

벼종자의 brassinosteroid 활성물질

박근형 · 김선재 · 박종대 · 이란숙 · 현규환*

전남대학교 농과대학 식품공학과, *순천대학교 농과대학 자원식물학과

초록 : 벼종자에 존재하는 brassinosteroid 활성물질을 탐색하기 위하여 동진벼 미숙종자를 MeOH로 추출하고, 이 추출물을 rice inclination test를 지표로, 용매분획, silica gel adsorption chromatography, Sephadex LH-20 chromatography, charcoal adsorption chromatography 등으로 brassinosteroid 활성물질을 정제한 다음, silica gel 흡착 chromatography로 활성성분을 분리하였다. HPLC에 의해 활성본체를 구명한 결과, castasterone, teasterone, 6-deoxocastasterone이 최초로 동정되었다. 벼종자에 함유된 brassinosteroid 활성물질의 함량은 brassinolide로 환산하여 생체중량 g당 0.5~1.5 ng 수준이었다(1993년 8월 30일 접수, 1993년 9월 27일 수리).

Brassinosteroid는 1979년 최초로 식물에서 발견된 steroid성 생물활성물질¹⁾로 이 물질에 의해 발현되는 성장촉진²⁾ 수확의 증대^{3,4)} 식물의 environmental stress의 해소효과^{5,6)} 등의 특이한 생물활성이 알려져 있다.

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

한편, 식품에 대한 최근의 연구경향은 식품의 영양과 기호성외에 소위 제3차 기능이라고 불리는 식품에 존재하는 활성물질에 의한 생체조절기능의 가능성에 대해 관심이 고조되고 있는바, 식품의 제3차 기능을 구명하기 위해서는 식품재료에 존재하는 활성물질의 검색이 또한 요구된다.

여기에, 본 연구는 세계 2대 작물의 하나이며 특히 우리나라의 가장 중요한 작물인 벼종자의 brassinosteroid에 관한 연구가 수행된 바 없어 식물이 생산하는 brassinosteroid 활성물질 탐색 연구의 일환으로 벼종자에 존재하는 brassinosteroid 활성물질을 탐색하였다.

재료 및 방법

실험재료

전남대학교 농과대학 포장에서 재배된 일반계품종인 동진벼(*Oryza sativa* L. cv. Tongjinbyeo)의 종피를 포함한

미숙종자 20 kg을 유숙기에 채취하여 공시하였다.

추출 및 용매분획

시료 20 kg을 과량의 MeOH 존재하에 blender로 마쇄하면서 추출한 다음, 여과지(Toyo No. 2)와 G3 glass filter를 사용하여 여과하였다. 이 추출조작을 3회 반복하여 얻은 추출여액을 40°C에서 감압농축하여 MeOH이 제거된 수용액을 Park 등의 방법^{7,8)}으로 용매분획하였다. 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 얻었다.

Silica gel adsorption chromatography

Silica gel(394 g과 45 g, 70~230 mesh, column chromatography용, Merck사)을 CHCl_3 으로 slurry를 만들어 column에 충전(gel 394 g, 3.9×100 cm; gel 45 g, 2.1×34 cm)시킨 후, CHCl_3 -MeOH 용매계로 MeOH 농도를 0, 5, 10, 15, 20, 50%(gel 394 g, 농도별로 3,300 ml씩; gel 45 g, 농도별로 375 ml씩)까지 단계적으로 증가시킨 step-wise 용출방법으로 용출분획하였다.

Sephadex LH-20 column chromatography

Sephadex LH-20(25~100 μm , Pharmacia사)을 MeOH- CHCl_3 (4 : 1, v/v)용매계⁷⁾와 70% EtOH 용매계^{9,10)}로 하룻밤 팽윤시킨 후, column에 충전(MeOH- CHCl_3 , bed volume 1,000 ml와 200 ml; 70% EtOH, bed volume 1,

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

000 ml와 500 ml와 300 ml)하고 동 용매계로 용출분획하였다.

