

벼짚에 함유한 생리활성물질 탐색

이춘우* · 김용욱** · 윤의병**

Search for Allelopathic Compound in Rice Straw

Lee Choon-Woo*, Yong-Wook Kim** and Eui-Byung Yoon**

ABSTRACT

When the rice straw mulched, the inhibition of weed growth was observed in the paddy field. If we use these allelopathic effect of decreased weed establishment, we can save labor, and protect environment. Aqueous extract of rice straw were bioassayed using water foxtail seeds to investigate their effects on the germination and the growth, and to identify allelopathic compounds. The major results obtained were summarized as follows :

Aqueous extract was fractioned by solvent, among various fractions, II-3, II-4 fractions inhibited the coleoptile and the radical of water foxtail, by 100%, respectively. There were fumaric acid and 4 unknown organic acids. Seven organic acids including fumaric acid inhibited the growth and germination of water foxtail in 10⁻²M solution. One of the most effective allelopathic compounds in rice straw was identified the unknown organic acid, as molecular weight 253, by GC/MS.

Key words : Allelopathy, Barley, Water foxtail

서 언

최근에 보리밭에 뚝새풀이 많이 발생하여 보리재배에 심각한 영향을 주고 있다. 뚝새풀용 제초제로 마세트와 밧사그란 등을 많이 사용하여 왔으나, 방제가 어려운 경향이다. 또한 어독성이나 지하수 오염으로 인하여 이러한 유기합성농약은 점차 사용이 규제되고 있다. 따라서 이에 대처하기 위하여 자연계에 해가 되지 않으면서 제초나 방충효과가 강력한 allelopathic 물질을 분리 동정하는 연구가 활발히 진행되고 있다¹⁾.

Allelopathic 물질은 주위 작물에 영향을 미치는 데²⁾ 이들의 분비는 토양수분의 영향을 받으며¹¹⁾ 작부체계의 결정에 중요한 영향을 미치고¹²⁾, 잡초의 발생이 달라지게 한다고 하였다⁵⁾.

지금까지 알려진 물질로는 보리에서^{8,10)} vanillic acid, p-coumaric acid, 밀에서⁶⁾ ferulic acid, p-coumaric acid, 귀리에서⁶⁾ ferulic acid, p-coumaric, syringic, vanillic acid, 벼에서⁴⁾ vanillic acid, p-coumaric acid, 등이 있다.

벚달이 있던 곳이나 콤바인 수확한 벚짚이 피복된 곳, 또는 벚짚을 넣고 보리를 파종한 곳에 잡초 발생과 생육이 감소하는 현상이 관

* 작물시험장(National Crop Experiment Station, RDA, Suwon 441-440, Korea)

** 동국대학교(Dongguk University, Seoul 100-175, Korea)

(’97. 7. 14 접수)

찰되는데, 이는 벚짚에 함유한 allelopathic 물질에 의한 것으로 추정되어 이를 탐색하고자 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 벚짚에서 생리활성물질의 추출, 조분획 및 생물검정

벚짚에 함유된 생리활성물질을 추출하기 위하여 건조 분쇄한 오대벚짚 분말을 물과 1:10의 비율로 혼합후 24°C에서 24시간 진탕하였다. 그리고 거즈로 여과후, 다시 No. 2 여지로 여과한 여액을 3000rpm에서 30분간 원심분리한 액을 시료로 사용하였다. 시료를 그림 1과 같이 각 단계별로 용매와 pH를 달리한후 24시간 추출하여 I, II, III, IV의 4종류로 분

획후 무수 Na_2SO_4 로 물을 제거하였다. 그리고 위의 각 분획을 30°C에서 감압농축하여 용매를 날려 보낸 김정액으로 생물검정을 하였다. 생물검정은 20ml vial에 여지(watman No. 2)를 넣은후 각 분획을 100 μl 를 가한후 용매를 상온에서 완전히 날려 보내고 독새풀 10립을 치상후 증류수 500 μl 를 넣고 15°C에서 15일 생장후 초장과 유근장을 조사하였다. 표준 유기산이 독새풀의 발아와 생육에 미치는 영향을 알고자 fumaric acid 등 10종의 유기산을 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} 농도로 조제후 500 μl 를 넣고 상기의 같은 방법으로 생물검정하였다.

