

인삼 Saponin이 *Bacillus cereus*의 성장에 미치는 영향

오혜숙 · 이호용 · 이영미*

상지대학교 식품영양학과

*경원대학교

(1990년 11월 21일 접수)

The Effect of Ginseng Saponin on The Growth of *Bacillus cereus*

Hae Sook Oh, Ho Yong Lee and *Young Mee Lee

Department of Food and Nutrition, Sangji University

Kyungwon university

(Received November 21, 1990)

Abstract

This study was designed to illustrate the effect of ginseng saponin on the growth of *Bacillus cereus* 425. The bacteria was cultured in the broth medium treated with ginseng saponin.

The result is as follows :

The binding experiment was tried to see relationship between the growth stimulation and increased nutrient absorption. The result showed that stimulation of glucose binding especially, increased cell growth. The ginseng saponin stimulated the cell growth showed a significant increase of acid phosphatase and alkaline phosphatase activities.

I. 서 론

인삼의 이용은 이미 2,000년전에 한방 고전에 기술된 이래로 우리나라에서는 소위 강장 식품 및 약재로 널리 이용되어 오고 있음은 주지의 사실이다. 최근 들어 경제적으로 여유가 증가함에 따라 인삼은 한약재로 이용되는 이외에도 인삼차, 인삼 젤리, 인삼 벡타 및 인삼을 함유한 과자류의 형태로 제조 유통되어 오고 있는 실정이다.

과거 5, 60년 동안 인삼의 효능을 규명하기 위해 여러 측면에서 많은 연구들이 수행되어 왔다.^{1,3)} Brekhman 등은 인삼 효능의 주성분인 saponin의 주요 기능을 추추 신경계에 대한 흥분 작용과 stress에 대한 방어 효과라고 지적한 바 있으며,⁴⁾ saponin에 의해 생체의 간 세포에서 RNA와 DNA의 합성과 단백질 합성 능력이 증가되었다는 보고도 있다.⁵⁾ 또한 saponin과 지질 대사의 관련성이 검토되었고, 고혈압이나 동맥 경화증의 치료 내지 예방에도 효과가 있다고 주장하기도 한다.⁶⁾ 한편, 김 등은 인삼 추출물이 흰쥐의 체중 증가 및 장기의 무게, hematocrit치와 혈청 cholestrol 수준에

미치는 영향을 알아보기 위하여 일련의 실험을 실시하였으며, 그 결과에 의하면 이들 측정치는 인삼 첨가 군과 대조군 사이에 유의적인 차이를 보이지 않는 것으로 나타났다.^{7,8)}

인삼의 효능을 나타내는 유효 성분에 대해서는 연구자들 사이에 이견들이 있기는 하나 saponin이 주활성 물질일 것이라는 데 대개 동의 하고 있다. 1963년 Shibata는 인삼의 성분 중에서 saponin을 분리, 추출, 정제하는 방법을 개발하고 이 방법에 의해 saponin을 6 가지 분획으로 분리하였다.⁹⁾ Saponin은 steroid 배당체로서(Fig. 1) 담즙산염, 인지질 및 단백질 등과 용이하게 mixed micelle을 형성하며,¹⁰⁾ 많은 효소들을 활성화시키고, 효소의 활성화를 통하여 대사를 촉진시키는 것으로 알려져 있다.¹¹⁾ 조 등은 0.1% 농도의 saponin을 E. coli의 생육 배질에 첨가하였을 때 E. coli의 성장속도가 빨라졌다고 보고하였다.¹²⁾

세포막은 막 전체 중량의 80%가 지질과 단백질, 탄수화물로 이루어진 거대 분자로서 lipid bilayer에 peripheral 혹은 integral protein들이 삽입되어 있는 기본 구조를 갖는다.¹³⁾ 생체를 이루는 다양한 세포들의 막

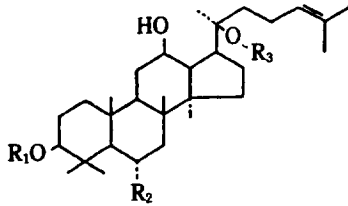


Fig. 1. The structural formular of saponin fractions.

