

피망고추 (*Capsicum annuum* Lin.) 중의 조(粗) Lipase Activator 의 분리와 그 특성

김 병 목

중앙대학교 식품가공학과

Separation and Properties of Crude Lipase Activator from Green Pepper, *Capsicum annuum* Lin.

Byung-Mook Kim

Department of Food Science & Technology, Chung-Ang University, Seoul

Abstract

Crude lipase activator (L.Activator) was extracted with 0.85 M NaCl solution from green pepper, *Capsicum annuum* Lin. and then fractionated by 0.2 saturation with ammonium sulfate. The activity of crude L.Activator preparation ($OD_{280} = 1.0$) had proportional relation with its added amounts below 1.0 ml. The L.Activator showed optimum temperature at 35°C. The L.Activator was very stable at the temperatures below 50°C and at pH range of 7~9, and its activities also remained 60% even at 100°C, 72% at pH 3, and 85% at pH 10, respectively. The activities of L.Activator decreased by most metal ions besides Na^+ , Mg^{++} , and Ca^{++} . The decreasing effects of heavy metal ions such as Ag^+ and Hg^{++} on L.Activator activity were not, however, so great as compared with the commonly known great effects of them on most enzyme activity. Crude L.Activator was separated into 4 peaks by the cellulofine column chromatography and the main active peak of L.Activator seemed to be contained in the same components as those of the activatory peak from crude L.Inhibitor.

Key words: green pepper, lipase activator, lipase inhibitor, properties.

서 론

피망고추 (*Capsicum annuum* Lin.)는 가지과에 속하는 채소로서 매운 맛이 없고 단맛이 있으며 초록색을 띤 과채를 이용하기 때문에 흔히 sweet pepper 또는 green pepper 로 불리워지고 있다.

피망고추는 비타민 A 와 C, 각종 무기질 등이 풍부하여 서양에서는 오래전부터 샐러드나 튀김 등 여러 가지 요리에 많이 쓰여져 왔으며 요즘은 우리나라에서도 많이 보급되어 널리 이용되고 있다.

그러나 근래에 와서 피망고추에 지방질 분해효소 (lipase)의 작용을 저해하는 단백질물질 lipase inhibitor(이하 L. Inhibitor 라 부름)가 함유되어 있음이 발견되면서⁽¹⁾ 식품영양학 및 생화학적인 면에서 많은 관심의 대상이 되어 왔다.

이 L. Inhibitor 에 대해서는 이미 ammonium

Corresponding author: Byung-Mook Kim, Department of Food Science & Technology, Chung-Ang University, 40-1 NaeRi, DaeDuk-Myun, AnSung-Gun, KyungGi-Do, 456-830, Korea

sulfate fractionation, DEAE-cellulose chromatography, gel filtration through Sephadex G-75, 열처리 등의 방법에 의해서 순수분리 정제되었고 물리, 화학적 특성과 효소화학적 특성도 밝혀진 바 있다⁽²⁾. 그런데 위의 연구에서 한 가지 흥미로운 것은 이 L. Inhibitor 가 정제되지 못한 상태에 있을 때 극히 낮은 농도 ($OD_{280} < 0.4$) 하에서는 오히려 lipase 활성을 증대시키는 효과를 나타내며, 정제된 이후에는 이러한 효과가 사라지는 현상이 발견된 것이다.

이 점에 대해서는 그간 피망고추 중에 L. Inhibitor 이외에 또 다른 lipase activator(이하 L. Activator 라 부름)가 혼재되어 있을 가능성이 여러 가지로 고려되어 왔다. 최근 필자는 ammonium sulfate fractionation, cellulofine GC-700m chromatography 방법 등에 의하여 피망고추 추출물에서 L. Activator 를 분리할 수 있었다.

따라서 본 연구에서는 우선 조(粗) L. Activator 를 분리하여 그의 특성을 조사하고 이것이 L. Inhibitor 와 어떤 관계를 가지고 있는가를 검토한 바 몇 가지 흥

미로운 결과를 얻었으므로 여기에 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 피망고추(*Capsicum annuum* Lin.)는 1988 봄 서울근교에서 수확된 것을 사용하였. Pancreatic lipase는 Tokyo Kasei Co., Japan 제품으로 bovine에서 얻어진 것이었으며 효소활성은 60 units/mg이었다. 기질로서는 tributyrin(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan 제품)을 사용하였다. Cellulofine GC-700m는 Chitso Chemicals, Ltd., Japan 제품을 사용하였고 기타 화학약품은 모두 특급시약을 사용하였다.