2. 조분획의 1차 silicagel column 전개 및 HPLC 분석

전개용매 개발은 TLC(Merck silicagel 60 F₂₅₄)

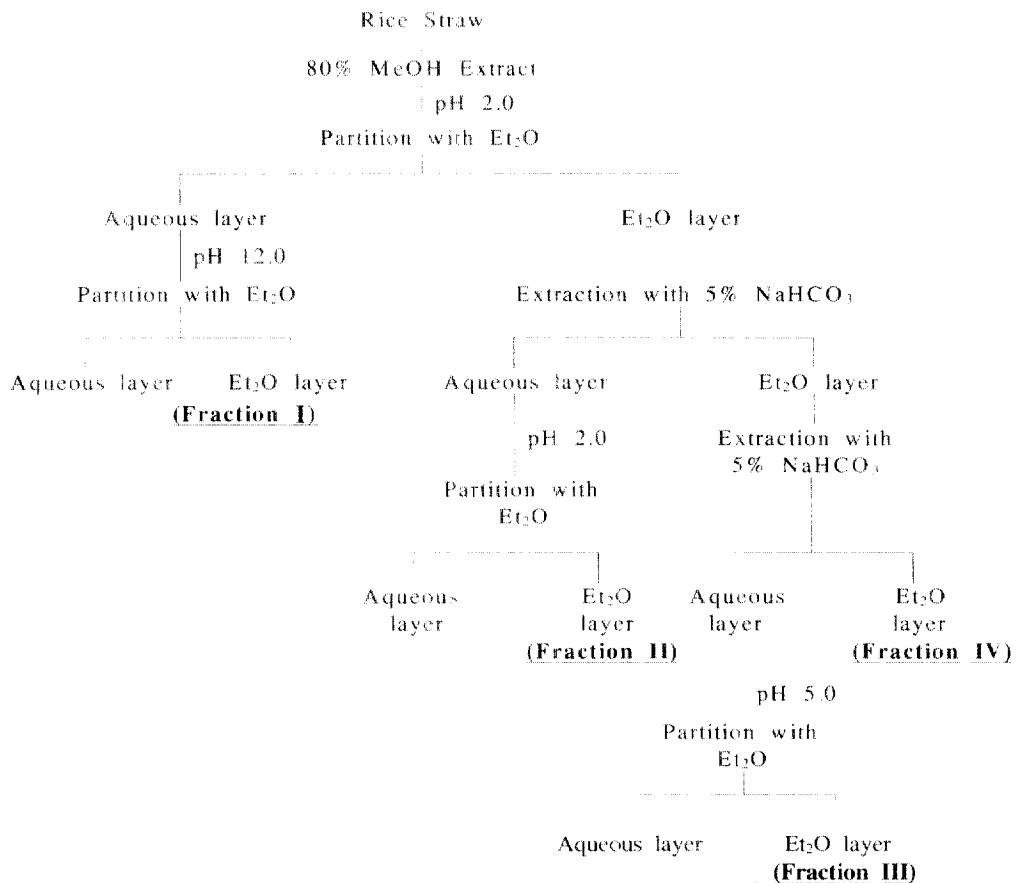


Fig. 1. Extraction and crude fraction of allelopathic substance in rice straw

를 고정상으로 하고 10종의 유기용매를 조합하여 254nm와 366nm의 UV하에서 분리능을 확인하였다. 1차 silicagel column의 전개는 II 분획을 silicagel(sigma No. 7734)로 채운 3.5×40cm의 column에 acetic acid : chloroform = 20 : 80의 전개용매를 사용하여 분획하였다. 시간당 60ml의 속도로 100ml 삼각플라스크에 10ml씩 받아 TLC확인후 같은 분획을 합쳐 3ml로 농축하였다.

