



Antiviral effect of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb. cv. Cheongdo-Bansi) extracts on murine norovirus

Jaemin Choe¹, Hyeju Jung¹, Changsun Choi², Mi-Kyung Park^{1*}

¹School of Food Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

²Department of Food and Nutrition, Chung-Ang University, Anseong 17546, Korea

청도반시 추출물의 murine norovirus에 대한 항바이러스 효과

최재민¹ · 정혜주¹ · 최창순² · 박미경^{1*}

¹경북대학교 식품공학부, ²중앙대학교 식품영양학과

Abstract

Norovirus infections are one of the most significant causes of foodborne outbreaks worldwide. This study aimed to investigate the antiviral effects of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb. cv. Cheongdo-Bansi) extracts on murine norovirus (MNV). Persimmon extracts obtained by solvent extraction and squeezing, prior to freeze-drying were evaluated by determining the yield and tannin contents. The cytotoxicity and antiviral effect of persimmon extracts were determined using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and a time-of-addition assay, respectively. The yield and tannin content were in following order: methanol > water > ethanol > acetone > juice extracts and juice > acetone > water > ethanol > methanol extracts, respectively. The concentrations of methanol, ethanol, acetone, water, and juice extracts were determined to be 800, 800, 600, 200, and 400 µg/mL, respectively. The MNV titer was significantly reduced by 1.65 log plaque forming unit (PFU)/mL with 18% reduction in plaque formation in group pre-treated with water extract. Furthermore, the significant reductions in MNV titer by 2.14, 1.69, and 2.96 log PFU/mL were observed in groups co-treated with acetone, water, and juice extracts, respectively with plaque formation inhibition of 22-40%. However, there were no significant antiviral effects in the post-treated groups. This study suggests the potential use of persimmon extracts as anti-noroviral agents.

Key words : norovirus, persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.), antiviral effect, time-of-addition assay, MTT assay

서 론

노로바이러스(Norovirus)는 Caliciviridae과에 속하는 7.5 kb 크기의 single positive stranded RNA 바이러스로 5개의 genogroups(G I -GV)으로 분류되며, 이 중 G I, GII, GIV가 인체 감염을 유발하는 것으로 알려져 있다(Bitler 등, 2013; Greening 등, 2016; Patel 등, 2009). 전 세계적으로 발생하는 식중독 사례의 약 20%가 노로바이러스에 의해 발생되고 있

으며, 이로 인한 경제적 손실이 약 66조 원으로 추정되고 있다(CDC, 2020). 미국의 경우, 해마다 평균 2,500건이 발생하며, 전체 식중독 발병의 58%를 차지하고 있다(CDC, 2020). 국내도 최근 5년간(2015-2019) 노로바이러스로 인한 식중독 발병률이 전체 식중독의 약 32%(평균 52건, 환자수 1,115명)로 가장 높은 비율을 차지하고 있다(MFDS, 2020). 노로바이러스로 인한 식중독은 오염된 식품이나 물이 주원인이며, 감염된 환자와의 접촉을 통해 전파되기도 한다(Patel 등, 2009;

*Corresponding author. E-mail : parkmik@knu.ac.kr, Phone : +82-53-950-5776, Fax : +82-53-950-6772

Received 09 March 2021; Revised 09 April 2021; Accepted 22 April 2021.

Copyright © The Korean Society of Food Preservation.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Richards 등, 2012). 노로바이러스에 감염되면 오심, 구토, 설사, 복통의 주요 증상을 나타내며, 대부분은 1-2일 후에 자연적으로 회복되나, 어린이, 노약자, 면역력이 약한 환자 등의 경우, 구토와 설사로 인해 심한 탈수 증세가 나타나 사망으로 이어질 수도 있다(Trivedi 등, 2013). 따라서, 노로바이러스 감염을 막기 위해서는 이를 예방하거나 제어하는 방법이 절실히 필요하며, 이를 위해 항노로바이러스 효과를 나타내는 식품소재의 연구가 매우 중요하다.

인체 노로바이러스는 현재의 cell culture system에서는 배양이 불가하므로, Caliciviridae과에 속하면서 노로바이러스와 유전학적, 형태학적, 생화학적 특성이 유사한 murine norovirus-1(MNV), feline calicivirus-F9(FCV), MS2 bacteriophage 등이 항노로바이러스 연구에 활용되고 있다(Hirneisen 등, 2013; Lee 등, 2011). 현재까지 국내에서 보고된 항노로바이러스 효과 검증을 위한 연구로 레몬그라스(*Cymbopogon citratus*)로부터 추출한 에센셜 오일의 MNV에 대한 항노로바이러스 효과(Kim 등, 2017)와 홍삼(*Panax ginseng*) 추출물(Lee 등, 2011)과 복분자(*Rubus coreanus*) 씨 추출물(Lee 등, 2016)의 MNV와 FCV에 대한 항노로바이러스 효과가 보고되었다. 또한, 국외에서는 크랜베리(*Vaccinium macrocarpon*) 주스(Su 등, 2010), 포도(*Vitis vinifera*) 씨 추출물(Joshi 등, 2015), 녹차(*Camellia sinensis*) 추출물(Randazzo 등, 2017)의 MNV와 FCV에 대한 항바이러스 효과가 보고되었다. 또한, Ueda 등(2013)은 MNV와 FCV를 대상으로 아카시아(*Robinia pseudoacacia*) 추출물, 커피(*Coffea arabica*) 추출물, 녹차(*Camellia sinensis*) 추출물의 항노로바이러스 효과를 검증하기도 하였다.

