

도둣놈의 갈고리의 지질분해효소 저해물질의 정제 및 특성

이종국 · 강민구* · 백승예* · 안용근** · †이종수*

충남 농업기술원, *배재대학교 생명유전공학과, **충청대학 식품영양학부

Purification and Characterization of Lipase Inhibitor from *Desmodium oxyphyllum* DC.

Jong-Kug Lee, Min-Gu Kang*, Seung-Ye Baek*, Young-Geun Ahn** and †Jong-Soo Lee*

Chungnam Agricultural Research and Extension Services, Yesan 340-861, Korea

*Dept. of Life Science and Genetic Engineering, Paichai University, Daejeon 302-735, Korea

**Faculty of Food Nutrition, Chungcheong University, Cheongwon 363-792, Korea

Abstract

A lipase inhibitor from *Desmodium oxyphyllum* DC. was purified by methanol extraction, systematic solvent extraction, silica gel column chromatography, C₁₈ solid phase extraction chromatography and RP-HPLC. We obtained the purified lipase inhibitor with 182 ng(IC₅₀) of lipase inhibitory activity for a 0.06% yield. Its molecular weight was estimated to be 655.37 Da from an instrumental analysis of MALDI-TOF-MS and it was identified copper-3,5-dibromo-2-hydroxybenzoic acid (C₁₄H₈Br₂CuO₆) by ¹H, ¹³C NMR analysis.

Key words: lipase inhibitor, *Desmodium oxyphyllum* DC., purification

서 론

비만은 인류의 건강을 위협하는 가장 큰 요인 중의 하나로 주목되고 있다(Taubes G 2000). 비만을 억제하는 방법의 하나인 lipase 저해제로는 지금까지 phosphatidyl choline, 콩 단백질과 tannin과 같은 천연 물질들이 알려져 있고(Wang & Huang 1984; Lee 등 2010), 미생물 기원의 lipase 저해제로는 *Streptomyces toxytricini*로부터 Orlistat(Xenical)이 개발되어 일부가 비만 치료 보조제로써 응용되고 있다(Bray 등 1999). 그러나 이들 lipase 저해제들의 활성이 산업적으로 응용하기에는 매우 낮다.

따라서 본 연구자들은 72.5%의 lipase 저해활성을 가진 상 황버섯 자실체로부터 lipase 저해제의 추출 최적 조건(Lee 등 2010)과 이들의 정제 및 특성에 관하여 보고하였다(Lee 등 2010). 또한 전보(Lee 등 2011)에서는 447종의 약용 식물들의 추출물을 제조한 후, 이들의 lipase 저해 활성을 측정하여 lipase 저해 활성이 높은 도둣놈의 갈고리(*Desmodium oxyphyllum* DC.)

를 최종 선별하였고, 이들의 대량 추출 조건을 검토하여 보고 하였다. 본 연구에서는 도둣놈의 갈고리 추출물 중의 lipase 저해 물질을 유기용매 계통 추출과 HPLC 등으로 정제하여 산업적 응용 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 도둣놈의 갈고리와 시약

본 연구에서 사용한 도둣놈의 갈고리(*D. oxyphyllum* DC.)는 2009년도에 충남농업기술원 생약 자원 재배장에서 재배된 것을 채취하여 동결 건조한 후 분쇄하여 20 mesh 표준체로 쳐서 시료로 사용하였다. Porcine pancreatic lipase(Type II)와 bathocuproine(2'9-dimethyl-4'7-diphenyl-1,10-phenanthroline) 등은 Sigma-Aldrich Co.(USA) 제품을 사용하였고, 조제용 HPLC와 분석용 HPLC 용매는 Burdick & Jackson(Muskegon, USA) 제품을 사용하였으며, 그 외에 사용된 시약은 모두 시판 특급

† Corresponding author: Jong-Soo Lee, Dept. of Life Science and Genetic Engineering, Paichai University, Daejeon 302-735, Korea. Tel: +82-42-520-5388, Fax: +82-42-520-5388, E-mail: biotech8@pcu.ac.kr

시약을 사용하였다.

실리카 겔 컬럼은 SnapCartridge KP-SIL 컬럼(Biotage Co. USA)을 사용하였고, 역상 컬럼은 SnapCartridge KP-C₁₈-HS column, 제조용 HPLC 컬럼은 역상 컬럼인 Optimapak C₁₈ column (250×21.2 mm), 분석용 HPLC 컬럼은 Xbridge C₁₈ 컬럼(Waters, Co.)을 사용하였다. 또한, 박층 크로마토그래피(TLC)용 pre-coated 실리카 겔 plates 60 F₂₅₄(0.25 mm)와 ODS RP-18 F_{254s} (25DC-Platten 5×10 cm)는 Merck사(Darmstadt, Germany) 제품을 사용하였다. 실험에 사용한 HPLC는 Water사(USA)의 조제용 액체 크로마토그래피(Water Delta 600, 2987 UV detector)와 분석용 액체 크로마토그래피(Alliance 2695 & 2998 PDA detector)를 사용하였고, 정제물질의 확인 및 동정에는 MALDI-TOF-MS (Bruker Ultraflex III, USA)와 NMR(Unity Plus 300, Varian Co. USA) 등을 사용하였다.