생물검정은 20ml vial에 여지(watman No. 2)를 넣은후 각 분획의 농축액을 50μl를 가하여 실험 1에서와 같은 방법으로 생물검정을 하였다. 1차 silicagel column 전개에서 생리활성반응이 높은 II-4 분획에 함유한 물질을 HPLC로 분석하였다. 분석조건은 UV detector(shimazu SPD-7AV)가 부착된 shimazu LC-7A를 0.09N H₂SO₄를 이동상으로 하고 column은 IC-Pak ion-exclusion (7.8×300mm)을 사용하였고 column temp는 50℃에서 분석하였다.

3. 조분획의 2차 silicagel column 전개 및 GC/MS 분석

2차 silicagel column 전개는 1차 column 전개에서 생리활성반응이 높은 분획을 3.5×40cm의 column에 silicagel(sigma No.7729)을 고정상으로 하고 acetic acid : chloroform : n-hexan : petroleum ether = 16 : 64 : 1 : 3인 전개용매를 사용하여 분획하였다. 전개액을 8ml씩 받아서 TLC로 확인하면서 같은 분획은 합쳐 3ml로 농축후 10μl를 취하여 1과 같은 방법으로 생물검정하였다.

2차 silicagel column 전개에서 생리활성반응이 높은 II-4-4 분획을 TLC전개후 253nm, 366nm에서 확인된 반점을 GC/MS로 동정하였다. GC/MS 분석은 BF₃로 methylation한후 hexane으로 분획한 시료를 사용하여 분석하였다. 분석조건은 Finnigan사의 GC/MS-EI SSQ 7000을 이용하여 column DB-5(0.25μm×30m)을 사용하였고 injection temp. 260℃, transfer line temp. 260℃, column temp는 처음 2분간 60℃를 유지후 다음 1분동안에 260℃로 올린후 유지하였다.

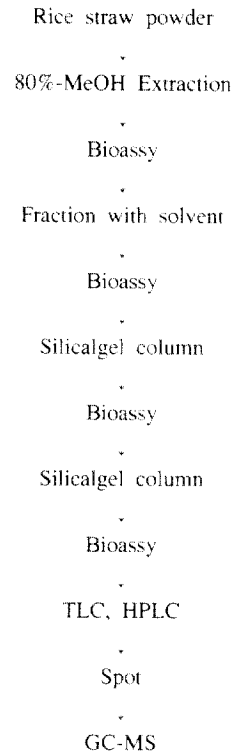


Fig. 2. Isolation flowsheet for allelopathic substance in rice straw

그림 2는 본 시험에서 allelopathic compound를 분리 동정한 과정을 요약한 것으로 각 단계의 분획을 생물검정후 생리활성반응이 가장 큰 분획을 다음 단계로 전개 및 생물검정을 반복하여 억제반응이 가장 강한 분획을 최종적으로 분리후 물질을 확인하는 순서로 수행하였다.

결과 및 고찰

1. 벚지에서 생리활성물질의 추출, 조분획 및 생물검정

식물계에는 지방산, 페놀산, 유기산 등 많은 물질을 함유하고 있으며 이들중 활성이 가장 큰 물질을 분리하는 것이 중요하다. 벚지 분말을 80% 메틸알콜에 24시간 추출하여 그림 1과 같은 방법으로 분획할 경우 pH 12.0에서 에틸 에테르에 녹는 층을 진공농축하였을 때, 연한

갈색을 나타내었으며 이를 분획 I 이라 하였다. 같은 방법으로 pH 2.0에 녹으며 진한 갈색을 나타내는 층을 분획 II, pH 5.0에 용해되며 연노랑색을 나타내는 층을 분획 III, NaHCO₃로 중화시켰을 때 노랑색을 띠는 층을 분획 IV라 하였다. 이들 4종류의 분획중 생리활성이 가장 강한 물질이 들어 있는 분획을 선별하기 위하여 독재품로 생물검정을 실시한 결과는 그림 3과 같았다.