Charcoal adsorption chromatography

Charcoal(60~150 mesh, column chromatography용, Nakarai사)을 H₂O, MeOH, CHCl₃으로 각각 3회씩 세척하여 건조시킨 다음, activated charcoal 140 g을 Park 등⁷⁾의 방법에 따라 40% MeOH로 slurry를 만들어 column에 충전(3.5×63 cm)하고, 동 용매계로 시료를 흡착시킨 후, 40(420 ml), 80(210 ml), 100% MeOH(210 ml)로 순차 용출분획한 다음, 또 다시 MeOH-CHCl₃ 용매계로 MeOH농도를 90%(210 ml)에서 70(210 ml), 50(210 ml), 30(210 ml), 10(210 ml), 0%(1,714 ml)까지 단계적으로 감소시키면서 용출분획하였다.

HPLC

시료를 Sep-Pak(silica와 C₁₈ type)으로 전처리하고, filter(GELMAN Acrodisc LC 13 PVDF)로 여과한 후, ODS column(0.8×25 cm, ODS-3215-D, Senshu사)을 사용하여 70% MeOH(0~35분), 80% MeOH(35~65분), 100% MeOH(65~100분) 용매계와 80% MeOH(0~30분), 100% MeOH(30분 이후) 용매계에 의한 step-wise 용출법으로 분당 2 ml로 분획하였으며, C₁₈ column(1.9×30 cm, Waters사)의 HPLC는 80% MeOH(0~60분), 100% MeOH(60~100분) 용매계로 분당 9 ml로 용출분획하였다.

Brassinosteroid의 활성검정 및 생물검정에 의한 함량측정

상풍벼의 조직을 이용한 Park 등¹¹⁾의 생물검정법(rice inclination test)에 의하여 brassinosteroid 활성을 검정하였는데 활성의 크기는 각도(180°에서 제2엽신과 제1엽초에 의해 이루어진 각도를 뺀 값)로 표시 하였다. Brassinosteroid 활성물질의 함량은 brassinolide 표준용액을 생물검정하여 작성된 검량선¹²⁾에 의하여 산출하였다.

결과 및 고찰

Brassinosteroid 활성물질의 확인 및 정제

벼의 미숙종자 20 kg을 MeOH로 추출하고 용매분획하여 얻어진 수용액 획분, n-Hexane획분, 80% MeOH 획분을 대상으로 생물검정법으로 활성을 검정한 결과, 80% MeOH획분(39.4 g)에서 활성이 인정되었다. 이 활성획분을 394 g의 gel을 사용한 silica gel adsorption chromatography로 분획하여 생체중량 20 g에 상당하는 추

출물로 검정한 결과, CHCl₃ 내의 MeOH농도 5~15% 용출획분(4,950~11,880 ml, 15.34 g)에 활성이 인정되었다.

이어서 silica gel 흡착 chromatography의 활성획분을 MeOH-CHCl₃ 용매계의 Sephadex LH-20의 gel filtration (bed volume 1,000 ml)으로 분획하고 생체중량 50 g에 상당하는 추출물로 검정한 결과, elution volume에 대한 bed volume의 비(V_e/V_i) 0.60~0.85의 용출범위(600~850 ml, 10.84 g)에 활성이 인정되었다. Park 등⁷⁾은 동일 조건의 gel filtration에서 전형적인 brassinosteroid의 용출범위가 V_e/V_i 0.625~0.750이라고 보고한 바 있는데, 이것은 본 실험의 결과와 거의 일치하여 벼종자에 포함된 활성본체가 알려진 brassinosteroid와 유사한 분자량의 물질에 의해 활성이 발현되고 있음이 시사되었다.

Charcoal 흡착 chromatography를 행하였다. 활성획분(10.84 g)을 흡착시키고 MeOH-H₂O, CHCl₃-MeOH 용매계로 순차 분획하고 생체중량 100 g에 상당하는 추출물로 검정한 결과, CHCl₃ 내의 MeOH농도 30~0% 용출영역(1,512~3,104 ml, 6.0 g)에 활성물질의 존재가 인정되었다.

