



감 부산물 에탄올 추출물의 항산화 및 항염증활성

박미혜^{1,2} · 이승환^{3*}

¹경북대학교 식품영양학과, ²JFNB, ³국립안동대학교 식품생명공학과

Studies on the Anti-Oxidative and Anti-Inflammatory Activity of the Extracts from Persimmon Waste

Mi Hye Park^{1,2} · Seung Hwan Lee^{3*}

¹Department of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, Andong 41566, Korea

²JFNB Co., Ltd., Paju 10825, Korea

³Department of Food Science and Biotechnology, Andong National University, Andong 36729, Korea

Abstract

Purpose: The health promotion effects of persimmon extracts from peels, stems and leaves was evaluated to utilize persimmon processing wastes as a value-added by-product resource. **Methods:** The extracts were obtained by adding 80% ethanol to 10 times as much of the raw samples, stirring it, concentrating it under reduced pressure, and vacuum-drying. The anticancer activity, anti-inflammatory activity and total polyphenols content of the extracts of persimmon peels, persimmon stems and persimmon leaves were studied. **Results:** The extraction yields of the peels, stems and leaves were 49.23%, 25.29% and 19.91%, respectively. The extracts from the persimmon leaves showed the highest total polyphenol content of 141.72 mg/g. All the extracts had anti-oxidative activity in a concentration-dependent manner. At the highest concentration of 400 µg/mL, the DPPH radical scavenging activities of the extracts from leaves, peels, and stems were 77.67%, 68.12%, and 48.50%, respectively. The ABTS scavenging activities were similar to the DPPH scavenging activities. The scavenging activity increased with increasing concentration. The production of nitrogen monoxide was examined at 50, 100, and 200 µg/mL which had no toxicity to macrophages (RAW 264.7 cells). The extract treated group showed lower nitrogen monoxide contents than those of the LPS stimulated control group. **Conclusion:** Persimmon peels, stems and leaves which are discarded during processing can be valuable natural anti-oxidant and anti-inflammatory agent.

Key words: persimmon, anti-oxidant activity, anti-inflammatory activity, total polyphenol

I. 서론

최근 우리나라에서도 고지방 섭취 증가와 같은 식생활과 생활양식이 변화함에 따라 면역력 저하와 심장병, 순환기 장애 및 암과 같은 각종 성인병 발병이 증가하고 있다. 여러 역학조사에서 식생활과 성인병에 대한 상관관계가 연구되었고, 이러한 다수의 성인병은 식사를 통하여 예방할 수 있다고 알려졌다(Cho YJ & Chun SS 2005, Lee JH 2014). 따라서 식품의 질병예방 기능 및 다양한 소재를 이용한 건강기능성 식품 개발에 대한 관심이 높아지고 있다. 또한, 기능성식품 소재 중 과일 부산물을

이용하는 경우 원가 절감이 된다는 장점이 있어 이를 활용하기 위한 다양한 연구들이 진행되고 있다(Kim MS 등 2017).

감(*Diospyros kaki* L.)은 우리나라의 대표적인 과실 중 하나로 당질, 비타민 A와 비타민 C를 비롯하여 식이섬유가 풍부한 알칼리성 식품이다(Kim JH 등 2005). 감에 함유되어 있는 폴리페놀과 떫은맛을 내는 탄닌산(tannic acid)은 다양한 생리활성을 갖기 때문에 감의 유용 성분을 추출하고 기능성 소재로 활용하고자 하는 연구들이 진행되었다(Kawakami K 등 2010). 감에 함유된 풍부한 식이섬유는 장운동을 원활하게 하고 고혈압, 동맥경화 등

*Corresponding author: Seung Hwan Lee, Department of Food Science and Biotechnology, Andong National University, 1375, Gyeongdong-ro, Andong-si, Gyeongbuk 36729, Korea

