

최 중
연구보고서

포도함유 항산화성분의 생리활성 구명과
기능성 가공식품 개발

Investigation of the physiological activity of
grapes and development of the functional
processed food by use of grapes containing
antioxidant ingredients

연구기관
호서대학교
공주대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “포도함유 향산화성분의 생리활성 구명과 기능성 가공식품 개발”
에 관한 연구과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 8월 23일

주관연구기관명 : 호서대학교

총괄연구책임자 : 정 혜 경

세부연구책임자 : 정 혜 경

연 구 원 : 송 은 승

연 구 원 : 강 명 화

연 구 원 : 최 창 숙

연 구 원 : 이 지 현

연 구 원 : 박 수 진

연 구 원 : 유 미 애

협동연구기관명 : 공주대학교

협동연구책임자 : 박 원 중

연 구 원 : 이 승 기

연 구 원 : 김 상 태

요 약 문

I. 제 목

포도함유 항산화성분의 생리활성 구명과 기능성 가공식품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 사회생활양식의 구미화와 고령화에 따라 종래에는 그다지 문제가 되지 않았던 고콜레스테롤 혈증, 고중성지방혈증이 우리나라 뿐 아니라 일본 등 아시아 지역에서도 문제가 되고 있다. 고지혈증은 죽상동맥경화증을 일으켜 생명에 위협이 되고 있고 췌장염 등의 합병증을 일으킬 수 있으나 프로브콜이나 노바스틴 등의 스타틴계열의 약품이 치료에 주로 사용되고 있으나 부작용을 유발시켜 장기간 복용할 수 없는 실정에 있다. 이미 선진국에서는 혈청콜레스테롤을 저하시키려는 노력에 의해 심혈관계 질환에 의한 사망률이 감소하고 있으나 우리나라에서는 오히려 급속히 증가하고 있어 국민들의 삶의 질을 향상시키기 위해 치료와 함께 예방적 차원에서 고지혈증을 예방할 수 있는 기능성 식품의 개발이 절실히 요구되고 있다. 포도에는 resveratrol, catechin 및 anthocyanin과 같은 항산화 성분이 함유되어져 있어 이들 성분들이 생체내에서 동맥경화증 및 심혈관계 질환과 같은 순환기계 질환을 예방하는 것으로 밝혀졌으나 가공식품의 개발은 부진한 상황이다. 특히, 포도씨에는 linoleic acid(70%)과 oleic acid(20%)가 다량 함유되어져 있고, 올리브유와 지방질 조성이 비슷하여 양질의 기름으로 알려져 있으며, catechin 성분도 함유되어져 있어 수렴, 해독, 살균 및 방부작용

이 있는 것으로 알려져 있으나 직접적으로 *in vivo* 수준에서 포도씨가 암, 동맥경화, 항산화 작용에 미치는 영향에 관한 과학적인 증명은 미흡한 실정이다. 이에 본 연구에서는 포도와 자생머루를 이용한 기능성 가공식품을 개발하여 포도의 활용도를 높이고 고부가가치 창출을 위한 방안으로 과즙뿐 아니라 씨 및 과피와 같은 부산물에서 기능성 물질을 추출 활용하여 가공기술 개발 및 생리활성 구명으로 고지혈증 예방 기능성 식품을 개발하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 포도부산물의 이화학적 특성 및 항산화 효과 구명

가. 포도씨 기름의 이용

나. 추출조건에 따른 포도과피의 이화학적 특성

다. 포도씨의 항산화 효과

라. 포도씨유가 흰쥐의 체내 지질대사 및 항산화능에 미치는 영향

마. 이소플라본과 포도씨유의 보충이 난소절제 흰쥐의 혈중지질 패턴 및 골격강도에 미치는 영향

2. 포도부산물 추출물의 *in vivo* 에서의 항산화 및 항혈전 효과

가. 포도씨 추출물의 혈소판 응집억제활성

나. 고콜레스테롤 혈증 토끼에서 포도씨와 과피 추출물이 미치는 영향

3. 머루 포도씨 및 과피의 항산화 효과 및 apo E 결핍 마우스에 미치는 항동맥경화 효과 구명

가. *In vitro*에서의 머루포도 씨와 과피 추출물의 항산화 효과

나. *In vivo*에서의 머루포도 씨와 과피 추출물이 apoE 결핍마우스의 지질패턴에 미치는 영향

4. 농산부산물인 포도씨를 이용한 기능성 제품 개발

- 가. 포도씨유의 encapsulation 및 분말화
- 나. 포도씨 기름 화장품과 비누제조
- 다. 포도씨의 음료화 및 응용
- 라. 포도씨 가루를 이용한 제빵특성

IV. 연구개발 결과

1. 연구개발 결과

가. 폐기화 되고 있는 포도씨를 대체 식용유지 자원으로 개발하고자 포도씨에 함유되어 있는 기름의 최적 추출방법을 확립하고자 하였다. Campbell early 포도씨의 일반 성분 분석 결과 압착 법으로 추출한 기름의 수율은 분쇄 후 볶아 증숙 했을 때 그리고 용매 추출시에는 ether로 48시간 정치 추출했을 때 가장 높은 수율을 나타냈다. 이에 추출수율을 높이기 위해서는 수분 10-12%의 포도씨를 95-100℃에서 20분 정도 볶아 처리하고, 분쇄 한 후 $0.8-0.9\text{kg} \cdot \text{f}/\text{cm}^2$ 의 압력으로 10분 정도 증숙 했을 때 기호도도 높은 포도씨유를 추출할 수 있는 조건인 것으로 나타났다.

나. 포도씨를 이용한 새로운 형태의 건강식품 또는 가공 식품화를 위해 씨앗의 압축 강도를 포함한 기계적, 물리적 특성을 구명하고, 이러한 특성을 기준으로 포도씨앗 가공이 가능한 기계적 시스템의 개발 가능성에 대해서 검증하였다. 품종별 함수율은 머루포도가 가장 높게 나타났고, 생물학적 강도는 열처리한 포도씨가 가장 강하였다. 하중의 재하속도에 따른 압축강도, 항복강도 및 극한강도의 변화사이에 유의성을 찾기는 쉽지 않았지만 일반적으로 압축강도의 변화와 마찬가지로 재하속도가 빠를수록 강도의 크기가 강하다는 것을 알 수 있었다.

다. 켈벨과 거봉의 과피색소 추출의 최적용매를 결정하기 위하여, ethanol에 0.1%농도의 여러 산성 용매를 첨가, 추출용매의 종류를 달리하여 포도과피 추출물의 이화학적 특성 및 항산화 효과에 대해 조사하였다. 켈벨은 산도가 낮아질수록 anthocyanin 색소의 함량이 높아졌고, citric acid 0.1% 첨가 용매처리에서 당도가 가장 높았다. 켈벨과피에는 glucose나 fructose 양의 비율이 비슷한 반면 거봉과피에는 fructose 양이 대부분을 차지했다. 항산화 활성에서는 0.1% HCl 용매조건에서 활성이 높았지만, 0.1% citric acid의 활성도 높은 것으로 나타났다.

라. 국내에서 재배되고 있는 7품종의 포도씨로 부터 이화학적 특성 및 유효성분의 함량을 분석한 결과 거봉개량종이 페놀함량이 가장 높았고 항산화성분으로 알려져 있는 resveratrol은 머루, 거봉개량, 켈벨에서 발견되었다. 또한, 전자공여능, hydroxyl radical, hydrogen radical, xanthine oxidase 저해활성 등을 통해 포도씨의 항산화 활성을 측정된 결과 ethyl acetate 층에서 가장 활성이 높은 것으로 나타났다.

마. 최적 추출조건으로 추출된 포도씨유와 일반 옥수수유 그리고 들기름이 체내 지질 패턴 및 항산화 효소활성계에 미치는 영향을 비교하였다. 포도씨유의 급여가 혈청 내 총지질, 총콜레스테롤, 중성지방 농도에는 유의적인 영향을 미치지 못했지만, HDL/LDL ratio는 포도씨유의 급여로 인해 상승하는 것으로 나타났다. 또한, 포도씨유 급여로 인해 체내 GPx 활성과 간조직내 P/S ratio도 증가되는 것으로 나타났다.

바. 이소플라본과 포도종실유를 보충시킴으로써 난소절제 흰쥐의 지질패턴과 골격강도에 미치는 영향을 연구한 결과는 다음과 같다. 이소플라본과 포도종실유를 함께 보충함으로써 골격강도 및 혈청 지질패턴에 미치는 상승작용은 없었지만, 포도종실유의 급여로 인해 혈청 총콜레스테롤, 중성지방 그리고 LDL 콜레스테롤 농도를

낮추고, GSH 함량을 높이는 것으로 나타났다.

사. 토끼 세정 혈소판 부유액을 이용하여 collagen, thrombin, arachidonic acid 및 PAF로 유도한 혈소판 응집에 대한 억제활성을 측정하였다. 측정결과 항산화활성이 높았던 ethyl acetate 층에서 높은 혈소판 응집억제활성을 나타냈고, ethyl acetate 층에서 분리한 소분획물과 2차 분획물에서도 높은 혈소판 응집억제활성을 나타냈다.

아. 콜레스테롤 식이로 유도된 고콜레스테롤 혈증 토끼에서 포도씨와 과피 추출물이 지질패턴 및 항산화효소활성계에 미치는 영향을 연구하였다. 콜레스테롤 식이 군에 비해 포도씨와 과피 추출물 급여시 혈청 내 중성지방 농도를 유의적으로 저하시켰고, 체외로 배출되는 콜레스테롤 농도를 높이는데 효과적인 것으로 나타났다. 또한, 포도씨 추출물은 산화된 glutathione을 환원형 glutathione으로 전환시켜주며, 산화적 스트레스로 생성된 H_2O_2 를 무독화 시키는데 효과가 뛰어난 것으로 나타났다. 포도과피가루는 환원형 glutathione함량과 CAT 그리고 GPX활성에는 미치는 영향은 낮았지만, 간조직내 GST활성을 높여 산화적 손상으로 발생한 지질과산화물(MDA)과 GSH 결합을 촉진시키는데 관여하여 혈청 내 지질과산화물 형성을 낮추는 것으로 나타났다.

자. 머루포도씨와 과피를 추출조건에 따른 항산화 효과를 측정한 결과, MeOH 보다는 70% EtOH를 78°C에서 추출했을 때 페놀함량 및 항산화 활성이 높았고, 과피는 100% EtOH를 이용 78°C에서 추출했을 때 항산화 활성이 높은 추출물을 얻을 수 있었다. 이 머루포도 씨와 과피 추출물을 가지고 유전적으로 동맥경화증을 가지고 있는 apo E 결핍 마우스에 경구투여 한 결과 한 달 후부터 머루포도 씨 추출물 경구투여군에서 혈장 내 총콜레스테롤과 중성지방 농도가 낮아지는 경향을 나타냈다.

차. 압착법으로 추출한 포도씨 기름을 공업적 정제과정 즉, 탈검을 수화법으로, 탈산은 수산화 나트륨법으로 탈색은 가열탈색법, 탈취는 진공탈취로 실시하여 시료로 하였고, 포도씨 캡슐화는 연질캡슐에 0.1% tocopherol를 첨가하여 1g 단위로 하루 5g을 섭취할 수 있도록 제조하였다. 또한, 포도씨 기름, sorbitol, mono glyceride, 제2인산 나트륨, sodium silico aluminate, lecithin을 혼합하고, 유화된 기름을 균질화 한 후 spray drier로 분말화 시켜 포도씨 유화 기름의 분말을 생산하였다.

카. 포도씨 기름의 화장품과 비누를 제조한 결과 화장품에서는 형태에 따라 밀크크림에 3.5%, 영양크림에 5%, 마사지 크림에 9.5%, 바디오일에 10%를 첨가하여 시제품을 만들었다. 비누는 포도씨 기름 200g당 가성소다 약 27g정도를 첨가하여 경성비누로 제조하는데 pH 7-8정도가 가장 적합한 결과를 얻었다. 포도씨 기름 비누는 피부보습효과가 뛰어났고, 피부염 등의 부작용은 5% 이내 외로 적은 편이다. 시중 비누에 비교해 표면장력과 세정력은 비슷한 경향이였다.

타. 포도씨의 볶음차 제조는 수분함량이 15%정도의 포도씨를 100℃로 5분 간격으로 처리한 결과 10분 처리한 것이 관능평가 및 색도변화가 좋았고, 음료화를 위한 색도변화 측정에서는 가열후의 1ℓ에 20g을 기준으로 10-20분간 처리가 가장 좋았다. 포도씨 볶음차 추출물의 혼합음료에서의 최적 조건은 Type I은 석류 음료의 특성을 살리면서 추출물을 2% 첨가하는 것이 기능성을 강조한 제품으로 적합했고, Type II는 오가피음료의 조건에 포도씨 추출물을 5%까지 첨가시 각 특성에 맞는 상품성이 인정되었다.

파. 포도씨 첨가제빵에서 파리노그래프에서는 1.5% 첨가 까지가 비교적 첨가할 수 있는 것으로 나타났고, 익스텐소그래프에서는 90분, 135분이 표준구에 비해 낮은 것을 나타내어 포도씨 가루의 흡습력, 식이 섬유 물질의 혼입에 의한 팽창력의 감소를 의미하는 것으로 hard류의 제빵에서는 좋은 texture를 형성시킬 수 있는 요인

으로 보였다. 아밀로그람에서는 점도를 측정된 결과 제빵에서 포도씨 가루를 첨가할 수 있는 양은 최대 2% 정도가 가장 적당한 것으로 나타났다.

2. 활용에 대한 건의

가. 포도관련 제품의 가공생산 중에 발생하는 대부분의 포도씨와 과피와 같은 포도부산물을 기능성 식품 및 제품 소재로써 활용함으로써 환경친화적인 대상임을 강조한다.

나. 포도씨와 과피로부터 항산화 물질로 알려져 있는 anthocyanin, resveratrol 그리고 catechin 류 등을 안정성이 높고 활성이 높은 추출물을 추출해 낼 수 있는 방법을 통해, 동맥경화의 예방과 치료 효과가 탁월한 건강 기능성 식품 소재 및 의약품의 소재로써 활용함으로써 포도부산물의 활용가치를 상승시킨다.

다. 포도씨유의 최적추출조건, 캡슐화, 화장품, 비누, 음료화와 같은 관련제품에 대한 특허를 출원하고, 이러한 기술을 기업에 이전할 수 있도록 한다.

라. 포도에 함유되어 있는 항산화 성분 및 고지혈증 그리고 항동맥경화 효과에 대한 분석결과를 홍보하여 포도의 안정적 대량 생산을 통한 포도농가 소득 증대뿐만 아니라 포도소비를 증대시킨다.

SUMMARY

I. Title

Investigation of the physiological activity of grapes and development of the functional processed food by use of grapes containing antioxidant ingredients

II. Purpose and Significance

With westernization and aging of the social life style, hypercholesterolemia and hypertriglycemia, which were not so serious in the past, have become serious problems in the Asian countries including not only Korea, but also Japan. Hyperlipidemia can be developed to atherosclerosis, which can cause a complication such as pancreas cancer. Statin-class medicine like probucol or novarstin is mainly used for treatment, but long-term use of it can induce side effects. In the advanced countries, death from cardiovascular diseases has been quite much decreased by the virtue of the effort to lower serum cholesterol, but in Korea, it is rapidly increasing so in order to improve people's life quality, development of functional foods which can prevent hyperlipidemia, not only a cure, is highly required.

Grapes contain antioxidant ingredients such as resveratol, catechins and anthocyanin, which are found to prevent atherosclerosis and coronary heart disease in human body, but development of processed foods using grapes has made little progress. Especially, grape seeds have a lot of linoleic acid (70%) and oleic acid

(20%), and the composition ratio of olive oil and fat contained in grape seeds is similar so grape seeds can become good oil. The grape seeds also have catechin which is known to have the functions of convergence, poison-counteracting, sterilization and antiseptics. However, the influence of the grape seeds on cancer, atherosclerosis and antioxidant activity has not been scientifically proved yet (in the *in-vivo* studies).

Therefore, this study intends to develop functional processed foods by use of grapes and wild grapes in order to increase practical use of them and create highly-added values. Specifically, it purports to develop functional foods, not only juice, which can prevent hyperlipidemia by extracting functional ingredients from dregs like seed and peel, by developing processing technology, and by investigating physiological activities.

III. Scope of the research

1. Investigation of the physicochemical characteristics and antioxidant effects of grape dregs
 - a. Utilization of grape seed oil
 - b. Physicochemical characteristics of grape peel according to extraction condition
 - c. Antioxidant effects of grape seed
 - d. Effects of grape seed oil on lipid profiles and antioxidant ability of rats
 - e. Effects of isoflavone and grape seed oil on blood lipid profiles and bone strength of ovariectomized female rats

2. Antioxidant and anti-thrombus effects of grape seed extracts (in the *in-vivo* study)

- a. Grape seed extract's inhibitory activity on blood platelet aggregability
 - b. Antioxidant effects of grape seed extracts by solvent (in the *in-vitro* study)
 - c. Effects of grape seed and peel extracts on hypercholesterolemia-rabbits
3. Investigation of the antioxidant effects of wild grape seed and peel, and of the anti-atherosclerosis effect on mice which are short of apo E
- a. Antioxidant effects of wild grape seed and peel extracts (in the invitro study)
 - b. Effects of wild grape seed and peel extracts on lipid profiles of mice which are short of apo E (in the *in-vivo* study)
4. Development of functional foods by use of grape dregs like seed
- a. Encapsulation and powdering of grape seed oil
 - b. Manufacture of cosmetics and soap by use of grape seed oil
 - c. Manufacture of beverage by use of grape seed and its application
 - d. Bread making by use of grape seed powder

IV. Results and recommendation

1. Results

- a. In order to use grape seeds, which are now being wasted, as a resource for edible oil, this study purported to set up the best way to extract oil from grape seeds.

As a result of analyzing the ingredients of Campbell early grape seeds, yield of oil extracted through expression was highest when the seeds were grinded, parched and steamed, and also when they were settled for 48 hours in ether.

The best condition to increase the extraction yield of grape seed oil was: to parch grape seeds having 10-12% moisture at 95-100°C for about 20 minutes, to grind them, and then, to steam at $0.8-0.9 \text{ kg} \cdot \text{f}/\text{cm}^2$ for about 10 minutes.

- b. This study investigated mechanical and physical characteristics (including compressive strength) of grape seeds in order to develop health food of new type or processed foods by use of grape seeds. Based on the characteristics, it verified if it is possible to develop a mechanical system which can process grape seeds. Wild grape showed the highest moisture content while heat-treated grape seeds showed the highest biological strength. It was not easy to find significance among the changes in compressive strength, yield strength, and ultimate strength by loading rate, but generally, just like the change in compressive strength, the faster the loading rate became, the greater the strength was.

- c. In order to decide the optimum solvent for extraction of Campbell and Kyoho grape peel pigment, several acid solvents of 0.1% concentration were added to ethanol. Using several extraction solvents, this paper investigated physicochemical characteristics and antioxidant effects of grape peel extracts. Campbell had more content of anthocyanin pigment as acidity got lowered, and it showed highest sugar content under the treatment of 0.1% citric acid solvent. Campbell grape peel had a similar amount of glucose and fructose, but Kyoho grape peel mostly had fructose. Their antioxidant activity was high under the condition of 0.1% HCl solvent, but it was found high too under the condition of 0.1% citric acid.

- d. Using the seeds of 7 kinds of grapes cultivated in Korea, this study analyzed their physicochemical characteristics and content of effective ingredients. Improved Kyoho grape had phenol content most, and resveratrol, that is known as an antioxidant ingredient, was found in wild grape, improved Kyoho grape and Campbell grape. In addition, it also measured antioxidant activity of grape seeds through electron donating ability and inhibitor of hydroxyl radical, hydrogen radical, and xanthine oxidase: The antioxidant activity was highest at the ethyl acetate level.
- e. The influences of grape seed oil (extracted under the best condition), general corn oil and perilla oil on lipid profiles and antioxidant enzymes in human body were comparatively analyzed. Grape seed oil didn't have significant effects on total lipid, total cholesterol and triglyceride levels in the serum, but it caused HDL/LDL ratio to go up. It also caused GPx activity in human body and P/S ratio in the liver tissues to increase.
- f. The effects of supplementing isoflavone and grape seed oil on lipid profiles and bone strength of ovariectomized female rats were investigated, the results of which were: It didn't cause the bone strength and the serum lipid profiles to increase, but grape seed oil lowered serum total cholesterol, triglyceride, and LDL cholesterol levels, and increased GSH content.
- g. The inhibitory activity on blood platelet aggregability that was induced by collagen, thrombin, arachidonic acid, and PAF was measured, by use of rabbit washing platelet suspending media. It was found high at the ethyl acetate level that had showed high antioxidant activity, and it was found high too in the

fractions separated from ethyl acetate.

- h. This paper also studied the effects of grape seed and peel extracts on lipid profiles and antioxidant enzymes in hypercholesterolemia-rabbits that were induced by cholesterol diet. Supply of the grape seed and peel extracts significantly lowered the serum triglyceride concentration and it was found effective in increasing the cholesterol concentration discharged out of the body. The grape seed extract was found effective in converting the oxidized glutathione into deoxidized glutathione, and in eradicating H₂O₂ created by oxidative stress. The grape peel powder was found to have small influence on deoxidized glutathione content, CAT and GPX activity, but it increased GST activity in liver tissues, which promoted combination of lipid hydroperoxide (MDA) and GSH, and further, lowered formation of lipid hydroperoxide in the serum.
- i. The antioxidant effects of wild grape seed and peel extracts were investigated according to the extraction conditions. The phenol content and the antioxidant activity were high under the extraction condition of 70% EtOH at 78°C rather than MeOH. When extracted at 78°C with 100% EtOH, grape peel showed high antioxidant activity. In the experiment of giving the wild grape seed and peel extracts to the mice with apo E deficiency suffering from hereditary arteriosclerosis, the total cholesterol and triglyceride level in the serum got lowered from a month later.
- j. The grape seed oil extracted by expression was made into test samples after going through the manual method for degumming, sodium hydroxide treatment

for deoxidation, heating treatment for decoloration, and vacuous treatment for deodorization. For encapsulation of grape seed, 0.1% tocopherol was added to soft capsule so a grape seed capsule was made for dose by 5g. Grape seed oil was emulsified by mixture of sorbitol, mono glyceride, diabetic sodium phosphate, sodium silico aluminate, and lecithin, which was into powder by spray drier.

- j. By adding grape seed oil (3.5% for milk cream, 5% for nourishing cream, 9.5% for massage cream and 10% for body oil), prototypes of cosmetics were made. Hard soap was made by adding anhydrous soda of about 27g per 200g of grape seed oil. Under pH 7-8, the best result was made. The soap made from the grape seed oil was excellent at moisturizing the skin while its side effect like dermatitis was low (less than 5%). Compared with other soaps available in the market, it showed similar surface tension and cleaning power.

- k. In order to make grape seed tea, the grape seeds having 15% moisture were parched at 100°C at 5-minute intervals. The seeds showed good sensory and color when they were treated for 10 minutes. And, its color was best at the time of 10 - 20-minute treatment (on the basis of 20g/1 ℓ). As the best optimum condition for making grape seed tea, in case of type 1, adding 2% extract while maintaining the characteristics of pomegranate beverage was found suitable for functional foods, and in case of type 2, adding 5% grape seed extract to the condition for Ogapy beverage was suitable for good products having each own characteristics.

- l. In the field of grape seed bread making, farinograph showed that it would be

possible to add up 1.5%, and extensograph told that 90-minute and 135-minute treatment needed less, which means decrease of grape seed powder's moisture absorption and tension because of mixture of fibers so grape seed was evaluated good to make good texture for hard type of breads. Amylogram measurement of viscosity showed that maximum 2% would be suitable as addition of grape seed for baking.

2. Suggestions for practical use of grape dregs

- a. To emphasize the products are environment-friendly because they are made of grape dregs like seed and peel that are generated during processing of grape products
- b. To set up the way to extract antioxidant materials like anthocyanin, resveratrol, and catechin from grape seed and peel, and further, to increase the practical use value of grape dregs by utilizing grape seed and peel as materials of health foods and medicines which are remarkably effective in prevention and cure of arteriosclerosis
- c. To apply for patents of the related products like the best optimum extraction condition, encapsulation, cosmetics, soap, beverage, etc. and then, try to transfer the related technologies to enterprises
- d. To increase grape farmers' income and grape consumption through stable mass production of grapes by publicizing the analysis results of antioxidant ingredients contained in grapes and the effects of grapes on hyperlipidemia and anti-atherosclerosis to the public

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	21
Section 1. Purpose and significance of project	22
1. Technical standpoint	22
2. Economic and industrial standpoint	23
3. Social and cultural standpoint	24
4. The present condition and problem of relative technique in domestic and foreign)	24
Chapter 2. Investigation of the physicochemical characteristics and antioxidant effects of grape dregs	26
Section 1. Utilization of grape seed oil.	26
1. Improved method for increasing of the oil yields in grape seed	26
2. Mechanical properties of grape seeds	33
Section 2. Physicochemical characteristics of grape peel according to extraction condition	42
Section 3. The antioxidant activity of grape seed	54
Section 4. The effect of dietary grape seed oil on lipid profiles and antioxidant ability in rats	78
Section 5. The effect of isoflavone and/or grape seed oil supplementation on blood lipid profiles and bone strength in ovariectomized female rats	100
Chapter 3. Antioxidant and anti-thrombus effects of grape seed extracts (in the <i>in-vivo</i> study)	114

Section 1. Grape seed extract's inhibitory activity on blood platelet aggregability	114
Section 2. Antioxidant effect of grape seed extracts different solvents	121
Section 3. The effect of grape and peel extract on hypercholesterolemia-rabbits	130
Chapter 4. Investigation of the antioxidant effects of wild grape seed and peel, and of the anti-atherosclerosis effect on mice which are short of apo E	139
Section 1. The antioxidant effect of wilde grape seed and peel (<i>in vitro</i> study)	139
Section 2. Effects of wild grape seed and peel extracts on lipid profiles of mice which are short of apo E (in the <i>in-vivo</i> study)	148
Chapter 5. Development of functional foods by use of grape dregs like seed	152
Section 1. Encapsulation and powdering of grape seed oil	152
Section 2. Manufacture of cosmetics and soap by use of grape seed oil	157
Section 3. Manufacture of beverage by use of grape seed and its application	161
Section 4. Bread making by use of grape seed powder	166
Chapter 6. Reference	172

목 차

제 1 장. 서 론	21
제 1 절 연구개발의 필요성 및 목표	22
1. 기술적 측면	22
2. 경제·산업적 측면	23
3. 사회·문화적 측면	24
4. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점	24
제 2 장. 포도부산물물의 이화학적 특성 및 항산화 효과 구명	26
제 1 절 포도씨 기름의 이용	26
1. 포도씨 기름의 수율 증진을 위한 방법개선	26
2. 포도씨의 기계적 특성	33
제 2 절 추출조건에 따른 포도과피의 이화학적 특성	42
제 3 절 포도씨의 항산화 효과	54
제 4 절 포도씨유가 흰쥐의 체내 지질대사 및 항산화능에 미치는 영향	78
제 5 절 이소플라본과 포도종실유의 보충이 난소절제 흰쥐의 혈중지질 패턴 및 골격 강도에 미치는 영향	100
제 3 장. 포도부산물물 추출물의 <i>in vivo</i> 에서의 항산화 및 항혈전 효과	114
제 1 절 포도씨 추출물의 혈소판 응집억제활성	114
제 2 절 <i>In vitro</i> 계에서 용매별 포도씨 추출물의 항산화 효과	121
제 3 절 고콜레스테롤 혈증 토끼에서 포도씨와 과피 추출물이 미치는 영향	130
제 4 장. 머루포도 씨 및 과피의 항산화 효과 및 생리활성이 미치는 영향	139

제 1 절 <i>In vitro</i> 에서의 머루포도 씨와 과피 추출물의 항산화 효과	139
제 2 절 <i>In vivo</i> 에서의 머루포도 씨와 과피 추출물이 apo E 결핍마우스의 지질패턴에 미치는 영향	148
제 5 장. 농산부산물인 포도씨를 이용한 기능성 제품 개발	152
제 1 절 포도씨유의 encapsulation 및 분말화	152
제 2 절 포도씨 기름 화장품과 비누제조	157
제 3 절 포도씨의 음료화 및 응용	161
제 4 절 포도씨 가루를 이용한 제빵특성	166
제 6 장. 참고문헌	172

제 1장 서론

최근 각종 성인병 발병의 주요 원인이 식생활임이 밝혀지고, 의약품의 오남용에 따른 부작용이 널리 인식됨에 따라 건강 증진 내지 질병예방을 위한 새로운 접근 방법의 하나로 기능성 식품에 대한 관심이 고조되고 있다. 농산물에 함유되어 있는 항산화 성분은 색소류, 폴리페놀, 플라본 배당체 및 리그난 배당체 등 다양한 형태로 종자 껍질이나 색소 및 식물 표면에 왁스형태로 분포하는데 이들 성분들이 항산화 활성을 나타냄에 따라 약용으로 이용되는 등 매우 중요한 자원으로 인정되고 있으므로 소비 확대와 고부가가치 창출을 위해 기술상의 경쟁력을 키워야 할 때이다. 미국, 유럽 및 일본을 비롯한 선진국에는 포도 과피 중 anthocyanin 및 resveratrol 과 포도씨 중의 catechin 등의 천연 폴리페놀성분이 생체내에서 산화억제를 통한 노화억제 및 동맥경화 예방기능이 있음이 밝혀지고 있다. 특히 대표적 성분인 resveratrol은 동맥경화의 예방과 치료 효과가 탁월하여 건강 기능성 식품 소재 및 의약품으로 개발가능성이 매우 높다. 포도의 부산물인 포도과피 및 포도씨에는 resveratrol, tannin, catechin, epigallocatechin 및 anthocyanin 류의 천연색소가 다량함유 되어져 있기 때문에 효율적으로 활용하는 것은 농산물의 부가가치를 높이고 식품의 고급화 및 다양화 그리고 환경보전적 차원에서 매우 중요하다. 포도에는 resveratrol, catechin 및 anthocyanin과 같은 항산화 성분이 함유되어져 있어 이들 성분들이 생체내에서 동맥경화증 및 심혈관계 질환과 같은 순화기계 질환을 예방하는 것으로 밝혀졌으나 가공식품의 개발은 부진한 실정이다. 이에 포도와 머루포도를 이용한 기능성 가공식품을 개발하여 포도의 활용도를 높이고 고부가가치 창출을 위한 방안으로 과즙뿐 아니라 씨 및 과피와 같은 부산물에서 기능성 물질을 추출 활용하여 가공기술 개발 및 생리활성 구명으로 생리활성을 나타내는 기능성 가공식품을 개발하고자 하였다.

제 1절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

가. 최근 각종 성인병 발병의 주요 원인이 식생활임이 밝혀지고, 의약품의 오남용에 따른 부작용이 널리 인식됨에 따라 건강 증진 내지 질병예방을 위한 새로운 접근 방법의 하나로 기능성 식품에 대한 관심이 고조되고 있다. 농산물에 함유되어 있는 항산화 성분은 색소류, 폴리페놀, 플라본 배당체 및 리그난 배당체 등 다양한 형태로 종자 껍질이나 색소 및 식물 표면에 왁스형태로 분포하는데 이들 성분들이 항산화 활성을 나타냄에 따라 약용으로 이용되는 등 매우 중요한 자원으로 인정되고 있으므로 소비확대와 고부가가치 창출을 위해 기술상의 경쟁력을 키워야 할 때이다.

나. 미국, 유럽 및 일본을 비롯한 선진국에는 포도 과피중 anthocyanin 및 resveratrol 과 포도씨중의 catechin등의 천연 폴리페놀성분이 생체내에서 산화억제를 통한 노화억제 및 동맥경화 예방기능이 있음이 밝혀지고 있는데, 특히 대표적 성분인 resveratrol은 동맥경화의 예방과 치료 효과가 탁월하여 건강 기능성 식품 소재 및 의약품으로 개발가능성이 매우 높다.

다. 포도의 부산물인 포도과피 및 포도씨에는 resveratrol, tannin, catechin, epicatechin 및 anthocyanin의 천연색소가 다량함유 되어져 있기 때문에 효율적으로 활용하는 것은 농산물의 부가가치를 높이고 식품의 고급화 및 다양화, 그리고 환경보전적 차원에서 매우 중요하다.

라. 포도씨에는 linoleic acid(70%)와 oleic acid(20%)가 다량 함유되어져 있고 올리브유와 지방질 조성이 비슷하여 양질의 기름으로 알려져 있고, catechin 성분도 함유되어져 있어 수렴, 해독, 살균 및 방부작용이 있는 것으로 알려져 있으나 직접적으

로 *in vivo* 수준에서 포도씨가 암, 동맥경화, 항산화 작용에 미치는 영향에 관한 과학적인 증명은 미흡한 실정이다.

마. 본 연구진은 이미 포도씨 및 과피에 함유되어 있는 resveratrol 및 anthocyanin류의 추출방법을 확립하여 사용 중에 있고 catechin등의 항산화물질을 체계적이고 신속한 방법으로 분리 동정할 수 있는 기술을 개발하였으나, 이들 성분들이 인간이나 동물의 생체내에서 생리활성효과를 나타내는지에 관한 과학적인 해명과 포도씨 추출물이나 과피를 이용한 기능성 식품개발에 관한 연구가 매우 절실하다.

2. 경제·산업적 측면

가. 2004년 칠레와 자유무역협정(FTA) 타결에 의한 수입관세 저하로 재배면적은 더 이상 늘지 않고 있으나 단수의 증대로 생산량은 49만톤에 달하고 있다. 포도 재배면적의 증가는 국민 소득 증가에 따른 기호식 및 건강식에 대한 관심의 고조와 인구 증가에 따른 수요의 증대로 앞으로도 요구량이 계속 증가할 것으로 추정된다.

나. 현재 포도의 생산량은 전년대비 32만톤에 이르며 이중 20%가 과피, 20%가 씨로 상당량의 부산물로 취급되고 있다. 과피에는 anthocyanin 색소의 천연색소가 다량 함유하는 것으로 알려져 있고 씨에는 resveratrol 및 catechin, tannin계의 항산화 성분이 다량 함유하므로 이들 부산물 함유 생리활성 물질을 활용할 방안 마련이 절실히 요구된다.

다. 포도씨 및 과피로 부터 천연 항산화제 및 천연색소의 대량 분리기술 개발은 식료품, 화장품 및 신약개발의 재료로 화학합성물에 대처 할 수 있는 경제적효과 및 수입대체효과 까지 얻을 수 있는 고부가가치 기술이다.

3. 사회·문화적 측면

가. 포도의 연령계층별 소비성향은 성인병이 걱정되는 중·장년층에서 선호가 크게 증가하였는데 이는 포도가 비만 예방 및 동맥경화증을 예방한다는 홍보의 성공으로 인한 결과로 사료되어 포도를 안정적 대량 생산 및 가공 식품으로 이용가치를 부여한다면 포도농가 소득 증대 뿐 아니라 계절에 구애받지 않고 소비 촉진을 유도하는 차별화 식품으로 새롭게 창출 될 것으로 예상된다.

나. 국민들의 외제선호 경향이 높지만 농산물만은 근간에 신토불이 및 토종 사상의 저변 확대로 만일 국내에서 보건적, 생리활성적 고기능성 함유 작물이용 기능성 식품이 생산 공급된다면 소비자의 인기를 제고시킬 뿐 아니라 충분히 다량 소비될 분위기가 형성되어 있으며 진보된 독농가는 새로운 소득 작목의 선택을 위해 보다 적극적으로 국가의 적극적 농촌지원에 따라 충분한 경제적 생산 기반을 갖추고 있다.

4. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

가. 선진국일수록 건강과 국민보건에 대한 관심이 크기 때문에 기능성 식품에 관한 연구와 관련 산업도 일찍부터 선진국에서 경쟁되었다.

나. 일본에서는 기능성 식품 발굴을 위한 체계적 연구로 문부성 특정 과제로 1단계(1984~1986) “식품 기능의 계통적 해석과 전개” 2단계 연구로(1988~1989) “식품의 생체 조절 기능 해석” 3단계로(1992~1994) “기능성 식품의 해석과 분자설계”라는 대형프로젝트에서 식품의 화학적 기능에 대하여 집중적으로 연구를 수행한 바 식품의 기능성에 관한 많은 결과가 도출되었다.

다. 미국에서는 1990년부터 미국 국립 암연구소에서는 디자이너 후드(항암 기능성 식물성분 개발) 계획이 시작되어 마늘, 감초, 대두 및 감귤류 등의 식물성분이 항암 활성이 높은 것으로 나타나 국민들의 많은 관심이 집중되었다. (R. Doll and Peto. 1982). 1990년부터 디자이너 후드(암 예방 식품 개발) 계획이 시작된 후 기능성 관련 연구예산은 1994년까지 없었으나 이후 1998년까지 3000만불 수준으로 증가하였고, 건강 기능성 식품은 1999년 275억불의 시장규모를 형성하고 있어 앞으로도 계속 증가할 것으로 예상된다.

라. 포도 과피, 종실 및 과실에는 resveratrol, catechin, tannin 및 그 외 polyphenol 류가 함유되어져 있다. 포도과즙의 색깔이 진할수록 항산화능이 높고 최근의 연구 결과에서는 적포도주 뿐 아니라 포도주스 섭취 시에도 동맥경화증이 예방됨이 보고되었다. 이들이 생체 내에서 동맥경화의 원인인 혈중 콜레스테롤 운반 단백질인 저밀도 지단백질(low density lipoprotein)의 산화를 억제시켜 항동맥경화, 혈소판 응집 억제작용 및 항암효과를 나타내는 것으로 증명되어 있다.

마. 국내에서는 생체 방어 기능성 물질의 탐색 연구가 의약품 소재로서의 연구가 진행 중이나 용매별 분획수준 및 *in vitro* 수준에 머물러 식품 소재로서의 접근은 아직 미미하고 검색 기술도 확립되지 않은 실정이다. 현실적으로 우리나라와 같이 국토면적이 좁고 노동력이 비싼 나라에서는 천연물의 2차 대사산물인 lignan, anthocyanin 및 glycyrrhizin 등의 항산화 성분을 활용하여 의약품 및 기능성 식품 소재로 개발하면 안정성 확보나 산업적 이용측면에서 유리하다.

제2장 포도 부산물의 이화학적 특성 및 항산화효과 구명

제 1절 포도씨 기름의 이용

1. 포도씨 기름의 수율 증진을 위한 추출 방법 개선

식물종자에 함유되어 있는 기름을 추출하는 방법으로는 열처리 후에 압착으로 하는 방법과 용매를 이용하여 추출하는 방법이 있으며 기름의 추출 수율도 중요하지만 고유성분의 변화 없이 추출하는 것이 가장 중요하다. 포도씨 기름은 다른 식용유지와 비교해 catechin류가 다량 함유되어 있어 산패 억제효과가 있을 뿐 아니라 기능성 식품소재로 각광 받고 있어 대체 식용유로 개발이 가능할 것으로 생각된다. 따라서 본 연구는 포도의 가공식품 제조 시 부산물로 생산되어 폐기화 되고 있는 포도씨를 재활용하여 유지지원으로 개발하기 위한 방안으로 포도씨로부터 기름추출의 수율을 높이기 위한 방안을 연구하고자 실시하였다.

가. 재료 및 방법

1) 재료

본 실험에 사용된 포도씨는 1999년 영동에서 재배된 campbell 품종의 포도로부터 과즙과 과피를 제거한 포도씨 만을 정선하고 세척한 후 -20°C 의 냉동고에 보관하면서 시료로 사용하였다.

2) 일반성분 분석

포도씨 중 수분, 조지방, 조단백 및 조회분 등의 일반성분은 AOAC법에 의하여 분

석하였다. 포도씨를 mill로 분쇄하여 80 mesh로 105℃에서 건조시킨 후 수분함량을 측정하였다. 회분은 회화법, 조지방은 Soxhlet법과 조단백은 Kjeldahal법으로 정량하였다. 총당 함량은 5% phenol-sulfuric acid법으로 환원당은 dinitrosalicylic acid 방법으로 정량하였으며 글루코스를 표준당으로 하여 환산하였다.

3) 포도씨 기름 제조

일반적인 식용유의 추출방법으로 압착법과 용매 추출법을 사용하였다. 용매 추출은 포도씨를 0.5mm로 분쇄한 시료를 n-hexane, ether, methanol의 용매별로 각각 24 시간 및 48 시간 침지 시킨 후 감압 농축 장치로 추출하였다. 압착추출은 포도씨를 볶음(roasting), 분쇄(grinding), 증숙(steaming) 하였으며 추출조건을 확립하기 위하여 처리과정을 grinding(1), grinding and roasting(2), grinding and steaming(3), grinding, roasting and steaming(4) 등으로 처리하였다. 이때 시료의 볶음은 roaster로 95~100℃에서 20분간 볶아 실온에서 식힌 후 롤러 분쇄기로 1~2 mm의 입자 크기로 1차 분쇄 한 후 다시 0.5 mm가 되도록 2차 분쇄하였다. 증숙 조건은 steam boiler로 0.8~0.9 kg · f/cm²의 압력에서 10분간 증숙하였다. 이렇게 처리한 시료는 열교환 장치가 부착된 밀폐식 압착기로 1차 400 kg/cm²의 압력으로 2~3분간, 550~600 kg/cm²의 압력에서 10분, 그리고 700 kg/cm²의 압력에서 기류의 흔적이 없어질 때까지 1시간 압착하여 기름을 추출하였다.

4) 관능검사

방법을 달리하여 추출 된 포도씨 기름의 관능적 검사는 훈련받은 관능요원 20명을 대상으로 3회 반복 실시하였다. 제조된 기름을 형광조명이 있고 개인 검사대가 설치된 관능 검사실에서 수행되었다. 시료에 대한 평가항목은 맛, 향기 및 색깔에 대하여 아주좋음(10), 좋음(8), 보통(6), 나쁨(4), 아주 나쁨(2)의 점수법으로 실시하여 그 값에 대한 평균치 결과를 나타내었다. 한 개의 시료를 평가한 후에는 반드시 물로 입안을 헹구어낸 다음 다른 시료를 평가하도록 하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 포도씨의 일반성분

포도씨의 일반성분 분석결과는 Table 2-1과 같다. 수분함량은 11.9%로 나타났고 조단백질 함량은 9.7%였다. 조지방 함량은 본 시험에 사용된 시료에서 23.0%로 나타났고, 품종에 따라 조지방 함량에서 차이가 있는 것으로 나타났다. 현재 일반적으로 식용유지 자원으로 이용되고 있는 들깨 및 참깨의 지방함량은 50.0%, 평지씨 45.5%, 호박씨 46.5% 및 해바라기씨는 22.1%이다. 유지 자원으로 사용되고 있는 참깨 및 들깨보다는 지방 함유량이 적지만 대두유 및 해바라기 기름과 비슷한 수준으로 포도씨는 20%이상의 지방을 함유하고 있으므로 식용유지 자원으로 개발 가능성이 있는 것으로 판단된다. 올리브유의 대체 식용유로 미강유와 함께 포도씨 기름을 부산물에서 생산할 수 있는 식용유지로서 개발가능성을 보고 한 바 있다. 조회분 함량은 3.4%로 나타나 또 다른 연구결과 1.7~3.2%로 나타난 결과와 비슷한 수준이었다. 총당 함량은 2.95 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 이었고 환원당 함량은 2.37 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 나타나 다른 연구 결과와 비슷한 수준이었다. 이상과 같이 포도씨에는 지방이 가장 많이 함유되어 있어 새로운 유지자원으로 효과적인 활용이 기대된다.

Table 2-1. Chemical composition of grape seed

Moisture(%)	Crude protein(%)	Crude fat(%)	Crude ash(%)	Sugar	
				Total($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Reducing($\mu\text{g}/\text{mg}$)
11.9	9.7	23.0	3.4	2.95	2.37

2) 포도씨 기름 추출

시료의 전처리 조건을 확립하기 위하여 추출물의 마이알 반응이 일어나지 않아 착색이 생기지 않는 조건인 100℃로 고정하여 10분, 20분, 30분 및 40분으로 볶는 시간을

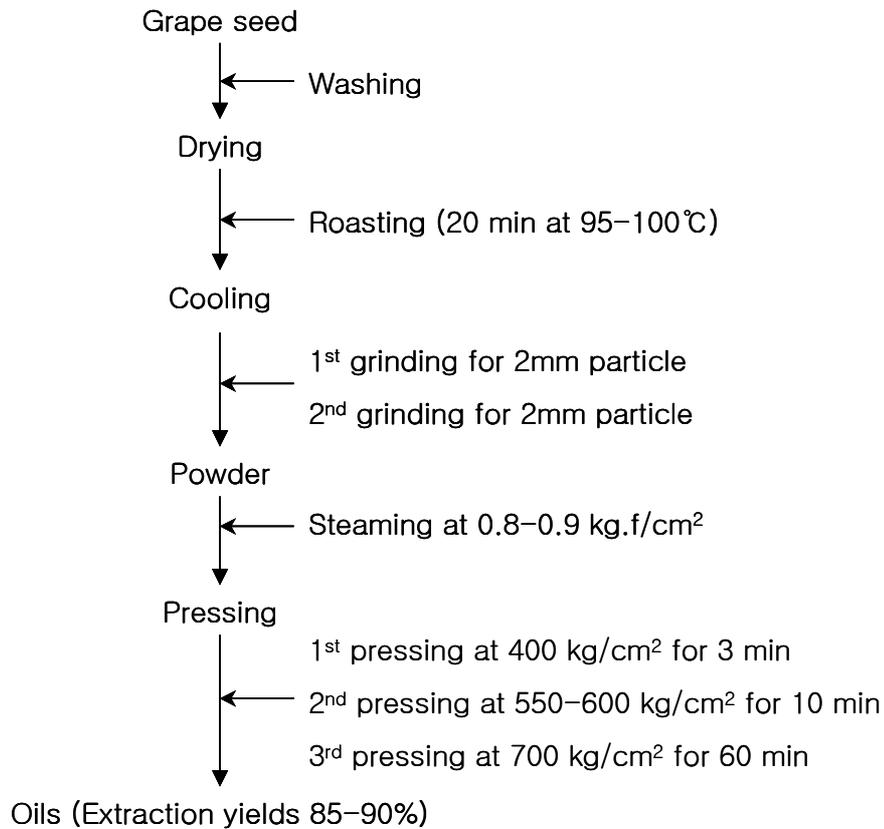


Figure 2-1. Optimal condition for grape seed oil extraction.

