

자외선 조사 포도 잎에서 Stilbene 화합물의 동정과 함량의 변화

최성진*

대구가톨릭대학교 생명공학과

The Identification of Stilbene Compounds and the Change of Their Contents in UV-irradiated Grapevine Leaves

Seong-Jin Choi*

Department of Biotechnology, Catholic University of Daegu, Gyeongsan 712-702, Korea

Abstract. Stilbenes are polyphenolic natural products, which have antioxidative and antifungal activities. In some plants, including grapevine, the stilbene compounds, as resveratrol derivatives, exist in very diverse forms. Experiments to identify the individual stilbene compounds were carried out first to quantify them in UV-irradiated grapevine leaves. For this, stilbene glycosides were extracted from grapevine leaves which irradiated intensively with UV light. The glycoside samples were hydrolyzed by β -glucosidase, before analyzed by HPLC-mass spectrometer at each m/z corresponding to the mass of specific stilbenes. As results, in chromatograms, the enzymatic hydrolysis resulted in decrease and increase of the peaks expected for glycosides and aglycones, respectively. The samples were also exposed to sunlight in order to photo-isomerize the stilbene compounds. The light exposure resulted in disappearance and appearance of peaks expected for *trans*- and *cis*-isomers of stilbenes, respectively. Such a change of the peaks in chromatograms provided information needed for the inference to peak components. In this way, it was possible to identify 16 kinds of stilbene compounds from grapevine leaves. The identified stilbenes were quantified from grapevine leaves irradiated mildly by UV light. The UV-irradiation increased markedly in the content of stilbene compounds, especially *trans*-resveratrol by several hundredfold. In addition, piceatannol, which is a mere minor component of stilbenes in control leaves and a more active radical scavenger than resveratrol, was also increased by several tenfold by the treatment. The increase in stilbene contents as influenced by UV irradiation seems to be one of the stress coping responses of grapevine as a hormesis phenomenon.

Additional key words: β -glucosidase, photo-isomerization, piceid, resveratrol, uv-hormesis

서 언

포도, 땅콩, 오디 등 몇몇 종류의 식물에서 발견되는 stilbene 은 다양한 생물 활성을 가지고 있어서 주목을 받고 있는 천연물의 한 종류이다. Stilbene 화합물은 동물 모델에서 암이나 심혈관계 질환의 예방 또는 완화 효과를 나타내는 것으로 보고되어 있다(Baur and Sinclair, 2006). 한편, 식물에서 stilbene 화합물은 phytoalexin의 일종으로서 균류에 대한 항균 활성이 있어서 감염의 진전을 저해하는 작용을 하는데(Chong et al., 2009; Morales et al., 2000), 병원균의 침입(Gehlert et al., 1990; Roh et al., 2005) 또는 자외선 조사와

같은 물리적 스트레스(Lancake and Pryce, 1977; Wang et al., 2010)에 의해 식물체내 stilbene 함량이 증가하는 것으로 알려져 있다.

Stilbene synthase에 의해 합성된 resveratrol(3,5,4'-trihydroxy-stilbene)을 기본 모체로 하여 이에 배당체화(glycosylation), 수산화(hydroxylation), 메톡시화(methoxylation) 또는 중합 등의 유도체화 반응이 가해져 합성되는 stilbene 화합물은 식물에서 수십 종류가 발견되어 있다(Chong et al., 2009). Stilbene 화합물의 생물 활성은 부분적으로는 항산화 활성에 기인하는데(Fabris et al., 2008; Jang et al., 1997), resveratrol의 배당체 또는 수산화 유도체는 resveratrol 그 자체보다 강

*Corresponding author: sjchoi@cu.ac.kr

※ Received 8 May 2011; Accepted 9 June 2011. 본 연구는 농촌진흥청의 연구비 지원에 의해 '지역특화작목연구개발사업'의 연구과제로 수행되었음.

한 항산화 활성을 나타낼 뿐만 아니라(Fabris et al., 2008; Lorenz et al., 2003), 당 또는 수산기의 결합에 의해 안정성이 나 체내 이동성이 더욱 증대되는 것으로 알려져 있다(Fabris et al., 2008; Regev-Shoshani et al., 2003).

Lancake and Pryce(1977)에 의해 포도 잎에서 resveratrol 함량이 자외선 조사에 의해 증대된다는 사실이 처음 보고된 이래, 자외선에 의한 resveratrol 증폭에 대해 여러 연구가 이루어져왔다(Sales and Resurreccion, 2009; Wang et al., 2010). 그러나 식물에는 매우 다양한 종류의 stilbene 화합물이 존재하는데 자외선 조사에 따른 다양한 stilbene 화합물의 총체적 변화에 대한 연구는 많지 않아 보인다.

다양한 종류의 stilbene 화합물을 분석하는데 있어서 표준 물질의 확보가 요구된다. 그러나 현재 모든 종류의 stilbene 화합물에 대한 표준 물질이 시판되고 있지는 않다. 이에, 본 연구에서는 자외선을 조사한 포도 잎에서 resveratrol 배당 유도체를 추출한 후 이를 효소적으로 가수 분해하고 광 노출에 의해 stilbene 화합물을 이성질화하는 방법을 활용하여 표준 물질의 확보 없이 다양한 종류의 stilbene 화합물을 동정하였다. 이러한 분석 방법을 바탕으로 자외선 조사에 의해 유발되는 포도 잎에서의 stilbene 화합물의 총체적 함량 변화를 조사하고 이를 UV hormesis 및 원예적 활용과 관련하여 고찰하였다.

