

Capsaicinoids의 微生物轉換 메카니즘

眞菌에 의한 Capsaicinoids의 一般的 分解代謝形態

李 益 秀 · 李 相 燮

서울대학교 藥學大學

(Received June 22, 1987)

Microbial Transformation Mechanism of Capsaicinoids

General Biodegradation Pattern of Capsaicinoids by Fungi

Ik Soo Lee and Sang Sup Lee

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

Abstract—There are three plausible bioconversion pathways in biodegradation mechanism of capsaicinoids; first, side chain degradation through ω -hydroxylation and β -oxidation, secondly, aromatic ring hydroxylation, and lastly, hydrolysis on the acidamide linkage. In microbes, it was reported that capsaicin and its synthetic analog, nonoylvanillylamide(NVA), could be metabolized to N-vanillylcarbamoylebutyric acid via ω -hydroxylation and consecutive β -oxidations by *Aspergillus niger*. In order to broaden the scope of microbial degradation of capsaicinoids, over thirty strains of various fungi including *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mycotypha*, *Gliocladium*, *Paecilomyces*, *Byssoclamys*, *Conidiobolus*, *Thamnidium*, and *Entomophthora*. It was observed that almost all the strains examined oxidized the side chain of capsaicids as *A. niger* did. These observations strongly support the notion that side chain degradation is the most dominant pathway in the microbial degradation of capsaicinoids.

고추(*Capsicum annum L.*)는 오랜 세월을 걸쳐 식품과 의약품산업에서 사용되었으나 주로 매운 맛과 자극성을 이용하는 것이다. 고추의 배운성분 capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-onenamide)의 존재가 알려진 것은 오래전이나¹⁾ 이 결정성 capsaicin이 단일성분이 아니고 5개의 vanillylamide 동족체라는 것이 밝혀진 것은 비교적 근래의 일이다.²⁾ 그러나 주성분은 capsaicin과 dihydrocapsaicin이며, 미량성분으로 존재하는 nordihydrocapsaicin, homodihydrocapsaicin, homocapsaicin은 GC-mass 분석으로 이루어졌고³⁾ 한국산고추 중 capsaicin과 dihydrocapsaicin의 비율도 밝혀져 있다.⁴⁾ 실험동물에 대한 capsaicin의 대량투여는 위궤막을 손상시키고⁵⁾ 반복투여로 간조직의 회사를 유발한다.⁶⁾ 근래 capsaicin의 지속적 진통효과가 알려지면서 진통작

용기전에 대한 연구가 활발하며⁷⁾, 특히 신경전달물질이라고 믿어지는 substance P와 capsaicin과의 관계에 관하여서는 많은 연구가 진행되고 있다.⁸⁾ 실험동물에서 capsaicin의 *in vitro* 및 *in vivo* 대사에 관하여서는 많은 연구가 이루어져서, vanillyl ring의 5-hydroxylation⁹⁾, acyl side chain에 대한 ω -hydroxylation¹⁰⁾ 그리고 N-vanillylamide 결합의 가수분해^{11,12)}가 밝혀졌다.

한편 발효식품 중 capsaicin의 동태를 구명하는데 도움이 될 뿐만 아니라 고등동물과 미생물에서의 대사과정을 비교하기 위하여 우리는 capsaicin과 capsaicin 동족체(capsaicinoids)에 대한 대사경로를 *A. niger*를 써서 밝혔다.¹⁰⁾ 즉 capsaicin과 nonoylvanillylamide (NVA)는 ω -hydroxylation과 β -oxidation으로 ω -hydroxycapsaicin을 거쳐 N-vanillylcarbamoylebutyric acid로

된다. 그러나 썩은 고추에 기생하는 진균 중에서는 동물조직에서처럼 capsaicin의 amide 결합을 가수 분해시키는 예가 있다.¹³⁾ 본 연구의 목적은 *A. niger*를 써서 구명한 ω -hydroxylation과 β -oxidation 경로가 다른 진균류에도 일어나는가를 확인하여 보편성이 있는 capsaicinoid의 대사경로를 밝히는 데 있다.

