

잎담배 성분중 갈색고분자 물질의 분리정제 및 열분해에 관한 연구

채 쾌 · 박 지 창

한국연초연구소 식연과학부

(1980. 2. 10 접수)

The Isolation and Pyrolysis of the Brown Pigmented Macromolecule from the Cured Leaf Tobacco

Quae Chae and Ji-Chang Park

Division of Smoking and Health,
Korea-Tobacco Research Institute,
Seoul, Korea

(Received Feb. 10, 1980)

초 록

전조잎담배로부터 단백질로 간주되는 고분자 물질의 gel filtration column chromatography (Sephadex G-75), 투석 그리고 흡착 chromatography의 일종인 brushite column chromatography 분리를 시도한 결과, 짙은 갈색의 고분자 물질을 얻었다.

Sephadex column에 의한 분리 profile를 보면 분자량이 상이한 두종류의 갈색고분자 물질이 존재함을 확인하였고 brushite column의 분리 profile에 의하면 분자의 전자구조가 다른 두종류의 고분자가 있음이 나타났다. Burley와 Hicks의 경우 단백질 분해효소에 의한 분해효과를 측정해본 결과, 가장 큰 분해효과를 보인 효소는 chymotrypsin으로 Burley에서 16-30% 수준까지 분해현상을 나타내 주었으며 Hicks인 경우 38-57%까지 감소현상을 보여 주었다.

Pepsin처리효과는 chymotrypsin처리구와 비슷한 수준을 보였으나 trypsin경우는 매우 낮은 분해현상을 나타냈다. 단백질 분해효소로 처리된 시료의 sephadex column분리 profile을 살펴보면, 분자량이 보다 큰 fraction의 경우 peak가 거의 완전하게 사라짐을 관찰할 수 있으나, 작은 분자량peak는 약간의 감소현상만을 보여 주었다.

투석후의 갈색 고분자물질을 300°C에서 연소시킨 경우, 연소전에 관찰할 수 없었던 강한 형광성 물질이 생성되었는데 TLC에 의한 분리후, 이 형광성 물질의 흡수 스펙트라를 측정해 본 결과, 최대흡수 파장이 265, 275nm (benzene용매)로 나타났으며 스펙트럼의 모양이 polynuclear aromatic hydrocarbon (PAH) 계열 화합물의 것과 유사함을 보여 주었다.

Abstract

Gel filtration column chromatography (Sephadex G-75), dialysis and Brushite column chromatography were carried out to separate the brown pigmented macromolecule from water extracts of the cured leaf tobaccos.

The two distinct macromolecules having different molecular weight were separated by the Sephadex column chromatography. Brushite also separated two different species of macromolecules which might have different electronic structures.

According to the enzymatic degradation of protein in Burley and Hicks, chymotrypsin showed the best degradation ratio, i.e., 16—30% in Burley and 38—57% in Hicks.

Similar effect was observed with pepsin. However, very low effect of degradation was revealed with trypsin.

The sample treated with the proteolytic enzymes revealed the disappearance of the first peak and the slight decrease of the 2nd peak height in the separation profile of Sephadex.

After dialysis, the brown pigmented macromolecule was pyrolyzed at 300°C and the strongly fluorescent components not identified before pyrolysis were detected with TLC separation.

Absorption spectrum of these fluorescent compounds was monitored in benzene and the absorption maxima at 265nm and 275 nm were obtained. Considering absorption maxima and shape of the spectrum, those fluorescent compounds seem to be PAH derivatives.

서론

미건조 잎담배로부터 분리되는 단백질에는 Fraction 1 Protein과 Fraction 2 Protein의 두가지 다른 성질의 단백질들이 있는데 Fraction 1 Protein은 건조과정에서 단백질 분해효소에 의거 거의 분해되어 자유 아미노산이나 저분자의 peptide로 바뀌나 Fraction 2 Protein은 분해되지 않은 상태로 남아있게 된다(1).

