Hanguk Nonghwahak Hoechi
(J. Korean Agric. Chem. Soc.)
36(3), 197~201(1993)

들깨의 brassinosteroid 활성물질

박근형 · 김선재 · 현규환*

전남대학교 농과대학 식품공학과, *순천대학교 농과대학 자원식물학과

초록 : 들깨에 존재하는 brassinosteroid 활성물질을 탐색하기 위하여 미숙종자를 MeOH로 추출하고, 이 추출물을 rice inclination test를 지표로, 용매 분획, silica gel adsorption chromatography, Sephadex LH-20 chromatography, charcoal adsorption chromatography, Bondesil chromatography 등의 수법으로 brassinosteroid 활성물질을 정제한 다음, silica gel 흡착 chromatography로 활성성분을 분리하고, 각 활성획분에 대해 HPLC에 의해 활성본체를 구명한 결과, main brassinosteroid로 castasterone이 그리고 minor brassinosteroid로 homodolicholide가 최초로 동정되었다. 들깨에 함유된 brassinosteroid의 함량은 brassinolide로 환산하여 생체중량 g당 0.5~0.8 ng 수준이었다(1993년 4월 16일 접수, 1993년 6월 1일 수리).

식량과 유용자원을 공급하고 있는 식물의 생산력을 제고하기 위해서는 식물이 생산하여 자신의 생리현상을 제어하고 있는 생물활성물질에 관한 연구가 대단히 중요하다. 생물활성물질 가운데 brassinosteroid는 1979년 최초로 발견된 steroid성 생장조절물질[1]로 이 물질에 의해 발현되는 생장촉진,[2] 수확의 증대,[3,4] 식물의 environmental stress의 해소효과[5,6] 등의 특이한 생물활성 때문에 이 물질에 관한 관심이 집중되고 있다.

Brassinosteroid에 관한 연구는 식물이 생산하는 brassinosteroid의 탐색, brassinosteroid의 합성, 미생물이나 배양세포를 이용한 brassinosteroid의 생산성검토 그리고 brassinosteroid의 생리작용과 응용연구 등을 생각할 수 있으나, 가장 핵심적이고 시급한 것은 식물이 생산하는 brassinosteroid의 탐색일 것이다.

한편, 식품에 대한 최근의 연구경향은 지금까지 중요시되어 왔던 식품의 영양과 기호성외에 소위 제 3차 기능이라고 불리우는 식품에 존재하는 활성물질에 의한 생체 조절기능의 가능성에 대해 관심이 고조되고 있는데, 식품의 제 3차 기능을 구명하기 위해서는 식품재료에 존재하는 활성물질의 검색이 우선적으로 요구되어진다.

여기에 본 연구는 유료작물로서 예로부터 지배되어 왔으며, 독특한 향미와 맛을 지니고 있어 잎과 기름이 식용[7]으로 이용되어 왔으며 특히 기름은 고혈압 예방[8]과 옻의 해독[9]에 민간약으로 사용되고 있는 꿀풀과인 들깨의 brassinosteroid에 관한 연구가 수행된 바 없어 식물이 생산하는 brassinosteroid 활성물질 탐색연구의 일환으로 들깨에 포함되어 있는 brassinosteroid 활성물질을 탐색하였다.

재료 및 방법

실험재료

전남 화순군 화순읍에서 지배된 꿀풀과 식물인 들깨(*Perilla frutescense*)를 완숙 한달 전인 9월 하순에 종자 외피를 포함한 미숙종자 16.5 kg을 채취하여 공시하였다.

