

미역의 Brassinosteroid 활성물질검색

문 제 학·현 규 환·박 근 형
전남대학교 식품공학과

Investigation of Brassinosteroid Substances in *Undaria pinnatifida*

Jae-Hak Moon, Kyu-Hawn Hyun, Keun-Hyung Park

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

ABSTRACT

In order to examine the presence of brassinosteroid substance in sea mustard(*Undaria pinnatifida*), leaves of sea mustard were extracted with MeOH. The extract was purified by solvent fractionation, counter current distribution, silica gel adsorption chromatography, charcoal adsorption chromatography, Bondesil chromatography, and reverse phase HPLC, successively. The activity was monitored by the rice inclination test and its presence could be confirmed in each purification step. Although sea mustard contained a less amount of the active substance than the vegetative tissue of higher plants, brassinosteroid was clearly present endogenously in sea mustard. We acknowledge that our work is probably the first publication reporting the presence of brassinosteroid in marine algae plants.

서 론

1979년 미국 농무성의 Grove등(1)에 의해 새로운 성장조절물질로 brassinolide가 보고된 이후, brassinolide 및 그 동족체인 brassinosteroid에 대한 연구가 계속 진행되어 그 존재가 알려진 식물은 지금까지 20여종(1,8-13)에 이르고 있는데, steroid의 구조와 이들의 특이한 생리적 작용(2-5)으로 관심이 집중되고 있다.

또한 식량과 유용자원은 주로 식물에 의존하고 있는데, 그것도 지질이나 기후등을 고려할 때 전 육지의 10%의 면적 밖에 이용할 수 없는 형편이어서, 식량 증산을 위해서는 단위면적당 수확을 증가시키는 것과 또 지구 표면적의 70%에 해당하는 광대한 바다에서 서식하는 해조류를 적극적으로 이용하는 것도 하나의 방법일 것으로 생각된다. 따라서 식물 자신이 생산하여 자신의 생리현상을 제어하고 있는 성장조절물질에 관한 연구는 인류에게 식량과 유용자원으로 공급되고 있는 식물의 적극적인 이용 측면에 있어서 그 연구의 필요성이 요구되어지고 있으나, 하등식물인 해조류가 생산하는 brassinosteroid

활성물질에 관한 연구가 아직까지 수행된 바 없다.

한편, 최근들어 식품에 대한 연구는 지금까지 중요시되어 왔던 식품의 영양과 기호성 외에 소위 제3차 기능이라고 불리는 식품에 존재하는 활성물질에 의한 성장조절기능의 가능성에 대해 관심이 고조되고 있는데, 식품의 제3차 기능을 구명하기 위해서는 식품중에 존재하는 활성물질의 검색이 우선적으로 요구되어질 것이다. 여기에 본 연구는 하등식물인 해조류로서 식용으로 널리 이용되고 있을 뿐 아니라 우리나라에서 해조류중 가장 많이 이용되고 있는 미역의 가식부인 엽상부에 포함된 brassinosteroid 활성물질을 검색하였다.

실험재료 및 방법

실험재료

완도군 완도읍의 양식장에서 종묘 후 60여일 생육시킨 미숙상태의 미역 18kg을 구입하였다.

추출 및 용매분획

미역을 세절하여 과량의 메탄올과 함께 마쇄 추출

한 다음, 여과지(Toyo No.2)와 G₃ glass filter를 사용하여 여과하였다. 이 추출 조작을 3회 반복하여 얻은 추출여액을 Rotary vacuum evaporator로 40 °C에서 감압 농축하여 메탄올이 제거된 수용액을 Park등의 방법(6,7)에 따라 CHCl₃으로 추출하고, CHCl₃획분을 85% 메탄올과 *n*-Hexane으로 분배한 다음, 85% 메탄올을 다시 EtOAc와 buffer(0.2M K₂ HPO₄)로 분배하였으며, buffer 획분은 다시 CHCl₃으로 추출하였다.

Counter Current Distribution (CCD)

CHCl₃-Benzene(2 : 3, v/v)과 MeOH-H₂O(5 : 2, v/v)의 용매계, *n*-Hexane-Benzene(9 : 1, v/v)과 MeOH-H₂O(9 : 1, v/v)의 용매계(7)를 각각 이용하였으며, 모든 용매계는 미리 포화시켜 사용하였고, 매 단계의 상층과 하층을 300ml로 하여 각각 5단계 이행시켰다.