달리하여 볶은 후 비교한 결과 갈변을 억제시킬 수 있는 최적 조건이 30분이었다. 또한 시료의 분말화는 포도 씨앗의 물성을 고려하여 껍질층과 종실층의 분리를 위해 처음에 1~2 mm 정도로 분쇄한 후 껍질에 기름성분이 흡착되는 것으로 방지하기 위하여 0.5 mm 이하로 재 분쇄 한 후 수분을 첨가시키기 위해 0.8~0.9 kg · f/cm²의 압력에서 증숙시켰다. 이와 같이 확립된 조건으로 시료 6~8kg을 600±10kg/cm²에서 30분간 추출한 후 압착 추출 방법으로 추출한 기름의 수율은 Table 2-2와 같다. 압착추출에

의한 착유율은 포도씨 기름 함유량인 23%와 비교해 분쇄 후 볶아 증숙한 처리구 65.6%, 분쇄 후 볶음 처리구 64.3%, 분쇄 후 증숙한 처리구 63% 그리고 볶음처리구가 34% 순으로 나타나 분쇄 후 볶아 증숙한 처리구에서 가장 높은 추출 수율을 나타내었다. 용매 추출법은 식물성씨에 유기 용매를 침지 시켜 방치 한 후 여과하고 용매를 완전히 증류하여 회수하는 방법이 사용하고 있다. 본 연구에서 유기 용매로 ether, n-hexane 및 methanol을 사용하여 추출한 결과는 Table 2-3과 같다. 용매추출은 각 용매별로 정치 추출하였는데 일반적으로 24시간 정치보다 48시간 정치 후 추출 수율이 높게 나타났다. 용매별로는 ether 처리구가 24시간에서 77.4%, 48시간에서 80.9%로 가장 높은 수율이었고 methanol로 추출 시 24시간 73.5%, 48시간 77.4%였으며 n-hexane으로 추출 시 24시간 71.7%, 48시간 73.5%로 시간이 증가할 수록 추출 수율은 증가하였다. 또한 용매별 추출 수율은 ether와 methanol로 추출 시 수율은 높았지만 식품으로의 이용 시 잔류성, miscella의 분리 등에 문제가 발생할 가능성이 높아 식품에 적용하기보다는 공업용유지로 이용하는 것이 적절할 것으로 생각된다. 이상의 결과를 바탕으로 포도가공공장에서 생산되어 폐기물화 되고 있는 포도씨를 이용한 식용유지로의 개발을 위해 Figure 2-1과 같이 최적 추출조건을 확립하여 소요경비나 시간을 최소화하고 수율과 경제성을 높이는 최적 추출방법을 제안하였다. 즉 포도씨를 수세하여 수분함량 10~12%이 되게 건조하고 95~100℃에서 20분 정도 볶음 처리하여 30분 정도 실온에 방냉 한 후 롤러 분쇄기로 1차 1~2 mm 정도의 입자로 분쇄시킨 후 다시 0.5mm이하가 되도록 재분쇄 한다. 0.5 mm이하로 분쇄한 포도씨 분말을 steam boiler로 0.8~0.9 kg · f/cm²의 압력에서 10분간 충분히 증숙시켜 곧 바로 열전달 장치가 부착된 압착식 추출기에 6~8 kg정도의 분쇄 포도씨를 넣고 압착력을 처음에 400 kg/cm²에서 2~3분, 550~600 kg/cm²에서 10분이 경과 되도록 하고 700 kg/cm²에서 계속 추출하였을 때 총 소요시간은 1시간에 포도씨에 함유된 약 20%의 기름을 85~90%까지 추출할 수 있었다.

Table 2-2. Yield of extraction prepared with different treatment methods.

(at grape seed oil 23.0%)

Treatment	Extraction yields (%)
G ¹⁾	34.0 (7.8)
GR ²⁾	64.3 (14.8)
GS ³⁾	63.0 (14.5)
GRS ⁴⁾	65.6 (15.1)

- 1) Grinding
- 2) Grinding and roasting
- 3) Grinding and steaming
- 4) Grinding, roasting and steaming

Table 2-3. Yield of oils extracted with different solvent

Solvent	Yields (%)	
	24h	48h
n-Hexane	71.7(16.5)	73.5(16.9)
Ether	77.4(17.8)	80.9(18.6)
Methanol	73.5(16.9)	77.4(17.8)

3) 포도씨 기름의 관능검사

추출방법을 달리하여 추출한 포도씨 기름에 대한 관능검사 결과는 Table 2-4와 같다. 포도씨 기름의 향, 색깔과 맛은 최적조건에서 추출한 기름이 가장 좋은 평가를 나타내었고 압착법으로 추출한 기름의 관능검사에서는 분쇄 후 볶아 추출한 기름이 가장 높았고 분쇄 후 볶아 증숙한 기름의 순으로 좋았으며 단순히 분쇄 후 증숙하여 추출한 기름이 제일 낮았다. 색깔에서는 분쇄 후 증숙한 기름이 가장 좋았고 분쇄만 하여 추출한 기름에서 가장 낮게 나타났다. 이러한 결과 포도씨 전처리 방법을 개선하여 추출한 기름에서 색깔, 향 및 맛이 우수한 기름이 추출되었다.

Table 2-4. Sensory evaluation of grape seed oils prepared by different treatment methods.

Treatment	Flavor	Taste	Color
G ¹⁾	6.5	7.1	7.8
GR ²⁾	8.5	8.7	8.2
GS ³⁾	6.8	7.1	8.8
GRS ⁴⁾	8.2	7.8	8.1
OC ⁵⁾	9.4	9.5	8.8

1) Grinding

2) Grinding and roasting

3) Grinding and steaming

4) Grinding, roasting and steaming

5) Optimal condition

10: very good 8: good 6: moderate 4: bad 2: very unpleasant

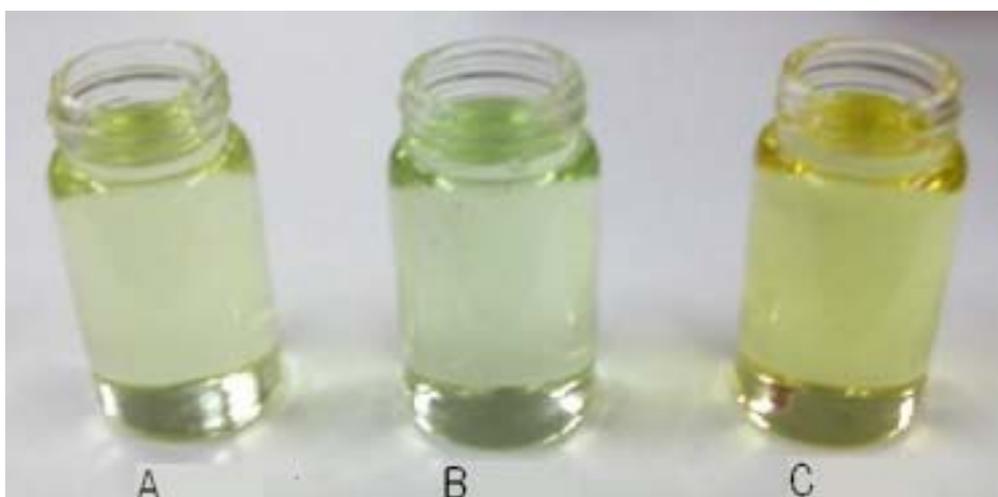


Figure 2-2. Grape seed oil

A: Grape seed oil by pressing treatment, B: Commercial grape seed oil (B Co.), C: Commercial grape seed oil (C Co.)

2. 포도씨의 기계적 특성 -항복강도와 극한강도 측정-

포도씨에는 catechin 성분이 함유되어 있고, 수렴, 해독, 살균 및 항 미생물작용 등 여러 가지 생리작용이 있는 것으로 알려져 있으며, 성인병 및 암예방에 관계하는 항산화, 항돌연변이, 혈중 콜레스테롤 저하 등의 생리활성 물질에 관심이 모아지고 있다. 농산물의 물리적 특성에 관한 연구는 외력에 따라 변형의 시간적 특성을 고려한 레올로지 특성에 대한 연구가 주로 이루어져있는데 농산물의 특성상 불규칙한 단면에 대한 하층 재하 단면적의 계산이 불가능하기 때문에 입자를 가공하며 처리한 실험 연구이다. 이에 본 실험에서는 기능성 건강식품으로 각광받고 있는 포도씨의 식품화 가능성을 구명하기 위하여 일부 품종별로 항복강도와 극한강도를 측정하여 분말 화시킬 수 있는 조건을 확립하고 포도 분말을 식품으로의 이용 가능성을 발현시키고자 수행하였다.

가. 재료 및 방법

1) 실험재료

실험에 사용한 포도 씨로 캠벨얼리는 2000년 산을 비교 실험을 위해 실험실에 보관되었던 것을, 2001 산은 (주)정산식품에서 포도 가공 중에 발생된 부산물을 채취하여 3차례 수세한 후 양건하여 10℃의 저온창고에 보관하여 사용하였으며, 기타, 거봉, 세레단, 머루 포도 등은 2001년 산을 예산 청과물 시장에서 완숙품을 구입하여 실험실에서 과육과 분리 수거하여 양건 후 같은 방법으로 수집 보관하여 사용하였다.

일반성분 분석은 AOAC에 따라 측정하였고 강도실험을 위한 정확한 수분함량측정은 ASAES 352.2 DEC 92의 Standard Method (1983)로 시료 10g을 130℃에서 4시간 건조시켜 함수율을 측정하였다.

2) 실험 장치 및 방법

포도 씨의 압축특성을 파악하기 위하여 이용한 장치는 재료 시험기(TA-X2 Texture analyzer USA)이며 주요사양은 Table 2-5와 같으며 Force Resolution은 5g,

Speed Range는 0.01~10 min/sec, Speed Accuracy는 0.1%, Position Range Section은 0.1~524mm이며, Range Resolution은 0.001이다. 압축강도를 측정하기 위하여 프로브(probe)는 직경 5 mm의 원판이 부착된 원통을 사용하였으며 포도 씨의 특성을 고려하여 0.6, 1.2, 1.8 mm/min의 3기준으로 하중재하속도를 변경하여 하중을 가하고 X-Y기록기에서 하중변위곡선을 구하여 포도 씨의 생물체 항복점과 변위량을 구하였다. 또한, 포도 씨가 파괴 될 때의 생물체 항복강도, 최대 하중, 극한변형량 및 극한강도를 20회 반복실험으로 구하였다. 압축 프로브를 이용하여 포도씨앗을 재하하는 과정에서 포도씨앗의 접촉방향에 따라 정확도의 차이가 있을 수 있을 것으로 생각하여 단면에 따른 오차를 최소화하기 위해 모든 시료에 대해서 2차 회전모먼트가 가장 작게 되는 방향으로 시료를 정치시키고 하중을 재하하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 포도 씨의 일반성분

포도 씨의 품종별 일반 성분을 분석한 결과는 Table 2-6과 같다. 포도 씨의 조단백질은 11.2%의 분포로 품종간의 다소 차이를 보였으나 머루포도가 15.7%로 가장 많은 함량을 보였고, 캬멜얼리는 8.7%로 가장 낮은 함량을 보였다. 조지방질 함량은 약 28%로 식용유로 이용할 수 있는 20% 보다 높은 함량으로 식용유지 자원으로 이용가능성이 높게 나타났으며 총당은 2.95~5.63 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 품종별 차이가 있었으며 환원당도 총당에 따라 차이를 나타내었으나 조회분의 함량은 1.7~3.2%로서 품종간의 큰 차이가 없었다.

2) 실험에 사용한 품종별 포도씨의 함수율

포도 씨를 ASAE S352.2 DEC92의 Standard Method에 의해 함수율을 측정한 결과는 Table 2-7과 같이 나타났다. 위의 결과에서 살펴보면 머루 포도 씨가 30% 이상으로 가장 높은 함수율을 나타내고 있으며, 세레단이 약 28%로 함수율이 높았다. 100°C에서 30분간 열처리 볶음 씨의 경우는 8.796%로 가장 낮게 나타났으며, 2001년산 캬

벨얼리와 거봉이 각각 10.894%, 12.181%로 나타났다. 캠벨얼리 2000년 산은 14.382%로 2001년 산에 비해 약 3.5% 정도 높게 나타났는데, 이는 생산된 시기보다는 보관하는 동안의 온도와 습도에 따라 차이가 생긴 것으로 판단된다.

Table 2-5. Models of experimental installation

Items	Specification	Remark
Micro computer	RAM 32MB(21GB H/D)	Pentium 200MHz
Servo motor	AC	Parasonic MSD11AIA
Servo motot driver	2,500 p/r	Parasonic MSD011A11XE
Strain gage measurment board	8 channels	ADAC,5508BG
STP-2M(PC) board	IBM PC-XT,AT	CONTEC,STP-2M
Single-point load cell	25,50 kgf capacity	BONGSHIN 25,30-OBU
Compression load cell	200 kgf capacity	KYOWA,LU-200KE

Table 2-6. Chemical composition of various grape seeds

(%)

Kinds	Constituent	Moisture	Crude protein	Crude fat	Ash	Sugar	
						Total	Reducing
	Campbell early	10.9	8.7	26.0	2.4	2.95	2.37
	Serdan(jingyu)	10.9	9.2	26.5	1.7	2.75	2.17
	Gerbong(kyoho)	9.3	9.2	29.5	3.2	4.50	4.03
	Meuru phodo	9.6	11.7	29.4	1.9	5.63	4.83
	Fuginori(Daebong)	9.9	11.7	28.3	2.9	3.57	3.2
	STP-2M(PC) board		IMB PC-XT,AT		CONTEC,STP-2M		
	Single-point load cell		25,50 kgf capacity		BONGSHIN 25,30-OBU		
	Compression load cell		200kg capacity		KYOWA, LU-200KE		

Table 2-7. Moisture of grape seeds.

(%)

Sample	Cambell early (2001)	Campbell early (2000)	Gerbong	Serdan	Meuru phodo	Roasting seeds
1	10.686	14.554	12.579	27.827	30.729	8.915
2	10.988	14.154	12.169	28.005	30.162	8.636
3	11.007	14.437	11.795	28.957	27.829	8.837
Average	10.894	14.382	12.181	28.264	30.535	8.796

3) 포도씨의 물리적 특성

포도 씨를 분말화하여 기능성 가공식품으로의 이용성을 검토하기 위해 종류별, 생산년도별 및 열처리한 씨의 물리적 특성을 극한강도를 중심으로 물성측정기를 이용하여 가공을 위한 시스템의 개발 가능성을 살펴본 결과는 다음과 같다.

가) 캠벨얼리(2000년 산)씨

캠벨얼리 2000년 산 씨의 생물학적 항복강도와 극한강도 실험결과는 Table 2-8과 같다. 실험에서 0.6, 1.2, 1.8 mm/min의 3수준의 하중재하 속도별 생물학적 항복강도는 각각 3.790, 4.126, 4.289 kg으로 나타났으며, 속도가 증가할수록 항복강도가 크기도 높아진다는 것을 알 수 있었다. 또한 최대 항복강도도 하중의 재하속도 1.8 mm/min에서 5.855 kg으로 가장 높게 나타났다. 극한강도의 경우 하중재하 속도별 5.554, 6.132, 6.376 kg으로 나타났으며, 평균 6.02kg의 극한강도를 보였다. 이는 항복강도와 마찬가지로 하중의 속도가 증가할수록 강도의 크기도 증가한다는 것을 알 수 있다. 극한강도의 최대값은 하중재하속도 1.2 mm/min에서 8.864 kg으로 나타났으며, 이는 하중재하속도의 영향으로 생각되기보다는 개체시료의 성분함량에 따른 물리화학적 특성의 영향으로 판단된다.

Table 2-8. The bio-yield point and limit strength of campbell early seeds.

(2000 year produced)

Loading compression velocity (mm/min)	Bio-yield point		Bio-yield strength		Maximum force		Limit strength	
	Aver.	Max.	Aver.	Max.	Aver.	Max.	Aver.	Max.
0.6(Test 4)	3.790	5.597	19.30	28.50	5.554	8.025	28.28	40.87
1.2(Test 5)	4.126	5.796	21.01	29.52	6.132	8.864	31.23	45.14
1.8(Test 6)	4.289	5.855	21.84	29.81	6.376	8.732	32.47	44.47
Average	4.07	5.75	20.72	29.28	6.02	8.54	30.66	43.49

나) 캠벨얼리(2001년산) 씨

캠벨얼리 2001년산 씨의 항복강도와 극한강도는 Table 2-9와 같다. 캠벨얼리 2001년 산 씨의 생물학적 항복강도는 3수준의 재하속도에 따라 각각 4.155, 3.085, 4.221 kg 으로 나타났으며, 평균 4.06 kg의 항복강도를 가지고 있었다. 또한 생물학적 항복강도의 최대값은 재하속도 0.6 mm/min에서 6.324 kg으로 나타났다. 극한강도의 평균값은 3수준의 재하속도에 따라 각각 6.066, 6.035, 6.790 kg으로 나타났으며, 극한강도의 최대값은 재하속도 1.2 mm/min에서 8.771 kg으로 나타났다. 이 결과에서 보면 재하속도에 따라 생물학적 항복강도의 평균값은 속도가 가장 큰 1.8 mm/min에서 가장 높게 나타났으며, 최대값은 0.6 mm/min의 재하속도에서 나타났다. 극한강도의 경우 평균값은 1.8 mm/min에서, 최대값은 1.2 mm/min에서 가장 높게 나타났다. 따라서 캠벨얼리 2001년 산 씨는 하중의 재하속도에 따른 항복강도 및 극한강도의 변화사이에 유의성을 찾기는 쉽지 않지만, 일반적인 압축강도의 변화와 마찬가지로 재하속도가 빠를수록 강도의 크기가 강하다는 것을 알 수 있었다.

다) 거봉 씨

거봉 씨의 생물학적 항복강도와 극한강도에 대한 실험결과는 Table 2-10과 같다. 거봉 씨의 생물학적 항복강도는 3수준의 재하속도에 따라 각각 5.047, 4.675, 5.715 kg

Table 2-9. The bio-yield point and limit strength of campbell early seeds.

(2001 year produced)

Loading compression velocity (mm/min)	Bio-yield point		Bio-yield strength		Maximum force		Limit strength	
	Aver.	Max.	Aver.	Max.	Aver.	Max.	Aver.	Max.
0.6(Test 4)	4.155	6.324	21.13	32.21	6.066	7.743	30.89	39.43
1.2(Test 5)	3.805	4.760	19.38	24.24	6.035	8.771	30.73	44.67
1.8(Test 6)	4.221	5.584	21.49	28.43	6.790	8.233	34.58	41.93
Average	4.06	5.56	20.67	28.29	6.30	8.25	32.07	42.01

으로 나타났으며, 평균 5.15 kg 의 항복강도를 가지고 있었다. 또한 생물학적 항복강도의 최대값은 재하속도 0.6 mm/min에서 7.793 kg으로 나타났다. 극한강도의 평균값은 3수준의 재하속도에 따라 각각 7.852, 7.297, 8.448 kg으로 나타났으며, 극한강도의 최대값은 재하속도 1.8 mm/min에서 11.823 kg으로 나타났다. 재하속도에 따른 생물학적 항복강도의 평균값은 속도가 가장 큰 1.8 mm/min에서 가장 높게 나타났으며, 최대값은 0.6 mm/min의 재하속도에서 나타났다. 극한강도의 경우 평균값은 1.8 mm/min에서, 최대값은 1.8 mm/min에서 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 캠벨얼리 2001년 산의 실험결과와 비슷한 경향을 보이고 있으며, 전체적인 강도의 크기가 캠벨얼리 2001년 산에 비해서 높게 나타났다. 따라서, 거봉 씨도 캠벨얼리 2001년 산 씨와 마찬가지로 하중의 재하속도에 다른 항복강도 및 극한 강도의 변화사이에 유의성을 찾기는 쉽지 않지만, 일반적인 압축강도의 변화와 마찬가지로 재하속도의 크기가 클수록 강도 크기가 높게 나타나는 것을 알 수 있었다.

라) 세레단 씨

세레단 씨의 생물학적 항복강도와 극한강도 실험결과는 Table 2-11과 같다. 세레단 씨를 이용한 3수준의 하중재하 속도별 생물학적 항복강도는 각각 3.877, 3.510, 4.332 kg으로 나타났으며, 최대 항복강도는 하중의 재하속도 1.2 mm/min에서 6.946 kg으로 가장 높게 나타났다

Table 2-10. The bio-yield point and limit strength of gerbong seeds.

Loading compression velocity (mm/min)	Bio-yield point		Bio-yield strength		Maximum force		Limit strength	
	Aver.	Max.	Aver.	Max.	Aver.	Max.	Aver.	Max.
0.6(Test 4)	5.047	7.793	25.70	39.68	7.852	10.565	39.98	53.80
1.2(Test 5)	4.675	6.627	23.80	33.75	7.297	9.581	37.16	48.79
1.8(Test 6)	5.715	7.408	29.10	37.72	8.448	11.823	43.02	60.21
Average	5.15	7.28	26.20	37.05	7.87	10.66	40.05	54.27

생물학적 항복강도의 평균값은 다른 품종에 비교해 가장 낮았지만 최대값은 1.2 mm/min의 속도에서 나타났다. 이러한 특성은 전체적인 씨앗의 강도로 평가하기보다는 개체시료의 특성으로 판단되었다. 극한강도의 경우 하중재하 속도별 6.143, 5.844, 6.269 kg으로 나타났으며, 평균 6.09 kg의 극한강도를 보였다. 세레단 씨의 항복강도와 극한강도의 절대적인 수치는 캠벨얼리 2001년 산 씨와 비슷하였으며 항복강도와 극한강도의 평균값은 하중재하속도 1.2 mm/min에서 가장 낮게 나타내었는데, 세레단 씨는 다른 포도 씨와 다르게 하중의 재하속도와 강도와의 사이에는 유의성이 거의 없는 것으로 나타났으며 극한강도의 최대값은 하중재하속도 0.6 mm/min에서 8.955 kg으로 캠벨얼리 2001년 산 씨의 최대값과 비슷한 수준이었다.

Table 2-11. The bio-yield point and limit strength of serdan seeds.

Loading compression velocity (mm/min)	Bio-yield point		Bio-yield strength		Maximum force		Limit strength	
	Aver.	Max.	Aver.	Max.	Aver.	Max.	Aver.	Max.
0.6(Test 4)	3.877	6.851	19.74	34.89	6.143	8.955	31.28	45.60
1.2(Test 5)	3.510	6.946	17.87	35.37	5.844	7.778	29.76	39.61
1.8(Test 6)	4.332	6.776	22.06	34.50	6.269	8.399	31.92	42.77
Average	3.91	6.86	19.89	34.92	6.09	8.38	30.99	42.66

마) 머루포도 씨

머루포도 씨를 이용한 압축강도 실험에서 생물학적 항복강도와 극한강도는 Table

2-12과 같다. 머루포도 씨를 이용한 3수준의 하중재하 속도별 생물학적 항복강도는 각각 3.632, 4.123, 3.507 kg으로 나타났으며, 최대 항복강도는 하중의 재하속도 0.6 mm/min에서 6.665 kg으로 가장 높게 나타났다. 하중재하속도 1.2 mm/min의 경우 생물학적 항복강도가 평균값은 가장 높지만, 최대값은 가장 작은 것으로 나타났으며, 극한강도의 경우 하중재하 속도별 6.664, 6.311, 6.005 kg으로 나타내었고, 평균 6.33 kg의 극한강도를 보였다. 이러한 결과는 머루 포도 씨가 가장 균일한 씨앗 분포특성을 가지고 있다는 것을 알 수 있었다. 또한 머루 씨의 항복강도와 극한강도는 절대적인 수치가 캠벨얼리 2001년 산 씨와 세레단 씨는 비슷한 수준이었다.

Table 2-12. The bio-yield point and limit strength of meuru phodo seeds.

Loading compression velocity (mm/min)	Bio-yield point		Bio-yield strength		Maximum force		Limit strength	
	Aver.	Max.	Aver.	Max.	Aver.	Max.	Aver.	Max.
0.6(Test 4)	3.632	6.665	18.49	33.94	6.664	7.721	33.93	39.32
1.2(Test 5)	4.123	5.797	20.97	29.52	6.311	8.350	32.14	42.52
1.8(Test 6)	3.507	6.054	17.86	30.83	6.005	7.967	30.58	40.57
Average	3.75	6.17	19.11	31.43	6.33	8.01	32.22	40.80

바) 열처리 포도 씨

열처리한 씨는 2001년 산 캠벨얼리 씨를 100℃에서 30분간 볶음처리하여 항복강도와 극한강도를 측정한 실험결과는 Table 2-13과 같다. 열처리한 씨를 이용한 3수준의 하중재하 속도별 생물학적 항복강도는 각각 6.219, 5.667, 6.054 kg으로 나타났으며, 최대 항복강도는 하중의 재하속도 1.8 mm/min에서 8.961 kg으로 가장 높게 나타났다. 극한강도는 하중재하속도별 각각 8.433, 7.421, 8.466 kg으로 나타났으며, 평균 8.11 kg의 극한강도값을 보였다. 또한 최대극한강도값은 하중재하속도 1.8 mm/min에서 11.671 kg으로 나타났다. 열처리한 씨의 경우 다른 포도 씨에 비해 전체적으로 가장 높은 강도를 나타냈는데 이는 씨의 종류에 따른 성분함량의 영향과 함수율과의 관계가 있을 것으로 판단되었다. 또한 캠벨얼리 2001년 산, 세레단, 머루포도 씨 등과 마

찬가지로 하중재하속도 1.2 mm/min인 중속의 속도에서 일반적으로 압축강도가 가장 낮게 나타내는 특성이 있었다. 이상에서와 같이 실험에 이용한 360개의 시료에 대한 생물학적 항복강도의 평균은 4.6 kg으로 나타났으며, 항복강도의 최대값의 평균은 6.72 kg으로 나타났다. 또한 항복강도의 평균값을 기준으로 열처리한 씨의 항복강도가 가장 높게 나타났으며, 세레단 씨의 항복강도가 가장 낮게 나타났다. 열처리한 씨와 세레단 씨의 생물학적 항복강도의 차이는 약 65%정도 있었다. 항복강도의 최대값은 열처리한 씨의 하중재하속도를 1.8 mm/min으로 실험한 실험구에서 가장 크게 나타났다. 항복강도를 기준으로 포도 씨앗가공을 하고자 할 때, 시스템의 설계에 이용할 항복강도는 최대항복강도값을 이용하는 것이 적절할 것으로 판단되며, 이보다 높은 항복강도는 실험수행 시 경험으로 많지 않을 것으로 판단된다. 극한 강도의 평균은 6.78 kg으로 나타났으며, 극한강도의 최대값의 평균은 9.20 kg으로 나타났다. 이는 생물학적 항복강도에 비해 약 60%증가한 값이다. 극한강도의 평균값을 종류별로 살펴보면 캠벨얼리 2001년 산의 경우, 6.30 kg, 캠벨얼리 2000년 산은 6.02 kg, 거봉은 7.89 kg, 세레단은 6.09 kg, 머루포도는 6.33 kg, 열처리한 씨는 8.11 kg으로 생물학적 항복강도와 마찬가지로 열처리한 씨의 극한강도가 가장 높게 나타났으며, 캠벨얼리 2000년 산과 세레단이 가장 낮게 나타났다. 극한강도의 최대값도 열처리한 씨가 가장 높은 분포를 보였다. 따라서 극한강도를 기준으로 포도 씨앗가공을 하고자 할 때, 시스템의 설계에 이용할 극한강도는 열처리한 씨를 기준으로 분쇄 시스템의 분쇄력은 9.20 kg 이상을 가할 수 있도록 설계를 행하는 것이 바람직할 것으로 판단되었다.

Table 2-13. The bio-yield point and limit strength of roasted grape seeds.

Loading compression velocity (mm/min)	Bio-yield point		Bio-yield strength		Maximum force		Limit strength	
	Aver.	Max.	Aver.	Max.	Aver.	Max.	Aver.	Max.
0.6(Test 4)	6.219	8.494	31.67	43.25	8.433	11.168	42.94	56.87
1.2(Test 5)	5.667	8.349	28.86	42.52	7.421	11.165	37.79	56.86
1.8(Test 6)	6.054	8.961	30.83	43.63	8.466	11.671	43.11	59.43
Average	5.98	8.60	30.45	43.13	8.11	11.33	41.28	57.72

제 2절 추출용매를 달리한 포도과피 추출물의 이화학적 특성

식품의 색은 식품의 풍미와 더불어 식품의 품질을 유지하여 기호성을 높여주고 있다. 따라서 식품의 가치를 높이기 위해 가공 중에 각종 색소를 첨가하거나 착색시키는데, 식품중의 천연색소는 값이 고가이고, 이화학적으로 불안정하여 인공합성색소가 널리 이용되어지고 있다. 그러나 최근 인공 합성색소의 인체에 대한 발암성과 위험성이 널리 알려지고, 소비자들의 건강에 대한 인식이 높아지면서 천연색소에 대한 관심이 높아지고 있다. 포도과피 속에는 anthocyanin 색소가 다량 존재하는데, anthocyanin의 추출용매로는 methanol이나 ethanol가 주로 사용되어진다. 그런데 anthocyanin 색소는 사용한 용매뿐만 아니라 용매의 pH에 의해 달라지기 때문에, 이때 추출효과를 증대시키기 위해 용매에 산을 첨가하기도 한다. 본 연구에서는 캠벨과 거봉의 과피색소 추출의 최적용매를 결정하기 위하여, ethanol에 0.1%농도의 여러 산성 용매를 첨가, 추출용매의 종류를 달리하여 포도과피 추출물의 이화학적 특성 및 항산화 효과에 대해 조사하였다.

1. 재료 및 방법

가. 실험재료

본 실험에 사용한 재료는 시중에서 판매되어 지고 있는 거봉과 캠벨종을 구입한 뒤, 과피와 씨를 분리, 건조하여 저온저장하면서 사용하였다.

나. 색소추출

0.1% citric acid 포도과피로부터 anthocyanin 색소의 추출은 Figure 2-3에 나타난 방법에 따라 실시하였다. 건조시킨 거봉과 캠벨과피를 분쇄한 뒤, 각각 2g을 용매를 달리하여 0.1% TFA, 0.1% acetic acid, 0.1% formic acid, 0.1% phosphoric acid, 0.1% HCl이 첨가된 ethanol 30ml를 넣고, 25°C의 water bath에서 3시간

shaking(100rpm) 3회 반복 추출하고 Whatman No. 2 여과지로 여과하여 색소원을 얻었으며, 최종 부피를 100ml로 각 용매를 이용하여 조절하였다. 추출해 낸 색소원은 20°C의 회전 진공감압장치를 이용하여 ethanol을 휘발시켜 최종 부피를 50ml로 조절하였다.

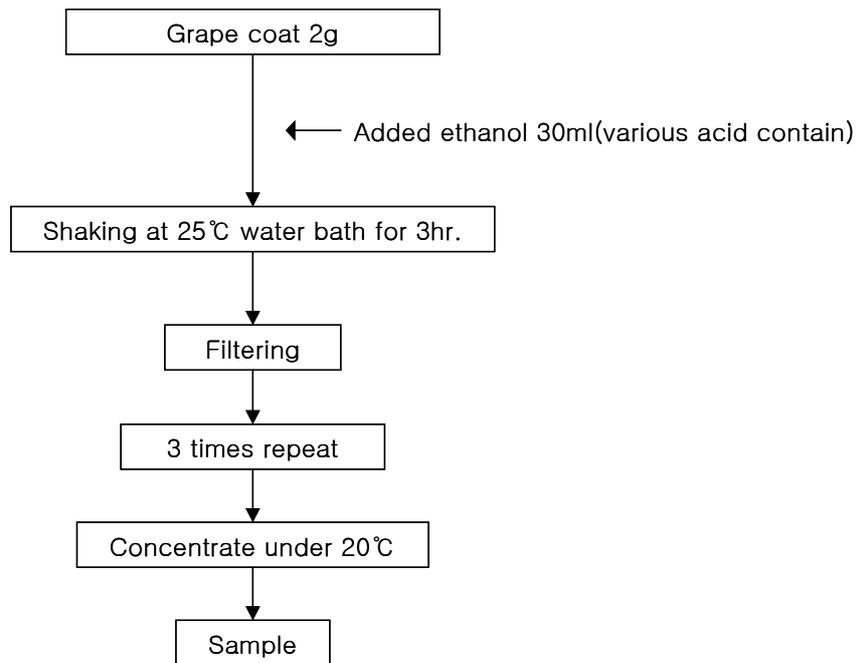


Figure 2-3. Procedure of extraction from grape coats.

다. 일반성분 분석

1) Anthocyanin 함량

추출물을 Ultra Spect 3000(Pharmacia사)를 이용하여 UV 532nm에서 3회 측정하였다.

2) 색도측정

MINOLTA사의 CR-300을 이용하여 3회 측정하였다.

3) 당도측정

ATAGO사의 HAND REFRACTOMETER을 이용하여 3회 측정하였다.

4) Browning index

Browning index (BI)는 색소용액의 갈변도로서 두가지의 파장에서 측정된 흡광도 값의 비로 표시하였다.

$$BI = A_{530nm} / A_{420nm}$$

530nm는 포도과피 색소의 최대 흡광도를 나타내는 파장이고, 420nm는 갈색도를 나타내는 흡수파장이다. 따라서 색소의 갈변이 진행될수록 BI값은 감소하게 된다. BI값 또한 3회씩 측정하여 평균값을 계산하였다.

5) 유기산 함량

추출물 20ml를 취하여 활성탄을 가하여 분자가 큰 물질 또는 색소물질을 흡착시킨 후 15,000rpm으로 2회 원심분리하여 활성탄을 제거하고 다시 0.45 μ mol Membrane filter로 여과한 후 Sep-pak (NH₂)를 delution하여 HPLC주입용 시료로 이용하였다. 사용된 HPLC는 Water 510, Column은 μ -Bondapak C18, Detector는 UV(214nm), 이동상은 0.009N H₂SO₄으로 하였다.

6) 유리당 함량

시료 10g에 탈이온수 20ml를 넣고 30분 동안 진탕한 후 항온원심분리기에서 2℃, 15,000rpm으로 40분간 원심 분리하여 얻은 상정액을 플라스크에 따르고, 잔사는 다시 탈이온수 20ml를 넣고 혼합하여 원심 분리하는 조작을 2회 반복하여 얻은 상정액을 모두 합하여 정용한 후 다시 초원심 분리한 다음, 그 일부를 0.45 μ mol Membrane filter로

여과하고, Sep-pak (NH₂)를 delution하여 HPLC주입용 시료로 이용하였다. 이때 사용한 HPLC는 Water 510 HPLC, Column은 Supeloco LC-NH₂(25.0cm × 4.6cm), Detector는 RI(Waters 410)이었고 이동상은 acetonitrile/water(75:25,v/v), Column온도는 40℃로 분석하였다.

라. HPLC 분석

Liquid chromatography를 이용하여 거봉과 켈벨과피 속에 함유된 resveratrol함량을 분석하였다. resveratrol 표준품은 Sigma사에서 구입하여 사용하였으며, 분석조건은 Table 2-14와 같다.

Table 2-14. HPLC condition for analysis of resveratrol from grape coats

Items	Conditions
Instrument	Pump 930 , Detector 720 Integrator
Column	Nova pak C-18 4.6×150mm
Mobile phase	22% acetonitrile
Flow rate	0.4ml/min
Injection volume	5μl
Wave length	UV 305nm

마. 항산화성분 분석

1) 전자공여능 측정

추출물에 DPPH 용액 가하여 잘 섞은 후 517nm에서 60분간 흡광도의 변화를 측정하였다.

2) 총 페놀함량 측정

건조 시료 0.01g을 1ml의 0.1% TFA in ethanol에 녹인 후 분석시료로 이용하였다. 시료에 2% Na₂CO₃를 넣고 2분간 실온에 정치한 뒤 Folin-ciocalteu's 시약을 가하고 혼합하여 실온에서 30분 정치한 후 750nm에서 흡광도를 측정하였다. Catechin을 표준 용액으로 사용하였다.

3) SOD(Superoxide dismutase) 유사활성 측정

SOD 유사활성 측정은 Marklund와 Marklund의 방법에 따라 각 시료에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer와 0.2mM pyrogallol를 가하고 25°C에서 10분간 방치 후 1N HCl로 반응을 정지시킨 후 420nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$100 - (\text{시료 무첨가구} / \text{시료 첨가구} \times 100)$$

2. 결과 및 고찰

캠벨은 산도가 낮아질수록 anthocyanin색소의 함량이 높아지는 것을 알 수 있으며, 색도 측정 결과에서도 산도가 낮을수록 a (Redness)값이 높게 측정되었다. 당도는 용매에 따른 큰 차이는 보이지 않지만, citric acid를 0.1% 첨가한 용매에서 가장 높은 수치를 보였다. Brown index란 색소용액의 갈변도를 말하며, 색소의 갈변이 진행될수록 값이 감소한다. Table 2-15와 같이 산도가 낮을수록 색소갈변의 진행이 서서히 발생하는 것으로 보아 anthocyanin색소는 pH에 의해 많은 영향을 받는 것을 알 수 있다. Table 2-16과 같이 거봉 속에 함유된 anthocyanin색소함량 또한 pH에 의해 높아지는 것을 볼 수 있으며, 예외적으로 citric acid를 첨가한 용매는 pH가 4.64임에도 불구하고 anthocyanin 함량이 높게 나타났다. 색도 측정결과 캠벨과는 달리 거봉은 전체적으로 a값이 낮고, b값이 높았으며, 색소의 갈변도는 전체적으로 비슷했으나 anthocyanin색소 함량이 높은 것으로 나타난 0.1%의 HCl, citric acid, TFA 첨가한 용매에서는 다소 높게 측정되었다. 당도측정에서는 citric acid를 첨가한 용매에서 가장 높은 것으로 나타나 캠벨과피의 경우와 유사한 경향을 보였다. 캠벨과피 속에 함유되

Table 2-15. Chemical composition of extracted from campbell coat.

	Anthocyanin in 함량 (OD/λ= 532nm)	pH	brown index	Color index			Brix °
				L (Lightness)	a (Redness)	b (Yellowness)	
0.1% Formic acid	1.35	4.59	0.85	105.75	3.15	6.69	19.7
0.1% Acetic acid	0.12	5.63	0.35	111.15	1.41	5.25	19.0
0.1% Citric acid	1.74	4.73	1.11	108.72	4.92	4.84	20.4
0.1% HCl	19.68	2.15	5.15	92.56	36.13	-4.65	20.0
0.1% Phosphoric acid	3.03	4.09	1.92	101.78	14.78	2.74	20.0
0.1% TFA	15.73	3.03	4.89	92.55	36.94	-3.90	20.0

Table 2-16. Chemical composition of extracted from Kyoho grape coat.

	Anthocyanin 함량 (OD/λ= 532nm)	pH	brown index	Color index			Brix °
				L (Lightness)	a (Redness)	b (Yellowness)	
0.1% Formic acid	0.14	4.78	0.11	79.42	-2.95	7.93	19.1
0.1% Acetic acid	0.11	5.43	0.11	110.71	-3.69	12.44	18.8
0.1% Citric acid	0.26	4.64	0.15	111.14	-3.29	10.27	19.4
0.1% HCl	0.27	2.42	0.16	111.42	-3.55	11.85	19.1
0.1% Phosphoric acid	0.13	3.96	0.11	111.24	-3.42	9.87	19.2
0.1% TFA	0.25	2.83	0.13	111.88	-3.00	9.66	19.1

어 있는 유리당 성분을 분석한 결과 Table 2-19에서 제시하였다. 전체적으로 sucrose 양은 거의 없었으며, glucose와 fructose양은 추출한 용매에 따라 다소 차이는 있으나 그 비율은 거의 비슷한 것을 발견할 수 있었다. 총 유리당은 0.1%의 formic acid, citric acid, HCl, TFA를 첨가한 용매에서 추출한 캠벨과피에서 높은 함량을 나타냈다.

산첨가를 달리한 용매를 이용하여 추출해낸 거봉과피 추출물의 유리당 함량을 분석한 결과, Table 2-20과 같았다. 캠벨에서와 같이 sucrose의 함량은 거의 없었으나, 캠벨과는 달리 거봉과피에서는 glucose가 없었고, fructose양이 총 유리당의 대부분을 차지하고 있었다. 이로 미루어보아, 캠벨보다 거봉은 당도가 떨어지고, 신맛을 많이 낼 것으로 생각되어진다.

Table 2-17. Organic acid content(mg%) of extracted from campbell grape coat.

	Fumaric acid	Formic acid	Maric acid	Citric acid	Succinic acid	Total acid
0.1%Formic acid	4	100	19	ND*	9	132
0.1%Acetic acid	19	89	ND	ND	23	131
0.1% Citric acid	28	ND	16	6120	ND	6164
0.1% HCl	22	ND	18	ND	ND	40
0.1%Phosphoric acid	21	ND	19	ND	ND	40
0.1% TFA	14	15	19	ND	8	56

ND : not detected

Table 2-18. Organic acid content(mg%) of extracted from Kyoho grape coat.

	Fumaric acid	Formic acid	Maric acid	Citric acid	Succinic acid	Total acid
0.1% Formic acid	ND*	105	29	ND	17	361
0.1% Acetic acid	ND	88	ND	ND	78	166
0.1% Citric acid	18	89	ND	6267	ND	6374
0.1% HCl	29	71	ND	ND	26	126
0.1% Phosphoric acid	51	75	ND	ND	81	207
0.1% TFA	8	ND	12	31	ND	51

ND : not detected

Table 2-19. Carbohydrate content(mg%) of extracted campbell grape coat.

	Free suger			
	glucose	fructose	sucrose	Total
0.1% Formic acid	36	54	2	92
0.1% Acetic acid	22	26	2	50
0.1% Citric acid	42	47	1	90
0.1% HCl	38	49	2	89
0.1% Phosphoric acid	32	33	2	67
0.1% TFA	38	42	1	81

Table 2-20. Carbohydrate content(mg%) of extracted Kyoho grape coat.

	Free suger			
	glucose	fructose	sucrose	Total
0.1% Formic acid	ND	90	2	92
0.1% Acetic acid	ND	152	1	153
0.1% Citric acid	ND	97	4	101
0.1% HCl	ND	123	1	124
0.1% Phosphoric acid	ND	104	1	105
0.1% TFA	ND	170	1	171

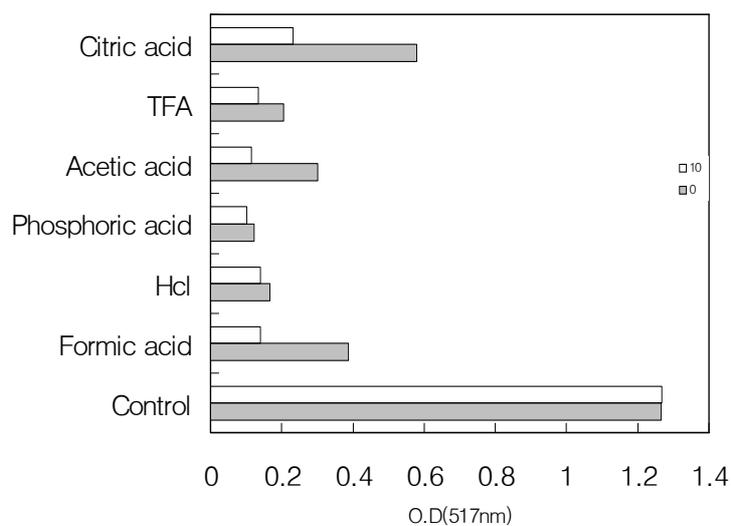


Figure 2-4. Electron donating ability of extracted Kyoho grape.

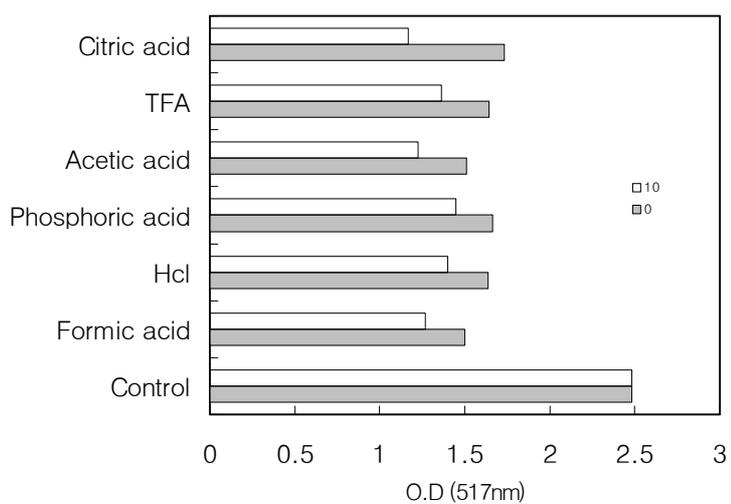


Figure 2-5. Electron donating ability of extracted Campbell grape.