추출 및 용매 분획

시료 16.5 kg을 과량의 MeOH 존재하에 blender로 마쇄하면서 추출한 다음, 여과지(Toyo No. 2)와 G_3 glass filter를 사용하여 여과하였다. 이 추출조작을 3회 반복하여 얻은 추출여액을 Rotary vacuum evaporator로 40°C에서 감압농축하여 MeOH이 제거된 수용액을 Park 등의 방법[10,11]으로 용매 분획하였다. 즉, MeOH이 제거된 수용액을 $CHCl_3$으로 추출하여 수용액 획분과 $CHCl_3$ 획분을 얻었다. $CHCl_3$ 획분은 *n*-Hexane과 80% MeOH로 partition하여 *n*-Hexane 획분과 80% MeOH 획분을 얻었으며, 80% MeOH 획분을 EtOAc와 0.2 M K_2HPO_4 buffer solution(pH 8.9)으로 partition하여 EtOAc 획분과 수용액 획분을 얻었다. 수용액 획분은 다시 $CHCl_3$으로 추출하여 수용액 획분, *n*-Hexane 획분, EtOAc 획분,

Key words : *Perilla frutescense*, endogeneous brassinosteroid, rice inclination test, HPLC
Corresponding author : K.-H. Park

$CHCl_3$ 획분을 얻었다.

Silica gel adsorption chromatography

Silica gel(360 g과 10 g, 70～230 mesh, column chromatography용, Merck사)을 $CHCl_3$으로 slurry를 만들어 column에 충진(3.9×50 cm와 1.5×18.5 cm)시킨 후, $CHCl_3$-MeOH 용매계로 MeOH 농도를 0, 5, 10, 15, 20% (gel 360 g, 농도별로 3,000 m*l*씩; gel 10 g, 농도별로 80 m*l*씩)까지 단계적으로 증가 시킨 step-wise 용출 방법으로 분획하였다.

Sephadex LH-20 column chromatography

Sephadex LH-20(25-100 μ, Pharmacia사)을 MeOH-$CHCl_3$(4 : 1, v/v)용매계[10]와 70% EtOH 용매계[12,13]로 하룻밤 팽윤시킨 후, column에 충진(MeOH-$CHCl_3$, bed volume 1,000 m*l*와 bed volume 200 m*l*: 70% EtOH, bed volume 300 m*l*)하고 동 용매계로 용출 분획하였다.

Charcoal adsorption chromatography

Charcoal(60-150 mesh, column chromatography 용, Nakarai 사)을 H_2O, MeOH, $CHCl_3$으로 각각 3회씩 세척하여 건조시킨 다음, activated charcoal 40 g을 Park 등[10]의 방법에 따라 40% MeOH로 slurry를 만들어 column에 충진(2.8×38 cm)하고, 동 용매계로 시료를 녹여 흡착시킨 후, 40(130 m*l*), 80(70 m*l*), 100% MeOH(70 m*l*)로 순차 용출 분획한 다음, 또 다시 MeOH-$CHCl_3$ 용매계로 MeOH 농도를 90%(70 m*l*)에서 70(70 m*l*), 50(70 m*l*), 30(70 m*l*), 10(70 m*l*), 0%(500 m*l*)까지 단계적으로 감소시키면서 순차 용출 분획하였다.

Bondesil chromatography

Gel 4 g(HPLC preparative grade, 40 μm, Analytichem International 사)을 MeOH로 slurry를 만들어 문등의 방법[14]으로 column에 충진(1.0×16.5 cm)하고 시료를 MeOH에 녹여 흡착시킨 후, 각 획분을 1 m*l*씩으로 하여 총 50 m*l*의 MeOH로 용출 분획하였다.

HPLC

시료를 Sep-Pak(silica type과 C_{18} type)으로 전처리하고, filter(GELMAN Acrodisc LC 13 PVDF, 0.2 μm, Waters 사)로 여과한 후, ODS column(0.8×25 cm, ODS-3215-D, Senshu 사)을 사용하여 70% MeOH(0～35분), 80% MeOH(35～65분) 그리고 100% MeOH 용매계(65～100분)를 이용한 step-wise 용출법으로 분당 2 m*l*로 분획하였다.

