

감나무잎 폴리페놀의 기능성 소재로서 산업적 활용

안 봉 전
경산대학교 생명자원공학부

An Industrial Application for Functional Materials and Polyphenols Isolated from the Korean Persimmon Leaves

서 론

감나무(*Diospyros kaki*)는 우리나라 중부 이남에서 잘 자라고, 열매인 감은 한국, 중국, 일본이 그 산지로 우리나라와 일본에서 가장 널리 재배되고 있는 과실로서 경제성이 높아 재배면적과 생산량이 최근 급격히 증가하고 있는 추세이다. 감잎(*Diospyros kaki* L. folium)에는 플라보노이드 배당체, 탄닌, 페놀류, 수지, 카큐민류 화합물, 환원당, 다당, 정유, 유기산, 엽록소를 함유하며 그 중에 탄닌이 다량 함유되어 있어 이것과 그 화합물들은 여러 가지 생물학적 활성과 함께 약리작용을 나타낸다는 보고들이 많다. 감잎의 생리활성 물질인 탄닌은 여러 가지 축합형 탄닌의 혼합물로 (-)-epicatechin, (+)-catechin, phloroglucinol, (+)-catechin, (+)-catechin-3-gallate, (+)-gallocatechin, (+)-gallocatechin-3-gallate 등과 같은 flavan-3-ol 화합물과 proanthocyanidin에 속하는 축합형 tannin이 많은 것으로 알려지고 있다. Uchida 등은 축합형 탄닌이 활성탄소의 free radical 억제 효과가 있음을 확인하였고, 그 밖에 감잎 플라보노이드의 항산화 활성, 항암효과 및 감잎에서 분리한 축합형 탄닌의 tyrosinase 억제효과 등 많은 보고가 있다.

최근 국민건강을 위한 건강보조식품의 활성화 및 기능성 화장품법의 시행 등으로 점차 새로운 기능성 원료의 개발이 각 분야에서 앞다퉀 진행되고 있는 실정이다. 그러나 순수 국산 원료를 이용한 새로운 기능성 원료의 개발이 극히 드문 실정이다. 따라서 한국산 감잎을 이용하여 건강식품 및 기능성 화장품 원료로서의 과학적 근거를 제시하고자 한국산 감잎으로부터 생리활성 물질로 검증된 polyphenol 화합물을 분리 및 정제하여, 고혈압, 통풍, 충치 예방 과 항산화작용, tyrosinase 억제효과 및 항균작용 등을 관찰하였다. 본 실험의 결과들은 물질 특허(2건)를 획득하였으며 국내외 다수의 논문이 발표되었고 현재 화장품소재로서 해외 수출을 위해 산.학.연 공동연구 진행중에 있으며 생물소재로서는 우리 나라 처음으로 미국화장품원료 회사에 수출하기 위한 계약을 체결하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 감잎은 경상북도 청도반시, 상주등시 및 경상남도 창녕부유 감나무의 잎을 채집한 후 이물질을 제거하고 세척한 후 본 실험에 사용하였다.

시료추출 및 정제

추출은 안 등이 개발한 축합형탄닌 추출법에 준해 행하였다. 감잎을 추출 탱크에서 80% 에탄올에 침지하여 상온에서 24시간 방치한 후 원심분리하여 상등액을 취했다. 침전물은 다시 위와 같은 조건으로 6회 반복하여 상등액을 모아 감압 농축하여 에탄올을 증발시킨 후 수용성 성분만을 회수하기 위하여 증류수로 용해하였다. 용해한 후 여과하여 클로로필을 제거한 다음, 여액을 회수하여 분리용 시료로 사용하였다. 분리에 사용된 크로마토그래피 고정상은 Nonaka 등의 방법에 준하여 행하였다. 즉, 분리용 column은 Sephadex LH-20에 약 300 mL의 분리용 시료를 loading하고, 전개용매로는 에탄올을 사용하여 에탄올 : 증류수(0 : 1 → 1 : 0)로 용출하면서, silicagel TLC(Thin Layer Chromatography)에 의해 polyphenol 화합물을 분류하여 Fraction I, II 및 III로 분리하여 동결건조시킨 것을 냉동 보관하면서 실험재료로 사용하였다.

Thin Layer Chromatography에 의한 동정

Column에 의해 용출된 각 분획물은 silicagel TLC(5.0 × 5.0cm)에 전개하였다. 전개 용매는 benzene : ethylformic acid : formic acid = 1 : 7 : 1, 1 : 7 : 2, 2 : 7 : 1, 2 : 5 : 1의 비율로 사용하였고 전개하여 건조시킨 후 280nm에서 분리 정도를 우선 확인하고 정색 반응을 위한 발색 시약으로 1% FeCl₃/MeOH 및 anisaldehyde-H₂SO₄ 용액을 사용하여 반응 물질의 형태, 전개 정도, 반응 색의 강도 등으로 폴리페놀 화합물을 확인하였다.

Total phenol 함량

총 페놀의 함량측정은 Folin-Dennis법에 준하여 실시하였으며, 감잎 시료 3mL를 시험관에 취한 후 phenol reagent 1mL를 넣고 잘 혼합하여 5분간 반응시킨다. 여기에 1mL의 탄산나트륨 포화용액을 넣고 혼합하여 실온에서 1시간 방치시킨 후 분광광도계로 640nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 (+)-catechin(Sigma, USA)를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 mg% 함량으로 환산하였다.