감(persimmon)은 그 학명이 *Diospyros kaki* Thunb.로 감나무과(Ebenaceae)에 속하고, 약 1,000여 종이 보고되고 있으며, 한국, 중국, 일본 등이 원산지로서 알려져 있다. 특히, 비타민 A, B, C와 탄닌(tannin), 갈산(gallic acid), 카테킨(catechin), 에피카테킨(epicatechin), 퀘세틴(queracetin), 클로로젠산(chlorogenic acid) 등과 같은 폴리페놀 화합물이 다량 함유되어 있어 숙취 해소와 기침 치료 등에 효과가 있으며, 항산화, 알코올대사 촉진, 지질대사 개선 등의 효과로 인해 민간과 한방에서 활용되어 왔다(Bian 등, 2015; Kim 등, 2011). 현재까지 감에 대한 연구로 식중독균을 대상으로 항균효과(Arakawa 등, 2014; Sung 등, 2012)에 관한 연구가 일부 진행되기는 하였으나, 최근에 문제가 되고 있는 항노로바이러스에 관한 연구는 거의 전무한 상황이다. 따라서 본 연구에서는 경북 청도 지역 특산품인 청도반시(*D. kaki* T. cv. Cheongdo-Bansi) 추출물 및 착즙물의 MNV에 대한 항노로바이러스 효과를 검증하고자 한다.

재료 및 방법

청도반시 추출물과 착즙물 제조 및 수율 측정

청도반시는 8월 말에 적과한 미숙과로 경상북도 청도군 [(주)행복한감]에서 제공 받아 추출과 착즙의 두 가지 방법으로 시료를 제조하였다. 미숙과를 세척 후, 꼭지를 제거하고 5 mm 두께로 절단하여 농산물 건조기(KED-132A, Kiturami Co., Seoul, Korea)로 건조한 뒤, 분쇄기(SNSG-1002SS, Hanil Electronic Inc., Seoul, Korea)를 이용하여 감 분말을 제조하였다. 추출물은 감 분말 50 g에 500 mL의 80% 메탄올, 80% 아세톤, 95% 에탄올, 그리고 물을 가하여 각각 150 rpm에서 24시간 동안 추출하였고, 착즙물 제조를 위해서는 동량의 미숙과를 착즙기(SJM-7500, Sungwon System Co., Ansan, Korea)로 착즙하였다. 추출물과 착즙물은 각각 여과지(Whatman No.4)로 여과하여 회전식 진공농축기(N-1300, Eyela, Tokyo, Japan)로 농축한 뒤, 동결건조기(MCFD 8518, Ilshinbiobase Co., Yanju, Korea)로 건조하였다. 추출물과 착즙물의 수율은 각각 추출 전 청도반시 분말의 중량 또는 착즙물의 중량에 대한 동결 건조 후 중량 변화를 측정하여 백분율(%)로 나타내었다(Jang 등, 2010).

탄닌 함량 측정

청도반시 추출물 및 착즙물의 탄닌 함량은 vanillin법(Price 등, 1978)으로 측정하였다. 1 mL의 추출물과 착즙물에 각각 5 mL의 1% vanillin 시약(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 30°C에서 20분 동안 반응시킨 후, 분광광도계(Optizen 2120UV, Mecasys Co., Daejeon, Korea)를 이용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. (+)-Catechin hydrate(Sigma-Aldrich Co.)를 표준물질로 사용하였으며, 탄닌 함량은 시료 1 g당 mg CE(mg of catechin equivalents)로 나타내었다.

세포 배양 및 바이러스 증식

RAW 264.7 세포와 norovirus surrogate인 murine norovirus-1(MNV)은 중앙대학교 식품영양학과 식품안전성 연구실로부터 제공받아 실험에 사용하였다. RAW 264.7 세포는 1% penicillin/streptomycin(Hyclone Inc., Logan, UT, USA)과 10% fetal bovine serum(Sigma-Aldrich Co.)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagles Medium(DMEM; Welgene Inc., Daegu, Korea)를 사용하여 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다. MNV 증식은 RAW 264.7 세포에 접종하여 48시간 배양 후 동결과 녹임을 3회 반복하여 RAW 264.7 세포를 완전히 파괴시킨 다음, 배양액을 회수하여 1,500 ×g에서 15분 동안 원심 분리하였고, 상층액을 -70°C에 보관하여 사용하였다.

청도반시 추출물 및 착즙물의 세포독성 측정

청도반시 추출물 및 착즙물이 RAW 264.7 세포에 미치는 독성을 확인하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay를 실시하였다. 96-well plate에 RAW 264.7 세포를 10^5 cells/mL로 분주하여 24 시간 배양하였으며, 세포 단층이 형성되면 메탄올, 에탄올, 아세톤, 물 추출물 및 착즙물을 각각 100, 200, 400, 600, 800 μ g/mL의 농도로 분주하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배지 제거 후, 100 μ L의 MTT(5 mg/mL) 용액을 분주하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. MTT 용액을 제거하고 100 μ L의 DMSO를 분주하여 MTT-formazan 결정체를 녹인 후, 흡광도 기기(Multiskan FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)로 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물 또는 착즙물을 처리하지 않은 세포를 대조군(control)으로 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율(%)로 나타내었다.