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8245-844X>

Tel: +82-54-820-5429, Fax: +82-54-820-6264, E-mail: leesh@anu.ac.kr



의 순환기계 질환에 도움을 주며 탄닌은 혈압저하 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Seo JH 등 2000). 그 외에도 폴리페놀, 플라보노이드, 카로티노이드와 같이 활성산소를 억제하는 능력이 뛰어난 항산화물질을 함유하고 있다(Cho YJ & Chun SS 2005). 이와 같이 감은 다양한 영양분 및 생리활성 성분을 함유하고 있어 이용가치가 높은 과일로 평가되고 있다. 따라서 감에 대한 선호도가 높기 때문에 감은 곱감, 감말랭이, 홍시로 이용될 뿐만 아니라 냉동홍시, 감식초, 감장아찌, 감와인 등으로 가공되어 판매되고 있다. 감 가공품의 생산이 늘어나면서 감 중량의 20%에 해당하는 잎, 과피, 꼭지와 같은 부산물은 대부분 버려져 방치되고 있으며, 매년 감 생산량이 증가함에 따라 부산물도 증가하고 있지만 이에 대한 활용은 이루어지지 않고 있다. 감부산물에 대한 연구와 기술 부족으로 인하여 산업적 활용에 한계가 있는 실정이며, 버려진 감 부산물은 2-3일 만에 초산발효가 일어나 악취와 더불어 토양과 수질을 산성화시켜 환경오염을 유발시키는 원인이 되고 있다(Kim YJ & Kim BK 2005). 따라서 감부산물의 생리활성에 대한 연구는 폐기되고 있는 감부산물의 산업적 활용도와 부가가치를 높여 감 재배 농가 및 가공기업들의 소득 증대에 기여할 것으로 기대된다. 감부산물 가운데 감과피는 천연 주황색 색소 성분인 카로티노이드, 폴리페놀류인 탄닌, 식이섬유가 다량 함유되어 있다(Hong JH 등 2008). 그러나 감꼭지, 감잎과 같은 부산물에 함유되어 있는 기능성 성분 및 생리활성에 대한 연구가 부족하여 산업적으로 이용하기 위해서는 다양한 선행연구가 필요하리라 생각된다. 따라서 본 연구는 감 가공 부산물 자원을 이용한 다양한 기능성 식품을 개발하기 위하여 감부산물 에탄올 추출물의 생리활성 성분 분석, 항산화활성 및 항염증활성을 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료 및 추출물 제조

실험에 사용한 감잎, 감과피 및 감꼭지는 2014년도 10월 21일에 경상북도 청도군의 청도반시로부터 채취하였다. 재료는 채취한 즉시 세척하고 실온에서 1차적으로 건조하였으며, 감과피와 감꼭지는 서늘한 곳에서 3일간 풍건한 후 일정하게 건조하기 위하여 열풍건조기(SM-60, Jongro Inc., Seoul, Korea)를 이용하여 45°C에서 24시간 동안 건조하였다. 건조된 감나무 부위별 재료는 분쇄기(HMF-32506, Hanil Inc., Seoul, Korea)를 이용하여 60 mesh 이하로 분쇄하였다. 식품 추출에 많이 사용되는 80% 에탄올(Duksan Pure Chemical Co., Ltd., Ansan, Korea)을 분말시료의 각 10배씩 첨가하여 25°C에서 24시간 동안 교반(150 rpm)한 후 4,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 이 조작을 2회 반복하여 얻은 추출

을 감압농축기(R-3000, Buchi Inc., Flawil, Switzerland)를 사용하여 농축한 후 동결건조한 다음 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였으며, 25°C에서 24시간 교반하여 추출물을 얻었다.

2. 시약

실험에 사용된 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl(DPPH), 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)diammonium salt(ABTS), L-ascorbic acid, thiazoly blue tetrazolium bromide(MTT), gallic acid, quercetin은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 또한, RAW 264.7 세포 배양에 사용한 fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin solution, trypsin 0.25% EDTA solution, dulbecco's modified eagle's minimal essential medium (DMEM/High glucose)은 Hyclone Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

3. 총 폴리페놀 함량 분석

감부산물의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(Moreno MIN 등 2000)을 이용하여 측정하였다. 즉, 증류수를 이용하여 1,000 mg/assay 농도로 녹인 추출물 1 mL에 증류수 5 mL와 10% Folin-Cioalteaous 2 mL를 넣고 3분간 방치하였다. 여기에 7.5% Na₂CO₃ 용액 2 mL를 가한 후 증류수로 희석하여 20 mL로 정용 후 실온에서 1시간 방치한 다음, 분광 광도계(CM-25000D, Konica Minolta Holdings Inc., Tokyo, Japan)를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 tannin acid를 사용하여 표준곡선을 작성 후 총 페놀 함량을 구하였다.

4. DPPH 라디칼 소거활성 측정

DPPH 라디칼 소거활성은 Blois MS(1958)의 방법을 이용하여 측정하였다. 즉, 0.1 M sodium acetate buffer(pH 5.5)를 이용하여 50-400 µg/mL 농도로 희석한 시료 1 mL에 7.5×10⁻⁵ M DPPH 용액 2 mL를 첨가하여 교반한 후 37°C 암소에서 30분간 반응시켰다. 이것을 분광 광도계(Konica Minolta Holdings Inc.)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거활성은 다음의 계산법을 사용하였다.

