

인삼 사포닌 분획이 콩 발아시의 당 신생반응에 미치는 영향

박혜수 · 곽한식 · 주충노
연세대학교 이과대학 생화학과
(1985년 9월 6일 접수)

The Effect of Ginseng Saponin on Gluconeogenesis at the Early Phase of Germinating Soy-bean Sprout

Hye Soo Park, Hahn Shik Kwak and Chung No Joo

Department of Biochemistry, College of Science, Yonsei University
(Received Sep. 6, 1985)

Abstract

The effect of ginseng saponin on the activities of isocitrate lyase, malate synthase, succinate dehydrogenase, malate dehydrogenase and lipase have been investigated at the early phase of germinating soy-bean sprout and found that all the above enzymes were stimulated when the bean was rinsed for 24 hours with $10^{-4}\%$ saponin solution.

The length of the saponin treated group was not longer than that of control group but the weight of the former was heavier (15%) than the latter. Total sugar content of test group was always much higher than that of control.

From the above results, it was concluded that ginseng saponin might stimulate several enzymes of Soybean sprout during germination resulting in rapid growth of the Soy-bean sprout.

緒 論

인삼 (*Panax ginseng* C. A. Meyer)에 관한 과학적 연구는 1854년 Garrigues¹⁾가 북미산 *Panax quinoquefolium* 뿌리에서 panaquilon이란 사포닌 성분을 분리한 이래 인삼 성분의 화학을 비롯하여 생리적, 약리적 작용에 관한 연구가 진행되어 왔으며, 특히 최근에는 여러 분석 기기의 개발, 실험 기술의 향상 및 방사성 동위원소의 이용등으로 인삼 효능에 관한 생화학적 연구가 크게 활기를 띠게 되었다.

1969년 Brekhman^{2,3)}은 인삼의 주요 성분의 하나인 dammarane glycoside가 비특이적으로 적응성을 증가시킨다고 주장하였고 Oura^{4~7)}은 인삼의 유효 성분이 인삼 사포닌이라고 지적하고 인삼 사포닌이 단백질과 핵산의 합성을 촉진하며 hormone과 같은 작용을 한다고 제안한 바 있다.

주동^{8,9)}은 인삼 사포닌이 표면 활성 물질임에 착안하여 인삼 사포닌의 물의 표면장력 저하작용, 입계 미셀농도를 측정하였고 지질대사에 관여하는 효소를 비롯하여 미토콘드리아의 탈수소효소 등 여러 효소반응에 미치는 인삼 사포닌의 영향을 관찰한 바 대부분의 효소는 인삼 사포닌 분획의 농도가 $10^{-4}\%$ ~ $10^{-5}\%$ 일 때 최고 활성을 나타내었고 인삼 사포닌의 농도가 커지면 오히려 효소활성이 억제됨을 확인하여 두 가지 공통점, 즉 비특이적인 활성화 작용과 최고 활성을 위한 적정 농도의 존재를 지적하고 적당량의 인삼 사포닌은 효소의 기질에 대한 Km치를 저하시킴으로써 효소 활성을 증대시키며 Km치의 저하는 인삼 사포닌의 표면 활성으로 인한 효소의 conformation의 변화에 기인할 것이라고 제안하였다¹⁰⁾

본 실험에서는 이와 같은 실험 결과를 토대로 하여 인삼 사포닌이 식물 발아시에 여러 효소들의 활성을 촉진하여 성장이 빨라질 것으로 예상하고 대두를 재료로 하여 콩나물 발아시의 몇 가지 효소 활성을 *in vitro*와 *in vivo*에서 관찰함으로써 인삼 사포닌의 비특이적인 효소 활성 촉진을 입증하고자 하는 것이다.

