

## Optimization of acid hydrolysis conditions of *Hovenia dulcis* extract for increasing bioactive compound

Sung-Hee Kang, Sung-Mun Kim, and Jin-Hyun Kim\*

Department of Chemical Engineering, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea,

Tel : 041-850-8642, Fax : 041-858-2575 E-mail : [jinhyun@kongju.ac.kr](mailto:jinhyun@kongju.ac.kr)

### ABSTRACT

This study was a method that used a hydrolysis for increasing the efficacy of alcohol decrease from *Hovenia dulcis* extract. The best pH was 2.0 to obtain a maximum activity at fixed reaction temperature and time. At pH 2.0, reaction temperature 80°C and reaction time 4 hr gave the highest activity which was 124.2% of control. This is very simple and efficient method to increase the efficacy of alcohol decrease from *Hovenia dulcis* extract. The mechanism that increases the efficiency of alcohol decrease be examined through hydrolysis.

### 서론

헛개나무(*Hovenia dulcis*)는 온화한 남쪽지방에서 잘 생육하는 교목으로 과병과 줄기는 단맛과 향을 내어 식용, 과주 및 약용으로 주독을 제거하는데 상용되어 왔다(1). 헛개나무에 관한 연구로는 민간요법으로 헛개나무 잎, 줄기 및 열매로 만든 차가 주독 제거 및 과음시 부작용으로 나타나는 황달, 지방간, 간경화증, 위장병 등의 간 기능 보호에 효능이 뛰어난 것으로 전해지고 있다(2). 또한 Fig. 1에서 보는 바와 같이 헛개열매에서 분리한 (2R,3R)-5,7,4',5'-tetrahydroxy-3'-methoxydihydro flavonol(분자량=333)와 (2R,3R)-5,7,3',4',5'-pentahydroxy-dihydro flavonol (ampelopsin, 분자량=319)가 알코올 분해 및 간 기능 회복에 효과가 있다고 보고하였으며(3), 헛개열매 추출물에서 분리한 *Hovenodulinol* (flavonol 성분)이 쥐의 알코올 분해에 효과가 있다고 보고하였다(4). Kim 등(5)은 산 가수분해방법을 이용한 paclitaxel의 수율 증가에 관한 연구를 보고하였다. 헛개열매 추출물은 알코올 분해 및 간 기능 회복에 뛰어난 효과가 있는 것으로 나타났고, 헛개열매 추출물은 알코올 분해효소를 30~40% 정도 촉진하는 것으로 나타났다. 산에 의하여 헛개열매를 가수분해를 시키면 헛개열매의 구성성분인 glycoside가 분해가 된다. 헛개열매 열수 추출물의 효능성분을 둘러싸고 있는 배당체를 산 가수분해하여 효능성분의 양을 증가시켰으며, 이를

HPLC를 통해 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 1) 헛개나무 추출

본 실험에서 사용한 헛개나무(*Hovenia dulcis*)의 열매, 잎 및 줄기는 충청남도 공주시에 서 2002년에 채집하여 냉동보관 하면서 실험의 재료로 사용하였다. 헛개나무를 열매, 잎, 줄기로 나누어 채집하여 건조 시킨 뒤 시료 중량에 대해 각각 10배의 증류수로 10시간 동안 100 °C에서 hot plate를 사용하여 열수 추출하였다. 추출물은 WHATMAN 0.45 µm 여과지를 사용하여 여과하였다.

### 2) 가수분해 방법

헛개열매 열수 추출물을 고속원심분리기(high-speed centrifuge)를 이용하여 헛개열매 추출물의 침전물을 제거하고 상층액을 실험에 사용하였다. 헛개열매 추출물의 pH는 4.65~4.69 정도이며, 2 N HCl 용액으로 산 처리하여 실험하였다. 실험 온도는 70°C, 80°C, 90°C이며 온도 조절은 water bath에서 10시간 동안 반응을 시켰다. 온도변화, 반응시간, pH 등의 산 처리 조건 변화에 따른 효능을 alcohol enzymatic assay를 통하여 확인하였다.