Spectrophotometer를 이용한 전자공여능 측정결과 Figure 2-4과 2-5와 같이 anthocyanin함량이 높게 측정된 0.1% HCl이 첨가된 용매나 0.1% TFA가 첨가된 용매에 비해 0.1% citric acid가 첨가한 용매에서 가장 활성이 높은 것으로 측정되어 포도과피의 항산화 활성은 anthocyanin색소보다는 resveratrol이나 catechin과 같은 다른 물질에 의한 생각되어진다. 페놀함량은 캠벨은 0.1% HCl과 0.1% citric acid가 첨가된 용매에서 유의적으로 가장 높은 수준을 보였으며, 거봉의 경우에는 두 용매가 유의적으로 다르게 나타났지만, 0.1% citric acid가 첨가된 용매의 경우가 더 유의적으로 높은 수준을 보였다.

SOD 유사활성은 캠벨은 0.1% HCl를 첨가한 용매에서 유의적으로 가장 높았으나, 0.1% citric acid가 첨가된 용매에서도 높은 수준으로 나타났고, 거봉은 0.1% citric acid가 첨가된 용매에서 추출한 경우 유의적으로 가장 높았다. 일반적으로 포도과피의 색소를 효율적으로 추출하기 위해 산을 첨가하는데, 본 연구에서는 산성용매를 달리 하여 캠벨과피와 거봉과피를 추출하여 가장 효율적으로 색소를 추출해내고, 더불어

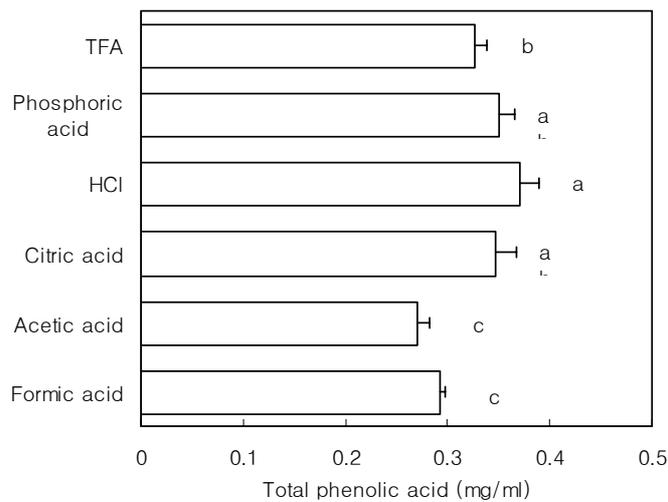


Figure 2-6. Content of total phenolic acid of campbell coat. ($p < 0.0001$)

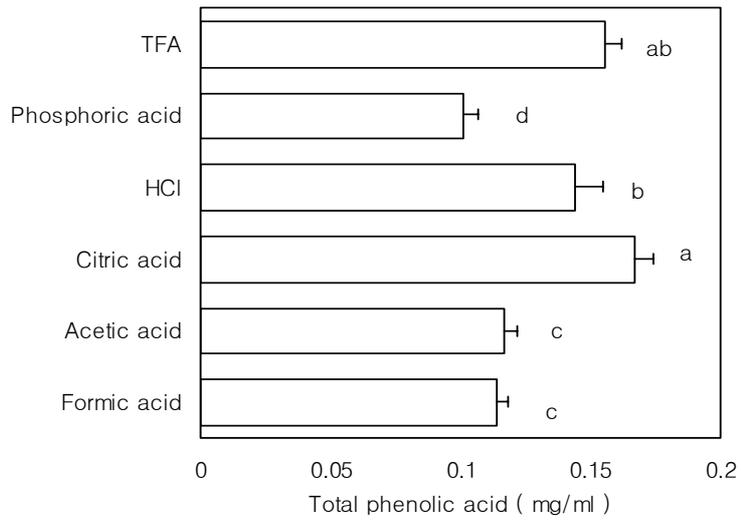


Figure 2-7. Content of total phenolic acid of Kyoho coat. ($p < 0.0001$)

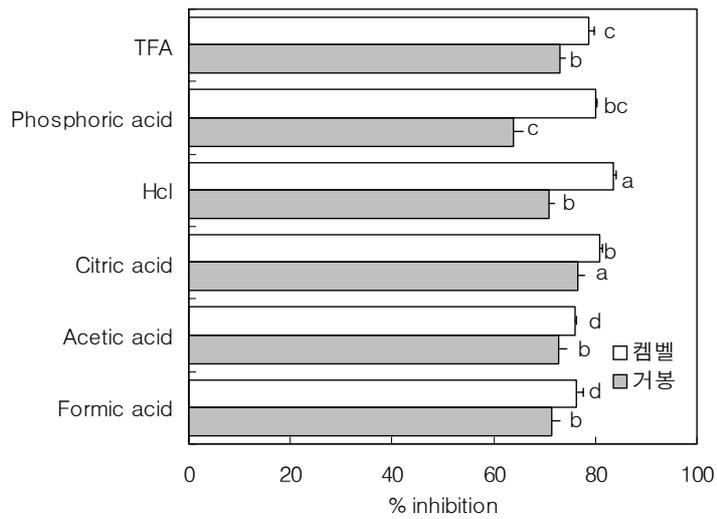


Figure 2-8. SOD (superoxide dismutase) content (%) of extracted Campbell and Kyoho coat. ($p < 0.0001$)

항산화 활성을 알아보았다. 실험결과, anthocyanin 함량이 높게 나타난 켈벨과피와 거봉과피와는 다소 차이점을 보이기는 하지만, 전반적으로 적색색소를 추출해내는 용도로 사용한다면, pH가 낮은 HCl을 첨가한 용매를 사용하는 것이 가장 효과적인 것으로 나타났다. 그러나, Citric acid를 첨가한 용매에서는 뛰어난 항산화 활성을 보였고, 거봉과피에서는 anthocyanin 함량도 높은 수치를 보여 추출용매로 사용하는데 있어 효과적일 것으로 사료된다.

제 3 절 포도씨 추출물의 항산화 효과

포도(*Vitis vinifera* Linne)는 유기산, 비타민, 미네랄은 물론이고, anthocyanins, benzoic acid, flavanol, procyanidin, prophyllgallate 등의 페놀성 화합물과 항산화물질로 알려져 있는 resveratrol이 풍부하게 함유되어 있어 혈중 콜레스테롤 수치를 저하시켜 동맥경화, 뇌졸중, 심장병 예방 및 치료효과가 있으며 항암, 항산화, 항진균 작용을 한다. 본 연구에서는 포도 가공과정 중 발생하는 포도폐기물을 기능성 식품으로 활용하기 위해 생과 중량의 약 3%를 차지하고 있는 포도씨를 ethyl acetate, water를 이용하여 추출하고 항산화 활성을 측정하였다.

1. 재료 및 방법

가. 재료

본 시험에 사용한 공시재료는 2002년도에 옥천 포도 시험장 포장에서 재배된 campbell early 품종을 수집하여 과피와 씨를 분리한 뒤 음건한 후, -20 ℃ 냉동고에 보관하면서 각종 실험에 사용하였다.

나. 실험방법

1) 포도씨의 이화학적 특성 분석

가) 추출

본 시험에 사용한 공시재료는 예산지역에서 생산된 캠벨(*Campbell Early*), 머스켓 오브 알렉산드리아(*Muscat of Alexandria*), 거봉계량(*Developed Kyoho*), 청포도(*Glod Finger*), 머루(*Meru*), 홍부사(*Beni Fuji*) 및 모르겐션(*Morgen Schon*)의 7가지 포도종을 사용하였으며, 각 품종별 포도로부터 과피와 씨로 분리하여 포도씨를 실온에서 건조시킨 뒤 막자사발을 이용하여 파쇄한 다음 냉장 보관하면서 시료로 사용하였다.

나) 일반성분 분석

포도씨의 수분, 조회분, 조단백질 및 조지방 함량은 AOAC 방법으로 정량하였다. 즉 수분은 분쇄한 포도씨를 100℃에서 건조시켜 수분함량을 계산하였고, 조회분은 회화법으로, 조지방질 함량 측정은 soxhlet을 이용하여 hexane으로 추출한 후 정량하였다. 조단백질 함량은 micro kjeldahl 방법에 의해 측정하였다.

다) 지방산 분석

포도씨에서 지방을 추출한 후, methanol과 benzene, 2'-dimethoxypropan 및 heptane으로 methylation하고, gas chromatography를 이용하여 Table 2-21과 같은 조건으로 측정하였다.

라) 페놀성 화합물의 정량

AOAC의 folin-denis법을 일부 변형하여 비색 정량하였다. 포도씨를 ethanol을 이용하여 mg/mL로 녹인 후 분석시료로 이용하였다. 시료에 2% Na₂CO₃를 넣고 2분간 실온에 정치한 뒤 50% folin ciocalteu's 시약을 가하고 혼합하여 실온에서 30분 정치한 후 750nm에서 흡광도를 측정하였다. catechin을 0-1.0 mg/mL의 농도로 조제하여 표준 곡선을 작성하여 계산하였고, 모든 처리는 3회 반복하였다.

마) Resveratrol 정량

HPLC를 이용하여 Table 2-22와 같은 조건으로 포도씨 속에 함유된 resveratrol 함량을 분석하였다. Resveratrol 표준품은 Sigma(USA)사에서 구입하여 0-1.0 mg/mL 농도로 조제하여 사용하였다.

2) 포도씨 추출물 조제

포도씨 10 kg을 분쇄(Cutting mill DS-40, Dasol Scientific Co.)하여 70% acetone 용매로 추출, 농축 후 동결 건조하여 662 g을 얻었고, 70% acetone 추출물 600 g을 water 1 L로 현탁하여 separated funnel에 넣은 후 petroleum ether 3 L로 3회 반복

분획하였다. 분획한 petroleum ether layer는 25℃에서 감압 농축하여 67.69 g 얻었고, water layer는 다시 water layer(122 g)과 ethyl acetate layer(32 g)로 분획하여, 25℃에서 감압 건조하여 냉장 보관하였다.

Table 2-21. Operation condition of gas chromatography.

Instrument	Hewlett Packard 5890 SERIES II Plus, USA
Column	SP TM 2330 capillary column (30cm×0.25mm×0.2μm film thickness)
Column temp.	Held at 140℃에서 3min, then temperature programed at 2℃/min to 220℃, and held at this point for a further 5min
Carrier gas	N ₂
Detector	FID

Table 2-22. Operation condition of HPLC for analysis of resveratrol contents.

Items	Conditions
Instrument	Young-lin associates
Column	μ-C18 Bondapak (4.6×150mm, Waters)
Mobile phase	Methanol : Water = 40 : 60, v/v
Flow rate	0.8 ml/min
Detector	UV 320 nm

가) Sephadex LH-20 column chromatography에 의한 분배-1차

용매 분획한 ethyl acetate layer를 open column chromatography로 분리하였다. Glass column에 sephadex LH-20을 충전시키고, ethyl acetate layer을 일정량 loading 하였으며, 전개용매는 ethanol 100%, methanol 100%를 사용하여 용출하였다. 분취한 시료는 UV-vis spectrophotometer에 의해 흡수파장을 확인하였으며, 같은 파장의 플라스크는 서로 합쳐 감압 농축 후, 박층 크로마토그래피(TLC)에 의해 ethyl acetate, acetone, water (18 : 1 : 1)로 전개하였다. TLC상의 spot은 UV-Lamp로 확인한 후 molybden, 4% H₂SO₄, 5% vanillin 발색하여 spot을 확인하였다. 그리고 동일한 Rf 값을 갖는 spot의 플라스크는 서로 합쳐 감압 농축하여 4개의 소분획물(A, B, C, D)을 얻었다.

나) Sephadex LH-20 column chromatography에 의한 분배-2차

Sephadex LH-20 column chromatography로 분리한 A, B, C, D 분획물 중에서 C 분획물을 일정량의 ethanol에 녹인 후 sephadex LH-20을 충전시킨 glass column에 loading하였다. 전개용매는 ethanol (100, 50:50), acetone 100%를 사용하여 용출하였고, 분취한 시료는 UV-vis spectrophotometer에 의해 200 nm-1000 nm까지 흡수파장을 확인하여 같은 파장대의 플라스크는 서로 합쳐 감압 농축 후, 박층 크로마토그래피(TLC)에 의해 ethyl acetate, acetone, acetic acid (10 : 1 : 1)로 전개하였다. TLC상의 spot은 UV-Lamp로 확인한 후 4% H₂SO₄과 5% vanillin로 각각 발색하여 spot을 확인하였고 동일한 Rf 값을 갖는 spot의 플라스크는 서로 합쳐 감압 농축하여 16개의 소분획물(E1-E11, A1-A5)을 얻었다.

3) 항산화 활성 측정

가) 총 페놀함량 측정

총 페놀함량 측정은 AOAC의 Folin-Denis법을 일부 변형하여 비색정량하였다. 시료에 2% Na₂CO₃를 넣고 2분간 실온에 정치한 뒤 50% Folin ciocalteu's(2 N) 시약을

가하고 혼합하여 실온에서 30분 정치한 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. Catechin을 0-1.0 mg/ml의 농도로 조제하여 표준곡선을 작성하여 계산하였다.

나) 총 플라반 함량 측정

4%의 vanillin에 추출물과 HCl 을 가하여 실온에서 15분 동안 반응시킨 후 500 nm에서 측정하였으며, 표준곡선은 catechin을 0-1.0 mg/mL 농도로 조제하여 검량하였다.

다) 전자공여능(Electron donating activity) 측정

추출물에 DPPH 용액을 가하여 잘 섞은 후 517 nm에서 20분간 흡광도의 변화를 측정하여 다음과 같이 계산하여 나타내었다.

$$\text{EDA (\%)} = 100 - (A / B \times 100)$$

A : 시료 첨가군의 흡광도

B : 시료 무첨가군의 흡광도

라) Hydroxyl radical 소거활성 측정

시험관에 0.1 mM FeSO₄/EDTA 용액, 10 mM 2-deoxyribose, 시료액, 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4), 10 mM H₂O₂를 혼합하여, 37°C 수욕조에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후 20% TCA, 0.67%의 TBA를 가하여 100°C에서 15분 가열시킨 후 급속히 냉각하고 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Hydroxyl radical scavenging activity} = (A - B) / A \times 100$$

A : 시료 무 첨가군의 흡광도

B : 시료 첨가군의 흡광도

마) Hydrogen peroxide 소거활성 측정

Hydrogen peroxide 소거활성은 Muller의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 시험관에 PBS, ethanol 또는 시료를 가한 후 1.0 mM의 H₂O₂를 가하고 5분 동안 방치한 후, 1.25 mM ABTS [2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid와 peroxidase를 가하고 37°C에서 10분간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Hydrogen radical scavenging activity (\%)} = (A - B) / A \times 100$$

A : 시료 무 첨가군의 흡광도

B : 시료 첨가군의 흡광도

바) Peroxyl radical 저해활성 측정

시험관에 혈청, 10 μ M AAPH(2-2'-Azobis Dihydrochloride), 시료 및 PBS를 가하고, 37°C의 수욕조에서 2시간 동안 반응시킨 뒤, 20% TCA와 0.67%의 TBA를 가하여 100°C에서 15분 가열시킨 후 급속히 냉각하고 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{AAPH oxidase scavenging activity (\%)} = (A - B) / A \times 100$$

A : 시료 무 첨가군의 흡광도

B : 시료 첨가군의 흡광도

사) Xanthine oxidase 저해활성 측정

Xanthine oxidase 저해활성 측정은 Stirpe와 Corte의 방법에 따라 측정하였다. 반응구는 0.2 mL의 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)와 2 mM xanthine 에 xanthine oxidase, 시료를 가하고 대조구에는 시료액 대신 증류수를 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시키고 20% TCA 를 가하여 반응을 종료시키고 원심 분리하여 단백질을 제거한 후 반응액 중에 생성된 uric acid를 흡광도 292 nm에서 측정하였다.

$$\text{Xanthine oxidase scavenging activity(\%)} = 100 - (A / B) \times 100$$

A : 시료 무 첨가군의 흡광도

B : 시료 첨가군의 흡광도

4) 통계처리

본 연구의 결과는 평균±SD로 나타내었고, 각 실험군 간의 비교분석은 SAS system을 이용하여 ANOVA 분석 후 $\alpha=0.05$ 에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의적 수준을 검증하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 포도씨의 이화학적 특성 분석

1) 일반성분

포도씨의 품종별 일반성분 분석결과는 Table 2-23과 같다. 수분함량은 청포도 8.7%, 캠벨 9.9%로 품종에 따라 약간의 차이가 나타났다. 조지방 함량은 평균 10.5%였고, 거봉계량이 13.03%로 가장 높았으며, 청포도가 7.8%로 가장 낮았다. 조회분 함량은 0.8-3.0%로 다양한 분포로, 홍부사가 가장 낮았고, 거봉계량과 머루가 유의적으로 높은 수준을 나타내었다. 포도씨의 평균 조단백질함량은 7.8%로, 홍부사가 5.7%로 가장 낮고, 모르젠션이 9.1%로 가장 높았다. 본 실험에서 측정된 결과는 황 등과 윤 등에 의한 결과보다는 다소 적게 나타났는데, 이러한 결과는 농산물의 생산지 또는 기후적 특성 및 토양적 차이로 인해 특수 및 일반성분이 커다란 차이를 나타내기 때문인 것으로 생각된다. 본 연구결과 포도씨에는 조지방, 조회분, 조단백질 함량 모두 품종 간에 차이를 보이기 는 하지만, 각 영양성분들이 골고루 함유되어 있어 유지자원 또는 단백질자원으로 포도씨의 활용가능성이 시사되었다.

2) 지방산 조성

Hexane을 이용하여 soxhlet 방법으로 추출한 조지방질의 지방산을 GC를 이용하여 분석한 결과는 Table 2-24와 같다. 주요 식물 지방산인 palmitic acid(C_{16:0}) 8.35-33.64%, heptadecanoic acid(C_{17:0}) 2.29-7.42%, stearic acid(C_{18:0}) 7.68-14.12%, oleic acid(C_{18:1}) 9.94-37.98% 및 linoleic acid(C_{18:2}) 6.48-50.17% 등을 골고루 함유하고 있으나 품종간의 구성비율은 큰 차이를 보였다. 평균적으로 oleic acid(C_{18:1}) > palmitic acid(C_{16:0}) > linoleic acid(C_{18:2}) > stearic acid(C_{18:0}) > heptadecanoic acid(C_{17:0})의 순으로 구성되어 있다. Palmitic acid(C_{16:0})는 캠벨에서 많이 검출되었고, 모르겐선 품종에서는 가장 적은 8.35%를 보였다. Oleic acid(C_{18:1})는 모르겐선에서는 가장 적은 9.94%를 보인 반면, 나머지 품종들은 비슷한 수준으로 나타났다. 필수 지방

Table 2-23. Proximate analysis of 7 different cultivar grape seeds.

Cultivar	Moisture (%)	Crude fat (%)	Crude ash (%)	Crude protein (%)
CE ¹	9.9	8.8	1.8	7.7
MA ²	8.8	11.7	2.0	8.5
DK ³	8.8	13.3	2.8	8.0
GF ⁴	8.7	7.8	1.8	8.7
MR ⁵	9.0	11.5	3.0	7.3
BF ⁶	9.5	9.4	0.8	5.7
MS ⁷	9.1	8.5	1.4	9.1

CE¹: *Campbell Early*, MA²: *Muscat of Alexandria*, DK³: *Developed Kyoho*,

GF⁴: *Glod Finger*, MR⁵: *Meru*, BF⁶: *Beni Fuji*, MS⁷: *Morgen Schon*

산의 하나인 linoleic acid는 청포도, 홍부사, 캠벨에서는 5.22, 6.48, 9.36%로 낮은 수준

으로 검출된 반면, 모르겐션은 50.17%로 포도씨에 함유되어 있는 지방산 조성이 상이 나타났다. 본 연구 결과 oleic acid(C_{18:1}), linoleic acid(C_{18:2})와 같은 불포화 지방산의 함량이 머루 65.05%, 거봉계량 60.96%, 모르겐션 60.11%, MOA 53.70% 차지하며, 짧은 사슬의 지방산보다는 긴 사슬의 지방산의 비율이 높은 것으로 보아 포도씨가 영양적 조성이 우수한 새로운 유지자원으로서 이용 가능하다고 생각된다.

3) 총 페놀성 화합물의 정량

페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포하며, 특히 2차 대사산물로 식물 내에 축적된다. 특히 페놀성 화합물들은 생체 내에서 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려지면서 천연물로부터 항산화물질을 추출하려는 연구가 다양한 각도에서 이루어지고 있다. 포도씨에 함유되어 있는 총 페놀성 화합물의 함량을 측정한 결과는 Figure 2-9에 나타내었다. 총 페놀성 화합물은 포도품종별로 1.31 mg-84.07 mg/100 mL로 많은 차이를 보였으며, 거봉계량종이 84.07 mg/100 mL로 MOA 1.31 mg/100 mL보다 유의적으로 높게 나타났다. Walker는 포도 와인 속에 함유되어 있는 페놀성 화합물의 항산화효과가 ascorbic acid나 α -tocopherol보다도 더 우수하다고 보고한 바 있으며, 이 외에도 포도나 와인 등에 함유된 페놀성 화합물의 항산화작용에 관한 연구는 많이 이루어져 있다. 항산화효과적인 측면에서 볼 때 총 페놀성 화합물의 함량과 항산화 효과와는 밀접한 관계가 있기 때문에 총 페놀성 화합물의 함량이 보다 높은 거봉계량종이나 모르겐션, 머루포도에서의 항산화 효과가 청포도나 MOA보다 더 우수할 것이라고 생각된다.

4) Resveratrol 함량

Resveratrol(3,4',5-trihydroxystilbene)은 대부분의 포도품종에서 발견되는 천연 페놀성 화합물로서 최근 많은 생물학적 활성이 보고되고 있다. 포도과피 속에 많이 함유되어 있는 resveratrol은, 특히 와인 속에 높은 수준으로 존재하여 LDL-콜레스테롤의 산화를 억제시킴으로써, 관상심장질환의 위험을 감소할 수 있다고 알려져 있다.

Kallithraka 등은 그리스 적포도주의 생산지와 재배지에 따라 resveratrol의 함량을 측정한 결과, 0.55-2.53 mg/L로 다양한 농도로 와인에 함유되어 있었고, 특히 Rhodes island에서 재배된 mandilaria grapes에 의해 만들어진 와인에서 평균 1.62 mg/L로 가장 높은 수준을 보였다. 본 연구에서는 7가지 품종의 포도씨를 methanol에 녹인 후, HPLC를 이용하여 resveratrol의 함량을 측정한 결과, Table 2-25와 같이 머루, 거봉, 계량 및 켄벨에서 발견되었으며, 특히 머루는 1 g seed당 29.29 mg으로 가장 높은 함량이 함유되어 있는 것으로 나타났다. 반면에 청포도, MOA, 홍부사 및 모르겐션은 측정되지 않아 품종에 따라 resveratrol 함량에 많은 차이가 있는 것으로 나타났다.

나. 포도씨 유효물질 분리

실온에서 음건한 포도씨 10 kg을 분쇄하여 70% acetone용매로 추출하고 농축한 후 동결 건조하여 662 g을 얻었으며, 지방성분을 제거하기 위하여 70% acetone 추출물 600 g을 water 1 L로 현탁하여 seperated funnel에 넣은 후 petroleum ether 3 L로 3회 반복 분획하였다. 분획한 petroleum ether layer는 25°C에서 감압 농축하여 67.69 g 얻었고, water layer는 다시 funnel flask를 이용하여 water layer(122 g)과 ethyl acetate layer(32 g)로 분획하였다. 용매 분획한 ethyl acetate layer에서 포도씨에 함유되어 있는 유효물질을 분리하기 위해 sephadex LH-20을 4×72cm까지 충전시킨 glass open column에 ethyl acetate layer 20 g을 loading하였으며, 전개용매는 ethanol 100%, methanol 100%를 사용하여 용출하였다. 분취한 시료는 UV-vis spectrophotometer에 의해 흡수파장을 확인하였으며, 같은 파장의 플라스크는 서로 합쳐 감압농축 후, 박층 크로마토그래피(TLC)에 의해 ethyl acetate, acetone, water (18:1:1)로 전개하였다. TLC상의 spot은 UV-Lamp로 확인한 후 molybden, 4% H₂SO₄, 5% vanillin 발색하여 spot을 확인하였고 동일한 R_f 값을 갖는 spot의 플라스크는 서로 합쳐감압 농축하여 각각 A (0.76 g), B (6.49 g), C (6.12 g), D (4.36 g) 4개의 소 분획물을 얻었다.

Table 2-24. Fatty acid compositions of crude grape seed oils by gas chromatography.

Fatty acid component(%)	CE ¹	MA ²	DK ³	GF ⁴	MR ⁵	BF ⁶	MS ⁷
C _{8:0} ⁸	6.67	4.29	3.18	8.91	N.D*	4.27	11.38
C _{14:0} ⁹	N.D	1.52	1.15	1.07	1.46	N.D	4.92
C _{14:1} ¹⁰	N.D	1.05	0.70	0.46	1.03	N.D	N.D
C _{15:0} ¹¹	N.D	0.78	0.92	0.64	0.64	1.39	N.D
C _{16:0} ¹²	33.64	26.12	19.85	27.76	19.03	28.82	8.35
C _{16:1} ¹³	2.99	1.19	2.61	1.00	1.47	3.09	N.D
C _{17:0} ¹⁴	7.42	4.87	2.29	5.07	2.53	4.37	3.89
C _{18:0} ¹⁵	9.65	7.68	8.36	14.12	8.80	13.59	11.35
C _{18:1} ¹⁶	30.26	31.14	36.56	35.77	36.79	37.98	9.94
C _{18:2} ¹⁷	9.36	22.56	24.40	5.22	28.26	6.48	50.17
USFA ¹⁸	39.62	53.70	60.96	40.99	65.05	44.46	60.11

CE¹: *Campbell Early*, MA²: *Muscat of Alexandria*, DK³: *Developed Kyoho*,

GF⁴: *Glod Finger*, MR⁵: *Meru*, BF⁶: *Beni Fuji*, MS⁷: *Morgen Schon*

N.D*: not detected, C_{8:0}⁸: Caprylic acid, C_{14:0}⁹: Myristic acid, C_{14:1}¹⁰: Myristoleic acid,

C_{15:0}¹¹: Pentadecanoic acid, C_{16:0}¹²: Palmitic acid, C_{16:1}¹³: Palmitoleic acid

C_{17:0}¹⁴: Heptadecanoic acid, C_{18:0}¹⁵: Stearic acid, C_{18:1}¹⁶: Oleic acid, C_{18:2}¹⁷: Linoleic acid

USFA¹⁸: Unsaturate fatty acid (C_{18:1}+C_{18:2})

Sepadex LH-20 column chromatography로 1차 분리하여 얻은 A, B, C, D 소분획물 중 C(6 g)을 일정량의 ethanol에 녹인 후 다시 sephadex LH-20을 7×42cm까지 충전시킨 galss column을 이용하여 2차 분리하였다. 전개용매는 ethanol (100, 50:50), acetone 100%를 사용하여 용출하였고, 분취한 시료는 UV-vis spectrophotometer에 의해 200 nm-1000 nm까지 흡수파장을 확인하여 같은 파장대의 플라스크는 서로 합쳐 감압농축 후, 박층 크로마토그래피(TLC)에 의해 ethyl acetate, acetone, acetic acid (10 : 1 : 1)로 전개하였다. TLC상의 spot은 UV-Lamp로 확인한 다음, 4% H₂SO₄과 5% vanillin로 각각 발색하여 spot을 확인하였고 동일한 Rf 값을 갖는 spot의 플라스크는 서로 합쳐 감압 농축하여 16개의 소분획물(E1: 0.134 g, E2: 0.148 g, E3: 0.170 g, E4: 0.075 g, E5: 0.102g, E6: 0.172 g, E7: 0.231 g, E8: 0.217 g, E9: 0.185 g, E10: 0.187 g, E11: 1.932 g, A1: 0.037 g, A2: 0.109 g, A3: 0.175 g, A4: 0.397 g, A5: 0.313 g)을 얻었다.

다. 항산화 활성 측정

1) 총 페놀함량 측정

폴리페놀 화합물 중 flavonoid는 ¹O₂나 O₂⁻와 반응하며 안정한 complex를 형성하여 이들의 소거작용을 가지고 있어 지질의 과산화에 대한 항산화제로 잘 알려져 있다. 포도씨에는 polyhydroxyflavan-3-ol units의 oligomer와 polymer인 proanthocyanidin으로 정의되는 폴리페놀 화합물이 각종 기능성을 나타내는 유용물질로 보고되고 있다. Negro등은 포도폐기물(marc, seed, peel)로부터 총 페놀함량을 측정하였으며 그 결과, 100g dry matter 당 marc; 4.19±0.04 g, seed; 8.58±0.03g, peel; 3.33±0.03 g으로 포도씨에 많은 양의 페놀성 화합물이 함유되어 있는 것을 알 수 있었다. 본 연구에서는 포도씨 조추출물과 sepadex LH-20에 의해 분리한 분획물의 총 페놀성 화합물의 함량을 측정한 결과, ethyl acetate layer에서 얻은 A, B, C, D 분획물 중 C 분획물이 ethyl acetate 조추출물과 다른 분획물에 비해 유의적으로 높은 수준을 보였으며, C

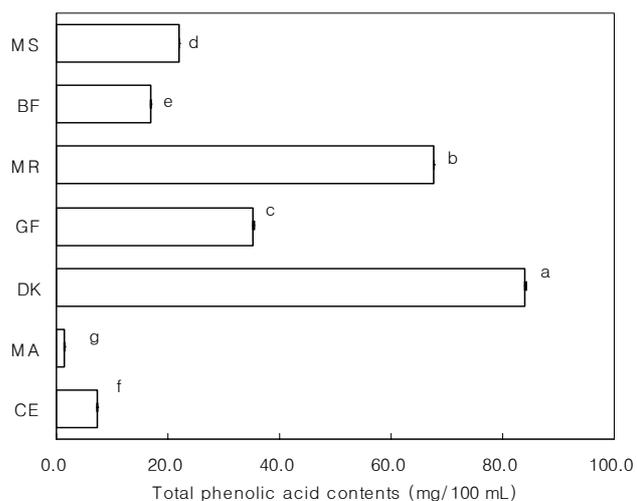


Figure 2-9. Total phenolic acid contents of extracts prepared from 7 different cultivar grape seeds.

CE: *Campbell Early*, MA: *Muscat of Alexandria*, DK: *Developed Kyoho*, GF: *Glod Finger*, MR: *Meru*, BF: *Beni Fuji*, MS: *Morgen Schon*

Table 2-25. Resveratrol contents of extracts prepared from 7 different cultivar grape seeds.

Cultivars	Resveratrol contents (mg/g seed)
CE ¹	10.77
MA ²	N.D*
DK ³	11.53
GF ⁴	N.D
MR ⁵	29.29
BF ⁶	N.D
MS ⁷	N.D

CE¹: *Campbell Early*, MA²: *Muscat of Alexandria*, DK³: *Developed Kyoho*, GF⁴: *Glod Finger*, MR⁵: *Meru*, BF⁶: *Beni Fuji*, MS⁷: *Morgen Schon*, N.D*: not detected

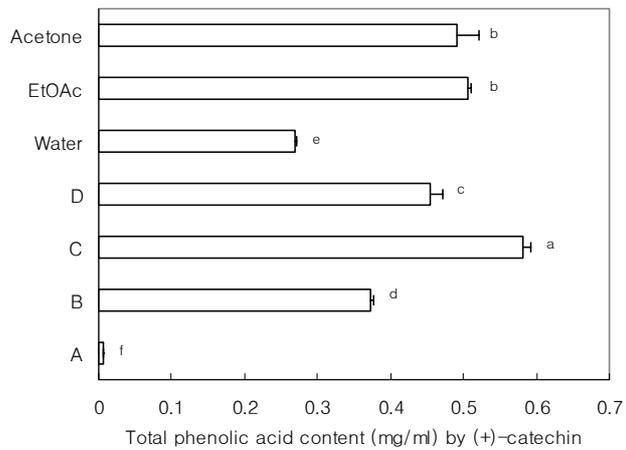


Figure. 2-10. Total phenolic acid content by (+)catechin of separated fraction from grape seed.

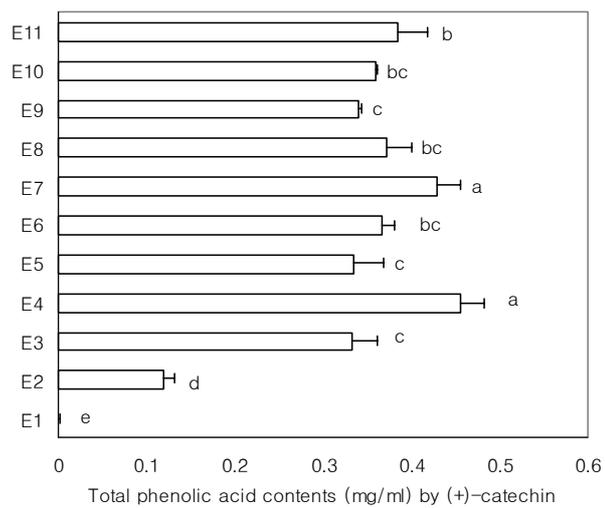


Figure 2-11. Total phenolic acid content by (+)catechin of separated fraction from ethyl acetate layer.

분획물을 다시 sepadex LH-20 column chromatography으로 분리하여 얻은 소분획물 중 E4와 E7 분획물이 높은 페놀함량을 보였다.

2) 총 플라본 함량 측정

과일 및 채소의 섭취와 암 발생간에는 서로 밀접한 상관관계가 있는데, 이는 식물 속에 함유되어 있는 많은 양의 폴리페놀 화합물이 산화를 억제하고 radical scavenger 활성을 가지고 있기 때문이다. Flavan-3-ol은 flavonoid 계열중 하나로서 포도씨에는 catechin monomer, procyanidin dimer와 같은 저분자량의 flavan이 많이 함유되어 있으며, 이들 화합물의 항산화효과는 이미 밝혀진 바가 있다. Santos Buelga 등은 와인에서 4종류의 monomers(C; catechin, EC; epicatechin, GC; gallocatechin, EGC; epigallocatechin), 8종류의 dimers(B1, B2, B3, B4, B7, GC-4,8-GC, GC-4,8-C, C-4,8-GC) 그리고 2종류의 trimers(EC-4,8-EC-4,8-C, C1)를 분리하여 이를 보고하였으며, Sakariah 등은 포도씨 추출물의 최적용매조건을 확립하기 위해 acetone, EtOAc, MeOH, EtOAc: water(9:1), EtOAc: water(17:3), EtOAc: water(4:1) 용매조건에서 추출하여 flavan-ol 함량을 측정하였으며 그 결과, EtOAc: water(17:3) 조건에서 추출한 포도씨 추출물에서 monomeric flavanols $30.2 \pm 2.26\%$ /100 g, procyanidins $23.8 \pm 2.16\%$ /100 g, total flavanols $54.0 \pm 4.86\%$ /100 g로 가장 높은 수준이었다. 본 연구에서는 포도씨 추출물과 Sepadex LH-20 column chromatography에 의해 얻은 분획물의 총 플라본 함량을 측정한 결과 추출물 중에서는 70% acetone에서 가장 높았으며, ethyl acetate층에서 분리한 소분획물 A, B, C, D 중에서는 C 분획물이 0.437 mg/ml로 유의적으로 가장 높은 수준이었다. C 분획물을 다시 sepadex LH-20 column chromatography를 통해 재분리하여 얻은 11가지 소분획물의 총 플라본 함량은 C 분획물의 수준에 미치지 못했으며 이중 E1 분획물이 0.074 mg/ml로 유의적으로 가장 높은 것으로 나타났다.

3) 전자공여능(Electron donating activity) 측정

전자공여능의 측정은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazil radical 소거법으로 측정하는데 DPPH는 분자 내 radical을 함유하고 있으며 토코페롤, 아스코르빈산, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의해 환원, radical이 소거되어 짙은 자색이 탈색되는데, 이 정도를 항산화물질의 수소공여능으로 측정하는 방법이다. 이때의 DPPH의 거동은 hydroxyl radical과 유사하여 free radical 소거실험에 활용된다. DPPH와 포도씨 추출물 및 분획물을 반응시켜 DPPH scavenger 활성을 측정한 결과, 모든 분획물이 10분 이내에 반응이 정지되었다. 특히 1차 분리에서는 ethyl acetate 층과 C 분획물이 각각 30.71%, 26.97%의 활성을 보였으며, 2차 분리를 통해 얻은 분획물에서는 E4 분획물이 58.56%, E9 분획물이 58.27%로 높은 전자공여능을 나타내었다. 이러한 결과는 포도씨 추출물이 95.3%의 전자공여능을 나타낸다고 보고한 장 등에 의한 결과와 비교하면 낮은 수준이나, 이는 실험에 사용된 포도품종 또는 포도씨 추출물의 농도가 다르기 때문일 것이라 생각되어진다.

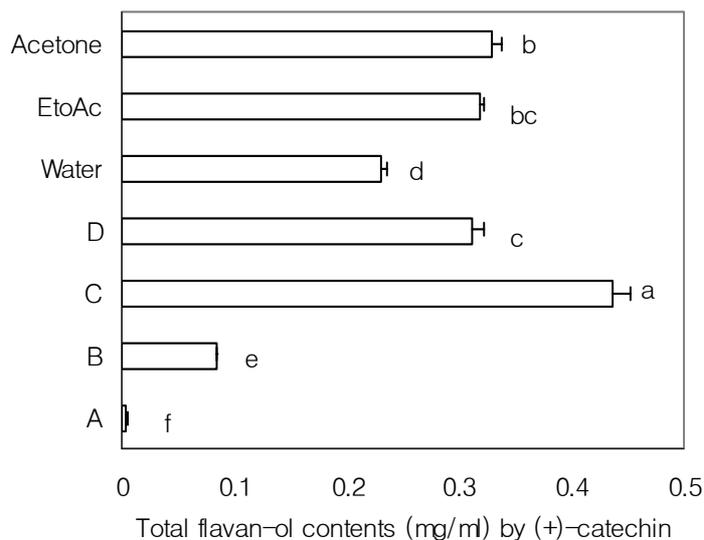


Figure 2-12. Total flavan-ol content by (+)catechin of separated fraction from grape seed.

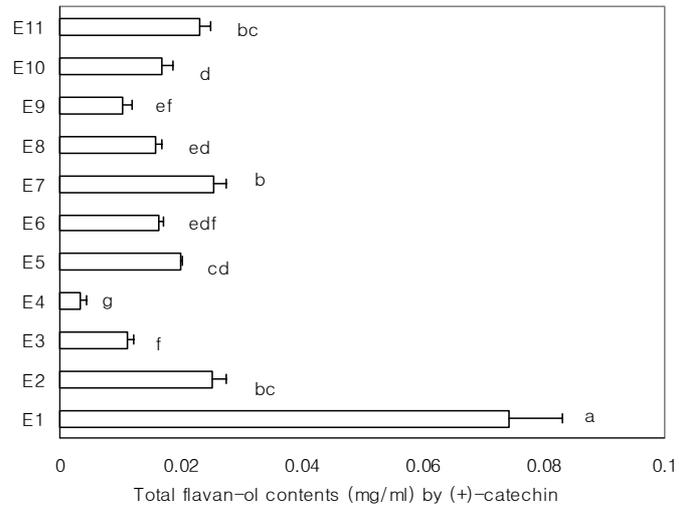


Figure 2-13. Total flavan-ol content by (+)catechin of separated fraction from ethyl acetate layer.

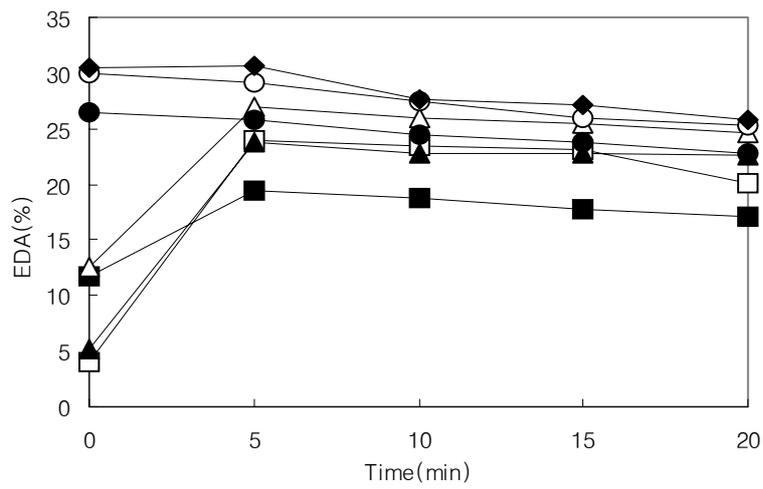


Figure 2-14. Electron donating activity(%) of separated fraction from grape seed.
 (■) : Fraction A, (□): Fraction B, (△): Fraction C, (▲): Fraction D, (●): Water extract,
 (○): Acetone extract, (◆): Ethyl acetate extract

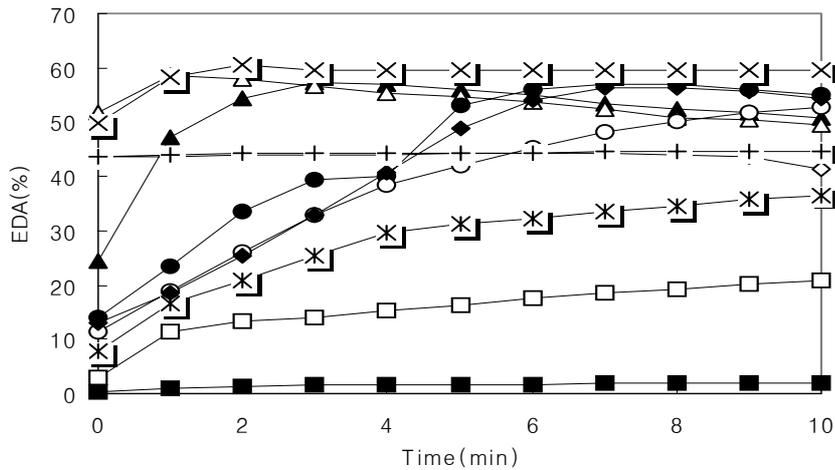


Figure 2-15. Electron donating activity(%) of separated fraction from ethyl acetate layer.

(■): Fraction E1, (□): Fraction E2, (▲): Fraction E3, (△): Fraction E4, (*): Fraction E5, (●): Fraction E6, (○): Fraction E7, (◆): Fraction E8, (×): Fraction E9, (◇): Fraction E10, (+): Fraction E11

4) Hydroxyl radical 소거활성 측정

Hydroxyl radical($\cdot\text{OH}$) 소거활성은 2-deoxyribose oxidation method에 의해 측정하였다. Hydroxyl radical 소거활성은 활성산소 중에서 반응성이 강하여 생체 산화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 포도씨 조추출물과 sepadex LH-20에 의해 분리한 분획물의 hydroxyl radical 소거활성을 측정한 결과, 조추출물과 분획물 모두 유의적으로 높은 수준을 보였으며, 특히 acetone, B, C, D 분획물이 각각 61.76%, 61.42%, 65.10%, 62.55%로 나타났고, E1과 E9 분획물은 41.97%, 39.33%으로 다른 분획물보다 높은 소거활성을 보였다. 장 등은 linoleic acid methyl ester를 기질로 하여 포도씨 추출물과 비교군으로 BHT, tocopherol, ascorbic acid를 0.01% 농도로 첨가하여 상대적인 산화억제율인 TBARS(%)를 측정한 결과 포도씨 추출물이 53%,

ascorbic acid 52%, BHT와 tocopherol이 37%의 산화 억제율을 보여 본 연구결과에서 나타난 C 분획물의 산화 억제율이 상대적으로 높은 수준임을 알 수 있었다.

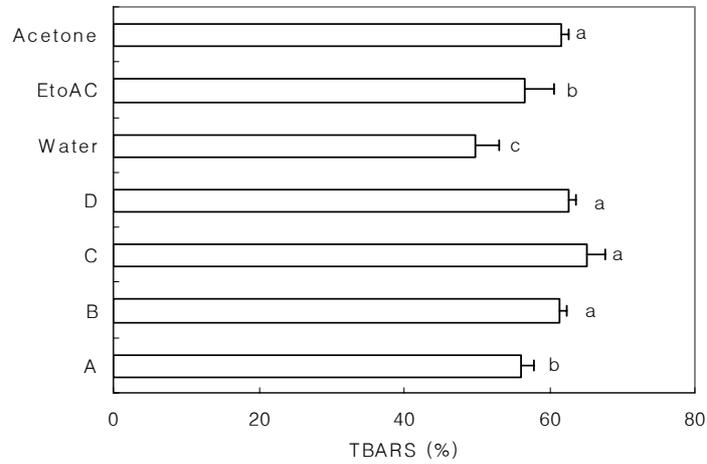


Figure 2-16. Hydroxyl radical scavenging activity(%) of separated fraction from grape seed.