實驗 材料 및 方法

1. 인삼 사포닌의 분리 및 정제

금산산 인삼(4년근, 50편급) 분말 100g에 chloroform 500ml을 가하고 1시간 동안 40°C에서 가열 추출하여 지질을 제거하는 과정을 3회 되풀이하여 남은 것을 건조하였다. 이 분말에 500ml의 methanol을 가하고 60°C에서 가열 추출하는 조작을 3회 되풀이한 다음 여과액을 모아 40°C에서 감압 농축한 뒤 동결 건조하여 7g의 methanol추출물을 얻었다. 이 추출물을 20%의 methanol용액 14ml에 녹여 합성 수지 흡착제 amberlite XAD-2 100g을 150ml의 물에 분산시켜 내경 2.5cm의 관에 충전시킨 column에 주입하고 유속을 20ml/min으로 하여 통과시켜 인삼 사포닌을 흡착시킨 다음 증류수를 주입하여 흘러 보낸 액의 색이 없어질 때까지 씻어내어 불순물을 제거하였다. 불순물을 제거한 후 99%의 methanol을 주입하여 유속을 10ml/min으로 하여 흘러 보내 흡착된 사포닌을 용리시켰다. 이 용리액을 마이크로 슬라이드 판으로 준비한 TLC판을 이용하여 사포닌을 확인하였으며 완전 용리까지 소모된 methanol은 500ml이었다. 이 용리액을 모아 40°C에서 감압 농축한 후 동결 건조하여 1.6g의 황백색의 사포닌 분획을 얻었다. 본 실험에서는 이 인삼 사포닌 분획을 더 이상 정제하지 않고 사용하였다.

2. 대두(*Glycine max*) 발아 및 효소원의 제조

콩나물의 재배는 전통적인 방법과 Longo¹²⁾의 방법을 병행하였다.

증류수에 24시간 담근 대두(대조군)와 $10^{-4}\%$ 사포닌 수용액에 24시간 담근 대두(시험

균)를 건져서 여과지와 가체를 덮은 용기에 옮긴 후 3시간 간격으로 물을 부어주는 조작을 계속하였다. 이 모든 과정은 25°C, 암소에서 시행하였다.

해당 50 seedling당 150ml의 물을 가하고 AM-8 homogenizer(Nissei Co. Ltd)를 이용하여 균질화한 후 이 혼합액을 효소원으로 사용하였다.

3. Lipase(EC. 3, 1, 1, 3)의 활성 측정

Lipase의 활성은 2g의 대두유를 lab line sonicator를 사용하여 100ml의 물에 분산시킨 것(2% soybean oil suspension)을 기질로 사용하고 다음과 같이 측정하였다.

15ml의 반응액 [조성(최종농도) : 50mM ammonium chloride buffer(pH 8), 0.2% soybean oil, 2.5ml의 효소원]을 37°C에서 1시간 흔들면서 반응시킨 후 즉시 1% phenolphthalein ethanol 용액 0.1ml를 가하고 0.02N KOH로 적정하여 생성된 지방산을 정량하여 lipase의 활성을 추정하였다.

4. Isocitrate lyase(EC. 4, 1, 3, 1)의 활성 측정

Isocitrate lyase의 활성 측정은 Roche등¹⁴⁾의 방법을 이용하였다.

효소원 0.05ml에 3mM MgCl₂와 1mM 2-mercaptoethanol을 포함한 50mM Tris-HCl buffer(pH 7.6) 0.85ml를 가하고 30°C에서 3분간 preincubation한 후 0.2M trisodium-DL-isocitrate 0.1ml를 가하여 30°C에서 정확히 10분간 반응시킨 다음 1M oxalic acid를 가하여 반응을 종결시키고 1% phenylhydrazine-HCl 0.1ml와 증류수 1.2ml를 가한 다음 실온에서 5분간 방치하고 반응물을 얼음통에서 5분간 냉각시킨 후 진한 염산 1.5ml와 8% (w/v) potassium ferricyanide 0.1ml를 가하여 발색 후 15분에 520nm에서의 흡광도를 측정하여 Isocitrate lyase의 활성을 추정하였다.

5. Succinate dehydrogenase(EC. 1, 3, 99, 1)의 활성 측정

Succinate dehydrogenase의 활성은 주등¹⁰⁾의 방법에 따라 반응액에 효소를 가한 뒤 37°C에서 10분간 방치하고 무수 EtOH 2ml를 가하여 반응을 중지시킨 다음 원심분리한 상층액의 620nm에서의 흡광도를 측정함으로써 추정하였다.