미건조엽에서 Fraction 1 Protein을 분리정제하는 방법은 Kawashima(2-3) 등에 의하여 보고된바 있는데 건조엽에서 Fraction 2 Protein을 순수하게 분리정제하는 방법은 잘 정립되어 있지 않은 상태이다.

이물질의 분리정제에 있어 큰 난점은 이 단백질의 산화반응으로 생성된 진한 갈색의 고분자 물질의 제거문제이다. 최근에 Bailey(4) 등이 특수건기 영동장치를 이용하여 이 갈색 고분자 물

질과 Fraction 2 Protein의 분리에 성공하였으나 아직도 이 방법은 여러가지 실용적인 문제점을 많이 가지고 있다. 갈색고분자 물질의 확실한 분자구조는 밝혀져 있지않고 있으나, 그 구성 성분은 chlorogenic acid, glucose, iron, protein, alkaloid 등의 복합체로 되어 있으며 분자량은 2,000에서 100,000정도로 다양하다고 보고되어 있다(5). 이와같은 갈색고분자 물질과 순수한 단백질이 건조 잎담배중에 약 6% 정도 함유되어 있는데(6) 이물질들이 열분해 될때 상당량의 질소함유 유해가스를 발생시키고 (7-8) 담배취미를 저하시켜 담배품질과는 역상관 관계에 있다는 사실이 보고되어 있다(9). 이 고분자 물질들의 흡연시 열분해산물에 관한 동정 및 생물학적 활성도 연구를 위하여 현재까지 많은 model system의 열분해연구가 진행되어 왔

L-serine(10), sulfur-containing amino acid (11), tryptophan(12), β -alanine(13), glutamine(14),

그리고 proline(14) 등 많은 자유아미노산의 열분해 연구가 수행되었는데 그 주요 열분해 산물로 는 질소함유 heterocyclic 화합물을 비롯하여 암모니아, 시안화수소등 주요 유해성 물질들이 생성되고 있다.

모델단백질로 albumin, globulin, casein 등을 사용하여 550°C에서 열분해시켰을 경우 Salmonella typhimurium TA 98에 mutagenic activity를 나타내는 2-amino-9H-pyrido [2,3-b]-indole 과 3-amino-1-methyl-5H-pyrido [4,3-b]indole 등 질소함유 heterocyclic 화합물이 생성되었다(15).

본 연구에서는 추출분리된 이 갈색 고분자 물질의 열분해 산물을 동정하기 위한 정성적인 시험이 실시되었다.

실 험

1. 시료 및 시약

잎담배로는 1978년산 Burley(남원산) 1종과 황색종 3종(Hicks(청주), BY-4(대전) 및 Va 115(영월))의 후엽 1,5등을 사용하였다.

Wiley mill (Arthur H. Thomas Co. Standard Model No. 3)을 이용 각각의 잎담배를 분쇄시킨후 polyethylene통에 밀봉, 보관하여 사용하였다. 단백질 분해 효소들은 Sigma 회사제품으로 chymotrypsin(1,560u/g), trypsin(2,000u/g), pepsin(10,000E/g) 3종을 더 이상 정제치 않고 사용하였다.

Sephadex G-75는 Pharmacia회사제품을 이용하였으며 silica gel G는 Merck회사제품을 사용하였다. 기타 solvent와 chemical들은 Merck사와 Kanto회사제품으로 더 이상 정제하지 않고 사용하였다.

Brushite는 Chae등이 사용한 방법(16)을 이용 제조하였다.

2. 실험 방법

-전질소 및 단백질 질소함량 측정:

전질소는 Kjeldahl방법으로 정량하였고 단백질

질 질소함량은 5% trichloroacetic acid 로 단백질을 침전시킨후 Gaines의 방법(17)을 이용, 정량 분석하였다.

단백질 분해효소처리 및 분해효과 측정:

잎담배 분말시료를 효소별로 각각 다른 buffer 용액에 넣은후 적정 pH로 맞추어 주고 농도별로 효소침가를 하였으며 37°C에서 6시간 incubation시켰다. 효소별로 사용한 buffer 및 pH는 다음과 같다.

