

적변인삼 유발 물질 구명 I. 항산화 활성을 중심으로

이성식[#] · 이명구 · 최광태 · 안영옥* · 권석윤* · 이행순* · 곽상수*

한국인삼연구소, *생명공학연구소 식물세포공학연구실
(2000년 8월 26일 접수)

Studies on the Causal Component of Rusty-Root on *Panax ginseng* I. Antioxidative Activity Oriented

Sung-Sik Lee[#], Myong-Gu Lee, Kwang-Tae Choi, Young-Ock Ahn*,
Seok-Yoon Kwon*, Haeng-Soon Lee* and Sang-Soo Kwak*

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, 434, Dangsudong, Kwonsun-Ku, Suwon, 441-480, Korea

*Plant Cell Biotechnology Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology,
Oun-Dong 52, Yusong, Taejeon, 305-333, Korea

(Received August 26, 2000)

Abstract : To analyze the correlation between the rusty root and the antioxidative activity in ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) roots, the levels of antioxidative activity in various tissues of healthy and rusty roots. The superoxide dismutase activity in rusty roots (126.9 units/mg protein) was approximately 3.5 times higher than that in healthy roots. The catalase activity in rusty roots was approximately 1.6 times higher than that in healthy roots, whereas the peroxidase activity showed a slight low level in rusty roots. The 1.1 diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH) free radical scavenging activity in rusty roots was approximately 2.0 times higher than that in healthy roots. The total ascorbate content in healthy roots was 166~240 µg/g fr. wt. depending on the tissues. Interestingly, the oxidized dehydroascorbate (DHA) content occupied more than 80% in total ascorbate content. The total ascorbate content in rusty roots was a similar level with healthy roots, but the reduced ascorbate content was 3.5~7.5 times higher than that of the healthy roots. The total glutathione content of the epidermis, cortex and stele tissues in rusty roots was 7.3, 4.8, 1.2 times higher than the healthy tissues, respectively. The ratio of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) showed a similar fluctuation of total glutathione content in rusty roots. These results indicate that the high antioxidative activity in rusty roots may involve in overcoming the oxidative stress derived from environmental stresses.

Key words : Rusty root, superoxide dismutase, catalase, peroxidase, DPPH free radical, dehydroascorbate, reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG).

서 론

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 다년생 숙근초로 동일 토양에서 3~5년간 재배하여야 하는 생육특성이 있다. 인삼 포장은 재배산지에 따라 해가림의 투광량이 다를 뿐 아니라 토양내의 염류농도 및 무기성분의 과다 및 결핍 등으로 생리장해가 유발되고, 재배기간중 각종 병해로부터 피해를 입고 있다.¹⁾ 특히 인삼뿌리의 표피에 황갈색 또는 적갈색의 반

점이 원형 또는 불규칙적인 모양으로 나타나서 전체 뿌리로 확대되는 적변인삼(rusty-root)의 발생은 수삼의 품질을 저하시켜 재배농가에 막대한 피해를 주고 있을 뿐 만 아니라 홍삼을 제조시 표피가 흑갈색으로 되고 잔류물이 생기는 옹피 홍삼이 생겨 홍삼의 상품 가치 또한 떨어진다.²⁾

이러한 적변현상은 토양이 과습하거나,³⁾ 배수가 불량한곳,⁴⁾ 미부숙 유기질거름을 사용 하였을 때⁵⁾, 토양의 물리성이 나쁠 때,³⁾ 예정지 관리미비³⁾ 등 근권의 불량한 환경스트레스에 의해 발생하는 생리 장애로 추측되고 있으나,^{6,7,8)} 아직도 적변현상의 정확한 원인에 대해서는 명확하게 구명되지 않고 있는 실정이다.