L. Activator의 추출

피망고추를 물에 잘 씻어 꼭지를 제거한 후 동량의 0.85 M NaCl와 함께 mixer로 파쇄한 다음 4°C 썬에서 하룻밤 추출하였다. 추출물은 가-제로 착즙한 후 0°C에서 8000×g로 15분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 L. Activator 추출액으로서 사용하였다.

L. Activator의 분리

L. Activator 추출액을 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 1.0 포화 ammonium sulfate로 분획한 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 0.2획분에서 L. Activator 활성이 주로 측정되었으므로 이 0.2획분을 취하여 4°C에서 탈이온수에 2일간 투석시킨 후 0°C에서 8000×g로 15분간 원심분리하여 생성된 침전물을 제거한 다음 상등액을 조(粗) L. Activator 로서 사용하였다.

Lipase의 활성측정

Pancreatic lipase의 활성측정은 Funatsu *et al.* Table 1. Relative activities of lipase influenced by ammonium sulfate fractions of green pepper extracts

Fractions*	Relative activity (%)
Control	100.0
0.2	198.6
0.4	72.4
0.6	65.5
0.8	80.5
1.0	81.3

* OD₂₈₀=1.0의 농도를 가진 각 획분(1.0 ml)을 사용했음

법⁽³⁾에 의하여 실시하였다. 즉 0.5 M KCl 1.0 ml, 5×10⁻³ M CaCl₂ 1.0 ml, enzyme 용액(60 units/ml) 0.5 ml, H₂O 7.3 ml의 혼합액을 35°C에서 10분간 가온한 후 tributyrin 0.2 ml를 넣어 다시 15분간 반응시킨 다음 100°C에서 2분간 끓여 효소작용을 정지시키고 생성된 fatty acid를 0.05 N NaOH로 phenolphthalein을 지시약으로 하여 적정함으로써 효소활성을 측정하였다.

효소역가는 매분당 기질 중의 ester 결합 1 micromole을 가수분해하는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

L. Activator의 활성측정

L. Activator의 활성은 0.5 ml의 L. Activator를 효소반응액 9.5 ml에 넣고 반응시켰을 때의 효소활성을 측정하여 L. Activator를 넣지 않았을 때의 효소활성과의 차이를 백분율로 하여 상대역가를 계산함으로써 측정하였다.

L. Activator의 specific activity는 pancreatic lipase의 활성을 150% 증가(A₁₅₀)시키는 L. Activator의 단백질농도(OD₂₈₀)의 역수로 나타내었고 total activity는 total OD₂₈₀×specific activity로서 나타내었다.

L. Inhibitor의 조제 및 활성측정

김 등의 방법⁽⁴⁾에 따라 ammonium sulfate 0.6-1.0 포화분획에 의하여 조제하였으며 효소반응액에 L. Inhibitor를 일정시간 작용시킨 후 남은 효소활성을 측정함으로써 L. Inhibitor의 활성을 측정하였다.

Cellulofine GC-700m column chromatography

Cellulofine GC-700m을 0.01 M Na-phosphate 완충액(pH 7.0)으로 평형시킨 후 충전시켜 만든 1.6×100 cm column에 시료 2.4 ml(OD₂₈₀=156.0)를 주입시키고 같은 완충액을 사용하여 25 ml/h의 유속으로 5 ml씩 분취하여 chromatography 하였다.

당분의 확인분석

당분은 Phenol-sulfuric acid 법⁽⁴⁾으로 측정하였다. 즉 시료용액 1.0 ml에 5% phenol 1.0 ml를 넣고 c-H₂SO₄ 5 ml를 속히 가하여 잘 섞고 20°C 수욕 중에서 20분간 보존한 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

RNA의 확인분석

시료 중에 함유되어 있는 RNA는 Ogur and Rosen 법⁽⁵⁾에 의하여 확인하였다. 즉 일정량의 시료용액에 15% perchloric acid를 가하여 pH 1.0으로 맞추고 생성된 침전물을 원심분리하여 얻은 후 여기에 0.5 N perchloric acid 4ml를 가하고 4°C에서 20분간 처리하여 RNA를 추출한 다음 260 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Lipid의 확인분석

