

Mechanism of Alcohol Decrease by Acid Hydrolysis of *Hovenia dulcis* Extract

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

Department of Chemical Engineering, Kongju National University,

Kongju 314-701, Korea,

Tel : +82-41-850-8642, Fax : +82-41-858-2575

E-mail : jinhyun@kongju.ac.kr

Abstract

This work was a method that used an acid hydrolysis for increasing the efficacy of decreasing alcohol concentration from *Hovenia dulcis* extract. The best pH was 2.0 to obtain a maximum alcohol dehydrogenase 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% of control. The bioactive compound, (+)-dihydromyricetin, content increased to 30% after acid hydrolysis. This is very simple and efficient method to increase the efficacy of decreasing alcohol concentration from *Hovenia dulcis* extract. The mechanism that increase 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 과음 시 부작용으로 나타나는 황달, 지방간, 간경화증, 위장병 등의 간 기능 보호에 효능이 뛰어난 것으로 전해지고 있다(2). 또한 헛개열매에서 분리한 (+)-dihydromyricetin [(2R,3R)-5,7,3',4',5'-pentahydroxydihydroflavonol, (+)-ampelopsin, 분자량: 319]는 알코올 분해 및 간 기능 회복에 효과가 있다고 보고하였으며(3), 헛개열매 추출물에서 분리한 hovenodulinol(flavonol성분)이 쥐의 알코올 분해에 효과가 있다고 보고하였다(4). 헛개열매 추출물은 알코올 분해효소를 30% 정도 증진

하는 것으로 나타났다(3). 본 연구에서는 헛개나무의 열매 속에 포함되어 있는 배당체(glycoside)를 산 가수분해 방법으로 분해하여 알코올 분해 및 간기능 회복에 효능이 있는 생리활성물질(+)-dihydromyricetin의 생산성을 증대시켰다. 산 가수분해조건을 최적화하였으며, 또한 생산성 증대 기작 (mechanism)을 규명하였다.

재료 및 방법

1) 헛개나무 추출

본 실험에서 사용한 헛개나무(*Hovenia dulcis*)의 열매는 충청남도 공주시에서 2002년에 채집하여 냉동보관 하면서 실험의 재료로 사용하였다. 채집한 헛개나무 열매를 건조 시킨 뒤 시료 중량에 대해 각각 10배의 증류수로 10시간 동안 100°C에서 hot plate를 사용하여 열수 추출하였다. 추출물은 WHATMAN 0.45 μ m 여과지를 사용하여 여과하였다.

2) 가수분해 방법

헛개열매 열수 추출물을 고속원심분리기(high-speed centrifuge)를 이용하여 헛개열매 추출물의 침전물을 제거하고 상층액 만을 실험에 사용하였다. 헛개열매 추출물의 pH는 4.65 ~ 4.69 정도이며, 2 N HCl 용액으로 산 처리하여 실험하였다. 실험온도는 70°C, 80°C, 90°C이며 온도 조절은 water bath에서 10시간 동안 반응을 시켰다. 온도 변화, 반응시간, pH등의 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 가하고, 효소작용으로 생성된 NADH를 UV/Visible spectrophotometer (Jenway 6505, Japan)를 사용하여 340 nm에서 흡광도를 측정하였다(5). 헛개열매 추출물 대신 증류수를 첨가하여 control로 사용하였다.

4) 당 분석 및 분자량 확인

본 실험에서는 산 가수분해 전후의 추출물을 WHATMAN 0.45 μ m 여과지를 통해 전처리를 거친 시료를 사용하였고, 산 가수분해 후에 당의 증감을 확인하기 위하여 HPLC(Waters)를 통해 분석하였다. 산 가수분해 전후의 미지 성분만을 분취, 농축하

였으며, MALDI-TOF를 사용하여 분자량을 측정하고 성분을 확인하였다.

5) 생리활성물질 ((+)-dihydromyricetin) 함량 분석 및 분자량 확인

HPLC (Waters) 분석방법에 의해 생리활성물질인 (+)-dihydromyricetin의 함량을 분석하였다. 헛개열매를 열수 추출하고 ethyl ether를 가하여 상 분리후 상층액 (ethylether층)만을 회수하여 농축 후 분석에 사용하였다. (+)-Dihydromyricetin 표준 물질은 Guilin Natural Ingredients Inc. (Guilin, China) 제품(순도 > 80%)을 사용하였다(7). 또한 분자량 확인을 위하여 LC/MS (Hewlett Packard, USA) 분석조건은 HPLC 분석과 동일하게 하여 분석하였다.

