

조록나무 Proanthocyanidin의 α -Amylase 및 α -Glucosidase에 대한 저해 효과

이위영* · 안진권 · 박영기 · 박소영 · 김용무¹ · 이해익¹
국립산림과학원 생물공학과, ¹강원대학교 생명공학부

Inhibitory Effects of Proanthocyanidin Extracted from *Distylium racemosum* on α -Amylase and α -Glucosidase Activities

Wi Young Lee*, Jin Kwon Ahn, Youngki Park, So Young Park, Yong Mu Kim¹, and Hae Ik Rhee¹

Div. Biotechnology, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-350, Korea

¹Division of Biotechnology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

Abstract – *Distylium racemosum* Sieb. Et Zucc contains some compounds inhibit α -amylase activity in experimental conditions. The inhibitory test showed that 50% acetone extracts from the bark and leaves of the plant strongly inhibited salivary α -amylase activity. Proanthocyanidin (PA) which has strong inhibitory activity was extracted from the leaves by chromatography on Sephadex LH-20. The inhibitory activities and the inhibition kinetics of the PA were studied against three kinds of enzymes : human salivary α -amylase (SAA), pork pancreatin α -amylase (PAA) and yeast α -glucosidase (AG). Then the activities of PA against SAA, PAA and AG were compared with those of acarbose, a commercial agent. The inhibitory activities of PA were stronger than those of acarbose. Inhibition kinetics of the PA showed competitive inhibition for SAA and PAA, and non competitive inhibition for GA.

Key words – *Distylium racemosum*, proanthocyanidin, α -amylase, α -glucosidase, α -amylase inhibitor

Proanthocyanidin (PA)는 polyphenolic oligomer와 flavan-3-ol들이 polymer를 형성한 것으로서¹⁾ polyphenol의 고분자 화합물이며 축합형 tannin이라고도 한다. 식물의 2차 대사 산물로서 목본 수종에 널리 분포하며 과피, 종자, 꽃, 수피 및 잎 등에 함유되어 있고, 적색이나 보라색의 주요 전구물질이다. 이러한 탄닌 물질은 곰팡이, 병원균의 침입이나 초식 동물 등으로부터 보호하기 위해 생성되는 것으로 간주된다.²⁾

PA는 동물이나 인체에서 여러 가지 생리활성기능이 밝혀지고 있어, Aerts 등³⁾은 PA가 단백질과 결합 능력이 있어 반추동물 후위 내의 미생물로 하여금 단백질을 암모니아로 분해되는 것을 조절해 주어 소장에서 단백질(아미노산)의 흡수력을 증진시킨다 하였고, Yamagishi 등⁴⁾은 카카오의 수용성 PA이 heterocyclic amine (HCAs)계 돌연변이원에 대한 항돌연변이 효과를 보고하였으며, 포도 씨앗 추출물 등으로부터 분리된 PA가 심장혈관 보호작용이나 항산화활성 등에 관한 보고^{5,6)}가 있다. 이와 같은 생리활성기능으로 PA는 앞

으로 많은 연구가 기대되고 있다.

목본 수종을 대상으로 α -amylase의 저해 수종을 탐색하여 조록나무에서 효과가 높게 나타났으며, 특히 조록나무에서 추출된 PA이 α -amylase의 저해효과가 높게 나타나는 것을 본 시험에서 확인하였다. α -amylase는 전분, glycogen이나 다른 탄수화물의 α -D-(14)-glucan 결합을 분해하는 효소로서 사람, 동물, 미생물, 곤충 등의 탄수화물 대사작용에 필수적인 효소이다. 그러나 당뇨, 비만, 과혈당증 등 탄수화물과 관련된 질병 치료를 위한 당의 소화 및 흡수를 제어할 목적으로 또는 해충이나 잡초의 방제를 위하여 α -amylase 저해제에 대한 연구가 진행되고 있다.⁷⁻⁹⁾

식물에서 보고된 α -amylase 저해제는 밀,⁷⁾ 보리,¹⁰⁾ 두류 식물¹¹⁻¹³⁾ 등에서 유래한 것으로 당 단백질과 관련된 물질이 대부분으로, 주로 초본이거나 일부 한약재와 미생물¹⁴⁻¹⁵⁾을 대상으로 연구가 있을 뿐 목본 식물 유래의 저해물질에 대한 보고는 거의 없는 형편이다.

