitrile (solvent A), water (solvent B)를 용매로 하여 solvent A : solvent B의 비율이 0 - 5 min 5 : 95, 5 - 25 min 30 : 70, 25 - 80 min 70 : 40이 되도록 하였으며, 용출속도는 20 mL/min으로 하였다. 순수하게 분리된 변환 산물은 pyridine-d<sub>5</sub>에 녹여 NMR 분석을 시행하였다. <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR은 400 MHz FT-NMR spectrometer (Varian Inova AS 400, USA)로 측정하였다.

## 2.8. 세포배양

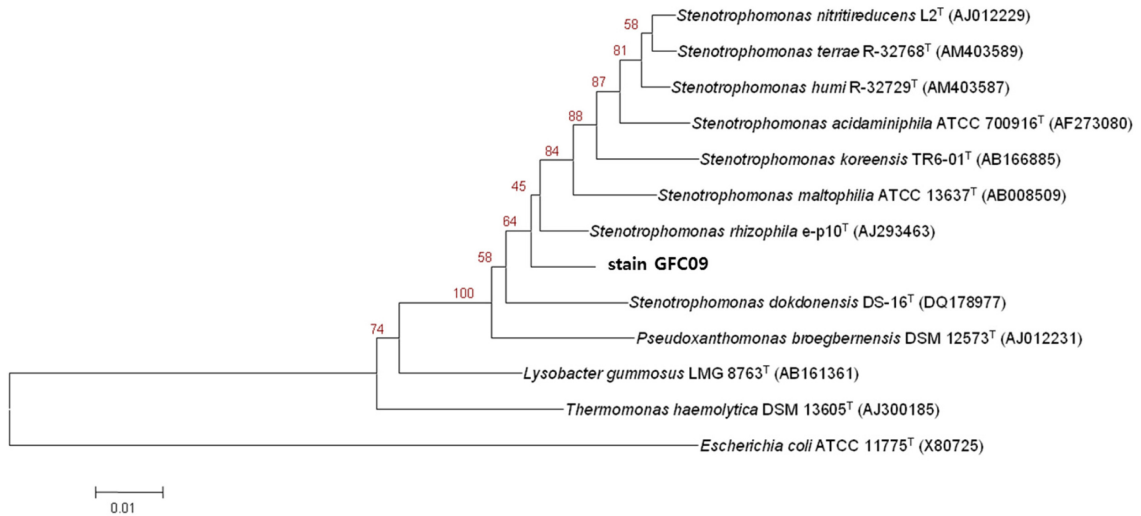
구입한 human dermal fibroblast neonatal (HDFn) 세포를 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL)을 첨가하여 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 조건하에서 배양하였다.

## 2.9. 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 Mosmann[18]의 방법을 응용하여 MTT 정량법을 이용하여 측정하였다. 96 well plate에 HDFn 세포를 1 × 10<sup>5</sup>개씩 분주하여 24 h 배양한 후, 전환 된 사포닌을 다양한 농도로 시료를 첨가하였다. 배양이 끝나면 배양액의 5 mg/mL의 MTT용액 10  $\mu$ L를 첨가하고 37 °C에서 4 h 처리한 다음 DMSO 100  $\mu$ L를 첨가한 상태에서 10 min간 진탕시켜 세포 내에 들어간 색소를 충분히 용출시킨 후 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 2.10. MMP-1 저해 및 콜라겐 생합성능 시험

HDFn세포는 6 well plate에서 well 당 2 × 10<sup>5</sup> cells/mL 농도로 배양하여, 약 80%의 confluency에 도달하였을 때, 6.5 J/cm<sup>2</sup> UVA를 조사하였다. UVA 조사 후



**Figure 1.** Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence showing by the phylogenetic relationships between strain GFC09 and related genus.

사포닌 전환 샘플을 처리하여 24 h 배양하였다. 24 h 후 세포 배양액은 모아서 원심분리기에서  $10,000 \times g$ , 5 min 동안 원심분리 시켰다. 그 상등액 중의 MMP-1은 fluorokine human active MMP-1 fluorescent assay kit (R&D Systems)을 사용하면서 fluorescent assay에 의해 정량화하였으며, procollagen type I protein synthesis kit를 이용하여 콜라겐 전구체의 C-말단의 양을 측정하였다.