DPPH 라디칼 소거활성(%)

$$= (1 - \text{시료 첨가구의 흡광도} / \text{시료 무첨가구의 흡광도}) \times 100$$

5. ABTS 라디칼 소거활성 측정

ABTS 라디칼 소거활성은 Joung EM 등(2010)의 방법을 이용하여 측정하였다. 즉, 7 mM ABTS 용액과 2.45 mM potassium persulfate 용액을 1:1로 혼합하여 30°C 암

소에서 12시간 방치하여 ABTS 라디칼 cation을 제조하였다. 라디칼을 형성시킨 후 이 용액을 734 nm에서 흡광도가 0.7-0.9가 되도록 증류수로 희석하였다. 시료는 5 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)를 이용하여 50-400 µg/mL 농도로 희석한 시료 50 µL에 ABTS+ 용액 100 µL를 가하여 5분간 반응시킨 후 413 nm에서 흡광도를 측정하였으며 ABTS 라디칼 소거활성은 아래 계산법을 이용하였다.

$$\text{ABTS 라디칼 소거활성(\%)} \\ = (1 - \text{시료 첨가구의 흡광도} / \text{시료 무첨가구의 흡광도}) \times 100$$

6. RAW 264.7 세포 배양

RAW 264.7 세포의 일산화질소 생성 억제 활성을 측정하기 위하여 사용한 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)으로부터 분양받아 사용하였다. DMEM배지에 10% FBS와 1% penicillin streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator(MCO-15 AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 세포 배양하였으며 4일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

7. RAW 264.7 세포에 대한 독성

추출물이 세포독성에 미치는 농도를 조사하여 nitric oxide(NO) 측정실험에 사용될 농도 범위 결정을 위해서 Mosmann T(1983)의 방법을 이용하여 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 시행하였다. 1×10⁵ cells/mL 농도로 RAW 264.7 세포 희석하여 96 well plate에 100 µL의 DMEM 배지와 함께 24시간 배양한 다음, 0.1 M phosphate buffer saline(PBS, pH 7.0)에 녹인 추출물을 분주하고 다시 24시간을 배양하였다. 각 well에 5 mg/mL 농도의 MTT 용액을 10 µL씩 넣은 후 3시간 동안 배양하면서 환원반응을 유도하였으며, 여기에 100 µL의 dimethyl sulfoxide(DMSO)을 첨가하여 보라색의 formazan 결정을 완전히 용해하였다. 발색 정도를 분광광도계(Konica Minolta Holdings Inc.)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성은 세포만 배양한 무처리군의 생존도 100%를 기준으로 추출물 처리군의 상대적인 세포 독성을 계산하였다.

8. Nitric oxide 생성량 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite oxide 농도를 griess reagent를 이용하여 측정하였다(Green LC 등 1982). RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 1×10⁶ cells/mL로 조절한 후 96 well plate에 seeding하고 37°C, 5% CO₂ incubator(Sanyo)에서 24시간 배양하였다. 그 다음 0.1 M phosphate buffer saline(PBS, pH 7.0)에 녹인 추출물을 분

주하고 1시간 뒤 1 µg/mL의 LPS를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양액의 상층액을 얻은 후 griess 시약과 반응 시킨 후 분광광도계(Konica Minolta Holdings Inc.)로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO 생성량을 백분율로 표시하였다.

9. RAW 264.7세포에 대한 사이토카인 분비능 평가

RAW 264.7 세포를 6 well plate에 1×10⁶ cells/mL이 되도록 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 여기에 PBS를 이용하여 감부산물 추출물을 200 µg/mL 농도로 희석하여 처리하고 1시간 동안 반응시킨 뒤 LPS 1 µg/mL를 처리하여 18시간 동안 배양하였다. 배양한 후 세포배양액을 수거하여 배양액에 함유된 TNF-α, IL-6, IL-1β를 ELISA kit(R&D system, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다.

10. 통계처리

실험결과는 SPSS Statistics(ver. 22, IBM Corp., Armonk, NY, USA)를 이용하여 분산분석(ANOVA)으로 유의성을 분석하였으며, 사후검증은 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 감부산물 추출수율 및 총 폴리페놀 함량 분석

감부산물의 추출수율 및 총 폴리페놀 함량을 측정된 결과는 Table 1과 같다. 추출수율은 감잎, 감꼭지 에탄올 추출물이 각각 19.91, 25.29%였으며, 감과피 에탄올 추출물의 추출수율은 49.23%로 부산물 추출물 가운데 가장 높았다. 이는 감잎과 감꼭지는 섬유소 함유량이 높아 상대적으로 수율이 낮은 반면, 감과피 추출물은 과육이 일부 함유되어 높은 수율을 나타낸 것으로 보인다. 한편, 식물에 널리 분포되어 있는 페놀성 화합물의 phenolic hydroxyl기는 단백질 또는 효소단백질과 같은 거대분자

Table 1. Extraction yield, total polyphenol compounds of 70% ethanol extract from persimmon leaves, persimmon peel, persimmon stem

Sample	Extraction yield (%)	Total polyphenol compounds (mg/g)
Persimmon leaves	19.91±1.43 ^{1)c2)}	141.72±2.35 ^a
Persimmon peel	49.23±4.35 ^a	20.22±0.25 ^b
Persimmon stem	25.29±3.67 ^b	27.20±1.30 ^b

¹⁾ Values are mean±SD (n=3).

