

연구노트

청미래덩굴 뿌리 열수 추출물로부터 칼슘 결합 물질의 분리

이지혜¹ · 전소정¹ · 송경빈^{1*}

¹충남대학교 농업생명과학대학 식품공학과

Isolation of a Calcium-Binding Fraction from a Hot-Water Extract of *Smilax rhizoma*

Ji Hye Lee¹, So Jeong Jeon¹ and Kyung Bin Song^{1*}

¹Department of Food Science & Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstract

We isolated a calcium-binding substance from *Smilacis rhizoma* hot-water extract using ion exchange, normal phase HPLC, and gel filtration chromatography; fractions were analyzed for calcium-binding activity. Fractions (F6) with the highest calcium-binding activity from the resource Q column were pooled and further purified on an NH₂ column. Two major peaks were separated and the fraction (F61) with the higher calcium-binding activity was then loaded onto a SuperdexTM column. A single peak (F611) with calcium-binding activity was finally obtained. These results suggest that the isolated calcium-binding fraction could be used as a functional food additive, similar to a calcium supplement, in the food industry.

Key words : calcium-binding, chromatography, isolation, *Smilacis rhizoma*

서 론

청미래덩굴(*Smilax china* Linne)은 백합과(Liliaceae)에 속하는 덩굴성 관목으로 우리나라를 비롯한 동아시아에 널리 분포하고 있으며(1), 늦가을에 3-5년생을 채취한 것을 한약재의 원료로써 사용하고 있다(2). 특히, 청미래덩굴 뿌리(*Smilacis rhizoma*)는 한의학에서는 토복령이라 하고, 민간에서는 산귀래라고 불리고 있으며(3), 해열, 해독, 이노 등의 증상 완화(1)와 체력증강(4) 및 피부염, 신장염, 방광염과 같은 염증의 치료제로써 이용되고 있다(5-6). 또한 황색 포도상구균, 녹농균, 대장균 등의 유해미생물의 성장을 억제하며, 특히 뿌리의 수용성 추출물은 *Bacillus subtilis*에 대한 항균활성의 연구결과가 보고된 바 있다(4). 또한 phenolic compound가 다량 함유되어 있어 polyphenol과 flavonoid 배당체인 kaempferol-7-O-β-D-glucoside를 이용한 anti-cancer로써의 연구가 입증되었으며(7-9), 수은, 납과

같은 중금속 제거에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다(10). 그러나 현재까지 청미래덩굴 뿌리를 이용한 항산화, 항균, 항암 등의 기능성에 대한 연구결과만 제한적으로 보고되었으며 일반성분 조성에 관한 내용도 수립되어 있지 않아(11), 식품이나 식품보충제로 이용되기에는 실질적인 자료가 많이 부족한 실정이다.

현재 칼슘 섭취 권장량은 대한민국 성인 남녀의 경우 700 mg/day이고, 청소년기와 50세 이상의 성인은 700-1,000 mg/day이지만(12), 실제 섭취량은 491.8 mg/day로 권장량에 크게 못 미치고 있다(13). 그러나 칼슘은 인체에서 골격과 치아를 구성하는 주요성분이며 신체 조절 기능을 하는 미량 영양소로써 골다공증, 동맥경화, 고혈압, 비만 등의 질병과 관련이 있다고 보고되어 칼슘의 섭취가 중요시 되고 있다(14-16). 따라서 미국에서는 칼슘보충제가 연간 2억 달러 넘게 소비되고 있으며, 전체 인구의 30-60 %는 일상적으로 칼슘 보충제를 복용하고 있다(17). 최근 판매되는 칼슘 보충제의 대부분은 정제 형태로서 calcium chloride와 같은 무기염류로 섭취되고 있지만, 장내 pH나 phytic acid, 섬유소 등에 의해 흡수가 저해되거나 흡수 불가능한 물질로

*Corresponding author. E-mail : kbsong@cnu.ac.kr,
Phone : 82-42-821-6723, Fax : 82-42-825-2664

변형되기 쉽다(18). 또한 생체이용률이 낮은 영양 보충제의 무분별한 섭취로 생체 균형의 파괴 등의 부작용이 나타나는 단점이 있어, 체내의 칼슘 흡수력을 증강시키기 위하여 peptide와 같은 물질에 chelate하여 체내에서 흡수를 촉진시킬 수 있는 방법에 관한 기초연구가 다양하게 진행되어 왔다(18,19).