반응액(전체 부피 : 3ml)의 조성(최종 농도)은 50mM phosphate buffer(pH7.6), 1mM KCN, 0.4mM DICPIP, 20mM Na-succinate와 효소원 0.6ml이었다.

6. Malate dehydrogenase(EC. 1, 1, 1, 37)의 활성 측정

Malate dehydrogenase의 활성 측정도 주등¹⁵⁾의 방법에 따라 SDH활성 측정과 같은 방법으로 추정하였다.

반응액(전체 부피 : 3ml)의 조성(최종 농도)은 14mM phosphate buffer(pH7.4), 0.43mM NAD⁺, 30mM nicotinamide, 0.86mM KCN, 0.034mM DICPIP, 7.1mM sodium-malate와 효소원 0.1ml이었다.

7. 당의 정량

전 당량과 유리당 및 녹말의 정량은 Somogyi¹⁶⁾와 Owens¹⁷⁾의 방법을 변형하였다.

시료 10ml, 물 20ml, 72% 진한 황산 10ml를 잘 섞어, 두 시간동안 역류가열한 뒤 일부(50 μ l)를 취하여 안트론 시약(0.2% 진한 황산용액)을 가하고 10분간 중탕한 후 620 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 전 당량을 측정하였다.

시료 1 ml에 6 ml의 열 80% ethanol을 가하고 잘 저어준 다음 원심분리하여 얻은 침전물을 열 80% ethanol로 두 번 세척한 상층액을 처음 얻은 상층액과 합친 것을 유리당의 정량시료로 사용하였다. 침전물에는 2.6ml의 52% perchloric acid를 가하고 저어주면서 15분간 방치한 후 원심분리하여 침전물을 제거하고 상층액에 4 ml의 증류수와 1.2ml의 52% perchloric acid를 가하여 이것을 녹말 정량시료로 사용하였다.

8. 시 약

Trisodium-DL-isocitrate, Tris, NAD⁺, DICPIP, nicotinamide, Na-succinate, Na-malate는 Sigma사 제품, anthrone은 Junsei Co. 사 제품, oxalic acid, phenylhydrazine-HCl, potassium ferricyanide는 Kanto사 제품을 사용하였고, 일반 시약은 Junsei사 제품, 유리 용매는 국내 시판용을 재증류하여 사용하였다.

Soybean oil과 대두(*Glycine max*)는 시판품을 구입하여 사용하였다.

實驗 結果 및 考察

본 실험실에서는 그동안 적당량의 인삼 saponin이 동물 및 미생물에서 추출된 여러 효소를 거의 예외없이 비특이적으로 활성화한다는 실험적 증거를 제시해 왔으며, 이와 같은 인삼 saponin의 비특이적인 효소 활성화는 식물 효소에게도 적용되리라고 생각하여 대두(*Glycine max*)가 발아, 성장할 때의 몇 가지 효소에 대한 인삼 saponin의 영향을 관찰하였다.

대두는 저장 지방을 이용하여 당을 합성하는 특이한 대사회로인 glyoxylate cycle을 가지고 있음은 잘 알려져 있으며¹⁸⁻²²⁾ 발아시 lipase, β -산화효소, glyoxylate cycle의 효소, isocitrate로부터 당이 합성될 때 관여하는 효소들이 활발한 것으로 예상된다.

본 실험에서는 특히 지방을 이용하여 당을 생성하는데 관여하는 몇가지 효소 즉 lipase, glyoxylate 회로의 주요 효소인 isocitrate lyase, 그리고 succinate dehydrogenase와 malate dehydrogenase의 활성화에 미치는 인삼 사포닌의 효과를 *in vitro*와 *in vivo*에서 관찰한 것이다.

Table 1은 lipase 활성화에 미치는 인삼 saponin의 영향을 *in vitro*에서 조사한 것이다. 가장 큰 lipase의 활성을 나타내는 5일째의 콩나물 파쇄액을 효소원으로 사용한 경우 반응액에서의 인삼 사포닌 분획의 농도가 10⁻⁵와 10⁻⁶%일 때 그 활성이 대조군 보다 20% 증가하였다.