Chymotrypsin은 tris buffer(pH 8.0), trypsin은 phosphate buffer(pH 7.5) 그리고 pepsin의 경우는 Clark and Lubs buffer(pH 1.9)를 각각 사용하였다.

Incubation 후 단백질의 함량은 Gaines 방법(17)을 이용 정량하였다.

갈색 고분자 물질의 분리:

phosphate buffer(pH7.0)로 추출된 갈색용액 으로부터 고분자 물질의 분리는 Bailey 등의 방법(18)을 이용하여 dialysis와 gel filtration 시켜 얻었다. 이물질의 분리 profile은 2개 흡수과장(280nm와 550nm)에서 흡광도를 측정하여 작성하였다.

열분해:

0.6g의 갈색 고분자 물질을 pyrex tube에 넣고 vacuum sealing하여 ampule을 만든 다음 electric muffle furnace에서 300°C로 1시간 동안 가열하였다(19). 열분해 산물의 분획별 채취는 Kato등(20)이 사용한 방법에 의하여 실시하였다. 산성, 중성, 염기성분획중 중성분획을 농축시킨후, TLC에 의한 분리를 시도하였다. 현단계에서 현저한 성분간의 분리는 성공치 못하였다. 전개된 sample중 강한 형광성물질이 꼬리를 달고 전개되었다.

이 형광성 물질을 benzene으로 추출된 다음 Cary 17D를 이용, 흡수스펙트럼을 측정하였다.

결과 및 고찰

Table 1은 네가지 다른 품종 잎담배의 후엽

Table 1. Percentage of total nitrogen and protein nitrogen of the tobacco leaves

Varieties	Area	Grade	Total N%	Protein N%
Burley	Nam-Won	H 1	3.61±0.06*	1.86±0.03*
		H 5	3.69±0.09	2.58±0.09
HS	Cheong Ju	H 1	1.75±0.10	1.40±0.02
		H 5	2.30±0.10	1.75±0.09
BY4	Dae-Jeon	H 1	1.64±0.06	1.33±0.03
		H 5	1.87±0.05	1.55±0.05
Va 115	Yeong Wol	H 1	1.22±0.07	0.99±0.06
		H 5	1.54±0.05	1.29±0.07

* : SD=Standard Deviation

1등과 5등의 전질소 함량과 단백질 질소함량을 정량한 결과이다. Burley의 경우 황색종과 비교하여 현저하게 이들 함량이 높음을 알 수 있고 황색종중에서는 청주산 Hicks의 경우가 다른 품종보다 약간 높은 함량을 보여주었다. 또한 전질소 함량과 단백질 질소함량간의 상관 관계를 보면 대체적으로 선형 함수관계에 있음을 알 수 있다.

Gaines의 분석결과(17)와 비교할 경우 Burley 내 전질소 및 단백질 질소함량은 비슷한 값을 보여주었으나 1978년산 황색종의 단백질 함량은 다소 높은 편이었다. 아마도 질소 비료의 사용량 증가로 인한 것이 아닌가 사려된다. 단백질분해 효소에 의한 분해효과를 측정하기 위하여 가장 단백질 질소함량이 많은 품종인 Burley후엽 5등과 황색종의 대표적인 품종인 Hicks 5등을 선발하여 세가지 다른 분해효소들 즉 pepsin, chymotrypsin, trypsin에 의한 농도별 처리를 실시한 결과, Table 2와 같은 값을 얻었다.

Trypsin처리구는 Burley나 Hicks 모두 분해효과를 나타내지 못하였으며, 특히 Burley의 경우보다 낮은 분해효과를 보였다.

Pepsin처리구는 Burley의 경우 16-38%, Hicks인 경우는 37-58%의 높은 수준까지 분해효과를 보여 주었다.

