Korean J. Ginseng Sci.
Vol. 10, No. 2 (1986)

인삼 사포닌이 효모의 몇가지 해당 효소에 미치는 영향

강철호 · 주충노
연세대학교 이과대학 생화학과
(1986년 10월 20일 접수)

The Effect of Ginseng Saponin Fraction on Several Glycolytic Enzymes of Yeast Cell

Chul Ho Kang and Chung No Joo
Department of Biochemistry, College of Science, Yonsei University, Seoul 120, Korea
(Received Oct. 20, 1986)

Abstract

It was attempted in this study to investigate the effect of ginseng saponin on several glycolytic enzymes of yeast cell and the following results were obtained.

The amount of CO_2formed during the incubation of yeast cells in medium containing saponin fraction of *Panax ginseng* C.A. Meyer was greater than that of control cells and found that the CO_2 formation was greatest when the cells were grown in the medium containing 10^{-3}% of the saponin fraction, at which the uptake of inorganic phosphate and glucose consumption were also increased.

Radioactivity study of several glycolytic intermediates of yeast cells cultured in the medium containing [U-^{14}C]-glucose showed that the radioactivity of fructose 6-phosphate of test cells was as much as 1.6 times that of control group. On the other hand, the radioactivity of pyruvate of test cells was considerably decreased compared to control. Investigation of the effect of ginseng saponin on yeast hexokinase, phosphoglucose isomerase, pyruvate kinase and pyruvate decarboxylase *in vitro* showed that the maximum activities of the above enzymes werer observed when the concentration of ginseng saponin was 10^{-5}% in the reaction mixture.

It seemed that the ginseng saponin stimulates both glycolytic enzymes such as hexokinase, phosphoglucose isomerase and pyruvate decarboxylase significantly.

서 론

주등[1-6]은 인삼 사포닌 분획의 비특이적 효소 활성화 작용을 확인하기 위해

ethanol 대사에 직접 관여하는 ADH, ALDH 및 mitochondria 의 탈수소효소계에 미치는 인삼 사포닌의 영향을 조사하여 사포닌의 농도가 10^{-5}%, 10^{-4}%일때, 위의 효소들이 활성화 된다는 것을 제시하고 이와 같은 인삼 사포닌의 비특이적 효소 활성화 작용이 인삼 사포닌의 계면 활성으로 인한 효소 단백질의 conformation 변화에 기인할 것이라고 주장하였다. 한편 주등[9, 10]은 [U—^{14}C]—glucose 를 사용한 실험에서 인삼 사포닌이 E.coli 의 단백질 및 지질합성을 촉진함으로서 증식을 촉진하고 대두 발아시에도 인삼 사포닌이 당 신생반응, 비타민 C 등의 생합성을 촉진함을 제시한 바 있다.

본 실험에서는 이와 같은 인삼 사포닌의 비특이적 효소활성화 작용과 연관하여 인삼 사포닌 분획이 효모균 증식및 몇가지 해당 관련 효소들에 미치는 영향을 관찰하였다.

실험재료 및 방법

인삼사포닌의 분리 및 정제

금삼산 인삼(4년근, 50편급)분말 100g 에 chloroform 500ml 을 가하고 실온에서 24시간 방치하여 지질을 제거하는 과정을 3회 되풀이하고 잔사를 건조하여 지질이 제거된 인삼분말을 얻었으며 이 분말에 500ml 의 methanol 을 가하고 40℃에서 24시간 진탕하여 사포닌을 추출하였으며 상기 용액을 여과하고 여액을 rotatory vacuum evaporator 를 사용하여 40℃에서 감압 건조하였으며 얻어진 methanol 추출물 7g 을 14ml 의 20% methanol 용액에 녹여서 5×30cm 의 Amberlite XAD—2 column 에 주입하고 20% methanol 용액500ml 를 10ml/min 의 속도로 유지하면서 흘려주고 용출액을 모아 rotatory vacuum evaporator 를 사용하여 감압 건조시켜 1.6g 의 황백색 인삼사포닌분획을 얻었다.

효모 증식과정에서는 CO_2발생량 측정

효모균의 증식과정에서 발생되는 CO_2의 양을 발효관을 사용하여 측정하였다. 시판용 yeast cake 10g 을 0.1M phosphate buffer(pH6.8) 10ml 에 분산시킨 다음 이 분산액 1ml 를 3% glucose 와 여러가지 농도의 인삼사포닌을 포함하는 0.1M phosphate buffer(pH 6.8) 10ml 에 가하고 발효관(37℃)에서 발생하는 CO_2의 양을 시간별로 조사하였다.

