



구아바 가지 추출물의 생리활성 및 간세포 보호 효과

전아영 · 김나은 · 천원영 · 김영화*
경성대학교 식품응용공학부

Biological Activity and Hepatoprotective Effects of Guava Branch Extract

Ahyeong Jeon, Naeun Kim, Wonyoung Cheon, Younghwa Kim*
School of Food Biotechnology and Nutrition, Kyung Sung University

Abstract

This study evaluated the biological activity and cytoprotective effect of guava (*Psidium guajava* L.) branch against oxidative stress. The contents of vitamin C, beta-carotene, total carotenoids, quercetin and catechin determined were 26.783, 43.676, 65.083, 58.245, and 8.309 mg/100 g, respectively. To measure antioxidant activity, the guava branch was extracted using various concentrations of ethanol (60, 80, or 100%) and water. The highest content of polyphenols (0.245 mg gallic acid equivalent/mg residue) and flavonoids (0.128 mg catechin equivalent/mg residue) was found in the 100% ethanol extract of the branch (E100). Moreover, E100 also possessed the highest radical scavenging activities and showed the highest inhibition rate of α -glucosidase (77.692%). E100 was the most effective extract to impart cytoprotectant activity against oxidative stress in HepG2 cells. Taken together, our results determine the promising antioxidant activity of guava branch, and indicate the potential to be applied as a natural antioxidant.

Key Words : Guava branch, functional component, antioxidant activity, α -glucosidase inhibition, hepatoprotective effect, antioxidant

1. 서 론

체내에서 발생하는 산소 부산물인 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 세균이나 이물질로부터 인체를 방어하는 역할을 하는 필수적인 물질이다(Beckman & Ames 1998; Bayr 2005). 그러나 ROS가 과량으로 발생하면 슈퍼옥사이드 라디칼(superoxide radical, $\cdot O_2^-$), 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2), 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical, $\cdot OH$) 등과 같은 자유 라디칼을 형성하고 산화적 스트레스를 유발한다(Lee et al. 2016). 산화적 스트레스가 유지되면 DNA 및 RNA 변성, 지질과산화 등을 촉진하여 동맥경화를 비롯한 당뇨병, 간 기능 저하 등을 야기하는 것으로 알려져 있다(Lee et al. 2006). 산화적 스트레스를 일으키는 대표적인 물질인 *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP)는 세포 내에서 활성산소종을 생성하여 DNA를 손상시켜 세포사멸을 초래하기 때문에 간세포의 산화적 손상을 일으키는 요인으로 실험에 사용되고 있다(Rush et al. 1985; Radi et al. 1991; Jung 2003; Kucera et al. 2014). 이와 같은 산화적 스트레스로부터 생체 내 세포의 손상을 최소화하거나 방어

하는 작용을 하는 물질을 항산화제라고 하며, 항산화 효소와 항산화제 등으로 구성되어 있다. 널리 알려진 항산화제로는 catalase, glutathione peroxidase, 비타민 C, carotenoids, flavonoid 등이 있다(Castro & Freeman 2001).

최근 만성질환 환자가 증가하면서 천연 식물자원으로부터 항산화물질을 찾고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 천연 식물은 예로부터 여러 가지 민간요법으로 사용되면서 효능이 검증되었으며, 식물자원을 활용한 질병 예방 및 치료 작용에 대한 연구가 이루어지고 있는 추세이다(Hong 2013). 구아바(*Psidium guajava* L.)는 도금양목 도금양과(Myrtaceae)에 속하는 쌍떡잎식물로 열대 및 아열대 지방에 널리 분포하는 아열대 작물로 알려져 있다(Begum et al. 2002; Gutiérrez et al. 2008). 예로부터 구아바의 잎, 과실, 뿌리는 위장질환 및 당뇨의 치료를 위해 민간법으로 널리 사용되고 있다(Keji 1981; Lozoya et al. 2002). 구아바 잎에는 항산화 효과가 있는 플라보노이드, 탄닌과 같은 화합물이 다량 함유된 것으로 보고되어 있으며(Tanaka et al. 1992), 과실에는 myricetin, ellagic acid, anthocyanin 등의 페놀성 화합물과 비타민 C, carotenoid 등의 함량이 높은 것으로 나타나 있다(Misra &

*Corresponding author: Younghwa Kim, School of Food Biotechnology and Nutrition, Kyung Sung University, Busan, 48434, Republic of Korea
Tel: +82-51-663-4652, Fax: +82-51-622-4986, E-mail: younghwakim@ks.ac.kr

Seshadri 1968; Mercadante et al. 1999; Mican & Mohamed 2001). 그뿐만 아니라 구아바 가지와 잎의 에탄올 추출물은 그람 양성균에 대한 높은 항균 활성을 가짐을 보고한 바 있다(Jo et al. 2009). 이처럼 구아바의 잎, 열매 등을 이용한 항산화 활성 효과에 대한 연구 결과는 보고된 바 있으나 구아바 가지를 이용한 생리활성에 대한 정보는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서 구아바 가지에 함유된 기능성 성분의 함량을 알아보고, 추출물을 제조하여 항산화 활성과 간세포에서의 항산화 효과를 알아보고자 하였다.

