

호밀, 귀리 추출물로부터 제초활성물질 탐색 및 동정

양계진* · 김광호** · 정일민**

Screening and Identification of Natural Herbicidal Active Substance in Rye and Oat Extracts

Yang, K.J.,* K.H. Kim** and I.M. Chung**

ABSTRACT

This study was conducted to identify allelopathic compounds in rye and oat straw extracts by HPLC analysis. These extracts were analyzed with 12 standard chemicals including salicylic acid. 11 chemicals in rye extract except for naringin and in oat extract except for catechin were identified. Salicylic acid(8.34mg/g) in rye straw extracts and naringin(7.50mg/g) in oat straw extracts among these standard chemicals were identified as the largest amount substance. The germination of *Chenopodium ablum* seeds was significantly inhibited by these chemicals at 10⁻³ and 10⁻⁴M concentrations as compared to control. Salicylic acid in rye and naringin in oat were considered as the major allelopathic substances although allelopathy may be caused by an interaction of many substances. Yet many unidentified chemical compounds are present in both extracts.

Key words : rye, oat, screening, identification, HPLC

서 론

Allelopathy는 어떤 식물체가 함유하고 있는 물질이 다른 식물체의 성장이나 발아를 억제하는 생화학적 작용¹⁸⁾으로서 최근 환경오염을 방지하고 무공해농산물을 생산하기 위하여 이러한 Allelopathy를 이용한 잡초의 생물학적 방제나 allelopathy현상에 관여하는 대사산물을 이용한 천연제초제개발연구가 활발히 진행되고 있다^{15,17,21)}. Allelopathy를 일으키는 물질은 주로 생합성되는 경로에 따라 Phenol류, Quinone류,

Juglone류, Tannin류, Alkaloid류, Cyanohydlin류, Terpenoid류로 분류되며¹⁸⁾ 자연계에는 수많은 식물들이 이러한 물질들을 함유하고 있는 것으로 알려져 있는데, 벼^{4,6,10,13,14)}를 비롯하여 보리^{11,13,23)}, 밀^{8,9,12,16,20)}, 호밀^{2,3,5,12,21)}, 귀리^{7,8)}, 수수^{8,15,23)}, 옥수수^{5,8)}도 이러한 Allelopathic물질을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다. Chou와 Patrick⁵⁾은 호밀잔유물에서 추출한 수용성물질이 25~50ppm농도에서 종자발아를 억제시켰으며, Barnes와 Putnam^{2,3)}은 호밀의 Allelopathic물질이 잡초의 생체중을 93%까지 감소시켰을 뿐

* 중부대학교 자연과학대학(College of Natural Resources, JoongBu University, Chungnam, 312-940, Korea)

** 건국대학교 농업생명과학대학(College of Agriculture and Life Science, KonKuk University, Seoul, 143-701, Korea)

<'98. 11. 5 접수>

만 아니라 잡초의 발아 및 생육을 억제한다고 하였고, 유와 정²³⁾은 보리와 수수의 식물체 추출물이 잡초의 발아와 초기생육에 영향을 미친다고 하였다. 따라서 이러한 Allelopathy 작물을 어떤 특정한 잡초를 방제하는데 이용한다면 제초제의 사용을 최소한으로 사용해야 하는 특용작물, 약용작물, 생채 채소류 및 산채류 등의 무공해 농산물을 생산하는데 매우 활용가치가 높을 뿐만 아니라 작물 잔유물을 토양피복물로 이용한다면 토양수분보지력과 유기물함량도 증가시킬 수 있고, 잡초의 방제효과도 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

본 실험은 고소득작물인 인삼의 생산비 절감을 위한 새로운 재배법을 확립하기 위한 방안으로 인삼포의 잡초 발생을 억제시키는 allelopathic식물에 대한 제초활성물질을 탐색 및 동정하기 위하여 실시되었다.

재료 및 방법

Allelopathy현상을 나타내는 호밀과 귀리가 함유하는 allelopathic물질을 분석하기 위하여 auto-sampler가 부착된 HPLC(Yolin Inc.)를 이용하였다.