무기인산 섭취량의 측정

무기인산의 섭취는 방사성 무기인산을 함유한 배양액에서 일정시간 배양한 균체를 회수하여 방사능을 측정함으로서 추정하였다. 시판용 yeast cake 0.1g 에 0.1M phosphate buffer(pH 6.8) 1ml 를 가한후 심하게 흔들어서 균체를 분산시키고 원심분리(20,000g× 1 min)하여 얻은 상층액을 먼저 얻은 상층액과 합하여 방사능을 측정하는 한편 침전물의 방사능을 측정하여 phosphate 가 흡수된 정도를 조사하였다.

효모 증식과정에서 이용된 glucose 양 측정

Yeast cake 1g 을 phosphate buffer(pH 6.8)에 잘 풀고 2%의 glucose 와 여러가지 농도의 사포닌이 함유된 phosphate buffer 2ml 를 가한 후[U—^{14}C]—glucose(7,000 cpm)를 가하여 37℃에서 반응시키고 시간별로 원심분리(20,000 x g 1min)하여 상층액의 방사능을

측정하였다.

Glucose의 섭취량 측정 및 해당관련 중간물질의 분리

Glucose 섭취량 측정

시판용 yeast cake 0.1g을 2%의 glucose를 포함하는 0.1M phosphate buffer(pH 6.8) 0.1ml에 잘 풀어준 후 [U—^{14}C]—glucose 1μCi를 포함한 2% glucose phosphate buffer(pH 6.8) 0.9ml를 가하고 37℃에서 10분간 반응시킨 후 원심분리(20,000xg1min)하여 상층액과 침전물로 나누고 상층액의 방사능을 측정하였다. 침전물에는 99% ethanol 1ml를 가하여 심하게 흔들어 준 후 원심분리(20,000xg 2min)하여 상층액과 침전물로 나누고 침전물의 방사능을 측정하여 glucose가 효모세포 내로 섭취된 양을 추정하였으며 상층액의 일부는 방사능 측정용으로 사용하고 나머지는 해당관련 중간물질의 분리에 사용하였다.

해당관련 중간물질의 분리

해당관련 중간물질의 분리는 Calvin[11]의 방법에 따라 배양액에서 얻은 중간물질 혼합액을 Wattman No.1 paper 중앙부의 하단에 점적하고 양 끝에는 표준물질(glucose, glucose 6—phosphate, fructose 6—phosphate, 3—phosphoglycerate, phosphoenolpyruvate, pyruvate)을 점적한 후 24시간 전개(전개용매 ; n-Buthanol:Acetic acid:Water, 74 : 19 : 50)하고 표준물질 부분을 잘라내어 2% $AgNO_3$ 용액을 분무하고 가열하여 3—phosphoglycerate를 발색시키고 다시 10M NaOH 10ml와 99% ethanol 40ml를 혼합한 용액을 분무하여 나머지 표준물질을 발색시키고 이 표준물질이 발색된 부분에 해당되는 시료 부분을 잘라내어 방사능을 측정하여 해당관련 중간물질의 분포를 조사하였다.

효소의 활성 측정

효소원의 제조

시판용 yeast cake 1g에 0.1M phosphate buffer(pH 6.8)과 2g의 glass bead를 가하고 막자사발에서 갈아 yeast cell을 깨뜨린 후 원심분리(3,000g x10min.)하여 상층액을 효소원으로 사용하였으며 단백질은 Lowry[12]의 방법으로 정량하였다.

Hexokinase(EC 2.7.1.1)의 활성 측정

Hexokinase의 활성은 Robbin[13]의 방법에 따라 glucose를 기질로 하여 생성된 glucose 6—phosphate를 glucose 6—phosphate dehydrogenase로 반응시키고 생성된 NADPH의 양을 spectrophotometer (Shimadzu UV—240)를 써서 관찰하였다. 반응액 1ml의 조성은 35mM triethanolamine buffer(pH 7.6), 1% glucose, 1mM $MgCl_2$, 0.13mM $NADP^+$, 0.3mM ATP, glucose 6—phosphate dehydrogenase 0.55U, 여러가지 농도의 인삼 사포닌과 효소원 0.01ml였다.