²⁾ Different letters (a-c) are significantly different (*p*<0.05) by Duncan's multiple range test.

및 2가 금속이온과의 결합하여 항산화, 항암 및 항균 활성을 가진다(Takahara U 1985, Husain SR 등 1987). Tannin acid를 기준물질로 하였을 때 감부산물의 총 폴리페놀 화합물 함량은 감잎 추출물에서 141.72 mg/g으로 유의적으로 가장 높게 정량되었으며, 감과피 추출물은 20.22 mg/g, 감 꼭지 추출물은 27.20 mg/g의 폴리페놀 함량을 나타내었다. 이는 귤감, 생감보다 감잎 추출물에서 폴리페놀 함량이 높게 측정되었다고 보고한 Hong JH 등(2008)의 결과와 같이 감잎에 페놀성 화합물이 다량 함유되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

2. DPPH 라디칼 소거활성

감잎, 감과피, 감꼭지 에탄올 추출물의 항산화 활성을 측정하기 위하여 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 감잎, 감과피, 감꼭지 에탄올 추출물 모두 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거활성을 보였으며, 가장 높은 농도인 400 µg/mL 농도에서 감잎 77.67%, 감과피 68.12%, 감꼭지 48.50%의 소거활성을 나타내었다. 본 연구에서는 폴리페놀 함량이 가장 높은 감잎 에탄올 추출물이 DPPH 라디칼 소거활성 또한 가장 높은 것으로 나타났다. Seong HM 등(2002)은 식물체의 폴리페놀 함량이 높을수록 라디칼 소거활성이 높아지는 양의 상관관계를 나타낸다고 보고하였다. 이러한 연구 결과는 폴리페놀 함량이 높을수록 DPPH 라디칼 소거활성이 높아지는 본 연구 결과와 유사한 양상을 나타내었다. 식물에 함유되어 있는 페놀성 화합물은 지질의 자동산화

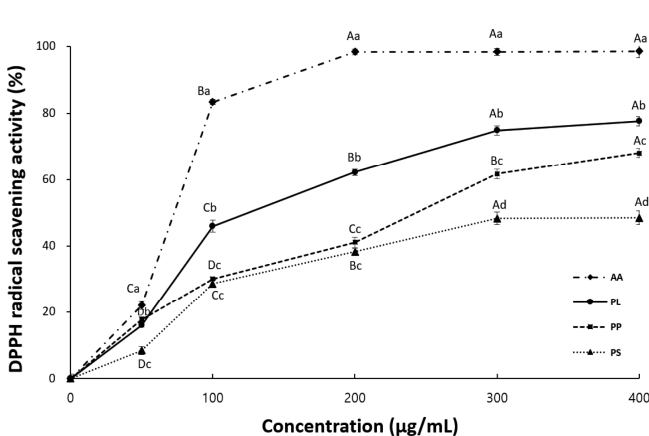


Fig. 1. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging ability of ethanol extract of persimmon leaves, persimmon peel, persimmon stem, AA: ascorbic acid; PL: ethanol extracts from dried persimmon leaves; PP: ethanol extracts from persimmon peel; PS: ethanol extracts from persimmon stem. (A-D) are significantly different ($p < 0.05$), Duncan's multiple range test, among different concentrations of same sample. (a-d) are significantly different ($p < 0.05$), Duncan's multiple range test, among the different samples of same concentration.

에 의해 생성된 유리라디칼의 생성을 지연시키거나 활성을 저해시켜 천연 항산화제로서의 기능을 하는 것으로 알려져 있으므로(Nakayama T 등 1992) 감잎의 높은 폴리페놀 성분이 항산화활성을 높이는 것으로 판단된다. 또한, 항산화력이 가장 우수한 감잎 추출물의 RC50값은 365.28 µg/mL로 오미자박 에탄올 추출물의 RC50값이 226.2 µg/mL라고 보고한 Kim MS 등(2017)의 결과보다 높아 오미자 부산물에 비하여 상대적으로 우수한 항산화활성을 나타내는 것으로 보인다.

