

## 大豆 및 벼懸濁培養 중 PCP 水溶性代謝物の 同定

### 1. PCP glucose conjugates의 형성

金弼濟·朴昌奎

## Identification of Water Soluble Metabolites of Pentachlorophenol (PCP) in the Suspension Cultures of Soybean and Rice Cells

### 1. Metabolic Conversion of PCP to Glucose conjugates

Pil Je Kim, Chang Kyu Park

#### Abstracts

A metabolic study has been conducted to investigate the conversion of pentachlorophenol(PCP) to water soluble metabolites in soybean and rice cell suspension cultures as well as in intact rice plants. PCP in plant cells was found to be exclusively transformed into water soluble metabolites. The relative rate of the metabolic conversion of PCP in decreasing order was soybean cultures > rice cultures > rice plants. Also observed was that, the older the cultures grown, the lower the conversion rate was. Primary water soluble metabolites isolated from both the 5 day old soybean and 8 day old rice cells were specifically hydrolyzed only by  $\beta$ -glucosidic linkage specific glucosidase, suggesting that the metabolites are  $\beta$ -glucose conjugates. The amount of glucose conjugates was increased with increasing time of incubation of PCP up to 24 hr in both soybean and rice cultures; Thereafter, it was decreased progressively. Most of the glucose conjugates were further metabolized to more polar conjugates in cells, but a portion of them was excreted into the culture medium.

Key words : PCP, Metabolism, glucose conjugates, suspension cultures

#### I. 序 論

Conjugation 반응은 微生物, 植物, 動物 및 土壤에 流入된 外來毒性物質(xenobiotics), 혹은 그 代

謝物이 生體內 極性分子와 결합되어 대사 진행 部位로부터 除去가 유리한 형태로 酵素에 의해 轉換되는 代謝上的 合成過程이다.<sup>6,10</sup> 農藥과 관련하여 흔히 관찰되는 conjugation 반응은 약제나 대사물의 化學構造와 체내에 존재하는 효소 등에 의해 定

性, 定量的인 차이는 있지만 1) gulcuronic acid, glucose 등 炭水化合物과의 반응 2) glycin, alanin 등 基本 아미노산이나, glutathion 등 複合아미노산과의 반응 3) sulfur가 관여하는 반응, 및 4) alkylation, acylation 반응 등으로 分類되고 이런 대사과정을 phase II 반응이라 한다.<sup>6,7,11)</sup> 生體系에서 農藥의 conjugation 반응은 無毒化反應(detoxification)으로 殺蟲, 殺菌劑에서는 약제에 대한 耐性 내지는 抵抗성과, 그리고 除草劑는 選擇성과 관련된 것으로 解析되고 있다.<sup>3,6,8)</sup> 과거에는 conjugation 반응 결과 生成된 代謝物은 일반 자연계에 존재하는 2차 대사물(secondary metabolites)과 마찬가지로 특이한 代謝上的 기능은 없는 것으로 평가되었으나, 현재는 conjugates가 생체 내에 임시 혹은 영구적인 독성 이물질의 저장체라는 해석이 있어 환경이나 인간에 유해할 수 있다는 평가도 제시되고 있다.<sup>3)</sup>

구조상 conjugates로 쉽게 전환이 가능한 phenol類는 다양한 source로부터 환경으로 유입되어 수계를 오염시키는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 phenol類 化合物 중 독성 및 환경위해 요인으로 인하여 가장 많은 관심이 있어 왔던 pentachlorophenol(PCP)를 선택하여 水稻栽培環境 및 懸濁培養細胞 조건에서 PCP가 水溶性代謝物로 전환되는 특성을 究明하여 phenol類의 환경위해 평가에 기여하고자 하였다.

## II. 材料 및 方法

### 가. 材 料

#### 1. 試 藥

본 연구에 사용한 標識 PCP는 [phenyl-U-<sup>14</sup>C]PCP로 Sigma사에서 購入하였다. 比放射能은 10.6mCi/mmole이었으며 放射化學的 純度は TLC와 HPLC로 確認한 결과 98% 이상이었다. 標識 PCP와 混合하여 藥劑處理에 사용된 非標識 PCP는 Aldrich사에서 구입한 것으로 hexane으로 再結晶하여 GC/MS로 확인한 후 사용하였다. Scintillation fluid는 水溶性 試料用으로 2,5-diphenylloxazole(PPO) 5.0g과 1,4-[4-methyl-(5-phenyl)-2-oxazolyl] benzene(DMPOP)100mg을 1ℓ의 toluene-Triton X-100 혼합액(2:1)에 용해시킨 것, 혹은 Beckman사의 Ready Value<sup>®</sup>을,

油溶性 試料의 경우는 PPO 5.0g과 DMPOP 100mg을 1ℓ의 toluene에 용해한 것을 각각 사용하였으며, IAA, kinetine, 2,4-D 및 agar를 비롯한 組織培養에 사용된 시약은 모두 Sigma사의 조 직배양용이었다.