2. Lipase 저해활성 측정

Lipase의 저해활성은 Bitou 등(1999)과 Zapf 등(1981)의 방법을 일부 변형시켜 전보(Lee 등 2010; Lee 등 2011)와 같이, triolein으로부터 생성되는 oleic acid를 측정하여 저해활성을 산출하였다.

3. Lipase 저해물질의 정제 및 특성

도둑놈의 갈고리 건조 분말 시료 3 kg을 95% methanol 24 l로 24시간씩 2회 추출한 후 여지(Whatman No.2)로 여과하고 감압 농축하여 추출물 217.2 g을 제조한 다음, 다음과 같이 정제하였다.

먼저, 도둑놈의 갈고리의 메탄올 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물로 극성에 따라 극성이 낮은 용매에서부터 극성이 높은 용매로 순차적으로 계통분획하였다. 용매 계통추출에서 lipase 저해활성이 높은 에틸아세테이트 분획 층을 농축하여, 헥산:클로로포름(CH₃Cl)=3:2 용매로 녹인 후 실리카 겔 50 g을 넣고 감압 농축하여 1차 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하였다. 즉, SnapCartridge Kp-sil 340 g을 실리카 겔 컬럼(71×252 mm, Biotage, USA)을 사용하여 헥산:클로로포름=3:2 용매로 평형 시킨 후 시료를 주입하여(헥산:클로로포름=3:2)-메탄올 용매계로 메탄올의 농도를 5~95%까지 단계별로 흘려주면서 분당 30 ml 유속으로 분획하여 300 ml씩 60개 분획을 얻었다. 각 분획을 1 ml씩 취하여 질소를 불어넣어 건조한 후 80% 메탄올을 1 ml로 용해하고 lipase 활성을 측정하였다. 1차 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 분리된 활성 분획을 모아 감압 농축한 후, SnapCartridge KP-C₁₈-HS 25 g 컬럼(31×130 mm, Biotage) 2개를 수직으로 연결한 컬럼에 주입하여 물과 아세트니트릴로 C₁₈ solid phase extraction chromatography를 실시

하였으며, 10%에서 시작하여 아세트니트릴 농도를 50%까지 분당 15 ml의 유속으로 기울기 용출하여, 100개 분획하였다. 다시, C₁₈ solid phase extraction chromatography로 분리된 활성 분획을 모아 감압농축한 후, 제조용 HPLC와 분석용 HPLC를 2회 반복 실시하여 단일물질을 얻었다. 정제물질의 주요 특성으로 MALDI-TOF-MS(Bruker Ultraflex III, USA, Matrix: CHCA)를 이용하여 정제물질의 분자량을 측정하였고, CD₃OD를 용매로 ¹H NMR 분광분석, ¹³C NMR 분광분석을 실시하여 정제물질의 구조를 동정하였다.

결과 및 고찰

1. 도둑놈의 갈고리로부터 Lipase 저해물질의 정제

도둑놈의 갈고리(*D. oxyphyllum* DC.) 메탄올 추출물 중의 lipase 저해물질을 유기용매 계통 추출을 실시한 결과, 수율은 물 층이 41.9%로 가장 높았으나 lipase 저해활성은 에틸아세테이트 추출층에서 81.1%로 가장 높았고, 부탄올 추출층 75.5%, 클로로포름 추출층 50.4%와 마지막 수용액 층에서 47.7%의 저해활성을 보였다.

활성이 가장 높은 에틸아세테이트 활성분획 농축물을 C₁₈ solid phase extraction chromatography와 2차 역상 조제용 HPLC 크로마토그래피 및 역상 분석용 HPLC를 실시하여 최종적으로 RT 16.0분에서 분획된, 순수 정제된 lipase 저해 물질을 0.06% 수율로 얻었다(Fig. 1). 이 정제물질의 lipase 저해활성은 IC₅₀ 182 ng이었고, 정제 전 메탄올 추출물(IC₅₀ 3870 ng)에 대하여 약 21.3배 정제되었다. 이 결과들은 상황버섯 사실체 중의 lipase 저해 물질이 최종 저해활성 IC₅₀ 175 ng으로 0.25% 수율로 정제되었다는 Lee 등(2010)의 결과와 비교했을 때 저해활성은 비슷하였으나 수율이 매우 낮았다. 한편, 이 도둑놈