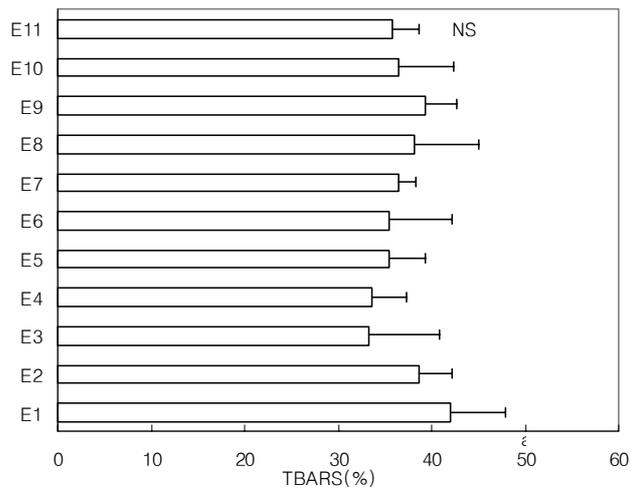


Figure 2-17. Hydroxyl radical scavenging activity(%) of separated fraction from ethyl acetate layer.

5) Hydrogen peroxide 소거활성 측정

H₂O₂는 과산화지질의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있으며, 과산화지질은 동맥경화, 뇌졸중 등의 성인병의 원인이 되고, 간장의 세포막에 과산화지질이 증가하며 세포의 기능이 저하되어 염증이 유발되며, 그 결과 간경화, 간염 등을 초래한다고 보고되고 있다. Hydrogen radical 소거활성은 SOD에 의해 생성된 과산화수소를 peroxidase를 첨가하여 물과 산소분자로 환원시켜 최종적으로 산패를 억제시켜주는 능력을 측정하는 것으로 ethyl acetate layer과 B 분획물이 59.68%, 59.22%로 유의적으로 높은 활성을 보였으며, C 분획물도 54.99%로 높은 소거활성을 나타내었다. 2차 column 분획물에서는 E11 분획물이 76.87%의 소거능을 보여 유의적으로 가장 높은 수준을 보였으며, hydroxyl radical 소거능이 가장 높았던 E1 분획물이 hydrogen radical 소거능은 2.29%로 거의 활성을 보이지 않는 것으로 나타나 radical 별로 다소 차이가 나는 것을 알 수 있었다.

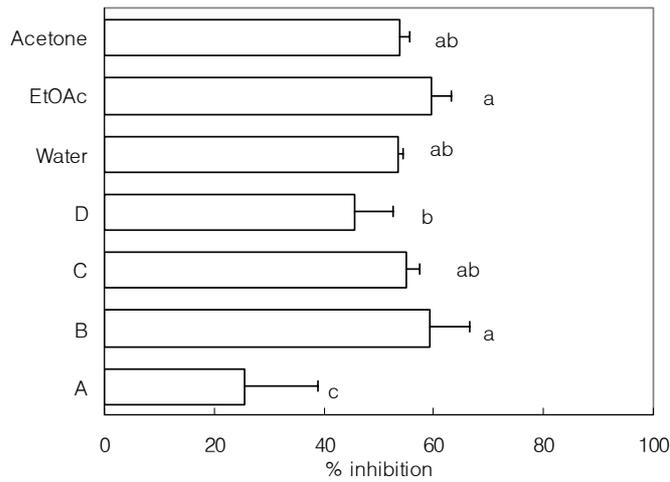


Figure 2-18. Hydrogen radical scavenging activity(%) of separated fraction from grape seed.

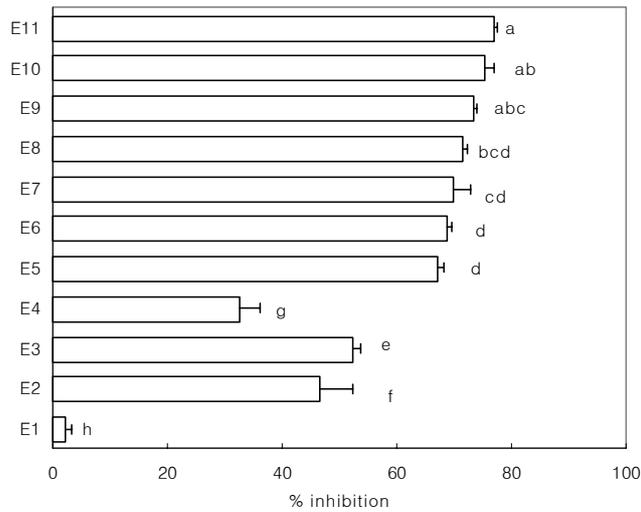


Figure 2-19. Hydrogen radical scavenging activity(%) of separated fraction from ethyl acetate layer.

6) Peroxyl radical 소거활성 측정

2-2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride, 즉 AAPH는 수용성의 azo화합물의 일종으로서 열분해에 의해 자유기를 생성시키는 것으로 알려져 있다. AAPH가 산소분자와 반응하여 생성한 탄소 자유기(carbon radical)가 또다시 과산화 자유기(peroxyl radical)를 생성하여 여러 형태의 생물학적 분자와 결합반응을 일으켜 생체막에 손상을 준다. 포도에는 resveratrol, catechin, epicatechin 및 oligomeric proanthocyanidins과 같은 항산화물질이 다양하게 함유되어 있는데, 이중 resveratrol은 과피속에 주로 존재하는 반면, proanthocyanidin은 포도씨 속에 존재한다. Das, D.K. 등은 포도씨 속에 다량 존재하는 proanthocyanidin이 peroxyl radical 및 hydroxyl radical 소거활성을 가지며, 심장질환을 예방한다고 보고하였다. 포도씨 추출물과 column chromatography를 통해 얻은 분획물의 AAPH oxidase 저해활성을 측정 한 결과 Figure 2-22와 같이 water 층 67.56%, A 분획물 64.16%, E2 분획물이

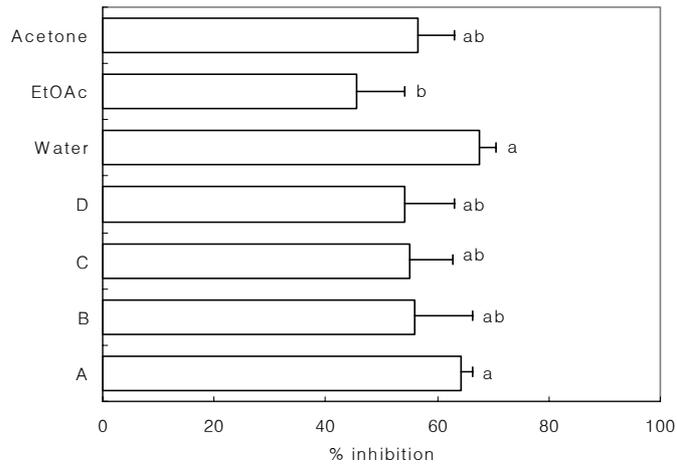


Figure 2-20. Peroxyl radical scavenging activity(%) of separated fraction from grape seed.

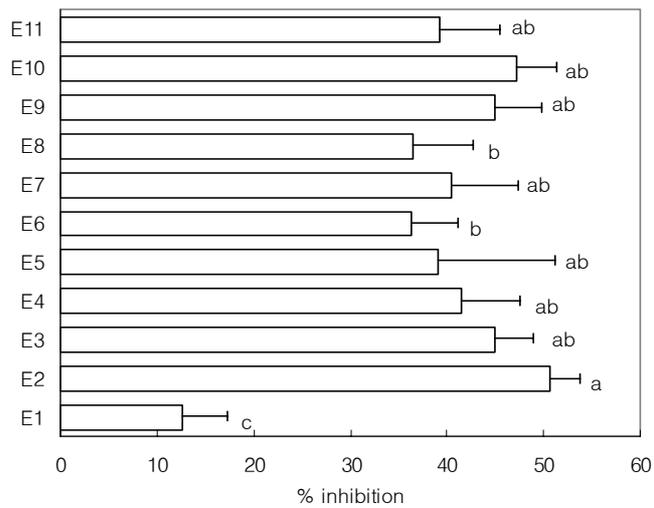


Figure 2-21. Peroxyl radical scavenging activity(%) of separated fraction from ethyl acetate layer.

50.67%로 나타났다.

7) Xanthine oxidase 저해활성 측정

Xanthine oxidase는 생체 내 퓨린 대사에 관여하는 효소로 xanthine 혹은 hypoxanthine으로부터 urate를 형성하여 혈장내 urate가 증가되면 골절에 축적되어 심한 통증을 유발하는 통풍을 일으킨다. xanthine oxidase와 xanthine, hypoxanthine과 같은 기질과의 반응은 일반적인 라디칼 형성 반응으로 알려져 있다. xanthine/xanthine oxidase-cytochrome c반응계에서 측정되는 초과산화물 음이온 라디칼에 대한 소거효과는 어떤 물질에 의해 반응계 자체가 억제될 경우, 그 물질의 실제 라디칼 소거효과는 보다 높은 활성으로 나타나게 된다. 안 등은 우롱차로부터 분리된 flavan-3-ol계인 procyanidin B-2-O-3, 3'-digallate 화합물이 농도 의존적으로 저해효과를 보였으며, 특히 50 μ mol에서 60.6%의 저해효과를 나타낸 반면, procyanidin B-2는 농도의 증가에도 거의 저해효과를 보이지 않아 같은 종류의 procyanidin B 화합물이라 하더라도 gallate가 결합된 것에서 xanthine oxidase 저해효과가 우수하다고 보고하였다. 포도씨 추출물과 open column chromatography를 통해 얻은 소분획물의 xanthine oxidase 저해효과는 Figure 2-22와 같이 ethyl acetate layer와 B, C, D 분획물에서 유의적으로 높았으며, 2차 분획에서도 E1을 제외한 모든 소분획물이 90%이상의 저해효과를 보였다. 이는 포도씨에 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있는 gallate가 결합된 procyanidin B 화합물에 의한 결과일 것으로 생각되어진다.

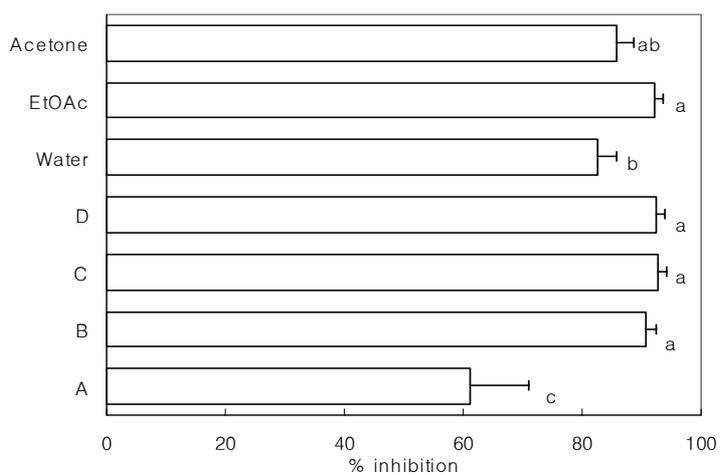


Figure 2-22. Xanthine oxidase inhibition activity(%) of separated fraction from grape seed.

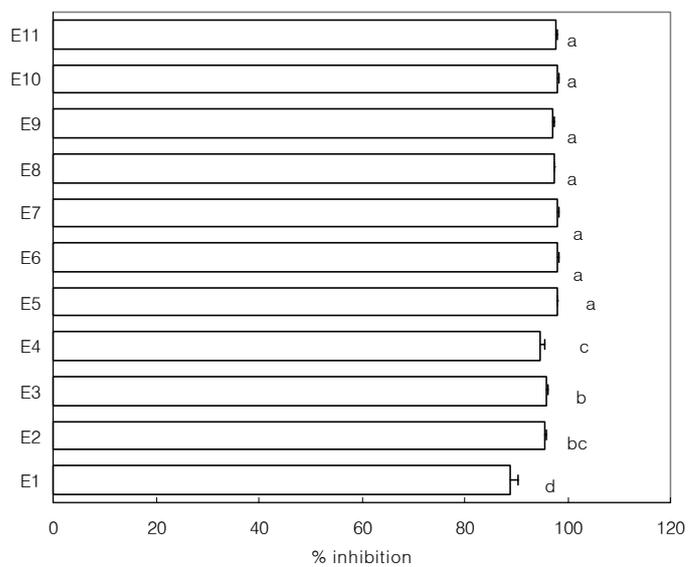


Figure 2-23. Xanthine oxidase inhibition activity(%) of separated fraction from ethyl acetate layer.

제 4 절 포도씨유가 흰쥐의 체내 지질대사 및 항산화능에 미치는 영향

최근 심장순환기계 질환 중 하나인 고지혈증과 관련된 심장질환의 발병 원인과 치료에 여러 가지 위험요소들이 논의되어지고 있는데 특히, 주요한 위험인자로는 고콜레스테롤혈증, 흡연, 고혈압, 비만, 당뇨병 등이 지적되고 있다. 식이 지방 중 콜레스테롤 및 포화지방산은 혈장 콜레스테롤과 중성지질의 농도를 상승시킴으로써 고지혈증의 유발인자로 지적되어 온 한편 다중 불포화지방산은 혈장 콜레스테롤과 중성지질 농도를 저하함으로써 심장질환계 질병 억제인자로 여겨져 왔다. 이러한 다중 불포화지방산 중 linoleic acid가 혈청 cholesterol양과 혈청 지질의 함량을 낮추고, 혈압을 감소시켜주며, 이러한 linoleic acid가 포도씨유에 70%이상 함유 되어있다고 보고된 바 있다. 또한 포도에는 resveratrol, catechin 및 anthocyanin과 같은 항산화 성분이 함유되어져 있어 이들 성분들이 생체 내에서 고지혈증 및 심혈관계 질환과 같은 순환기계 질환을 예방하는 것으로 밝혀진바 있으며, 특히 포도씨에는 catechin 성분이 함유되어 있어 수렴, 해독, 살균 및 방부작용 등 여러 가지 생리작용이 있는 것으로 알려져 있다. 이에 따라 포도씨유가 체내 지질대사에 영향을 미칠 수 있다고 생각되고, 고형 폐기물 중 전체 포도의 3~5%를 차지하는 것으로 알려진 포도종실을 다른 종실들과 같이 식량자원으로 이용할 수 있다면 산업적인 측면에서 매우 유용한 일이라 생각되어 본 연구를 실행하게 되었다.

1. 실험재료 및 방법

가. 포도씨유 제조

수분 10~12%의 포도씨를 95~100℃에서 20분 정도 볶음처리 하고 30분간 실온방냉한 다음 분쇄기로 1차 1~2mm 정도 입자로 하여 2차 분쇄로 0.5mm 이하 입자크기로

분쇄하였다. 분쇄된 씨를 steam boiler에서 0.8~0.9kg · f/cm² 의 압력으로 10분 정도 증숙시킨 후 열교환 장치가 부착된 압착 추출기에 6~8kg 정도 넣어 추출하였다. 이때의 압착력은 400kg/cm²에서 2~3분, 550~600kg/cm²에서 10분 그리고 700kg/cm²에서 기름 흔적이 없어 질 때까지 추출하여 냉장온도에 보관하면서 시료로 사용하였다.

나. 들기름 및 옥수수유

들기름은 산화방지를 위하여 방앗간에서 즉시 제조하여 사용하였으며, Corn oil은 제일제당사의 제품을 구매하여 사용하였다.

다. 실험동물 사육

생후 6주령 된 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐 60마리를 구입하여 실험 시작 전 2주일간 고형배합사료로 적응시켰다. 적응 기간 후 체중이 248.1±19.5 g인 쥐들을 체중에 따라 난괴법(randomized complete block design)에 의해 10마리씩 옥수수유군, 포도씨유군, 들기름군, 고지방식+옥수수유군, 고지방식+포도씨유군, 고지방식+들기름군 등 6군으로 나누어 9주간 사육하였다. 동물사육실은 온도 22~24℃, 습도 45% 내외로 유지시켰으며, lighting cycle은 12시간으로 일정하게 하였다. 실험동물은 한 마리씩 분리하여 stainless steel cage에서 사육하였고, 식이와 물은 자유롭게 먹도록 하였다.

라. 실험동물의 식이

실험에 사용한 식이의 구성성분은 Table 2-26과 같다. 식이섭취량은 일주일에 3회 일정한 시각에 측정하였고, 체중은 1주일에 1회 같은 시각에 측정하였다. 사육기간 동안의 총 평균 식이 섭취량과 그 동안의 체중 증가량을 계산하였다. 식이효율(Food efficiency ratio: FER)은 사육기간 동안의 체중증가량을 같은 기간동안 섭취한 식이량으로 나누어 산출하였다.

$$\text{식이 효율(FER, \%)} = \frac{\text{총실험기간의 체중증가량(g)}}{\text{총실험기간의 식이섭취량(g)}} \times 100$$

마. 혈액과 장기의 채취

실험동물을 희생 전에 하룻밤 동안 절식시키고, diethyl ether로 마취시켜 복부를 개복한 후 간정맥에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 원심분리관에 담아 24시간 냉장온도에 방치한 후 3,000rpm, 4°C에서 30분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 혈액을 채취한 후 간은 ice bath에서 즉시 떼어 0.1mM ice phosphate buffer(pH 7.4)에 세척한 다음 연결조직을 제거한 후 filter paper로 물기를 제거하여 무게를 측정하고 분석 직전까지 -70°C deep freezer에 보관하였다.

바. 생화학적 분석

1) 혈청의 총지질, 중성지방, 인지질, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤, 혈청의 총지질 농도는 Frings법으로 측정하였다. 혈청의 총콜레스테롤(TC)과 중성지방(TG) 그리고 HDL-콜레스테롤 농도는 ADVIA 1650 (JEOL, JAPAN) 장비를 이용하여 측정하였고, 인지질 농도는 Cobas Mira Plus (Roche, Switzerland) 장비를 사용하였다. 혈청의 LDL-콜레스테롤(LDL-C)은 Friedwald법 [LDL-콜레스테롤 = 총콜레스테롤-(HDL-콜레스테롤 + 중성지방/5)]에 의해 계산하였다. 혈청의 HDL-Cholesterol 농도와 LDL-Cholesterol 농도의 비율은 측정된 HDL-Cholesterol 농도에 대한 및 LDL-Cholesterol 농도로 계산하여 나타내었으며, Atherogenic Index는 동맥경화지수로서 [Total cholesterol- HDL-Cholesterol/ HDL-Cholesterol]에 의해 계산하였다

2) 간의 총지방, 중성지방 및 총 콜레스테롤

간 조직내에 총지질은 chloroform : methanol =2:1 용액을 이용한 Folch 법에 의해 추출하였다. 총콜레스테롤은 진한 황산 존재 하에서 무수초산과 반응하여 청록색의 착색 물질을 만든다. 이 때 콜레스테롤의 3위치의 수산기가 에스테르화 되는 동시에 분자 내 재배치 반응이 일어나는 원리를 이용하여 측정하였다. 중성지방은 알칼성 KOH로 비누화시킨 후 유리되는 글리세롤을 metaiodate로 산화시켜 생성된

Table 2-26. The composition of experimental diet.

(%)

Groups ¹⁾ Ingredient	C	GSO	P	CHF	GSHF	PHF
Corn starch	69.8	69.8	69.8	58.675	58.675	58.675
Casein	15	15	15	15	15	15
Mineral Mix ²⁾	4	4	4	4	4	4
Vitamin Mix ³⁾	1	1	1	1	1	1
Choline chloride	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Corn oil	10	-	-	10	-	-
Grape seed oil	-	10	-	-	10	-
Perilla oil	-	-	10	-	-	10
Lard oil	-	-	-	10	10	10
Cholesterol	-	-	-	1	1	1
Taurocholic acid	-	-	-	0.125	0.125	0.125

1) C : Corn oil diet, GSO : Grape seed oil diet, P : Perilla oil diet, CHF : Corn oil diet + 1% cholesterol + 10% lard oil, GSHF : Grape seed oil diet + 1% cholesterol + 10% lard oil, PHF : Perilla oil diet + 1% cholesterol + 10% lard oil

2) Mineral mixture(g/kg min. mix) according to AIN-76

: Calcium phosphate, dibasic 500.0, zinc carbonate 1.6, sodium chloride 74.0, cupric carbonate 0.3, potassium citrate monohydrate 220.0, potassium iodate 0.01, potassium sulfate 52.0, sodium selenite 0.01, manganese carbonate 3.5, chromium potassium sulfate 0.55, magnesium oxide 24.0, ferric citrate 6.0, powdered to make 1000.0g

3) Vitamin mixture(g/kg vit. mix.) according to AIN-76

: Thiamine-HCl 0.6, biotin 0.02, riboflavin 0.6, cyanocobalamin 0.001, pyridoxine-HCl 0.7, retinyl acetate 0.8, nicotinic acid 3.0, DL- α -tocopherol 3.8, Ca-panthothenate 1.6, 7-dehydro-cholesterol 0.0025, folic acid 0.2, menadione 0.005, powdered to make 1000.0

formaldehyde를 acetyl acetone과 반응시켜 생성된 황색의 3,5-diacetyl-1-4-dihydro luldine을 spectrophotometer로 비색 정량하는 원리를 이용하여 측정하였다.

3) 혈청과 조직 내 지질과산화도

가) 혈청과 간의 단백질 정량

0.1M phosphate buffer(pH 7.4)에 일정 비율로 희석한 시료에 2% Na_2CO_3 , 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2% potassium sodium tartarate 혼합시약을 첨가한 후 vortex하여 실온에서 10분간 방치하였다. 1N phenol시약을 첨가하고 30분 실온에 방치한 후 600nm에서 비색 정량하였다. 표준용액은 Albumin(Sigma A-8806)을 이용하였다.

나) AAPH(2,2'-Azobis(2-amidinopropane) Dihydrochloride)로 산화유도된 혈청, 간, 신장조직의 과산화물 생성량

0.1mM phosphate buffer (pH 7.4)를 1:9 비율로 가하여 마쇄 균질화한 간균질액을 단백질 정량하여 2mg protein/ml로 농도를 맞춘다. 간균질액에 100mmol AAPH, 0.1mM phosphate buffer를 넣고 37°C에서 2시간동안 incubate하여 산화를 유도했다. 이 후 BHT를 첨가하여 산화반응을 중지시키고, 0.8% TBA, 8.1% SDS, 20% acetic acid(pH 3.5), DW를 넣어 vortex한 다음 95°C에서 1시간동안 반응시킨 후 냉각시켰다. 다음 n-butanol: pyridine(14:1) 혼합액을 넣어주고 vortex 한 후에 3000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 이의 상층액을 취하여 532nm에서 spectrophotometer로 비색 정량하였다. 표준 시약으로는 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 사용하였으며 2mg protein의 양에 따라 생성된 TBARS 값으로 나타냈다.

4) 항산화능

가) 간 조직 내 Glutathione 함량 분석

0.1mM phosphate buffer (pH 7.4)를 1:9 비율로 가하여 마쇄 균질화한 간균질액을 10,000 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리하여 얻은 cytosol에 10 mM

5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoic acid와 0.1M phosphate buffer(pH 8.0)를 섞어 만든 DTNB working solution을 첨가하였다. 15분 후 412nm에서 흡광도를 측정하였다. Glutathione ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$: Sigma G-4251)을 사용하여 1g의 조직 안에 함유되어 있는 glutathione 함량을 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 단위로 계산하였다.

나) 간 조직 내 Glutathione-S-transferase 활성

GST는 셀레늄 비의존성 GSH-Px로서 친전자성 물질을 무독화시키는 과정을 촉매하는 효소이며 친전자성 물질 등에 환원형 GSH를 포함시켜 glutathione thioester를 형성하는 반응을 촉매하는 효소로서 GST(glutathione-S-transferase)활성은 GST buffer(pH 6.5) 기질로서 10 mM GSH를 첨가하고 H_2O 와 시료를 넣어 vortex 하였다. 여기에 10mM 1-chloro-2,4-dinitro-benzene(CDNB)을 빠른 속도로 주입하여 3분 동안 340nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 효소의 활성도는 단백질 mg당 1분간 반응되는 CDNB nmol로 나타내었다.

다) 간 조직 내 Glutathione peroxidase 활성

1M tris buffer, 기질로써 0.1M GSH, NADPH의 산화를 유도시키는 glutathione reductase, 2mM NADPH, 0.1mM phosphate buffer (pH 7.4)를 1:9 비율로 가하여 마쇄 균질화한 간균질액을 10,000 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리하여 얻은 cytosol을 첨가하고 H_2O 로 일정용량으로 맞추어 vortex 한 후 curvet에 담아 37°C에서 2분 동안 incubation 하였다. 여기에 반응시약인 7mM tert-butylhydroperoxide $10\mu\text{l}$ 을 첨가한 후 파장 340nm에서 3분 동안 15초 간격으로 흡광도의 변화를 측정하였으며, 효소의 활성도는 단백질 mg당 1분간 NADPH를 산화시킬 수 있는 nmol수로 1 units/ml로 환산하여 표기하였다. 간의 GSH-Px 활성을 계산하는 데에 필요한 효소원의 단백질 함량 또한 Lowry에 준하여 측정하였다.

라) 간조직 내 Catalase 활성

0.1mM phosphate buffer (pH 7.4)를 1:9 비율로 가하여 마쇄 균질화한 간균질액을 10,000 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리하여 얻은 cytosol을 50mM phosphate buffer (pH 7.0)을 사용하여 실험시작 5~10분전에 100~500배 희석하였다. Blank로 50mM PBS을 시료군에는 30mM를 첨가하여 재빨리 vortex 하여 파장 240nm에서 2분 동안 15초 간격으로 흡광도 변화를 측정하였으며, 효소활성은 1분 동안 분해된 1 μ mol의 H₂O₂를 1 unit로 정의하였으며 단백질 1mg을 기준으로 환산하여 표기하였다. Catalase 활성을 계산하는 데에 필요한 효소원의 단백질 함량 또한 Lowry에 준하여 측정하였다.

6) Gas chromatography analysis를 통하여 식이성 지방에 대한 간지질의 지방산 조성변화

간의 지방산 조성분석은 소량의 건조된 간조직에 methanol : benzen : 2,2-dimethoxypropane : H₂SO₄ = 37 : 20 : 5 : 2 의 비율로 배합용액과 heptane을 넣은 뒤 70°C water bath에서 120분간 반응시켜 methylation 시켰다.

7) 통계처리

본 연구의 동물사육 실험 결과는 SAS Program을 이용하여 각 실험군당 평균과 표준편차를 계산하였고, 각 군별로 나누어 일원배치분산분석(one-way analysis of variance)을 한 후 $\alpha=0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의하여 각 실험군 평균치간의 유의성을 검정하였다.

2. 실험 결과

가. 체중변화 및 증가량

실험동물의 실험기간 동안의 체중변화는 Figure 2-24와 같고, 체중증가량은 Figure

Table 2-27. GC condition for analysis of fatty acid methyl esters from liver lipids.

Instrument	: Hewlett Packard 5890 SERIES II Plus, USA
Column	: SP TM 2330 capillary column(30cm×0.25mm×0.2 μ m film thick mess
Column temp	: Held at 140°C에서 3min, then temperature programed at 2°C/min to 220°C, and held at this point for a further 5min
Carrier gas	: N ₂
Detectr	: FID

2-25에 제시하였다. 실험기간 동안의 체중변화는 각 군간의 차이 없이 0주에서 8주까지 꾸준히 증가하여, 8주째에서 가장 높은 체중을 보였으며 9주째에 감소하는 경향을 나타내었다. 9주 후 체중 증가량 측정 결과, 일반식이군에서 들기름 급여군의 체중 증가량이 유의적으로 감소했고, 고지방식이군에서는 유의적인 차이를 보이지는 않았으나 포도씨유 급여군에서 감소하는 결과를 나타내었다.

나. 총 식이섭취량 및 식이섭취효율

실험동물의 총 식이섭취량과 섭취효율은 Table 2-28과 같았다. 실험기간동안의 총 식이섭취량은 고지방식이의 옥수수유 급여군이 유의적으로 낮게 측정되었고, 일반식이군 중에서는 포도씨유 급여군이 낮은 결과를 나타내었다. 식이섭취효율은 일반식이 들기름 급여군에서 가장 낮은 효율을 보였으며 다른 유지에 비하여 옥수수유급여군의 식이섭취효율이 높은 경향을 나타내었다. 포도씨유 급여군에서는 고지방식기와 일반식이 사이에 섭취율의 차이를 볼 수 없었으나, 들기름 급여군에서는 현저하게 차이가 나타남을 알 수 있었다.

다. 장기무게

실험동물의 간, 신장무게는 Table 2-29와 같았다. 간의 무게는 기름의 차이에 영향을 받지 않고 고지방식이군이 일반식이군에 비하여 유의적으로 높은 것으로 나타났다. 또한, 옥수수유와 포도씨유 급여군에 비하여 들기름을 급여한 군의 간의 무게가 감소하는 경향을 보였다. 신장의 무게는 포도씨유의 고지방식이군이 감소하는 것으로 나타난 반면, 들기름 일반식이군의 무게가 증가하는 것을 알 수 있었다.

2. 혈청 내 지질패턴

가. 혈청 내 총 지질, 중성지방 그리고 인지질 농도

실험동물의 혈청 내 총 지질, 중성지방 그리고 인지질의 농도는 Table 2-30과 같다. 혈청 내 총지질의 농도는 고지방식이와 일반식이에 관여하지 않고 들기름 급여군이 유의적으로 낮은 함량을 나타내었는데 특히, 일반식이에의 들기름군이 가장 낮은 것을 알 수 있었다. 반면, 옥수수유와 포도씨유 급여군에서는 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 옥수수급여군에서의 총지질 함량이 높은 경향을 보였다. 혈청 내 중성지방 농도는 일반식이의 들기름 급여군이 유의적으로 낮은 것으로 나타났으며 일반식이의 옥수수유 급여군이 가장 높은 함량을 보였다. 일반식이와 고지방식이에 영향을 받지 않고 포도씨유 급여군이 옥수수유 급여군에 비하여 중성지방 농도가 낮은 경향이었으며 고지방식이군에서의 들기름 급여가 옥수수유 및 포도씨유에 비하여 혈중 중성지방 농도를 증가시킴을 알 수 있었다. 혈청 내 인지질 농도는 일반식이의 옥수수유 급여 군에서 유의적으로 가장 높은 함량을 나타낸 반면 고지방식이 및 일반식이의 들기름 급여가 혈중 인지질 농도를 유의적으로 감소시키는 경향을 나타내었다. 또한 포도씨유 급여보다 옥수수유급여로 인하여 인지질의 농도가 상승됨이 관찰되었다.

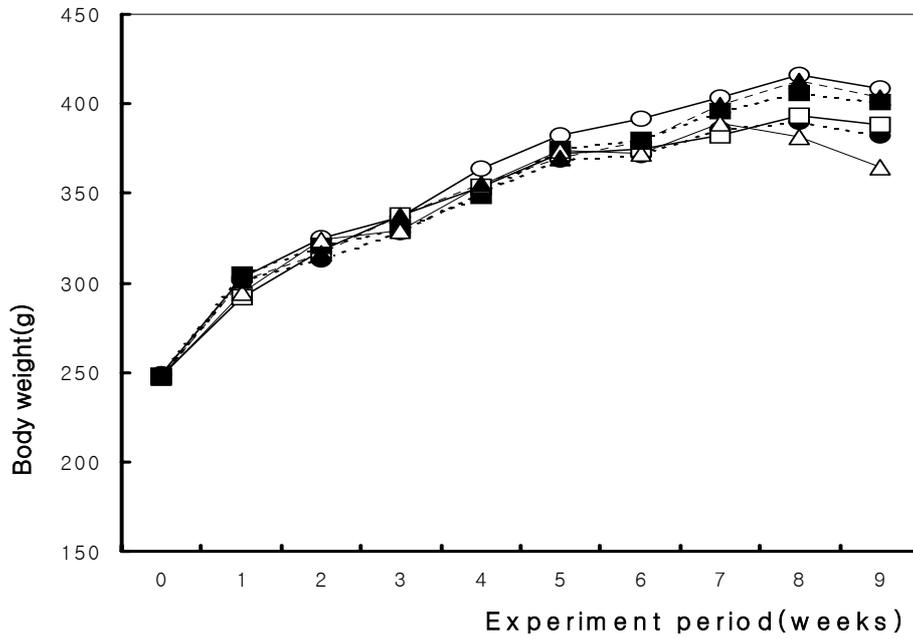


Figure 2-24. Changed of body weight during the experimental periods.

(○ : Corn oil diet, □ : Grape seed oil diet, △ : Perilla oil diet, ● : Corn oil diet + 1% cholesterol + 10% lard oil, ■ : Grape seed oil diet + 1% cholesterol + 10% lard oil, ▲ : Perilla oil diet + 1% cholesterol + 10% lard oil)

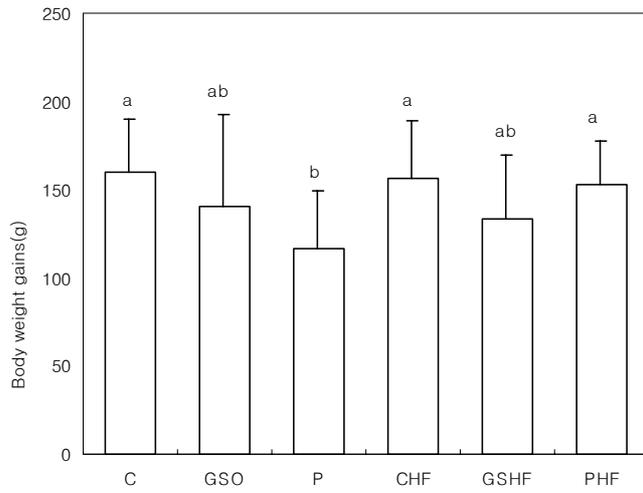


Figure 2-25. Body weight gains during the experimental periods.

Table 2-28. Total food intake and food efficiency ratio for 9 weeks.

Groups	Total food intake (g/9 week)	FER (%)
C	1549.77±71.945 ^a	10.387±2.224 ^a
GSO	1525.522±151.074 ^a	9.388±3.509 ^{ab}
P	1541.930±138.601 ^a	7.651±2.126 ^b
CHF	1344.380±142.088 ^b	11.751±2.708 ^a
GSHF	1412.310±143.632 ^{ab}	9.308±2.072 ^{ab}
PHF	1448.670±158.254 ^{ab}	10.605±1.742 ^a

Table 2-29. Liver and kidney weight per 100g body weight of experimental groups.

Groups	Liver weight/100g B.W. (g)	Kidney weight/100g B.W. (g)
C	2.591±.185 ^b	0.619±0.030 ^b
GSO	2.553±0.123 ^b	0.644±0.064 ^{ab}
P	2.393±0.165 ^b	0.679±0.066 ^a
CHF	4.049±0.403 ^a	0.671±0.050 ^a
GSHF	4.025±0.461 ^a	0.610±0.045 ^b
PHF	3.828±0.455 ^a	0.619±0.043 ^b

나. 혈청 내 총 콜레스테롤, HDL-cholesterol 그리고 LDL-cholesterol 농도

실험동물의 혈청 내 총 콜레스테롤, HDL-cholesterol 그리고 LDL-cholesterol 농도는 Table 2-31과 같다. 혈청 내 총 콜레스테롤 농도는 식이지방의 차이에 관여 없이 일반식이의 함량이 유의적으로 낮은 경향을 보였다. 그러나 고지방의 들기름 급여군은 포도씨유 및 옥수수유 일반식이의 콜레스테롤 농도 수준보다 낮은 것으로 나타났다. 총 콜레스테롤 또한 총지질과 유사하게 옥수수유급여군이 포도씨유 급여군보다 유의적이지는 않았으나 높은 농도로 나타남을 관찰할 수 있었다. HDL-Cholesterol 농도는 식이지방의 차이에 상관없이 유의적으로 일반식이군의 농도가 높았으며, 그 중 포도씨유 급여군의 함량이 가장 높은 것으로 나타났다. 반면 고지방식이군의 포도씨유 급여군에서는 가장 낮은 농도로 관찰되었다. LDL-Cholesterol 농도는 식이지방의 차이에 상관없이 유의적으로 고지방식이군의 농도가 높은 것을 알 수 있었으나 예외로 들기름군의 농도가 일반식이의 옥수수유 및 포도씨유 급여군보다 낮은 것으로 관찰되었다. 또한 모든 군을 비교하여 볼 때 일반식이군의 들기름군이 유의적으로 감소되는 경향을 보였으며 고지방식이의 옥수수유군

이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다.

다. 혈청 내 HDL-Cholesterol 농도와 LDL-Cholesterol 농도의 비율 및 Atherogenic Index

실험동물의 혈청 내 HDL-Cholesterol 농도와 LDL-Cholesterol 농도의 비율은 Figure 2-26에, Atherogenic Index는 Figure 2-27에 제시하였다. 혈청 내 HDL/LDL은 일반식이의 들기름 급여군이 가장 높은 비율을 나타낸 반면 고지방식이의 옥수수유 급여군에서 유의적으로 낮은 비율로 관찰되었다. 그리고, 고지방식이와 일반식이에 상관없이 포도씨유 급여군의 HDL/LDL이 옥수수유의 급여군보다 높은 것을 확인할 수 있었다. Atherogenic Index는 고지방식이의 옥수수급여군이 유의적으로 높은 것으로 나타났으며 고지방식이와 일반식이에 상관없이 들기름 급여군의 값이 유의적이지는 않았으나 낮은 경향임을 확인할 수 있었다.

3. 간 조직 내 지질패턴

실험동물 간의 총 지방, 총콜레스테롤 그리고 중성지방 농도는 Table 2-32와 같았다. 간의 총 지방 농도는 식이지방의 차이에 상관없이 고지방식이군의 농도가 유의적으로 높은 것으로 나타났다. 또한 일반식이의 들기름 급여군이 가장 낮은 농도를 보였으며, 고지방식이의 들기름 급여군이 가장 높은 수준으로 관찰되었다. 간의 총콜레스테롤 농도는 고지방식이의 들기름 급여로 인하여 가장 높은 함량을 보인 반면, 일반식이의 들기름 급여로 유의적으로 낮은 농도를 보였다. 또한 일반식이에서의 포도씨유 급여가 옥수수유 급여보다 간의 총 콜레스테롤 함량을 감소시키는 것으로 나타났으나 고지방식이에서는 증가시키는 경향으로 관찰되었다. 고지방식이의 포도씨유 급여가 유의적으로 가장 높은 함량을 나타낸 반면 일반식이의 들기름 급여군이 낮은 수준을 보였다. 고지방식이와 일반식이에 들기름의 급여로 인하여 다른 유지들보다 중성지방 함량이 감소되었으나 옥수수유 급여로 인하여 증가되는 것을 관찰할 수 있

있고 포도씨유 급여보다 높은 수준이라는 것 또한 알 수 있었다.

Table 2-30. Total lipid, triglyceride and phospholipid in serum.

Groups	TG (mg/dL)	PL (mg/dL)	TL (mg/dL)
C	67.0±12.708 ^a	96.3±10.404 ^a	233.5±27.710 ^a
GSO	64.7±11.757 ^{ab}	92.4±13.020 ^{ab}	234.2±24.509 ^a
P	48.4±9.058 ^c	57.8±13.315 ^c	155.9±20.475 ^b
CHF	55.7±19.137 ^{abc}	80.9±17.578 ^{bc}	265.6±91.372 ^a
GSHF	52.0±19.339 ^{bc}	77.1±18.628 ^c	262.8±88.730 ^a
PHF	60.9±9.746 ^{abc}	42.3±6.800 ^e	160.1±18.472 ^b

Table 2-31. Total cholesterol, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol in serum.

Groups	TC (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)
C	74.8±8.657 ^b	25.2±4.290 ^a	34.4±9.782 ^b
GSO	72.5±13.778 ^b	26.6±2.186 ^a	34.8±8.632 ^b
P	49.7±8.718 ^b	22.8±4.709 ^a	17.2±4.632 ^b
CHF	129.9±58.649 ^a	9.3±5.599 ^c	94.1±46.414 ^a
GSHF	132.8±68.134 ^a	8.1±4.040 ^c	76.3±40.887 ^a
PHF	56.9±13.237 ^b	14.7±3.302 ^b	30.0±12.902 ^b

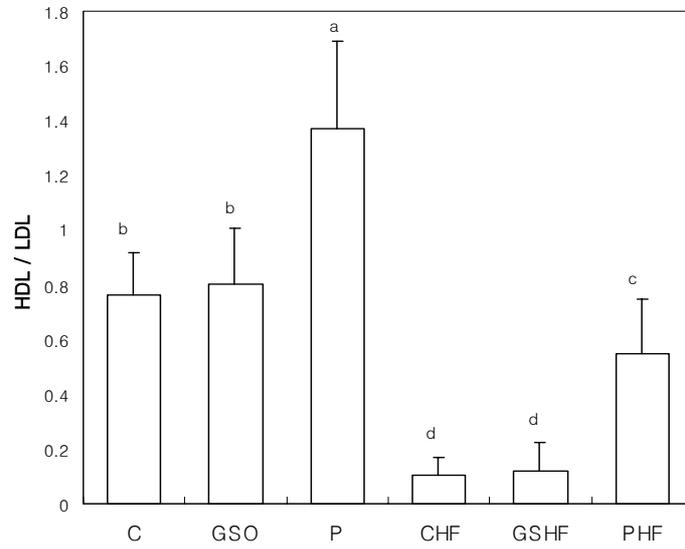


Figure 2-26. Effect of dietary grape seed oil on serum HDL-Cholesterol :
LDL-Cholesterol ratio in rats.

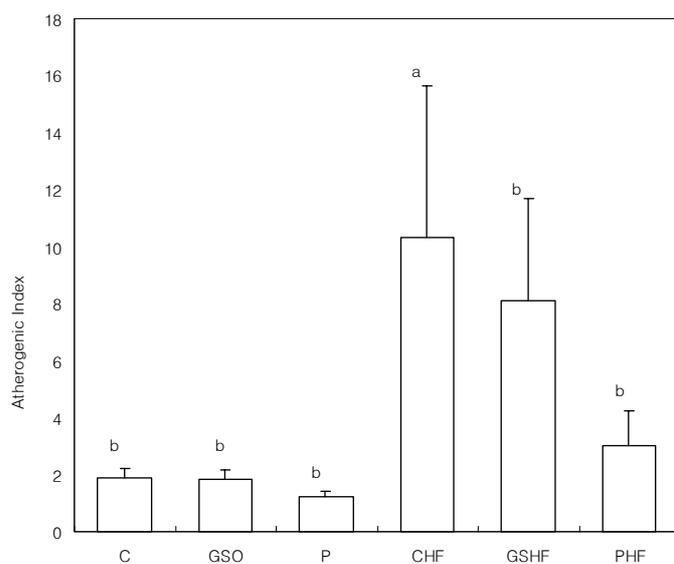


Figure 2-27. Effect of dietary grape seed oil on atherogenic index in rats.

Table 2-32. Total lipid, total cholesterol and triglyceride in liver tissue.

Groups	TL (mg/g liver tissue)	TC (mg/1g liver tissue)	TG (mg/1g liver tissue)
C	59.9±7.385 ^b	13.3±1.661 ^c	5.85±0.912 ^c
GSO	52.8±6.280 ^b	9.9±2.153 ^c	4.58±0.826 ^d
P	51.6±7.749 ^b	8.5±1.200 ^c	4.13±0.465 ^d
CHF	209.9±36.928 ^a	45.6±9.770 ^b	10.27±2.453 ^a
GSHF	232.9±41.996 ^a	56.1±12.647 ^a	7.33±1.415 ^b
PHF	232.9±34.578 ^a	57.8±9.344 ^a	6.46±0.906 ^{bc}

4. 혈청과 조직 내 지질과산화도

실험동물의 AAPH로 산화 유도된 간 조직 내 지질과산화물 함량을 측정된 결과는 Figure 2-28과 같았다. 고지방식이의 들기름 급여군만이 유의적으로 높은 함량을 나타냈고, 각 군들의 차이는 찾아 볼 수 없었다. 그러나 일반식이 들기름 급여군의 농도가 다소 높게 측정된 것으로 나타났다. AAPH로 산화 유도된 신장 조직 내 지질과산화물 함량을 측정된 결과는 Figure 2-29에 제시하였다. 일반식이의 포도씨유군에서 유의적으로 낮은 함량을 보였고, 전반적으로 보아 다른 식이지방보다 포도씨유 급여군의 지질과산화물 함량이 낮은 수치를 나타내었다. 그러나 들기름급여와 옥수수유급여 사이의 함량에는 차이가 없었다.

실험동물의 AAPH로 산화 유도된 혈청 내 지질과산화물 함량을 측정된 결과는 Figure 2-30과 같았다. 전체적으로 보아 식이지방과 관계없이 고지방 식이군이 일반 식이군에 비하여 지질과산화물 생성량이 높은 경향을 나타내었고, 고지방식이의 들기름 급여군이 유의적으로 가장 높은 것으로 관찰되었다. 또한 고지방군에서의 포도씨유 급여군이 다른 식이지방에 비하여 현저히 낮게 측정되었으며, 일반식이군에서는 식이지방 차이의 효과가 없었지만 포도씨유 급여가 다소 함량을 낮추는 것으로 보여졌다.