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 031-419-0577 (팩스) 031-419-9434
(E-mail) sslee@gtr.kgtri.re.kr

최근에 식물이 각종 환경스트레스에 노출되면 생체내 산소가 유해한 활성산소종(reactive oxygen species: ROS)으로 변하며, 이들 ROS는 생체내에서 단백질, 지질, DNA 등에 손상을 주어 노화와 질병을 촉진하고 심할 경우는 세포를 고사하게 하는 것으로 알려져 있다.^{9,10} 식물은 ROS에 의한 산화적 스트레스(oxidative stress)로부터 자신을 보호하기 위하여 superoxide dismutase(SOD), peroxidase(POD), catalase(CAT) 등의 항산화효소와 ascorbic acid(AsA), glutathione(GSH) 등의 다양한 종류의 저분자 항산화물질을 생산한다.^{9,11,12}

본 시험에서는 적변인삼의 유발도 토양 환경스트레스에 의해 발생하는 것으로 추정하여, 인삼의 적변현상 유발 원인물질을 구명하기 위한 일환으로, 인삼의 적변현상과 항산화활성과의 관계를 구명하고자 적변인삼뿌리와 건전한 인삼뿌리의 각 조직별 SOD, POD, CAT의 활성과 대표적인 저분자 항산화물질인 ascorbate와 glutathione의 함량을 비교하였다.

재료 및 방법

1. 식물재료

시료의 균일성을 유지하기 위하여 고려인삼인 자경종계에서 순계 분리 육성하여 한국인삼연구원에서 보유중인 다401계통을 사용하였으며, 시료 채취는 한국인삼연구원 음성시험장 포장에서 재배한 6년생 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)을 1999년 10월 19일 채굴하였다. 적변의 구분은 뿌리중에서 표피가 유백색인 건전한 인삼뿌리(healthy root), 표피의 적변면적이 75% 이상인 적변 인삼뿌리(rusty root), 그리고 적변화가 진행되고 있는 표피의 적변면적이 11~24% 정도되는 약간 적변된 인삼뿌리(lightly rusty root)로 선별한 다음, 각각 표피조직(epidermis), 피층조직(cortex), 중심주조직(stele)으로 구분하여 사용하였다.

2. 항산화효소 활성

항산화효소 활성은 건전뿌리와 적변뿌리의 표피조직과 피층조직을 사용하여 분석하였다. 효소의 활성을 조사하기 위하여 각 인삼조직의 생중량 1 g을 막자사발에 넣고 액체질소와 함께 완전히 파쇄한 후, 시료무게의 3배(v/w)의 50 mM 인산완충액(pH 7.0)를 넣어 단백질을 충분히 추출하였다. 추출액을 12,000 rpm에서 30 분간 원심분리하여 얻어진 상층액을 조효소액(crude extract)으로 하여 실험에 이용하였다. Superoxide dismutase(SOD) 활성은 xanthine oxidase(XOD)와 cytochrome c를 이용한 McCord와 Fridovich¹³의 방법에 따라 측정하였다. Peroxidase(POD) 활성은 pyrogallol을 기질로 사용하여 420 nm에서 20초간의 흡광도 변화로 측정하였

다.¹⁴ Catalase(CAT) 활성은 기질인 H₂O₂의 감소량을 측정하는 방법으로 사용하였다.¹⁵ 단백질 정량은 bovine serum albumin(BSA)을 표준단백질로 하여 Bio-Rad사의 시약을 사용하여 검량곡선을 작성하여 구하였다.¹⁶

3. DPPH 자유라디칼 포착활성

저분자 항산화 활성은 건전뿌리, 약간적변뿌리, 적변뿌리의 표피조직, 피층조직, 중심주조직을 사용하여 분석하였다. 저분자 활성물질의 추출은 각 조직 생중량 1 g을 액체질소에서 파쇄한 후 메탄올 1 ml을 넣은 후 4°C, 12,000 rpm에서 20 분간 원심 분리하였다. 상층액 300 mg의 추출물을 methanol 4 ml에 녹여 1.5×10⁻⁴ M DPPH radical 용액 1 ml와 30 분간 실온에서 반응 시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하는 Xiong 등의 방법¹⁷에 따라 DPPH(1,1 diphenyl-2-picryl-hydrazyl) 자유 라디칼 포착활성으로 조사하였다.

