

## 폴리페놀산화효소를 활용한 Gallic Acid 반응물의 라디칼 소거 및 $\alpha$ -Glucosidase 저해 활성 평가

- 연구노트 -

정윤희 · 김태훈  
대구대학교 식품공학과

### Evaluation of Radical Scavenging and $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Effects of Gallic Acid Reactants Using Polyphenol Oxidase

Yun Hee Jeong and Tae Hoon Kim

Department of Food Science and Biotechnology, Daegu University

**ABSTRACT** Gallic acid is a representative hydroxybenzoic acid and is found in free form in several plants and in various esterified forms as a part of hydrolyzable tannins. Convenient enzymatic transformation of trihydroxylated gallic acid with polyphenol oxidase originating from pear was evaluated to investigate whether polyphenol oxidase can be used as a valuable compound to improve the biological activity of gallic acid. Enzymatic oxidation processing of gallic acid using polyphenol oxidase was carried out for five different reaction times. The antioxidant effects of transformed gallic acid for different reaction times were evaluated via radical scavenging assays using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radicals. In addition, the anti-diabetic property of the transformed gallic acid was measured based on  $\alpha$ -glucosidase. Gallic acid reacted for 5 h showed significantly higher antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities compared to the tested positive control substances. Biotransformation of simple gallic acid induced by polyphenol oxidase might be responsible for enhancing the biological activity of gallic acid.

**Key words:** biotransformation, polyphenol oxidase, radical scavenging activity,  $\alpha$ -glucosidase inhibition

## 서론

최근 생활습관성 및 각종 퇴행성 질환이 현대인들의 건강을 위협하고 있으며, 이는 과도한 산화적 스트레스에 노출된 것이 그 원인 중 하나이다. 인체에서는 산화 촉진물질과 산화 억제물질이 균형을 유지하기 위하여 자유라디칼의 생성과 항산화 방어체계가 유지되는데 자외선, 흡연, 매연, 약물, 스트레스, 방사선 등의 요인에 의해 그 균형이 파괴된다. 이로 인해 과도하게 생성된 superoxide, nitric oxide, nitrogen dioxide, hydroxyl, peroxyxynitrite 등과 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 산화적 스트레스를 유발하며 세포의 구성성분인 지질, 단백질, 당, DNA 등에 비선택적, 비가역적 파괴(1,2)를 촉진하여 노화 및 암, 뇌질환, 심혈관계질환, 피부질환 등의 각종 질병의 원인이 된다(3,4). 항산화 물질은 체내에서 활성산소종이나 자유라디칼을 중화시켜 노화 방지, 성인병 예방 등의 기능을 하는 성분

을 말하며, BHA(butylated hydroxyanisole), BHT(butylated hydroxytoluene) 등의 합성 항산화제가 광범위하게 사용되었으나(5,6), 이들 물질의 암, 지질대사 불균형 등의 부작용으로 인하여 사용제한을 권고하고 있다(7). 최근 항산화 성분에 대한 대중의 관심이 높아짐에 따라 평소 생활에서 항산화 효능이 뛰어난 과일이나 견과류 등의 천연자원을 통한 천연 항산화제의 섭취가 늘고 있으며, 최근 연구보고에 의하면 블루베리, 셀러리, 감귤 및 포도 등에도 항산화 물질이 다량 포함되어 항산화 활성을 나타냄이 알려져 있다(8).

또한, 최근 경제성장 및 생활수준의 지속적 향상으로 인한 식습관의 변화가 가속화됨에 따라 만성 대사성 질환 중 하나인 당뇨병이 증가하고 있다. 세계적으로도 당뇨 인구는 급격히 증가하고 있을 뿐만 아니라 발병연령도 점차 낮아져 앞으로는 더 많은 인구가 당뇨병으로 인해 고통받을 것으로 예측된다(9). 당뇨병은 크게 두 가지로 나뉘며 제1형은 췌장 베타세포의 병변에 따른 인슐린 결핍으로 인한 인슐린 의존성, 제2형은 인슐린 저항성으로 인한 인슐린 비의존성 당뇨로 정의할 수 있다(10,11). 일반적으로 당뇨병과 항산화 작용은 서로 밀접한 연관성이 최근 연구에서 시사되었으며, 이는 췌장 베타세포의 손상이 산화적 스트레스에 의해 발생하고 이것이 곧 인슐린 분비 감소로 이어져 항산화 물질이