3. ABTS 라디칼 소거활성

DPPH 라디칼 소거활성은 자유라디칼을 소거하는 반면, ABTS 라디칼 소거법은 양이온 라디칼을 소거하는 방법으로 DPPH 라디칼 소거활성과 차이가 있다(Dawidowicz AL & Olszowy M 2013). 감부산물 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성을 농도별로 측정하여 비교한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 모든 추출물에서 농도 의존적으로 ABTS 라디칼 소거활성을 보였으며, 400 µg/mL 농도에서 감잎 82.03%, 감과피 70.04%, 감꼭지는 52.89%로 각각 나타났다. 감부산물의 ABTS 라디칼 소거활성은 DPPH 라디칼 소거활성보다 같은 농도에서 높은 활성을 나타내었다. 가장 높은 라디칼 소거활성을 보인 감잎에는 플라보노이드 일종인 astragalin(kaempferol-3-glucosidase)과 탄닌이 다량 함유되어 있는 것으로 보고되었다(Ito S & Oshima Y 1962). Astragalin은 kaempferol로 쉽게 가수분해 되어 탄닌과 함께 linoleic acid와 methyl linolenate이 trans형으로

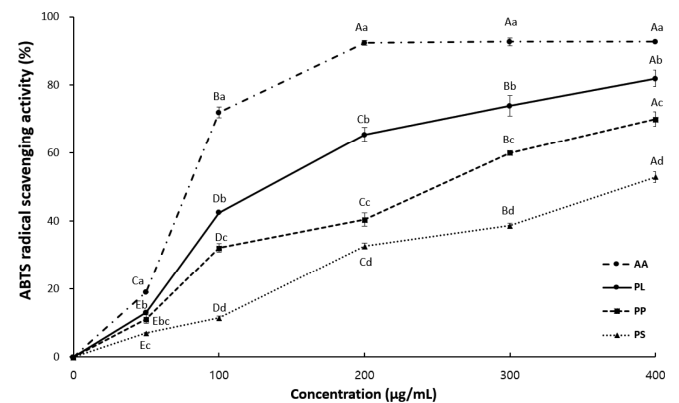


Fig. 2. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) radical scavenging activity of solvent fractions of ethanol extract of persimmon leaves, persimmon peel, persimmon stem, AA: ascorbic acid; PL: ethanol extracts from dried persimmon leaves; PP: ethanol extracts from persimmon peel; PS: ethanol extracts from persimmon stem. (A-D) are significantly different ($p < 0.05$), Duncan's multiple range test, among different concentrations of same sample. (a-d) are significantly different ($p < 0.05$), Duncan's multiple range test, among the different samples of same concentration.

전환되는 것을 억제하는 기전을 통하여 자동산화를 억제함으로써 항산화작용을 하는 것으로 보고되었다(Torel J 등 1986). 그러나 본 연구에서는 총 폴리페놀 함량만 확인하였으므로 다른 추가 연구를 통하여 부산물의 항산화 물질에 대한 성분 분석이 필요한 것으로 사료된다. 한편, 배부산물의 생리활성을 연구한 Lee PH 등(2014)이 배 과피에는 다량의 플라보노이드가 함유되어 있어 기능성 식품 소재로서 과피의 유용성을 보고한 바와 같이 과일 가공 부산물은 항산화제로서 이용가능성이 높은 것으로 보인다.

4. 세포 생존율

RAW 264.7 세포에 대한 감부산물 추출물의 독성 여부는 MTT assay를 이용하여 측정하였다(Fig. 3A). 즉, 감잎, 감과피 및 감꼭지 에탄올 추출물은 50, 100, 200 µg/mL의 농도에서 세포 생존율이 모두 85% 이상 나타났으며, 농도 증가에 따라 유의적인 차이를 나타내지 않아 추출물

자체가 RAW 264.7 세포에 독성을 나타내지 않는 것으로 보인다. 따라서 추출물이 RAW 264.7 세포에 독성을 나타내지 않는 범위 내에서 일산화질소(NO) 측정을 실시하였다.

