한국생물공학회지 제8권 제3호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 8. No. 3. 300-305(1993)

옥수수 종실의 Brassinosteroid 활성물질 탐색

박 근 형 · 김 선 재 · 현 규 환*
전남대학교 농과대학 식품공학과
*순천대학교 농과대학 자원식물학과

Brassinosteroid Substances in Immature *Zea mays* Seeds

Keun-Hyung Park, Seon-Jae Kim and Kyu-Hawn Hyun*
Department of Food Science and Technology, College of Agriculture,
Chonnam National University
*Department of Resources Plant, College of Agriculture, Sunchon University

ABSTRACT

In order to explore the brassinosteroid-active components in *Zea mays* seeds, the methanol extract was purified by the sequences of solvent fractionation, silica gel adsorption chromatography, 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 separated by silica gel adsorption chromatography. Brassinosteroid substances in separated active fractions were identified as castasterone and teasterone by HPLC. The content of brassinosteroid in *Zea mays* seeds as converted into brassinolide was 3-8ng/g fresh weight.

서 론

식량과 유용자원을 공급하고 있는 식물의 생산력을 높이기 위해서는 식물이 합성하여 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 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 지금까지 중요시되어 왔던 식품의 영양과 기호성 외에 소위 제3차 기능이라고 불리우는 식품에 존재하는 활성물질에 의한 생체조절기능의 가능성에 대해 관심이 고조되고 있는데, 식품의 제3차 기능을 구명하기 위해서는 식품재료에 존재하는 활성물질의 검색이 또한 요구된다.

여기에 본 연구는 쌀, 밀 다음으로 많이 재배되고 있으며 식용 및 가공식품 그리고 동물사료와 공업용 원료로 이용되며, 민간에서는 이뇨약으로 사용(7, 8)하기도 하는 벼과인 옥수수 종실의 brassinosteroid에 관한 연구가 수행된 바 없어, 식물이 생산

는 brassinosteroid 활성물질 탐색 연구의 일환으로 옥수수 종실에 존재하는 brassinosteroid 활성물질을 탐색하였다.

재료 및 방법

실험재료

전남대학교 봉황농장에서 재배된 벼과 식물인 옥수수(*Zea mays*)의 미숙종자 20kg을 완숙적인 8월 하순에 채취하여 공시하였다.

추출 및 용매분획

시료 20kg을 과량의 MeOH 존재하에 blender로 마쇄하면서 추출한 다음, 여과지(Toyo No. 2)와 G_3 glass filter를 사용하여 여과하였다. 이 추출조작을 3회 반복하여 얻은 추출여액을 40℃에서 감압농축하여 MeOH이 제거된 수용액을 Park 등의 방법(9, 10)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(170g과 30g과 10g, 70~230mesh, column chromatography용, Merck사)을 $CHCl_3$으로 slurry를 만들어 column에 충진(gel 170g; 3.2×50cm, gel 30g; 1.7×32.5cm, gel 10g; 1.5×18.5cm)시킨 후, gel 170g과 30g의 경우는 $CHCl_3$-MeOH 용매계로 MeOH 농도를 0, 5, 10, 15, 20, 50% (gel 170h, 농도별로 1,400ml씩; gel 30g, 농도별로 250ml씩)까지 단계적으로 증가시키고, gel 10g의 경우는 동용매계로 MeOH농도를 0~10%(농도별로 30ml씩)까지 1%씩 단계적으로 증가시킨 step-wise 용출방법으로 용출분획하였다.

Sephadex LH-20 column chromatography

Sephadex LH-20(25~100μm, Pharmacia사)을 MeOH-$CHCl_3$(4:1, v/v) 용매계(9)와 70% EtOH 용매계(11, 12)로 하룻밤 팽윤시킨 후, column에 충진(MeOH-$CHCl_3$, bed volume 1,000ml와 bed volume 200ml; 70% EtOH, bed volume 1,000ml와 bed volume 500ml)하고 동용매계로 용출분획하였다.