#### 2. Callus 및 懸濁培養細胞

대두(*Glycine Max*, L. 장백)의 callus 誘起 및 현탁배양은 柳<sup>18)</sup>의 방법등을 참조하였다. Callus를 2~3주일 간격으로 3~4개월간 繼代培養한 후 懸濁培養을 시도하였으며, 현탁액을 40mesh 濾膜(cell dissociation kit, Sigma Co., USA)을 통과시켜 cell을 모으고 새로운 배지 50ml에 cell 1.5~2.0g을 再懸濁 시키는 방법으로 3개월 이상 8일 간격으로 계대배양하였다.

벼의 경우 벼씨(*Oryza, Sativa*, L. 동진)의 껍질을 제거하고 滅菌한 다음 2,4-D(5.0mg/ℓ)가 첨가된 MS배지(0.8% agar)를 이용, 28℃ 암조건에서 2주일간 배양하여 callus를 유기, 4주일마다 계대배양하였다. Ohira 등의<sup>9)</sup> 방법을 참고하여 光을 200~300lux로 照射하였으며, 또한 2,4-D의 농도를

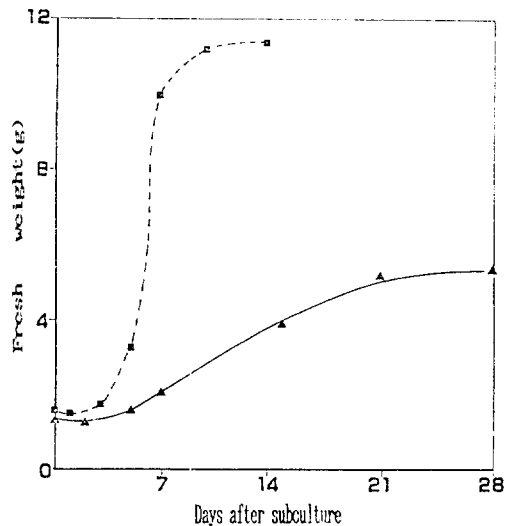


Figure 1. Growth curves of soybean (■) and rice (▲) cells. Soybean cells were cultured in B-5 medium in the dark and rice cells in R-2 medium under room light (200-300 lux) at 28°C. Inoculum size was 1.5 g cells/50ml of culture medium.

5.0mg/ℓ 로 조절한 R-2 배지에 callus 3~4 g 을 현탁하여 150rpm으로 진탕하였다. 이후의 계대배양은 2,4-D의 농도를 2.0mg/ℓ 로 하고, cell의 현탁에 도움을 주는 것으로 알려진 proline(1.35 g/ℓ) 과 casein hydrolyzate(300mg/ℓ)를<sup>10)</sup> 새로이 첨가한 R-2배지에 1.5~2.0 g 의 cell을 재 현탁시키는 방법으로 14일 간격으로 실시하였다. 대두 및 버의 각각의 현탁배양 조건에서 生育特性은 Fig.1과 같다.

### 3. 버

土壤 50 g 을 시험관(22×50mm)에 취하고 증류수를 2cm 깊이로 채운 뒤 28℃ 恒溫室에서 2주일간 保管하였다. 滅菌한 범씨(동진)를 각 시험관에 3개씩 옮겨심고 약 7000lux의 광 조건에서 1개월간 栽培하였다.

## 나. 方 法

### 1. PCP의 大豆 및 버 cell 生育阻害調査

배양액 기준으로 無處理를 포함하여 PCP의 농도가 0.1~30ppm이 되도록 대두의 경우 계대배양후 1일째에, 버는 2일째에 methanol에 용해한 PCP를 50μℓ 씩 처리하였다. 각각 8일 및 12일간 배양한 후 cell을 수확하여 무게를 측정하였다.

### 2. PCP의 體內吸收 및 變換調査

#### 1) 懸濁培養

대두는 계대배양 후 5일째에, 버는 8일째에 非標識 PCP와 標識 PCP를 混合시켜 methanol용액중 PCP의 濃度가 1.0 ppm(0.2μCi)이 되도록 처리한 후 배양시간에 따른 PCP의 經時的인 轉換을 조사하였다. 한편, cell의 生育기에 따른 PCP의 轉換은 대두의 경우 배양 1일~11일째, 버는 2일~14일째 까지 2일 간격으로 PCP를 처리하고 48시간 배양하여 조사하였다.

현탁배양 cell의 추출 및 분배는 Bligh-Dyer방법을 약간 변형하였다.<sup>1,3,14,15)</sup> 흡수, 이행이 끝난 cell을 수확하여 80ml 용량의 screw-capped vial에 옮기고 여기에 Bligh-Dyer mixture I (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O, 9.6 : 19.2 : 3.8, v/v) 32.6ml를 가하여 -10℃ 이하 냉동고에 24시간 이상 보관하였다. 현탁액을 0℃에서 7~8분간 超音波 粉碎器(Fisons Model MSE Soniprep 150, UK)를 이용하여 추출한

후 減壓濃縮하고 잔사를 Bligh-Dyer mixture II (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O, 9.6 : 19.2 : 7.6) 36.4ml와 CHCl<sub>3</sub> 10ml로 씻어 여액과 합하였다. 濾液을 소량의 물이 남을 때까지 減壓濃縮하고 수용액층을 50 ml로 조절하고 같은 양의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>로 2회 분배하였으며, 배양액 중 방사능도 동일한 방법으로 분배한 후 각 층의 放射能을 측정하였다. 추출 후 잔사는 연소시켜 비추출성 성분으로 하였다.

