

## 곶감, 생감 및 감잎 추출물의 생리활성 효과

홍정희<sup>1</sup> · 김현정<sup>1</sup> · 최용화<sup>2</sup> · 이인선<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구(TMR)센터

<sup>2</sup>상주대학교 식물자원학과

## Physiological Activities of Dried Persimmon, Fresh Persimmon and Persimmon Leaves

Jung-Hee Hong<sup>1</sup>, Hyun-Jeong Kim<sup>1</sup>, Yong-Hwa Choi<sup>2</sup>, and In-Seon Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Plant Resources Sangju National University, Sangju 702-711, Korea

### Abstract

Antioxidative, antidiabetes, antibacterial, anticancer and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of methanol extracts of dried persimmon, fresh persimmon and persimmon leaves were investigated. Total polyphenol content of dried persimmon, fresh persimmon and persimmon leaves were 147.79, 301.45 and 315.90  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , respectively, of which fresh persimmon and persimmon leaves had significantly higher total polyphenol than dried persimmon. Activities of DPPH radical scavenging, lipid peroxidation inhibition and salivary  $\alpha$ -amylase inhibition were increased in persimmon leaves related to total polyphenol contents. Anticancer activities against AGS of fresh persimmon and persimmon leaves were 65~70%; however, there were no significant differences between dried persimmon and fresh persimmon on free radical scavenging activity and inhibitory activity of salivary  $\alpha$ -amylase. Also, extracts of dried persimmon, fresh persimmon and persimmon leaves showed good ACE inhibitory activities. Dried persimmon and fresh persimmon showed antibacterial activities on *E.coli* O157:H7. Therefore, there are many difference activities by dried and parts of persimmon. From this result, it is suggested that persimmon leaves is believed to have possible antioxidative, antidiabetes and anticancer capacities by polyphenol, but further studies on the identification of the active compound(s) as antioxidant, antidiabetic, antihypertensive and antibacterial materials will be needed to develop a better understanding of its potency on persimmons.

**Key words:** antioxidative, antidiabetes, antibacterial, anticancer, antihypertensive

### 서 론

현재 수많은 식품소재들의 건강증진효능 및 질병예방효과가 밝혀지면서 소비자들은 과거 식품이 갖는 영양소 공급을 위한 1차적 기능을 넘어 식품의 생리활성 측면에 대한 관심이 증대되고 있으며(1) 식물성 소재 및 약용식물을 이용한 다양한 기능성식품이 출시 또는 연구되고 있다.

감나무(*Diospyros kaki* THUNBERG)는 온대 아시아 지방, 우리나라, 중국, 일본이 원산지이며, 우리나라의 중, 북부 및 일부 산간 지방을 제외하고 전국 어디에서나 재배가 가능하고 성숙 후에도 1~2%의 탄닌을 함유하고 있어 수확 후 반드시 탈삼 혹은 연시 제조과정을 거쳐야만 식용이 가능한 과실로(2) 비타민 A와 C가 풍부한 알칼리성 식품이며, 장내 분비액의 분비를 촉진하는 등의 효능을 갖고 있어 전통적으로 애용되어 온 과실이다(3). 감에서 떫은맛을 내는 것이 수

용성 탄닌이며, 탄닌 성분은 과실, 야채류 및 식물종자 등의 식물체에 널리 함유되어 있으며 수렴성이나 지혈작용 등의 약리적 효과와 더불어 단백질이나 알칼로이드와 결합하는 특성을 가지고 있으며(4), 항균, 항산화, 항종양작용 및 중금속 제거능과 같은 생리활성이 보고되었다(5,6). 또한 감에는 녹차에 다량 함유되어 있는 폴리페놀성분인 catechin, epicatechin, epicatechingallate, epigallocatechin, epigallocatechingallate, betulinic acid 등과 같은 기능성 페놀화합물이 다량 함유되어 있으며, 이들 물질은 항산화기능, 노화방지, 심혈관계 질환 예방 및 항암효과가 보고되어 있다(7-9). 떫은 감을 박피한 후 건조하여 제조하는 곶감은 오래전부터 우리나라에서 이용되고 있는 주된 과실 건조가공품으로 떫은 감의 50% 이상이 곶감으로 가공되고 있다(10). 곶감은 가을에 일시적으로 다량으로 출하되는 감 과실의 이용기간을 연장하는 가장 중요한 수단으로, 건조하는 과정에서 생감

\*Corresponding author. E-mail: inseon@kmu.ac.kr  
Phone: 82-53-580-5538, Fax: 82-53-580-5538

보다 4배 정도 단맛이 증가하며, 비타민 A의 함량도 증가한다. 감잎은 심장병 및 고혈압 등의 순환기 질환에 효능이 있을 뿐 아니라 위궤양, 십이지장 궤양 및 당뇨병 등 만성질환과 천식을 치료하는데 효과가 있다고 알려져 있다(11,12). 감잎의 성분으로는 astragalín, myricitrín과 같은 flavonoid 배당체, tannin, polyphenol류, 수지, coumarin류 화합물, betulic acid, oleanolic acid, ursolic acid와 같은 유기산 및 엽록소, 비타민 A, C를 풍부하게 함유하고 있으며 비타민 B1, 판토텐산, 엽산의 함유량이 많아 성인병 예방을 위한 좋은 식품으로 권장되고 있다(13). 감잎에 관한 국내외에 연구동향은 감잎의 성분(7), 성장시기별 비타민 C의 변화(14), 항산화 효과(15,16), 열수추출물 및 탄닌의 항돌연변이 효과와 항암효과(12-14) 등이 있으며 감잎에서 분리된 flavonoids의 angiotensin-converting enzyme(ACE) 활성 저해 작용(17) 등과 같은 연구가 진행되어 왔다.