Brassnosteroid의 활성검정 및 생물검정에 의한 함량측정

상풍벼의 조직을 이용한 Park 등[15]의 생물검정법(rice inclination test)에 의하여 brassinosteroid 활성을 검정하였다. Brassinosteroid 활성물질의 함량은 brassinolide 표준용액을 생물검정하여 작성된 검량선[16]에 의하여 산출하였다.

결과 및 고찰

Brassinosteroid 활성물질의 확인 및 정제

종자외피를 포함한 들깨의 미숙종자 16.5 kg을 MeOH로 추출하고 용매 분획하여 얻어진 수용액 획분, *n*-Hexane 획분, EtOAc 획분, $CHCl_3$ 획분을 대상으로 생물검정법으로 활성을 검정한 결과, EtOAc 획분(35.9 g)에서 활성이 인정되었다. 이 활성 획분을 360 g의 gel을 사용한 silica gel adsorption chromatography로 분획한 후, 각 획분에 대하여 생체중량 20 g에 상당하는 추출물에 의해 검정한 결과, $CHCl_3$ 내의 MeOH 농도 10～15% 용출 획분(3,900～12,000 m*l*, 8.5 g)에서 활성이 집중되어 활성물질의 존재를 확인할 수 있었다.

이어서 silica gel 흡착 chromatography의 활성획분(8.5 g)을 MeOH-$CHCl_3$ 용매계를 사용한 Sephadex LH-20의 gel filtration(bed volume 1,000 m*l*)에 의해 분획하고 생체중량 50 g에 상당하는 추출물에 의해 검정한 결과, elution volume에 대한 bed volume의 비(Ve/Vt) 0.55～0.75의 용출범위(550～750 m*l*, 2.86 g)에서 뚜렷한 활성이 인정되었다. Park 등[10]은 동일조건의 gel filtration에서 전형적인 brassinosteroid의 용출범위가 Ve/Vt 0.625～0.750이라고 보고한 바 있는데, 이것은 본 실험의 결과와 일치하여 들깨의 활성본체가 이미 알려진 brassinosteroid와 유사한 분자량을 갖는 물질에 의해 활성이 발현되고 있음이 시사되었다.

이를 더욱 더 정제하기 위하여 charcoal 흡착 chromatography를 행하였다. 활성 획분(2.86 g)을 전 처리한 activated charcoal이 충진된 column에 흡착시키고 MeOH-H_2O 용매계와 $CHCl_3$-MeOH 용매계로 순차 분획하여 얻어진 획분에 대해 생체중량 100 g에 상당하는 추출물에 의해 검정한 결과, $CHCl_3$내의 MeOH 농도 50～0% 용출영역(466～760 m*l*, 1.19 g)에서 활성물질의 존재가 인정되어 활성물질의 활성을 재확인할 수 있었으며 상당한 정제효과도 얻을 수 있었다.

Charcoal 흡착 chromatography의 활성 획분을 더욱 정제하고 활성본체에 대한 정보를 얻기 위하여, 70% EtOH 용매계로 Sephadex LH-20의 gel filtration(bed

volume 300 ml)에 의하여 분획하고, 생체중량 150 g에 상당하는 추출물에 의해 검정한 결과, Ve/Vt 0.60~0.80의 용출범위(180~240 ml, 0.89 g)에서 활성을 나타내었다. 이 결과는 동일조건에 의한 gel filtration에서 전형적인 brassinosteroid가 Ve/Vt 0.65~0.80의 용출범위에서 용출된다고 한 Park 등[11]과 Yokota 등[13]의 보고와 거의 일치하여 이 활성물질의 활성본체가 기지의 brassinosteroid와 유사한 분자량을 갖는 물질일 가능성을 더욱 높여 주었다.