Phosphoglucose isomerase(EC 5.3.1.9)의 활성 측정

Phosphoglucose isomerase의 활성은 Noltman(14)의 방법에 따라 fructose 6—phosphate를 기질로 하여 생성된 glucose 6—phosphate를 glucose 6—phosphate dehy-

drogenase로 반응시키고 이때 생성된 NADPH의 양을 관찰하므로써 측정하였다. 반응액 1ml의 조성은 30mM triethanolamine buffer(pH7.6), 0.47mg/ml fructose 6—phosphate, 1mM $MgCl_2$, 0.13mM NADP, 0.46U glucose 6—phosphate dehydrogenase, 여러가지 농도의 인삼사포닌과 효소원 0.01ml 였다.

Pyruvate kinase(EC 2.7.1.40)의 활성 측정

Pyruvate kinase의 활성은 McQuate[15]의 방법에 따라 phosphoenolpyruvate를 기질로 하여 생성된 pyruvate를 lactate dehydrogenase로 반응시키고 이 때 소모되는 NADH 양을 추적하여 측정하였다. 반응액의 조성은 0.1M phosphate buffer(pH 6.8), phosphoenolpyruvate, 2.5mM $MgSO_4$, 10mM KCl, 0.7mM ADP, 0.12mM NADH, 9.2 U lactate dehydrogenase, 여러가지 농도의 인삼사포닌과 효소원 0.01ml 였다.

Pyruvate decarboxylase(EC.4.1.1.1)의 활성 측정

Pyruvate decarboxylase의 활성은 Utter[16]의 방법에 따라 pyruvate를 기질로 하여 생성된 acetaldehyde를 alcohol dehydrogenase로 반응시키고 이 때 소모되는 NADH의 양을 추적하여 측정하였다. 반응액의 조성은 0.186mM citrate buffer(pH 6.0), 10mM pyruvate, 0.12mM NADH, 10 U alcohol dehydrogenase, 여러가지 농도의 인삼사포닌과 효소원 0.01ml 였다.

방사능 측정

Liquid scintillation cocktail은 PPO 10g, POPOP 0.25g과 naphthalene 100g을 dioxane 1,000ml에 녹인 혼합액을 사용하였으며 방사능 측정은 Packard Tri-Carb 4530 liquid scintillation spectrometer를 사용하였다.

시약

Amberlite XAD—2, glucose, chrolamphenicol, glucose 6—phosphate, fructose 6—phosphate, 3—phosphoglycerate, phosphoenolpyruvate, pyruvate, $AgNO_3$, glass beads, glucose 6—phosphate dehydrogenase, NADP, ATP, ADP, lactate dehydrogenase는 Sigma 제품, $Na_2H^{32}PO_4$는 한국에너지 연구소제품, [U—^{14}C]—glucose는 New Englland Nuclear 제품, PPO, POPOP는 Fisher scientific Co. 제품을 사용하였고 기타 일반 시약은 Wako 사 특급 및 Junsei 사 특급을 사용하였고 yeast cake는 시판용을 사용하였다.

실험결과 및 고찰

주등[1-6]은 적정농도의 인삼 사포닌이 동물, 미생물 및 식물에서 추출한 여러 효소를 거의 예외없이 비 특이적으로 활성화한다는 것을 제시한 바 있으며 이와 같은 인삼 사포닌의 비특이적인 효소의 활성화 작용은 효모균에서의 해당과정에서도 관찰될 것으로 생각하고 본 실험을 수행하였다.

효모균은 공기 공급이 없을 때에는 해당작용에서 얻어지는 ATP만을 이용하지만 충분한 공기가 공급되면 발효와 호흡을 동시에 하는 것으로 알려져 있으나 glucose나

fructose 등 해당작용의 출발물질이 배지에 존재할 때에는 호흡보다 발효가 우선해서 일어남이 보고되어 있다[15].

Fig. 1은 3% glucose 배지에서 효모를 배양할 때 생성되는 CO2의 양을 측정한 것으로 배양액에서의 사포닌 농도가 10^{-4}%, 10^{-3}%, 10^{-2}%일 때는 사포닌이 첨가되지 않은 배지에서 배양 할 때보다 발생량이 많았으며 특히 사포닌의 농도가 10^{-3}%일 때 CO_2의 발생량이 가장 많았다.