이러 활성획분을 70% EtOH 용매계로 Sephadex LH-20의 gel filtration (bed volume 1,000 ml)으로 분획하고, 생체중량 120 g에 상당하는 추출물로 검정한 결과, V_e/V_i 0.500~0.775의 용출범위(500~775 ml, 4.73 g)에 활성을 보였다.

정제 중간단계에서의 brassinosteroid 함량측정

이상의 정제과정에서 정제된 벼종자의 brassinosteroid 활성획분에 포함된 brassinosteroid 함량을 검량선¹²⁾을 이용하여 측정하였다. 벼의 생체중량 1, 5, 10 g에 상당하는 추출물에 의해 각각 68°, 92°, 110°활성을 나타내, brassinolide로 환산한 전 brassinosteroid의 함량은 생체중량 g당 0.5~1.5 ng 수준을 나타냈다. 이러한 수준은 결명자의 미숙종자¹²⁾, 들깨의 미숙종자¹³⁾, 그리고 옥수수 미숙종자¹⁴⁾ 보다 더 낮은 수준이었다.

Brassinosteroid 활성물질의 분리

이상의 정제과정에서는 전활성획분을 모아서 정제하였으나, 정제가 어느 정도 이루어 졌기에 활성성분의 분리를 시도하였다. Sephadex LH-20 chromatography의 활성획분(4.73 g)을 45 g의 gel을 사용한 silica gel 흡착 chromatography로 분획하고 생체중량 117 g에 상당하는 추출물로 검정한 결과(Fig. 1), CHCl₃ 내의 MeOH 농도 5% 중반부 용출획분(525~645 ml, 1.47 g, 활성 I로 명명)와 MeOH 농도 10% 전반부 용출획분(765~885 ml, 203.7

mg, 활성 I로 명명)에 활성을 보여 활성물질의 분리가 이루어졌다.

활성 I, II 모두 보다 정제의 필요성이 있어 70% EtOH 용매계의 Sephadex LH-20의 gel filtration(활성 I, bed volume 500 ml; 활성 I, bed volume 300 ml)으로 분획하고 생체중량 194 g에 상당하는 추출물로 검정한 결과, 활성 I은 V_0/V_t 0.54~0.82의 용출범위(325~327 ml, 1.01 g)에서, 활성 I은 V_0/V_t 0.65~0.80의 용출범위(240~390 ml, 62 mg)에서 활성이 인정되었다. 이어, MeOH-CHCl₃ (4 : 1, v/v) 용매계의 Sephadex LH-20의 gel filtration (bed volume, 200 ml)으로 분획하고 생체중량 990 g(활성 D), 300 g(활성 D)에 상당하는 추출물에 의해 활성을 검정한 결과, 활성 I은 V_0/V_t 0.65~0.75의 용출범위(130~150 ml, 129 mg)에서, 활성 I은 V_0/V_t 0.675~0.775의 용출범위(135~155 ml, 30.4 mg)에서 활성이 인정되어 더욱 정제가 이루어졌다.

Brassinosteroid 활성본체의 구명

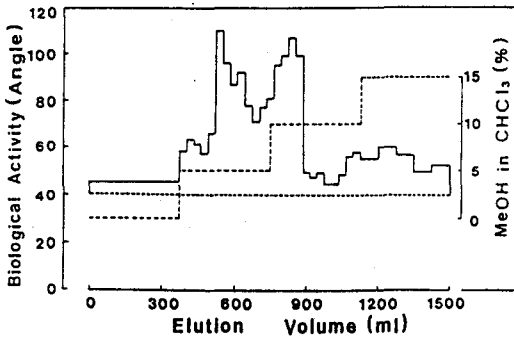


Fig. 1. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test with seedlings of Sangpu- ngbyeo after silica gel adsorption chromatography of the extract from *Oryza sativa* seeds.

