

통일계 벼의 Brassinosteroid활성물질 검색

현 규 환 · 박 근 형
전남대학교 농과대학 식품공학과

Investigation of Brassinosteroid substances in the shoots of hybrid type korean rices.

Kyu-Hawn Hyun and Keun-Hyung Park

Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Chonnam National University, Kwang-Ju, 500-757, Korea

ABSTRACT

The production of brassinosteroid-like substances of two hybrid types of Korean rice, Jangseongbyeo, Taebackbyeo were investigated. The shoots at the maximum tillering stage were extracted and purified by solvent fractionation, silica gel adsorption chromatography Sephadex LH-20 chromatography, charcoal adsorption chromatography, Bondesil chromatography and HPLC of reverse phase, successively. Biological activities of each purification step were monitored by the rice lamina inclination test. Higher activities against the rice lamina inclination test in the each purification step showed that the shoots of two cultivars biosynthesize brassinosteroids. Two cultivars also showed a similar distribution of biological activities of endogenous brassinosteroids detected by HPLC.

서 론

Steroid 구조물질인 새로운 생물활성물질로 brassinolide가 유채화분에서 발견(1, 2)된 이래 brassinosteroid로 총칭되는 brassinolide활성을 갖는 steroid성 활성물질이 다른 식물에서도 발견되고 있으며 brassinosteroid에 의해 발현되는 특이하고도 다양한 생물활성(3-6) 또한 알려져 있다.

지금까지 brassinosteroid의 존재가 알려진 식물은 20여종에 이르고 있으나, brassinosteroid가 식물계에 보편적으로 존재하는 물질이며 또 어떠한 brassinosteroid를 생산하고 있는가라는 식물이 생산하는 brassinosteroid의 탐색에 관한 연구는 식량과 유용자원을 공급하고 있는 식물의 적극적인 이용연구의 기초가 되리라 생각된다.

여기에 본 연구는 우리나라에서 재배하고 있는 벼의 brassinosteroid활성물질 탐색의 일환으로 일반계(7)에 이어 통일계 품종인 장성벼와 태백벼를 대상으로 하여 brassinosteroid활성물질을 검색하였다.

재료 및 방법

실험재료

우리나라에서 재배되고 있는 통일계(*japonica* × *indica* type) 품종인 장성벼와 태백벼를 대상으로 하였으며, 이들 벼 품종을 1987년 11월 농촌진흥청 산하기관에서 분양받아 다음 해인 1988년 5월에 전남대학교 농과대학 포장에서 벼를 이앙, 재배하면서, 벼의 생육시기중 세포분열이 활발하다고 인정되어지는 최고분얼기때 지상부를 20kg씩

채취하여 시료로 사용하였다.

추출 및 용매분획

최고분얼기때 채취한 비 지상부 20kg을 세절한 후, MeOH과 함께 마쇄하여 추출한 다음, 여과지(Toyo No. 2)와 G₃ glass filter를 사용하여 여과하였다. 이 추출 조작은 3회 반복하여 얻은 추출 여액을 40°C에서 감압 농축하여 MeOH이 제거된 수용액을 Park등의 방법(8, 9)에 따라 용매분획하였다.

Silica gel 흡착 chromatography

Silica gel(100~200mesh, column chromatography용, Merck 사)을 CHCl₃으로 slurry를 만들어 column을 제작하고, 시료를 CHCl₃-MeOH 용매계로 MeOH 농도를 0%에서 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 15, 20, 50%까지 단계적으로 증가시키면서 step-wise 용출(silica gel 10g 당 0~2%는 74ml, 3~9%는 55ml, 12~50%는 78ml)하면서 분획하였다.

Sephadex LH-20 chromatography

Sephadex LH-20(25~100 μ , Pharmacia사)을 MeOH-CHCl₃(4:1, v/v) 용매계(9)와 70% EtOH 용매계(8, 10, 11)로 하룻밤 팽윤 시킨 후 column에 충전(MeOH-CHCl₃, bed volume 1,000ml; 70% EtOH, bed volume 300ml)하고, 동 용매계로 용출 분획하였다.