본 연구에서는 청미래덩굴 뿌리를 일반적인 조리를 통해 이용할 수 있는 형태인 열수로 추출하고 calcium-binding activity에 근거하여 다양한 chromatography로 칼슘 결합 물질을 분리하였다. 따라서 본 연구 결과로써, 청미래덩굴 뿌리 열수 추출물을 이용하여 기존의 칼슘 보충제의 문제점을 보완하고 향후 기능성 식품의 신소재로 활용하기 위한 기초연구로써의 의의가 있다.

재료 및 방법

실험재료

청미래덩굴 뿌리는 2010년 경북 경주시에서 채집한 것을 사용하였다. 청미래덩굴의 뿌리는 건조하여 초고속분쇄기(WB-1, SANPLATEC Co., Osaka, Japan)를 사용하여 분쇄하고, 80 mesh 이하의 것만 선별하여 본 연구에서의 열수 추출 재료로 사용하였다.

청미래덩굴 뿌리 열수 추출물 제조

분쇄한 청미래덩굴 뿌리 200 g에 증류수 800 mL을 가하여 70°C에서 24시간 추출하였다. 추출한 용액은 원심분리기로 불용성물질을 제거하고 얻어진 상등액을 Whatman No.1(Whatman, Maidstone, England) 여과지로 거른 후 동결 건조하여 시료로 사용하였다.

Calcium binding capacity 측정

시료를 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 용해시킨 뒤, 2.5 mM calcium chloride를 첨가하여 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 침전물을 제거하기 위해 4,500 x g에서 20 분간 원심분리 하여 얻어진 상등액으로 ortho-cresolphthalein complexone 시약을 이용한 colorimetric method(20)를 이용하여 칼슘 함량을 측정하였다.

Calcium binding 물질의 분리 및 정제

청미래덩굴 뿌리 열수 추출물은 fast protein liquid chromatography (FPLC, Amersham Pharmacia Co., Uppsala, Sweden)를 이용하여 분획하였다. Anion exchange column인 Resource Q column (Amersham Pharmacia Co.)을 이용하여, 용매 A는 20 mM Tris-buffer (pH 8.0), 용매 B는 0.5 M NaCl을 포함한 20 mM Tris-buffer (pH 8.0)를 사용하여 1.0 mL/min 유속으로 254 nm에서 흡광도를 측정하며 분획

하였다. Resource Q를 이용하여 분리된 분획 중 가장 높은 calcium binding activity를 가진 분획을 모아 동결건조한 후 normal-phase high performance liquid chromatography (HPLC, Waters, Milford, MA, USA)를 사용하여 분리하였다. HPLC의 column은 amino column(4.6 x 250 mm, Luna NH2, Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA)을 이용하였고, 용매 A는 0.1 % trifluoroacetic acid가 포함된 acetonitrile, 용매 B는 0.1 % trifluoroacetic acid가 포함된 water를 사용하였다. 용매 B를 30분간 0-100%로 상승하여 분획하였으며, 0.5 mL/min의 유속으로 254 nm에서 흡광도를 측정하며 분획하였다. NH₂ column을 이용하여 분리된 분획 중 가장 높은 calcium binding activity를 가지는 fraction을 받아 동결 건조 하였고, 최종적으로 gel filtration column (Superdex™ peptide 10/300 GL, 10 x 300 mm, GE Healthcare, Uppsala, Sweden)을 사용하였는데, 이때 용매는 water를 사용하여 1.0 mL/min의 유속으로 분획하여 칼슘 결합 물질을 분리하였다.

결과 및 고찰

청미래덩굴 뿌리 열수 추출물을 칼슘 보충제인 기능성식품 소재로 활용하기 위한 기초 연구로써, 칼슘결합 물질을 다양한 chromatography를 이용하여 물질을 분리하였다. Anion exchange column인 resource Q를 이용하여 추출물을 분리한 결과 7개의 주요 peaks를 얻었으며, 이 중 5개의 peaks가 salt gradient로 elute 되는 동안 분리되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 또한 분획된 각각의 fraction을 같은 양 취하여 calcium chloride와 반응시켜 칼슘 결합 농도를 측정한 결과, F6 fraction이 0.083 mM으로 다른 분획들 보다 calcium binding ability가 높은 것을 확인할 수 있었다(Table 1). 그리고 Resource Q에서 상대적으로 가장 높은 calcium 함량을 가지는 F6 fraction을 normal-phase HPLC인 NH₂ column으로 분리한 결과 2개의 주요 peaks를 얻었는데(Fig. 2), 이 중 F61이 0.130 mM으로 F62의 0.045 mM 보다 높은 칼슘 결합력을 나타내었다(Table 2). 칼슘 결합 물질을 순수 분리하기 위해서 최종적으로 F61 fraction을 Superdex™ column을 이용하여 분리하였는데, single peak (F611)가 검출되어 단일 물질로 이루어졌음을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