재료 및 방법

포도 잎의 자외선 조사

6월 중순경 무가온 비닐 하우스에서 생육 중인 포도 (*Vitis vinifera* cv. Campbell Early) 잎에 자외선을 조사하였다. 자외선 등(germicidal UV lamp, G30T08 30W, Sankyo Denki, Japan)을 포도 잎에서 약 30cm 간격을 두고 수관 하부에 설치한 후 오전 중에 2분간 점등하였다. 실험처리는 stilbene 화합물의 정성적 동정과 자외선 조사에 따른 stilbene의 정량적 변화 분석의 두 종류로 구분하여 수행되었다. 첫번째 동정 실험에서는 대량의 stilbene 화합물을 획득할 목적으로 포도 잎에 3일에 걸쳐 매일 2분간 자외선을 조사한 후 포도 잎을 수확하였다. 이러한 반복적인 자외선 조사는 포도 잎에 장해를 유발하여 흑색 반점이 형성되고 갈변 증상이 나타났으나 stilbene 화합물의 대량 확보에는 유리하였다. 한편, 두번째 자외선 조사 효과 분석 실험에서는 단 하루만 2분간 자외선을 조사한 후 3일째에 포도 잎을 수확하였다. 이러한 처리에서는 자외선 조사에 따른 장해가 관찰되지 않았다. 수확한 포도 잎은 가지 선단부로부터 5장, 기부로부터 5장까지의 잎을 각각 유엽과 성엽으로 구분한 후 액체 질소에 동결하여 분석에 이용할 때까지 -70°C 에 보관하였다.

Stilbene의 추출

Stilbene의 동정을 목적으로 한 실험에서는 대량 추출을 목적으로 100g의 동결 포도 잎(자외선 3회 조사)에 250mL의 메탄올을 가하여 stilbene을 추출하였다. 잎에 메탄올을 가하고 믹서로 간 후 나일론 천으로 압착하여 얻은 추출액을 다시 20분간 25,000x g로 원심분리하였다. 원심분리하여 획득한 상징액은 rotary evaporator를 이용하여 40°C 에서 진공을 가함으로써 메탄올 용매를 제거 농축하였으며, 농축액은 다시 한번 원심분리 과정을 거쳐서 stilbene 화합물의 동정을 위한 배당체 시료의 준비에 이용되었다. 한편, 자외선 조사 효과를 분석하는 실험에서는 1g의 동결 잎(자외선 1회 조사)에 4mL의 80%(v/v) 메탄올을 가하여 stilbene을 추출하였다. 막자 사발에서 포도 잎에 용매를 가하고 약간의 해사와 함께 마쇄하여 얻은 추출액을 20분간 25,000x g로 원심분리하였다. 원심분리 후 상징액을 취하여 즉시 HPLC에 주입하여 stilbene 화합물을 분석하였다.

Stilbene 동정을 위한 배당체 시료의 준비

자외선을 3회 조사한 포도 잎에서 위의 추출 과정을 통하여 준비한 농축 시료로부터 stilbene 배당 유도체를 확보하기 위하여 다음과 같은 용매 추출법을 적용하였다. 15mL의 시료 용액에 동량의 ethylacetate를 가하고 혼합한 후 분액하는 과정을 3회 반복하여 stilbene 화합물을 ethylacetate 층으로 회수하였다. 회수한 ethylacetate 층은 진공 건조한 후 물에 다시 용해하였다. 추출된 stilbene 화합물 중에서 배당체가 아닌 성분(resveratrol과 piceatannol)을 제거하기 위하여 회수한 시료 용액에 다시 4mL의 hexane/ether(4:1, v/v)를 가하고 혼합한 후 분액하였다. HPLC 분석을 통하여 시료 용액에서 더 이상 비배당체의 stilbene 화합물이 검출되지 않을 때까지 이러한 분액 과정을 3회 반복하였다.

이와 같이 확보한 stilbene 배당 유도체의 시료 용액은 다음과 같은 고체상 추출법을 이용하여 여러 단계의 분취 시료로 다시 한번 분할하였다. 즉, 시료 용액을 Sep-Pak C-18 (1g, Waters, USA) cartridge에 통과시켜 stilbene 배당 유도체를 고체상에 흡착 고정시킨 후 메탄올/물의 혼합 비율을 달리한 (메탄올 0-40%, 5% 간격) 50mL의 용매를 이용하여 고체상으로부터 stilbene 배당체를 단계적으로 용출하여 분취하였다. 이 때, Sep-Pak cartridge는 사용 전에 미리 30mL의 메탄올과 물로 차례로 세척하여 활성화시켰으며, 세척 및 용출 과정에서 유속은 $5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 으로 하였다. 분취한 시료는 진공 건조한 후 3mL의 메탄올에 재용해하여 β -glucosidase에 의한 효소적 가수분해에 이용할 때까지 -70°C 에 보관하였다.

β-Glucosidase에 의한 stilbene 배당 유도체의 가수분해 및 광 이성질화

β-Glucosidase를 이용하여 stilbene 배당 유도체를 가수분해하기 위하여, 위에서 준비한 각 분취 시료 200μL를 4mL 용량의 vial에 옮긴 후 질소가스를 불어넣어 메탄올 용매를 제거하였다. Vial에 다시 100μL의 100mM sodium acetate buffer(pH 5.0)를 가하고 초음파 수조에서 sonication하여 잔사를 재용해한 후 100μL의 10U β-glucosidase(from almond, Sigma Chemicals Co., USA, 위와 동일한 sodium acetate buffer에 용해)를 가하였다. 이와 같이 준비한 반응액은 35°C에서 하룻밤 incubation하여 배당체의 가수분해를 유도하였으며, 800μL의 메탄올을 가하고 원심분리하여 단백질을 침전 제거한 후 HPLC에 주입하였다.

한편, 광 노출에 의한 stilbene 화합물의 이성질화를 유도할 때에는 시료를 투명 유리 vial에 담아서 화창한 날 정오의 직사 일광에 15분간 노출하였다. *Trans*-stilbene 화합물은 빛에 의해 쉽게 *cis*-형의 이성질체로 이성질화하는 것으로 알려져 있다(Chong et al., 2009).

동일 시료에 대해 가수분해와 일광 노출을 복합하여 시행하였으며, 가수분해 전후와 일광 노출 전후 시료에 대해 HPLC 분석을 수행하였다.

