

## 청도반시(*Diospyros kaki* Thunb. cv. Cheongdo-Bansi) 탈삼 껍질 추출물의 산화스트레스로부터 PC-12 신경세포 보호 효과

정다울 · 조치홍 · 라찬수 · 이승환<sup>1</sup> · 김대옥\*  
경희대학교 식품생명공학과, <sup>1</sup>경일대학교 식품산업융합학부

### Neuroprotective effects of astringency-removed peel extracts of *Diospyros kaki* Thunb. cv. Cheongdo-Bansi on oxidatively-stressed PC-12 cells

Da-Wool Jeong, Chi Heung Cho, Chan Su Rha, Seung Hwan Lee<sup>1</sup>, and Dae-Ok Kim\*

Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Hee University

<sup>1</sup>School of Food Science and Industry, Kyungil University

**Abstract** Astringent persimmon (*Diospyros kaki* Thunb. cv. Cheongdo-Bansi) peel with the astringency removed, which is a by-product of dried persimmon (*gotgam*), was investigated for its antioxidant and neuroprotective properties. A mixture of peel and 40% (v/v) aqueous ethanol was subjected to ultrasonication and then thermal and nonthermal treatments, to produce thermally-treated and nonthermally-treated persimmon peel extracts (TPE and NTPE, respectively). The total phenolic and flavonoid contents and the antioxidant capacity of TPE was approximately 1.3-1.8 times higher than those of NTPE. TPE resulted in the increased viability of neuronal PC-12 cells compared with NTPE. Furthermore, intracellular oxidative stress in PC-12 cells was more decreased by treatment with TPE than NTPE. Cholinesterases, such as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, were more inhibited by treatment with TPE than NTPE. These results suggest that TPE is useful as a functional material to decrease oxidative stress in neuronal cells and to inhibit cholinesterases.

**Keywords:** acetylcholinesterase, astringent persimmon, butyrylcholinesterase, removal of astringency, vitamin C equivalents

## 서 론

활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 생체 내에서 세포의 정상적인 신진대사를 통해서 뿐만 아니라, 자외선 등 여러 외적 요인에 의해 생성된다(1). 활성산소로는 초과산화물(superoxide), 과산화수소(hydrogen peroxide), 일중항산소(singlet oxygen), 수산화 라디칼(hydroxyl radical) 등이 존재한다. 활성산소로부터 발생하는 산화스트레스(oxidative stress)는 단백질 변성, 지질과산화, DNA 손상, 효소 불활성화 등을 유발하고 세포 괴사나 세포 자살을 유도하여 결국에는 류마티스, 암, 노화 유발 및 알츠하이머 병과 같은 퇴행성 신경질환을 유발하기도 한다(2). 생체 내 활성산소가 축적되는 것을 막기 위하여 산화방지제(antioxidant)에 대한 연구는 꾸준히 증가하고 있는 추세이다. 비교적 인체에 대한 부작용과 독성이 없는 식물 유래 소재로부터 천연 산화방지제 발굴에 대한 관심이 더 높아지고 있다(3,4).

감(*Diospyros kaki*)은 감나무과에 속하는 과일로 동아시아 지역, 그 중에서도 한국, 일본, 중국 등지에서 주로 재배되고 있다. 감

은 예로부터 딸꾹질, 기침, 고혈압, 동상과 같은 질병에 약제로서 사용되어 왔다(5). 감에는 카로티노이드(carotenoid), 테르페노이드(terpenoid), 스테로이드(steroid), 나프토퀴논(naphthoquinones) 같은 다양한 생리활성물질들이 존재하며, 특히 페놀화합물(phenolics)로는 갈산(gallic acid), 탄닌(tannin), 카페산(caffeic acid), 클로로젠산(chlorogenic acid), 카테킨(catechin), 에피카테킨(epicatechin), 퀘서틴(quercetin), 프로토키테추익산(protocatechuic acid) 등이 알려져 있다(5,6).

감은 일반적으로 다 자란 과실의 짧은 맛의 정도에 따라 단감과 짧은 감으로 나뉘어진다(5). 우리나라에서 재배되는 재래종은 대부분이 짧은 감 품종이며, 단감 종류는 모두 일본으로부터 도입되었다. 재래종 짧은 감은 주로 껍질을 벗기고 과육만을 이용하여 꽃감의 형태로 가공한다. 이와 같은 과정에서 껍질은 많은 양의 부산물로 버려지고 있으나, 그 부산물로서 껍질에 대한 연구는 미비한 실정이다. 과일의 껍질 부분은 과육보다 더 높은 총 페놀 함량, 총플라보노이드 함량, 산화방지능을 갖는 것으로 알려져 있다(4,7,8). 꽃감 제조 시 부산물로서 버려지는 탈삼된 껍질은 새로운 기능성 소재로서의 가능성을 가지고 있으며, 이를 이용한다면 경제적 가치가 매우 클 것으로 기대한다.