Silica gel 흡착 chromatography

Silica gel(220g, 70-230 mesh, column chromatography용, Merck사)을 benzene으로 slurry를 만들어 column에 충전(3.3×64cm)시킨 후 Benzene-EtOAc용매계로 EtOAc의 농도를 0%, 60%, 80%, 100%까지 증가시키면서 용출(silica gel 10g당 45ml)시키고, 계속해서 EtOAc-MeOH용매계로 MeOH의 농도를 5%, 10%, 15%, 20%, 100%까지 단계적으로 증가시킨 step-wise용출(silica gel 10g당 45ml)방법을 사용하여 분획하였다.

Sephadex LH-20 chromatography

Sephadex LH-20(25-100 μ , Pharmacia사)을 MeOH-CHCl₃(4 : 1, v/v)용매계(6)와 70% EtOH용매계(7, 8, 9)로 하룻밤 팽윤 시킨 후 column에 충전(MeOH-CHCl₃, bed volume 250ml ; 70% EtOH, bed volume 200ml)하고, 동용매계로 용출 분획하였다.

Charcoal 흡착 chromatography

Charcoal(60-150 mesh, Nakarai사)을 H₂O, MeOH, CHCl₃으로 각각 3회씩 세척하여 건조시킨 다음, charcoal 50g을 Park등(7)의 방법에 따라 40% MeOH로 slurry를 만들어 column에 충전(2.2×56cm)하고, 동 용매계로 시료를 녹여 흡착시킨 후 charcoal 10g당 40%(30ml), 80%(15ml), 100% MeOH(15ml)로 순차 용출 분획한 다음, 또 다

시 MeOH-CHCl₃ 용매계로 MeOH 농도를 charcoal 10g당 90%(15ml)에서 70%(15ml), 50%(15ml), 30%(15ml), 10%(15ml), 0%(80ml)까지 단계적으로 감소시키면서 순차 용출 분획하였다.

Bondesil chromatography

Gel 2g (HPLC preparative grade, 40 μ m, Analytichem International사)을 column에 충전하고, 질소가스 압력하에서 MeOH로 충분히 세척시킨 후, 시료를 MeOH로 녹여 흡착시키고, 각 획분을 0.5ml씩으로 하여 총 20ml의 MeOH로 용출 분획하였다.

HPLC

시료를 여과(Millipore FH, 0.5 μ m, Waters사)시킨 다음 C₁₈ column(Waters사, 1.9×30cm)에 의한 preparative HPLC는 80% MeOH용매계로 분당 9ml로 용출 분획하였으며, ODS column(Senshu사, 0.8×25cm, ODS-3251-D)에 의한 HPLC는 MeCN-H₂O(45 : 55, v/v)용매계를 이용하여 분당 2ml로 용출 분획하였다.

Brassinosteroid의 활성검정

상풍벼의 조직을 이용한 Park등(5)의 생물검정법(rice inclination test)에 의하여 brassinosteroid 활성을 검정하였다.

결과 및 고찰

용매분획과 활성물질의 확인

미역 18kg을 MeOH로 추출하고 용매분획하여 얻어진 *n*-Hexane획분, EtOAc획분(Neutral EtOAc soluble fraction), CHCl₃획분, 그리고 수용액획분(0.2M KH₂PO₄ buffer soluble fraction)을 대상으로 활성을 검정한 결과 중성가용획분인 EtOAc획분에 대부분의 brassinosteroid 활성을 나타냈으며, *n*-Hexane획분에서도 약하나마 활성이 인정되었다. brassinosteroid는 용매분획의 중성획분에 존재한다는 일련의 보고(8-13)와 일치하여, 미역 추출물에 brassinosteroid 활성물질의 존재가 시사되었다.