조록나무는 제주도 지역과 일본 및 중국에 분포하는 상록 활엽수로서, 잎에 벌레혹을 형성하는 특징이 있으며,¹⁶⁾ 향

*교신저자(E-mail) : lwy20@foa.go.kr
(FAX) : 031-290-1020

산화 활성도 비교적 높은 수준¹⁷⁾으로 보고되고 있다.

본 연구는 α -amylase저해 활성이 높게 나타난 조록나무 추출물의 α -amylase에 대한 활성저해 효과와, 조록나무 잎의 추출물인 proanthocyanidin의 α -amylase 및 α -glucosidase에 대한 활성저해 효과 및 기작을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료 - 제주도 상효동 돈내코 계곡에서 8년생의 조록나무(*Distylium racemosum* Sieb. Et Zucc)를 4월 중순에 채취하여 시험재료로 사용하였다. 조록나무의 부위별 저해 활성검정을 위하여 뿌리, 목부, 잎, 수피의 내피 및 외피로 분류, 음건, 파쇄하여 추출시료로 사용하였다. 추출용매 종류별에 따른 저해활성 검정용 및 PA 분리용 시료는 잎을 사용하였다.

부위별 및 추출용매별 추출물 조제 - 조록나무 부위별 시료를 50% acetone으로 교반기에서 120 rpm으로 24시간 추출, 여과하여 여액을 일정 농도로 희석하여 SAA 저해활성 검정 용액으로 사용하였다. 추출용매별 SAA 저해활성을 검정하기 위하여 조록나무의 잎 시료를 EtOH, MeOH 및 0.1N-NaOH에 넣어 교반기에서 120 rpm으로 24시간 추출하였고, H₂O에 의한 추출은 환류냉각 장치에서 1시간동안 가열 추출을 하였다. 추출물을 여과하고, 여액의 pH를 6.8로 조절 후 일정 농도로 희석하여 검정용액으로 사용하였다.

Proanthocyanidin (PA) 분리 - 건조, 분말화된 조록나무 잎을 50% acetone으로 추출, 농축하였다. Booker 등¹⁸⁾의 방법에 따라 농축액을 diethylether 및 ethyl acetate로 분획, 제거 후 물층을 농축, 건조하고 Sephadex-LH 20 칼럼에 충전하였으며, 50% methanol로 세척 후 50% acetone으로 PA를 분리하였다. 분리된 PA를 농축, 건조하여 ethanol로 녹여 검정시료로 사용하였다.

Salivary α -amylase (SAA)와 pancreatin α -amylase (PAA)의 활성저해 검정 - 인간 타액 유래의 SAA와 돼지 췌장 유래의 PAA (Sigma, Mo, U.S.A)에 대한 저해활성은 starch (Sigma, Mo, U.S.A)를 기질로 하여 측정하였다. 효소액 (2 unit)과 조록나무의 추출물이나 PA 및 비교로서 acarbose (Bayer, German)을 0.2 M-Tris-HCl buffer (pH

7.0)에 넣고, 37°C에서 10분간 혼합, 반응시킨 후 0.5% starch를 가하여 37°C에서 5분간 반응시키고, DNS 발색시약을 넣어 반응을 정지시켰다. 이를 80°C에서 10분간 가열하여 발색을 시키고, 냉각 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이렇게 얻은 결과를 반응액에 추출물 대신 동량의 ethanol을 넣은 값과의 차이로부터 저해율을 계산하였다.

