

잠두 (*Vicia faba* L) 가 생산하는 Brassinosteroid 활성물질

朴 根 亨 · 玄 圭 煥

전남대학교 농과대학 식품공학과
(1987년 1월 9일 수리)

Brassinosteroid-like Substances in Immature *Vicia faba* L seeds

Keun-Hyung Park and Kyu-Hawn Hyun

Department of Food Science and Technology, College of Agriculture,
Chonnam National University, Kwang-ju 500, Korea

Abstract

Occurrence of two type brassinosteroid-like substances and less molecular weight substance than brassinosteroid were suggested in immature *Vicia faba* seeds extracts, which were purified using various chromatographic techniques, by Korean rice-lamina inclination test.

서 론

1970년 Mitchell등¹⁾에 의해 유채화분에 새로운 식물생장 조절물질의 존재가 시사된 이래, Grove 등²⁾에 의해 1979년 이 물질이 단리, 구조결정되어 brassinolide로 명명되었다. 그후 brassinosteroid (이하 BR)로 총칭되는 brassinolide 및 동족체가 타식물에서도 발견되어짐과 동시에 BR가 저농도에서 특이하고도 다양한 생리활성³⁻⁶⁾을 나타내며, 또 식물체에서 발견된 최초의 steroid 골격의 식물생장 조절물질로 인하여 이들 물질에 관한 관심이 집중되어 지금은 BR의 발견이 gibberellin 발견 이후 가장 중요한 발견⁷⁾으로 생각되고 있다.

지금까지 BR의 존재가 알려진 식물은 쌍자엽식물 8종^{2, 8-16)}, 단자엽식물 3종^{17, 18)}, 나자식물 2종^{19, 20)}에 이르고 있으나, BR가 식물계에서 보편적으로 존재하는 식물생장 조절물질인가, 또 어떠한 BR를 생산하고 있는가 하는 점은 고등식물의 생리 제어기구의 해석은 물론, 추후 BR에 관한 연구의 기초가 되리라 생각된다.

여기에 본 연구는 아직 내생의 BR에 대해 보고된 바 없는 잠두(*Vicia faba*. L)를 대상으로 전보²¹⁾에서 확립한 생물검정법을 적용하여, 잠두가 생산하는 BR 활성물질을 검색하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

전남 진도군 진도읍 근교에서 재배된 잠두(*Vicia faba*. L)를 사용하였다. 이 잠두는 전년도 10월 20일에 파종하여 개화후 약 40일 경과된 것으로, 완숙 15~20일 전의 미숙 잠두종자를 5월 24일에 콩각지와 함께 채취하여 추출 직전에 껍질을 제거하였다.

2. 추출 및 용매분획

미숙 잠두종자 29.5kg을 MeOH을 사용하여 마쇄 추출하고, 여과지(Toyo No. 2)와 G₃ glass filter를 사용하여 추출여액을 얻었다. 여액은 40°C에서 감압농축하여 얻어진 MeOH이 제거된 수용액을 Fig. 1에 나타난 방법에 따라 용매 분획하였다.

3. Silica gel 흡착 chromatography

시료의 약 10배량에 상당하는 silica gel(100-200 mesh, column chromatography용, Merck사)을 CHCl₃로 slurry를 만들어 column을 만들고 시료를 소량의 CHCl₃로 녹여 흡착시킨 후, CHCl₃-MeOH, CHCl₃-acetone 용매계로 MeOH과 acetone의 농도를 0%에서 20%까지 각각 단계적으로 증가시키면서 용출 분획하였다.

4. Sephadex LH-20 column chromatography

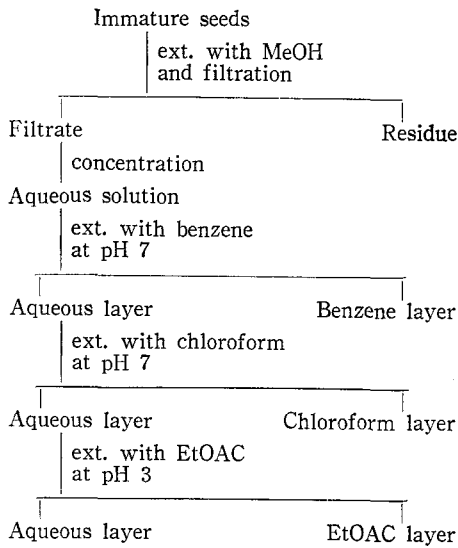


Fig. 1. Solvent fractionation procedure for brassinosteroid in *Vicia faba*.