시료 중에 지방질이 함유되어 있는지는 Folch *et al.*⁽⁶⁾법에 의하여 시료를 chloroform-methanol (2:1)로 처리하여 지방질을 추출한 후 지방추출물을 증발접시상에서 증발건고(乾固)시켜 용매를 제거한 다음 소량의 증류수로 현탁시킨 후 지방질의 정성반응⁽⁷⁾, 즉 acrolein 반응(중성지질), ninhydrin 반응(아미노지질), molybdenum 반응(인지질) 및 알카리 적정(지방산) 등에 의하여 lipid 확인분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

L. Activator 추출액의 ammonium sulfate 분획

L. Activator 추출액에 ammonium sulfate를 첨가하여 0.2 포화시킨 후 생성된 침전물을 0°C, 8000×g에서 15분간 원심분리하여 0.2회분으로서 따로 모은 다음 상등액에 다시 ammonium sulfate를 추가하여 0.4포화시켜 위와 동일한 방법으로 0.4회분을 얻고 이어서 같은 요령으로 0.6, 0.8 및 1.0회분을 각각 얻었다. 이렇게 분획된 각 회분을 탈이온수에 투석시켜 L. Activator 활성을 측정한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같이 L. Activator 활성은 0.2회분에서만 검출되었다. 따라서 이 0.2회분을 모아 조(粗) L. Activator로서 사용하였다.

L. Activator의 첨가량과 효소활성과의 관계

효소반응액에 L. Activator 용액(OD₂₈₀=1.0)을 0.0-2.0ml 범위안에서 각각 달리 첨가하여 효소활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같이 1.0ml까지는 L. Activator의 첨가량에 비례해서 효소활성이 증대되었으나 그 이상의 첨가에서는 크게 증대되지 않았다.

L. Activator의 열의존성

효소반응액에 L. Activator 용액 0.5ml를 첨가한 것(A)과 첨가하지 아니한 것(B)을 각각 4, 20, 35,

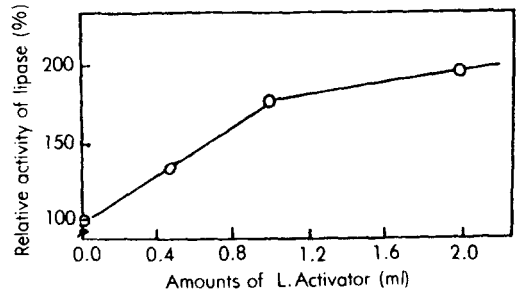


Fig. 1. Relation between the amount of L. Activator and the activity of lipase. The protein concentration (OD₂₈₀) of L. Activator was 1.0

50, 60, 80 및 100°C에서 반응시켜 활성을 측정한 후 (A)-(B)로서 계산하여 L. Activator의 열의존성을 검토한 바 Fig. 2에서 보는 바와 같이 L. Activator는 35°C에서 최적온도를 나타내고 있다.

L. Activator의 열안정성

L. Activator 용액을 각각 4, 20, 35, 50, 60, 80 및 100°C에 30분간 방치한 후 활성을 측정한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 L. Activator는 50°C 이하의 온도에서 안정하였으며 80°C에서 80%, 100°C에서 60% 정도의 활성이 잔존되었다. 이는 조 L. Inhibitor의 경우⁽¹⁾ 50°C 이하의 온도에서 큰 안정성을

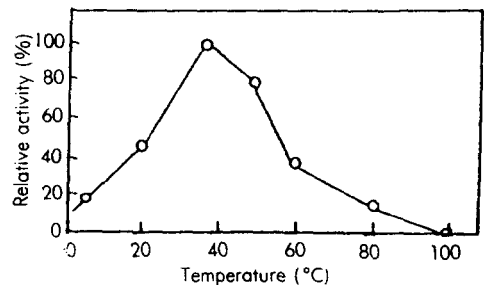


Fig. 2. Thermal dependence of L. Activator

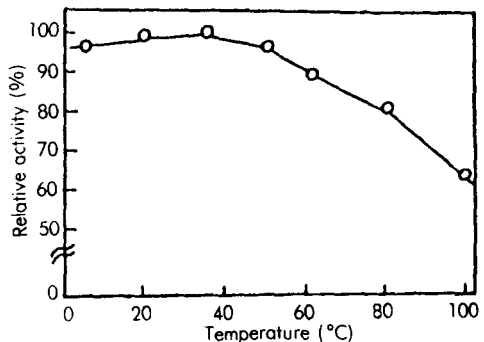


Fig. 3. Thermal stability of L. Activator

나타내었고 정제 L. Inhibitor II의 경우⁽²⁾ 100°C에서 85% 활성이 잔존된 것과 상당히 비슷한 특성을 나타내었다.