Charcoal 흡착 chromatography

Charcoal(60~150mesh, Nakarai사)을 H₂O, MeOH, CHCl₃으로 각각 3회씩 세척하여 건조시킨 다음, 시료의 약 15배량의 charcoal을 Park등의 방법(9)에 따라 column을 제작하고, 동 용매계로 시료를 녹여 흡착시킨 후, charcoal 10g 당 40%(40ml), 80%(20ml), 100% MeOH(30ml)로 순차 용출 분획한 다음, 또다시 MeOH-CHCl₃ 용매계로 MeOH 농도를 90%(20ml)에서 70(20ml), 50(20ml), 30(20ml), 10(40ml), 0%(95ml)까지 단계적으로 감소시키면서 순차 용출 분획하였다.

Bondesil chromatography

Gel(HPLC preparative grade, 40 μ m, Analytichem International사) 2g을 column에 충전하고, 질소 gas 압력하에서 MeOH로 충분히 washing 시킨 후, 시료를 MeOH로 녹여 흡착시키고, MeOH 0.5ml씩 용출 분획하였다.

HPLC

시료를 여과(Millipore FH, 0.5 μ m, Waters사)시킨 다

음, C₁₈ column(Waters사, 0.8×10cm)에 의한 HPLC는 MeCN-H₂O(45:55, v/v) 용매계로, ODS column(0.8×25cm, ODS-3215-D, Senshu사)에 의한 HPLC 역시 MeCN-H₂O(45:55, v/v) 용매계로 각각 분당 2ml로 용출 분획하였다.

생물검정법

상풍배의 조직을 이용하여, 본 연구실에서 검토한 방법(16)으로 활성을 검정하였다.

결 과

용매분획

최고분얼기까지 채배된 장성배와 태백배의 지상부 20kg씩을 수확하여, 과량의 MeOH존재하에 마쇄, 추출하고, 용매분획하여 얻어진 *n*-Hexane획분, 중성획분(Neutral EtOAc soluble fraction) 그리고, 수용액획분(0.2M KH₂PO₄ buffer soluble fraction)을 얻었다. 이들 획분을 대상으로 생물검정한 결과, 장성배, 태백배 모두 가용 중성획분인 EtOAc획분(장성배 33.56g, 태백배 36.50g)에 brassinosteroid-like 활성이 집중되었으며, 수용액 획분(장성배 6.3g, 태백배 6.7g)에서도 brassinosteroid-like 활성이 인정되었다. 이것은, 유리형의 brassinosteroid가 중성획분에 존재한다는 일련의 보고(10~15)와 잘 일치하고 있을 뿐 아니라, 본 실험에서 채용된 bioassay법이 brassinosteroid활성물질에 specific하게 감도가 높은점 등을 고려할 때, 두 품종의 배에는 유리형의 brassinosteroid 존재는 물론, 약하나마 결합형 brassinosteroid의 존재 가능성이 시사 되었다.

Silica gel 흡착 chromatography

용매분획에서 활성이 집중된 두 품종의 EtOAc획분을 CHCl₃-MeOH 용매계의 silica gel 흡착 chromatography로 용출 분획하고 각 획분의 활성을 검정한 결과, 장성배의 경우는 Fig. 1과 같은 활성을 나타냈다.

장성배는 MeOH 농도 4, 5, 6, 7% 용출획분에서 생체중량 30g에 상당하는 추출물에 의해 대조구에 대비 260%에 이르는 대부분의 활성이 나타났으며, 또 MeOH 농도 0% 용출획분인 저극성 부위에 약간의 활성이 인정되었다.

