Korean Journal of Life Science
Vol. 12. No. 1. 87~95, 2002

고추잎 열수추출물로부터 보체계 활성화 다당의 분리 및 특성

나경수[1] · 정상철[2] · 서형주[3] · 박희성[4] · 백형석[5] · 최장원[6] · 이용세*[6]

[1]대구공업대학 식품영양과, [2]대구대학교 생물공학과
[3]고려대학교 보건대학 식품영양과, [4]대구가톨릭대학교 생명자원학부
[5]부산대학교 미생물학과, *[6]대구대학교 자연자원대학 생명자원학부

Isolation and Characterization of Complement System Activating Polysaccharides from the Hot Water Extract of the Leaves of *Capsicum annuum* L.

Kyung Soo Ra[1], Sang Chul Jeong[2], Hyung Joo Suh[3], Hee Sung Park[4],
Hyung Suk Baik[5], Jang Won Choi[6] and Yong Se Lee*[6]

[1]*Department of Food and Nutrition, Taegu Technical College, Taegu 704-350, Korea*
[2]*Department of Biotechnology, Taegu University, Kyungsan 712-714, Korea*
[3]*Department of Food and Nutrition, College of Health Science, Korea University, Seoul 136-703, Korea*
[4]*Division of Life Resources, Catholic University of Taegu, Kyungsan 712-702, Korea*
[5]*Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea*
[*6]*Division of Life Resources, Taegu University, Kyungsan 712-714, Korea*

Abstract

It was observed that the hot water extract of the leaves of *Capsicum annuum* L., a Korean edible plant, had a potent anti-complementary activity. Crude polysaccharide fraction(CAL-0) was obtained by methanol reflux, ethanol precipitation, dialysis and lyophilization. CAL-0 contained 51.8% of total sugar, 8.2% of uronic acid and 16.8% of protein, and consisted of mainly arabinose, galactose and glucose as neutral sugars and galacturonic acid as uronic acid. The anti-complementary activity of CAL-0 decreased greatly by periodate oxidation, but was not changed by pronase treatment. Also, the anti-complementary activity of CAL-0 was reduced partially in the absence of the Ca^{2+} ion. The crude polysaccharide CAL-0 was found to activate the C3 component both in the presence and in the absence of Ca^{2+} through the crossed- immunoelectrophoresis suggesting that those involved in both classical and alternative complement pathway. CAL-0 was further separated to an unabsorbed fraction(CAL-1) and six absorbed fractions(CAL-2→CAL-7) on DEAE Sepharose CL-6B ion exchange column. Among them four major fractions in activity and yield were obtained, and consisted mainly of arabinose, galactose and glucose with various molar ratios. The major fraction, CAL-2, was purified to give a high molecular fraction(CAL-2-I) and a low molecular fraction(CAL-2-II) on Sepharose CL-6B column. The anti- complementary activity of CAL-2-I, a molecular weight of about 61,000, was higher than it of CAL-2-II.

Key words – leaves of *Capsicum annuum* L., anti-complementary activity, polysaccharide

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 053-850-6763, Fax : 053-850-6769
E-mail : yslee@taegu.ac.kr

서 론

면역계의 비특이적 기구 중 체액성인 보체(complement)는 C1에서 C9까지 9개의 보체인자와 조절인자 등 약 20여 종으로 구성된 효소 체계이다. 보체계(complement system)는 항원 침입시 비특이적으로 활성화되어 표적세포의 분해, 대식세포와 림프구의 활성화, opsonization을 통한 이물질의 제거 및 활성화 과정 중 생성되는 보체 산물에 의한 혈관 투과성과 부종의 증가(C3a, C5a), 백혈구 주화, 용해 효소의 방출, 응집 반응에 따른 혈소판 방출, 대식세포로부터 prostaglandin 생성 반응 등의 특정 면역 반응을 유도, 조절하여 숙주 면역 반응에서 중요한 역할을 담당한다[1]. 보체계의 활성화에서 고전적 경로(classical pathway)는 IgG와 IgM과의 면역복합체나 이들 응집물에 의해 C1부터 활성화되어 C3b 활성형을 생성하는 경로이며 부경로(alternative pathway)는 혈액 중에 활성형으로 존재하는 D인자에 의해 C3b와 B인자로부터 활성화되는 경로로서 polysaccharide, bacteria, fungi, virus, protozoa, parasite 등이 주요한 활성인자이다[13].

