J. Fd Hyg. Safety 17(1), 26–30 (2002)

오염된 인삼으로부터 분리된 *Enterobacter* sp.의 동정 및 인삼사포닌의 균 생육억제효과

곽이성† · 이종태 · 여운형
한국인삼연초연구원

An Identification of *Enterobacter* sp. Isolated from Contaminated Ginseng and Inhibition Effect of Ginseng Saponin on Its Growth

Yi-Seong Kwak†, Jong-Tae Lee and Woon-Hyung Yeo
Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, 302 Shinseong dong, Youseong-Ku, Taejeon 305-345, Korea

ABSTRACT – A bacterium isolated from contaminated white ginseng was indentified by using API kit and electron microscope. The isolate was determined as rod shaped bacterium having 0.6-1.0 μm in diameter and 1.2-3.0 μm in length. It had motility by flagellum. The isolate had β-galactosidase, arginine dihydrolase and ornithin decarboxylase. It used citrate as sole carbon source but not produced H_2S. It also fermented glucose, manitol, sorbitol, rhamnose, sucrose, melibiose, arabinose and amygdalin. The isolate was identified as *Enterobacter* sp by the above API kit analysis and electron microscopy observation. Ginseng saponin was added to culture of *Enterobacter* sp. in order to investigate saponin's influence on its growth. The strain was incubated at 38°C for 3 days after addition of 0.05, 0.5, 2.0 and 4.0% (w/v) of saponin, respectively and the growth rates were investigated. The relative bacterial growth rates showed 75.0, 37.5, 7.5 and 0.5%, respectively, when compared with 100% of saponin non-added group. These results suggest that the growth of Enterobacter sp. is inhibited by saponin with the concentration dependency.

Key words □ Ginseng, saponin, coliform group, *Enterobacter* sp.

생약재는 오래전부터 민간 전통요법이나 한방에서 이용되어 왔으며 국내 식품산업에서는 생약재를 그 자체 및 부원료로 사용하여 식품의 기호성 및 기능성을 부가시키는 재료로 이용하여 왔다. 현재 식품공전에서는 생약재를 식품으로 이용 가능한 생약재, 식품으로 최소량 사용 가능한 생약재, 사용이 불가능한 생약재 등으로 분류하고 있다. 하지만 최근 식품위생법과 식품공전이 개정되면서 많은 생약재 들이 사용 가능하도록 허가되는 추세이다.[1] 생약자원 중 대체로 많이 사용되는 것은 인삼, 당귀, 계피, 은행 등인데 인삼은 그 우수한 효능과 안전성으로 인해 꾸준히 사용되고 있으며, 미국 및 일본 등에서도 생약자원(herb) 중 그 사용량이 10위 안에 들 정도로 중요한 생약재이다.[2]

이러한 생약자원은 저장 및 취급시 주의가 필요한데 이는 만약 부패성, 위해성 미생물이 오염되면 이들이 유전독성물질, 발암성 물질 등 유해한 물질을 생성하기 때문이다.[1] 따라서 이들 오염 미생물의 방제는 생약재를 취급하는데 있어서 중요한 문제로 대두되고 있다. 인삼제품류도 미생물학적 안정성을 확보하기 위해서는 인삼원료의 위생관리, 작업자 및 작업환경의 청결성 유지 등이 필요할 것으로 생각된다. 현행 인삼분말의 경우 미생물 기준[3]은 일반세균은 5.0×10^4 CFU/g 이하이어야 하고, 대장균군은 음성이어야 하는데 만약 균수가 낮음에도 불구하고 대장균군이 오염되면 인삼은 고가임에도 불구하고 전량폐기되어야 한다. 곽 등[4-6]은 인삼분말에 오염된 대장균 및 미생물 수를 감소시키기 위해 여러 가지 살균방법을 시도한 바 있으나 무엇보다 가장 중요한 것은 먼저 균의 오염을 최소화하는 것이다.