Xanthine oxidase(XOase)저해활성측정

XOase 활성저해 측정은 Storch 등의 방법에 준하여 측정한다. 즉, 반응구는 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 xanthine 2mM을 녹인 기질액 1mL에 효소액 0.1mL와 탄닌용액 0.1mL를 가하고 대조구에는 탄닌 대신 증류수를 0.1mL 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시키고 20% trichloroacetic acid(TCA) 1mL를 가하여 반응을 종료시키고 원심분리하여 단백질을 제거한 후 반응액 중에 생성된 uric acid를 흡광도 292nm에서 측정하여 다음 식으로 저해율을 구한다.

$$\text{저해율(\%)} = 1 - \frac{\text{반응구의 uric acid 생성량}}{\text{대조구의 uric acid 생성량}} \times 100$$

Angiotensin Converting Enzyme(ACE) 저해 활성 측정

ACE 저해효과 측정은 Cushman 등의 방법에 의하여 행한다. 즉, 반응구는 0.3M NaCl을 함유하는 0.1M Potassium phosphate buffer(pH 8.3)에 기질 (Hippuryl-L-histidyl-L-leucine : HHL) 2.5ml, ACE 0.1ml와 탄닌용액 0.1ml를 혼합하며, 대조구는 탄닌대신 증류수 0.1ml를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시키고 1N-HCl 0.35ml 첨가로 반응을 중지시킨 뒤 3ml의 EtOAc를 첨가한다. EtOAc층으로 부터 용매를 증류시킨 잔사에 2ml의 증류수를 첨가하여 추출된 hippuric acid를 흡광도 280nm에서 측정한다.

Glucosyltransferas(GTase) 저해 활성 실험

GTase 저해활성측정은 안 등의 방법에 의해 행하였다. 시험관내 기질용액 0.8 ml, 효소액 0.02ml에 조제된 화합물을 첨가하고 최종 1ml로 한 후 30° 경사에서 37°C에서 16시간 반응시켰다. 반응 후 증류수 3ml을 가해 2회 세척하고 부착된 글루칸을 초음파로 분쇄한 후 spectrophotometer를 사용하여 550nm에서 글루칸 형성량을 측정함으로 저해도를 나타내었다.

Tyrosinase 저해효과

효소의 활성저해능 측정은 Yagi 등의 방법에 준하여 실험을 실시하였고, 35°C 수조에서 온도를 미리 조정된 0.175M phosphate buffer(pH 6.8) 0.2mL, 10mM L-DOPA solution 0.2mL 및 시료 용액 0.5mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase(110 units/mL) 0.1mL를 첨가하여 35°C에서 반응시킨 다음 475nm에서 단위시간당 변화된 초기흡광도의 변화값(S_{Abs})과 효소액 대신에 증류수 0.1mL를 첨가하여 흡광도를 측정한 값(B_{Abs}), 시료 용액 대신에 증류수 0.5mL를 첨가하여 동일한 방법으로 흡광도를 측정한 값(C_{Abs})을 측정하여 다음의 식에 의해 계산하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{S_{Abs} - B_{Abs}}{C_{Abs}} \right) \times 100$$

전자공여능(DPPH) 측정

추출물의 전자공여작용(Electron donating abilities, EDA)은 Blois의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 시료 1.0mL에 2×10^{-4} M의 α, α -diphenyl- β -picryl-hydrazyl(DPPH) 1.0mL를 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료와 DPPH 첨가구의 흡광도를 측정한 값(S_{Abs})과 시료와 DPPH 대신 증류수를 첨가한 흡광도를 측정한 값(B_{Abs}), 시료용액 대신에 증류수를 첨가하여 동일한 방법으로 흡광도를 측정한 값(C_{Abs})을 측정하여 다음의 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Electron donating ability(\%)} = \left(1 - \frac{S_{\text{Abs}} - B_{\text{Abs}}}{C_{\text{Abs}}} \right) \times 100$$

SOD 유사활성능 측정

Superoxide dismutase(SOD) 유사활성능은 Marklund의 방법에 따라 각 시료액 0.2mL에 tris-HCl의 완충용액(50mM tris + 10mM EDTA, ph 8.5) 3.0mL와 7.2mM pyrogallol 0.2mL를 가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1.0N HCl 0.1mL를 가하여 반응을 정지시키고 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420nm에서 측정한 값(S_{Abs})과 pyrogallol 대신에 buffer를 첨가하여 흡광도를 측정한 값(B_{Abs}), 시료대신 buffer를 첨가하여 흡광도를 측정한 값(C_{Abs})을 측정하여 다음의 식에 의해 계산하였다.

$$\text{SOD-like activity(\%)} = \left(1 - \frac{S_{\text{Abs}} - B_{\text{Abs}}}{C_{\text{Abs}}} \right) \times 100$$

Xanthine oxidase(XOase) 저해효과

XOase 활성저해 측정은 Stirpe와 Corte의 방법을 변형시켜 행하였다. 즉 반응구는 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 0.5mL에 xanthine 2mM을 녹인 기질액 1.0mL에 효소액 0.1mL(40 mU/mL)와 시료용액 0.5mL를 가하고 37°C에서 5분간 반응시키고 1 N HCl 1mL를 가하여 반응을 종료시킨 다음 반응액 중에 생성된 uric acid를 흡광도 292nm에서 흡광도를 측정한 값(S_{Abs})과 효소액 대신 buffer를 첨가하여 흡광도를 측정한 값(B_{Abs}), 시료대신 buffer를 첨가하여 흡광도를 측정한 값(C_{Abs})을 측정하여 다음의 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Xanthine oxidase activity(\%)} = \left(1 - \frac{S_{\text{Abs}} - B_{\text{Abs}}}{C_{\text{Abs}}} \right) \times 100$$