청도반시 추출물 및 착즙물의 항노로바이러스 효과 검증

항노로바이러스 효과 검증을 위한 메탄올, 에탄올, 아세톤, 물 추출물 및 착즙물의 최종 농도는 세포 독성 실험 결과를 토대로 각각 800, 800, 600, 200, 400 μ g/mL로 선정하였다. 항노로바이러스 효과의 검증은 추출물 및 착즙물의 첨가 시점을 기준으로 pre-treatment(바이러스 접종 전 추출물 및 착즙물의 처리), co-treatment(바이러스와 추출물 및 착즙물의 동시 접종), post-treatment(바이러스 접종 이후 추출물 및 착즙물의 처리)로 나누어 분석하였다(Seo 등, 2016). 첫째, 6-well plate에 RAW 264.7 세포를 10^5 cells/mL로 분주하여 37°C, 5% CO₂에서 배양한 후, 세포의 단층형성을 현미경으로 관찰하였다. Pre-treatment 효과 검증을 위해 상기에 언급된 농도의 추출물 및 착즙물이 함유된 DMEM을 세포 단층을 형성한 RAW 264.7 세포에 100 μ L씩 처리하고, 37°C, 5% CO₂에서 1시간 동안 배양한 뒤, MNV(7.3 log PFU/mL)를 DMEM으로 십진 희석하여 100 μ L씩 접종하고 37°C, 5% CO₂에서 2시간 동안 배양하였다. Co-treatment 효과 검증을 위해 MNV와 상기에 언급된 농도의 추출물 및 착즙물의 혼합액을 100 μ L씩 처리한 뒤, 37°C, 5% CO₂에서 2시간 동안 배양하였다. Post-treatment 효과 검증을 위해 세포 단층을 형성한 RAW 264.7 세포에 DMEM으로 십진 희석한 MNV를 100 μ L씩 접종하여 37°C, 5% CO₂에서 2시간 동안 배양한

뒤, MNV가 함유된 DMEM을 제거하였고, 100 μ L의 추출물 또는 착즙물을 상기에 언급된 농도로 각각 처리하여 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 모든 처리구는 0.6% agarose가 함유된 DMEM을 첨가한 후 48시간 동안 배양하였고, plaque 형성 여부가 관찰되면 10% formaldehyde(Samchun Chemicals, Pyeongtaek, Korea)을 첨가하여 상온에서 4시간 동안 세포를 고정하였다. Agar overlay medium을 제거하고, crystal violet 용액으로 염색하여 plaque를 계수하였다. 추출물 및 착즙물을 처리하지 않은 DMEM 및 MNV를 각각 음성대조군(negative control)과 양성대조군(positive control)으로 하였으며, 추출물 및 착즙물의 항노로바이러스 효과는 양성대조군에 대한 플라크 형성 유무를 백분율(%)로 나타내었다.

통계분석

모든 데이터는 3회 반복하여 평균±표준편차로 나타내었으며, 통계 분석은 GraphPad and InStat v.3 programs(GraphPad, San Diego, CA, USA)를 이용하였다. 각 평균값의 차이를 검증하기 위하여 t-test와 one-way ANOVA 분석을 실시하였으며, Duncan의 다범위 검정(Duncan's multiple range test)를 통하여 $p < 0.05$ 의 수준에서 유의차를 검증하였다.

결과 및 고찰

청도반시 추출물 및 착즙물의 수율

청도반시 추출물 제조를 위한 용매 조건은 선행연구(Akter 등, 2010; Jang 등, 2010)를 참고로 하여 80% 메탄올, 95% 에탄올, 80% 아세톤, 물로 선정하였다. 용매 추출물과 착즙물을 동결 건조하여 각각의 수율을 비교 검토한 결과(Table 1), 메탄올 추출물 > 물 추출물 > 에탄올 추출물 > 아세톤 추출물 > 착즙물의 순으로 높았다. 이 중 메탄올이 37.74%로 가장 높은 반면, 착즙물은 7.25%로 가장 낮은 추출 수율을 보여 주었다. Jang 등(2010)은 부유 단감(*D. kaki* T. cv. Fuyu)을 부위별(과육, 껍질, 씨, 꼭지)로 구분하여 이들을 메탄올, 에탄올, 아세톤, 물로 각각 추출하였고, 수율을 검토한 결과, 과육 추출물의 수율이 껍질, 씨, 꼭지보다 유의적으로 높았으며($p < 0.05$), 메탄올(91.02%) > 에탄올(75.95%) > 물(17.60%) > 아세톤(11.64%)의 순으로 보고되었다. 추출 용매에 따른 수율이 메탄올에서 가장 높고, 아세톤에서 가장 낮다는 점에서 본 연구와 유사함을 보여 주고 있다.

Table 1. Yields of persimmon (*D. kaki* T. cv. Cheongdo-Bansi) extracts

	Methanol	Ethanol	Acetone	Water	Juice
Yield (%)	37.74	14.87	7.41	15.38	7.25

청도반시 추출물 및 착즙물의 탄닌 함량

탄닌은 항바이러스 효과를 나타내는 주요한 성분(Kim 등, 1995)이므로 추출물과 착즙물의 탄닌 함량을 vanillin법으로 측정하였고 catechin을 표준물질로 하여 검량선을 작성한 결과(Fig. 1), 회귀식은 $y=0.42x+0.05$ 이었으며, 상관계수(R^2) 0.99로 나타났다. 검출한계(limit of detection, LOD)와 정량한계(limit of quantitation, LOQ)는 식품의약품처의 의약품 및 시험방법 validation 가이드라인에 따라 각각 $3.3 \times \sigma$ (반응의 표준편차)/S(표준곡선의 기울기), $10 \times \sigma$ /S로 결정하였으며, 그 결과 LOD와 LOQ는 각각 0.23, 0.68 mg/mL로 나타났다. 0.25-2.00 mg/mL의 농도 범위에서 회수율(recovery)은 79.68-121.43%로 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)는 1.14-6.47%로 결정되었다. 표준곡선으로부터 추출물 및 착즙물의 탄닌 함량을 측정된 결과(Table 2), 착즙물 > 아세톤 추출물 > 물 추출물 > 에탄올 추출물 > 메탄올 추출물 순으로 착즙물에서 36.13 ± 0.17 mg CE/g으로 유의적으로 가장 높았으며, 아세톤 추출물, 물 추출물 순으로 높은 탄닌 함량을 나타내었다($p < 0.05$). 반면, 에탄올 추출물과 메탄올 추출물에서는 유의적으로 낮은 탄닌 함량이 측정되었다($p < 0.05$). 이는 수율과는 상반되는 결과로 7.25%로 가장 낮은 수율을 보였던 착즙물에서 유의적으로 높은 탄닌 함량이 측정된 반