Table 2는 isocitrate lyase 활성화에 미치는 인삼 saponin의 영향을 조사한 것인데 가장 큰 isocitrate lyase의 활성을 나타낸 3일째의 콩나물을 효소원으로 사용한 경우 인

Table 1. The effect of ginseng saponin fraction on soybean lipase *in vitro*

Added saponin concentration (%)	Enzyme activity (unit)*	Relative activity**
0	3.0 ± 0.3	100
10 ⁻⁷	2.9 ± 0.2	97
10 ⁻⁶	3.7 ± 0.3	123
10 ⁻⁵	3.6 ± 0.2	120
10 ⁻⁴	3.4 ± 0.1	113
10 ⁻³	2.8 ± 0.2	93

- The values are mean value of three or five times determination.
- * One unit of enzyme was defined as a titrated volume with 0.02N KOH per seedlings
- ** The relative activities are expressed assuming the activity of control is 100.

Table 2. The effect of ginseng saponin fraction on soybean isocitrate lyase *in vitro*

Added saponin concentration (%)	Enzyme activity (unit)*	Relative activity**
0	4.63 ± 0.37	100
10 ⁻⁷	5.99 ± 0.06	129
10 ⁻⁶	5.55 ± 0.24	120
10 ⁻⁵	4.92 ± 0.50	107
10 ⁻⁴	5.99 ± 0.46	129

The values are mean value of three times determination.

- * One unit of enzyme was defined as a density increment of 0.01 per min. per seedling.
- ** The relative activities are expressed assuming the activity of control is 100.

삼 사포닌의 농도가 10⁻⁶일 때 20%의 활성 증가를 나타내었다.

Succinate dehydrogenase와 malate dehydrogenase의 최대활성을 나타낸 5일째의 콩나물 파쇄액을 효소원으로 사용하였을 때는 인삼 사포닌의 농도 10⁻⁵%일 때 SDH는 57%(Table 3), MDH는 20%(Table 4)의 활성 증가를 나타내었다.

이상과 같은 실험 결과는 동물 효소들에서 관찰된 적당량의 인삼 사포닌의 비특이적인 효소 활성화 효과와 유사하였다.

Table 5는 대두를 사포닌으로 미리 처리하지 않은 대조군과 10⁻⁴% 사포닌으로 처리한 시험군의 성장상을 나타낸 것이다. 길이는 큰 유의성있는 차이를 발견할 수 없었지만 무게는 현저히 (20% 정도) 증가하였다.

Table 6은 콩나물 성장에 따라 변동하는 lipase의 활성을 측정한 것이다. 시험군과 대조군 모두 5일째 가장 큰 활성을 나타내었고 시험군의 활성은 2일, 3일, 4일째 대

Table 3. The effect of ginseng saponin fraction on succinate dehydrogenase *in vitro*

Added saponin concentration (%)	Enzyme activity (unit)*	Relative activity**
0	1.44 ± 0.42	100
10 ⁻⁷	1.47 ± 0.11	102
10 ⁻⁶	1.69 ± 0.30	117
10 ⁻⁵	2.26 ± 0.27	157
10 ⁻⁴	1.58 ± 0.22	110

- The values are mean value of three times determination.
- * One unit of enzyme was defined as a density decrement of 0.001 per min. per seedling.
- ** The relative activities are expressed assuming the activity of control is 100.

Table 4. The effect of ginseng saponin fraction on soybean malate dehydrogenase *in vitro*

Added saponin concentration (%)	Enzyme activity (unit)*	Relative activity**
0	2.42 ± 0.17	100
10 ⁻⁷	2.59 ± 0.27	107
10 ⁻⁶	2.70 ± 0.31	112
10 ⁻⁵	2.92 ± 0.30	121
10 ⁻⁴	2.30 ± 0.29	98

- The values are mean value of three times determination.
- * One unit of enzyme was defined as a density decrement of 0.001 per min. per seedling.
- ** The relative activities are expressed assuming the activity of control is 100.

조균보다 각각 36%, 52%, 23%의 현저한 증가를 보였다.