가열과정을 거치게 되면 열반응에 의해서 페놀화합물과 같은 생리활성 물질들의 구조가 깨어지고, 산화방지 효과가 떨어진다(9,10). 하지만, 이와 대조적으로 오히려 가열과정을 통해서 산화방지능이 높아질 수 있다는 연구도 보고되고 있다(11,12). 식물체의 많은 페놀화합물들은 불용성 중합체와 함께 공유결합을 한 형태로 존재하고 있다(13). 식물체로부터 더 높은

\*Corresponding author: Dae-Ok Kim, Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin, Gyeonggi 17104, Korea  
Tel: +82-31-201-3796  
Fax: +82-31-204-8116  
E-mail: DOKIM05@khu.ac.kr  
Received May 9, 2017; revised June 8, 2017;  
accepted June 17, 2017

산화방지능을 얻기 위해서는 이러한 결합을 떼어내거나, 가열처리 공정을 통해 저분자 형태로 만들 필요가 있다(14-16). 그러므로, 본 연구에서는 짧은 감을 이용하여 꽃감을 만들어 내는 과정에서 생성되는 주요한 부산물인 탈삼된 껍질을 이용하여 가열처리 추출물과 비가열처리 추출물을 만들고, 총페놀 함량, 총플라보노이드 함량, 산화방지능을 측정하였다. 또한 PC-12 신경세포를 이용하여 산화스트레스에 의한 세포손상으로부터 신경세포 보호 효과 및 콜린가수분해효소(cholinesterase) 억제능을 평가하였다. 이를 통해 꽃감 제조 부산물인 탈삼된 껍질로부터 산화방지능을 토대로 한 신경세포 보호 소재 개발을 위한 기반을 마련하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약

폴린-시오칼토 페놀 시약(Folin & Ciocalteu's phenol reagent), 2,2'-azobis(3-ethyl-benz-thiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH), 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH), 바이타민 C, 갈산(gallic acid), 카테킨(catechin), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 다이메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), 인산완충식염수(phosphate buffered saline), 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine hydrochloride hydrate (tacrine), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 아세틸콜린가수분해효소(acetylcholinesterase, AChE), 부틸콜린가수분해효소(butrylcholinesterase, BChE), 아이오딘화아세틸콜린(acetylcholine iodide; ATCI), 염화부틸사이오콜린(butrylthiocholine chloride; BTCC)는 Sigma-Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, 우테아 혈청(fatal bovine serum, FBS), 돌베코의 인산완충식염수(Dulbecco's phosphate buffered saline; DPBS), 페니실린(penicillin), 스트렙토마이신(streptomycin), 트립신(trypsin)-EDTA는 Welgene Inc. (Daegu, Korea)에서 구입하였다.

### 추출

2015년 8월에 경상북도 청도군에서 수확한 청도반시를 꽃감을 만들기 위해 탈삼하고 부산물로 나오는 껍질을 냉동 건조 후 분쇄기(FM-909W, Hanil Electric, Seoul, Korea)를 이용하여 분쇄한 후 -20°C에서 보관하여 실험에 사용하였다. 냉동 건조한 껍질 0.5 g과 40% (v/v) 에탄올-물 혼합용액 50 mL를 각각 섞은 후 Polytron homogenizer (PT 10/35, Kinematica, Kriens-Luzern, Switzerland)를 이용하여 15,000 rpm에서 2분 동안 분쇄하였다. 분쇄한 껍질을 초음파발생기를 이용하여 10분 동안 처리하였다. 가열처리 껍질 추출물 제조를 위해 밀폐 용기에 넣고 90°C의 항온수조에서 1시간 동안 반응시킨 후 방냉하였으며, 비가열처리의 경우 1시간 동안 상온에 방치하였다. 그 후 원심분리기를 이용하여 2,200×g에서 10분 동안 원심분리하였다. 침전물을 상층액과 분리한 후, 동일한 방법으로 침전물을 1회 더 반복 추출을 하였으며, 추출물은 Whatman No. 2 (Whatman International Ltd., Kent, UK) 여과지를 이용하여 여과 후 회전식 진공농축기(Eyela, Tokyo, Japan)를 사용하여 40°C에서 감압농축하였다. 농축된 가열처리 및 비가열처리 감 껍질 추출물은 -20°C에 저장하며 실험에 사용하였다.

### 총페놀 함량 측정

총페놀 함량은 폴린-시오칼토 페놀 시약을 이용한 발색법(17)으로 다음과 같이 측정하였다. 추출물 200 µL에 증류수 2.6 mL와 폴린-시오칼토 페놀 시약 200 µL를 혼합하여 6분간 상온에서 반응시킨 후 7% (w/v) 탄산소듐(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 용액 2 mL를 첨가하고, 이후 84분 동안 정치시킨 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 총페놀 함량은 갈산을 사용하여 표준곡선을 작성한 후 정량 측정하였으며, mg 갈산 당량(gallic acid equivalents, GAE)/g dry weight (DW)로 나타내었다.