Chymotrypsin처리구도 역시 높은 분해효과를 보여주어 Burley의 경우 24-30%, Hicks의 경

Table 2. Determination of protein nitrogen contents after proteolytic enzyme treatments

		Burley		H S	
Total nitrogen %		3.69		2.30	
Protein nitrogen %		2.58 ^a		1.75	
Pepsin	4.8 × 10 ⁻⁵ M	2.18 ^b	84.4 ^c	1.10	62.9
	7.3 × 10 ⁻⁵	1.88	72.9	0.92	52.6
	14.5 × 10 ⁻⁵	1.59	61.6	0.74	42.3
	2.9 × 10 ⁻⁴	1.85	71.7	0.89	50.8
Chymotrypsin	1 × 10 ⁻⁴	2.21	85.6	1.09	62.3
	2 × 10 ⁻⁴	1.80	69.8	0.76	43.4
	4 × 10 ⁻⁴	2.06	79.8	0.88	50.3
Trypsin	1.04 × 10 ⁻⁴	2.58	100	1.75	100
	2.08 × 10 ⁻⁴	2.45	94.9	1.43	81.7
	4.16 × 10 ⁻⁴	2.53	98.0	1.56	89.1

enzyme activity : Pepsin : 10,000E/g

Chymotrypsin : 1,560U/g

Trypsin : 2,000U/g

b : protein N after enzyme treatment

c : b/a

우 38-57%수준까지 단백질을 분해시켰음을 알 수 있다. 물론 여기에서 구체적인 분해 양상은 기술할 수 없으나, 한가지 명확한 점은 trichloroacetic acid처리에 의해 침전이 생성되지 않을 정도의 small peptide 또는 free amino acid로 분해되었다는 것이다. 또한 같은 효소를 사용하였을 경우라도, Burley와 Hicks에서 다른 분해효과를 보인것은 이 두품종의 단백질에서 구성 아미노산 성분이 서로 상이하며 아미노산 결합 순서가 상이함을 시사한다.

효소의 농도별 처리과정에서 pepsin 처리구인 경우, 그 농도가 1.45 × 10⁻⁴M일때 Burley와 Hicks 모두 가장 효과적인 분해현상을 나타내고 있다(Fig. 1). Hicks의 경우는 58%, Burley는 38% 분해율을 보였는데 같은 실험조건에서 Hicks는 Burley보다 20%정도 더 많이 분해효과를 보여주었다. 이러한 차이는 Carugno 실험 (21)결과로 밝혀진 바와 같이 담배 품종간의 아미노산구성 성분 및 결합순서의 차이때문일 것이다.

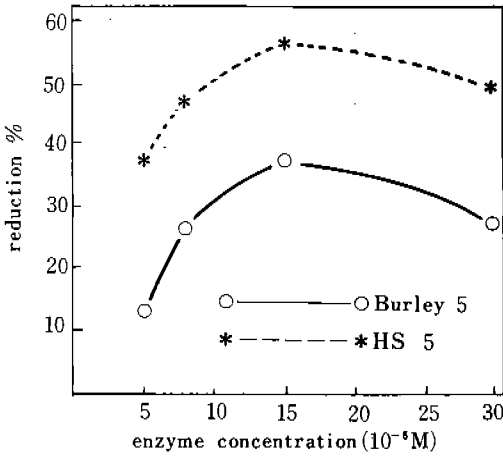


Fig. 1. Reduction % of protein nitrogen contents as a function of pepsin concentrations.

이러한 현상은 chymotrypsin 처리구의 경우도 마찬가지였다 (Fig. 2).

Fig. 1, 2에서 보는 바와 같이 효소의 농도가 증가하면 분해효과가 증가하다가, 다시 감소하는 현상을 나타내는데, 아마도 감소하기 시작하는 이유는 효소자체의 첨가효과와 포화 효과에 의한 것으로 사려된다.

실제로 효소를 첨가하여 incubation 할 때 앞담배 자체 단백질량과 첨가효소의 양(최대농도 즉 pepsin : $2.9 \times 10^{-4}M$, chymotrypsin : $4 \times 10^{-4}M$)을 무게비로 계산해 보면 Burley의 경우 7.25% (pepsin) 과 6.31% (chymotrypsin) 이었다.

