

인삼사포닌이 벼의 발아 및 초기 생장에 미치는 영향

이용우·주충노

연세대학교 이과대학 생화학과

(1987년 6월 10일 접수)

The Effect of Ginseng Saponin Fraction on the Germination and Early Growth of Rice Seed (*Oryza sativa* L.)

Yong Woo Lee and Chung No Joo

Department of Biochemistry, College of Science, Yonsei University, Seoul 120, Korea

(Received June 10, 1987)

Abstract

The effects of ginseng saponin on the germination and early growth of rice seeds (*Oryza sativa* L.) were investigated. The early growth (length) of test rice seeds which were rinsed for 60 hrs in $10^{-4}\%$ saponin solution prior to transplantation to water agar bed was about 20% faster than that of control seeds. It was also found that the amylase activity of the seeds was most active when the seeds were rinsed in $10^{-4}\%$ saponin solution for 48 hrs. *In vitro* investigation showed that the amylase activities were stimulated about 30% by the treatment of $10^{-5}\%$ saponin solution compared with control group. From the above results, it seems that the ginseng saponin might activate amylase of rice seed during germination, resulting in rapid growth of rice.

서 론

고려인삼 (*Panax ginseng* C. A. Meyer) 뿌리의 주요성분의 하나인 인삼사포닌은 물질대사의 촉진이란 관점에서 중간대사와 밀접한 관계가 있는 효소계에 미치는 영향연구가 여러 연구실에서 활발히 진행되어 왔다.

주 등¹⁻⁶⁾은 여러가지 효소활성에 미치는 인삼사포닌의 영향을 조사하여 사포닌의 농도가 10^{-3} — $10^{-5}\%$ 일때, 최고활성을 나타냄을 제시하였고, 이와같은 인삼사포닌의 비특이적 효소활성화작용이 인삼사포닌의 계면활성에 기인한 것이라고 주장하였으며, 이러한 인삼사포닌의 비특이적 효소활성화작용이 식물 효소계에도 적용될 것으로 예측하였다. 그들은 인삼사포닌이 대두 발아시의 당 신생반응, 비타민C의 생합성을 촉진함을 제시하였고, 인삼차에 침전한 범씨의 생장 및 수확이 촉진됨을 보고하였다^{7,8)}.

본 연구에서는 위와같은 실험결과들을 토대로 하여 인삼사포닌의 벼(*Oryza sativa* L.)의 발아 및 초기생장에 미치는 영향을 관찰하고, 발아 및 초기생장에 중요한 구실을 하는 amylase의 활성화에 미치는 인삼사포닌의 영향을 조사하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험방법

1) 인삼사포닌의 제조

인삼사포닌 혼합물은 김 등⁹⁾의 방법에 따라 금산산 인삼(4년근, 백삼 300당 50편답) 분말 100g에 chloroform 500 ml/을 가하여 40°C에서 1시간 방치하고, 지질을 제거하는 과정을 3회 되풀이하여 얻은 분말에 methanol 500 ml/을 가하고, 60°C에서 3회 가열추출하여 methanol 엑스를 얻었다. 이 엑스를 140 ml/의 20% methanol을 가해 완전히 녹인 후 Amberite XAD₂ column에 흡착시키고 증류수(유속: 20 ml/min)로 유출하였다. 유출액의 색이 다 없어질때까지 증류수를 흘려보낸 다음, 95% methanol용액(유속: 10 ml/min)으로 흡착된 사포닌을 용출한 후, 용출액을 감압 농축하여 약 1.6g의 황백색 사포닌혼합물을 얻어 실험에 사용하였다.

