

수확후 생체대사제어기법을 이용한  
레스베라트롤 고함유 포도 생산기계 개발  
Development of a System to Enrich  
Resveratrol Content of Harvested Grapes  
Using Metabolism Modulation

연구기관  
한국식품연구원

농림부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “수확후 생체대사제어기법을 이용한 레스베라트롤 고함유 포도 생산기계 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 7월 14일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

총괄연구책임자 : 조용진

연 구 원 : 김철진

연 구 원 : 김종태

연 구 원 : 김순희

연 구 원 : 지호균

협동연구기관명 : 단국대학교

협동연구책임자 : 피재호

연 구 원 : 피혜경

연 구 원 : 이향화

연 구 원 : 김창훈

위탁연구기관명 : 이화여자대학교

위탁연구책임자 : 이상국

연 구 원 : 민혜영

연 구 원 : 홍지영

# 요 약 문

## I. 제 목

수확후 생체대사제어기법을 이용한 레스베라트롤 고함유 포도 생산기계 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 과제는 항암 기능성 물질인 레스베라트롤이 고함유된 생식용 청정 포도 생산을 위해 수확후 세정 및 생체대사 조절처리용 기계를 개발하는 것을 최종 목표로 하며 이 장치를 통해 포도 과피에 잔류된 농약 및 불순물이 제거되고 reveratrol 함량이 증폭되어 과피까지 먹을 수 있는 생식용 포도를 생산하고자 하였다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

(제1과제: 주관연구기관) Resveratrol 고함유 청정 포도 생산기계 개발 및 품질 평가 연구(식품연)

- 수확후 포도의 세정 및 생체대사 조절장치의 기본설계
- 수확후 포도의 세정 및 생체대사 조절을 위한 레스베라트롤 고함유 청정 포도 생산기계 시제품 개발 및 현장 검증
- 수확후 세정 및 생체대사 조절처리 포도의 품질 평가

(제2과제: 협동연구기관) 포도 수확 후 기능성 물질 생합성 유도 시스템 개발 및 resveratrol 대사 안정성 연구(단국대)

- 포도 수확 후 resveratrol 함량 증진을 위한 유전자 발현 조절 인자 탐색
- 포도 수확후 처리 기간 및 방법에 따른 resveratrol 생합성 유전자 발현 변화 분석 및 최적 환경 조건 확립
- 포도 수확 후 처리에 따른 resveratrol 함량 분석 및 대사 안정성 연구

(제3과제: 위탁연구기관) 처리된 포도의 생물활성 효능 평가(이화여대)