이 활성 획분을 MeOH에 의한 Bondesil chromatography로 분획하고 얻어진 획분에 대해 생체중량 120 g에 상당하는 추출물에 의해 검정한 결과, 5~14 ml의 용출영역(0.73 g)에서 활성물질의 존재가 인정되었다. 이상의 과정을 Fig. 1에 나타냈다.

정제 중간단계에서의 brassinosteroid 함량측정

이상의 정제과정에서 정제된 들깨의 brassinosteroid 활성획분에 포함된 brassinosteroid 함량을 검량선[16]을 이용하여 측정하였다. 들깨의 생체중량 1, 5, 10, 50 g에 상당하는추출물에 의하여 각각 71.2°, 91.7°, 95.6°, 115.6° 활성을 나타내, brassinolide로 환산하여 전 brassinosteroid의 함량은 생체중량 g당 0.5~0.8 ng 수준을 나타냈다. 이러한 수준은 기 보고[17,18]된 다른 식물에 존재하는 brassinosteroid 함량과 비교하면, 영양생장조직의 함량보다는 많고, 화분보다 훨씬 낮으며 결명자의 미숙종자[16]보다 낮은 수준이었다.

Brassinosteroid 활성물질의 분리

이상의 정제과정에서는 전활성 획분을 모아서 활성획분을 분리하지 않고 정제하였으나, 정제가 어느 정도 이루어 졌기에 활성성분의 분리를 시도 하였다. Bondesil chromatography의 활성 획분(0.73 g)을 10 g의 gel을 사용한 silica gel 흡착 chromatography로 용출 분획하고, 얻어진 획분에 대해 생체중량 160 g에 상당하는 추출물에