결과 및 고찰

1) 산 가수분해에 의한 유효 성분의 생산성 증대 이론

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

2) 반응 pH, 반응온도, 반응 시간에의 영향

헛개열매 추출물로부터 원심분리기를 이용하여 침전물을 제거한 상층액을 실험재료로 사용하였다. 헛개열매 추출물의 pH는 4.65 ~ 4.69정도이며, 헛개열매 추출물에 2 N HCl 용액으로 산 처리하여 실험에 이용하였다. 반응온도 80°C, 4hr인 경우, pH 2.0에서 124.16% 활성이 증가하여 최적임을 알 수 있었으며, pH4.0에서는 오히려 활성이 감소하였고, pH3.0에서는 120.04% 활성이 증가함을 알 수 있었다. 반응 온도 90°C와 80°C에서 활성의 증가를 확인 할 수 있었으며, 반응온도가 증가할수록 활성이 증가하다가 반응온도 80°C, 반응시간 4hr에는 124.16%의 활성의 증가를 보여 최대치를 나타내었으며 그 이후에는 활성이 오히려 감소하였다. 이러한 감소현상은 높은 온도와 반응시간의 지속으로 효능 성분의 분해에 따른 것으로 판단된다. 모든 온도에서 유사한 결과를 얻었으며 70°C에서는 반응시간이 길어져도 활성이 증가되지 않았다.

3) 산 가수분해 전후 당 및 생리활성물질 ((+)-Dihydromyricetin) 분석

pH 2.0, 반응온도 80°C, 반응시간 4 hr 조건에서 산 가수분해 한 추출물을 시료로

사용하여 산 가수분해 전 후의 당 성분 변화를 확인하였다. HPLC를 이용하여 헛개 열매 추출물을 이용한 산 가수분해 전후의 당 분석을 하였다. 단당류 (glucose, fructose)와 이당류 (sucrose), 그리고 미지 (unknown)의 성분이 확인되었고, 산 가수분해 후 이당류인 sucrose (75%)는 감소하는 반면 단당류인 glucose (40%)와 fructose (22%), 그리고 미지의 성분 (9%)은 증가함을 알 수 있었다. 산 가수분해 전 후의 미지의 성분을 HPLC를 이용하여 분취하고 농축하여 MALDI-TOF로 분자량을 확인하였다. 산 가수분해 전에는 미지의 성분 내에 분자량이 큰 다당류 (분자량: 700~1,700)들이 많이 함유되어 있었으나, 산 가수분해 후에는 미지의 성분 내에 분자량이 큰 다당류들이 가수분해되어 분자량이 상대적으로 작은 다당류 (분자량: 700~1,000)로 전환됨을 알 수 있었다. 따라서 산 가수분해에 의해 고분자 물질들이 분해되어 저분자 물질로 전환됨을 알 수 있었다. 또한 산 가수분해 전후에 생리활성물질인 (+)-dihydromyricetin의 함량을 HPLC로 분석한 결과 산 가수분해 후에 약 30%가 증가됨을 알 수 있었다. 또한 LC/MS를 이용하여 HPLC상으로 생리활성물질로 예상되는 성분의 분자량을 확인한 결과 319 g/g-mol이었으며 이는 표준물질인 (+)-dihydromyricetin의 분자량과 일치함을 알 수 있었다.

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* T_{HUNB} 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* T_{HUNB}, *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* T_{HUNB}, *Chem. Pharm. Bull.* **117**, 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., Kangwon Nat'l. Univ.* **11**, 1-11.
5. Kim, M. H. and O. H. Kown (1992), Relationship hepatic triglyceride accumulation by ethanol to activity of lipogenic enzymes in rat liver, *Korea Biochem. J.* **25**, 499-503.
6. Kang, S. H., S. M. Kim, and J. H. Kim(2005), Method of Using Acid Hydrolysis to Increase the Efficacy of Decreasing Alcohol Concentration from *Hovenia dulcis* Extract, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 91-94.

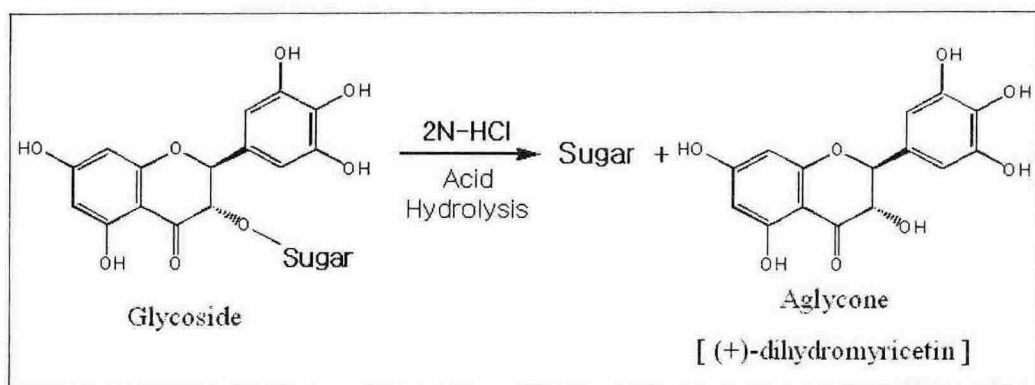


Figure 1. Theory of acid hydrolysis.