#### 2) 버 callus

2,4-D의 농도를 5.0 ppm으로 한 MS-agar 배지를 15분간 가압 멸균하고 agar가 응고되기 전 C-14표지 PCP를 0.2μCi 처리하였다. 계대배양 후 2주일이 경과된 버 callus를 4등분하여 1.0 g 씩 옮기고 암조건에서 배양하면서 경시적으로 callus를 수확하여 유리제 세포마쇄기를 이용, MeOH과 70% MeOH(aq.)으로 연속 추출하여 상기 1)과 동일하게 분석하였다.

#### 3) 버

C-14 標識 PCP를 1.0 μCi씩 湛水處理하고 經時的으로 버를 뿌리와 함께 채취하여 수도물로 가볍게 씻은 후 소량의 MeOH을 가하면서 마쇄한 후 약 80ml이 되게 methanol을 가해 48시간 Soxhlet 추출하였다.<sup>4,17)</sup> MeOH 추출액을 減壓濃縮하고 cell 추출물 분배방법으로 분석하였다.

### 3. 초기 conjugate(s) 確認 反應

대량배양한 대두 및 버에서 PCP 전환시험으로 얻은 수용성분획을 TLC(EtOAc/H<sub>2</sub>O/AcOH, 18 : 1 : 1, v/v)하여 radioscanner(Berthold Model BF-220-23, FRG)로 silica gel plate에서의 대사물 분포를 조사하여 초기 수용성 대사물로 판단된 R<sub>f</sub> 0.45~0.55 분획에 대해 β-glucosidase, α-glucosidase 및 HCl에 의한 加水分解 성질을 조사하였다.

### 4. Conjugates의 含量조사

현탁배양에서 1차적으로 생성되는 conjugate(s) 含量은 미리 얻은 R<sub>f</sub> 0.45~0.55 분획을 표준물로 하여 정량하였다. 현탁배양 중 PCP 전환시험에서 얻은 수용성 cell 추출물을 동결건조하고 MeOH/H<sub>2</sub>O(1 : 1) 5ml에 용해시켰다. 이중 2~3000 dpm에 해당하는 수용성 분획을 TLC로 조사하여 표준물의 R<sub>f</sub>에 해당하는 부위를 분취하지 않고 직접 scintillation fluid와 혼합하여 放射能을 計測하였다.

### Ⅲ. 結果 및 考察

#### 가. 懸濁培養에서 PCP의 轉換

##### 1. 大豆 및 벼 生育에 대한 影響

PCP를 cell이 성장하기 시작하는 시기부터 대체로 멈추는 시기까지 처리하여 cell 生育에 대한 약제의 影響을 조사하였다(Fig. 2). 光磷酸化反應을 阻害하는 PCP는 매우 낮은 농도에서도 cell 生育에

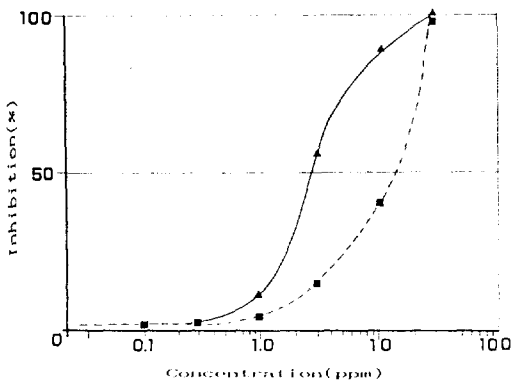


Figure 2. Inhibitory effect of PCP on the growth of soybean (■) and rice (▲) cells. Soybean and rice cells were incubated with PCP for 7 and 12 days respectively.

영향을 주었다. 특히 벼 cell은 배양액 기준 PCP가 2.75ppm일때 50% 정도 阻害되어 대두의 12 ppm에 비해 敏感한 阻害를 받았다. 이러한 差異는 cell 生育特性, PCP의 吸收, 移行 및 低毒性 物質로의 전환등과 關聯된 것으로 豫견되었다. 배양액 기준 PCP의 濃度가 1.0ppm(3.75μM)일 때 生育저해는 微弱하여 懸濁배양에서 PCP의 전환 시험과 수용성 대사를 분리시 약제 처리 수준으로 하였다.