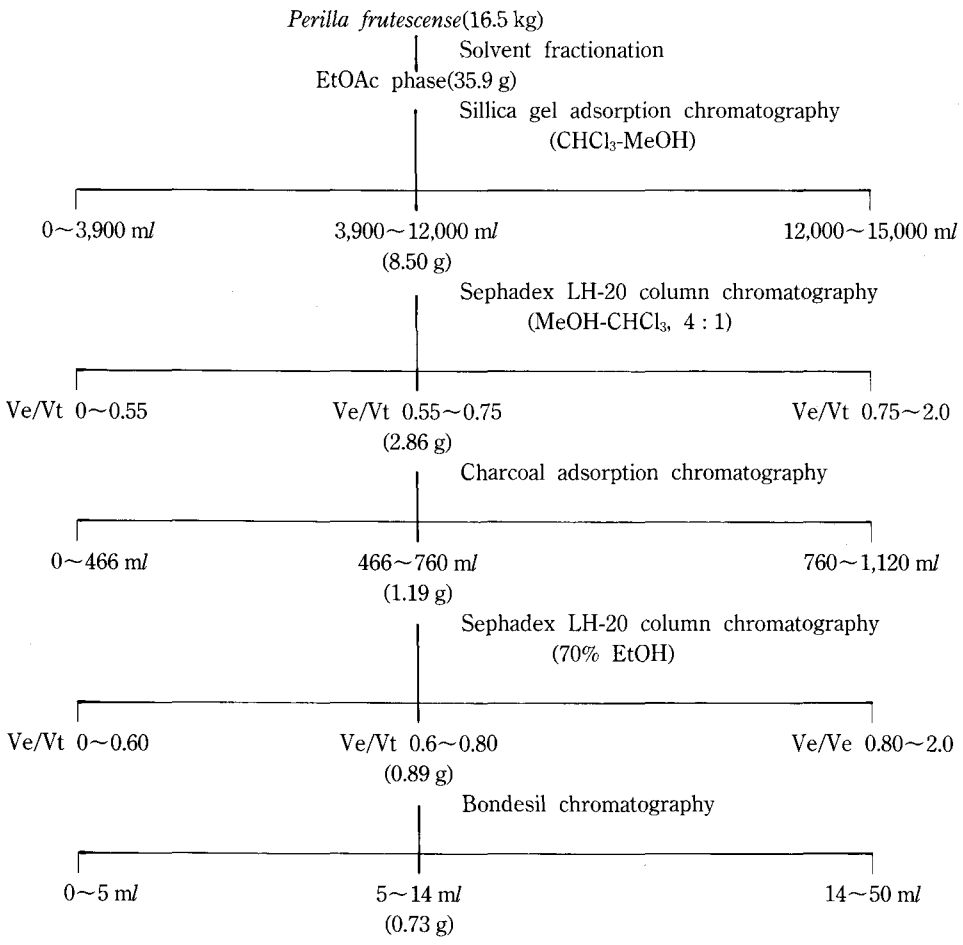

Fig. 1. Purification process of brassinosteroids from *Perilla frutescense* extracts.

의해 검정한 결과(Fig. 2), $CHCl_3$ 내의 MeOH 농도 5～10 % 용출 획분에 main 활성(155～185 ml, 34 mg, 활성 I로 명명)이 그리고 MeOH 농도 10% 후반부 용출 획분(200～240 ml, 138.8 mg, 활성 II로 명명), MeOH 농도 15% 용출 획분(255～320 ml, 53.2 mg, 활성 III으로 명명)에서 minor 활성을 나타내어 활성물질의 분리가 이루어졌다.

활성 II와 III은 보다 정제 필요성이 있어 MeOH-$CHCl_3$ 용매계의 Sephadex LH-20의 gel filtration(bed volume, 200 ml)에 의해 각각 분획하였다. 활성 II는 생체중량 251 g 상당 추출물로는 분명하지 않아 1,000 g 상당 추출물로 재검정하여 활성 분획으로 Ve/Vt 0.650～0.675(130～135 ml, 12.9 mg) 획분을 얻었으며, 활성 III(Fig. 3)은 생체중량 755 g 상당하는 추출물에 의해 활성 획분으로 Ve/Vt 0.65～0.70(130～140 ml, 7.4 mg) 획분을 얻었다.

Brassinosteroid 활성본체의 구명

활성 I을 ODS column의 HPLC로 분획하고 얻어진 획분에 대해 생체중량 708 g에 상당하는 추출물에 의해 검정한 결과(Fig. 4), Retention time(Rt) 43～45분에 뚜렷한 활성을 나타냈다. 동일조건의 HPLC에 의한 authentic brassinosteroid의 Rt와 비교하여 보면 Rt 43～45분은 castasterone의 Rt와 완전히 일치하여 활성 I의 활성본체로 castasterone이 동정되었다.

Gel filtration에 의해 정제된 활성 II와 III의 활성 획분을 합하여 동일조건의 HPLC로 분획하고 얻어진 획분에 대해 생체중량 2,170 g에 상당하는 추출물로 검정한 결과(Fig. 5), Rt 26～28분과 Rt 74～76분에 활성을 보였는데, 검정수준을 올려 재검정하여 활성의 재현성을 확인하였다. 동일조건의 HPLC에 의한 authentic brassinosteriod의 Rt와 비교하여 보면 Rt 26～28분은 homodolicholide, Rt 43～45분은 castasterone의 Rt와 일치하여, Rt 26～28분의 활성본체로 homodolicholide, 그리고 Rt 43～45분의 활성본체로 castasterone이 동정되었다. 한편, Rt 74～76분의 활성본체는 기지의 brassinosteroid 중 낮은 극성을 보이는 2-deoxy형인 teasterone[19](Rt

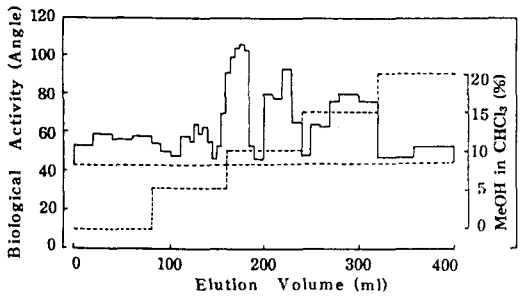

Fig. 2. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test with seedlings of cultivar Sangpungbyeo after silica gel adsorption chromatography of the extract from *Perilla frutescense.*