당뇨병 개선에 관련하는 것이 증명되었다(12). 한편  $\alpha$ -glucosidase는 장의 소장 점막에 존재하는 당 분해효소의 한 종류로서 이를 저해하면 탄수화물의 소화를 방해하여 소장에서의 당의 흡수가 지연되므로 식후 급격한 혈당상승을 막아준다(13). 대표적인  $\alpha$ -glucosidase 저해제는 acarbose 및 voglibose가 시판되고 있으나 이들을 장기 복용할 경우 내성 및 각종 부작용을 야기할 수 있어 사용이 제한(14,15)되어 보다 안전하며 효능이 우수한 천연 기능성 소재의 탐색이 필요한 실정이다.

녹차에는 (-)-epigallocatechin gallate(EGCG) 등 구조적으로 유사한 카테킨류인 폴리페놀이 약 14% 이상 함유되어 있는데 이들 화합물은 녹차 잎에 존재하는 polyphenol oxidase에 의해 카테킨의 catechol과 pyrogallol 부분이 산화되고 benzotropolone의 새로운 구조를 가진 theaflavin과 같은 축합물을 생성하며 이들 화합물은 녹차의 발효 과정에서 다량 생성됨이 증명되었다(16). 본 연구에서는 이전 연구에서 보고한 페놀성 화합물의 효소 반응 산화 생성물의 항염증 효능 평가를 수행한 실험과 동일한 방법(17)으로 배유래의 polyphenol oxidase를 효소원으로 하여 페놀성 화합물인 gallic acid의 산화 반응을 수행하여 새롭게 생성되는 gallic acid 산화 반응물에 대해 항산화 및  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성에 관한 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 기기

본 실험에서 사용된 시약으로 gallic acid, 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), (+)-catechin 및 tacrine은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였고, 그 외에 사용된 용매 및 시약은 모두 일급 이상의 등급을 사용하였다. HPLC는 Shimadzu LC-10A(Tokyo, Japan)를 사용하였으며, 이동상인 MeCN, MeOH는 Sigma-Aldrich Co. 제품을 사용하여 변화물을 분석하였다.

### Gallic acid 산화물의 제조 및 분석

경북 영천시 금호읍에서 11월에 생산된 배(200 g)를 증류수 200 mL에 넣어 잘게 마쇄하여 균질화한 다음, 5겹의 거즈로 여과한 후 이 균질현탁액(200 mL)에 증류수(40 mL)로 녹인 gallic acid(200 mg)를 첨가하고 실온에서 1, 3, 5, 7, 10시간 동안 교반시킨다. 이 여과액을 10% 메탄올(100 mL)에 현탁시킨 후 EtOAc로 분획하여 각 EtOAc 가용분획 180.9 mg, 173.9 mg, 184.2 mg, 165.3 mg, 170.9 mg을 얻었고, 역상 HPLC로 분석하여 화합물의 생성을 확인하였다. HPLC 분석의 이동상 용매로는 0.1% HCOOH(solvent A)와 acetonitrile(solvent B)을 사용하여 gradient elution을 다음과 같이 수행하였다. 0~20 min, 95% A : 5% B;

21~30 min, 50% A : 50% B의 용매 조성으로 물질 분석 및 분리를 하였으며 이동상의 유속은 1.0 mL/min을 유지하였고 280 nm에서 화합물을 검출하였다. HPLC 분석용 칼럼은 YMC-Pack ODS A-302 column(4.6 mm i.d.×150 mm; YMC Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하여 분석하였다.

### DPPH 라디칼 소거능 측정

시료의 전자공여능은 Blois 방법(18)에 따라 측정하였다. 각 시료용액 120  $\mu$ L에 0.45 mM의 희석한 DPPH 용액 60  $\mu$ L를 넣고 교반한 후 15분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가군과 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

### ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능 측정

Gallic acid 산화 반응물의 ABTS radical 소거능을 Re 등(19)의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 7 mM ABTS(in water)와 2.4 mM K<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub> 동량을 혼합 후 실온, 암소에서 12시간 방치하여 라디칼의 생성을 유도한 다음 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 용액을 희석하여 734 nm에서 흡광도 값이 0.7~0.8 정도가 되도록 희석한 후 사용하였다. 희석한 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 용액 100  $\mu$ L와 산화 반응물 100  $\mu$ L를 혼합하여 실온에서 7분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 양성대조군으로는 (+)-catechin을 사용하였으며 결과는 시료를 처리하지 않은 군에 대한 백분율로 표시하였다.

