

인삼(*Panax ginseng*)에 존재하는 Calcium Oxalate 결정체의 분포, 유형 및 미세구조

이상욱 · 권우생* · 정병갑[#]

고신대학교 생명과학과, *KT&G 중앙연구원
(2002년 11월 9일 접수)

Occurrence, Type and Ultrastructure of Calcium Oxalate Crystals in *Panax ginseng*

Sang-Wook Lee, Woo-Saeng Kwon* and Byung-Kap Jeong[#]

Dept. of Biological Science, Kosin University, Pusan 606-701, Korea

*KT&G Central Research Institute, Suwon 440-600, Korea

(Received November 9, 2002)

Abstract : Crystalline calcium oxalate occur throughout nearly all plants species in five major forms; styloids, druses, raphids, prisms and sands. These crystals are known to be distributed in specific tissue such as cortex, xylem, phloem, cambium and epidermis. This research was undertaken to identify the occurrence, type, location and ultrastructure of druse crystals in *Panax ginseng*. *In situ* visualization, conventional light microscopy, histochemistry and scanning electron microscopy were applied for these purposes. Druse crystals in ginseng were identified as calcium oxalate by silver nitrate-rubeanic acid histochemistry. Calcium oxalate crystals are observed in nearly all plant organs such as leaf, petiole, peduncle, stem, rhizome, tap root and lateral root except fine root. Most frequent observation of crystals in the leaf and rhizomes were noticed. Three different types of calcium oxalate druse crystals were identified by scanning electron microscopy.

Key words : *Panax ginseng*, calcium oxalate, druse crystal, histochemistry, scanning electron microscopy

서 론

결정체는 식물체 내에서 형성되는 다양한 후형질 중의 한 종류로서^{1,2)} 분포, 형태, 크기, 성분 등이 다양한 것으로 알려져 왔으며,²⁻⁵⁾ 특정 조직이나 세포에 존재하는 것으로 알려져 왔다.^{3,6,7)} 결정체의 성분 및 형태 등은 식물에 따라 다르게 나타나므로 분류형질로 이용되기도 한다.⁸⁾ 식물에서 관찰되는 대부분의 결정체는 Ca^{2+} 과 oxalic acid가 결합하여 생성된 calcium oxalate이지만,^{3,7,9,10)} calcium sulfate, calcium phosphate, calcium carbonate, calcium citrate, calcium malate 등 다양한 성분으로 구성된 결정체도 알려져 있다. 또한 단자엽 식물의 잎에서는 silicon dioxide 성분의 결정체인 규산체가, 고무나무 잎의 표피에는 calcium carbonate 결정체인 종유체

가 존재하는 것으로 밝혀져 있다.^{7,10-12)}

Calcium oxalate 결정체는 형태에 따라 druse, raphide, styloids, prism, crystal sand 등 5가지 유형으로 구분되는데^{2,10,13)} 자작나무과의 *Corylus avellana*, 은행나무과의 *Ginkgo biloba* 등에는 druse가, 백합과의 *Aspidistra elatior*, 마과의 *Dioscorea alata*, 천남성과의 식물 등에는 raphide가, 대극과의 *Tragia ramosa*, 마편초과의 *Gmelina arborea*, 봇꽃과 등의 식물에는 styloid가, 국화과의 *Helianthus annuus*, 콩과의 *Glycine max* 등의 식물에는 prism형의 결정체가, 지치과의 *Cordia subcordata* 에서는 crystal sand가 존재하는 것으로 보고되었다.^{3,7,10)}

Calcium oxalate 결정체가 형성되는 원인에 대해서는 잘 알려지지 않았지만,^{6,13)} 그 기능에 대하여는 초식동물로부터 자신을 방어하기 위한 기작,^{13,14)} 조직의 구조적 지지작용,¹⁵⁾ 세포내에 생성된 Ca^{2+} 의 농도조절,⁶⁾ 대사결과 과량 생성된 oxalic acid의 독성 방지,³⁾ 식물체내의 중금속을 배출하기 위

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 051-400-2322; (팩스) 051-403-5911
(E-mail) bkjeong@kosin.ac.kr