태백배의 경우도 장성배와 유사한 경향을 나타내, MeOH 농도 4, 5, 6, 7% 용출획분에서 생체중량 30g에 상당하는 추출물에 의해 270%에 이르는 활성을 나타냈으며, 또한 저극성 물질의 용출영역인 MeOH 농도 0% 용출획분에서도 활성이 인정되었다.

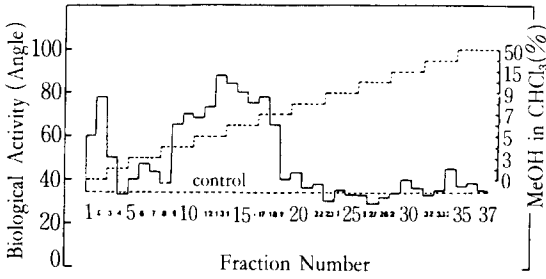


Fig. 1. Distribution of biological activity determined by the rice lamina inclination test with seedlings Sangpungbyeo after silica gel adsorption chromatography of the extract from *O. sativa* cv. Jangseongbyeo.

동 용매계에 의한 silica gel 흡착 chromatography에 있어서 기지의 천연 brassinosteroid의 거동 (8, 9, 14, 17)과 두 품종의 brassinosteroid 활성획분이 MeOH 농도 4~7% 용출영역에 대부분의 활성이 나타난 결과와 잘 일치하고 있어, 장성버, 태백벼에 brassinosteroid 활성물질의 존재 가능성을 확인할 수 있었다.

한편, 저극성 물질의 용출영역에서 두 품종 모두 활성이 인정되었는데, 활성분체는 silica gel 흡착 chromatography 상의 거동으로 보아 brassinosteroid이기 보다는 활성형 auxin(8, 17)으로 생각되어진다.

Sephadex LH-20 chromatography

Silica gel 흡착 chromatography의 활성획분(장성버 1 g, 태백벼 12 g)을 MeOH-CHCl₃ (4:1, v/v)용매계를 사용하여 Sephadex LH-20 chromatography의 gel filtration에 의하여 용출 분획하고 활성을 검정한 결과, 장성버의 경우는 Fig. 2와 같은 활성을 나타냈다. 생체중량 50 g에 상당하는 추출물에 의해 장성버는 Ve/Vt 0.60~0.75의 용출범위에서 280%에 이르는 활성을, 그리고 태백벼역시 장성버와 유사한 경향을 나타내, Ve/Vt 0.65~0.75의 용출범위에서 200%에 이르는 활성을 나타냈다. Park등(9)은 동일조건에서 전형적인 brassinosteroid의 용출범위가 Ve/Vt 0.625~0.750의 용출범위라고 보고한 바 있는데, Park등의 보고와 본실험의 결과와 잘 일치하고 있어, 장성버, 태백벼의 활성분체는 brassinolide나 castasterone의 brassinosteroid와 거의 같은 분자량을 갖는 물질에 의해 활성이 발현되고 있음을 알 수 있었다.

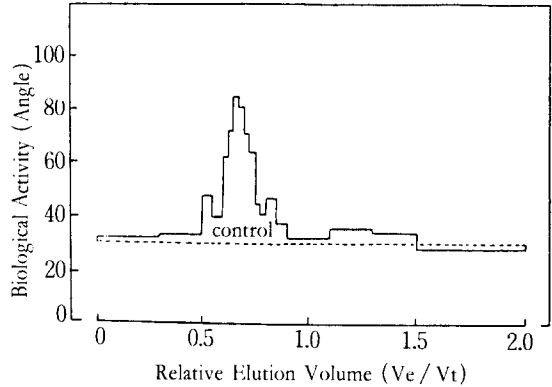


Fig. 2. Distribution of biological activity determined by the rice lamina inclination test with seedlings Sangpungbyeo after Sephadex LH-20 chromatography of the extract from *O. sativa* cv. Jangseongbyeo.