### 총플라보노이드 함량 측정

총플라보노이드 함량은 Kim 등(18)의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 탈삼된 감 껍질 추출물 0.5 mL에 증류수 3.2 mL와 5% (w/v) 아질산소듐(NaNO<sub>2</sub>) 150 µL를 혼합하여 5분간 반응시킨 뒤 10% (w/v) 염화알루미늄(AlCl<sub>3</sub>) 용액 150 µL를 첨가하여 1분간 더 반응시키고, 1 M 수산화소듐(NaOH) 용액 1 mL를 넣고 혼합하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 총플라보노이드 함량은 카테킨을 이용하여 표준곡선을 작성한 후 정량하였으며, mg 카테킨 당량(catechin equivalents, CE)/g DW로 나타내었다.

### 산화방지능 측정

산화방지능 측정은 라디칼 소거능에 기반한 ABTS법과 DPPH법을 이용하였다. ABTS법을 이용한 산화방지능은 Kim 등(19)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 인산완충식염수 100 mL에 AAPH (1.0 mM)와 ABTS (2.5 mM)를 넣고, 70°C 항온수조에서 ABTS 라디칼 용액을 만들었다. 인산완충식염수를 이용하여 734 nm에서 0.650±0.020의 흡광도로 희석한 ABTS 라디칼 용액 980 µL와 추출물 20 µL를 혼합하고, 37°C에서 10분간 반응 후, 734 nm에서 흡광도 감소를 측정하였다. 산화방지능은 바이타민 C의 표준곡선을 이용하여 정량하였고, mg 바이타민 C 당량(vitamin C equivalents, VCE)/g DW로 나타내었다.

DPPH 라디칼을 이용한 산화방지능은 Brand-Williams 등(20)의 방법을 변형하여 측정하였다. 80% (v/v) 메탄올-물 혼합용액을 사용하여 100 µM의 DPPH 용액을 제조한 후, 517 nm에서 0.650±0.020의 흡광도로 희석하였다. 추출물 50 µL에 DPPH 라디칼 용액 2.95 mL를 첨가하여 23°C에서 30분간 반응시킨 후, 흡광도를 측정하였다. 산화방지능은 mg VCE/g DW로 나타내었다.

### 세포 배양

본 실험에 사용한 PC-12 신경세포는 쥐의 부신 수질(adrenal medulla)의 갈색세포종(pheochromocytoma) 유래의 세포주로, American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포배양을 위하여 사용한 배지는 RPMI 1640 배지에 10% 열불활성 FBS, 100 unit/mL 페니실린, 100 µg/mL 스트렙토마이신을 첨가하여 사용하였고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기(CO<sub>2</sub> incubator BB 15, Thermo Electron LED GmbH, Langensfeld, Germany)에 배양하여 사용하였다.

### 신경세포 보호능 측정

탈삼한 감 껍질로부터 얻어진 추출물의 PC-12 세포에 대한 무해한 농도를 결정하고, 그에 따른 신경세포 보호능을 평가하기 위해서 MTT법을 이용하였다(21). 추출물의 독성평가를 위해 96-

well plate에  $2.0 \times 10^4$  cell/well로 100  $\mu$ L 분주하여 6시간 배양하였다. 가열처리와 비가열처리를 이용하여 추출한 각각의 추출물은 31.25, 62.5, 125, 250, 500 및 1,000  $\mu$ g/mL의 농도로 분주하여 24시간 동안 처리하였다. 이후 MTT 100  $\mu$ L을 첨가하고 3시간 동안 반응시킨 후, 50  $\mu$ L의 다이메틸설폭사이드를 이용하여 보라색의 포마잔(formazan)을 용해시켜 마이크로플레이트 판독기(microplate reader, Infinite M200, Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물의 독성은 대조군(control)의 세포생존율 대비 80% 이상의 생존율을 보이는 농도로 설정하였다.

탈삼한 감 껍질 추출물의 신경세포 보호 효과 평가를 위해서 위와 같은 방법으로 세포를 배양하고, PC-12 신경세포에 독성이 없는 최대 농도까지 추출물을 처리한 후, 150  $\mu$ M의  $H_2O_2$ 를 1시간 동안 처리하여 산화스트레스를 유발하였다. 이후 MTT를 처리하고 3시간 동안 반응시킨 후, 다이메틸설폭사이드를 이용하여 포마잔을 용해하고 마이크로플레이트 판독기(Infinite M200)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 대조군과 비교하여 백분율(%)로 나타내었으며, 독립적으로 3반복을 실시하였다.