Sephadex LH-20(25~100 μ , Pharmacia사)을 70% EtOH로 하루밤 팽윤시킨 후 column에 충전하고 동용매계로 용출 분획하였다.

5. Preparative-TLC

Silica gel (10~40 μ , H type, Sigma사)로 박층 (20 \times 20cm, 1mm 두께)을 만들고, 110 $^{\circ}$ C에서 1시간 건조시켜 활성화시킨 다음, 시료를 band 상으로 흡착시키고, EtOAc-EtOH (22 : 3, v/v) 용매계로 15cm 전개시킨 다음, R_f 치에 의해 10등분하여 용출하였다.

6. HPLC

시료를 여과(Millipore FH, 0.5 μ m, Water사)시킨 다음, Porasil(Water사) column에 의한 HPLC는 $CHCl_3$ -iso PrOH (95 : 5, v/v)로 C_{18} (Water사) column에 의한 HPLC는 CH_3CN - H_2O (45 : 55, v/v) 용매계로 각각 용출 분획하였다.

7. 생물검정법

선발된 우리나라 벼²¹⁾의 lamina joint 조직을 이용하여 진보²²⁾와 같은 방법으로 생물 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 용매분획

잠두 꼬투리 82.3kg에서 미숙 잠두종자 29.5kg을 수확할 수 있었으며, 이들을 MeOH로 추출하

고, 용매분획하여 중성구(neutral benzene soluble fraction 37.86g, neutral chloroform soluble fraction 0.53g)로 38.39g과 산성구(acidic EtOAc soluble fraction)로 15.91g을 얻었다. 이들 분획을 생물검정한 결과, 중성분획에 BR의 활성이 인정되었다. 이것은 천연의 BR가 중성분획에 존재한다는 일련의 보고^{10,11,12,15,17,22,23)}와 잘 일치하고 있다.

이 중성구에는 잠두종자의 지질성분과 색소성분이 다량 함유하고 있어 *n*-hexane과 80% MeOH로 분배하여 hexane구 (16.69g)와 80% MeOH 구 (19.45g)를 얻었는데, 대부분의 활성은 80% MeOH 구에 존재하였다

2. Silica gel 흡착 chromatography

80% MeOH 구를 $CHCl_3$ -MeOH 용매계의 silica gel 흡착 chromatography에 의해 분획하고 각 분획의 활성을 생물검정법으로 측정된 결과는 Fig. 2와 같다.

생체중량 5g에 상당하는 추출물에 의해 100% $CHCl_3$ 용출구는 194%, 그리고 5~10% MeOH 용출구에 240%에 이르는 활성을 나타내, 극성이 낮은 것을 활성 I (0.49g), 높은 것을 활성 II (6.07g)로 명명하였다.

이어서 비교적 다량인 활성 II를 $CHCl_3$ -acetone 용매계로 용출 분획하고 생물검정한 결과는 Fig. 3과 같다.

활성 II는 0~5% acetone 용출구와 15~20%

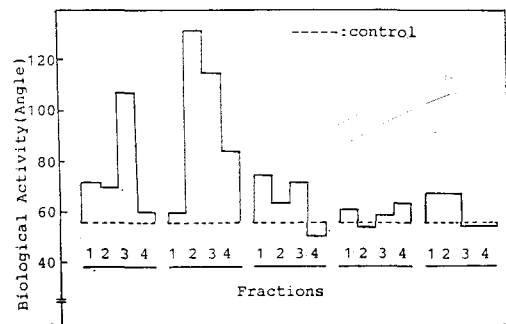


Fig. 2. Histogram of biological activity of the fractions of silica gel adsorption chromatography. Fraction I, II, III, IV, V correspond to 0, 5, 10, 15, 20% MeOH in $CHCl_3$ and each fractions were eluted with 200ml of the solvent systems. Bioassay: Rice inclination test with rice seedlings "Tongjin-byeo".

