

헛개열매 추출물의 산 가수분해에 의한 알코올 분해 효능 증대

강 성 희 · 김 성 문 · † 김 진 현

공주대학교 화학공학부

(접수 : 2005. 4. 7., 게재승인 : 2005. 4. 23.)

Method of Using Acid Hydrolysis to Increase the Efficacy of Decreasing Alcohol Concentration from *Hovenia dulcis* Extract

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

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

(Received : 2005. 4. 7., Accepted : 2005. 4. 23.)

This work was a method that used an acid hydrolysis for increasing the efficacy of decreasing alcohol concentration from *Hovenia dulcis* extract. For acid hydrolysis, 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.

Key Words : *Hovenia dulcis*, acid hydrolysis, efficacy of decreasing alcohol concentration

서 론

헛개나무 (*Hovenia dulcis*)는 갈매나무과의 낙엽활엽교목으로 높이가 10~20 m, 직경 40~80 cm 내외로 자라는 나무로 헛개나무, 호개나무, 허리개나무라고 불리며 열매는 10~11월경에 갈색으로 열리며 과경 끝에 8 mm 정도로 3개의 방에 윤채가 있는 종자가 각각 1개씩 들어있다. 우리나라에서는 설악산, 오대산, 지리산, 한라산 및 계룡산 등에 주로 자라며 중북부 지방보다는 온화한 남쪽지방에서 잘 생육하는 교목으로 과병과 줄기는 단맛과 향을 내어 식용, 과주 및 약용으로 주로 주독을 제거하는데 많이 사용되어져 왔다(1, 2). 헛개나무에 관한 연구로는 민간요법으로 헛개나무 잎, 줄기 및 열매로 만든 차가 주독 제거 및 과음시 부작용으로 나타나는 황달, 지방간, 간경화증, 위장병 등의 간기능 보호에 효능이 뛰어난 것으로 전해지고 있다(3). 특히 Fig. 1에서 보는 바와 같이 헛개나무의 열매에서 분리한 (+)-dihydromyricetin [(2R,3R)-5,7,3',4',5'-pentahydroxydihydroflavonol, (+)-ampelopsin, 분자량: 319]는 알코올 분해 및 간기능 회복에 효과가 있다는 보고가 있

으며(4), 헛개열매 추출물에서 분리한 hovenodulinol (flavonol 성분)을 이용한 동물실험 결과 알코올 분해에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(5). Hase와 Basnet(6)는 쥐에 간염을 유발한 후에 헛개나무 추출물을 첨가하였을 경우 간염치료 효과를 보고하였고, Sakai와 Yamane(7)은 헛개나무의 추출물이 알코올을 투여한 쥐의 혈중 알코올 농도를 저하시키는 효과가 있음을 보고하였다. 이처럼 헛개열매 추출물은 알코올 분해 및 간 기능 회복에 뛰어난 효과가 있는 것으로 나타났고, 헛개열매 추출물은 알코올 분해효소의 활성을 30% 정도 증진하는 것으로 나타났(5).

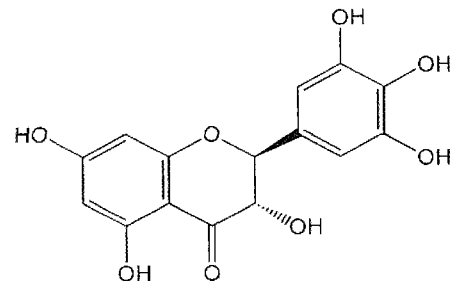


Figure 1. Structure of (+)-dihydromyricetin.