### $\alpha$ -Glucosidase 저해 활성 측정

$\alpha$ -Glucosidase 저해능은 Eom 등(20)이 행한 방법을 변형하여 효소-기질반응을 이용한 분광학적 방법으로 측정하였다. 즉 1 U/mL  $\alpha$ -glucosidase 90  $\mu$ L에 시료 혹은 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 10  $\mu$ L를 첨가하여 혼합한 후 37°C에서 15분 동안 incubation 시킨다. 반응 후 기질인 1 mM *p*-NPG(*p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside) 100  $\mu$ L를 첨가한 후 5분간 반응시키고 405 nm에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정함으로써 기질로부터 유리되어 나오는 *p*-nitrophenol을 측정하였다. 양성대조군으로는  $\alpha$ -glucosidase 저해제로 알려진 Acarbose를 사용하였으며  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

### 통계처리

실험 결과는 SPSS package program(version 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 평균과 표준편차를 구하였으며 실험군 간 차이의 유의성은 one-way ANOVA에 의하여  $F < 0.05$  수준에서 검증하였다.

## 결과 및 고찰

**Polyphenol oxidase에 의한 gallic acid의 생물전환 및**

## 분석

페놀성 화합물은 천연에 광범위하게 존재하며, 특히 과일, 야채, 주스, 차, 커피 및 와인 등의 음료에 풍부하게 존재하는 천연 항산화 물질이며, 그중에서 polyphenol은 벤젠에 두 개의 수산기를 가지는 단순한 구조의 페놀성 화합물로 잘 알려져 있다(21). 최근 연구에서는 오배자, 옷, 참나무 및 찻잎 등에 유리 및 ester 형태로 존재하는 gallic acid가 귀의 대사산물로 변화하여 gallic acid의 COOH기가 탈락하고 methyl기, glucuronic acid 등이 생성되며 이들 화합물은 gallic acid와 유사한 정도의 항산화 활성을 나타내는 것으로 보고돼 있으나(22), gallic acid의 산화된 형태의 생성물에 대한 항산화 및 항당뇨 활성에 대한 연구는 부족한 실정이다. 본 연구에서는 천연에 광범위하게 존재하는 단순 페놀 성분인 gallic acid의 산화 반응생성물의 기능성 평가의 일환으로 배 유래의 polyphenol oxidase를 활용하여 간편한 효소적 산화 반응을 실온에서 1, 3, 5, 7, 10시간 동안 유도하였으며, 산화 반응물을 EtOAc로 분획하여 당을 제거하고 변화된 성분을 1% formic acid 및 MeCN을 이동상으로 하여 280 nm에서 역상 HPLC를 활용하여 분석하였다. 그 결과 Table 1에서 나타낸 것과 같이 gallic acid의 변화에 의한 생성물이 검출되었으며, 그중에서도 gallic acid의 5시간 반응물에서 미지의 물질 8종(UI 1-8)의 생성이 발견되었고 gallic acid의 함량은 5시간 반응부터 조금씩 감소함을 확인하였다. 또한, 13.5분에서 검출된 화합물은 5시간 반응물에서 상대함량이 약 32.5%로 증가하였으며, 7시간 및 10시간 반응 동안 소량 증가함을 확인하였다(Table 1, Fig. 1).

## DPPH 라디칼 소거능 측정

보라색의 DPPH 라디칼은 항산화 활성이 있는 물질과 반응하게 되면 안정한 형태로 돌아가면서 탈색되고 흡광도 값이 감소하는데 이 원리(23)를 이용한 본 실험의 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 실온에서 gallic acid를 배 유래의 polyphenol oxidase를 활용하여 산화 반응을 1, 3, 5, 7, 10시간