실 험 방 법

실험재료—Capsaicin은 E. Merck사 제품이고, nonoylvanillylamide은 현대약품주식회사에서 제공받았다. ω -Hydroxycapsaicin, 2-methyl-N-vanillyl carbamoyl-3(E)-octanoic acid, N-vanillyl carbamoyl butyric acid, ω -hydroxynonoylvanillylamide는 모두 capsaicin과 nonoylvanillylamide (NVA)를 각각 *A. niger*에 작용시켜 미생물 전환반응으로 얻었다.¹⁴⁾ 기타 유기 및 무기시약은 모두 특급시약을 사용하였다. TLC용 plate는 E. Merck사의 Kieselgel Art 11798의 기성 Plate를 쓰거나 정량적 분리용으로는 HF 254로 만들어 사용하였다.

Agar slant의 조성 :

① Czapeck-Dox agar slant medium— NaNO_3 (2g), K_2HPO_4 (1g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5g), KCl (0.5g), FeSO_4 (0.01g), sucrose(30g), Bacto agar (20g), dist. water(1,000ml).

② Malt extract agar slant medium—malt extract(20g), peptone(1g), dextrose(20g), agar (15~20g), dist. water(1000ml).

③ Soybean dextrose medium(SDM)—soybean (0.5%), NaCl (0.5%), K_2HPO_4 (0.5%), dextrose(2%), yeast extract(0.5%), pH5.4(HCl로 조정).

④ Henneberg medium¹³⁾—dextrose (10%), $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (0.2%), MgSO_4 (0.05%).

TLC용 전개용매 System:

① System I—sec-butanol (100)와 H_2O (25)을 혼합 진탕하여 하루 방치후 상정액을 사용하였다.

② System II—ethylacetate (110), isoctane

(50), acetic acid(20), H_2O (100)을 진탕 혼합하여 하루 방치후 상정액을 사용하였다.

발색시약—Diazotized sulfanilic acid reagent (Baldrige)¹⁵⁾

① 1차 분무시액 : sulfanilic acid 용액과 sod. nitrite 용액을 동량씩 분무직전에 혼합 사용함(sulfanilic acid 용액 : 8ml의 HCl에 1g의 sulfanilic acid를 녹이고 여기에 물을 가하여 전체량을 100ml로 함. sod. nitrite용액 : 0.69% NaNO_2 용액).

② 2차 분무시액 : 10% sod. carbonate 용액임.

사용균주—상한 고추에서 분리한 진균류의, 32종의 균주는 미국 Wisconsin대학(Madison)의 Dr.C.J. Sih가 제공한 것으로 agar slant에 보존하였다.

가. Capsaicinoids 대사산물의 추출 및 동정

1) 사용균주 및 양—Table. I에 나타난 균주들을 사용하여 소규모 발효를 행하였다. 정량적 접종을 위하여 멸균된 Tween 80 0.01% 용액 5ml씩을 각각의 agar slant에 가한 후 vortex type mixer를 사용하여 균의 포자가 agar slant 배지

Table I—The list of tested fungi.

<i>Aspergillus oryzae</i> (C)*	<i>Penicillium notatum</i> (C)
<i>A. giganteus</i> (M)**	<i>P. camemberti</i> (C)
<i>A. fischeri</i> (M)	<i>P. javanicum</i> (M)
<i>A. nidulans</i> (M)	<i>P. varioti</i> (C)
<i>A. varicolor</i> (C)	<i>P. lanoscoeruleum</i> (C)
<i>A. unguis</i> (C)	<i>P. expansum</i> (C)
<i>A. versicolor</i> (C)	<i>P. digitatum</i> (M)
<i>A. flavipes</i> (C)	<i>P. purpurogenum</i> (C)
<i>A. alliaceus</i> (C)	
<i>A. foetidus</i> (C)	<i>Mycotypha microspora</i> (M)
<i>A. lumchuensis</i> (M)	<i>Byssolamys fulva</i> (C)
<i>A. ochraceus</i> (C)	<i>Paecilomyces varioti</i> (C)
<i>A. sclerotiorum</i> (C)	<i>Thamnidium elegans</i> (M)
<i>A. tamaritii</i> (C)	<i>Entomophthora apicusasa</i> (M)
<i>A. avenaceus</i> (C)	<i>Gliocladium roseum</i> (M)
<i>A. kanagawaensis</i> (M)	<i>Conidiobolus sp.</i> (M)
<i>A. ustus</i> (C)	<i>Unidentified species</i> (M)
	(from spoiled red pepper)

* : Czapeck-Dox agar slant medium.