† Corresponding Author : 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

본 연구에서는 헛개나무의 열매 속에 포함되어 있는 배당체 (glycoside)를 산 가수분해 방법으로 분해하여 알코올

분해 및 간기능 회복에 효능이 있는 생리활성물질 ((+)-dihydromyricetin)의 생산성을 증대시켰다. 산 가수분해 조건을 최적화하였으며, 또한 생산성 증대 기작 (mechanism)을 규명하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 추출방법

본 실험에서 사용한 헛개나무 (*Hovenia dulcis*)의 열매, 잎 및 줄기는 충청남도 공주시에서 2004년에 채집하여 냉동보관하면서 실험의 재료로 사용하였다. 헛개나무를 열매, 잎, 줄기로 나누어 채집하고 건조시킨 뒤 분쇄 (1 mm)하여 시료 중량에 대해 각각 10배의 증류수로 10시간 동안 100°C에서 hot plate를 사용하여 열수 추출하였다. 추출물은 Whatman 0.45 µm 여과지를 사용하여 여과하였다.

산 가수분해 방법

헛개열매 열수 추출물을 고속원심분리기 (high-speed centrifuge)를 이용하여 헛개열매 추출물의 침전물을 제거하고 상층액을 실험에 사용하였다. 열수 추출 후 헛개열매 추출물의 pH는 4.65~4.69 정도이며, 이를 2 N HCl 용액으로 산 처리하여 산 가수분해 실험을 수행하였다. 산 가수분해 온도는 70°C, 80°C, 90°C이며 water bath에서 온도 조절하여 10시간 동안 반응을 시켰다. 온도변화, 반응시간, pH 등의 산 처리 조건 변화에 따른 효능을 알코올 분해 효소 (alcohol dehydrogenase, ADH)의 활성 분석을 통하여 확인하였다.

알코올 분해 효소 활성 측정

알코올 분해 효소의 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(8). 헛개열매 추출물 대신 증류수를 첨가하여 control로 사용하였다.

당 분석 및 분자량 확인

HPLC (Waters, USA)를 이용하여 산 가수분해 전 후에 당 성분의 변화를 확인하였다. HPLC 분석은 CHO 820 column (7.8 × 300 mm, Trans genomic, USA)을 사용하였다. 이동상은 distilled water (isocratic), 유속은 0.5 ml/min, column 온도는 90°C, 시료 주입량은 10 µl이며 RI detector를 사용하였다. 또한 산 가수분해 전후의 미지 성분을 분취, 농축하고, MALDI-TOF-MS (ABI Voyager DE-STR, USA) 분석을 통하여 분자량을 확인하였다. 장치는 300 nm nitrogen laser 및 1.178 m flight tube가 장착되어 있으며 양이온 모드에서 측정되었다. 사용된 가속전압은 25 kV이며 delayed extraction mode를 이용한 linear 조건에서 측정하였으며 external calibration (matrix: 2,5-dihydroxybenzoic acid, MW = 154.12 Da)을 사용하였다(9).

생리활성물질 ((+)-dihydromyricetin) 함량 분석

HPLC (Waters, USA) 분석방법에 의해 생리활성물질인 (+)-dihydromyricetin의 함량을 분석하였다. 헛개열매를 열수 추출하고 ethyl ether를 가하여 상 분리후 상층액 (ethylether 층)만을 회수하여 농축 후 분석에 사용하였다. HPLC 분석은 C18 column (4.6 × 150 mm, Beckman, USA)을 사용하였다. 이동상의 gradient 조건은 acetonitrile/distilled water를 10/90 (v/v)을 5분간 흘려준 뒤 25분 후 70/30 (v/v)이 되도록 하였다. 유속은 1.0 ml/min, 시료 주입량은 20 µl, UV detector (254 nm)를 사용하였다. (+)-Dihydromyricetin 표준물질은 Guilin Natural Ingredients Inc. (Guilin, China) 제품 (순도 > 80%)을 사용하였다(10).