1. 분석시료액 조제과정 및 주입

건조 분쇄된 호밀과 귀리 2g에 2ml HCl (0.1N)과 acetonitrile(10ml)을 혼합한 후 2시간 동안 정치, 여과(Whatman No. 42), 건조과정을 거친 후 80% MeOH 10ml로 건조된 물질을 용해, 0.45 μ m syringe filter를 이용하여 여과시킨 용액을 HPLC에 주입하였다.

2. HPLC 분석조건

HPLC 분석조건은 고정상은 YMC AM-303 column(ODS, 4.6 \times 250mm)을 사용하였으며, 이동상은 0.018M ammonium acetate에 물과 glacial acetic acid를 각각 98%, 2%를 혼합한 용액을 용매 A, 0.018M ammonium acetate에 water, methanol, butanol, glacial acetic acid를 각각 68%, 25%, 5%, 2%로 혼합한 용액을 용매 B로 하

여 추출물과 표준물질을 (a)분석초기에서 1분까지는 용매 B를 10%로 유속은 1.0ml/min, (b)1.0에서 21분까지는 용매 B를 10%에서 25%로 증가하는 농도구배(linear gradient), (c)21.0에서 36분까지는 용매 B를 25에서 45%로 증가하는 농도구배, (d)36.0에서 56분까지는 용매 B를 45%에서 100%로 증가하는 농도구배, (e)50.0에서 50.15분까지는 유속을 1.20ml/min 증가, (f)82.0에서 82.15분까지는 용매 B를 100%에서 10% 조절, (g)92.0에서 92.15분까지는 유속을 1.00ml/min 감속, (h)99분에서는 sample loop을 세척 및 윗의 농도구배를 반복하는 조건에서 1회 주입량은 20 μ l였으며 UV detector의 파장은 280nm, 감도는 0.05로 조절하여 분석하였다.

3. 표준검량선 작성

Chlorogenic acid의 11개의 표준물질을 methanol에 용해시켜 0.1 - 25 μ g/ml 범위의 표준용액을 조제하여 위의 조건에서 HPLC분석을 실시하고 peak area로부터 검량선을 작성하였다. 추출물과 표준물질의 retention time의 비교는 표준물질을 개별적으로 분석한 것과 표준물질을 혼합하여 3회 분석한 평균값을 이용하였다.

4. 동정된 물질을 이용한 활성검정

HPLC의 분석결과 표준물질과 호밀과 귀리의 추출물간의 retention time이 일치된 표준물질을 이용하여 어떤 물질이 활성을 보이는지를 검정하기 위하여 명아주(*Chenopodium album*) 종자를 대상으로 실시하였다. 사용된 표준물질은 benzoic acids계열의 salicylic acid(M.W.=138.1), cinnamic acids계열의 caffeic acid(M.W.=180.2), ferulic acid(M.W.=194.2), *p*-coumaric acid(M.W.=194.2), cinnamic acid 유도체 계열의 chlorogenic acid(M.W.=354.3), flavanones계열의 narigenin (M.W.=272.3), hesperidin(M.W.=610.6), *d*-catechin (M.W.=290.3), flavonone glycosides계열의 naringin (M.W.=580.5), flavones계열의 myricetin(M.W.=318.2), quercetin(M.W.=338.3), kaempferol(M.W.=286.2) 등 12종류와 allelopathy현상에 관여하는 물질로 알려진 benzoic acids계열 syringic acid

(M.W.=198.2), gallic acid(M.W=188.1), genitisc acid(M.W=154.1)을 이용하였다. 이 표준물질들을 증류수에 용해시켜 농도를 $10^{-3}M$ 과 $10^{-4}M$ 로 조절하였고 대조구로서 증류수를 사용하였다. 이 표준물질의 pH를 측정하였고 조사항목 중 총 발아율은 총 공시종자에 대한 발아종자의 백분율로, 평균발아일수는 발아실험 기간중 매일 발아한 종자수를 발아일수에 곱하여 그 합계를 발아율로 나눈 것이며 발아세는 총 발아 조사기간의 중간발아조사일 까지의 발아율로 계산하였다. 이 실험은 완전임의배치법 3반복으로 실시하였으며 통계분석은 SAS를 이용하였다¹⁹⁾.

