

미강과 백미의 Brassinosteroid 활성물질

박경원 · 박종대 · 박근형
전남대학교 식품공학과

Brassinosteroids in Rice Bran and Polished Rice

Kyoung-Won Park, Jong-Dae Park and Keun-Hyung Park
Department of Food Science and Technology, Chonnam National University

Abstract

To investigate the presence of brassinosteroids in rice bran and polished rice, they were extracted with MeOH. The extracts were purified through sequential procedure of solvent fractionation, silica gel adsorption chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography and charcoal adsorption chromatography. The activity of brassinosteroids was monitored by the rice inclination test and its presence was confirmed in each purification step. The purified active components were further separated by TLC and HPLC. Brassinosteroids in active fractions of rice bran were identified as castasterone and teasterone by HPLC. We acknowledge that our work is probably the first report of brassinosteroids in mature seeds of rice. The more amount of brassinosteroids was confirmed in rice bran than polished rice. The contents of castasterone and teasterone which were identified in rice bran were 0.15 ng/g and 0.37 ng/g, respectively.

Key words: brassinosteroids, rice bran, polished rice, rice inclination test

서 론

인류역사에서 농업이 시작된 것은 불과 만년 전이라 한다. 자연물에만 의존하던 시대에는 수천 가지 식물이 식용되었으나 농업단계에 들어와서는 백여종의 식물이 재배되다가 현재에 이르러서는 주식으로 꼽히는 작물은 열가지 내외로 압축되었다. 이 중에서도 밀, 쌀, 옥수수가 3대 주종⁽¹⁾을 이루고 있으며, 특히 우리가 주식으로 삼고 있는 중요 작물인 쌀에 관한 연구는 70년대부터 쌀의 다수화 및 식미제고의 품종개발과 쌀의 가공적 측면에 관한 연구가 주로 진행되어 왔다⁽²⁾.

최근 식품에 관한 연구는 지금까지 중요시되어 왔던 식품의 영양과 기호성 외에 소위 제 3차 기능이라고 불리우는 식품에 존재하는 활성물질에 의한 생체 조절기능의 가능성에 대한 관심이 고조되고 있는데, 식품이 갖는 기능성을 구명하기 위해서는 식품소재중에 존재하는 활성물질에 관한 정보가 요구되어진다. 특히 우리가 주식으로 다량 섭취하고 있는 쌀에 존재

하는 미량 생물활성물질에 관한 정보는 식품으로서 쌀의 기능성 구명 연구에 크게 도움이 될 것으로 생각된다.

한편, brassinosteroid에 관한 연구는 1970년대부터 연구가 시작되어 Mitchell 등⁽³⁾은 유채화분에 존재하는 활성물질을 단리하였고, Grove 등⁽⁴⁾은 steroid 구조를 갖는 brassinolide의 분자구조를 해명하였다. Brassinosteroid는 steroid성 구조와 stress를 해소하는 등 특이하고도 다양한 생리활성^(5,6)으로 인하여 식물의 활성물질로서는 중요한 발견으로 생각되어지고 있다.

밀과 더불어 세계 2대 작물이며 특히 우리나라에서는 가장 중요한 작물이라고 할 수 있는 벼의 brassinosteroid 활성물질에 관해서는 Park 등^(10,17)이 유숙기의 미숙벼의 brassinosteroid 활성물질로 castasterone, teasterone, 6-deoxocastasterone을 최초로 구명한 바 있다.

본 연구는 주식으로 이용하고 있는 쌀의 식품적 기능성 구명 연구에 도움이 되고자 미숙상태가 아닌 완숙벼를 대상으로 이를 도정하여 미강과 백미로 분리한 후 이들에 포함된 brassinosteroid 활성물질의 탐색을 시도하였다.

Corresponding author: Keun-Hyung Park, Department of Food Science and Technology, Chonnam National University, 300 Yongbong-dong, Kwangju 500-757, Korea

재료 및 방법

실험 재료

전라남도 농촌진흥원에서 1994년에 재배된 일반계 품종인 동진벼(*Oryza sativa* L. cv. Tongjinbyeo)를 전남대학교 농과대학 곡물종합처리실습장에서 도정하여 얻어진 미강과 백미를 본 실험의 재료로 사용하였다.