II. 연구내용 및 방법

1. 재료 및 시약

구아바 가지는 충북 음성군 한국 구아바 경원농장으로부터 2018년 5월에 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 catechin, dimethyl sulfoxide (DMSO), sodium chloride, 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), Folin-ciocalteu's reagents, 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT), α - α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH), *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP)는 Sigma사(Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), trypsin EDTA, fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin는 Thermo Fisher사(Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 구아바 가지 추출물 제조

구아바 가지 추출물을 제조하기 위해 구아바 가지를 손질 후 동결 건조하여 분쇄하였다. 동결 분말 2 g을 칭량하고 각 농도별 ethanol 및 정제수 200 mL를 가하여 18시간 동안 추출하였다. 추출물은 여과(Advantec No. 2, Toyo Kaisha Ltd., Tokyo, Japan)한 후 감압농축기(EYELA N-1000, Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 잔사를 얻었으며, 얻어진 잔사는 DMSO에 녹여 실험에 사용하였다.

3. 비타민 C, 총 carotenoid 및 β -carotene 함량 분석

구아바 가지의 비타민 C 함량은 Phillips et al. (2010)의 방법을 이용하여 분석을 진행하였다. 시료 2 g에 5% MPA (metaphosphoric acid) 용액 30 mL를 첨가하고 균질화하였다. 이후 10분간 3,000 rpm으로 원심분리 하여 상등액을 50 mL로 정용하였다. 추출물은 0.45 μ m PVDF syringe filter (Whatman Inc., Maidstone, UK)로 여과하여 HPLC/DAD (Chromaster 5000 series, Hitachi)를 분석에 사용하였다. 이동상은 0.05% formic acid 용액이었으며, 분석에 사용한 column은 Mightysil RP-18이었다(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m, Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan).

구아바 가지의 총 carotenoid 및 β -carotene 측정을 위해,

시료 1 g에 6% pyrogallol 10 mL를 첨가한 후 5분간 sonication한 뒤, 60% KOH 8 mL를 첨가하고 환류냉각관을 연결하여 75°C에서 진탕 추출하였다. 이후 ice에서 냉각시킨 후, 2% NaCl 20 mL 및 0.01% BHT를 함유한 hexane-ethylacetate 용액 15 mL를 첨가하고 진탕하여 상등액은 50 mL로 정용하였다. 구아바 가지의 총 carotenoid 함량은 앞서 50 mL로 정용한 추출물을 사용하여 445 nm에서 흡광도 (Thermo Scientific Ltd., Lafayette, CO, USA)를 측정하였다(Lee et al. 2001). β -Carotene의 함량은 MFDS (2012)의 방법을 응용하여 분석하였으며, 총 carotenoid를 측정하기 위해 준비한 추출물을 0.45 μ m syringe filter로 여과하여 HPLC 분석을 실시하였다. 이동상으로는 acetonitrile, methanol, 및 dichloromethane을 75:20:5 (v/v/v)의 비율로 유속 1 mL/min이 되도록 실험을 진행하였으며, column (YMC-Pack Pro RS C₁₈, 250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m, YMC Co., Tokyo, Japan) 온도는 40°C로 설정하였다.

4. Quercetin 및 catechin 함량 분석

구아바 가지에 함유되어 있는 quercetin의 함량은 Shin et al. (2016)의 방법을 이용하였다. 구아바 가지 2 g에 80% methanol 25 mL를 첨가하고 35°C에서 초음파 추출한 다음, 추출물을 0.45 μ m syringe filter로 여과하여 분석에 사용하였다. 이동상으로는 정제수: *o*-phosphoric acid (99.5:0.5, v/v) 와 ACN:정제수: *o*-phosphoric acid (50:49.5:0.5, v/v)를 사용하였으며, 유속은 1 mL/min, column (YMC-Pack Pro RS C₁₈, 250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m, YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan) 온도는 35°C로 설정하였다. 분석 시료는 20 μ L씩 주입하여 255 nm에서 측정하였다.

구아바 가지에 함유되어 있는 catechin의 함량은 Kim et al. (2019)의 방법을 이용하여 분석을 진행하였다. 구아바 가지 2 g에 80% methanol 25 mL를 첨가하고 35°C에서 초음파 추출한 다음, 추출물을 0.45 μ m syringe filter로 여과하여 분석에 사용하였다. 이동상으로는 0.1% formic acid를 함유한 물과 0.1% formic acid를 함유한 ACN을 사용하였으며, 유속은 1 mL/min, column (YMC-Pack Pro RS C₁₈, 250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m, YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan) 온도는 30°C로 설정하였다. 분석 시료는 10 μ L씩 주입하여 275 nm에서 측정하였다.