Table 7은 콩나물 성장에 따라 isocitrate lyase의 활성 변동을 조사한 것이다. 시험균과 대조균 모두 3일째 가장 큰 활성을 나타내었고 1일째는 시험균의 활성이 30% 정도 증가하였다.

Glyoxylate cycle에서 생성된 succinate는 mitochondria에서 산화되어 malate가 되고 이것이 oxaloacetic acid로 산화되는데 관여하는 succinate dehydrogenase와 malate dehydrogenase의 콩나물 성장에 따른 활성 변동은 각각 Table 8과 9에 표시하였다.

SDH의 경우 성장함에 따라 시험균과 대조균 모두 활성이 점차 증가하였으며 4일째 시험균의 활성은 대조균보다 45% 증가하였고 MDH도 성장함에 따라 시험균과 대조균 모두 활성이 점차 증가하였으며 3일째에 시험균의 활성이 30% 증가하였다.

Fig. 1은 콩나물 성장에 따른 당의 함량을 조사한 결과이다. 전 당량은 시험균이 대조

Table 5. The effect of ginseng saponin fraction on the growth of germinating soybean sprout

5-1. The weight of beans

Group Day of germination	Control (g)	Test (g)	Relative* %
0.5	0.243 ± 0.008	0.229 ± 0.008	105**
1	0.244 ± 0.009	0.250 ± 0.009	104**
2	0.251 ± 0.009	0.286 ± 0.010	116***
3	0.315 ± 0.010	0.375 ± 0.013	115***
4	0.385 ± 0.013	0.393 ± 0.022	103**
5	0.575 ± 0.019	0.577 ± 0.019	102**
6	0.646 ± 0.022	0.782 ± 0.026	120**

* Relative percentage was expressed assuming the weight of control is 100.

** P > 0.05

*** P < 0.05

5-2 The length of beans

Group Day of germination	Control (cm)	Test (cm)	Relative* (%)
0.5	—	—	—
1	1.45 ± 0.30	1.37 ± 0.37	95**
2	3.00 ± 0.68	3.00 ± 0.77	100**
3	4.58 ± 1.30	4.82 ± 0.82	105**
4	7.43 ± 1.43	7.54 ± 1.32	102**
5	10.55 ± 2.47	11.25 ± 1.26	107**
6	16.95 ± 1.90	16.65 ± 1.61	98**

* Relative percentage was expressed assuming the length of control is 100.

** P > 0.05

군보다 언제나 훨씬 많았으며 free sugar의 양은 시험군과 대조군 모두 성장에 따라 감소하지만 시험군이 대조군보다 언제나 많았고 녹말의 함량도 높았다.

Table 6. The effect of ginseng saponin fraction on lipase activity during the germination of soybean sprout

Group Day of germination	Control (unit)*	Test (unit)*	Relative** %
0.5	1.18 ± 0.10	1.39 ± 0.16	118
1	1.19 ± 0.20	1.53 ± 0.15	128
2	1.28 ± 0.10	1.74 ± 0.22	136
3	1.82 ± 0.10	2.76 ± 0.28	152
4	2.33 ± 0.07	2.87 ± 0.15	123
5	5.19 ± 0.14	5.54 ± 0.31	107
6	3.05 ± 0.10	3.38 ± 0.15	111

- The values are mean value of three times determination.
- * One unit of enzyme was defined as a titrated volume with 0.02N KOH pre seedling.
- ** The relative percentage is expressed assuming the activity of control is 100.

이와 같은 실험 결과는 적당량의 인삼 saponin이 여러 가지 효소를 비특이적으로 활성화한다는 본 연구실의 실험 결과를 뒷받침하는 것으로 생각되며 대두를 10~4%

Table 7. The effect of ginseng saponin fraction on isocitrate lyase activity during the germination of soybean sprout

Group Day of germination	Control (unit)*	Test (unit)*	Relative** %
0.5	1.67 ± 0.11	1.95 ± 0.04	117
1	1.60 ± 0.10	2.03 ± 0.14	127
2	1.73 ± 0.11	2.01 ± 0.18	116
3	2.75 ± 0.36	3.06 ± 0.46	112
4	2.46 ± 0.22	2.94 ± 0.25	119
5	2.34 ± 0.16	2.35 ± 0.34	101

- The values are mean value of three times determination.
- * One unit of enzyme was defined as a density increment of 0.01 per min. per seedling.
- ** The relative percentage is expressed assuming the activity of control is 100.