CCD

활성이 집중된 EtOAc획분(14.43g)에 대하여 CHCl₃-benzene과 MeOH-H₂O의 용매계를 사용하여 CCD를 행한 후 각 분획의 생체중량 5, 20g에 상당하는 추출물에 의해 활성을 검정한 결과를 Fig. 1에

나타냈다. 분획 0의 상층, 1의 상층, 5의 하층을 제외한 모든 분획이 대조구에 비하여 290%에 이르는 활성을 보였으며, *n*-Hexane획분(34.58g)은 *n*-Hexane-Benzene과 MeOH-H₂O용매계(13)를 사용하여 CCD를 행한 후 각 분획에 대해 생체중량 5, 20g에 상당하는 추출물에 의해 활성을 검정한 결과 Fig. 2

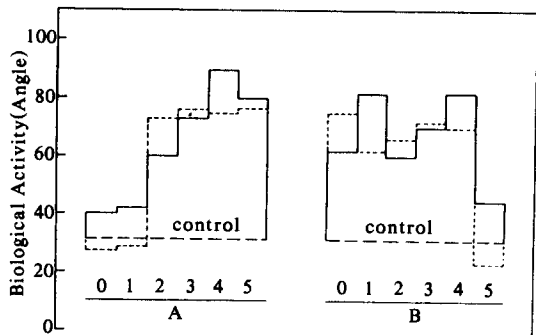


Fig. 1. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test with seedlings Sangpungbyeo after CCD of EtOAc phase from the solvent fractionation. The numbers mean a five transfer CCD between CHCl₃-Benzene and MeOH-H₂O. A: upper phase, B: lower phase. —: fresh weight 5g equivalent. - - -: fresh weight 20g equivalent.

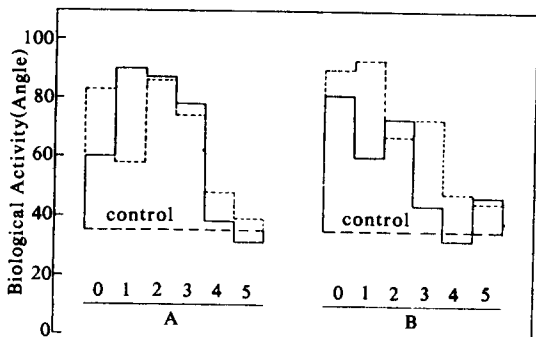


Fig. 2. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test with seedlings Sangpungbyeo after CCD of *n*-Hexane phase from the solvent fractionation. The numbers mean a five transfer CCD between *n*-Hexane-Benzene and MeOH-H₂O. A: upper phase, B: lower phase. —: fresh weight 5g equivalent. - - -: fresh weight 20g equivalent.

와 같이 이행횟수 0-3까지의 분획에서 대조구에 비하여 270%에 이르는 활성을 보였다. *n*-Hexane획분의 CCD 활성획분(17.5g)과 EtOAc획분의 CCD 활성획분(2.61g)을 합하여 미역의 brassinosteroid 활성획분(20.11g)으로 하였다.

Silica gel 흡착 chromatography

CCD의 brassinosteroid 활성획분(20.11g)에 대하여 silica gel 흡착 chromatography를 행하여 용출 분획한 후, 각 분획에 대하여 생체중량 30g에 상당하는 추출물에 의해 활성을 검정한 결과는 Fig. 3과 같다. EtOAc내의 MeOH 농도 5% 용출분획에서 대조구에 비하여 250%에 이르는 활성을, 그리고 MeOH 농도 10% 용출분획에서 240%에 이르는 활성을 나타내, EtOAc내의 MeOH 농도 5~10% 용출한 분획을 silica gel 흡착 chromatography의 brassinosteroid 활성획분(4.26g)으로 하였다.

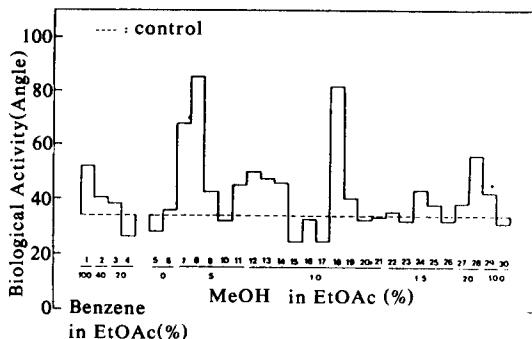


Fig. 3. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test with seedlings Sangpungbyeo after silica gel adsorption chromatography of the extract from sea mustard.