추출 및 용매분획

미강 4.5 kg과 백미 10 kg을 각각 methanol (MeOH) 4 l, 10 l에 침지시킨 후 과량의 MeOH 존재 하에 homogenizer (NISSEI bio-mixer)로 마쇄하면서 추출한 다음, 이 추출물을 여과지(Toyo No. 2)와 G3 glass filter를 사용하여 여과하였다. 이 추출조작을 3회 반복하여 얻은 추출액을 evaporator (EYELA TYPE N-N)를 사용하여 40°C에서 감압농축하여 MeOH을 제거한 뒤 ethyl acetate (EtOAc)와 0.5 M HCl 용액(pH 2-3)으로 분배하여 중 산성구와 수용액구로 분획하였다. 중 산성구를 다시 EtOAc와 buffer-용액(0.5 M NaHCO₃, pH 7-8)으로 분배시켜 얻어진 EtOAc(중성구)획분은 *n*-hexane과 80% MeOH (MeOH-H₂O, 80 : 20, v/v)로 분배하여 *n*-hexane 획분과 80% MeOH 획분을 얻었다.

Silica gel adsorption column chromatography

Silica gel (미강, 32 g; 백미, 19 g, 7.5 g; 70-230 mesh, column chromatography-용, Merck사)을 CHCl₃으로 slurry를 만들어 column (1.3×18 cm, 1.5×25 cm, 1.7×31 cm)에 충전시킨 후, CHCl₃-MeOH 용매계로 MeOH 농도를 0%에서 5, 10, 15, 20, 50%(농도별로 미강 160 ml와 백미 100 ml씩)까지 증가시켜 분획하였으며 그리고 7.5 g gel을 사용한 column은 CHCl₃-MeOH 용매계로 0%에서 2.5, 5, 7.5, 10, 20, 50%(0%는 120 ml, 2.5%부터는 농도별로 60 ml씩)까지 단계적으로 증가시켜 분획하였다.

Sephadex LH-20 column chromatography

Sephadex LH-20 (25-100 μm, Pharmacia사)을 MeOH-CHCl₃(4 : 1, v/v) 용매계⁽¹¹⁾로 팽윤시킨 후, column (3.1×61 cm, bed volume 500 ml; 2.0×91 cm, bed volume 250 ml; 2.2×68 cm, bed volume 200 ml)에 충전하고 동 용매계를 사용하여 용출분획하였다.

Charcoal adsorption chromatography

Charcoal (60-150 mesh, column chromatography-용, Nakarai사)을 H₂O, MeOH, CHCl₃으로 각각 3회씩 세

척하여 건조시킨 charcoal을 Park 등⁽¹²⁾의 방법에 따라 40% MeOH (MeOH-H₂O, 40 : 60, v/v)로 slurry를 만들어 column (1.4×29 cm)에 충전하고, 동 용매계로 시료를 흡착시킨 후, 40% MeOH (30 ml), 80% MeOH (15 ml), 100% MeOH (15 ml)로 순차 용출분획한 다음, 이어서 CHCl₃-MeOH 용매계로 MeOH 농도를 90%(15 ml)에서 70(15 ml), 50(15 ml), 30(15 ml), 10(15 ml), 0%(150 ml)까지 단계적으로 감소시키면서 용출분획하였다.

Preparative-Thin layer chromatography(TLC)

시료를 MeOH로 녹여 plate (Kieselgel 60 F₂₅₄, 20×20 cm, 1.0 mm, Merck사)에 banding하였다. EtOAc-EtOH-Acetone (22 : 3 : 3, v/v/v) 용매계로 15 cm 전개시키고 UV (254 nm)를 이용하여 전개양상에 따라 분획한 후 MeOH-CHCl₃ (1 : 1, v/v) 용매계로 용출하였다.

HPLC

시료를 Park 등⁽¹³⁾의 방법에 따라 Sep-pak (C₁₈ type)으로 전처리하고 filter (GELMAN Acrodisc LC 13 PVDF, 0.2 μm)로 여과한 후, ODS column (0.8×25 cm, ODS-3215-D, Senshu사)을 사용하여 80% MeOH (0-30분), 100% MeOH (30-50분)로 분당 2 ml로 용출 분획하였다.