분획 I가 초장과 유근의 억제율 38.5%와 54.4%로 가장 높았고, 분획 III은 초장을 20.9% 억제하였으나 유근은 14.7% 진장을 촉진하여, 白² 등이 피검작물과 추출물질에 따라 생리활성반응이 다르다고 한 보고와 유사하였다.

분획 II에서 유근과 초장의 진장이 적해되었는데 이 분획은 주로 유기산 등의 강산성 물질이 노인 분획으로 뿌리의 진장을 증가케 시킨 것으로 사료되며, 빛질에 함유된 성분중 억제작용이 가장 강한 것은 유기산 등의 산성 물질일 것으로 추정되었다. 전¹¹의 보고에 의하면 양피 뿌리 추출물에서 강산성 분획이 비의

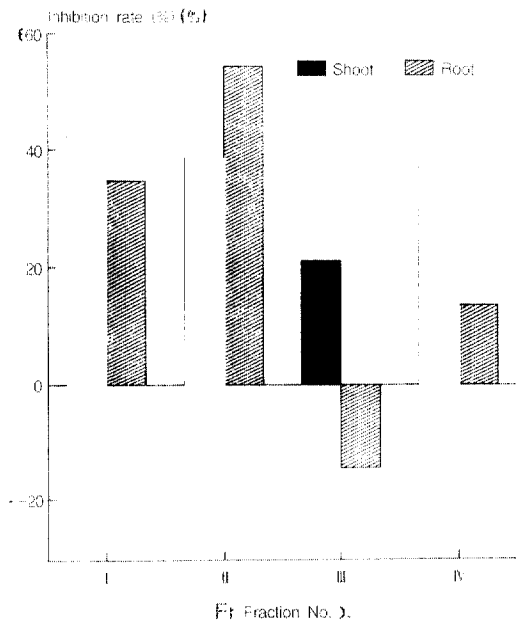


Fig. 3. Inhibition rate of shoot and root of water foxtail by different fractions from rice straw extraction.

생장을 가장 억제하였다는 보고와 유사하였다.

2. 조분획의 1차 silicagel column 전개.

HPLC분석, 표준 유기산에 의한 생물검정

Silicagel column의 전개용매를 개발하기 위하여, hexane 등 10종류의 유기용매를 조합하여 TLC 전개하였을 fraction II는 acetic acid : chloroform = 20 : 80가 가장 좋았다(표생략). 전¹¹은 양피 호밀 추출물의 전개용매로는 1차는 butanol : acetic acid : water = 4 : 1 : 2.2, 2차는 2% acetic acid가 좋다고 하여 추출작물에 따라 전개용매는 다른 것을 알 수 있었다.

생육억제 효과가 가장 컸던 분획 II를 silicagel (MERCK No.7734)을 채운 column에서 acetic acid : chloroform = 20 : 80을 전개용매로 10ml씩 104개를 받으면서 TLC로 확인하여 같은 것끼리 모아 11종으로 구분되었다. 이 11종의 각 분획을 5%로 생물검정한 결과는 그림 4와 같았다. II-3, II-4분 분획이 독재품이 전혀 받아되지 않아 억제효과가 가장 컸다.

II 분획은 pH 3이하에서 해리되지 않는 산성물질로 유기산 등이 이에 해당하며 이를 silicagel column으로 전개한 II-4분획을 HPLC로 분석한 결과는 그림 5와 같았다. Fumaric acid와 확인이 불가능한 peak가 4개 확인되었다. fumaric acid를 포함한 유기산이 독재품의 생육 및 발아에 영향을 미치는 것인가를 조사한 결과는 Table 1과 같았다. tartaric acid, quinic acid, phroglutanic

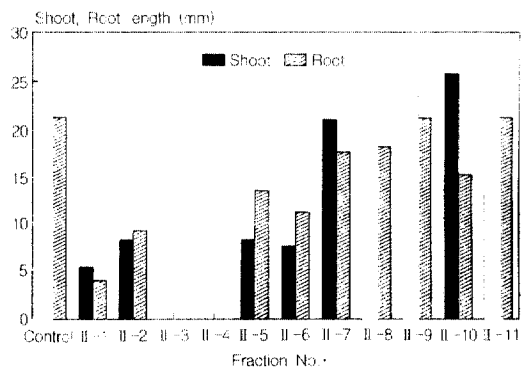


Fig. 4. Shoot and root length of water foxtail by 1 ~ 11 fraction zones of fraction II.