#### 세포 내 산화스트레스 측정

세포 내 산화스트레스 측정은 DCFH-DA를 이용한 형광탐침법(fluorescence probe method)을 사용하였다. PC-12 세포는 96-well plate에  $2.0 \times 10^4$  cell/well로 분주하여 6시간 배양하였다. 이후 가열처리 및 비가열처리 감 껍질 추출물을 다양한 농도로 분주하여 24시간 동안 더 배양한 뒤, 50  $\mu$ M DCFH-DA를 세포에 1시간 동안 처리하였다. 이어 산화스트레스 유발을 위해 30  $\mu$ M AAPH를 첨가하고 1시간 후에 마이크로플레이트 판독기(Infinite M200)를 이용하여 들뜸(excitation)은 485 nm, 방출(emission)은 530 nm에서 측정하였다. 세포 내 산화스트레스는 대조군과 비교하여 백분율(%)로 나타내었으며, 독립적으로 3반복을 실시하였다.

#### AChE 및 BChE 억제능

콜린가수분해효소 억제능은 AChE와 BChE를 이용하여 측정하였다. AChE 억제능 평가를 위해서 추출물 20  $\mu$ L에 인산완충염수 150  $\mu$ L, 10 mM의 DTNB 30  $\mu$ L, 15 mM의 ATCI 20  $\mu$ L를 첨가하고 37°C에서 10분간 반응시켰다. 이어 AChE (0.2 U/mL) 20  $\mu$ L를 첨가한 뒤 37°C에서 30분간 반응시켜 마이크로플레이트 판독기(Infinite M200)를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 반면, BChE 억제능은 AChE 억제능에서 사용한 조건에서 ATCI 대신에 BTCC (10 mM)를 20  $\mu$ L를 첨가하고, AChE 대신에 BChE (0.06 U/mL)를 20  $\mu$ L를 첨가하여 실험하였다. 탈삼한 감 껍질 추출물의 AChE 및 BChE 억제능은 3반복 실험 후 nM 타크린 당량(nM tacrine equivalents)을 사용하여 정량하였다.

#### 통계분석

모든 추출 및 정량 분석은 3회 반복하여 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. 통계분석은 SPSS 프로그램(ver. 23.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였다. 각 평균값의 차이를 검증하기 위하여 ANOVA 분석을 실시하였고,  $p < 0.05$  유의수준에서 스튜던트의  $t$  검정(student's  $t$ -test)과 던컨의 다중검정(Duncan's multiple range test)으로 유의차를 검증하였다.

## 결과 및 고찰

#### 총페놀 및 총플라보노이드 함량

탈삼한 감 껍질을 가열처리하여 얻은 추출물(thermally-treated persimmon peel extracts, 이하 TPE)의 총페놀 함량은 비가열처리 탈삼 감 껍질 추출물(nonthermally-treated persimmon peel extracts, 이하 NTPE)에 비해서 약 1.5배 높았고, 총플라보노이드 함량은 약 1.3배 높았다(Table 1). Kim 등(22)은 가열처리한 감(*Diospyros kaki* L.) 껍질의 물 및 70% 에탄올 추출물이 비가열처리한 것에 비해서 총페놀 함량은 유의적으로 증가한다고 보고하였다. Lee와 Lee(16)는 단감(*Diospyros kaki* cv. Fuyu) 주스에서 열처리 온도가 올라갈수록 총페놀 함량이 증가한다고 보고하였다. 또한, 가열처리에 의해 사과, 토마토 등의 과일과 채소의 총페놀 및 총플라보노이드 함량이 증가한다고 보고되었다(23). NTPE와 비교하여 TPE에서 총페놀과 총플라보노이드 함량의 증가는 감 껍질에 존재하는 고분자 페놀화합물이 열처리 과정 중에 분해되어 저분자 페놀화합물로 전환되었기 때문으로 여겨진다.

#### 산화방지능

ABTS법과 DPPH법을 이용하여 탈삼한 감 껍질 추출물의 산화방지능을 측정한 결과는 Table 1과 같다. ABTS법을 이용한 산화방지능은 TPE가 NTPE에 비해 약 1.8배 높았다. 한편, DPPH법을 이용한 산화방지능은 TPE가 NTPE에 비해서 약 1.6배 높았다. 본 연구의 총페놀 및 총플라보노이드 함량의 결과와 유사하게, NTPE에 비해서 TPE에서 산화방지능이 더 높은 경향을 보였다. Kim 등(22)은 산화방지능이 비가열처리 감(*Diospyros kaki* L.) 껍질 추출물에 비해서 가열처리한 것에서 유의적으로 증가한다고 보고하였다. Lee와 Lee(16)는 열처리 온도와 시간이 단감 주스의 산화방지능 및 산화방지제 함량에 영향을 미치는 것으로 보고하였다. 감귤류인 *Citrus paradisi* Changshan Huyou의 껍질을 열처리를 했을 때 비열처리에 비해 산화방지능이 증가하였고, 이는 열처리 과정에서 벤조산(benzoic acid) 유도체, 계피산(cinnamic acid) 유도체와 같은 유리 페놀산(free phenolic acids)의 증가에 기인한 것으로 보고되었다(24).