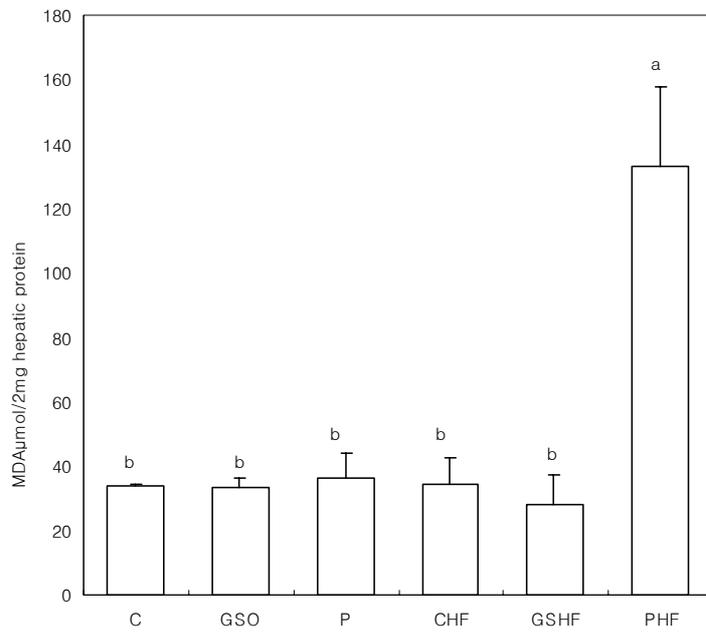


Figure 2-28. Effect of dietary grape seed oil on hepatic tissue lipid peroxidation induced by AAPH.

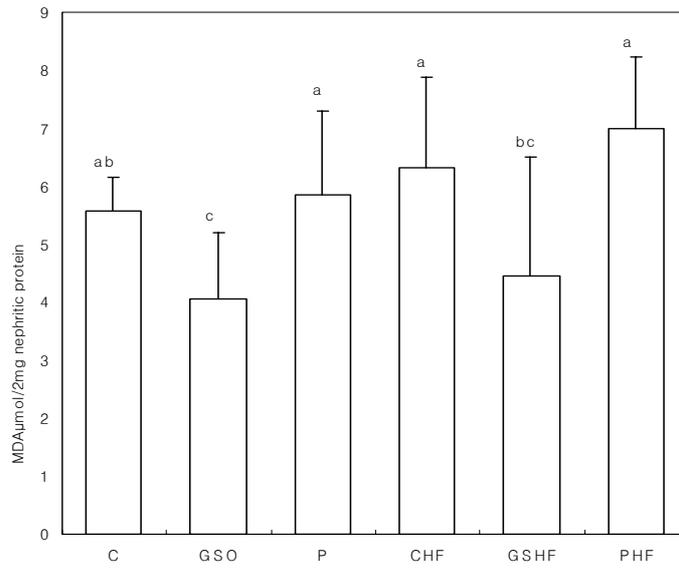


Figure 2-29. Effect of dietary grape seed oil on nephritic tissue lipid peroxidation induced by AAPH.

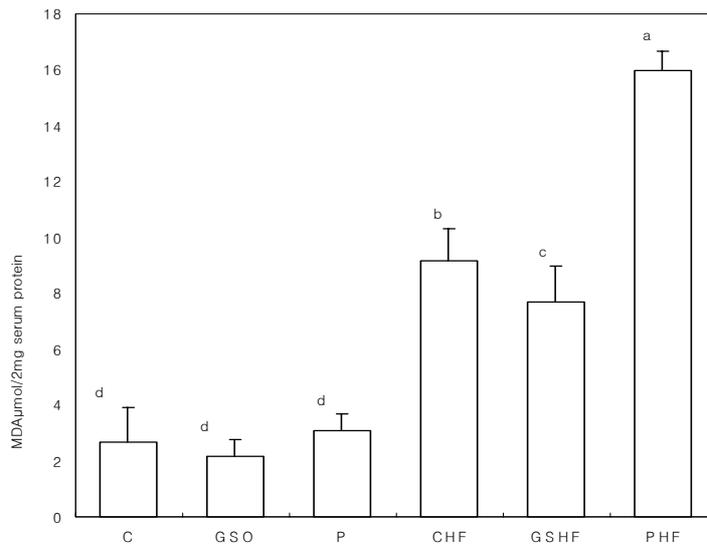


Figure 2-30. Effect of dietary grape seed oil on serum lipid peroxidation induced by AAPH.

5. 항산화능

가. 간 조직 내 Glutathione 함량

외부의 산화적 손상에 의한 세포의 방어작용을 나타내는 효소인 glutathione의 함량을 측정된 결과는 Table 2-33과 같았다. GSH 함량은 외부의 산화적 손상에 의한 세포의 방어작용을 나타내는 효소인 glutathione-S-transferase (GST)와 GSH-Px의 기질로 작용하며 세포내 지질과산화물과 이물질 제거, 아미노산 수송 및 저장고로써 다양한 세포기능을 수행하는 물질로 알려져 있는 항산화능을 갖는 단백질이다. 고지방 식이와 일반식이의 차이에 상관없이 들기름 급여군이 다른 식이지방군에 비해 glutathione 농도가 높은 것으로 나타났는데, 특히 고지방식이에 들기름 급여군의 함량이 높음을 알 수 있었고, 포도씨유의 급여로 인하여 glutathione의 함량을 감소시키는 것으로 관찰되었다.

나. 간 조직 내 Glutathione-S-transferase 활성

실험동물의 간 조직 내 GST 활성을 측정된 결과는 Table 2-33에 제시하였다. 전체적으로 큰 차이를 보이지는 않았으나 들기름 급여군의 활성이 다소 높은 경향이었으며, 고지방식으로 인하여 활성이 낮아짐을 알 수 있었다. 또한 고지방식이의 옥수수 급여군이 유의적으로 낮은 활성을 보였으며 포도씨유로 인한 GST 활성 증가 효과는 나타나지 않았다.

다. 간 조직 내 Glutathione peroxidase 활성

간의 glutathione peroxidase(GSH-Px) 활성은 GSH-Px가 H_2O_2 와 glutathione(GSH)의 반응을 촉진시켜 이 환원형 GSH를 산화형 glutathione(GSSG)으로 전환시키고, GSSG는 glutathione reductase의 작용으로 NADPH의 H를 받아 다시 환원형인 GSH로 되고 NADPH는 H를 빼앗겨 산화형 NADP가 된다는 원리는 이용한 것으로 H_2O_2 와 GSH으로부터 산화형 glutathione(GSSG) 및 H_2O 를 생성하는

반응과 기타 과산화물이나 GSH로부터 GSSG, alcohol 및 H₂O를 생성하는 반응을 촉매 함으로써 조직의 과산화적 손상을 방지한다. 실험동물의 glutathione peroxidase(GSH-Px) 활성을 측정한 결과는 Table 2-33과 같았다. 일반식이 포도씨유 급여군의 활성이 다른 군들에 비하여 유의적으로 증가하였고, 전체적으로 식이지방에 관여하지 않고 고지방식을 섭취함으로 인하여 활성이 감소하는 것으로 나타났다.

라. 간 조직 내 Catalase 활성

실험동물의 Catalase 활성을 측정한 결과는 Table 2-33에 제시하였다. Catalase는 대부분의 장기, 특히 간과 적혈구에 많이 있으며 H₂O₂를 무독성의 H₂O로 환원시키거나 methanol, ethanol, formic acid, phenol과 같은 hydrogen donor의 산화에 관여하는 효소로서 지방산화에 의해 생성된 유리기를 제거하는 것으로 알려져 있다. 전체적으로 고지방식을 급여함에 따라 catalase 활성이 증가되는 것으로 나타났으며 들기름 >옥수수유>포도씨유 순으로 활성이 증가됨을 알 수 있었다. 고지방식의 들기름 급여가 가장 높은 활성을 보였으며 일반식의 포도씨유 급여가 가장 낮은 활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

Table 2-33. Glutathione contents, Glutathione-S-transferase activity, Glutathione peroxidase activity and Catalase activity in cytosolic liver.

Groups	GSH (μ g/ml)	GST (units/mg protein/min)	GPx (nmol/NADPH oxidized/min)	CAT (mU/mg protein)
C	24.6 \pm 3.90 ^{bc}	0.144 \pm 0.018 ^{ab}	2.89 \pm 0.474 ^{ab}	357.50 \pm 30.05 ^{bc}
GSO	21.0 \pm 1.67 ^d	0.142 \pm 0.010 ^{ab}	3.36 \pm 0.611 ^a	318.07 \pm 60.46 ^c
P	27.0 \pm 2.72 ^{ab}	0.156 \pm 0.013 ^a	3.12 \pm 0.522 ^{ab}	364.39 \pm 33.90 ^b
CHF	23.4 \pm 3.33 ^{cd}	0.122 \pm 0.019 ^b	2.71 \pm 0.580 ^b	430.56 \pm 65.07 ^a
GSHF	22.2 \pm 1.73 ^{cd}	0.136 \pm 0.039 ^{ab}	3.05 \pm 0.878 ^{ab}	413.58 \pm 16.26 ^a
PHF	28.7 \pm 3.74 ^a	0.143 \pm 0.019 ^{ab}	2.69 \pm 0.545 ^b	442.51 \pm 60.65 ^a

6. Gas chromatography analysis를 통하여 식이성 지방에 대한 간지질의 지방산 조성 변화

실험동물의 식이성 지방에 따른 간지질의 지방산 조성 변화를 분석한 결과는 Table 2-34에 제시하였다. 포도씨유 급여군에서는 linoleic acid area, 옥수수유 급여군에서는 palmitic acid area, 일반식이의 들기름 급여군에서는 linolenic acid area가 높게 측정되어 식이지방의 영향이 있음을 알 수 있었다. 전체적으로 보아 일반식이와 고지방식이보다 불포화지방산의 함량이 높은 것을 알 수 있었으며 이중, 포도씨유 급여군이 가장 높은 비율을 나타내었다. 이에 반하여 고지방식이의 포도씨유 급여와 옥수수유 급여군에서 유의적으로 낮은 비율로 관찰되었다. 전반적으로 볼 때 고지방과 일반식에 상관없이 포도씨유 급여군에서의 L/P 비율이 높게 나타난 반면 들기름 급여에서 낮은 비율로 관찰되었다. 실험동물의 간지질 지방산 조성 분석결과 linoleic acid area(%)는 고지방식이와 일반식이에 상관없이 전체적으로 포도씨유 > 옥수수유 > 들기름 순으로 높은 함량을 보인 것으로 관찰되었고, 들기름 급여로 인하여 지방산 중 linoleic acid의 함량을 차지하는 비율을 유의적으로 감소시켰음을 알 수 있었다.

Table 2-34. Fatty acid compositions of total fatty acid from liver lipids of the rats fed the experimental diets for 9 weeks.

(peak area %)

Fatty acid	Groups ¹⁾					
	C	GSO	P	CHF	GSHF	PHF
Rauric(C _{12:0})	0.0389	0.0352	0.0805	0.0903	0.0575	0.0917
Myristic(C _{14:0})	0.3833	1.5198	0.3078	0.3426	0.3298	0.2148
Pentadecanoic(C _{15:0})	0.0856	0.0425	0.0709	0.0490	0.0330	0.0143
Palmitic(C _{16:0})	26.2854	23.6556	21.9944	17.2236	17.9783	15.6637
Palmitoleic(C _{16:1n9c})	1.0974	0.8834	1.6721	3.0699	3.2298	3.5431
Heptadecanoic(C _{17:0})	0.1102	0.1192	0.1314	0.1063	0.0707	0.548
Stearic(C _{18:0})	17.1188	18.6143	17.5262	7.8988	9.4271	9.5641
Oleic(C _{18:1})	13.1994	9.6176	20.6093	33.7440	29.5122	32.1571
Linoleic(C _{18:2})	26.6421	29.3540	24.0808	29.2025	34.0892	18.5709
Arachidic(C _{20:0})	0.1324	0.0267	6.5117	1.9606	0.2578	15.7459
Linolenic(C _{18:3})	0.0066	0.1666	0.2355	0.2449	0.1846	0.1704
Behenic(C _{22:0})	14.8999	15.9651	6.1870	6.0674	4.8300	4.2091

제 5 절 이소플라본과 포도종실유의 보충이 난소절제 흰쥐의 혈중지질 패턴 및 골격강도에 미치는 영향

골다공증의 치료에는 에스트로겐을 이용한 호르몬 요법이 시행되고 있으나 자궁내막염 및 유방암과 같은 부작용 발생 때문에 에스트로겐 이외의 대체요법에 대한 연구의 필요성이 대두되었다. 최근 가장 관심의 대상이 된 것이 대두 속에 함유되어 있는 이소플라본인데 대두의 섭취는 호르몬 의존성 질환인 유방암, 난소암, 전립선암 및 골다공증의 발병율을 낮출 수 있다는 사실이 밝혀지면서, 이소플라본의 생리활성에 대한 관심이 높아졌다. 대두 속의 이소플라본은 당류와 결합되어 있고, 섭취된 후 장에서 미생물에 의해 가수분해되어 당과 분리된 aglycone인 제니스틴과 다이드진으로 소장에서 흡수되어 혈액으로 이동된다. 이소플라본은 17 β -estradiol과 유사한 구조를 가지고 있고, 에스트로겐 수용체(ER)에 작용하여 에스트로겐 대체물로 작용한다. Draper등은 coumestrol과 formononetin과 같은 다른 phytoestrogen도 자궁비대증을 보이지 않는 난소절제 흰쥐에서의 골손실을 예방하는 것으로 나타났고, 자궁에 실질적인 에스트로겐 작용을 하지 않고 골격에 선택적으로 작용한다고 보고했다. 이러한 화합물들은 선택적 에스트로겐 조절제로 불리며 골다공증의 예방에 유용한 것으로 밝혀졌다. 특히, 여성의 경우, 폐경과 함께 관상동맥 심장질환의 발병율이 급격히 증가하는데, 이소플라본 섭취는 동맥경화증을 감소시키고, 일본여성의 역학조사결과 폐경기 여성의 일일 이소플라본섭취량은 평균 54.3mg이고, 식이로 섭취된 이소플라본이 골밀도를 증강시켰다고 한다. 포도씨에는 (+)catechin, (-)epicatechin 그리고 (-)epicatechin-3-O-gallate와 같은 페놀성 화합물들이 풍부하며 이 물질들이 항돌연변이성과 항바이러스성을 나타내고, 동맥경화증을 예방하는 기능성이 있는 것으로 보고되었다. 특히, 포도씨추출물이 동맥경화증과 항궤양성작용과 같은 생체내 생리활성에 효과가 있다고 밝혀지면서 포도씨가 기능성식품 소재로써 주목받게 되었다. Gorinstein등에 의하면 포도씨에는 다른 지방산에 비해 linoleic acid(69.5%)가 풍부하게 함유되어 있어, 평지씨와 함께 폴리페놀함량이 높은 것으로 비교하였다. 또한, 포

도종실유는 혈청내 cholesterol 농도를 낮추어 동맥경화 및 고지혈증과 같은 질환에 효과가 있고, 혈액응고방지 및 혈관확장기능이 있어 혈압을 낮추는 것으로 보고하였다. 포도씨가 불포화지방산의 함량이 높으면서도 다른 기름에 비해 비교적 쉽게 산패하지 않는데, 이는 포도씨에 함유되어 있는 항산화성분의 영향이라고 한다. 강등은 서로 다른 유지를 150℃ 열처리했을 때, 참깨나 들깨유 보다 포도종실유가 낮은 산패도를 나타냈다고 보고하였고, 포도종실로부터 높은 수율의 유지추출을 위한 방법도 개발되었다. 따라서, 본 연구는 난소절제로 임의로 폐경을 유도한 흰쥐에게 이소플라본과 포도종실유를 함께 식이에 보충함으로써 혈중 지질패턴과 골격 강도에 미치는 영향을 알아보기 위해 실시되었다.

1. 재료 및 방법

가. 사육 및 식이

SD(Sprague-Dawley)종, 6주령 암컷 24 마리의 흰쥐를 (주)샘타코에서 구입하여, 일주일 동안 고품분 사료로 적응시킨 후 난소절제 기술을 통해 임의적으로 폐경을 유도하였다. 실험식은 2주간의 회복기간 후 일반식이(O, n=5), 일반식이+이소플라본 보충식이(OI, n=5), 일반식이+포도종실유 보충식이(OG, n=5), 일반식이+이소플라본+포도종실유 보충식이(OIG, n=5)로 나누어 Table 2-35와 같이 실험식이를 조제한 후 8주 동안 사육하였다. 이소플라본은 0.085mg/100g b.w/day 수준으로, soya rich(이소플라본 0.04% 함유)를 식이에 혼합하여 공급하였다. 물과 사료는 자유급식 하도록 하였으며 일주일에 한번 같은 시간에 체중을 기록하고, 식이섭취량은 하루에 한번 측정하였다. 사육실의 온도는 20±2℃를 유지하고 조명은 12시간 주기로 조절하였다. 식이 효율(food efficiency ratio :FER)은 사육기간동안의 체중증가량을 같은 기간동안 섭취한 식이량으로 나누어 산출하였다.

$$\text{식이 효율(FER, \%)} = \frac{\text{총실험기간의 체중증가량(g)}}{\text{총실험기간의 식이섭취량(g)}} \times 100$$

Table 2-35. Composition of experimental diet.

(%)

Groups Ingredient	O	OI	OIG	OG
Corn starch	69.8	67.675	67.675	69.8
Casein	15.0	15.0	15.0	15.0
Soya rich	-	2.125	2.125	-
Corn oil	10.0	10.0	-	-
Mineral Mix	4.0	4.0	4.0	4.0
Vitamin Mix	1.0	1.0	1.0	1.0
Choline chloride	0.2	0.2	0.2	0.2
Grape seed oil	-	-	10.0	10.0

나. 시료수집 및 분석

1) 시료수집

노는 실험동물 희생 직전에 metabolic cage를 이용하여 24시간 노를 채취한 후, -20°C의 냉동고에 보관하면서 각종 분석에 사용하였다. 각 군들은 희생 12시간 전부터 절식시키고, ethyl ether로 마취시킨 후 복부를 절개하여 간정맥에서 주사기를 이용하여 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 냉장온도에서 24시간 방치 후 3000rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 간과 신장을 적출 해내어 냉 생리식염수에 씻은 후 연결조직을 제거하고 중량을 측정하였고 분석직전까지 -80°C의 냉동고에 보관하였다.

2) 생화학적 분석

혈청 내 total cholesterol(TC), triglyceride(TG) 그리고 HDL-콜레스테롤(HDL-C)

농도는 ADVIA 1650 (JEOL, JAPAN)를 이용하여, phospholipid(PL)은 Cobas Mira Plus (Roche, Switzerland)에 의해 측정하였다. LDL-콜레스테롤(LDL-C)은 Friedwald 법 [LDL-콜레스테롤 = 총콜레스테롤-(HDL-콜레스테롤 + 중성지방/5)]에 의해 계산하였다. 측정된 결과값을 가지고 atherogenic index(=total cholesterol-HDL cholesterol/HDL cholesterol)를 측정하였다. 혈청내 Ca 및 P함량은 효소법을 이용하고 alkaline phosphatase (ALP)활성은 Kind King법으로 측정하였다.

3) 간조직내 지방함량 측정

간조직내 조지방(Crude lipids, CL) 함량은 건조된 간을 soxhlet 지방추출장치를 이용하였고 총 콜레스테롤함량은 Zak법으로 측정하였다.

4) 항산화효소활성 측정

간조직에 0.1mM PBS를 가하여 homogenizer로 균질화한 후, 3500rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이 상등액을 가지고 Simons와 Johnson의 방법에 따라 glutathion 함량(GSH)을 측정하고, Habig법에 의해 GST(glutathione-S-transferase)활성을 측정하였다.

5) 지질과산화도 측정

지질과산화물 함량의 측정은 Buege등의 방법에 따라 thiobarbituric acid(TBA)법을 사용하여, 간조직내 malondialdehyde(MDA)함량으로 정량화하였다. 표준 시약으로 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 사용하여 1mg protein의 양에 따라 생성된 TBARS 값으로 나타냈다.

6) 골격강도 측정

혈액 채취 후 오른쪽 대퇴골(femur bone)과 견갑골(scapular bone)을 취하여, 근육, 지방, 인대 등을 제거한 상태로 습중량(wet weight)을 측정하였다. 이 후 105±5°C의

건조기에서 일정한 무게가 될 때까지 건조시켜 건중량(dry weight)을 재고 골격의 길이(length)는 calliper를 사용하여 측정하였다. 골강도 측정은 texture analyzer(SUN RHEO METER compac-100)를 이용하여 뼈의 최대강도(Max weight)와 bending strength(=Breaking force/Cross-sectional area)를 측정하였다.

다. 통계처리

실험결과는 SAS program을 이용하여 각 실험군 마다 평균과 표준편차를 계산하였고, 각 실험군간의 비교는 ANOVA로 분석한 후, 유의적인 차이는 $\alpha=0.05$ 에서 Duncan's multiple range test에 의해 검정하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 체중증가량, 식이섭취량 및 장기무게

난소절제 쥐에서 체중이 증가한다는 것은 난소절제 동물의 특징으로 에스트로겐의 분비감소로 인한 것으로 알려져 있는데, 본 연구의 결과에서도 각 군간의 차이 없이 실험기간 내내 꾸준히 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 2-31). 다만 OG 군에서만 6주째에 체중이 감소된 것을 볼 수 있었는데, 이것은 식이에 따른 영향이라기 보다는 8주째에 다시 체중이 증가되었기 때문에 일시적인 체중감소로 보여진다. 그리고 총식이섭취량, 체중 증가량 그리고 식이효율에 있어서도 이소플라본과 포도종실유 섭취군이 일반식이군에 비하여 유의성을 나타내지 않았다(Table 2-36). Ishimi등과 Deyhim등의 결과에서도 체중변화에 대한 이소플라본의 영향이 없었고, 난소절제로 인해 체중이 증가한 것으로 나타났다. 반면, 정등은 수컷흰쥐를 대상으로 했을 때, 식이내 이소플라본의 농도가 높을수록 식이섭취량이 감소하고, 그로 인해 체중증가가 적었다고 보고하였다. 이러한 차이는 본 실험에서 섭취시킨 이소플라본의 양이 상대적으로 낮았기 때문이고, 성별의 차이로 인한 결과인 것으로 생각된다. 실험동물의 간장과 신장의 무게는 체중 100g당 환산했을 때 중량은 Table 2-37에 나타내었다. 간장

과 신장의 무게는 이소플라본과 포도종실유의 급여에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

2. 혈청내 지질 패턴에 미치는 효과

혈청내 총콜레스테롤과 중성지방농도는 일반식이군이 유의적으로 높은 것으로 나타났다. 포도종실유를 보충했을 때 혈청내 콜레스테롤 농도가 낮게 관찰되었다. 또한, 이소플라본을 섭취한 군이 일반식이군에 비해서 낮은 것으로 나타나, 이소플라본과 포도종실유가 혈청 총 콜레스테롤 농도에 영향을 미치는 것으로 생각된다(Table 2-38). 이러한 결과는 최등의 폐경기 여성을 대상으로 이소플라본의 섭취수준에 따른 연구결과에서도 총지질, LDL콜레스테롤 그리고 중성지방 농도는 총콜레스테롤에서 나타난 것과 유사하게 일반식이군이 높은 경향을 보였고 이소플라본과 포도종실유 보충이 혈액지질패턴에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 그러나, 폐경기 여성을 대상으로 한 이들의 연구결과에서 통계적으로 유의하지는 않았지만, 이소플라본의 보충으로 총콜레스테롤과 중성지방의 농도를 낮출 뿐만 아니라, HDL콜레스테롤 농도를 유의적으로 증가시켰다고 보고하여 같은 대상과 비슷한 농도의 이소플라본을 가지고 실험한 결과에서도 다소 차이가 발생할 수 있다는 것을 알 수 있다. 이소플라본의 유도체인 ipriflavone의 투여효과를 실험한 원등의 결과 ipriflavone의 투여로 혈중 HDL콜레스테롤 농도를 높일 수 있다고 보고하였는데, 본 실험에서는 이소플라본의 보충이 혈청내 HDL콜레스테롤 농도에 영향을 미치지 못한 것으로 나타났다. Atherogenic index는 혈청내의 HDL콜레스테롤과 LDL콜레스테롤의 농도를 가지고 동맥경화증과 같은 심혈관계 질환의 위험도를 측정하는 것이다. 본 실험 결과는 이소플라본과 포도종실유의 섭취에 따라 유의적이진 않았지만, 포도종실유 보충군의 지수가 낮은 것으로 나타나 동맥경화증 예방에 효과가 있을 것으로 추측된다. 포도종실유가 혈청 지질패턴에 영향을 미친 것으로 관찰되어, 포도종실유식이 다른 식이에 비해서 P/S 비율 및 식물성스테롤의 함량이 높기 때문에 혈청 cholesterol 농도의 증가를 억제시키는 것으로 생각된다.

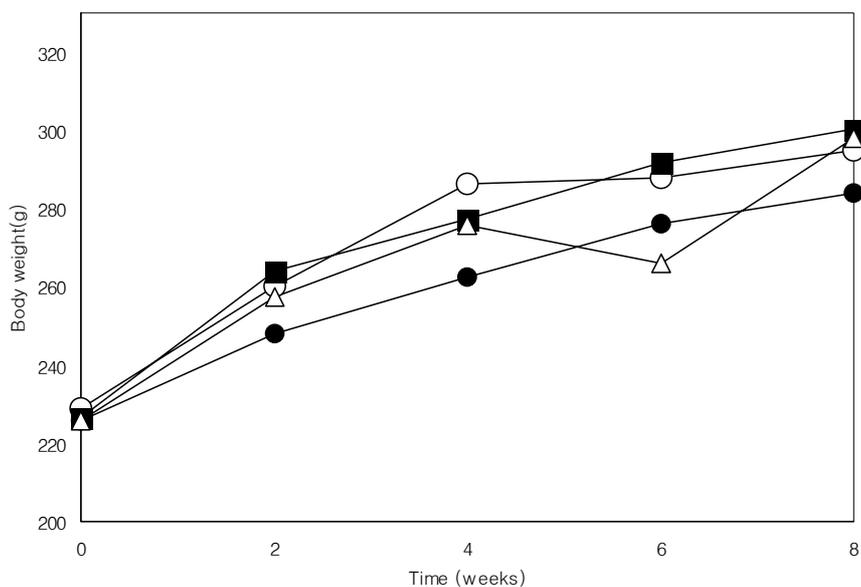


Figure 2-31. Changed of body weight during the experimental periods.

(○) O: ovariectomized female rats. (■) OI: Isoflavone supplement in ovariectomized female rats. (●) OIG: Isoflavone and/or seed oil supplement in ovariectomized female rats. (△) OG: Grape seed oil supplement in ovariectomized female rats.

Table 2-36. Total food intake, body weight gain and food efficiency ratio for 8 weeks.

Group	Total food intake (g)	Body weight gain (g)	FER (%)
O	1148.5±177.88 ^{NS}	66.00±7.87 ^{NS}	5.84±1.08 ^{NS}
OI	1108.0±65.43	73.80±37.91	6.65±3.43
OIG	1074.6±161.60	58.20±34.48	5.38±2.85
OG	1137.0±143.78	72.20±3.56	6.45±1.03

Table 2-37. Liver and kidney weight per 100g body weight of experimental groups.

Group ¹⁾	Liver weight/100g BW (g)	Kidney weight/100g BW (g)
O	2.42±0.53 ^{NS}	0.59±0.06 ^{NS}
OI	2.29±0.21	0.57±0.08
OIG	2.25±0.34	0.59±0.10
OG	2.02±0.24	0.53±0.03

3. 간조직내 지질패턴 및 항산화 효소활성에 미치는 효과

간조직의 지방함량과 콜레스테롤 농도는 이소플라본과 포도종실유 보충에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았다(Table 2-39). Demonty 등의 연구에서 이소플라본 보충군의 총콜레스테롤 농도가 높은 것으로 나타났으며, 정등의 결과에서는 이소플라본 섭취 시 대조군에 비해 중성지방과 콜레스테롤 농도가 유의적으로 감소되었다고 보고하고 있어, 이소플라본의 섭취수준의 차이가 간조직중 지질패턴에 영향을 미친다고 할 수 있다. TBA법을 이용하여 간조직의 지질과산화정도를 측정한 결과 이소플라본과 포도종실유 보충에 따른 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Figure 2-33). Glutathione(GSH)함량은 일반식이군을 제외한 나머지 군들의 함량이 높았으며, 이의 대사관련 효소인 glutathione-S-transferase (GST)활성은 각 군간의 유의적인 차이를 보이지 않았다. GSH는 생체내 생성된 H₂O₂등의 free radical을 소거하여 항산화 효과를 나타내며, GST는 생체내에서 발암물질, 살충제, 알코올, free radical, 항암제 등과 환원형 GSH와 축합반응을 촉진시켜, 이물질을 무독화해 체외로 배설을 촉진시키는 생체내 중요한 해독효소이다. 상대적으로, GST활성에 있어서 각 군간의 유의적인 차이는 없었지만, 이소플라본과 포도종실유의 보충이 GSH함량 증가에는 유의한 효과를 보이는 것으로 관찰되었다.

Table 2-38. Total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, phospholipid, total lipids and atherogenic index in serum.

Group	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	PL (mg/dl)	TL (mg/dl)	Atherogenic index ⁵⁾
O	109.50±18.4 ^a	67.25±6.40 ^a	47.00±5.83 ^a	49.05±13.12 ^a	133.75±19.57 ^a	310.5±23.98 ^a	1.32±0.13
OI	99.00±10.98 ^{ab}	55.60±8.03 ^b	44.20±6.26 ^a	44.80±5.15 ^{ab}	132.60±10.06 ^a	235.2±17.91 ^c	1.25±0.11
OG	80.00±8.80 ^b	55.60±7.80 ^b	34.80±2.86 ^b	34.08±6.31 ^b	99.60±9.76 ^b	281.6±16.65 ^{ab}	1.03±0.10
OIG	87.60±15.37 ^b	54.60±9.45 ^b	38.20±8.44 ^{ab}	38.48±7.94 ^b	113.80±13.83 ^b	256.0±28.04 ^{bc}	1.32±0.18

Table 2-39. Crude lipid, total cholesterol and GSH contents and GST activity in hepatic tissue.

Group	CL (mg)/0.1g dry liver	TC (mg)/0.1g dry liver	GSH (μ g/ml)	GST (units/mg protein/min)
O	13.52±5.48 ^{NS}	773.76±0.93 ^{NS}	344.67±95.18 ^b	0.075±0.032 ^{NS}
OI	16.56±5.96	838.77±0.51	453.00±69.16 ^a	0.072±0.008
OG	14.80±0.66	807.64±0.47	470.00±77.84 ^a	0.075±0.005
OIG	13.36±2.28	797.79±1.24	467.33±52.98 ^a	0.074±0.016

4. 혈중 칼슘과 인 함량 그리고 alkaline phosphatase 활성

이소플라본과 포도종실유가 체내칼슘대사에 미치는 효과를 측정하기 위해 혈청내 칼슘과 인함량은 Table 2-40, alkaline phosphatase(ALP)활성은 Figure 2-34에 나타내었다. ALP활성은 α 1 collagen, osteocalcin, osteopontin 및 transforming growth factor- β 1 등과 함께 골모세포를 만드는 데 중요한 인자로 알려져 있는데, 이의 활성은 대사성 골질환 등 골대사 회전이 활발할 때 즉, 골격형성시 조골세포의 활동이 증가되어 골교체율이 빠를 때 혈장 내에서의 농도가 증가된다고 한다. 이소플라본이 골모세

포의 ALP의 활성도에 미치는 영향에서 이소플라본을 $10\mu\text{l}$ 투여했을 때는 전체의 46%, $50\mu\text{l}$ 투여했을 때는 56%의 활성도가 나타나, 이소플라본이 인간의 골모세포를 자극하여 골형성에 도움이 된다고 한다. 그러나, 본 연구결과에서는 이소플라본과 포도종실유 보충에 따른 영향이 없는 것으로 나타났고 혈청 내 칼슘과 인의 함량에도 이소플라본과 포도종실유의 영향이 미치지 않은 것으로 관찰되었다. 폐경기 여성에게 있어 식이칼슘이 골격대사에 미치는 영향은 여러 실험을 통해 연구되어왔고, 또한 미량영양소인 붕소에 대한 연구도 많이 이루어졌는데, 정등의 연구결과에서는 붕소가 ALP활성에 영향을 미치지 않았다고 보고하고 있어, 이소플라본과 포도종실유가 ALP 활성에는 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다.

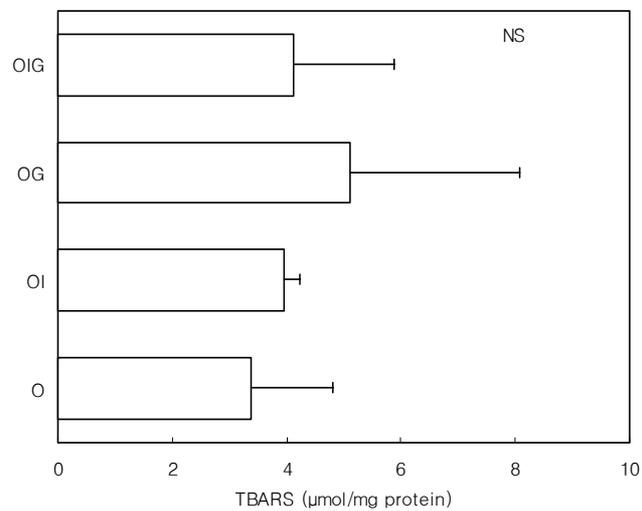


Figure 2-33. Effect of isoflavone and/or grape seed oil supplementation on the TBARS formation in hepatic tissue of ovariectomized female rats.

Table 2-40. Ca, P and Ca/P ratio in serum.

Group	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	Ca/P
O	10.9±0.74 ^{NS}	7.10±1.63 ^{NS}	0.083±0.015 ^b
OI	10.3±1.00	6.84±0.68	0.078±0.009 ^b
OG	10.4±0.25	6.12±0.82	0.105±0.012 ^a
OIG	10.6±0.57	6.62±0.57	0.094±0.012 ^{ab}

5. 골격강도에 미치는 효과

이소플라본과 포도종실유가 골격강도에 미치는 영향을 관찰하기 위해, 좌측 대퇴골과 견갑골을 취해 길이, 습중량 그리고 건중량을 측정된 결과는 Table 2-41과 같다. 측정결과 대퇴골과 견갑골 모두 이소플라본과 포도종실유의 영향이 미치지 못한 것으로 나타났고, 골강도의 지표라 할 수 있는 Max weight, Bending strength 그리고 Diameter에 있어서도 각 군간의 유의적인 차이가 나타나지 않았다(Table 2-42). Deyhim등도 난소절제 한 흰쥐에서 이소플라본을 0.575mg/g dietary protein과 1.15mg/g dietary protein의 수준의 식이를 공급했을 때, 이소플라본의 두 수준이 골격의 질적 향상에는 유의적인 영향을 미치지 못한 것으로 관찰되어, 적절한 이소플라본의 수준을 설정하는 것이 어느 무엇보다 중요한 과제임을 알 수 있다. 이소플라본 보충이 난소절제 흰쥐의 골대사에 미치는 영향을 연구한 박등의 실험결과에서는 골강도 및 골무게 등의 골다공증에 대한 영향인자에서 이소플라본 공급에 의한 차이는 나타나지 않았다.

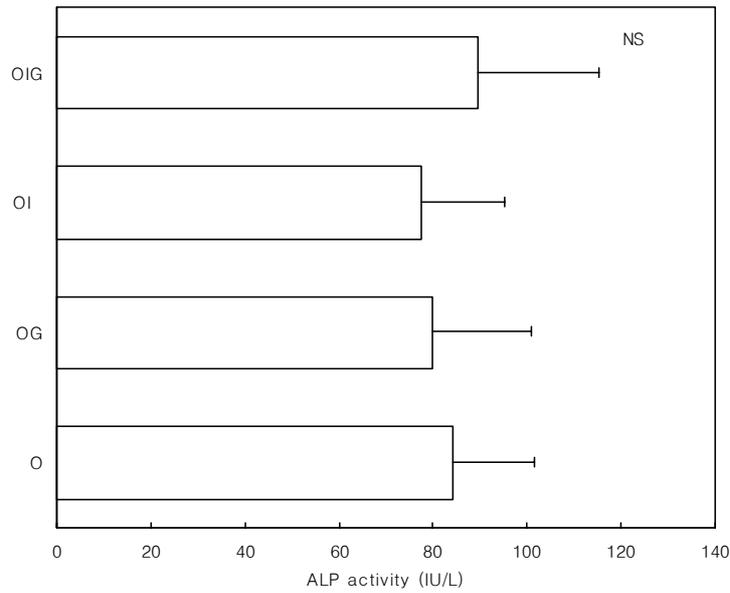


Figure 2-34. Effect of isoflavone and/or grape seed oil supplementation on alkaline phosphatase activity in serum of ovariectomized female rats.

Table 2-42. Length, wet weight, dry weight of scapular and femur in experimental groups.

Group	Length (mm/100g BW)		Wet weight (mg/100g BW)		Dry weight (mg/100 BW)	
	Scapular	Femur	Scapular	Femur	Scapular	Femur
O	9.85±0.48 ^{NS}	12.49±0.64 ^{NS}	68.35±5.71 ^{NS}	253.39±14.35 ^{NS}	53.20±4.59 ^{NS}	194.19±11.18 ^{NS}
OI	9.24±2.36	11.36±1.36	65.32±9.44	230.53±22.37	51.79±5.87	174.53±15.34
OG	10.43±1.47	12.46±1.80	70.06±9.84	247.74±38.38	55.10±7.22	184.30±28.95
OIG	9.73±0.44	11.87±1.25	66.37±7.87	249.32±25.02	50.28±4.70	179.89±14.32

Table 2-43. Max weight, bending strength and diameter of femur bone in experimental groups.

Group	Max weight (g)	Bending strength (g/cm ²)	Diameter (mm)
O	3729.8±1581.5 ^{NS}	23.57±10.46 ^{NS}	3.04±0.22 ^{NS}
OI	3254.6±901.61	19.75±8.46	3.02±0.18
OG	3511.6±711.24	25.22±4.41	3.16±0.26
OIG	2644.0±1419.03	17.54±12.12	3.22±0.11

제 3 장 포도부산물 추출물의 *in vivo*에서의 항산화 및 항혈전 효과

제 1절 포도씨 추출물의 혈소판 응집억제활성

녹차나 포도주에 다량 함유된 polyphenol 물질이 혈중 cholesterol 저하 및 항산화, 항혈전 효과가 있으며 심장질환 특히, 동맥경화를 예방하고 치료하는데 가능성 있다고 보고되어 있다. 이에 본 연구에서는 포도씨를 acetone, ethyl acetate, water로 추출한 추출물과 *in vitro*에서 가장 높은 항산화 활성을 갖는 ethyl acetate 조추출물의 제 1차, 제 2차 fraction 물질이 collagen, thrombin, arachidonic acid 그리고 PAF 등에 어떠한 혈소판 응집 억제활성을 보이는지를 측정하였다.

1. 재료 및 방법

가. 재료

포도씨 추출물과 분획물의 분리방법은 제 2 장의 제 3절에 서술된 것과 동일하다.

나. 방법

1) 혈소판 현탁액의 조제

토끼 귀 동맥을 70% 에탄올로 확장시킨 후, 20G의 주사바늘로 ACD 용액에 채혈한 후, 1300rpm으로 15분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거한 후 침전물을 Tyrode HEPES buffer pH 6.35 로 세척한 다음 3000rpm으로 10분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고, Tyrode HEPES buffer pH 7.35 용액으로 부유하여 세정 혈소판 부유액 (washed platelet rich plasma)을 조제하였다. 혈소판 수를 광학 현미경 및 Hematocyte counter로 계측하여 혈소판 수가 $4 \times 10^8/\text{ml}$ 가 되도록 Tyrode HEPES

buffer pH 7.35 용액으로 희석하여 실험에 사용하였다.

Table 3-1. Composition of Tyrode HEPES buffer solution for washing platelet.

	First	Second	Third
Buffer	10	10	10
Na ₂ H ₂ PO ₄	2.5	2.5	2.5
Glucose	2.5	2.5	2.5
HEPES	2.5	2.5	2.5
BSA	2.5	2.5	2.5
EGTA	5	-	-
H ₂ O	-	5	5
pH	6.5	6.5	7.35

2) 혈소판 응집억제 활성 측정

각 혈소판 유발 인자에 대한 혈소판 활성화작용 및 혈소판 응집억제 활성의 측정은 광 투과도 변화를 이용한 흡광도 측정 장치(Aggregometer 470-vs, 4 channel, Chrono-log Co., U.S.A)를 사용하였다. 혈소판 부유액(PRP)을 취하여 37°C로 1000rpm에서 교반하면서 3분이 경과된 후, CaCl₂을 최종농도가 1mM이 되도록 투여한다. 3분간 incubation한 후 각각의 시료를 각 농도별로 투여한 다음, 다시 3분간 incubation한 후 각 혈소판 유발 인자를 최적농도로 투여하여 혈소판 응집억제작용을 측정하였다. 혈소판 응집유발인자로는 collagen, thrombin, arachidonic acid 및 PAP를 사용하였다.

$$\text{혈소판 응집 억제율(\%)} = [(A-B)/A] \times 100$$

A: 대조군의 응집율

B: 시료의 응집율

2. 실험결과 및 고찰

가. 포도씨 조추출물의 혈소판 응집억제활성

1) Collagen

혈소판 응집유발인자로 collagen $2\mu\text{g/ml}$ 투여시 포도씨 조추출물의 응집억제활성은 다음과 같았다. 추출물의 농도를 $100\mu\text{g/ml}$ > $150\mu\text{g/ml}$ > $200\mu\text{g/ml}$ 로 하여 혈소판 응집억제 활성을 측정된 결과 acetone 층은 $100\mu\text{g/ml}$ 에서 22.22%, $150\mu\text{g/ml}$ 에서 64.44% 억제하였으나 $200\mu\text{g/ml}$ 에서는 자체응집이 유도되었다. Water 층은 $100\mu\text{g/ml}$ 에서 11.11%, $200\mu\text{g/ml}$ 에서 68.89% 억제되었고, $300\mu\text{g/ml}$ 에서는 70.83% 억제되었다. Ethyl acetate 층은 $100\mu\text{g/ml}$ 에서 66.67%, $150\mu\text{g/ml}$ 에서 88.89% 억제되었으며, $200\mu\text{g/ml}$ 에서는 자체응집 되었다. 각각의 추출물 $100\mu\text{g/ml}$ 에서 ethyl acetate > acetone > water 순으로 collagen에 대해 혈소판 응집 억제율이 높았으며, 활성이 가장 높은 ethyl acetate 층은 다시 A, B, C, D, 4개의 소분획물로 분리하였다. A 분획물은 $100\mu\text{g/ml}$ 에서 22.54%, $150\mu\text{g/ml}$ 에서는 100% 억제되었으며, B 분획물은 $100\mu\text{g/ml}$ 에서 29.58%, $150\mu\text{g/ml}$ 에서 98.36% 억제되었다. C 분획물은 $25\mu\text{g/ml}$ 에서 25%, $50\mu\text{g/ml}$ 에서 55.73%, $100\mu\text{g/ml}$ 에서 61.97% 억제되어 소분획물중 혈소판 응집억제 활성이 가장 높은 것을 알 수 있었고, D 분획물은 $100\mu\text{g/ml}$ 에서 자체응집이 유도되어 혈소판 응집억제 효과를 측정할 수 없었다.

2) Trombin

Thrombin 0.04 unit/ml 투여시 포도씨 조추출물과 분획물의 농도별 혈소판 응집억제 활성을 측정된 결과, acetone 층은 $25\mu\text{g/ml}$ 6.98%, $50\mu\text{g/ml}$ 9.3%, $100\mu\text{g/ml}$ 20.37%의 혈소판 응집억제율을 보였고, water 층은 $50\mu\text{g/ml}$ 16.28%, $100\mu\text{g/ml}$ 24.07%, ethyl acetate 층은 $50\mu\text{g/ml}$ 23.08%, $100\mu\text{g/ml}$ 68.52%, $150\mu\text{g/ml}$ 에서 82.46% 억제되었다. 또한 ethyl acetate 층의 소분획물 A, B, C의 혈소판 응집억제활성을 측정된 결과, A 분

획물은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 11.32%, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 45.52%, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 8.89%로 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 가장 높은 활성을 보였으며, B 분획물은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 34.09%, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 48.08%, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 84.91%, C 분획물은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 34.09%, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 63.46%, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 86.79%의 활성을 보여 농도 의존적으로 혈소판 응집억제율이 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 혈소판 응집유발인자로 collagen을 투여했을 때와 유사한 경향이었으며, collagen과 thrombin이 비슷한 경로를 통해 혈소판을 활성화시키는 것으로 생각되어진다.

3) Arachidonic acid

혈소판 응집유발인자로 arachidonic acid 100 μM 투여시 ethyl acetate 층의 소분획물인 A, B, C의 혈소판 응집억제활성을 측정된 결과, A, B, C 분획물 모두 농도 의존적으로 혈소판 응집을 억제하는 것으로 나타났다. A와 B 분획물 경우에는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 10% 정도로 응집억제율이 낮았으나 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 투여한 경우에는 60% 이상 특히 A 분획물은 90% 이상의 응집억제율을 보였다. C 분획물은 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 25%, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 47.46%, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 57.38%의 혈소판 응집억제활성을 나타내었다.