### 2.11. 통계처리

실험은 총 3회 반복으로 실시하였으며, 모든 실험의 데이터 통계처리는 실험값의 SAS (statistical analysis system, ver 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 프로그램을 통하여 two-way ANOVA 방법으로 처리하였다. 처리구 간의 유의수준의 차는  $p < 0.05$ 로 통계처리 하였다.

## 3. 결과 및 고찰

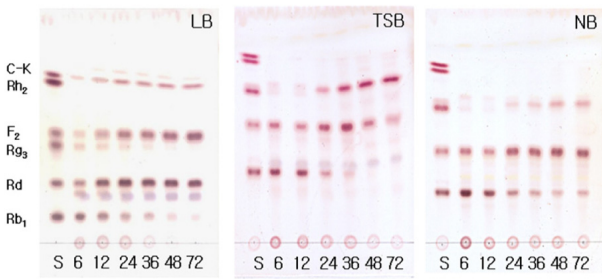
### 3.1. Phylogenetic Analysis

Esculin 방법을 이용하여 인삼 근권 토양에서 분리한  $\beta$ -glucosidase 활성을 가진 strain GFC09 균주의 16S rRNA sequence를 NCBI에서 BLAST를 이용하여 등록된 균주들과의 상동성을 비교한 결과 *Stenotrophomonas*에 속한 균주들과 가장 높은 상동성을 나타내었다.

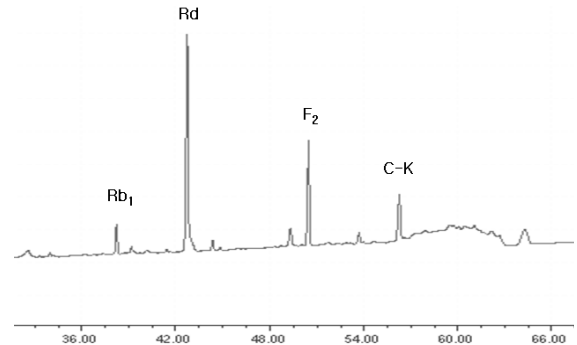
*Stenotrophomonas* genus 내에 속해있는 모든 종들의 type strain의 16S rRNA gene 염기서열을 조사하여 BioEdit program과 Clustal X program을 이용하여 alignment한 후 MEGA3 program으로 phylogenetic tree를 그려 본 후, 이들 중 strain GFC09 균주와 가까운 유연관계에 있는 종들을 선별하여 다시 phylogenetic tree를 작성하였다(Figure 1). Strain GFC09 균주는 *S. rhizophila* e-P10<sup>T</sup>(AJ293463)와 97.7% 상동을 나타내어 최종 *S. rhizophila* strain GFC09로 동정하였다.