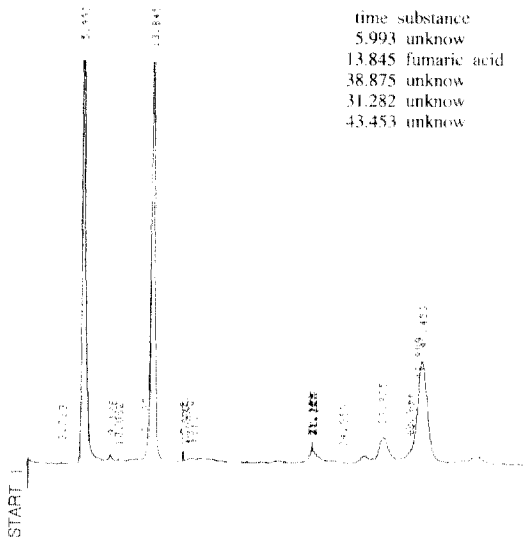


Fig. 5. HPLC chromatogram of fraction II-4.

acid, phytic acid, glutaric/citric acid는 10^{-2} 의 고농도에서 독새물의 발아를 100% 억제시켰고, fumaric acid, pyruvic acid, fumaric acid도 초장과 근장 및 발아를 상당히 억제시켰다.

반면에 succinic acid는 다른 유기산에 비하여 생육이나 발아억제율이 낮았다. 10^{-4} , 10^{-6} 의 저농도에서도 생육은 비슷하였으며 10종의 표준 유기산중 succinic acid가 독새물의 생장억제 정도가 낮았고, malic acid가 가장 높았으며 대부분의 유기산은 독새물의 생육을 억제하는 것으로 사료되어 빗질속에 함유한 fumaric acid의

4종의 비확인 물질도 독새물의 생육을 억제할 가능성이 있는 것으로 추측되었다.

작물에 함유하고 있는 억제물질로 보리에는^{8,10)} vanillic acid, coumaric acid, 밀에는⁶⁾ ferulic acid, coumaric acid, 퀴리에는⁶⁾ ferulic acid, coumaric acid, syringic acid, vanillic acid, 벼에는⁴⁾ vanillic acid, coumaric acid 등 주로 페놀산이라는 보고가 많이 있다. 본 시험에서도 페놀성물질이 포함되어있는 분획 III에서 초장과 유근의 신장을 49.2%와 43.7% 억제하여, 위의 보고들과 일치하였으나, 유기산 분획인 분획 II보다 그 억제 정도는 약하였다. 따라서 빗질에도 페놀산 분획도 억제작용성이 있지만 유기산 분획이 더욱 강한 것으로 사료되었다.

3. 조분획의 2차 silicagel column 전개 및 GC/MS분석

생물검정에서 억제효과가 가장 컸던 II-4 분획의 전개용매를 개발한 결과 acetic acid : chloroform : n-hexane : petroleum ether = 16 : 64 : 1 : 3가 분리능이 가장 좋았다(표 생략). 따라서 II-4 분획을 silicagel (MERCK No.7729)을 채운 column에서 위의 전개용매로 8ml씩 150개를 받으면 시 TLC로 확인, 같은 분획끼리 모아 7개의 분획으로 구분한 후 추출액을 10μl로 독새물로 생물검정한 결과는 표 2와 같았다.

II-4-3, II-4-4분획이 초장이 11.1mm, 12.4mm로

Table 1. Effect of organic acids on the growth and germination of water foxtail.