현재까지 특유의 유용성분과 다양한 페놀성 물질 및 flavonoids를 함유하고 있는 감잎에 의한 항산화, 항암 및 항고혈압 활성에 관한 연구는 다소 되어 있으나, 생감, 꾀감 및 감잎의 생리활성에 관한 비교 연구는 이루어진 바 없다. 따라서 본 연구에서는 생감, 꾀감 및 감잎의 항산화, 항당뇨, 항고혈압, 항암 및 항균 활성을 측정하여 각각의 생리학적 활성에 대하여 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 시료의 제조

본 실험에 사용된 꾀감, 생감 및 감잎은 상주 감시험장으로부터 구입하여 사용하였다. 먼저 각 시료를 10배 용량의 80% 메탄올과 혼합하여 24 시간 동안 정치 추출하고, 이를 총 3회 반복 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman No. 1, England)를 사용하여 2회 여과하고 회전감압 농축기(R-3000, Buchi, Switzerland)로 농축하여 동결건조한 후 분말화하여 본 실험의 시료로 사용하였다.

### 세포주 배양

암세포주중 인간유래의 위암 세포주인 AGS와 간암 세포주인 HepG2는 한국 세포주 은행으로부터 분양받아 사용하였다. 이들 암세포주는 각각 RPMI-1640배지 및 MEM배지에 10% fetal bovine serum(FBS)과 1% antibiotics (penicillin/streptomycin)를 첨가하여 37°C의 5% CO<sub>2</sub> incubator에 배양하면서, 2~3일에 한 번씩 계대배양 하였다.

### 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 분석방법으로 널리 사용되고 있는 Folin-Denis법을 응용하여 측정하였다(18). 즉, 각 분획물 시료 1 mg을 증류수 1 mL에 녹이고 10배 희석한 희석액 2 mL에 2배로 희석한 Folin 시약 2 mL를 첨가하여 잘 혼합한 후 3분간 방치한 후 2 mL의 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 서서히 가하

였다. 이 혼합액을 1시간 동안 방치한 후 UV/visible spectrophotometer(UVIKON 922, Kontron, Italy)를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 폴리페놀 화합물은 tannic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다. Tannic acid를 이용한 표준곡선은 tannic acid의 최종농도가 5, 25, 50 µg/mL이 되도록 하여 위와 같은 방법으로 700 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다.

### 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Moreno 등의 방법(19)에 의해 측정하였다. 각 시료 100 µL를 80% ethanol 900 µL에 희석한 후 100 µL를 취하여 10% aluminum nitrate와 1 µM potassium acetate를 함유하는 80% ethanol 4.3 mL에 혼합하여 실온에서 40분 방치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 total flavonoid 함량은 quercetin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

### α-α-Diphenyl-β-picrylhydrazyl radical 소거활성 측정

α-α-Diphenyl-β-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거활성은 Blois의 방법(20)에 따라 각 시료의 DPPH 라디칼에 대한 환원력을 측정하였다. 각 분획물을 농도별로 99% 메탄올에 녹인 후, 800 µL을 취하여 메탄올에 녹인 0.15 mM DPPH 용액 200 µL와 혼합하여 30분경과 후에 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 분획물의 유리 라디칼 소거활성은 IC<sub>50</sub>값으로 나타내었다.

### 간 microsome에서의 지질과산화 억제 효과 측정

Sprague-Dawley 중 수컷으로부터 간 microsome 분획을 Slater와 Sawyer의 방법(21)으로 분리하여 사용하였다. FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O/L-ascorbic acid(22)에 의해 유도된 쥐 간 microsome의 지질과산화도를 Ohkawa 등의 TBA방법(23)으로 TBARS를 측정하였다. 즉, 쥐 간 microsome(2 mg/mL, 0.1 mL), 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5, 1.5 mL)와 각 시료(0.2 mL)를 함유한 반응액에 5 mM FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O와 0.1 mM L-ascorbic acid를 각각 0.1 mL씩 가하여 37°C에서 60분간 반응시켜 microsome의 지질과산화를 유도하였으며, 이 혼합액에 3.0 M TCA-2.5 N HCl 0.5 mL를 가하고 원심분리(3,000 rpm)하여 얻은 상등액을 1 mL 취하여 여기에 0.67% TBA 수용액 1 mL를 가하고 마개를 하여 100°C에서 30분간 가열시킨 후 얼음물에 냉각하고 이를 535 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### α-Glucosidase 저해활성 측정

α-Glucosidase 저해활성은 nitrophenol 분석법(24,25)을 응용하여 측정하였다. 0.2 U/mL α-glucosidase 효소액 50 µL, 2.5 mM p-nitrophenyl α-D-glucopyranoside(pNPG) 100 µL, sample 50 µL 및 50 mM phosphate buffer(pH 6.8) 50 µL와 혼합하여 37°C에서 20분간 preincubation한 후 0.1 M NaOH 100 µL를 가하여 반응을 정지시키고 405 nm에서

흡광도를 측정하였다.

**α-Amylase 저해활성 측정**

α-Amylase 저해활성은 환원당 분석법(24,25)을 응용하여 측정하였다. 0.5 U/mL saliva 또는 pancrea 기원의 α-amylase 효소액 50 μL, 0.5% starch 100 μL, sample 50 μL 및 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)와 혼합하여 37°C에서 20분간 preincubation한 후 DNS 발색시약(1% 3,5-dinitrosalicylic acid, and 12% sodium potassium tartrate in 0.4 M NaOH) 250 μL를 넣고 100°C에서 10분간 끓여 발색시킨 후 충분히 냉각시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하고 저해율을 계산하였다.