본 연구 결과, 청미래덩굴 뿌리 열수 추출물을 다양한 chromatography를 이용하여 분리한 분획 중 F611이 calcium binding activity가 가장 높은 fraction으로 확인되었으며, 칼슘 결합과 관련해서는 이온, 공유결합 등의 복합적인 상호작용으로 인하여 칼슘이온과 결합하는 것으로 판단된다.

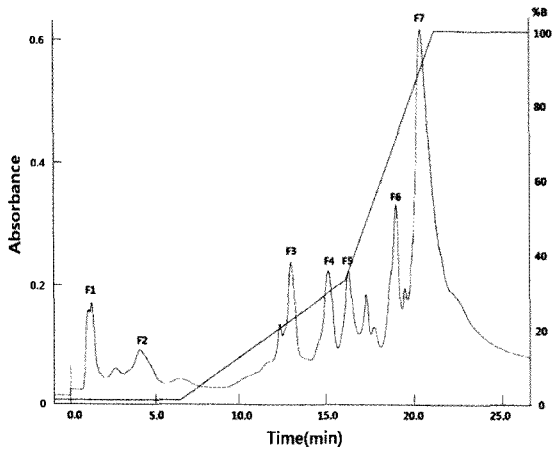


Fig 1. Elution profile of *Smilax china* L. rhizome extract from ion exchange chromatography.

FPLC with an anion exchange column (Resource Q column) equilibrated with a 20 mM Tris-buffer (pH 8.0) was used.

Table 1. Ca binding activity for the fraction from ion exchange chromatography

Fraction	Ca concentration (mM)
F1	0.077
F2	0.061
F3	0.067
F4	0.076
F5	0.020
F6	0.083
F7	0.081

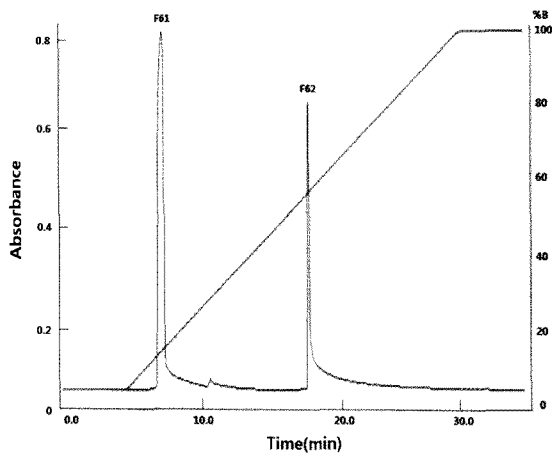


Fig 2. Elution profile of the F6 fraction in Fig. 1 from normal phase HPLC.

Normal phase HPLC with a NH₂ column (4.6 x 250 mm) was used. Elution was performed on the condition of solvent A (0.1 % trifluoroacetic acid in acetonitrile) and solvent B (0.1 % trifluoroacetic acid in water).

특히, 청미래덩굴 뿌리에 다량 함유되어 있는 flavonoid 성분은 철과 구리와 같은 금속이온과 chelating ability가

뛰어나 complex를 형성한다는 연구결과가 이미 보고된 바 있어 본 연구 결과와 간접적으로 일치함을 보여 준다 (21-23). 따라서 본 실험의 F611 fraction은 칼슘이온과 결합하는 물질로써 flavonoid 성분을 포함하고 있는 chelating ability가 뛰어난 물질로 판단되어 식품이나 칼슘 보충제 같은 기능성 식품의 원료로 사용될 가능성이 높다고 판단된다.

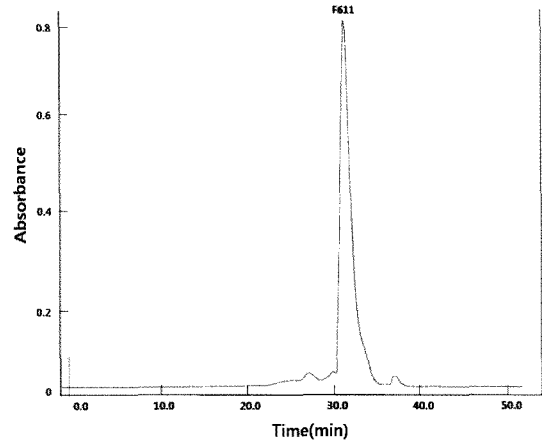


Fig 3. Elution profile of the F61 fraction in Fig. 2 from gel permeation chromatography.