##### 2. PCP의 經時的 轉換

초기 대수성장기로 추정된 5일(대두) 및 8일(벼)째에 標識 PCP를 懸濁배양 중인 대두 및 벼에 각각 처리하여 經時的으로 吸收·移行을 조사하였다(Table 1 및 Table 2). 처리한 PCP는 대두 및 벼 모두에서 1시간 이내에 90% 이상이 cell로 흡수 이행이 完了되었으며 시간이 경과해도 큰 변화가 없었다. 비록 이러한 흡수 이행이 cell 내로의 완전한 이동이 아니고 PCP와 같은 油溶性 분자가 배양액(hydrophilic)과 세포막(hydrophobic)으로 단순히 分배되는 것으로 해석되고는 있지만<sup>13)</sup> 懸濁배양에서 PCP는 cell과 접촉이 원활하고 또한 intact plant에서 관찰되는 약제의 침투지연(penetration delay)이 없는 것으로 판단되었다. 그리고, 흡수, 이행된 PCP는 比較的 빠르게 비추출성 성분(non-extractables)으로 전환되었으며, 이는 phenol類가 세포벽의 lignin 부위로 쉽게 유입되어 bound

Table 1. Changes in the distribution of radioactivity in soybean cell suspension culture after application of [<sup>14</sup>C]PCP into the culture medium

| Incubation time(hr) | Radioactivity recovered(%) |               |             |                 | Total recovered |
|---------------------|----------------------------|---------------|-------------|-----------------|-----------------|
|                     | Medium                     |               | Cell        |                 |                 |
|                     | DM* soluble                | Water soluble | Extractable | Non-extractable |                 |
| 0.5                 | 7.7                        | 0.4           | 90.7        | 3.6             | 102.4           |
| 1                   | 5.5                        | 0.4           | 91.3        | 7.5             | 104.7           |
| 2                   | 5.6                        | 0.6           | 90.2        | 10.2            | 106.6           |
| 4                   | 6.4                        | 1.2           | 69.8        | 10.9            | 88.3            |
| 24                  | 2.2                        | 4.3           | 66.4        | 19.8            | 92.7            |
| 48                  | 1.2                        | 4.3           | 68.1        | 15.5            | 89.1            |
| 72                  | 1.3                        | 4.5           | 62.6        | 16.6            | 85.0            |
| 96                  | 2.4                        | 4.3           | 59.1        | 18.2            | 84.0            |

\* Dichloromethane

Table 2. Changes in the distribution of radioactivity in rice cell suspension culture after application of [<sup>14</sup>C]PCP in the culture medium

| Incubation time(hr) | Radioactivity recovered(%) |               |             |                 | Total recovered |
|---------------------|----------------------------|---------------|-------------|-----------------|-----------------|
|                     | Medium                     |               | Cell        |                 |                 |
|                     | DM* soluble                | Water soluble | Extractable | Non-extractable |                 |
| 1                   | 8.4                        | 1.3           | 88.3        | 1.8             | 99.8            |
| 2                   | 8.6                        | 2.7           | 90.1        | 4.2             | 105.6           |
| 4                   | 6.2                        | 2.6           | 78.6        | 3.9             | 91.3            |
| 24                  | 6.9                        | 7.4           | 57.4        | 17.0            | 88.7            |
| 48                  | 7.3                        | 8.4           | 58.6        | 16.4            | 90.7            |
| 96                  | 6.9                        | 7.6           | 56.5        | 22.1            | 93.1            |
| 168                 | 7.1                        | 8.7           | 44.6        | 34.7            | 85.1            |

\* Dichloromethane

residues로 전환된다는<sup>13)</sup> 연구결과와 一致되었다. 48시간 배양시 회수되는 방사능이 90%를 상회하여 호흡 등에 의한 휘발성 성분을 조사하지 않아도 대사시험 결과를 해석하는데 큰 문제는 없는 것으로 판단되었다. 현탁배양에서 약제의 대사가 빠름에도 휘발성 성분이 적은 것은 광합성, 호흡 등 체내 일부 대사과정이 정지되기 때문으로 보고되고 있다.<sup>14)</sup> 그리고 흡수·이행 정도는 cell 특성과 관련된 것으로 PCP의 生育阻害와는 무관하였다.

배양액과 cell 抽出物 중 수용성 대사물의 양을 조사하였다(Fig. 3). 대두의 경우 PCP의 수용성 대사물로의 전환은 매우 빨라 처리 4시간 후에 이미 50% 이상이 되었으며, 24~72시간 처리했을 때 65~75% 수준을 유지하였다. 대두에 비해 벼는 轉換速度와 양이 적어 48시간 이상 경과되어서야 50%수준이 되었고, 특히 처리 초기에 대두에 비해 전환 속도가 느렸다. 앞에 언급한 대두와 벼의 PCP에 대한 민감성 차이는 PCP 뿐만 아니라 그 油溶性代謝物(PCPs)도 활성(bioactivity)이 높다는 보고를<sup>2,12)</sup> 참조할 때 처리한 PCP가 수용성 대사물로 전환되는 速度와 量이 다르기 때문으로 판단된다.