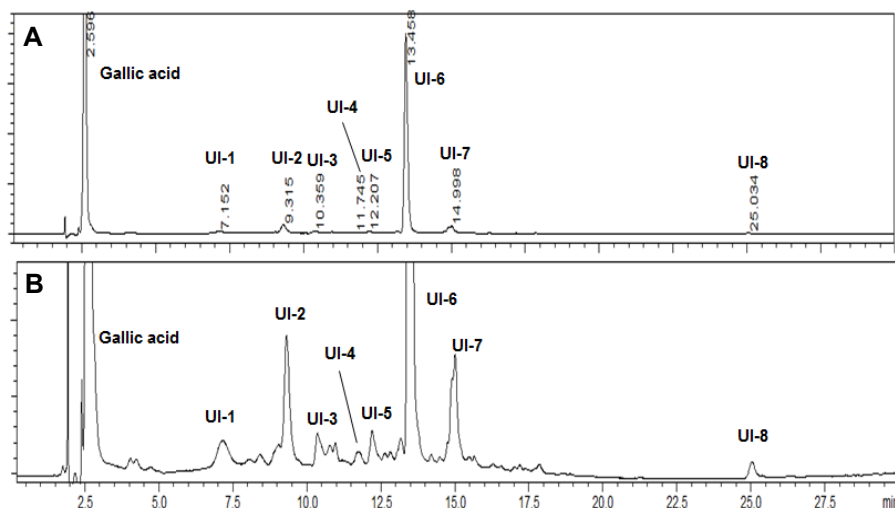
**Table 1.** Relative amounts of individual unidentified metabolite in the different reacted mixtures

Compounds	Retention time (min)	Content (%)				
		1 h	3 h	5 h	7 h	10 h
Gallic acid	2.60	79.3	92.7	60.2	57.2	57.0
UI-1 <sup>1)</sup>	7.15	—	—	0.9	0.4	0.6
UI-2	9.32	0.2	0.4	2.9	2.2	2.3
UI-3	10.32	0.1	0.3	0.1	0.1	0.6
UI-4	11.75	—	0.2	0.2	0.2	—
UI-5	12.20	0.1	0.7	0.5	0.4	0.5
UI-6	13.45	20.0	3.7	32.5	33.1	34.3
UI-7	15.00	0.0	0.6	2.3	2.1	0.7
UI-8	25.03	0.3	1.4	0.4	4.3	4.0

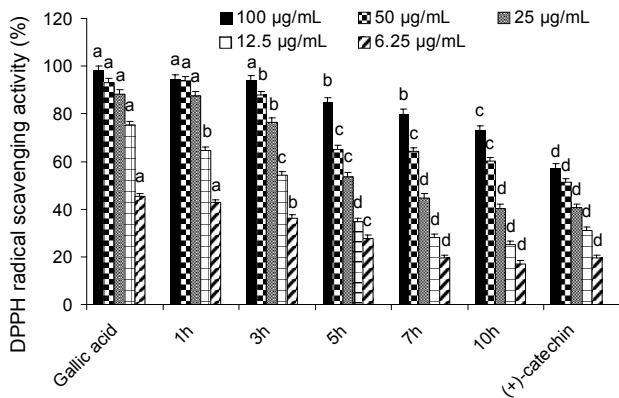
<sup>1)</sup>UI is unidentified.

동안 유도하여 얻어진 각 결과물에 대하여 DPPH 라디칼 소거 활성을 평가한 결과, gallic acid의 경우 100 µg/mL의 농도에서 98.3%의 라디칼 소거능을 나타낸 것과 비교하여 1시간 반응물은 같은 농도에서 94.6%, 3시간 반응물은 94.1%의 라디칼 소거 활성을 나타내었다. 한편, 5시간 반응물의 경우 100 µg/mL의 농도에서 84.9%의 라디칼 소거 활성을 나타내었으며 7시간 반응물은 79.9% 및 10시간 반응물은 73.2%의 라디칼 소거 활성을 나타내어 활성이 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 이상의 결과는 모든 반응물에서의 라디칼 소거 활성은 양성대조군으로 사용된 천연 항산화 성분인 (+)-catechin이 100 µg/mL의 농도에서 57.3%의 라디칼 소거 활성보다 우수한 활성을 나타냄을 확인하였다. 최근 DPPH 라디칼 소거능은 페놀성 화합물의 함량과 밀접한 상관관계가 있다는 보고(19)에 근거하여 gallic acid의 polyphenol oxidase 반응으로 생성된 변화물의 항산화 활성과 페놀성 화합물 함량의 연관성을 평가한 결과, Fig. 1 및 2에서 나타낸 바와 같이 gallic acid의 산화 생성물의 DPPH 라디칼 소거능은 산화축합 반응으로 생성된 산화축합 화합물의 구조와 깊은 관계가 있음을 시사하였다.