한 기작,¹⁶⁾ 세포막의 포도당 투과 조절¹⁷⁾ 등 다양한 기능을 하는 것으로 알려져 왔다. 그러나 인삼 결정체에 관해서는 중국약전에 박벽세포(薄壁細胞)에 결정체가 존재한다는 기록¹⁸⁾ 외에는 보고된 바 없다. 따라서 본 연구는 인삼에 존재하는 것으로 알려진 calcium oxalate 결정체가 어떠한 유형이며, 성분은 무엇인지, 어떤 기관에 어떻게 분포하며 미세구조는 어떠한지 등을 밝히고자 광학 및 전자 현미경적 방법을 사용하여 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에 사용된 재료는 4년생 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)으로 7월에 밭에서 직접 채취하여 사용하였다.

2. 광학현미경적 방법

세포내의 결정체 위치는 전자현미경적 방법을 응용한 광학현미경 관찰을 통하여 확인하였다. 즉 봄통뿌리, 지근, 세근, 뇌두, 화경, 소엽, 소엽병, 장엽병, 꽃대 등의 기관을(Fig. 1) 1 mm 크기로 절취하여 100 mM phosphate buffer(pH 6.8)로 제조한 2% glutaraldehyde(v/v) 용액에 4°C에서 2시간 동안 전고정하고 동일 buffer로 세척하였다. 이 시료를 K₄Fe(CN)₆ 가 0.8% 되도록 첨가한 2% OsO₄ 용액에 4°C에서 2시간 후 고정하고 동일 방법으로 세척하여 acetone 농도 상승순으로 탈수하고 Spurr's low viscosity epoxy resin으로 포매하였다. Leica Ultracut R형 ultramicrotome을 사용하여 1-2 μm 두께의 절편을 제작하여 methylene blue-basic fuchsin으로 이 중 염색한 후 광학현미경(Olympus BX 40)으로 관찰하고 Olympus PM-10AK형 카메라로 촬영하였다.

2. In situ visualization 및 cryomicrotomy

조직내의 결정체 위치를 확인하기 위해서 잎을 5×5 mm 크기로 절취하여 95% ethanol에 넣고 50°C에서 2시간 처리한 후 증류수로 세척하였고, 10% NaOH로 50°C에서 1시간 처리한 다음 동일방법으로 세척하였다. 10% NaOH와 10% NaClO가 1:1로 혼합된 용액을 사용하여 실온에서 20분간 처리하여 투명화 시킨 후 광학현미경으로 관찰하였다.

또한 봄통뿌리, 측근, 뇌두는 통상적인 광학 현미경적 방법으로 재료를 처리 할 경우 조직이 쉽게 부스러지기 때문에 냉동 절편을 제작하여 관찰하였다. 즉 시료를 2% glutaraldehyde에 2시간 고정한 후 증류수로 세척하고, 10% glycerin 용액으로 35°C에서 8시간 처리한 후 O.C.T compound로 포매하여 Leica CM 1900형 cryomicrotome으로 -30°C에서 20-

30 μm 두께의 절편을 제작하여 염색하지 않고 관찰하였다.

3. 결정체의 순수분리 및 조직화학적 성분 분석

인삼 봄통뿌리를 1 mm³ 크기로 자른 후 macerozyme R10, cellulase, pectolyase가 혼합된 용액에 넣고 37°C shaking incubator에서 12시간 처리하여 세포벽을 용해시키고 결정체를 세포에서 노출시킨 다음 sucrose density gradient centrifugation 방법으로 순수분리 하였다. 이 결정체의 성분을 분석하기 위해서 Yasue의 방법¹⁹⁾에 따라 5% acetic acid로 10분간 처리하고 증류수로 세척한 다음 5% silver nitrate로 20분 동안 처리한 후 동일 방법으로 세척하였다. 결정체를 alcohol에 포화시킨 rubeanic acid에 암모니아수를 소량 첨가한 용액으로 조직화학적 반응을 실시한 후 50% alcohol과 증류수로 세척하여 관찰하였다.