이 값은 Fig. 1, 2에서 최적 분해효소 농도일 때 단백질 분해율과 최대효소농도일 때 분해율과의 차이와 거의 일치하는 값을 보여주고 있다.

현 단계에서는 어느 효소에 의해 얼마만큼의 단백질이 분해되는가 하는 실험적인 시험만이 실시되었으나, 장차 이와같은 결과의 응용으로 immobilized enzyme system을 개발하여 산업에 응용할 수 있는 실용연구가 진행되어야 할 것이다. 또한 이렇게 단백질을 분해시켰을 경우 생성되는 질소 함유 유해성분 함량은 어떻게 달라질 것이며 낫미는 어떻게 달라질 것인지에 관한 연구도 계속되어야 할 것이다.

Fig. 3은 앞담배내에 존재하는 단백질을 분리하기 위한 gel filtration (Sephadex G-75) co-

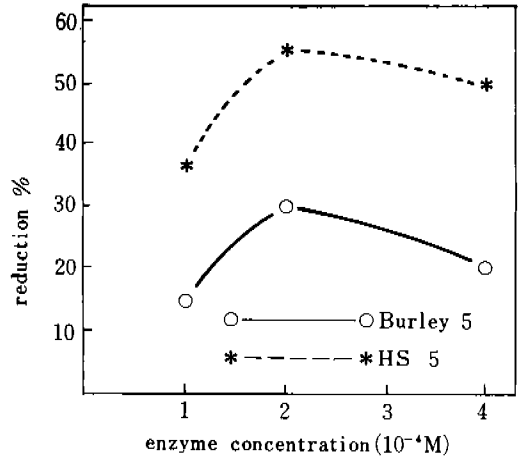


Fig. 2. Reduction % of protein nitrogen contents as a function of chymotrypsin concentrations.

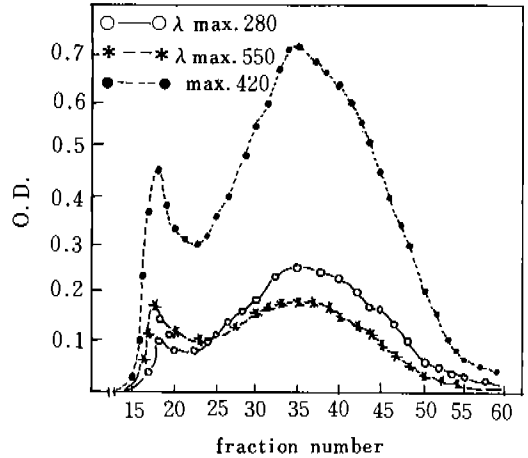


Fig. 3. Elution profile of the brown pigmented macromolecules with Sephadex G-75 column chromatography.

lumn chromatography의 분리모양인데, 이 그림에서 보면 분자량이 상이한 두종류의 고분자물질이 있음을 시사한다.

분리모양이나 peak크기로 보아 분자량이 큰 고분자 물질이 분자량이 적은 것보다는 소량 존재함을 알 수 있다. 이때 column을 통과하고 나오는 용액의 색깔은 진한 갈색으로 이물질이 순수한 단백질만은 아니고 어떤 다른 화합물들이 어떤종류의 화학결합을 하고 부착되어 있는 macromolecular complex인 것임에 틀림없다.

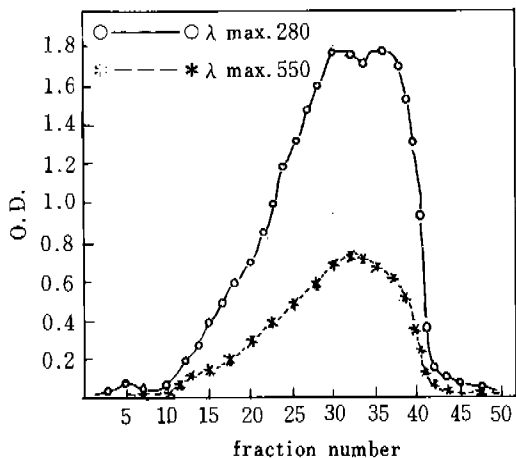


Fig. 4. Elution profile of the brown pigmented macromolecules incubated in chymotrypsin buffer ($2 \times 10^{-4}M$) with Sephadex G-75 column chromatography.