** : Malt extract agar slant medium.

면으로부터 Tween 80용액에 현탁되도록 한 다음, 멸균된 cap tube에 옮기고 그의 소량을 취해서 hemacytometer를 사용하여 포자수를 측정함으로써 그 기준치를 설정하였다. 실제로 사용된 균의 양은 포자 $2.5 \sim 5 \times 10^7$ 개이다.

2) 발효—각각의 agar slant에 보존된 균주를 25ml SDM을 함유하는 100ml erlenmeyer flask에 접종하여 orbital incubator shaker에서 180rpm, 30°C 로 48시간 preincubation시킨 후 그 5ml를 취하여 50ml SDM을 함유하는 300ml erlenmeyer flask에 재접종하였다. 24시간 더 배양시킨 후, $250 \mu\text{g/ml}$ 의 농도의 해당량인 12.5mg의 기질 (capsaicin 또는 NVA)을 0.3ml의 N,N-dimethylformamide (DMF)에 녹인 뒤에 위 배양액에 가하였다.

3) 대사산물의 추출 및 확인—배양액을 약 12시간 간격으로 5ml씩을 시험관에 따로 채취하여 진한 염산 한 방울로 산성화시켜 배양을 중지시켰다. 5ml의 ethylacetate를 가한 후 vortex-type mixer를 사용하여 진탕현탁시키고 이를 원심분리하여 그 상등액을 취해 농축하였다. TLC 용plate에 각각 점적하여 system I 또는 system II로 전개시키고 UV-lamp로 흡수반점을 확인한 후 diazotized sulfanilic acid test로 그 발색반응을 검토하였다.

실험결과 및 고찰

Capsaicinoids의 미생물에 의한 일반적인 분해 대사과정의 메카니즘을 알기 위하여 capsaicin과 NVA를 $250 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 총 35종의 진균 배양액 중에 첨가한 후 일정시간마다 일정량을 취하여 TLC를 행한 후 diazotized sulfanilic acid test를 행하였을 때에 몇 가지 부류의 chromatogram이 얻어졌다.

먼저 Fig. 1에서 보는 바와 같이 *A. nidulans*에 capsaicin을 기질로 사용하였을 때의 예처럼, 그 대사 pattern이 *A. niger*와 동일한 경우이며,¹⁴⁾ Fig. 3에서와 같이 NVA에서도 역시 *A. niger*와 같은 대사 경로를 따르는 것을 알 수 있다. Fig. 2는 Fig. 1에 나타난 각각의 Rf 치를 가지는 부

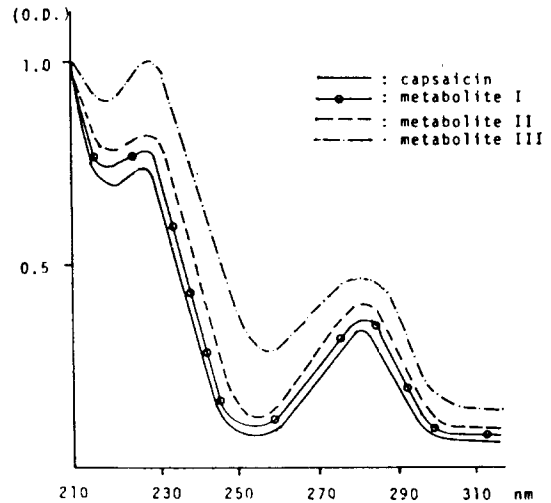


Fig. 1—A TLC of capsaicin-biodegradation by *Aspergillus nidulans*.

Time: fermentation period

Std. I (Std.): capsaicin

Std. II (cap-OH): ω -hydroxycapsaicin

Std. III (cba): N-vanillylcarbamoylbutyric acid

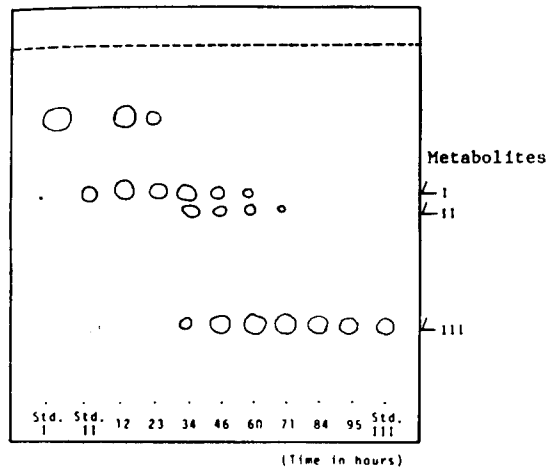


Fig. 2—UV spectra of capsaicin and its metabolites by *Aspergillus nidulans*.