- 항산화 효능 평가
- 암세포전이 및 침윤에 관한 효능 평가
- 항염증 효능 평가

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

##### 가. 연구개발 결과

###### <포도의 레스베라트롤 대사연구>

- 이미 genomic Southern blot 분석을 통해 포도 게놈내에는 적어도 4개 이상의 stsy 유사 유전자군이 존재한다는 것을 알았고 다양한 환경시그널을 찾기 위한 보다 효율적인 탐색 시스템을 만들기 위해 PCR-based DNA walking을 실시하여 promoter 부위를 포함하는 4개의 서로 다른 genomic clone을 얻었다. 이들 clone의 ORF간의 DNA 염기서열은 100%일치하며 promoter region은 90% 이상의 유사성을 가지고 있었다. 이 중 가장 긴 promoter 1의 DNA 염기 서열을 분석한 결과 transcripton start site로부터 33bp 떨어진 곳에 TATA box를 시작으로 GATA motif와 ethylene에 반응하는 GCC-box, CAAT, HES(heat response element), WUN(wound response element), G box, GT 1, AS-1가 포함되어 있으며 promoter 전반적으로 light에 반응하는 I box, AE box, GAG motif등의 cis-acting element들이 분포되어 있었다. 따라서 이러한 점에 착안하여 4개의 stsy promoter들을 각각 GUS 유전자에 붙여 환경 stress에 반응하는 시그널 탐색 시스템을 제작하였다. 이 4개의 promoter-GUS 유전자를 각각 Arabidopsis에 형질전환한 후 GUS assay를 수행한 결과 stsy promoter 1이 silique에서 발현되는 것이 확인되었으며 stsy promoter 1을 particle delivery system을 사용하여 포도에 주입하여 transient analysis를 시행한 결과 과피와 과육에서 발현되는 것을 확인했다. 또한 포도에 UV, yeast extract, ozone, aluminum chloride, salicylic acid, methyljasmonate, 6-benzylamino purine 등의 다양한 stress를 단용 또는 혼용 처리한 후 상온에 저장하여 RT-PCR로 각 stress 별 최적의 stsy 유전자 발현 유도 조건을 찾아내었다. UV stress의 경우 10분 이상 처리시 48시간 이후에도 stsy transcript 합성이 유지되는 것을 관찰 할 수 있었으며 UV를 단용 처리했을 때보다 ozone을 함께 2시간을 처리했을 경우와 MJ를 혼용 처리할 경우 (200uM MJ, 6시간) stsy transcript 합성이 더 많이 유도되었다.
- 포도에 UV, yeast extract, ozone, aluminum chloride, salicylic acid, methyljasmonate, 6-benzylamino purine 등의 다양한 stress를 단용 또는 혼용 처리한 후 저장 온도와 기간을 달리하여 RT-PCR을 이용하여 stsy

유전자의 발현양을 비교하고 HPLC를 이용하여 resveratrol의 함량을 측정하였다. 모든 stress 처리 실험군에서 4℃에 저장하였을 경우 resveratrol의 양이 거의 증가하지 않은 것을 관찰할 수 있었으며 주목할 점으로는 UV를 제외한 YE, SA, MJ, BA 처리에 의한 낙과와 갈변, 악취 그리고 곰팡이의 생성 등 포도에 상품성에 영향을 주는 negative effect를 관찰할 수 있었다. UV stress는 특이할만한 negative effect가 없는 안정성, 생산기계 제작 및 사용시 초도비용 이외에 추가비용이 거의 들지 않는 경제성, stress 처리의 편의성 등의 장점이 있어 UV 단용처리에 의한 resveratrol induction 최적 조건을 탐색하였다. UV stress 처리 경우 시간대별로 보았을 때 30분을 처리했을 경우 가장 resveratrol의 함량이 높은 것으로 측정되었다 또한 UV 30분을 처리 후 저장 온도를 비교해 보았을 때 23℃ 저장시 3-5일에서 resveratrol 함량이 control에 비해서 5-15배의 증가 후 감소하는 것으로 측정되었다.

- 실제로 경북 영천 농가에서 재배된 muscat 포도에 포도생산기계를 이용하여 탐색된 resveratrol 합성 최적조건의 UV stress를 처리하고 저장 기간과 온도에 따른 resveratrol의 함량을 측정하였다. muscat 포도는 campbell early에 비해 resveratrol 함량은 낮지만 충분한 induction 효과를 거둘 수 있었으며 더불어 이 실험을 통해 포도 저장의 최적 온도인 2-6℃ 온도가 stsy 유전자 발현 이후의 resveratrol 합성 induction 효과를 유지해주는 것으로 생각되는 결과를 얻었다.

#### <포도의 세정 및 생체대사 조절장치>

- 포도에 대해서 세정방법을 달리 한 후 UV 처리를 하였을 때 약간의 색상 변화를 제외하면 대부분의 품질인자는 세정효과에 따른 영향이 크지 않은 것으로 나타난 반면에, 레스베라트롤 함량은 초음파 세정을 실시하였을 때 증가하는 것으로 나타났다.
- 포도에 대해서 UV A와 UV C 처리에 따른 품질 및 레스베라트롤 함량의 변화를 분석한 결과, 약간의 색상의 변화를 제외하면 대부분의 품질인자는 UV 처리에 따른 영향이 크지 않은 것으로 나타났다. UV 처리가 색상 변화에 미치는 영향에서도 UV A가 Hunter b의 값에 약간의 영향을 미치는 것으로 나타난 반면에 UV C는 Hunter b 조차도 큰 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 그러나 UV 처리는 레스베라트롤의 함량 변화에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났는데 특히, UV C가 레스베라트롤 함량을 증폭시키는 데 있어 더 효과적인 것으로 나타났다.