Charcoal adsorption chromatography

Charcoal(60~150mesh, column chromatography용, Nakarai사)를 H_2O, MeOH, $CHCl_3$으로 각각 3회씩 세척하여 건조시킨 다음, activated charcoal 90g을 Park 등(9)의 방법에 따라 40% MeOH로 slurry를 만들어 column에 충진(3.5×43.5cm)하고, 동용매계로 시료를 녹여 흡착시킨 후, 40(270ml), 80(135ml), 100% MeOH(135ml)로 순차 용출분획한 다음, 또 다시 MeOH-$CHCl_3$ 용매계로 MeOH농도를 90%(135ml)에서 70(135ml), 50(135ml), 30(135ml), 10(135ml), 0% (1,450ml)까지 단계적으로 감소시키면서 순차 용출분획하였다.

Bondesil chromatography

Gel 8g(HPLC preparative grade, 40μm, Analytichem International사)을 MeOH로 slurry를 만들어 문등의 방법(13)으로 column에 충진(1.3×21cm)하고 시료를 MeOH에 녹여 흡착시킨 후, 각 획분을 1ml씩으로 하여 총 100ml의 MeOH로 용출분획하였다.

TLC

시료를 plate(Kiesel gel 60 F254, 5×20cm, 0.25㎜, Merck사)에 spotting한 후, EtOAc-EtOH-Acetone(22:33:3, v/v) 용매계로 15cm 전개시킨 후, *Rf*별로 10등분하여 절취하고, MeOH-$CHCl_3$ (1:1, v/v) 용매계로 용출하였다.

HPLC

시료를 Sep-Park(silica type과 C_{18} type)으로 전처리하고, filter(GELMAN Acrodisc LC 13 PVDF, 0.2μm, Waters사)로 여과한 후, ODS column(0.8×25cm, ODS-3215-D, Senshu사)을 사용한 HPLC는 70% MeOH(0~35분), 80% MeOH(35~65분), 100% MeOH(65~100분) 용매계와 80% MeOH(0~30분), 100% MeOH(30분 이후) 용매계를 사용한 step-wise 용출법으로 분당 2ml로 분획하였으며, C_{18} column(1.9×30cm, Waters사)을 사용한 HPLC는 80% MeOH 용매계를 사용하여 분당 9ml로 용출분획하였다.

Brassnosteroid의 활성검정 및 생물검정에 의한 함량측정

상풍벼의 조직을 이용한 Park 등(14)의 생물검정

법(rice inclination test)에 의하여 brassinosteroid 활성을 검정하였는데, 활성의 크기는 angle(180°에서 제2엽신과 제1엽초에 의해 이루어진 각도를 뺀 값)로 표시하였다. Brassinosteroid활성물질의 함량은 brassinolide 표준용액을 생물검정하여 작성된 검량선(15)에 의하여 산출하였다.

결과 및 고찰

Brassinosteroid 활성물질의 확인 및 정제

옥수수의 미숙종자 20kg을 MeOH로 추출하고 용매분획하여 얻어진 수용액 획분, *n*-Hexane 획분, 80% MeOH 획분을 대상으로 생물검정법으로 활성을 검정한 결과, 80% MeOH 획분(16.5g)에서 활성이 인정되었다. 이 활성획분을 170g의 gel을 사용한 silica gel adsorption chromatography로 분획하여 생체중량 10g에 상당하는 추출물로 검정한 결과, $CHCl_3$ 내의 MeOH농도 5~10% 용출획분(1,680~3,080ml, 10.95g)에 활성이 집중되어 활성물질의 존재를 확인할 수 있었다.

이어서 silica gel 흡착 chromatography의 활성획분을 MeOH-$CHCl_3$ 용매계의 Sephadex LH-20의 gel filtration(bed volume 1,000ml)으로 분획하고 생체중량 20g에 상당하는 추출물로 검정한 결과, elution volume에 대한 bed volume의 비(Ve/Vt) 0.55~0.75의 용출범위(550~750ml, 6.54g)에 활성이 인정되었다. Park 등(9)은 동일조건의 gel filt-ration에서 전형적인 brassinosteroid의 용출범위가 Ve/Vt 0.63~0.75라고 보고한 바 있는데, 이것은 본 실험의 결과와 거의 일치하여 옥수수 종실에 포함된 활성본체가 이미 알려진 brassinosteroid와 유사한 분자량을 갖는 물질에 의해 활성이 발현되고 있음이 시사되었다.