α -Glucosidase (AG)의 활성저해 검정 - 효모기원의 0.2 unit의 AG (Sigma, Mo, U.S.A)와 조록나무의 PA 및 비교로서 acarbose를 0.1 M-phosphate buffer (pH 7.0)에 넣고 혼합하여, 37°C에서 15분간 반응시킨 후 3 mM p-nitrophenyl α -D-glucopyranoside (Sigma, Mo, U.S.A)를 가하여 37°C에서 10분간 반응 후, 0.1 M Na₂CO₃를 가하여 반응을 정지시켰다. 400 nm에서 흡광도를 측정하여 저해율을 계산하였다.

효소의 활성저해에 대한 반응기작 - PA처리에 따른 SAA, PAA 및 AG에 대한 저해활성 기작은 각 효소에 PA 및 기질을 농도 별로 처리하여 농도별, 시간에 따른 K_m 및 K_i 값을 계산하였고, 또한 Lineweaver-Burk plot으로부터 저해활성기작을 구하였다.

결과 및 고찰

조록나무의 부위별 및 추출용매별 추출물의 SAA에 대한 활성저해 효과

추출용매별 SAA에 대한 저해 효과를 비교하기 위해 조록나무 잎을 대상으로 용매별로 추출하여 적정 비교가능 농도로 일정하게 희석 후 활성저해 효과를 비교하였다. 50% acetone추출물에서 가장 높은 저해 효과를 보였다(Table I). 이러한 acetone추출물에는 주로 flavonoid류를 포함한 색소류와 지질성분 등이 포함되어 있다. Flavonoid류는 식물에서 자외선(ultraviolet)의 선택적 흡수, 곤충의 유인 등에 의한 수분과 수정 유도, 그리고 곤충과 병원균 등의 병해충의 침입으로부터의 방어기능을 하는 것으로 알려져 있다.¹⁹⁾

조록나무의 부위별 추출물의 SAA에 대한 활성저해 효과를 비교하기 위해 50% acetone으로 추출 후 적정 비교가능 농도로 일정하게 희석하여 활성저해 효과를 검정하였다. 부위별 추출물의 SAA에 대한 저해활성은 수피의 외피 > 잎 > 수피의 내피 > 뿌리 > 목부의 순으로 나타났다(Table II). 특

Table I. SAA inhibitory activities of solvent extracts from leaves of *Distylium racemosum*

	Extract solvents							
	100% MeOH	50% MeOH	100% EtOH	50% EtOH	100% Acetone	50% Acetone	0.1N-NaOH	H ₂ O
Inhibition ratio (%)	10	69	5	19	5	91	5	5

Each extracts was obtained by shaking at 120 rpm for one day, with exception on H₂O-extract which was obtained by refluxing at 100°C for 30 min. The extracts were diluted with H₂O and the diluted solutions were used to compare inhibitory activities with each other.

Table II. SAA inhibitory activities of extracts from root, xylem, inner bark, outer bark, and leaves of *Distylium racemosum*

Inhibition ratio(%)	Parts				
	Roots	Xylem	Inner bark	Outer bark	Leaves
	28	12	38	93	85

Each extracts was obtained by shaking at 120rpm for one day using 50% acetone as an extract solvent. The extracts were diluted with H₂O and the diluted solutions were used to compare inhibitory activities with each other.

히 수피와 잎의 추출물에서 활성저해 작용이 가장 높았다. 이는 수피나 잎 부분에 2차 대사산물로서 안토시아닌, proanthocyanidins 등과 같은 탄닌 물질이 병원균이나 해충으로부터 자신을 보호하기 위해 다량 함유하고 있기 때문인 것으로 추정된다.²⁾ 한편 뿌리 및 목부 추출물에서도 활성저해효과가 있어, 전반적으로 조록나무 전체 부위의 추출물에서 SAA에 대한 활성저해작용이 있었다.

PA의 SAA에 대한 활성저해 효과

50% acetone 추출물의 분리물질에 대한 활성 실험을 통하여 PA에서 강한 활성이 확인되어 PA의 SAA에 대한 활

성저해 효과 및 기작을 구명하고자 하였다.