결과 및 고찰

산 가수분해에 의한 생리활성물질의 생산성 증대 이론

천연물에 존재하는 생리활성물질은 배당체 (glycoside) 형태로 존재하는 경우가 많다(11, 12). 헛개열매에 포함되어 있는 배당체를 산 가수분해를 통하여 알코올 분해능을 가진 생리활성물질인 (+)-dihydromyricetin의 생산을 증가시키는 이론을 Fig. 2에 나타내었다. 배당체 형태로 존재하는 생리활성물질인 (+)-dihydromyricetin을 산 가수분해에 의해 배당체에 결합되어있는 당과 생리활성물질인 (+)-dihydromyricetin을 분리하여 생리활성물질의 생산량을 증대시켰다.

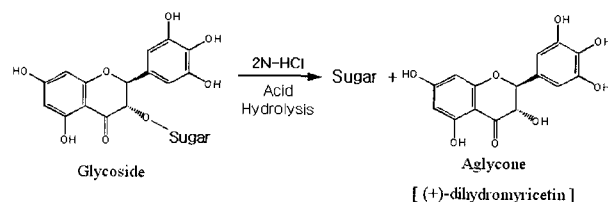


Figure 2. Theory of acid hydrolysis.

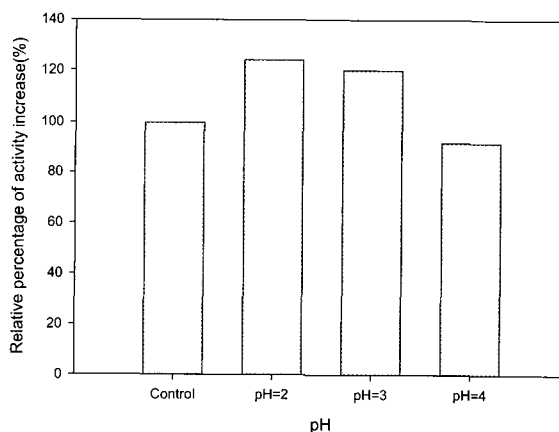


Figure 3. Effect of pH on alcohol dehydrogenase activity in acid hydrolysis (reaction temperature: 80°C, reaction time: 4 hr).

산 가수분해 반응 pH의 영향

헛개열매 추출물로부터 원심분리기를 이용하여 침전물

을 제거한 상등액을 실험 재료로 사용하였다. 헛개열매 추출물의 pH는 4.65~4.69 정도이며, 헛개열매 추출물에 2 N HCl 용액으로 산 처리하여 실험에 이용하였다. 산 처리 조건인 pH 변화 (pH = 2.0, 3.0, 4.0)에 따른 헛개열매 추출물의 알코올 분해 효소의 활성 증감을 Fig. 3에 나타내었다. 반응온도 80℃, 반응시간 4 hr인 경우, pH 2.0에서 124% 활성이 증가하여 최대치를 보였다. pH 3.0에서는 120% 활성이 증가하였으며 pH 4.0에서는 오히려 활성이 감소하여 산 가수분해를 위한 최적의 pH는 2.0임을 알 수 있었다. 반면에 Fig. 4에서 보는 바와 같이 헛개나무의 잎과 줄기의 경우에는 산 가수분해 전후에 효소활성 증가가 전혀 확인되지 않음을 알 수 있었다. 이러한 결과로부터 헛개나무의 잎과 줄기에는 열매와 달리 생리활성물질이 거의 없었으며, 또한 배당체 형태로도 존재하지 않아 산 가수분해의 효과도 없음을 알 수 있었다.

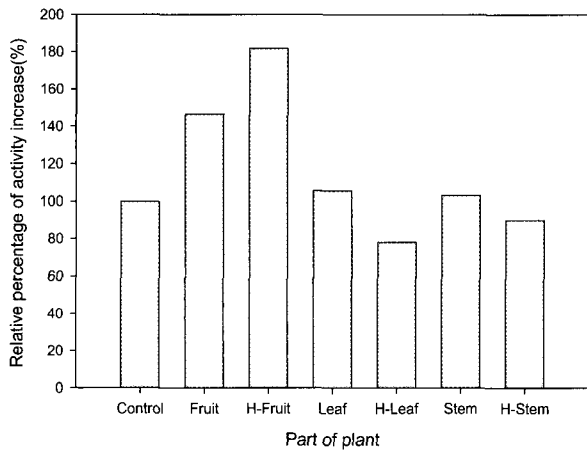


Figure 4. Effect of fruit, leaf and stem extract on alcohol dehydrogenase activity in acid hydrolysis (reaction temperature: 80℃, reaction pH: 2.0, H-Fruit: hydrolyzed fruit, H-Leaf: hydrolyzed leaf, H-Stem: hydrolyzed stem).