더욱 정제하고자 charcoal 흡착 chromatography를 행하였다. 활성획분(6.54g)을 charcoal column에 흡착시키고 MeOH-H_2O 용매계와 $CHCl_3$-MeOH 용매계로 순차 분획하고 생체중량 50g에 상당하는 추출물로 검정한 결과, $CHCl_3$ 내의 MeOH농도 30~0% 용출영역(845~2,065ml, 3.73g)에 활성물질의 존재가 인정되어 활성물질의 존재를 재확인 할 수 있었으며 상당한 정제효과도 얻을 수 있었다.

Charcoal 흡착 chromatography의 활성획분의 정제와 활성본체에 대한 정보를 얻기 위하여 70% EtOH 용매계로 Sephadex LH-20의 gel filtration (bed volume 1,000ml)으로 분획하고, 생체중량 75g

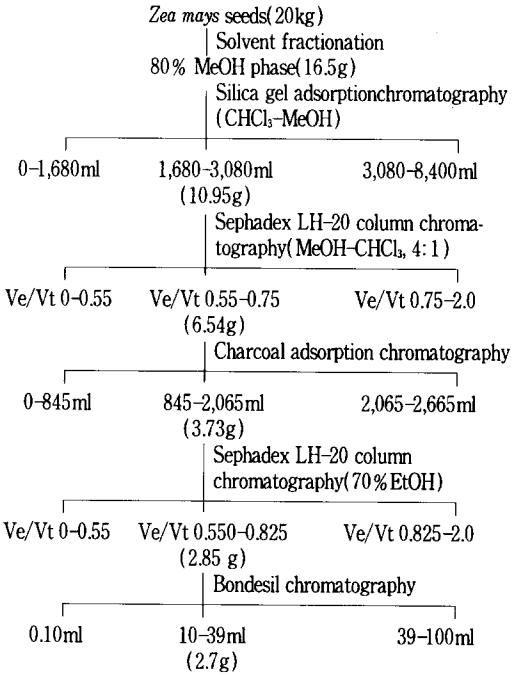

Fig.1. Purification process of brassinosteroids from *Zea mays* seeds extracts.

에 상당하는 추출물로 검정한 결과, Ve/Vt 0.55~0.82의 용출범위(550~825ml, 2.85g)에 높은 활성을 보였다. 이 결과는 동일조건에 의한 gel filtration에서 전형적인 brassinosteroid가 Ve/Vt 0.65~0.80의 용출범위에서 용출된다는 Park 등(10)과 Yokota 등(12)의 보고와 거의 일치하여, 이 활성물질의 활성본체가 기지의 brassinosteroid와 유사한 분자량을 갖는 물질의 가능성을 더욱 높여 주었다.

이 활성획분을 Bondesil chromatography로 분획하고 생체중량 100g에 상당하는 추출물로 검정한 결과, 10~39ml의 용출용역(2.7g)에서 활성물질의 존재가 인정되었다. 이상의 과정을 Fig. 1에 나타냈다.

정제 중간단계에서의 brassinosteroid함량 측정

이상의 정제과정에서 정제된 옥수수 종실의 brassinosteroid 활성획분에 포함된 brassinosteroid함량을 검량선(15)을 이용하여 측정하였다. 옥수수의 생체중량 1, 5, 10g에 상당하는 추출물에 의해 각각 110°, 120°, 122° 활성을 나타내, brassinolide로 확산한 전 brassinosteroid의 함량은 생체중량 g당 3

~8ng 수준을 나타냈다. 이러한 수준은 기 보고(16, 17)된 다른 식물에 존재하는 brassinosteroid 함량과 비교하면, 영양 생장조직의 함량보다는 많으며, 옥수수 화분(22)보다 훨씬 낮고 결명자의 미숙종자(15)와 비슷하였으며 들깨(18)보다는 높은 수준이었다.