L. Activator의 pH안정성

L. Activator 용액에 각각 2배량의 0.01M acetate buffer(pH 3-5), 0.01M phosphate buffer(pH 6-8) 및 0.01M carbonate buffer(pH 9, 10)을 첨가하여 하룻밤 저온실(4°C)에 방치한 후 탈이온수에 투석시킨 다음 활성을 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. 즉 조 L. Activator는 pH 7에서 9 사이의 알카리범위에서 가장 안정하였으며 pH 10에서 85%, pH 3에서 75%의 활성이 잔존될 정도로 큰 안정성을 나타내었다. 이는 조 L. Inhibitor의 경우 pH 3-10의 범위에서 극히 안정하였고 정제 L. Inhibitor의 경우 pH 6-8에서 가장 안정하였고 pH 10에서 85%, pH 3에서 78%의 활성이 잔존되었던 것과 비슷한 특성을 나타내었다.

L. Activator에 대한 금속이온의 영향

각 금속이온 1×10^{-5} mole 씩을 첨가한 pancreatic lipase 수용액(30units) 9.3ml에 L. Activator 0.5 ml 씩을 첨가한 것(A)과 첨가하지 아니한 것(B)을 35°C에서 10분간 가온한 후 tributyrin 0.2 ml 씩을 넣어 35°C에서 15분씩 반응시켜 효소활성을 측정된 다음 (A)-(B)로서 계산하여 금속이온이 L. Activator의 활성에 미치는 영향을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 즉 Na^+ , Mg^{++} , Ca^{++} 등만이 다소 증대효과를 나타내었고 그 외의 대부분의 금속이온은 감소효과를 나타내었다. 특히 Cu^{++} , Co^{++} , Sn^{++} , Mn^{++} , Fe^{3+} , Al^{3+} 등은 현저한 감소효과를 나타내었다. 또한 Ag^+ , Hg^{++} 등 중금속이온의 경우는 역시 L. Activator 활성에 대하여 상당히 큰 감소효과를 나타내기는 하나 보

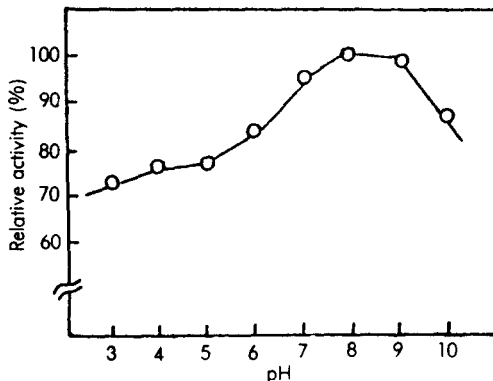


Fig. 4. pH-stability of L. Activator

Table 2. Effect of metal ions on the activities of L. Activator

Ions ($1 \times 10^{-3}M$)	Relative activities (%)
Control	100.0
K^+	83.9
Na^+	115.3
Li^+	95.0
Ag^+	41.7
Ca^{++}	108.6
Cu^{++}	54.4
Mg^{++}	124.4
Zn^{++}	98.9
Co^{++}	63.2
Ba^{++}	85.5
Sn^{++}	44.2
Hg^{++}	2.8
Mn^{++}	31.5
Fe^{+3}	38.0
Al^{+3}	14.9

통 효소활성에 대하여 중금속이온이 다른 금속이온의 수백 내지 수천 배의 강력한 저해작용을 하는 것에 비교하면 그리 큰 것은 못된다. 이는 L. Inhibitor의 경우 Mn^{++} 만이 증대효과를 나타내었고 대부분의 금속이온은 감소효과를 나타내었으며 Ag^+ , Hg^{++} 등의 중금속이온의 영향이 극히 현저하였던 것과는 다소 다른 특성을 나타내고 있다.