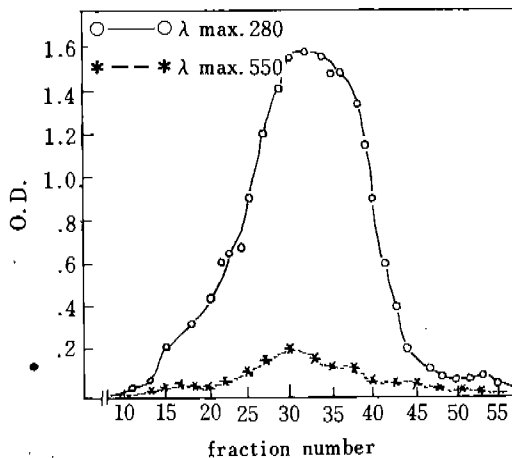


Fig. 5. Elution profile of the brown pigmented macromolecules incubated in pepsin buffer ($1.45 \times 10^{-4}M$) with Sephadex G-75 column chromatography.

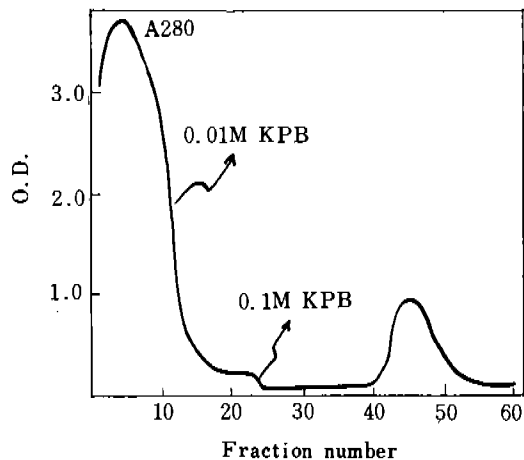


Fig. 6. Elution profile of brown pigmented macromolecule after dialysis with 0.01M (pH 7.3) and 0.1M KPB (pH 7.3). Brushite column size: $2.2 \times 31cm$.

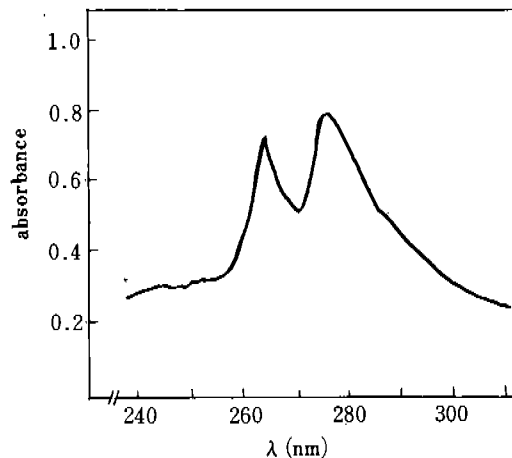


Fig. 7. Absorption spectrum of the fluorescent components in benzene after TLC separation.

Fig. 4,5는 효소(pepsin, chymotrypsin) 처리후의 sample을 column에 loading하고 그 분리모양을 추적하였던바, 첫번째 peak가 거의 사라짐을 볼 수 있었고 두번째 peak도 절대 O.D를 비교하면 상당량 감소하였다. 그림에 표현된 O.D는 dilution배수가 다른 관계로 다르게 나타나 있다. 이와같은 profile을 검토해 볼때 상당량의 단백질이 분해되어 저분자의 polypeptide나 free amino acid로 된다는 사실을 직시할 수 있는 것

이다.

또한 Sephadex column에 의해 분리된 fraction중 main peak에 해당하는 부분을 채취하여 adsorption column chromatography 일종인 brushite에 넣고 분리를 시도해본 결과, 그 분리모양을 보면 low ionic strength와 high ionic strength영역에서 각각 단백질이 분리됨을 보았다(Fig. 6).