Charcoal 흡착 chromatography

Sephadex LH-20 chromatography에서 부분 정제된 활성획분(장성버 4.5 g, 태백벼 4.9 g)을 40% MeOH에 녹여 흡착시킨 후, MeOH-H₂O 및 CHCl₃-MeOH의 용매계로 용출 분획하여 활성을 검정한 결과, 태백벼의 경우는 Fig. 3과 같은 활성을 나타냈다. 장성버는 생체중량 100 g, 태백벼는 200 g에 상당하는 추출물에 의해 장성

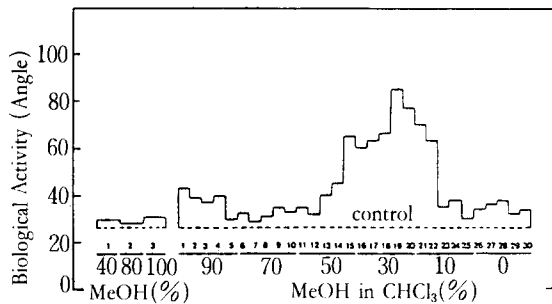


Fig. 3. Distribution of biological activity determined by the rice lamina inclination test with seedlings Sangpungbyeo after charcoal adsorption chromatography of the extract from *O. sativa* cv. Taebackbyeo.

며, 태백버 모두 Fig. 3과 같은 양상을 보여 MeOH 농도 30%를 중심으로 50-10%에서 각각 270%, 330%에 이르는 활성을 나타냈다. 이 용출위치는 Park등(9)에 의한 동일조건인 charcoal 흡착 chromatography의 결과와 잘 일치하고 있어, 이 활성은 brassinosteroid에 의해 발현되고 있음을 재확인할 수 있었을 뿐만 아니라 상당한 정제효과도 얻을 수 있었다.

Sephadex LH-20 chromatography

Charcoal 흡착 chromatography에서 얻어진 활성획분(장성버 0.7 g, 태백버 0.6 g)을 더욱 정제하고 활성분체에 대한 정보를 얻기 위하여, 70% EtOH용매계로 Sephadex LH-20 chromatography에 의해 분획하고 얻어진 획분에 대해 활성을 검정한 결과, 장성버의 경우는 Fig. 4와 같은 활성을 나타냈다. 장성버는 생체중량 200 g, 태백버는 400 g에 상당하는 추출물에 의해 장성버는 V_e/V_t 0.66~0.74의 용출범위에서 280%에 이르는 활성을, 그리고 태백버도 장성버와 유사한 양상을 보여, V_e/V_t 0.62~0.74의 용출범위에서 290%에 이르는 활성을 나타냈다. 이 용출범위는 Yokota(10), Park등(17)이 보고한 dolicholide, dolichosterone, homodolichosterone, brassinolide, castasterone 그리고 6-deoxydolichosterone 등의 brassinosteroid가 동 용매계에 의한 Sephadex LH-20 chromatography에서의 용출범위인 V_e/V_t 0.65~0.80과 일치하여 이 활성물질의 활성분체가 기지의 brassi-

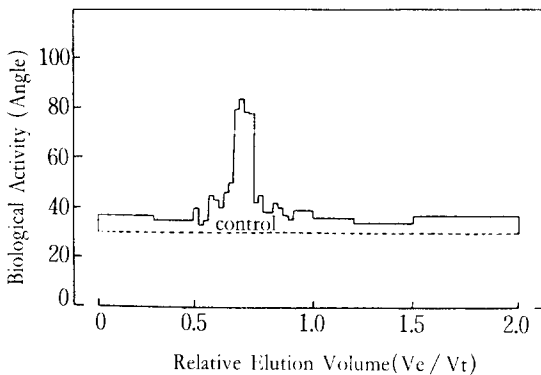


Fig. 4. Distribution of biological activity determined by the rice lamina inclination test with seedlings Sangpungbyeo after Sephadex LH-20 chromatography of the extract from *O. sativa* cv. Jangseongbyeo.

nosteroid와 유사한 분자량을 갖는 활성물질임을 재확인할 수 있었다.