5. 총 폴리페놀 함량 측정

구아바 가지에 함유되어 있는 총 폴리페놀의 함량을 알아보기 위해 Folin & Denis (1912)의 방법을 이용하여 측정하였다. 구아바 가지 추출물(50 μ L)은 2% Na₂CO₃, 1 mL 및 50% Folin-ciocalteu's reagents (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) 100 μ L를 가하여 빛이 차단된 장소에서 5분간 반응을 시켰다. 이후 분광광도계를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. 총 플라보노이드 함량 측정

구아바 가지에 함유되어 있는 총 플라보노이드 함량을 알아보기 위해 Zhishen et al. (1999)의 방법에 따라 실험을 진행하였다. DMSO에 희석한 구아바 가지 추출물 250 µL에 증류수 1.250 mL를 첨가한 후, 5% NaNO₂ 75 µL와 혼합한 후 6분간 암소에 방치하였다. 이 후 10% AlCl₃·6H₂O를 150 µL 첨가하여 빛이 차단된 곳에 5분간 방치하여 반응을 시켰고, 그 뒤 1 M NaOH 1 mL를 첨가한 후 혼합하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. DPPH 라디칼 소거능 및 ABTS 라디칼 소거능 측정

구아바 가지의 항산화능을 알아보기 위해 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능을 측정하였으며, Blois (1958)의 방법에 따라 실험을 진행하였다. DPPH 라디칼에 대한 환원력 측정을 위해 DMSO에 희석된 구아바 가지 추출물 50 µL에 0.2 mM의 DPPH 용액 1 mL를 가하여 진탕한 후 암소에서 30분간 방치하고 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 라디칼 소거능을 측정하기 위해 20 µL의 구아바 가지 추출물에 ABTS 라디칼 용액 1 mL를 가하여 진탕하였고, 30분간 암소에서 방치한 후 735 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. α-Glucosidase 저해능 측정

구아바 가지 추출물의 α-glucosidase 저해능은 Son & Choi (2013)의 방법을 변형하여 기질과 효소반응을 이용한 분광학적 방법으로 측정하였다. 2 U/mL의 α-glucosidase 50 µL에 구아바 가지 추출물 또는 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) 10 µL를 첨가하여 혼합한 후 실온에서 10분간 반응시킨 후, 5 mM p-NPG 50 µL를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 그 후, 405 nm에서 흡광도를 측정하여 아래의 식으로 계산하였다.

$$\alpha\text{-glucosidase inhibition rate (\%)} = \frac{1-A}{B} \times 100$$

A: sample absorbance

B: control absorbance

9. 세포 배양

실험에 사용한 HepG2 세포는 ATCC (American Type Culture Collection, CL-173, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 세포는 1% penicillin과 10%의 FBS를 함유한 DMEM을 사용하여 37°C의 5% CO₂ incubator에서 배양하였으며, 2일 간격으로 배지를 교체하였다.

10. 시료 독성 및 간세포 보호능 측정

배양된 HepG2 세포는 96 well plate에 각 well당 3×10⁴으로 배양하였으며, 다음 날 DMEM 배지에 시료와 t-BHP를 희석하여 각 well에 처리하였다. 6시간 후 MTT assay를

실시하였으며, MTT 시약에 의해 형성된 formazan은 DMSO에 녹여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다(Lee et al. 2017).

11. 통계처리

결과 값은 평균±표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였고, 모든 연구 결과는 3회 이상의 반복 실험을 수행한 값이다. 통계분석을 위해 SAS version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 사용하였고, one-way ANOVA로 분석한 후, Duncan's multiple range test를 통해 p<0.05 수준에서 분석결과를 검증하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 구아바 가지의 기능성 성분 함량 분석

본 연구에서는 구아바 가지에 함유된 비타민 C, β-carotene, carotenoid, quercetin 및 catechin 등의 기능성 성분의 함량을 알아보았고, 그 결과를 <Table 1>에 나타내었다. 구아바 가지의 비타민 C 함량은 26.783 mg/100 g이었고, β-carotene의 함량은 43.676 mg/100 g이었으며, 총 carotenoid의 함량은 65.083 mg/100 g이었다. 구아바 가지의 quercetin 함량은 58.245 mg/100 g이었으며 catechin의 함량은 8.309 mg/100 g이었다. 비타민 C는 체내 축적된 활성산소로 인한 세포 손상 및 노화 등을 억제하는 역할을 하며(Voko et al. 2003), 체내에서 합성되지 않기 때문에 식품을 통해 섭취해야 하는 필수 수용성 비타민 중 하나이다(Phillips et al. 2010). Carotenoid는 과채류에 다량 존재하는 지용성 천연 색소로서, α-carotene, β-carotene, lutein 등으로 존재하여 항산화 활성, 항암 효과, 심혈관 질환 예방 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Seong et al. 2018). Catechin은 항균 작용, 충치 예방, 비만 억제, 혈당저하 작용, 항알러지 효과 등의 생리활성이 보고되어 있으며, 또한 강력한 항산화제로 알려진 quercetin은 항균 작용, 충치 예방, 항염, 항암 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Di Carlo et al. 1999; Castillo et al. 2000; Joshi et al. 2000). Lee et al. (2018)은 식품으로 사용가능한 원료인 황칠나무 가지 30% 에탄올

<Table 1> Contents of functional components in the branch of *Psidium guajava* L.