- Rb1 : R₁ = glu-2-1-glu, R₂ = H, R₃ = glu-6-1-glu
- Rb2 : R₁ = glu-2-1-glu, R₂ = H, R₃ = glu-6-1-ara
- Rb3 : R₁ = glu-2-1-glu, R₂ = H, R₃ = glu-6-1-xyl
- Rc : R₁ = glu-2-1-glu, R₂ = H, R₃ = glu-6-1-ara
- Rd : R₁ = glu-2-1-glu, R₂ = H, R₃ = glu
- Re : R₁ = H, R₂ = glu-2-1-rham, R₃ = glu
- Rf : R₁ = H, R₂ = glu-2-1-glu, R₃ = H
- Rg1 : R₁ = H, R₂ = glu, R₃ = glu
- Rg2 : R₁ = H, R₂ = glu-2-1-rham, R₃ = H

구조의 정확한 조성 및 구조는 세포의 기능에 따라 크게 차이가 나는데 세포막에는 중성지질과 sterol 성분이 거의 없어 상대적으로 간단한 지질로 구성되어 있다. 이는 세포막에 대한 연구를 수행함에 있어 단순함을 주기 때문에 매우 편리한 특성이 되기도 한다. 본 연구에서는 인삼 saponin이 미생물의 성장에 어떠한 영향을 주는지 알아 보기 위해 gram positive 세균인 *Bacillus cereus* strain 425를 사용하여 세균의 성장률과 영양 물질의 결합정도, hydrolytic enzyme들의 활성을 측정하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 사용균주

균주로는 *Bacillus cereus* strain 425를 사용하였다.

2) 인삼 saponin의 추출

강화산 수삼(시판 5년산) 300g에 methanol 1500 ml을 가하여 마쇄 시키고, 실온에 2시간 방치한 후, 감압 여과하여 얻은 여액을 감압하에서 증발시켰다. 잔유물에 다시 순수한 methanol을 가하여 용해시킨 다음, 여과 과정을 거쳐서 불용성 물질을 제거시키고 감압 농축함으로써 crude saponin을 얻었다. 회수된 물질은 TLC를 이용하여 확인한 후, 추출된 saponin 전체를 실험에 사용하였다.

3) 시약

Culture용 배지는 Difco회사 제품이였으며, 일반 시약은 Sigma 회사 제품을 구입하여 사용하였다. 방사능 측정에 사용되는 표식 화합물은 영국의 Anersham사 제품이었고, 기타 시약은 Merck나 Sigma사의 1급 시

Table 1. Incubation medium for *Bacillus cereus*

Peptone	1 %
Yeast extract	1 %
NaCl	0.5 %
Na ₂ HPO ₄	0.04%
pH	7.2

약이거나 이에 준하는 시약을 구입하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 균주의 배양

균주를 표 1과 같이 조성된 배양 배지에 첨가시킨 후, 37°C에서 70-80 rpm의 속도로 10시간 동안 진탕 배양하였다. Saponin은 0.45 μM의 membrane filter (Millipore, USA)를 사용하여 filter시킨 후 무균적으로 각 배지에 첨가하여 배양하였다.

2) 균체수의 측정

균체수는 Spectrophotometer(Baush and Lomb spectronic 20)을 사용하여 520 nm에서 배양 초기로부터 배양 후 10시간까지 일정 시간 간격으로 측정된 광학 밀도로부터 구하였다.

3) 세균 세포막의 영양물질 binding 정도 분석

Bacillus cereus 개체균의 성장에 미치는 saponin의 효과를 보기 위하여 0.1% 농도의 saponin을 사용하였다. *Bacillus cereus*의 배양 균주는 5000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 0.01 M Tris-HCl buffer(pH 7.2)로 세척하여 수확하였다. 수확된 세포는 동일 buffer 10 ml을 가한 후 이중 0.5 ml을 시험관에 취하고 10⁻⁶%에서 10⁻¹% 농도가 되도록 saponin을 가하여 총량을 1 ml로 조정하였다. 그 후 37°C의 shaking water bath에서 30분간 preincubation하였다.

여기에 C¹⁴-glucose, C¹⁴-alanine 및 C¹⁴-phosphatidylethanolamine(PE) 등을 일정량 가한 후 다시 37°C에서 30분간 incubation하였다. 배양액은 2000 rpm에서 5분간 원심분리하고, 그 상등액을 위하여 방사능량을 측정하였다. 방사능의 측정은 Packard사의 liquid scintillation counter(Model TRI-CARB 4530)를 사용하여 측정하였다.

또한 scintillation cocktail은 toluen 10L와 500 ml의 ethanol 혼합액에 PPO 15g과 POPOP 0.15g을 용해시켜 제조하였고, 이 cocktail 용액 10 ml과 0.1 ml의 시료를 혼합하여 방사능 함량을 측정하였다.

대조군은 saponin을 가하지 않았으며 C¹⁴ 표식 영양물질의 흡수량 계산은 가한 방사능량에서 상등액에 남아 있는 방사능량을 빼줌으로써 세포에 흡수된 C¹⁴ 표식 영양물질의 양을 계산하였다.