Organic acid	10-2M			10-4M			10-6M		
	s*	r	g	s	r	g	s	r	g
succinic acid	20.0a	8.3a	76.6a	14.3abcd	6.6bcd	30.0bcd	31.0a	20.6a	50.0ab
citric acid	7.6b	3.6b	23.3c	25.3a	15.0a	30.0bcd	30.3a	17.6ab	46.6ab
pyruvic acid	18.6a	2.0b	36.6b	13.3abcd	14.3ab	53.3abc	26.0a	14.3ab	53.3ab
fumaric acid	5.6bc	0.3b	10.0cd	17.6abc	12.6abc	60.0a	20.0a	13.0ab	53.3ab
tartaric acid	0.0c	0.0b	0.0d	6.3bcd	1.6d	3.3d	26.6a	18.3ab	70.0a
quinic acid	0.0c	0.0b	0.0d	3.6cd	3.6d	23.3cd	18.3a	10.6b	26.6b
phroglutanic acid	0.0c	0.0b	0.0d	3.6cd	3.6cd	10.0d	27.0a	15.3ab	26.6b
phytic acid	0.6c	0.0c	0.0d	21.6ab	14.3ab	56.6ab	28.3a	16.0ab	56.6ab
glutaric acid	0.6c	0.0b	0.0d	27.6a	15.3a	60.0a	27.0a	16.0ab	66.6a
malic acid	0.0bc	0.4b	0.0cd	0.0d	0.0d	0.0d	25.6a	14.3ab	43.3ab

*s : shoot length r : root length g : germination rate

가장 짧았고, 유근장도 각각 14.5mm, 14.0mm로 짧아 독새물의 생장억제에 가장 효과적인 분획으로 사료되었다.

억제반응이 가장 컸던 II-4-3, II-4-4 분획에서 TLC 전개하여 UV 366nm에서 공통으로 존재하였던 보라색 형광을 나타내는 Rf 0.50 반점을 채취하여 methylation한후 GC/MS로 분석하였다. 0.5초 간격으로 scanning하였을 시 6종류의 peak가 확인되었다(그림 6). 이 중에서 강도가 가장 강한 A peak를 mess spectra를 확인하여 보면 분자량 253인 물질이 검출되었으며(그림 7) 이 물질은 library에 등록되어 있지 않아 지금까지 알려지지 않은 신물질로 추정되었다. 그러나 이물질은 Octadecanoic acid, 2-oxo-, methyl ester(C19H36O3, MW : 312)에서 methyl ester(MW : 59)가 유리된 형태인 것으로 사료되었으나, 이를 더 확인하기 위하여 달리 동정에 대한 연구가 계속되어야 할 것으로 생각되었다.

Table 2. Shoot and root length of water foxtail by 7 fraction zones of fraction II-4.

Fraction no.	Coleoptile length (mm)	Radicle length (mm)
Control	22.2	13.0
II-4-1	14.9	15.1
II-4-2	17.8	18.1
II-4-3	11.1	14.5
II-4-4	12.4	14.0
II-4-5	11.8	16.8
II-4-6	20.8	17.3
II-4-7	20.9	18.3

* Same letter within column are significantly different by Duncan's multiple range test at the 0.05 probability level.

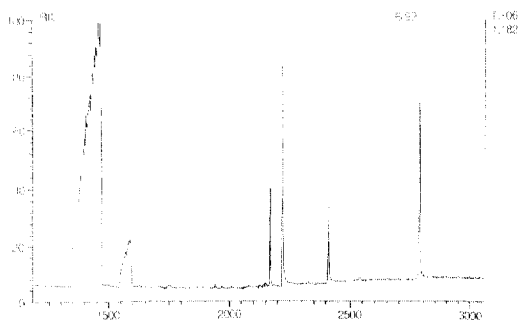


Fig. 6. GC/MS chromatogram of fraction II-4-4-Rf 0.50

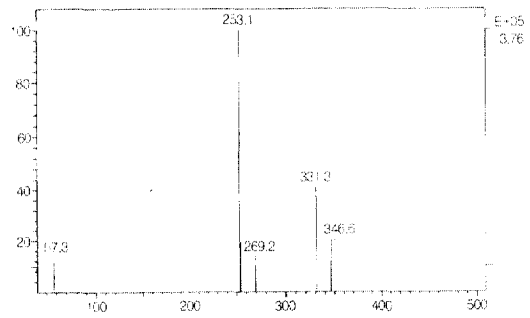


Fig. 7. GC/MS mess spectra of A peak in fig 6.