녹차의 polyphenol oxidase에 의한 효소적 산화 반응을



**Fig. 1.** HPLC chromatograms of treated gallic acid with polyphenol oxidase during 5 h. A, original chromatogram; B, expanded chromatogram.

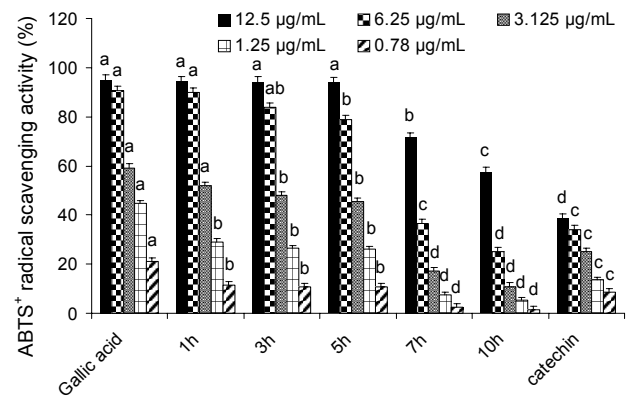


**Fig. 2.** Comparison of DPPH radical scavenging activity of gallic acid via oxidation processing with polyphenol oxidase. Data represent the mean±SD of three replications and means with different letters (a-d) differ significantly ( $P<0.05$ ). (+)-Catechin was used as a positive control.

통하여 catechin의 B-ring의 산화 축합된 형태의 다양한 화합물의 존재가 시사되었으며, 이들 화합물의 반응 메커니즘이 보고되었다(16,24). 최근 쥐에서 gallic acid의 대사를 통하여 gallic acid의 COOH기가 탈락하고 methyl기, glucuronic acid 등의 결합으로 생성된 gallic acid 산화 반응생성물의 우수한 항산화 효능을 나타내는 보고(22)와 같이 본 연구에서 gallic acid의 산화 생성물의 분리를 통한 DPPH 라디칼 소거 활성 성분의 동정이 필요하다고 생각한다.

### ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능 측정

ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거 활성은 시료의 항산화능에 의해 ABTS<sup>+</sup>가 소거되어 본래의 색상인 청록색이 탈색되는 원리를 이용한 항산화 활성 측정 방법으로 천연물로부터 항산화 활성 물질 개발을 위한 연구에 광범위하게 이용되고 있다(19). 그 결과 Fig. 3에서 나타낸 것처럼 gallic acid의 배유래의 polyphenol oxidase를 활용한 산화 반응물 중, 1, 3, 5, 7, 10시간 동안 수행하여 얻어진 각 결과물에 대하여 ABTS<sup>+</sup> 라디칼을 활용한 항산화 활성을 평가하였다. 그 결과, 12.5 µg/mL의 농도에서 반응시간이 1시간의 경우 94.6%, 3시간의 경우 94.6%, 5시간의 경우 94.0%, 7시간의 경우는 71.6%, 10시간의 경우 57.3%의 라디칼 소거 활성을 확인하였으며, 이들 활성은 양성대조군인 (+)-catechin의 12.5 µg/mL의 농도에서 38.6%의 라디칼 소거 활성보다 강한 활성임을 확인하였다. 반응 1, 3, 5시간의 경우 거의 유사한 활성을 나타내었으나 7시간 반응물부터는 라디칼 소거 활성이 감소함을 확인하였으며, Table 1과 Fig. 1에서 나타낸 바와 같이 배 유래의 polyphenol oxidase에 의해 생성되는 물질 중 5시간 반응물에서 급격한 증가를 나타낸 UI-6 화합물 및 관련 화합물이 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거 활성에 관여함을 시사하였다. 위에서 언급한 바와 같이 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거 활성을 나타내는 물질의 동정을 위하여 분리 및 기기분석을 활용한 구조 결정이 필요하다고 생각한다.

