

Cacao Bean Husk로부터 Glucosyltransferase 저해물질 구조결정

안봉진* · 최 청¹

*동국전문대학 향장공업과, ¹영남대학교 식품가공학과

초록 : Cacao bean husk로부터 2종류의 2당체 flavan-3-ol을 분리하였고 anisaldehyde-H₂SO₄ 용액, FeCl₃ 및 TLC상에서 축합형 탄닌으로 확인되었다. 이들 2종류의 flavan-3-ol 화합물은 procyanidin B-1[epicatechin-(4β→8)-catechin], procyanidin B-3[catechin-(4α→8)-catechin]로 기기분석에 의해 분자구조가 결정되었다. Procyanidin B-1은 0.3 mM에서 50% glucosyltransferase 저해효과가 관찰되었고 비경쟁적 저해작용기작을 보였으며 epicatechin을 함유한 화합물이 저해 효과가 높은 것으로 확인되었다(1994년 10월 7일 접수, 1994년 11월 25일 수리).

서 론

현재 문화병으로 전세계적으로 가장 널리 만연되고 있는 치아우식증(충치)은 구강내 존재하는 *Streptococcus mutans*균에 의한 glucosyltransferase(GTase)의 작용에 의한 것으로 알려져 있다.¹⁾

최근 10여년 동안 충치 발생기작에 관한 기초적인 연구와 충치 예방에 관한 활발한 연구가 이루어져 왔고^{2,3)} 이중 치면 세균막 형성저해제 즉 GTase 활성저해제가 가장 주요한 충치예방수단으로 인정되어 이러한 저해물질 탐색에 많은 노력이 집중 되고 있다.

이와 같은 충치예방물질의 탐색연구는 미생물이나 합성화합물 뿐만 아니라 녹차류나 생약제 등의 각종 천연물을 대상으로 새로운 탐색, 개발이 진행되고 있는데 이들에 함유되어 있는 polyphenol류 등은 각종 효소 저해제로 생리활성을 함유하는 것으로 알려졌다. 안⁴⁾ 등은 우롱차로부터 flavan-3-ol 화합물의 분자를 결정하고 xanthine oxidase 저해제로 효과가 우수하였다는 보고가 있으며 Jackfruit 잎의 polyphenol류가 충치예방에 우수한 효과가 있다는 것을 안⁵⁾ 등이 보고한 바 있다. 중국산 한약재와 일본 녹차류로부터 분리구조가 확인된 flavan-3-ol 화합물은 혈압강하, 항산화, 항균성, 항암 및 항에이즈 등의 효과가 인정되어 의약품 개발에 많은 기여가 되고 있다.⁶⁻¹⁰⁾

Cacao Bean은 Byttneriaceae과에 속하는 다년생 식물인 Cacao *Theobroma cacao* L. 나무의 과실속에 펠

프질로 쌓여 있는 종알로서 현재 세계적으로 널리 이용되고 있는 초콜렛의 주원료인 cacao mass 및 butter를 함유하고 있다.¹¹⁻¹³⁾ 이중자의 외피인 Cacao Bean Husk (CBH)는 초콜렛 생산과정중 탈각되어 중량비 약 15%의 부산물로 생성되어 폐기되고 있는데 현재 세계적으로 년간 40만톤의 CBH 부산물이 폐기물화 되고 있는 실정이다. 그러므로 본 연구는 이들 천연 생리활성물질 탐색연구의 일환으로 CBH로부터 GTase 저해물질을 분리하고 구조를 결정하였으며 충치예방물질로써 산업에 응용하고자 이 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 연구의 재료는 가나산 cacao bean 외피이며 시약 으로서는 Sephadex LH-20(Pharmacia Co. Ltd. Sweden), MCI-gel CHP-20(Mitsubishi Chemical Ind, Co. Japan), Bondapak C₁₈ porasil B(Water Co. Ltd U.S.A)를, glucosyltransferase는 일본 합동주조에서 공급받아 실험에 사용하였다.