4. Ascorbate와 Glutathione 함량

Ascorbate와 glutathione은 각 인삼조직 생중량의 2배(v/w)의 62.5 mM meta-phosphoric acid(MPA)를 사용하여 유발에서 분쇄한 후, 4°C, 12,000 rpm에서 20 분간 원심분리하였다. Ascorbate는 Graham과 Annette의 방법¹⁸에 따라 상층액을 시료로 하여 HPLC방법으로 분석하였다. MPA 추출액을 0.5 μm FH-type Miltonpore filter로 여과하여 aminex HPX-87H 칼럼(300×7.8 mm, Bio-Rad사)을 사용하여 환원형 ascorbate 함량을 분석하였다. 용출액(4.5 mM 황산)의 유속은 0.5 ml/min였으며 UV 245 nm에서 화합물을 검출하였다. 산화형 ascorbate인 dehydroascorbate(DHA)는 MPA 추출액에 60 mM DTT를 1:1(v/v)로 첨가하여 상온에서 하루동안 반응시킨 후, 전체 ascorbate 함량을 구하고 여기에서 환원형 ascorbate의 양을 뺀 값으로 하였다.

Glutathione 함량은 glutathione reductase(GR)과 4-vinylpyridine를 이용한 Griffith¹⁹의 방법에 따라 측정하였다. 전체 glutathione 함량은 반응액 [5 mM EDTA, 0.6 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), 0.2 mM NADPH를 포함하는 100 mM 인산완충액(pH 7.5)] 3 ml가 첨가된 1 회용 큐벳에 시료 100 μl와 GR 10 unit(10 μl)를 넣고 혼합하여 412 nm에서 1 분간 반응시켜 흡광도 변화를 조사하여 GSH 표준 검량선으로부터 구하였다. 산화형 GSSG의 함량은 시료에 5 μl 4-vinylpyridine(95% 순도)을 첨가하여 10 분 동안 상온에서 반응시킨 후, 상기 반응액 3 ml와 혼합하여 전체 glutathione 함량분석과 같은 방법으로 측정하였다. GSH의 함량은 전체 glutathione 함량과 GSSG 함량의 차로써 산출하였다. 실험에 사용한 시약은 Sigma사로부터 구입하였다.

Table 1. The contents of protein and antioxidant enzymes in epidermis and cortex of healthy and rusty root

Rusty state of root	Part of root	Protein (mg/g fr. wt.)	SOD (units/mg protein)	POD (units/mg protein)	CAT (units/mg protein)
Healthy	Epidermis	5.1 ± 2.5	36.6 ± 3.4	49.2 ± 7.5	0.54 ± 0.11
	Cortex	9.1 ± 2.0	40.7 ± 7.2	25.9 ± 7.0	0.27 ± 0.13
Rusty	Epidermis	5.5 ± 0.9	126.9 ± 36.3	40.2 ± 9.3	0.89 ± 0.88
	Cortex	10.1 ± 2.7	79.6 ± 15.0	18.0 ± 2.3	0.44 ± 0.10

Mean ± standard error. SOD : superoxide dismutase, POD : peroxidase, CAT : catalase.

결과 및 고찰

1. 항산화효소 활성

Table 1은 건전뿌리와 적변뿌리의 표피조직(epidermis)과 피층조직(cortex)의 단백질 함량, 항산화효소 활성을 비교한 것이다. 단백질 함량(mg/g fr. wt.)은 적변뿌리의 표피조직과 피층조직에서 건전뿌리보다 모두 약 1.1배 높았다. SOD의 활성은 적변뿌리의 표피조직이 건전뿌리보다 약 3.5배 높았으며, 피층조직에서는 약 2.0배가 높았다. CAT의 활성은 적변뿌리의 표피조직과 피층조직이 건전뿌리에 비해 모두 1.6배가 높았다. 그러나 POD의 활성은 오히려 적변뿌리의 표피조직과 피층조직에서 건전조직보다 각각 0.8배와 0.7배가 낮았다.