Stilbene 화합물의 HPLC 분석

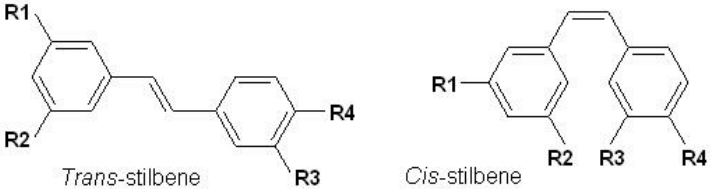
Stilbene 화합물은 HPLC-mass spectrometer(model 2695 HPLC, model 3100 MS, Waters, USA)를 이용하여 분석하였다. 분리에 이용한 column은 XTerra MS C18(3.5μ, 150 × 2.1mm, Waters, USA)이었다. 이동상은 0.1%(v/v) formic acid(용매 A)와 acetonitrile(용매 B) 혼합액으로 하였으며 용매 B를 25분간에 걸쳐 10%에서 30%까지 증가시킨 후 다시 40분간에 걸쳐 100%까지 증가시켰다. 이 때 용매의 유속은 0.2mL·min⁻¹로 하였다. HPLC에서 분리된 stilbene 화합물은 mass spectrometer(MS)를 이용하여 electrospray negative (ES-) mode에서 이온화한 후 single ion reaction(SIR) mode로 검출하였다. MS의 설정 조건은 다음과 같았다; desolvation gas(N₂) 유속 = 500L·h⁻¹, cone gas(N₂) 유속 = 50L·h⁻¹, desolvation 온도 = 400°C, source 온도 = 120°C, capillary voltage = 4KV, ionization mode = electrospray(ES) negative, cone voltage = 35V.

결과 및 고찰

포도 잎의 stilbene 화합물의 동정

식물에 포함되어 있는 다양한 종류의 stilbene 화합물은 기본적으로 resveratrol 유도체이다. 본 연구에서는 resveratrol

Table 1. Structure of common stilbenes and their molecular mass and m/z of [M-H]⁻ ions to be produced at ES- ionization mode.

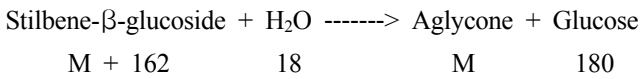


Group	Stilbenes	R1	R2	R3	R4	Mass	m/z
I	Resveratrol	OH	OH	OH	H	288	287
	Piceid	OGlu ²	OH	OH	H	390	389
	Resveratrolside	OH	OH	OGlu	H	390	389
II	Piceatannol	OH	OH	OH	OH	244	243
	Astringin	OGlu	OH	OH	OH	406	405
III	Pinostilbene	OCH ₃	OH	OH	H	242	241
	Pinostilbene-3-glucoside	OCH ₃	OGlu	OH	H	404	403
	Pinostilbene-4'-glucoside	OCH ₃	OH	OGlu	H	404	403
IV	Rhapontigenin	OH	OH	OCH ₃	OH	258	257
	Isorapontigenin	OCH ₃	OH	OH	OH	258	257
	Rhapontin	OGlu	OH	OCH ₃	OH	420	419
	Isorhapontin	OCH ₃	OH	OGlu	OH	420	419

²Glu = β-D-Glucopyranoside.

의 기본 구조에 추가된 원자단, 즉 hydroxyl group 또는 methyl group에 따라 stilbene 화합물을 4개의 group으로 구분하였으며, 이 때 각 group은 glucose moiety의 포함 여부에 따라 배당체(glycoside)와 그 배당체의 aglycone으로 다시 세분된다(Table 1). 식물에 존재하는 stilbene 배당체는 항상 glucose와 결합한 형태 즉 β -glucoside인 것으로 알려져 있으므로(Chong et al., 2009), 본 연구에서는 stilbene 배당체로부터 aglycone을 확보하기 위한 가수분해 방법으로 β -glucosidase를 이용하는 방법을 채택하였다. Stilbene 화합물에서 glucoside와 aglycone의 질량 변화는 다음과 같은 관계에 있다.

β -glucosidase, pH 5.0



단, M = resveratrol의 질량(228) + 추가된 원자단의 질량 (OH = 17, CH₃ = 15) - H의 질량(1) × 추가된 원자단의 수

Stilbene 화합물을 분석할 때 mass spectrometer를 이용하면 질량에 기초하여 특정 m/z 값을 가지는 성분만을 SIR chromatogram 상에 표시할 수 있다. Fig. 1A는 자외선을 조사한 포도 잎에서 확보한 stilbene 배당체 시료에 대해 가수분해 전과 후에 group I의 stilbene 화합물에 해당하는 m/z 값을 가지는 성분을 mass spectrometer를 이용하여 분석한 SIR chromatogram이다. 가수분해에 의해 chromatogram(Fig.

1A)에서 3개의 peak(peak 1, 2, 3)가 사라졌으므로 시료에는 본래 3종의 배당체가 들어 있음을 추정할 수 있었으며, 이들은 piceid 또는 resveratroloside일 것이다. 한편, stilbene 화합물은 *trans*- 또는 *cis*-형의 두가지 isomer 형태로 존재하는데, *trans*-형은 빛에 의해 쉽게 *cis*-형으로 전환된다. 따라서 배당체 시료를 일광 노출 전과 후에 분석한 chromatogram (Fig. 1B)을 보면, 일광 노출에 의해 peak 1과 2가 사라졌으므로 이들은 *trans*-glycoside이며, peak 3과 4는 증가하였으므로 이들은 *cis*-glycoside임을 알 수 있었다. 이러한 결과를 종합하면, Fig. 1A와 1B의 glycoside 분석 chromatogram에 나타나는 peak의 성분은 모두 다음과 같이 확인할 수 있다; peak 1 = *trans*-resveratroloside, peak 2 = *trans*-piceid, peak 3 = *cis*-piceid, peak 4 = *cis*-resveratroloside. 단, 이 때, piceid와 resveratroloside의 peak를 구별하는데 있어서, 식물에 분포하는 resveratrol 배당체의 형태는 piceid가 보다 일반적이므로 (Chong et al., 2009) piceid의 peak 크기는 resveratroloside 보다 커야 할 뿐만 아니라, 분자 구조상 piceid는 resveratroloside 보다 비극성이므로 역상(reversed phase) 분석시 piceid는 resveratroloside 보다 긴 retention time을 가져야 한다는 일반적 사실에 기초하였다. 한편, Fig. 1C는 가수분해에 의해 생성된 aglycone, 즉 resveratrol을 분석한 chromatogram이다, 가수분해에 의해 두 개의 peak(peak 5, 6)가 나타났는데 이들은 각각 *trans*-와 *cis*-resveratrol로서 일광 노출 전과 후의 시료를 분석한 chromatogram(Fig. 1D)에 의해 peak 5 = *trans*-resveratrol, peak 6 = *cis*-resveratrol임을 확인할 수