Components	Contents (mg/100 g)
Vitamin C	26.783±0.820 ¹⁾
β-carotene	43.676±0.521
Total carotenoids	65.083±0.003
Quercetin	58.245±0.482
Catechin	8.309±0.233

¹⁾The values are means of triplicate determinations±standard deviation.

<Table 2> Polyphenols and flavonoids contents of the branch extracts of *Psidium guajava* L.

Samples	Polyphenols		Flavonoids	
	Contents (mg GAE ¹⁾ /mg residue)	F-value	Contents (mg CE ²⁾ /mg residue)	F-value
Water extract	0.194±0.018 ^{b3)}	19.69	0.075±0.002 ^d	875.12
60% ethanol extract	0.200±0.002 ^b		0.102±0.001 ^c	
80% ethanol extract	0.208±0.003 ^b		0.111±0.001 ^b	
100% ethanol extract	0.245±0.002 ^a		0.128±0.001 ^a	

¹⁾GAE: Gallic acid equivalent.

²⁾CE: Catechin equivalent.

³⁾The values are means of triplicate determinations±standard deviation.

^{a-d}Means with different superscripts are significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05.

<Table 3> The effects of antioxidant activity according to the branch extract of *Psidium guajava* L.

Samples (0.25 mg/mL)	DPPH radical scavenging activity		ABTS radical scavenging activity	
	Antioxidant activity (%)	F-value	Antioxidant activity (%)	F-value
Water extract	28.476±0.376 ^{1d}	542.16	42.751±0.469 ^d	413.26
60% ethanol extract	38.789±0.659 ^e		48.674±0.293 ^c	
80% ethanol extract	39.920±0.094 ^b		51.616±0.469 ^b	
100% ethanol extract	42.981±0.000 ^a		57.664±0.469 ^a	

¹⁾The values are means of triplicate determinations±standard deviation.

^{a-d}Means with different superscripts are significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05.

추출물의 quercetin 함량이 106 mg/100 g이라고 하였으며, 또한 Kwon et al. (2014)의 연구에 따르면 식용 및 약용으로 이용되는 미선나무의 줄기의 비타민 C 함량은 30 mg/100 g 이라고 보고하였다. 기존에 식용 및 약용으로 사용되는 나뭇가지의 기능성 성분 및 비타민 함량과 비교하였을 때 구아바 가지 추출물은 낮거나 유사한 수준으로 나타났다. 그러나 본 연구를 통하여 구아바 가지 추출물이 기능성 성분 및 비타민을 함유하는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 구아바 가지의 활용을 위한 기초 자료로 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구에서는 추출 용매에 따른 구아바 가지 추출물의 폴리페놀 및 플라보노이드의 함량을 알아보았으며, 그 결과는 <Table 2>에 나타내었다. 구아바 가지 추출물의 총 폴리페놀 함량은 100% 에탄올 추출물에서 0.245 mg GAE/mg residue로 유의적으로 가장 높게 나타났다. 또한, 구아바 가지 추출물의 플라보노이드 함량은 100% 에탄올 추출물에서 0.128 mg CE/mg residue로 가장 높은 값을 나타내었으며, 그다음 80% 에탄올 추출물(0.111 mg CE/mg residue)>60% 에탄올 추출물(0.102 mg CE/mg residue)>95°C 열수 추출물(0.075 mg CE/mg residue) 순으로 나타났다. 페놀 화합물은 대표적인 항산화 물질로 이들의 함량은 항산화 능력과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Dragsted 2003; Perron & Brumaghim 2009). 폴리페놀 성분은 식물에 널리 분포되어 있으며 항산화, 항염증, 항균 등 다양한 생리활성을 나타낸다(Kim et al. 2011). 기존 연구에서 구아바 잎 에탄올 추출

물은 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 각각 0.275 mg GAE/mg과 0.166 mg CE/mg으로 보고하였다(Cheon et al. 2019). 본 연구에서 알아본 구아바 가지 100% 에탄올 추출물은 건강기능식품 원료로 등재된 구아바 잎 추출물과 비교하였을 때 총 폴리페놀 함량은 유사한 수준이었으며 플라보노이드는 조금 낮은 함량을 나타내었다. 이처럼 구아바 가지는 항산화 활성을 나타내는 성분을 함유함으로써 구아바 잎과 같이 기능성 소재로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