**ACE 저해활성 측정**

Cushman과 Cheung의 방법(26)에 의하여 ACE 저해활성을 측정하였다. 즉, angiotensin-I 전환효소는 ACE 1 g에 400 mM sodium borate buffer(pH 8.3) 10 mL를 가하여 용해한 후 ACE 조효소액으로 사용하였다. 시료 50 μL에 ACE 조효소액 100 μL 및 0.1 M sodium borate buffer(pH 8.3) 200 μL를 가한 다음 37°C에서 5분간 preincubation하였다. 여기에 기질로써 0.5 mM Hip-His-Leu 50 μL를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 1 N HCl 250 μL를 가하여 반응을 정지하였다. Ethyl acetate 2 mL를 가하여 15초간 교반한 후 3,000×g에서 5분간 원심분리 하여 상정액 1 mL를 취하였다. 이 상정액을 완전히 건조시킨 뒤 1 N NaCl 3 mL를 가하여 용해한 다음 228 nm에서 흡광도를 측정하여 ACE 저해 활성을 구하였다.

$$\text{ACE 저해활성(\%)} = \frac{1 - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

**암세포 성장 억제효과 측정**

암세포주에 대한 세포증식 억제효과는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide(MTT) assay(27)로 조사하였다. 배양된 cell에 RPMI-1640배지 또는 MEM배지를 첨가하고 잘 혼합하여 cell수를  $1 \times 10^5$  cells/mL로 조정된 다음, 96-well microtiter plate에 준비된 cell을 100 μL씩 첨가하고, 각 농도의 꽃감, 생감 및 감잎의 메탄올추출물을 10 μL씩 well에 첨가한 후 37°C의 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 48시간 배양하였으며, 이때 대조군은 시료 대신 DMSO를 동량 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 배양 후 5 mg/mL의 MTT시약 10 μL를 각 well에 첨가한 후 다시 4시간 더 배양하였다. 배양종료 후 1,500 rpm에서 15분간 원심분리 하여 생성된 formazan 결정을 DMSO로 용해시켜 cell plate reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포증식 억제 효과는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Cytotoxicity(\%)} = \left\{ \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \right\} \times 100$$

**사용균주 및 배양**

본 실험에 사용한 균주는 *Esherichia coli* O157:H7 ATCC 43889, *Staphylococcus aureus* ATCC 23235, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1640으로 ACTT 및 KCTC로부터 분양 받아 사용하였다. 성장 배지는 tryptic soy broth(TSB, Difco, USA) 및 agar(TSA, Difco, USA)를 사용하였으며, 37°C에서 24시간 3회 계대 배양하여 사용하였다.

**항균력 검색**

식중독균에 대한 꽃감, 생감 및 감잎의 메탄올추출물의 항균효과는 inhibition zone diameter test로 조사하였다. 초기 log phase 상태에 도달한 균을  $10^8 \sim 10^9$  CFU/mL의 농도로 한천배지에 도달한 후 멸균된 paper disc(diameter 8 mm)를 올려놓은 다음, 각 추출물은 10% 농도로 조제하여 membrane filter(0.45 μm)로 제균하고 paper disc에 50 μL씩 첨가하여 37°C의 incubator에서 48시간 배양 후 paper disc 주위에 생성된 clear zone의 유무 확인 및 직경을 측정하여 항균력을 검색하였다.

**통계처리**

대조군과 각 시료에서 얻은 실험 자료로부터 ANOVA를 구한 후 Student's test를 이용하여 통계분석 하였다.

**결과 및 고찰**

**총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량**

식물에 널리 분포되어 있는 페놀성 물질은 phenolic hydroxyl 그룹 때문에 단백질 또는 효소단백질, 기타 거대분자들과 결합하는 성질, 항산화 효과, 2가 금속이온과의 결합력을 가진다. 또한 단백질과 결합하는 성질은 미생물 세포와 작용하여 성장저해를 유발시킴으로써 항균효과 등의 생리활성을 가진다(28,29). 따라서 본 실험에서는 꽃감(KK1), 생감(KK2) 및 감잎(KK3)의 메탄올 추출물에 존재하는 총 폴리페놀 함량은 tannic acid를 기준물질로, 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 기준 물질로 하여 측정 비교하였다(Table 1). 폴리페놀 함량은 꽃감, 생감 및 감잎 각각 147.79, 301.45 및 315.90 μg/mg으로 생감 및 감잎의 폴리페놀 함량이 꽃감에 비해 유의적으로 높았다. 총 플라보노이드 함량은 꽃감, 생감 및 감잎 각각 12.73, 19.09 및 43.64 μg/mg으로 대체로 감잎에 페놀성 화합물이 많이 존재함을 알 수 있었다.

**DPPH free radical의 소거활성**

활성산소는 생체막의 구성성분인 불포화지방산을 공격하여 지질과산화물을 형성하며, 이렇게 축적된 과산화지질이 생체의 기능 저하 또는 노화 및 성인병의 유발 요인으로 알려져 있다(30). DPPH 라디칼을 이용한 항산화능 측정법은 주로 phenolic 구조와 aromatic amine 화합물에서 많이 사용되는 방법으로 DPPH는 dioxane이나 carbone tetrachloride

**Table 1. Content of total polyphenols and flavonoids in methanol extracts from dried persimmon, fresh persimmon and persimmon leaves**

	Total polyphenols <sup>1)</sup> (µg/mg)	Total flavonoids <sup>2)</sup> (µg/mg)
KK1	147.79±39.20 <sup>3b)</sup>	12.73±1.57 <sup>c)</sup>
KK2	301.45±13.11 <sup>a)</sup>	19.09±1.29 <sup>b)</sup>
KK3	315.90±57.36 <sup>a)</sup>	43.64±3.86 <sup>a)</sup>

KK1, methanol extracts from dried persimmon; KK2, methanol extracts from fresh persimmon; KK3, methanol extracts from persimmon leaves.

<sup>1)</sup>Micrograms of total polyphenol content/mg of plants based on tannic acid as standard.

<sup>2)</sup>Micrograms of total flavonoid content/mg of plants based on quercetin as standard.

<sup>3)</sup>Each value is mean±SD (n≥3).

(CCl<sub>4</sub>)와 같은 비극성 용매 내에서는 2,3차 산화 반응이 일어나기도 하나 alcohol 용액 내에서는 DPPH의 질소원자와 alcohol 간에 수소결합의 형성으로 비교적 안정하다고 보고되었다(30).