**Table 1. Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant capacity of astringency-removed peel of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb. cv. Cheongdo-Bansi)**

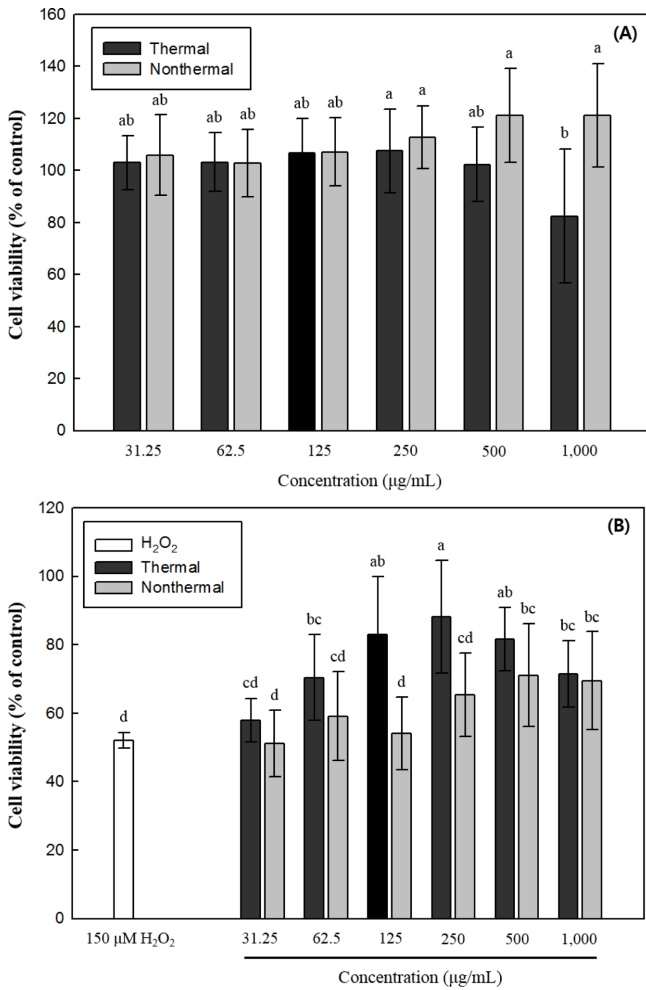
Total phenolic content (mg gallic acid equivalents/g dry weight)		Total flavonoid content (mg catechin equivalents/g dry weight)		Antioxidant capacity (mg vitamin C equivalents/g dry weight)			
				ABTS <sup>1)</sup>		DPPH <sup>2)</sup>	
Thermal	Nonthermal	Thermal	Nonthermal	Thermal	Nonthermal	Thermal	Nonthermal
22.2 $\pm$ 0.5 <sup>3)4)</sup>	14.4 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	12.5 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	9.9 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	45.7 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	26.0 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	12.4 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	7.6 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>ABTS radical scavenging assay

<sup>2)</sup>DPPH radical scavenging assay

<sup>3)</sup>Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (n=3).

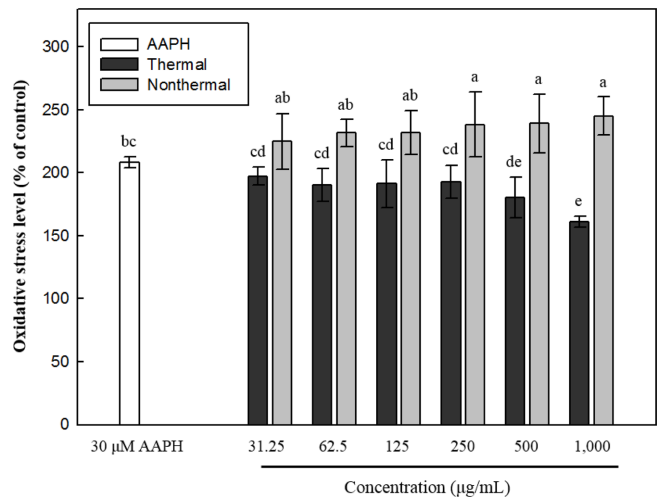
<sup>4)</sup>The different superscripts between thermal and nonthermal groups in each assay indicate the significant difference by Student's  $t$ -test ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 1.** Cytotoxic (A) and protective (B) effects of thermally- and nonthermally-treated extracts from astringency-removed peels of *Diospyros kaki* Thunb. cv. Cheongdo-Bansi on neuronal PC-12 cells against oxidative stress induced with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> using the MTT assay. Different letters indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) based on Duncan's multiple range test.

