

Antilipolytic Activity 를 보유하는 인삼 Oligopeptide 의 추출 및 정제

金秀一 · 羅志英 · 曹道鉉* · 李春寧**

서울대학교 농과대학 농화학과, *아주대학교 생물공학과, **경희대학교
(1987년 2월 3일 수리)

Extraction and Purification of Ginseng Oligopeptides with Antilipolytic Activities

Su-Il Kim, Jee-Yeong Na, Do-Hyun Jo* and Chun-Yung Lee**

Department of Agricultural chemistry, College of Agriculture, Seoul National University,
*A-Jou University, Suwon, **Kyung Hee University, Seoul, Korea

Abstract

To investigate ginseng oligopeptides with biological activities, the water extract was purified by ultra-filtration, gel filtration, ion-exchange and thin layer chromatography. Ultra-filtered water extract exhibited antilipolytic activity, inhibiting epinephrine-induced lipolysis in the isolated fat cells of rat epididymal adipose tissue. The filtrate was separated into 3 fractions by Sephadex G-25 gel filtration. Peptides were found only in the first fraction(S-FI). Saponine and sugars were also detected in the fraction. S-FI fraction resolved further into 6 fractions by Dowex 50 ion-exchange chromatography. The sugar and saponine depleted fraction(P-F2) from the second chromatography showed antilipolytic activity. The P-F2 fraction revealed 6 spots on TLC. The 6 spots were isolated by TLC and identified as peptides.

서 론

인삼의 다양한 효능이 경험적으로 인정되어¹⁾ 인간의 약재로 사용되어진 이후 약효 성분에 대한 연구는 주로 saponin을 중심으로 행해졌고 그외에 sapogenin, phenol 화합물, oligopeptide 및 기타 성분들에 대해서도 생리활성을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다.²⁾

동물의 oligopeptide 들은 신경 전달 물질인 hypothalamus-hypophysis hormone 및 상당수의 항생물 질로서 생리적 활성을 가지고 있는 것이 보고되고 있는 바, 인삼중에도 생리적 활성을 가지고 있는 oligopeptide 들이 존재할 가능성이 있으나 이들 peptide 에 관한 연구 보고는 극히 적다.

Gstirner³⁾는 인삼의 MeOH-H₂O(1:1) 추출물로부터 전기 영동으로 5개의 ninhydrin positive peptide 를 분리하여 이들 oligopeptide 의 amino 산 조성을 보고하였고 이⁴⁾ 등은 인삼중 2개의 peptide 를 TLC로 분리하여 amino 산 조성을 밝히고 있으나 생리활성에 대한 언급은 없었다.

근래에 이르러 인삼의 수용성 alcohol 추출물이 토끼의 혈당량을 감소시킨다는 Petkov의 보고⁵⁾와 인삼의 saponin이 adrenaline induced hyperglycemia를 감소시키는 것을 관찰하였다는 Takeuchi의 보고⁶⁾를 기초로 하여 Okuda 등^{7,8,9)}이 인삼의 물 추출액중 insulin과 같은 작용을 하는 물질로서 rat fat cell의 adrenaline-induced lipolysis를 강력히 저해하는 antilipolytic activity가 있는 것을 발견하고 그 물질을 분리 정제한 결과 산성

peptide 라는 것을 발표하였다.

이 insulin-like peptide는 14개의 amino 산으로 구성되어 있으며 Gstirner가 분리한 5개의 peptide 분획중 하나와 유사하다고 보고하고 있다. 그러나 이 peptide를 결정으로 얻지는 못하였으며, 그 정제 과정이 매우 복잡하고 saponin과 같은 glycoside들을 완전히 제거했는지에 대하여는 불분명하다.

본 연구는 인삼의 oligopeptide를 순수 분리 정제하여 그 이화학적 성질과 구체적인 약리 활성을 규명하기 위한 기초 실험으로써 인삼중 antilipolytic activity가 있는 oligopeptide를 중심으로 이들을 추출하고 정제하는 방법을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

인삼은 경기도 용인에서 구입한 85년도산 수삼 6년근으로 깨끗이 씻어 말린 후 80mesh로 분쇄하여 사용하였다.