따라서 꽃감, 생감 및 감잎 각각의 메탄올 추출물과 합성 항산화제인 BHA의 항산화 효과를 DPPH 라디칼의 소거활성을 측정하여 비교하였다(Table 2). IC<sub>50</sub>값은 꽃감, 생감 및 감잎 각각 74.40, 78.02 및 64.47 µg/mL로 페놀성 화합물의 함량이 많은 감잎이 free radical 소거활성도 높음을 알 수 있었다. Kang 등(31)은 전자공여능이 phenolic acids와 flavonoids 및 기타 phenolic 물질에 대한 항산화작용의 지표라고 하였으며, 이러한 물질은 환원력이 큰 것일수록 전자공여능이 높다고 하였으며, DPPH는 아스코르빈산, 토코페롤, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의하여 환원되어 짙은 자색으로 탈색됨으로써 전자공여능의 차이를 측정한다고 보고한 바 있다. 그러나 폴리페놀 함량에 차이가 있는 꽃감과 생감의 경우 free radical 소거능은 유의적인 차이가 없으므로, 이러한 효과를 나타내는 꽃감의 원인물질에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

**간 microsomes에서의 지질과산화 억제 효과 측정**

FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O/L-ascorbic acid에 의해 유도된 쥐 간 mi-

**Table 2. Scavenging effects of methanol extracts from dried persimmon, fresh persimmon and persimmon leaves on DPPH radical**

	Scavenging effect <sup>1)</sup> (%)	IC <sub>50</sub> <sup>2)</sup> (µg/mL)
BHA	108.76±7.66 <sup>3a)</sup>	35.97
KK1	67.20±8.56 <sup>bc)</sup>	74.40
KK2	64.09±3.04 <sup>c)</sup>	78.02
KK3	77.55±3.38 <sup>b)</sup>	64.47

BHA, butylated hydroxyanisole; KK1, methanol extracts from dried persimmon; KK2, methanol extracts from fresh persimmon; KK3, methanol extracts from persimmon leaves.

<sup>1)</sup>The concentration of all test samples was 100 µg/mL.

<sup>2)</sup>IC<sub>50</sub> value is the concentration of sample required for 50% inhibition.

<sup>3)</sup>Each value is mean±SD (n≥3).

rosome의 지질과산화 억제효과에 미치는 꽃감, 생감 및 감잎의 효과를 측정된 결과는 Table 3과 같다. IC<sub>50</sub>값은 꽃감, 생감 및 감잎 각각 390.32, 121.51 및 90.87 µg/mL로 감잎의 지질과산화 억제효과가 높음을 알 수 있었다. 감잎으로부터 추출된 축합형 탄닌은 DPPH radical, O<sub>2</sub>, OH 그리고 OOH radical 등의 활성산소 유리기를 소거하는 효과가 있고, 이들 중 galloyl group을 가진 (-)-epigallocatechin 3-O-gallate가 가장 효과적이라고 보고된 바 있다(32). 한편 감잎의 flavonoids 성분인 astragalin(kaempferol-3-glucosidase)은 kaempferol로 쉽게 가수분해 될 수 있는데(33), 감잎 탄닌의 성분중 하나인 catechin과 함께 linoleic acid와 methyl linolenate의 trans, trans-hydroperoxide isomers의 형성을 억제함으로써 linoleic acid와 methyl linolenate의 자동산화를 억제하는 항산화 효과가 있다고 보고되었다(34).

**α-Glucosidase 저해활성**

α-Glucosidase는 소장점막의 미세용모막에 존재하는 효소로서 다당류의 탄수화물을 단당류로 분해하는 탄수화물의 소화와 흡수에 필수적인 효소이다. 이 효소의 억제제로서 대표적인 아카보스는 소장내의 점막에서 α-glucosidase의 효소 활성을 저해함으로써 다당류의 분해를 방해하여 소장에서 glucose의 흡수를 지연시켜주어 식후 혈당의 급격한

**Table 3. Effect of methanol extracts from dried persimmon, fresh persimmon and persimmon leaves on inhibitory effect of lipid peroxidation in liver microsomes**

	Lipid peroxidation inhibition <sup>1)</sup> (%)	IC <sub>50</sub> <sup>2)</sup> (µg/mL)
BHA	60.77±0.68 <sup>3a)</sup>	82.27
KK1	12.81±5.24 <sup>d)</sup>	390.32
KK2	41.15±6.56 <sup>c)</sup>	121.51
KK3	55.02±1.99 <sup>b)</sup>	90.87

BHA, butylated hydroxyanisole; KK1, methanol extracts from dried persimmon; KK2, methanol extracts from fresh persimmon; KK3, methanol extracts from persimmon leaves.

<sup>1)</sup>The concentration of all test samples was 100 µg/mL.

<sup>2)</sup>IC<sub>50</sub> value is the concentration of sample required for 50% inhibition.

<sup>3)</sup>Each value is mean±SD (n≥3).

**Table 4. α-Glucosidase inhibitory activities of methanol extracts from dried persimmon, fresh persimmon and persimmon leaves**

	Inhibitory effect <sup>1)</sup> (%)	IC <sub>50</sub> <sup>2)</sup> (µg/mL)
Acarbose	104.51±5.12 <sup>3a)</sup>	4.80
KK1	64.51±9.42 <sup>b)</sup>	77.51
KK2	80.54±2.96 <sup>b)</sup>	62.08
KK3	76.52±1.36 <sup>b)</sup>	65.34

KK1, methanol extracts from dried persimmon; KK2, methanol extracts from fresh persimmon; KK3, methanol extracts from persimmon leaves.

<sup>1)</sup>The concentration of all test samples was 100 µg/mL except acarbose (10 µg/mL).

<sup>2)</sup>IC<sub>50</sub> value is the concentration of sample required for 50% inhibition.

<sup>3)</sup>Each value is mean±SD (n≥3).