이러한 면역계의 유지 및 항상성의 회복에 식품의 기여는 매우 크며, 특히 식품 유래의 기능성 인자의 생체조절기능은 내재성 생리기능 조절인자인 hormone, 효소, 세포 등에 활성을 주거나 내재성 인자의 생합성 혹은 분비를 촉진 및 제어하며, 식품기원의 인자가 독립적으로 생체에 효과를 주는 단독작용도 있다. 식품재료 등에 함유된 특정성분들이 가진 생리효과로는 항보체 활성(보체계 활성화 효과)[23]과 더불어 항암효과[19], 식세포강화작용[18], 혈당강하효과[5], 항응고 활성[9], 인터페론 유도활성[17], 장관면역작용[26] 등으로 주로 다당을 포함한 고분자 물질에서 발견되어 이들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 예로 항종양 활성 다당으로 저령, 복령, 구름버섯, 표고버섯의 β-(1→3)-glucan과 영지버섯의 arabinoxyloglucan 등이 연구되었고, 당귀의 pectic arabinogalactan[22], 시호의 arabinan, arabinoglucan, glucan[24], 고사리의 α-(1→2)-glucuronomannan[8] 등은 높은 항보체 활성 효과를 지닌 다당 분획으로부터 정제되어 연구되었다. 이외에도 음나무 수피[15] 등의 임산재료, 고추[14], 청각[9] 등의 식품재료 및 인삼잎[4], 생강[16], 계피[10] 등의 한약재로부터도 면역활성 다당들이 연구되었다. 본 연구에서는 고추잎에 항보체 활성이 있음이 발견되어 실험 재료로 선택하였다. 고추는 농가소득의 중요한 작물이나 과잉재배 또는 과잉생산되어 가격폭락과 폐기처분되는 양이 매년 증가하며, 특히 고추잎은 이용도가 매우 낮다. 고추잎은 수분함량 79.4%, 단백질 4.18%, 지질 1%, 섬유소 3.8%, 당질 8.2%, 회분 3.5%로 탄수화물의 비율이 다른 성분보다 비교적 높다. 따라서 본 연구에서는 고추잎의 열수추출물에서 보체계를 활성화시켜 여러 면역작용을 강화, 조절할 수 있는 효과를 가진 다당을 추출, 분리하고 각 단계에서의 활성과 성분조사 및 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험 재료인 고추잎(leaf of *Capsicum annuum* L.)은 일반 재래시장에서 구입하여 세척 후 건조하여 잎부분과 줄기부분으로 분리하여 사용하였다.

시약

양의 감작 적혈구(IgM hemolysin sensitized sheep erythrocyte, EA cell)는 일본 Bio test사로부터 구입하였고, 혈청(normal human serum)은 건강한 한국 성인의 혈액으로부터 제조하여 사용하였다. DEAE Sepharose CL-6B, Sepharose CL-6B는 Pharmacia사 제품을, Dowex-1 resin, pronase, standard dextran(T-2000, T-500, T-70, T-40, T-10)은 Sigma사 제품을 사용하였다. TLC plate(cellulose coated plastic sheet, 5577)와 5,5'-diethyl barbituric acid sodium salt는 Merck사 제품을, trifluoroacetic acid와 sodium periodate는 Aldrich사에서 구입하여 사용하였으며 그 외 기타 시약은 시판 일급 혹은 특급 시약을 사용하였다.

시료성분의 정량 분석

총당 함량은 arabinose와 galactose를 1 : 1로 섞은 것을 표준물질로 사용하여 phenol-sulfuric acid법[3]으로, 산성당 함량은 β-D-galacturonic acid를 표준물질로 사용하여 *m*-hydroxydiphenyl법[2]으로, 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 Lowry[11]법으로 각각 정량하였다.

구성당 분석

다당의 구성당 분석은 시료 1~3 mg을 2M trifluoroacetic acid에 녹여 121°C에서 1.5시간 가수분해한 시료를 cellulose-coated plastic sheet에서 ethyl acetate, pyridine, water, acetic acid(5 : 5 : 1 : 3, v/v)를 전개용매로 사용하여 전개시킨 후, 환원당 분석에는 alkaline silver nitrate로, 산성당 분석에는 *p*-anisidine으로, 아미노당 분석에는 ninhydrin으로 발색시켜 rhamnose, arabinose, xylose, mannose, galactose, glucose, galacturonic acid, galactosamine과의 R_f 값을 비교하여 분석하였다. 가수분해물의 중성당과 산성당은 sodium borohydride를 사용하여 중성당은 alditol로, 산성당은 aldonic acid로 각각 환원시키고 Dowex-1 (anion exchange resin, acetate form)으로 분리하였다. Aldonic acid는 sodium borohydride로 다시 alditol로 환원시킨 후 acetic anhydride를 이용하여 각각 alditol acetate 유도체로 전환시켜 gas liquid chromatography법으로 구성당을 분석하였다. Gas liquid chromatography 분석은 fused silica capillary column(Supelco, SP™ 2380, 15 m× 0.25 mm ID, 0.2 μm film thickness)을 사용하여 210℃에서 flame ionization detector(FID)로 표준물질의 retention time과 비교하여 시료 중의 구성당을 분석하였다. 구성당의 molar ratio는 각 peak들의 면적비와 구성당들의 alditol acetate 유도체 분자량으로부터 계산하였다[6].

항보체 활성의 측정

항보체 활성은 시료에 의한 보체 소비(complement consumption)후 잔여 보체에 의한 적혈구 용혈 정도에 근거를 둔 complement fixation test법으로 측정하였다[7]. 즉, 여러 농도로 증류수에 녹이거나 분산시킨 시료에 정상인의 혈청과 2% gelatin, 3mM Ca^{2+}, 10 mM Mg^{2+}이 함유된 GVB^{2+}(gelatin veronal buffered saline, pH 7.4)을 각각 50 μl씩 혼합하여 37°C에서 20분간 1차 반응시킨 후 이 반응액에 GVB^{2+}를 350 μl 가하고 이를 10~160배로 연속 희석하였다. 여기에 다시 750 μl의 GVB^{2+}와 양의 감작 적혈구(1× 10^8 cells/ml)를 250 μl 가해 37°C에서 60분간 2차 반응시킨 후 PBS(phosphated buffered saline, pH 7.4) 2.5 ml을 가하여 반응을 정지시켰다. 이 반응액을 2800 rpm에서 약 10분간 원심분리하여 얻어진 상등액의 흡광도를 412 nm에서 측정하였다. 항보체 활성은 혈청과 buffer, 시료대신 증류수만을 반응시킨 대조군의 총보체 용혈(50% total complement hemolysis, TCH_{50}%)에 대한 저지율(inhibition of 50% total complement hemolysis, $ITCH_{50}$%)로서 나타내었다.