남[7] 과 조 등[8]은 인삼 조사포닌(crude saponin)이 식품발효 미생물인 젖산균 및 식물병원성 곰팡이의 생육을 저해한다고 보고한 바 있다. 젖산균(lactic acid bacteria)의 성장은 인삼조사포닌 1.99% 이상의 농도에서 저해되었고, 곰팡이 *Fusarium solani*의 성장은 0.001% 이상의 농도에서 저해되었다. 또한 성장저해 기작에 대해 조 등[8]은 사포닌이 세포막 성분에 존재하는 sterol과 복합체를 형성하여 세포막기능을 저해함으로써 성장을 억제하는 것으로 추정하였다. 그러나 인삼사포닌의 미생물 생육억제작용에 대해서는 상기의 일부 미생물만을 대상으로 연구되었고 병원성 미생물, 대장균 및 부패성 미생물 등 위해성 미생물을 대상으로는 아직까지

†Author to whom correspondence should be addressed.

거의 연구되지 않은 실정이다.

이러한 관점에서 인삼에 미생물이 오염되었을 경우 이의 방제법을 연구하기위한 기초자료로써 인삼사포닌과 대장균군과의 관계를 조사하고자 먼저 인삼을 장기보관하면서 자연적으로 오염된 대장균군을 분리, 동정하여 이들의 생육에 미치는 인삼사포닌의 영향을 조사하였다.

실험재료 및 방법

오염된 인삼에서 대장균군의 순수분리

인삼(4년근 백삼, 충남 금산)은 대전시내 한약방으로부터 구입하였다. 인삼은 분쇄(Centricon, USA)하여 분말화(200 mesh이하)한 후 인삼분말을 완전히 밀폐시키지 않고 상온에서 통상적인 유통기한 설정기간[13]인 2년 동안 10 개의 식품포장용 지퍼백(polyethylene, thickness 25 μm, 35 × 45 cm)에 보관한 후 약 10-20 g의 시료를 무작위적으로 채취하여 미생물을 검사하였다. 미생물은 대장균군 양성, 미생물 생균수 10^4 CFU/g 이상이었을 때 오염균으로 지정하였다. 본 실험에서 대장균군 양성 및 생균수 10^4 CFU/g 이상인 것은 1/10 개 이었으며 이 시료로부터 대장균군을 순수분리한 후 동정하였다. 대장균군은 오염된 시료에서 연속적인 희석법(serial dilution)과 획선법(streaking)을 사용하여 NA (nutrient agar; Difco Co.) 배지에서 순수분리하였으며, 순수분리된 균주는 NA slant 배지에 접종하여 38°C에서 1일 동안 배양한 후 4°C에 보관하면서 본 실험에 사용하였다.

인삼으로부터 조사포닌의 분리

인삼으로부터 사포닌분리는 김 등[9]의 방법에 준하여 분리하였으며, 이들은 TLC[4-5]에 의하여 확인한 후 시료로 사용하였다.

API kit 동정법에의한 분리균주의 동정

순수분리균은 API kit 20E(BioMerieux, France)를 사용하여 생리적 특성을 조사한 후 Bergey's manual of systematic bacteriology[10]에 준하여 동정하였다.

전자현미경에 의한 형태관찰

순수분리균을 NA 배지에서 24 시간 배양한 후 주사전자현미경 [Scanning electron microscopy(× 10,000배, JEM 100 CX, Japan)]으로 관찰하였다. 전자현미경 관찰을 위한 시료의 전처리는 다음과 같다. 분리균이 배양된 배지를 일정한 크기(1 × 1cm)로 자른 후 Karnovsky fixation을 3 시간 동안 행한다. 이것을 0.05M cacodylate buffer(pH 7.2)로 약 20분 동안 washing(2회)한 후 2% osmium tetroxide으로 2시간 동안 고정(post-fix) 시켰다. 5분 동안 증류수로 짧게 washing 한 후 30, 50, 70, 80, 95, 100% ethanol로 각각 10분 동안 연속적으로 탈수(dehydration) 조작을 행하였다. 80 및 70% ethanol로 처리(antidehydration) 하여 건조(critical point dryer) 시키고 gold coating을 2회 실시한 후 상기의 전자현미경으로 관찰하였다.