**Table 5.  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of methanol extracts from dried persimmon, fresh persimmon and persimmon leaves**

	Salivary $\alpha$ -amylase		Pancreatin $\alpha$ -amylase	
	Inhibitory effect <sup>1)</sup> (%)	IC <sub>50</sub> <sup>2)</sup> ( $\mu$ g/mL)	Inhibitory effect <sup>1)</sup> (%)	IC <sub>50</sub> <sup>2)</sup> ( $\mu$ g/mL)
Acarbose	116.47 $\pm$ 1.48 <sup>3)a</sup>	4.29	111.28 $\pm$ 2.18 <sup>a</sup>	4.49
KK1	53.41 $\pm$ 6.66 <sup>c</sup>	93.62	80.67 $\pm$ 5.33 <sup>b</sup>	61.98
KK2	52.63 $\pm$ 3.88 <sup>c</sup>	95.00	38.60 $\pm$ 9.32 <sup>c</sup>	129.53
KK3	86.04 $\pm$ 8.42 <sup>b</sup>	58.11	35.55 $\pm$ 6.92 <sup>c</sup>	140.65

KK1, methanol extracts from dried persimmon; KK2, methanol extracts from fresh persimmon; KK3, methanol extracts from persimmon leaves.

<sup>1)</sup>The concentration of all test samples was 100  $\mu$ g/mL except acarbose (10  $\mu$ g/mL).

<sup>2)</sup>IC<sub>50</sub> value is the concentration of sample required for 50% inhibition.

<sup>3)</sup>Each value is mean $\pm$ SD (n $\geq$ 3).

상승을 막는다(35). Matsui 등(36)은 다수의 식물에서 유래한 폴리페놀 추출물이 제2형 당뇨병 치료 약제인 acarbose 혹은 voglibose와 유사한 소장  $\alpha$ -glucosidase 및 maltase 저해활성을 가진다고 보고하였다. 따라서 본 실험에서 폴리페놀 함량이 상대적으로 높은 생감 및 감잎의  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 기대하였으나, 대조군인 acarbose에 비하여 저해율은 유의적으로 저하되었으며, 각 실험군 간의 유의적인 차이는 없었다(Table 4).

**$\alpha$ -Amylase 저해활성**

$\alpha$ -Amylase 저해제는 소장에서 전분의 소화를 저해하여 포도당의 흡수를 지연시킴으로써 혈당 조절 목적으로 이용된다.  $\alpha$ -Amylase 저해활성은 식물의 폴리페놀 성분 중 특히 탄닌과 proanthocyanidins에 더 민감하다고 보고되었다(37,38). 따라서 본 연구에서는  $\alpha$ -amylase 저해제를 탐색할 목적으로 꽃감, 생감 및 감잎의 메탄올 추출물을 이용하여 salivary, pancreatin  $\alpha$ -amylase에 대한 저해활성을 관찰한 결과(Table 5) IC<sub>50</sub>이 salivary  $\alpha$ -amylase의 경우 각각 93.62, 95.00 및 58.11로 나타났다. 그러나 폴리페놀 함량에 차이가 있는 꽃감과 생감의 경우  $\alpha$ -amylase에 대한 유의적인 차이가 없으므로, 이러한 효과를 나타내는 꽃감의 원인물질에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다. Pancreatin  $\alpha$ -amylase의 IC<sub>50</sub>의 경우 각각 61.93, 129.53 및 140.65로 나타나 pancreatin 기원보다 salivary 기원에 대해 보다 강하게 저해하는 것을 보여주었다. 앞서 보고에 따르면  $\alpha$ -amylase는 기원에 따라 구조적인 차이와 저해제에 대해 서로 다른 감수성을 나타냈다(39). 따라서 꽃감, 생감 및 감잎의 메탄올 추출물의 두 효소에 대한 저해활성 차이는 효소의 구조적인 차이에서 기인한 것으로 판단된다.

**ACE 저해활성**

ACE는 불활성형의 angiotensin- I (decapeptide)의 C 말단에 존재하는 His-Leu를 절단하여 혈관벽 수축작용을 하는 angiotensin- II (octapeptide)를 생성하고 혈압을 감소시키는 bradykinin을 불활성화시키는 효소이다(40). ACE 저해제는 ACE의 작용을 저해함으로써 angiotensin II의 생성 저해, aldosterone 분비감소, 혈관확장제인 bradykinin의 증

가 등의 과정을 통해 신장혈관을 확장시켜 sodium의 배설을 촉진함으로써 혈압을 낮추어 줄 수 있다(41).

추출물의 ACE에 대한 저해 효과를 측정함으로써 항고혈압 효과를 살펴본 결과 Table 6과 같이 꽃감, 생감 및 감잎 추출물 10 mg/mL 농도에서 각각 88.04, 88.17 및 86.27%의 저해율을 나타내었다. 현재까지 captopril, enalapril과 같은 화학합성 ACE 저해제가 널리 상용되고 있지만, 높은 역가에 비해 각종 부작용이 많아 안정성 측면에서 가치가 더 높은 천연물질에 대한 탐색과 개발에 대한 더 많은 연구가 필요하다. 일반적으로 phenol 유래의 화합물과 단백질과의 결합은 단백질의 아미드 결합과 페놀성 수산기 간의 수소결합에 의한 반응으로 단백질과 복합체의 침전물을 형성하며, 이런 현상은 pH, 이온강도, 단백질 및 phenol 농도에 의한 상호작용으로 비경쟁적으로 효소를 저해함으로써 효소의 용해성 및 안정성을 저하시켜 효소의 불활성화를 일으키는 것으로 보고되고 있다(42). 따라서 본 연구에서의 ACE의 효소 작용 억제제는 추출물의 phenol 유래 화합물에 의한 것으로 사료되며, 이에 따른 추후 실험이 필요할 것으로 사료된다.

**항암활성**

암세포의 증식억제는 비 특이적인 방어기전으로서 암세포에 직접적 손상을 줄 뿐 아니라 동물 생체내 림프구나 대식세포와 같이 표적세포에 대해 세포 독성효과를 나타내는 작동세포를 자극함으로써 세포독성 효과를 향진시킨다고 보고되고 있다.