2. 구아바 가지 추출물의 라디칼 소거능 및 α-glucosidase 억제능 측정

본 연구에서는 구아바 가지 추출물의 생리활성 효과를 평가하기 위해 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능을 측정하였으며, 그 결과를 <Table 3>에 나타내었다. 구아바 가지 추출물을 0.25 mg/mL로 조제하여 실험을 진행한 결과, DPPH 라디칼 소거능은 100% 에탄올 추출물에서 42.981%의 소거능을 보여주었으며, 다른 추출물에 비하여 유의적으로 가장 우수한 라디칼 소거능을 나타내었다. DPPH 라디칼 소거능은 80% 에탄올 추출물(39.920%), 60% 에탄올 추출물(38.789%), 95°C 열수 추출물(28.476%) 순으로 라디칼 소거능이 나타났다. 또한, ABTS 라디칼 소거능도 100% 에탄올 추출물에서 57.664%로 가장 우수한 라디칼 소거능을 나타내었으며, 80% 에탄올 추출물에서는 51.616%, 60% 에탄올 추출물에서는 48.674%, 95°C 열수 추출물은 42.751%로 나타났다. 전자공여능은 식품 중의 지질 산화 억제나 인체 내에서의 노화를

<Table 4> The effects of α-glucosidase inhibitory activity according to the branch extract of *Psidium guajava* L.

Samples	α-Glucosidase inhibitory activity	
	Inhibition (%)	F-value
Acarbose ¹⁾	80.256±0.000 ^{a2)}	
Water extract	71.026±0.000 ^c	13.99
60% ethanol extract	74.744±0.711 ^b	
80% ethanol extract	75.898±2.900 ^b	
100% ethanol extract	77.692±0.181 ^{ab}	

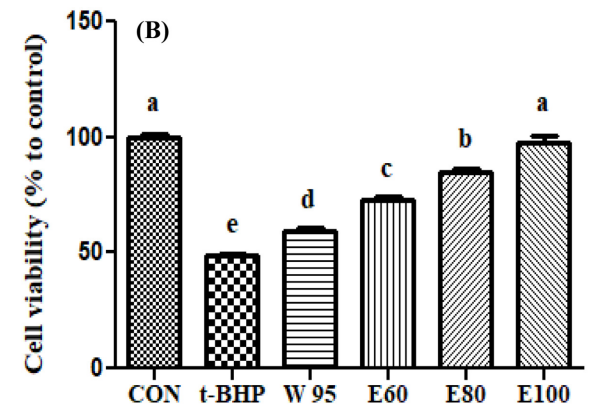
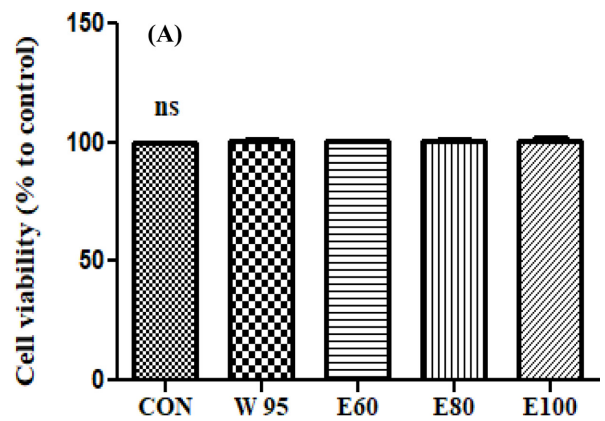
¹⁾Positive control.

²⁾The values are means of triplicate determinations±standard deviation.

^{a-c}Means with different superscripts are significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05.

억제하는 항산화 작용의 척도로 자주 이용된다(Hong 2013). Maisuthisakul et al. (2007)의 연구에 의하면 폴리페놀 화합물은 불안정한 라디칼에 전자를 공여하여 라디칼을 소거한다고 하였다. 폴리페놀 화합물로는 catechin, quercetin, luteolin 등이 있으며, 이와 같은 물질은 라디칼 소거능과 강력한 항산화 효과를 가지는 것으로 알려져 있다(Guo & Wang 2007). 그러므로 구아바 가지 100% 에탄올 추출물이 다른 추출물보다 더 많은 quercetin 및 catechin 등과 같은 폴리페놀 화합물을 함유하고 있으므로 가장 우수한 라디칼 소거능을 나타낸 것으로 사료된다.

본 연구에서는 α-glucosidase 저해제로 알려진 acarbose를 positive control로 사용하여 구아바 가지 추출물의 α-glucosidase 억제능을 측정하고, 결과는 <Table 4>에 나타내었다. Positive control인 acarbose (1 mg/mL) 대비 100% 에탄올 추출물은 농도 1 mg/mL에서 77.692%로 다른 시료에 비하여 가장 우수한 α-glucosidase 억제능을 나타내었다. α-Glucosidase는 체내 소장내 존재하는 전분 분해 효소로 탄수화물을 단당류로 가수분해하여 체내 흡수를 돕는데 기여한다(Caspary 1978). 이로 인해 α-glucosidase의 활성을 억제하는 것은 탄수화물의 가수분해를 억제함으로써 식후 혈당 상승을 낮추는 효과를 나타내기 때문에 당뇨병과 같은 만성질환의 예방에 밀접한 영향을 끼치는 것으로 알려져 있다(Chun et al. 2001). Wang et al. (2010)에 따르면 구아바 잎 75% 에탄올 추출물의 α-glucosidase 억제능은 1.5 mg/mL의 농도에서 38.3% (sucrase) 및 33.4% (maltase)를 나타내었고, 본 연구의 구아바 가지 추출물의 α-glucosidase 억제능이 1 mg/mL 농도에서 더 높은 것을 확인할 수 있었다. 구아바 잎 추출물은 우리나라 식품의약품안전처의 건강기능식품 공전에 등록된 원료로, 함유된 폴리페놀에 의하여 식후 혈당 상승 억제에 도움을 주는 것으로 알려져 있다(MFDS 2016). 따라서 구아바 가지도 구아바 잎과 마찬가지로 식후 혈당 상승을 효과적으로 제어할 수 있는 소재로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.