**신경세포 보호 효과**

신경세포인 PC-12를 이용하여 각 탈삼한 감 껍질 추출물의 세포 독성을 확인한 결과, 가열처리 및 비가열처리 추출물 모두 1,000 µg/mL까지 약 80% 이상의 세포 생존율을 보여 세포 독성이 없었다(Fig. 1A). 따라서 이후 실험은 1,000 µg/mL의 농도까지 진행하였다. 과산화수소를 이용하여 인위적으로 산화스트레스를 유도하였을 때, 세포 생존율은 대조군(control)에 비해 약 52% 정도로 감소하였다(Fig. 1B). 각각의 추출물을 다양한 농도로 처리하였을 때, 세포 생존율이 증가하였다(Fig. 1B). TPE는 250 µg/mL의 농도에서 최대 약 88%의 세포 생존율을 보였고, NTPE의 경우 500 µg/mL의 농도에서 최대 약 71%의 세포 생존율을 보였다. TPE가 NTPE보다 더 저농도에서 산화스트레스로부터 신경세포를 보호하였다. Lee 등(25)은 단감 껍질 추출물이 꼭지나 과육 추출물보다 더 N18-RE-105 신경세포의 생존율을 높인다고 보고하였다. 또한 감 껍질 추출물이 허혈유도 신경세포 손상으로부터 산화방지 작용을 통해 PC-12 신경세포를 보호한다고 보고되었다(26). 따라서, 탈삼한 감 껍질 추출물은 과산화수소로 유도된 산화스트레스에 대하여 껍질에 존재하는 페놀화합물 같은 산화방



**Fig. 2.** Effects of thermally- and nonthermally-treated extracts from astringency-removed peels of *Diospyros kaki* Thunb. cv. Cheongdo-Bansi on intracellular oxidative stress in neuronal PC-12 cells using the DCFH-DA assay. Different letters indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) based on Duncan's multiple range test.

지에 의해서 신경세포를 보호하는 것으로 여겨진다.

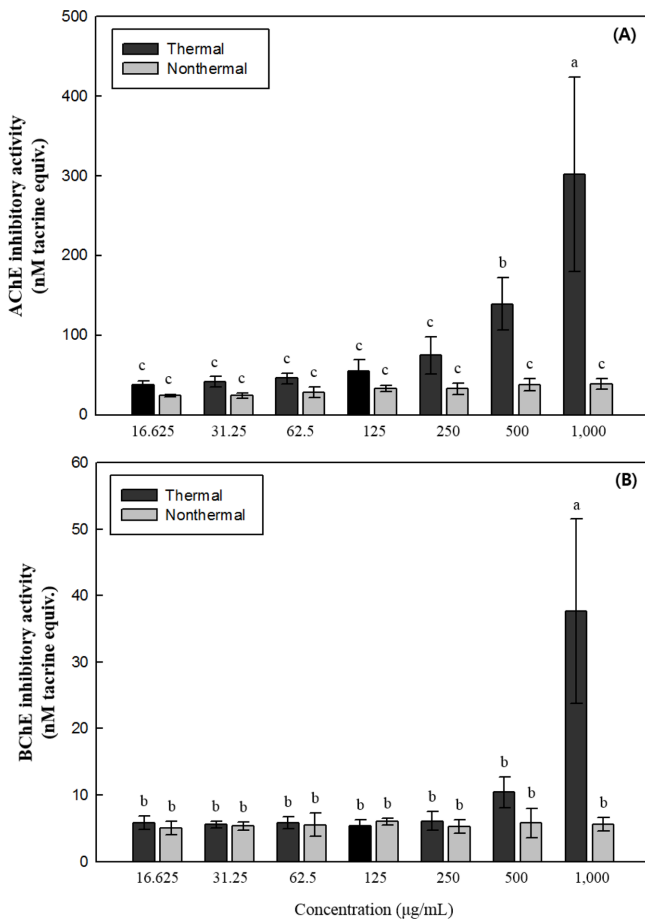
**세포 내 산화스트레스 완화**

TPE와 NTPE의 세포 내 산화스트레스에 대한 영향을 DCFH-DA법을 이용하여 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 산화스트레스를 유발하는 AAPH를 처리하지 않은 대조군과 비교하여, AAPH 처리한 한 군에서 세포 내 산화스트레스 수준은 약 200%까지 증가하였다. 1,000 µg/mL의 TPE 처리에서 세포 내 산화스트레스는 대조군 대비 약 160% 수준까지 감소하였다. 감 껍질에 있는 페놀화합물인 프로시아니딘(procyanidin)은 과산화수소로 유발된 산화스트레스로부터 TIG-1 섬유아세포를 보호하여 세포 노화를 억제한다고 보고되었다(27). 폴리페놀(polyphenol)로서 프로시아니딘은 비타민 C보다 더 높은 산화방지능을 갖는다고 보고되었다(28). TPE가 NTPE보다 세포 내 산화스트레스 감소에 더 효과적인 것은 가열처리 과정 중에 페놀화합물과 같은 산화방지능 보유 성분들이 더 용출되었기 때문일 것으로 여겨진다.