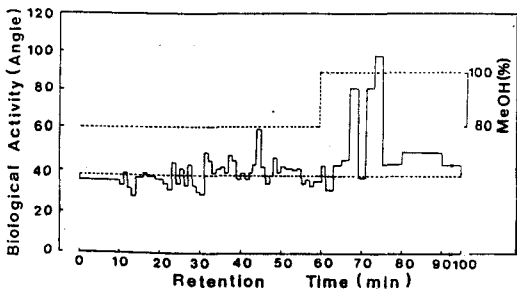


Fig. 2. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test with seedlings of Sangpu- ngbyeo after HPLC on C₁₈ column of *Oryza sativa* seeds active fraction I.

활성 I(129 mg)을 C₁₈ column의 HPLC로 분획하고 생체중량 2,457 g에 상당하는 추출물로 활성을 검정한 결과(Fig. 2), Retention time(R_t) 44~45분, R_t 67~69, R_t 71~75분의 분획에 활성이 인정되었다. 동일조건인 HPLC에 의한 authentic teasterone의 R_t (44.5분)과 일치하여 R_t 44~45분의 활성본체로 teasterone이 동정되었다. 한편 100% MeOH 용출분획인 Rt 67~69분과 R_t 71~75분의 활성획분은 너무 낮은 polarity를 보여 재 확인 하고자 80, 100% MeOH 용매계를 사용한 ODS column의 HPLC로 재분획하고 생체중량 3,638 g에 상당하는 추출물에 의해 검정한 결과(Fig. 3), R_t 22~24분, R_t 38~41분에서 활성이 인정되었다. 동일조건인 HPLC에 의한 authentic 6-deoxocasterone의 R_t(23.1 분)과 일치하여 R_t 22~24분의 활성본체로 6-deoxocasterone이 동정되었다. R_t 38~41분의 활성본체는 가장 낮은 극성을 보이는 6-deoxo형 brassinosteroid¹⁵⁾ 보다 훨씬 낮은 극성을 보여 R_t 38~41분의 활성본체는 새로운 brassinosteroid-like 활성물질의 가능성이 시사된다.

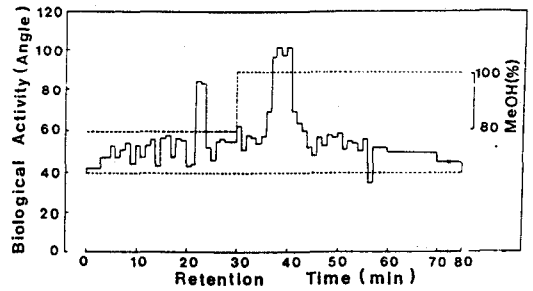


Fig. 3. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test with seedlings of Sangpu- ngbyeo after HPLC on ODS column of *Oryza sativa* seeds active fraction I.

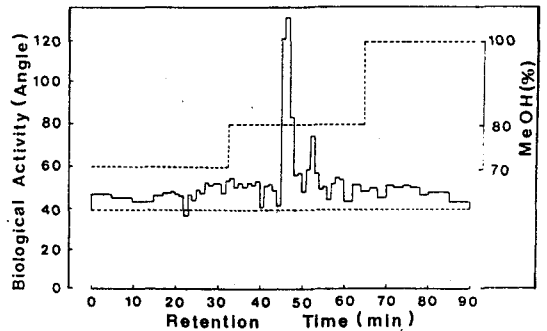


Fig. 4. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test with seedlings of Sangpu- ngbyeo after HPLC on ODS column of *Oryza sativa* seeds active fraction II.

활성 I(30.4 mg)를 70, 80, 100% MeOH 용매계를 사용한 ODS column의 HPLC로 분획하고 생체중량 1,518 g에 상당하는 추출물에 의해 검정된 결과(Fig. 4), R_f 45~48분에서 main활성이 그리고 R_f 52~53분에서 minor활성이 인정되었다. 이를 동일조건인 HPLC에 의한 authentic brassinosteroid의 R_f과 비교하여 보면 R_f 45~48분은 castasterone, R_f 52~53분은 teasterone의 R_f과 일치하여 활성 I의 활성본체 castasterone과 teasterone이 동정되었다.