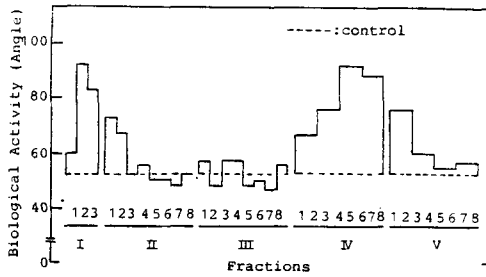


Fig. 3. Histogram of biological activity of the fractions from silica gel adsorption chromatography. Fraction I, II, III, IV, V correspond to 0, 5, 10, 15, 20% acetone in CHCl_3 , and each fractions were eluted with 50ml of the solvent systems. Bioassay: Rice inclination test with rice seedlings "Tongjin-byeo".

acetone 용출구로 활성이 분리되어 극성이 낮은 것을 활성 II-1(3.59g), 높은 것을 활성 II-2(0.25g)로 명명하였다. 이 과정에서 잠두가 생산하는 BR 활성을 재확인할 수 있었으며, 활성본체로 극성이 다른 적어도 2종의 BR 존재가 시사되었다.

3. Sephadex LH-20 chromatography

앞 과정에서 부분정제된 활성구를 70% EtOH의 LH-20 chromatography로 용출 분획하고, 활성을 측정된 결과를 활성 II-1은 Fig. 4에, 활성 II-2는 Fig. 5에 나타냈다.

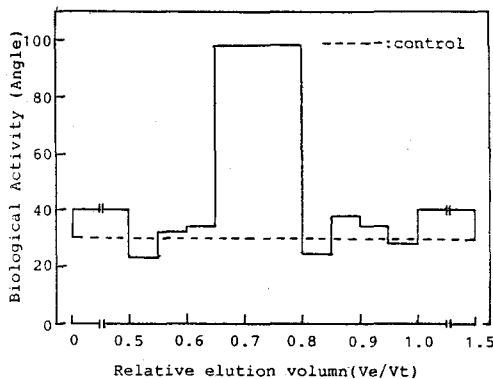


Fig. 4. Histogram of biological activity of the fractions from Sephadex LH-20 column chromatography. A column of LH-20 (bed vol., 320ml) was run with 70% EtOH. Bioassay: Rice inclination test with rice seedlings "Samnam-byeo".

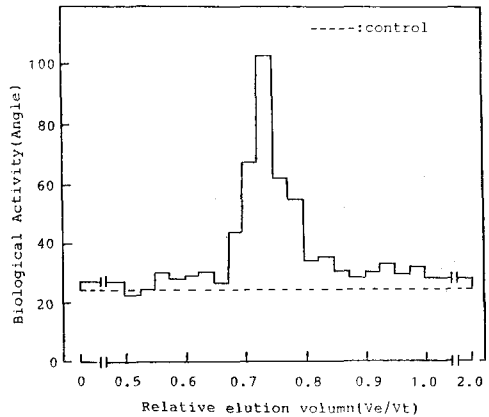


Fig. 5. Histogram of biological activity of the fractions from Sephadex LH-20 column chromatography. A column of LH-20 (bed vol., 320ml) was run with 70% EtOH. Bioassay: Rice inclination test with rice seedlings "Kiho-byeo".

활성 II-1은 Ve/Vt 0.65~0.80의 용출위치에 생체중량 100g에 상당하는 추출물에 의해 340%에 이르는 활성을 나타냈으며, 활성 II-2는 Ve/Vt 0.675~0.80의 용출위치에 75g에 상당하는 추출물에 의해 435%에 이르는 활성을 나타냈다. 한편 Yokota 등¹⁵⁾은 dolicholide, dolichosterone, homodolichosterone, brassinolide, castasterone, 6-deoxydolichosterone 등의 BR는 동 용매에 의한 LH-20 chromatography에서 Ve/Vt 0.65~0.80의 용출범위에서 용출됨을 보고하고 있는데, 이것은 본 실험의 결과와 잘 일치하고 있어, 활성 II-1과 II-2의 본체는 기지의 BR과 거의 같은 분자량을 갖는 활성물질임이 거듭 시사되고 있다. 또 활성구로 II-1(798mg), II-2(125mg)를 얻을 수 있어 LH-20 chromatography는 BR에 관한 정보뿐만 아니라 정제효과도 뛰어남을 알 수 있다.

한편 활성 I의 TLC 활성구(316mg)를 동용매계의 LH-20 chromatography로 분획하고 생물검정한 결과는 Fig. 6과 같다.