**AChE 및 BChE 저해능**

체내에는 AChE와 BChE가 있다. AChE는 뇌에 존재하는 주된 콜린가수분해 효소이며, BChE 활성은 알츠하이머형 치매에서 점진적으로 증가하는 것으로 알려졌다(29). 이들 효소는 아세틸콜린(acetylcholine)을 콜린(choline)과 아세테이트(acetate)로 분해하여 신경전달을 종결하는 역할을 한다. 알츠하이머 치매 환자의 경우, 이러한 콜린가수분해효소를 억제함으로써 신경전달물질이 좀더 오래 시냅스 간극에 존재하도록 하여 신경전달을 더 지속시킬 필요가 있다.

AChE에 대한 TPE와 NTPE의 억제능은 Fig. 3A와 같다. NTPE의 경우 평균적으로 약 30 nM 타크린 당량을 나타냈으며, 추출물 농도에 따른 농도 의존적인 결과는 보이지 않았다. 반면 TPE에서는 16.625 µg/mL부터 1,000 µg/mL까지 AChE 저해능이 증가하는 경향이 나타났으며, 1,000 µg/mL에서 301.7 nM 타크린 당량을 나타냈다(Fig. 3A). 이는 NTPE보다 TPE가 AChE의 활성을 더 저해한다는 것을 보여준다.



**Fig. 3. Inhibitory effects of thermally- and nonthermally-treated extracts from astringency-removed peels of *Diospyros kaki* Thunb. cv. Cheongdo-Bansi on acetylcholinesterase (A) and butyrylcholinesterase (B) activities.** Different letters indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) based on Duncan's multiple range test.

Fig. 3B는 TPE와 NTPE의 처리에 의한 BChE 활성 억제능을 보여주고 있다. 다양한 농도의 NTPE 처리에서 BChE 활성 억제능은 약 5 nM 타크린 당량을 나타내었다. 하지만 TPE 1,000 µg/mL 농도를 처리하였을 때 37.6 nM 타크린 당량으로 가장 높은 BChE 활성 억제능을 나타냈다(Fig. 3B). 탈삼 감 껍질 추출물이 AChE 활성을 저해하는 것과 마찬가지로 BChE 활성을 어느 정도 저해하는 것으로 나타났다. TPE 처리가 NTPE 처리와 비교하여 더 높은 억제능을 가지는 것을 확인하였다.

## 요 약

본 연구에서는 짧은 감인 청도반시(*Diospyros kaki* Thunb. cv. Cheongdo-Bansi)를 탈삼하여 껍감으로 만드는 과정 중에 다량의 부산물로 생겨나는 감 껍질을 활용하고자 산화방지능 및 신경세포 보호능을 평가하였다. 탈삼한 감 껍질을 40% (v/v) 에탄올-물 혼합용액을 사용하여 초음파 추출을 한 후에, 가열처리와 비가열처리 방법을 이용하여 각각의 추출물을 확보하였다. 가열처리한 추출물이 비가열처리로 얻어진 것에 비해서 총페놀 함량, 총플라보노이드 함량, 산화방지능에서 약 1.3-1.8배 더 높았다. 비가열처리 추출물과 비교하여, 가열처리한 것이 PC-12 신경세포의 생존율을 더 높이고, 세포 내 산화스트레스를 좀 더 완화하였다. AChE

와 BChE 억제능 역시 가열처리한 추출물이 비가열처리로 얻은 추출물보다 더 높았다. 이러한 결과들은 산화방지능을 보유하며 콜린가수분해효소를 억제하는 기능성 소재 발굴을 위한 탈삼 감 껍질 추출물 활용 가능성을 보여준다.

## 감사의 글

본 연구는 산림청(한국임업진흥원) 산림과학기술 연구개발사업(과제번호: 2016017D10-1719-AB02)의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