2) 방사능 표지 인삼사포닌의 제조

방사성 인삼사포닌은 주 등¹⁰⁻¹¹⁾의 방법에 따라 분리 정제하였다. 한국인삼연초연구소 경작 시험장에서 분양받은 4년생 인삼뿌리의 절편 2g에 3.3 ml/의 반응혼합물[9.1×10^{-2} M phosphate buffer(pH 6.8), 3.6×10^{-3} M MgCl₂, 3.6×10^{-3} M MnCl₂, 1.1×10^{-1} M sucrose, 4.5×10^{-3} M ATP, 2.7×10^{-4} M NADPH, 4.5×10^{-4} M CoA, 7.3×10^{-4} M NAD⁺, 2.3×10^{-2} M nicotinamide, 9.1×10^{-3} M glutathione, 1.1×10^{-2} M sodium acetate, 1.2×10^{-4} C-acetic acid(sodium salt, 55 mCi/nmole) 500 μ Ci]을 37°C에서 72시간 동안 흔들어 주면서 반응시킨 후, 증류수를 가하여 균질화하여 원심분리(12,000 \times g, 30 min)한 다음 상층액을 냉동건조하였다. 이것을 methanol로 추출한 후 3배 부피의 chloroform을 가하여 불용성 부분을 제거한 후 사포닌 분획을 얻어 thin layer chromatography(전개용매, chloroform/methanol/H₂O=65:40:9, v/v/v)법으로 분리, 정제하고 autoradiography법¹²⁻¹⁴⁾으로 사포닌임을 확인하였다.

3) 벼의 초기생장 측정

벼의 초기생장을 관찰하기 위하여 증류수에 60시간(적산온도: 100°C) 담근 범씨(대조군)와 10⁻²~10⁻⁵% 사포닌 수용액에 60시간 담근 범씨(시험군)중 발아한 전진종자를 선발하여 2% water agar 배지에 파종한 후 30°C에서 10일간 배양하면서 지상부의 길이를 측정하였다.

4) Amylase 활성 측정

Amylase의 활성은 Bernfeld의 방법¹⁵⁾에 따라 측정하였다. *In vivo* 실험의 경우, 증류수에 12~72시간 침종시킨 범씨(대조군)와 10⁻⁴% 사포닌용액에 12~72시간 침종시킨 범씨(시험군)를 1 M phosphate buffer(pH 7.6)로 균질화한 후 원심분리(3,000 \times g, 20 min)하여 상층액을 효소원으로 사용하였고, *in vitro* 실험의 경우, 증류수에 48시간 침종시킨 범씨를 위와같은 방법으로 분리하여 효소원으로 사용하였다. 반응액의 조성은 5 mg/ml soluble starch, 10 mM phosphate buffer(pH 7.0), 3 mM NaCl, 효소원 0.2 ml이었으며, 25°C에서 50 min간 반응시킨 후 반응생성물인 maltose를 3,5-dinitrosalicylic acid(1g 3,5-dinitrosalicylic

acid in 20 ml 2 N NaOH+30g K-Na tartrate, to make 100 ml with distilled water) 로 정량하였다. 단백질은 Lowry의 방법¹⁶⁾으로 정량하였다.

5) 범씨내로의 사포닌 흡수도 측정

범씨내로의 사포닌의 흡수도는 방사성 인삼사포닌을 이용하여 측정하였다. 범씨를 10⁻⁴% 사포닌용액 (¹⁴C-labeled saponin, 143,044 dpm 포함)에 침중시키고, 12, 24, 48, 72시간 후에 원심분리하여 상층액 (outside)과 침전물 (inside)의 방사능을 측정하였다.

2. 시 약

NADPH, CoA, NAD⁺, nicotinamide, glutathione, BSA, Amberlite XAD₂는 Sigma사 제품, 1,2-¹⁴C-acetic acid는 Amersham사 제품, 3,5-dinitrosalicylic acid는 Fluka사 제품을 사용하였고, 기타 일반시약은 Wako사 특급 및 Junsei사 특급을 사용하였으며, 추출용 유기용매는 국내 시판품을 재증류하여 사용하였다.

실험결과 및 고찰

본 연구실에서는 적당량의 인삼사포닌이 동물 및 미생물에서 추출된 여러 효소를 거의 예외 없이 비특이적으로 활성화한다는 실험적 증거를 제시하였으며, 이와같은 인삼사포닌의 비특이적인 효소활성화가 식물효소에도 적용되리라고 생각하여 벼의 발아 및 초기생장에 미치는 인삼사포닌의 영향을 관찰하였다.

