

Cacao Bean Husk 추출물로부터 Glucosyltransferase 저해 활성 물질의 분리 및 구조 동정

*권 익 부 · **안 봉 전 · †이 신 영

*롯데 중앙연구소, **동국전문대학 향장공업과, 강원대학교 환경·생물공학부

Purification and Structure Determination of the GTase Inhibitor from Cacao Bean Husk Extract

Ik-Boo Kwon*, Bong-Jeon An**, and Shin-Young Lee†

†Division of Environmental and Biological Engineering, Kangwon National University,
Chunchon, Kangwon 200-701, Korea

*Institute of R & D, Lotte Group, Seoul 150-104, Korea

**Department of Cosmetic Engineering, Dongkuk Junior College, Chilkok, Kyungbuk 718-850, Korea

ABSTRACT

The isolation of active compounds showing the inhibitory effect on glucosyltransferase(GTase) from cacao bean husk(CBH) extract was carried out for screening of anti-plaque agents. These active compounds were purified by additional column chromatography of MCI-gel CHP-20 and Sephadex LH-20 and their chemical structures were determined by NMR and mass spectroscopy. Two compounds showing the inhibitory effect on GTase from CBH extract were obtained. These compounds showed positive reactions with anisaldehyde-H₂SO₄ solution and FeCl₃, and were identified as dimeric flavan-3-ols on TLC. By NMR and MS data analyses, the structures of two different flavan-3-ols were identified as procyanidin B-1 and procyanidin B-3, respectively.

서 론

Cacao bean husk(CBH)는 cacao(*Theobroma cacao* L.) bean으로부터 초코레이트의 주원료를 제조하는 공정 중에 탈각되어 중량비 약 15%의 부산물로 생성되는 물질이다(1). 전세계적으로 약 40만 톤의 양이 얻어지고 있으나 아직까지는 거의 전량이 폐기물화되고 있다(2).

그러나 이들 CBH는 다당류, 단백질 등의 유효성

분을 함유하므로 이의 재활용이나 폐기물 이용의 측면에서의 검토 필요성은 매우 높고, 특히, 녹차류나 한방재 등의 각종 천연물에 널리 존재하는 생리 활성 물질인 phenol류 등도 다량 존재하므로 새로운 생리 활성 물질의 탐색 소재로도 매우 유망하다(3-5). 하지만 지금까지 이에 대한 연구는 거의 보고되지 않았다.

그동안 안 등(6)은 천연 생리 활성 물질의 탐색 연구 일환으로 CBH로부터 최근 가장 유력한 충치 예방 수단으로 인정되고 있는 치면 세균막 형성 저해제 즉, *Streptococcus mutans*의 glucosyltrans-

† Corresponding Author

ferase(GTase)에 대한 저해 효과를 탐색하였고, 그 결과 CBH 추출물 중의 polyphenol류가 GTase 저해 활성 물질의 주요인 성분임을 밝힌 바 있다. 또 water-methanol(50:50,v/v)을 용출 용매로 하여 CBH 추출물을 Sephadex LH-20 column(25×150 cm) chromatography함으로써 Fraction I, II 및 III의 3가지 GTase 저해 활성 분획을 얻었으며, 이중 Fraction I과 III의 활성 성분에 대한 구조를 동정하여 이들 성분이 (-)-Epicatechin, Procyanidin B-2 및 Cinnamtannin A-2임을 밝혔다(7, 8).

본 연구에서는 Fraction II의 활성 분획을 다시 MCI-gel CHP-20와 Sephadex LH-20의 column chromatography법으로 분리, 정제하였으며, 이로부터 얻어진 2개의 GTase 활성 저해 물질(Fr-II-1 및 Fr-II-2)에 대한 구조 동정을 행하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구의 재료는 초코레이트 제조과정 중 탈각되어 부산물로 생산되는 카카오 콩의 외피(cacao bean husk 또는 shell, CBH)이다. CBH는 말레이시아산의 생 cacao bean(*Theobroma cacao L.*)으로부터 얻었고, 100mesh로 분쇄하여 4℃의 저온실에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 한편, CBH 분말 50g에 증류수 1 liter를 넣고 약 100℃의 열수로 1 시간씩 2회 추출한 다음, 원심분리(3000xg, 20 min)하고, 그 상층액을 냉동 건조기(Labconco 75040, USA)로 건조하여 CBH 추출물 시료로 하였다.