한편, Abe 등¹⁶⁾은 이탈리아 벼(Arborio J-1)의 새순(fresh shoots)에 castasterone을 중심으로 dolichosterone이 생체중량 g당 15~8 pg 수준으로 존재함을 보고한 바 있다. 벼의 품종과 채취부위가 달라 직접적인 비교는 어려우나, 새순보다는 종자에 5~10배의 brassinosteroid가 존재 하였으며, 종자에는 보다 다양한 brassinosteroid가 존재 하였다.

이상의 결과, 벼종자에 존재하는 brassinosteroid 활성물질은 brassinolide로 환산하여 생체중량 g당 0.5~1.5 ng 수준이었으며, 존재하는 brassinosteroid로 castasterone, teasterone, 6-deoxocastasterone이 HPLC에 의해 동정되었으며 낮은 극성을 갖는 새로운 brassinosteroid 존재가 시사되었는데, 완전한 동정이 되기 위해서는 추후 GC-MS에 의한 분석이 요구된다.

감사의 말

본 연구는 농업생물신소재연구센터 지원으로 수행되었기에 과학재단에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Grove, M. D., Spencer, G. F., Rohwedder, W. K., Mandava, N., Worley, J. F., Warthen, J. D., Steffens, G. L., Flippen Anderson, J. L. and Cook, J. C.: Nature, 23 : 216(1979).
- Worley, J. F. and Mitchell, J. W.: J. Am. Soc. Hort. Sci., 96 : 270(1971).
- Gregory, L. E.: Am. J. Bot., 68 : 586(1981).
- Maugh, T. H.: Science, 212 : 33(1981).
- Fujita, F.: Kagaku-to-seibutsu, 23 : 717(1985).
- Takematsu, T. and Takeuchi, Y.: Chem. Regul. Plants, 18 : 38(1983).
- Park, K. H., Saimoto, H., Nakagawa, S., Sakurai, A., Yokota, T., Takahashi, N. and Syono, K.: Agric. Biol. Chem., 53 : 805(1989).
- Park, K. H., Yokota, T., Sakurai, A. and Takahashi, N.: Agric. Biol. Chem., 51 : 3081(1987).
- Ikeda, M., Takatsuto, S., Sassa, T., Ikekawa, H. and Nukiwa, M.: Agric. Biol. Chem., 47 : 655(1983).
- Yokota, T., Baba, J., Koba, S. and Takahashi, N.: Agric. Biol. Chem., 49 : 2529(1984).
- Park, K. H., Hyun, K. H. and Kim, D. Y.: Korean J. Agric. Chem., 29 : 22(1986).
- Park, K. H., Kim, S. J., and Hyun, K. H.: Korean J. Agric. Chem., 36 : 99(1993).
- Park, K. H., Hyun, K. H. and Kim, S. J.: Korean J. Agric. Chem., 36 : 99(1993).
- Park, K. H., Kim, S. J., and Hyun, K. H.: Korean J. Biotechnol. Bioeng., 8(3), 인쇄 중(1993)
- Yokota, T.: personal communication
- Abe, H., Nakamura, K., Morishita, T., Uchiyama, M., Takatsuto, S. and Ikekawa, N.: Agric. Biol. Chem., 48, 1103(1984)

Brassinosteroid substances in immature *Oryza sativa* seeds

Keun-Hyung Park, Seon-Jae Kim, Jong-Dae Park, Lan-Sook Lee and Kyu-Hawn Hyun*
(Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Chonnam National University *Department of Resources Plant, College of Agriculture, Suncheon University Suncheon, 540-742)

Abstract : To investigate the presence of the brassinosteroid substances in immature *Oryza sativa* L. cv Tongjinbyeon seeds, the methanol extract was purified by the sequential use of solvent fractionation, silica gel adsorption chromatography, Sephadex LH-20 chromatography and charcoal adsorption 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 separated by silica gel adsorption chromatography and Sephadex LH-20 chromatography. Brassinosteroid substances in separated active fractions were identified as castasterone, teasterone and 6-deoxocastasterone by HPLC. Our work is probably the first report of endogenous brassinosteroids in *Oryza sativa* seeds. The content of brassinosteroid in *Oryza sativa* seeds as converted into brassinolide was 0.5~1.5 ng/g fresh weight.