기기

본 실험에 사용된 NMR(Jeol FX. GX-270, Japan)은 270 MHz, Ms(Jeol JMS, PX-300)는 negative ion FAB-mass 이용하였고 Spectrophotometer(Hitachi 200-10, Japan)와 Ultrasonicator(Ultrasonic Generator US-30,

Key words : Glucosyltransferase inhibitor

Corresponding author : B.-J. An

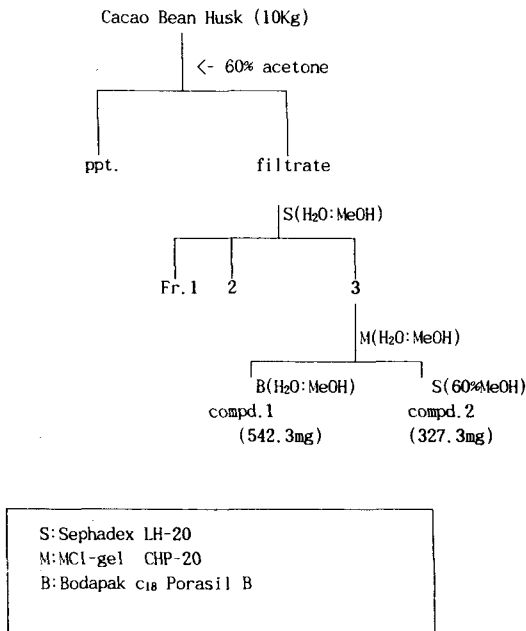


Fig. 1. Procedure for isolation of compounds 1 and 2 from cacao bean husk.

Nissei, Japan)를 사용하였다.

추출 및 분리

CBH 10 kg을 추출탱크에서 60% acetone 25 l를 가하여 실온에서 24시간 침지하고 원심분리하여 상등액과 침전물을 얻었다. 다시 침전물에 60% acetone을 첨가하여 위와 같은조건으로 4회 반복 추출한 농축 여과하여 클로로필을 제거하고 2 l로 하였다. 농축액을 Fig. 1과 같이 Sephadex LH-20 column에 loading하고 $H_2O:MeOH(1:0 \rightarrow 0:1, v/v)$ 을 용출용매로 하여 분획물 1, 2, 3로 분리하고 이 분획물중 분획물 3을 MCI-gel CHP-20 [$H_2O:MeOH(1:0 \rightarrow 0:1, v/v)$], Sephadex LH-20 column(60% MeOH), Bondapak C_{18} [$H_2O:MeOH(1:0 \rightarrow 0:1, v/v)$] 등을 이용하여 gradient 용출하였다. 분획물을 thin layer chromatography(TLC)에선 탄닌의 분리정도 및 유무를 확인하면서 반복정제하였다. 즉, 위와 같은 방법으로 완전히 순수화합물이 될 때까지 순수정제하였다.

Glucosyltransferase 저해 활성측정

GTase 저해활성 측정은 분리된 compound 1, 2를 최종농도 0.001~1.0 mM로 조제하고 안⁵⁾ 등의 방법에 의해 측정하였다. 즉, 시험관에 sucrose 기질용액 0.8 ml,

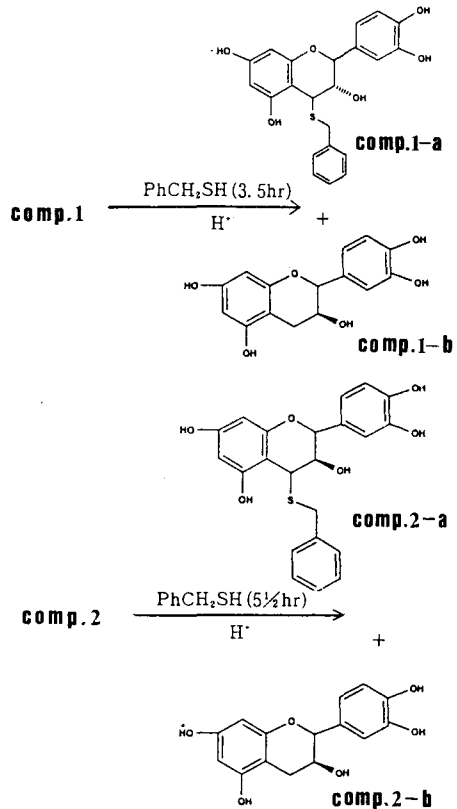


Fig. 2. The scheme for the thiolysis of compound 1 and 2.