범씨를 사포닌으로 처리하지 않은 대조군과 10⁻²~10⁻⁵% 사포닌으로 처리한 시험군의 생장도를 조사한 결과, 인삼사포닌의 농도가 10⁻⁴%일때, 지상부의 생장이 약 20% 정도 크게 증가하였으며, 통계적으로도 유의함을 확인하였다 (Table 1). 또한 벼의 생장을 촉진하는 사포닌의 특정농도 (10⁻⁴%)가 존재함을 확인하였다.

Table 1. The effect of ginseng saponin fraction on the early growth of rice seed. The values are mean value of the length of 30 seedlings.

Day	3	5	7
Group			
0	2.67 ± 0.38 (100)	8.42 ± 0.80 (100)	15.16 ± 1.17 (100)
10 ⁻² %	2.97 ± 0.43 (111)*	8.43 ± 0.64 (100)*	14.40 ± 0.80 (95)*
10 ⁻³ %	2.71 ± 0.35 (101)*	8.78 ± 0.64 (104)	14.63 ± 1.05 (97)
10 ⁻⁴ %	3.24 ± 0.36 (121)*	9.48 ± 0.67 (113)*	15.93 ± 0.85 (105)*
10 ⁻⁵ %	2.74 ± 0.24 (103)	8.39 ± 0.54 (100)	15.28 ± 1.34 (101)*

The figure in blackets are relative percentage assuming that of control group being 100.

* P 0.05

Table 2. The effect of ginseng saponin fraction (10⁻⁴%) on the early growth of rice seed. The values are mean value of the length of 100 seedlings.

Day	Group	Control (cm)	Test (cm)	Relativity (%)
2		0.39 ± 0.14	0.40 ± 0.18	103
3		0.93 ± 0.28	1.06 ± 0.54	114*
4		2.34 ± 0.57	2.32 ± 0.64	99
5		4.61 ± 0.73	4.65 ± 0.81	101
6		6.80 ± 0.72	6.94 ± 0.72	102
7		8.16 ± 0.80	8.58 ± 1.01	105*
8		9.53 ± 1.29	10.59 ± 1.43	111*
9		11.47 ± 1.63	12.59 ± 1.68	110*
10		13.40 ± 1.76	14.56 ± 1.77	109*

The relative percentage expressed assuming that of control group being 100.

* P < 0.05

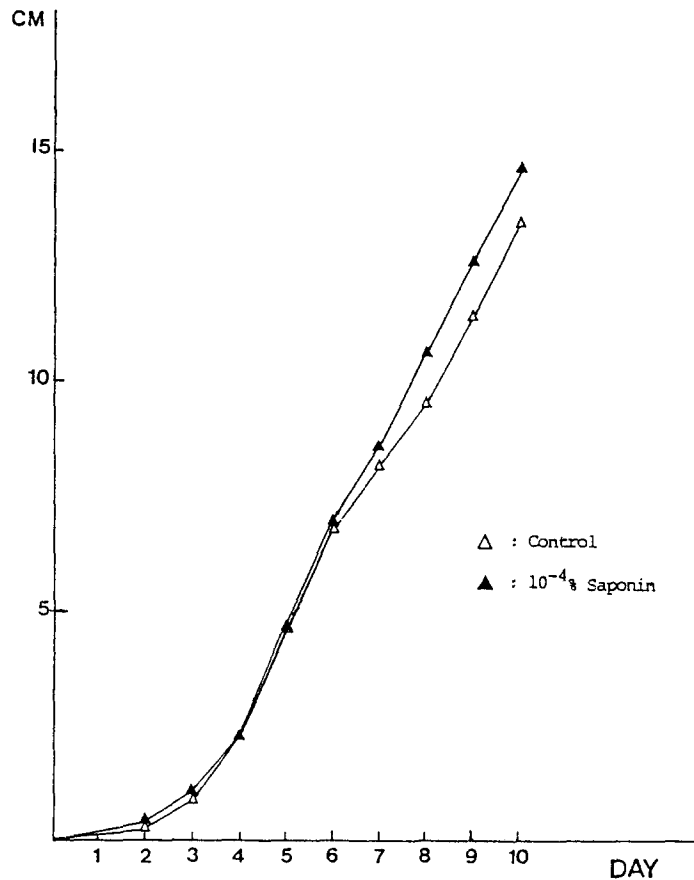


Fig. 1. The effect of ginseng saponin fraction on the early growth of rice seed.