### 3.2. TLC 분석에 의한 Ginsenoside 전환 조사

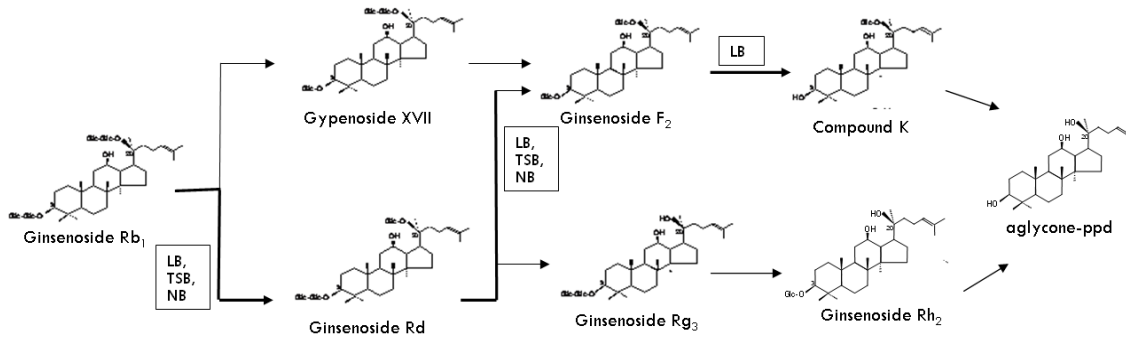
Strain GFC09 균주를 NB, TSB, LB broth에서 호기성 조건하에서 균주를 배양한 후 조제한 조효소 액과 1 mM ginsenoside Rb<sub>1</sub>과 시간별로 24 h부터 72 h까지 24 h 간격으로 반응시켰다. Figure 2에서 보는 바와 같이 균주를 생장 시킨 배지의 종류에 따라 다양한 양상의 최종 산물을 얻는 것을 확인할 수 있었다. LB 배지를 사용한 경우 ginsenoside Rb<sub>1</sub>는 시간이 경과되면서 점차 감소하고 중간 산물인 ginsenoside F<sub>2</sub>를 거쳐 ginsenoside compound K로 전환되는 것이 확인되었고, TSB 배지를 이용한 경우 최종적으로 ginsenoside F<sub>2</sub>를 생산할 수 있음이 확인되었다. 더불어 NB배지를 이용할 경우 ginsenoside Rd를 최종 대사산물로 이용할 수 있음이 관찰되었다. 이는 균주의 생장 조건에 따라 분비되는 효소의 종류 및 활성에 따라 같은 균주에서 다양한



**Figure 2.** Microbial conversion of ginsenoside Rb<sub>1</sub> by the strain GFC09 cultured in different medium. Developing solvent: CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (65 : 35 : 30, v/v/v, lower phase). S : ginsenoside standard.



**Figure 3.** HPLC assay of conversion of ginsenoside Rb<sub>1</sub> to compound K by strain GFC09. A; ginsenoside Rb<sub>1</sub>, B; transformed metabolite.



**Figure 4.** Conversion pathway of ginsenoside Rb<sub>1</sub> by strain GFC09 in different media (LB, TSB and NB).

전환 경로를 통한 최종 산물의 변화가 가능하다는 것을 시사하는 것으로 *Microbacterium*의 glucosidase가 배지 조건에 의하여 다르게 생성되어 조건에 따라 Rg<sub>3</sub>와 Rd로 각각 생성 된다는 기존 보고[20]와 유사한 것으로 사료된다.

### 3.3. HPLC에 의한 Ginsenoside 전환 수율 확인

*S. rhizophylae* strain GFC09이 생산하는 효소에 의한 ginsenoside Rb<sub>1</sub>의 전환 수율을 HPLC를 이용하여 확인하였다. Figure 3의 24 h의 HPLC 분석 결과로, 시간이 경과될수록 ginsenoside Rb<sub>1</sub>의 peak가 감소하여 ginsenoside Rd 및 ginsenoside F<sub>2</sub> 그리고 compound K로 전환되었다. 따라서 *S. rhizophylae* strain GFC09이 생산하는 효소는 ginsenoside Rb<sub>1</sub>을 Rb<sub>1</sub> → Rd → F<sub>2</sub> → compound K의 순으로 전환시킨다는 것을 알 수 있었다(Figure 4). 반응 72 h 후 1 mg/mL Rb<sub>1</sub>의 전환을 정량적으로 확인하여 본 결과 Rb<sub>1</sub>의 경우 모두 분해됨을 확인하였고