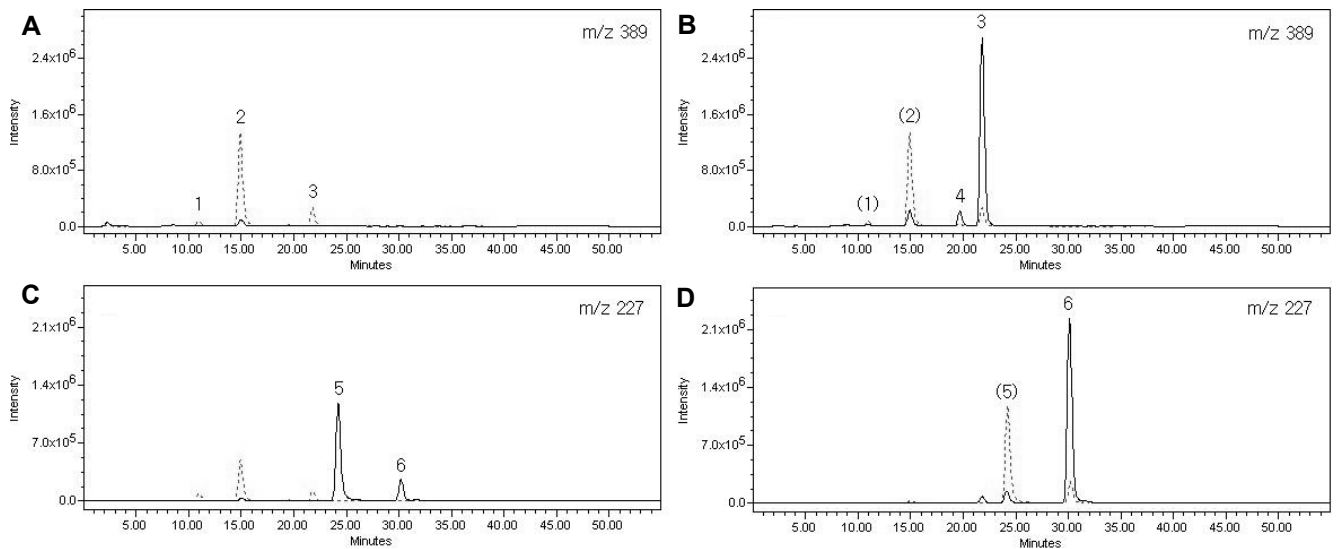


Fig. 1. SIR chromatograms of stilbene compounds belonging to group I and analyzed from the 10% methanol fraction of glycoside sample. Two chromatograms (solid line and dotted line) were overlaid on one figure. In Figs. A and C, solid line = β -glucosidase treated, dotted line = untreated. In Figs. B and D, solid line = sunlight-irradiated after β -glucosidase treatment, dotted line = only β -glucosidase treated. Peak 1 = *trans*-resveratroloside, peak 2 = *trans*-piceid, peak 3 = *cis*-piceid, peak 4 = *cis*-resveratroloside, peak 5 = *trans*-resveratrol, and peak 6 = *cis*-resveratrol.

있었다.

이와 같이 자외선을 조사한 포도 잎에서 추출한 stilbene 배당체 시료를 가수분해 및 광 이성질화하여 반응 전과 후에 분석한 SIR chromatogram의 해석을 통하여, group I에 해당하는 6종의 stilbene 화합물을 동정할 수 있었는데, 이러한 분석 과정을 group II - IV에 속하는 stilbene 화합물에 대해 동일하게 적용하였다(Figs. 2, 3, and 4). Stilbene 화합물의 동정을 목적으로 한 이러한 분석 과정에 의해 총 16종의 stilbene 화합물을 포도 잎에서 확인할 수 있었으며(Table 2), 이 과정에서 확인된 각 화합물의 retention time은 다음 단계의 실험

에서 각 stilbene 화합물을 확인하는 지표로 활용되었다. 한편, *trans-resveratrol*을 기준으로 각 stilbene 화합물의 retention time을 비교하여 보면, hydroxyl group 또는 당의 추가시 retention time이 감소하고 methyl group의 추가에 의해 증가하였으며 *cis*-형은 *trans*-형보다 긴 retention time을 보였다.