적 요

벚단이 있던 곳이나 콤바인 수확한 벚짚이 피복된 곳은 잡초 발생이나 생육이 감소하는 현상이 관찰되고 있다. 이는 벚짚에 함유한 allelopathic 물질에 의한 것으로 추정되어 벚짚을 80% 메칠알콜로 추출후 독새풀로 생물검정, 10종의 표준 유기산이 독새풀의 생육과 발아에 미치는 영향, 벚짚추출물을 silicagel column으로 분획후 HPLC, GC/MS로 분석한 결과는 아래와 같았다.

1. HPLC 분석에 의하여 벚짚에는 fumaric acid 와 4종류의 미확인 유기산이 확인되었다.
2. Fumaric acid를 포함한 7종의 유기산은 10^{-2} 의 농도에서 독새풀의 생육을 상당히 억제하였고 특히 발아를 100-90% 억제시켰다.
3. 벚짚에 함유한 물질중 억제효과가 가장 큰 것은 GC/MS분석에 의하여 II-4-4-Rf 0.5에 함유한 물질로 분자량 253인 치환된 유기산인 신물질로 Octadecanoic acid, 2-oxo-, methyl ester에서 methyl ester가 유리된 물질로 추정되었다.

인 용 문 헌

1. 안중웅 · 최정섭 · 조광연. 1989. 천연에서부터 제조활성물질의 탐색. 한잡초지 9(1) : 76~79.
2. 白鏡煥 · 金吉雄. 1988. 田作雜草로부터 生理活性物質 探索. 韓雜草誌 8(3) : 283~290.

3. Choi, S.T. 1993. Studies on the biologically active substances from *Allium fistulosum*. II. Allelopathic substances from *Allium fistulosum*. J.K.S.H. Science. 34 : 355 ~ 361.
4. Chou, C.H, Chang, F.J and Oka, H.I. 1991. Allelopathic potentials of a wild rice, *Oryza perennis*. Taiwania. 36 : 201 ~ 210.
5. Fujii, Y, Shibuya, T. and Usami, Y. 1991. Allelopathic effect of *Mucuna pruriens* on the appearance of weeds. Weed Research Tokyo. 36 : 43 ~ 49.
6. Guenzi, W.D. and T.M. 1966. McCalla Phenolic acids in oats, wheat, sorghum, and corn residues and their. phytotoxicity. Agro.J.58 : 303 ~ 304.
7. 平吉功・黒田佐俊・西川活三. 1955. 植物の自家生育阻害物質に関する研究. 農業及園藝 30(3) : 453 ~ 454.
8. 草野 秀・小川和夫. 1974. 植物體に含まれるフェノール性酸について. 日土肥誌. 45(1) : 29 ~ 36.
9. 權純泰・金吉雄. 1975. 麥類作物의 殘餘物로부터 同定된 Phenolic Compounds가 雜草의 發芽 및 生育에 미치는 影響. 韓雜草誌 5(2) : 121 ~ 130.
10. 郭尙洙・金吉雄. 1984. 보리 殘餘物속에 含有된 主要 Phenolic Acids가 雜草發芽에 미치는 影響. 韓雜草誌 4(1) : 39 ~ 51.
11. Shivanna, L.R. Prasanna, K.T, Javed M. and Mumtaz, J. 1992. Allelopathic effects of eucalyptus : an assessment on the response of agricultural crops. Proceedings. First National Symposium. Allelopathy in agroecosystems (agriculture & forestry), 108 ~ 110.
12. 高橋佳孝・魚住 順・小野 茂・余田康亮. 1986. 暖地型牧草刈株水溶性抽出物イタリオンライグラスの發芽. 生長に及する影響. 日草誌 1 : 397 ~ 404.