미생물 생균수 측정

생균수는 곽 등[4-6]의 방법에 따라 nutrient agar(Difco Co., USA) 배지를 이용하여 SPC 방법[11]에 준하여 측정하였다.

결과 및 고찰

분리균주의 동정

오염된 인삼분말로부터 분리된 균주는 API kit를 이용하여 생리적, 생화학적 특성을 조사한 결과(Table 1), 본 분리균은 β-galactosidase, arginine dihydrolase, ornithine decarboxylase를 보유하고 있었으며 탄소원으로 citrate를 이용할 수 있었다. 또한 탄소원으로 glucose, mannitol, sorbitol, rhamnose, sucrose, melibiose, arabinose 및 amygdalin을 이용할 수 있었다. 그러나 urease 및 tryptophan deaminase를 가지고 있지 않았고 H_2S 및 indole도 생성하지 못하였다. 이

Table 1. Physiological and biochemical characteristics of the strain isolated from contaminated ginseng. (× 10,000)

Test	Result (+/-)	Remark
ONPG	+	β -galactosidase
ADH	+	arginine dihydrolase
LDC	-	lysine decarboxylase
ODC	+	ornithine decarboxylase
CIT	+	citrate utilization
H_2S	-	H_2S production
URE	-	urease
TDA	-	tryptophan deaminase
IND	-	indole production
VP	+	acetoin production
GEL	-	gelatinase
GLU	+	glucose fermentation/oxidation
MAN	+	mannitol fermentation/oxidation
INO	-	inositol fermentation/oxidation
SOR	+	sorbitol fermentation/oxidation
RHA	+	rhamnose fermentation/oxidation
SAC	+	sucrose fermentation/oxidation
MEL	+	melibiose fermentation/oxidation
AMY	+	amygdalin fermentation/oxidation
ARA	+	arabinose fermentation/oxidation
OX	-	cytochrome oxidase

상의 결과로부터 오염된 인삼으로부터 분리된 균주는 *Enterobacter* sp.와 유사한 특성을 나타내는 것으로 생각된다. 이것을 상세히 조사하기 위하여 분리균주를 전자현미경(scanning electron microscopy)으로 관찰한 결과(Fig. 1), 균의 형태는 *Enterobacter* sp.의 전형적인 특징인 간균으로 직경은 0.6~1.0 μm, 길이는 1.2~3.0 μm 이었으며 세포표면의 편모에의해 운동하는 것을 관찰할 수 있었다. 이상 API kit를 이용한 생리적 특성분석 및 전자현미경을 이용한 미세구조 관찰에 의해 분리균주는 대장균군 *Enterobacter* sp.로 동정되었다.

일반적으로 대장균군(Coliform bacteria)은 장내세균과(Family Enterobacteriaceae)에 속하는 그람양성 무아포성 간균으로 유당(lactose)을 분해하여 산(acid)과 가스(gas)를 생성하는 통성혐기성 세균이다. 장내세균과에 속하는 미생물에는 *Escherichia* sp., *Salmonella* sp., *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Erwinia* sp., *Serratia* sp., *Proteus* sp., *Yersinia* sp. 속의 미생물이 포함된다. 이중 *Enterobacter* 속에는 *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. hafniae*, *E. liquefaciens*를 포함하여 7 종이 있는 것으로 알려지고 있다.[10] 사람의 분변에서는 *E. cloacae, E. aerogenes, E. agglomerans*의 순서로 고빈도로 분리되고 있다. 이들 균은 물, 토양, 동물, 사람의 장내에 정상적으로 널리 분포되어 있으며, 내성균이 많아서 최근 약제의 남용에 의해서 분리율이 증가하고 있다. 또한 내성균은 요로감염, 패혈증, 창상감염, 수막염 등을 일으킨다고 알려져 있다.[12] 따라서 이러한 균들의 성장억제 및 사멸은 중요할 것으로 생각되는데 본 실험에서 분리된 *Enterobacter* sp.도 사람과 동물의 분변 및 오염된 물, 토양, 오물 등으로부터 쉽게 오염가능하므로 오염된 인삼도 이러한 과정에 의해 오염되었을 것으로 추정되어 진다.