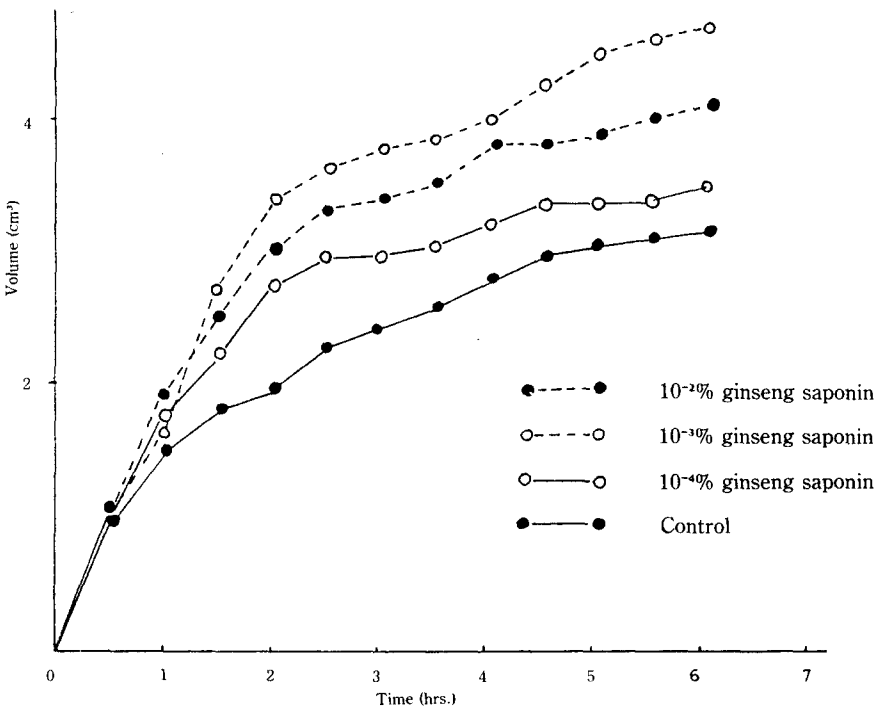

Fig. 1. Generation of CO_2 from yeast cells incubated (37°C) in glucose medium containing 0.1M phosphate buffer (pH 6.8), 3% glucose, 1g of yeast cake and ginseng saponin fraction (0 ~ 10^{-3}%)

Table 1. Amount of inogranic phosphate incorporated into yeast cells

	Control(cpm)	Test(cpm)	Test/Contro (%)
Total	1.7×10^7	1.7×10^7	
Supernatant	12.95×10^6	12.08×10^6	97.9
Precipitate	4.05×10^6	4.32×10^6	106.7

* Yeast cells were incubated for 30min. at 37°C

Table 1은 발효시 섭취된 무기인산이 효모 세포내로 편입된 양을 나타낸 것으로 발효가 가장 빠른 조건(사포닌의 농도10^{-3}%)에서 역시 많은 무기인산의 섭취가 관찰되었으며 glucose 의 감소율도 사포닌이 첨가되지 않는 배지에서 배양할 때 보다 빨랐다.