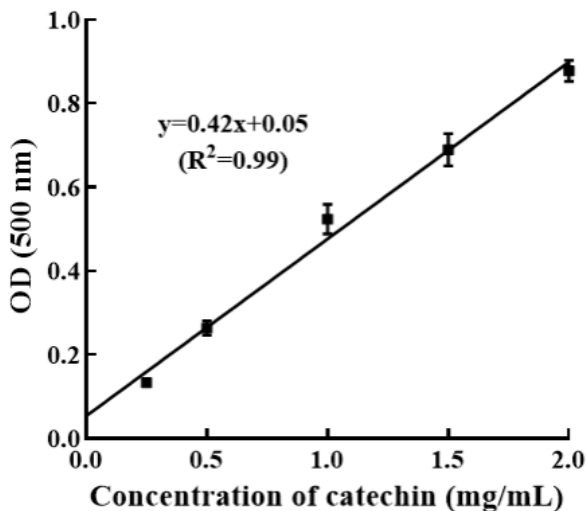


Fig. 1. Standard curve of (+)-catechin hydrate.

Table 2. Tannin content of persimmon (*D. kaki* T. cv. Cheongdo-Bansi) extracts for different solvents

	Methanol	Ethanol	Acetone	Water	Juice
Tannin content (mg CE/g)	0.04 ± 0.01^{d1}	0.08 ± 0.03^d	6.13 ± 0.55^b	2.32 ± 0.03^c	36.13 ± 0.17^a

¹⁾Values are mean \pm SD (n=3). The letters (^{a-d}) indicate significant difference within row by one-way ANOVA ($p < 0.05$).

면, 37.74%로 가장 높은 수율을 보였던 메탄올 추출물에서 가장 낮은 탄닌 함량을 나타내었다.

Sim 등(2016)은 본 연구 결과와 유사하게 청도반시(*D. kaki* T.) 미숙과의 물 추출물의 탄닌 함량을 2.88 mg/g으로 보고한 반면, Kim 등(2015)은 동시(*D. kaki* T.) 에탄올 추출물의 탄닌 함량을 0.18 mg/g으로 보고하였다. 탄닌의 함량은 감의 품종 및 수확 시기 그리고 추출용매에 따라 그 범위가 다양하며, 청도반시 에탄올 추출물의 탄닌 함량(0.08 ± 0.03 mg/g)이 Kim 등(2015)의 연구보다는 2배 정도 낮게 검출된 이유는 감의 품종 및 수확 시기 차이에 따른 결과로 해석된다 (Bian 등, 2015).

청도반시 추출물 및 착즙물의 처리에 따른 세포 독성

청도반시 추출물 및 착즙물이 RAW 264.7 세포 생존율에 미치는 영향을 MTT assay로 분석하였고, 그 결과는 Fig. 2와 같다. 메탄올 추출물(Fig. 2A)의 세포 생존율은 농도 의존적으로 감소하는 경향(600 μ g/mL의 농도 제외)을 보여 주었으며, 800 μ g/mL의 농도에서는 대조구 대비 $86.19 \pm 5.53\%$ 로 유의적인 차이를 보여 주었다($p < 0.05$). 이에 비해 에탄올 추출물(Fig. 2B)의 세포 생존율은 증감을 유지하다가 600 μ g/mL와 800 μ g/mL의 농도에서는 $91.75 \pm 6.98\%$ 와 $83.63 \pm 2.61\%$ 로 대조군과 유의적인 차이를 보여 주었다($p < 0.05$). 그 외에 아세톤 추출물(Fig. 2C), 물 추출물(Fig. 2D), 착즙물(Fig. 2E) 모두 세포 생존율은 추출물의 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보여 주었다. 선행 연구 결과를 토대로(Inwasawa 등, 2013; Yoo 등, 2014) 80% 이상의 세포 생존율을 보이는 추출물 및 착즙물의 농도를 cut-off 값으로 선정하였고, 항노로바이러스 효과 검증을 위한 추출물 및 착즙물의 최종 농도로 메탄올과 에탄올은 각각 800 μ g/mL, 아세톤은 600 μ g/mL, 물 추출물 및 착즙물은 200 μ g/mL와 400 μ g/mL로 결정하였다.

청도반시 추출물 및 착즙물의 항노로바이러스 효과

청도반시 추출물 및 착즙물의 항노로바이러스 효과는 대조구 대비 노로바이러스 플라크 형성율과 감소된 노로바이러스의 농도를 Fig. 3과 Table 3에 각각 나타내었다. 바이러스 접종 전 청도반시 추출물 및 착즙물을 세포에 처리(pre-treatment)한 결과, 메탄올, 에탄올, 아세톤, 물 추출물 및 착즙물 처리구에서 노로바이러스의 플라크 형성을 및 감소된 노로바이러스