$$\text{Inhibition of } TCH_{50}\ (\%) = \frac{TCH_{50} \text{ of control} - TCH_{50} \text{ of treated with sample}}{TCH_{50} \text{ of control}} \times 100(\%)$$

항보체 활성 물질의 추출

고추잎 600 g에 10배의 증류수를 가하고 부피가 절반으로 될 때까지의 가열과정을 3회 반복하여 얻은 열수추출 상등액을 농축하고 4배의 methanol을 가해 5회 환류 추출하여 methanol 가용 성분을 분리하였다. Methanol 비가용 성분을 소량의 증류수에 녹인 후 5배의 ethanol을 가해 4°C에서 24시간 교반하여 ethanol 가용 성분을 분리하였다. 다시 ethanol 침전 성분을 물에 재용해하여 3일간 증류수에서 투석한 다음 비투석된 성분을 농축, 동결건조하여 조다당 CAL-0로 조제하였다(Fig. 1).

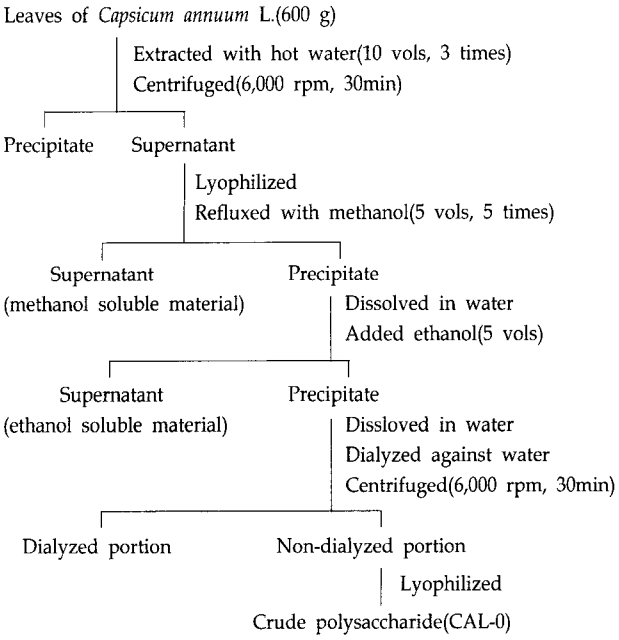

Fig. 1. Isolation and preparation procedure of crude polysaccharide fraction from the leaves of *Capsicum annuum* L.

조다당의 pronase 처리

조다당 30 mg을 10 mM $CaCl_2$가 함유된 50 mM tris-HCl buffer(pH 7.9) 50 ml에 용해시킨 후 10 mg의 pronase를 가하여 37°C에서 48시간 동안 반응시켰다. 5분간 가열하여 효소를 불활성화한 후 반응액을 원심분리하여 불용성 침전을 제거하고 상등액을 투석, 동결건조하여 조다당의 pronase 분해물을 얻었다[14].

조다당의 과요오드산 산화

조다당 30 mg을 50 mM acetate buffer(pH 4.5) 50 ml에 용해시킨 후 50 mM sodium periodate를 가하여 4°C 암소에서 3일간 교반, 방치하였다. 이 반응액에 ethylene glycol 5 ml을 가하여 잔존 과요오드산을 제거하고 1시간 동안 실온에서 방치한 후 3일간 투석하여 얻은 투석내액을 약 10 ml 정도로 농축하였다. 이 농축액에 sodium borohydride를 20 mg 가하고 실온에서 12시간 교반하여 환원시킨 후 0.1 M acetic acid로 중화하고 methanol 첨가와 증발을 반복하여 잔존 boric acid를 제거하였으며 투석 후 비투석획분을 동결건조하여 조다당의 산화물을 조제하였다[14].

보체계 활성화 경로 파악

조다당의 보체계 활성경로를 파악하기 위해 GVB^{2+}, Ca^{2+} 이온을 제거한 Mg^{2+}-EGTA-GVB^{2-}를사용한 경우와 2가 금속이온을 모두 제거한 10 mM EDTA-GVB^{2-}에서의 항보체 활성을 비교하였다[16].

교차 면역전기영동

GVB^{2+} buffer, 10 mM EDTA 및 1% gelatin을 함유한 veronal buffer (EDTA-GVB^{2-}) 및 Mg^{2+}-EGTA-GVB^{2-} buffer에 각각 희석된 시료액과 정상인의 혈청을 혼합하고 37℃에서 30분간 반응시킨 후 barbital buffer(pH 8.6)에 용해한 1% agarose 상에서 2시간 동안 1차원 전기영동을 하고 0.5% goat anti-human C3 serum이 함유된 1% agarose 상에서 2차원 전기영동(15 mA/plate, 15시간)을 행하였다. 전기영동 후 gel은 고정 및 탈 단백과정과 bromophenol blue로 염색하여 C3의 분해산물을 관찰하였다[12].

이온교환 크로마토그래피에 의한 조다당의 분획

조다당 CAL-0 500 mg을 증류수에 녹여 증류수로 평형화시킨 DEAE Sepharose CL-6B 이온교환 컬럼(4.0×25 cm)에 흡착시킨 후 증류수, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1 M NaCl 용액으로 용출시켜 7개의 획분으로 분리하였다.

겔 여과 크로마토그래피에 의한 활성물질의 정제 및 분자량 검토

항보체 활성을 가진 CAL-2 획분을 0.2 M NaCl 용액으로 평형화시킨 Sepharose CL-6B 컬럼(2.3×90 cm)을 사용하여 분당 0.3 ml/min의 유속으로 4℃에서 겔 여과 크로마토그래피를 행하여 분리, 정제를 행하였다. 정제 다당의 분자량은 dextran T-2000(M.W.: 2×10^6), T-500(M.W.: 7×10^4), T-40(M.W.: 4×10^4), T-10(M.W.: 1×10^4) 및 glucose를 표준물질을 사용하여 Sepharose CL-6B 컬럼에서 얻어진 표준곡선과 비교하여 측정하였다.