결과 및 고찰

Allelopathy 물질 분석

자연 생태계에는 수많은 식물들이 Allelopathy를 일으키는 물질들을 함유하고 있는데, 이러한 물질들은 생합성되는 경로에 따라 주로 phenol류, alkaloid류, terpenoid류^{17,18,22)}로 알려져 있으며, 특히 맥류인 밀^{8,9,12,16,20)}, 호밀^{2,3,5,12,21)}에는 phenol류 물질이 많이 함유되어 있는데, 이 중 benzoic acids, cinnamic acids 계열의 화합물이 주로 화본과 식물의 Allelopathy현상에 관여하고 있는 것으로 보고되어 있으므로^{5,10,12,18)}, 이러한 물질들 중에서 12개의 물질을 선발, 표준품을 이용하여 분석한 결과는 그림 1과 같으며 호밀과 귀리 추출액을 HPLC를 이용하여 분

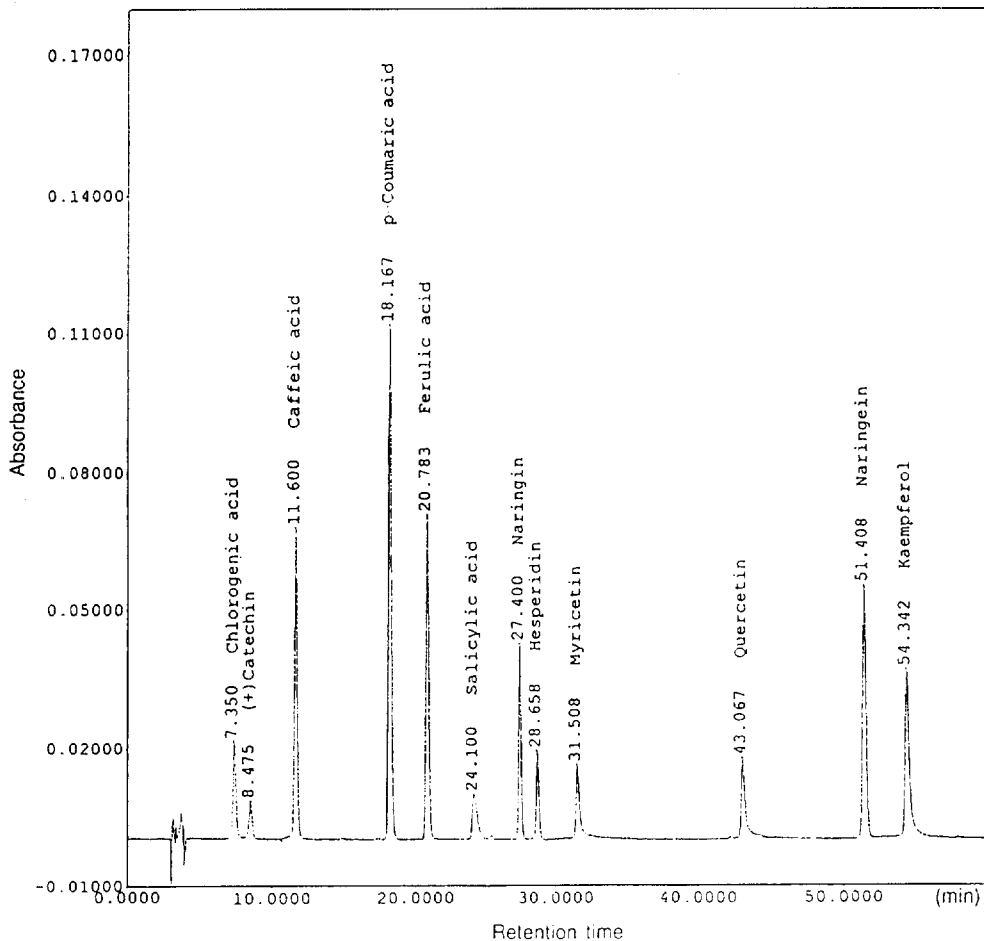


Fig. 1. HPLC chromatogram of standard chemical mixtures.