Antilipolytic activity를 측정하기 위하여 사용한 동물은 Whiston종의 rat로서 서울대학교 동물사육장에서 제공된 4~5주령, 120~160g의 수컷이었다.

2. 실험 방법

1) Peptide의 추출

추출 용매는 BuOH-HOAc-H₂O(4:1:1, v/v) 혼합 용액이나 MeOH-H₂O(1:1, v/v) 용액, CHCl₃-MeOH-H₂O(8:4:3, v/v) 용액 및 H₂O 등 4가지를 사용했다.

백삼분말 1g과 각 용매 10ml를 2시간 동안 상온에서 진탕하여 추출하였고 이를 1000×g로 20분간 원심분리한 후 상등액을 peptide추출액으로 하였다.

2) Ultra-filtrate의 제조

백삼분말 200g을 물 1l와 함께 4°C에서 24시간 교반한 후 1000×g에서 30분간 원심분리하는 과정을 2회 반복하고 원심분리하여 얻은 상등액을 합쳐서 Amicon-hollow fiber(M.W. cut range 10,000)를 사용하여 ultra-filtration 하였다. ultra-filtrate는 냉동건조하여 보관하였다.

3) Antilipolytic activity의 측정

Rodbell¹⁰⁾의 방법에 따라 rat의 epididymal adipose tissue를 collagenase로 처리하여, fat cell을 분리한 후 fat cell suspension에 epinephrine 1μg,

trypsin inhibitor 1mg을 첨가하고 Krebs-Ringers' buffer¹¹⁾ 0.5ml를 가한 후 37°C에서 2시간동안 incubation 함으로써 lipolysis를 유도하였으며 방출된 유리 지방산은 Dole^{12, 13)}의 방법에 따라 추출하고 측정하였다.

Antilipolytic activity는 검체를 Krebs-Ringers' phosphate buffer 0.5ml에 녹인 것을 fat cell 혼합 용액에 함께 첨가하여 2시간동안 incubation 한 후 방출된 유리 지방산을 측정하여 조사하였으며 다음과 같이 % inhibition으로 나타내었다.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A : Epinephrine만 처리한 fat cell 용액의 적정시 소모된 1×10⁻³N NaOH의 ml수

B : Epinephrine과 검체를 함께 처리한 fat cell 용액의 적정시 소모된 1×10⁻³N NaOH의 ml수

4) Gel filtration chromatography

Sephadex G-25 column(1.2×120cm)은 0.2N acetic acid 용액을 사용하여 상법에 준하여 준비하였고 시료는 600mg을 동일 용액 600μl에 녹여 column에 주입한 후 시간당 14ml로 용출하였다. 용출액은 4ml씩 분획하여 fraction collector로 수집하고 280nm에서 흡광도를 측정하여 동일 peak의 분획들을 모두 모아 냉동건조하였다.

5) Ion-exchange chromatography^{14, 15, 16)}

Dowex 50 column(2.2×40cm)는 상법에 준하여 Dowex resin을 활성화시킨 후 pyridine acetic acid buffer(pH 3.1)에 평형시켜 준비하였다.

시료는 동일 buffer에 녹여 pH 2로 조정한다음 column에 주입한 후 pH 5.0 pyridine-acetic acid buffer를 사용하여 pH 3.1에서 pH 5.0까지 linear gradient로 용출하였다. 용출 속도는 1ml/min, 용출액은 5ml씩 분획하였다. 분획된 용출액은 filter paper에 점적한 후 0.2% ninhydrin 용액으로 발색하여 발색 정도를 보아 분리하였으며 또한 Lowry법에 의한 peptide 함량과 saponin 및 당에 대한 검정을 각 분획에 대하여 행하였다. 분리된 각 peak는 60°C에서 감압 농축한 후 냉동건조하였다.