배양액 중 수용성 대사물의 수준은 벼가 높았으나 배양액 전체 대비에서는 낮았다(Table 1, 2 참고). 배양액 중 수용성 대사물은 cell에서 PCP의 전환과 관련된 것으로 cell에서 생성된 수용성 대사물이 배양액으로 分泌되는 것으로 생각된다. 또한, PCP를 장기간 처리할 경우 PCP가 빠르게 수용성

산물로 전환됨에도 불구하고 배양액 중 수용성 분획이 일정 수준을 유지하였다. 이는 conjugation 반응을 동적평형(dynamic equilibrium)으로 해석하는<sup>3)</sup> 시각과 관련된 것으로 시사하는 바가 크다고 생각된다. 즉 conjugates는 쉽게 가수분해되어 독성성분

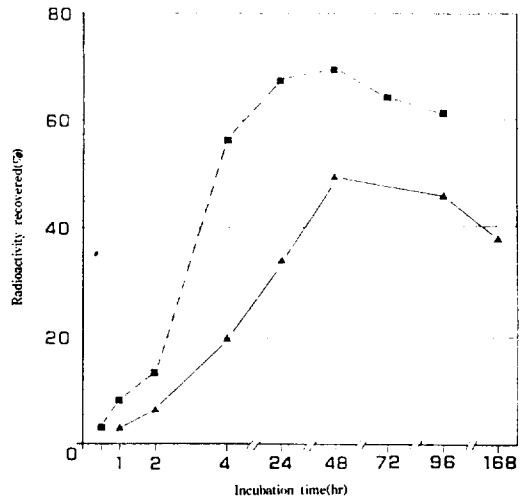


Figure 3. Changes of water soluble metabolites of PCP in soybean (■) and rice (▲) cultures as a function of incubation time.

[<sup>14</sup>C]PCP was applied to the 5 day old soybean and the 8 day old rice cultures.

Table 3. Formation of water soluble metabolites of PCP in soybean culture of different ages

| Age of cell<br>(Days after<br>subculture) | Radioactivity recovered(%) |               |             |               |                        |
|---|----------------------------|---------------|-------------|---------------|------------------------|
|   | Medium                     |               | Cell        |               | Total<br>water soluble |
|   | DM* soluble                | Water soluble | DM* soluble | Water soluble |                        |
| 1   | 3.1                        | 3.7           | 5.4         | 70.9          | 74.6                   |
| 3   | 2.3                        | 2.3           | 3.3         | 69.8          | 72.1                   |
| 5   | 1.7                        | 2.6           | 2.3         | 64.7          | 67.3                   |
| 7   | 0.8                        | 5.0           | 2.0         | 54.0          | 59.0                   |
| 9   | 0.6                        | 8.2           | 2.9         | 53.4          | 61.6                   |
| 11  | 0.6                        | 6.1           | 2.8         | 44.4          | 50.5                   |

Measurements were made in 48hrs after application of [<sup>14</sup>C]PCP. \* Dichloromethane

Table 4. Formation of water soluble metabolites of PCP in rice culture of different ages

| Age of cell<br>(Days after<br>subculture) | Radioactivity recovered(%) |               |             |               |                        |
|---|----------------------------|---------------|-------------|---------------|------------------------|
|   | Medium                     |               | Cell        |               | Total<br>water soluble |
|   | DM* soluble                | Water soluble | DM* soluble | Water soluble |                        |
| 2   | 8.2                        | 6.2           | 21.1        | 38.8          | 45.0                   |
| 4   | 9.8                        | 7.3           | 22.2        | 37.3          | 44.6                   |
| 6   | 10.2                       | 6.9           | 21.2        | 40.9          | 47.8                   |
| 8   | 8.6                        | 7.4           | 20.1        | 39.2          | 46.6                   |
| 10  | 10.4                       | 8.3           | 23.3        | 38.8          | 47.1                   |
| 12  | 10.9                       | 7.0           | 23.1        | 37.4          | 44.1                   |
| 14  | 9.8                        | 7.6           | 31.7        | 29.6          | 37.3                   |

Measurements were made in 48hrs after application of [<sup>14</sup>C]PCP. \* Dichloromethane

을 분비하는 중간대사물로 볼 수 있어 현재 약제의 독성 評價에서 경시되고 있는 수용성 대사물에 대해 새로운 연구가 필요하다고 판단된다.

3. Cell 生育時期別 conjugates 生成

현탁배양에서 PCP의 전환이 cell 生育상태에 따라 다를 수 있다고 판단되어 生育시기가 다른 cell 에 PCP를 48시간 處理하여 약제의 흡수 및 전환을 조사하였다(Table 3, 4.). PCP의 흡수, 이행 정도는 대두 및 벼 모두 상기 2항의 48시간 배양 결과와 비슷하였다. 그러나 수용성 대사물의 양은 계대배양 초기에 많이 생성되어 生育시기에 따라 큰 差異를 보였다. 벼에서는 대두에 비해 그 차이가 적기는 하지만 cell의 양(Fig. 1 참고)을 고려할 때 전체적으로 처리한 PCP는 계대배양 초기에 빠르게 수용성 대사물로 전환되었으며, 특히 대두의 경우 계대

배양 1일째에 48시간 처리한 경우 70% 이상이 전환되어 生育말기의 50% 수준과 비교되었다.