효소액 0.02 ml에 조제된 화합물을 첨가하고 최종 1 ml로 한 후 30° 경사에서 37°C 16시간 반응시켰다. 반응후 증류수 3 ml를 가해 수용성 글루칸을 2회 반복세척하고 초음파로 분쇄한 후 Spectrophotometer 550 nm에서 glucan 형성량을 측정함으로 저해도를 관찰하였다.

Compound 1과 2의 thiolysis

순수분리하여 재결정화된 compound 1, 2 100 mg을 AcOH:EtOH(1:5) 5 ml 용해하고 benzylmercaptan(2 ml)를 가해 reflux상에서 5시간 반응시켰다. 반응 중 생성물을 TLC상에서 확인하면서 목적 생성물이 형성되면 반응을 중단하고 감압농축하고 Sephadex LH-20 column (EtOH)로 순수정제하여 건조하고 소량의 물을 첨가하여 결정화를 유도한 후 여과하여 건조시켰다(Fig. 2).

결과 및 고찰

Compound 1,2의 분리 및 동정

Fig. 1의 과정에 의해 얻어진 compound 1과 2는 Fig. 3

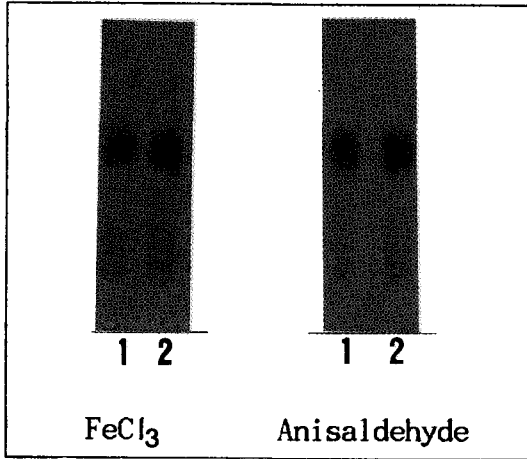


Fig. 3. Thin layer chromatography of flavan-3-ols isolated from cacao bean husk.

Solvent: benzen: ethylformic acid: formic acid (1 : 7 : 1 v/v/v); 1. compound 1; 2. compound 2.

에서 보여주고 있는 것과 같이 anisaldehyde-H₂SO₄와 FeCl₃ 용액에서 각각 갈색 및 청색반응 보였으므로 flavan-3-올류임을 추정할 수 있었다. 이런 결과는 Morimoto¹²⁾ 등이 발표한 flavan-3-올화합물의 정색반응 결과와 일치하였고 TLC의 R_f값을 비교시 R_f치가 동일한 flavan-3-올 화합물로 생각되어졌고 Sephadex LH-20 column으로 분리시 40~60% methanol용액에서 compound 1, 2가 용출되었으며 MCI column으로 분리시 10~20% methanol 용액에서 두 화합물이 TLC에 검정되었다. 이러한 결과는 Sephadex LH-20 column으로 polyphenol 류를 분리시 저분자 물질분리에 용이하였다는 Kashiwada¹¹⁾ 등의 결과와 잘 일치하였다.

Compound 1과 2의 화학구조 결정

Compound 1(procyanidin B-1), 무정형 분말, $[\alpha]_D^{25}$; +40.2°C (C=1.0, acetone), ¹H-NMR(acetone-d₆+D₂O); 2.58(1H, dd, J=16, 8 Hz, 4'-H), 2.83(1H, dd, J=16, 6 Hz, 4'-H), 3.98(1H, brs, 3-H), 4.10(1H, m, 3'-H), 4.68(1H, brs, 4-H), 4.96(1H, m, 2'-H), 5.08(1H, m, 2-H), 5.94(1H, d, J=2H, 6-H), 5.97(1H, s, 6'-H), 6.03(1H, d, J=2 Hz, 8-H), 6.62-7.08(6H, m, aromati-H), ms; m/z(%)=577[M-H]⁻.

Compound 1-a(epicatechin-4β-benzylthioether)

$[\alpha]_D^{25}$; -28°C (C=0.9, acetone), ¹H-NMR(acetone-d₆+D₂O): 3.96(1H, m, 3-H), 4.01(2H, s, -SCH₂), 4.08(1H,

d, J=2 Hz, 4-H), 5.28(1H, d, J=2 Hz, 2-H), 5.90(1H, d, J=2 Hz, 6-H), 6.04(1H, d, J=2 Hz, 8-H), 6.74(1H, d, J=2 Hz, 6'-H), 6.83(1H, d, J=8 Hz, 5'-H), 7.03(1H, d, J=2 Hz, 2'-H), 7.16-7.54(5H, m, aromatic H).