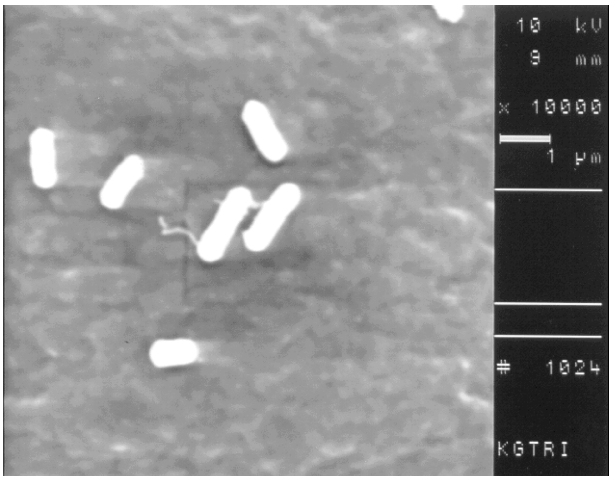

Fig. 1. Electron micrograph of the *Enterobacter* sp. isolated from contaminated ginseng.

인삼조사포닌의 분리

인삼조사포닌은 김 등[9]의 방법에 준하여 추출·분리하여 시료로 사용하였으며, 분리된 시료를 TLC을 이용하여 조사한 결과 주종 사포닌인 ginsenoside-Rb_1, -Rb_2, -Rc, -Rd, -Re 등이 모두 검출되어 인삼사포닌인 것으로 확인되었다 (Figure not shown). 그러나 TLC는 정성분석방법으로써 정확한 사포닌양을 알기위해서는 추후 HPLC를 이용한 사포닌 분석이 필요할 것으로 생각된다.

인삼조사포닌이 *Enterobacter* sp.의 성장에 미치는 영향

인삼조사포닌(crude saponin)이 분리균주 *Enterobacter* sp.의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사포닌을 4.0%까지 배지에 첨가하고 균액의 pH 및 생균수를 측정하였다 (Table 2). 조사포닌을 첨가하지 않은 대조군에서는 균액의 pH가 초기 6.99에서 5.34로 균의 성장에 따른 산(acid)의 생성에 따라 크게 감소하였고, 생균수도 초기 6.0×10^6에서 4.0×10^9 CFU/ml으로 크게 증가하였다. 그러나 사포닌 첨가시 균의 생육은 감소하는 경향을 나타내었는데, 사포닌 0.05

Table 2. Effect of ginseng saponin on growth of *Enterobacter* sp. isolated from contaminated ginseng

Saponin (%)	pH		Viable cell count[1] (CFU/ml)			Growth rate[2](%)
	Initial	Final	day 0	day 1	day 3	
0.00	6.99	5.34	6.0×10^6	9.5×10^8	4.0×10^9	100.0
0.05	6.95	5.58	6.0×10^6	7.0×10^8	3.0×10^9	75.0
0.50	6.96	5.65	6.0×10^6	3.9×10^8	1.5×10^9	37.5
2.00	6.91	6.17	6.0×10^6	3.0×10^7	3.0×10^8	7.5
4.00	6.91	6.65	6.0×10^6	1.0×10^7	2.0×10^7	0.5

The *Enterobacter* sp. was incubated at 38 for 3 days.
[1]The values were means of three experiments.
[2]Growth rates were relative percentages when compared with saponin non-added group as 100%.