4) PAF

포도씨의 ethyl acetate 추출물을 shephadex LH-20 column chromatography을 이용하여 얻은 분획물 A, B, C, D 중 자체응집을 유도하는 D 분획물을 제외하고 A, B, C 분획물의 PAF 1 μM 에 대한 혈소판 응집억제활성을 측정하였다. 측정결과, A 분획물은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 전혀 활성을 보이지 않았으며, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 투여시에도 5% 미만의 응집억제활성을 보여 별 효과가 없는 것으로 나타났다. 또한 B 분획물에서도 전혀 혈소판 응집억제활성을 보이지 않았다. C 분획물은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 15.28%, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 25%, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 29.58%의 혈소판 응집억제활성을 보였으나 collagen, thrombin 및 arachidonic acid에 비해 혈소판 응집억제활성이 매우 낮은 것으로 나타났다.

Table 3-2. IC₅₀ value(ug/ml) of fraction isolated form grape seed on platelet activation induced by each agonist.

	Collagen	Trombin	Arachidonic acid	PFA
A	118.84	106.67	177.38	2441.469
B	112.80	177.59	270.47	0
C	63.87	158.41	75.20	573.61
D	N.D	N.D	N.D	N.D
Water	182.13	266.43	N.D	N.D
Acetone	132.90	262.89	N.D	N.D
EtOAc	62.49	86.49	N.D	N.D

N.D : not detected

나. 포도씨 분획물의 혈소판 응집억제활성

포도씨의 ethyl acetate 층으로부터 sephadex LH-20 column chromatography에 통과시켜 A, B, C, D 4개의 소분획물을 얻었으며, 혈소판 응집유발인자 collagen, thrombin, arachidonic acid 및 PAF에 대해 이들 분획물의 혈소판 응집억제활성을 측정 한 결과 4종류의 혈소판 응집유발인자 모두 C 분획물에서 가장 뛰어난 활성을 보였다. 따라서 C 분획물을 다시 sephadex LH-20 column chromatography에 통과시켰다, 전개용매로 ethanol을 사용하여 11개의 소분획물(E1-E11)을 얻은 후, acetone으로 층진물을 세척하면서 5개의 소분획물(A1-A5)을 얻었으며, 총 16개의 소분획물에 대해 혈소판 응집억제활성을 측정하였다. 혈소판 응집유발인자는 collagen, thrombin, arachidonic acid 및 PAF를 사용하였다.

1) Collagen

Collagen 2 μ g/ml에 대해 16개의 소분획물의 혈소판 응집억제활성을 농도별로 측정

한 결과는 다음과 같다. 분획물의 농도가 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 경우를 비교해보면, E1 84.75%, E2 30.51%, E3 94.92%, E4 93.44%, E5 44.26%, E6 98.33%, E7 96%, E8 96%, E9 98%, E10 75%, E11 54.69%의 응집억제율을 보였으며, 특히 E1, E3, E6, E7, E8, E9에서 활성이 매우 높은 것으로 나타났다. 반면 acetone을 전개용매로 사용하여 얻은 소분획물 A1-A5는 자체응집이 유도되어 혈소판 응집억제활성이 전혀 볼 수 없었다.

2) Thrombin

Thrombin 0.04 unit에 대한 포도씨 추출물을 sephadex LH-20 column chromatography로 2차 분획하여 얻은 소분획물의 혈소판 응집억제활성을 측정하였다. 각각의 분획물은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 E1 56.36%, E2 30.91%, E3 40%, E4 48.57%, E5 68.57%, E8 44.68%, E9 61.70%, E11 26.67% 억제하였으며, E6, E7, E10 분획물은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 혈소판 응집억제활성이 전혀 나타나지 않았다. 분획물의 혈소판 응집억제율을 농도별로 측정한 결과 대체적으로 농도 의존적으로 억제율이 증가하였으나, E2에서는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (34.78%) > 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (30.91%) > 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (18.87%)로 농도가 증가할수록 오히려 혈소판 응집이 유도되었다, 이와 같이 혈소판 응집 유발인자로 thrombin을 투여한 경우 E1과 E9 분획물에서 혈소판 응집억제활성이 높았으며, 이는 혈소판 응집 유발인자로 collagen을 사용한 경우와 비슷한 양상을 보여 유사한 경로를 통해 혈소판 응집이 억제되는 것으로 생각된다.

3) Arachidonic acid

Arachidonic acid 대사계로부터 생산되는 prostaglandin류(thromboxane A_2 (TXA₂), prostaglandin I₂(PGI₂, prostacyclin), leukotriene B₄(LTB₄)) 중 TXA₂의 생성은 혈소판에 있어서 혈소판 응집을 강하게 유발하고 혈관이나 기관지의 평활근을 수축하는 작용을 갖고 있다. 포도씨 추출물을 sephadex LH-20 column chromatography로 2차 분리하여 얻은 분획물의 농도에 따른 혈소판 응집억제활성을 측정한 결과, 분획물 모두 농도 의존적으로 억제율이 증가하였다. 각각의 분획물을

100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 투여시 E4와 E5 분획물은 전혀 활성을 보이지 않았으나 E1 89.40%, E2 3.03%, E3 28.79%, E6 29.31%, E7 22.41%, E8 34.48%, E9 63.79%, E10 22.41%, E11 29.31% 억제율을 보였다.

4) PAF

혈소판 응집유발인자로 PAF 1 μM 을 투여하여 이에 대한 포도씨 2차 분획물의 혈소판 응집억제활성을 측정하였다. PAF는 세포내로 Ca^{2+} 의 농도를 증가시켜 혈소판 응집을 유도하는 것으로 알려져 있다. 각 분획물의 첨가농도가 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일 때 PAF에 대한 혈소판 응집억제율은 다른 응집유발인자 즉, collagen, thrombin 및 arachidonic acid를 투여했을 때보다 현저하게 낮았으나, E1, E3, E9, E11 분획물에서 억제율이 높게 나타나 혈소판 응집억제활성을 보이는 경향은 유사하였다. E5, E7, E8 분획물은 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서도 전혀 활성을 보이지 않았으며, E2, E3, E10과 E11 분획물은 오히려 농도가 증가할수록 혈소판 응집억제활성이 감소되는 것으로 나타났다.

Table 3-3. $\text{IC}_{50}(\mu\text{g}/\text{ml})$ value of fraction isolated from C fraction on platelet aggregation induced by each agonist.

	Collagen	Trombin	Arachidonic acid	PAF
E 1	53.79	85.15	63.55	176.47
E 2	158.97	N.D	285.45	N.D
E 3	34.38	335	166.60	434.20
E 4	98.15	208.15	473.78	1074.66
E 5	106.48	184.59	302.92	N.D
E 6	3.92	383.91	213.76	1177.13
E 7	44.58	201.39	226.71	N.D
E 8	45.01	173.37	213.82	N.D
E 9	35.01	42.96	75.81	400.27
E 10	136.48	595.86	216.27	349.90
E 11	103.40	181.07	200.68	279.96

N.D : Not detected

제 2절 *In vitro*계에서 용매별 포도씨추출물의 항산화효과

1, 재료 및 방법

가. 포도씨추출

포도씨는 품종에 상관없이 충청지역에서 재배되는 포도를 구입하여, 포도씨와 과육을 분리하였다. 이렇게 분리된 포도씨는 증류수에 2회 수세하여, 50℃에서 72시간 건조시켰다. 건조된 포도씨는 분쇄하고, hexane에 6시간씩 2차례 처리하여 포도씨에 함유되어 있는 지방질 성분을 제거하여 탈지포도씨를 얻었다. 포도씨추출은 단일용매와 혼합용매의 방법을 달리하여 실시하였다.

1) 단일용매를 이용한 포도씨추출

탈지포도씨 50g은 60-70℃에서 acetone, ethyl acetate 그리고 methanol을 이용하여 속실텀에서 10시간 동안 추출하였다. 추출물은 감압농축기를 이용하여 용매를 제거하고, 점질액은 2배 분량의 hexane으로 처리하여 procyanidin을 침전시켰다. 이렇게 얻어진 침전물은 다시 감압농축기를 이용하여 용매를 완전히 제거하였다. 추출물은 동결건조기를 이용하여 완전히 건조시킨 후 사용직전까지 -70℃의 냉동고에 보관하였다.

2) 혼합용매를 이용한 포도씨추출

단일용매를 이용한 포도씨추출과정과 달리 혼합용매를 이용할 경우에는 shaking water bath를 활용하였다. 탈지포도씨 50g을 삼각플라스크에 담고, 용매를 부어 60-70℃에서 2차례 추출하여 여과하였다. 여과액은 감압농축기를 이용하여 용매를 제거하고, 점질액은 2배 분량의 hexane으로 처리하여 procyanidin을 침전시켰다. 이렇게 얻어진 침전물은 다시 감압농축기를 이용하여 용매를 완전히 제거하였다. 추출물은 동결건조기를 이용하여 완전히 건조시킨 후 사용직전까지 -70℃의 냉동고에 보관하였

다.

나. 포도씨추출물의 항산화효과측정

1). 페놀성 화합물 정량

용매별 포도씨추출물의 총페놀함량은 Folin-Denis법을 일부 변형하여 비색정량 하였다.. 각 추출물에 2% Na_2CO_3 를 넣고, 상온에서 2-3분 정도 방치시켰다. 이후 Folin(1N)시약을 첨가하고, 혼합시킨 후 30분간 상온에서 방치하였다. 방치가 끝난 후 700nm에서 흡광도를 읽어주었다. 표준시약은 chlorogenic acid를 이용하였다.

2) DPPH법을 이용한 자유라디칼 소거능

1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH)를 99% Ethanol에 녹여 반응시약을 준비하였다. Curvet에 일정양의 DPPH용액을 담고, 포도씨추출물을 첨가하여 10분 동안의 흡광도 변화를 측정하였다. 이때 흡광도는 517nm에서 30초 간격으로 읽어주었다.

3) SOD 유사활성 측정

SOD 유사활성 측정은 각 시료에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer와 0.2mM pyrogallol 0를 가하여 25℃에서 10분간 방치 한 후 1N-HCl로 반응을 정지시킨 후 420nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같이 계산하였다.

4) 지방산패

일정량의 egg yolk lecithin을 chloroform에 녹인 후 질소가스로 용매를 완전히 날리고 일정한 농도의 추출물, 2mM FeSO_4 , 2mM ascorbic acid를 첨가하여 잘 섞은 후 37℃에서 30분간 incubation 한 후 과산화 지질 생성량을 2-thiobarbituric acid reactive-substance(TBARS)법에 의하여 측정하였다.

5) 2-deoxyribose의 산화에 미치는 영향

5mM EDTA와 0.1mM PBS에 FeSO_4 를 녹이고, 10mM 2-deoxyribose와 10mM H_2O_2 를 준비한다. 각각의 용액에 DMSO에 녹인 시료를 반응시켜, 37°C에서 2시간 동안 incubation 시켰다. 이후, 0.67% TBA와 20% TCA를 첨가하고, 100°C에서 15분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 얼음물에서 식히고, n-butanol:pyridine을 첨가하여 3000rpm에서 원심하였다. 상층만을 취하여 532nm에서 흡광도를 측정하였다.

다. 통계처리

실험결과는 평균과 표준편차로 산출하였으며, 각 실험치 간의 검증은 SAS를 이용한 Anova와 Duncan's multiple range test로 각 군간의 차이에 대한 유의성을 검증하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 용매에 따른 포도씨추출물의 수율측정

단일용매와 EtOAc와 Water의 혼합용매를 이용하여 포도씨추출을 한 결과, 각 추출물의 수율은 Table 3-4와 같다. MeOH, EtOAc 그리고 Acetone과 같은 단일용매를 사용했을 때 혼합용매에 비해 각 추출물의 수율이 전체적으로 높았으며, EtOAc를 단일용매로 추출했을 때 보다 물을 첨가하여 사용했을 때 수율이 낮아지는 것을 관찰할 수 있었다.

나. 포도씨 추출물의 항산화효과

포도씨추출물의 페놀성 함량을 측정한 결과는 Figure 3-1과 같다. 추출수율에서는 단일용매를 사용했을 때 높았지만, 페놀성함량은 EtOAc와 Water의 혼합용매를 추출용매로 사용했을 때 추출수율에 비해 상대적으로 페놀성함량이 높은 것으로 나타났다.

Table 3-4. Extract yield of grape seed extracts.

Solvents used for extraction ¹⁾	Extract yield (% dry grape seeds)
AT	1.73±0.14 ^c
EA	1.89±0.07 ^b
MeOH	2.89±0.07 ^a
EW(9 : 1)	0.96±0.01 ^d
EW(17 : 3)	0.94±0.02 ^d
EW(4 : 1)	0.76±0.01 ^e

1) AT = Acetone, EA = Ethyl acetate, MeOH = Methanol, EW(9:1) = Ethylacetate : Water (9:1), EW(17:3) = Ethyl acetate : Water (17:3), EW(4:1) = Ethyl acetate : Water (4:1)

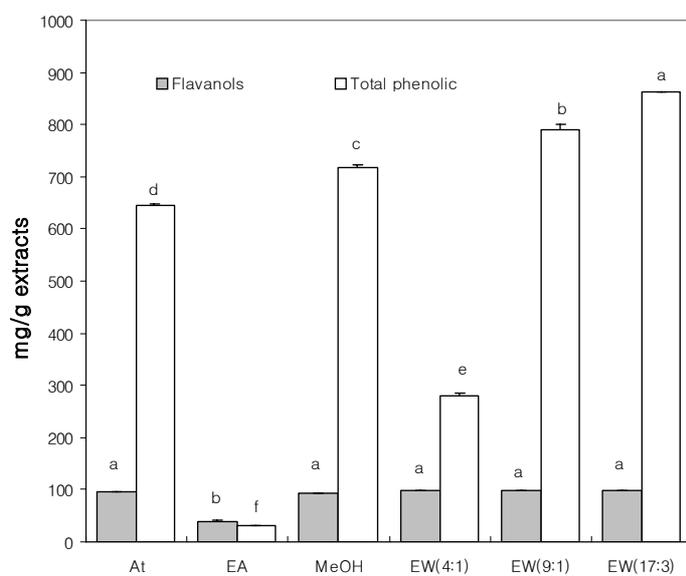


Figure 3-1. Total flavanols and phenolic acid contents of grape seed extracts prepared from various solvent.

1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH)를 이용한 자유라디칼 소거능은 Figure 3-2와 3-3에 나타내었다. 시간 경과에 따른 소거능의 차이에서는 ascorbic acid, chlorogenic acid, tannic acid, BHT 그리고 quercetin과 같이 기존에 사용되고 있는 항산화제들의 활성이 높은 것을 확인할 수 있었다. 단일용매와 혼합용매의 차이보다는 단일용매에서는 메탄올 추출물이 혼합용매에서는 EW(17:3)이 BHT 그리고 quercetin과 비교해서 높은 활성을 나타냈다. EW(4:1)의 경우는 초기반응은 약하지만 시간이 경과함에 따라 활성이 함께 증가되는 것으로 측정되어 지속적인 자유라디칼 소거능을 가지고 있는 것을 확인할 수 있었다. 측정시간 5분 때의 결과는 Figure 3-2와 같은데, 이 결과에서도 기존의 항산화제의 소거능이 높은 것을 알 수 있었다. 그리고 혼합용매를 사용했을 때 전체적으로 활성이 높았고, 단일 용매중 에서 methanol의 자유라디칼 소거능이 혼합용매와 비교해서도 활성이 높은 것으로 측정되었다.

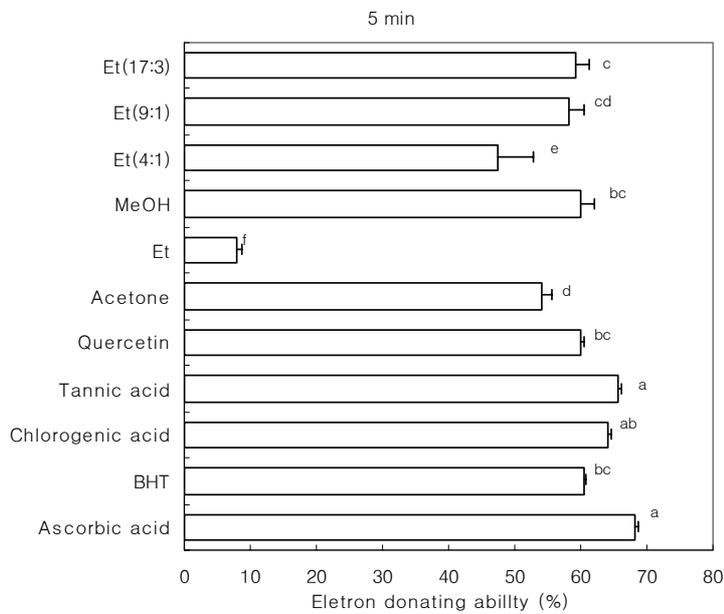


Figure 3-2. Electron donating ability of grape seed extract from each solvent.

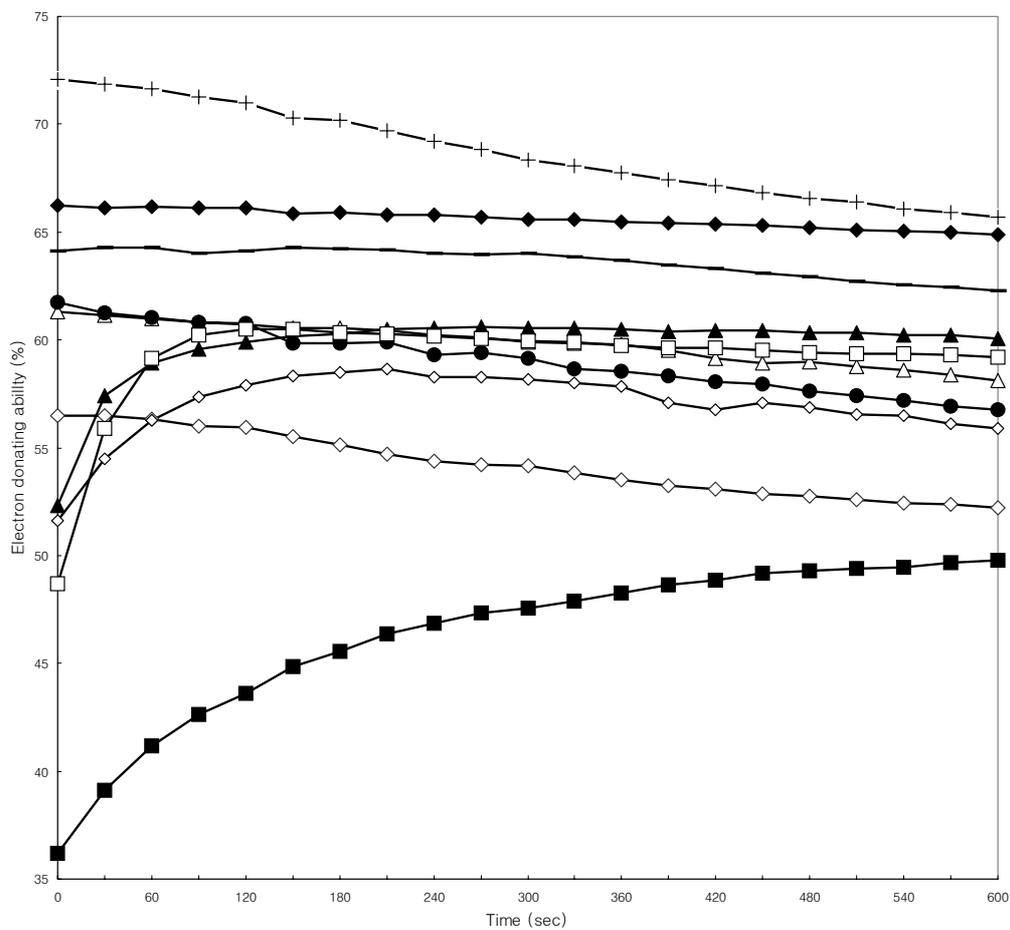


Figure 3-3. Time response of electron donating ability of grape seed extract from each solvent by time-score.

(○) Acetone, (■) EW(4:1), (●) EW(17:3), (▲) BHT, (◆) Tannic acid, (△) MeOH, (◇) EW(9:1), (+) Ascorbic acid, (-) Chlorogenic acid, (□) Quercetin

Pyrogallol은 수용액에서 자동산화가 빠르게 일어나는데 여기에는 superoxide가 관여한다고 알려져 있다. 그러므로 SOD나 SOD유사활성물질이 존재하는 경우 이의 자동산화가 억제될 수 있고, 이 억제되는 정도를 비교하여 실험대상 물질의 효능을 비교한다. 즉 포도씨추출물을 pyrogallol 산화가 일어날 수 있는 수용액에 첨가한 후 superoxide가 관여하는 pyrogallol의 자동산화를 감소시키는 효과를 측정하는 것이다. 일반적으로 pyrogallol의 산화는 superoxide dismutase(SOD)존재에 의하여 속도가 감소한다. 그러나, pyrogallol의 산화를 감소시키는 물질이 SOD이외의 다른 물질일 수도 있으므로 포도씨 추출물이 pyrogallol의 산화속도를 감소시킨다고 하여도 그것이 꼭 SOD가 있었기 때문이라고 할 수는 없다. SOD효소 자체는 아니더라도 SOD의 작용과 마찬가지로 superoxide를 소거하는 역할이 있어 pyrogallol의 산화를 유사활성물질이라고 한다. 분석결과 BHT가 가장 높은 SOD유사활성을 나타냈으며, 단일용매 보다는 혼합용매의 추출물이 높은 활성을 보이는 것으로 나타나, 생체 산화에 중요한 역할을 하는 superoxide radical 소거능이 우수한 것으로 나타났다.

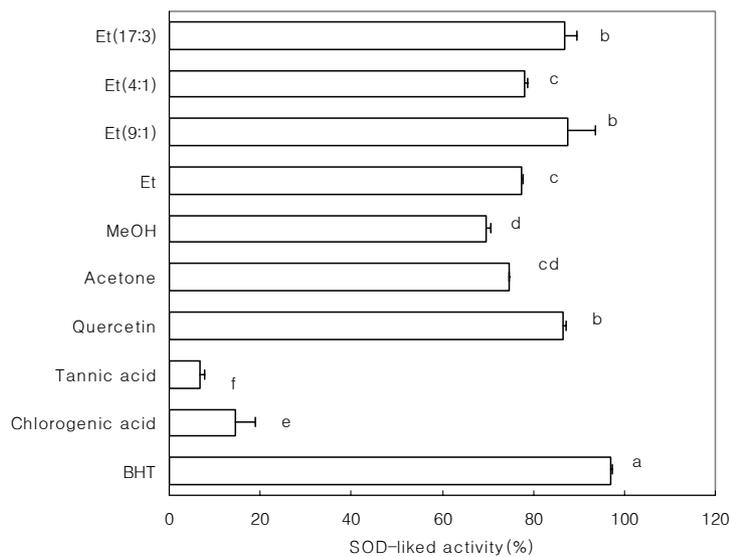


Figure 3-4. SOD-like activity of grape seed extract from each solvent.

Egg yolk lecithin에 FeSO_4 와 ascorbic acid를 첨가하면 활성산소종인 hydroxyl radical이 생성되어 lecithin을 산화시켜 과산화지질을 유발하는 것으로 알려져 있다. Lecithin에 포도씨추출물, FeSO_4 와 ascorbic acid를 첨가하여 산화를 유도한 후 과산화 지질의 산패정도를 TBARS로 측정된 결과는 Figure 3-5와 같다. 산화 저해율은 BHT와 quercetin이 가장 높게 나타났고, 단일 용매 보다는 혼합용매의 산화저해율이 높은 것으로 관찰되었다. 그러나, 단일 용매중에서도 메탄올의 포도씨추출물이 높은 산화저해율을 나타내고 있어, 혼합용매와 더불어 lecithin의 산화를 억제하는 것으로 보여진다.

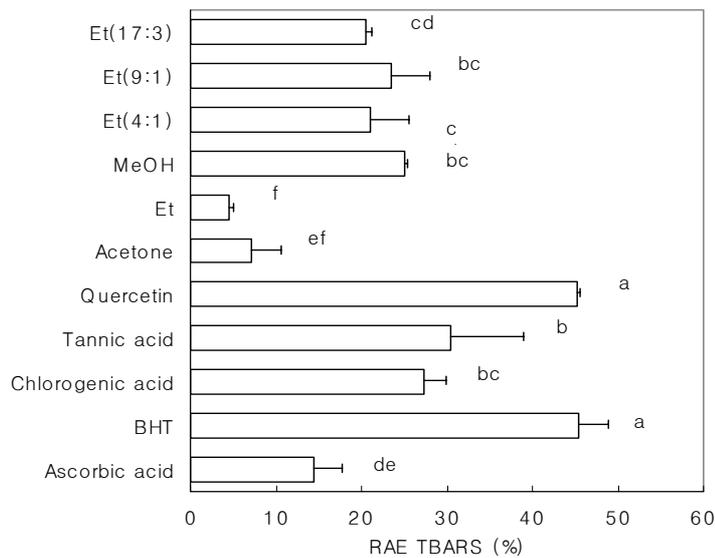


Figure 3-5. Relative antioxidative effects of grape seed extract from each solvent on the peroxidation of egg yolk lecithin.

Deoxyribose에 포도씨추출물이 미치는 항산화효과 측정에서도 기존의 항산화제의 활성이 높은 것으로 측정되었으며, 단일용매와 혼합용매에 따른 차이는 보이지 않았다. 단일용매에서는 메탄올과 아세톤의 추출물이 그리고 혼합용매에서는 EtAOc : Water = 17 : 3의 추출물이 높은 항산화 효과를 나타냈다.

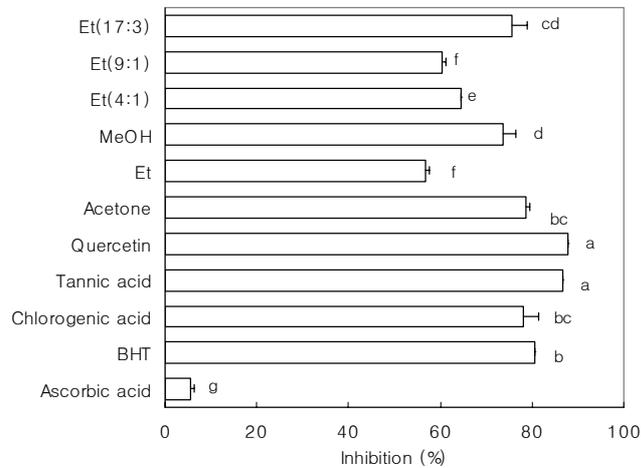


Figure 3-6. Relative antioxidative effects of grape seed extract from each solvent on 2-deoxyribose.

3. 결론

Methanol, acetone, ethyl acetate(EtAOc)와 같은 단일용매와 ethyl acetate와 water의 혼합비율을 달리한 혼합용매에 따른 포도씨추출물에 대한 추출수율과 각 추출물의 항산화효과를 측정하였는데, 결과적으로 단일용매를 이용했을 경우 추출수율이 전체적으로 높았음을 알 수 있었다. 그러나, 추출수율이 크다고 해서 상대적으로 항산화효과가 높은 것이 아닌 것을 확인할 수 있었다. Free radical 소거능과 지질과산화 억제도에 있어서는 단일용매 보다는 혼합용매를 추출용매로 사용했을 때 항산화활성이 높은 것으로 나타났지만, 단일용매 중 추출수율이 가장 높았던 MeOH의 포도씨추출물이 추출수율과 함께 전체적으로 항산화활성이 높은 경향을 보였다. 따라서, 본 실험을 통해 procyanidin이 풍부한 포도씨추출물을 얻기 위한 적절한 용매가 MeOH인 것으로 측정되어, MeOH의 포도씨추출물을 이용하여 *in vivo study*에 적용하게 되었다.

제 3 절 고콜레스테롤 혈증 토끼에서 포도씨와 과피 추출물이 미치는 영향

Procyanidin은 polyhydroxy flavan-3-ol 단위의 oligomer나 polymer 형태로써, 포도씨는 물론이고, 적포도주내 함유되어 있는 주요 polyphenol 이다. Procyanidin은 특히, hydrophilic radical에 대해 뛰어난 소거능을 보이며, *in vitro* 상에서 LDL 산화를 억제하는 물질로 알려져 있다. 또한, 식이성 procyanidin은 항산화제로서의 활성을 통해 동맥경화증과 같은 심장질환의 발생율을 감소시킬 수 있을 것을 보인다. 그러나, *in vivo* 상에서의 항동경화능은 많이 이루어지고 있지 않는 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 포도씨로와 과피로부터 procyanidin과 anthocyanin이 풍부한 추출물을 고콜레스테롤 혈증이 유발된 토끼에게 공급함으로써 지질패턴 및 항산화 효소활성계에 미치는 영향을 측정하였다.

1. 재료 및 방법

가. 실험동물사육

실험동물은 총 48마리의 NewZealand 흰토끼를 이용하였다. 실험식은 (주)퓨리사의 토끼사료를 분말화하여 동맥경화를 유발하기 위해 여기에 1% 콜레스테롤(w/w)을 혼합하였다. 이 식이에 0.2%(w/w) 포도씨추출물(GSE), 0.2%(w/w) 포도과피추출물(GPE), 0.1%(w/w) 포도씨추출물+0.1%(w/w) 포도과피추출물(GE), 10%(w/w) 포도씨가루(GSP), 10%(w/w) 포도과피가루(GPP) 그리고 5%(w/w) 포도씨가루+5%(w/w) 포도과피가루(GP)를 첨가하여 실험식을 조제하였다.

나. 실험동물의 처리 및 시료 수집

8주간의 사육기간이 끝난 후 토끼의 귀정맥에 공기주사를 통해 실험동물을 희생시켰다. 희생된 토끼를 개복하여, 일회용 주사기를 이용 간정맥에서 혈액을 취하였다.

채취된 혈액은 상온에서 30분 이상 방치하고, 방치 후 3000rpm에서 15분 동안 원심하여 혈청을 분리하였다. 혈청은 분석직전 까지 -70℃ 냉동고에 보관하였다. 혈액을 취한 후, 간과 신장을 적출하여 냉장 PBS(0.1mM)에 세척하고, 물기를 제거한 후 장기 무게를 측정하였다. 적출된 간과 신장도 분석직전 까지 -70℃ 냉동고에 보관하였다. 간과 신장 이외의 장기들을 제거하고 심장에서 나오는 대동맥궁과 복부대동맥까지를 적출해내었다. 적출 해 낸 동맥은 냉 PBS(0.1mM)에 세척하면서, 이물질을 제거하였다. 이후 가로로 잘라 동맥 내부를 펼쳐 나머지 이물질을 전부 제거하였다. 동맥이 바닥에 잘 펼쳐질 수 있도록 절개를 한 후 image analysis를 위해 디지털카메라로 촬영을 하였다.

다. 혈청학적 분석

혈청내 지질패턴을 분석하기 위해, 총지질, 총콜레스테롤, LDL 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤, 중성지방 농도는 자동분석기(Automatic Analyzer, HITACHI, Japan)를 사용하여 측정하였다. 심근경색증 등의 이행여부를 확인하는 인자로써 LDH(lactate dehydrogenase) 활성도와 HDL 콜레스테롤과 LDL 콜레스테롤 농도를 이용하여 Atherogenic index을 계산하였다.

라. 조직내 항산화효과 분석

간조직에 0.1mM PBS를 가하여 homogenizer로 균질화한 후, 3500rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이 상등액을 가지고 Simons와 Johnson의 방법에 따라 glutathion 함량(GSH)을 측정하고, Habig법에 의해 GST(glutathione-S-transferase)활성을 측정하였다.

마. 지질과산화도 측정

지질과산화물 함량의 측정은 thiobarbituric acid(TBA)법을 사용하여, 혈청과 간조직내 malondialdehyde(MDA)함량으로 정량화 하였다. 표준 시약으로 1,1,3,3-tetraethoxy

propane을 사용하여 1mg protein의 양에 따라 생성된 TBARS 값으로 나타냈다.

바. 통계처리

실험결과는 SAS program을 이용하여 각 실험군 마다 평균과 표준편차를 계산하였고, 각 실험군간의 비교는 ANOVA로 분석한 후, 유의적인 차이는 $\alpha=0.05$ 에서 Duncan's multiple range test에 의해 검정하였다.

2. 실험결과 및 고찰

가. 실험동물의 체중 및 간무게

토끼의 체중증가는 각 군별로 실험기간에 따라 꾸준히 증가하였으며, 최종체중의 변화에서는 군별의 유의적인 차이는 없었다. 그리고 간무게는 일반식이군(NOR)이 유의적으로 가장 낮았으며 다른 군들간의 변화는 없는 것으로 관찰되었다.

나. 혈청 지질 패턴에 미치는 영향

포도씨와 포도과피가 고콜레스테롤 식이를 공급한 토끼의 혈청 지질 패턴에 미치는 영향은 Table 3-6에 나타냈다. 총 콜레스테롤, 중성지방 그리고 LDL 콜레스테롤은 1% 콜레스테롤 식이를 공급한 군(CHOL)에서 가장 높은 것으로 나타났다. 혈청 내 총 콜레스테롤과 LDL 콜레스테롤 농도는 포도씨추출물(GSE) 군이 다른 군들에 비해 낮은 농도를 보이고 있어, 포도씨추출물이 혈청 콜레스테롤 농도에 유의적인 영향을 미치는 것으로 나타났다. HDL 콜레스테롤 농도는 유의적이지 않았으나 일반식이군(NOR)이 높았으며, 포도씨와 포도과피가 미치는 영향은 관찰 할 수 없었다. 그러나, 중성지방 농도에 있어서는 일반식이군과 비교해서도 포도과피추출물(GPE)군이 다른 군들에 비해 유의적으로 낮은 것을 관찰할 수 있었고, 포도과피가루(GPP)군이 포도씨가루(GSP)군에 비해 농도가 높아 혈청내 중성지방의 농도를 낮추는데는 포도씨가루와 포도과피추출물의 형태가 바람직한 것으로 사료되었다. 그리고, 포도씨와 포도과피

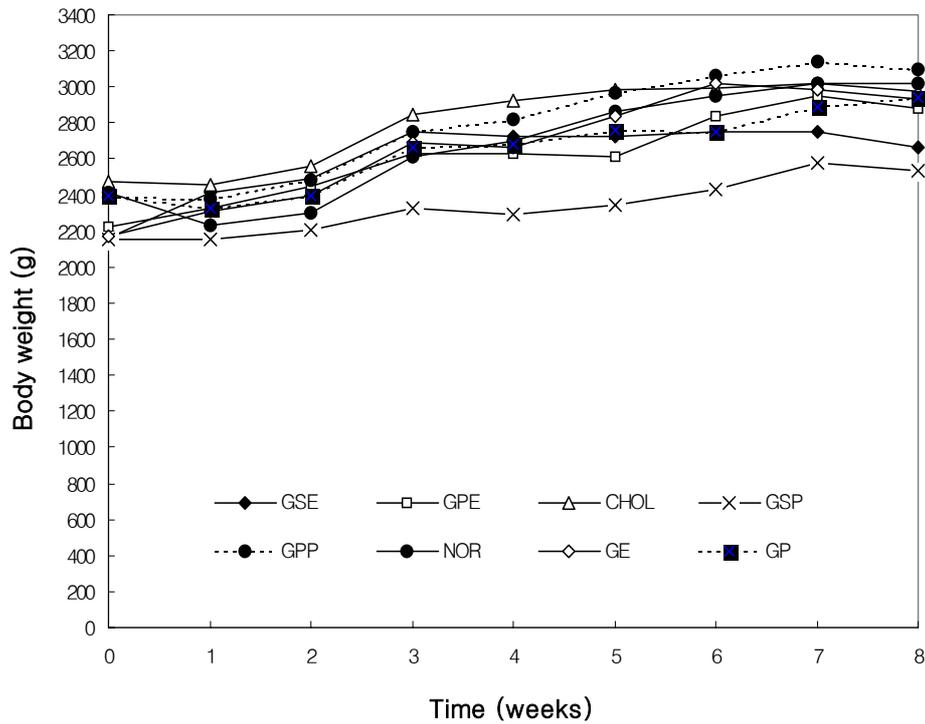


Figure 3-7. Body weight changes of rabbits on high cholesterol diet.

의 교호작용은 관찰할 수 없었으나, 포도 포도과피를 섭취함으로써 혈청내 지질축적을 예방하는데 효과가 있었음을 알 수 있었다.

Lactate dehydrogenase 활성은 급성 심근경색증이나 울혈성 심부전의 증상을 검사하는데 활용되는 지수로서, 본 실험결과에 있어서는 포도가루(GP)군의 활성이 콜레스테롤군(CHOL)에 비해 낮은 것으로 나타났다. 그리고 추출물 단독 투여시 보다는 가루 단독 투여시에 활성이 낮았으며 추출물의 경우에는 포도씨추출물과 포도과피추출물을 혼합 투여했을 때 효과적인 것으로 나타났다. 동맥경화증의 위험도를 알아보는 atherogenic index는 군들간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 이들 결과에서는 포도씨와 포도과피가루가 심근경색증의 위험도를 낮출 수 있는 것으로 나타났으며,

단일 형태 보다는 혼합 형태로 섭취할 경우가 급성 심근경색증에 보다 긍정적인 영향을 미칠 수 있는 것으로 보여졌다.

Table 3-5. Body weight gain and liver weight of rabbits on high cholesterol diets.

Group	Weight gain (g)	Liver weight (g/kg b.w)
GSE	528.9±354.00 ^{NS}	35.62±4.32 ^a
GPE	654.9±203.69	38.00±6.74 ^a
CHOL	502.9±220.04	37.82±3.66 ^a
GSP	378.7±268.93	37.40±4.43 ^a
GPP	713.3±288.70	38.39±7.37 ^a
NOR	604.2±446.73	25.32±3.38 ^b
GE	760.9±108.10	39.02±9.49 ^a
GP	544.1±366.74	37.67±4.88 ^a

Table 3-6. Concentration of serum lipids of rabbits on high cholesterol diets.

Group	Total cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)	HDL cholesterol (mg/dl)	LDL cholesterol (mg/dl)
GSE	1568.2±413.16 ^b	51.5±29.00 ^{ab}	22.50±12.76 ^{NS}	1537.8±415.79 ^b
GPE	1951.8±27.96 ^a	45.7±16.26 ^c	19.80±1.79	1925.0±29.25 ^a
CHOL	1948.5±89.38 ^a	149.0±31.51 ^a	29.17±8.13	1900.8±95.83 ^a
GSP	1890.5±54.59 ^a	59.5±46.22 ^{ab}	23.83±7.88	1851.2±61.57 ^a
GPP	1856.2±32.65 ^a	88.6±30.46 ^{ab}	20.00±1.87	1818.5±35.37 ^a
NOR	92.8±43.71 ^c	84.2±7.63 ^{ab}	34.50±20.84	38.9±22.5 ^c
GE	1869.5±204.93 ^a	98.0±31.93 ^b	25.50±2.43	1828.4±199.46 ^a
GP	1912.5±48.34 ^a	101.8±38.14 ^b	31.83±11.69	1856.9±57.82 ^a

Table 3-7. Lactate dehydrogenase activity and atherogenic index in serum of rabbits on high cholesterol diets.

Group	Lactate dehydrogenase (IU/L)	Atherogenic index
GSE	1113.0±257.45 ^{ab}	88.77±46.56 ^a
GPE	960.00±215.48 ^{abc}	98.21±8.89 ^a
CHOL	1397.5±333.37 ^a	76.19±31.01 ^a
GSP	658.0±401.27 ^{bcd}	86.47±32.18 ^a
GPP	713.0±342.02 ^{bcd}	92.54±9.79 ^a
NOR	442.6±167.31 ^d	1.98±0.71 ^b
GE	539.3±346.93 ^{cd}	69.08±5.41 ^a
GP	471.4±224.95 ^{cd}	65.75±23.42 ^a

다. 지질과산화 및 항산화 활성에 미치는 영향

간 조직내 glutathione(GSH)함량과 GST 활성 그리고 지질과산화 정도는 Table 3-8에 나타냈다. 조직내 glutathione(GSH)함량에 있어서는 GSE, GE 그리고 GP 군이 다른 군들에 비해 낮은 함량이 존재하는 것으로 관찰되었다. 이러한 조직내 항산화 물질을 활용하여 체내 항산화 방어체계에 관여하는 효소인 GST의 활성을 측정된 결과, 포도씨와 포도과피가루를 섭취한 군(GSP, GPP, GP)에서의 활성이 1% 콜레스테롤과 비교해서 높은 것으로 나타났다. GSH 함량과 GST활성에 있어서 추출물 상태로 섭취하기 보다는 가루 형태의 섭취를 통해 조직내 항산화 방어체계에 바람직한 영향을 가져올 수 있는 것으로 보여졌다.

TBARS 법을 이용하여 혈청 내 지질과산화정도를 측정된 결과는 Figure 3-8과 같다. 1% cholesterol을 섭취한 군의 지질과산화정도가 가장 높았고, 포도씨추출물(GSE) 군이 포도과피추출물(GPE)군에 비해 과산화 정도가 낮은 것을 관찰할 수 있었다. 가

루 섭취에 있어서는 포도과피가루(GPP)군이 포도씨가루(GSP)군에 비해 과산화정도가 낮은 것으로 나타났다. 포도추출물군(GE)와 포도가루군(GP)의 차이가 나타나지 않아, 포도씨와 포도과피의 지질과산화정도에 미치는 상호작용은 살펴볼 수 없었다. 그러나, 포도씨와 포도과피의 섭취로 인한 혈청 내 지질과산화정도에 긍정적인 영향을 미치는 것을 확인 할 수 있었다.

Table 3-8. Glutathione contents, glutathione-S-transferase activity and TBARS liver of rabbits on high cholesterol diets.

Group	Glutathione ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	GST activity (units/mg protein/min)	TBARS (μM)
GSE	37.5 \pm 3.75 ^b	247.4 \pm 67.33 ^c	46.88 \pm 8.80 ^a
GPE	41.5 \pm 4.28 ^{ab}	419.5 \pm 105.62 ^b	44.69 \pm 8.19 ^{ab}
CHOL	48 \pm 6.02 ^a	412.6 \pm 177.44 ^b	41.56 \pm 6.32 ^{abc}
GSP	46.7 \pm 2.91 ^a	455.1 \pm 117.97 ^{ab}	40.63 \pm 2.19 ^{abc}
GPP	46.1 \pm 4.48 ^a	530.9 \pm 70.19 ^{ab}	34.06 \pm 4.89 ^{cs}
NOR	45.8 \pm 5.93 ^a	598.5 \pm 85.21 ^a	27.71 \pm 4.69 ^d
GE	36.3 \pm 5.90 ^b	366.2 \pm 86.40 ^{bc}	34.27 \pm 4.68 ^{bcd}
GP	38.2 \pm 7.11 ^b	470.5 \pm 191.97 ^{ab}	35.10 \pm 2.93 ^{cd}

라. 대동맥내 콜레스테롤 침착정도.

대동맥궁과 복부동맥내에 콜레스테롤 침착정도를 관찰하기 위해 적출된 대동맥을 가로로 절개하여 촬영한 사진은 Figure 3-9에 나타났다. 일반식이군(NOR)에서는 콜레스테롤침착을 전혀 관찰할 수 없었으며, 대동맥궁과 복부동맥간의 차이도 관찰되지 않았다. 콜레스테롤군(CHOL)에서는 대동맥궁에서부터 복부동맥에 이르기까지 콜레스테롤 침착이 발생한 것을 알 수 있었다. 다른 군들에서는 대동맥궁에만 콜레스테롤

침착이 관찰되어, 포도씨와 포도과피의 섭취가 동맥내 콜레스테롤 침착을 예방하는 것으로 나타났다.

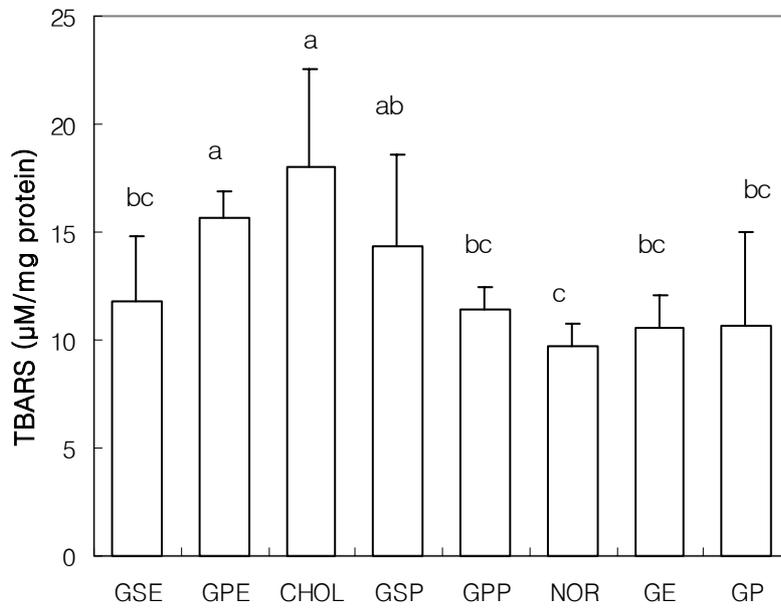


Figure 3-8. TBARS in serum of rabbits on high cholesterol diets.