Brassinosteroid의 활성검정 및 생물검정에 의한 함량측정

Brassinosteroid 활성검정은 상풍벼의 조직을 이용하여 Park 등⁽¹⁴⁾의 생물검정법(rice inclination test)에 의하여 brassinosteroid 활성을 측정하였다. Brassinosteroid 활성물질의 함량은 brassinolide, castasterone, teasterone의 표준용액을 생물검정하여 작성된 검량선에 의하여 산출하였다.

결과 및 고찰

미강의 brassinosteroid 활성물질 정제 및 분리

미강 4.5 kg(수분함량 10.4%)을 MeOH로 추출여과하여 얻은 MeOH추출물 236.8 g을 용매분획하여 얻어진 수용액 획분, *n*-hexane 획분, 80% MeOH 획분을 대상으로 rice inclination test의 bioassay를 지표로 활성을 검정한 결과, 중성구인 80% MeOH획분(3.2 g)에서 brassinosteroid 활성이 나타났다. 이와같은 결과는 벼, 결명자, 옥수수, 들깨 미숙종자의 brassinosteroid가 80% MeOH획분에 존재한다는 사실이 확인^(10,11,13,15)된

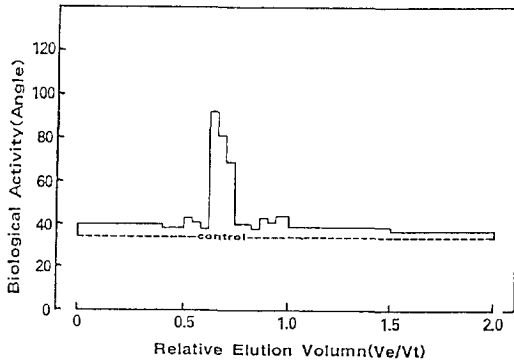


Fig. 1. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test after Sephadex LH-20 column chromatography of the extract from rice bran

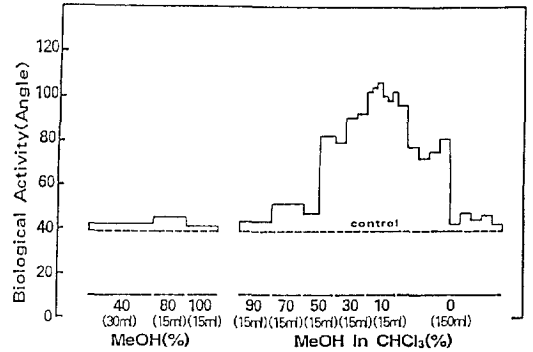


Fig. 2. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test after charcoal adsorption chromatography of the extract from rice bran

바 있는데, 미강의 80% MeOH획분에 활성이 인정되어 미강에 brassinosteroid 활성물질의 존재가 시사되었다.

용매분획의 활성획분(3.2 g)을 silica gel adsorption chromatography로 분획한 후 각 획분에 대하여 생체중량 29.7 g에 상당하는 추출물에 의해 활성을 검정한 결과, CHCl₃ 내의 MeOH농도 5~20% 용출획분(224~720 ml, 2.52 g)에 활성을 보였다. 이 활성획분을 MeOH-CHCl₃ (4 : 1, v/v) 용매계의 Sephadex LH-20 column chromatography로 분획하여 활성을 검정하였다. Fig. 1에 나타낸 바와 같이 생체중량 62g에 상당하는 추출물에 의해 bed volume에 대한 elution volume의 비(Ve/Vt)가 0.62~0.74의 용출영역(642 mg)에서 활성을 나타냈다. 이와같은 결과는 Park 등⁽¹²⁾이 보고한 바 있는 동일조건에서 brassinosteroid의 전형적인 용출 범위인 Ve/Vt 0.625~0.75와 일치하여 활성 본체가 이미 알려진 brassinosteroid와 유사한 분자량을 갖는 물질에 의해 활성이 발현되고 있음이 시사되었다.