및 0.5% 첨가시 pH는 초기 6.95, 6.96에서 각각 5.58, 5.65으로 비첨가구에 비해 감소폭이 작았고 생균수도 초기 6.0×10^6에서 3.0×10^9, 1.5×10^9 CFU/ml으로 무첨가군에 비해 증가폭이 감소하는 경향을 나타내었다. 2.0 및 4.0% 조사포닌 첨가군에서도 최종 pH가 6.17 및 6.65로 초기 pH 9.91에서 큰 감소가 관찰되지 않았고 최종 생균수도 3.0×10^8 및 2.0×10^7 CFU/ml으로 균의 성장도 크게 감소하는 경향을 나타내었다. 사포닌 비첨가시의 최종생균수를 100%로 놓고 사포닌 농도에 따른 균의 성장률을 상대적으로 계산한 결과 사포닌 0, 0.05, 0.5, 2.0, 4.0% 첨가시 성장률은 각각 100.0, 75.0, 37.5, 7.5, 0.5%로 나타났다(Table 2). 이것을 균의 생육저해율로 환산하면 각 농도별로 상대적 저해율은 0, 25.0, 62.5, 92.5, 99.5%로써 농도의존적으로 균의 생육은 저해되는 것으로 나타났다.

인삼사포닌의 미생물 생육억제작용에 대해 남[7]은 사포닌(crude saponin)의 농도를 1.99% 이상으로 하면 젖산균(lactic acid bacteria)의 생육은 억제된다고 하였다. 사포닌은 젖산균의 유도기(lag phase)를 길게하고 젖산균의 최고 산도(acidity)에 도달하는 시간을 길게하지만 사포닌 이외의 다른 성분들과 함께 첨가하면 그 저해효과는 약해진다고 보고한 바 있다. 또한 조 등[8]도 곰팡이를 대상으로 실험한 결과 사포닌(crude saponin)은 0.0002%에서는 곰팡이 *Fusarium solani*의 생육을 19.8% 촉진시켰으나 0.001% 이상의 농도에서는 *F. solani*의 생육을 최고 25.2% 까지 억제하였다고 보고하였다. 조등은 이것을 여러 사포닌 중에서 Rg2, Rh, Rf 등의 미량사포닌이 *F. solani*의 세포막 성분에 존재하는 sterol과 복합체를 형성하여 세포막의 기능을 저해함으로써 생육을 억제하는 것으로 추정하였다. 이는 소량의 농도에서는 세포막성분과 결합할 수 있는 사포닌성분이 적고 또한 조사포닌 분획에는 사포닌 이외에도 유리당 등 이물질이 약 20-30% 함유되어 있으므로 균의 생육을 억제하지 않고 오히려 촉진하는 것으로 추정보고 한 바 있다.

미생물의 생육억제는 일반적으로 사멸(bactericidal) 및 정균작용(bacteriostatic action)이 작용하는 것으로 알려져 있는데, 본 실험에서는 비교적 고농도인 사포닌 4.0% 에서도 *Enterobacter* sp.가 완전히 사멸되지 않고 일정량의 생균수가 관찰되는 것으로 보아 사포닌의 생육억제 작용은 사멸작용보다는 정균작용(bacteriostatic)일 것으로 추측된다. 이것은 남[7] 과 조 등[8]이 사포닌의 미생물 생육억제 작용은 정균작용이었다는 연구결과와도 일치한다. 그러나 이것을 좀더 확인하기 위해서는 추후 사포닌 첨가시 미생물 세포막의 미세구조 관찰 등 추가적으로 상세한 실험이 요구된다 하겠다.