결 과

보체계 활성화 물질의 추출 및 분획

줄기 부분을 제거한 고추잎 600 g으로부터 열수추출, 열수추출물의 methanol 환류, methanol 비가용성 물질의 ethanol 침전 그리고 침전물의 투석 및 동결건조를 통하여 186 g의 조다당(crude polysaccharide) CAL-0를 얻었다 (Fig. 1). 이 과정에서 얻은 methanol 및 ethanol 가용성 물질과 조다당의 항보체 활성을 비교한 결과(Fig. 2), methanol

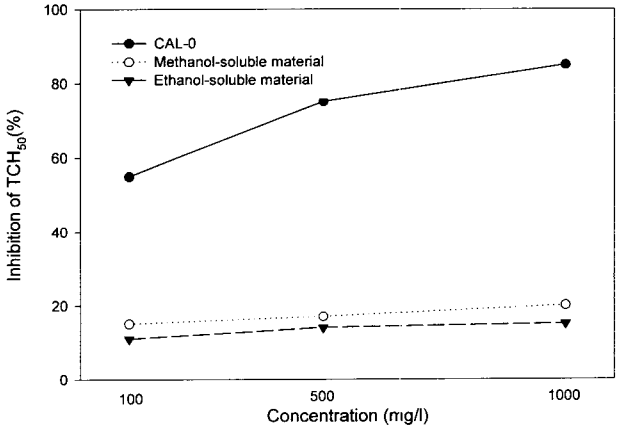

Fig. 2. Anti-complementary activities of methanol-, ethanol-soluble materials and CAL-0 from the leaves of *Capsicum annuum* L. TCH_{50} is 50% of the total complement hemolysis.

가용성과 ethanol 가용성 물질에서는 20% 이하의 낮은 활성이 나타난 반면, 조다당 CAL-0는 1000 mg/l의 시료농도에서 80% 이상의 높은 활성을 나타내어 저분자 획분보다 고분자 획분인 조다당 CAL-0에 보체계 활성화 작용이 있음을 알 수 있었다. 고추잎으로부터 얻은 조다당 CAL-0는 당 51.8%, 단백질 16.8%, 산성당 8.2%를 함유하고 있었고, TLC와 gas chromatography 분석 결과 중성당은 주로 arabinose, galactose와 glucose로, 산성당은 galacturonic acid로 구성되어 있음이 확인되었다(Table 1).

보체계 활성화 물질의 본체 확인

총당 51.8%와 16.8%의 단백질이 함유되어 있는 조다당 획분인 CAL-0의 보체계 활성화 본체를 파악하기 위하여 pronase처리에 의한 단백질 분해 및 periodate를 이용하여 다당부위를 선택적으로 산화시킨 후, 각각의 활성을 대조군인 CAL-0와 비교한 결과를 Fig. 3에 나타냈다. Pronase로 처리한 CAL-0에서는 보체계 활성능이 대조군에 비해 활성의 변화가 없었으나 CAL-0의 periodate 산화물은 활성이 20%이하로 급감하였다. 따라서 고추잎에서 유래된 조다당 획분의 활성은 단백질이 아닌 다당에 기인함을 알 수 있었다.

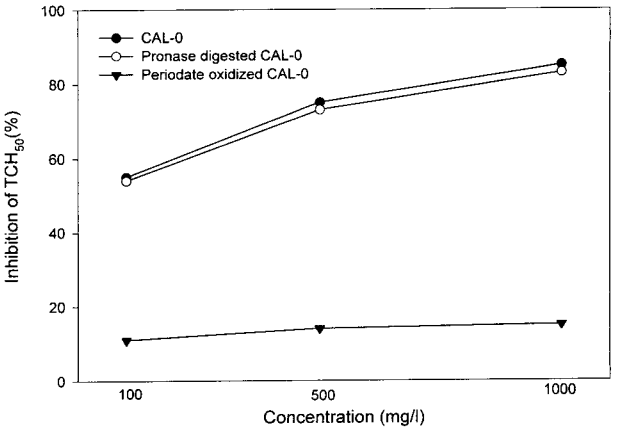

Fig. 3. Anti-complementary activities of pronase digested or periodate oxidized CAL-0. TCH_{50} is 50% of the total complement hemolysis.

항보체 활성 다당의 작용양식

보체계의 활성화 경로는 고전경로(classical pathway)와 부경로(alternative pathway)로 구성되어 있고, 고전경로에서는 Ca^{2+} 및 Mg^{2+}이온이, 부경로에서는 Mg^{2+}이온만이 각각 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 조다당 CAL-0를 대상으로 보체계 활성화의 두 경로 중 어느 경로를 통하여 보체계를 활성화는지를 파악하기 위해 GVB^{2+}

Table 1. Chemical composition of crude polysaccharide(CAL-0) and polysaccharide fractions from crude polysaccharide on DEAE Sepharose CL-6B ion exchange chromatography

	CAL-0	CAL-1 (H_2O)	CAL-2 (0.1M)*	CAL-3 (0.2M)	CAL-4 (0.3M)	CAL-5 (0.4M)	CAL-6 (0.5M)	CAL-7 (1 M)
								(%)
Total sugar	51.8	81.6	52.2	61.1	48.4	31.6	27.4	16.1
Uronic acid	8.2	0	0	12.2	20.0	15.5	0	0
Protein	16.8	13.4	7.8	14.1	6.2	24.4	45.7	49.2
Yield	31.0	19.8	19.0	30.0	22.2	4.4	3.8	1.8
						neutral sugar (molar ratio)		
Rhamnose	0.73	0.20	trace	0.58	1.60	1.70	0.57	0.73
Arabinose	1.14	1.14	0.94	1.08	1.35	0.78	1.02	1.08
Xylose	0.12	0.19	trace	trace	trace	0.13	trace	0.14
Mannose	0.23	0.68	0.12	trace	trace	0.23	0.41	0.36
Galactose	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Glucose	1.23	2.76	0.27	0.12	0.17	0.94	2.37	1.40

*The concentration of NaCl.