GTase의 활성 및 저해를 측정

GTase의 활성은 전보(6)에서와 마찬가지로 sucrose를 기질로 하여 생성된 불용성 glucan을 분광광도법으로 측정하는 Endo들의 방법(9)에 따라 측정하였다.

저해물질의 분리·정제

GTase 저해 물질의 분리 정제 공정을 Fig. 1에 나타내었다. Cacao bean husk 분말 10kg에 60% acetone 35liter를 가하고 실온에서 24시간 추출한 후 원심분리(3000xg, 30min.)하여 상층액과 침전물을 얻었다. 이 침전물에 다시 60% acetone을 가하고 위와 같은 추출과정을 4회 반복한후 각각의 상층

액만을 모아 여과(Whatman filter paper No. 5)한 다음, 그 여과액을 진공하에서 농축하여 2liter의 농축 추출물을 얻었으며, 이를 GTase 저해물질 시료로 하였다.

농축 추출물 2 liter를 Sephadex LH-20 column(25×150cm)에 넣고 water-methanol(50:50,v/v)을 용출 용매로 사용하여 등용매 용출시켜 Fraction I, II 및 III의 세가지 활성 분획을 얻었다(6-8). 이중 Fraction II를 다시 MCI-gel CHP-20 및 Sephadex LH-20의 column chromatography하여 처리하고 2개의 물질을 분리 정제하였으며, 이들을 각각 Fr-II-1과 Fr-II-2로 명명하고 냉동 건조한 후 정제 시료로 하였다.

정제 과정에서 Sephadex LH-20 column chromatography는 H₂O-MeOH(1:0:0→0:1)를 용출 용매로, 그리고 MCI-gel CHP-20 column chromatography의 용출 용매로는 60% MeOH을 사용하였다. 한편, 각 gel chromatography 방법으로 용출된 용출액은 사용한 column에 첨가한 투입량 및 column 크기에 따라 2~8mL씩 분취하였고, silica gel-coated 또는 cellulose-coated TLC plate를 사용한 thin-layer chromatography법으로 전개한 후, 그 발색 반응에 의해 polyphenol을 동정하였다. 또 분리된 polyphenol물질의 thiolysis 및 탈유황 반응(10)은 전보(7, 8)에서와 마찬가지로 행하였다.

저해물질의 구조분석

용해점 및 $[\alpha]_D^{25}$

용해점은 용해점 측정기(Hitachi, AX-80)로 측정하였으며, $[\alpha]_D^{25}$ 는 시료를 아세톤에 용해한 후 polarimeter(JASCO, DIP-370)로 측정하였다.

NMR 및 Mass spectrum

NMR spectrum은 Pulse Fourier Transform method를 이용하여 시료 7~10mg을 acetone-D₆-D₂O에 5~20%(w/v)비율로 용해시키고 TMS(tetramethylsilane)를 기준 물질로 하여 JEOL FX-100 JOEL JIM-GX 270 NMR로 측정하였다. 이때 측정 조건은 Table 1과 같다. 한편, mass spectrum은 고체 시료 1mg을 감압 상태(10^{-6} ~ 10^{-8} mmHg)에서 가열(100-300℃) 기화시키고, negative ion FAB mass spectrum을 이용하여 JEOL JMS-DX 300 MS로 측정하였다. 이때 용매는 acetone/glycerol(50:50, v/v)을 사용하였다.