<Figure 1> Effects of ethanolic extracts of *Psidium guajava* L. branch (100 µg/mL) on cytotoxicity (A) and protective effect (B) determine by MTT assay.

Each value was expressed as the means±standard deviation (n=3). ^{a-c}Means with different letters are significantly different (p<0.05) compared to control. ns, not significant; CON, control; t-BHP, tert-butylhydroperoxide; W95, water extract at 95°C; E60, 60% ethanol extract; E80, 80% ethanol extract; E100, 100% ethanol extract.

3. 산화적 스트레스에 대한 구아바 가지 추출물의 간세포 보호 효과

간세포 내의 t-BHP는 배양된 간세포 내에서 cytochrome P-450에 의해 peroxy 및 alkoxy radical 등의 독성물질로 전환되고, 이러한 라디칼은 초기 지질과산화물을 일으키는 것으로 알려져 있다(Lee et al. 2006). 이러한 대사과정을 통해 간세포에서 상당량의 t-BHP가 유리라디칼을 생성하고, 이는 세포막 구성성분인 불포화 지방산과 직·간접적으로 반응하여 malondialdehyde를 형성하여 간세포의 자연사 및 세포괴사를 일으킨다(Vaca et al. 1992). 본 연구에서는 간세포에 구아바 가지 추출물을 처리하여 산화적 스트레스에 대한 세포 보호효과를 측정하였다. HepG2 세포에서 실험에 사용된 모든 추출물(100 µg/mL)은 대조군과 비교하여 모두 독성을 나타내지 않았다<Figure 1A>. 또한, t-BHP에 의한 산화적 스트레스에 대한 세포 보호능을 측정하여 <Figure 1B>에 나

타내었다. 모든 추출물이 대조군인 *t*-BHP 처리군(48.976%)보다 모두 유의적으로 높은 보호능을 나타내었고, 그중 100% 에탄올 추출물에서 97.346%로 가장 우수한 세포 보호능이 나타났다. Alia et al. (2006)은 HepG2에 천연 물질인 quercetin을 처리할 경우, 산화적 손상으로부터 세포를 강력하게 보호한다고 하였다. 또한, Kim et al. (2013)의 연구에 따르면 catechin 및 그 중합체인 procyanidin과 같은 폴리페놀 화합물은 산화적 스트레스로부터 유의적으로 세포를 보호한다고 하였다. 따라서 구아바 가지에 함유된 quercetin, catechin 및 비타민 C 등과 같은 항산화 물질은 산화적 스트레스로부터 간세포를 효과적으로 보호하는 것으로 사료된다.

IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 구아바 가지 추출물에 함유된 기능성 성분의 함량을 분석하였고, 항산화 활성 및 산화적 스트레스에 대한 간세포 보호능을 알아보았다. 구아바 가지에는 비타민 C (26.783 mg/100 g), β -carotene (43.676 mg/100 g), carotenoid (65.083 mg/100 g), quercetin (58.245 mg/100 g) 및 catechin (8.309 mg/100 g) 등이 함유되어 있었다. 또한 추출 용매에 따른 구아바 가지 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 100% 에탄올 추출물에서 각각 0.245 mg GAE/mg residue, 0.128 mg CE/mg residue로 유의적으로 가장 높게 나타났다. 구아바 가지 추출물의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능 또한 100% 에탄올 추출물에서 가장 높은 활성을 나타내었고 각각 42.981% 및 57.664%이었다. 그리고 100% 에탄올 추출물은 α -glucosidase 효소의 활성을 77.692%까지 억제시킴으로써 시료 중 가장 높은 억제능을 나타내었다. 간세포에서 모든 구아바 가지 추출물은 100 μ g/mL의 농도에서 독성이 없는 것으로 나타났으며, *t*-BHP에 의한 산화적 스트레스에 대하여 100% 에탄올 추출물(100 μ g/mL)은 세포의 생존율을 97.346%까지 증가시켜 세포 보호효과가 뛰어난 것을 확인하였다. 따라서 본 연구를 통하여 구아바 가지에 함유된 다양한 기능성 성분 및 우수한 α -glucosidase 저해능을 알 수 있었으며, 간세포 보호에 잠재적인 효과가 있는 것으로 나타났다. 이는 구아바 가지를 기능성 식품 소재로서 개발하는 데 기초자료로 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