Table 8. The effect of ginseng saponin fraction on succinate dehydrogenase activity during the germination of soybean sprout

Group Day of germination	Control (unit)*	Test (unit)*	Relative** %
0.5	0.750 ± 0.049	0.940 ± 0.044	125
1	0.840 ± 0.030	0.940 ± 0.017	112
2	1.110 ± 0.150	1.160 ± 0.160	104
3	1.100 ± 0.170	1.220 ± 0.190	111
4	1.150 ± 0.300	1.670 ± 0.270	145
5	1.670 ± 0.350	1.850 ± 0.260	111

• The values are mean value of three times determination.

* One unit of enzyme was defined as a density decrement of 0.001 per min. per seedling.

saponin용액에 담근 후 발아시키면 대두의 발아에 관여하는 여러 효소들이 비특이적으로 활성화됨으로써 지방을 이용하여 당을 합성하는 속도가 촉진되고 결과적으로 성장이 빨라진 것으로 해석된다.

Table 9. The effect of ginseng saponin fraction on malate dehydrogenase activity during the germination of soybean sprout

Group Day of germination	Control (unit)*	Test (unit)*	Relative** %
0.5	1.01 ± 0.06	1.10 ± 0.02	109
1	1.04 ± 0.04	1.19 ± 0.06	114
2	1.28 ± 0.02	1.43 ± 0.03	111
3	1.32 ± 0.10	1.70 ± 0.12	129
4	2.47 ± 0.15	2.68 ± 0.13	109
5	3.10 ± 0.13	3.05 ± 0.21	101

• The values are mean value of three times determination.

* One unit of enzyme was defined as a density decrement of 0.001 per min. per seedling.

** The relative percentage is expressed assuming the percentage of control is 100.

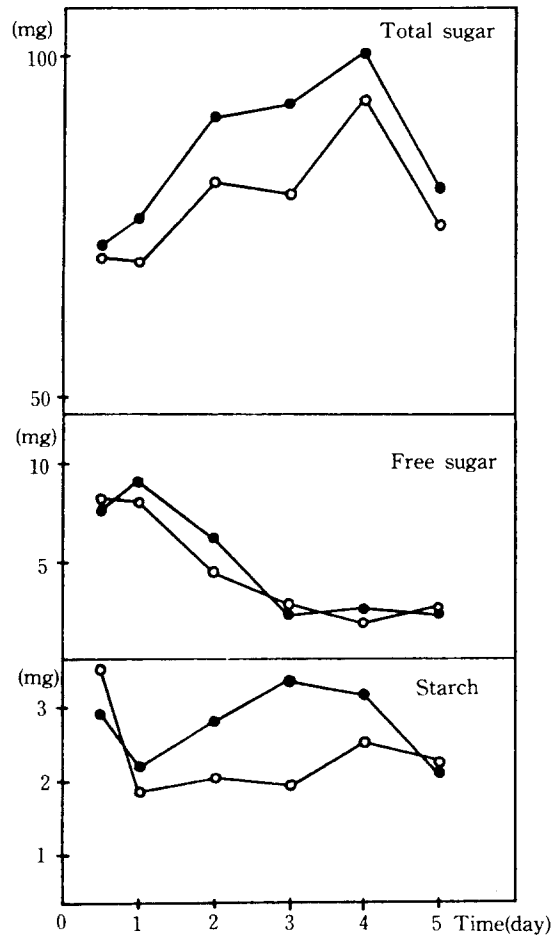


Figure 1. The effect of ginseng saponin fraction G_{11} sugar formation of germinating soyean sprout. All values are plotted as mg per 1 seedling and they are mean value of three times determination. The white dot (O-O), indicates the control group and the black (●-●) indicates the test group.