4. 주사전자현미경적 방법

Sucrose density gradient centrifugation 방법으로 순수 분리한 결정체를 증류수로 세척한 다음 공기 중에서 건조시킨 후 Hitachi E-1030 ion sputter로 약 50 nm 두께로 platinum coating하여 Hitachi S-4200형 주사전자현미경으로 15Kv 하에서 관찰하였다.

결과 및 고찰

Calcium oxalate 결정체는 4년생 인삼의 꽃대, 잎, 소엽병, 장엽병, 줄기, 뇌두, 봄통뿌리, 지근 등 대부분의 조직에서 관찰되었으나 세근에서는 전혀 관찰 할 수 없었다(Table 1). 결정체의 출현 빈도는 잎에서 가장 높게 나타났으며 장엽병, 꽃대, 지근 등에서는 상대적으로 낮게 나타났다. 인삼에서 관찰되는 결정체는 모두 calcium oxalate 결정체의 대표적인 유형인 druse 형태로서 크기는 약 20-40 μm였다. *Nymphaea*, *Psychotria* 등 일부 식물에서는 200 μm 이상의 큰 결정체가 보고되었으나³⁾ 인삼의 결정체는 20-40 μm로서 대부분의 식물에서 관찰되는 calcium oxalate 결정체 크기인 40-50 μm^{10,11)} 보다는 작은 편이었다. 특히 줄기에서 가장 큰 크기의 결정체가 관찰된 반면 줄기와 연속적으로 연결된 기관인 꽃대에서 가장 작은 결정체가 관찰된 점이 특이하였다.

화경과 소엽병에서는 결정체가 유관속 안쪽에 위치한 유세포에서 드물게 관찰되었는데(Fig. 2a, 2d). 이 두 기관은 측근과 함께 인삼의 영양기관 중에서 결정체 출현 빈도가 가장 낮았다(Table 1). 장엽병(Fig. 2c)에서는 유관속 양쪽의 모든 유세포에 분포하였으며 관찰빈도는 화경과 줄기보다 높았다. 또한 봄통뿌리에서는 지질분비관²⁰⁾ 주변에서 다수의 결정체

Table 1. Distribution, frequency and size of calcium oxalate crystals of *Panax ginseng*.

Organ	Localization	Frequency	Size (μm)
Leaflet	Mesophyll parenchyma	+++++	24.6(± 4.9)
Petiole	Vascular parenchyma	++	36.7(± 8.0)
Rachis	Vascular parenchyma	+	38.5(± 6.9)
Peduncle	Vascular parenchyma	+	20.8(± 3.8)
Stem	Vascular parenchyma, pith	++	39.4(± 7.3)
Rhizome	Cortex, pith, cambial parenchyma	++++	36.8(± 8.2)
Tap Root	Cortex, pith, cambial parenchyma	+++	35.7(± 9.4)
Lateral Root	cortex, cambial parenchyma	+	34.2(± 8.9)
Fine Root	-	-	-

가 관찰되었다(Fig. 3a, 3b). Idioblast 내에는 지질, 탄수화물, 단백질 및 Ca^{++} 및 glycolate oxidase가 함유되어 있으나, *Lenina minor*의 경우는 이효소가 결여되어 있으므로 oxaloacetate에서 생성된 oxalate가 Ca^{++} 와 결합하여 결정체를 형성하는 것으로 알려져왔다.²¹⁾ 또한 idioblast 내에 다량 존재하는 isocitrate lyase는 lipid를 oxalic acid로 전환시키는 일련의 반응에 일부 관여 하므로써 oxalic acid가 결정체를 형성 할 수 있도록 하는 것으로 보고 되었다.²²⁾ 이러한 결과는 결정체 형성과 지질성분이 관련 있음을 보여주는 것이라 생각되는데, 인삼 몸통뿌리의 지질분비관 주변에서 calcium oxalate 결정체가 관찰되는 사실로 미루어 볼 때 결정체 형성과 지질대사가 관련이 있을 것으로 추정된다. 그러나 구체적

으로 어떠한 관련이 있는지에 대하여는 앞으로 더 연구되어야 할 것이다.