6) Thin layer chromatography

TLC plate(20×20cm)는 Kiesel gel 60G로 0.5mm 두께로 제조하여 사용하였다. 전개 용매로는 1차 전개시는 BuOH-HOAc-H₂O(4:1:1)을 사

용하였고 2 차 전개 용매로는 phenol-H₂O(3 : 1, 0.5% HOAc 함유)을 사용하였다.

Peptide의 발색은 0.2% ninhydrin 용액(w/v)과 1% starch-iodine 용액(w/v)^{17,18)}을 병용하여 행하였다.

TLC에 의하여 전개된 peptide의 분리능 각 spot을 부위 별로 읽어내어 각각 시험관에 모은 후 BuOH-HOAc(4 : 1) 혼합 용액으로 추출하여 행하였다.

7) Saponin 및 carbohydrate의 검정

Saponin은 TLC한 후 3% CeSO₄ 용액¹⁹⁾을 분무하여 발색시키는 방법으로 검정하였고, carbohydrate 성분들은 filter paper에 시료를 점적한 후 AgNO₃-NaOH 방법²⁰⁾으로 검정하였다.

8) 일반 성분의 분석

시료의 총 질소는 AOAC(1980)²¹⁾의 micro-kjeldahl법에 의하여 정량하였으며 protein 및 peptide의 정량은 Lowry²²⁾등의 방법을 일부 수정하여 측정하였다. 환원당은 Somogyi-Nelson²³⁾법으로 정량하였고, 총당은 시료 용액을 pH 2로 조정하고 100°C water bath에서 20분간 가열하여 가수 분해한 후 유리된 환원당을 Somogyi-Nelson 법으로 측정하였다.

결과 및 고찰

1. Peptide의 추출

4 가지 solvent system을 사용하여 추출한 인삼 추출물을 TLC로 검정한 결과 chromatogram에 큰 차이가 없게 나타났다(Fig. 1).

따라서 각 solvent system에 의하여 추출된 peptide 및 유리 amino산 성분은 거의 같다고 추정하고 이후 peptide 추출을 위한 용매는 물을 사용하였다. 물을 인삼 추출 용매로서 사용하는 것은 이상에서와 같이 용매간에 선택적으로 추출하는 경향이 보이지 않고, 물은 추출용매 중 인삼 성분들의 회수율이 높은 것으로 보고된 바²⁴⁾ 있고 Okuda^{7,8,9)} 등의 생리 활성이 있는 물질이 물 추출액에서 분리된 것으로서 연구 보고되었기 때문이다.

물로 2회 반복 추출했을 경우 총 질소의 회수율은 32.4%였으며 냉동건조한 추출물의 질소함량은 5.5%, Lowry법에 의해 측정된 protein 함량은 10%로 나타났다.

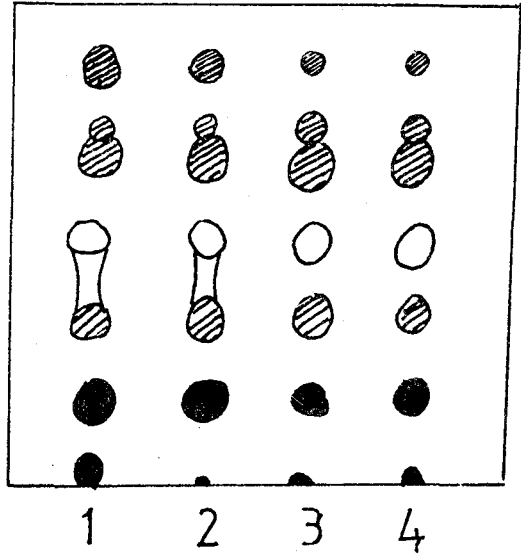


Fig. 1. Thin layer chromatogram of ginseng extracts with different solvent systems:
 1. water(25°C)
 2. BuOH-H₂O-CH₃COOH(4 : 1 : 1)
 3. MeOH-H₂O(1 : 1)
 4. CHCl₃-MeOH-H₂O(8 : 4 : 3)

2. Ultra-filtration

인삼의 물 추출액에서 부터 분자량이 10,000 이상인 고분자 물질을 제거하기 위하여 ultra-filtration한 결과 추출액 1,300ml로부터 778ml의 ultra-filtrate를 얻었으며 잔여물은 약 400ml였다. 추출물 및 ultra-filtrate, ultra-filtration 잔여물의 총질소 함량, 단백질 함량 및 합질소물의 수율은 Table 1에 나타내었다.