위암 세포주인 AGS에 대해 Fig. 1과 같이 시료 첨가량이

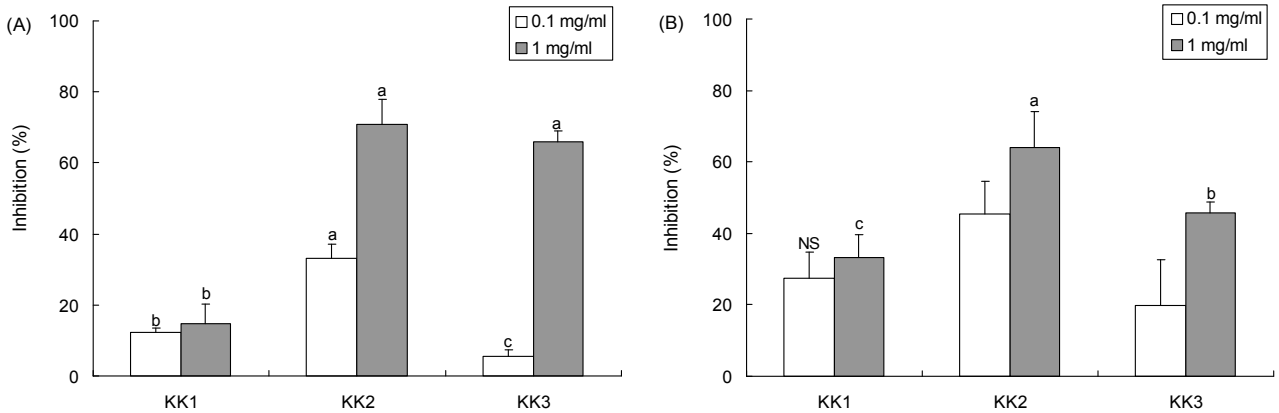
**Table 6. Effect of inhibition on angiotensin converting enzyme (ACE) by methanol extracts from dried persimmon, fresh persimmon and persimmon leaves**

	Inhibitory effect <sup>1)</sup> (%)
KK1	88.04 $\pm$ 0.25 <sup>2)NS</sup>
KK2	88.17 $\pm$ 7.15
KK3	86.27 $\pm$ 8.27

KK1, methanol extracts from dried persimmon; KK2, methanol extracts from fresh persimmon; KK3, methanol extracts from persimmon leaves.

<sup>1)</sup>The concentration of all test samples was 10 mg/mL.

<sup>2)</sup>Each value is mean $\pm$ SD (n $\geq$ 3).



**Fig. 1. Growth inhibitory effects of the methanol extracts from dried persimmon, fresh persimmon and persimmon leaves on human gastric cancer AGS (A) and hepatic cancer HepG2 (B) cells.**

KK1, methanol extracts from dried persimmon; KK2, methanol extracts from fresh persimmon; KK3, methanol extracts from persimmon leaves.

증가될수록 세포증식 억제 활성이 더 증가하였다. 즉 시료농도 0.1 mg/mL 처리 시에는 꽃감, 생감, 감잎 각각 12.23, 33.26 및 5.56%의 저해율을 보였으나, 1 mg/mL 처리 시에는 꽃감, 생감, 감잎 각각 14.87, 70.83 및 65.91%의 저해율을 보였다. Hibasami 등(43)에 의하면 감추출물은 human lymphoid leukemia Molt 4B cell에 투여 시 세포의 성장저해와 programmed cell death를 유도하는 것을 보여주고 있어 감추출물에 항암 효과를 가진 성분이 있을 것을 예시하였다. 또한 감잎의 항암연구로는 감잎에 존재하는 kaempferol이 종양세포의 핵산합성 및 RNA polymerase II에 의해 전사를 저해하며(44), 사람의 위암 세포인 AZ-521 암세포 증식 억제효과는 감잎의 수용성 성분보다는 핵산, 클로로포름 및 에틸아세테이트에 많이 용해되어 나오는 지용성 성분의 작용이 크다는 Moon(45)의 보고 등이 있다. 감 및 감잎 추출물이 강한 세포독성효과를 나타내었다는 보고(43-45)와 유사하게 본 연구에서도 생감 및 감잎 모두 시료농도 1 mg/mL의 처리 시 65~70%의 높은 저해율을 관찰할 수 있었다. 간암 세포주인 HepG2도 AGS와 비슷한 경향이였다.

#### 항균활성

꽃감, 생감 및 감잎 추출물이 대표적인 식품 유해세균인 *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) ATCC 23235, *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7 ATCC 43889, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) KCTC 1640 등의 생육을 저해하는 지를 조사하였다(Table 7). 플라보노이드 화합물이 항균작용을 가진다는 Ueda 등(46)의 보고에 의해, 본 연구에서도 폴리페놀 함량 및 플라보노이드 함량이 높은 감잎 추출물의 항균활성을 기대하였으나, 대부분의 균주에 대한 감잎 추출물의 항균력은 없었다. 꽃감 및 생감의 경우 *E. coli* O157:H7에 대해서만 약한 항균력을 볼 수 있었다. Kim 등(47)의 보고에 의하면 차초기의 30, 50, 70, 95% 에탄올 추출물과 물추출물의 단계별 계통분획 하여 얻은 분획물의 항균력 실험에

**Table 7. Antimicrobial activities of various methanol extracts from dried persimmon, fresh persimmon and persimmon leaves**

Source of extract	Strains <sup>1)</sup>	Size of clear zone (mm)
KK1	<i>S. aureus</i> ATCC 23235	- <sup>2)</sup>
	<i>E. coli</i> ATCC 43889	1.90±0.00 <sup>3)</sup>
	<i>P. aeruginosa</i> KCTC 1640	-
KK2	<i>S. aureus</i> ATCC 23235	-
	<i>E. coli</i> ATCC 43889	1.55±0.00
	<i>P. aeruginosa</i> KCTC 1640	-
KK3	<i>S. aureus</i> ATCC 23235	-
	<i>E. coli</i> ATCC 43889	-
	<i>P. aeruginosa</i> KCTC 1640	-

The concentration of all test samples was 20 mg/disc.

KK1, methanol extracts from dried persimmon; KK2, methanol extracts from fresh persimmon; KK3, methanol extracts from persimmon leaves.