Bondesil chromatography

Sephadex LH-20 chromatography에서 부분 정제된 활성획분(장성버 0.14 g, 태백버 0.21 g)을 더 정제하기 위하여, MeOH에 의한 Bondesil chromatography로 용출 분획하고, 얻어진 획분에 대하여 활성을 검정한 결과, 장성버의 경우는 Fig. 5와 같은 활성을 나타냈다. 생체중량 600 g에 상당하는 추출물에 의해 장성버는 2.5~4.0 ml의 용출범위에서 270%에 이르는 활성을, 그리고 태백버도 장성버와 같이 3.5~4.5 ml의 용출범위에서 310%에 이르는 활성을 나타내어, 활성의 재확인 뿐만 아니라, 상당한 정제효과도 얻을 수 있었다.

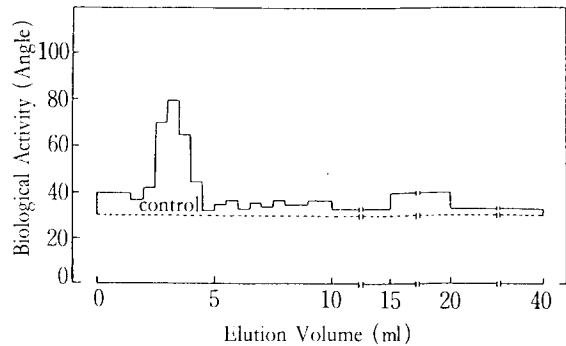


Fig. 5. Distribution of biological activity determined by the rice lamina inclination test with seedlings Sangpungbyeo after Bondesil chromatography of the extract from *O. sativa* cv. Jangseongbyeo.

C_{18} column을 사용한 reverse phase의 HPLC

Bondesil chromatography에서 정제된 활성획분(장성버 48mg, 태백버 98mg)을 C_{18} column을 사용하여 HPLC를 행하여 분획하고, 활성을 검정한 결과 생체중량 1kg에 상당하는 추출물에 의해 장성버의 경우 retention time (이하 R_t) 6~14, R_t 20~24, R_t 26~28, R_t 36~40분의 범위에서 200~270%에 이르는 활성을, 그리고 태백버의 경우는 R_t 7~12, R_t 18~26, R_t 28~32, R_t 40~42분의 범위에서 200~320%에 이르는 활성을 나타냈다. preparative의 목적으로 수회 반복 분획 하였기에, 정성적인 효과는 한계가 있을 것으로 생각되나, 장성버, 태백버가

서로 유사한 양상을 보이고, 또 두 품종 모두 넓은 영역에서 활성이 인정되어, 두 품종 비에는 2종 이상의 brassinosteroid 존재 가능성이 시사 되었다.

ODS column을 사용한 reverse phase의 HPLC

C₁₈ column의 HPLC에 이르는 일련의 정제과정에서 brassinosteroid 활성물질로 확인되고, 정제된 활성성분의 본체에 대한 정보를 얻고자 장성벼와 태백벼의 활성획분을 ODS column의 HPLC로 분획하고 활성을 검정한 결과를 장성벼는 Fig. 6에, 그리고 태백벼는 Fig. 7에 나타냈다. 생체중량 3.0kg에 상당하는 추출물에 의해 장성벼의 경우, R_t 9~10, R_t 15~18, R_t 19~22, R_t 23~25, R_t 27~29, R_t 30~32, R_t 33~36, R_t 39~40, R_t 42~44분의 용출위치에서 140~180%에 이르는 활성을 나타냈으며, 태백벼 역시 장성벼와 유사하게 R_t 8~11, R_t 15~18, R_t 20~22, R_t 23~25, R_t 26~28, R_t 30~32, R_t 35~38, R_t 39~42분의 용출위치에서 130~180%에 이르는 활성을 나타냈다. 이 결과를 동일조건의 HPLC에 의해 조사한 authentic specimens의 용출위치