완충액 및 GVB^{2+} 완충액에서 Ca^{2+} 이온만을 제거한 Mg^{2+}-EGTA-GVB^{2-}를 사용한 경우와 2가 금속이온을 모두 제거한 10 mM EDTA-GVB^{2-}를 사용한 경우의 항보체 활성을 시료 100 mg/l의 농도에서 비교 측정하였다. EDTA-GVB^{2-} 반응계에서는 대조구에 비해 완전한 활성의 감소를 관찰할 수 있었으나 Mg^{2+}-EGTA-GVB^{2-} 반응계에서는 20% 정도의 활성이 유지됨을 알 수 있었다(Fig. 4). 따라서 고추잎으로부터 추출한 조다당 CAL-0는 보체계의 고전경로 뿐만 아니라 부경로도 활성화할 수 있음을 추측할 수 있었다.

교차 면역전기영동에 의한 C3 산물의 동정

고추의 조다당 CAL-0가 보체계의 고전경로 및 부경로 모두를 활성화하는 것을 확인하기 위해 교차 면역전기영동에 의한 C3의 분해산물 생성여부를 관찰하였다. CAL-0를 정상인의 혈청과 혼합하고 GVB^{2+}, EDTA-GVB^{2-} 및 Mg^{2+}-EGTA-GVB^{2-} 반응계에서 반응시킨 후 보체 활성화에 중요한 역할을 담당하고 있는 C3의 반응산물을 확인한 결과를 Fig. 5에 나타냈다. 그 결과 정상인 혈청만을 반응시킨 경우와 2가 금속이온을 모두 제거한 EDTA-GVB^{2-}에서는 C3의 활성화가 이루어지지 않은 것에 기인한 1개의 침강선만이 관찰된 반면, GVB^{2+}와 Ca^{2+}이온만 선택 제거한 Mg^{2-}- EGTA-GVB^{2-}에서는 각각 2개씩의 침강선을 관찰할 수 있었다. 특히 Mg^{2+}-EGTA-GVB^{2-} 반응계에서는 well로부터 두 번째 peak가 GVB^{2+} 반응계에서 보다 작게 나타났는

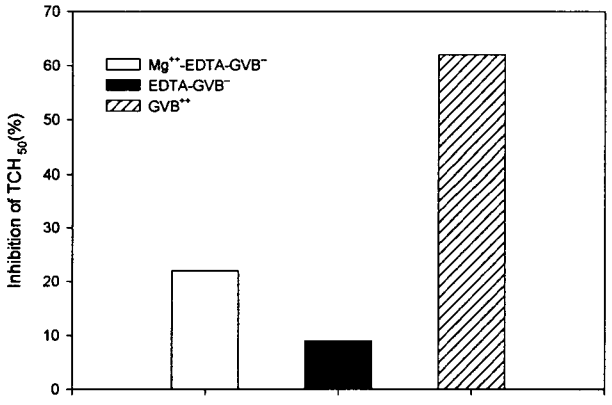

Fig. 4. Effect of Ca^{2+} and Mg^{2+} ions on the anti-complementary activity of the crude polysaccharide (CAL-0) from the leaves of *Capsicum annuum* L. TCH_{50} is 50% of the total complement hemolysis.

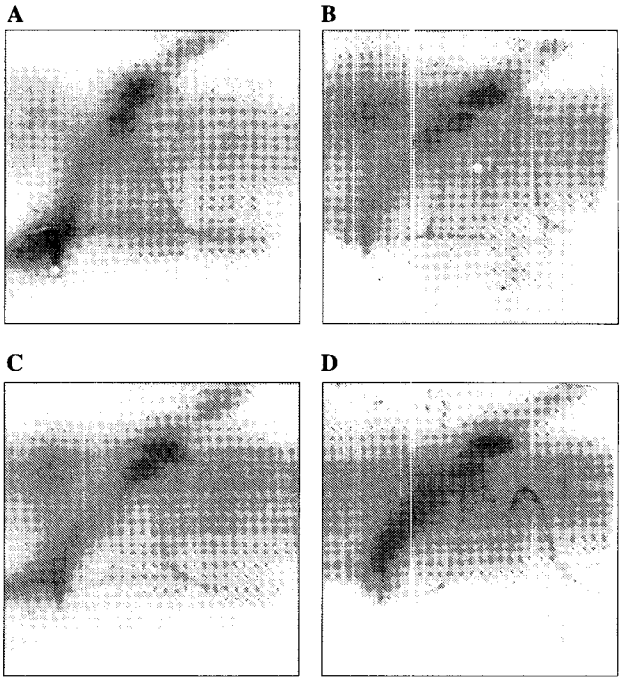

Fig. 5. Crossed immunoelectrophoresis of complement C3 component treated with CAL-0 in the presence or absence of Ca^{2+} ion. Normal human sera were incubated with PBS(A), CAL-0 with GVB^{2+}(B), CAL-0 with EDTA-GVB^{2-}(C) or CAL-0 with Mg^{2+}-EGTA-GVB^{2-}(D). Anode is to the right.