### 3) Alcohol dehydrogenase 활성 측정

Alcohol dehydrogenase (ADH)의 활성 측정은 50 mM sodium pyrophosphate - 95%(v/v) ethanol - 15 mM NAD에 효소액을 가하여 3.0 ml가 되게 하였다. 이 반응액의 효소작용으로 생성된 NADH를 UV/Visible spectrophotometer (JENWAY 6505)를 사용하여 340 nm에서의 흡광도 차이로부터 측정(6)하여 효소활성을 표시하였다.

### 4) 당분석

본 실험에서는 산 가수분해 전후의 추출물을 WHATMAN 0.45 µm 여과지를 통해 전처리된 시료를 사용하였고, 산 가수분해 후에 당의 증감을 확인하기 위하여 HPLC(WATERS)를 통해 분석하였다. 산 가수분해 전후의 미지 성분만을 분취, 농축하였으며, MALDI-TOF를 사용하여 분자량을 측정하고 성분을 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### 1) 산가수분해에 의한 유효 성분의 생산성 증대 이론

헛개열매의 구성 성분인 glycoside를 산 가수분해를 통하여 유효 성분의 생산을 증가시키는 이론을 Fig. 1에 나타내었다. 배당체 형태로 존재하는 유효 성분을 산 가수분해에 의해 배당체에 결합되어 있는 당과 유효성분을 분리하여 전체적인 유효 성분의 양을 증대시

키고자 하였다.

### 2) 반응 pH, 반응 온도, 반응 시간의 영향

헛개열매 추출물로부터 원심분리기를 이용하여 침전물을 제거한 상층액을 실험 재료로 사용하였다. 헛개열매 추출물의 pH는 4.65~4.69 정도이며, 헛개열매 추출물에 2 N HCl 용액으로 산 처리하여 실험에 이용하였다. 반응 온도 80℃, 4 hr 인 경우, pH 2.0에서 124.16% 활성이 증가하여 최적임을 알 수 있었으며 pH 4.0에서는 오히려 활성이 감소하였고, pH 3.0에서는 120.04% 활성이 증가함을 알 수 있었다. 반응 온도 90℃와 80℃에서 활성의 증가를 확인 할 수 있었으며, 반응 온도가 증가할수록 활성이 증가하다가 반응 온도 80℃, 반응 시간 4 hr에는 124.16%의 활성의 증가를 보여 최대치를 나타내었으며 그 이후에는 활성이 오히려 감소하였다. 이러한 감소현상은 높은 온도와 반응 시간의 지속으로 효능 성분의 분해에 따른 것으로 판단된다. 모든 온도에서 유사한 결과를 얻었으며 70℃에서는 반응 시간이 길어져도 활성이 증가되지 않았다.

### 3) 당 분석

pH 2.0, 반응 온도 80℃, 반응 시간 4 hr 조건에서 산 가수분해 한 추출물을 시료로 사용하여 실험하였다. 추출물의 당 성분을 분석하기 위하여 산 가수분해한 추출물을 HPLC로 분석한 결과 Glucose, Sucrose, Fructose, 미지의 성분이 검출되었다. Fig. 2을 비교하여 볼 때, Sucrose는 감소함에 비하여 Glucose, Fructose, 미지의 성분은 증가함을 보였다. 산 가수분해 전후의 미지 성분을 알아보기 위하여 미지 성분만을 분취하고 농축하여 MALDI-TOF로 분자량을 확인하였다. 산 가수분해 전에는 분자량이 큰 다당류, 올리고당들이 분포하고 있으며, 산 가수분해 후에는 분자량이 큰 다당류와 올리고당들이 가수분해되어 단당류나 분자량이 작은 다당류로 전환되는 것으로 사료된다.

## 감 사

본 연구는 산업자원부 지정 공주대학교 자원재활용 신소재연구센터의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Kim, M.H., Y.T.Chung, J.H.Lee, Y.S.Park, M.K.Shin, H.S.Kim, D.H.Kim, and H.Y.Lee (2000), Hepatic detoxification activity and reduction of serum alcohol concentration of *Hovenia dulcis* THUNB from Korea and China, Korean J. Medicinal Crop Sci. 8, 225-233.
2. Lee, M.K., Y.G.Kim, S.W.An, M.H.Kim, J.H.Lee, and H.Y.Lee (1999), Biological activity of *Hovenia dulcis* THUNB, Korean J. Medicinal Crop Sci. 7, 185-192.