나. 水稻體 및 벼 callus에서 PCP 轉換

현탁배양과 PCP의 전환 능력을 비교하고 궁극적으로 水稻栽培 환경에서 主 수용성 대사물을 조사하기 위해 벼는 土壤에, 벼 callus는 agar 배지에 PCP를 처리하여 經時的으로 흡수, 이행과 전환을 조사하였다(Fig. 4). 벼에서 PCP의 이행은 2주일까지는 경시적으로 증가하였으나 이후에는 緩慢하였다. 그리고, 흡수, 이행된 PCP는 서서히 수용성 산물로 전환되었으며 벼 callus의 경우가 흡수 뿐만 아니라 전환도 빨라, 21일 경과시 抽出性 방사능 중 50%가 되었다. 벼유묘에서 비록 수용성 산물의 양은 적지만 전체 흡수, 이행된 PCP 중 상대적인

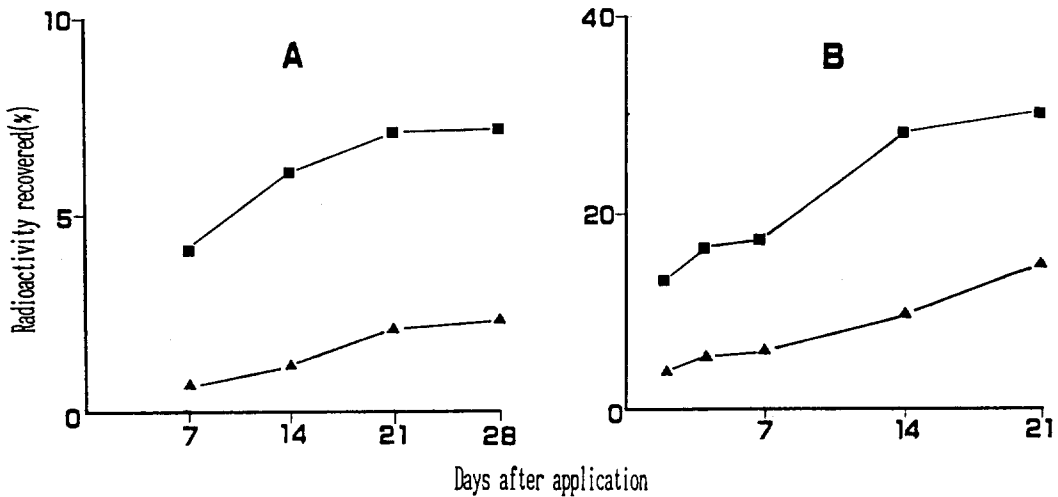


Figure 4. Time sequential analysis of the water soluble metabolites (▲) of PCP from rice plants(A) and rice callus(B), as compared with those of the organic extractable metabolites (■).

수용성 성분의 양이 경시적으로 증가하는 것으로 보아 토양-식물체에서도 conjugation 반응이 주요 대사과정의 하나로 생각된다.

다. Glucose conjugation 反應의 進行

대두와 벼의 cell 추출물을 TLC로 조사하여 glucose conjugate(s)로 추정된 R<sub>f</sub> 0.45분획(PCP의 R<sub>f</sub>는 0.92)이 산과 효소에 의해加水分解되는性質을比較하였다(Table 5). Glucose conjugate(s)는 p-Nitrophenyl-β-D-glucoside를選擇적으로加水分解시키는 것으로 確認된 β-glucosidase에 의해 70~80%, α-glucosidase에 의해서는 무처리의 경우와 差異 없이 소량만이 가수분해 되었다. 그리고 2N HCl에 의해서는 거의 정량적으로加水分解되는 것으로 보아 glucose conjugate(s) 분획 중에는 농약의 대사시험에서 수용성 대사물 조사시 자주 나타나는 non-hydrolyzable conjugates는 포함되어 있지 않은 것으로 생각된다. 그리고 origine 분획은 HCl에 의해서만 33-42% 가수분해될 뿐 기타 효소에 의해서는 거의 분해되지 않았다. 이러한 가수분해 성질로부터 R<sub>f</sub> 0.45 분획은 glucose conjugate(s)(β-glucoside)로 판단하였다. Glucose conjugate(s)는 효소를 처리하지 않은 pH 5.0이나 6.8의緩衝溶液에서도 상당량 가수분해되는(Table 5 참고)

것으로 보아 매우 불안정한 화합물로 생각된다.