데 이는 well로부터 첫 번째 peak는 C3에, 두 번째 peak는 C3a 및 C3b에 기인한 침강선임을 고려할 때 부경로의 활성화가 상대적으로 낮음을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 고추잎의 활성 조다당 획분 CAL-0의 작용양식은 고전경로 뿐만 아니라 부경로도 활성화시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

조다당의 분획 및 정제

조다당 CAL-0를 DEAE Sepharose CL-6B 컬럼에서 이온교환 크로마토그래피를 행하여 1개의 비흡착획분(CAL-1)과 6개의 흡착획분(CAL-2→CAL-7)을 얻었다. 이들 획분의 수율은 0.2 M NaCl에서 용출된 획분인 CAL-3의 수율이 30%로 가장 높았으며 다음에 CAL-4, CAL-1, CAL-2의 순이었으나 0.4 M NaCl 이상의 용출 획분에서는 수율이 급격하게 감소하였다. 보체계 활성은 시료 100 mg/l의 농도에서 증류수 용출획분인 CAL-1이 다른 획분에 비해 다소

높게 나타났으며 0.1 M, 0.2 M, 0.3 M에서도 40~55% 정도의 활성을 나타냈다(Fig. 6). 이들 각각의 당함량, 단백질 함량, 산성당 함량을 측정한 결과 Table 1과 같이 총당의 함량은 비흡착 획분인 CAL-1이 81.6%로 가장 높았으며 산성당은 0.2 M, 0.3 M 및 0.4 M NaCl 획분에서 12~20%의 함량으로 나타났다. 단백질 함량은 0.5 M과 1 M NaCl 용출 획분에서 45% 이상의 높은 함량을 나타냈으나 항보체 활성은 상대적으로 낮았다. 구성당의 조성은 모든 획분에 arabinose와 galactose가 주 구성당으로 되어 있었으며 비흡착 획분인 CAL-1과 0.4 M NaCl 이상의 획분에서는 glucose 비율이 비교적 높게 나타났다. 또한 rhamnose는 CAL-4와 CAL-5에서 타 획분보다 높게 나타났다. 이온교환 크로마토그래피에 의해 얻어진 획분 중 활성이 높았던 CAL-2는 Sepharose CL-6B 컬럼(2.6×90 cm)을 이용한 겔 여과 크로마토그래피에서 고분자 획분과 저분자 획분으로 분리되었다(Fig. 7). 이 두 획분의 항보체 활성은 CAL-2-I에서 활성이 높게 나타났으며(Fig. 8), 표준 분자량 물질과 비교했을 때 약 61,000 정도의 분자량을 가지고 있는 것으로 나타났다.

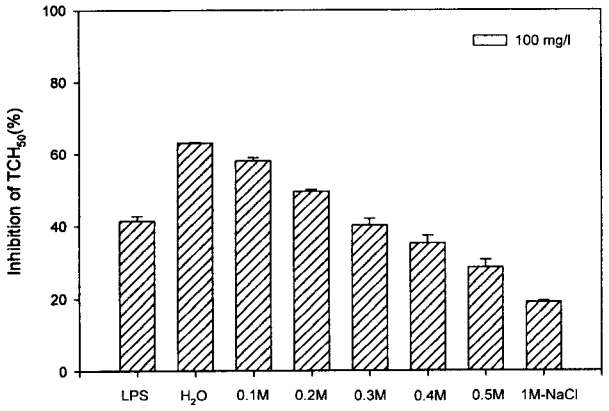

Fig. 6. Anti-complementary activities of polysaccharide fractions from crude polysaccharide(CAL-0) on DEAE Sepharose CL-6B ion exchange chromatography. TCH_{50} is 50% of the total complement hemolysis.

고 찰

자연계에 존재하는 식물체에는 강한 생리활성, 생체방어, 항상성 유지 등의 효능을 가진 저분자 및 고분자 물질이 함유되어 있어 이들로부터 유용물질을 분리하여 건강보

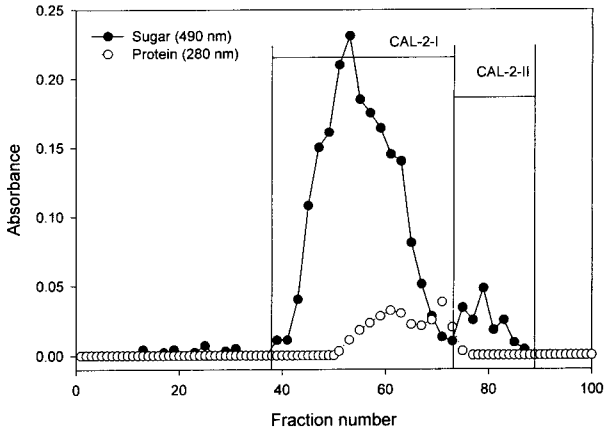

Fig. 7. Gel chromatography of CAL-2 on Sepharose CL-6B column. The column(2.6×99 cm) was eluted with 0.2 M NaCl.