Brassinosteroid 활성물질의 분리

이상의 정제과정에서는 전활성획분을 모아서 정제하였으나 정제가 어느 정도 이루어졌기에 활성성분의 분리를 시도하였다. Bondesil chromatography의 활성획분(2.7g)을 30g의 gel을 사용한 silica gel 흡착 chromatography로 분획하고 생체중량 30g에 상당하는 추출물로 검정한 결과(Fig. 2), $CHCl_2$ 내의 MeOH 농도 5% 용출획분에 minor활성(310~410ml, 1.08g, 활성 I로 명명)과 MeOh 농도 5~10% 용출획분에 main활성(470~590ml, 56mg, 활성 II로 명명)을 보여 활성물질의 분리가 이루어졌다.

활성 I(1.08g)은 보다 정제의 필요성이 있어 70% EtOH 용매계의 sephadex LH-20의 gel filtration(bed volume, 500ml)으로 분획하고 생체중량 58g에 상당하는 추출물로 활성을 검정한 결과, Ve/Vt0.60~0.76의 용출범위(300~380ml, 783g)에 활성이 인정되었다. 이 활성획분을 10g의 gel을 사용하는 silica gel adsorption chroma-tography로 분획하여 생체중량 77.5g에 상당하는 추출물로 활성을 검정한 결과, $CHCl_3$ 내의 MeOH농도 3~4% 용출획분(114~132ml, 362mg, 활성 I-I로 명명)과 MeOH농도 5~6% 용출획분(168~192ml, 20.5mg, 활성 I-II로 명명)에 활성이 인정되었다. 활성 I-I은 더욱 정제의 필요성이 있어 MeOH-$CHCl_3$ (4:1, v/v) 용매계의 sephadex LH-20의 gel filtration(bed volume, 200ml)으로 분획하고 생체중량 150g에 상당하는 추출물에 의해 활성을 검정하였더니, 활성이 확실하게 인정되지 않아 생체중량 600g에 상당하는 추출물로 재검정한 결과, Ve/Vt 0.675~0.750의 용출범위(135~150ml, 82.25mg)에 활성이 인정되었다. 한편, 활성 II(56mg)를 MeOH-$CHCl_3$ 용매계의 Sephadex LH-20의 gel filtration(bed volume, 200ml)으로 분획하고 생체중량 62g에 상당하는 추출물로 활성을 검정한 결과(Fig. 3), Ve/Vt 0.65~0.75의 용출범위(130~150ml, 27.7mg)에 활성이 인정되었다. 이 활성획분에 흰색의 결정성 물질이 존재하여, 활성획분을 농

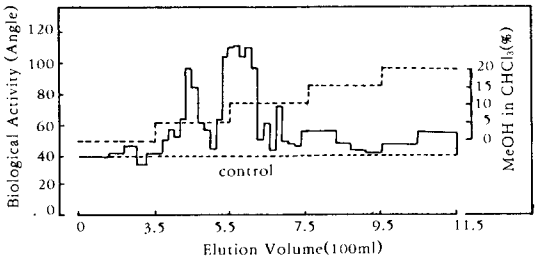

Fig.2. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test with seedlings of Sangpungbyeo after silica gel adsorption chromatography of the extract from *Zea mays* seeds.

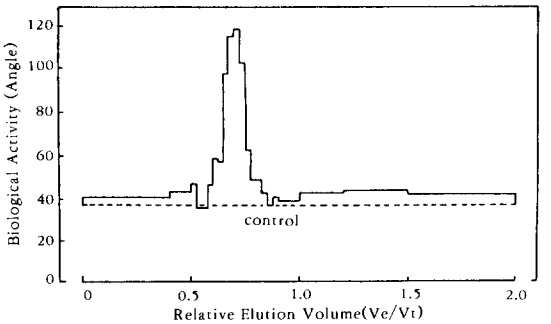

Fig.3. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test with seedlings of Sangpungbyeo after Sephadex LH-20 column chromatography of *Zea mays* seeds active fr. II.

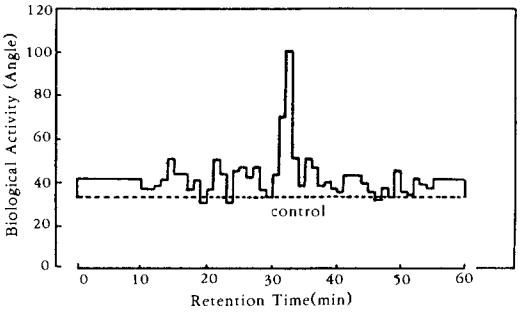

Fig.4. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test with seedlings of Sangpungbyeo after HPLC on C_{18} column of *Zea mays* seeds active fr. I-I.