Sephadex LH-20 chromatography

Silica gel 흡착 chromatography의 활성획분을 MeOH-CHCl₃ 용매계를 사용하여 Sephadex LH-20 chromatography의 gel filtration에 의하여 용출 분획하고 활성을 검정한 결과는 Fig. 4와 같다. 생체중량 100g에 상당하는 추출물에 의해 elution volume/bed volume(Ve/Vt) 0.52-0.90의 용출범위에서 대조구에 비하여 250%에 이르는 활성을 나타냈다. Park등(6)은 동일 조건의 gel filtration에서 brassinosteroid의 전형적인 용출 범위가 Ve/Vt 0.62-0.75라고 보고한 바 있는데, 본 실험의 결과는 Park등이 보고한 용출 범위를 중심으로 Ve/Vt

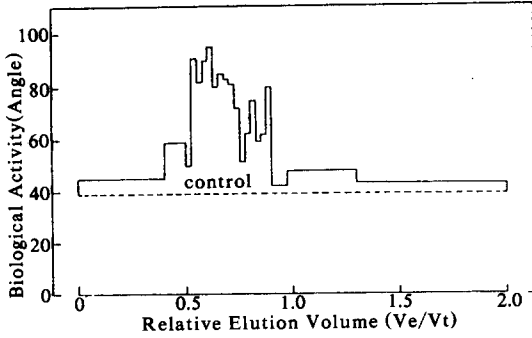


Fig. 4. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test with seedlings Sangpungbyeo after Sephadex LH-20 chromatography on the silica gel adsorption chromatography(active fraction) of the extract from sea mustard.

0.52-0.90에 걸쳐 활성을 나타내, 미역의 brassinosteroid활성본체가 이미 알려진 brassinosteroid와 유사한 분자량을 갖는 물질에 의해 활성이 발현되고 있음이 시사되었으며, Ve/Vt 0.52~0.90획분(2.10g)을 활성획분으로 하였다.

Charcoal 흡착 chromatography

정제된 활성획분(2.10g)을 charcoal이 충전된 column에 흡착시키고 MeOH-H₂O의 용매계로 순차 용출시킨 다음, 이어서 CHCl₃-MeOH 용매계로 순차 용출 분획하여 생체중량 250g에 해당하는 추출물에 의해 활성을 검정한 결과는 Fig. 5와 같다. MeOH 농도 50%와 30%의 용출분획에서 대조구에 비하여 323%에 이르는 활성을 나타내었다. 이 용출 위치는 Park등(6)에 의한 동일조건의 charcoal 흡

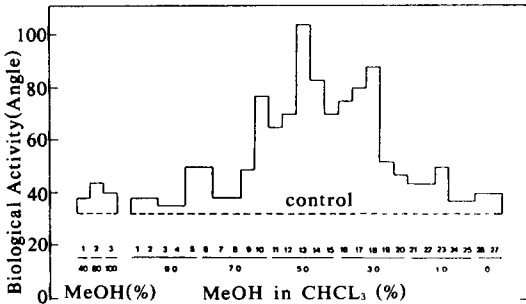


Fig. 5. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test with seedlings Sangpungbyeo after charcoal adsorption chromatography.

착 chromatography의 결과와 유사한 위치에서 활성이 인정되어 brassinosteroid 활성물질의 존재를 재확인할 수 있었을 뿐만 아니라 좋은 정제효과를 얻을 수 있었으며, MeOH농도 30~50%의 용출분획(0.35g)을 활성획분으로 하였다.

Sephadex LH-20 chromatography

Charcoal 흡착 chromatography의 활성획분(0.35g)을 더욱 정제하고 활성 본체에 대한 정보를 얻기 위하여 70% EtOH을 이용하여 Sephadex LH-20 chromatography에 의해 분획하여 얻어진 각 분획에 대하여 생체중량의 500g에 해당하는 추출물에 의해 활성을 검정한 결과는 Fig. 6과 같다. Ve/Vt 0.60-0.78의 용출 범위에서 대조구에 비하여 266%에 이르는 활성을 나타내어 brassinosteroid가 동 용매계에 의한 Sephadex LH-20 chromatography의 Ve/Vt 0.65-0.80의 용출 범위에서 용출된다고 한 Yokota(9), Park등(14)의 보고와 잘 일치하여 이 활성 물질의 활성 본체가 기지의 brassinosteroid와 유사한 분자량을 갖는 활성 물질일 것이라는 보다 확실한 정보를 얻을 수 있었으며, Ve/Vt 0.60~0.78의 획분(0.21g)을 Sephadex LH-20 chromatography의 활성획분으로 하였다.