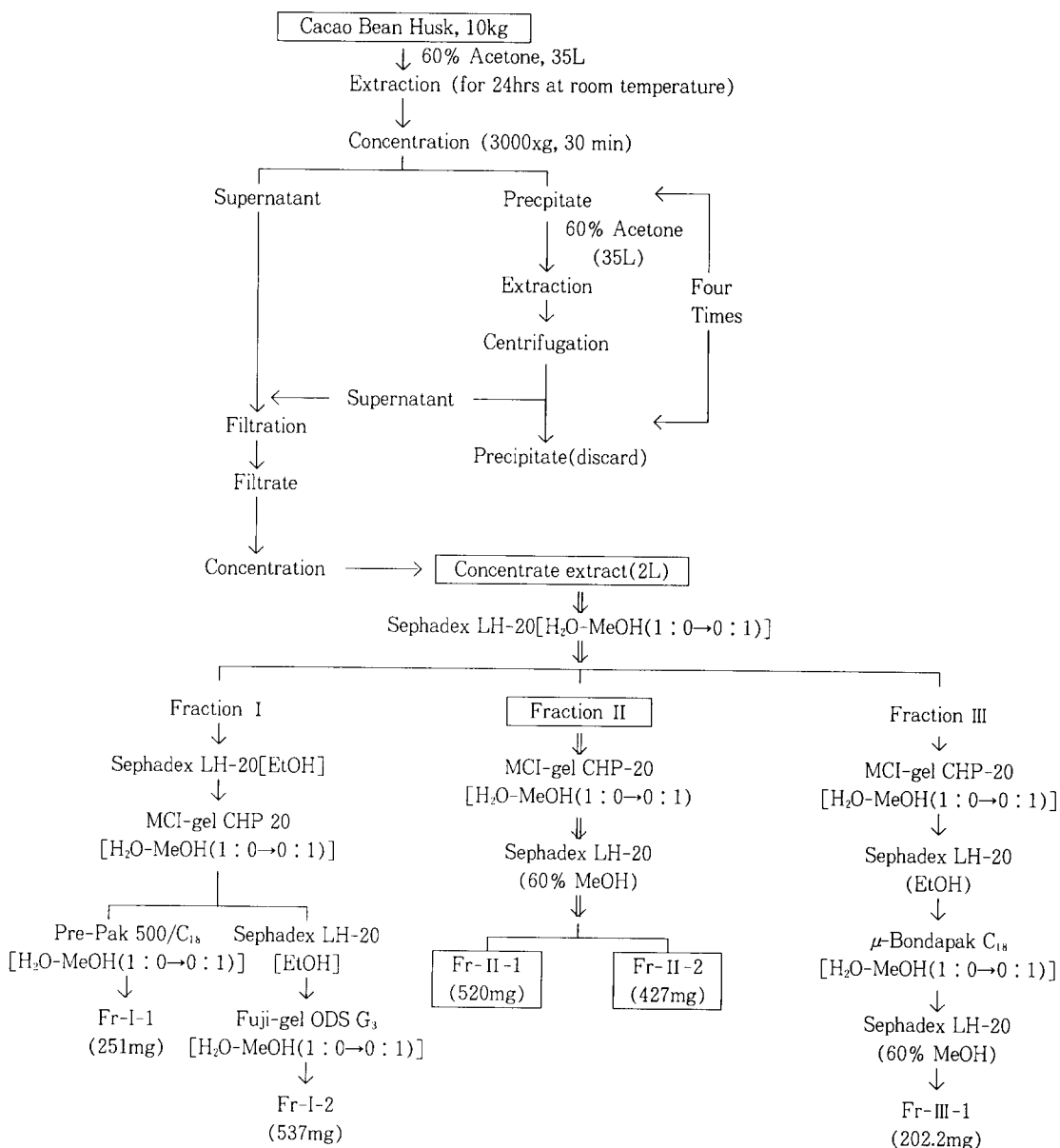


Fig. 1. A procedure for fractionation and purification of polyphenol mixture from cacao bean husk.

Table 1. Conditions for NMR spectrometry

	Concentration	Reference	Pulse	Window	Spectral width	Amplitude	Temperature
^1H	5~20%(w/v)	TMS	Single	e^{-3}	2K/2Hz	23×3dB	Room Temp.
			Width: $15\mu\text{sec}(\pi/4)^\circ$				
^{13}C	5~20%(w/v)	TMS	Multi	e^{-12}	6002	23×3dB	Room Temp.
			Width: $19\mu\text{sec}(\pi)^\circ$				

Table 2. Physicochemical properties of purified fractions of Fr-II-1 and Fr-II-2

	Fr-II-1	Fr-II-2
Nature	: Brownish powder	Brownish powder
Color reaction	: Anisaldehyde-H ₂ SO ₄ (+) FeCl ₃ (+)	Anisaldehyde-H ₂ SO ₄ (+) FeCl ₃ (+)
$[\alpha]_D^{25}$ (C=1.0, acetone)	: - 198.1°	+ 40.2°
Molecular weight		
FAB-MS; m/z(%)	: 577[M-H] ⁻	577[M-H] ⁻

결과 및 고찰

GTase 저해 활성 물질의 분리 및 특성

분리 정제한 GTase 저해 활성 물질, 즉 Fr-II-1 및 Fr-II-2의 일부 이화학적 특성을 조사한 결과는 Table 2와 같다.