要 約

대두 (*Glycine max*)를 $10^{-4}\%$ 인삼 사포닌 용액에 24시간 담근 후 발아시켰을 때와 순수한 물에 24시간 담근 후 발아시켰을 때의 몇 가지 효소활성의 변동을 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

인삼 사포닌 용액($10^{-4}\%$)에 담근 콩(시험군)은 대조군(순수한 물에 담근 콩)에 비해 성장 길이에는 큰 차이가 없었으나 무게는 시험군이 대조군보다 2일, 3일째에 각각 16%, 15% 증가하였다.

전 당량은 시험군이 대조군보다 언제나 많았고, free sugar의 양은 성장에 따라 시험군과 대조군 모두 감소하지만 시험군이 대조군보다 언제나 많았으며 녹말의 함량도 높았다.

저장 지질을 지방산과 glycerol로 분해하는 lipase의 활성은 시험군이 대조군에 비해 2일, 3일, 4일째에 각각 36%, 52%, 23% 증가하였다.

Glyoxylate회로의 주요 효소인 isocitrate lyase는 3일째에 시험군의 활성은 대조군의 1.5배로 가장 큰 활성차이를 나타내었으며 succinate dehydrogenase는 4일째에 시험군이 대조군보다 45% 증가하였고 malate dehydrogenase의 활성도 3일째에 시험군이 대조군보다 약 30% 증가하였다.

이상과 같은 실험 결과는 인삼 사포닌이 여러가지 효소를 비특이적으로 활성화한다는 것을 재확인하는 것이며 이와 같은 인삼 사포닌의 비특이적 효소 활성화 효과가 콩의 발아에 관여하는 효소들을 활성화시킴으로써 지방을 이용하여 당을 합성하는 속도가 촉진되어 성장이 빨라진 것으로 해석된다.

References

1. Garriques, S.S.: *Ann. Chem. Pharm.* **90**, 231 (1854).
2. Brekhman, I.I and I.V. Dardymov: *Ann. Rev. Pharmacol.* **9**, 419 (1969)
3. Brekhman, I.I.: *Life Sci. Physiol. Pharmacol.* **8**, 113 (1969).
4. Oura, H., S. Hiai, S. Nakashima and K. Tsukada: *Chem. Pharm. Bull.* **19**, 453 (1971).
5. Oura, H., S. Hiai, K. Tsukada and Y. Ohita: *Chem. Pharm. Bull.* **20**, 980 (1972).
6. Oura, H. and S. Hiai: *In proceedings of International ginseng symposium, Seoul* (1974).
7. Oura, H., S. Hiai, S. Nabetani, Y. Kurata and N. Sasaki: *Plant Medica*.
8. Joo, C. N., R. S. Choi, S. J., Lee, S. H. Cho, M. H. Son: *Korean Biochem. J.* **6**, 185 (1973).
9. Joo, C. N., R. S. Choi, R. P., Chung, S. J. Lee and O. H. Kim: *Korean Biochem. J.* **7**, 85 (1974).
10. 주충노, 유학수, 이상직, 이효숙: *한국 생화학회지* **6**, 177 (1973).
11. 林輝明, 足立俊文, 東野正行: 特許出願公開, 昭 53-107185, 日本國特許廳(JP.) (1980).
12. Claudio P. Longo: *Plant Physiol.* **43**, 660 (1968).
13. Bier M.: *Methods in Enzymol. Vol. I.* 627 (1955).
14. Roche, T. E., J. O. Williams and B. A. McFadden: *Biochem. Biophys. Acta* **206**, 193 (1970).
15. Joo, C. N. and J. H. Han: *Korean Biochem. J.* **9**, 43 (1976).
16. Norton Nelson: *Anal. Chem.* (1950).
17. McCready R. M. and H. S. Owens: *Anal. Chem.* (1950).
18. Mayer A. M. and A. Poljakoff-Mayber: *The Germination of seeds* (1982).
19. Osborne, D. J.: *The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination, North-Holl and Amsterdam* (1972).
20. Mettler, I. J. and H. Beevers: *Plant Physiol.* **66**, 55 (1980).
21. Beevers, H.: *Nature* **191**, 433 (1961).
22. Canvin, D. T. and H. Beevers: *J. Biol. Chem.* **236**, 988 (1961).