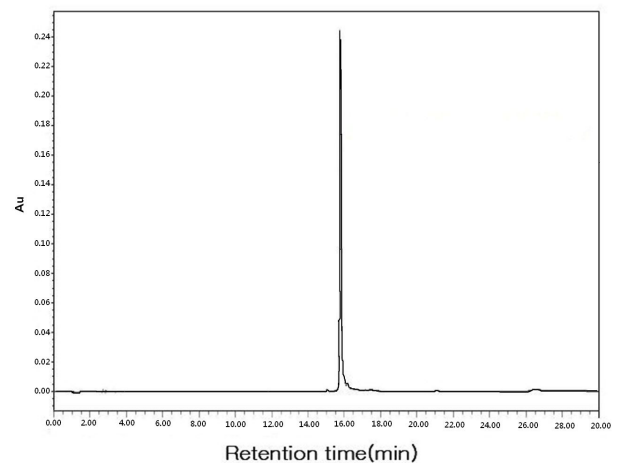


Fig. 1. The HPLC chromatogram of the purified lipase inhibitor from active fraction(H₅).

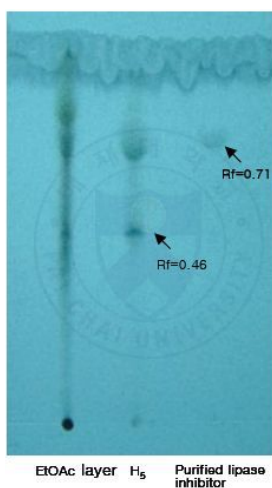


Fig. 2. Thin layer chromatogram of the purified lipase inhibitor from *Desmodium oxyphyllum* DC extract.¹⁾

¹⁾ Eluent ; water : acetonitril(1:1)

의 갈고리로 부터 순수 정제된 물질을 역상 박층 크로마토그래피를 실시한 결과, Fig. 2와 같이 Rf값이 0.71인 단일물질로 나타나, 순수한 정제물질임을 확인하였다.

2. 정제된 Lipase 저해물질의 특성

도독놈의 갈고리로 부터 정제된 lipase 저해물질은 Fig. 3과 같이 분자량이 655.37 Da이었고, copper-3,5-dibromo-2-hydroxybenzoic acid(C₁₄H₈Br₂CuO₆)로 최종 추정되었으나, 보다 정확한 동정을 위해 추가적인 기기분석이 요구된다(Fig. 4, 5). 또한 정제된 lipase 저해물질은 흰색 분말로 물에는 100%, 메탄올에 95%가 녹았고, 최대 흡수 파장은 265.4 nm이었으며, 347.7 nm에서도 높은 흡수 파장을 가지는 스펙트럼을 보였다. 이 결과들은

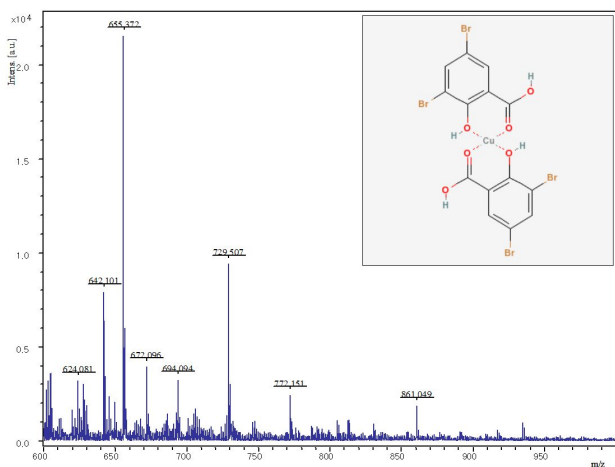


Fig. 3. MALDI-TOF-MS of the purified lipase inhibitor from *Desmodium oxyphyllum* DC.(Inner circle: C₁₄H₈Br₂CuO₆).

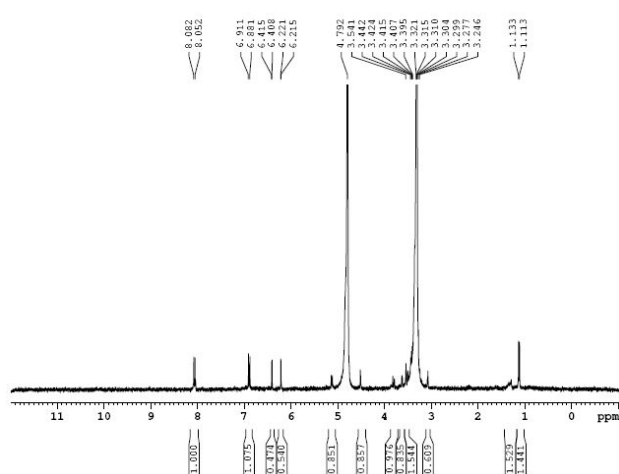


Fig. 4. The ¹H NMR spectrum of the lipase inhibitor from *Desmodium oxyphyllum* DC.(CD₃OD, 300 MHz, 20 °C).