더욱 정제하기 위하여 charcoal adsorption chromatography를 행하였다. 활성획분(642 mg)을 MeOH-H₂O 용매계와 CHCl₃-MeOH 용매계로 순차 용출분획하여 활성을 검정하였다. 그 결과, Fig. 2에 나타낸 바와 같이 생체중량 107g에 상당하는 추출물에 의해 CHCl₃내의 MeOH 농도 50~0% 용출영역(100~210 ml, 489.8 mg)에 활성을 보였다. 이 활성획분(489.8 mg)을 EtOAc-EtOH-Acetone (22 : 3 : 3, v/v/v) 용매계의 TLC로 분획한 후 각 획분에 대하여 생체중량 119.3 g에 상당하는 추출물에 의해 활성을 검정하였다. 그 결과, Fig. 3에 나타낸 바와 같이 R_f 0.35~0.50(130.4 mg, 활성 I로 명명)과 R_f 0.55~0.70 (194.3 mg, 활성 II로

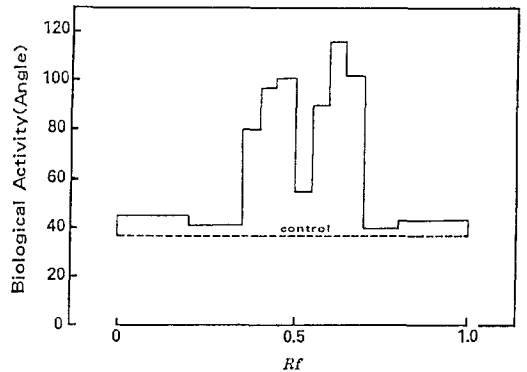


Fig. 3. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test after preparative-TLC of the extract from rice bran

명명)위치에 활성을 보여 활성물질의 분리가 이루어졌다.

TLC로 분리된 활성 I과 활성 II를 LH-20 column에 의해 더욱 정제하였다. 활성 I은 Ve/Vt 0.66~0.80의 용출영역(17.42 mg)에서, 활성 II는 Ve/Vt 0.62~0.74의 용출영역(145.6 mg)에서 활성을 나타냈다.

백미의 brassinosteroid 활성물질 정제 및 분리

백미 10 kg(수분함량 13.1%)의 MeOH추출물 39.89 g을 용매분획하여 얻어진 수용액 획분, n-hexane 획분, 80% MeOH 획분을 대상으로 활성을 검정한 결과 미강과 동일하게 중성구인 80% MeOH획분(1.87 g)에서 brassinosteroid 활성물질의 존재가 인정되었다. 80% MeOH획분을 silica gel adsorption chromatography로 분획하여 각 획분에 대하여 생체중량 49.8 g에 상당하는 추출물에 의해 활성을 검정한 결과, CHCl₃ 내의 MeOH농도 5~15% 용출획분(100~400 ml, 0.95 g)에

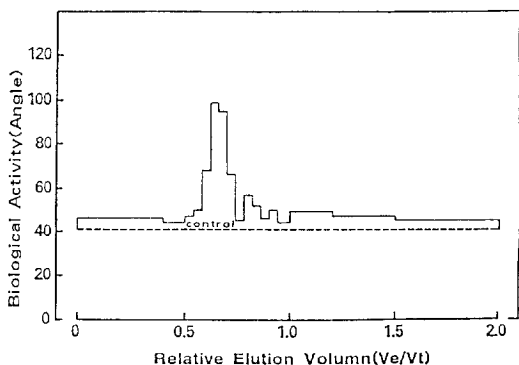


Fig. 4. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test after Sephadex LH-20 column chromatography of the extract from polished rice

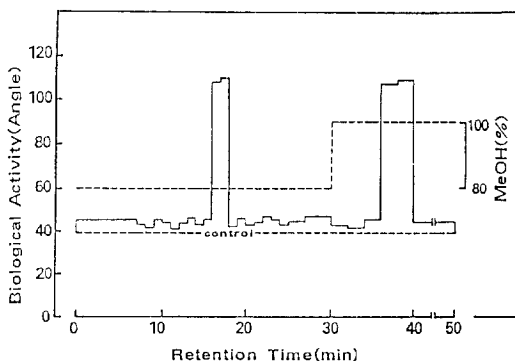


Fig. 6. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test after HPLC on ODS column of the active fraction I of the extract from rice bran

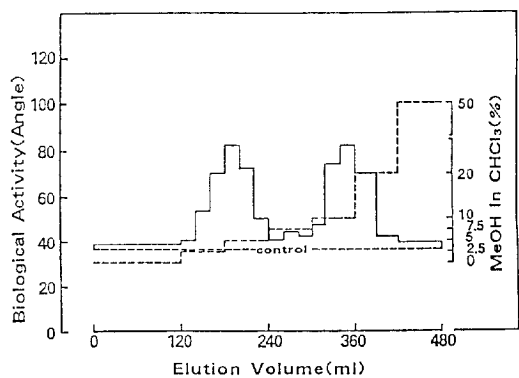


Fig. 5. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test after re-silica gel adsorption chromatography of the extract from polished rice