<sup>1)</sup> *S. aureus* ATCC 23235, *Staphylococcus aureus* ATCC 23235; *E. coli* ATCC 43889, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43889; *P. aeruginosa* KCTC 1640, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1640.

<sup>2)</sup> No inhibitory zone was formed.

<sup>3)</sup> Each value is mean±SD (n≥3).

서는 ethyl acetate층이 실험 대상 미생물 모두에 대하여 항균활성을 나타내었으며 에탄올 혼합용이 낮을수록 즉, 30% 에탄올과 물추출물의 ethyl acetate 분획물의 저해력이 가장 크게 나타났다고 보고하였다. 따라서 꽃감, 생감 및 감잎의 항균활성을 검증하기 위해서는 물 추출물과의 비교 실험이 필요할 것으로 사료된다.

#### 요약

본 연구에서는 꽃감, 생감 및 감잎의 메탄올 추출물을 제조한 후 이들의 생리활성을 검색하였다. 총 폴리페놀 함량은 꽃감, 생감 및 감잎 각각 147.79, 301.45 및 315.90 µg/mg으로

생감 및 감잎에 폴리페놀 함량이 꽃감에 비해 유의적으로 많았다. 감잎의 경우 폴리페놀 함량에 비례하여 DPPH radical 소거활성, 지질과산화 억제효과 및 salivary  $\alpha$ -amylase 저해활성이 증가되었다. 항암활성도 폴리페놀 함량이 높은 생감 및 감잎추출물이 위암 세포인 AGS에 대해 65~70%의 높은 저해율을 나타내었다. 그러나 폴리페놀 함량에 차이가 있는 꽃감과 생감의 경우 free radical 소거능 및 salivary  $\alpha$ -amylase 저해활성은 유의적인 차이가 없었다. 또한, 항고혈압 활성은 꽃감, 생감 및 감잎 추출물 모두 80% 이상의 높은 저해활성을 나타내었다. 항균활성은 감잎 추출물의 항균력은 나타나지 않았으나, 꽃감 및 생감의 경우 *E. coli* O157:H7에 대해서만 약한 항균력을 볼 수 있었다. 이와 같이 같은 감류임에도 건조 상태 및 부위에 따라 다양한 차이를 보이는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 종합하면 감잎의 항산화, 항당뇨 및 항암 활성은 폴리페놀 함량에 기인하나, 꽃감은 생감 및 감잎에 비하여 폴리페놀 함량은 상대적으로 적으나 항산화, 항당뇨, 항고혈압 및 항균효과가 있는 물질을 함유한 것으로 판단되며, 이들 효과를 나타내는 원인물질에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다.

### 감사의 글

이 논문은 2006년도 상주시의 신활력사업연구개발과제 및 산업자원부 지정 계명대학교 전통미생물 자원개발 및 산업화연구센터의 지원에 의해 수행된 연구결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

### 문헌

1. Park SH, Hwang HS, Han JH. 2004. Development of drink from composition with medicinal plants and evaluation of its physiological function. *Korean J Nutr* 37: 364-372.
2. Mutsuo T, Ito S, Ben-Arie R. 1991. A model experiment for elucidating the mechanism of astringency removal in persimmon fruit using respiration inhibitors. *J Jpn Soc Hort Sci* 60: 437-442.
3. Yu TJ. 1976. *Food carte*. Pak Myoung Publishing Co., Seoul, Korea. p 129-132.
4. Hanlam E. 1981. Vegetable tannins. In *Biochemistry of plants*. Stumpf PK, Comm EE, eds. Academic Press, NY. p 527-539.
5. Nose M, Fujino N. 1982. Antioxidant activities of some vegetable food and active component of avocado epicarp. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 29: 507-512.
6. Seo JH, Jeong YJ, Kim KS. 2000. Physiological characteristics of tannins isolated from astringent persimmon fruits. *Korea J Food Sci Technol* 32: 212-217.
7. Moon SH, Kim KH, Park KY. 1996. Antitumor effect of persimmon leaves in vivo using sarcoma-180 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25: 865-870.
8. Ma J, Liu XY, Noh KH, Kim MJ, Song YS. 2007. Protective effects of persimmon leaf and fruit extracts against acute ethanol-induced hepatotoxicity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 12: 202-208.

9. Kim ES, Kim MK. 1999. Effect of dried leaf powders and ethanol extracts of persimmon, green tea and pine needle on lipid metabolism and antioxidative capacity in rats. *Korean J Nutr* 32: 337-352.
10. Ham YJ, Park YM. 2003. Evaluation of astringency removal process in carbon dioxide flushing system and storability of 'Sagoksi' persimmon fruits. *J Kor Soc Hort Sci* 44: 417-421.
11. Joung SY, Lee SJ, Sung NJ, Jo JS, Kang SK. 1995. The chemical composition of persimmon leaf tea. *J Korean Soc Food Nutr* 24: 720-726.
12. Song HS, Lee HK, Jang HD, Kim JI, Park OJ, Lee MS, Kang MH. 1996. Antimutagenic effects of persimmon leaf tea extracts in sister chromatid exchange (SCE) assay system. *J Korean Soc Food Nutr* 25: 232-239.
13. Moon SH, Park KY. 1995. Antimutagenic effects of boiled water extract and tannin from persimmon leaves. *J Korean Soc Food Nutr* 24: 880-886.
14. Park YJ, Kang MH, Kim JI, Park OJ, Lee MS, Jang HD. 1995. Changes of vitamin C and superoxide dismutase (SOD)-like activity of persimmon leaf tea by processing method and extraction condition. *Korean J Food Sci Technol* 27: 281-285.
15. Choi SW, Kang WW, Chung SK, Cheon SH, Rhuw TH. 1996. Antioxidative activity of flavonoids in persimmon leaves. *Foodtech* 5: 119-123.
16. Jeong HS, Chung HS, Lee HD, Seong JH, Choi JU. 2001. Controlled atmosphere storage and modified atmosphere packaging of astringency-removed persimmons. *Food Sci Biotechnol* 10: 380-386.
17. Kameda K, Takaku T, Okuda H, Kimura Y, Okuda T, Hatano T, Agata I, Arichi S. 1987. Inhibitory effects of various flavonoids isolated from leaves of persimmon on angiotensin converting enzyme activity. *J Nat Prod* 50: 680-683.
18. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299: 152-178.
19. Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71: 109-114.
20. Blois MS. 1977. Antioxidant determinations by the use of a stable free radicals. *J Agric Food Chem* 25: 103-107.
21. Slater TF, Sawyer BC. 1971. The stimulatory effects of carbon tetrachloride on peroxidative reactions in rat liver fractions in vitro. Interaction sites in the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 123: 805-821.
22. Gutierrez AM, Reboledo GR, Arcemis CJ, Catala A. 2000. Non-enzymatic lipid peroxidation of microsomes and mitochondria isolated from liver and heart of pigeon and rat. *Int J Biochem Cell Biol* 32: 73-79.
23. Okhawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.
24. Ogawa S, Fujieda S, Sakata Y, Ishizaki M, Hisamatsu S, Okazaki K, Ooki Y, Mori M, Itoh M, Korenaga T. 2004. Synthesis and glycosidase inhibitory activity of some N-substituted 5a-carba- $\beta$ -fuco- and  $\beta$ -galactopyranosylamines, and selected derivatives. *Bioorg Med Chem* 12: 6569-6579.
25. Gao H, Kawabata J. 2005.  $\alpha$ -Glucosidase inhibition of 6-hydroxyflavones. Part 3: Synthesis and evaluation of 2,3,4-trihydroxybenzoyl-containing flavonoid analogs and 6-aminoflavones as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Bioorg Med*