Fr-II-1 및 Fr-II-2 분획은 연갈색의 무정형 분말로 FeCl₃ 및 anisaldehyde와의 정색 반응에서 각각 청색 및 갈색의 양성 반응을 보여 flavan 유래의 축합형 탄닌 화합물로 존재하는 것이 예측되었다. 각각의 선평도는 $[\alpha]_D^{25} = -198.1^\circ$ (C=1.0, acetone) 및 $[\alpha]_D^{20} = +25.4^\circ$ (C=0.7, acetone)이었으며, 또 자료로서 나타내지는 않았으나 FeCl₃ 및 anisaldehyde와의 TLC 발색 반응에서 dimer의 flavan-3-ol R_f값을 나타내는 단일의 spot를 나타내어 두 시료 모두 균질의 polyphenol 물질임을 확인할 수 있었는데, 두시료 모두 negative FAB-MS에 의해서 m/z:577[M-H]⁻이 얻어졌다.

한편, 두 정제 분획은 Table 3에서 보는 바와 같이 GTase 저해 활성을 보였는데, Fr-II-1 및 Fr-II-2 분획의 GTase 저해 활성은 1mM 농도에서 각각 27~43%, 그리고 10mM 농도에서 62~68%이었다. 이는 전보(7, 8)에서 보고한 바 있는 Cinnamtannin A-2로 밝혀진 Fraction III보다는 낮았으나 Fraction I의 (-)-Epicatechin 및 Procyanidin B-2과 비교하여서는 거의 비슷하였다.

Fr-II-1 fraction의 구조 동정

Fr-II-1은 분자량이 m/z:577로 flavan-3-ol 화합물 2당체에 해당하는 것으로 생각되었으므로 Fr-II-1(100mg)을 산성하에서 benzylmercaptan으로 처리하여 완전히 thiolysis시킨 결과, 거의 1:1 비율로 Fr-II-1-b(32mg) 및 Fr-II-1-c(38mg)가 얻어져 dimer 화합물임을 확인하였다. Fr-II-1-b의 PMR spectrum에서는 4.09 (2H, s, -SCH₂), 7.16-7.46(5H, aromatic H)의 benzylthioether가 관찰

Table 3. Effect of purified polyphenol compounds on GTase activity

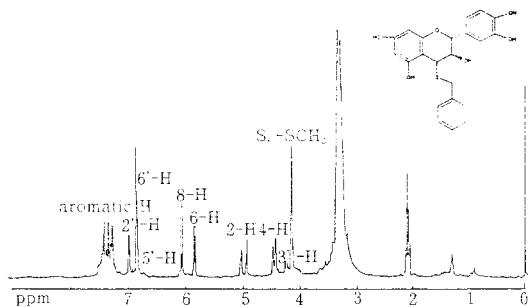
Sample	Concentration (mM)	Absorbance at 550nm	Inhibition (%)
Control		1.162 ± 0.052	0
Fr-II-1	1.0	0.848 ± 0.002	27.02
	10.0	0.371 ± 0.002	68.07*
Fr-II-2	1.0	0.662 ± 0.002	42.68
	10.0	0.441 ± 0.003	62.04*
(-)-Epicatechin	1.0	1.034 ± 0.01	11.01
	10.0	0.384 ± 0.02	66.95*
Procyanidin B-2	1.0	0.673 ± 0.01	42.08
	10.0	0.302 ± 0.031	74.1*
Cinnamtannin	1.0	0.34 ± 0.01	70.74
A-2	10.0	0.02 ± 0.002	98.27**

* : P<0.05, ** : P<0.01

(The values are mean value of five determinations)