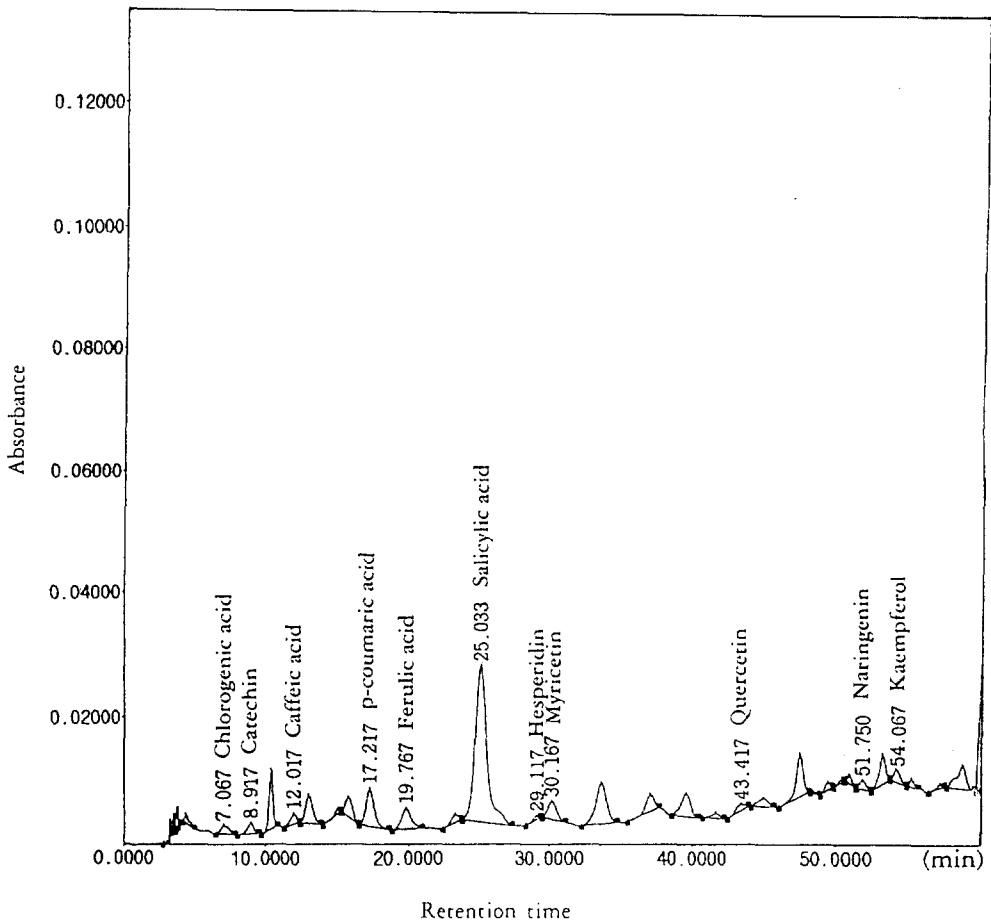


Fig. 2. HPLC chromatogram of rye extract.

석한 결과는 그림 2와 3과 같다.

호밀추출액에는 salicylic acid가 25.033분에서 귀리추출액에서는 naringin이 27.050분에서 각각 가장 많이 검출되었다. 표준품의 HPLC 크로마토그램(그림 1)과 호밀의 HPLC 크로마토그램(그림 2)과 비교했을 때, *p*-coumaric acid, ferulic acid 및 salicylic acid의 peak가 비교적 일치하였으며, 또한 귀리의 HPLC 크로마토그램(그림 3)과는 ferulic acid, salicylic acid, naringin, myricetin 및 kaempferol의 peak가 비교적 일치하는 것으로 나타났다.

호밀짚과 귀리짚에 대한 Allelopathy물질을 분석한 결과는 표 1과 같다. 호밀짚의 경우 분석된 12개 물질 중 benzoic acids계열인 salicylic acid가 8.34mg/g(0.834%)로서 가장 많은 함유량

을 보였으며, flavanones 계열인 hesperidin이 0.10mg/g(0.01%), flavones 계열인 quercetin이 0.25mg/g(0.025%)으로 함유량이 낮았다. 또한, flavanone glycosides 계열인 naringin은 전혀 동정되지 않았다. 따라서 호밀짚 추출액은 benzoic acids 계열(salicylic acid)과 cinnamic acids 계열(*p*-coumaric acid)의 화합물이 flavonoids계열의 화합물보다 상대적으로 더 많은 양을 함유하고 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 호밀품종, 줄기, 뿌리 등 부위간 물질 함유량에 차이는 있으나 호밀의 줄기에는 salicylic acid, coumaric acid 등의 phenolic acid가 많이 함유되어 있다는 유²⁴⁾의 보고와도 일치하였다.