국문요약

오염된 인삼분말로부터 1 종의 세균을 순수분리하여 API kit 및 전자현미경을 이용하여 형태적, 생리적 특성을 조사하였다. 분리균은 직경 0.6-1.0 μm, 길이는 1.2-3.0 μm 이었고 세포표면에 편모를 가진 간균이었다. 분리균은 β-galactosdase, arginine dihydrolase, ornithin decarboxylase를 가지고 있으며 탄소원으로 citrate를 이용할 수 있지만 H_2S는 생성하지 못하였다. 또한 glucose, manitol, sorbitol, rhamnose, sucrose, melibiose, arabinose 등의 당 및 amygdalin을 탄소원으로 이용할 수 있었다. 이상의 API kit를 이용한 생리적 특성분석 및 전자현미경을 이용한 미세형태적 특성 관찰결과에 의해 본 균주는 장내세균과(*Enterobacteriaceae*) 에 속하는 *Enterobacter* sp.로 동정되었다. 한편 분리균주 *Enterobacter* sp.의 생육에 미치는 인삼사포닌의 영향을 조사한 결과 사포닌은 농도의존적으로 균의 생육을 억제하는 경향을 나타내었다. 즉, 사포닌을 0.05, 0.5, 2.0, 4.0% 첨가하고 38°C에서 3일 동안 배양한 후 사포닌 비첨가군과 비교한 결과 균의 상대적 성장률은 각각 75.0, 37.5, 7.5, 0.5%로 나타났다. 사포닌의 미생물 생육억제작용은 비교적 고농도인 4.0% 사포닌 첨가시에도 초기의 6.0×10^6에서 2.0×10^7 CFU/g으로 완만한 증가경향을 나타내어 사멸작용보다는 정균작용일 것으로 추측된다.

참고문헌

1. 이상윤: 식품산업에서 생약자원의 활용과 전망. 식품산업과 영양. **5**(3), 21-26 (2000).
2. 이진만, 이상한, 김환묵: 약용식품으로 한약재의 이용. 식품산업과 영양, **5**(1), 50-56 (2000).
3. 식품의약품안전청: 식품공전. pp.399-400 (2000).
4. 곽이성, 노길봉, 장진규, 최강주: 오존처리가 인삼분말에 오염시킨 미생물의 생육에 미치는 영향. 한국식품위생안전성학회지, **10**, 45-51 (1995).
5. 곽이성, 장진규, 주종재: 알콜처리가 인삼분말에 오염된 미생물의 성장에 미치는 영향. 한국식품위생안전성학회지, **12**(3), 205-209 (1997).
6. 곽이성, 장진규: 여러 가지 살균방법이 인삼분말에 오염된 미생물의 성장에 미치는 영향. 한국식품위생안전성학회지, **16**(3), 221-226 (2001).

7. 남성희: 인삼성분이 초산발효에 미치는 영향에 관한 연구. 고려대학교 석사학위 논문. pp. 27-30 (1979)
8. 조대휘, 오승환, 유연현, 유태종: *Fusarium solani*와 *Phytophthora cactorum*이 고려인삼의 사포닌 성분변화에 미치는 영향. 고려인삼학회지, **10**(1), 180-189 (1986).
9. 김시관, 곽이성, 김세원, 황석연, 고영수, 유종명: 인삼조사 포닌의 조제방법 개선, 고려인삼학회지, **22**(3), 155-160 (1998).
10. Noel, R.K. and John G.H.: Bergy's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore, USA (1984).
11. Beach, F.W. and Davenport, R.R.: Methods in Microbiology. Vol.4, pp.153, Academic Press London and New York (1971).
12. The International Commision on Microbiological Specification for Foods: Factors affecting life and death of microorganisms. *Microbial Ecology of Foods*. Vol.1, pp.98, Academic Press, London, United Kingdom (1980).
13. 대한약학회 · 대한약품공업협회: GMP 실시에 관련된 의약품의 안정성과 유효기 간 설정에 대하여. 제약공업을 위한 세미나, 서울, pp. 81-83 (1981).