되며, 또 전형적인 (+)-catechin spectrum과 동일하여 이를 benzylthioether화한 (+)-catechin으로 확인하였다(Fig. 2). 반면, Fr-II-1-c는 선평도 및 PMR spectrum을 비교한 결과, catechin으로 밝혀지고(Fig. 3), CMR spectrum으로부터 31, 38 ppm(2xC)에서 C-4에 해당하는 signal이, 그리고 68, 70.1 ppm(2xC)에서 C-3, 76.2, 81.5 ppm(2xC)에서 C-2의 전형적인 flavan 골격이 확인되었다(Fig. 4). 또한 이 화합물은 상부 unit인 (+)-catechin 골격의 4-H에 귀속된 signal이 높은 coupling constant를 보여주므로 α 의 배위 결합인 것으로 생각되었다. 한편, Fr-II-1-b fraction은 연갈색의 무정형 분말로 $[\alpha]_D^{20} = +25.4^\circ$ (C=0.7, acetone), C₂₂H₂₀O₆S · 1/2 H₂O, m/z: 411[M-H]⁻이었으며, Fr-II-1-c fraction은 무색 침상형 결정(H₂O), mp 172-175°C, $[\alpha]_D^{25} = +9.4^\circ$ (C=1.0, acetone), C₁₅H₁₄O₆, m/z:289[M-H]⁻이었다.

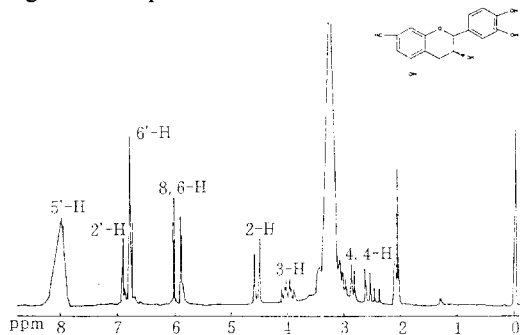
따라서 이에 따라 동정한 결과, Fr-II-1 fraction



The peaks were assigned as follows:

4.09(2H, s, -SCH ₂)	4.00-4.24(1H, m, 3'-H)
4.38(1H, d, J=4Hz, 4-H)	4.94(1H, d, J=10Hz, 2-H)
5.82(1H, d, J=2Hz, 6-H)	6.03(1H, d, J=2Hz, 8-H)
6.76(1H, dd, J=8.2Hz, 6'-H)	6.84(1H, d, J=8Hz, 5'-H)
6.93(1H, brs, 2'-H)	7.16-7.46(5H in total, aromatic H)

Fig. 2. PMR spectrum of Fr-II-2-b fraction



The peaks were assigned as follows:

2.52(1H, dd, J=16.8Hz, 4-H)	2.94(1H, dd, J=16.6Hz, 4-H)
4.02(1H, m, 3-H)	4.57(1H, d, J=8Hz, 2-H)
5.90(1H, d, J=2Hz, 6-H)	6.06(1H, d, J=2Hz, 8-H)
6.75(1H, dd, J=8.2Hz, B-ring, 6'-H)	6.75(1H, d, J=2Hz, 2-H)
6.92(1H, d, J=2Hz, 2-H)	8.04(1H, d, J=8Hz, B-ring, 5'-H)

Fig. 3. PMR spectrum of Fr-II-1-c fraction.

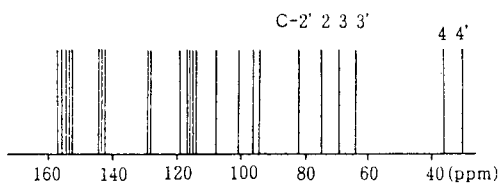
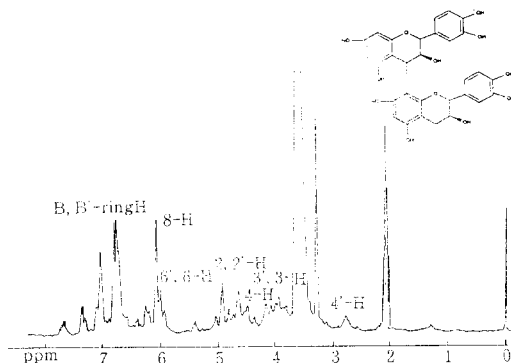


Fig. 4. CMR spectrum of Fr-II-1 fraction.

은 Fig. 5 에서와 같은 catechin 의 dimer 인 pro-cyanidin B-3(C₃₀H₂₀O₁₂)로 밝혀졌다.