물 추출물은 단백질 함량이 10%가 되었으나, ultra-filtrate에는 3.3%로 낮아져서 많은 단백질이 제거되었음을 알 수 있었다. 또 ultra-filtrate는 총질소 함량이 건물중 6.4%인 반면 protein의 함량은 3.3% 이어서 물 추출물과 비교할 때 비단백질 질소 함유 성분이 훨씬 많이 존재하고 있는 것으로 나타났다. 총 질소 회수율은 50.1%, protein은 14.3%였다. 또한 물추출액과 ultra-filtrate 및 그 잔여물에 대하여 TCA와 acetone을 각각 10%, 50%의 농도가 되게 첨가하였을 때 ultra-filtrate를 제외한 용액들에만 침전이 형성되었으므로 ultra-filtrate에는 TCA와 acetone에 침전되는 분자량이 큰 protein은 제거되고 Lowry법에 의해 정량되는 oligopeptide들이 존재한다고 추정

Table 1. Contents of nitrogen containing compound

Sample	Total N (%, dry base)	Nitrogen recovery %	Protein (%, dry base)	Protein recovery %
Water extract	5.5	100	10	100
Ultra-filtrate	6.4	50.4	3.3	14.3
Residue	4.5	45.1	21.0	87.7

되었다.

3. Ultra-filtrate의 antilipolytic activity

Rat의 epididymal adipose tissue에서 분리한 fat cell에 epinephrine을 처리하여 유도된 lipolysis에 대한 ultra-filtrate의 영향은 Fig. 2에 나타내었다.

Epinephrine으로 fat cell내에 lipolysis를 유도시켜 방출되는 총 유리 지방산의 함량은 fat cell 1g 당 19.3 μ eq 이었고 ultra-filtrate를 처리할 경우 총 유리 지방산은 감소하는 것으로 나타났다. 즉 ultra-filtrate의 처리량이 증가함에 따라 유리 지방산의 방출이 비례적으로 감소하여 13%에서 20%의 저해 정도를 나타내었다. 이는 ultra-filtrate가 epinephrine으로 유도되는 fat cell의 lipolysis를 저해하는 활성을 가지고 있음을 확실하게 나타내는 것으로 이러한 antilipolytic activity는 insulin에서도 볼 수 있어 본 실험과 동일한 방법으로 Rodbell¹⁰⁾은 insulin이 lipolysis를 저해하는 작용이 있음을 보고하고 있다.

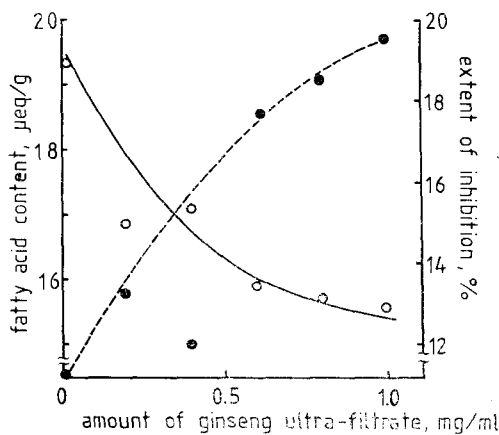


Fig. 2. Anti-lipolytic activity of ginseng ultra-filtrate

○—○ : Fatty acid content(μ eq/g fat cell)
●—● : Extent of inhibition(%)