한편, 귀리짚의 추출물에서는 cinnamic acid 계열인 caffeic acid와 flavanones 계열인 catechin

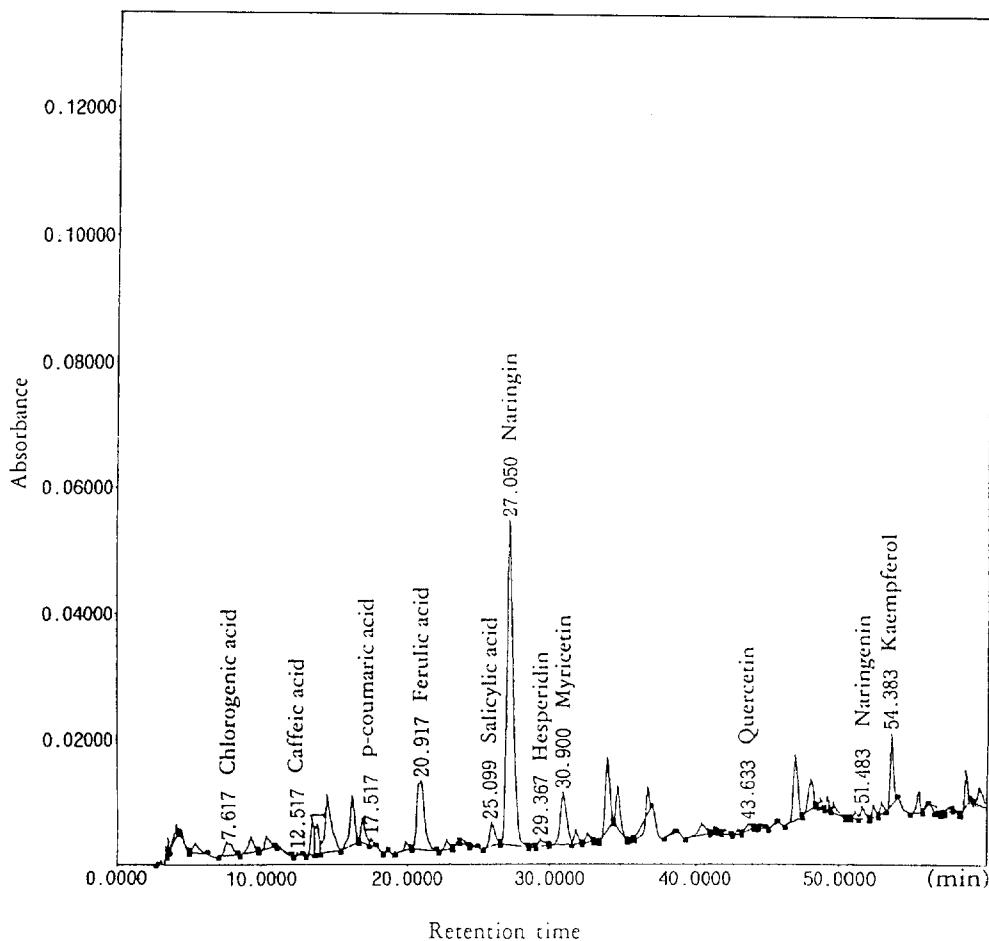


Fig. 3. HPLC chromatogram of oat extract.

Table 1. The result of HPLC analysis of rye and oat extracts.

Class	Chemicals	Retention time (min)		Relative peak area(%)		Concentration (mg/g)	
		Rye	Oat	Rye	Oat	Rye	Oat
Benzoic acids	Salicylic acid	25.033	25.099	33.357	0.100	8.34	0.03
Cinnamic acid derivatives	Caffeic acid	12.017	12.517	1.179	0.005	0.45	0.00
	Chlorogenic acid	7.067	7.617	1.199	1.423	0.30	0.36
	Ferulic acid	19.767	20.917	3.623	7.541	0.91	1.89
	<i>p</i> -coumaric acid	17.217	17.517	5.626	0.032	1.41	0.01
Flavanone glycosides	Naringin	0.000	27.050	0.000	29.987	0.00	7.50
Flavones	Myricetin	30.167	30.817	2.809	0.796	0.70	0.20
	Quercetin	43.417	43.633	0.998	0.453	0.25	0.11
	Kaempferol	54.067	54.383	1.309	3.532	0.33	0.88
Flavanones	Catechin	8.917	0.000	1.392	0.000	0.35	0.00
	Hesperidin	29.117	29.367	0.398	0.118	0.10	0.03
	Naringenin	51.175	51.483	0.935	0.658	2.33	0.16