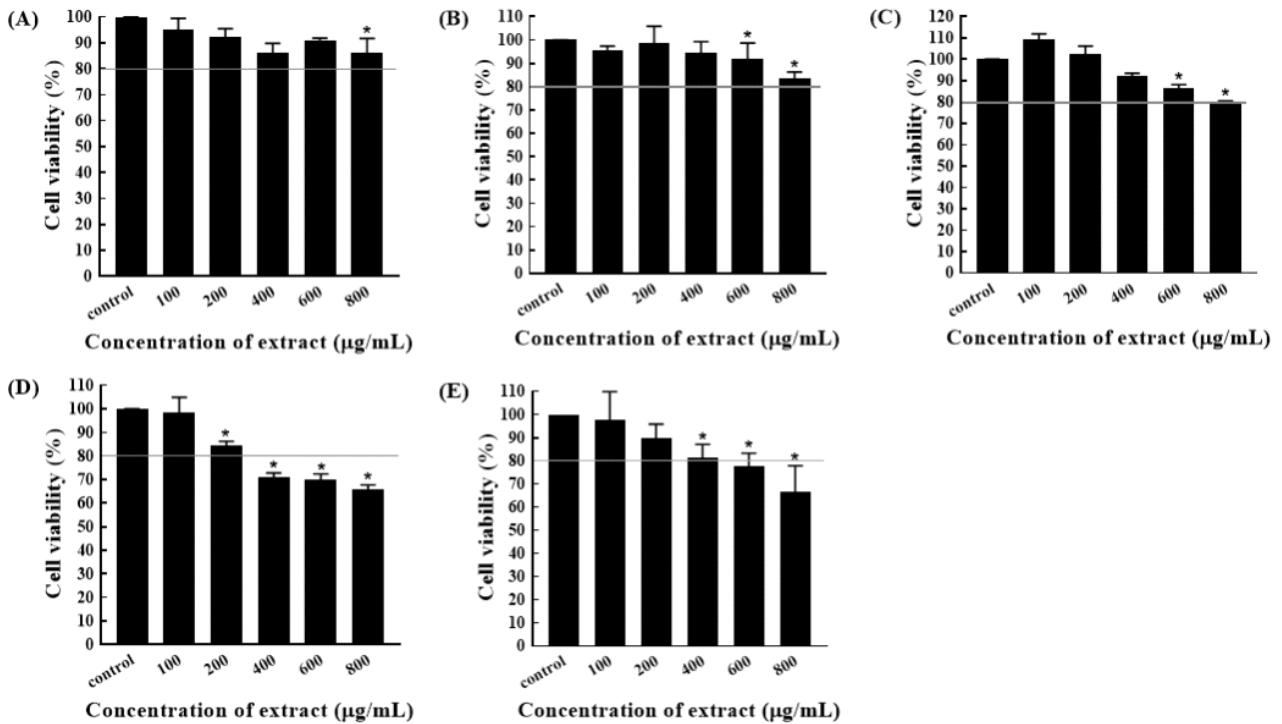


Fig. 2. Cell viability of RAW 264.7 cells treated with (A) methanol, (B) ethanol, (C) acetone, (D) water, and (E) juice extracts from persimmon (*D. kaki* T. cv. Cheongdo-Bansi).

The symbol (*) indicates the significant difference between control and extract treatments by t-test ($p < 0.05$).

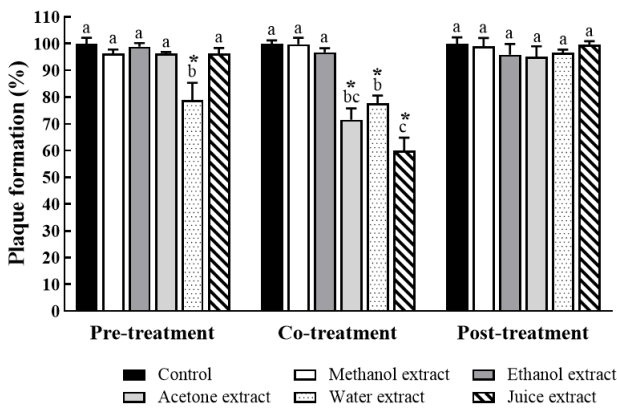


Fig. 3. Antiviral effects of persimmon (*D. kaki* T. cv. Cheongdo-Bansi) extracts on murine norovirus.

The symbol (*) indicates the significant differences between control and each extract treatment by t-test ($p < 0.05$). The letter (a-c) indicates the significant differences among extract treatments at the same time period by one-way ANOVA ($p < 0.05$). The concentration of methanol, ethanol, acetone, water, and juice extracts were 800, 800, 600, 200, and 400 µg/mL, respectively.

농도는 각각 $96.19 \pm 1.59\%$ 와 0.29 ± 0.19 log PFU/mL, $98.45 \pm 1.33\%$ 와 0.11 ± 0.07 log PFU/mL, $96.35 \pm 0.53\%$ 와 0.27 ± 0.03

log PFU/mL, $82.40 \pm 6.64\%$ 와 1.65 ± 0.43 log PFU/mL, $96.26 \pm 2.05\%$ 와 0.27 ± 0.06 log PFU/mL로 나타났다. 특히, 물 추출물 처리구에서는 노로바이러스의 플라크 형성과 감소된 농도는 약 82%와 1.65 log PFU/mL로 대조구 대비 유의적으로 감소되는 효과를 보여 주었으나($p < 0.05$), 메탄올, 에탄올, 아세톤 추출물 및 착즙물 처리구에서는 유의적인 차이가 없었다($p < 0.05$). 감 추출물과 착즙물의 탄닌 함량(Table 2)은 착즙물 > 아세톤 추출물 > 물 추출물 > 에탄올 추출물 > 메탄올 추출물 순이었으나, 본 연구의 결과는 물 추출물 처리구에서 유의적으로 가장 높았으며, 다른 추출물에서는 거의 효과가 없는 것으로 나타났다. 탄닌 함량과 항바이러스의 비례적 상관관계에 관해 일부 연구(Fukuchi 등, 1989; Kammimoto 등, 2014)가 보고되긴 하였으나, 이들 모두 pre-treatment 시점이 아닌 co-treatment 시점에서의 효과 검증 결과를 토대로 한 것이므로 본 연구 결과와 상관성은 없다고 사료된다. 즉, pre-treatment는 감 추출물과 착즙물이 노로바이러스와 결합하는 RAW 264.7 세포의 receptor에 미치는 영향을 검토하는 것으로 물 추출물이 세포의 receptor에 영향을 미쳐 노로바이러스의 결합을 억제함으로써 항노로바이러스 효과를 갖는 것으로 사료된다(Lee 등, 2011).