The peaks were assigned as follows:

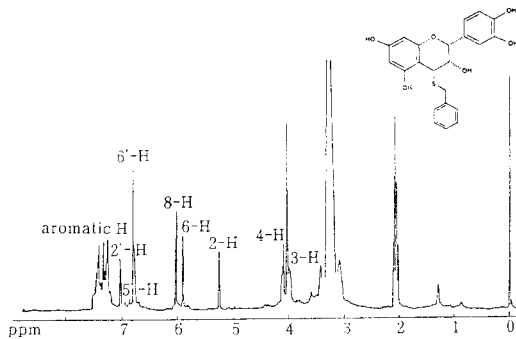
2.58(1H, dd, J=16.8Hz, 4'-H)	2.83(1H, dd, J=16.6Hz, 4-H)
3.98(1H, brs, 3-H)	4.10(1H, m, 3-H)
4.68(1H, brs, 4-H)	4.76(1H, m, 2-H)
5.08(1H, brs, 2-H)	5.94(1H, d, J=2Hz, 6-H)
5.97(1H, s, 6-H)	6.03(1H, d, J=2.8Hz, 8-H)
6.62-7.08(6H in total, m, B, B'-ring H)	

Fig. 5. PMR spectrum of Fr-II-1 fraction.

Fr-II-2 fraction의 구조 동정

Fraction Fr-II-2 역시 FAB-MS에 의한 분자량이 $m/z: 577 [M-H]^-$ 로서 flavan-3-ol 화합물 2 당체에 해당하는 것으로 생각되었다. 따라서 Fr-II-2(70mg)을 산성하에서 benzylmercaptan으로 완전히 thiolysis시킨 결과, Fr-II-2-b(28mg) 및 Fr-II-2-c(31mg)가 얻어졌으며, 이 분리 유도체는 1:1의 몰비로 용출되었으므로 역시 dimer의 분자로 존재함을 지지하였다.

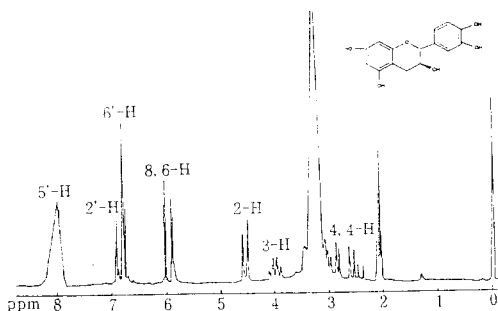
Fr-II-2-b는 상부에 해당되는 unit로 PMR spectrum에서 epicatechin 골격의 2-H에 해당하는 signal이, 그리고 7.10-7.60 ppm에 해당하는 benzylthiol기 유래의 5-H 분의 aromatic signal을 보여주므로, 이 물질은 (-)-epicatechin-4 β -benzylthioether임이 확인되었다(Fig. 6). 또 하부에 해당되는 Fr-II-2-c는 Fr-II-1-c와 마찬가지로 (+)-catechin으로 확인되었다(Fig. 3). 그러나 상부의 물질인 (-)-epicatechin-4 β -benzylthioether의 PMR spectrum은 δ 5.28에서 (1H, s, 2-H), δ 6.83에서 (1H, d, J=8Hz, 5,-H)로, Fr-II-1의 (+)-catechin signal(δ :4.94(1H, d, J=10Hz, 2-H), 6.76 (1H, dd, J=8.2Hz, 6'-H))과는 다른 PMR spectrum을 나타내었다. 또한 PMR spectrum에서 상부에 해당되는 (-)-epicatechin의 4-H에 귀속된 signal의 coupling constant는 작아서 4 β



The peaks were assigned as follows:

3.96(1H, m, 3-H)	4.01(2H, s, -SCH ₂)
4.08(1H, d, J=2Hz, 4-H)	5.28(1H, s, 2-H)
5.90(1H, d, J=2Hz, 6-H)	6.04(1H, d, J=2Hz, 8-H)
6.74(1H, d, J=2Hz, 6'-H)	6.83(1H, d, J=8Hz, 5-H)
7.03(1H, d, J=2Hz, 2'-H)	7.16-7.54(5H in total, m, aromatic H)

Fig. 6. PMR spectrum of Fr-II-2-b fraction.