TLC상의 R<sub>f</sub> 0.45 분획이 glucose conjugate(s)라는 결과를 참조하여 현탁배양에서 얻은 cell의 수용성 분획 중 glucose conjugate(s)의 함량을 TLC로 조사하였다(Fig. 5). 초기 代數成長期에 glucose conjugate(s)는 대두 및 벼 모두 약제처리 초기에 빠르게 생성되었다(Fig. 5의 A). 특히 대두에서는 약제처리 후 4-24 시간 경과되었을 때 glucose conjugate(s) 양은 전체 처리한 PCP 중 40-43% (수용성 분획 기준 72-74%) 수준이 되었다. 벼의 경우는 같은 처리시간 동안에 비록 대두에 비해 glucose conjugate(s) 양이 1/3 수준으로 낮기는 하지만 수용성 분획기준으로는 70%가 되었다. 이와같이 PCP 처리 초기에 수용성 산물은 대부분

Table 5. Acidic and enzymatic hydrolysis of glucose conjugate(s) separated from the water soluble metabolites of [<sup>14</sup>C]PCP

| Treatment                | Percent hydrolysis |      |
|--------------------------|--------------------|------|
|                          | Soybean            | Rice |
| HCl, 2N                  | 96.4               | 91.6 |
| β-glucosidase(at pH 5.0) | 79.6               | 73.1 |
| α-glucosidase(at pH 6.8) | 17.3               | 15.6 |
| Buffer at pH 5.0         | 13.7               | 14.3 |
| Buffer at pH 6.8         | 8.8                | 10.6 |

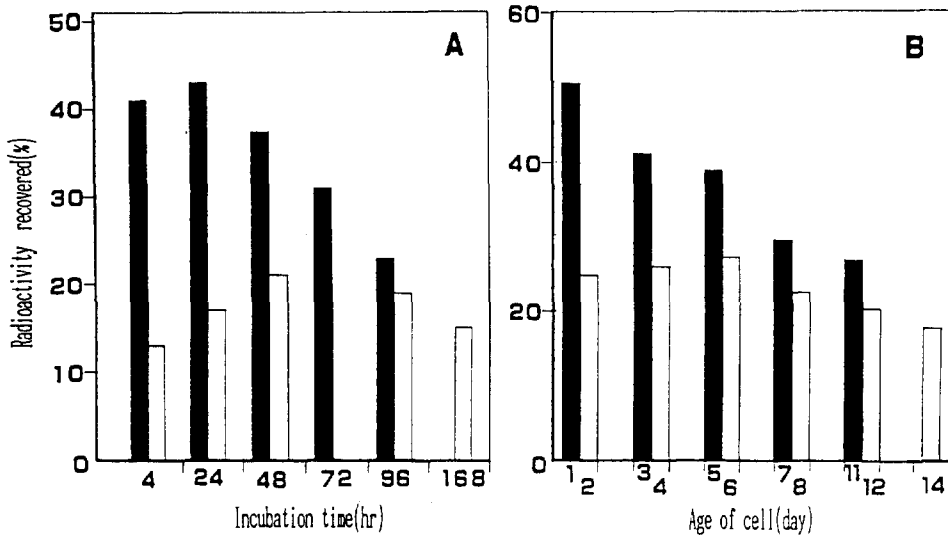


Figure 5. Dependence of the amount of glucose conjugate(s) in the soybean (■) and rice (□) cells on the incubation time of PCP(A) and the age of cells(B).

glucose conjugate(s)인 사실로부터 대두 및 벼의 현탁배양에서 PCP의 1차 대사과정은 glucose conjugation 반응임을 알 수 있었다. 그리고 약제처리 시간이 48시간 이상 경과할 경우 전체 수용성 분획은 비슷함에도 glucose conjugate(s) 함량이 점차 감소하는 것은 생성된 conjugates가 transglycosylation 반응 등에 의해 gentiobiocide와 같은 보다 극성이 강한 고분자로 轉換되기 때문인 것으로 예측된다. 분비기능이 거의 없는 식물체에서 gentiobiocide와 같은 complex conjugates는 약제가 非抽出性 성분으로 轉換되는 중간산물로 추정되고 있다.

생체내 2차 대사 및 xenobiotics 분해 관련 효소들은 cell 생육기 별로 효소활성에 큰 차이가 있는 것으로 알려져 있다. Benzoic acid의 glucose conjugation 반응에 관여하는 acylglucosylase는 초기 대수성장기에, cinnamic acid hydrolase는 대수성장기 말에 각각 활성이 높은 것으로 알려져 있다.<sup>14)</sup> PCP의 경우에도 생육시기에 따라 glucose conjugate(s) 함량이 차이가 있는지 조사하였다(Fig. 5의 B). 벼의 경우 생육초기를 제외하고는 전 시험기간에 걸쳐 대체로 비슷하였고 대두에서는 생육초기에 glucose conjugate(s) 함량이 특히 높았지만 대두와 벼 모두 전체 수용성분획의 50% 이상이었다. 즉 생육상태가 다른 cell에서도 PCP는 1차 수용성

대사물로 판단된 glucose conjugates로 빠르게 轉換됨을 알 수 있었다. 계대배양 초기에 glucose conjugate(s) 양이 상대적으로 많은 것은 cell 分化에 필요한 여러 효소계가 活性化될 때 glucose conjugation 反應에 관여하는 glucosyltransferase의 활성이 이 시기에 높을 것으로 추정된다.