인삼 적변뿌리에서 SOD 활성이 약 3.5배 증가한 것은 적변화조직에서 과량으로 발생하는 superoxide anion radical 등에 의한 산화적인 스트레스를 극복하기 위하여 SOD를 과량으로 생산하는 것으로 사료된다. SOD 반응에 의해 생산되는 과산화수소는 POD 또는 CAT에 의해 안전한 물로 변환될 수 있는데, 적변뿌리에서 높은 SOD와 함께 CAT 활성이 약 1.6배 높은 것은 SOD의 반응산물인 과산화수소를 효율적으로 제거하기 위하여 생산되는 것으로 생각된다. POD 활성이 오히려 적변조직에서 약간 낮았는데 이에 대한 정확한 원인은 알 수 없지만, POD는 CAT와 달리 효소반응을 하기 위해서는 과산화수소 이외에 phenol 화합물 등 또 다른 기질로서 전자공여체가 필요로 하는 특징이 있다. 적변조직에는 POD 반응을 위한 전자공여체가 충분히 제공되지 않거나 인삼뿌리의 POD가 CAT에 비해 과산화수소에 대한 기질특이성이 낮을 수도 있을 것으로 생각되나, 자세한 연구가 요구된다. 실험결과에서 인삼뿌리의 적변현상과 항산화효소 특히 SOD의 활성과는 깊은 관계가 있음이 시사된다.

2. DPPH 자유라디칼 포착활성

건전뿌리, 약간 적변된뿌리, 적변뿌리의 표피조직, 피층조직, 중심주조직 추출물의 저분자 항산화활성을 조사하기 위하여 DPPH 자유라디칼 포착활성을 조사하였다. Fig. 1은 각

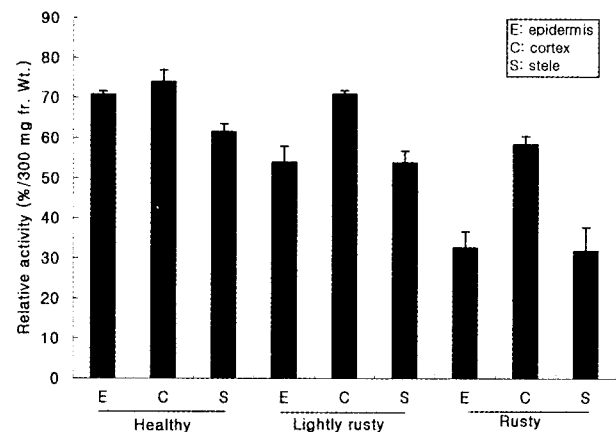


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity in epidermis, cortex and stele tissues of healthy and rusty roots of ginseng. Values are means ± S.E. of 3 replication plot.

조직 생중량 300 mg 추출물의 DPPH 자유라디칼 포착활성을 시료를 첨가하지 않았을 때의 OD 값에 대한 상대값으로 나타낸 것이다. Fig. 1에서 %값이 낮을수록 DPPH 자유라디칼 포착활성이 높은 것을 의미한다. 건전뿌리의 표피, 피층, 중심주조직의 값이 각각 70.6%, 73.9%, 61.5%인데 비해 적변뿌리에서는 각각 32.7%, 58.4%, 31.8%를 나타내어 적변뿌리에서 약 2배의 DPPH 자유라디칼 포착활성을 나타내었다. 약간 적변된 뿌리는 건전뿌리와 적변뿌리의 중간 정도 활성을 보였다. 이는 인삼의 적변화가 진행되는 과정에서 저분자 항산화활성물질이 증가되는 것을 시사한다. 천연에서 보고된 저분자 항산화물질에는 ascorbate, glutathione, α -tocopherol을 포함하여 많은 종류의 phenol계 화합물, flavonoid계 화합물 등이 있으며, 인삼에도 많은 종류의 항산화물질이 보고되어 있다.^{20,21)} 본 연구에서는 가장 대표적인 식물유래 항산화물질인 ascorbate와 glutathione의 함량을 건전뿌리, 약간적변된 뿌리, 적변뿌리의 각 부위별로 조사하였다.