Compound 1-b(catechin)

¹H-NMR(acetone-d₆+D₂O), 2.52(1H, dd, J=16, 8 Hz, 4-H), 2.94(1H, dd, J=16, 6 Hz, 4-H), 4.02(1H, m, 3-H), 4.57(1H, d, J=8 Hz, 2-H), 5.90(1H, d, J=2 Hz, 6-H), 6.60(1H, d, J=2 Hz, 8-H), 6.75(1H, dd, J=8, 2 Hz, 6'-H), 6.9291H, d, J=2 Hz, 2'-H), 8.04(1H, d, J=8 Hz, 5'-H).

Compound 2(procyanidin B-3)

무정형 분말, $[\alpha]_D^{25}$; -198.1°C (C=1.0, acetone), 4.04-4.99(5H, m, 2, 3, 4, 2', 3'-H), 5.87-6.19(3H, m, 6, 8, 6'-H), 6.32-7.20(6H, m, B, B'-ringH), ms; m/z(%)=577[M-H].

Compound 2-a(catechin-4α-benzylthioether)

¹H-NMR(acetone-d₆+D₂O), 4.09(2H, s, -SCH₂), 4.00-4.24(1H, m, 3'-H), 4.38(1H, d, J=4 Hz, 4-H), 4.94(1H, d, J=10 Hz, 2-H), 5.82(1H, d, J=2Hz, 6-H), 6.03(1H, d, J=2H, 8-H), 6.76(1H, dd, J=8, 2 Hz, 6'-H), 6.84(1H, d, J=8 Hz, 5'-H), 6.93(1H, brs, 2'-H), 7.16-7.46(5H, m, aromatic H).

Compound 2-b(catechin)

¹H-NMR의 signal은 compound 1-b와 일치하였다.

Compound 1은 anisaldehyde-H₂SO₄ 용액 및 FeCl₃에서 갈색 및 청색반응을 하였으므로 축합형 탄닌으로 생각되어졌다. ¹H-NMR의 5.08 ppm의 signal은 flavan-3-올의 2-H를 암시하므로 catechin류의 복합물질로 추정할 수 있다. 분자량에서 577[M-H]은 flavan-3-올화합물의 2당체에 해당하는 것으로 위 결과를 더욱 지지하였다. 이 화합물을 thiolysis한 결과 compound 1-a는 ¹H-NMR에서 4.01 ppm 2H의 -SCH₂-, 7.16~7.54 ppm에서 5H분의 aromatic H가 확인되었고 나머지 signal 귀속은 인¹⁴⁾ 등이 발표한 (-)-epocatechin과 일치하였으므로 (-)-epicatechin-4β-benzylthioether로 동정하였다. Compound 1-b는 ¹H-NMR에서 alipatic 영역의 2.25 ppm (dd, J=16, 8 Hz), 2.94 ppm(dd, J=16, 6 Hz)의 signal 분열형태 배열에 의해 C-4 위치의 1H proton 귀속이 가능하였다.

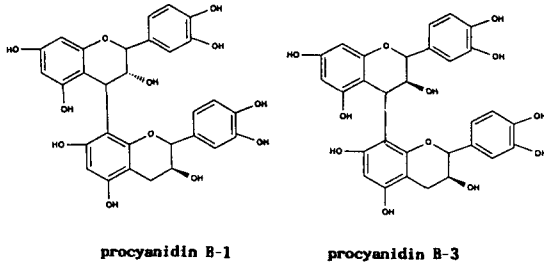


Fig. 4. Structure of flavan-3-ols isolated from cacao bean husk.