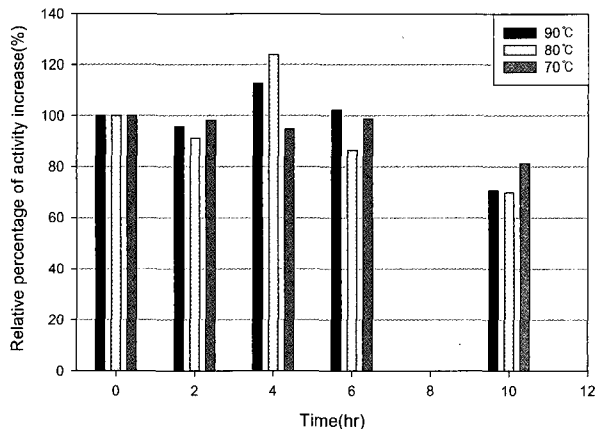


Figure 5. Effect of reaction temperature on alcohol dehydrogenase activity in acid hydrolysis (pH = 2.0).

산 가수분해 반응온도와 반응시간의 영향

최적의 pH 2.0에서 온도변화와 반응시간에 따른 효소 활성의 증감을 Fig. 5에 나타내었다. 반응온도 90℃와 80℃에

서는 반응시간 4 hr에서 알코올 분해 효소 활성의 증가를 확인할 수 있었으며, 반응온도가 증가할수록 활성이 증가하다가 반응온도 80℃, 반응시간 4 hr에는 124%의 활성의 증가를 보여 최대치를 나타내었으며 그 이후에는 활성이 오히려 감소하였다. 이러한 감소현상은 낮은 pH, 높은 온도 및 반응시간의 지속으로 효능성분의 분해에 따른 것으로 판단된다(13). 70℃에서는 반응시간이 길어져도 활성이 증가되지 않았다. pH 3.0에서도 반응온도가 80℃, 반응시간 4 hr에서 120%로 활성이 증가하여 최대치를 보였으며, 그 이후에는 감소하였다. pH 4.0에서는 70℃와 80℃에서 반응시간 증가에 따라 효소 활성이 증가하였으며 반응시간 10 hr에서 각각 107%, 110%를 나타내어 최대치를 보였다(data not shown). 이상의 산 가수분해 실험에서 산 가수분해를 위해 반응 pH 2.0, 반응온도 80℃, 반응시간 4 hr이 최적 조건임을 알 수 있었다.

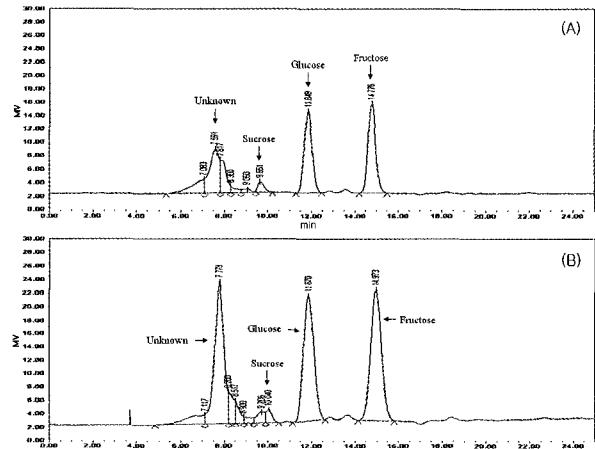


Figure 6. Effect of acid hydrolysis on sugar concentration ((A) Before acid hydrolysis, (B) After acid hydrolysis).