항균력 측정

항균력 시험은 paper disc(φ 8mm, Advantec 27)법으로 실시하였다. 즉, 추출액을 membrane filter(0.2 μm)로 제균시키고 25μl씩 paper disc 표면에 흡수시킨 다음 용매를 제거하였다. 이 disc를 미리 배양한 균액을 100μl씩 도말한 TSA(Tryptic Soy Agar) plate 표면에 얹어 37°C에서 40시간 동안 배양한 후 disc 주위의 clear zone의 직경(mm)으로 항균 활성을 측정하였다. 이때 사용한 균주는 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* IFO No.3972로 그람 양성균 2종, 그람음성균 1종을 선정하였으며 배지는 Tryptic soy agar 배지를 사용하였다.

미생물의 증식저해효과 측정

각 Fraction을 membrane filter(0.2 μm , pore size)로 제균시키고, 액체배지에 각 추출물의 고형분을 기준으로 각 농도별(ppm)로 첨가한 후 여기에 활성화된 배양액 0.1ml를 접종하여 30°C에서 2일간 배양하면서 5시간 마다 spectrophotometer로 620nm에서 흡광도를 비교하여 미생물 증식 정도를 비교하였다.

결과 및 고찰

폴리페놀화합물의 순수 정제 및 구조

Sephadex LH-20, MCI-gel 및 Bondapak C₁₈ column에 의하여 F-1, F-2, F-3의 fraction으로 분획한 후 F-1 fraction에서 compound 1~4까지 4종류의 화합물, F-2 fraction에서는 compounds 5, 6화합물, F-3 fraction에서 compound 7, 8, 9화합물을 순수정제하여 재결정하였다. 감잎으로부터 통풍치료, 미백효과, 고혈압 억제효과의 개발목적으로 9종의 flavan-3-ol 화합물을 분리하였고 기기분석에 의해 화학구조를 밝혔다. 각 화합물은 (+)-catechin, (+)-gallocatechin, procyanidin B-1, pyrocyanidin C-1, prodelphinidin B-3, gallocatechin-(4 α →8)-catechin과 감나무 잎에서 새로운물질인 procyanidin B-7-3-O-gallate, procyanidin C-1-3'-3''-3'''-O-trigallate, (-)-epigallocatechin-(4 β →8)-epigallocatechin-(4 β →8)-catechin 3종류를 발견하였다.

순수정제물에 대한 생리활성효과

감잎으로부터 순수 분리한 polyphenol류의 ACE 저해활성측정을 실험한 결과 procyanidin B-7-3-O-gallate는 100 μM 농도에서 94%의 저해효과를 나타내었으며 epigallocatechin-(4 β →8)-epigallocatechin-(4 β →8)-catechin, procyanidin C-1-3'-3''-3'''-O-trigallate는 각각 90.69, 80.90% 저해를 하였다. Xanthine oxidase 저해활성측정을 조사한 결과 procyanidin B-7-3-O-gallate와 procyanidin C-1-3'-3''-3'''-O-trigallate 즉, gallate가 붙은 호합물에서 100 μM 의 농도에서 66%와 63%의 강한 저해효과를 나타냈다. Tyrosinase 저해활성을 측정한 결과는 procyanidin C-1-3'-3''-3'''-O-trigallate는 100 μM 에서 70%의 강한 저해효과를 나타냈으며, epigallocatechin-(4 β →8)-epigallocatechin-(4 β →8)-catechin는 51%의 저해효과를 나타내었다. 여기에 관한 물질 특허(2건)를 획득하였으며 국내외 다수의 논문이 발표되었다. 현재 화장품소재로서 해외 수출을 위해 산업체와의 공동연구로 생물소재로서는 우리 나라 처음으로 미국화장품원료 회사에 수출하기 위한 계약을 체결하였다.

총 페놀함량 측정

한국산 감잎의 폴리페놀 화합물을 건강식품 및 화장품 원료로서의 가능성을 검증하기 위하여 정제 과정을 통해 Fraction I, II, III로 분리하였다. 이 시료들의 총 페놀함량을 측정한 결과 Fig. 2.과 같이 나타났으며, Fraction I은 20%인데 반해 Fraction II와 III에서는 각각 70, 82.7%로 높은 함량을 나타내었다.