3. Ascorbate와 glutathione의 함량

건전뿌리, 약간적변된 뿌리, 적변뿌리 사이의 전체 ascorbate 함량은 큰 변화가 없었으나, 적변화가 진행될수록 전체

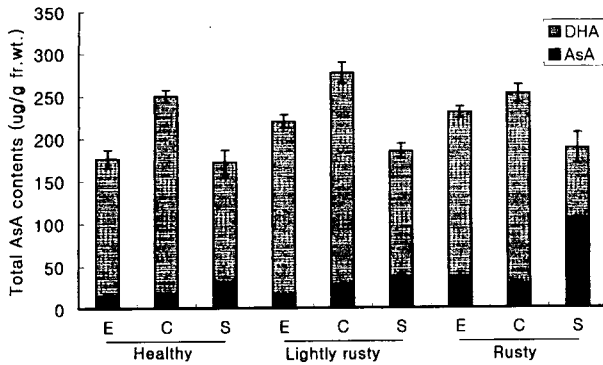


Fig. 2. The contents of ascorbate and dehydroascorbate in epidermis, cortex and stele tissues of healthy and rusty roots of ginseng.

Values are means \pm S.E. of 3 replication plot. DHA: oxidized dehydroascorbate, AsA: reduced ascorbate. E: epidermis, C: cortex, S: stele

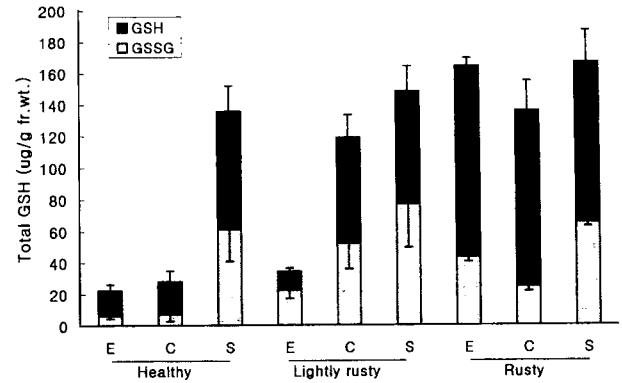


Fig. 3. The contents of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) in epidermis, cortex and stele tissues of healthy and rusty roots of ginseng.

Values are means \pm S.E. of 3 replication plot. GSH: reduced glutathione, GSSG: oxidized glutathione. E: epidermis, C: cortex, S: stele

ascorbate의 함량이 약간씩 증가되었다(Fig. 2). 표피조직에서 적변뿌리는 건전뿌리 보다 전체 ascorbate 함량이 약 1.3배 증가하였으며 특히 환원형 ascorbate의 함량은 2.4배, 산화형의 ascorbate인 DHA(oxidized dehydroascorbate)는 약 1.2배 증가하였다. 피층과 중심주 조직에서 약간적변된 뿌리와 적변뿌리는 건전뿌리 보다 전체 ascorbate 함량은 비슷하거나 조금 높았으나, 환원형 ascorbate인 AsA(reduced ascorbate)는 크게 증가하였다. 세부적으로 보면 AsA는 피층조직에서 건전뿌리에 비해 약간적변된뿌리는 약 1.6배, 적변뿌리는 약 1.8배 높았고, 중심주 조직에서는 건전뿌리에 비해 약간적변된 뿌리와 적변뿌리가 정상뿌리의 것보다 각각 1.2배와 3.5배 증가하였다.

환원형의 ascorbate는 DPPH 자유라디칼을 50% 포착하는 활성(IC₅₀)이 0.35 μ g으로 높은 항산화활성을 나타내는 물질이지만 산화형인 DHA는 활성이 매우 낮다. 인삼에서는 적변화가 진행되면서 전체 ascorbate 함량의 증가보다는 항산화활성을 갖는 환원형 ascorbate 함량의 증가가 더 크게 진행되어, 적변화에 따른 활성산소종을 제거하기 위하여 환원형 AsA가 중요하게 관여하고 있음이 시사되었다.