Table 3. Reduction of murine norovirus titer (log PFU/mL) after persimmon (*D. kaki* T. cv. Cheongdo-Bansi) extracts treatment

Extract	Pre-treatment	Co-treatment	Post-treatment
Methanol	0.29±0.19 ^{1) b2)}	0.02±0.17 ^d	0.07±0.16 ^a
Ethanol	0.11±0.07 ^b	0.25±0.10 ^d	0.30±0.28 ^a
Acetone	0.27±0.03 ^b	2.14±0.20 ^b	0.37±0.30 ^a
Water	1.65±0.43 ^a	1.69±0.16 ^c	0.25±0.19 ^a
Juice	0.27±0.06 ^b	2.96±0.16 ^a	0.04±0.03 ^a

¹⁾Data was expressed in log plaque forming units/mL. Values are mean±SD (n=3).

²⁾The letters (^{a-d}) indicate significant difference within column by one-way ANOVA (p<0.05).

청도반시 추출물 및 착즙물을 노로바이러스에 동시에 접종(co-treatment)한 결과, 아세톤 추출물, 물 추출물, 착즙물의 처리구에서 노로바이러스 형성율은 각각 대조구 대비 71.50±4.24%, 77.62±2.92%, 59.76±2.36%로 나타났으며, 감소된 노로바이러스 농도는 각각 2.14±0.20 log PFU/mL, 1.69±0.16 log PFU/mL, 2.96±0.16 log PFU/mL로 유의적인 감소를 보여주었다(p<0.05). 반면, 메탄올과 에탄올 추출물 처리구는 대조구 대비 유의적인 차이를 나타내지 않았으므로 항노로바이러스 효과가 확인되지 않았다. 본 연구에서 가장 높은 탄닌 함량을 보인 착즙물 처리구에서 유의적으로 높은 항노로바이러스 효과를 나타냈으며, 이는 기존의 연구들(Fukuchi 등, 1989; Kammimoto 등, 2014)의 결과와 일치하는 결과를 보여주고 있다. Fukuchi 등(1989)은 co-treatment 시점에서 탄닌(10 µg/mL) 처리구가 herpes simplex virus (HSV-1)를 3 log PFU/mL 이상 저해시켰고, 처리된 탄닌이 세포와 바이러스의 흡착을 직접적으로 저해함으로써 항바이러스 효과를 나타낸다고 보고하였다. Ueda 등(2014)은 co-treatment 시점에서 감 착즙물 처리구가 influenza virus의 감염을 약 5.5 log PFU/mL 저해시켰으며, 이는 감 착즙물의 탄닌이 influenza virus의 단백질과 상호작용하여 바이러스와 세포의 흡착을 저해한다고 보고하였다. 본 연구에서는 감 추출물 및 착즙물의 탄닌 함량에 따라 항바이러스 효과의 유의적인 차이를 보여주었으므로 탄닌이 바이러스가 세포로 흡착하는 것을 저해하는 것으로 예측할 수 있다.

이에 비해, 바이러스 접종 이후 청도반시 추출물 및 착즙물을 처리(post-treatment)한 결과, 메탄올, 에탄올, 아세톤, 물 추출물 및 착즙물의 처리구에서 노로바이러스 플라크 형성율과 감소된 농도는 각각 99.04±3.06%와 0.07±0.16 log PFU/mL, 95.86±4.00와 0.30±0.28 log PFU/mL, 95.15±3.85%와 0.37±0.30 log PFU/mL, 96.64±1.12%와 0.25±0.19 log PFU/mL, 99.32±1.39%와 0.04±0.03 log PFU/mL로 확인되었다. 감 추출물과 착즙물 모두 post-treatment 시점에서 노로바이러스 농도의 감소는 보였으나 대조구 대비 유의적인 차

이는 나타나지 않았다. 이는 탄닌(10 µg/mL)의 post-treatment가 HSV-1에 대해 항노로바이러스 효과를 보이지 않았다는 선행 연구와 유사한 경향을 보인다(Fukuchi 등, 1989).

현재까지 국제 저명 학술지에 감 추출물 및 착즙물 대상으로 항바이러스 효과 관련된 논문이 극히 제한적이거나, Ueda 등(2013)은 감 착즙물과 MNV를 동시에 접종한 결과, MNV의 농도가 대조구 대비 4.3 log PFU/mL 감소되었고, 본 연구의 결과와 동일하게 감 착즙물이 노로바이러스와 세포와의 결합을 저해함으로써 항노로바이러스 효과를 나타냄을 보고하고 있다. 그 외, Su 등(2011)의 연구에서는 포도 씨 에탄올 추출물을 MNV와 동시에 접종한 결과, MNV의 농도가 0.82-1.73 log PFU/mL 감소하는 효과를 확인하였다. 또한, Lee 등(2016)은 복분자 씨 에탄올추출물의 항노로바이러스 효과를 pre-treatment, co-treatment, post-treatment로 검증한 결과, MNV의 농도가 각각 3.03 log PFU/mL, 3.93 log PFU/mL, 3.07 log PFU/mL 감소됨을 확인하였다. 따라서, 청도반시 물 추출물과 아세톤 추출물 그리고 착즙물에서 포도 씨 에탄올 추출물 및 복분자 에탄올 추출물의 항노로바이러스 효과와 비견할만한 플라크 형성 감소를 확인할 수 있었다. Kammimoto 등(2014)의 연구에서는 co-treatment 시점에서 감 착즙물에 의해 MS2 phage가 약 99.9% 감소되었고, 인체 노로바이러스에도 90%의 감소율을 보여주었다. 또한, Li 등(2012)의 연구에서는 co-treatment 시점에서 포도 씨 추출물에 의해 MNV에서는 99.9%, 인체 노로바이러스에서는 99%의 감소율을 보여주었다. Surrogate로 사용된 MS2 phage 및 MNV와 인체 노로바이러스의 저감화에 대해 수치적인 차이는 보였으나, 항노로바이러스 효과 자체에는 동일한 경향을 보여주었다. 따라서, 본 연구에서 MNV에 대해 효과를 보인 감 추출물 및 착즙물은 인체 노로바이러스에서도 항노로바이러스 효과를 보여줄 수 있을 것으로 예측된다. 이는 청도반시 추출물 및 착즙물을 대상으로 항노로바이러스 대응 기능성 소재로서의 응용가능성을 제시하였다.