생체중량 200g에 상당하는 추출물에 의해 300%에 이르는 활성이 Ve/Vt 1.0~0.5의 용출위치에 나타나, 앞 과정의 활성을 재확인할 수 있었으며, 활성구로 18.4mg을 얻어 큰 정제효과를 얻었다. 그러나 활성 I의 용출위치는 활성 II-1과 II-2의 용출위치와 달리 저분자영역에서 활성을 나타내, 활성 I의 본체는 기지의 BR보다 작은 분자량을

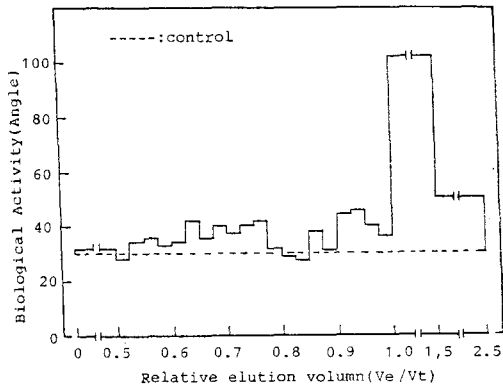


Fig. 6. Histogram of biological activity of the fractions from Sephadex LH-20 column chromatography. A column of LH-20 (bed vol., 500ml) was run with 70% EtOH. Bioassay: Rice inclination test with rice seedlings "Sangpung-byeo".

가지면서도 동 수준의 활성을 갖는 새로운 활성물질의 가능성이 시사된다.

4. Preparative TLC

LH-20 chromatography에 의해 얻어진 활성구를 preparative TLC를 하였다. 생체중량 150g에 상당하는 활성 II-1 추출물을 생물검정한 결과 R_f 0.3~0.6 범위에 390%에 이르는 활성을 보였으며 생체중량 100g에 상당하는 활성 II-2 추출물을 생물검정한 결과는 R_f 0.6~0.9 범위에서 450%에 이르는 활성을 나타냈다. 이와 같이 활성 II-1과 II-2는 동일용매계에 의한 TLC에서 다른 R_f 치를 나타내고 있어, 활성 II-1과 II-2는 silica gel chromatography의 결과와 같이 극성이 다른 BR임을 나타내고 있다.

한편, 활성 I은 생체중량 100g에 상당하는 추출물에 의한 생물검정의 결과는 Fig. 7과 같이 R_f 0.6~0.9의 범위에서 250%에 이르는 활성을 보여 활성 I의 활성을 재확인할 수 있었다.

5. Normal phase의 HPLC

생체중량 200g에 상당하는 활성 II-1의 정제 추출물을 Porasil column의 HPLC로 분획하여 생물검정한 결과, t_R 18~27분을 중심으로 t_R 18~45분(26.5mg)에 325%에 이르는 활성을 나타냈다. 그리고 활성 II-2의 생체중량 200g에 상당하는 추출

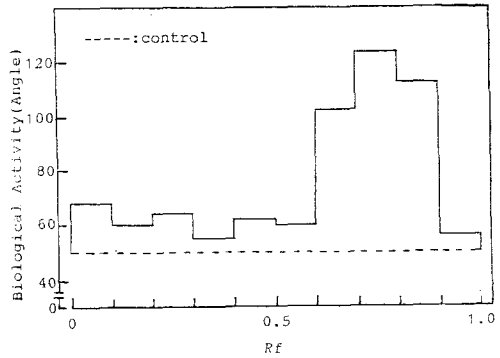


Fig. 7. Histogram of biological activity of the fractions from thin layer chromatography. TLC: Silica gel plate developed by EtOAc-EtOH(22 : 3, v/v). Bioassay: Rice inclination test with rice seedlings "Sangpung-byeo".

물을 생물검정한 결과는 t_R 21~27분을 중심으로 t_R 15~45분(8mg)에 260%에 이르는 활성을 나타냈다. 이와같이 활성 II-1, II-2 모두 넓은 범위에 활성을 보여 정성적인 효과는 없었으나 대부분의 impurity가 t_R 2~15분에 존재하여 Porasil의 HPLC에 의해 상당한 정제효과를 얻을 수 있었다.

한편, 활성 I을 동 용매(CHCl₃-iso PrOH, 95 : 5, v/v)로 2ml/min의 유속으로 용출 분획하여 생물검정한 결과, t_R 2~4분에 집중적인 활성을 나타냈으나 impurity와 중복되기에, 용매계의 극성을 줄이고(CHCl₃-iso PrOH, 99 : 1, v/v) 유속을 줄여(1.5ml/min) 용출분획하여 생체중량 300g에 상당하는 추출물로 생물검정한 결과, Fig. 8과 같이 t_R 4~10분(5mg)에 활성이 나타나고 대부분의 impurity는 t_R 2~4분에 나타나 정제효과를 얻을 수 있었다. 또 이 과정에서 활성 I의 본체는 활성 II보다 극성이 훨씬 작은 물질임이 거듭 시사되었다.