조록나무 잎에서 분리된 PA을 대상으로 SAA에 대한 PA의 저해활성을 조사한 결과 인간 타액기원의 α -amylase 및 돼지 기원의 α -amylase에 대한 PA의 저해 활성은 공통적으로 비교적 높았으며, 혈당강하제로 사용되고 있는 acarbose와 비교한 결과 PA가 100 ug/ml이상의 처리농도에서는 acarbose보다 높은 저해활성을 나타냈다. 그러나 PA가 100 ug/ml보다 낮은 처리 농도에서는 acarbose보다 낮은 경향을 나타냈다(Fig. 1).

Fig. 2는 PA의 SAA 및 PAA에 대한 저해기작을 나타낸 것으로서, SAA 및 PAA의 두 종류 모두에서 경쟁적인 형

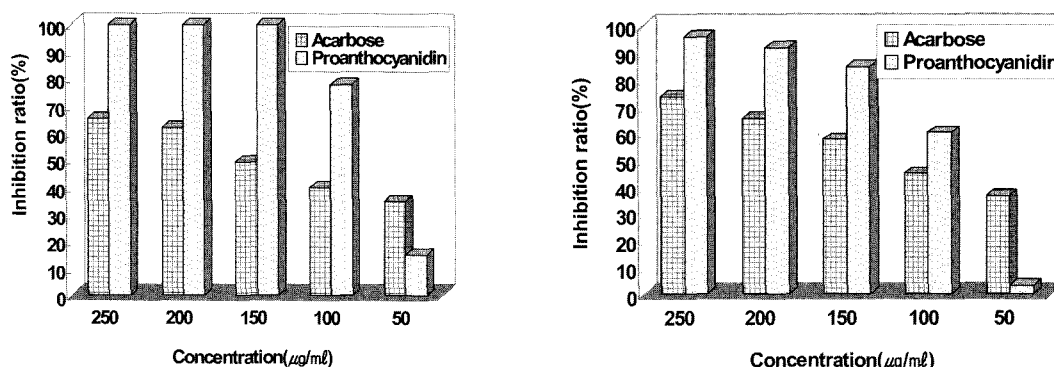


Fig. 1. SAA (soused in human; left) and PAA (soused in pork; right) inhibitory activities of PA isolated from *Distylium racemosum* and acarbose

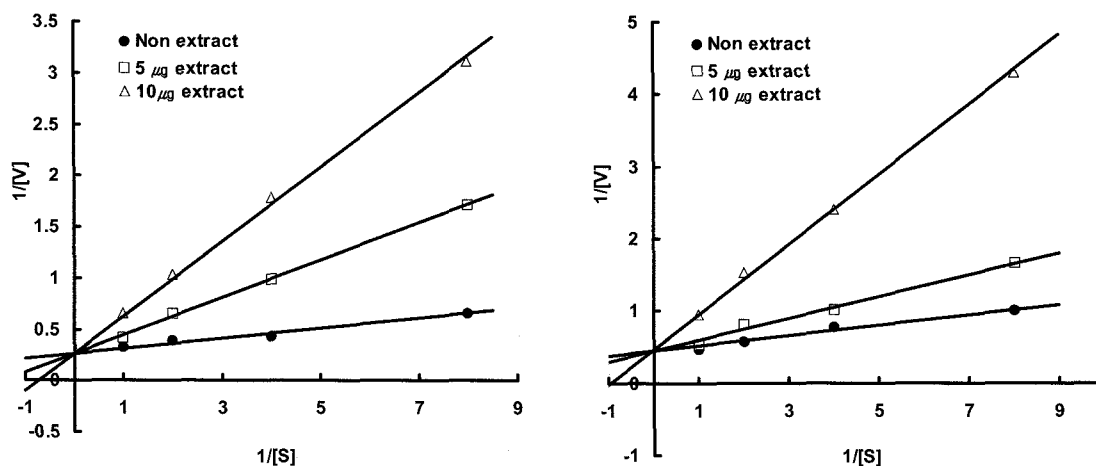


Fig. 2. Line weaver-Burkplot of the reaction of SAA (soused in human; left) and PAA (soused in pork; right) in the presence of PA isolated from *Distylium racemosum*.