요 약

청도반시의 향노로바이러스 효과를 검증하기 위해 메탄올, 에탄올, 아세톤, 물 추출물 및 착즙물을 제조하여 각각의 수율과 탄닌 함량을 분석한 결과, 수율은 메탄올 추출물 > 물 추출물 > 에탄올 추출물 > 아세톤 추출물 > 착즙물 순인 반면, 탄닌 함량은 착즙물 > 아세톤 추출물 > 물 추출물 > 에탄올 추출물 > 메탄올 추출물의 순으로 상반되는 결과를 보여주었다. MTT assay를 통한 세포 생존율 결과를 토대로 메탄올과 에탄올은 각각 800 µg/mL, 아세톤은 600 µg/mL, 물 추출물 및 착즙물은 200 µg/mL와 400 µg/mL로 항바이러스 효과 검증을 위한 최종 농도로 결정하였다. MNV에 대한 향노로바이러스 효과를 time-of-addition assay로 분석한 결과, 바이러스 접종 전 추출물 및 착즙물을 세포에 처리한 pre-treatment에서 물 추출물 처리구가 향노로바이러스 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 추출물 및 착즙물과 바이러스를 동시에 접종한 co-treatment에서 아세톤, 물 추출물 및 착즙물의 처리구의 플라크 형성율이 각각 71.50±4.24%, 77.62±2.92%, 59.76±2.36%로 나타났으며, 2.14±0.20 log PFU/mL, 1.69±0.16 log PFU/mL, 2.96±0.16 log PFU/mL로 유의적인 노로바이러스 농도 감소 효과를 보여 주었다. 그러나 바이러스 접종 이후 추출물 및 착즙물을 처리한 post-treatment에서는 5가지 추출물 및 착즙물의 노로바이러스 플라크 형성율 및 감소된 농도가 95.15-99.32%와 0.04-0.37 log PFU/mL로 노로바이러스 농도의 감소는 보였으나, 대조구 대비 유의적인 차이를 나타내지는 않았다. 감 추출물 및 착즙물이 직접적으로 MNV에 미치는 영향을 검토한 co-treatment 결과에서는 탄닌 함량에 따라 높은 향노로바이러스 효과를 보여주었다. 결론적으로 감 착즙물의 경우, 추출 수율은 낮았으나, 탄닌 함량과 향노로바이러스 효과는 가장 높게 나타남을 확인할 수 있었다. 따라서, 향후 추가적인 연구를 통해 청도반시 착즙물의 향노로바이러스 대응 기능성 소재로서의 활용 가능성을 부각시킬 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2020년도 청도반시 향균, 항바이러스 효과 검증 학술연구용역에 의하여 수행되었습니다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Jaemin Choe <https://orcid.org/0000-0003-1393-7516>
Mi-Kyung Park <https://orcid.org/0000-0003-1182-6046>

References

- Akter MS, Ahmed M, Eun JB. Solvent effects on antioxidant properties of persimmon (*Diospyros kaki* L. cv. Daebong) seeds. *Int J Food Sci Technol*, 45, 2258-2264 (2010)
- Arakawa H, Takasaki M, Tajima N, Fukamachi H, Igarashi T. Antibacterial activities of persimmon extracts relate with their hydrogen peroxide concentration. *Biol Pharm Bull*, 37, 1119-1123 (2014)
- Bian LL, You SY, Park J, Yang SJ, Chung HJ. Characteristics of nutritional components in astringent persimmons according to growing region and cultivar. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 44, 379-385 (2015)
- Bitler EJ, Matthews JE, Dickey BW, Eisenberg JNS, Leon JS. Norovirus outbreaks: A systematic review of commonly implicated transmission routes and vehicles. *Epidemiol Infect*, 141, 1563-1571 (2013)
- Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/norovirus/trends-outbreaks/worldwide.html> (accessed February 2020)
- Greening GE, Cannon JL. Human and animal viruses in food (including taxonomy of enteric viruses). In: *Viruses in Foods*, Goyal (Editor), Springer, New York, NY, USA, p 5-57 (2016)
- Fukuchi K, Sakagami H, Okuda T, Hatano T, Tanuma SI, Kitajima K, Inoue Y, Inoue S, Ichikawa S, Nonoyama M, Konno K. Inhibition of herpes simplex virus infection by tannins and related compounds. *Antiviral Res*, 11, 285-297 (1989)
- Hirneisen KA, Kniel KE. Comparing human norovirus surrogates: Murine norovirus and Tulane virus. *J Food Prot*, 76, 139-143 (2013)
- Iwasawa A, Ayaki M, Niwano Y. Cell viability score (CVS) as a good indicator of critical concentration of benzalkonium chloride for toxicity in cultured ocular surface cell lines. *Regul Toxicol Pharmacol*, 66, 177-183 (2013)
- Jang IC, Jo EK, Bae MS, Lee HJ, Jeon GI, Park E, Yuk HG, Ahn GH, Lee SC. Antioxidant and antigenotoxic activities of different parts of persimmon (*Diospyros*