저자 정보

전아영(경성대학교 일반대학원 식품생명공학과, 석사과정 대학원생, 0000-0003-3721-753X)

김나은(경성대학교 일반대학원 식품생명공학과, 석사과정 대학원생, 0000-0002-0217-9337)

천원영(경성대학교 일반대학원 식품생명공학과, 석사과정 대학원생, 0000-0002-5578-3693)

김영화(경성대학교 식품응용공학부, 교수, 0000-0003-4186-887X)

감사의 글

이 성과는 2017년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구(No. 2017 R1C1B1008236)이며, 일부 2020년도 Brain Busan 21 플러스 사업에 의하여 지원되었고, 이에 감사드립니다.

Conflict of Interest

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

References

- Alia M, Ramos S, Mateos R, Granado-Serrano AB, Bravo L, Goya L. 2006. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by *tert*-butyl hydroperoxide. *Toxicol Appl Pharmacol* 212:110-118
- Bayr H. 2005. Reactive oxygen species. *Crit Care Med.* 33:S498-S501
- Beckman KB, Ames BN. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 78:547-581
- Begum S, SI Hassa, BS Siddiqui F, Shaheen F, Ghayur MM, Gilani AH. 2002. Triterpenoids from the leaves of *Psidium guajava*. *Phytochemistry.* 61:399-403
- Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.* 26: 1199-1204
- Caspary WF. 1978. Sucrose malabsorption in man after ingestion of α -glucosidase hydrolase inhibitor. *Lancet.* 1:1231-1233
- Castillo J, Benavente-Garcia O, Lorente J, Alcaraz M, Redondo A, Ortuno A, Del Rio JA. 2000. Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced *in vivo* by X-rays of flavin-3-ols (procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): comparative study versus other phenolic and organic compounds. *J. Agric Food Chem.* 48:1738-1745
- Castro L, Freeman BA. 2001. Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition.* 17:161-165
- Cheon W, Seo D, Kim Y. 2019. Antioxidative and hepatocyte protective effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaves cultivated in Korea. *Korean J. Food & Nutr.* 32(1):33-40
- Chun HS, Chang HB, Kwon YI, Yang HC. 2001. Characterization of an α -glucosidase inhibitor produced by *Streptomyces* sp. CK-4416. *J. Microbiol Biotechnol.* 11:389-393
- Dragsted LO. 2003. Antioxidant actions of polyphenols in humans. *Int J. Vitam Nutr Res.* 73:112-119
- Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life sciences.* 65(4):337-353
- Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as colour reagents. *J. Biol Chem.* 12:239-249