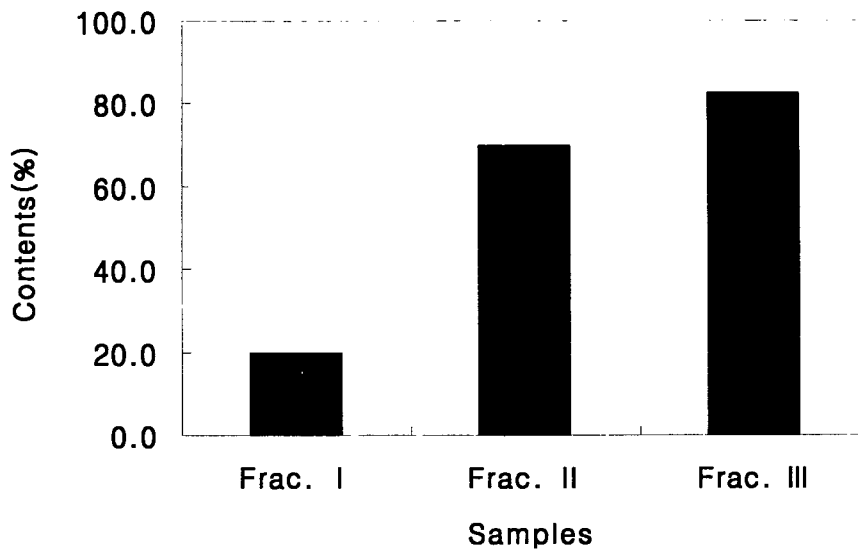


Fig. 1. The contents of total phenols

Tyrosinase 저해 효과

Fraction I, II, III로 분리한 시료를 농도에 따른 tyrosinase 저해효과를 확인하기 위해 실험한 결과 Fig. 3과 같이 나타났다. 각 분획별 농도를 50~1,000 ppm으로 조제하여 실험한 결과 폴리페놀의 함량이 적은 Fraction I의 저해율이 가장 낮게 나타남을 알 수 있었고, Fraction II는 Fraction III보다 낮은 저해율을 나타내었지만 500 ppm에서 50%이상의 저해율을 나타내었다. 폴리페놀의 함량이 많은 Fraction III이 가장 높은 저해율을 나타내었는데, 50 ppm과 500 ppm에서 각각 51.7%, 74.2%로 아주 높은 저해율을 나타내었다. 이러한 결과들을 볼 때 감잎 폴리페놀류의 tyrosinase 억제효과를 확인할 수 있었고, 미백효과 신소재로서의 이용가능성을 엿볼 수 있었다.

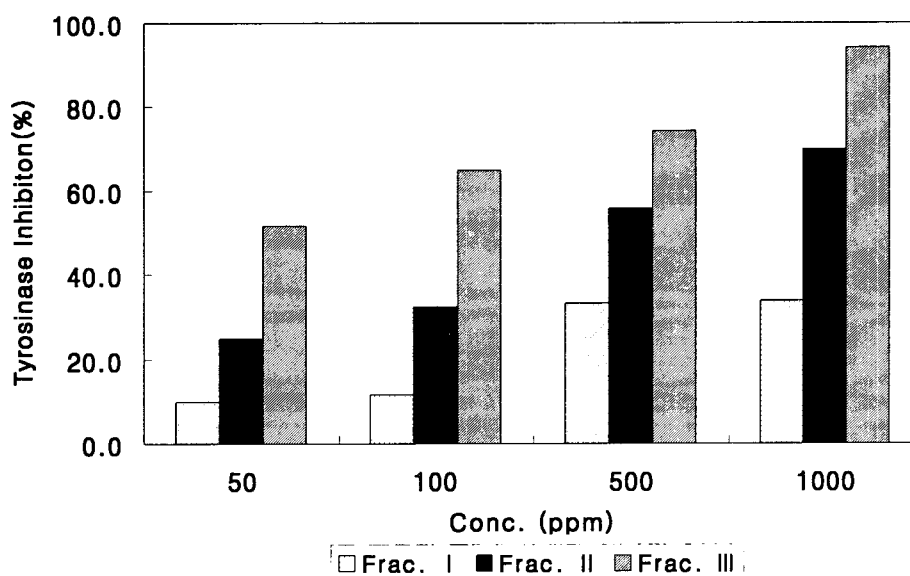


Fig. 2. Inhibition effect of isolated persimmon leaves on the in vitro melanin synthesis by tyrosinase

전자공여능(DPPH) 측정

수소 공여능 측정에 사용된 DPPH는 안정한 자유라디칼로서 그것의 비공유전자로 인해 517nm 부근에서 최대 흡수치를 나타내는데 전자 또는 수소를 받으면 517nm 부근에서의 흡광도가 감소하며 다시 산화되기 어렵다. 따라서 감잎의 각 분획물이 이러한 라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 크다면 높은 항산화 활성 및 활성 산소를 비롯한 다른 라디칼에 대한 높은 소거활성을 기대할 수 있다. 감잎 폴리페놀의 각 분획별 전자공여능을 측정결과는 Fig. 4.과 같이 나타났으며, 각 분획별 농도를 50~1,000 ppm으로 조제하여 실험한 결과 폴리페놀의 함량이 적은 Fraction I부터 Fraction III까지 모두 50 ppm에서 80% 이상의 높은 전자공여능을 나타내었고 500 ppm에서는 모두 90% 이상의 전자공여능을 나타내었다. 항산화제의 일반적인 작용을 수소공여능만으로 설명할 수는 없으나, 전자공여능 측정을 통한 감잎 폴리페놀의 항산화능을 인정할 수 있었고, 항산화 신소재로서 가능성 또한 확인할 수 있었다.