이 전혀 동정되지 않았으며, naringin은 호밀짚에서는 동정되지 않은 반면에 귀리짚에서는 7.50mg/g(0.750%)으로 가장 많이 함유하고 있는 것으로 나타났다. 이러한 현상은 호밀짚과 귀리짚 추출물이 이러한 계통의 물질을 함유하고 있지 않거나 혹은 함유하고 있다고 할지라도 분석된 추출물의 농도가 매우 낮아서 검출되지 않은 것으로 생각되었다.

동정된 물질을 이용한 활성검정

표 2는 Allelopathy 효과를 나타내는 물질의 표준품을 이용하여 명아주 종자에 대한 발아 시험을 한 결과이다. 표준품의 10^{-3} M과 10^{-4} M 두 농도 처리간에는 통계적인 유의성을 보이지 않았으나 대체로 농도가 높을수록 명아주 종자

의 발아를 억제하는 것으로 나타났다.

표준품을 10^{-3} M과 10^{-4} M의 농도로 조절하여 명아주의 발아율 조사결과 10^{-3} M에서는 salicylic acid가 39.3%, 10^{-4} M에서는 naringin이 40.7%로 가장 낮은 발아율을 보였다. 그리고, 평균 발아 일수에서 10^{-3} M의 경우 대조구(2.23일)에 비해 quercetin과 hesperidin이 각각 2.48일로서 통계적인 유의성은 보이지 않았으나 본 시험에 사용된 15개 표준품중 가장 발아를 지연시키는 물질로 나타났다. 발아세에서는 10^{-3} M의 경우 naringin이 36.0%로 대조구(59.3%)에 비해 가장 억제적으로 작용하였으며, salicylic acid도 36.7%로 낮게 나타났다. 이외에도 chlorogenic acid, quercetin 및 hesperidin도 각각 38.7%의 낮은 발아세를 나타냈다. 또한, Allelopathy 물질로 알

Table 2. Allelopathic effects of standard chemicals on *Chenopodium ablum* seed.

Chemicals	Concentrations(M)	pH	Parameters		
			GP ¹⁾ (%)	MGT ²⁾ (day)	GE ³⁾ (%)
Control		7.0	67.3	2.23	59.3
Salicylic acid	10^{-3}	3.3	39.3	2.26	36.7
	10^{-4}	5.0	44.7	1.83	41.3
Caffeic acid	10^{-3}	4.3	50.7	2.29	45.3
	10^{-4}	6.0	56.7	2.23	49.3
Chlorogenic acid	10^{-3}	4.0	44.0	1.97	38.7
	10^{-4}	5.3	44.5	2.13	37.3
Ferulic acid	10^{-3}	4.0	53.3	1.94	49.3
	10^{-4}	5.4	60.7	2.28	50.7
<i>p</i> -coumaric acid	10^{-3}	4.1	46.7	2.29	41.3
	10^{-4}	5.4	49.3	1.99	44.7
Naringin	10^{-3}	4.0	40.7	2.38	36.0
	10^{-4}	5.8	46.0	2.40	38.7
Myricetin	10^{-3}	6.0	45.3	2.15	40.7
	10^{-4}	5.7	52.0	1.92	49.3
Quercetin	10^{-3}	5.6	47.3	2.48	38.7
	10^{-4}	6.3	51.3	2.52	43.3
Kaempferol	10^{-3}	5.7	47.3	2.12	43.3
	10^{-4}	6.1	53.3	2.01	48.0
Catechin	10^{-3}	6.6	52.7	2.00	46.7
	10^{-4}	6.4	56.0	2.05	53.3
Hesperidin	10^{-3}	6.6	47.3	2.48	38.7
	10^{-4}	6.4	53.3	2.75	42.0
Naringenin	10^{-3}	6.5	48.0	2.37	40.0
	10^{-4}	6.6	56.0	2.23	48.7
CV(%)			12.9	11.9	13.0
			13.4	10.7	14.4
LSD(0.05)			10.3	0.43	9.2
			11.8	0.39	11.1

1) Germination percentage,

2) Mean germination time,

3) Germinative speed

려진 benzoic acids 계열인 gallic acid, genitistic acid 및 syringic acid에서 genitistic acid만이 발아율(43.3%)과 발아세(38.0%)에서 낮은 수치를 보였다.