전체 glutathione 함량은 표피조직에서 적변뿌리는 건전뿌리에 비해 약 7.3배 증가하였으며, 약간적변된 뿌리에서도 약 1.5배 증가하였다(Fig. 3). 피층조직에서도 약간적변된 뿌리와 적변뿌리에서 건전뿌리에 비해 각각 4.2배와 4.8배로 크게 증가하였다. 중심주 조직에서는 건전뿌리, 약간적변된 뿌리와 적변뿌리 사이에는 큰 차이를 나타내지 않았다. 적변화에 대한 환원형 또는 산화형 glutathione(GSSG: oxidized glutathione)의 함량변화는 전체 glutathione의 변화와 유사하였다. 환원형 glutathione(GSH: reduced glutathione)의 변화

를 살펴보면 표피조직에서 약간적변된 뿌리와 적변뿌리가 건전뿌리에 비해 각각 3.5배와 6.7배 증가하였고, 피층조직에서는 약간적변된 뿌리와 적변뿌리에서 건전뿌리 보다 각각 3.3배와 7.1배 증가하였다. 중심주 조직에서는 약간적변된 뿌리와 적변뿌리가 건전뿌리에 비해 각각 1.1배와 1.2배로 약간 증가하였다. 뿌리의 적변화가 심해짐에 따라 glutathione의 함량이 표피조직과 피층조직에서 현저히 높았고, 중심주조직에서는 큰 차이를 나타내지 않았다. 그러나 흥미롭게도 적변화가 심해짐에 따라 ascorbate는 중심주조직에서 크게 증가한 것과는 대조적이다.

식물의 항산화기구는 매우 복잡하지만, ascorbate-glutathione pathway가 가장 중요한 항산화기구로 인정되고 있다.¹⁰⁾ Ascorbate와 glutathione은 이 pathway에 가장 중요한 구성성분일 뿐 아니라 다양한 생리작용을 지닌 활성물질이다. 본실험에서 인삼적변조직에서 SOD 활성, 환원형 ascorbate 함량과 glutathione 함량이 크게 증가한 것은 아직 인삼 적변화의 정확한 원인은 밝혀져 있지 않지만, 어떤 외부스트레스에 의해 생체내에서 과다하게 발생하는 ROS에 의한 산화적인 스트레스를 극복하기 위하여 항산화물질이 많이 생성되는 것으로 생각된다. 일반적으로 외부스트레스를 받으면 생체는 독성의 ROS가 과다하게 발생되며 이들은 생체조직을 파괴하여 질병을 유발하고 노화를 촉진하며 심할 경우는 세포를 고사하게 한다. 외부 스트레스에는 병원균을 포함한 생물학적인 스트레스와 UV, 영양결핍 등과 같은 비생물학적인 스트레스로 대별된다. 인삼 적변화에는 뿌리에서 철이온 흡수와 관련된 흡수기구의 문제,⁸⁾ 폐놀화합물 등이 관여한다는 보고²¹⁾가 있으나 아직 확실한 원인은 모르는 실정이다. 본 연구에서 적변인삼 뿌리에서 항산화 활성이 높았고,

또한 적변인삼 뿌리내에서도 직접적으로 적변이 유발되는 표피부위를 중심으로 SOD 활성, 환원형 ascorbate와 glutathione의 함량이 높아, 이들 물질이 포장상태에서 적변이 유발되는 토양의 과습, 유해가스발생 등 환경스트레스 조건과 밀접한 관련이 있음을 확인할 수 있었다. 앞으로 이들 물질이 인삼적변을 유발하는 기작에 관해서는 보다 상세한 연구가 필요하다고 생각된다.