4) 효소의 활성도 측정

Saponin이 효소활성에 미치는 영향을 보기 위하여 saponin의 농도를 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5%까지 다섯구간으로 나누어, *Bacillus cereus*가 함유하고 있으며 영양물질이 세포내 유입할 때 작용하는 효소의 활성도를 측정하였다. Acid 및 alkaline phosphatase 효소활성도는 Torriani¹⁴⁾의 방법에 의하였으며, 효소활성의 측정시 사용한 기질은 p-nitrophenylphosphate로서, 기질의 분해산물인 p-introphenol의 농도를 400 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 효소 활성도를 측정하였다. 이 때 사용한 buffer는 acid phosphatase는 0.1 M acetate buffer(pH 5.0)를, alkaline phosphatase는 0.1 M glycine buffer(pH 9.8)이었다. 효소 활성도는 1 unit를 0.01 OD 변화/min/mg protein으로 하였다. 효소의 단백질량은 Lowry 등의 방법¹⁵⁾으로 정량하였다.

5) 통계적 검증

본 실험의 결과는 대조군과 실험군 사이에 t-test 방법으로 차이를 검증하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 개체군의 성장에 미치는 saponin의 영향

Saponin이 *Bacillus cereus*의 성장에 미치는 영향을 관찰한 결과는 그림 2와 같다. *Bacillus cereus*는 0.1% saponin을 첨가하고 10시간 배양하였을 때 대조군에 비하여 개체의 성장이 약 20%정도($p < 0.01$) 증가되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 saponin이 단백질과 인지질의 생합성을 촉진시켰다는 조 등과 이 등의 결과^{12,16)}와도 일치하는 것이다.

균체 성장의 촉진과 적응 현상은 aliphatic alcohol 이나 약물에 적용함으로써 막지질 성분이 변화하거나,¹⁷⁾ saponin 등과 같은 detergent에 의하여 야기되는 cell membrane의 permeability가 증가되기 때문이라고 한다.¹⁸⁾ Goodnow 등과 이 등은 saponin과 같은 deter-

gent들이 세포의 성장에 필요한 영양원으로 직접 이용될 수도 있음을 시사하였다.^{19,20)}

2. Saponin 처리에 의한 세포막의 영양물질 binding 효과

Bacillus cereus 세포에 C¹⁴-glucose, C¹⁴-alanine 및 C¹⁴-phosphatidylethanolamine(이하 PE라고 칭함)이 흡수되는 정도는 처리한 saponin의 농도에 따라 차이가 있음이 관찰되었다.

표 2에서 보는 바와 같이 C¹⁴-glucose의 경우 10⁻⁴ -10⁻²%의 saponin 농도에서는 대조군에 비하여 약간 증가 현상을 보였으며, 10⁻¹%로 처리하였을 때는 오

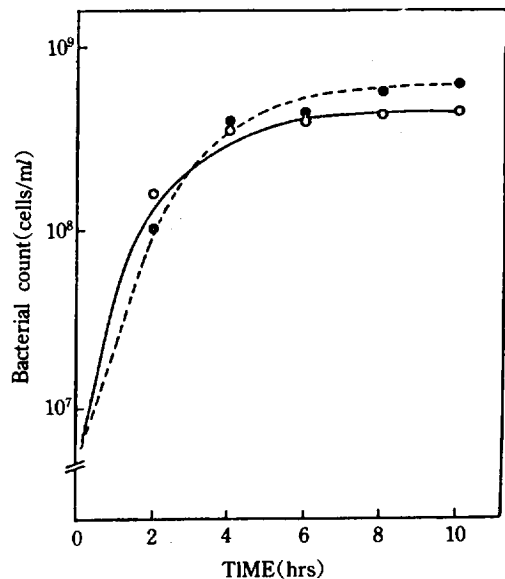


Fig. 2. The bacterial growth phase of *Bacillus cereus* treated with 0.2% of saponin during the cultivation at 37°C ○-○ : control, ●-● : experimental

Table 2. Effect of saponin on C¹⁴-glucose, C¹⁴-alanine, C¹⁴-phosphatidylethanolamine(PE) uptake to *Bacillus cereus*

Treatment of saponin	C ¹⁴ -glucose bound cpm increse(%)		C ¹⁴ -alanine bound cpm increse(%)		C ¹⁴ -PE buond cpm increse(%)	
control	10591		1205		908	
10 ⁻⁴ %	11101	4.8	779	-35.4	778	-14.3
10 ⁻³ %	10871	2.6	1080	-10.4	928	2.2
10 ⁻² %	10801	2.0	1139	-5.5	978	7.7
10 ⁻¹ %	8741	-17.5	1230	2.1	1128	24.2