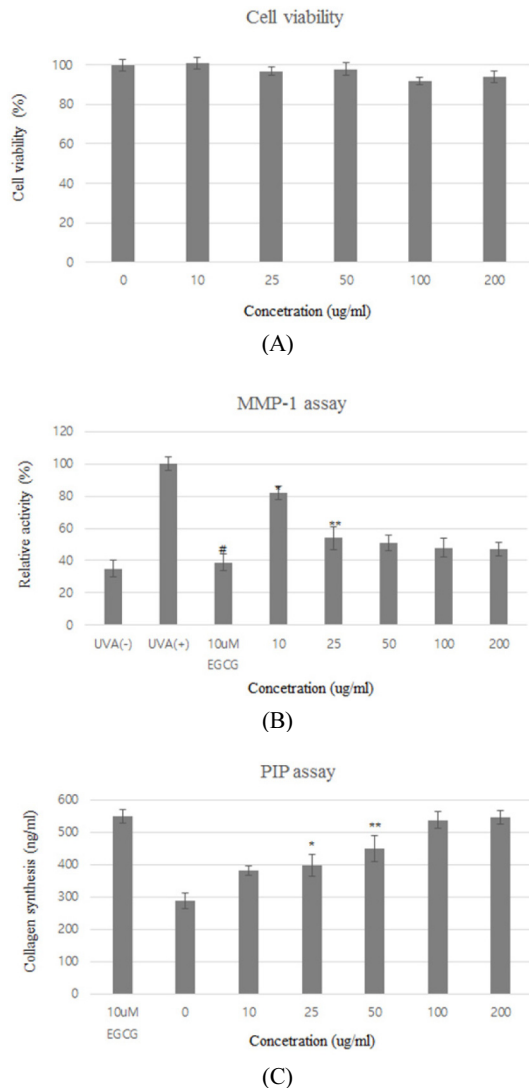
0.43 mg/mL ginsenoside F<sub>2</sub>와 0.189 mg/mL compound K가 생성됨을 확인하였다.

### 3.4. 분리된 화합물의 NMR 분석 결과

분리된 화합물의 NMR 구조 동정결과 ginsenoside compound K임을 확인하였으며, 그 세부 결과는 다음과 같다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum: δ 3.42 ppm (<sup>3</sup>H, dd, 11,8, J = 5.2 Hz), δ 5.18 ppm (<sup>1</sup>H, H-20-glc-1', J = 8.0 Hz), δ 5.25 ppm (<sup>24</sup>H, t, J = 6.4 Hz). <sup>13</sup>C-NMR : C-24, C-25, 20-glc-6', 20-glc-1'는 각각 δ 126.01 ppm, δ 130.92 ppm, δ 63.11 ppm, δ 98.33 ppm으로 확인되었으며 이는 기존에 보고된[21] 20-O-[β-D-glucopyranosyl]-20(S)-protopanaxadiol인 ginsenoside compound K와 같음을 확인하였다.

### 3.5. MMP-1 저해 활성

사포닌 전환 산물을 처리하여 MMP-1 농도를 측정



**Figure 5.** Effect of converted compound on (A) cytotoxicities, (B) MMP-1 inhibition, (C) type I collagen synthesis.

한 결과는 Figure 5B와 같다. UVA처리 전후의 비교를 통하여 UVA에 의해 활성화된 MMP-1의 양이 통계학적으로 유의성 있게 증가하였음을 확인하였다. 균주에 의한 인삼 사포닌 전환물 처리가 활성화된 MMP-1의 억제에 효과에 미치는 영향을 확인하여 본 결과 균주에 의한 인삼 사포닌 전환물질은 무처리군에 비하여 약 48%의 억제율을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. MMP-1의 억제는 콜라겐 분해를 감소시키며, 피부조직의 탄력을 유지하고 주름생성을 억제시킬 수 있어 본 물질이 뛰어난 항노화 물질임을 확인하였다.

### 3.6. 콜라겐 생합성 측정

피부를 구성하는 주단백질인 콜라겐은 피부 진피에 존재하는 섬유아세포에서 프로콜라겐을 거쳐 생성된다. 섬유아세포에서 합성된 프로콜라겐은 세포외기질로 분비되어 세포 표면에 존재하는 procollagen peptidase에 의해 C-peptide가 분해되고 고분자화 과정을 거쳐 활성 콜라겐으로 전환된다. 이러한 원리를 이용하여 콜라겐 생성량의 증가는 사람 섬유아세포에 사포닌 전환 물질을 처리하여 procollagen type I C-peptide (PIP)의 함량을 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 그 결과는 Figure 5C에 나타나 있다. 사포닌 전환 물질을 농도별로 처리하였을 경우, 콜라겐 합성이 농도 의존적으로 증가함을 알 수 있었다. 대조군의 콜라겐 생성량을 100%로 볼 때, 사포닌 전환 물질을 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리 농도로 시험한 시험군은 대조군에 비해 185%의 콜라겐 생성 증가율을 보이고 있는 것이 관찰되었다.