FPLC with a Superdex column (10 x 300 mm, superdex™ peptide 10/300) was used.

Table 2. Ca binding activity for the fraction from normal phase HPLC

Fraction	Ca concentration (mM)
F61	0.130
F62	0.045

칼슘과 같은 무기질은 염의 형태로 섭취할 때보다 다른 물질과 binding 된 형태로 섭취되는 것이 보다 안정하며, 체내 흡수 및 이용률이 높다는 장점이 있다고 알려져 있다 (24). 현재까지 미네랄 흡수증진과 관련한 연구로 casein phosphopeptide(25), porcine blood plasma protein hydrolysates (19,24), Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) backbone (26), rice bran protein hydrolysates(27), whey protein hydrolysates(28) 등의 소재를 이용하여 미네랄과 복합체를 형성함으로써 체내에서 흡수 및 bioavailability를 증진시킬 수 있다고 보고하였다.

본 연구에서 얻어진 청미래덩굴 뿌리 열수 추출물은 divalent metal ion과 chelate되는 형태이므로(10), 칼슘과 결합하는 물질의 분리가 가능하였다고 판단된다. 한편 청미래덩굴 뿌리는 그 자체에도 칼슘을 다량(836.5 ppm) 함유하고 있을 뿐만 아니라(10), 일반적인 조리를 통해 이용할 수 있는 형태인 열수로 추출하였기 때문에 마시는 차처럼 음용함으로써 칼슘을 보충하고, 또한 체내에 축적된 중금

속을 제거하는데도 효과가 있을 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서 얻어진 F611 fraction은 칼슘과 결합된 biomineral의 소재로써 기존 칼슘보충제의 문제점을 보완하여 체내에서 흡수와 bioavailability를 증진시키기에 향후 식품산업에서의 식품 신소재로써 활용이 가능하다고 판단된다.

요 약

청미래덩굴 뿌리(*Smilacis rhizoma*)로부터 칼슘과 결합하는 물질을 분리하고자 열수로 추출한 추출물을 ion exchange, normal-phase HPLC 및 gel filtration chromatography를 이용하여 칼슘 결합 물질을 순차적으로 분리하였다. 그 결과 ion exchange chromatography에서 7개의 major peaks를 얻었으며, 이 중 F6 fraction이 0.083 mM로 칼슘과 가장 높은 결합력을 가졌다. 또한 F6를 NH₂ column으로 분획한 결과 F61에서 0.130 mM의 가장 높은 칼슘함량을 나타내었으며, 최종적으로 Superdex™를 이용하여 F611 fraction으로 분리하였다. 따라서 청미래덩굴 뿌리 추출물 중 F611 fraction을 이용하여 biomineral을 제조함으로써 칼슘 보충제나 기능성 성분의 원료로써 식품산업에 활용될 수 있다고 판단된다.