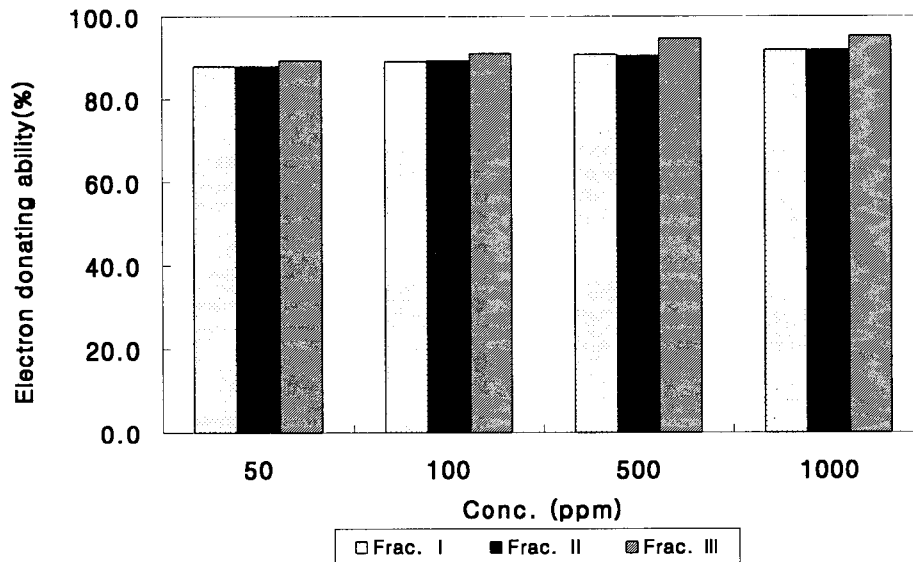


Fig. 3. Electron donating abilities of isolated persimmon leaves

SOD 유사활성능 검증

Superoxide dismutase(SOD)는 생체내에서 superoxide radical을 산소로 산화시켜주는 천연 항산화제로 알려져 있다. 그러나 SOD는 분자량이 비교적 큰 단백질 물질로 체내에 쉽게 흡수되지 못하고 단점을 가지고 있어 SOD와 유사한 활성을 가지면서도 SOD의 단점들을 보완할 수 있는 저분자 물질에 관한 연구가 진행되고 있으며 그 중에서 Nice 등⁽¹⁷⁾은 SOD 정제시 열안정이 뛰어나고 SOD와 유사한 활성을 나타내는 물질을 함께 정제하였는데 이를 SOD와 결합된 phenol류 물질인 것으로 보고한 바 있다. 따라서 산화방지는 물론 노화억제와도 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있는 SOD 유사활성능 측정을 위해 감잎 각 분획물을 50~1,000ppm으로 조제하여 효과를 측정한 결과 Fig. 5와 같이 나타났다. Fraction I, II, III 모두가 100ppm의 농도에서는 비교적 낮은 활성능을 보여주었으나 500ppm 이상에서는 강한 활성능을 나타내었다. Fraction II와 III은 1,000ppm에서 각각 95.3%, 98.7%로 아주 강한 활성능을 나타내었다. 폴리페놀의 함량이 높을수록 강한 활성능을 나타낸 것으로 보아 감잎 폴리페놀의 높은 SOD 유사활성능을 인정할 수 있었다.

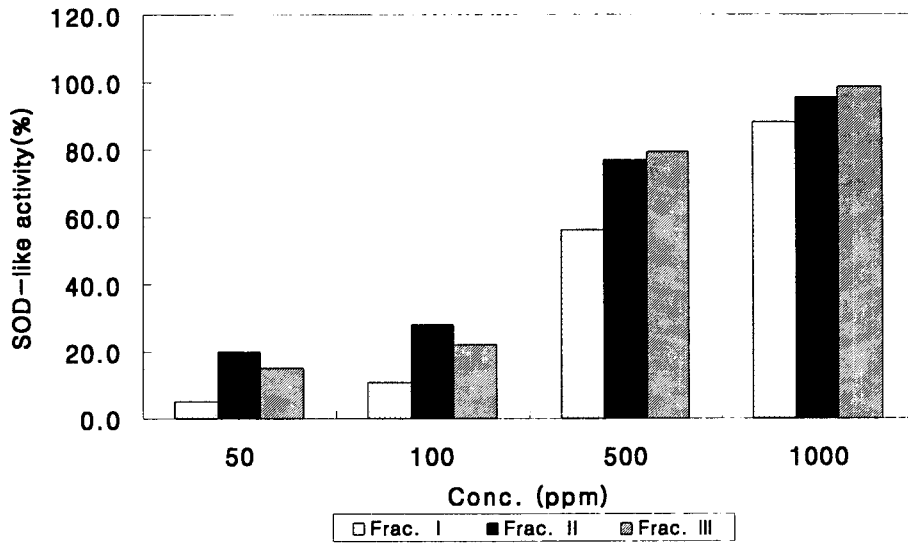


Fig. 4. SOD-like activity of isolated persimmon leaves

Xanthine oxidase 활성 저해 효과

Xanthine과 xanthine oxidase 반응의 생성물인 uric acid는 통풍의 원인이 되기도 하는데, 이 효소의 저해효과는 유리 라디칼의 생성 억제와 더불어 생물학적으로 중요한 의의를 가진다고 할 수 있다. xanthine oxidase의 저해물질로는 다양한 탄닌류 및 관련 페놀성 물질들이 보고되어 있는 바 감잎 폴리페놀류의 xanthine oxidase 활성저해효과를 각 분획물의 농도별로 실험한 결과 Fig. 6과 같이 나타났 다. Fraction I, II, III 모두가 100ppm의 농도에서 80.0%를 넘는 높은 저해율을 나타내었다. 감잎 폴리페놀의 이러한 결과는 Hatano 등의 효소의 저해활성과 라디칼 소거능간의 상관관계는 찾을 수 없 지만 xanthine oxidase를 강하게 저해하는 ellagic acid와 같은 탄닌 및 관련 물질들이 라디칼 소거능도 공유한다고 발표한 것과 일치하였다.