## 4. 결 론

본 연구에서는 인삼의 사포닌과의 반응을 통하여 인삼 사포닌 전환활성을 가지는 *S. rhizopila* strain GFC09를 분리하였다. 본 균주는 성장 조건에 의하여 전환시킬 수 있는 최종 산물이 ginsenoside Rd, F<sub>2</sub> 및 compound K로 달라질 수 있어 선택적으로 물질을 생산할 수 있는 능력이 있는 것을 확인하였다. *S. rhizopila* strain GFC09와 ginsenoside Rb<sub>1</sub>과의 반응으로 생성된 F<sub>2</sub> 및 compound K 함유 전환 물질을 활용하여 효능 평가를 수행한 결과, 사포닌 전환 생성물은 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 세포독성 없이 165%의 콜라겐 생성 증가율을 보였다. 이는 ginsenoside compound K와 같은 minor ginsenoside의 증가가 MMP-1 저해에 영향을 준다는 기존의 연구 결과[13]와 일맥상통하는 것으로 본 분리 균주에 의해서 주름에 효과가 있는 물질을 대량 생산할 수 있어 의의가 있으며 앞으로 후속적인 연구를 통하여 이를 대량화 시키는 기술에 대한 부분을 계속적으로 규명해 나갈 예정이다. 결론적으로 본 연구에서 발견한 *S. rhizopila* strain GFC09은 인삼의 배당체를 가수분해 시키는 활성을 가지고 있으며, 이를 통하여 만들어진 사포닌 전환물은 진피 콜라겐 생성 증진시킬 수 있어 주름개선 화장품 소재로서의 개발 가능성을 확인할 수 있었다.