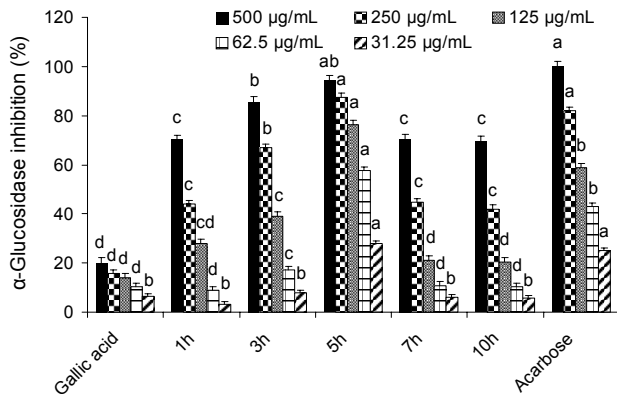


**Fig. 3.** Comparison of ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity of gallic acid via oxidation processing with polyphenol oxidase. Data represent the mean±SD of three replications and means with different letters (a-d) differ significantly ( $P<0.05$ ). (+)-Catechin was used as a positive control.

### α-Glucosidase 저해 활성 측정

섭취한 탄수화물을 단당류로 분해하는 데 관여하는 효소인 α-glucosidase의 활성을 저해하는 기전으로 연구 개발된 acarbose와 voglibose(25) 등은 항당뇨의 목적으로 시판된 대표적인 당뇨에 효과적인 치료제이다. 그러나 이들 당뇨치료제를 장기간 복용할 경우 구토, 설사를 비롯한 복부 팽만감 등의 심각한 부작용을 초래할 수 있으므로 보다 안전하면서 식후에 혈당 강하의 효능이 뛰어난 천연소재로의 대체에 관한 연구의 필요성이 대두하고 있다(26). 천연에 광범위하게 존재하는 천연물의 청정화학 방법을 활용한 생물전환을 통하여 항산화 및 항당뇨 선도물질 개발을 목표로 하여 gallic acid를 실온에서 1, 3, 5, 7, 10시간 동안 polyphenol 산화효소 반응의 생성물에 대하여 항당뇨 활성평가에 광범위하게 활용되는 α-glucosidase 저해 활성을 평가하였다. 그 결과 gallic acid의 경우 250 µg/mL의 농도에서 15.6%의 낮은 저해 활성을 나타내었으나, polyphenol oxidase에 의해 반응한 gallic acid 250 µg/mL의 농도에서 1시간 반응물의 경우 43.9%, 3시간 반응물의 경우 66.9%의 활성을 나타내었다. 또한, 5시간 반응물의 경우 같은 농도에서 87.4%로 가장 강한 저해 활성을 나타내었으며 이 활성은 양성대조군 acarbose의 81.8%의 저해 활성보다 강한 활성을 나타내었다. 7시간 반응물의 경우 44.6% 및 10시간의 경우 42.0%의 저해 활성을 나타내어, 반응시간이 5시간을 초과하면 활성이 저하되는 것을 Fig. 4에서 나타낸 바와 같이 확인하였으며, Table 1에서 나타낸 바와 같이 UI-6 화합물의 함량이 5시간 반응물에서 활성성분의 급격한 증가와 활성의 연관성이 시사되었다. 이상의 결과로부터 gallic acid의 5시간 산화 반응생성물의 α-glucosidase 저해 활성을 나타내는 물질의 존재가 시사되었으며 이들 물질의 분리 및 구조 결정이 필요하다고 생각한다.

최근 천연물의 생물전환을 통한 구조변형 및 활성 상승을 위하여 녹차의 polyphenol 산화 효소를 활용한 catechin류



**Fig. 4.** Comparison of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of gallic acid via oxidation processing with polyphenol oxidase. Data represent the mean $\pm$ SD three replications and means with different letters (a-d) differ significantly ( $P < 0.05$ ). (+)-Catechin was used as a positive control.