## References

- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.* 5: 9-19 (2012)
- Gupta RK, Patel AK, Shah N, Choudhary AK, Jha UK, Yadav UC, Gupta PK, Pakuwal U. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: A review. *Asian Pac. J. Cancer P.* 15: 4405-4409 (2014)
- Sung NY, Song H, Ahn DH, Yoo YC, Byun EB, Jang BS, Park C, Park WJ, Byun EH. Antioxidant and neuroprotective effects of green tea seed shell ethanol extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 45: 958-965 (2016)
- Lee I, Lee BH, Eom SH, Oh C-S, Kang H, Cho Y-S, Kim D-O. Antioxidant capacity and protective effects on neuronal PC-12 cells of domestic bred kiwifruit. *Korean J. Hort. Sci. Technol.* 33: 259-267 (2015)
- Yaqub S, Farooq U, Shafi A, Akram K, Murtaza MA, Kausar T, Siddique F. Chemistry and functionality of bioactive compounds present in persimmon. *J. Chem.* 2016: 3424025 (2016)
- Butt MS, Sultan MT, Aziz M, Naz A, Ahmed W, Kumar N, Imran M. Persimmon (*Diospyros kaki*) fruit: Hidden phytochemicals and health claims. *EXCLI J.* 14: 542-561 (2015)
- Park J-H, Lee M, Park E. Antioxidant activity of orange flesh and peel extracted with various solvents. *Prev. Nutr. Food Sci.* 19: 291-298 (2014)
- Kim H, Moon JY, Kim H, Lee D-S, Cho M, Choi H-K, Kim YS, Mosaddik A, Cho SK. Antioxidant and antiproliferative activities of mango (*Mangifera indica* L.) flesh and peel. *Food Chem.* 121: 429-436 (2010)
- Lee DJ, Lee H, Lee S-H, Lee CY, Kim D-O. Effects of jam processing on anthocyanins and antioxidant capacities of *Rubus coreanus* Miquel berry. *Food Sci. Biotechnol.* 22: 1607-1612 (2013)
- Sharma K, Ko EY, Assefa AD, Ha S, Nile SH, Lee ET, Park SW. Temperature-dependent studies on the total phenolics, flavonoids, antioxidant activities, and sugar content in six onion varieties. *J. Food Drug Anal.* 23: 243-252 (2015)
- Juániz I, Ludwig IA, Huarte E, Pereira-Caro G, Moreno-Rojas JM, Cid C, de Peña M-P. Influence of heat treatment on antioxidant capacity and (poly)phenolic compounds of selected vegetables. *Food Chem.* 197: 466-473 (2016)
- Choi Y, Lee SM, Chun J, Lee HB, Lee J. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chem.* 99: 381-387 (2006)
- Shahidi F, Yeo JD. Insoluble-bound phenolics in food. *Molecules* 21: 1216 (2016)
- Lee S-C, Moon J-S, Kim S-Y, Park H-R, Nam KC, Ahn DU. Effect of far-infrared radiation and heat treatment on the antioxidant activity of water extracts from peanut hulls. *Food Chem.* 94: 489-493 (2006)
- Jeong S-M, Kim S-Y, Kim D-R, Jo S-C, Nam KC, Ahn DU, Lee S-C. Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from Citrus peels. *J. Agr. Food Chem.* 52: 3389-3393 (2004)
- Lee D-W, Lee S-C. Effect of heat treatment condition on the antioxidant and several physiological activities of non-astringent

- persimmon fruit juice. Food Sci. Biotechnol. 21: 815-822 (2012)
17. Singleton VL, Rossi JA, Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic. 16: 144-158 (1965)
  18. Kim D-O, Jeong SW, Lee CY. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. Food Chem. 81: 321-326 (2003)
  19. Kim D-O, Lee KW, Lee HJ, Lee CY. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. J. Agr. Food Chem. 50: 3713-3717 (2002)
  20. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Sci. Technol. 28: 25-30 (1995)
  21. Heo H-J, Cho H-Y, Hong B, Kim H-K, Kim E-K, Kim B-G, Shin D-H. Protective effect of 4',5-dihydroxy-3',6,7-trimethoxyflavone from *Artemisia asiatica* against A $\beta$ -induced oxidative stress in PC12 cells. Amyloid 8: 194-201 (2001)
  22. Kim S-Y, Jeong S-M, Kim S-J, Jeon K-I, Park E, Park H-R, Lee S-C. Effect of heat treatment on the antioxidative and antigenotoxic activity of extracts from persimmon (*Diospyros kaki* L.) peel. Biosci. Biotechnol. Biochem. 70: 999-1002 (2006)
  23. Kim H-Y, Woo K-S, Hwang I-G, Lee Y-R, Jeong H-S. Effects of heat treatments on the antioxidant activities of fruits and vegetables. Korean J. Food Sci. Technol. 40: 166-170 (2008)
  24. Xu G, Ye X, Chen J, Liu D. Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of Citrus peel extract. J. Agr. Food Chem. 55: 330-335 (2007)
  25. Lee M-R, Moon S-H, Choi A-R, Lee S-C, Ahn K-H, Park H-R. Neuroprotective effects of extracts from *Diospyros kaki* L. peel. Korean J. Food Cook. Sci. 27: 67-73 (2011)
  26. Forouzanfar F, Torabi S, Askari VR, Asadpour E, Sadeghnia HR. Protective effect of *Diospyros kaki* against glucose-oxygen-serum deprivation-induced PC12 cells injury. Adv. Phar. Sc. 2016: 3073078 (2016)
  27. Lee YA, Cho EJ, Yokozawa T. Protective effect of persimmon (*Diospyros kaki*) peel proanthocyanidin against oxidative damage under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cellular senescence. Biol. Pharm. Bull. 31: 1265-1269 (2008)
  28. Floegel A, Kim D-O, Chung SJ, Song WO, Fernandez ML, Bruno RS, Koo SI, Chun OK. Development and validation of an algorithm to establish a total antioxidant capacity database of the US diet. Int. J. Food Sci. Nutr. 61: 600-623 (2010)
  29. Greig NH, Lahiri DK, Sambamurti K. Butyrylcholinesterase: An important new target in Alzheimer's disease therapy. Int. Psychogeriatr. 14: 77-91 (2002)