분을 TLC로 분리 추출하여 그 U.V. spectrum을 측정된 것이며, Metabolite I, II, III이 기질과 마찬가지로 230, 281nm에서 최대흡수 peak를 나타내었다. 이는 vanillyl ring moiety에는 변화가 없고 side chain에만 변화가 생긴 것을 알 수 있다. 즉, ω -hydroxylation과 β -oxidation을 거쳐 side chain degradation이 일어난 것을

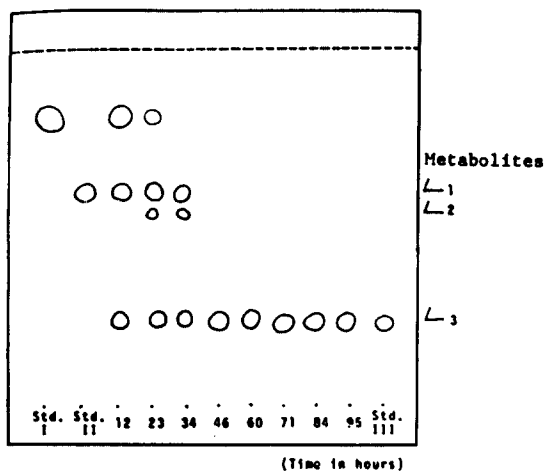


Fig. 3-A TLC of NVA-biodegradation by *Asp. nidulans*.

Time: fermentation period.

Std. I: NVA (nonoylvanillylamide)

Std. II: ω -hydroxy NVA

Std. III: N-vanillylcarbamoylebutyric acid

알 수 있다.

Metabolite I, II, III의 동정은 각각의 GC-mass chart를 문헌의 방법에 따라 전처리하여 얻고 표준품의 것과 비교하므로써 Metabolite I는 ω -hydroxycapsaicin, Metabolite II는 2-methyl-N-vanillylcarbamoyle-3(E)-octeroic acid, Metabolite III은 N-vanillylcarbamoylebutyric acid인 것을 확인하였다.

Fig. 3에 표시된 NVA의 Metabolite I, II, III의 U.V. spectra 역시 Fig. 2와 동일하였고, 이 중 Metabolite I는 ω -hydroxy-NVA, Metabolite III은 N-vanillylcarbamoylebutyric acid의 표준품과 동일한 GC-mass chart를 얻었다. Capsaicin의 대사경로, U.V. Spectrum, TLC profile 등으로 보아 Metabolite II는 N-vanillylcarbamoyleoctanoic acid라고 추정된다. Capsaicin과 NVA에 대하여 *A. niger* 및 *A. nidulans*와 동일한 대사경로를 밝을 균주는, *A. giganteus*, *A. fischeri*, *A. varicolor*, *A. unguis*, *A. flavipes*, *A. alliaecus*, *A. foetidus*, *A. lumchuensis*, *A. sclerotiorum*, *A. tamarisii*, *A. oryzae*, *A. kanagawaensis*, *A. ustus*, *A. avenaceus*, *Gliocadium roseum*, *P. javanicum*, *P. camemberti*, *P. expansum*, *P.*

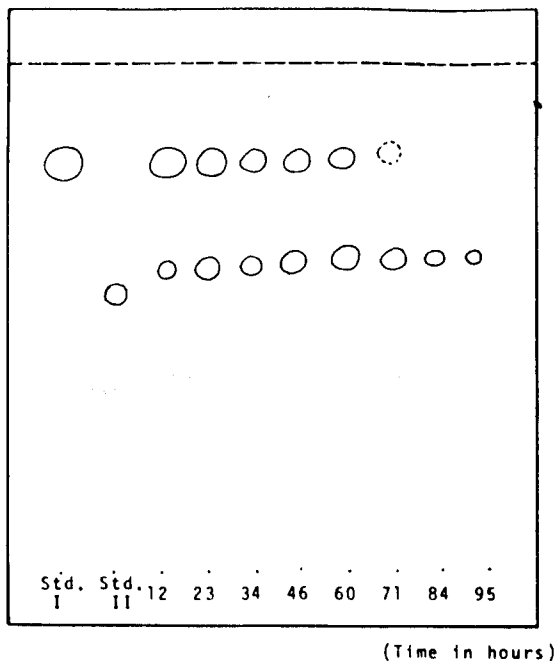


Fig. 4-A TLC of capsaicin-biodegradation by *Penicillium varioti*.