- Chem* 13: 1661-1671.
26. Cushman DW, Cheung HS. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol* 20: 1637-1648.
  27. Green LM, Reade JL, Ware CF. 1984. Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J Immunol Methods* 70: 257-268.
  28. Lee TB. 1979. *Illustrated Flora of Korea*. Hyangmoon Publishing Co., Seoul, Korea. p 511.
  29. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1198-1200.
  30. Ancerewicz J, Migliavacca E, Carrupt PA, Testa B, Bree F, Zini R, Tillement JP, Labidalle S, Guyot D, Chauvet-Monges AM, Crevat A, Le Ridant A. 1998. Structure-property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Radic Biol Med* 25: 113-120.
  31. Kang YH, Park YK, Oh SR, Mood KD. 1995. Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. *Korean J Food Sci Technol* 27: 978-984.
  32. Uchida S, Ohta H, Niwa M, Mori A, Nonaka G, Nishioka I, Ozaki M. 1990. Prolongation of life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) ingesting persimmon tannin. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 38: 1049-1052.
  33. Ito S, Oshima Y. 1962. Studies on the tannin of Japanese persimmon. *Agric Biol Chem* 26: 156-161.
  34. Torel J, Cillard J, Cillard P. 1986. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry* 25: 383-385.
  35. Josse RG, Chiasson JL, Ryan EA, Lau DC, Ross SA, Yale JF, Leiter LA, Maheux P, Tessier D, Wolever TM, Gerstein H, Rodger NW, Dornan JM, Murphy LJ, Rabasa-Lhoret R, Meneilly GS. 2003. Acarbose in the treatment of elderly patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 59: 37-42.
  36. Matsui T, Ueda T, Oki T, Sugita K, Terahara N, Matsumoto K. 2001.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 1. Survey of natural pigments with potent inhibitory activity. *J Agric Food Chem* 49: 1948-1951.
  37. Quesada C, Bartolome B, Nieto O, Gomez-Cordoves C, Hernandez T, Estrella I. 1995. Phenolic inhibitors of  $\alpha$ -amylase and trypsin enzymes by extracts from pears, lentils and cocoa. *J Food Prot* 59: 185-192.
  38. Gyemant G, Zajacz A, Batta G. 2004. Inhibitory effects of tannin on human salivary  $\alpha$ -amylase. *Biochem Biophys Res Commun* 319: 1265-1271.
  39. Lee WY, Ahn JK, Park YK, Park SY, Kim YM, Rhee HI. 2004. Inhibitory effects of proanthocyanidin extracted from *Distylium racemosum* on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activities. *Kor J Pharmacogn* 35: 271-275.
  40. Noh H, Song KB. 2001. Isolation of an angiotensin converting enzyme inhibitor from *Oenathe javanica*. *Agric Chem Biotechnol* 44: 98-99.
  41. Oh SJ, Kim SH, Kim SK, Baek YJ, Cho KH. 1997. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the K-casein fragments hydrolyzated by chymosin, pepsin, and trypsin. Fractionation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from soybean paste. *Korean J Food Sci Technol* 27: 230-234.
  42. Funayama S, Hikino H. 1979. Hypotensive principles of *Diospyros kaki* leaves. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 27: 2865-2868.
  43. Hibasami H, Achiwa Y, Fujikawa T, Komiya T. 1996. Induction of programmed cell death (apoptosis) in human lymphoid leukemia cells by catechin compounds. *Anticancer Res* 16: 1943-1946.
  44. Nose K. 1984. Inhibition of flavonoids of RNA synthesis in permeable WI-38 cells and of transcription by RNA polymerase II. *Biochem Pharmacol* 33: 3823-3837.
  45. Moon SH. 2002. Inhibitory effect of persimmon leaves on the mutagenicity in spore rec assay and on the growth of human cancer cells. *Korean J Food & Nutr* 15: 23-28.
  46. Ueda S, Yamashita H, Nakajima M, Kuwabara Y. Inhibition of microorganism by spice extracts and flavoring compounds. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 29: 389-392.
  47. Kim MH, Lee NH, Lee MH, Kwon DJ, Choi UK. 2007. Antimicrobial activity of aqueous ethanol extracts of *Perilla frutescens* var. *acuta* leaf. *Korean J Food Culture* 22: 266-273.

(2008년 5월 19일 접수; 2008년 7월 28일 채택)