포도 잎의 자외선 조사에 따른 stilbene 화합물의 변화

Table 2는 자외선을 2분간 1회 조사 후 수확한 포도 잎에서 유엽과 성엽, 자외선 조사 여부등에 따른 stilbene 화합물 함량의 변화를 분석한 결과이다. 각 화합물은 해당 m/z의

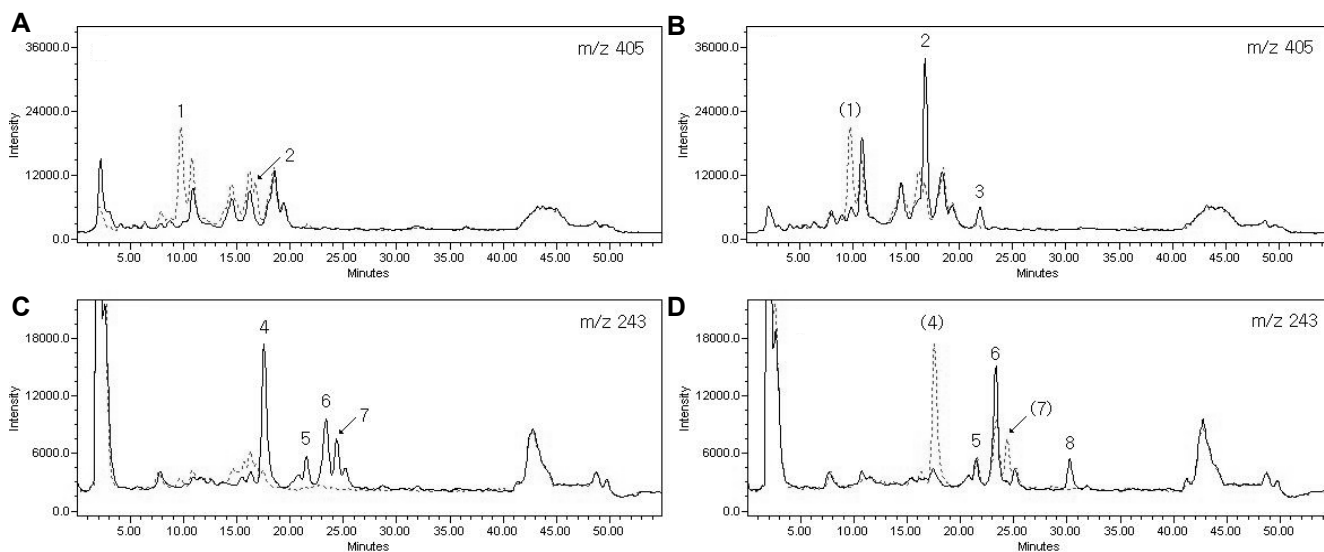


Fig. 2. SIR chromatograms of stilbene compounds belonging to group II and analyzed from the 5% methanol fraction of glycoside sample. The explanation of chromatograms is the same as in Fig. 1. Peak 1 = *trans*-astringin, peak 2 = *cis*-astringin, peak 3 = *cis*-piceid, peak 4 = *trans*-piceatannol, peak 5 = unknown, peak 6 = *cis*-piceatannol, peak 7 = *trans*-resveratrol, and peak 8 = *cis*-resveratrol.

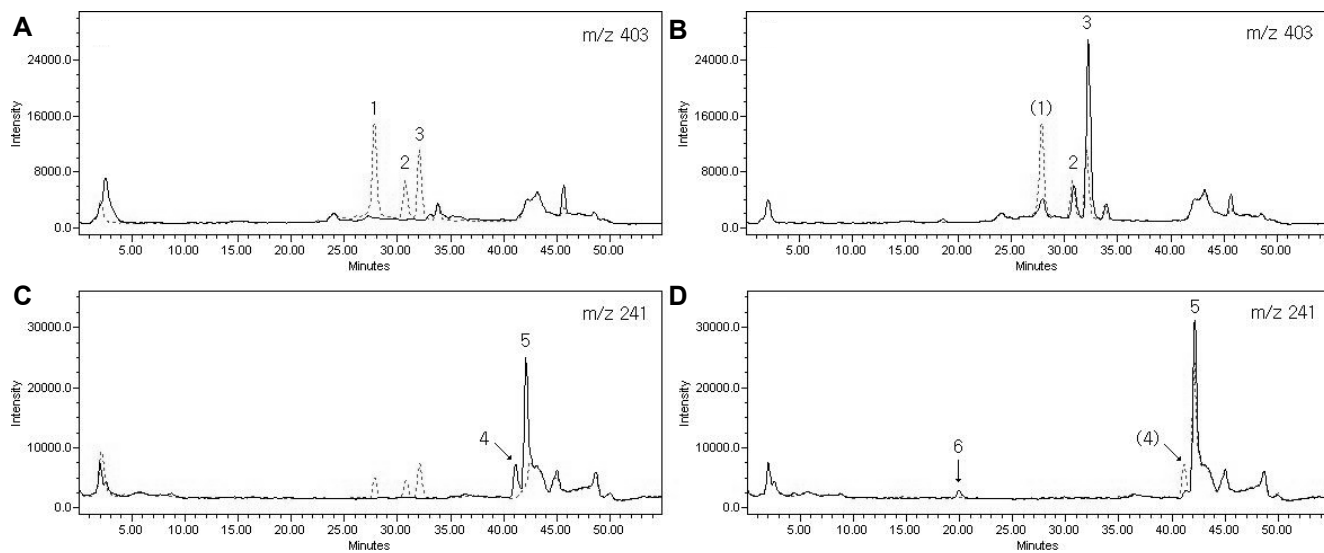


Fig. 3. SIR chromatograms of stilbene compounds belonging to group III and analyzed from the 30% methanol fraction of glycoside sample. The explanation of chromatograms is the same as in Fig. 1. Peak 1 = *trans*-isorhapontin, peak 2 = *cis*-isorhapontin, peak 3 = *cis*-rhapontin, peak 4 = *trans*-isorhapontigenin, peak 5 = *cis*-isorhapontigenin, and peak 6 = *cis*-rhapontigenin.