Time: fermentation period.

Std. I: capsaicin

Std. II: ω -hydroxycapsaicin

purpurogenum, *P. digitatum*, 고추착생진균(미분류) 중의 하나, *Paecilomyces varioti*, *Byssoclamys fulva*, *Conidiobolus sp.* 등이었다. 이와는 달리 둘째로는 *A. niger*에 의한 NVA대사물질 1보다 약간 높은 Rf치를 가지는 단일 spot 하나만을 대사물질로서 생성하는 경우로서, Fig. 4의 *Penicillium varioti*에 의한 capsaicin의 분해대사 pattern이다. NVA에 대해서도 같은 유형을 나타낸다. Capsaicin과 NVA의 각각의 대사산물의 U.V. spectra는 모두 capsaicin과 NVA와 같이 230, 281nm에서 최대흡수를 나타내므로 ring moiety에는 변화가 없고 side chain에 변화가 생긴 것을 알 수 있다.

이러한 유형의 예로서는, *Mycotypha microspora*, *Thamnidium elegans*, *Entomophthora apiculata* 및 고추착생 미분류진균의 하나에서 볼 수 있었다.

세번째로는, Fig. 5의 *Penicillium lanosocoeruleum*의 경우로서, *A. niger*에 의한 NVA 분해

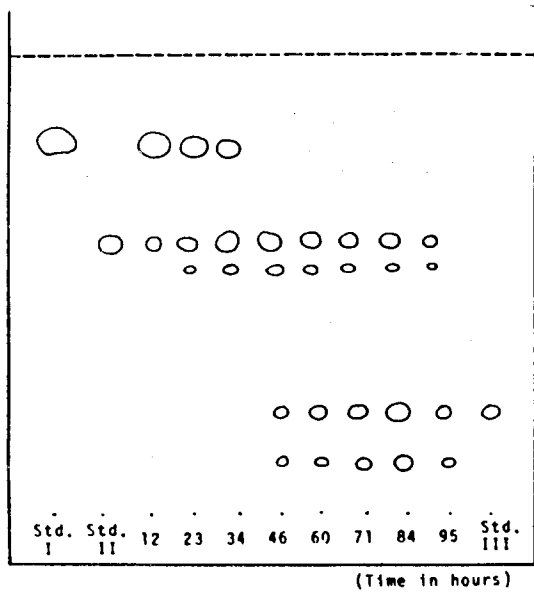


Fig. 5-A TLC of NVA-biodegradation by *Penicillium lanosocoeruleum*.

Time: fermentation period.

Std. I: NVA (nonoylvanyllamide)

Std. II: ω-hydroxy NVA

Std. III: N-vanyllylcarhamoylbutyric acid

대사산물 3개와 동일한 Rf 치를 갖는 분해산물이외에 3rd metabolite보다 더 낮은 Rf 치의 spot 하나를 더 가지는 분해대사 pattern이다.

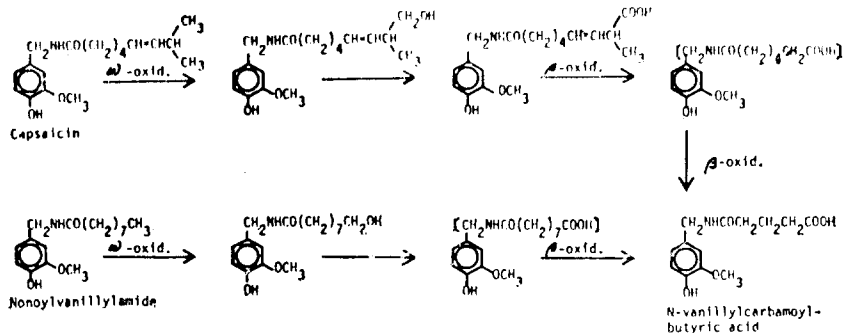
또한, *A. ochraceus*와 고추착생미분류진균 하나에 대해서는 12시간 단위로 행해진 실험에서 대사가 빨라서 TLC plate상에서 대사물을 확인할 수 없었다. 다시 12시간 이내에서 2시간 간격으로 동일한 조작을 행한 결과는 *A. niger*의 것과 동일한 chromatogram을 얻었다.