Table III. K_i values of PA for salivary α -amylase, pancreatin α -amylase and yeast α -glucosidase

Enzyme	Substrate	K_m (M)	K_i ($\mu\text{g/ml}$)
Salivary α -amylase	Starch	1.9×10^{-4}	1.81
Pancreatin α -amylase	Starch	1.6×10^{-4}	1.73
Yeast α -glucosidase	pNPG ¹⁾	5.2×10^{-4}	0.14

¹⁾: p-nitrophenyl α -D-glucopyranoside

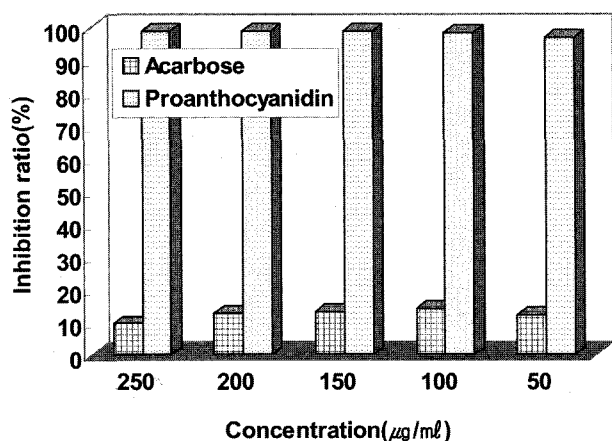


Fig. 3. GA (soused in yeast) inhibitory activities of PA isolated from *Distylium racemosum* and acarbose

태의 저해작용을 하는 것으로 나타났다. 이러한 특성은 경쟁적인 형태의 acarbose²⁰⁾와 같은 기작으로 저해활성을 나타내고 있었다. PAA와 SAA의 starch에 대한 K_m 값은 각각 0.19과 0.16 mM로 나타났으며, 이때의 K_i 값은 각각 1.81과 1.73 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다(Table III).

PA의 AG에 대한 활성저해 효과

효모기원의 AG에 대한 PA의 저해활성은 acarbose보다 매우 높았으며 또한 저농도에서도 높았으며(Fig. 3), PA의 AG에 대한 저해기작은 비경쟁적 저해 기작을 하는 것으로 나타났다(Fig. 4). AG의 p-nitrophenyl α -D-glucopyranoside에 대한 K_m 값은 0.52 mM로 나타났고, 이때의 K_i 값은 0.14 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다(Table III).

이러한 특성은 혈당 강하제인 acarbose와는 다른 형태로 저해기능을 하는 것으로 나타났다. 즉 acarbose가 갖고 있지 못한 효모기원의 AG에 강한 억제효과가 있다. 또한 저농도에서도 높은 저해활성이 있어 인체에 적용할 경우 장내 세균 활성도를 낮게 하여 acarbose의 단점인 복부팽만감을 낮출 수 있는 효과가 있을 것으로 생각된다. 그러나 본 논문에는 제시하지 않았지만 돼지 소장 점막 유래의 α -glucosidase에 대한 저해활성은 없었다. 이는 Blanco 등²¹⁾이 corn에 존재하는 α -amylase 저해제는 돼지 췌장, 인간의 타액과 곰팡이 α -amylase에는 활성이 없었지만, 곤충과 세균의 α -amylase에는 저해활성을 보였다는 것과 유사한

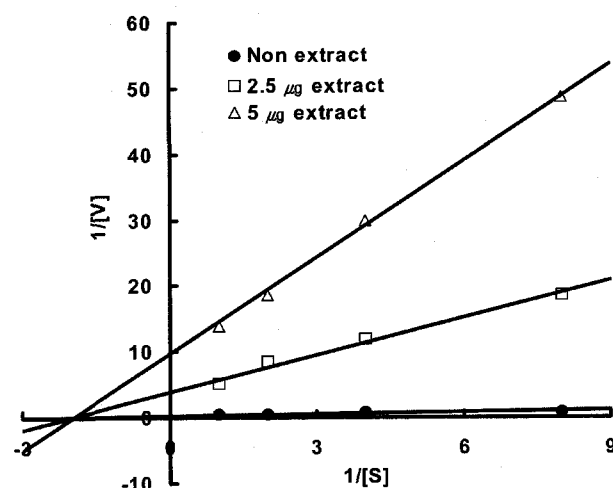


Fig. 4. Line weaver-Burkplot of the reaction of AG (soused in yeast) in the presence of PA isolated from *Distylium racemosum*.