앞에서는 결정체가 엽육조직에서 다수 관찰되었다(Fig. 4c, 4d). 이러한 분포는 *Rhynchosia*, *Canavalia* 및 *Begonia*와 유사한 유형으로서⁷⁾ 유관속 주변을 따라서 분포하는 *Ipomoea batatas*(미발표결과)와는 다른 양상을 나타냈다. 엽육조직에 널리 산재하여 분포하는 calcium oxalate 결정체는 glycolate oxidase의 촉매작용에 의하여 glycolate와 glyoxylate로부터 반

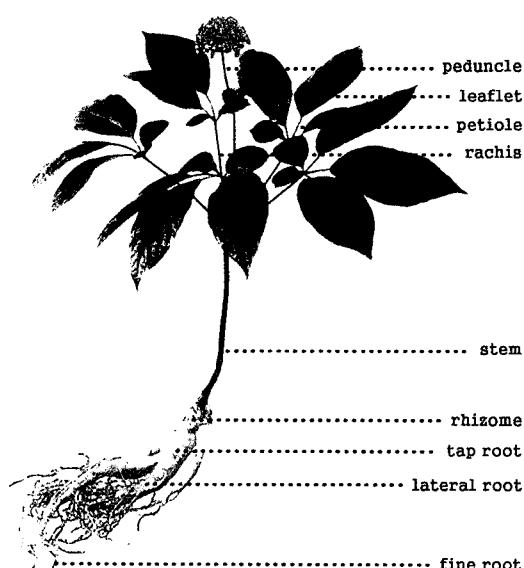


Fig. 1. Typical appearance of 4-years old ginseng plant used in this investigation. Every five slices of each organ from different individual plant were used for light microscopy.

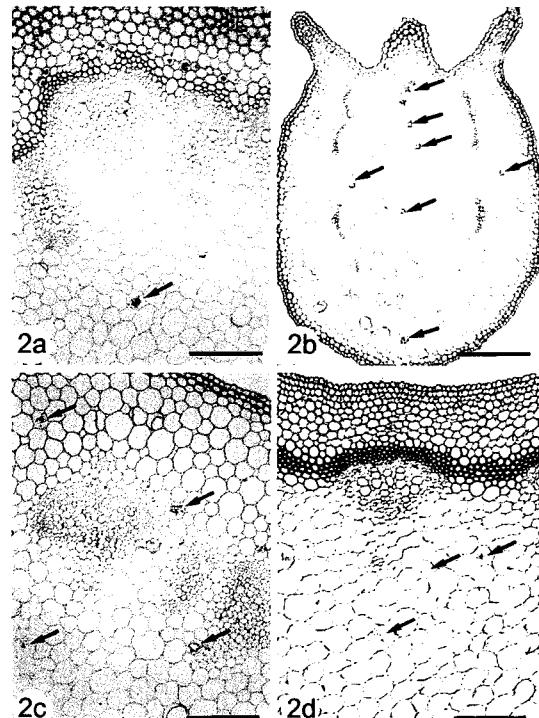


Fig. 2. Photomicrographs of semisections stained with methylene blue and basic fuchsin show unstained crystals (arrows) in different tissues from organ to organ. Most of the crystals are observed in parenchyma cells located inner side of each organ. 2a. peduncle bar=230 μm , 2b. petiole bar=410 μm , 2c. rachis bar=230 μm , 2d. stem bar=230 μm