Capsaicinoid에 대한 미생물의 acid-amide 결합의 가수분해 효소작용의 보편성을 알기 위하여 Henneberg 배지를 사용하여 실험균주에 적용하여 보았다. Capsaicin과 NVA를 기질로 하여 *A. niger*, *A. nidulans* 그리고 고추착생미분류진균들에 대한 대사산물을 분석한 결과 수층추출물에서 vanillylamine을 검출하지 못하였고 ethylacetate 추출물에서는 capsaicin과 NVA가 그대로 남아 있어 Henneberg 배지에서는 capsaicinoid의 대사가 잘 이루어지지 않는 것으로 추정된다.

이상과 같은 실험결과를 종합하여 보면 시험균주 35종중 30종이 *A. niger*와 동일한 ω-hydroxylation과 β-oxidation의 과정을 밟는 것을 알 수 있다. 나머지 5종은 배양과정에서 먼저 축적되는 대사산물의 TLC상의 Rf치가 ω-hydroxy체보다 높으나 이 중 일부균은 배양시간 경과에 따라 Rf 치가 높은 대사산물이 N-vanyllylcarbamoylbutyric acid로 점차 전환된다. 이는 ω-2-hydroxylation후 β-oxidation으로 넘어가는 가능성을 암시하기도 한다.¹⁶⁾ Onozaki 등이 보고한 amide 결합의 가수분해과정은 고등동물의 경우와는 달리 예외적인 분해과정이라는 것이 Hennesberg의 medium을 사용한 실험으로 확인할 수 있었다. Capsaicinoid에 대한 vanillyl ring hydroxylation 역시 동물조직에서와 같은 ring hydroxylation 산물⁹⁾을 발견하지 못하였다.

결 론

Capsaicinoid에 대한 미생물대사과정은 실험동물에서 알려진 vanillyl ring 상의 hydroxylation



을 찾을 수 없었고, acid-amide 결합의 가수분해 역시 보편성이 있는 과정이라 생각할 수 없다. Capsaicinoid를 산화 분해할 수 있는 대부분의 진균류는 다음 Scheme과 같은 분해경로를 밟는 것으로 생각된다.

문 헌

- 1) Nelson, E.K. and Dowson, L.F.: *J. Am. Chem. Soc.* **45**, 2179 (1923).
- 2) Bennet, D.J. and Kirby, G.W.: *J. Chem. Soc. (C)* 442 (1968).
- 3) Lee, K.R., Suzuki, T., Kobashi, M., Hasegawa, K. and Iwai, K.: *J. Chromatography* **123**, 119 (1976).
- 4) Kim, K.H. and Lee, S.S.: *Seoul Univ. J. of Pharm. Sci.* **2**, 171 (1977).
- 5) Schneider *et al.*: *Am. J. Gastrology* **26**, 722 (1956).
- 6) Lee, S.O.: *Korean J. Intern. Med.* **6**, (1963).
- 7) LaHann, T.R.: *Method of Producing Analgesia.*, U.S. Pat. 4, 313, 958 (1982).
- 8) Burk, T.F., Buck, S.H. and Miller, M.S.: *Fed. Proceeding (United States)* **44**, 2531 (1985).
- 9) Lee, S.S. and Kumar, S.: *J. National Acad. Sci., R.O.K., Natural Sci. Ser.* **21**, 219 (1982).
- 10) Lee, S.S. and Surh, Y.J.: *J. Protein Chem.* **5**, 292 (1986).
- 11) Iwai, K. and Kawada, T.: *Agri. Biol. Chem.* **49** (2), 441 (1985).
- 12) Soh, Y.J. and Lee, S.S.: *Seoul Univ. J. of Pharm. Sci.* **11**, 1 (1986).
- 13) Onozaki, H., Sasaoka, K. and Ezaki, H.: *J. Ferment. Technol.* **54**, 297 (1976).
- 14) Lee, S.S.: *J. National Acad. Sci., R.O.K., Natural Sci. Ser.* **22**, 139 (1983).
- 15) Baldrige, R.C. and Lewis, H.B.: *J. Biol. Chem.* **202**, 169 (1953)
- 16) Ko, S.Y. and Lee, S.S.: Unpublished data.