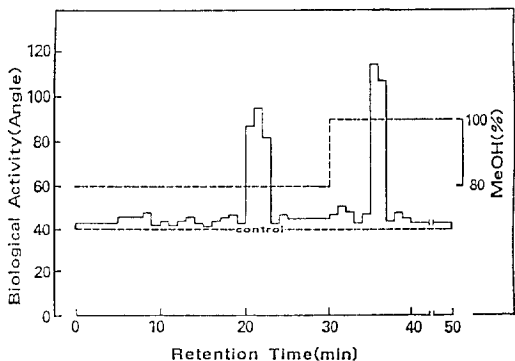


Fig. 7. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test after HPLC on ODS column of the active fraction II of the extract from rice bran

활성을 보였으나 미강보다는 낮은 활성을 나타냈다.

이 활성획분(0.95 g)을 Sephadex LH-20 column chromatography로 활성을 검정한 결과 Fig. 4에 나타낸 바와 같이 생체중량 99.2 g에 상당하는 추출물에 의해 V_e/V_t 0.58~0.74의 용출영역(0.75 g)에서 활성을 나타냈다. 이 활성획분을 silica gel adsorption chromatography (7.5 g gel)로 재분획한 후 각 획분에 대하여 생체중량 163.6 g에 상당하는 추출물에 의해 활성을 검정하였다. $CHCl_3$ 내의 MeOH농도 2.5~5% 용출획분 (160~220 ml, 164 mg, 활성 I로 명명)과 10~20% 용출획분(320~392 ml, 61.9 mg, 활성 II로 명명)에서 활성을 보여 활성물질의 분리가 이루어졌다(Fig. 5).

Brassinosteroid 활성본체의 구명

미강에서 얻어진 활성 I (17.42 mg)과 활성 II (145.63 mg)의 활성본체를 구명하고자 각각 HPLC로 분획

하고 생체중량 300 g에相当하는 추출물로 활성을 검정하였다. 활성 I은 retention time (t_R) 16~18분과 t_R 36~40분에서(Fig. 6), 활성 II는 t_R 20~23분과 t_R 35~37분의 위치에서 활성을 나타냈다(Fig. 7). 동일조건의 HPLC에 의한 authentic brassinosteroid의 용출위치와 비교하여 보면, 활성 I의 t_R 16~18분의 활성은 castasterone의 t_R 과 완전히 일치하여 활성본체로 castasterone이 동정되었으며, 활성 II의 t_R 20~23분의 활성은 teasterone의 t_R 과 일치하여 활성본체로 teasterone이 동정되었다. 또한 미강의 활성 I의 t_R 36~40분과 활성 II의 t_R 35~37분은 최근 Park 등^(16,17)이 brassinosteroid 활성을 갖는 물질로 보고한 monoglyceride의 HPLC 용출양상과 일치하여 이들 활성본체는 monoglyceride로 생각된다.

LH-20 column에 의해 더욱 정제된 백미의 활성 I (17.2 mg)과 활성 II (18.8 mg)의 활성본체를 구명하고자 HPLC로 분획하고, 활성 I은 생체중량 935.3 g에

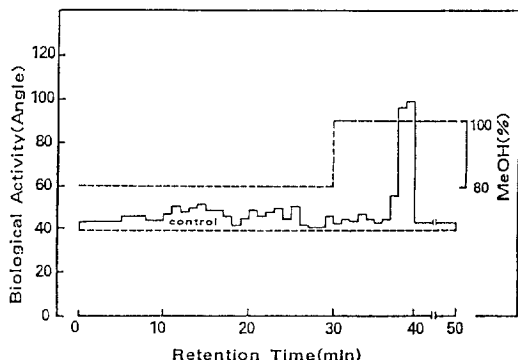


Fig. 8. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test after HPLC on ODS column of the active fraction I of the extract from polished rice