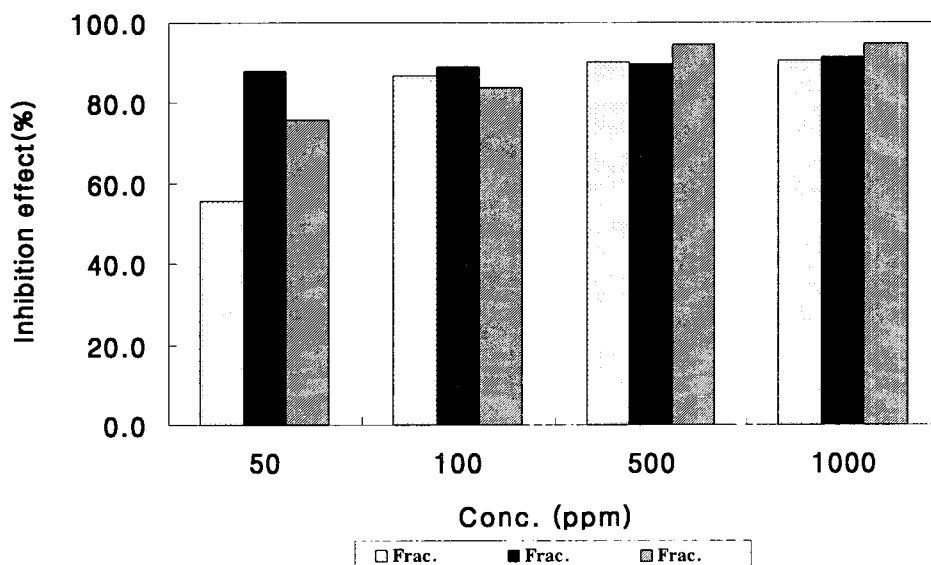


Fig. 5. Inhibition effect of isolated persimmon leaves by xanthine oxidase

각 Fraction별 항균효과

감염 각 Fraction의 농도별 균주에 대한 항균력 측정결과는 Fig.과 같이 나타났다. Fraction I의 경우, *Staphylococcus aureus*에 대하여 항균활성을 보였으나, 그 외 *E. coli*, *Staphylococcus epidermidis*에 대해서는 항균력을 보이지 않았다. Fraction II와 III은 II의 경우 그람양성균과 그람음성균주에서 광범위하게 생육저해 효과가 나타났으나, Fraction III은 대장균에서는 항균활성을 보이지 않았으나, *Staphylococcus aureus*와 *Staphylococcus epidermidis*에 대하여 강한 증식억제효과를 보였다. 본 실험에서는 피부상재균인 그람양성균 2종과 그람음성균 1종에 대해 항균력을 조사한 결과, Fraction II의 경우 그람양성균과 그람음성균주에서 광범위하게 생육저해 효과를 보여주었고 특히, Fraction I, II, III 모두가 그람양성균에 대하여 더 강한 증식억제효과가 있는 것으로 분석되었다. 정은 손바닥 선인장의 추출물의 경우 에탄올 추출물의 경우 그람양성세균과 그람음성세균에서 광범위하게 활성이 나타났고, 특히 그람양성균에 대하여 더 강한 증식억제효과가 나타났다고 보고하여 본 실험의 결과와 유사한 경향을 나타냈다.

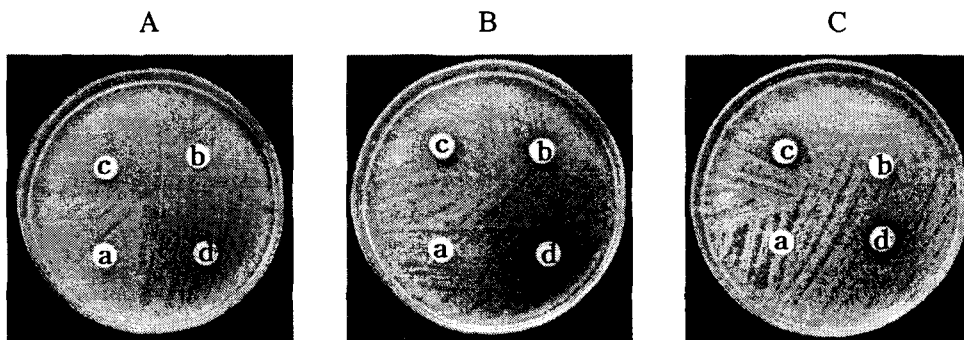


Fig. 6. Inhibitory effect of Fraction I on the growth of microorganisms.