조(粗) L. Activator와 조(粗) L. Inhibitor의 Cellulofine GC-700m Chromatography pattern 비교

조 L. Activator (2.4 ml, $OD_{280}=156.0$)와 조 L. Inhibitor(2.4 ml, $OD_{280}=118.0$) 용액을 cellulofine GC-700m column에 각각 주입하여 0.01M phosphate buffer(pH 7.0)으로 chromatography 한 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 조 L. Activator는 4개의 peak로 분리되었고 조 L. Inhibitor는 2개의 peak로 분리되었다. 조 L. Activator의 앞쪽 2개의 peak는 모두 L. Activator의 활성을 나타내었으나 specific activity를 비교해 보면 맨 앞쪽의 peak가 L. Activator의 main peak이며 두번째 peak는 minor peak이거나 혹은 단순히 L. Activator가 다소 혼재되어 있는 불순 peak인 것으로 보여진다. 한편 조 L. Inhibitor의 경우는 앞쪽의 peak가 activator 활성을 나타내고 있으며 그의 용출위치가 L. Activator의 맨 앞쪽 main peak와 일치되어 있다. 이는 결국 L. Inhibitor에서 분리된 activatory

peak는 L. Activator 의 main peak와 동일한 것이 아닌가 하는 심증이 가며 이는 이미 보고된 바 있는(1) 조(粗) L. Inhibitor 가 극히 낮은 농도에서 효소활성 증대효과를 나타내었던 것이 바로 이 혼재되어 있는 activator에 기인되었던 것으로 해석되어 진다.

한편, 조 L. Activator 에서 분리된 활성 main peak와 조 L. Inhibitor 에서 분리된 activatory peak의 화학적 특성을 비교하기 위하여 종래 L. Inhibitor의 단백질성분 이외에 구성성분으로 함유되어 있는 것으로 밝혀진 당분과 RNA의 존재여부를 확인하기 위하여 각각 490 nm와 260 nm에서 흡광도 곡선을 측정해본 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 L. Activator의 main peak와 L. Inhibitor 에서 분리된 activatory peak는 다같이 RNA의 흡광도는 나타내고 있으나 당분의 흡광도는 나타내지 않고 있다. 또한 최근 lipoprotein성 L. Activator 가 많이 보고되고 있는 데에(8-10) 근거해서 두 peak에 대하여 지질

의 정성적 검사를 실시해본 결과 지질이 함유되어 있는 것이 확인되었다. 따라서 이상의 결과를 종합해 보건대 본 L. Activator 는 lipoprotein성 activator일 가능성이 크고 또한 L. Inhibitor 의 경우에는 달리 본 L. Activator 의 활성에는 당분이 관여되지 않는 것으로 해석되어진다. 그러나 보다 더 확실한 활성발현기구를 밝히기 위해서는 더 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

피망고추 중에 함유되어 있는 L. Activator 를 0.85 M NaCl 용액으로 추출하고 ammonium sulfate 0.2포화시켜 분리한 후 그의 성질을 검토하였다. 분리된 조 L. Activator (농도 $OD_{260}=1.0$)는 1.0 ml 이 내의 범위에서 첨가량에 비례하여 효소활성을 증가시켰으며 35°C에서 작용력이 가장 높았다. 이 L. Activator는 50°C 이하의 온도에서 가장 큰 안정성을 나타내었으며 100°C에서 30분간 가열하였을 때에도 약 60%의 활성이 잔존되어 높은 안전성을 나타내었다. 또 pH 안정성의 경우는 pH 7-9의 약알칼리성 쪽에서 가장 큰 안정성을 나타내었고 pH 3에서 72%, pH 10에서 85%의 활성이 잔존되는 등의 대단히 큰 안정성을 나타내었다. 한편 이 L. Activator 는 Na^+ , Mg^{++} , Ca^{++} 등을 제외한 대부분의 금속이온에 의해서 활성이 감소되는 경향을 나타내었으나 Ag^+ , Hg^{++} 등 중금속의 L. Activator 활성저하 영향은 일반적인 효소활성에 미치는 영향에 비해서는 그리 현저하지 못하였다. 또한 이 L. Activator 는 cellulofine column chromatography에 의해서 4개의 peak로 분리되었으며 그 중 주활성 peak는 L. Inhibitor 에서 분리된 activatory peak와 일치되었다. 이 L. Activator 의 활성 peak에는 단백질 이외에 RNA, lipid 등이 함유되어 있었으며 당분은 함유되어 있지 않았다.