5. RAW 264.7 세포의 일산화질소 생성 억제 활성

감부산물의 면역활성을 알아보기 위하여 LPS로 염증반응이 유도된 RAW 264.7 세포의 NO 생성량에 어떠한 영향을 주는지 살펴보았다(Fig. 3B). RAW 264.7 세포만 배양한 대조군에서 NO 생성 농도는 4.64 µM로 측정되었으며, LPS를 처리한 경우 NO 생성량은 27.36 µM으로 대조군에 비해 유의적으로 증가되었다($p < 0.05$). 감잎, 감과피, 감꼭지 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 후 NO 생성량을 측정한 결과 LPS로 자극한 대조군에 비해 감잎 추출물을 처리한 군에서 모든 농도 의존적으로 NO 생성이 감소하는 것으로 나타났다. NO는 낮은 농도에서 신체내에서 신경반응과 혈관 이완에 관여하며 대식세포의 활성화와 cytokine 생성을 증가시켜 면역반응에 관여한다(Jung IS 등 2007). 그러나 염증반응으로 인하여 inducible NOS (iNOS)가 발현되면 과량의 NO가 생성되는데 이는 NF-κB의 활성을 막아 염증반응을 더욱 악화시키는 것으로 보고되어 있다(Choi BM 등 2002). 따라서 추출물의 면역활성 평가에서 NO 생성량 측정은 매우 중요한 지표인자이다. 본 연구에서는 감잎과 감과피 추출물은 LPS 처리군에 비해 농도 의존적으로 NO 생성을 감소시키는 것으로 나타났다. 이는 Lee JH(2014)의 보고에서 감잎 추출물을 대식세포에 처리한 결과, NO 생성량이 감잎 추출물의 농도가 증가함에 따라 감소하였다는 결과와 일치하는 경향을 나타내었다. 또한, Joung SY 등(1995)은 감잎 추출물의 NO 생성 저해 효과가 감잎 추출물이 함유한 flavonoid와 유의적인 관련이 있다고 보고하였다. 이는 폴리페놀 함량과 항산화능이 높은 감잎 및 감과피 추출물에서 NO 생성 억제 효과가 높은 것으로 나타난 본 연구 결과와 일치한다. 감잎 추출물은 RAW 264.7 세포 NO 생성을 감소시켜 외부 항원으로부터 자극 받은 경우 면역반응을 조절하여 과도한 NO 생성을 감소시켜 염증반응을 조절할 것으로 사료된다. 이러한 NO 분비능의 증가로 미루어 보아 감부산물 추출물 면역 활성화에 효과가 있을 것으로 생각되며, 기전을 분석을 위하여 감부산물 추출물의 cytokine 분비능을 관찰하였다.

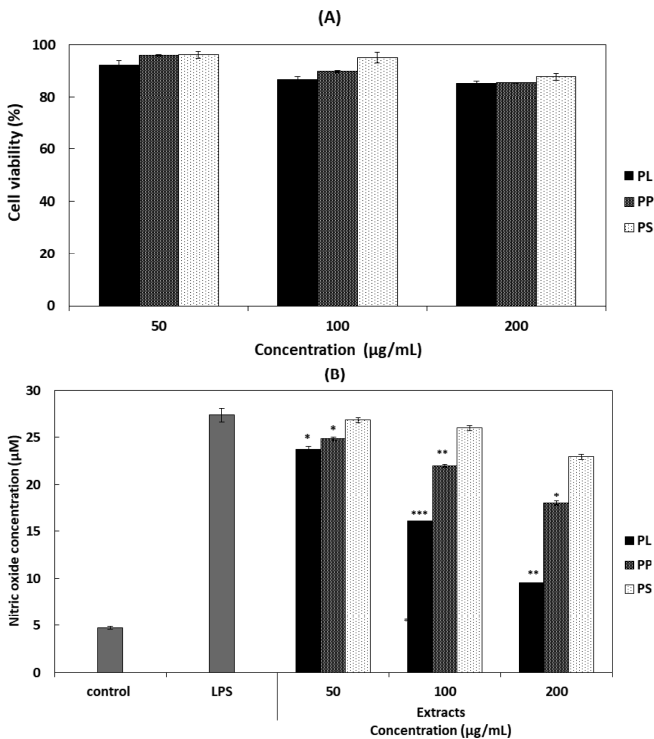


Fig. 3. Effect of 70% ethanol extract from persimmon leaves, persimmon peel, persimmon stem on cell viability (A) and nitric oxide product levels (B) in RAW 264.7 cells. Control: untreated control RAW 264.7 cells; LPS: LPS treated RAW 264.7 cells; PL: ethanol extracts from dried persimmon leaves; PP: ethanol extracts from persimmon peel; PS: ethanol extracts from persimmon stem. Data represent the mean±SD of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to the group treated with LPS.

6. RAW 264.7 세포의 cytokine 분비능 측정

면역세포에서 분비하는 cytokine은 면역반응 시 외부 반응에 의해 분비되는 단백질로서 면역세포들 사이에 일어나는 반응을 조절함으로써 면역세포 분화와 이들 반응을 조절하는데 매우 중요한 역할을 수행한다. 본 연구에

Table 2. Effect of persimmon leaves, persimmon peel, persimmon stem on IL-1 β , IL-6 and IFN- α in RAW 264.7 cells

Sample ¹⁾	Cytokines (pg/mL)		
	IL-1 β	IL-6	TNF- α
Control	<10	<10	<10
LPS	38.38 \pm 2.58 ²⁾	368.38 \pm 2.58	2,534.73 \pm 33.67
PL	19.50 \pm 1.33 ^{**3)}	219.32 \pm 3.49 ^{**}	1,739.48 \pm 13.59 ^{**}
PP	16.29 \pm 2.56 ^{**}	258.54 \pm 4.88 ^{**}	1,938.52 \pm 43.39 [*]
PS	30.01 \pm 1.38 [*]	302.16 \pm 4.35 [*]	2,193.93 \pm 57.16 [*]

¹⁾ Control: untreated control RAW 264.7 cells; LPS: LPS (1 μ g/mL) treated RAW 264.7 cells; PL: ethanol extracts from dried persimmon leaves; PP: ethanol extracts from persimmon peel; PS: ethanol extracts from persimmon stem.