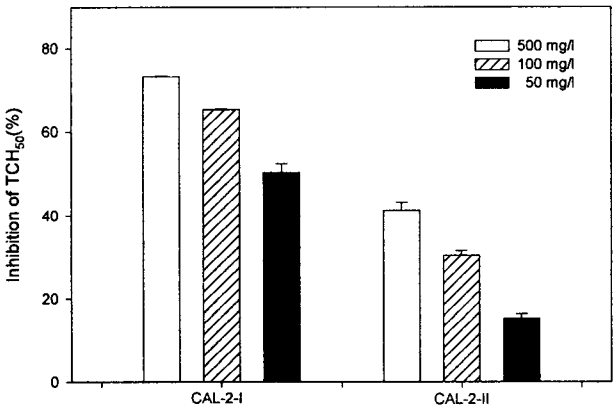

Fig. 8. Anti-complementary activities of polysaccharide fractions from CAL-2 on Sepharose CL-6B column. TCH_{50} is 50% of the total complement hemolysis.

조식품 및 의약품으로 개발하려는 노력이 계속되고 있으며 실제로 상용화된 제품도 있다. 이중 보체계를 활성화하는 물질로는 한약재, 담자균류 및 식물류의 다당류와 단백 다당들이 보고되어 있다. 식물성 식품재료 총 38 종을 대상으로 항보체 활성을 측정한 신 등[16]의 보고에서 돌나물, 달래, 시금치, 미나리, 부추, 취나물, 들깻잎 등의 식품으로 이용되는 채소잎들은 다른 식물체, 특히 한약재의 뿌리, 외피 혹은 줄기보다 활성이 낮은 것으로 보고되어 있다. 그러나 인삼잎은 인삼과 동일 수준의 높은 활성을 가지고 있는 것으로 보고되었으며[4], 본 연구에서 식품소재인 고추잎을 대상으로 항보체 활성을 조사한 결과 고추열매에서

높은 활성이 나타난 것과 마찬가지로 잎에서 조제한 조다당에서도 높은 활성이 관찰되었고, 시호, 당귀, 쑥, 대복피, 고사리 등에서와 같이 보체계 활성화 물질들이 다당에 기인한다는 보고와 일치하였다[20]. 식물성 식품재료 및 한약재에서 분리한 보체계 활성 다당의 조성은 매우 복잡하고 다양하여 활성과 당조성 사이의 정확한 관계를 밝히기는 매우 어려우나 버섯류의 경우에는 glucose로 구성된 glucan이 대부분이며 식물성 재료 및 한약재에서 분리한 활성 다당들은 arabinan, glucan, arabinogalactan처럼 다양한 당조성 및 비율로 구성되어 있다[12,23]. 고추잎에서 분리한 다당도 galacturonic acid, arabinose, galactose, glucose 및 rhamnose 등이 주요 구성당으로 되어 있어 고추, 당귀, 차전자, 쑥, 시호, 자근 등에서 분리된 보체계 활성화 다당들과 유사한 특성을 나타냈다. 또한 조다당 분획 CAL-2의 겔여과 크로마토그래피에서 얻은 고분자 획분이 저분자 획분보다 활성이 높은 것과 같이 동일한 재료에서 분리 정제된 경우 고분자 획분이 저분자 획분보다 일반적으로 활성이 높으나 활성을 가진 타 재료와의 분자량 비교에는 곤란한 점이 있으며, 복합산성다당의 경우 활성에 영향을 주로 미치는 것은 rhamnogalacturonan의 주쇄구조에 연결된 중성당 부분[17]으로 활성과 당조성 및 분자량과의 관계는 더 연구될 필요가 있다고 본다.

보체계의 활성화는 고전경로와 부경로를 통하여 활성화되는데 자근에서 분리된 arabinan[21], 차전자 중의 Plantago mucilage A[22] 등은 고전경로 및 부경로를 활성화하며, lentinan, inulin, zymosan, pachman 등의 다당들은 주로 부경로를 통하여, lipid A나 peniculatan 등은 고전 경로를 통하여 보체계를 활성화하는 것으로 알려져 있다[25]. 본 연구에서 분리한 고추잎의 다당은 고전경로 및 부경로 모두에 관여함이 밝혀졌으나 활성과 당조성 및 구조와의 상관관계에 대해서는 현재 연구 중이다.

요 약

고추잎의 열수추출을 행하여 추출물의 보체계 활성을 측정한 결과 열수추출물에서 높은 항보체 활성이 나타나 고추잎의 열수추출물을 대상으로 활성 다당을 분리하여 특성을 조사하였다. 즉 열수추출물의 메탄올 환류, 에탄올 침전, 투석 및 동결건조를 통하여 고추잎 600 g으로부터 186 g의 조다당(CAL-0)을 얻었다. CAL-0는 당 51.8%, 산성당 8.2%, 단백질 16.8%를 함유하고 있었으며 주로 arabinose, glucose, galactose로 구성되어 있었다. 조다당 CAL-0는 pronase 처리에서 활성의 변화가 없었으나 과요오드산 산화에 의해서 급격히 활성이 감소하였다. 또한 CAL-0의 항보체 활성은 Ca^{2+}이온 존재 유무시의 항보체 활성과 교차면역 전기영동 결과 고전경로와 부경로를 통하여 보체계를 활성화하는 것이 관찰되었다. 이 조다당 CAL-0를 DEAE Sepharose CL-6B을 사용하여 0→1 M NaCl로 이온교환 크로마토그래피를 행하여 1개의 비흡착획분과 6개의 흡착획분을 얻었다. 이중 증류수(CAL-1)와 0.1 M NaCl에서 용출된 획분(CAL-2)이 다른 획분에 비해 높은 보체계 활성을 보였으며 활성 획분들에서는 주로 arabinose, galactose, glucose가 다양한 비율의 몰비로 구성되어 있었다. CAL-2 획분은 Sepharose CL-6B의 gel filtration에서 고분자 peak와 저분자 peak로 분리되었으며 항보체 활성은 분자량 61,000 정도의 고분자 획분에서 높게 나타났다.

감사의 글

본 연구는 1999년 대구대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었음.