A : *E. coli*, B : *S. aureus*, C : *S. epidermidis*

a: 0 mg/disc(control), b: 0.25mg/disc, c: 0.75mg/disc, d: 1.25mg/disc

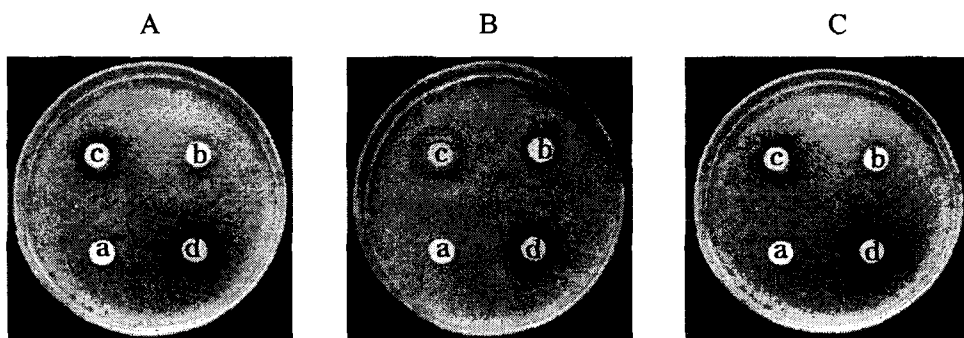


Fig. 7. Inhibitory effect of Fraction II on the growth of microorganisms.

A : *E. coli*, B : *S. aureus*, C : *S. epidermidis*

a: 0 mg/disc(control), b: 0.25mg/disc, c: 0.75mg/disc, d: 1.25mg/disc

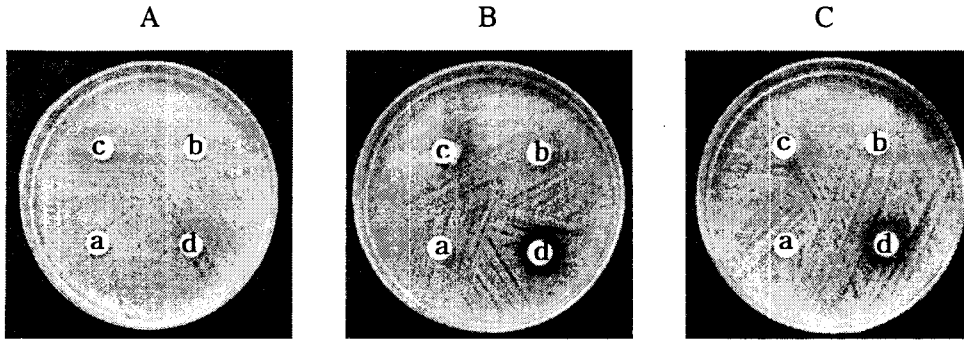


Fig. 8. Inhibitory effect of Fraction III on the growth of microorganisms.

A : *E. coli*, B : *S. aureus*, C : *S. epidermidis*

a: 0 mg/disc(control), b: 0.25mg/disc, c: 0.75mg/disc, d: 1.25mg/disc

미생물의 증식저해효과

농도를 달리한 감잎 각 Fraction이 시험균주의 생육에 미치는 영향을 측정한 결과는 Fraction I을 보면 *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228에 대해서 1,000ppm의 농도에서 증식억제효과가 뚜렷하게 나타남을 알 수 있었으나, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923와 *Escherichia coli* IFO No.3972에 대해서는 농도에 따라 차이를 보이긴 하지만 민감한 반응을 보여주지는 못하였다. 그러나 Fraction II의 경우, 모든 균에서 500 ~ 1,000 ppm 첨가시 실험구는 뛰어난 항균효과를 보여 배양 2일동안 증식이 완전히 억제되었고 Fraction III은 그람음성균인 *Escherichia coli* IFO No.3972에 대해서는 증식억제효과가 떨어짐을 알 수 있었다. 따라서 본 실험에서는 각 Fraction에 따라, 첨가 농도의 범위에 따라 증식억제효과가 다름을 알 수 있었고, 그람음성균보다 그람양성균에 대하여 효과적으로 성장을 억제하는 것으로 나타났다.

요 약

감잎으로부터 통풍치료, 미백효과, 고혈압 억제효과의 개발목적으로 9종의 flavan-3-ol 화합물을 분리하였고 기기분석에 의해 화학구조를 밝혔다. 각 화합물은 (+)-catechin, (+)-gallocatechin, procyanidin B-1, pyrocyanidin C-1, prodelphinidin B-3, gallocatechin-(4 α →8)-catechin과 감나무 잎에서 새로운물질인 procyanidin B-7-3-O-gallate, procyanidin C-1-3'-3''-3' ''' -O-trigallate, (-)-epigallocatechin-(4 β →8)-epigallocatechin-(4 β →8)-catechin 3종류를 발견하였다. 감잎으로부터 순수 분리한 polyphenol류의 ACE 저해활성측정을 실험한 결과 procyanidin B-7-3-O-gallate는 100 μ M농도에서 94%의 저해효과를 나타내었으며 epigallocatechin-(4 β →8)-epigallo-catechin-(4 β →8)-catechin, procyanidin C-1-3'-3''-3' ''' -O-trigallate는 각각 90.69, 80.90% 저해를 하였다. Xanthine oxidase 저해활성측정을 조사한 결과 procyanidin B-7-3-O-gallate와 procyanidin C-1-3'-3''-3' ''' -O-trigallate 즉, gallate가 붙은 호합물에서 100 μ M의 농도에서 66%와 63%의 강한 저해효과를 나타냈다. Tyrosinase 저해활성을 측정한 결과는 procyanidin C-1-3'-3''-3' ''' -O-trigallate는 100 μ M에서 70%의 강한 저해효과를 나타냈으며, epigallocatechin-(4 β →8)-epigallo-catechin-(4 β →8)-catechin는 51%의 저해효과를 나타내었다. 산업적응용