참고문헌

- Chu KT, Ng TB. (2006) Smilaxin, a novel protein with immunosimulatory, antiproliferative, and HIV-1-reverse transcriptase inhibitory activities from fresh *Smilax glabra* rhizomes. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 340, 118-124
- Korea Food and Drug Administration. (2008) Standard Manufacturing Manual for Korean Traditional Herbal Medicine (I), Seoul, Korea, p.85
- Song HS, Park YH, Jung SH, Kim DP, Jung YH, Lee MK, Moon KY. (2006) Antioxidant activity of extracts from *Smilax china* roots. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 35, 1133-1138
- Song JH, Kwon HD, Lee WK, Park IH. (1998) Antimicrobial activity and composition of extract from *Smilax china* roots. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 27, 574-584.
- Ng TB, Yu YL. (2001) Isolation of a novel heterodimeric agglutinin from rhizomes of *Smilax glabra*, the Chinese medicinal material tufuling. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 33, 269-277
- Xia D, Yu X, Liao S, Shao Q, Mou H, Ma W. (2010) Protective effect of *Smilax glabra* extract against lead-induced oxidative stress in rats. *J. Ethnopharmacol.*, 130, 414-420
- Li YL, Gan GP, Zhang HZ, Wu HZ, Li CL, Huang YP, Liu YW, Liu JW. (2007) A flavonoid glycoside isolated from *Smilax china* L. rhizome in vitro anticancer effects on human cancer cell lines. *J. Ethnopharmacol.*, 113, 115-124
- Xu W, Liu J, Li C, Wu HZ, Liu YW. (2008) Kaempferol-7-O-β-D-glucoside (KG) isolated from *Smilax china* L. rhizome induces G2/M phase arrest and apoptosis on HeLa cells in a p53-independent manner. *Cancer Lett*, 264, 229-240
- Wu LS, Wang XJ, Wang H, Yang HW, Jia AQ, Ding Q. (2010) Cytotoxic polyphenols against breast tumor cell in *Smilax china* L. *J. Ethnopharmacol.*, 130, 460-464
- Lee IB. (2004) The Study on the Removal Effect of Heavy Metals by *Smilax china* Rhizome Diet. MS thesis, Dongeui University, Korea
- Lee CH. (2008) Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effect of Fractionated Extracts of *Smilacis Glavrae* Rhizoma in Human Umbilical Vein Endothelial Cell. Ph.D thesis, Dungguk University, Korea
- The Korean Nutrition Society. (2010) Dietary reference intakes for Korean, Seoul, Korea
- Lee SH, Chang SO. (1994) Comparison of the bioavailability of calcium from anchovy, tofu and nonfat dry milk (NFDM) in growing male rats. *Korean J. Nurt.*, 27, 473-482
- Choi YM, Lee JH, Han JS. (2009) Effect of vitamin D and calcium intervention on the improvement of resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. *Korean Diabet. J.*, 33, 324-334
- Davies KM, Heaney RP, Recker RR, Lappe JM, Barger-Lux MJ, Rafferty K, Hinders S. (2000) Calcium intake body weight. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85, 4635-4638
- Zemel MB, Thompson W, Milstead A, Morris K, Campbell P. (2004) Calcium and dairy acceleration of weight and fat loss during energy restriction in obese adults. *Obes. Res.*, 12, 582-590
- Han JH, Kim EM, Cheong MK, Chee SK, Chee KM. (2010) Bioavailability and digestibility of organic calcium sources by bone health Index. *Korean J. Nutr.*, 43, 12-25
- Jeon SJ, Lee JH, Song KB. (2010) Preparation for calcium

- and iron-binding peptides from rice bran protein hydrolysates. *J. Appl. Biol. Chem.*, 53, 174-178
19. Lee SH, Song KB. (2009) Isolation of a calcium-binding peptide from enzymatic hydrolysates of porcine blood plasma protein. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, 52, 290-294
 20. Gitelman HJ. (1967) An improved automated procedure for the determination of calcium in biological specimens. *Anal. Biochem.*, 18, 521-531
 21. Kim SY, Chung MA, Song DU, Shin JH, Chay KO, Jung YD, Yang SY, Ahn BW. (2001) Effects of flavonoids on amyloid β peptide toxicity in PC12 cells. *Korean. J. Gerontol.*, 11, 41-48
 22. Leopoldini M, Russo N, Chiodo S, Toscano M. (2006) Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 6343-6351
 23. Tereza Fernandez M, Lurdes Mira M, Helena Florencio M, Jennings KR. (2002) Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *J. Inorg. Biochem.*, 92, 105-111
 24. Lee SH, Song KB. (2009) Purification of an iron-binding nona-peptide from hydrolysates of porcine blood plasma protein. *Process Biochem.*, 44, 378-381
 25. Hartmann R, Meisel H. (2007) Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18, 163-169
 26. Jung WK, Karawita R, Heo SJ, Lee BJ, Kim SK, Jeon YJ. (2006) Recovery of a novel Ca-binding peptide from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) backbone by pepsinolytic hydrolysis. *Process Biochem.*, 41, 2097-2100
 27. Jeon SJ, Lee JH, Song KB. (2010) Preparation for calcium and iron-binding peptides from rice bran protein hydrolysates. *J. Appl. Biol. Chem.*, 53, 174-178
 28. Kim SB, Seo IS, Khan MA, Ki KS, Lee WS, Lee HJ, Shin HS, Kim HS. (2007) Enzymatic hydrolysis of heated whey: Iron-binding ability of peptides and antigenic protein fractions. *J. Dairy Sci.*, 90, 4033-4042

(접수 2010년 7월 22일, 수정 2010년 11월 24일, 채택 2010년 12월 3일)