의 구조변환을 수행하여 갈색의 phenol 구조가 quinone 등의 구조로 전환된 catechin 축합물들의 존재 및 생성 메커니즘이 보고(16,27)되어 있으며, 이들과 관련된 catechin 이량체 화합물인 theaflavin류는 *in vivo* 실험에서 강력한 항당뇨 활성을 나타내는 것을 확인하였다(28). 본 연구팀에서도 청정화학 방법을 활용한 기능성 신소재 개발을 위하여 배 유래의 폴리페놀산화효소를 이용한 phenylpropanoid 화합물의 산화 반응을 통하여 신규 lignan 화합물의 효율적인 생합성 및 이들 신규화합물의 cyclooxygenase-2에 우수한 저해 활성을 나타내어 항염증 소재로서의 가능성을 보고하였다(17). 본 연구에서는 배 유래의 polyphenol oxidase를 활용하여 기능성 신소재 개발의 일환으로서 천연에 광범위하게 존재하는 gallic acid의 산화 축합반응을 시간별로 유도하여 라디칼 소거 및  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성을 평가하여 얻어진 gallic acid 산화 반응물의 가치를 탐색하였다. 최근 polyphenol의 항산화 활성 및 생활습관성 질환의 예방 효능에 대한 다양한 검증이 이루어지고 있고 이와 관련하여 본 연구에서는 gallic acid 산화 반응물에 대한 항산화 활성을 DPPH, ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능을 활용하여 검증하였으며, 항당뇨 활성의 1차 스크리닝에 활용되는  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성을 평가하여 polyphenol oxidase를 활용하여 기능성 소재 개발을 위한 천연 유래 자원 활용 가능성을 확인하였다. 추가적인 연구로 polyphenol oxidase에 의한 gallic acid 변화물을 분리 및 구조 결정하고 이들 물질의 활성 검증을 수행하여 더욱 우수한 수율을 나타내는 활성 성분의 개발을 위하여 추가적인 연구개발이 필요하다고 생각한다.

## 요 약

폴리페놀 화합물은 천연에 광범위하게 존재하는 천연 화합물로 과일, 주스, 야채 등에 존재하여 일상생활에서 쉽게 접

취할 수 있으며, 이들 화합물의 건강증진 및 질병 예방 효과로 오랫동안 주목을 받고 있다. 천연물 유래의 항산화 및 항당뇨 개발과 관련하여 많은 연구가 효소 저해, 세포 및 동물실험을 통하여 다양하게 이루어져 왔다. 본 연구는 배 유래의 polyphenol oxidase를 이용하여 천연에 존재하는 단순 페놀성 화합물인 gallic acid의 산화 축합반응을 실온에서 1, 3, 5, 7, 10시간 동안 유도하여 얻어진 결과물에 대하여 DPPH 및 ABTS<sup>+</sup> 라디칼을 활용한 항산화 활성 및  $\alpha$ -glucosidase 저해능을 통해 항당뇨 활성을 평가하였다. 먼저 DPPH 라디칼 소거 활성은 gallic acid의 5시간 반응물의 경우, 100  $\mu$ g/mL의 농도에서 84.9%의 활성을 나타내어, 양성대조군인 (+)-catechin보다 우수한 활성을 나타내었으며 7시간 및 10시간 반응물의 경우 라디칼 소거 활성이 점차 감소하는 경향을 확인하였다. 또한, ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거 활성은 반응 1, 3, 5시간 반응물에서 양성대조군인 (+)-catechin보다 강한 라디칼 소거능을 확인하였으며 7시간 반응물부터는 라디칼 소거 활성이 감소함을 확인하였다.  $\alpha$ -Glucosidase 저해능은 5시간 반응물의 250  $\mu$ g/mL 농도에서 87.4%의 가장 강한 저해 활성을 나타내었으며, 이 활성은 같은 농도에서 양성대조군인 acarbose의 81.8%보다 강한 활성이었다. 향후 이들 반응을 통하여 생성된 화합물의 대량생산을 통한 물질 분리 및 구조 동정을 통하여 항산화 및 항당뇨 활성과 추가적인 메커니즘 검증을 수행할 필요성이 있다고 생각한다.

## 감사의 글

이 논문은 2015학년도 대구대학교 학술연구비지원에 의한 논문임.

## REFERENCES

- Videla LA, Fernández V. 1988. Biochemical aspects of cellular oxidative stress. *Arch Biol Med Exp (Santiago)* 21: 85-92.
- Halliwell B, Aruoma OI. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 281: 9-19.
- Jennings PE, Barnett AH. 1988. New approaches to the pathogenesis and treatment of diabetic microangiopathy. *Diabet Med* 5: 111-117.
- Shim JS, Kim SD, Kim TS, Kim KN. 2005. Biological activities of flavonoid glycosides isolated from *Angelica keiskei*. *Korean J Food Sci Technol* 37: 78-83.
- Farag RS, Badei AZMA, Hewedi FM, El-Baroty GSA. 1989. Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media. *J Am Oil Chem Soc* 66: 792-799.
- Frei B. 1994. *Natural antioxidants in human health and disease*. Academic Press Inc., San Diego, CA, USA. p 44-55.
- Branen AL. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J Am Oil Chem Soc* 52: 59-63.