Cells were incubated at 37°C for 30 min. Radioactivity of C¹⁴-glucose was 22,701 cpm and specific activity was 56.8 mCi/m mol, radioactivity of C¹⁴-alanine was 26,660 cpm and specific activity was 171 mCi/m mol, radioactivity of C¹⁴-PE was 6,708 cpm and specific activity was 56.8 mCi/m mol

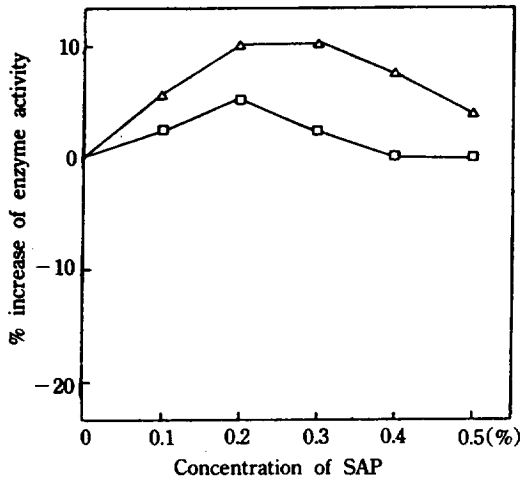


Fig. 3. Effect of saponin on acid phosphatase, alkaline phosphatase and protease activity of *Bacillus cereus* (enzyme was incubated at 37°C for 30 min) ○-○ : protease, □-□ : acid phosphatase, △-△ : alkaline phosphatase

히려 감소하였다. 이에 반해 C^{14} -alanine은 10^{-4} - 10^{-2} %의 저농도에서는 대조군보다 적은량이 흡수되었으나, 이 농도의 범위 내에서는 농도가 증가할 수록 흡수율이 높았다. 그러나 10^{-1} %에 이르러서는 대조군보다 높은 흡수율을 보였다. C^{14} -PE의 흡수는 다른 영양 물질의 경우와는 다른 양상을 나타냈다. 10^{-3} %이상의 농도 처리군에서는 대조군보다 높은 흡수 효과를 나타내었고, 10^{-1} %의 농도로 처리시 최고 24.2%의 증가를 보였다.

조 등은 적혈구를 이용하여 palmitoylcarnitine으로 처리한 후 영양물질의 흡수 정도를 측정해 본 결과 이들 물질이 적혈구 내로 다량 흡수된다고 하였다.¹²⁾ Saponin과 palmitoylcarnitine은 생체 세포막에 대한 detergent로써 유사한 역할을 한다는 사실에 근거하여 볼 때, 이는 본 실험의 결과와 일맥상통하는 것으로 여겨진다. 영양물의 membrane binding site는 각기 달라서 PE의 경우에는 막 외부에 glucose와 alanine은 막 내부에 binding site가 있다고 하는데,²¹⁾ 이는 saponin의 농도를 달리했을 때 영양물질의 흡수 정도에 미치는 효과가 영양물질의 종류에 따라 다르게 나타나는 원인들 중의 하나라고 사료된다.

3. Saponin 처리에 따른 효소의 활성도 측정

Saponin이 *Bacillus cereus*에 함유된 alkaline phosphatase와 acid phosphatase의 활성도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 5개의 농도로 처리한 결과를 그림 3에

제시하였다. 두 효소 모두 saponin 처리시 대조군보다 높은 활성도를 보였다. Saponin 농도에 따른 효과는 alkaline phosphatase는 0.2%와 0.3%에서 최대의 활성도를, 그리고 acid phosphatase는 0.2%의 saponin 농도에서 최대의 활성도를 나타내었다.

Gram-negative 세균은 전체 cell mass의 20-40%를 차지하는 periplasmic space를 가지고 있는데,²²⁾ 이의 기능은 eucaryote에 있어서 lysosome의 기능과 매우 유사하다. 즉, phosphatase, glycosidase, nuclease 및 protease 등의 hydrolytic enzyme을 포함하고 있어서 외부로부터 들어오는 영양물질을 소화시킨다.²¹⁾ 인삼 추출물이 alkaline phosphatase의 활성을 증가시켰다는 점 등의 실험결과²²⁾는 본 실험의 결과와 같다. 인삼 saponin 외에 기타 detergent에 의해 효소 활성도가 증가되었다는 보고가 있는데, Wittenberg는 80이 enzyme 합성에 관여함을 밝혔고²³⁾, nonionic detergent에 의해 extracellular fungal enzyme의 양이 증가되었다는 Reese 등의 연구²⁴⁾가 이에 속한다.