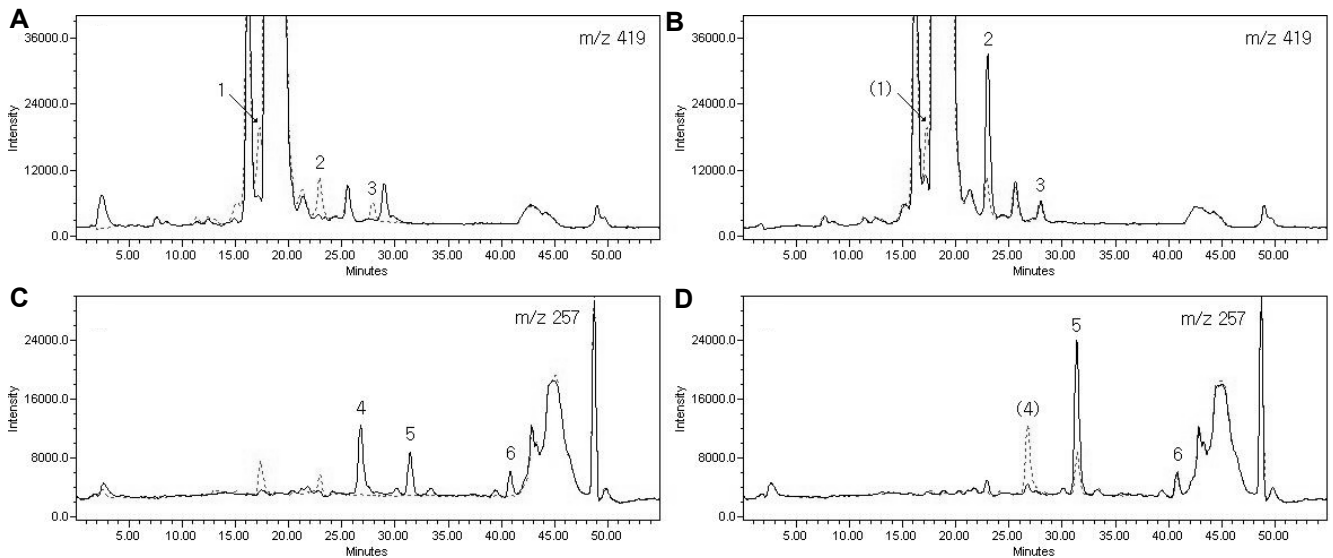


Fig. 4. SIR chromatograms of stilbene compounds belonging to group IV and analyzed from the 15% methanol fraction of glycoside sample. The explanation of chromatograms is the same as in Fig. 1. Peak 1 = *trans*-pinostilbene-3-O- β -D-glucopyranoside, peak 2 = *cis*-pinostilbene-4'-O- β -D-glucopyranoside, peak 3 = *cis*-pinostilbene-3-O- β -D-glucopyranoside, peak 4 = *trans*-pinostilbene, peak 5 = *cis*-pinostilbene, and peak 6 = unknown.

Table 2. Contents of stilbene compounds in control and UV irradiated grapevine leaves.

SIR chromatogram에서 retention time을 지표로 하여 확인 하였으며, 각 화합물의 함량은 표준물질의 확보가 가능한 *trans*-resveratrol과 비교하여 peak 면적의 상대적 비율에 의해 산출하였다.

자외선을 조사하지 않은 포도 잎(control)의 stilbene 화합물의 함량을 보면, 주로 발견되는 stilbene은 group I에 속하는 종류로서 이들이 전체 stilbene 화합물 함량의 84(유엽)-91%(성엽)를 차지하였는데, 포도 잎에 가장 많이 함유되어 있는 stilbene은 배당체 형태인 *trans/cis*-piceid이었으며 그 다음으로 aglycone 형태의 *trans/cis*-resveratrol의 순이었다. 포도 잎에서 stilbene 화합물은 aglycone의 형태보다는 주로 배당체로 존재하였는데, 배당체의 비율은 유엽에서 성엽으로 생육이 진전됨에 따라 72%에서 91%로 증가하는 경향을 보였다. 또한 *cis*-형의 stilbene 화합물의 함량이 *trans*-형보다 많았는데 특히 piceid의 경우 *cis/trans*의 비율은 유엽(2.1)에 비해 성엽(4.0)에서 훨씬 높게 나타났다. 이러한 함량 변화에서 유추하여 볼 때, 자연 상태의 포도 잎에서는 stilbene synthase에 의해 처음 합성된 *trans*-resveratrol이 빠르게 *trans*-piceid로 전환된 후 궁극적으로는 *cis*-piceid의 형태로 축적되는 것으로 생각된다. *Trans*-stilbene의 *cis*-형으로의 이성질화를 촉매하는 효소는 보고되어 있지 않다. 따라서 효소적 반응(Chong et al., 2009)에 의한 resveratrol의 유도체화와는 달리 *trans*-stilbene의 *cis*-형으로의 전환은 비효소적으로 일광에 의해 자연적으로 진행되는 것으로 생각된다.

자외선의 조사는 포도 잎에서 stilbene 함량의 큰 변화를 초래하여 총 stilbene 함량은 7.9(성엽)-9.3(유엽)배 증가하였다. 이 중 특히 *trans*-resveratrol 함량의 증가는 수백 배에 달하였다(유엽 333배, 성엽 133배). 다른 stilbene 화합물의 모체가 되는 *trans*-resveratrol 함량의 이러한 증가는 또한 resveratrol 배당 유도체 또는 수산화 유도체의 함량 증가를 가져왔다. 그러나 이러한 함량 변화에 있어서, resveratrol 배당체 즉 piceid 함량의 증가는 2-4배에 불과한 반면 수산화 유도체 즉 piceatannol 함량의 증가는 83(성엽)-103(유엽)배에 달하였는데, 자외선을 조사하지 않은 잎에서 piceatannol은 본래 미량으로 존재하는 화합물이다. 따라서 이러한 결과는 자외선 조사에 의해 포도 잎에서는 resveratrol 합성이 활성화될 뿐만 아니라 resveratrol을 선택적으로 특정 유도체로 전환하는 반응(즉, hydroxylation) 역시 활성화됨을 보여준다. 한편, 배당체 또는 수산화 유도체와는 달리, 포도 잎에서 resveratrol의 methoxyl 유도체(group III)는 함량이 미량에 불과하였다.