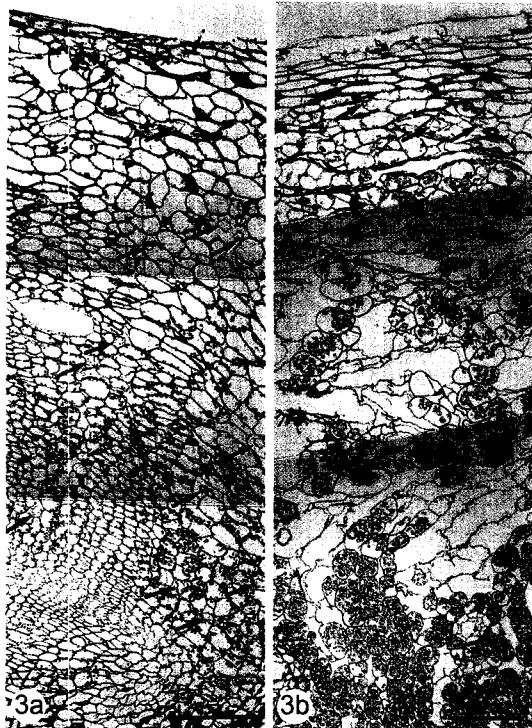


Fig. 3. Photomicrographs of rhizome(3a) and tap root(3b). Calcium oxalate crystals (arrows) are homogenously localized from subepidermis to inner parenchyma cells in rhizome compared to partial localization in the subepidermal cortex in main root. bar=115 μm . 3a: rhizome. 3b: tap root.

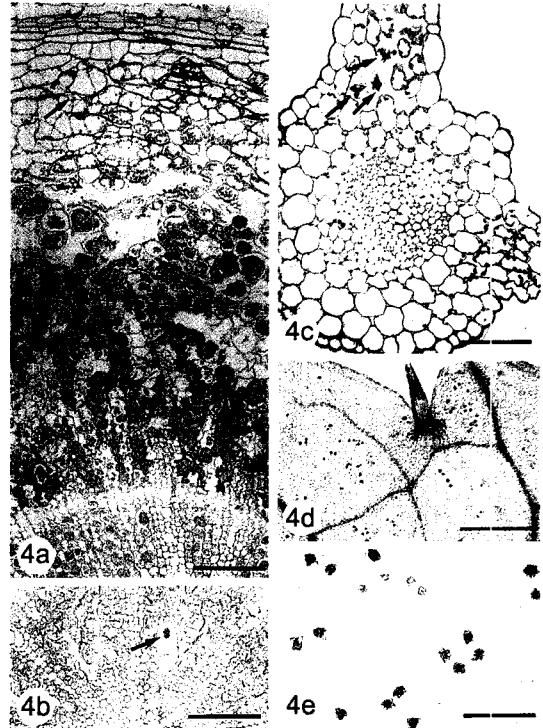


Fig. 4. Photomicrographs of cross section of the lateral root(4a, 4b) and leaflet(4c), and surface view of the cleared leaf(4d, 4e). Only a few crystals are observed in lateral root, otherwise a lot of randomly distributed crystals in the leaf(4c). 4a: lateral root. bar=115 μm , 4b: lateral root. bar=520 μm , 4c: leaflet. bar=115 μm , 4d: leaflet. bar=520 μm , 4e: high magnification of Fig. 4d. bar=115 μm .

들어진 oxalic acid가 Ca^{2+} 와 결합함으로서 형성된다고 보고 된 바 있는데,²¹⁾ 인삼 잎에서도 엽육조직에 결정체가 분포하는 것으로 미루어 보아 이러한 과정에 의해 결정체가 형성되는 것으로 생각된다. 인삼의 뿌리에서는 결정체가 몸통뿌리와 지근의 표피 아래층과 수에서 관찰되었으며 형성층부근에서는 거의 관찰 할 수 없었다(Fig. 3b, 4a, 4b, 5d-5f). 또한 뇌두와 몸통뿌리에서는 표피 가까이에 위치한 피층에서 가장 많은 수가 관찰되었으며 중심쪽의 수에 가까울수록 관찰빈도가 낮아졌다(Fig. 5a-5f). 특히 전분을 함유한 세포에서는 결정체가 전혀 관찰되지 않았고 모든 결정체가 전분을 함유하지 않은 세포에서 관찰된 점이 특이하였다. 인삼의 결정체는 잎을 제외하고는 지상부와 지하부가 연결되는 뇌두에서 가장 많이 관찰되었다(Fig. 3a, 5a-5c). 뇌두는 지상부가 사멸해도 다음과 해 또 다른 지상부를 형성하는 분열조직이 발달하는 부위로서, 몸통뿌리와 지근에서 관찰되었던 결정체 분포와는 달리 전체 조직에 골고루 산재하여 분포하였다(Fig. 3a). 뇌두의 세포들은 몸통뿌리나 지근에 비하여 전분을 함유한 세포가 많지 않았는데, 이러한 조직학적 특징으로 뇌두에는 몸통뿌리나 지근의 세포와 달리 많은 결정체가 함유될 수 있다고 사료된다.