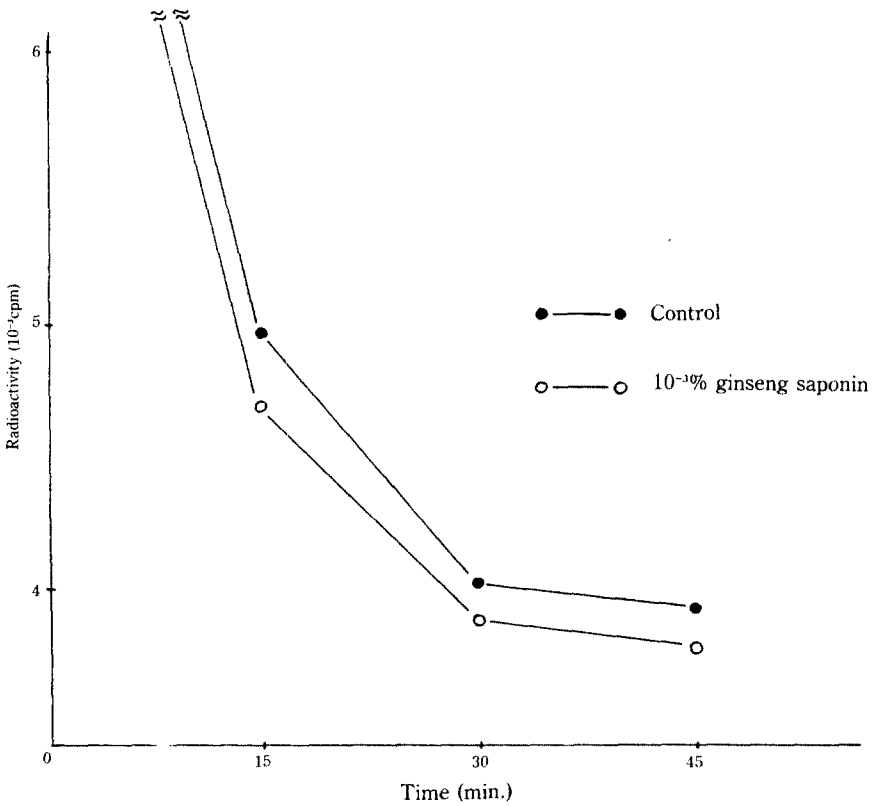

Fig. 2. Glucose consumption during the incubation of yeat cells in the glucose medium containing [U-^{14}C]-glucose (7,000 epm).

인삼 사포닌(10^{-3}%)과 [U—^{14}C]—glucose 가 함유된 배지에서 배양한 효모세포 균질액의 당 분해 중간물질을 분석한 결과 표2와 같이 fructose 6—phosphate 의 방사능이 대조에 비해 크게 증가하고 pyruvate 의 방사능은 훨씬 작았다. 이것은 인삼 사포닌이 해당 초기반응과 pyruvate 의 탈탄산 반응을 크게 촉진하였음을 의미하는 것이다.

Table 2. Distribution of radioactivities of glycolytic intermediates of yeast cells incubated in the glucose medium containing [U-^{14}C]-glucose

	Control(cpm)	Test(cpm)	Test/Control (%)
Initial spotting amount	30,000	30,000	
Glucose	4,440	7,914	178
Glucose 6-phosphate	1,574	1,669	106
Fructose 6-phosphate	3,630	5,767	158
Phosphoenol pyruvate	2,304	2,248	98
Pyruvate	4,564	2,910	63
3-Phosphoglycerate	914	910	100

* The extract was spotted on Wattman No. 1 paper and chromatographed by developing solvent (n-Buthanol: Acetate: Water, 74:19:50) for 24 hrs.

Table 3. The effect of ginseng saponin fraction on yeast hexokinase *in vitro*

Saponin concentration (%)	Activity (unit)*	Relative activity (%)**
0	38.37	100
10^{-7}	39.14	102
10^{-6}	41.44	108
10^{-5}	45.66	119
10^{-4}	44.13	115
10^{-3}	45.09	118
10^{-2}	45.28	118
10^{-1}	20.64	54

The values are mean of three determinations.

* One unit of enzyme is the amount that catalyzes the formation of 1μmol of NADPH per min.

** The relative activities are expressed assuming the activity of control is 100.

Table 3, 4, 5, 6은 몇가지 해당 관련 효소에 미치는 사포닌의 영향을 시험관에서 관찰한 결과이다. Hexokinase, phosphoglucose isomerase, pyruvate kinase, pyruvate decarboxylase의 경우 모두 반응액에서의 인삼 사포닌 농도가 10^{-5}%일 때 가장 큰 활성을 나타내었으며 주등이 주장한 여러가지 효소에대한 인삼 사포닌의 비 특이성 활성화 작용과 잘 일치하였다.

Table 4. The effect of ginseng saponin fraction on yeast phosphoglucose isomerase *in vitro*

Saponin concentration (%)	Activity (unit)*	Relative activity (%)**
0	66.14	100
10^{-7}	66.65	101
10^{-6}	75.55	114
10^{-5}	112.64	170
10^{-4}	66.04	100
10^{-3}	61.50	93
10^{-2}	64.00	96
10^{-1}	60.70	90

The values are mean of three determinations.

* One unit of enzyme is the amount that catalyzes the formation of 1μmol of NADPH per min.