8. Matsuoka A, Furuta A, Ozaki M, Fukuhara K, Miyata N. 2001. Resveratrol, a naturally occurring polyphenol, induces sister chromatid exchanges in a Chinese hamster lung (CHL) cell line. *Mutat Res* 494: 107-113.
9. Rubin RR, Peyrot M. 1999. Quality of life and diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 15: 205-218.
10. Lee SH, Lee JK, Kim IH. 2012. Trends and perspectives in the development of antidiabetic drugs for type 2 diabetes mellitus. *Korean J Microbiol Biotechnol* 40: 180-185.
11. Lee EB, Na GH, Ryu CR, Cho MR. 2004. The review on the study of diabetes mellitus in oriental medicine journals. *J Korean Orient Med* 25: 169-179.
12. Schwarz K, Mertz W. 1959. Chromium(III) and the glucose tolerance factor. *Arch Biochem Biophys* 85: 292-295.
13. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poitout V. 2004.  $\beta$ -Cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 53: S119-S124.
14. Tsujimoto T, Shioyama E, Moriya K, Kawaratani H, Shirai Y, Toyohara M, Mitoro A, Yamao J, Fujii H, Fukui H. 2008. Pneumatosis cystoides intestinalis following alpha-glucosidase inhibitor treatment: A case report and review of the literature. *World J Gastroenterol* 14: 6087-6092.
15. Kihara Y, Ogami Y, Tabaru A, Unoki H, Otsuki M. 1997. Safe and effective treatment of diabetes mellitus associated with chronic liver diseases with an alpha-glucosidase inhibitor, acarbose. *J Gastroenterol* 32: 777-782.
16. Li Y, Shibahara A, Matsuo Y, Tanaka T, Kouno I. 2010. Reaction of the black tea pigment theaflavin during enzymatic oxidation of tea catechins. *J Nat Prod* 73: 33-39.
17. Bae JS, Kim TH. 2012. Enzymatic transformation of caffeic acid with enhanced cyclooxygenase-2 inhibitory activity. *Bioorg Med Chem Lett* 22: 793-796.
18. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
19. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
20. Eom SH, Lee SH, Yoon NY, Jung WK, Jeon YJ, Kim SK, Lee MS, Kim YM. 2012.  $\alpha$ -Glucosidase- and  $\alpha$ -amylase-inhibitory activities of phlorotannins from *Eisenia bicyclis*. *J Sci Food Agric* 92: 2084-2090.
21. Sies H. 2010. Polyphenols and health: Update and perspectives. *Arch Biochem Biophys* 501: 2-5.
22. Yasuda T, Inaba A, Ohmori M, Endo T, Kubo S, Ohsawa K. 2000. Urinary metabolites of gallic acid in rats and their radical-scavenging effects on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *J Nat Prod* 63: 1444-1446.
23. Lee SG, Yu MH, Lee SP, Lee IS. 2008. Antioxidant activities and induction of apoptosis by methanol extracts from avocado. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 269-275.
24. Li Y, Tanaka T, Kouno I. 2007. Oxidative coupling of the pyrogallol B-ring with a galloyl group during enzymatic oxidation of epigallocatechin 3-O-gallate. *Phytochemistry* 68: 1081-1088.
25. Shin JA, Lee JH, Kim HS, Choi YH, Cho JH, Yoon KH. 2012. Prevention of diabetes: a strategic approach for individual patients. *Diabetes Metab Res Rev* 28: 79-84.
26. Bischoff H. 1995. The mechanism of  $\alpha$ -glucosidase inhibition in the management of diabetes. *Clin Invest Med* 18: 303-311.
27. Tanaka T, Miyata Y, Tamaya K, Kusano R, Matsuo Y, Tamaru S, Tanaka K, Matsui T, Maeda M, Kouno I. 2009. Increase of theaflavin gallates and thearubigins by acceleration of catechin oxidation in a new fermented tea product obtained by the tea-rolling processing of loquat (*Eriobotrya japonica*) and green tea leaves. *J Agric Food Chem* 57: 5816-5822.
28. Miyata Y, Tamaru S, Tanaka T, Tamaya K, Matsui T, Nagata Y, Tanaka K. 2013. Theaflavins and theasinensin A derived from fermented tea have antihyperglycemic and hypotriacylglycerolemic effects in KK-A<sup>y</sup> mice and Sprague-Dawley rats. *J Agric Food Chem* 61: 9366-9372.