한방에서 인삼을 약재로 사용할 경우 뇌두를 제거하고 사용하고 있는 점은 뇌두에 다량의 calcium oxalate 결정체가 존재하는 것도 한가지 이유로 생각되며, 이는 약리학적으로 calcium oxalate의 성분이 위산과 반응하여 oxalic acid를 생성할 수 있기 때문에 이로 인해서 일어날 수 있는 부작용을 최소화하기 위한 목적이 아닌가 사료된다.

인삼에서 결정체 분포는 특이한 양상을 나타낸다고 할 수 있다. 즉 지상부의 잎에 가장 많은 결정체가 존재하며 소엽병, 장엽병의 순으로 그 수가 감소하다가 지하부의 뇌두에서 갑자기 증가하며 몸통뿌리, 지근, 세근으로 갈수록 다시 줄어드는 것이다. 이러한 결과는 유사한 조직내에서는 결정체 형성을 위한 물질이 국소적으로 이동하기 때문이 아닌가 생각된다. 즉, 뿌리에서의 결정체 형성은 토양으로부터 흡수한 염에 의한 환경적 요인과 세포내 생리학적 요인의 복합적인 결과로 나타나는 현상²³⁾이라 사료되지만 확인을 위해서는 이에 대한 연구가 수반되어야 할 것이다. Calcium oxalate 결정체는 silver nitrate-rubeanic acid를 사용한 조직화학적 실험을 실시하면 무색에서 흑갈색으로 변한다고 알려졌는데¹⁹⁾, 순수분리

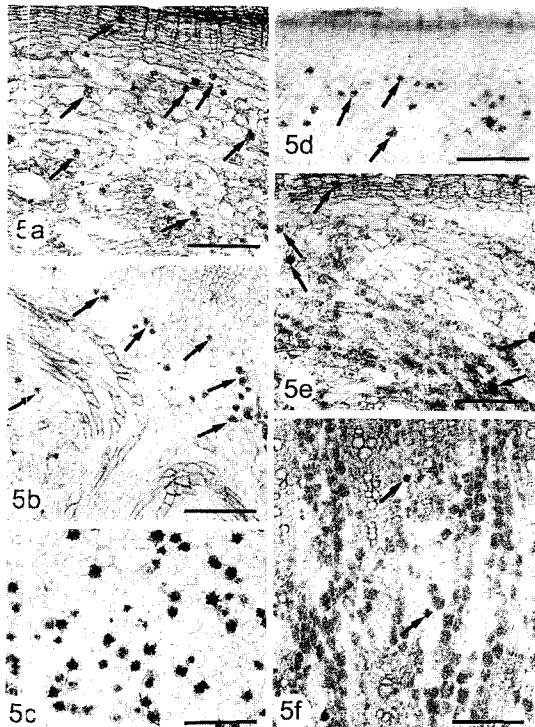


Fig. 5. Thick cross sections of rhizome (5a-5c) and root (5d-5f) by cryomicrotomy show lots of crystals in all part of those organs. Note high quantity of the crystals and low density of starch grains in rhizome and vice versa in root. bar=285 μm . 5a: rhizome. 5b: rhizome. 5c: rhizome. 5d: tap root. 5e: lateral root. 5f: lateral root.