참 고 문 헌

1. Benjamini, E. and S. Leskowitz. 1991. *In Immunology.* pp. 121-125, Alan R. Liss, Inc., New York.
2. Blumenkranz, N. and G. Asboe-Hansen. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* **54,** 484-489.
3. Dubios, M. K. A., T. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* **28,** 350-356.
4. Gao, Q. P., H. Kiyohara, J. C. Cyong and H. Yamada. 1989. Chemical properties and anti-complementary activities of polysaccharide fractions from roots and leavses of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Planta Med.* **55,** 9-12.
5. Hikino, H. and T. Mizuno. 1989. Hypoglycemic actions of some heteroglycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta. Med.* **55,** 385-389.

6. Jones, T. M. and P. O. Albersheim. 1972. A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharide. *Plant Physiol.* **49,** 926-936.
7. Kabat, E. A. and M. M. Mayer. 1964. *Experimental Immunology.* pp. 133-156, 2nd eds., Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illinois.
8. Kweon, M. H., K. S. Ra and H. C. Yang. 1995. Partial structure of the neutral side chain of PA-IIa-1, an anti-complementary polysaccharide isolated from bracken. *Foods and Biotech.* **4(2),** 101-107.
9. Kweon, M. H., M. K. Park, K. S. Ra, H. J. Sung and H. C. Yang. 1996. Screening of anticoagulant polysaccharides from edible plants. *Korean J. Agri. Chem. Biotech.* **39(2),** 159-164.
10. Kweon, M. H., H. H. An, K. S. Shin, K. S. Ra, H. J. Sung and H. C. Yang. 1997. Purification of complement system-activating polysaccharide from hot water extract of young stems of *Cinnamomum cassia* Blume. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29(1),** 1-8.
11. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, L. Farr and R. J. Rindall. 1951. Protein mesurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193,** 265-275.
12. Oh, B. M., M. H. Kweon and K. S. Ra. 1994. Isolation and characterization of acidic polysaccharides activating complement system from the hot water extracts of *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum. Korean J. Food & Nutri.* **7(3),** 159-168.
13. Pillemer, L., M. D. Schoenberg, L. Blum and L. Wurz. 1955. Properdin system and immunity. II. Interaction of the properdin system with oligosaccharides. *Science* **122,** 548-551.
14. Ra, K. S., H. Yamada, H. J. Sung, J. C. Cyong and H. C. Yang. 1989. Purification and chemical properties of anti-complementary polysaccharide from Capsici Fructus. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **32(4),** 378-385.
15. Shin, K., K. S. Ra and K. H. Paik. 1992. Purification and characterization of complement system activating polysacchride from the bark of *Kalopanax pictus* N. *Mokchae Konghak* **20(4),** 73-84.
16. Shin, K. S., K. S. Ra, H. J. Sung and H. C. Yang. 1993. Screening of complement-system activating polysaccharide from edible plants and its action mode. *Korean J. Food Sci. Technol.* **25(3),** 197-203.
17. Shin, K. S., H. Kiyohara, T. Matsumoto and H. Yamada. 1998. Rhamnogalacturonan II dimers cross-linked by borate diesters from the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer are responsible for expression of their IL-6 production enhancing activities. *Carbohydr. Res.* **307,** 97-106.
18. Tomoda, M., N. Shimizu, M. Kanari, R. Gonda, S. Arai and Y. Okuda. 1990. Characterization of two polysaccharides having activity on the reticuloendothelial system from the root of *Glycyrrhiza uralensis. Chem. Pharm. Bull.* **38(6),** 1667-1671.
19. Usui, T., Y. Iwasaki and T. Mizuno. 1983. Isolation and characterization of antitumor active β-D-glucans from the fruit bodies of *Ganoderma applanatum. Carbohydr. Res.* **115,** 273-280.
20. Yamada, H., K. Ohtani, H. Kiyohara, J. C. Cyong, Y. Otsuka, U. Yoshino and S. Omura. 1984. Purification and chemical properties of anti complementary polysaccharide from the leaves of *Artemisiae princeps. Planta Medica* **50,** 121-125.
21. Yamada, H., J. C. Cyong and Y. Otsuka. 1986. Purification and characterization of complement activating-acidic polysaccharide from the root of *Lithospermum euchromum. Int. J. Immunopharmac.* **8(1),** 71-82.
22. Yamada, H., T. Nagai, J. C. Cyong and H. Otsuka. 1986. Relationship between chemical structure and activating potencies of complement by an acidic polysaccharide, plantago-mucilage A, from the seed of *Plantago asiatica. Carbohydr. Res.* **156,** 137-145.
23. Yamada, H., H. Kiyohara, J. C. Cyong and Y. Otsuka. 1987. Structural characterization of an anti-complementary arabinogalactan from the roots of *Angelica acutiloba* KITAGAWA. *Carbohydr. Res.* **159,** 275-291.
24. Yamada, H., K. S. Ra, H. Kiyohara, J. C. Cyong and Y. Otsuka. 1988. Characterization of anti-complementary neutral polysaccharide from the roots of *Bupleurum falcatum. Phytochem.* **27,** 3163-3168.
25. Yamada, H. and H. Kiyohara. 1989. Bioactive polysaccharides from Chinese herbal medicines. *Abstract of Chinese Medicines* **3(1),** 104-124.
26. Yu, K. W. and K. S. Shin. 2001. Bone marrow cell proliferation activity through intestinal immune system by the components of *Atractylodes lancea* DC. *Korean J. Food Sci. Technol.* **33(1),** 135-141.

(Received January 25, 2002; Accepted February 18, 2002)