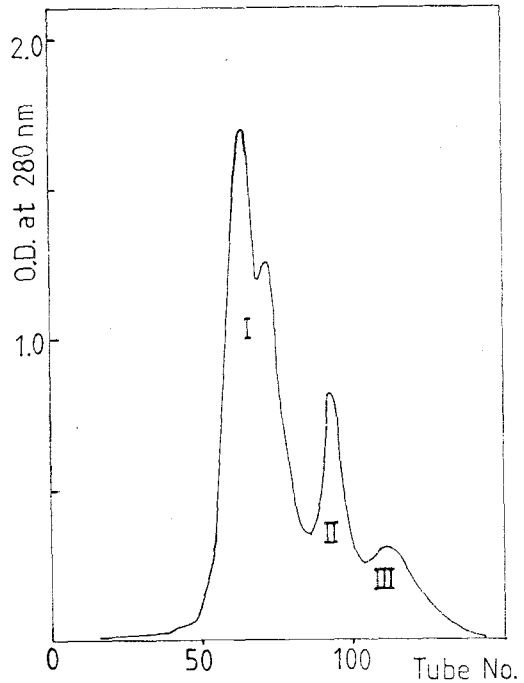


Fig. 3. Sephadex G-25 gel filtration chromatogram of ultra-filtrate

4. Peptide의 분리

1) Gel filtration chromatography

Ultra-filtrate는 Sephadex G-25 gel filtration에 의하여 3개의 peak로 분리되었으며(Fig. 3) 냉동 건조한 3개 fraction(S-FI, S-FII, S-FIII)을 TLC하여 발색한 결과 S-FI은 여러개의 spot으로 나타났고, S-FII, S-FIII는 각각 하나의 spot으로 나타났다(Fig. 4). Saponin과 당은 S-FI에서만 검출되었고, saponin 및 당은 검출되지 않은 S-FII, S-FIII가 peptide들인지 여부를 확인하기 위하여 각 fraction을 산 가수 분해한 후 TLC검정해 본 결과는 Fig. 5에 나타내었다.

TLC pattern을 비교해 보면 S-FII나 S-FIII가

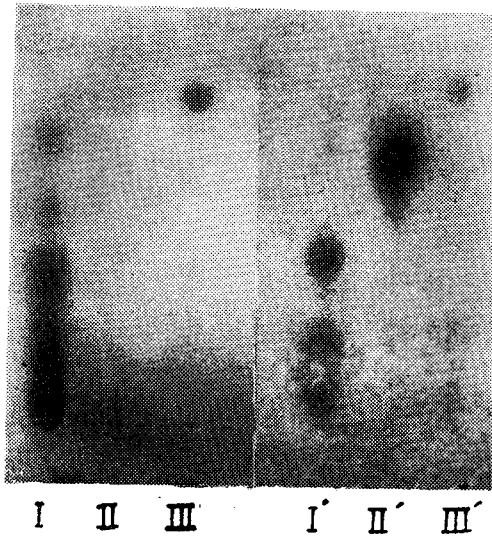


Fig. 4. Thin layer chromatogram of gel filtration fractions:

I, II, III : Layer sprayed with 0.2% ninhydrin solution
 I', II', III' : Layer sprayed with 1% starch-iodine solution

각각 단일 spot로서 가수 분해 전과 후가 동일하게 나타나서 적어도 이들은 peptide가 아닌 것으로 추정되었다.

2) Ion-exchange chromatography

S-FI 은 Dowex 50×2 ion-exchange chromatography 에 의하여 Table 2 에서와 같이 모두 6 개의 fraction(P-F1~P-F6)으로 나뉘었다. 각 분획물들은 용매에 포함된 pyridine 때문에 U.V 에 의한 O.D 는 측정할 수가 없어 분획물들의 ninhydrin 에 의한 발생 정도를 기준으로 분획하였다. ninhydrin 에 의해 발색된 분획물들은 모두 4 개의 fraction 으로 대별되었으며 발색하지 않은 분획물은 두 fraction 으로 P-F 3 와 P-F 5 였다(Table 2). 이들 fraction 에 대하여 Lowry 법에 의한 peptide 함량을 측정할 결과 P-F2 가 가장 함량이 높고 이외의 fraction 들은 1/10 정도로 대체로 낮았다. 또 saponin 과 당성분을 검정한 결과 첫번째 fraction 인 P-F1 에서만 모두 용출되었음을 알 수 있었다. 이들을 TLC 한 결과, P-F4 와 P-F6 가 한 spot 로 P-F1 은 2개, P-F2 는 5 개의 spot 로 나타났으며 P-F3 와 P-F5 도 희미하지만 1 개의 spot 가 나타났다(Fig. 6). P-F2 는 ninhydrin 발색 후 peptide