** The relative activities are expressed assuming the activity of control is 100.

Table 5. The effect of ginseng saponin fraction on yeast pyruvate decarboxylase *in vitro*

Saponin concentration (%)	Activity (unit)*	Relative activity (%)**
0	17.70	100
10^{-7}	17.60	99.5
10^{-6}	18.63	105.3
10^{-5}	21.10	119.2
10^{-4}	22.53	127.3
10^{-3}	19.12	108.0
10^{-2}	13.32	75.3
10^{-1}	7.97	45.0

The values are mean of three determinations.

* One unit of enzyme is the amount that catalyzes the formation of 1umol of NAD^+ per min.

** The relative activities are expressed assuming the activity of control is 100.

Table 6. The effect of ginseng saponin fraction on yeast pyruvate kinase *in vitro*

Saponin concentration (%)	Activity (unit)*	Relative activity (%)**
0	5.24	100
10^{-7}	5.45	108
10^{-6}	5.71	113
10^{-5}	5.80	115
10^{-4}	5.74	113
10^{-3}	4.65	92
10^{-2}	3.36	72
10^{-1}	60.70	90

The values are mean of three determinations.

* One unit of enzyme is the amount that catalyzes the formation of 1umol of NAD^+ per min.

** The relative activities are expressed assuming the activity of control is 100.

요 약

효모의 발효과정에 관련된 여러 반응과 효소에 대한 인삼 사포닌의 영향을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

10^{-4}%-10^{-2}%의 인삼 사포닌이 함유된 배지에서 배양한 효모에서 발생한 CO_2의 양은 대조보다 많았으며 배양액에서의 농도가 10^{-3}%일 때 CO_2의 발생양이 가장 많았으며 이 농도에서 무기인산의 흡수와 glucose 감소 속도도 대조에 비해 크다.

[U—^{14}C]—glucose와 10^{-3}%의 인삼 사포닌을 함유한 배지에서 배양한 효모균에서 해당작용의 중간물질을 분리, 분석한 결과 fructose 6—phosphate의 방사능은 대조보다 1.6배 많았고 pyruvate의 방사능은 대조의 60%정도로 감소하였다. 효모의 hexokinase, phosphoglucose isomerase, pyruvate kinase 그리고 pyruvate decarboxylase에 미치는 인삼 사포닌의 영향을 시험관에서 조사한 결과 반응액에서의 사포닌 농도가 10^{-5}%일 때 가장 큰 활성을 나타내었다.

이상과 같은 실험결과는 인삼 사포닌이 여러 효소를 비 특이적으로 활성화한다는 주 등의 주장을 재확인하는 것이며 이와 같은 인삼 사포닌의 비 특이적 효소 활성화 효과가 효모의 발효에 관여하는 효소들을 활성화 함으로서 발효속도가 촉진된 것으로 생각된다.

인용 문헌

1) 주충노, 유학수, 이상직, 이효숙 : 한국생화학회지 **6,** 177(1973).
2) 주충노, 최임순, 정노팔, 이상직 김옥희 : 한국생화학회지 **7,** 85(1974).
3) 주충노, 한정호 : 한국생화학회지 **9,** 43(1976).
4) 주충노, 오정환, 노수진 : 한국생화학회지 **9,** 53(1976).
5) Joo, C. N. : Surfactants in solution, vol. 3, pp. 2093, Plenum Publishing Coopreration (1983).
6) 주충노, 김재원 : 한국생화학회지 **18,** 279(1985).
7) 김태봉, 이희성, 이근배 : 한국생화학회지 **3,** 35(1970).
8) 유승용 : 서울의대잡지 **12,** 173(1971).
9) Ko, J. H., H. B. Lee, and C. N. Joo : *Korean J. Ginseng Sci.* **7,** 82(1983).
10) Park, H. S., H. S. Kwak, and C. N. Joo : *Korean J. Ginseng Sci.* **9,** 221(1985).
11) Calvin, M. and A. A. Benson : *Science* **107,** 476(1948).
12) Lowry, O. H., N. J. Rogebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall : *J. Biol. Chem.* **193,** 265(1951).
13) Robbins, E. A. and P. D. Boyer : *J. Biol. Chem.* **224,** 121(1957).
14) Noltman, E. A. and F. H. Bruns : *Biochem. J.* **331,** 436(1959).
15) McQuate, J. T. and M. F. Utter : *J. Biol. Chem* **234,** 2151(1959).
16) Utter, M. F., P. D. Boyer, and H. Lardy : The enzymes, Vol. 5, pp. 320, Academic Press, New York (1961).