Table 2는 사포닌으로 처리하지 않은 대조군과 10⁻⁴% 사포닌으로 처리한 시험군의 초기생장 속도의 영향을 조사한 것으로서, 시험군이 대조군에 비해 생장단계별 지상부의 생장이 촉진되었음이 관찰되었다(Fig. 1). 한편, 잎의 출현시기도 시험군이 더 빨랐다. 이것은 인삼사포닌이 벼의 초기생장을 촉진함을 의미하는 것이다.

발아 초기에는 배유가 저장하고 있는 녹말, 지방, 단백질과 섬유소 등이 발아시 유도되는 분해효소의 작용으로 가수분해되어 유아와 유근의 영양분이 된다는 사실은 이미 잘 알려져 있다. 벼씨는 녹말이 약 88%, 나머지가 단백질, 지질 및 기타 미량원소로 구성되어 있으므로, 발아시의 주요 영양분이 녹말의 산물임을 예상할 수 있다.

본 실험에서는 건물량의 대부분을 차지하는 녹말의 가수분해 효소인 amylase의 활성에 미치는 인삼사포닌의 영향을 *in vivo*와 *in vitro*에서 관찰하였다.

Table 3는 amylase 활성에 미치는 인삼사포닌의 영향을 *in vivo*에서 조사한 것으로서, 발아시기 전체에 걸쳐 인삼사포닌에 의한 amylase 활성의 현저한 증가를 관찰할 수 있었으며,

Table 3. The effect of ginseng saponin fraction on amylase activity during the germination of rice seed. The values are mean value of three determinations.

Group Time	Amylase activity (Units/mg protein)*		Relativity** (%)
	Control	Test	
12 hr	0.67	0.85	127
24 hr	0.53	0.84	158
48 hr	1.06	1.79	169
72 hr	0.84	1.25	149

* One unit of enzyme was defined as mg maltose liberated in 50 min at 25°C by 1 ml enzyme solution.

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

Table 4. The effect of ginseng saponin fraction on amylase activity *in vitro*. The values are mean value of three determinations.

Added saponin concentration(%)	Enzyme Activity (unit)*	Relativity** (%)
0	0.585	100
10 ⁻¹	0.320	55
10 ⁻²	0.480	82
10 ⁻³	0.490	84
10 ⁻⁴	0.510	87
10 ⁻⁵	0.780	133
10 ⁻⁶	0.650	111
10 ⁻⁷	0.625	107

* One unit of enzyme was defined as mg maltose liberated in 50 min at 25°C by 1 ml enzyme solution.

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

48시간 침종한 볍씨 파쇄액을 효소원으로 사용한 경우, 가장 크게 촉진(약 70% 정도)되었다.

최대활성을 나타낸 48시간째의 볍씨 파쇄액을 효소원으로 사용하여 *in vitro* 실험을 실시한 결과(Table 4), 인삼사포닌의 농도가 10⁻⁵%일때 최대활성증가(33%)를 나타냈으며, 인삼사포닌의 농도가 높아질수록 현저히 억제되었다. 이것은 고농도의 인삼사포닌을 처리하였을 경우 생장이 억제되고, 적정농도에서 촉진되었던 초기생장에 관한 이전의 실험결과와 일치하는 것이다.