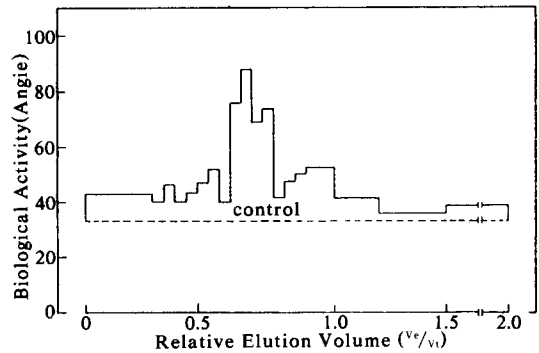


Fig. 6. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test with seedlings Sangpungbyeo after Sephadex LH-20 chromatography of the extract from sea mustard.

Bondesil chromatography

활성획분(0.21g)을 MeOH에 의한 Bondesil chromatography로 용출 분획하고, 얻어진 분획에 대하여 활성을 검정한 결과는 Fig. 7과 같다. 생체중량 750g에 해당하는 추출물에 의해 3.5-4.5ml의 용출 범위에서 대조구에 비하여 293%에 이르는 활성을

나타내어 brassinosteroid의 활성을 재확인함과 동시에 상당한 정제 효과도 얻을 수 있었으며, 3.5~4.5 ml의 용출분획(61mg)을 활성획분으로 하였다.

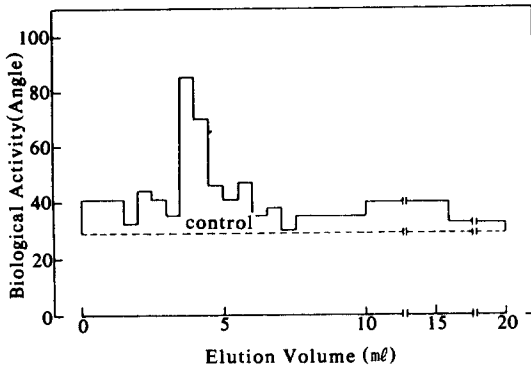


Fig. 7. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test with seedlings Sangpungbyeo after Bondesil chromatography of the extract from sea mustard.

Preparative-HPLC

Bondesil chromatography의 활성획분(61mg)을 C₁₈ column을 사용하여 HPLC를 행하여 분획하고, 생체중량 2kg에 상당하는 추출물에 의해 활성을 검정한 결과(Fig. 8) retention time(Rt) 8~10, Rt 14~17, Rt 18~20, Rt 23~25, Rt 28~29분의 분획에서 180~263%에 이르는 활성을 나타냈다. preparative scale이었기에 정성적인 효과는 충분히

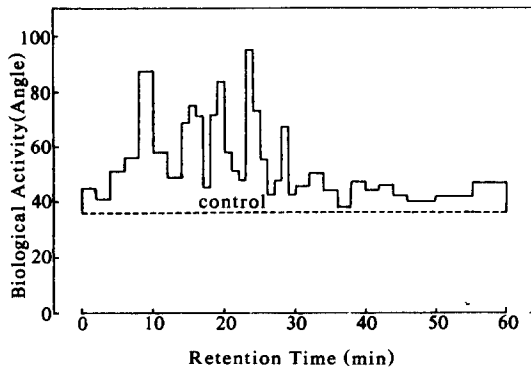


Fig. 8. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test with seedlings Sangpungbyeo after HPLC on C₁₈ column chromatography of the extract from sea mustard.

기대하기는 어려웠으나 다종의 brassinosteroid 활성 물질의 존재 가능성이 시사되었다.

ODS column을 사용한 HPLC

C₁₈ column의 HPLC에서 활성이 인정된 획분(24 mg)에 대해 활성본체의 보다 정확한 정보를 얻고자 ODS column을 이용하여 HPLC를 행하여 분획하고, 생체중량 2kg에 상당하는 추출물에 의해 활성을 검정한 결과(Fig. 9) Rt 8~10, Rt 15~17, Rt 19~21, Rt 23~24, Rt 27~28, Rt 30~32분의 분획에서 277%에 이르는 활성을 나타냈다. 이들의 활성본체는 authentic 시료의 Rt과 비교하여 각각 dolicholide, brassinolide, homodolichosterone, castasterone, homobrasinolide와 ethyl brassinone으로 추정되어진다.