포도 잎에서 자외선 조사에 따른 stilbene 화합물 함량의 증가는 전형적인 hormesis 현상의 하나로 이해될 수 있다. 즉, 자외선은 식물에 위해 요인이지만, 치명적이지 않은 낮은 수준에서 가해지는 위해 요인은 일반적으로 오히려 세포의 생명 활동을 활성화하며(Luckey, 1980; Shama and Alderson, 2005), 이로 인해 페놀화합물, 폴리아민, 이소프레노이드 등의 다양한 이차대사산물의 합성 경로가 활성화되는 것으로 알려져 있다(Jansen et al., 2008). 따라서 자외선의 광산화

Table 2. Contents of stilbene compounds in control and UV irradiated grapevine leaves.

Compound name	RT (min)	Triplication ($\mu\text{g}\cdot 0.1\text{ g}^{-1}$ fresh wt.)							
		Young leaves				Mature leaves			
		Control		UV-irradiated		Control		UV-irradiated	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
<i>trans</i> -Astringin	9.7	7.1	0.9	7.5	0.8	4.1	0.2	7.6	0.5
<i>trans</i> -Resveratrolside	10.8	12.6	1.0	7.5	1.1	21.8	4.4	9.8	2.3
<i>trans</i> -Piceid	14.9	39.6	6.3	129.2	15.2	46.2	1.8	196.1	13.2
<i>cis</i> -Astringin	16.8	0.2	0.0	2.1	0.6	2.1	0.3	0.9	0.2
<i>trans</i> -Piceatannol	17.3	2.0	0.1	206.3	32.8	2.8	0.2	232.1	33.3
<i>cis</i> -Resveratrolside	19.7	16.4	3.7	15.2	0.8	37.5	2.7	24.2	2.0
<i>cis</i> -Piceid	21.7	79.8	6.2	223.2	27.9	185.5	11.7	368.4	38.5
<i>cis</i> -Isorhapontin	22.8	12.4	2.5	3.7	0.3	21.3	1.5	12.0	2.2
<i>trans</i> -Resveratrol	24.0	4.5	0.0	1,500.4	206.7	10.3	1.4	1,886.8	242.4
<i>trans</i> -Isorhapontigenin	26.7	<0.1		9.6	1.7	<0.1		8.5	0.9
<i>trans</i> -Pinostilbene-3-O-glu	27.7	<0.1		3.3	0.5	<0.1		2.6	0.5
<i>cis</i> -Resveratrol	30.7	42.5	2.9	53.1	6.5	18.3	1.5	31.4	6.5
<i>cis</i> -Isorhapontigenin	31.4	13.0	3.5	<0.1		<0.1		<0.1	
<i>cis</i> -Rhapontin	40.9	1.8	0.4	<0.1		<0.1		<0.1	
<i>trans</i> -Pinostilbene	41.3	<0.1		2.0	0.3	<0.1		1.6	0.1
<i>cis</i> -Pinostilbene	42.1	0.2	0.1	<0.1		<0.1		0.3	0.1
Sum	Total	231.4		2,163.5		350.5		2,782.5	
	Glycosides	167.2		391.8		318.6		621.6	
	<i>Trans</i> -isomer	65.1		1,865.8		85.5		2,345.1	
	<i>Cis</i> -isomer	166.3		297.7		265.0		437.4	
	Group I	194.4		1,928.7		319.6		2,516.7	
	Group II	9.3		215.9		9.0		240.6	
	Group III	0.4		5.4		0.3		4.5	
	Group IV	27.3		13.5		21.6		20.7	

작용에 따른 산화 스트레스는 포도 잎에서 항산화 메커니즘의 활성화를 유도하여 강한 항산화 활성을 가지는 stilbene 화합물의 합성 경로가 활성화되는 것으로 추측된다.

Resveratrol을 포함하여 stilbene 화합물은 항산화 기능뿐만 아니라 포도에서 일종의 phytoalexin의 역할을 수행한다. 이와 관련하여, Roh et al.(2005)의 보고에 따르면 *Plasmopora viticola* 또는 *Elisinoe ampelina*에 저항성을 가지는 포도 품종에서는 병원균을 접종하였을 때 resveratrol의 함량이 증가하며, resveratrol은 포도에서 *P. viticola*(Dai et al., 1995), *Phomopsis viticola*(Hoos and Blaiich, 1990), *Rhizopus stonifer*(Sarig et al., 1997) 등에 대한 저항성을 증진하는 것으로 보고되어 있다. 한편 자외선 조사는 resveratrol 뿐만 아니라 resveratrol의 수산화 유도체인 piceatannol 함량의 증가를 가져왔는데, stilbene 화합물의 라디칼 소거능은 수산기(-OH)의 개수와 상관성이 있고 따라서 piceatannol은 resveratrol보다 훨씬 강한 항산화 활성을 가지는 것으로 보고되어 있

다(Lorenz et al., 2003).

식품적인 관점에서 항산화 활성이 강한 stilbene 화합물은 포도에서 발견되는 대표적인 건강 기능성 성분으로서, 근래에는 수확 후 포도 과실에 자외선을 조사하여 stilbene 화합물의 함량을 증대한 후 포도 주스 또는 포도주 등 가공품의 건강 기능성을 향상하는 연구가 수행되고 있기도 하다(Gonzalez-Barrio et al., 2009; Guerrero et al., 2010). 생육 기간 중의 자외선 조사는 포도 과실의 건강 기능성 강화와 동시에 병저항성의 증대에도 기여할 수 있으며, 포도 잎에 장해를 유발하지 않을 정도의 낮은 자외선 조사 수준에 의해서도 stilbene 화합물의 함량이 크게 증가하므로 자외선의 조사는 원예적 활용 가치가 클 것으로 기대된다.