3. Mssayuki Y. and T. Murakami (1996), Absolute Stereostructures of New Dihydroflavonols, Hovenitins I, II and III, Isolated from Hovenia Semen Seu Fructus of *Hovenia dulcis* THUNB, *Chem. Pharm. Bull.*, 117(2), 108-118.
4. Hong, Y.L., M.H. Kim, C.Ahn, H.Y.Lee, and J.D.Kim (2000), Studies on the biological activities of the extract from *Hovenia dulcis* THUNB, *Inst. Agr. Sci., Nat. Univ.*, 11, 1-11.
5. Kim, J.H., I.S. Kang and S.S. Hong (2000), Method of Using Hydolysis to Increase Paclitaxel Yeild from Plant Cell Culture, *Korean J. Biotechnol.*, Vol 11, No.4, 402-404.
6. Kim, M. H, Kown, O. H. (1992), Relationship hepatic triglycerideby ethanol to activity of lipogenic enzymes in rat liver, *KoreaJ.* 25, 499-503.

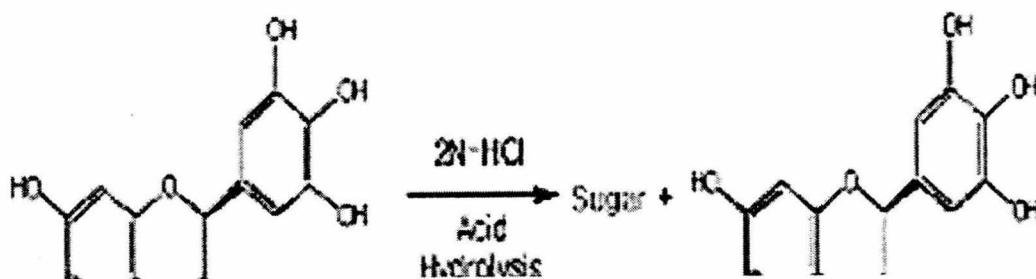


Figure 1. Theory of acid hydrolysis.

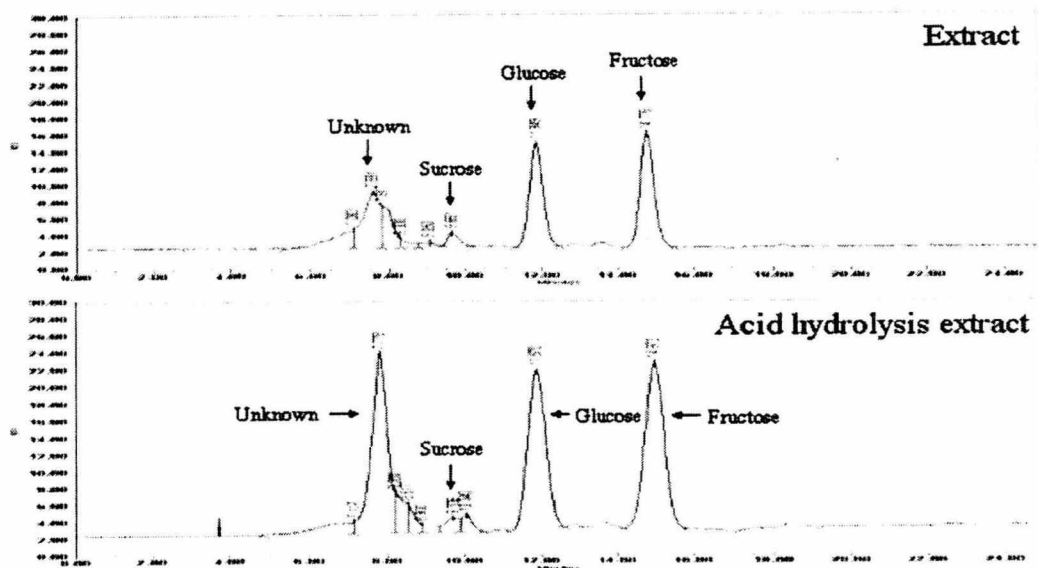


Figure 2. acid hydrolysis sugar analysis before and after.