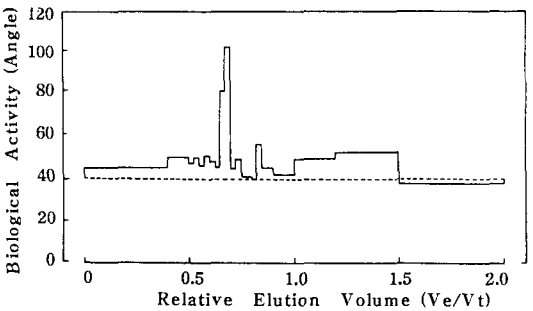

Fig. 3. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test with seedlings of Sangpungbyeo after Sephadex LH-20 column chromatography of *Perilla frutescense* active fr. III.

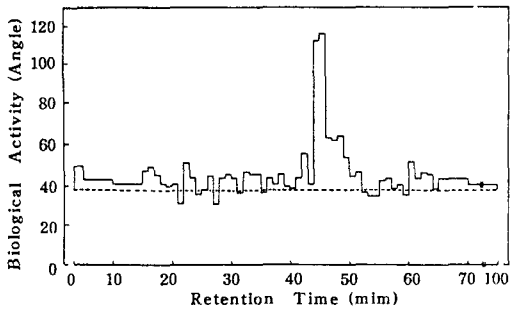

Fig. 4. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test with seedlings of Sangpungbyeo after HPLC on ODS column of *Perilla frutescense* active fr. I.

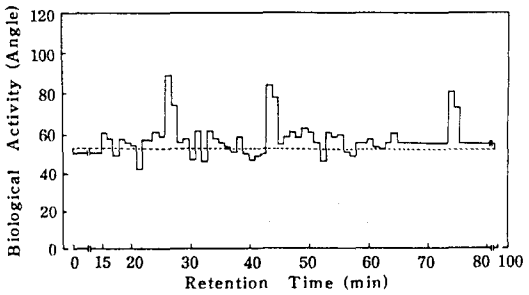

Fig. 5. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test with seedlings of Sangpungbyeo after HPLC on ODS column of *Perilla frutescense* active fr. II and III.

54~55분)보다 훨씬 낮은 극성을 보여 새로운 brassinosteroid의 존재가능성이 시사되었는데 이에 관해서는 추후 검토하고자 한다.

Rice inclination test에 의한 brassinosteroid의 활성은 lactone 구조(homodolicholide)가 ketone 구조(castasterone)로 되면 활성이 50~20%로 떨어지는 경향[18-20]을 보여, castasterone은 homobrassinolide의 40~60% 활성을 나타낸다. Brassinosteroid 구조활성과 분리된 분획의 활성의 크기를 고려할 때 들깨의 main brassinosteroid로 castasterone 그리고 minor brassinosteroid로 homodolicholide가 존재함을 알 수 있었다.