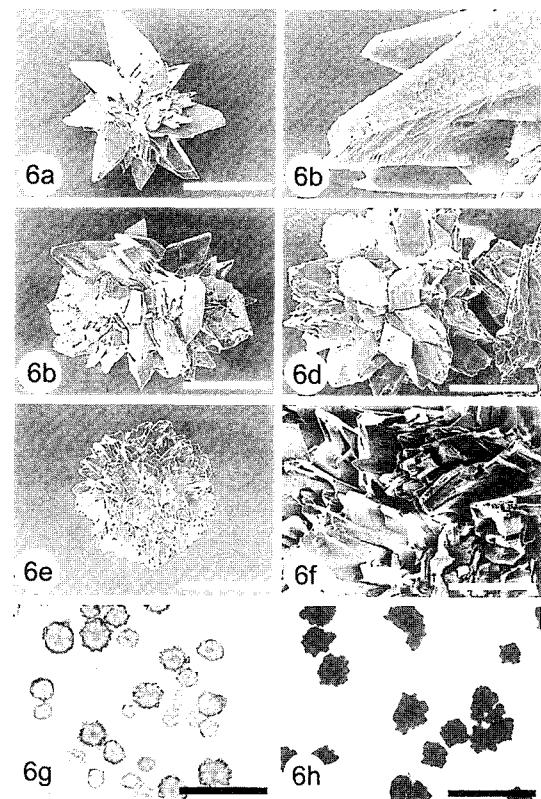


Fig. 6. Scanning electron micrographs(6a-6f), bright field light micrograph(6g) and histochemically identified micrograph (6h) of crystals isolated by enzymatic digestion from tap root. 6a: bar=33.3 μm , 6b: bar=2.2 μm , 6c: bar=25.6 μm , 6d: bar=13.3 μm , 6e: bar=16.6 μm , 6f: bar=7.4 μm , 6g: bar=115 μm , 6h: bar=115 μm .

된 인삼의 결정체를 동일방법으로 처리한 결과 정상적인 결정체(Fig. 6g)와 비교할 때 흑갈색으로 관찰되므로(Fig. 6h). 인삼 결정체의 성분은 calcium oxalate임이 확인되었다.

또한 calcium oxalate 결정체는 식물체의 당 투과와 관련이 있는 것으로 알려졌다. 즉 포도당이 원형질막을 투과하기 위해서는 ATP가 필요한데 과량의 Ca^{+2} 는 원형질막의 ATPase를 불활성화시켜서 당 투과를 억제하는 기능을 하기 때문에 과량의 Ca^{+2} 가 불용성인 calcium oxalate로 전환되어야만 Ca^{+2} 에 의한 당 투과가 일어날 수 있다고 알려져왔다.^{17,24)} 인삼 결정체의 미세구조를 주사 전자현미경으로 관찰한 결과 결정체는 삼각뿔 형태의 결정이 다수 모여서 형성된 유형(Fig. 6a-6b), 프리즘 형태의 소결정이 모여서 형성된 유형(Fig. 6c, 6d). 및 막은 판상의 소결정이 모여서 형성된 유형(Fig. 6e, 6f). 등 3 가지 형태로 구분 할 수 있었다. 인삼의 결정체는 순수분리 과정에서 쉽게 부서지는 특징이 있었는데, 이는 소결정의 결합이 불안정하거나, *Ipomoea batatas*에서와 같이 중심구조가 비정질상태(미발표결과) 때문인 것으로 추정된다. 또한 뽕나무 속에서 동일한 유형의 druse와 prism형 결정이 동시에 관찰

되고²⁵⁾ 포도속에서는 대칭형의 raphides 만이 존재하는 것으로 밝혀졌으며²⁶⁾ 담배와 토마토 잎에서는 pseudotetrahedron 형의 druse crystal 만이 관찰된 바²⁷⁾ 인삼에서 이와 같이 서로 다른 유형의 druse crystal이 관찰되는 것은 다른 식물에서는 잘 알려지지 않은³⁾ 독특한 양상이라고 할 수 있다.

요 약

본 연구는 인삼에 존재하는 calcium oxalate 결정체의 분포 위치, 형태 및 미세구조에 관하여 밝히고자 광학현미경, 조직화학적 방법 및 주사 전자현미경적 방법 등을 사용하여 연구하였다.