이는 분자량이 큰 고분자 물질이라도 그 전

자분포가 다른 2 종류의 물질로 구성되어 있음을 알 수 있다.

물론 이 전자분포가 단백질에 의한 것인지, 아니면 단백질에 결합되어 있는 다른 어떤 구성성분의 전자분포 차이에 의한 것인지는 더 연구하여 보아야 할 것이다. 그러면 이 분리된 고분자 물질이 열분해하여 어떤 물질로 바뀌겠는가 관심의 대상인데 이를 위하여 dialysis 과정을 마친 sample을 300°C에서 가열, 열분해 시켜 보았다.

이와같이 열분해된 smoke중 neutral fraction 만을 채취하여 TLC에 의한 분리를 시도하였다.

우선, 열분해전에 전혀 보이지 않던 강한 형광이 열분해 산물로부터 발생되고 있는 사실인데, 본 시험에서는 구체적이고 정확하게 이물질을 동정할 수는 없었으나 그 흡광 스펙트럼을 측정해 보니 Fig. 7에 나타난 바와 같았다. 이 spectrum의 모양이나 최대흡광 파장을 볼때 질소함유 heterocyclic 화합물의 것과 유사함을 알 수 있다.

차기 시험에서는 이 형광물질의 보다 구체적인 분리정제 및 동정연구가 진행되어야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. Donald W. De Jong and Jess J. Lam, Jr., Proc. Am. Chem. Soc. Sym., 173rd, 78 (1977).
2. Kawashima, N., and Wildman, S. G., Ann. Rev. Plant physiol., 21 : 325 (1970).
3. Kawashima, N. and Wildman, S. G., Biochem. Biophysics Acta., 229 : 240 (1971).
4. Bailey, D. G. and Schepartz, A. I., J. Agric. Food Chem., 25 : 1432 (1977).
5. The Chemistry of Tobacco and Tobacco Smoke, Edited by Irwon Schmeltz, PP. 32-33 (1972).
6. Engell, C. R., Symposium Volume of 30th Tobacco Chemist Research Conference, Nashville, Tennessee (1976).
7. Chortyk, O. T., Schlotzhauer, W. S. and Stedman, R. L., Beitr. Tabakforschung, 3 : 422 (1966).
8. Tso, T. C. and Chaplin, J. F., USDA Technical Bulletin No. 1551, P. 135 (1977).
9. Gaines, T. P. and Miles, J. D., J. Agric. Food Chem., 23 (4): 690 (1975).
10. Kato, S., Kurata, T. and Ishitsjka, R., Agr. Biol. Chem., 34 : 1826 (1970).
11. Kato, S., Kurata, T., Ishiguro, S. and Fujiusaki M., Agr. Biol. Chem., 37 : 1759 (1973).
12. Kato, S., Kurata, T. and Fujimaki, M., Agric. Biol. Chem. 35 : 2106 (1971).
13. Ratcliff, M. A., Medley, E. E. and Simmonds, P. G., J. Org. Chem., 39: 1481 (1974).
14. Charles, R. G., Symposium Volume of 30th Tobacco Chemist Research Conference, Nashville, Tennessee, PP. 426 (1976).
15. Yoshida, D., Nishigata, H. and Matsumoto, T., Agric. Biol. Chem. 43 : 1769 (1979).
16. Chae, Q., Ph. D. Dissertation, Texas Tech. University (1977).
17. Gaines, T. P., Tob. Sci., 19 : 31 (1975).
18. Bailey, D. G. and Schepartz, A. I., Tob. Sic., 18 : 145 (1974).
19. Breitbart, D. and Nawar, W. W., J. Agric. Food Chem., 27 (3) : 511 (1979).
20. Kato, S. and Kurata, R., Agric. Biol. Chem., 34 (12) : 1826 (1970).
21. Carugno, N., Neri, M. and Lionetti, G., Beitr. Tabackforschung, 7 : 222 (1974).