4.02 ppm(dd, $J=9.8, 5$ Hz)와 4.57 ppm(d, $J=8$ Hz)도 각각의 signal 분열형태가 H-3, H-2에 해당하였고 aromatic 영역의 6.75~6.92 ppm의 signal 분열양상이 ABX-type으로 catechol환 H-6', H-5', H-2'의 proton임이 입증되었으므로 compound **1-b**는 (+)-catechin으로 확인되었다. 또한 compound **1-a** 및 **1-b**를 1:1 mol 비율로 얻었으므로 이 화합물은 상단부에 (-)-epicatechin 하단부에 (+)-catechin으로 구성된 procyanidin B-1[epicatechin-(4 β →8)-catechin]으로 동정하였다. Compound **2**도 anisaldehyde-H₂SO₄와 FeCl₃상에서 갈색과 청색반응을 하였고 분자량도 557[M-H]⁻ 탄닌인 dimeric 화합물로 compound **1-a**과 같았으나 ¹H-NMR에서 signal 양상은 매우 다른 결과를 얻었다. Compound **2**를 완전 thiolysis한 결과 compound **2-a**와 **2-b**를 1:1 mol 비율로 얻었고 ¹H-NMR에서 4.04~4.99 ppm 사이 flavan H-2에 해당하는 골격의 signal은 catechin류임을 추정하게 하였다. Compound **2-a**는 ¹H-NMR에서 4.09 ppm(2H, s, -SCH₂-), 7.16, 7.47 ppm(5H, aromatic H)에 benzylthioether 화합물이 확인되었고 그 밖의 signal은 compound **1-b**의 proton과 일치하여 이 화합물을 (+)-catechin-4 α -benzylthioether로 동정하였고 compound **2-b**는 ¹H-NMR에서 compound **1-b**와 일치하였다. 따라서 compound **2**는 catechin의 두분자가 결합한 procyanidin B-3로 확인되었고 이러한 결과는 안²⁾ 등이 발표한 결과와도 일치하였다(Fig. 4).

Compound **1**과 **2**의 glucosyltransferase 저해영향 및 기작

분자구조가 결정된 compound **1** 및 **2**를 0.01~1.0 mM로 조제하고 저해 효과를 관찰하였다. Fig. 5에서 보여주고 있는 것과 같이 procyanidin B-3는 0.9 mM에서 약 50%의 저해효과를 보여주었으며 procyanidin B-1은 0.3 mM에서 50%의 저해효과가 관찰되었고 0.5 mM에서

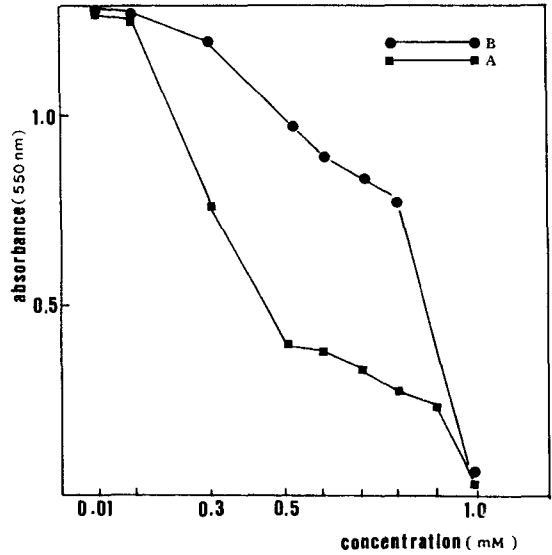


Fig. 5. Effect of isolated flavan-3-ols from cacao bean husk on the glucosyltransferase activity. A. procyanidin B-1; B. procyanidin B-3.

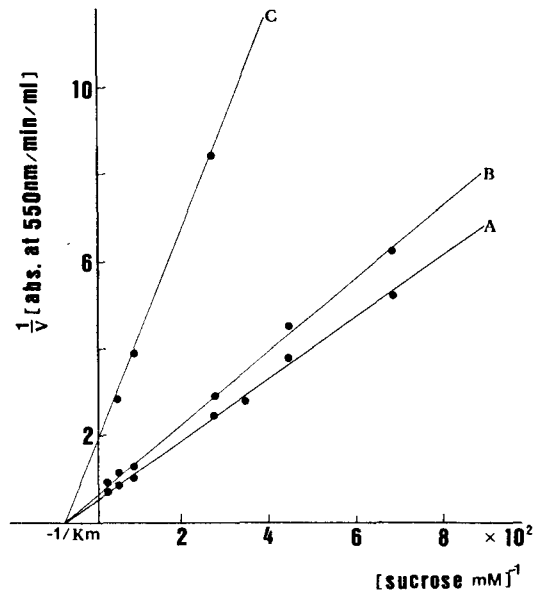


Fig. 6. Inhibition of glucosyltransferase by procyanidin B-1.