인삼의 결정체는 calcium oxalate의 성분으로 구성되며, 결정체는 몸통뿌리, 지근, 뇌두, 줄기, 장엽병, 소엽병, 꽃대 등 대부분의 기관에서 관찰되었다. 특히 지상부는 잎에서, 지하부는 뇌두에서 가장 많은 결정체가 관찰되었다. 인삼에 존재하는 결정체는 silver nitrate-rubanic acid를 사용한 조직화학

적 반응을 실시한 결과 calcium oxalate의 성분으로 확인되었다. 또한 주사전자현미경으로 관찰한 결과 삼각뿔 형태의 결정체가 다수 모여서 형성된 유형, 프리즘 형태의 소결정이 모여서 형성된 유형 및 얇은 판상의 소결정이 모여서 형성된 유형 등 3가지 형태로 구분 할 수 있었다.

감사의 글

본 연구의 주사 전자현미경적 관찰은 기초 과학 지원 연구원 부산 분소의 Hitachi S-4200형 Scanning Electron Microscope를 사용하여 이루어 졌으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Gunning, B. E. S. and Steer, M. W. : *The Study of Plant Structure*, Edward Arnold Ltd., London, p. 37 (1975).
- Metcalfe, C. R. : *Anatomy of Dicotyledons* 2nd. ed., Pergamon Press, Oxford, p. 63 (1983).
- Franceschi, V. R. and Horner Jr, H. T. : *Bot. Rev.* **46**, 361 (1980).
- Frey-Wyssling, A. : *Am. J. Bot.* **68**(1), 130 (1981).
- Lersten, N. R. : *Bot. Rev.* **49**, 233 (1983).
- Nakata, P. A. and McConn, M. M. : *Plant Physiol.* **124**(3), 1097 (2000).
- Horner Jr, H. T. and Zindler-Frank, E. : *Can. J. Bot.* **60**, 1021 (1981).
- Horner, H. T. and Weitmoyer, R. E. : *J. Cell Sci II*, 339 (1972).
- Pentecost, A. : *Int. Rev. Cytol.* **62**, 1 (1980).
- Mauseth, J. D. : *Plant Anatomy*, Benjamin Cummings, New York, p. 23 (1988).
- Kim, W. K., Park, H. D. and Jeong, B. K. : *Plant Morphology and Anatomy*, Academy Press, Seoul, p. 93 (1993).
- Fahn, A. : *Plant Anatomy*, Pergamon Press, Oxford, p. 23 (1990).
- Doaigey A. R. : *Am. J. Bot.* **78**(12), 1608 (1991).
- Arnott H. J. and Webb M. A. : *Int. J. Plant Sci.* **161**(1), 133 (2000).
- Finley, D. S. : *Revista de Biología Tropical*. **47**, 27 (1999).
- Choi, Y. E., Harada, E., Wada, M., Tsuboi, H., Morita, M., Kusano, T., and Sano H. : *Planta*. **213**, 45 (2001).
- Leonard, R. T. and Hodges T. K. : *The Plasmamembrane*, HP Publishing Co. Inc., New York, p. 163 (1980).
- Pharmacopia Commission of PRC. : *The Pharmacopia of China Vol. I*, Chemical Industry Press, Beijing, p. 360 (1997).
- Yasue, T. : *Acta Histochem Cytochem*, **2**, 83 (1969).
- Kim W. K. and Kim E. S. : *Korean J. Electron Microscopy* **10**, 77 (1980).
- Li, X. and Franceschi, V. R. : *Eur. J. Cell Bio.* **51**, 9 (1990).
- Kausch A. P. and Horna H. T. : *Am. J. Bot.* **70**(5), 691 (1983).
- Horner, H. T. and Wagner, Bruce L. : *Am. J. Bot.* **79**, 531 (1992).
- Giaquinta, R. T. : *Aust. J. Plant Physiol.* **3**, 619 (1979).
- Wu C. C. and Kuo-Huang L. L. : *Bot. Bull. Acad. Sci.* **38**, 97 (1997).
- Arnott H. J. and Webb M. A. : *Int. J. Plant Sci.* **161**, 133 (2000).
- Bouropoulos N., Weiner S. and Addadi L. : *Chemistry* **7**, 1881. (2001).