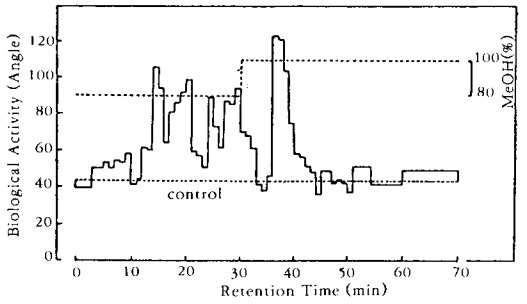

Fig.5. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test with seedlings of Sangpungbyeo after HPLC on ODS column of *Zea mays* seeds active fr. I-II.

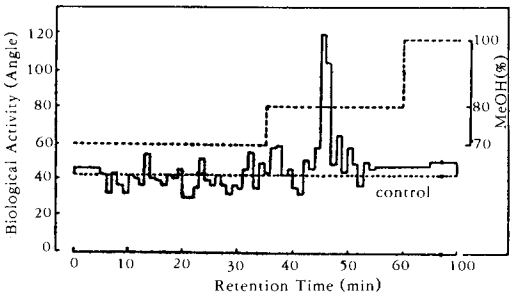

Fig.6. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test with seedlings of Sangpungbyeo after HPLC on ODS column of *Zea mays* seeds active fr. II.

축건고시키고 80% MeOH로 가열하면서 추출, 원심분리조작 후, 얻어진 상등액과 잔사에 대해 활성을 조사한 결과, 상등액(16mg)에서 활성이 인정되었다.

Brassinosteroid 활성본체의 구명

활성 I-I(82.25mg)을 C_{18} column의 HPLC로 분획하고 생체중량 1,023g에 상당하는 추출물로 활성을 검정한 결과(Fig. 4), retention time(Rt) 31~33분에서 뚜렷한 활성을 나타냈다. 동일조건의 HPLC에 의한 authentic castasterone의 Rt와 완전 일치하여 활성 I-I의 활성본체로 castasterone이 동정되었다.

활성 I-II(20.5mg)를 ODS column의 HPLC로 분획하고 생체중량 530g에 상당하는 추출물로 검정한 결과 100% MeOH 용출획분에서 활성이 인정되자, 용매계를 달리하여 재 HPLC를 실시하였다. 즉, 80, 100% MeOH 용매계로 분획하고 생체중량 3,100g에 상당하는 추출물로 검정한 결과(Fig. 5), Rt 14~16분, Rt 19~21분, Rt 24~26분, Rt 27~30분, Rt 36~39분에서 활성이 인정되었다. 이를 동일조건의 HPLC에 의한 authentic brassinosteroid의 Rt과 비교하여 보면 Rt 14~16분은 castasterone, Rt 19~21분은 teasterone의 Rt과 일치하여 활성 I-II의 활성본체로는 castasterone (19), teas-terone(20)이 동정되었다. Rt 24~26분의 활성본체는 authentic brassinosteroid의 용출양상(21)으로 보아 typhasterol(20)의 가능성이 크며, Rt 27~30분, Rt 36~39분의 활성본체는 기지의 brassinosteroid중 가장 낮은 극성을 보이는 2-deoxy형 brassinosteroid보다 훨씬 낮은 극성을 보여 새로운 brassinosteroid의 존재 가능성이 시사되었는데 이에 관해서는 추후 검토하고자 한다.

활성 II(16mg)의 일부(1/180, 108g 생체중량 상당)을 취하여 TLC를 실시하고 생체중량 18g, 90g에 상당하는 추출물로 검정한 결과, *Rf* 0.4~0.5를 중심으로 활성이 인정되었다. 동일조건의 TLC에 의한 authentic brassinosteroid와 비교하여 보면 *Rf* 0.4~0.5의 활성본체로 castasterone이 추정되었다. TLC에 의해 활성본체에 대한 정보가 얻어지자, 70, 80, 100% MeOH 용매계를 사용한 ODS column의 HPLC로 분획하고 생체중량 125g에 상당하는 추출물로 검정한 결과(Fig. 6), Rt 45~47분에 뚜렷한 활성을 나타냈다. 동일조건의 HPLC에 의한 authentic castasterone의 Rt과 일치하여 활성 II의 활성본체로 castasterone이 동정되었으며 또한 TLC의 결과와 일치하였다.