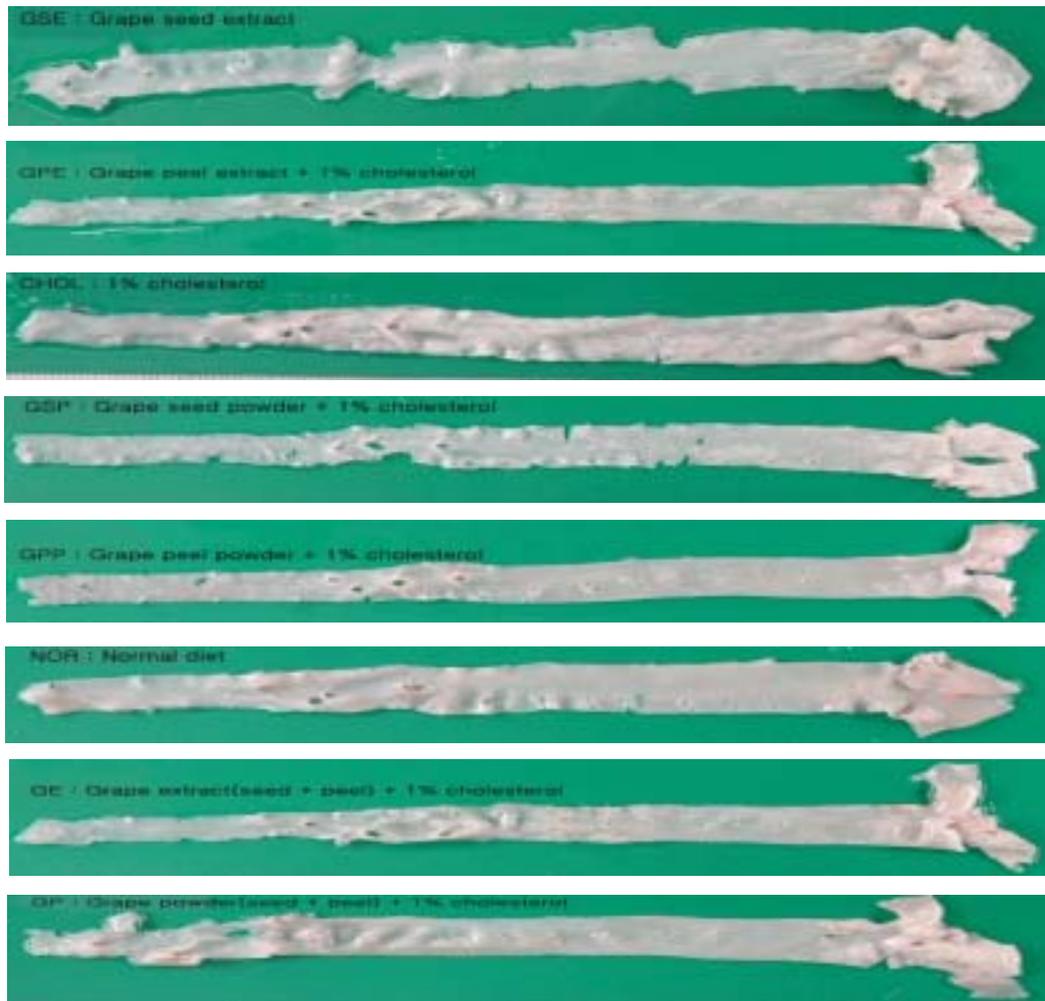


Figure 3-9. Observation of aortic atherosclerotic lesion size.

제 4 장 머루 포도씨 및 과피의 항산화 효과 및 apoE 결핍 마우스에 미치는 항동맥경화 효과 구명

제 1 절 *In vitro*에서의 머루 포도씨와 과피 추출물의 항산화 효과

머루(*Vitis Coignetiae*)는 포도과에 속하며 일명 산포도라 부르는 덩굴성 목본식물로 중부 이남의 표고 100~1,300m 사이의 산록 및 계곡에 자생하며 지리적으로는 일본, 대만, 중국에도 분포하는 낙엽활엽의 덩굴성식물로 길이 3m 이상 자란다. 내한성이 강하며 수세가 강건하고 비옥, 적윤한 곳에서 양호한 생장을 하며 도시와 바닷가에서도 자생한다. 약용으로 옛날부터 열매로 종창, 종화, 화장, 동상, 식욕촉진, 해독, 보혈, 폐질환, 유종안질, 무독증, 지갈, 이뇨, 두통, 요통, 두풍, 대하증, 양혈, 폐염, 폐결핵, 허약증 등에 널리 사용되어 왔다. 머루는 포도의 조상으로 10배 이상 농축되어 있어 효과가 매우 우수한 것으로 인정받고 있다. 머루의 효과는 저혈압, 혈액순환, 부인병에 좋고 성장기 어린이 두뇌발달에 도움을 주며 머루의 신맛은 식욕촉진과 소화촉진을 돕는 알칼리성 식품이다. 또한 불면증, 변비, 피로회복, 숙취, 피부미용에 효능이 있으며, 특히 최근 학술에 탁월한 효능을 나타낸다고 조사되고 있다. 이에 본 실험은 아직 연구가 미약하게 이루어지고 있는 머루를 이용하여 *in vitro*상에서 활성산소 및 지질과산화물을 억제하는 항산화 활성을 비교를 검토하고자 한다.

1. 재료 및 방법

가. 재료

머루포도 씨는 50~60℃에서 12시간 건조 후 분쇄기로 갈아 가루로 제조하였다. 제조된 가루는 지방추출기에서 hexan을 이용하여 완전히 탈지한 후 추출에 사용하였다. 머루포도 씨는 각각 3가지 조건을 이용하여 추출하였다. 1) 70% EtOH를 이용하

여 78℃에서 6시간 2회 추출(WG1), 2) 100% MeOH를 이용하여 78℃에서 6시간 2회 추출(WG2), 3) 100% MeOH를 이용하여 78℃ 속실텐을 이용 추출(WG3)한 것을 농축하여 동결건조 후에 시료로 사용하였다. 그리고, 머루포도 과피는 동결건조 후에 분쇄하고, 1) 100% EtOH로 25℃에서 6시간씩 2회 추출(WGS1), 2) 100% EtOH로 78℃에서 12시간 추출(WGS2)한 것으로 농축하여 동결건조 후에 사용하였다.

나. 방법

1) 총 페놀함량 측정

총 페놀함량 측정은 AOAC의 Folin-Denis 법을 일부 변형하여 비색 정량하였다. 시료에 2% Na₂CO₃을 넣고 2분간 실온에 정치한 뒤 1N Folin-Ciocalteus 시약을 가하고 혼합하여 실온에서 30분 정치한 후 750nm에서 흡광도를 측정하였다. Chlorogenic acid를 표준시약으로 사용하였다.

2) 총 플라바놀 함량 측정

총 플라바놀 함량 측정은 Porter법을 응용하여 비색 정량하였다. 표준시약은 catechin을 이용하였고, 0.1% *p*-dimethylaminocinnamaldehyde에 반응시킨 후 640nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) DPPH free radical scavenging activity

DPPH 라디칼 소거능 측정은 Okada 법에 따라 수행하였다. 1.0mM DPPH, 99.9% EtOH에 시료를 혼합하여, 517nm에서 10분 동안 흡광도의 변화를 측정하였다. 시료의 활성은 대조군에 대한 상대적인 활성으로 나타내었다.

4) Hydroxyl radical 소거활성 측정

시험관에 0.1mM FeSO₄/EDTA, 10mM 2-deoxyribose, 시료액과 0.1M phosphate buffer(pH 7.4), 10mM H₂O₂를 가하고, 37℃ 수욕조에서 2시간 반응시킨 후 20% TCA(trichloroacetic acid) 용액을 가하여 반응을 중지시키고, 0.67%의

TBA(thiobarbituric acid) 용액을 가하여 100℃에서 15분 가열한 후 급속히 냉각시켜 532nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Hydroxyl radical scavenging activity (\%)} = (A-B)/A \times 100$$

A: 시료 무 첨가군의 흡광도

B: 시료 첨가군의 흡광도

5) Hydrogen peroxide 소거활성 측정

Hydrogen peroxide 소거활성은 Muller의 방법을 변형하여 측정하였다. 시험관에 phosphate buffer, ethanol 또는 시료를 가한 후 1.0mM의 H₂O₂를 가하고 5분 동안 방치한 후, 1.25mM ABTS [2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)]와 1U/ml peroxidase를 가하고 37℃에서 10분간 반응시킨 후 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Hydrogen radical scavenging activity (\%)} = (A-B)/A \times 100$$

A: 시료 무 첨가군의 흡광도

B: 시료 첨가군의 흡광도

6) ABTS radical scavenging activity

2.0mM AAPH,을 가하여 radical을 유도해 내고, acetate buffer(pH 5.4)에 녹인 2.5mM ABTS와 혼합하였다. 혼합물은 55℃에서 1시간 동안 가열시킨 후, 청록색 ABTS^{•-} 용액에 시료를 첨가하여 25℃에서 14분간 incubation 시켰다. 734nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 지방산패

일정량의 egg yolk lecithin을 chloroform에 녹인 후 질소 가스로 용매를 완전히

날리고 일정한 농도의 추출물, 2mM FeSO₄, 2mM ascorbic acid를 첨가하여 잘 섞은 후 37 °C에서 30 분간 incubation 한 후 과산화 지질 생성량을 2-thiobarbituric acid reactive-substance(TBARS)법에 의하여 측정하였다. 각 추출물의 항산화 효과는 시료대신 DMSO를 첨가하여(Control) 비교하였고 계산은 다음과 같이 하였다.

$$\text{Relative antioxidative effect(RAE) TBARS(\%)} = (A-B)/A \times 100$$

A : 시료 무첨가군의 흡광도

B : 시료 첨가군의 흡광도

8) 통계처리

본 연구의 결과는 평균으로 나타내었고 실험군간의 비교분석은 SAS system을 이용하여 ANOVA 분석 후 $\alpha=0.05$ 에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성 검증을 하였다.

2. 실험결과 및 고찰

가. 총페놀함량 및 총플라바놀 함량

추출조건에 따른 머루포도 씨의 추출물의 총페놀함량과 총플라바놀 함량 비교는 Figure 4-1과 같다. 총페놀함량은 70% 에탄올로 추출했을 때 가장 높은 것으로 나타났다, 메탄올을 추출용매로 사용시에는 속실렛 장치를 이용했을 때 총페놀함량이 높은 추출물을 얻을 수 있었다. 그러나, 수율적인 면에서 속실렛 장치 사용시에 2.8%로 일반적인 가열법으로 추출했을 때 15% 정도인 것은 감안하다면 페놀함량이 높은 추출물을 얻기 위한 조건은 70% 에탄올로 78°C에서 추출하는 것이 가장 바람직한 것으로 판단되었다. 또한, 총플라바놀 함량에서도 WG1이 가장 높은 것으로 나타나, 전체적으로 폴리페놀 함량이 높은 추출물을 얻기 위해서는 70% ethanol로 추출하는 것이 가장 합리적인 것으로 생각된다.

머루포도 과피의 경우 머루포도 씨 추출물과 같은 농도로 비교했을 시에는 그 농도

가 매우 낮아 함께 비교하지 않았다. 총페놀함량이 WGS1 15mg/g extract, WGS2 23mg/g extract로 78°C에서 추출했을 때 높은 것으로 나타났다.

나. DPPH free radical scavenging activity

머루포도 씨 추출물이 10분동안 DPPH 라디칼 소거하는 활성은 Figure 4-2와 같다. DPPH는 분자내 radical을 함유하고 있으며 토코페롤, 아스코르빈산, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의해 환원, radical이 소거되어 짙은 자색이 탈색되는데, 이 정도를 항산화물질의 수소공여능으로 측정하는 방법이다. 기존에 산업적으로 많이 활용되고 있는 BHT 보다도 같은 농도(1mg/ml)에서 비교했을 때 매우 우수한 라디칼 소거능을 보이고 있는 것을 알 수 있었다. 또한, 추출조건에 상관없이 머루포도씨 추출물의 활성이 80% 이상의 높은 수치를 나타내었다. DPPH 라디칼 소거능은 페놀함량이 높을수록 활성이 커지는 것으로 알려져 있는데, 본 실험에서도 총페놀함량과 총플라바놀 함량이 높을수록 라디칼 소거능이 큰 것으로 나타났다.

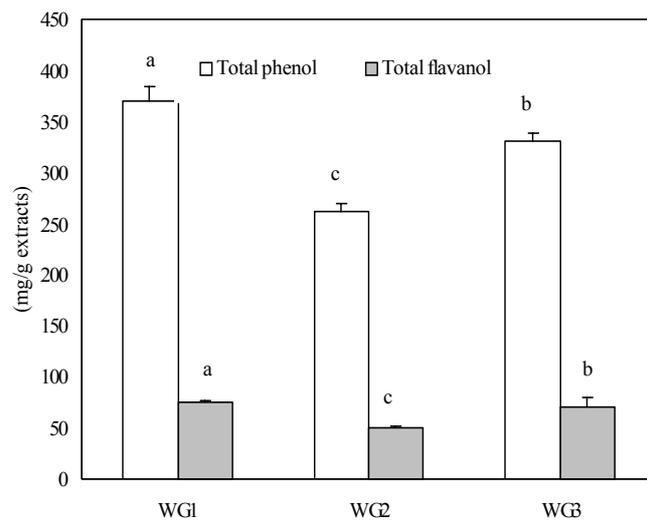


Figure 4-1. Total flavanols and phenolic acid contents of wilde grape seed extracts prepared from each extraction condition.

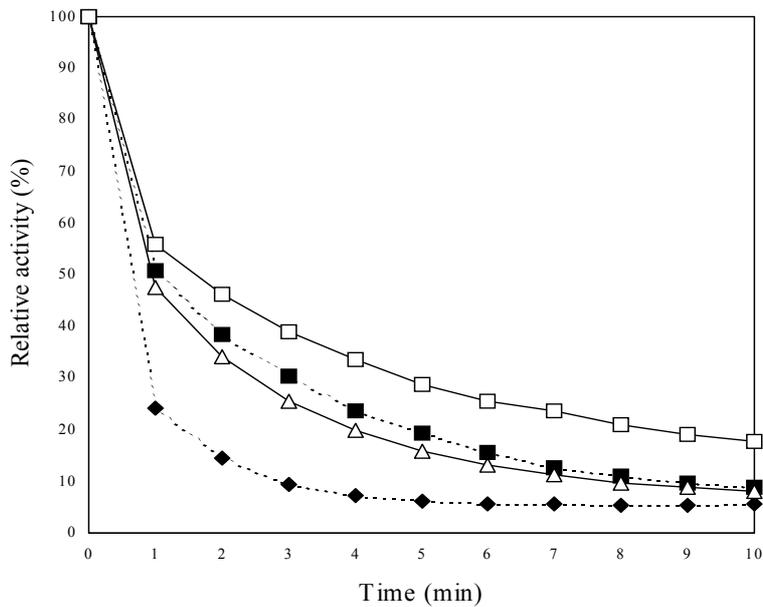


Figure 4-2. DPPH radical scavenging capacities of the grape seed extracts from various solvent.

(◆) WG1 = Wilde grape seed extract of 70% EtOH at 78°C, (△) WG2 = Wilde grape seed extract of 100% MeOH at 78°C, (■) WG3 = Wilde grape seed extract of 100% MeOH at 78°C in soxhlet. (□) BHT = Butylated hydroxytoluene

다. Hydroxyl radical scavenging activity

Hydroxyl radical 소거능은 2-deoxyribose oxidation method에 의해 측정하였다 (Figure 4-3). Hydroxyl radical은 활성산소 중에서 반응성이 강하여 생체 산화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 머루포도 씨 추출물의 hydroxyl radical 소거 활성을 측정한 결과, ethanol 보다는 methnaol 추출물의 활성이 높은 것으로 나타났고, 전체적으로 머루포도 씨 추출물이 tannic acid에 비해 유의적으로 높은 활성을 보이는 것으로 나타났다. 그러나, 머루포도 씨 추출물 간의 활성은 경미한 차이가 나타날 뿐 추출조건에 따른 유의적인 차이는 보이지 않았다. 대조군으로 사용한 ascorbic acid의 활성은 거의 나타나지 않아 비교대상에서 제외하였다.

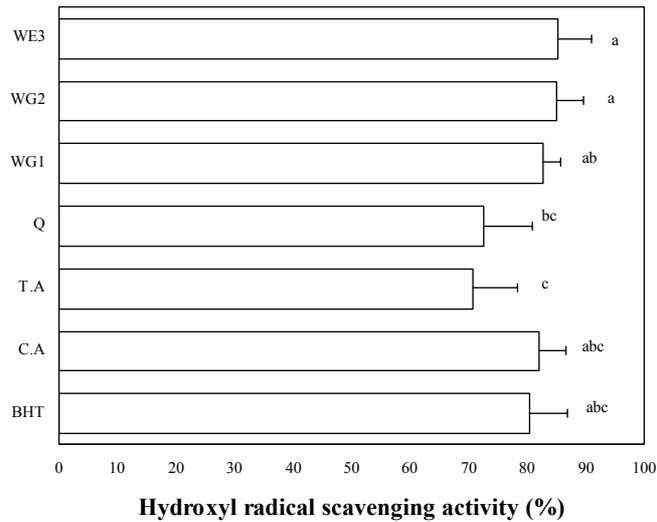


Figure 4-3. Inhibition on deoxyribose degradation of grape seed extract at different extraction condition by hydroxyl radical induced Fe^{2+} .

라. Hydrogen peroxide 소거능 측정

H_2O_2 는 과산화지질의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있으며, 과산화 지질은 동맥 경화, 뇌졸중 등과 같은 성인병의 원인이 되고, 간장의 세포막에 과산화지질을 증가시켜 세포의 기능이 저하되어 염증이 유발되며, 그 결과 간경화, 간염 등을 초래한다고 보고되고 있다. Hydrogen radical 소거활성은 SOD에 의해 생성된 과산화수소를 peroxidase를 첨가하여 물과 산소분자로 환원시켜 최종적으로 산패를 억제시켜주는 능력을 측정하는 것으로 ascorbic acid 99.2%, tannic acid 97.6%, WG1 88.2, WG2 88.4, WG3 87.8, WGS1 92.7, WGS2 93.5%로 나타났다. 추출조건에 따른 머루포도 씨 추출물 이나 과피 추출물의 유의적인 차이는 없었다. 다만, 머루씨 추출물에 비해 머루포도 과피 추출물의 활성이 높은 것으로 나타나, 과피내에 함유되어 있는 물질이 과산화 수소의 발생을 억제하는데 효과적인 것으로 사료된다.

마. ABTS 라디칼 소거능 측정

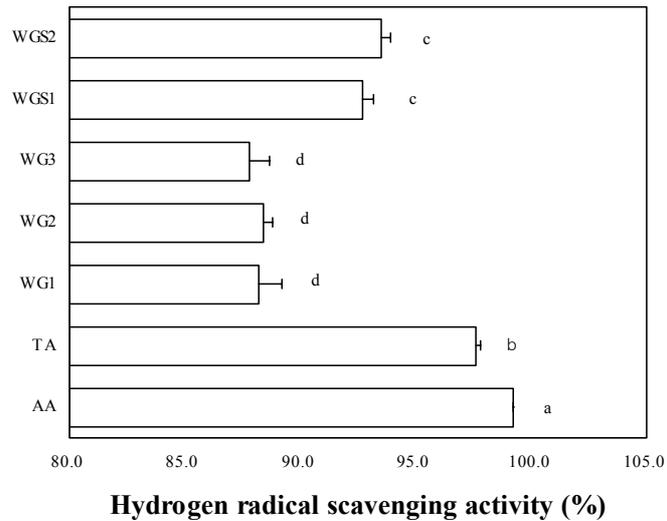


Figure 4-4. Hydrogen radical scavenging activity of extracts from different extraction condition.

ABTS free radical 소거능은 Figure 4-5에 나타내었다. 머루포도 씨와 과피 추출물의 농도는 1mg/ml 농도로 측정하였는데, 실험결과 ascorbic acid를 제외한 나머지 대조군으로 사용된 항산화제와 머루포도 씨 추출물의 라디칼 소거능은 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 머루포도 씨 추출물의 활성은 일반 항산화제와 비교해서 높은 활성을 보이고 있는 것으로 확인되었다. 머루포도 과피의 경우 78℃에서 추출했을 때 ABTS 라디칼 소거능이 높았고, 머루포도 씨에 비해 약 50% 정도의 활성을 보이는 것으로 나타났다.

바. 지방산패

Egg yolk를 기질로 하여 머루포도 씨 추출물과 과피 추출물이 지방산패를 억제하는 정도를 살펴본 결과는 Figure 4-6과 같았다. 머루포도 씨 추출물 중에서는 70% EtOH 추출물이 가장 활성이 높은 것으로 나타났고, 과피 추출물은 추출조건에 따른 유의적인 차이는 보이지 않았다. 머루포도 씨와 과피 추출물 모두 ascorbic acid에 비

해 활성이 높은 것으로 나타나 천연항산화제로써 가능성을 타진해 볼 수 있었다.

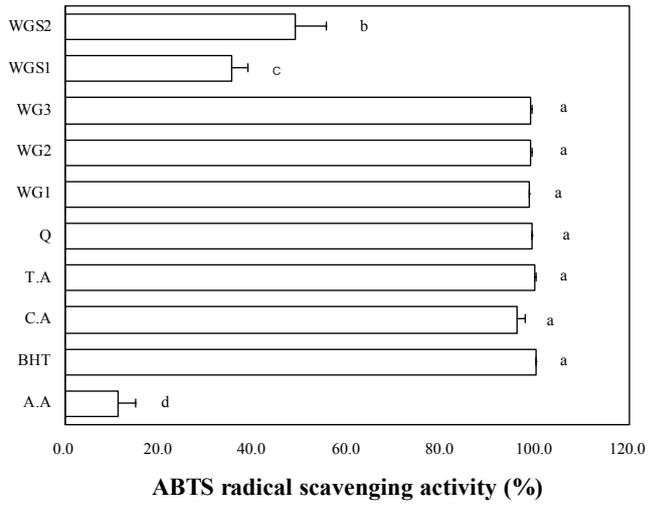


Figure 4-5. ABTS radical scavenging activity of grape seed extract at different solvent.

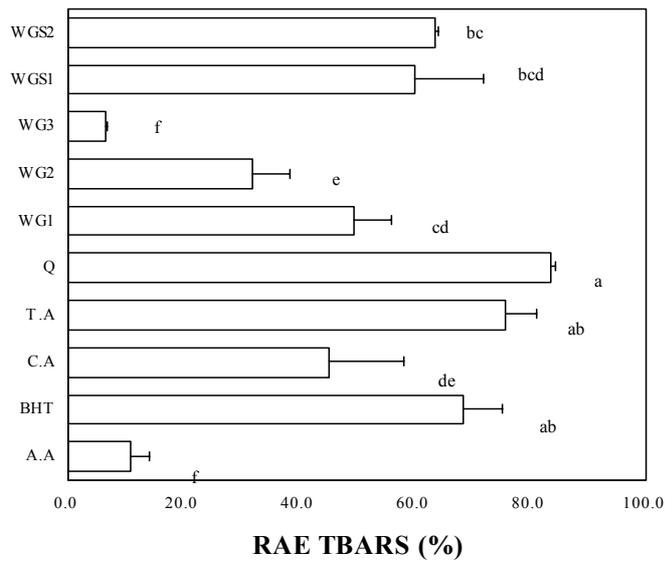


Figure 4-6. Relative TBARS of grape seed extract at different extraction condition by egg yolk peroxidation.

제 2 절 *In vivo*에서의 머루 포도씨와 과피 추출물이 apo E 결핍 마우스의 지질패턴에 미치는 영향

Apo E는 저밀도지단백(LDL) 콜레스테롤 또는 chylomicron remnant 등의 지단백을 간세포의 수용체에서 흡수하는 과정에 배위자 역할을 한다. 이러한 apo E에는 유전학적 다형성(genetic polymorphism)이 있어서 이들은 19번째 염색체의 apolipoprotein C I 과 CII에 위치한 대립유전자 E2, E3, E4의 조합에 의해 6개의 표현형을 가지고 있고, apo E의 112번째 아미노산이 cysteine이고 158번째 아미노산이 arginine이면 E3, 양쪽이 모두 arginine이면 E4, 양쪽이 모두 cysteine이면 E2가 된다. 이러한 표현형의 다양성에 의해 콜레스테롤 대사 조절에 차이가 발생하여, 특히 apo E4는 다른 유전형에 비하여 수용체에 대한 친화력이 높아 장에서 콜레스테롤 흡수를 증가시키고, 혈액 내 chylomicron remnant를 간세포 내로 더 빨리 제거한다고 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 유전적으로 apo E가 결핍되어 자연적으로 동맥경화증이 발현된 apo E^(-/-)마우스를 이용하여 머루 포도씨와 과피 추출물이 지질패턴에 어떠한 영향을 미치는지를 검토하였다.

1. 재료 및 방법

가. 재료

*In vitro*에서의 결과 머루씨는 70% EtOH를 이용 78℃에서 추출한 것과 과피는 100% EtOH를 이용 78℃에서 추출한 것을 본 *in vivo* 실험에 활용하였다.

나. 실험동물

Apo E 형질결핍 마우스는 (주) 중앙실험동물을 통해 호주 ARC사의 Apo E^(-/-) C57BL/6J를 구입하여, 10마리씩 3군으로 나누어 사육하였다. 각 군은 Control, 머루포

도 씨 추출물 공급군(WGS), 머루포도 과피 추출물 공급군(WGP)으로 나누고, 혈액 채취시 체중도 함께 측정하였다. 사료는 일반설치류 사료를 사용하였고, 물과 사료는 자유급식 하도록 하였다. 각 추출물은 25mg/day 양으로 경구투여 했다.

다. 혈청지질분석

실험직전과 실험 후 한달 마다 마우스의 안와정총맥을 통해 혈액을 취하고 EDTA가 처리된 tube에 담아 혈장을 분리해냈다. Triglyceride와 total cholesterol 농도 분석은 혈액자동분석기(Automatic Analyzer, HITACHI, Japan)를 이용하여 측정하였다.

2. 실험결과 및 고찰

실험 후 체중을 측정한 결과 실험 기간 동안 꾸준히 체중이 증가하고 있는 것을 알 수 있었다. 총콜레스테롤 농도는 실험 한 달 까지 경구투여에 상관없이 모든 군에서 상승하는 것으로 나타나 초기에는 머루포도 씨와 과피 추출물의 영향이 나타나지 않는 것으로 보였다. 그러나, 그 이후로는 머루포도 씨 추출물의 경구 투여군에서 농도가 낮아지는 경향을 나타냈다. 또한, 중성지방 농도에서도 2달 후부터 머루포도 씨 추출물 군에서 그 농도가 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 현재 경구투여 중으로 4달 이후로 계속적으로 경구투여가 이루어지면 머루포도 씨가 혈액 지질패턴에 긍정적인 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료된다.

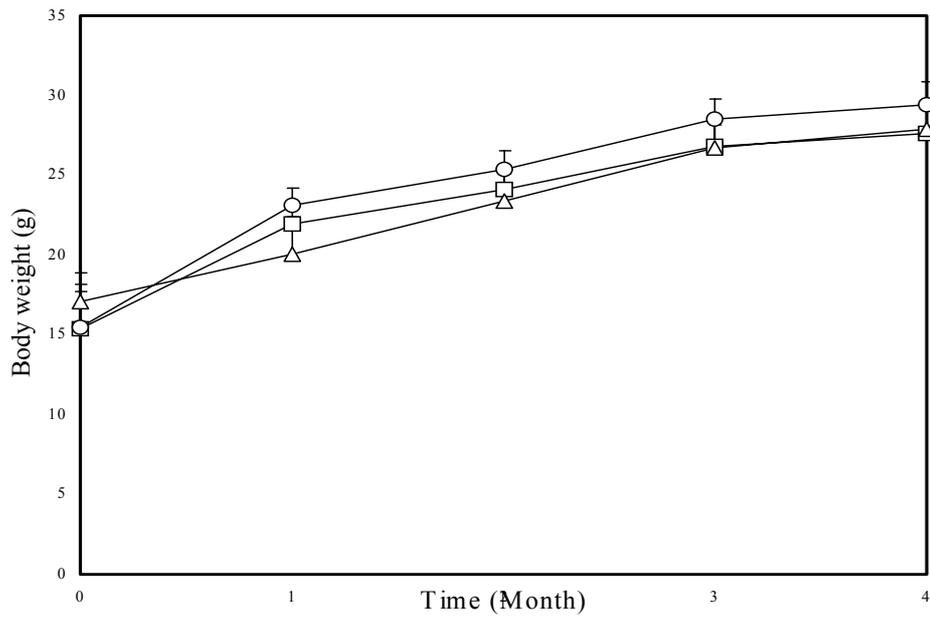


Figure 4-7. Changed of body weight during the experimental periods.

(□) WGP = wilde grape peel extract , (△) WGS = wilde grape seed extract (○)

C = Control

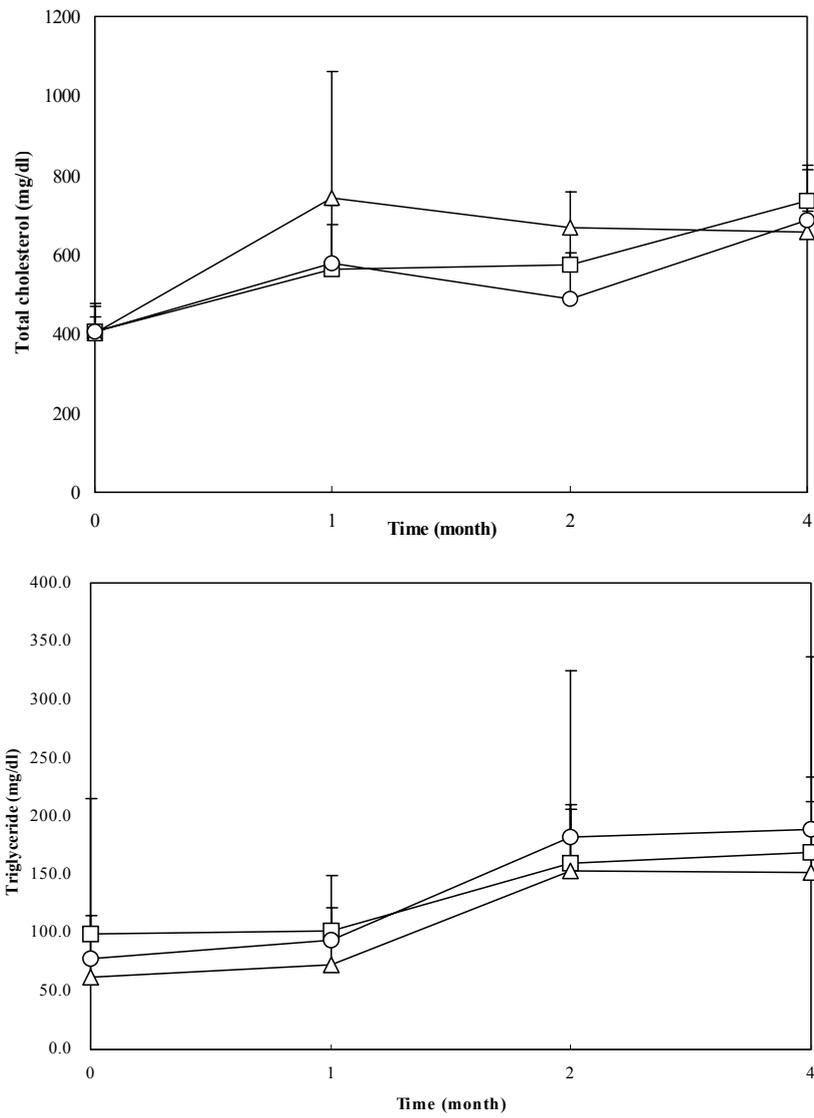


Figure 4-8. Total cholesterol and triglyceride levels in plasma of apo E^(-/-) mice.
 (□) WGP = wilde grape peel extract , (△) WGS = wilde grape seed extract (○)
 C = Control

제 5 장 농산부산물인 포도씨를 이용한 기능성 제품 개발

제 1절 포도씨유의 Encapsulation 및 분말화

1. 실험방법

가. 포도씨 기름의 캡슐화

압착법으로 추출한 포도씨 기름을 공업적 정제과정 즉, 탈검은 수화법으로, 탈산은 수산화나트륨으로 탈색은 가열탈색법, 탈취는 진공탈취로 실시하여 시료로 하였고, 캡슐은 공장에서 1% tocopherol를 첨가하여 시제품으로 생산하였다.

나. 포도씨 기름의 분말화

전체 고형분의 1.5배수의 정제수를 60℃까지 가온하여 제2인산칼륨, 카제이나트륨 용해하였다. 여기에 아라비아검을 용해한다. 이때, 아라비아검은 일반 정제수에 용해는 되지만 자체내의 결합력으로 쉽게 용해되지 않기 때문에 저감미당에 그 입자를 최대한 분산시킨 후에 용해시킨다. 포도씨오일에 지방산 모노글리세리드, 레시틴을 넣고 65℃까지 가온하였다. Homomixer에 친수성 물질과 친유성 물질을 투입하고, 6000rpm으로 교반하면서 토코페롤을 투입하였다. 토코페롤은 최종 제품이 나온후에 포도씨오일의 산패방지를 위해 사용하였다. Homomixer에서 30분간 교반된 원액의 입자를 더욱 균일하게 분산시키기 위해 Homogenizer(균질기)를 이용하여 150kg/cm²의 압력으로 2차 유화를 안정화 시켰다. 이렇게 조제된 분무원액을 분무건조기를 이용하여 분말화 하였다.

Table 5-1. The experimental condition of spray dryer.

	Inlet Temp	Outlet Temp	Pressure	Feed rate	Atomized Speed
Condition	180°C	98°C	95 mmH ₂ O	40ml/min	15,000 RPM

Table 5-2. Ingredient and ratio of emulsified grape seed oil.

Ingredient	Ratio
Grape seed oil	35%
Sorbitol	50%
Mono Glyceride	8%
Sodium diphosphate	1.2%
Sodium Silco Aluminate	2%
Lecithin	3.8%

2. 결과

포도씨 기름을 건강 보조식품으로 이용하고자 압착법으로 추출한 기름을 식품규격에 맞춰 공업적 정제를 하고 연질캡슐에 tocopherol 0.1%를 첨가하여 1g단위로 하루 5g을 섭취할 수 있도록 설계 시제품을 생산하여 시장성을 분석 보급하고자 하였다.

포도씨 기름 분말화는 생산예정량 48.3kg에서 38kg 생산 (수율 78.7%)을 하였다. 본 연구에서의 수율저하의 원인으로는 현장기계의 용량에 비해 생산투입량이 적었고, 기계적인 LOSS로 사료된다. 또한, 완제품의 지방이 많고 비중이 낮아 가볍고 정전기발생이 있어 건조기 기벽에 잔존되어 있는 것으로 생각되며, 1톤이상 작업시 정상적으로 생산될 것으로 예상되었다. Encapsulation에 실패했던 사례들은 다음과 같았다.

- ① 폴리소르베이트와 자당지방산에스테르, 스테아릴 젯산나트륨을 이용하여 실험하였으나 분말화에 성공했을 뿐, emulsion과 encapsulation에는 성공하지 못하였다.
- ② 처음 실험했던 원료인 저감미당을 텍스트린과 썬캡에 각각 100%, 50%로 대체하

여 실험하였으나 이 역시 분말화에 성공했을 뿐, emulsion과 encapsulation에는 성공하지 못하였다.

- ③ 기존배합에서 폴리소르베이트와 자당지방산에스테르, 스테아릴젓산나트륨을 제외하고 새로운 유화제로 대두레시틴을 산패 방지제로 토크페롤을 사용하여 실험하였으나, 그 사용함량이 맞지 않아 실험에 실패하였다.
- ④ 위의 실패했던 사례들을 개선하여 포도씨 기름 70% encapsulation 성공하였으나 그 이상의 성공을 기대하여 포도씨 기름 80%를 encapsulation하는 실험을 계속하였지만 70% 이상의 성공은 기대할 수 없었다.

또한, 포도씨 기름의 분말을 이용하여 설탕과 연유의 함량을 조절하여 농도를 맞추고 포도씨 분말기름의 유화성을 최소화시켜 음료로 개발하고자 했는데, 그 결과는 다음과 같다.

Table 5-3. The combination of grape seed oil powder using drink.

Type 1			Type 2		
Ingredient	(%)	Note	Ingredient	(%)	Note
Grape seed oil powder	3.0		Grape seed oil powder	1.5	
Sugar	9.5		Sugar	9.1	
Condensed milk	4.0	3 fold condensed milk	Condensed milk	1.5	3 fold condensed milk
Fiberon kr	1.5		Fuberon kr	0.5	
Carageenan	0.018		Carageenan	0.018	
Salt	0.02		Salt	0.035	
Flavor	0.13		Flavor	0.25	
Addition	0.472		Addition	0.997	
Refine water	81.46		Refine water	86.20	

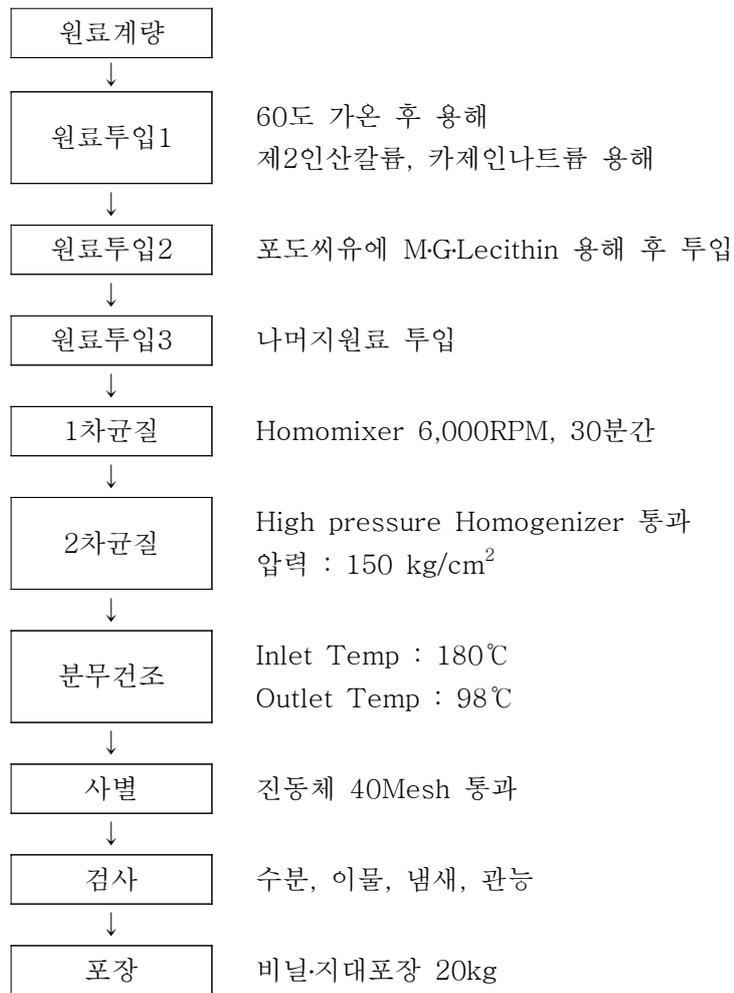


Figure 5-1. The procedure of raw material processing.

유화제품임으로 연유를 첨가하여 milky 형태로 음료를 제조한 결과 Type 1에서는 설탕과 연유의 함량을 높여 농도를 진하게 하여 포도씨 분말기름의 유화성을 최소화시켜 맛을 새롭게 하고자 하였다. Type 2는 포도씨 분말기름의 제품성을 강조하기 위해 Type 1보다 설탕과 연유의 함량을 상대적으로 적게 배합하였다. 기존 음료 제품과 유

사하고 유화안정성을 유지하고 식이섬유의 일종인 fiberon kr을 첨가시키고 안정제인 카라기난과 식염 그리고 포도향을 첨가하였으며, 기타첨가물로는 xantin Gum류, 글루코만난, 모노솔 등을 첨가하였다. 이때 유화음료의 특징을 부여하기 위해 식이섬유류와 안정제를 사용하면 더욱 좋은 제품을 생산할 수 있는 것으로 판단되었다.



Figure 5-2. Capsules of grape seed oil and grape seed extract.



Figure 5-3. Grape seed oil powder.

제 2 절 포도씨 기름 화장품과 비누제조

1. 실험 재료 및 방법

가. 화장품 제조

화장품은 사용부위, 형상, 사용목적에 따라 분류되는데 기술적 특징에 따라 유화제품, 가용화 제품, 분산제품 등으로 구분한다. 화장품 제조는 분산, 유화, 가용화, 혼합, 분쇄공정으로 반제품이 제조되고 성형 및 포장공정으로 완제품을 생산하여 제품의 특성에 따라 각 공정을 생략하기도 한다. 이제 포도씨 기름을 화장품으로 사용하기 위하여 유화제품인 크림, 로션, 가용화 제품인 스킨로션, 에센스 등으로 제품은 제조하였다. 유화제품의 제조공정은 정제수와 1,2차 유화를 실시하여 수상의 상태로 하였다.

이때 보습제를 첨가하고 3분 동안 3600rpm에서 유화시키고 점증제와 중화제 그리고 완충제를 첨가하여 70-80℃에서 탈기 가열한 후 여과하고 다시 유지와 왁스 에스테르 등을 첨가 한 후 냉각하여 유상으로 한 후 고급알콜, 에스테르, 탄화수소 등과 유화제 산화 방지제를 첨가하여 안정화시킨 다음 추출물과 향료 등을 첨가 일정용기에 충전하였다. 포도씨 기름의 첨가는 유상 상태로 유화 시킬 때 밀크크림에는 3.5% 영양크림에는 5%, 마사지 크림에는 9.5%, 바디오일에는 10% 첨가하여 시제품을 제조하였다. 가용화 제품은 정제수와 보습제, 중화제 등을 용해 혼합시켜 가용화 시킨 후 금속이 온 봉쇄제와 기타 첨가제 등을 혼합하여 에탄올로 다시 가용화 시킨 후 유연제, 산화방지제 향료, 색소 등을 넣고 여과 한 후 충전하였다. 시제품에 사용한 가용화 제품인 에센스 제조에 포도씨 기름을 5.5% 사용하였으며 화장품 제조에서 사용한 각종 물질로 표시 성분은 methylparaben, propyl paraben, pheroxyl ethanol 등이었다.

나. 비누제조

비누제조는 실험실에서 일반법에 따라 경성비누를 제조하였다. 비누는 일반법에 따

라 포도씨 기름 200g에 유지 25.2%를 증류수 66 ml와 혼합하고 45-55℃에서 30분 정도 녹혀 결합을 형성시킨 다음 방냉 후 수욕조에서 60℃로 가온하여 색소 및 향료를 혼합하고 정형하여 건조 시켰다. 비누의 물리화학적 성질로 표면장력은 표면장력측정기를 이용 25℃에서 농도 0.1%로 측정하였고 세정력은 Tergotometer로 물 1L에 비누 2g을 넣고 우지와 돈지를 묻힌 시료를 10분 정도 교반하여 측정하였다.

2. 결과 및 고찰

포도씨 기름의 첨가는 유상 상태로 유화 시킬 때 밀크크림에는 3.5% 영양크림에는 5%, 마사지 크림에는 9.5%, 바디오일에는 10%를 첨가하여 시제품을 제조하였다. 가용화 제품은 정제수와 보습제, 중화제 등을 용해 혼합시켜 가용화 시킨 후 금속이 봉쇄제와 기타 첨가제 등을 혼합하여 에탄올로 다시 가용화 시킨 후 유연제, 산화방지제 향료, 색소 등을 넣고 여과 한 후 충전하였다. 비누는 연성, 경성, 계면활성 등이 있는데 실험에서는 경성비누로 제조한 결과 비누와 값(유지 1g당 NaOH 0.126)에 따른 NaOH 양을 약 25g으로 했을 때 건조 시 비누가 완전히 굳어지지 않고 약간 무른 현상이 나타났으며 NaOH가 완전히 반응하기 전에 유지와 혼합하여 건조시키고 결과 건조 후 향, 색소가 모두 분리되는 현상을 보였다. 색소, 향을 분리되지 않고 섞이게 하기 위해 여러 가지 방법으로 실험한 결과 NaOH와 반응이 완전히 끝난 후 유지와 혼합하여 결합이 끝난 것을 water bath에서 고온으로 녹여 비누소지에 향료, 색소를 첨가하는 것이 좋았다. 실험에서 제조한 경성비누는 SY RED Color No.50의 적색색소로 포도씨 기름임을 표시하였고, 포도냄새와 같은 Muscat flavor N-266을 사용하였다. 색과 향의 첨가에 따라 굳기가 달라지는데 색과 향이 들어가면 단단하던 것들이 많이 유연해져 Hardness는 가성소다와 중탕에 의한 차이로 생겼다. 비누를 만든 다음에 1주일 정도가 지난 pH를 측정하여 pH가 중성이 가깝도록 중화제를 가하여 사용한 결과 pH 7-8정도가 가장 적당하였다. 포도씨 기름 비누의 물리화학적 평가에서 표면장력은 41.5, 31.5로 비슷하였고, 세정력은 sample 1이 약간 떨어지는 경향이었으나 별 차이는 없는 것으로 판단되었다.

Tabel 5-4. Analysis of grape seed oil soap.

Sample	Moisture	Free fatty acid	Petroleum ether-soluble ingredient
1	15.4	0.15	0.04
2	16.2	0.17	0.45

Table 5-5. Physical-chemical assesment of grape seed oil soap.