6. Reverse phase의 HPLC

Normal phase의 HPLC에 의해 정제된 활성 II-1과 II-2를 합하여 reverse phase인 C₁₈ column에 의해 분획하고 생체중량 300g에 상당하는 추출물로 생물검정한 결과 Fig. 9와 같이 t_R 6~10분(6.1 mg)에 220%에 이르는 대부분의 활성이 존재하였다.

또 정제된 활성 I을 같은 조건의 C₁₈ column에

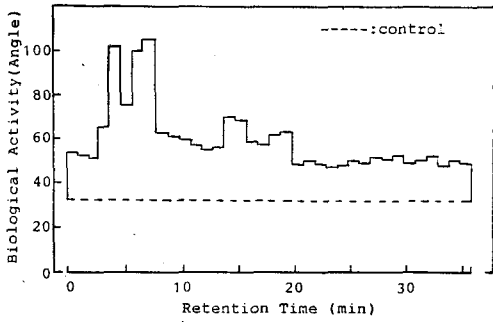


Fig. 8. Histogram of biological activity of the fractions from HPLC.

HPLC: Column, radial μ Bondapak Porasil (0.8×10 cm); mobile phase, CH_2Cl_2 -*iso* PrOH(99 : 1, v/v); flow rate, 1.5 ml/min.

Bioassay: Rice inclination test with rice seedlings "Sangpung-byeo".

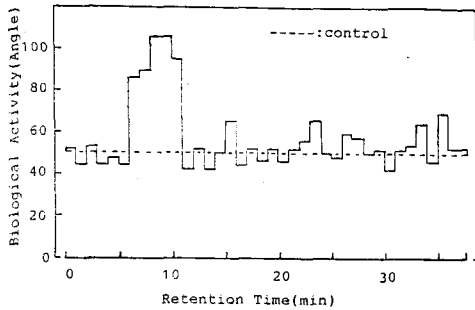


Fig. 9. Histogram of biological activity of the fractions from HPLC.

HPLC: Column, Radial C_{18} (0.8×10 cm); mobile phase, $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (45 : 55, v/v); flow rate, 2ml/min.

Bioassay: Rice inclination test with rice seedlings "Sangpung-byeo".

의해 분획하고 생체중량 300g에 상당하는 추출물로 생물검정한 결과, Fig. 10과 같이 t_R 6~12분 (3.5mg)에 290%에 이르는 대부분의 활성이 존재하였다.

이상의 결과, 전보²⁾에서 검토된 한국산 벼의 lamina joint 조직을 이용한 생물검정법을 지표로 삼아 미숙잡두종자에 포함되어 있는 BR 활성을 나타내는 물질을 검색한 결과, 극성이 다른 적어도 2종의 BR의 존재가 인정되었으며, 또 기지의 BR 보다 분자량과 극성이 낮은 새로운 활성물질의 존재가 시사되었다. 이러한 새로운 물질로서 강력한 활성형의 neutral auxin 이거나, vicinal hydroxy

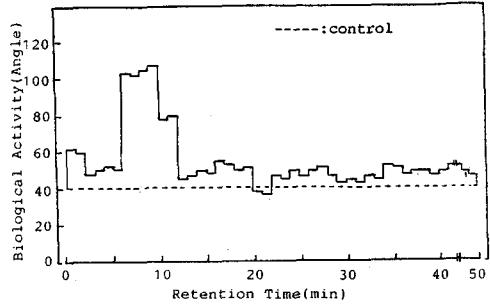


Fig. 10. Histogram of biological activity of the fractions from HPLC.

HPLC: Column, radial C_{18} (0.8×10 cm); mobile phase, $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (45 : 55, v/v); flow rate, 2ml/min.

Bioassay: Rice inclination test with rice seedlings "Sangpung-byeo"

기가 결여된 BR의 가능성이 생각되어진다.

따라서, 한국산 벼를 이용한 생물검정법²⁾은 미량의 천연 BR 검색에 유용한 수단으로 활용될 수 있으며, 콩과식물인 잠두는 BR 생산 식물범주에 포함될 수 있다고 생각된다.