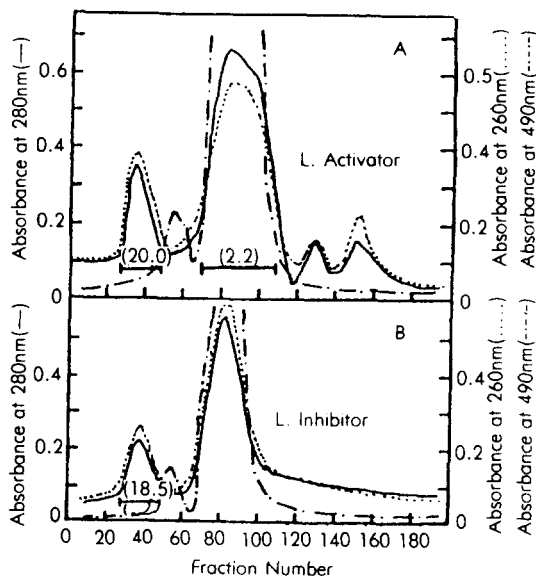


Fig. 5. Cellulofine GC-700-m column chromatography of crude L. Activator (A) and crude L. Inhibitor (B). Column size: 1.6x100 cm, eluting solvent: 0.01M Na-phosphate buffer (pH 7.0), flow rate: 25 ml/h, fraction volume: 5.0 ml/tube. The black bars and parenthesized numbers in figure represent the sections containing activatory activities and their specific activities (1/OD₂₆₀ at A₁₅₀) from L. Activator or L. Inhibitor, respectively. Absorbances at 260 nm were measured by Ogur and Rosen method⁽⁵⁾ for RNA determination and absorbances at 490 nm were measured by phenol-sulfuric acid method⁽⁴⁾ for sugar determination

감사의 글

이 연구는 문교부의 학술조성연구비의 지원으로 이루어졌음을 밝히며 감사를 드린다.

문 헌

1. Kim, B.M., Shimoda, T. and Funatsu, M.: Lipase Inhibitors from Green Pepper, *Capsicum annuum*

- Lin. I. Separation and Some Properties of Crude Lipase Inhibitor, *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, 21, 1-8(1977)
2. Kim, B.M.: Lipase Inhibitors from Green Pepper, *Capsicum annuum* Lin., Doctoral Thesis in Kyushu Univ., Japan(1977)
 3. Funatsu, M., Aizono, Y., Hayashi, K., Watanabe, M. and Eto, M.: Biochemical studies on rice bran lipase. Part I. Purification and physical properties. *Agr. Biol. Chem.*, 35, 735-742(1974)
 4. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P. A. and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28, 350(1956)
 5. Ogur, M. and Rosen, G.: The nucleic acids of plant tissues. I. The extraction and estimation of desoxy-pentose nucleic acid and pentose nucleic acid. *Arch. Biochem.*, 25, 262(1950)
 6. Folch, J., Lees, M. and Sloanestansley, G.H.: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497(1957)
 7. 阿南功一, 紺野邦夫, 田村善藏, 松橋通生, 松本重一郎: "基礎生化学實驗法(5) 化学的測定" p.106, 丸善株式会社(1976)
 8. Smith, L.C., Voyta, J.C., Catapano, A.L., Kinnunen, P.K.J., Gotto, A.M. and Sparrow, J.T.: Activation of lipoprotein lipase by systhetic fragmets of apolipoprotein C-II. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 348, 213(1980)
 9. Uyeda, M., Suzuki, K. and Shibata, M.: Action of lipase activator(LAV) produced by Streptomyces sp. strain No. BR-1381 on phycomyces nitens lipase. *Agric. Biol. Chem.*, 49(5), 1503(1985)
 10. Jackson, R.L., Balasubramaniam, A., Murphy, R.F. and Demel, R.A.: Interaction of synthetic peptides of apolipoprotein C-II and lipoprotein lipase at monomolecular lipid films. *Biochim. Biophys. Acta* 875(2), 203(1986)

(1989년 6월 30일 접수)