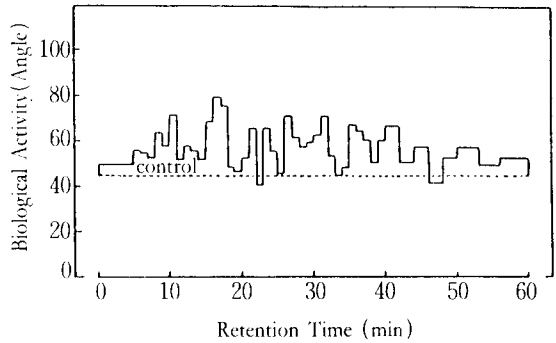


Fig. 7. Distribution of biological activity determined by the rice lamina inclination test with seedlings Sangpungbyeo after HPLC on ODS column chromatography of the extract from *O. sativa* cv. Taeb-ackbyeo.

(Fig. 6)와 비교하여 보면, 장성벼의 경우, R_t 9~10, R_t 15~18, R_t 19~22, R_t 23~25, R_t 27~29, R_t 30~32분의 활성분체, 그리고 태백벼의 경우는 R_t 8~11, R_t 15~18, R_t 20~22, R_t 23~25, R_t 26~28, R_t 30~32분의 활성분체가 각각 dolicholide, brassinolide, homodolichosterone, castasterone, homobrasinolide와 ethyl brassinone으로 추정되어지며, 그외에 장성벼의 경우에는 R_t 33~36, R_t 39~40, R_t 42~44분, 그리고 태백벼의 경우는 R_t 35~38, R_t 39~42분에서도 활성이 인정되어, 장성벼, 태백벼 모두 6종 이상의 brassinosteroid의 존재 가능성이 시사 된다.

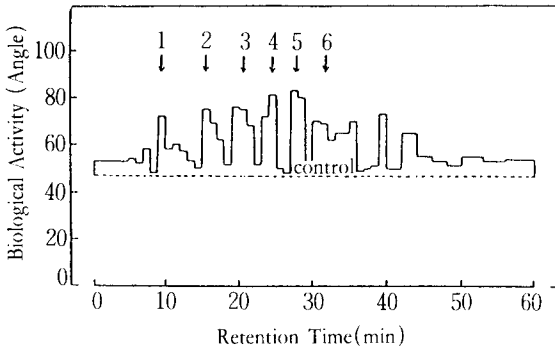


Fig. 6. Distribution of biological activity determined by the rice lamina inclination test with seedlings Sangpungbyeo after HPLC on ODS column chromatography of the extract from *O. sativa* cv. Jang-seongbyeo. The arrow denote the elution position of authentic specimens:

1. dolicholide
2. brassinolide
3. homodolichosterone
4. castasterone
5. homobrasinolide
6. (24S)-24-ethylbrassinone.

고 찰

용매분획에서 얻어진 활성획분을 silica gel 흡착 chromatography, Sephadex LH 20 chromatography, charcoal 흡착 chromatography, Bondesil chromatography 그리고 reverse phase의 HPLC등의 수법을 사용한 정제과정에서 brassinosteroid 활성을 매년 확인할 수 있었다. 또 각 chromatography에서의 활성분체의 거동은 기지의 brassinosteroid의 거동과 잘 일치하고 있어, 2품종 모두 brassinosteroid 활성물질을 생산하고 있음을 확인할 수 있었으며, ODS column의 HPLC로 분획하고 검정된 활성성분의 용출위치와 authentic specimens의 용출위치와 비교에 의해 장성벼와 태백벼 2품종 모두 다수의 brassinosteroid 존재가 추정 되었다. 보다 확실한 동정을

위해서는 GC/MS나 GC/SIM등의 분석이 요구 되어지나, 지금까지의 지견을 종합하여 보면 두 품종간 endogenous brassinosteroid의 유사성이 인정되었으며, 또 일반계의 endogenous brassinosteroid와도 유사성이 인정되었다.