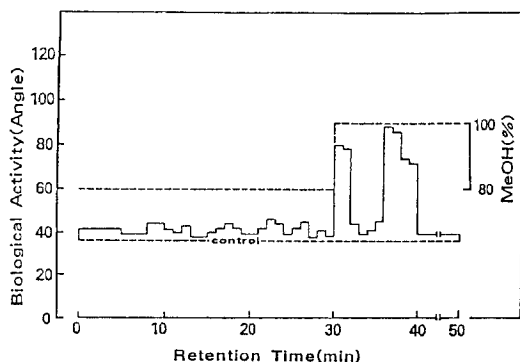


Fig. 9. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test after HPLC on ODS column of the active fraction II of the extract from polished rice

상당하는 추출물에 의해 활성 II는 생체중량 2,104.3 g에 상당하는 추출물에 의해 활성을 검정하였다. 그 결과, 활성 I은 t_R 38~40분에(Fig. 8), 활성 II는 t_R 30~32분과 t_R 36~40분의 위치에서 활성을 나타냈다(Fig. 9). 백미 활성 I의 t_R 38~40분과 활성 II의 t_R 36~40분획분은 미강의 HPLC 용출양상과 같이 진술한 monoglyceride의 용출영역과 일치하여 이들 활성분체는 monoglyceride로 생각되었다. 그리고 백미 활성 II의 t_R 30~32분의 활성분체는 ODS column의 용출양상으로 보아 6-deoxocastasterone의 가능성을 나타냈다.

한편, Park 등⁽¹⁰⁾은 벼 미숙종자에서 castasterone, teasterone, 6-deoxocastasterone을 동정하여 보고한 바 있는데, 완숙벼의 미강에서도 castasterone, teasterone이 동정되어 Park 등의 실험결과와 일치하였다.

이상의 결과, 미강에 포함된 brassinosteroid 활성물질로 castasterone과 teasterone이 동정되어 미강에

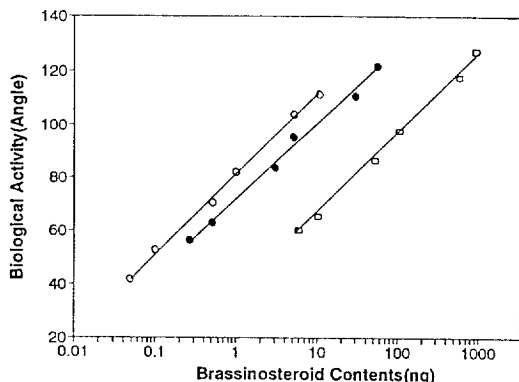


Fig. 10. Calibration curve of brassinosteroids by the rice inclination test with seedlings of Sangpungbyeo
○—○, brassinolide; ●—●, castasterone; □—□, teasterone

brassinosteroid가 존재함을 확인하였다. 완숙된 쌀의 미강부위에서 brassinosteroid 활성물질이 확인 및 동정된 것은 본 연구가 최초로 생각된다.

미강과 백미의 brassinosteroid 활성물질의 함량

LH-20 column에 의해 부분정제된 미강과 백미의 brassinosteroid 활성획분에 포함된 brassinosteroid 함량을 brassinosteroid 표준용액을 생물검정하여 작성된 검량선(Fig. 10)을 이용하여 측정하였다. Brassinolide로 환산한 총 brassinosteroid 함량은 생체중량 g당 미강은 0.12 ng, 백미는 0.008 ng 수준으로 완숙벼의 brassinosteroid는 주로 미강에 존재하였다. 이러한 함량은 벼의 미숙종자(0.5~1.5 ng/g fresh weight)⁽¹⁰⁾, 결명자의 미숙종자(3.5~5.5 ng/g fr. wt.)⁽¹¹⁾, 들깨의 미숙종자(0.5~0.8 ng/g fr. wt.)⁽¹²⁾ 그리고 옥수수의 미숙종자(3~8 ng/g fr. wt.)⁽¹³⁾와 비교하여 훨씬 낮은 수준이었다.

또한 미강에서 동정된 castasterone과 teasterone의 함량은 미강 g 중량당 castasterone은 0.15 ng, teasterone은 0.37 ng 수준이었다. 그러나 정제과정에서의 손실을 고려한다면 실제로는 이 수준 이상 함유되어 있을 것으로 생각된다.