²⁾ Values are mean \pm SD (n=3).

³⁾ * p <0.05, ** p <0.01 compared to the group treated with LPS.

서 LPS를 이용하여 RAW 264.7 세포의 염증반응을 유도시키고 여기에 감부산물 추출물을 처리한 다음 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 생성량을 측정하였으며 그 결과는 Table 2과 같다. 즉, 감잎 및 감과피 추출물 처리 시 LPS 처리 군에 비해 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 생성이 유의적으로 억제되었다. 이러한 결과는 고종시 감부위별 수용성 추출물을 처리하여 TNF- α 와 IL-1 β 의 생성량을 살펴본 Jeon IH 등 (2014)의 연구에서도 감꼭지와 감잎 추출물을 400 μ g/mL 농도로 처리 시 TNF- α 와 IL-1 β 의 생성량이 유의적으로 억제되었다고 보고한 결과와 동일한 양상을 나타내었다. TNF- α , IL-6, IL-1 β 는 대식세포가 분비하는 대표적인 cytokine으로 선천적 면역반응에서 나타나는 염증매개물질로 과도하게 생성되면 급성 및 만성 염증을 일으킨다고 보고되었다(Shan J 등 2009). 특히, IL-6이 과도하게 생성되면 B세포가 plasma 세포로 분화되는 단계가 활성화되어 급성 염증 반응을 만성 염증 반응으로 전환시키는 역할을 한다(Hibi M 등 1996). 따라서 감잎 추출물이 RAW 264.7 세포에서 IL-6 발현을 억제하는 것을 통해 염증 억제 효과를 가지는 것으로 생각된다. 따라서 감부산물에는 다량의 폴리페놀 화합물이 함유되어 있으며, 항산화 및 항염증활성이 우수하여 항산화, 면역 활성 개선을 위한 천연 건강기능식품 소재로서 개발 가능성이 있는 것으로 사료된다.

IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 감잎, 감과피, 감꼭지의 에탄올 추출물에 대한 생리활성을 검색하였다. 감잎, 감과피 및 감꼭지 추출물에서 각각 141.72, 20.22 및 27.20 mg/g의 총 폴리페놀 함량을 나타내었으며, 감잎 추출물의 폴리페놀 함량은 다른 부산물 추출물에 비해 유의적으로 높았다. 항산

화력 측정 결과, 감잎, 감과피, 감꼭지 에탄올 추출물 모두 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거활성을 보였으며, 가장 높은 농도인 400 μ g/mL 농도에서 감잎은 77.67%, 감과피는 68.12%, 감꼭지는 48.50%의 소거활성을 나타내었다. 이러한 라디칼 소거활성은 ABTS 라디칼 소거활성에서도 동일한 양상을 나타내었다. RAW 264.7 세포에 대해 독성을 나타내지 않는 50, 100, 200 μ g/mL 농도에서 감부산물의 NO 생성량을 측정하였다. 그 결과 LPS로 자극한 대조군에 비해 감부산물 추출물을 처리한 군에서 모두 농도 의존적으로 NO 생성이 감소하여 다른 부산물에 비해 가장 높았다. 또한 대식세포의 염증성 cytokine인 IL-6, IL-1 β 및 TNF- α 의 분비량은 추출물 처리 시 억제됨을 확인하였다. 이상의 결과를 종합하면 폴리페놀 함량이 높은 감잎 추출물에서 가장 높은 항산화 및 항염증 활성을 나타내었으며, 감과피 및 감꼭지 추출물에서도 항산화, 항염증 활성이 높은 것을 알 수 있었다. 따라서 이를 이용한 천연 건강기능식품 소재로서 개발 가능성이 높은 것으로 보인다.

Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgments

This research was supported by the Forest Science Technology Research and Development Project (2016017E10-1819-AB02) of the Korea Forestry Promotion Institute, Korea Forest Service, Republic of Korea.