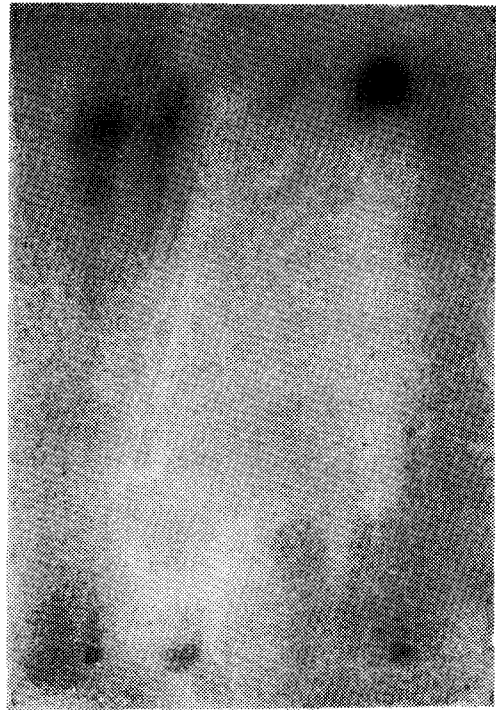


Fig. 5. Thin layer chromatogram of hydrolysates of S-FII, S-FIII.

II, III : S-FII, S-FIII
 II', III' : hydrolysates of S-FII, S-FIII

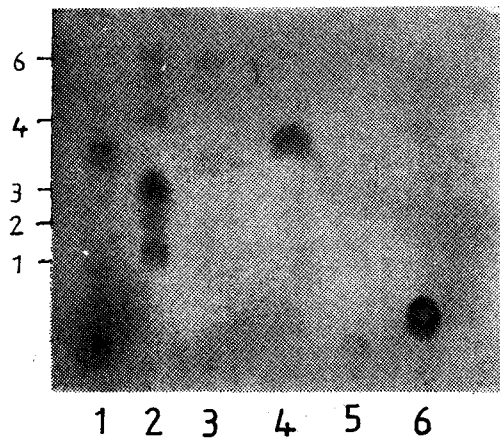


Fig. 6. Thin layer chromatogram of Dowex 50 cation exchange chromatography fractions ; Numbers : P-F1~P-F6

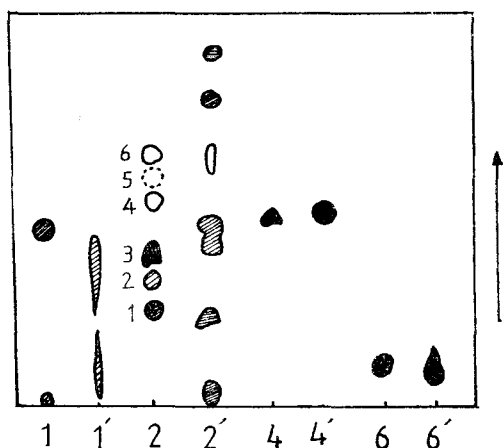


Fig. 7. Thin layer chromatogram of acid hydrolysates of ion-exchange fractions. 1', 2', 4', 6' : Acid hydrolysates of P-F1, P-F2, P-F4, P-F6