초 록

Stilbene 화합물은 항산화 및 항균 활성을 가지는 폴리페

농계의 천연물이다. 포도를 포함하는 몇몇 종류의 식물에서 stilbene 화합물은 resveratrol의 유도체로서 매우 다양한 형태로 존재한다. 자외선 조사 포도 잎에서 stilbene 화합물을 정량 분석하기에 앞서, 먼저 각 stilbene 화합물을 동정하기 위한 실험을 수행하였다. 이를 위하여, 자외선을 심하게 조사한 잎에서 stilbene 배당체를 추출하였다. 추출한 배당체 시료는 β -glucosidase를 이용하여 가수분해한 후, 특정 stilbene 화합물의 질량에 해당하는 m/z에서 HPLC-mass spectrometer를 이용하여 분석하였다. 효소적 가수분해에 의해 chromatogram 상에는 glycoside에 해당할 것으로 예상되는 peak의 감소와 aglycone에 해당할 것으로 예상되는 peak 증가가 나타났다. 또한 stilbene 화합물의 광 이성질화를 유도하기 위하여 시료를 일광에 노출하였으며, 광 노출에 의해 trans-isomer에 해당할 것으로 예상되는 peak의 소멸과 cis-isomer에 해당할 것으로 예상되는 peak의 생성이 나타났다. Chromatogram 상의 peak의 이러한 증감으로부터 각 peak의 성분을 유추하였다. 이러한 방법으로 포도 잎에서 16종의 stilbene 화합물을 동정할 수 있었으며 자외선을 조사한 포도 잎에서 동정된 화합물에 대한 정량적 분석을 수행하였다. 자외선 조사는 포도 잎에서 총 stilbene 함량의 상당한 증가를 가져왔는데 특히 trans-resveratrol은 수백 배 증가하였다. 또한, resveratrol보다 더 강한 radical 소거 활성을 가지지만 무처리 잎에서는 단지 미량으로만 존재하는 piceatannol의 함량 역시 수십 배 증가하였다. 자외선 조사에 의한 이러한 stilbene 함량의 증가는 hormesis 현상으로서 포도의 스트레스 대응 반응의 하나로 생각된다.

추가 주요어 : 베타-글루코시다제, 광이성질화, 피사이드, 레스베라트롤, 자외선 호르메시스

인용문헌

- Baur, J.A. and D.A. Sinclair. 2006. Therapeutic potential of resveratrol: The in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5:493-506.
- Chong, J., A. Poutaraud, and P. Hugueney. 2009. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Sci.* 177:143-155.
- Dai, G.H., C. Andray, L. Mondolot-Cosson, and D. Boubals. 1995. Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V. rupestris*, and *V. rotundifolia* and downy mildew fungus, *Plasmopara viticola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46:177-188.
- Fabris, S., F. Momo, G. Ravagnan, and R. Stevanato. 2008. Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles and monolamellar liposomes. *Biophys. Chem.* 135:76-83.
- Gehlert, R., A. Schoppner, and H. Kindl. 1990. Stilbene synthase from seedlings of *Pinus sylvestris*: Purification and induction in response to fungal infection. *Mol. Plant-Microbe Interact* 3:444-449.
- Gonzalez-Barrio, R., M.L. Vidal-Guevara, F.A. Tomas-Barberan, and J.C. Espin. 2009. Preparation of a resveratrol-enriched grape juice based on ultraviolet C-treated berries. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* 10:374-382.
- Guerrero, R.F., B. Puertas, M.I. Fernández, Z. Pineiro, and E. Cantos-Villar. 2010. UVC-treated skin-contact effect on both white wine quality and resveratrol content. *Food Res. Intl.* 43:2179-2185.
- Hoos, G. and R.J. Blaich. 1990. Influence of resverastrol on germination of conidia and mycelial growth of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola*. *J. Phytopathol.* 129:102-110.
- Jang, M., L. Cai, G. Udeani, K. Slowing, C. Thomas, C. Beecher, H. Fong, N. Farnworth, A. Kinghorn, R. Mehta, R. Moon, and J. Pezzuto. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275:218-220.
- Jansen, M.A.K., K. Hectors, N.M. O'Brien, Y. Guisez, and G. Potters. 2008. Plant stress and human health: Do human consumers benefit from UV-B acclimated crops? *Plant Sci.* 175:449-458.
- Lancake, P. and R.J. Pryce. 1977. The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochem.* 16:1193-1196.
- Lorenz, P., S. Roychowdhury, M. Engelmann, G. Wolf, and T.F.W. Horn. 2003. Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: Effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. *Nitric Oxide* 9:64-76.
- Luckey, T.D. 1980. Hormesis with ionizing radiation. CRC Press. Boca Raton.
- Morales, M., A.R. Barcelo, and M.A. Pedereno. 2000. Plant stilbenes: Recent advances in their chemistry and biology. *Adv. Plant Physiol.* 3:39-70.
- Regev-Shoshani, G., O. Shoseyov, I. Bilkis, and Z. Kerem. 2003. Glycosylation of resveratrol protects it from enzymic oxidation. *Biochem. J.* 374:157-163.
- Roh, J.H., H.K. Yun, K.S. Park, Y.J. Choi, S.S. Hong, and S.H. Jeon. 2005. Salicylic acid and resveratrol content changes as affected by Downy Mildew and Anthracnose in grapevine. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 46:59-63.
- Sales, J.M. and A.V.A. Resurreccion. 2009. Maximising resveratrol and piceid contents in UV and ultrasound treated peanuts. *Food Chem.* 117:674-680.
- Sarig, P., Y. Zutkhi, A. Monjauze, N. Lisker, and R. Ben-Arie. 1997. Phytoalexin elicitation in grape berries and their susceptibility to *Rhizopus stolonifer*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 50:337-347.
- Shama, G. and P. Alderson, 2005. UV hormesis in fruits: A concept ripe for commercialisation. *Trends Food Sci. Technol.* 16:128-136.
- Wang, W., K. Tang, H.R. Yang, P-F. Wen, P. Zhang, H.L. Wang, and W.D. Huang. 2010. Distribution of resveratrol and stilbene synthase in young grape plant (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) and the effect of UV-C on its accumulation. *Plant Physiol. Biochem.* 48:142-152.