	Surface tension (dyne/cm)	Washing ability	
		beef tallow	lard oil
Commercial soap	32.0	4.7	4.8
Sample 1	41.0	3.8	3.9
Sample 2	31.5	4.5	4.6

Sample 1= soda 27g/200g grape seed oil

Sample 2= soda 30g/200g grape seed oil

이상의 결과 포도씨 기름의 비누는 비누량, 거품정도, 세정력 등이 좋은 결과를 나타내었으며 피부보습효과가 뛰어났고 피부염 등의 부작용은 5% 이내 외로 적은편 이었다. 또한 행굼성, 기포성 향기 등에서도 시중비누에 비교해 어느 정도 효과가 있었으며 표면장력과 세정력은 비슷하였다.



Figure 5-4. Cosmetic contained grape seed oil.



Figure 5-5. Soap contained grape seed oil.

제 3절 포도씨의 음료화 및 응용

1. 실험재료 및 방법

가. 실험재료

1) 포도씨 볶음차 제조

포도씨를 식용음료로 개발하기 위하여 볶음 정도에 따른 색도 변화를 hunter 색차계(Minolta co. Japan)을 이용하여 측정하였다. 시료는 성숙된 캠베일리 포도 품종을 구입 과육과 과즙 그리고 껍질을 다용도로 이용한 후 중량의 15%정도인 포도씨를 정선하여 2번 물로 세척하여 수분함량 15%정도로 건조하여 사용하였다. 볶음 처리는 건조시킨 씨를 개방상태에서 약 100℃ 온도에서 각 시간별로 처리하여 색도의 변화를 관찰하였고 식용차류로 색도변화를 각 시간별로 처리 한 재료를 1ℓ 당 20g을 기준으로 5분, 10분, 15분, 20분, 30분 가열하여 측정하였다.

2) 포도씨 볶음차 추출물의 혼합음료

실험에 사용한 혼합음료는 오미자와 석류 농축액이다. 실험에서 오가피 추출액은 오가피 줄기와 뿌리, 양배추를 30:20:15 비율로 10배액으로 98-100℃에서 3시간 추출한 것을 이용하였고, 석류 농축액은 이란산 65Brix 제품을 5%로 희석하였으며 포도씨물 추출물은 20배액으로 98-100℃에서 2시간 추출한 것을 이용하였고, Type 에 따라 약간의 수용성 비타민, 타우린, 스테비텐 등을 첨가할 수 있도록 실험하였다. (Table 5-6)

2. 실험결과 및 고찰

가. 색도변화

1) 볶음 처리 포도씨의 색도

건조상태의 포도씨는 옅은 갈색으로 고유한 색도를 나타내었는데 이때의 L.a.b 값은 112.69,-1.75,7.46 이었다. 처리 구에서는 L값이 급격하게 낮아져 5분 처리구에서는 24.66을 나타내었고 그 이상 처리구에서는 14.59~14.89이었으며 특이한 것은 30분 처리구에서는 상대적으로 L값이 약간 높아 15.65를 나타내었다. a값은 무처리구가 -1.75이었으나 5분 처리구 4.38, 10분 처리구 2.73, 15분 처리구 -0.67, 20분 처리구 -0.96, 30분 처리구 -1.40으로 초기에는 높은 값을 나타냈다. 점차적으로 무처리구에 가까운 색도를 나타내는 것으로 밝혀졌으며 b 값은 무처리구가 7.46 이었는데 5분 처리구는 10.20으로 약간 높아졌으며 15분 처리구에서는 7.37로 무처리와 비슷하였다가 처리시간이 경과함에 따라 4.89~4.66으로 낮아지는 경향이였다. 이러한 경향은 갈색의 고유색을 지닌 포도가 가열 볶음에 의해 밝은 정도는 갈변으로 탄화 현상을 나타내는 것이었으며 a.b 값도 이와 비슷한 변화를 나타내어 천연의 색을 유지 시킬수 있는 볶음 처리 시간은 10분 정도 인 것이 적당한 것으로 판단되었다.

Table 5-6 . The combination ratio of ogapi and seukryu drink.

Type I			Type II		
Ingredient	(%)	Note	Ingredient	(%)	Note
Seukryu extract	5.0	65Brix	Seukryu extract	5.0	65Brix
Ogapi extract	13.0	Solid 1% ↑	Ogapi extract	83.13	
Grape seed water extract	2		Grape seed water extract	5	
Citric acid	0.37		Citric acid	0.25	
Sodium citrate	0.13		Sodium citrate	0.12	
Maric acid	0.07		Maric acid	0	
Vitamin C	0.2		Vitamin C	0.2	
Vitamin B1	0.02		Vitamin B	0.02	
Saccharide	13.0	fructose 3, honey 6, sugar 4	Saccharide	11.0	fructose 4, honey 4, sugar 3
Taurine	0.03		Taurine	0.03	
Natural red pigment	0.03~0.07		Natural red pigment	0.05	
Refine water	67~68				

Table 5-7. Chromaticity change by roasted treatment of grape seed.

	0min	5min	10min	15min	20min	30min
L	112.69	24.66	14.89	14.93	14.58	15.65
a	-1.75	4.38	2.73	-0.67	-0.69	-1.10
b	7.46	10.20	7.37	4.89	4.66	4.88

2) 볶음처리 포도씨의 음료화를 위한 색도 변화측정

포도씨를 식음료로 이용하기 위한 방법으로 가열후의 1ℓ에 20g을 기준으로 시간별로 볶음 처리 후 다시 시간별로 가열하여 추출한 포도씨 추출물의 색도변화를 측정하였다. 5분 볶음구는 L값이 초기 24.66에서 5분 가열 하였을때 30.20이었고 10분, 15분, 20분에서는 27정도로 안정성이 있었고 30분 가열 하였을때 21.17로 낮게 나타났으며 a값은 초기 4.38에서 5~20분간 처리구에서는 낮아졌다. 30분처리에서 무처리 구와 비슷하였으며 b값도 비슷한 경향이였다. 5분 처리구에서는 20분 가열이 L.a.b값이 27.20, 0.26, 10.71fh 가장 적당한 가열시간으로 나타났다. 10분 볶음 구에서 초기 L값이 14.89이었으나 가열 시간이 경과되면서 29.25부터 21.54로 5분 가열 하였을때 약간 높아지다 서서히 비슷한 값을 나타내었으며 a값은 점차 감소되는 경향이였고 b값은 5분 가열에서 약간 증가하였다가 10분, 15분 가열에서 낮아지다 20분, 30분 처리에서는 다시 약간 증가하였다. 15분, 20분 볶음구도 약간의 차이는 있으나 10분 볶음구와 비슷한 경향의 색도 변화를 나타내었으며 30분 볶음구에서는 초기 L값이 15.65 a값이 -1.40, b값이 4.84 이었으나 이 L 값은 5분 가열 하였을때 24.36이었으며 가열시간에 따른 L값 변화는 거의 없는 것으로 나타났으며 a.b 값도 비슷한 경향이였다. 이상의 가열에 따른 색도 변화는 측정한 결과 음료로서 포도씨의 볶음 처리 후 용출을 위한 가열 시간을 색도의 의해 선택하면 5~10분 볶음 처리가 가장 좋은 색도를 유지하며 가열 시간은 10~20분으로 추정 할 수 있었다. 이를 바탕으로 대구소재 삼원 식품과 태평양 실업에서 포도씨를 이용한 음용식수로 상업성을 고려 할 수 있는 조건으로 제시하여 시제품을 제작하였으며 앞으로 용출 음용식수의 향미생물성과 유효성분의 용

출정도를 계획 연구하고자 한다.

또한, 최적조건은 Table 5-6과 같이 오가피 추출액의 사용량에 따라 Type 2으로 제조하였을 때 Type 1은 석류 음료의 특징을 살리고 오가피와 포도씨물 추출물의 기능성을 강조하기 위하여 설계 첨가하였고, Type II 에서는 오가피 추출액으로 오가피음료의 조건에 석류농축액과 포도씨물 추출물을 첨가하였을 때 각 특성에 맞는 상품성이 인정되어 오가피, 석류 음료에 볶음 포도씨물 추출물을 첨가 이용할 수 있음을 입증하였다.

Table 5-8. Chromaticity change by roasting grape seed water extract.

		0	5	10	15	20	30
5 min	L	24.66	30.20	24.40	27.18	27.20	21.17
	a	4.38	-0.27	-0.10	-0.74	0.26	3.18
	b	10.20	6.24	6.91	6.35	10.71	8.67
10 min	L	14.89	29.25	24.37	22.94	22.19	21.54
	a	2.73	0.51	-0.07	-0.84	-0.28	-0.28
	b	7.37	8.36	4.76	3.16	5.01	5.68
15 min	L	14.73	24.52	25.01	23.35	23.83	23.82
	a	-0.67	0.44	-0.80	-0.90	-0.57	-0.68
	b	4.89	3.47	3.38	2.85	4.34	4.56
20 min	L	14.58	26.89	26.31	24.72	23.79	25.48
	a	-0.96	-1.24	-1.01	-1.12	-0.84	-0.71
	b	4.66	2.48	3.04	2.54	3.79	4.11
30 min	L	15.65	24.36	25.42	24.25	24.08	24.86
	a	-1.40	-0.99	-0.99	-0.16	-0.5	-0.74
	b	4.84	3.25	3.45	3.18	4.57	4.44



Figure 5-6. Grape seed tea.



Figure 5-7. Compare of general grape seed(left) and grape seed tea(right).



Figure 5-8. Prototyping of grape seed tea.

제 4절 포도씨 가루를 이용한 제빵 특성

1. 재료 및 방법

가. 포도씨 가루

포도씨를 수분함량 14%이하로 건조하여 1차 Roll Crusher로 조분쇄 한 후 2차 Hamer mill로 미분쇄 하여 60-80mesh로 가루를 내어 제빵에 첨가 원료로 사용하였다.

나. 원료배합

제빵에 사용한 원료 배합비는 Table 5-9와 같다. 표준빵은 직접반죽법(AACC 10-10A)을 변경하여 30℃에서 1차 발효를 그리고 38℃에서 Proofing을 실시하였다. 밀가루에 건조재료를 첨가한 후 호바트 형 믹서(Hobart co. USA)를 이용하여 60rpm에서 5분간 예비 혼합한 다음 물에 용해시킨 이스트와 쇼트닝을 제외한 모든 재료를 넣고 80rpm에서 clean-up 단계까지 혼합하였다. clean-up 단계에서 쇼트닝을 첨가한 후 3분간 60rpm에서 혼합한 다음 80rpm에서 final gluten development 단계까지 혼합하였다. 빵의 부피는 빵을 오븐에서 꺼낸 후 빵의 내부온도가 40℃에 도달 할 때까지 실온에서 냉각시킨 후 종자 치환법으로 측정하였고 빵의 외관 및 내상을 조사하였다. 모든 결과는 적어도 3번 이상 반복하여 측정된 값의 평균값으로 나타내었다.

Table 5-9. Baking Formula(% based on flour weight).

Ingredients	Grape Fruit Powder(%)				
	0	1	1.5	2	3
flour	100	100	100	100	100
water	63	63	63	63	63
yeast	3	3	3	3	3
salt	2	2	2	2	2
sugar	5	5	5	5	5
shortening	5	5	5	5	5

다. 반죽의 물리적 특성

밀가루의 파리노그래프와 익스텐소그래프는 AACC방법에 따라 분석하였다. 파리노그래프는 300g용 mixing bowl을 사용하여 반죽의 굳기가 500 B.U에 도달하도록 물을 가하고 여러 측정치를 시간 또는 B.U로 표시하였다. 익스텐소 그래프는 2%의 소금을 첨가하고 반죽을 3분간 1차 혼합하고 5분간 resting 시킨 다음 다시 2분간 혼합하면서 커브의 중앙이 500B.U에 도달하도록 필요에 따라 흡수량을 조절하였다. 반죽(150g)을 익스텐소그래프 라운더에서 20번 정도 처리한 후 30℃의 발효 캐비닛에 넣어 45분간 방치 시킨 후 1차 측정을 하고 다시 45분간 방치하여 2차 측정을 하였다. 그리고 마지막으로 45분간 방치한 후 3차 측정을 실시하였다. 익스텐소 그램에서 저항도는 5cm에서의 높이를 B.U로 신장도는 거리를 cm로 나타내었다. 시료의 호화양상은 Brabender Visco/amylograph(Brabender co.)를 이용하여 AACC의 방법으로 그 특성치를 분석하였다. 시료(14% 건량기준)를 증류수와 잘 혼합한 다음 30℃에서 95℃로 1분간 1.5℃씩 승온 시키고 95℃에서 15분간 유지시킨 다음 다시 1분당 1.5℃속도로 50℃까지 냉각시키면서 점도 변화를 측정하였다. 아밀로그람으로부터 호화개시온도(℃), 최고점도, 95℃에서의 점도 및 95℃에서 15분 후의 점도를 구하였다. 호화개시온도는 초기 점도가 10 B.U에 도달하는 온도로 나타내었다. 점도 붕괴도는 최고점도와 15분 후의 점도차이로 부터, setback은 냉각점도(50℃에서 점도)와 95℃에서의 점도차이로 부터 구하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 첨가량을 달리한 포도씨 가루의 파리노그래프 분석

포도씨 가루를 1%, 1.5%, 2%, 3%로 첨가하여 500B.U 도달 하였을때 흡수량, 도달 시간 및 안정성 유지 시간 등을 조사한 결과는 Table 5-10과 같이 대조구에 비교해 상대적인 값이 낮게 나타났지만 1.5% 첨가 까지가 비교적 첨가 할 수 있는 값으로 나타났다.

Table 5-10. The Effect of grape fruit seed powder on Farinogram Characteristics

	control	1%	1.5%	2%	3%
absorption(%)	67.6	66.7	66.0	65.8	65.5
peak time(min.)	3	2	2.5	2.0	2.0
stability(min.)	12	4	4	3.5	3.5
MTI(B.U)	20	70	90	90	90
arrival time (min.)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Departure Time (min.)	13.5	5.5	5.5	4.5	4.5
Degree of Softening(B.U)	7.	105	115	115	115

나. 첨가 포도씨 가루의 익스텐소 그래프 비교

포도씨 가루를 첨가하여 저항력과 팽창력을 45분, 90분, 135분으로 측정한 결과는 Table 5-11과 같이 저항력은 45분에서 표준구 108B.U에 비해 약 3배 정도인 340-390B.U로 나타났으며 90분에서는 표준구가 330B.U 이었으나 첨가구에서는 1%가 585B.U 정도로 비교적 비슷한 값이 나타내었으나 1.5%이상 첨가구에서는 700B.U 정도의 저항력을 나타냈었고 135분에서는 표준구는 변화가 없이 330B.U이었으나 대조구는 상대적으로 높게 나타났다. 그리고 3% 첨가구 에서는 저항력이 상대적으로 적은 값으로 유지되는 것이 특징이었다.

팽창력은 표준구가 45분에서 20.6B.U 이었으나 대조구들은 15B.U 정도는 약간 낮게 나타났지만 90분,135분에서는 표준구에 비교해 상대적으로 낮은 값을 나타내었는데 이는 밀가루와의 혼합에서 포도씨 가루의 흡습력, 식이 섬유 물질의 혼입에 의한 팽창력의 감소를 의미하는 것으로 hard류의 제빵에서는 좋은 Texture를 형성시킬 수 있는 요인으로 작용 할 것으로 생각된다.

Table 5-11. The Effect of grape fruit seed powder on Extensogram Characteristics

Grape Fruit Powder(%)	Resistance(B.U)			Extensibility(Cm)		
	45	90	135	45	90	135
0	108	330	330	20.6	20.4	17.3
1	340	585	620	15.4	9.1	7.9
1.5	385	705	775	15.0	9.1	7.9
2	395	715	775	15.0	8.4	7.4
3	390	700	720	15.4	8.4	7.3

다. 첨가 포도씨 가루의 아밀로그람 비교

시료의 호화양상을 비교하기 위하여 dough를 30℃에서 95℃까지 1분간 1.5℃ 씩 상승시키고 95℃에서 15분간 유지 후 1분당 1.5℃씩 하강시켜 50℃까지 냉각한 후 점도를 측정된 결과는 Table 5-12와 같다. 호화 개시 온도는 초기 점도가 10B.U 일 때 표준구가 77.5℃를 나타내었고 첨가구는 71.5-75℃로 비교적 비슷한 온도에서 호화가 이루어 졌으며 최고점도는 표준구가 720B.U이었으나 첨가량이 많을수록 620-560B.U로 점차 낮아지는 경향이였다. 또한 95℃에서 15분간 정치후의 점도는 표준구가 460B.U인 반면에 첨가량에 따라 350-300B.U로 낮아지는 경향을 나타내었다. 50℃로 냉각후의 점도는 표준구가 940B.U인 반면 첨가구는 760-660으로 같은 방향으로 낮아지는 경향이였다. 점도 붕괴도는 같은 경향으로 낮아지는 경향이였다. 점도 붕괴도는 별 차이가 없이 260-270B.U를 나타냈으며 setback은 표준구가 480B.U 이었으며 1-2% 첨가구는 400B.U을 나타내었고 3%첨가구에서 360B.U를 나타내었다. 이러한 결과로 보아 제빵에서 포도씨 가루를 첨가 할 수 있는 양은 최대 2%정도가 가장 적당한 것으로 나타났다.

Table 5-12. The Effect of grape fruit seed powder on Amylogram Characteristics

Characteristics	Grape Fruit Powder(%)				
	0	1	1.5	2	3
Gelatinization Temperature (°C)	77.5	75.0	73.0	72.0	71.5
Max. Viscosity (B,U) (A)	720	620	600	590	560
Viscosity at 95°C after 15 min (B)	460	350	340	320	300
Viscosity at 50°C (C)	940	760	740	720	660
Break down A-B	260	270	260	270	260
Setback C-B	480	410	400	400	360

라. 제빵

예비시험으로 비율별로 포도씨 가루를 첨가하여 제빵을 실시하여 빵의 부피를 측정 한 결과는 Table 5-13과 같이 표준구는 127(inch³/g)을 나타내었으며 첨가구는 112-100으로 나타났다.

이상의 결과 기능성 물질을 함유한 포도씨 가루를 제빵에 이용하기 위한 조건으로 복합분의 증량 첨가 보다는 포도씨 가루의 탄닌, 카테킨류, 식이섬유 기타 기능성 물질을 이용하기 위한 방법으로 하는 것이 바람직하며 제빵 적성 실험과 부피 측정 결과 개량제조의 활용이 기대되고 첨가량은 1.5%-2%가 가장 적합한 것으로 나타났다. 추후 제빵 적성에서 좀 더 많은 연구가 진행되어 식용화 할 수 있는 방법을 모색해야 될 것으로 생각되었다.

Table 5-13. The Effect of grape fruit seed powder on Specific Loaf Volume of White Pan Bread(inch³/g)

	Grape Fruit Powder(%)				
	0	1	1.5	2	3
Loaf Volume	127	112	110	108	100

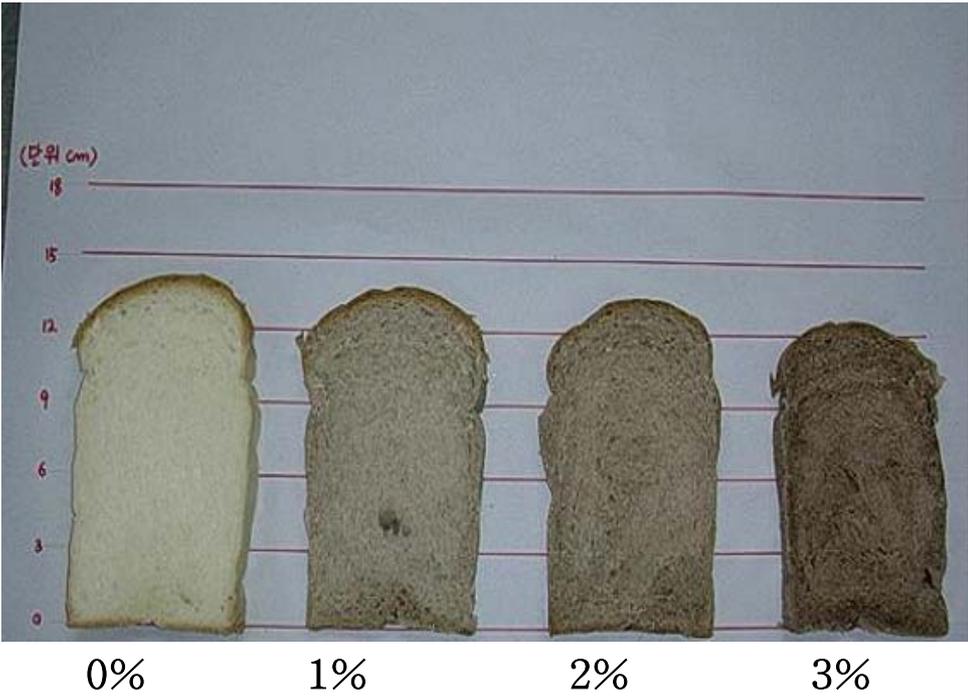


Figure 5-9. A cross-sectional view of grape seed powder bread.

제 6 장 참고문헌

1. A.O.A.C : Official Method of Analysis, 15th ed., Washintom D.C (1990)
2. Alessandro S, Raffaele A., Beatrice, F., Alma, B., Federica, I.W. Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative. DNA damage. Mutation Research 496: 171-180 (2001)
3. An BJ, Bae MJ, Choi C. Inhibitory effect of flavan 3-ols isolated from Oolong tea on xanthine oxidase. Korean J. Food Sci. Technol. 28(6):1084-1088 (1996)
4. Angela A, Barroso T and Mourafe JA. Grapefrut seed oil sterols. JAOCS, 86-86 (1971)
5. Ariga T. Antioxidative functions. Preventive action toward disease and utilization of proanthocyanidins. 日本油化學會誌 48: 1087-1096 (1999)
6. Ariga T, Hamano M. Radical scavenging action and its mode in procyanidin B-1 and B-3 from azuki beans to peroxy radical, Agricultural and biological chemistry 54: 2499-2508 (1990)
7. ASAE Year Book. 1983. ASAE Standard S368.1 : 332-335.
8. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 26: 1199-1204 (1954)
9. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. Methods in Enzymology 52: 302-306. 1978
10. Castillo J, Benavente Garcfa O, Lorente, J, Alcaraz M, Redondo A, Ortuno A, DelRio J. Antioxidant activity and radioprotective effect against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavan 3-ols(procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*) Comparative study versus other phenolic and organic compounds. J. Agric. Food Chem. 48: 1738-1745 (2000)

11. Chang YE, Chung HK, Chang NS, Lee HS. The effects of dietary protein and calcium levels on calcium and bone metabolism in growing rats. *Korean J Nutrition* 30(3): 266-276, 1997
12. Chang HW. Platelet activating factor (PAF), *Biochem.* 5: 33-239 (1992)
13. Chen P and Fridley RB. 1972. Analytical method for determining viscoelastic constants of agricultural materials. *Trans. of the ASAE Vol. 15 (6).* pp : 1103-1106.
14. Cho YJ, Chun SS, Choi C. Inhibitory effect of condensed tannins isolated from korean green tea against xanthine oxidase. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 22(4): 418-422 (1993)
15. Choi HJ, Whang YH, Pek UH, Shin HS. Effect of dietary grapeseed oil on serum lipids in spontaneously hypertensive rats. *Korean J Nutrition* 23(7): 467-476, 1990
16. Choi Y, Toon S, Lee MJ, Lee SK, Lee BS. Does response relationship of isoflavone supplementation on plasma lipid profiles and total antioxidant status in perimenopausal and postmenopausal women. *Korean J Nutrition* 34(3): 322-329, 2001
17. Choi SH, Kim SH, Lee BH. Effect of green tea on the antidiuodenal ulcer in cysteamine-administrated rats. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 22(4): 374 (1993)
18. Choi SH, Moon SH. Antimutagenic effect of the volatile aroma compounds identified from green tea, *Foods Biotech.* 6(2): 83 (1997)
19. Chung HK, Chang NS, Lee HS, Chang YE. The effect of various types of calcium sources on calcium and bone metabolism in rats. *Korean J Nutrition* 29(5): 480-488 (1996)
20. Chu DC, Juneja LR. General chemical composition of green tea and its infusion, chemistry and applications of green tea. Yamamoto, T., Juneja, L.R.,

- Chu, D.C., Kim, M. (eds.), CRC Press. New York. 13 (1997)
21. Chung HK, Kim JY, Lee HS, Kim HY. The effect of dietary calcium and phosphate levels on calcium and bone metabolism in rats. *Korean J Nutrition* 30(7): 813-824, (1996)
 22. Chung HK, Lee HS, Choe CS. Effect of dietary boron supplementation and calcium levels on calcium and bone metabolism in ovariectomized female rats. *Korean J Nutrition* 34(8): 887-895 (2001)
 23. Chung HK, Lee HS, Kim JY, Kim JY. Effect of boron supplementation in rats during growth. *Korean J Nutrition* 31(6): 1039-1048 (1998)
 24. Chung, S.K. Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard. *Biosci. Biotech Biochem.* 61: 118-123 (1997)
 25. Costa F, Moreno JL, Hernandez T, Lax A, Cegarra J. Roig A. Mineralization of organic materials in a calcareous soil. *Biological Wastes* 28: 189-201 (1989)
 26. Das DK, Sato M, Maulik G, Ray PS, Bagchi D. Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidin against ischemic reperfusion injury. *J. Mol cell cardiol.* 31: 1289-1297 (1999)
 27. Demonty I, Lamarche B, Desai Y and Jacques H. Role of soy isoflavones in the hypotriglyceridemic effect of soy protein in the rat. *J Nutritional Biochemistry* 13: 671-677 (2002)
 28. Deyhim F, Stoecker BJ, Brusewitz GH, Arjmandi BH. The effects of estrogen depletion and isoflavone on bone metabolism in rats. *Nutrition Research* 23, (2003)
 29. Dittmer U, Budde, K., Stindt, A. Weltzien, H. The influence of the compost extracts on different plants pathogens. *Gesundepflanzen* 42: 219-235 (1990)
 30. Drape CR, Edel MJ, Dick IM, Randal AG, Martin GB, Prince RL. Phytoestrogens reduce bone loss and bone resorption in oophorectomized rats.

- J Nutr 127: 1795-1799 (1997)
31. E. Fedeli : Miscellaneous Exotic Oils, JAOCS, 60(2), 404-406 (1983)
 32. Faure, D. and Deschamps, A. Physicochemical and microbiological aspects in composting of grape pulps. *Biological Wastes* 34: 251-528 (1990)
 33. Fazli, G., Ciolluffo, V., Indovina, M. C. and Pirrone, L. : *Rivista delle Società Italiana di Nutrizione Alimentare*. 11, 349-340 (1982)
 34. Fedeli, E. Miscellaneous exotic oils. JAOCS, 60 : 404-406 (1983)
 35. Fedeli, E., Lanzani, A. and Capella, G. Triterpene alcohols and sterols of vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 43 : 254-256.(1966)
 36. Finney, E. E., C. W. Hall and G. E. Mase. 1964. Theory of linear viscoelasticity applied to the potato. *J. Agri. Eng. Res.* Vol. 9 (4). pp : 307-312
 37. Fitzpatrick LA. Soy isoflavones: hope or hype? *Maturitas* 44: S21-S29 (2002)
 38. Frankel, E., Kanner, J., German, J.B., Parks, E. Kinsella, J.E. Inhibition of oxidation of human low density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*. 34: 454-457 (1993)
 39. Frankel, E., Waterhouse, A.L. Tessedre, P.L. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity inhibiting oxidation of human low density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43: 890-894 (1995)
 40. Frankel, E.N., Kanner, J., German, J.B., Parks, E. and Kinsella, J.E. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 341, 454-457 (1993a)
 41. Frankel, E.N., Waterhouse, A.L. and Kinsella, J.E. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* 341, 1103-1104 (1993b)
 42. Frankel, E.N., Waterhouse, A.L. and Tessedre, P.L. Principle phenolic

- phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoprotein. *J. Agric. Food Chem.* 43: 890-894 (1995)
45. Friedwald WT, Levy RT, Fridrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without the use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Nutr* 18: 499-502, 1972
 46. Gattuso, A.M., Fazio, G. and Gilluffo, V. : *Rivista delle Societa Italiana di Scienza delle'Alimentazione.* 12, 47?51(1983)
 47. Goldberg, D.M., Pace-Asciak, C.R., Hahn, S., Diamandis, E.P., Soleas, G. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. *Clinica Chimica Acta* 235(2): 207-219 (1995)
 48. Gorinstein S, Leontowicz H, Leontowicz M, Lojek A, Ciz M, Krzeminski R, Zachwieja Z, Jastrzebski Z, Delgado-Licon E, Marin-Belloso O, Trakhtenberg S. Seed oil improve lipid metabolsim and increase antioxidant potential in rats fed diets containing cholesterol. *Nutrition Research* 23: 317-330, 2003
 49. Grigorashrili, G. Z., Moniava, I. I., Lekiasvili, E. I., Beliashvili, N.N and Grigorashrili, G.Z, Moniava, II., Lekiasvili, E.I., Beliashvili, N.N. and Maglaperidze, N.D. : *Voprysy Pitniya,* 6, 37 (1981)
 50. Groff, J.L., Gropper, S.S., *Advnced nutrition and human metabolism,* Third edition, Wadsworth 161 (1989)
 51. Gyasi, S., R. B. Fridley and P. Chen. 1981. Elastic and viscoelastic Poisson's ratio determination for selected citrus fruits. *Trans. of the ASAE* Vol. 24 (3). pp : 747-750.
 52. H,C Kang , W.J park, S.D Kim, J.C park : Characterization of Grape Seed Oil, *Agric. Cham Biotechnol,* 41(8), 578-582 (1998)

53. Habig WH, Pabst MP, Jakoby WB. Glutathione S-transferase. *J Biol Chem* 249: 7130-7139, 1974
54. Hammerle, J. R. and N. N. Mohsenin. 1970. Tensile relaxation modulus of corn horney endosperm as a function of time, temperature and moisture content. *Trans. of the ASAE Vol. 13 (3)*. pp : 372-375.
55. Han YK, Park WK, Choi EH, Shin HH, Kim SW. A study on hormonal changes and bone densities in Korean menopausal women. *J. Korean Soc Endocrinol* 4: 21-26, 198
56. Han-Chul Kang, Won-Jong Park, Si-Dong Kim and Jong-Cheon Park : Characterization of Grape Seed Oil, *Agric. Chem. Biotechnol* 41(8), 578-582(1998)
57. Hwang JT, Kang HC, Kim TS, Park WJ. Lipid component and properties of grape seed oils. *Korean J Food & Nutr* 12(2): 150-155, 1999
58. Hwang, J.T., Kang, H.C., Kim, T.S. Park, W.J. Lipid component and properties of grape seeds oils. *Korean J. Food Nutr.* 12(2): 150-155 (1999)
59. Hwang, J-T., Kang, H-C., Kim, T-S. and Park, W-J. Lipid component and properties of grape seed oils. *Korean J. Food & Nutr.* 12 : 150-155 (1999)
60. Isabel M, Moncef C, Federico F, Francisco ATB. 1997. Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. *J. Agric. Food. Chem.* 48 : 2824-2829
61. Ishibashi, S. and T. Kojima. 1970. Studies on mechanical properties of agricultural products (II). *J. of JSAM.* Vol. 32(1). pp : 59-64. 농림부. 2000. 농림통계연보
62. Ishimi Y, Arai N, Wang X, Wu J, Umegaki K, Miyaura C, Takeda A, Ikegami S. Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 274: 697-701, 2000

63. Jang, J.K., Han, J.Y. The antioxidant ability of grape seed extract. Korean J. Food Sci. Technol. 34(3): 524-528 (2002)
64. Jayaprakasha GK, Shingh RP, Sakariah K.K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation model in vitro. Food chemistry 73: 285-290, 2001
65. Jeong MK, Bang NH, Seol SM, Kim WK. The effect of isoflavone on lipid metabolism and Responses in SD rats. Korean J Nutrition 35(6): 635-642, 2002
66. Jonnes, P.H. Iodine as an antihypertensive agent. Ibid. 3: 679 (1973)
67. Jorge, M., Ricardo, D.S., Jacques, R., Veronique, C., Annie, C. and Michel, M. Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. Phytochemistry 30: 1259-1264 (1991)
68. Kallithraka, S., Arvanitoyannis, I., El-Zajouli, A., Kefalas, P. The application of an improved method for trans-resveratrol to determine the origin of Greek red wines. Food Chem. 75: 355-363 (2001)
69. Kamel, B.S., Dawson, H. and Kakuda, Y. Characteristics and composition of melon and grape seed oils and cakes. JAOCS, 62 : 881-884 (1985)
70. Kang HC, Lee SH, Kim JB. Quantification and physicochemical properties of grape seed lipids. J Korean Soc Agric Chem Biotechnol 44(3): 172-178, 2001
71. Kang MH, Chung HK, Song ES, Park WJ. Improved method for increasing of the oil yields in grape seed. Korean J Food Sci Technol 34(5): 931-934, 2002
72. Kang MH, Katsuzaki H, Osawa T. 1998. Inhibition of 2,2'-azobis (2,4-dimethylvaleronitrile) - induced lipid peroxidation by sesaminols. Lipids 33 : 1031.
73. Kang MH, Naito M, Kawai Y, Osawa T. 1999. Antioxidative effects of dietary defatted sesame flour ; In hypercholesterolemia rabbits. J. Nutr. 129 :

1111-1119.

74. Kang MH, Naito M, Sakai K, Uchida K, Osawa T. . Action of mode sesame lignans in protecting low-density lipoprotein against oxidative damage *in vitro*. Life Sciences.(2000)
75. Kang MH, Naito M, Tsujihara N, Osawa T. . Sesamol inhibits lipid peroxidation in rat liver and kidney. J. Nutr. 128 : 1018-1022 (1998)
76. Kang MH, Ryu SN, Bang JK, Min KS, Lee BH. Physiological functions of sesamin and sesamol in sesame. Kor. J. Intl. Agri. 11 : 126-137 (1999)
77. Kang, C.B., Son, H.S., Kim, C.H. Effects of administration of 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride(AAPH) on liver function in rats 1. Clinical signs and blood chemical values. Korean J. Vet Clim Med. 15(1): 75-78 (1998)
78. Kang, H.C., Lee. S.H., Kim. J.B. Quantification and Physicochemical Properties of Grape Seed Lipids. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 44(3): 173-178 (2001)
79. Kang, H-C., Hahn, T-R., Chung, I-S. and Park, J-C. Characterization of an aminopeptidase from grape. Int. J. Plant Sci. 160 :299-306
80. Kang, H-C., Min, Y-K., Hwang, J-T., Kim, S-D. and Kim, T-S. Extraction and mixing effects of grape(Campbell) seed oil. Agric. Chem. Biotechnol. 42, 175-179 (1999)
81. Kang, M.H., Choi, C.S., Kim, Z.S., Chung, H.K, Min, K.S., Park, C.G., Park, H.W. Antioxidative activities of ethanol extract prepared from leaves, seed, branch and aerial part of *Crotalaria sessiflora* L. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 1098-1102 (2002)
82. Kang, M.H., Park, C.G., Cha, M.S., Seong, N.S., Chung, H.K. Lee, J.B. Component characteristics of each extract prepared by different extract

- methods from by-products of glycyrrhizia uralensis. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 30(1): 138-142 (2001)
83. Kang, M.H., Park, C.G., Cha, M.S., Seong, N.S., Chung, H.K., Lee, J.B. Component characteristics of each extract prepared by different extract methods from by-products of glycyrrhizia uralensis. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 30(1): 138-142 (2001)
 84. Kanner, J., Frankel, E.N., Granit, R., German, B., Kinsella, J.E. Natural antioxidant in grapes and wines. J. Agric. Food Chem. 42: 64-69 (1994)
 85. Kim KH, Choi MJ, Lee IK. The effect of dietary calcium level on bone mineral density and bone mineral content in ovariectomized female rats. Korean Nutrition 29(6): 590-596 (1996)
 86. Kim WW, Lee KS, Lee SH. An immunohistochemical study on alkaline phosphatase activity in osteoblasts cultured with isoflavone. The Korean Society of Menopause 8(1): 3-10 (2002)
 87. Kim, Y-D., Ha, K-Y., Lee, K-B. Shin, H-T and Cho, S-Y. Varietal variation of anthocyanin content and physicochemical properties in colored rice. Korean J. Breed. 30 : 305-308. (1998)
 88. Kind PRN, King EJ. Estimation of plasma phosphatase by determination of hydrolyzed phenol with amino antipyrine. Am J Clin Pathol 24: 322-326, 1954
 89. Kinsella, J. E :Food Technol, 28, 58-61(1983)
 90. Koeppen, B.H. Basson, D.S. The anthocyanin pigments of Barlinka grapes. Phytochemistry. 5: 183 (1966)
 91. Kojima T. Study on the physical properties of the horticultural products (I). J. of JSAM. Vol. 36(4). pp : 549-554 (1975)
 92. Larson, R.A. Antioxidant mechanism of secondary natural products, in: AHMAD,S. (ed.) Oxidative stress and antioxidant defenses in biology, New

York: Chapman and Hall, 210-233 (1995)

93. Lee BS, Won HJ, Lee SK, Choi Y, Yoon S, Park KH, Cho DJ, Song CH. The effect of isoflavone on serum lipid profiles and bone markers in postmenopausal women. *The Korean Society of Menopause* 8(1): 59-67 (2002)
94. Lee, C. H. Health concepts on traditional Korean Diet. *Proceeding of IUFOS, '96 Resional symposium on non-nutritive health factors for future foods*. Seoul, South Korea pp 47-56, (1996)
95. Luliano, L., Colavita, A.R., Leo, R., Pratico, D., Violi, F. Oxygen free radicals and platelet activation. *Free radical Biologr & Medicine* 22(6): 999-1006 (1997)
96. Maglaeridze, N.D : *Voprosy Pitniya*, 6, 37-39 (1981)
97. Mayer A.S., Yi, O.S., Person, D.A., Waterhouse, A.L., and Frankel, E.N. Inhibition of human LDL oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). *J. Agric. Food Chem.* 45: 1638-1643 (1997)
98. Min-Ju Song, Effect of extracellular Ca²⁺, Bupleuri Radix and Lithospermi Radix on platelet activation in the rabbit. 석사학위논문, 순천향대학교 대학원 (1997)
99. Muller. H.E. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganisms on an ABTS-peroxidase medium. *Zentralbl Bakteriol. Mikrobio. Hyg.* 259: 151-155 (1985)
100. Muramatsu K, Fukuyo M, Hara Y. Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 32: 613-622 (1986)
101. Negro, C., Tommasi, L., Miceli, A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology* 87: 41-44 (2003)

102. Park YH, Yoon S, Chung SY, Yang SO, Yoo TM. The effect of isoflavone supplementation on bone metabolism in ovariectomized SD rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30(4): 657-661, 2001. Saito M, Hosoyama H, Ariga T, Kataoka S, Yamaji N. Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. *J Agric Food Chem* 46: 1460-1464 (1998)
103. PascualMarti, M.C., Salvador, A., Chafer, A., Berna, A. Supercritical fluid extraction of resveratrol from grape skin of *Vitis vinifera* and determination by HPLC. *Talanta* 54: 735-740 (2001)
104. Ra, K.S., Suh, H.J., Chung, S.H., Son, J.Y. Antioxidant activity of solvent extract onion skin. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 595-600 (1997)
105. Renaud, S., and De, Lorgeri, M. : Wine, alcohol. platelets, and the french paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339, 1523-1526 (1992)
106. Sakariah KK, Singh R.P., Jayaprokasha, G.K. Antioxidant activity of grape seed(*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry* 73: 285-290 (2001)
107. Santiago B, Ferrer JR, Colmenares N, Paez G. Industrial use of grape pomace. *Rev. Tec. Ing. Univ. Zulia.* 17: 197-206 (1993)
108. Santos Buelga C, De Pascual Teresa S, Rivas Gonzalo JC. Prodelphinidins and related flavanols in wine. *International Journal of Food. Science and Technology* 335: 33-40 (2000)
109. Sastre I, Vicente MA. Lobo CM. Influence of the application of sewage sludges on soil microbial activity. *Bioresource Technology* 57: 19-23 (1996)
110. Shanmuganayagam D, Beahm MR, Osman HE, Krueger CG, Reed JD, Folts JD. Grape seed and grape skin extracts elicit a greater antiplatelet effect when used in combination than when used individually in dogs and humans. *The American Society for Nutritional Sciences J. Nutr.* 132: 3592-3598 (2002)

111. Shim KH, Kang KS, Choi JS, Seo KI, Moon JS. Isolation and stability of anthocyanin pigments in peels. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 23(2): 279-286 (1994)
112. Simons SS, Johnson, DF. Reaction of o-phtal-alaldehyde and thiols with primary amines: Fluorescence properties of 1-alkyl (and aryl) rhio-2-alkylisoindoles. *Ann Biochem* 90: 705-725 (1978)
113. Sohn HS, Lee YS, Shin HC, Chung HK. Does soybean isoflavone have adverse effects on human? *Korea Soybean Digest* 17(2): 9-19 (2000)
114. Somekawa Y, Chiguchi M, Ishibashi T, Aso T. Soy intake related menopausal symptoms, serum lipids, and bone mineral density in postmenopausal japanese women. *Obstet Gynecol* 97(1): 109-115 (2001)
115. Son DJ. Studies on platelet activation of bioactive constituents isolated from several plants. 석사학위논문, 순천향대학교 대학원 (2000)
116. Stirpe F, Corte ED. The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 244: 3855-3863 (1969)
117. Stojanovic S, Stojsvljervic T, Vunurevic N, Vikičvranjes M, Mandić A. Nutritive and feeding value of dried grape pomace in feeding fattening cattle. *Stocarstvo* 43: 313-319 (1989)
118. Storch J, Ferber E. Detergent amplified chemiluminescence of lucigenin for determination of superoxide anion production by NADPH oxidase and xanthine oxidase. *Anal. Biochem.* 169:262 (1988)
119. Suh HJ, Kim YS, Cho JS. Free radical scavenging activities and inhibitory effect on xanthine oxidase by acetone extract from Buckwheat. *Agricultural Chemistry and Biotechnology* 40(3): 254-258 (1997)
120. Tebib K, Rouanet JM, Besancon P. Antioxidant effects of dietary polymeric grape seed tannins in tissues of rats fed a high cholesterol-vitamin

- E-deficient diet. *Food chemistry* 59(1): 135-141 (1997)
121. Teissedre PL, Frankel EN, Waterhouse AL, Peleg H and German JB
Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. *J. Sci. Food Agric.* 70: 55-61 (1996)
 122. Terao K, Niki E. Damage to biological tissue induced by radical initiator 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride and its inhibition by chain-breaking antioxidants. *J. Free Radicals in Biol Med.* 2: 193-201 (1986)
 123. Tikkanen MJ, Adlercreutz H. Dietary soy-derived isoflavone phytoestrogen. *Biochemical pharmacology* 60: 1-5. (2000)
 124. Tsuda T, Yoshinori F, Katsumi O, Yamamoto A, Kawakishi S and Osawa T.
: Antioxidative activity of tamarined extract prepared from the seed coat. *Nippon Shagaku Kaishi* 42, 430-435 (1995)
 125. Walker, M. Antioxidant properties of pycnogenol. *Townsend Letters for Doctors.* 616-619 (1991)
 126. Weon YJ, Chung YS, Hong KY, Park YK, Kim HS, Lee JH, Lee EJ, Lim SK, Kim KR, Lee HC, Huh KB. The effect of ipriflavone on postmenopausal osteoporosis. *J Korean Society of Endocrinology* 8(3): 259-264 (1993)
 127. Wilson, T., Knight, T.J., Beitz, D.C., Lewis, D.S. and Engen, R.L. Resveratrol promotes atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Life Science* 59, 15-21 (1996)
 128. Wu MK, Degorge JG, Atrakchi A, Barry E, Biger A, Chen C, Du L, Geyer H, Goheer A, Jacobs A, Jean D, Rhee H, Osterberg R, Schmidit W. and Farrelly JG, Preclinical issues and status of investigation of botanical drug products in the United States. *Toxicology Letter.* (2000)
 129. Yamakoshi J, Kataoka S, Koga T, Ariga T. Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in

- cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 142: 139-149 (1998)
130. Yoon, H.S., Kwon, J.H., Choi, J.C., Hwang, J.H. Shin, D.H. Studies on the development of food resources from waste seeds. *Korean J. Food Sci. Technol.* 14(3): 250-256 (1982)
131. Zak B. Total and free cholesterol. In *Standard method chemistry*. Academic Press, New York, pp. 79-89 (1968)
132. Zeany, B.A., Abdel-Kawy, M. and Amer, M. M. : *Grasas Y Aceites*, 33, 212-215(1982)
133. 在勝充克, 食品加工と調味用ワイン, 食品と科學 (1996)
134. 井上正康, 活性酸素と醫食同源, 共立出版株式會社, (1996)
135. 山本 章, 田島正二, 池田康行. リポタンパク質-その生理と病態. *生化學* 62 : 89. (1990)
136. 大矢 友子. 生體內メイラド反應に關する化學的研究. 名古屋大學 博士論文 (1999)
137. 五島雄一郎編. わかりやすい脂質代謝とその異常. *メデカルトリビューン*. (1991)
138. 菊川清見, フリ?サジ?カルとくすり, 廣川書店, (1993)