에 더 민감한 starch-iodine 발색 처리를 할 경우 spot 4와 6사이에 새로운 spot이 검출되었다(Fig. 7). 6개의 fraction 중 P-F3와 P-F5는 Lowry 반응 및 ninhydrin 반응이 거의 없어 더이상 실험하지 않았으며 나머지 4개 fraction(P-F1, 2, 4, 6)들에 peptide 성분이 존재하는지를 알기 위해 각각을 산 가수 분해하여 TLC한 후 가수 분해 전과 비교한 결과 뚜렷한 차이를 보인 것은 P-F2였으며 P-F4, 6는 변화가 없었고 P-F1은 tailing이 생겨 spot의 구분이 힘들었는데, 이는 P-F1에 존재하는 당과 saponin의 영향으로 보인다(Fig. 7). 따라서 peptide가 존재하는 주 fraction은 P-F2로 생각되었다. 이 peptide fraction이 ultra-filtrate에 존재하는 antilipolytic activity를 보유하고 있는지를 알기 위해 실험한 결과 68%의 저해 정도를 나타내어 anti-lipolytic activity를 가지고 있

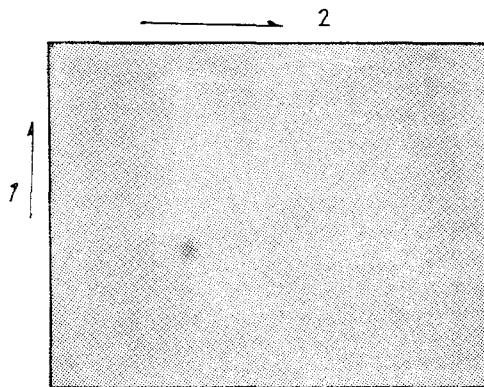


Fig. 8. 2-dimensional thin layer chromatogram of spot 3 of P-F2

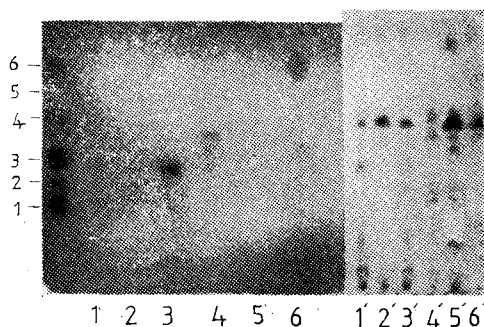


Fig. 9. Thin layer chromatogram of isolated each spot of P-F2 and its acid hydrolysates. 1', 2', 3', 4', 5', 6' : Acid hydrolysates

음이 확인되었다.

TLC에 의한 P-F2 peptide의 분리 및 확인 P-F2에 존재하는 각 peptide를 분리하고자 TLC로 전개한 후 나타난 각 spot를 끊어내고 추출하여 이들을 2차원 TLC로 검정한 결과 분리한 각각의

Table 2. Fractionation of S-FI on Sephadex G-25 by ion-exchange chromatography on Dowex 50 with pyridine-acetic acid buffer

	P-F1	P-F2	P-F3	P-F4	P-F5	P-F6
Tube No	9~13	17~43	45~57	59~73	75~91	93~130
Ninhydrin Rxn	++	+++	--	++	--	+++
Lowry Rxn*	0.020	0.160	0.00	0.010	0.003	0.001
Saponin	+	--	--	--	--	--
Carbohydrates	+	--	--	--	--	--

* O.D at 570nm

spot 는 하나로 나타났다(Fig. 8—spot 3의 2차 전개), 분리된 각 spot 들의 peptide 여부를 검정하기 위하여 산 가수 분해한 후 TLC 를 비교한 결과 spot 1, 4, 5 는 산 가수 분해에 의하여 4 개의 spot 로 spot 2, 3 은 5 개, spot 6 은 2 개로 나타나서 P-F2 에 있는 6 개 spot 는 모두 peptide 라고 추정할 수 있었다(Fig. 9).

분리된 6 개 peptide spot 는 순수한 한개의 peptide 라고는 단정할 수 없으므로 HPLC 등을 이용하여 순수성 검정 및 순수 분리를 시도하여야겠고 또한 순수 분리한 peptide 중 어떤 것이 antilipolytic activity 가 있는지에 대하여도 계속 실험해야 할 것으로 생각된다.