을 위해 분획한 폴리페놀군은 미백효과 검증실험인 tyrosinase 저해율 측정평가에서 폴리페놀 함량이 가장 높은 Fraction III의 경우 500ppm에서 74.2%의 높은 저해율을 나타내었다. 항산화력 실험에서는 500ppm이상에서 강한 활성능을 보인 SOD 유사활성능을 제외한 나머지 DPPH와 xanthine oxidase 저해 효과에서는 Fraction II와 III 모두가 50ppm이상에서 80% 이상의 높은 유리라디칼 소거능력을 나타내었다. 그리고 각 Fraction별 항균력 측정 결과 Fraction II와 III이 우수하게 나타났고 항균활성은 그람 음성균보다 그람양성균에서 효과적이었으며, 농도별 항균력시험 결과 농도가 증가할수록 비례하여 저해율도 증가함을 알 수 있었다. 첨가농도를 달리하여 미생물의 생육도를 측정한 결과, Fraction II와 III의 경우 그람양성균에 대해 500 ppm 이상에서 뚜렷한 증식억제효과를 나타내었다.

문 헌

1. Bae, D.K., Choi, H.J., Son, J.H., Park, M.H., Bae, J.H., An, B.J., Bae, M.J. and Choi, C. The Study of Developing and Stability of Functional Beverage from Korean Persimmon(*Diospyros kaki* L. folium) Leaf. Korean J. Food Sci. Technol., 32(4): 860-866 (2000)
2. Matsuo, T. and Ito, S. The chemical structure of kakitannin from immature fruit of the persimmon(*Diospyros kaki* L.). Agric. Biol. Chem. 42(9): 1637-1640 (1978)
3. Choi, J.S., Park, S.H. and Choi, J.H. Nitrite scavenging effect by flavonoids and its structure effect relationship. Arch. Pharm. Res. 12(1): 26-31 (1989)
4. Uchida, S., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Nonaka, G.Y., Nishioka, I., Niwa, M. and Ozaki, M. Condensed tannins scavenge active oxygen free radicals. Med. Sci. Res. 15: 831-834 (1987)
5. Choi, S.W., Kang, W.W., Chung, S.K. and Cheon, S.H. Antioxidative activity of flavonoids in persimmon leaves. Foods and Biotechnol. 5(2): 119-123 (1996)
6. Hisayuki, T., Shizuo, T., Yasuyuki, S., Toshio, T., Teruaki, H., Shigeru, A. and Yoshio, T. Natural antioxidants. I. Antioxidative components of tea leaf (*Thea sinensis* L.). Chem. Pharm. Bull. 32(5): 2011-2014 (1984)
7. Kim, J.H., Kim, K.Y., Roh, Y.K. and Choi, S.W. Antioxidative substances and their changes in the leaves of persimmon (*Diospyros kaki*) during growth. Korean J. PostHarvest Sci. Technol. Agri. Products 4(3): 323-330 (1997)
8. Park, M.H. Effect of polyphenol compounds from persimmon leaves (*Diospyros kaki* folium) on immunofunctional and biological activity. Ph. D. Thesis, Yeungnam Univ. Kyungsan, Korea (1998)
9. Choi, H.J., Son, J.H., Woo, H.S., An, B.J., Bae, M.J. and Choi, C. Changes of composition in the species of persimmon leaves (*Diospyros kaki* folium) during growth(in Korean). Korean J. Food Sci. Technol. 30(3): 529-534 (1998)
10. An, B.J. Inhibitory effect of polyphenols isolated from green tea on the xanthin oxidase. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 12(5): 582-585 (1997)
11. Nonaka, G.H. Isolation and structure elucidation of tannins. Pure & Appl. Chem. 61(3): 357-360 (1989)

12. A.O.A.C. Official Methods Analysis, 14th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. USA (1984)
13. Yagi, A., Kanbara, T. and Morinobu, N. *Planta Medica*, 3981: 517 (1986)
14. Blois, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 26: 1198—1202 (1958)
15. Marklund, S. and Marklund, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallo and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47: 469-474 (1974)
16. Stripe, F. and Corte, E.D. The Regulation of Rat Liver Xanthine Oxidase. *J. Biol. Chem.* 244: 3855—3861 (1969)
17. Nice, D.J., Robinson, D.S. and Holden, M.A. Characterisation of a heat-stable antioxidant co-purified with the superoxide dismutase activity from dried peas. *Food Chem.* 52: 393-397 (1995)
18. Kelley, W.N. and Wyngaarden, J.B. Enzymology of gout. *Adv. Enzymol.* 41: 23-28 (1974)
19. An, B.J., Lee, J.T. and Bae, M.J. Isolation of a Novel Polyphenol from Oolong Tea and Its Effective Prevention of the Gout. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30(4): 970-975 (1998)
20. Hatano, T., Yasuhara, T., Fukuda, T., Noro, T. and Okuda, T. Phenolic constituents of Licorice. II. Structures of Licopyranocoumarin, Licoaryl coumarin and Glisoflavone, and inhibitory effects of Licorice phenolics on xanthine oxidase. *Chem. Pharm. Bull.* 37: 3005-3011 (1989)
21. Chung, H.J. Antioxidative and antimicrobial activities of *Opuntia ficus indica* var. saboten. *Korean J. Soc. Food Sci.* 16(2): 160-166 (2000)