- Guo J, Wang MH. 2007. Antioxidant and antidiabetic activities of *Ulmus davidiana* extracts. *Food Sci Biotechnol.* 16(1): 55-61
- Gutierrez RM, Mitchell S, Solis RV. 2008. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J. Ethnopharmacol.* 117:1-27
- Hong JH. 2013. Physiological activities of leaf and twing extracts from *Lindera obtusiloba* Blume. *Korean J. Food Cook Sci.* 29(5):573-580
- Jo YH, Ok DL, Lee SC. 2009. Antimicrobial characteristics of different parts of guava against food-borne bacteria. *J. Korean Soc Food Sci Nutr.* 38(12):1773-1778
- Joshi SS, Kuszynski CA, Bagchi M, Bagchi D. 2000. Chemopreventive effects of grape seed proanthocyanidin extract on Chang liner cells. *Toxicology.* 155:83-90
- Jung SH. 2003. Effect of baicalein on *t*-butyl hydroperoxide-induced cell injury in renal tubular epithelial cells. *J. Biomed Lab Sci.* 9:189-193
- Keji C. 1981. Understanding and treatment of Diabetes mellitus by traditional Chinese medicine. *Am J. of Chinese Med.* 9:93-94
- Kim MS, Rha CS, Kim DO. 2019. Effects of commonly used infusion method on catechin content and antioxidant capacities of pure green tea packaged in tea bags. *J. Korean Food Sci Technol.* 51(4):356-360
- Kim Y, Choi Y, Ham H, Jeong HS, Lee, J. 2013. Protective effects of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from defatted grape seeds on *tert*-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage in HepG2 cells. *Food chem,* 137:136-141
- Kim YS, Lee SJ, Hwang JW, Kim EH, Park PJ, Jeon BT. 2011. Antioxidant activity and protective effects of extracts from *Helianthus tuberosus* L. leaves on *t*-BHP induced oxidative stress in Chang Cells. *J. Korean Food & Nutr.* 40(11):1525-1531
- Kucera O, Endlicher R, Rousar T, Lotkova H, Garnol T, Drahotova Z, Cervinkova Z. 2014. The effect of *tert*-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress on lean and steatotic rat hepatocytes *in vitro*. *Oxid Med Cell Longev.* 2014:752506
- Kwon S, Kang H, Kim M, Kim J, Shin H, Kim K. 2014. Analysis on the components and safety evaluation of *Abeliophyllum distichum* Nakai leaves and stems. *J. Environ Health Sci.* 40(3):234-244
- Lee EG, Kim KB, Jeong JM. 2006. Hepatoprotective effects of poly Herbal formulation (Hepa-1000) on *t*-BHP-induced toxicity in human hepatoma cells. *J. Korean Soc Food Sci Nutr.* 35(9):1121-1126
- Lee HS, Castle WS, Coates GA. 2001. High-performance liquid chromatography for the characterization of carotenoids in the new sweet orange (Earlygold) grown in Florida, USA. *J. Chromatogr A.* 913:371-377
- Lee KH, Na HJ, Song CK, Kang SY, Kim S. 2018. Quercetin quantification in a Jeju *Dendropanax moribifera* Lev. Extract by varying different parts, harvest times, and extraction solvents. *Korean J. Food Preserv.* 25(3):344-350
- Lee KM, Kwon TY, Kang U, Seo EK, Yun JH, Nho CW, Kim YS. 2017. Tussilagonone-induced Nrf2 pathway activation protects HepG2 cells from oxidative injury. *Food Chem Toxicol.* 108:120-127
- Lee Y, Kim NS, Shon MS, Kim GN, Hwang YI, Park E. 2016. Effect of fermented herbal mixture against oxidative stress in HepG2 and PC12 Cells. *J. Korean Soc Food Sci Nutr.* 45:1057-1064
- Lozoya X, Reyes Moralesb H, Chavez Sotoa MA, Martinez Garciac MC, Soto Gonzalezd Y, Doubova SV. 2002. Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease. *J. Ethnopharmacol.* 83:19-24
- Maisuthisakul P, Suttajit M, Pongsawatmanit R. 2007. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food chem.* 100(4): 1409-1418
- Mercadante AZ, Steck A, Pfander H. 1999. Carotenoids from guava (*Psidium guajava* L.): Isolation and structure elucidation. *J. Agric Food Chem.* 47:145-151
- Miean KH, Mohamed S. 2001. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *J. Agric Food Chem.* 49:3106-3112
- Ministry of Food and Drug Safety [MFDS]. 2012. NLS standard operating procedure analytical methods. Ministry of Food and Drug Safety. Osong, Korea, pp 92-95
- Ministry of Food and Drug Safety [MFDS]. 2016. The functional ingredients recognized status of health functional food. Ministry of Food and Drug Safety. Osong, Korea, pp 19
- Misra K, Seshadri TR. 1968. Chemical components of the fruits of *Psidium guajava*. *Phytochemistry.* 7:641-645
- Perron NR, Brumaghim JL. 2009. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys.* 53:75-100
- Phillips KM, Tarrago-Trani MT, Gebhardt SE, Exler J, Patterson KY, Haytowitz DB, Pehrsson PR, Holden JM. 2010. Stability of vitamin C in frozen raw fruit and vegetable homogenates. *J. Food Compos Anal.* 23(3):253-259
- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. 1991. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* 288:481-487
- Rush GF, Gorski JR, Ripple MG, Sowinski J, Bugelski P, Hewitt WR. 1985. Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 78(3):473-483
- Seong GU, Kim JB, Chung SK. 2018. Carotenoid Contents of Head-Type Kimchi Cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. pekinensis) Leaves. *J. Korean Soc Food Sci Nutr.* 47(9):912-916
- Shin NR, Moon JS, Shin SY, Li L, Lee YB, Kim TJ, Han NS.

2016. Isolation and characterization of human intestinal *enterococcus avium* EFEL009 converging rutin to quercetin. *Lett Appl Microbiol.* 62:68-74
- Son WR, Choi SW. 2013. Biological activity and analysis of α -glucosidase inhibitor from mulberry (*Morus alba* L.) wine. *J. Korean Food Preserv.* 20(6):877-885
- Tanaka T, Ishida N, Ishimatsu M, Nonaka G, Nishioka I. 1992. Tannins and related compounds CXVI. Six new complex tannins, guajavins, psidinins and psiguavin from the bark of *Psidium guava* L. *Chem Pharm Bull.* 40:2092-2098
- Vaca CE, Vodicka P, Hemminki K. 1992. Determination of malonaldehyde-modified 2'-deoxyguanosine-3'-monophosphate and DNA by 32P-postlabelling. *Carcinogenesis.* 13:593-599
- Voko Z, Hollander M, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. 2003. Dietary antioxidants and the risk of ischemic stroke: the Rotterdam Study. *Neurology.* 61(9):1273-1275
- Wang H, Du YJ, Song HC. 2010. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of guava leaves. *Food Chem.* 123(1): 6-13
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64:555-559

Received February 15, 2021; revised March 17, 2021; revised April 9, 2021; accepted April 19, 2021