요 약

인삼 성분중 생리적 활성을 가지고 있는 oligopeptide 를 검출하고 분리하기 위하여 물 추출액을 ultra-filtration 한 후 gel filtration, ion-exchange chromatography 및 thin layer chromatography 등을 행하였다. 인삼 물 추출액으로부터 고분자 물질을 제거한 ultra-filtrate 는 epinephrine 에 의해 유도된 fat cell 의 lipolysis 를 저해하는 antilipolytic activity 를 보유하고 있었으며 Sephadex G-25 gel filtration 에 의해 3 개 fraction 으로 나뉘어졌다. 이중 첫번째 fraction(S-FI)만이 peptide 성분을 함유하고 있었으며 saponin 및 당도 검출되었다. S-FI fraction 은 Dowex 50×2 ion-exchange chromatography 에 의하여 6 개의 fraction (P-F1~P-F6)으로 분리되었고 TLC 검정 결과 P-F2 fraction 이 peptide fraction 으로 antilipolytic 를 보유하고 있었으며 TLC 로 분리한 6 개 spot 는 각각 가수 분해한 전후의 TLC pattern 을 비교해 본 결과 모두 oligopeptide 임이 밝혀졌다. S-FI fraction 에 존재한 saponine 과 당은 P-F1 fraction 에서 모두 용출되었다.

사 의

본 연구는 한국 과학 재단의 지원을 받아 수행되었습니다.

참 고 문 헌

1. 금춘병 : 인삼사 제 5 권 '인삼의 약론' 사문각 (1971).
2. 배효원 : 생화학 뉴스 : 57 (1985).
3. Gstivner F. and Vogt, H.J.: Arch. Pharm. 299 : 936 (1966).
4. 이정근 : 건국대학교 학술지 22 : 23 (1978).
5. Petkov, W.: Araneim. Forsch(Drug Res.) 11 : 288 (1961).
6. Takeuchi: UDC(The Report of the Ministry of Education of Japanese Government): 615, 34 (1966).
7. Okuda, H. and Sekiya, K.: Proc. Symp. WAKAN-YAKU 14 : 133(1981).
8. Okuda, H. and Yoshida, R.: Preceed. 3ed Inter. Gins. Symp.: 53 (1980).
9. Okuda, H. and Ando, T.: Planta Medica 38: 18 (1980).
10. Rodbell, M.: J. Biol. Chem. 239 : 375 (1964).
11. Lawrence, J.C.: J. Biol. Chem. 259 : 7975 (1984).
12. Dole, V.P.: J. Clinic. Invest. 35 : 150(1956).
13. Dole, V.P. and Meinertz, H.: J. Biol. Chem. 235 : 2595 (1960).
14. Schroeder, W.A.: Meth. Enz. 11 : 203 (1967)
15. Schroeder, W.A. and Jones, R.T.: Anal. Chem. 34 : 1570 (1962).
16. Moore, S. and Stein, W.H.: J. Biol. Chem: 893 (1954).
17. Mazur, R.H. and Ellis, B.W. and Cammarata, P.S.: J. Biol. Chem. 237(5) : 1619 (1962)
18. Touchstone, J.C.: In 'Thin Layer Chromatography' Wiley-Interscience Pub. (1981).
19. 조성환 : 한국 농화학회지 19(4) : 233 (1976).
20. Dawson, M.C.: In 'Data for Biochemical Research', 3ed Ed., Oxford Univ. Press, (1986).
21. A.O.A.C.: mikrokjeldahl method, 13rd ed.: 858 (1980).
22. Somogyi, M.: Biol. Chem. 195 : 19 (1952).
23. Nelson, N.: Biol. Chem. 153 : 375 (1944).
24. Gstirner, F. and Braur, W.: Arch. Pharm. 296(6) : 384[C.A. 59 : 8543e (German)]