Table 4의 결과, 10⁻⁴% 사포닌용액에서 효소활성이 억제되고, 10⁻⁵%에서 촉진된 것은 수용액에서 볍씨 내부로 흡수되는 인삼사포닌의 흡수도에 기인하는 것으로 생각되며, ¹⁴C으로 표지된 방사성 사포닌을 이용하여 위의 사실을 확인하였다(Table 5).

Table 5. Absorbance of ginseng saponin fraction(10⁻⁴%) during germination of rice seed.

Time (hr)	Radioactivity(DPM)		Absorbance (%)
	Outside	Inside	
0	143,044	0	0
12	130,516	12,529	8.8
24	122,612	20,432	14.3
48	116,614	26,430	18.5
72	100,022	43,022	30.1

이와같은 실험결과는 적정농도의 인삼사포닌이 여러가지 효소들을 비특이적으로 활성화한다는 본 연구실의 실험결과를 뒷받침하는 것으로 생각되며, 또한 대두 발아초기에 콩이 저장하고 있는 지방을 탄수화물로 변화시키는데 관여하는 효소들이 인삼사포닌을 처리할 경우 크게 활성화된다는 이전의 실험결과와도 일치한다.

이상의 결과로부터 인삼사포닌이 볍씨의 발아에 기능하는 amylase 및 몇가지 효소들을 활성화함으로써, 벼의 발아 및 초기생장을 촉진하는 것으로 해석되며, 다른 효소들에 대한 연구도 이루어져야 할 것으로 기대된다.

요 약

인삼사포닌이 벼(*Oryza sativa* L.)의 초기생장 및 발아에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 볍씨를 10⁻⁴% 사포닌용액에 침종시킨 후, 30°C에서 성장시켰다.

인삼사포닌용액(10⁻⁴%)에 60시간 동안 침종한 볍씨(시험군)는 증류수에 침종한 대조군에 비해 시간에 따른 생장이 촉진(약 10%)되었으며, 잎의 출현시기도 통계적으로 빨랐다.

또한, 볍씨 발아시의 주요효소인 amylase의 활성을 12, 24, 48, 72시간 침종한 볍씨파쇄액에서 조사한 결과, 시험군이 대조군에 비해 각각 1.27, 1.58, 1.69, 1.49배 촉진되었으며, *in vitro* 실험의 결과도 10⁻⁵% 사포닌 존재하에서 대조군에 비해 활성이 약 30% 증가하였다.

이상의 결과로부터 인삼사포닌이 벼의 발아에 기능하는 amylase를 활성화하여, 벼의 발아 및 초기생장을 촉진하는 것으로 해석된다.

인용문헌

1. 주충노, 유학수, 이상직, 이효숙 : 한국생화학회지, 6, 177(1973).
2. 주충노, 최입순, 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, 2093, Plenum Publishing Cooperation (1983).
6. 주충노, 김재원 : 한국생화학회지, 18, 279(1985).
7. Park, H.S., Kwak, H.S. and Joo, C.N.: *Korean J. Ginseng Sci.* **9**, 221 (1985).
8. Joo, C.N. and Lim, S.K.: *Korean J. Ginseng Sci.*, in press.
9. Kim, J.W., Lee, H.B. and Joo, C.N.: *Korean Biochem. J.* **16**, 142 (1983).
10. Joo, C.N., Koo, J.H., Lee, H.B., Yoon, J.B. and Byun, Y.S.: *Korean Biochem. J.* **15**, 189 (1982).
11. Lee, H.B. and Joo, C.N.: *Korean Biochem. J.* **16**, 136 (1983).
12. Gretchen, H.S. and Yanishevsky, R.: *Methods in Enzymol.*, Academic Press, **58**, 279 (1979).
13. Ronald, A.L. and Mills, A.D.: *Eur. J. Biochem.* **56**, 335 (1975).
14. Mangold, H.K.: in E. Stahl (ed.) *Thin Layer Chromatography* (Springer-Verlag, NY), 155 (1969).
15. Bernfeld, P.: *Methods in Enzymol.*, Academic Press, Vol. I, 149 (1955).
16. Lowry, O.H., Rogebrough, N.J., Forr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).