이상의 결과를 볼 때, 호밀짚에는 Allelopathy 현상에 관여하는 물질로 알려진 것들 중에서 salicylic acid가, 귀리짚에서는 naringin이 가장 많이 함유되어 있음을 알 수 있었으며, 또한 이 물질들이 표준품중에서 명아주 종자의 발아를 가장 억제하는 것으로 보아 Allelopathy 효과를 나타내는 주요 성분의 하나로 판명되었다. 이러한 결과는 $10^{-3}M$ 농도에서 salicylic acid 등의 phenolic acids를 이용한 바랭이, 개비름, 쇠비름, 닭의장풀의 켈루스 생장을 억제시켰다는 유²⁴⁾의 보고에 의해서도 뒷받침되고 있다.

벼^{4,6,10,13,14)}를 비롯하여 보리^{11,13,23)}, 밀^{8,9,12,16,20)}, 호밀^{2,3,5,12,21)}, 귀리^{7,8)}, 수수^{8,15,23)}, 옥수수^{5,8)} 추출물이 일부 잡초에 대하여 Allelopathy 효과가 있음은 이미 보고된 바 있어 본 시험의 결과를 실제 인삼 재배에서 이용하는데는 아무런 문제가 없을 것이다. 그러나 예정지 관리시, 묘삼포 또는 본포에서의 이용 등의 이용시기와 인삼밭에 대한 추출액 처리 또는 짚이나 왕겨로 피복 처리하는 등의 구체적인 처리 방법이 구명되어야 잡초 방제를 위한 실용적인 생력 재배 기술이 확립될 수 있을 것으로 생각하며 호밀, 귀리의 추출물로 부터 잡초 발생 억제 효과가 있는 Allelopathy물질을 동정과 표준품을 이용한 발아시험결과(그림 1,2,3, 표 1,2), salicylic acid와 naringin 등의 물질이 Allelopathy효과가 있음이 미흡하나마 확인되었으므로 이러한 Allelopathy물질을 추출 분리하여 인삼포장에 잡초 방제 이용을 위한 천연제초제의 기초자료로 활용이 가능 할 것으로 생각되었다.

적 요

고소득 작물인 인삼의 생산비 절감 및 고품질화를 위한 새로운 재배법을 확립하기 위하여 Allelopathic 식물이 함유하고 있는 제초활성물질 탐색 동정한 결과는 다음과 같다.

12종류의 표준품을 이용하여 호밀과 귀리의 추출물에 대한 Allelopathy 물질을 분석한 결과, 두 추출물간에 함유하는 물질의 차이를 보였으나 호밀에서는 benzoic acids계열인 salicylic acid (8.34mg/g), 귀리에서는 flavonone glycosides계열인 naringin(7.50mg/g)이 가장 많이 함유되어 있음을 알 수 있었으며, 동정된 표준품을 이용하여 $10^{-3}M$ 과 $10^{-4}M$ 에서 명아주 종자에 대한 발아율, 평균 발아 일수 및 발아세를 조사한 결과 대조구에 비하여 통계적으로 낮은 값을 보여 salicylic acid, naringin를 비롯하여 이러한 물질들이 Allelopathy를 나타내는 성분일 것으로 생각되었다.

참 고 문 헌

1. Alsaadawi, I.S., J.K. Al-uqaili, A.J. Alrubeaa and S.M. Al-Hadithy. 1986. Allelopathic suppression of weeds and nitrification with selected cultivars of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. J. Chem. Ecol. 12 : 209-220.
2. Barnes, J.P. and A.R. Putnam. 1983. Rye residues contribute weed suppression in notillage cropping systems. J. Chem. Ecol. 9 : 1045-1057.
3. Barnes, J.P. and A.R. Putnam. 1986. Evidence for allelopathy by residues and aqueous extracts of rye(*Secale cereale* L.). Weed Sci. 34 : 384-390.
4. Chou, C.H. and H.J. Lin. 1976. Autointoxication mechanism of *Oryza sativa* I. Phytotoxic effects of decomposition rice residues in soil. J. Chem. Ecol. 2(3) : 353-367.
5. Chou, C.H. and Z.A. Patrick. 1976. Identification and phytotoxic in activity of compounds produced during decomposition of corn and rye residue in soil. J. Chem. Ecol. 2(3) : 369-387.
6. Chung, I.M., K.H. Kim, J.K. Ahn and H.J. Ju. 1997. Allelopathic potential evaluation of rice varieties on *Echinochloa crus-galli*. K.J.