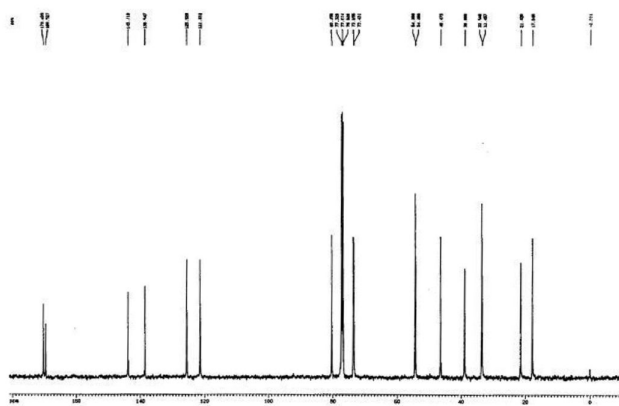


Fig. 5. The ¹³C NMR spectrum of the lipase inhibitor from *Desmodium oxyphyllum* DC.

상황버섯 자실체로부터 정제된 lipase 저해제의 분자량(523.06 Da)보다 컸을 뿐 용해도 등 여타의 성질은 비슷하였다(Lee 등 2010).

도독놈의 갈고리로부터 정제된 lipase 저해물질을 상업적으로 시판되고 있는 lipase 저해물질인 Orlistat와 농도별로 저해활성을 비교하였다. 시판 Orlistat는 1.0 μg/ml와 10.0 μg/ml에서 83.2%와 85.3%의 높은 lipase 저해활성을 보인 반면, 도독놈의 갈고리로부터 정제된 lipase 저해물질은 10.0 μg/ml에서 67.4%의 lipase 저해활성을 보였다(data not shown). 비록 도독놈의 갈고리에 함유되어 있는 lipase 저해 물질이 상업적으로 이용되고 있는 Orlistat보다 낮은 lipase 저해활성을 갖고 있지만, 도독놈의 갈고리가 이미 안전성이 검증된 약용식물 이므로 건강식품이나 대체 의학의 소재로는 산업적 응용성이 있는 것으로 판단된다.

요약 및 결론

본 연구에서는 식물로부터 도독놈의 갈고리에 함유되어 있는 lipase 저해 물질을 건강식품산업에 응용하고자 도독놈의 갈고리(*D. oxyphyllum* DC.)의 메탄올 추출물을 계통 용매 추출하고, 활성분획인 에틸아세테이트 추출물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피와 HPLC를 실시하여 최종적으로 IC₅₀ 182 ng의 lipase 저해활성을 가진 정제된 lipase 저해 물질을 0.06% 수율로 얻었다. 이 정제된 lipase 저해물질의 분자량은 655.37 Da 이었고, copper-3,5-dibromo-2-hydroxybenzoic acid(C₁₄H₈Br₄CuO₆)로 추정되었으며, 물과 메탄올에 각각 100%와 95%가 용해되었다.

참고문헌

- Bitou N, Nimomiya M, Tsjita T, Okuda H. 1999. Screening of lipase inhibitors from marine algae. *Lipids* 34:441-445
- Bray GA, Blackburn GL, Ferguson JM, Greenway FL, Jain AK, Mendel CM, Mendels J, Ryan D, Schwartz SL, Scheinbaum ML, Seation TB. 1999. Sibutramine produces dose -related weight loss. *Obesity Research* 7:189-198
- Lee JK, Jang JH, Lee JS. 2011. Screening of a new anti-obesity lipase inhibitor- containing plant and optimal extraction conditions of the lipase inhibitor. *Korea J Food & Nutrition* (Submitted)
- Lee JK, Jang JH, Lee JT, Lee JS. 2010. Extraction and characteristics of anti-obesity lipase inhibitor from *Phellinus linteus*. *Mycobiol* 38:52-57
- Lee JK, Song JH, Lee JS. 2010 Purification of anti-obesity lipase inhibitor from the fruiting body of *Phellinus linteus*. *Mycobiol* 38:57-61
- Taubes G. 2000. Weight increases worldwide. *Science* 280:1368
- Wang SM, Huang AHC. 1984. Inhibitors of lipase activities in soybean and other oil seeds. *Plant Physiol* 76:929-934
- Zapf J, Schoenle E, Waldvogel M, Sand M and Froesch ER. 1981. Effect of trypsin treatment of rat adipocyte on biological effects and binding of insuline and insuline-like growth factors. *Eur J Biochem* 133:605-609

접 수 : 2011년 4월 18일
 최종수정 : 2011년 6월 15일
 채 택 : 2011년 7월 15일