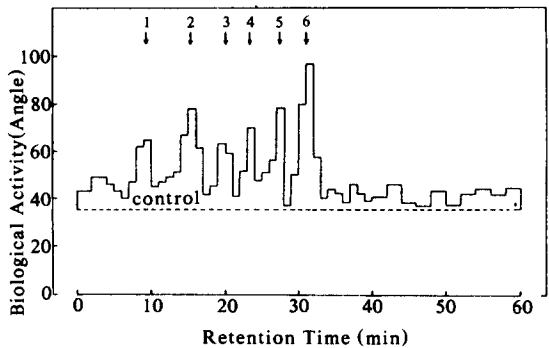


Fig. 9. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test with seedlings Sangpungbyeo after HPLC on ODS column chromatography of the extract from sea mustard.

고 찰

미역 엽상부를 MeOH로 추출하여 용매분획, CCD, silica gel 흡착 chromatography, Sephadex LH-20 chromatography, charcoal 흡착 chromatography, Bondesil chromatography, 그리고 reverse phase의 HPLC등의 수법으로 분리 정제하는 과정에서 매번 brassinosteroid의 활성을 인정할 수 있었으며, 각 chromatography에서의 활성본체의 거동은 기지의 brassinosteroid의 거동과 잘 일치하고 있어 갈조류인 미역이 brassinosteroid 활성물질을 생산하고 있음을 확인할 수 있었으며, 활성본체로 6종의 brassinosteroid의 존재가 추정되었다.

따라서 endogenous brassinosteroid가 미역에 존재한다는 사실이 확인되었는데 이것은 해조류의 식물에서는 첫 보고로 생각된다.

한편, 미역에 함유된 brassinosteroid활성물질의 양은 생물검정법에 의해 brassinolide의 활성과 비교 측정된 결과 0.5~2.0ng/g fr. wt. 수준으로 추측되며, 이는 기지의 식물에 함유된 brassinosteroid의 함량보다 낮은 경향을 나타내었다.

요 약

미역엽상부의 MeOH 추출물에 포함되어 있는 brassinosteroid 활성물질을 검색하기 위하여 용매분획, CCD, silica gel 흡착 chromatography, Sephadex LH-20 chromatography, charcoal 흡착 chromatography, Bondesil chromatography, 그리고 reverse phase의 HPLC 등의 수법을 이용하여 분리 정제하고 각 단계에서 생물검정법으로 활성을 검정한 결과, 해조류인 미역에도 brassinosteroid 활성물질의 존재가 인정되었는데, 그 함량은 타식물의 영양조직에 비교하여 낮은 수준이었다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 연구비 지원(90-05-00-07)으로 수행되었기에 재단 당국에 감사드리며, 시료 채취에 도움을 주신 목포대학교 박경양 교수와 authentic 시료를 제공하여 주신 일본 Teikyo 대학의 T. Yokota 교수께 감사드립니다.

참고문헌

1. 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.
2. L. E. Gregory(1981), *Am. J. Bot.*, **68**, 586.
3. T. H. Maugh(1981), *Science*, **212**, 33.
4. F. Fujita(1985), *Kagaku-to-seibutsu*, **23**, 717.
5. K. H. Park, K. H. Hyun and D. Y. Kim (1986), *Korean J. Agric. Chem.*, **29**, 22.
6. K. H. Park, H. Saimoto, S. Nakagawa, A. Sakurai, T. Yokota, N. Takahashi and K. Syō no(1989), *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 805.
7. K. H. Park(1988), *Korean J. Agric. Chem.*, **31**, 106.
8. M. Ikeda, S. Takatsuto, T. Sassa, H. Ikekawa, and M. Nukina(1983), *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 655.
9. T. Yokota, J. Baba, S. Koba and N. Takahashi(1984), *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2529.
10. T. Yokota, J. Baba and N. Takahashi(1982), *Tetrahedron Letters*, **23**, 4965.
11. H. Abe, T. Morishita, M. Uchiyama, S. Marumo, K. Munakata, S. Yakatsuto and N. Ikekawa(1982), *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2609.
12. M. Arima, T. Yokota and N. Takahashi (1984), *Phytochemistry*, **23**, 1587.
13. Y. Suzuki, I. Yamaguchi and N. Takahashi (1985), *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 49.
14. K. H. Park, T. Yokota, A. Sakurai and N. Takahashi(1987), *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 3081.