A. control; B. 0.3 mM; C. 0.8 mM.

는 거의 완벽한 glucan 형성을 억제하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 epicatechin으로 구성되어 있는 procyanidin B-1이 저해효과가 좋았고 dimeric flavan-3-ol에서 결합 입체구조에 따라 저해 정도의 차가 있음을

보여주었으며 이러한 결과는 안⁹⁾ 등이 발표한 Jakfruit 잎에서 분리된 procyanidin류의 GTase 저해영향과 일치하였다. 또한 procyanidin B-1의 GTase 저해기작에서 0.3 mM, 0.8 mM의 농도에서 km치의 변화가 관찰되지 않았으므로 비경쟁적 저해제임이 확인되었다(Fig. 6).

참 고 문 헌

1. Elattori, M. and Y. Hara (1990) Effect of tea polyphenols on glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*, *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 717-719
2. Shukei Kan (1991) Effect of mineral elements on the growth and tannin content, *Shoyakukagaku Zasshi*, 45(1), 49-51
3. Haslam, F. (1965) Galloyl esters in the *Aceraceae*, *Phytochemistry*, 4, 495-498
4. 안봉전, 김원국, 최장윤, 권익부, 최청 (1992) 우롱차로부터 Xanthine oxidase 저해물질의 분리 및 구조, *한국식품과학회지*, 24(6), 558-562
5. 안봉전, 최장윤, 권익부, 니시오키 이트슈, 최청 (1992) Jack Fruit 잎으로부터 glucosyltransferase inhibitor 물질의 분리 및 구조, *한국생화학회지*, 25(4), 347-353
6. 권익부, 안봉전, 이용우, 이신영 (1993) Cacao Bean Husk 추출물의 Glucosyltransferase 저해효과, *한국생물공학회지*, 8(1), 75-82
7. 권익부, 안봉전, 유주현, 이신영 (1993) Cacao Bean Husk로부터 분리한 총치 예방물질의 구조결정, *한국생물공학회지*, 8(1), 69-74
8. Okuda, T., Yoshida, T. and T. Hattano (1989) Ellagitannins as active constituents of medicinal plants, *Plant Medica*, 55, 117-122
9. Maria Rita Maroques and J. Xavier-Filho (1991) Enzymatic and inhibitory activities of cashew tree gum exudate, *Phytochemistry*, 30(5), 1431-1433
10. Elizabeth, A. and M. K. Al-shafi (1982) The metabolism of gallic acid and hexahydroxydiphenic acid in plants. *Phytochemistry*, 21(5), 1049-1062
11. Kashiwada, Y. and I. Nishioka (1990) Tannin and related compounds, *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 856-858
12. Morimoto, Y., Nonaka, G. and I. Nishioka (1988) Isolation and structures of novel bi- and triflavonoids from the leaves of *Cassia fistula* L. *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 717-719
13. Hashimoto, F., Nonaka, G. and I. Nishioka (1987) Isolation of four new acylated flavan-3-ols from Oolong tea, *Chem. Pharm. Bull.*, 35, 611-614

Structure Determination of Glucosyltransferase Inhibitors from Cacao Bean Husk.

Bong-Jeun An* and Cheong Choi¹(*Department of Cosmetic Engineering, ¹Department of Food Science & Technology)

Abstract : For glucosyltransferase(GTase) inhibitors, two flavan-3-ols were isolated from *Theobroma cacao* bean husk. They showed positive reaction with anisaldehyde-H₂SO₄ solution, FeCl₃ to be confirmed as dimeric flavan-3-ols on TLC and were identified as procyanidin B-1 [(-)-epicatechin-(4 β →8)-catechin] and procyanidin B-3 [(+)-catechin-(4 β →8)-catechin] by spectroscopic analysis. Their inhibitory effect on glucosyltransferase activity was also investigated and procyanidin B-1 showed 50% inhibition at 0.3 mM. They inhibited on the glucosyltransferase noncompetitively and dimeric flavan-3-ol containing (-)-epicatechin had higher inhibitory activity.