- kaki* cv. Fuyu) fruit. J Med Plants Res, 4, 155-160 (2010)
- Joshi SS, Su X, D'Souza DH. Antiviral effects of grape seed extract against feline calicivirus, murine norovirus, and hepatitis a virus in model food systems and under gastric conditions. Food Microbiol, 52, 1-10 (2015)
- Kamimoto M, Nakai Y, Tsuji T, Shimamoto T, Shimamoto T. Antiviral effects of persimmon extract on human norovirus and its surrogate, bacteriophage MS2. J Food Sci, 79, M941-M946 (2014)
- Kim BO, Cha WS, Ahn DH, Cho YJ. The change on cell wall composition and physiological characteristic of astringent persimmon fruits by gamma irradiation. Korean J Food Preserv, 22, 512-519 (2015)
- Kim HJ, Park TS, Jung MS, Son JH. Study on the anti-oxidant and anti-inflammatory activities of sarcocarp and calyx of persimmon (Cheongdo Bansi). J Appl Biol Chem, 54, 71-78 (2011)
- Kim YH, Lee SW, Kim HS, Lee SH, Song MK, Sung YC, Lee JJ. Inhibitory activities of tannins against reverse transcriptase and HIV-1 replication. Yakhak Hoeji, 39, 560-564 (1995)
- Kim YW, You HJ, Lee S, Kim B, Kim DK, Choi JB, Kim JA, Lee HJ, Joo IS, Lee JS, Kang DH, Lee G, Ko GP, Lee SJ. Inactivation of norovirus by lemongrass essential oil using a norovirus surrogate system. J Food Prot, 80, 1293-1302 (2017)
- Lee JH, Bae SY, Oh M, Seok JH, Kim S, Chung YB, K GG, Mun JY, Chung MS, Kim KH. Antiviral effects of black raspberry (*Rubus coreanus*) seed extract and its polyphenolic compounds on norovirus surrogates. Biosci Biotechnol Biochem, 80, 1196-1204 (2016)
- Lee MH, Lee BH, Jung JY, Cheon DS, Kim KT, Choi C. Antiviral effect of Korean red ginseng extract and ginsenosides on murine norovirus and feline calicivirus as surrogates for human norovirus. J Ginseng Res, 35, 429-435 (2011)
- Li D, Baert L, Zhang D, Xia M, Zhong W, Van Coillie E, Jiang X, Uyttendaele M. Effect of grape seed extract on human norovirus GII. 4 and murine norovirus 1 in viral suspensions, on stainless steel discs, and in lettuce wash water. Appl Environ Microbiol, 78, 7572-7578 (2012)
- Ministry of Food and Drug Safety. https://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/healthyfoodlife/foodPoisoningStat.do?menu_no=3724&menu_grp=MENU_NEW02 (accessed February 2020)
- Patel MM, Hall AJ, Vinje J, Parashar UD. Noroviruses: A comprehensive review. J Clin Virol, 44, 1-8 (2009)
- Price ML, Van Scoyoc S, Butler LG. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. J Agric Food Chem, 26, 1214-1218 (1978)
- Randazzo W, Falco I, Aznar R, Sanchez G. Effect of green tea extract on enteric viruses and its application as natural sanitizer. Food Microbiol, 66, 150-156 (2017)
- Richards GP. Critical review of norovirus surrogates in food safety research: Rationale for considering volunteer studies. Food Environ Virol, 4, 6-13 (2012)
- Seo DJ, Jeon SB, Oh H, Lee BH, Lee SY, Oh SH, Jung JY, Choi C. Comparison of the antiviral activity of flavonoids against murine norovirus and feline calicivirus. Food Control, 60, 25-30 (2016)
- Sim HJ, Kang JR, Kang MJ, Choi MH, Suh HJ, Shin JH. Changes in quality characteristic of immature flat persimmon (*Diospyros kaki* Thunb) during heat treatment aging. Korean J Food Preserv, 23, 301-309 (2016)
- Su X, D'Souza DH. Grape seed extract for control of human enteric viruses. Appl Environ Microbiol, 77, 3982-3987 (2011)
- Su X, Howell AB, D'Souza DH. Antiviral effects of cranberry juice and cranberry proanthocyanidins on foodborne viral surrogates-A time dependence study *in vitro*. Food Microbiol, 27, 985-991 (2010)
- Sung SH, Kim KH, Jeon BT, Cheong SH, Park JH, Kim DH, Kwon HJ, Moon SH. Antibacterial and antioxidant activities of tannins extracted from agricultural by-products. J Med Plants Res, 6, 3072-3079 (2012)
- Trivedi TK, Desai R, Hall AJ, Patel M, Parashar UD, Lopman BA. Clinical characteristics of norovirus-associated deaths: A systematic literature review. Am J Infect Control, 41, 654-657 (2013)
- Ueda K, Kawabata R, Irie T, Nakai Y, Tohya Y, Sakaguchi T. Inactivation of pathogenic viruses by plant-derived tannins: Strong effects of extracts from persimmon (*Diospyros kaki*) on a broad range of viruses. PloS One, 8, e55343 (2013)
- Yoo SA, Kim OK, Nam DE, Kim Y, Baek H, Jun W, Lee J. Immunomodulatory effects of fermented *Curcuma longa* L. extracts on RAW 264.7 cells. J Korean Soc Food Sci Nutr, 43, 216-223 (2014)