요 약

벼(*Oryza sativa* L.)의 가식부인 쌀의 brassinosteroid 활성물질의 존재를 구명하기 위하여 벼를 도정하여 미강과 백미를 얻고 이들을 각각 MeOH로 추출하여 얻어진 추출물을 rice inclination test의 생물검정법으로 검정한 결과 활성이 인정되었다. 각각의 추출물을 생물검정법을 지표로 용매분획, silica gel adsorption

chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, charcoal adsorption chromatography 등의 수법으로 brassinosteroid 활성물질을 정제하고, silica gel adsorption chromatography, TLC 등에 의해 활성본체를 분리하고 각 활성획분을 HPLC에 의해 활성본체 구명을 시도한 결과 미강의 활성획분에서는 castasterone과 teasterone이 동정되었다.

완숙된 쌀에서 brassinosteroid 활성물질의 확인 및 동정은 본 연구가 최초로 생각되며, brassinosteroid 활성물질은 주로 미강에 존재하였으며, 그 함량은 g 중량당 castasterone이 0.15 ng 이고 teasterone은 0.37 ng 수준이었다.

감사의 말

본 연구는 농업생물신소재연구센터의 지원으로 수행된 연구결과의 일부이며 이에 연구센터와 과학재단 당국에 감사드립니다.

문헌

1. 李春寧 : 쌀과 文化. 서울대학교 출판부, p.27 (1994)
2. 이현우, 한 역, 이상효, 권상오, 김성수, 오상룡, 민병용 : 쌀을 이용한 압출형 가공식품 개발 연구. 한국식품개발연구 보고서, G1007-0198 (1992)
3. Mitchell, J.W., Mandava, N., Worley, J.F., Plimmer, J.R. and Smith, M.V.: Brassina new family of plant hormones from rape pollen. *Nature*, **225**, 1065 (1970)
4. 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.: Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature*, **281**, 216 (1979)
5. Gregory, L.E.: Acceleration of plant growth through seed treatment with Brassins. *Amer. J. Bot.*, **68**, 586 (1981)

6. Thomas, H. and Maugh, H.: New chemicals promise larger crops. *Science*, **212**, 33 (1981)
7. Wada, K. and Marumo, S.: Synthesis and plant growth-promoting activity of brassinolide analogues. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2579 (1981)
8. Park, K.H.: Chemistry and biological activity of brassinosteroid. *Korean Society of Plant Tissue Culture*, **18**, 277 (1991)
9. Fujita, F.: 브라시놀라이드 농업이용への期待. *化學と生物*, **23**, 717 (1985)
10. Park, K.H., Kim, S.J., Park, J.D., Lee, L.S. and Hyun, K.H.: Brassinosteroid substances in immature *Oryza sativa* seeds. *Korean J. Agric. Chem.* **36**, 376 (1993)
11. Park, K.H., Kim, S.J. and Hyun, K.H.: Brassinosteroid substances in immature *Cassia tora* seeds. *Korean J. Agric. Chem.*, **36**, 99 (1993)
12. Park, K.H., Saimoto, H., Nakayama, S., Sakurai, A., Yokota, T., Takahashi, N. and Syono, K.: Occurrence of brassinolide and castasterone in crown gall cells of *Catharanthus roseus*. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 805 (1989)
13. Park, K.H., Kim, S.J. and Hyun, K.H.: Brassinosteroid substances in immature *Zea mays* seeds. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **8**, 300 (1993)
14. Park, K.H., Hyun, K.H. and Kim, D.Y.: An assay method with lamina joint of Korean rice. *Korean J. Agric. Chem.*, **29**, 22 (1986)
15. Park, K.H., Kim, S.J. and Hyun, K.H.: Brassinosteroid substances in immature *Perilla frutescense* seeds. *Korean J. Agric. Chem.*, **36**, 197 (1993)
16. Park, K.H., Park, J.D., Hyun, K.H., Nakayama, M. and Yokota, T.: Brassinosteroids and monoglycerides in immature seeds of *Cassia tora* as the active principles in the rice lamina inclination bioassay. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1343 (1994)
17. Park, K.H., Park, J.D., Hyun, K.H., Nakayama, M. and Yokota, T.: Brassinosteroids and monoglycerides with brassinosteroid-like activity in immature seeds of *Oryza sativa* and *Perilla frutescens* and in cultured cells of *Nicotiana tabacum*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 2241 (1994)

(1996년 1월 22일 접수)