한편 Suzuki 등(22)은 옥수수의 화분에서 castasterone, teasterone, typhasterol의 존재를 보고한 바 있는데, 옥수수 종실에서도 함량은 화분의 1/10 수준이었으나 활성본체는 유사한 경향을 보였다.

이상의 결과, 옥수수의 종실에서 포함되어 있는 brassionsteroid 활성물질로 castasterone, teasterone이 동정되었으며, typhasterol의 존재 가능성과 함께 아주 낮은 극성을 보이는 새로운 brassinosteroid 존재가 시사되었다. 이들 brassinos-teroid에 의해 발현되는 활성의 분담은 castas-terone이 91.9%, teasterone이 1.0%, typhasterol이 0.5% 그리고 미지의 brassinosteroid가 6.5%로 대부분 castasterone 형태로 존재하였다.

요 약

옥수수 종실에 존재하는 brassinosteroid 활성물질을 탐색하기 위하여 MeOH로 추출하고, 이 추출물을 rice inclination test를 지표로 용매분획, 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 HPLC에 의해 활성 본체를 구명한 결과, castasterone과 teasterone이 동정되었는데, 대부분 castasterone형태로 존재하였다. 옥수수 종실에 함유된 brassinosteroid함량은 brassinolide로 환산하여 생체중량 g당 3~8ng 수준이었다.

감 사

본 연구는 한국과학재단 지원으로 수행되었기에 재단당국에 감사드립니다. 아울러 농업생물신소재연구센터의 지원과 실험을 도와준 박종대 군과 이란숙 양에게 감사드립니다.

참고문헌

1. M. D. Grove, G. F. Spencer, W. K. Rohwedder, N. Mandava, J. F. Worley, J. D. Warthen, G. L. Steffens, J. L. Flippen Anderson and J. C. Cook(1979), *Nature*, **23**, 216.
2. J. F. Worley and J. W. Mitchell(1971), *J. Am Soc. Hort. Sci.*, **96**, 270.
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. 약품식물학연구회(1981), 약품식물학 각론, 진명출판사, **82.**
8. 이창복(1980), 식물도감, 향문사, **127.**
9. K. H. Park, H. Saimoto, S. Nakagawa, A. Sakurai, T. Yokota, N. Takahashi and K. Syono(1989), *Agric, Biol. Chem.*, **53**, 805.
10. K. H. Park, T. Yokota, A. Sakurai and N. Takahashi(1987), *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 3081.
11. M. Ikeda, S. Takatsuto, T. Sassa, H. Ikekawa and M. Nukiwa(1983), *Agric, Biol. Chem.*, **47**, 655.
12. T. Yokota, J. Baba, S. Koba and N. Takahashi(1984), *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2529.
13. J. H. Moon, K. H. Hyun and K. H. Park (1992), *Korean J. Biotechnol. bioeng.*, **7**, 21.
14. K. H. Park, K. H. Hyun and D. Y. Kim (1986), *Korean J. Agric. Chem.*, **29**, 22.
15. K. H. Park, K. H. Hyun and S. J. Kim(1993), *Korean J. Agric. Chem.*, **36**, 99.
16. T. Yokota and N. Takahashi(1984), *Chem. Regul. Plants*, **19**, 102.
17. G. Adam and V. Marquardt(1986), *Phytochemistry*, **25**, 1787.
18. K. H. Park, K. H. Hyun and S. J. Kim(1993), *Korean J. Agric. Chem.*, **36**, 197.
19. T. Yokota, M. Arima and N. Takahahi (1982), *Tetrahedron Lett.*, **23**, 1275.
20. H. Abe, T. Morishita, M. Uchiyama, S. Takatsuto and N. Ikekawa(1984), *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2171.
21. T. Yokota, unpublished data.
22. Y. Suzuki, I. Yamaguchi, T. Yokota and N. Takahashi(1986). *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 3133.