References

- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181(4617):1199-1200.
- Cho YJ, Chun SS. 2005. Effect of wastewater treatment with tannins from peel of astringent persimmon fruits. *Korean J Food Preserv* 12(3):299-304.
- Choi BM, Pae HO, Jang SI, Kim YM, Chung HT. 2002. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. *J Biochem Mol Biol* 35(1):116-126.
- Dawidowicz AL, Olszowy M. 2013. The importance of solvent type in estimating anti-oxidant properties of phenolic compounds by ABTS assay. *Eur Food Res Technol* 236(6):1099-1105.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126(1):131-138.

- Hibi M, Nakajima K, Hirano T. 1996. IL-6 cytokine family and signal transduction: A model of the cytokine system. *J Mol Med* 74(1):1-12.
- Hong JH, Kim HJ, Choi YH, Lee IS. 2008. Physiological activities of dried persimmon, fresh persimmon and persimmon leaves. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37(8):957-964.
- Husain SR, Cillard J, Cillard P. 1987. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochem* 26(9):2489-2491.
- Ito S, Oshima Y. 1962. Studies on the tannin of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* L.). Part I. Isolation of leucoanthocyanin from Kaki fruit. *Agric Biol Chem* 26(3):156-161.
- Jeon IH, Kang HJ, Lee HS, Shin JH, Park YG, Jeong SI, Jang SI. 2014. Antioxidant and anti-inflammatory activities of water-soluble extracts from different parts of Kojongsi persimmon (*Diospyros kaki* L.). *Korean J Food Sci Technol* 46(4):505-510.
- Joung EM, Kim HY, Hwang IG, Jeong JH, Yu KW, Lee JS, Jeong HS. 2010. Changes of antioxidant activities on cultured ginseng with mushroom mycelia during cultivation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39(9):1346-1352.
- Joung SY, Lee SJ, Sung NJ, Jo JS, Kang SK. 1995. The chemical composition of persimmon (*Diospyros kaki*, Thumb) leaf tea. *J Korean Soc Food Nut* 24(2):720-726.
- Jung IS, Kim YJ, Choi IS, Choi EY, Shin SH, Gal SW, Choi YJ. 2007. Studies on antioxidant activity and inhibition of nitric oxide synthesis of germinated brown rice soaked in mycelial culture broth of *Phellinus linteus*. *J Life Sci* 17(8):1141-1146.
- Kawakami K, Aketa S, Nakanami M, Iizuka S, Hirayama M. 2010. Major water-soluble polyphenols, proanthocyanidins, in leaves of persimmon (*Diospyros kaki*) and their alpha-amylase inhibitory activity. *Biosci Biotechnol Biochem* 74(7):1380-1385.
- Kim JH, Kang WW, Kim JK. 2005. Quality evaluation of *Yut* (Korean traditional candy) prepared from low quality dried-persimmon. *Korean J Food Preserv* 12(2):135-140.
- Kim MS, Sung HJ, Park JY, Sohn HY. 2017. Evaluation of anti-oxidant, anti-microbial and anti-thrombosis activities of fruit, seed and pomace of *Schizandra chinensis* Baillon. *J Life Sci* 27(2):131-138.
- Kim YJ, Kim BK. 2005. Effect of dietary persimmon peel powder on physico-chemical properties of pork. *Korean J Food Sci Anim Resour* 25(1):39-44.
- Lee JH. 2014. Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of *Diospyros kaki* Thumb leaves extracts. *Korean J Aesthet Cosmetol* 12(5):719-724.
- Lee PH, Park SY, Jang TH, Yim SH, Nam SH, In MJ, Kim DC, Chae HJ. 2014. Effects of complex carbohydrase treatment on physiological activities of pear peel and core. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43(3):404-410.
- Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several region of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71(1-2):109-114.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2):55-63.
- Nakayama T, Niimi T, Osawa T, Kawakishi S. 1992. The protective role of polyphenols in cytotoxicity of hydrogen peroxide. *Mutat Res* 281(77):77-80.
- Seo JH, Jeong YJ, Kim KS. 2000. Physiological characteristics of tannins isolated from astringent persimmon fruit. *Korean J Food Sci Technol* 32(1):212-217.
- Seong HM, Seo MS, Kim SR, Park YK, Lee YT. 2002. Characteristics of barley polyphenol extract (BPE) separated from pearling by-products. *Korean J Food Sci Technol* 34(5):775-779.
- Shan J, Fu J, Zhao Z, Kong X, Huang H, Luo L, Yin Z. 2009. Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells through suppressing NF- κ B and JNK/AP-1 activation. *Int Immunopharmacol* 9(9):1042-1048.
- Takahara U. 1985. Inhibition of lipoxygenase-dependent lipid peroxidation by quercetin: Mechanism of antioxidative function. *Phytochem* 24(7):1443-1446.
- Torel J, Cillard J, Cillard P. 1986. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochem* 25(2):383-385.

Received on Oct.31, 2017 / Revised on Aug.1, 2018 / Accepted on Aug.1, 2018