이상의 결과, 들깨의 종실에 포함되어 있는 brassinosteroid 활성물질로 castasterone, homodolicholide가 동정되었으며 극성이 아주 낮은 새로운 brassinosteroid의 존재 가능성이 시사되어 들깨가 brassinosteroid 활성물질을 생합성하고 있음이 확인되었다. 들깨의 brassinosteroid 활성물질에 관한 연구는 물론 들깨가 속하는 꿀풀과(Labiatae)식물의 brassinosteroid에 관한 연구로는 첫 보고로 생각된다. Brassinosteroid 활성물질의 함량은 brassinolide로 환산하여 생체중량 g당 0.5~0.8 ng 수준이었으며, 동정된 2종의 brassinosteroid는 대부분 castasterone 형태로 존재하였다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 지원으로 수행되었기에 재단 당국에 감사드립니다. 아울러 농업생물신소재연구센타의 지원과 실험을 도아준 박종대 군과 이란숙 양에게 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Grove, M. D., Spencer, G. F., Rohwedder, W. K., Mandava, N., Worldy, J. F., Warthen, J. D., Jr., Steffens, G. L., Flippen Anderson, J. L. and Cook, J. C.: Nature, 23 : 216(1979)
2. Worley, J. F. and Mitchell J. W.: J. Am. Soc. Hort. Sci., 96 : 270(1971)
3. Gregory, L. E.: Am. J. Bot., 68 : 586(1981)
4. Maugh, T. H.: Science, 212 : 33(1981)
5. Fujita, F.: Kagaku-to-seibutsu, 23 : 717(1985)
6. Takematsu, T. and Takeuchi, Y.: Chem. Regul. Plants, 18 : 38(1983)
7. 이춘령, 김우정: 천연향신료와 식용색소, p. 50, 향문사(1987)
8. 진명출판사: 약품식물학 각론, p. 351, 약품식물학연구회(1981)
9. 이창복: 대한식물도감, p. 659, 향문사(1980)
10. Park, K.-H., Saimoto, H., Nakagawa, S., Sakurai, A., Yokota, T., Takahashi, N. and Syono, K.: Agric. Biol. Chem.,53 : 805(1989)
11. Park, K.-H., Yokota, T., Sakurai, A. and Takahashi, N.: Agric. Biol. Chem., 51 : 3081(1987)
12. Ikeda, M., Takatsuto, S., Sassa, T., Ikekawa, H. and Nukiwa, M.: Agric. Biol. Chem., 47 : 655(1983)
13. Yokota, T., Baba, J., Koba, S. and Takahashi, N.: Agric. Biol. Chem., 49 : 2529(1984)
14. Moon, J.-H., Hyun, K.-H. and Park, K.-H.: Korean J. Biotechnol. Bioeng., 7 : 21(1992)
15. Park, K.-H., Hyun, K.-H. and Kim, D.-Y.: J. Korean Agric. Chem., 29 : 22(1986)
16. Park, K.-H., Hyun, K.-H. and Kim, S.-J.: J. Korean Agric. Chem., 36 : 99(1993)
17. Yokota, T. and Takahashi, N.: Chem. Regul. Rlants, 19 : 102(1984)
18. Adam, G. and Marquardt, V.: Phytochemistry, 25 : 1787(1986)
19. Abe, H., Morishita, T., Uchiyama, M., Takatsuto, S. and Ikekawa, N: Agric. Biol. Chem., 48 : 2171 (1984)
20. Yokota, T.: Chem. Regul. Plants, 22 : 10(1987)

Brassinosteroid substances in immature *Perilla frutescense* seeds

Keun-Hyung park, Seon-jae Kim and Kyu-Hawn Hyun* (Department of Food Science Technology, college of Agriculture, Chonnam National University, Kwang-ju, 500-757, Korea, *Department of Resources Plant, College of Agriculture, Sunchon University, Sunchon, 540-742, Koera)

Abstract : In order to explore the brassinosteroid-active component in *Perilla frutescense*, methanol extract of immature seeds was purified by sequences of solvent fractionation, silica gel adsorption chromtography, Sephadex LH-20 chromatography, charcoal adsorption chromatography and Bondesil chromatography. The activity of brassinosteroid was monitored by the rice inclination test and its presence could be confirmed in each purification step. The purified active components were seperated by silica gel adsorption chromatography. The seperated main and minor active brassinosteroid fractions were identified as castasterone and homobrassinolide, respectively, by HPLC. We acknowledge that our work is probably the first report of endogenous brassinosteroid in *Perilla frutescense.* The content of brassinosteroid in *Perilla frutescense* as converted into brassinolide was 0.5~0.8 ng/g fresh weight.