The peaks were assigned as follows:

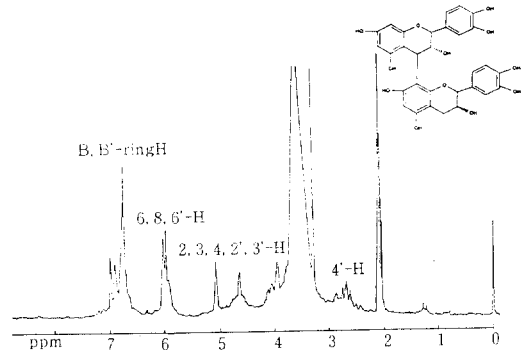
2.52(1H, dd, J=16,8Hz, 4-H)	2.94(1H, dd, J=16,6Hz, 4-H)
4.02(1H, m, 3-H)	4.57(1H, d, J=8Hz, 2-H)
5.90(1H, d, J=2z, 6-H)	6.06(1H, d, J=2z, 8-H)
6.75(1H, dd, J=8,2Hz, B-ring, 6'-H)	6.92(1H, d, J=2Hz, 2'-H)
8.04(1H, d, J=8Hz, B-ring, 5'-H)	

Fig. 7. PMR spectrum of Fr-II-2-c fraction.

→8의 배위 결합을 시사하였다(Fig. 7).

한편, Fr-II-2-b fraction은 연갈색의 무정형 분말로 $[\alpha]^{25}_D = -25^\circ$ (C=1.0, acetone), C₂₂H₂₀O₆ 1/2 H₂O, m/z:411[M-H]⁻이었고, Fr-II-2-c fraction은 무색 침상형 결정(H₂O)으로 mp 172-175 °C, $[\alpha]^{25}_D = +9.4^\circ$ (C=1.0, acetone), C₁₅H₁₄O₆, m/z: 289 [M-H]⁻이었다.

따라서 이에 따라 동정한 결과, Fr-II-2 fraction



The peaks were assigned as follows:

2.54 - 2.96(2H, m, 4'-H)
4.04 - 4.99(5H in total, m, 2, 3, 4, 2', 3'-H)
5.87 - 6.19(3H in total, m, 6, 8, 6'-H)
6.32 - 7.20(6H in total, m, B, B'-H)

Fig. 8. PMR spectrum of Fr-II-2 fraction.

은 Fig. 8에서와 같은 (-)-epicatechin-(4β→8)-catechin으로 결합된 procyanidin B-1(C₃₀H₂₆O₁₂)로 밝혀졌다.

요 약

충치 예방 물질의 탐색 연구 일환으로, Cacao bean husk(CBH) 추출물로부터 얻어진, glucosyltransferase(Gtase) 저해 활성 분획을 분리하였다. 이를 다시 MCI-gel CHP-20와 Sephadex LH-20의 column chromatography법으로 분리, 정제하였으며, 이로부터 얻어진 2개의 GTase 활성 저해 물질에 대한 구조 해석을 행하였다.

분리·정제된 2개의 GTase 저해 활성 물질은 anisaldehyde-H₂SO₄ 및 FeCl₃에서 각각 갈색 및 청색 반응을 하며, 또 TLC상에서 dimer of flavan-3-ol R값을 나타내는 단일 물질이었다. NMR(PMR, CMR) 및 mass spectrum으로 두 정제 분획에 대한 화학 구조를 분석한 결과, GTase 저해능을 나타내는 단일질은 (-)-epicatechin-(4β→8)-catechin으로 결합된 procyanidin B-1(C₃₀H₂₆O₁₂) 및 catechin의 2량체인 procyanidin B-3(C₃₀H₂₆O₁₂)이었다.

참고문헌

1. 中西 喜次(1965), チョコレート ココア 製造の

- 理論と 實際, 光林書院, p. 51.
2. E. D. & F. Man Cocoa Ltd.(1991), Cocoa Market Report, No.339, p. 12.
 3. C. Shukei(1991), *Shoyakukagaku Zassi*, **45**, 49.
 4. T. Hayashi, K. Sawa, and N. Morita (1988), *J. Natural Products*, **51**, 345.
 5. K. Kameda, T. Takaku, H. Okuda, and Y. Kimura(1987), *J. Natural Products*, **50**, 680.
 6. 안봉전, 권익부, 이용우, 이신영(1993), *한국생물공학회지*, **8**(1), 75.
 7. 안봉전, 권익부, 유주현, 이신영(1993), *한국생물공학회지*, **8**(1), 69.
 8. 안봉전, 권익부, 최청(1995), *한국식품과학회지*, **27**(1), 92.
 9. A. Endo, O. Hayashima, and S.Murakawa (1983), *J. Antibiotics*, **36**, 203.
 10. G. Nonaka, E. Ezaki, K. Hayashi, and I. Nishioka(1983), *Phytochemistry*, **22**, 1659.