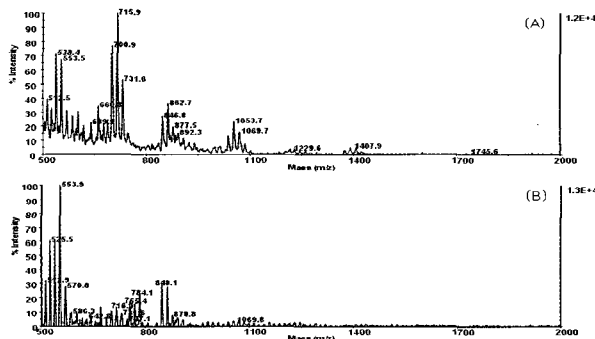


Figure 7. The result of MARDI-TOF analysis ((A) Before acid hydrolysis, (B) After acid hydrolysis).

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

pH 2.0, 반응온도 80℃, 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 분석 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 단당류 (glucose, fructose)와 이당류 (sucrose), 그

리고 미지 (unknown)의 성분이 확인되었다. 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 확인하여 Fig. 7에 나타내었다. 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.

요 약

본 연구는 헛개열매 추출물의 pH를 산성으로 조절한 산 가수분해 방법에 의하여 헛개열매 추출물에 배당체 형태로 존재하는 알코올분해 효능을 가진 생리활성물질 ((+)-dihydromyricetin)의 양을 증가시켰다. 반응온도 80℃, 반응시간 4 hr, 반응 pH 2.0에서 124%의 알코올분해 효능이 증가하여 최적임을 알 수 있었다. 산 가수분해 전 후에 생리활성물질인 (+)-dihydromyricetin의 양이 30% 증가함을 알 수 있었으며, 또한 헛개열매 추출물에 포함되어 있는 고분자 물질이 분해됨을 확인할 수 있었다.

감 사

본 연구는 산업자원부 지정 공주대학교 자원재활용신소재 연구센터의 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. Jeong, C. H. and K. H. Shim (1999), Antimicrobial activity of *Hovenia dulcis* THUNB leaf and fruit stalk extracts, *J. Inst. Agri. & Fishery Develop., Gyeongsang Nat'l. Univ.* **18**, 25-32.
3. 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.
4. 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**, 108-118.
5. 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.
6. Hase, K. and P. Basnet (1997), Effect of *Hovenia dulcis* on lipopolysaccharide-induced liver injury in chronic alcohol-fed rats, *J. Trad. Med.* **14**, 28-33.
7. Sakai, K., T. Yamane, Y. Saitoh, C. Ikawa, and T. Nishihata (1987), Effect of water extracts of crude drugs in decreasing blood alcohol concentrations in rats, *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 4597-4604.
8. Kim, M. H. and O. H. Kwon (1992), Relationship hepatic triglyceride accumulation by ethanol to activity of lipogenic enzymes in rat liver, *Korea Biochem. J.* **25**, 499-503.
9. Harvey, D. J. (1999), Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates, *Mass Spectrom. Rev.* **18**, 349-451.
10. Du, Q., W. Cai, M. Xia, and Y. Ito (2002), Purification of (+)-dihydromyricetin from leaves extract of *Ampelopsis grossedentata* using high-speed countercurrent chromatograph with scale-up triple columns, *J. Chromatogr. A* **973**, 217-220.
11. Lee, K. J. and K. H. Row (2004), Comparison of extraction methods for aglycone isoflavones from Korean Soybean, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **19**, 421-426.
12. Guo, J., D. L. Yu, L. Xu, M. Zhu, and S. L. Yang (1998), Flavonol glycosides from *Lysimachia congestiflora*, *Phytochemistry* **48**, 1445-1447.
13. Kim, J. H., I. S. Kang and S. S. Hong (2000), Method of using hydrolisis to increase paclitaxel yeild from plant cell culture, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **11**, 402-404.