요 약

적변인삼의 원인 물질을 구명코저 인삼뿌리의 적변현상과 항산화 활성과의 상관관계를 조사하기 위하여 적변뿌리와 건전뿌리의 각 부위별 항산화 활성을 조사하였다. 적변삼의 표피와 피층조직의 superoxide dismutase(SOD) 활성(units/mg protein)은 각각 126.9와 79.6으로 정상뿌리에 비해 각각 3.5배, 2.0배 높았다. 적변뿌리의 catalase 활성은 약 1.6배 높았으나, peroxidase 활성은 오히려 약간 낮았다. 적변뿌리 각 조직의 DPPH 자유라디칼 포착활성은 정상뿌리에 비해 약 2.0배 높았다. 정상뿌리의 ascorbate 함량은 조직에 따라 약간의 차이를 나타내었지만(166~240 µg/g fr. wt.), 산화형 dehydroascorbate(DHA) 함량이 전체 ascorbate 함량의 약 97~79%를 차지하였다. 적변뿌리의 전체 ascorbate함량은 정상뿌리와 비슷하였지만 환원형 ascorbate의 함량은 조직에 따라 다르지만 정상뿌리에 비해 3.5~7.5배 높았다. 적변뿌리의 표피조직, 피층조직, 중심주 조직의 전체 glutathione 함량은 정상조직에 비해 각각 7.3배, 4.8배, 1.2배 높았다. 적변화에 따른 환원형 glutathione(GSH)과 산화형 glutathione(GSSG)의 함량비는 전체 glutathione 함량변화와 비슷하였다. 이상의 결과는 인삼의 적변조직은 어떤 외부스트레스에 의해 과도하게 발생하는 활성산소종을 제거하기 위하여 SOD 활성, 환원형 ascorbate 함량, 환원형 glutathione 함량이 크게 증가하는 것으로 사료된다.

인용문헌

1. 박명규 : 최신고려인삼(재배편), 천일인쇄사, 대전, p. 92 (1996).

2. 김명수, 이종화, 이태수, 백남인 : 인삼연구보고서(재배분야), 한국인삼연초연구소, p. 1 (1984).
3. 목성균, 반유선, 천성기, 이태수 : 인삼연구보고서(재배분야), 한국인삼연초연구원, p. 84(1996).
4. 목성균, 반유선, 천성기, 이태수, 이성식 : 인삼연구보고서(재배분야), 한국인삼연초연구원, p. 51 (1995).
5. 김명수, 이종화, 홍순근, 이태수, 백남인, 한종구 : 인삼연구보고서(재배분야), 한국인삼연초연구소, p. 785 (1985).
6. Chung, Y. R., Ohh, S. H., Lee, I. H. and Park, C. S. : *Korean J Ginseng Sci.* **9**, 24 (1985).
7. Wang, Y., Li, Z., Sun, Y., Guo, S., Tian, S. and Liu, Z. : *Korean J Ginseng Sci.* **21**, 69 (1997).
8. Yang, D. C., Kim, Y. H., Yun, K. Y., Lee, S. S., Kwon, J. N. and Kang, H. M. : *Korean J Ginseng Sci.* **21**, 91 (1997).
9. Alscher, R. G. and Hess, J. L. : Antioxidants in higher plants. CRC Press, Boca Raton, FL (1993).
10. Asada, K. : *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**, 601 (1999).
11. Inze, D. and Van Montagu, M. : *Curr Opin Biotechnol* **6**, 153 (1995).
12. Noctor, G. : *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* **49**, 249 (1998).
13. McCord, J. M. and Fridovich, I. : *J. Biol Chem* **244**, 6049 (1969).
14. Kwak, S. S., Kim, S. K., Lee, M. S., Jung, K. H., Park, I. H. and Liu, J. R. : *Phytochemistry* **39**, 981 (1995).
15. Aebi, H. : *Methods Enzymol* **105**, 121 (1984).
16. Bradford, M. M. : *Anal Biochem* **72**, 248 (1976).
17. Xiong, Q., Kadota, S., Tadota, T. and Mamba, T. : *Biol Pharm Bull* **19**, 1580 (1996).
18. Graham, W. D. and Annette, D. : *J. Chromatogr.* **594**, 187 (1992).
19. Griffith, O. W. : *Anal Biochem* **106**, 207 (1980).
20. Han, B. H., Park, M. H. and Han, Y. N. : *Korean Biochem. J.* **18**, 337 (1985).
21. Lee, T. S., Mok, S. K., Cheon, S. K., Choi, K. J. and Choe, J. : *Korean J Ginseng Sci.* **19**, 77 (1995).