Brassinosteroid활성물질의 함유량은 생물검정법에 의해 brassinolide의 활성과 비교 측정한 결과, 70~90 pg/g fr. wt. 수준이었는데 이것은 일반계 벼 품종의 brassinosteroid 함유량 (190~210 pg/g fr. wt.)보다 낮은 경향을 나타내었다.

요 약

통일계 품종의 벼를 대상으로 brassinosteroid활성물질의 검색을 시도 하였다. 장성벼와 태백벼를 최고분얼기까지 재배하여 지상부를 수확하고, 유기용매로 추출하여 얻어진 추출물에서 rice lamina inclination test에 의한 생물검정법으로 활성이 인정되어, 활성본체의 구명과정제의 목적으로 각각의 활성구를 silica gel 흡착 chromatography, Sephadex LH-20 chromatography, charcoal 흡착 chromatography, Bondesil chromatography 그리고 reverse phase의 HPLC등의 수법으로 분획하여 검정하였다. 그 결과 2품종 모두 brassinosteroid활성물질을 생산하고 있으며, 또 2품종간의 endogenous brassinosteroid의 유사성이 인정되었다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 연구비 지원(881-1502-016-2)으로 수행 되었기에 재단당국에 감사드리며, 실험을 도와준 안찬영, 문제학, 김선재군에게 감사함을 드립니다.

참 고 문 헌

I. J. W. Mitchell, N. Mandava, J. F. Worley, J. R. Pli-

- mmmer and M. V. Smith (1970), *Nature*, **225**, 1065.
2. M. D. Grove, G. F. Spencer, W. K. Rohwedder, N. Mandava, J. F. Worley, J. D., Jr. Warthen, G. L. Steffens, J. L. Flippen Anderson and J. C. Cook (1979), *Nature*, **28**, 216.
3. L. E. Gregory(1981), *Am. J. Bot.*, **68**, 586.
4. T. H. Maugh(1981), *Science*, **212**, 33.
5. F. Fujita(1985), *Kagaku-to-seibutsu*, **23**, 717.
6. T. Takematsu and Y. Takeuchi(1983), *Chem. Regul. Plants*, **18**, 38.
7. K. H. Park and K. H. Hyun(1990), *Korean J. Agric. Chem.*, **33**, 307.
8. K. H. Park(1988), *Korean J. Agric. Chem.*, **31**, 106.
9. K. H. Park H. Saimoto, S. Nakagawa, A. Sakurai, T. Yokota, K. Syono and N. Takahashi(1989), *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 805.
10. T. Yokota, J. Baba, S. Koba and N. Takahashi(1984), *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2529.
11. M. Ikeda, S. Takatsuto, T. Sassa, H. Ikekawa and M. Nukiwa (1983) *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 655.
12. H. Abe, T. Morishita, M. Uchiyama, S. Marumo, K. Munakawa, S. Yakatsuto and N. Ikekawa(1982), *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2609.
13. M. Arima, T. Yokota and N. Takahashi(1984), *Phytochemistry*, **23**, 1587.
14. Y. Suzuki, I. Yamaguchi and N. Takahashi(1985), *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 49.
15. T. Yokota, J. Baba, and N. Takahashi(1982), *Tetrahedron Letters*, **23**, 4965.
16. K. H. Park, K. H. Hyun and D. Y. Kim(1986), *Korean J. Agric. Chem.*, **29**, 22.
17. K. H. Park, T. Yokota, A. Sakurai and N. Takahashi(1987), *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 3081.

(Received; April 26, 1991, Accepted; May 17, 1991)