#### IV. 要 約

Pentachlorophenol(PCP)가 大豆 및 벼 縣濁培養과 수도체 중에서 水溶性成分으로 轉換되는 것을 경시적으로 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 현탁배양에서 처리한 PCP의 50%가 수용성 대사물로의 轉換되는 시간은 대두의 경우 4시간, 벼는 48시간 이내였다. 수용성 대사물의 생성 속도와 양은 PCP의 cell 생육 저해 정도와 밀접한 관계가 있었다.
2. 식물 cell에서 PCP의 主 代謝過程은 生育時期 및 藥劑 處理時間을 달리한 전환시험에서 얻은 수용성 대사물 및 glucose conjugates 함량변화 조사와 conjugates가 가수분해되는 성질로부터 glucose conjugates( $\beta$ -anomers)형성 反應임을 알 수 있었다.
3. Cell에서 glucose conjugates는 藥劑處理 초기 및 대수성장기 이전에 생성 속도가 매우 빨라 전체



수용성 대사물의 70% 이상이었으며, 점차 비가수분해성 極性成分으로 전환되었고, 일부는培養液으로 分泌되었다.

### V. 參考文獻

1. Bligh E. G. and W. J. Dyer (1959) : A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 : 911-917.
2. Cohen E., A. Gamliel, and J. Katan(1988) : The fungitoxicity of chlorophenols to the pathogenic fungi, *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* : A structure-activity relationship study, *Pestic. Sci.* 24 : 139-146.
3. Edwards V. T., A. L. McMinn and A. N. Wright (1982) : Sugar conjugates of pesticides and their metabolites in plants-Current status, *Progress in Pesticide Biochemistry*, 2.
4. Frear D. S., H. R. Swanson, and E. R. Mansager (1985) : Alternate pathways of metribuzin metabolism in soybean : Formation of Nglucoside and homogluthathione conjugates, *Pestic. Biochem. Physiol.* 23 : 56-65.
5. Ide A., Y. Niki, F. Sakamoto, I. Watanabe and H. Watanabe (1972) : Decomposition of pentachlorophenol in paddy soil, *Agric. Biol. Chem.* 36 : 1937-1944.
6. Kaufman, D. D., Still, G. G, Paulson G. D., and Bandal S. K (1976) : Bound and conjugated pesticide residues : *Pesticide conjugates-glycosides*, *ACS Symp. Ser.* 29, American Chemical Society, Washington.
7. Lewer P. and W. J. Owen (1989) : Amino acid conjugation of Triclopyer by soybean cell suspension cultures, *Pestic. Biochem. Physiol.* 33 : 249-256.
8. Mumma R. O. and R. H. Hamilton (1979) : Xenobiotic metabolism in higher plants : *In vitro tissue and cell culture techniques*. *ACS Symp.* 97 : 35-76
9. Ohira K., K. Ojima, and A. Fujiwara (1973) : Studies on the nutrition of rice cell culture I : A simple, defined medium for rapid growth in suspension culture, *Plant and Cell Physiol.* 14 : 1113-1121.
10. Ozawa K. and A. Komamine (1989) : Establishment of a system of high-frequency embryogenesis from long-term cell suspension cultures of rice (*Oryza sativa* L.), *Theor. Appl. Genet.* 77 : 205-211.
11. Paulson, G. D. and R. H. Hamilton (1978) : Xenobiotic metabolism in higher plants : *In vitro tissue and cell culture techniques*. *ACS Symp. Ser.* 97, American Chemical Society, Washington.
12. Ruckdeschel G. and G. Renner (1986) : Effects of pentachlorophenol and some of its known and possible metabolites on fungi, *Appl. Environ. Microbiol.* 51 : 1370-1372.
13. Sandermann H., D. Scheel, and Th. V. D. Trenck (1983) : Metabolism of environmental chemicals by plants-copolymerization into lignin, *J. Appl. Poly. Sci. Applied Polymer Symposium*. 37 407-420
14. Sandermann H., D. Scheel, and Th. V. D. Trenck (1984) : Use of plant cell cultures to study the metabolism of environmental chemicals, *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 8 : 167-182.
15. Schuphan I., A. Haque and W. Ebing (1984) : Ecochemical assessment of environmental chemicals Part 1 : Standard screening procedure to evaluate chemicals in plant cell cultures, *Chemosphere*. 13 : 301-313.
16. Shimabukuro R. H. and W. C. Walsh (1979) : Xenobiotic metabolism in plants : *In vitro tissue, organ. and isolated cell techniques*. *ACS Symp. Ser.* 97 : 3-34.
17. Weiss U. M., P. Moza, I. Scheunert, A. Haque, and F. Korte (1982) : Fate of pentachlorophenol in rice plants under controlled conditions, *J. Agric. Food Chem.* 30 : 1186-1190.
18. 柳 基中 (1989) : 大豆 protoplast의 細胞壁再生에 대한 benzyladenine의 영향, 서울대학교 박사학위 논문