## Reference

1. J. E. Shin, E. K. Park, E. J. Kim, Y. H. Hong, K. T. Lee, and D. H. Kim, Cytotoxicity of compound K (IH-901) and ginsenoside Rh<sub>2</sub>, main biotransformants of ginseng saponins by bifidobacteria, against some tumor cells, *J. Ginseng Res.*, **27**(3), 129 (2003).
2. M. Karikura, T. Miyase, H. Tanizawa, T. Taniyama, and Y. Takino, Studies on absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. VII. Comparison of the decomposition modes of ginsenoside-Rb<sub>1</sub> and Rh<sub>2</sub> in the digestive tract of rats, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**(9), 2357 (1991).
3. Y. Kikuchi, H. Sasa, T. Kita, J. Hirata, and T. Tode, Inhibition of human ovarian cancer cell proliferation *in vitro* by ginsenoside-Rh<sub>2</sub> and adjuvant effects of cisplatin *in vivo*, *Anti-cancer Drugs*, **2**(1), 63 (1991).
4. V. Vuksan, M. K. Sung, J. L. Sievenpiper, P. M. A. L. Jenkins, M. D. Buono, K. S. Lee, L. A. Leiter, K. Y. Nam, J. T. Armason, M. Choi, and A. Naeem, Korean red ginseng (*Panax ginseng*) improves glucose and insulin regulation in well-controlled, type 2 diabetes: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled study of efficacy and safety, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, **18**, 46 (2008).
5. H. Kaneko and K. Nakanishi, Proof of the mysterious efficacy of ginseng: basic and clinical trials: clinical effects of medical ginseng, Korean red ginseng: specifically, its anti-stress action for prevention of disease, *J. Pharmacol. Sci.*, **95**, 158 (2004).
6. B. J. Park, Y. S. Lim, H. J. Lee, W. S. Eum, J. Park, K. H. Han, and K. S. Lee, Anti-oxidative effects of *Phellinus linteus* and red ginseng extracts on oxidative stress-induced DNA damage, *BMB Rep.*, **42**, 500 (2009).
7. E. K. Park, M. K. Choo, M. J. Han, and D. H. Kim, Antiallergic and anti inflammatory activities of ginsenoside Rh<sub>1</sub>, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **133**, 113 (2004).
8. S. Shibata, O. Tanaka, T. Ando, M. Sada, S. Tsushima, and T. Ohsawa, Chemical studies on oriental plant drugs. XIV. Protopanasadiol, a genuine sapogenin of ginseng saponins, *Chem. Pharm. Bull.*, **14**, 595 (1966).
9. J. D. Park, D. K. Lee, and Y. H. Lee, Biological activities and chemistry of saponins from *Panax ginseng* C. A. Meyer, *Phytochem. Reviews*, **4**(2), 159 (2005).
10. Z. Y. Luo, Q. H. Lu, S. P. Liu, X. H. Chen, J. Q. Luo, L. J. Tan, and W. X. Hu, Screening and identification of novel genes involved in biosynthesis of ginsenoside in *Panax ginseng* plant, *ACTA Biochem. Biophys. Sin.*, **35**(6), 554 (2003).
11. M. K. Kim, J. W. Lee, K. Y. Lee, and D. C. Yang, Microbial conversion of major ginsenoside rb<sub>1</sub> to pharmaceutically active minor ginsenoside Rd, *J. Microbiol.*, **43**, 456 (2005).
12. K. S. Kim, M. S. Kim, J. R. Lee, and C. H. Choi, Ginsenosides compound K and Rh<sub>2</sub> inhibit tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced activation of the NF- $\kappa$ B and JNK pathways in human astroglial cells, *Neuroscience letters*, **421**, 37 (2007).
13. D. He, J. Sun, X. Zhu, S. Nian, and J. Liu, Compound K increases type I procollagen level and decreases matrix metalloproteinase-1 activity and level in ultraviolet-A-irradiated fibroblasts, *J. Formos. Med. Assoc.*, **110**(3), 153 (2011).
14. L. Q. Cheng, J. R. Na, M. K. Kim, M. H. Bang, and D. C. Yang, Microbial conversion of ginsenoside Rb<sub>1</sub> to minor ginsenoside F<sub>2</sub> and gypenoside XVII by *Intrasporangium* sp. GS603 isolated from Soil, *J. Microbiol. Biotech.*, **17**(12), 1937 (2007).
15. M. Mochizuki, Y. C. Yoo, and K. Matsuzawa, Inhibitory effect of tumor metastasis in mice by saponins, ginsenoside Rb<sub>2</sub>, 20(R)- and 20(S)-ginsenoside Rg<sub>3</sub>, of red ginseng, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**(9), 1197 (1995).
16. J. H. Su, J. H. Xu, W. Y. Lu, and G. Q. Lin, Enzymatic transformation of ginsenoside Rg<sub>3</sub> to Rh<sub>2</sub> using newly isolated *Fusarium proliferatum* ECU2042, *J. Molecul. Catal.*, **38**, 113 (2006).
17. M. Kimura, Preponderance of synonymous changes

- as evidence for the neutral theory of molecular evolution, *Nature*, **267**, 275 (1977).
18. S. Kumar, K. Tamura, and M. Nei, MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment, *Brief. Bioinform.*, **5**(2), 150 (2004).
  19. K. Meada and M. Fukuda, *In vitro* effectiveness of whitening cosmetic components in human melanocyte, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **42**(6), 361 (1991).
  20. L. Q. Cheng, J. R. Na, M. H. Bang, M. K. Kim, and D. C. Yang, Conversion of major ginsenoside Rb<sub>1</sub> to 20 (S)-ginsenoside Rg<sub>3</sub> by *Microbacterium sp.* GS514, *Phytochemistry*, **69**(1), 218 (2008).
  21. S. R. Ko, Y. Suzuki, K. Suzuki, K. J. Choi, and B. G. Cho, Marked production of ginsenosides Rd, F<sub>2</sub>, Rg<sub>3</sub>, and compound K by enzymatic method, *Chem. Pharm. Bull.*, **55**(10), 1522 (2007).