경우로서 효소의 기원에 의한 특이성 때문인 것으로 추정된다.

Mitsunaga 등²²⁾은 일본잎갈나무 및 아카시아나무 수피로부터 분리한 PA이 치아 우식증의 원인이 되고 있는 GTase 효소활성을 억제하는 것을 보고한 바가 있어 PA은 탄수화물과 관련한 효소의 일부 기능을 억제하고 있는 것으로 생각된다. 기존의 식물유래의 α -amylase 억제물질은 대부분 단백질과 관련된 물질이나 본 연구에서 밝혀진 PA은 phenol 계통의 물질이라는 것이 특징이며, PA가 α -amylase 및 α -glucosidase의 활성을 저해하는 기능이 있음을 처음으로 보고하는 것이다. 본 연구에서 제시하지는 않았으나 소나무 수피나 밤 내피 유래의 PA에서도 효소활성 억제의 차이는 있지만 조록나무 유래의 PA과 유사한 α -amylase에 대한 활성억제 작용이 있었다.

PA은 α -amylase 및 α -glucosidase에 대한 저해활성이 높아 천연물 유래의 약제로서의 개발가능성도 있는 것으로 추정된다. 그러나 이러한 결과는 *in vitro*에서의 실험 결과이므로 실제 *in vivo*에서의 결과는 달리 나올 경우가 많다. PA은 비교적 고분자 화합물이므로 인체내에서 산이나 소화효소에 의해 변형이 될 수 있기 때문이다. 앞으로 PA에 대한 물질의 구성성분의 동정, 물성 및 *in vivo*에서의 활성 등에 관한연구가 필요하다.

결 론

조록나무로부터 분리한 PA에 대하여 SAA, PAA 및 GA의 활성저해 효과 및 기작을 규명하였다.

조록나무 채취 부위별에 따른 조추출물의 SAA에 대한 활성 억제는 잎과 수피에서 가장 높았다. 조록나무에서 분리한 PA은 salivary 및 pancreatin기원의 α -amylase에 저해활성이 높았으며 또한 효모 기원의 GA의 저해활성도 높게 나타났다. PA의 활성저해 기작은 SAA 및 PAA 대해서는 경쟁적으로 나타났고, GA의 경우는 비경쟁적인 저해 작용을 하는 것으로 나타났다.