초 록

미숙잡두 종자의 추출물을 silica gel chromatography, Sephadex LH-20 chromatography, TLC, 역, 순상의 HPLC 등에 의해 분획정제하여 BR 활성물질을 한국산 벼를 이용한 생물검정법에 의해 검색한 결과, 2종의 BR의 존재가 인정되었으며, BR 보다 분자량과 극성이 작은 물질의 존재가 시사되었다.

사 사

본 연구는 한국과학재단의 연구비 지원에 의해 수행된 연구의 일부이며, 관계하신 여러분께 깊은 감사를 드리는 바입니다.

참 고 문 헌

1. Mitchell, J.W., Mandava, N., Worley, J.F., Plimmer, J.R. and Smith, M.V.: Nature, 225 : 1065 (1970).
2. Grove, M.D., Spencer, G.F., Rohwedder, W.

- K., Mandava, N., Worley, J.F., Warthen, J.D., Jr., Steffens, G.L., Flippen Anderson, J.L. and Cook, J.C., Jr.: *Nature*, 281 : 216 (1979).
3. Maugh, T.H.: *Science*, 212 : 33 (1981).
4. Meudt, W.J., Thompson, M.J. and Bennett, M.W.: *Proc. Plant Growth Regul. Soc. Am.* 312 (1983).
5. Devlin, R.M., Zbiec, I.I. and Karczmarczyk, S.J.: *Proc. Plant Growth Regul. Soc. Am.* 29 (1984).
6. Meudt, W.J. and Thompson, M.J.: *Proc. Plant Growth Regul. Soc. Am.* 306 (1984).
7. Thompson, M.J., Mandava, N.B., Meudt, W.J., Lusby, W.R. and Spaulding, D.W.: *Steroids*, 38 : 567 (1981).
8. Abe, H., Morishita, T., Uchiyama, M., Kitsuwa, T., Takatsuto, S., Ikekawa, N., Ikeda, M., Sassa, T. and Marumo, S.: *Experientia*, 39 : 351 (1983).
9. Ikekawa, N., Takatsuto, S., Kitsuwa, T., Saito, H., Morishita, T. and Abe, H.: *J. Chromatogr.* 290 : 289 (1984).
10. Ikeda, M., Takatsuto, S., Sassa, T., Ikekawa, N. and Nukina, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 47 : 655 (1983).
11. Abe, H., Morishita, T., Uchiyama, M., Marumo, S., Munakawa, K., Takatsuto, S. and Ikekawa, N.: *Agric. Biol. Chem.*, 46 : 2609 (1982).
12. Arima, M., Yokota, T. and Takahashi, N.: *Phytochemistry*, 23 : 1587 (1984).
13. Katsumi, M.: *Plant Cell Physiol.*, 26 : 615 (1985).
14. Morishita, T., Abe, H., Uchiyama, M., Marumo, S., Takatsuto, S. and Ikekawa, N.: *Phytochemistry*, 22 : 1051 (1983).
15. Yokota, T., Baba, J., Koba, S. and Takahashi, N.: *Agric. Biol. Chem.*, 48 : 2529 (1984).
16. Yokota, T., Morita, M. and Takahashi, N.: *Agric. Biol. Chem.*, 47 : 2149 (1983).
17. Suzuki, Y., Yamaguchi, I. and Takahashi, N.: *Agric. Biol. Chem.*, 49 : 49 (1985).
18. Schneider, J.A., Yoshihara, K., Nakanishi, K. and Kato, N.: *Tetrahedron Letters*, 24 : 3589 (1983).
19. Yokota, T., Arima, M., Takahashi, N., Takatsuto, S., Ikekawa, N. and Takematsu, T.: *Agric. Biol. Chem.*, 47 : 2419 (1983).
20. Yokota, T., Arima, M., Takahashi, N. and Crozier, A.: *Phytochemistry*, 24 : 1333 (1985).
21. Park, K.H., Hyun, K.H. and Kim, D.Y.: *Korean J. Agric. Chem.*, 29 : 22 (1986).
22. Abe, H., Nakamura, K., Morishita, T., Uchiyama, M., Takatsuto, S. and Ikekawa, N.: *Agric. Biol. Chem.*, 48 : 1103 (1984).
23. Yokota, T., Baba, J. and Takahashi, N.: *Tetrahedron Letters*, 23 : 4965 (1982).