- weed Sci. 17(1) : 52-58.
7. Fay, P.K. and W.B. Duke. 1977. An assessment of allelopathic potential in *Avena* germplasm. *Weed Sci.* 22 : 224-228.
 8. Guenzi, W.D., T.M. McCalla and F.A. Norstade. 1967. Presence and persistence of phytotoxin substances in wheat, oat, corn, and sorghum residues. *Agron. J.* 59 : 163-165.
 9. Hicks, S.K., C.W. Wendt, J.R. Gannaway and R.B. Baker. 1989. Allelopathic effects of wheat straw on cotton germination, emergence, and yields. *Crop Sci.* 29 : 1057-1061.
 10. Kim, K.W., K.U. Kim, D.H. Shin, H.Y. Kim, H.J. Jeong, G.Y. Chung, and G.S. Kwon. 1997. Isolation of allelopathic potentials produced by rice(*Oryza sativa* L.) cultivars. *Bulletin of Institute of Agricultural Science and Technology.* 4 : 71-80.
 11. Kwak, S.S. and K.U. Kim. 1984. Effects of major phenolic acids identified from barley residues on the germination of paddy weeds. *K.J. Weed Sci.* 4(1) : 39-51.
 12. 권순태 · 김길웅. 1985. 맥류작물(밀, 호밀)의 잔유물로부터 동정된 phenolic compounds가 잡초의 발아 및 생육에 미치는 영향. *한국잡초학회지.* 5(2) : 121-130.
 13. 이춘우 · 김창석 · 장영희 · 연규복. 1991. 잡초생장에 미치는 벧짚, 보리짚의 Alleopathic Effect. *한국잡초학회지.* 11(2) : 122-127.
 14. 이춘우. 1995. 벧짚 추출물에 대한 보리 및 뚝새풀의 생리 활성 반응. *동국대학교. 박사학위논문.* 78p.
 15. Lehle, F.R. and A.R. Putnam. 1982. Quantification of allelopathic potential of sorghum residues by novel indexing of Richards function fitted to cumulative cress seed germination curves. *Plant Physiol.* 69 : 1212-1216.
 16. Liebl, R.A. and A.D. Worsham. 1983. Inhibition of pitted morningglory(*Ipomoea lacunosa* L.) and certain other weed species by phytotoxic components of wheat(*Triticum aestivum* L.) straw. *J. Chem. Ecol.* 9 : 1027-1043.
 17. Putnam, A.R. 1988. Allelochemicals from plant as herbicides. *Weed Technol.* 2 : 510-518.
 18. Rice, E.L. 1984. *Allelopathy.* 2nd Edition. Academic Press, New York.
 19. SAS Institute. 1985. *SAS User's Guide ; Basics.* 5th ed. SAS Institute, Cary, NC.
 20. Steinsiek, T.W., L.R. Oliver and F.C. Collins. 1982. Allelopathic potential of wheat(*Triticum aestivum*) straw on selected weed species. *Weed Sci.* 30 : 495-497.
 21. Vasey N.M., B.M. John and A.W. Leslie. 1995. Effects of fertility on biomass, phytotoxicity, and allelochemical content of cereal rye. *J. Chem. Ecol.* 21(1) : 81-96.
 22. William, R.D. and R.E. Hoagland. 1982. The effects of naturally occurring phenolic compounds on seed germination. *Weed Sci.* 30 : 206-212.
 23. 유창연 · 정일민. 1997. 보리, 수수의 식물체 추출물이 잡초의 발아와 초기생육에 미치는 영향. *한국환경농학회지.* 16(1) : 67-71.
 24. 유창연. 1996. 주요특용작물의 allelopathy를 이용한 잡초방제. *농촌진흥청. 특정연구과제 제3차년도 보고서.* 1-48.