인용문헌

- Haslam, E. (1996) Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat. Prod.* **59**: 205-215.
- Bernays, E. A., Cooper Driver, G., and Bilgener, M. (1989) Herbivores and plant tannins. In Begon, M., Fitter, A.H., MacFadyen, A. (Eds.), *Advances in Ecological Research*. vol. 19, 263-302. Academic Press, London.
- Aerts, R. J., Barry, T. N., and McNabb, W.C. (1999) Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agric. Ecosys. Environ.* **75**: 1-12.
- Yamagishi, M., Natsume, M., Osakabe, N., Nakamura, H., Furukawa, F., Imazawa, T., Nishikawa, A., and Hirose, M. (2002) Effects of cacao liquor proanthocyanidins on PhIP-induced mutagenesis *in vitro*, and *in vivo* mammary and pancreatic tumorigenesis in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett.* **185**: 123-130.
- Bagchi, D., Sen, C. K., Ray, S. D., Das, D. K., Bagchi, M., Preuss, H. G., and Vinson, J. A. (2003) Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutat. Res.* **523**: 78-97.
- Jagan Mohan Rao, L., Yada, H., Ono, H., Ohnishi-Kameyama, M., and Yoshida, M. (2004) Occurrence of antioxidant and radical scavenging proanthocyanidins from the Indian minor spice nagkesar (*Mammea longifolia* planch and triana syn). *Bioorg. Med. Chem.* **12**: 31-36.
- Feng G. H., Richardson, M., Chen, M. S., Kramer, K. J., Morgan, T. D., and Reek, G. R. (1996) -Amylase inhibitors from wheat: Amino acid sequences and patterns of inhibition of insect and human α -amylases. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **26**: 419-426.
- Markwick, N. P., Laing, W. A., Christeller, J. T., Reid, S. J., and Netwton, M. R. (1996) α -amylase activities in larval midgut extracts from four species of *Lepidoptera* (Tortricidae and Gelechiidae): Response to pH and to inhibitors from wheat, barley, kidney bean, and streptomycetes. *J. Eeon. Entomol.* **89**: 39-45.
- Rekha, M. R., Sasikiran, K., and Padmaja, G. (2003) Inhibitor potential of protease and α -amylase inhibitors of sweet potato and taro on the digestive enzymes of root crop storage pests. *J. Stored Prod. Res.* In press.
- 문주석, 신창식, 최진상, 박석규, 심기환 (1995) 한국산 쌀 보리 α -amylase 저해물질의 분리 및 정제. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **24**: 556-562.
- Takahashi, T., Hiramoto, S., Wato, S., Nishimoto, T., Wada, Y., Nagai, K., and Yamaguchi, H. (1999) Identification of essential amino acid residues of an α -amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris* white kidney beans. *J. Biochem.* **126**: 838-844.
- Yamada, T., Hattori, K., and Ishimota, M. (2001) Purification and characterization of two α -amylase inhibitors from seeds of tepary bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). *Phytochemistry* **58**: 59-66.
- 전승호, 류일환, 박승택, 이갑상 (2001) White kidney bean (*Phaseolus vulgaris*)로부터 α -amylase 저해제의 분리/정제. *Korean J. Food Sci. Technol.* **33**: 117-121.
- Miller, B. S. and Keen, E. (1947) The amylase inhibitor of *Leoti sorghum*. *Archiv. Biochem.* **15**: 251-261.
- 김제학, 김정우, 김하원, 심미자, 최웅철, 김병각 (1985) α -amylase 저해제 생산 방선균의 선별과 분류 및 α -amylase 저해제의 분리와 Kinetics 연구. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **13**: 223-232.
- Lee, T. B. (1979) Illustrated flora of Korea. 424. Hyangmoonsa, Seoul.
- Park, Y., Lee, W. Y., Ahn, J. K., Lee, H. J., Chin, H. S., and Kwon, Y. J. (2003) Antioxidant compounds from *Distylium racemosum* leaves. *J. Wood Sci. Technol.* **31**: 67-72.
- Booker, F. L., Anttonen, S., and Heagle, A. S. (1996) Catechin, proanthocyanidin and lignin contents of loblolly pine (*Pinus taeda*) needles after chronic exposure to ozone. *New Phytol.* **132**: 483-492.
- Bohm, B. A. (1998) Introduction to flavonoids. In Ravindrath, B. (Eds.), *Chemistry and biochemistry of organic natural products*. 503. Hardwood academic publishers, India.
- Yoon, S. H. and Robyt, Y. J. (2003) Study of the inhibition of four alpha amylases by acarbose and its 4^{IV}- α -maltohexaosyl and 4^{IV}- α -maltododecaosyl analogues. *Carbohydrate Res.* **338**: 1969-1980.
- Blanco, L. A. and Iturbe, C. F. A. (1981) Purification and characterization of an α -amylase inhibitor from maize(*Zea mays*). *J. Food Biochem.* **5**: 1-14.
- Mitsunaga, T., Abe, L., Kontani, M., Ono, H., and Tanaka, T. (1997) Inhibitory effects of bark proanthocyanidins on the activities of glucosyltransferases of *Streptococcus sobrinus*. *J. Wood Chem. Technol.* **17**: 327-340.

(2004년 4월 2일 접수)