IV. 요 약

인삼 추출물인 saponin이 *Bacillus cereus*의 성장에 미치는 영향을 세포의 성장 및 영양물질의 세포내 유입 정도와 효소 활성도를 관찰함으로써 알아보았다.

인삼 saponin을 *Bacillus cereus*의 배양액에 첨가하였을 때, 영양물질의 세포내 유입이 증가하고 이들 물질의 대사와 관련된 효소의 활성도가 증가하는 것으로 나타났다. 또한, Saponin에 의해 *Bacillus cereus* 개체군의 전반적인 성장이 증가하였다. 성장의 증가 현상은 인삼 saponin이 세포막에 먼저 작용하여 세포의 영양물질 흡수 통로인 영양물질 결합 부위를 노출시켜 영양물질의 흡수를 증진시킨데 기인한 것으로 사료되는 바이다.

참고문헌

- 홍사악, 박찬용, 김재훈, 김명석 : 인삼사포닌이 동물의 행동에 미치는 영향, 대한약리학회지, 10, 73(1974).
- 심명정, 오진섭 : 인삼의 중추 신경계에 대한 작용, 대한약리학회지, 9, 16(1973).
- 신상구, 김명석 : 인삼 사포닌이 Mouse의 Pentobarbital 수면 Carcadian Rhythm에 미치는 영향, 대한약리학회지, 15, 13(1979).
- Brekman, I.I. : New substances of plant origine with increasing non-specific resistance, Ann. Rev. Pharmacol., 9, 419(1969).
- 박찬용, 김명석 : 인삼 사포닌이 지방조직에서 유리 지방산의 동원에 미치는 효과, 대한약리학회지, 10, 41

- (1974).
6. Hiai, S.H., Oura, K. Tsukada : Stimulating effect of Panax ginseng extract on RNA polymerase activity in rat liver nucleus, Chem. Pharm., **19** : 1656(1971).
 7. 김형수, 이희자, 조혜정 : 인삼 함유 계과류에 의한 백쥐의 사육 시험, 한국식품과학회지, **10**, 151(1978).
 8. 김형수, 이희자 : 인삼추출물 함유 액체 식품에 의한 백쥐사육 실험, 한국식품과학회지, **11**, 50(1979).
 9. Shibata, S., Tannaka, O., Sado, M. : The prosapogenin of ginseng saponin, Chem. Pharm. Bull., **12**, 795 (1963).
 10. 주충노, 최임순, 이상직, 조성희, 손명희 : 인삼 saponin의 연구(II), 한국생화학회지, **6**, 815(1973).
 11. Feng, J.S., Webb, J.W. : Enhancement by sodium dodecyl sulfate of pigment formation in *Serratia marcescens* 08, Appl. Environ. Microbiol., **43**, 850(1982).
 12. 조기승 : *E. Coli*의 acylphosphatidylglycerol의 생합성에 관한 연구, J. Bioch. Biophys. Acta **486**, 47(1977)
 13. Guidotti, G. : Membrane proteins, Ann. Rev. Biochem. **41**(1972)
 14. Torriai, A. : Influence of inorganic phosphate in the formation of phosphatase by *E. coli*, Biochem. Biophys., **38**, 460(1960).
 15. Lowry, O.H., Rosebraugh, N.J. : Protein measurement with the foli phenol reagent J. Biol. Chem., **193**, 265(1951).
 16. Lee, H.Y. : Studies on the microbial pigment(IV), Korean J. Microbio., **18**, 15(1980).
 17. Tilby, M.J. : Detergent-resistant variants of *Bacillus subtilis* with reduced cell diameter, J. Bacteriol. **136**, 10(1978).
 18. Ernest, R. : Biological effects of surfactants, Environ. Pollut. **31**, 159(1983).
 19. Goodnow, R. A. : Bacterial degradation of detergent compounds, Appl. Microbiol. **24**, 255(1972).
 20. 이강순, 장정순, 조기승 : 적혈구막에 관한 연구(I), 한국생화학회지, **8**, 21(1975).
 21. Inouye, M. : What is the outer membrane? John Wiley and Sons Inc.(1979)
 22. 정노팔 : 인삼이 장기의 alkaline phosphatase 활성과 혈중 무기 인량이 미치는 영향, 대한생리학회지, **7**, 1 (1983)
 23. Wittenberger, C., L. : Tween 80 effect on glucosyltransferase synthesis by *Streptococcus salivarius*, J. Bacteriol., **133**, 231(1978)
 24. Reese, E. T., A. Maguire : Surfactants as stimulants of Enzyme production by microorganism, Appl. Microbiol., **17**, 242(1969).