- UV C 처리가 포도의 품질에 미치는 영향을 보면, UV 처리 직후 약간의 색상 변화에 영향을 미치는 것을 제외하면 저장에 따른 영향은 거의 없는 것으로 나타났다.
- UV의 세기와 처리시간이 클수록 저장기간이 길어질수록 UV 처리에 따른 포도의 레스베라트롤의 증폭 효과는 증가하는 것으로 나타났음을 알 수 있다. 특히, UV 처리후 0℃보다는 20℃에서 저장하였을 때 UV 처리 효과는 더욱 크게 나타남을 알 수 있었다. 이러한 결과를 종합해 볼 때, 포도 수확 후 UV C를 이용하여 400~600 mJ/cm<sup>2</sup>의 에너지를 조사하고 20℃에서 5~6일 저장하였을 때 레스베라트롤의 함량 가장 많이 증폭되는 것을 알 수 있었다.
- 시작기를 이용하여 현장에서 대량 처리를 한 경우, 레스베라트롤은 평균적으로 약 10배 증폭되는 것으로 나타났다. 특히, 1차 시작기를 통해 얻어진 결과를 바탕으로 개선된 2차 시작기에서는 작업의 편리성이 향상되었을 뿐만 아니라 UV 처리 시 포도의 온도 상승에 의한 포도알의 열과 현상이 전혀 나타나지 않았다. 또한, 2차 시작기에서도 1차 시작기에서와 마찬가지로 8시간 동안 약 10톤의 포도를 처리할 수 있는 것으로 검증되었다.
- 본 연구에서 개발된 기술은 관련 산업체에 이미 기술이전을 완료하여 제품화를 시행하고 있다. 이미 2005년도에 약 10톤의 포도를 출시하여 약 5천만원의 매출규모를 달성하였고, 2006년도에는 약 100톤의 레스베라트롤 증폭 포도를 출시할 계획을 가지고 있다. 1차 및 2차 시작기를 통해서 레스베라트롤을 증폭하기 위해 도입된 기계의 비용을 개략 분석한 결과, 본 연구를 통해 개발된 기술은 매우 저렴한 비용으로 고부가가치를 창출할 수 있는 산업화 기술로 평가되었다.

#### <포도의 생물활성 평가>

- 국내 생산되는 MBA와 거봉을 신선포도 상태에서 UV처리한 포도껍질을 대상으로 한 생물활성 시험에서 UV처리를 한 포도껍질이 UV처리를 하지 않은 시료에 비해 항산화 및 암세포 전이 및 침윤, 항염증 효과가 더 높은 것으로 나타났다.
- 항산화 효능 평가에서는 DPPH assay를 통해 UV처리에 따른 항산화 효능

이 더 높은 것을 확인할 수 있었으며 산화적 스트레스로 인한 세포내 ROS 생성 저해 효능 평가에서는 UV처리에 의한 뚜렷한 억제 효과차이는 나타나지 않았으나 전체적으로 포도 추출물들이 뚜렷한 항산화 효능을 갖는 것으로 나타났다.

- 암세포의 성장 및 사멸 효능평가에서는 다른 암세포주에 비해 폐암세포주인 A549에서 포도껍질의 효과가 비교적 우수하게 나타났으며 UV처리한 시료가 UV처리하지 않은 시료에 비해 약간 더 높은 암세포의 성장억제 및 사멸 효과를 보였다. 그러나 세포주기 분석, DNA fragmentation, caspase-3 활성을 평가해 본 결과 apoptosis를 통한 암세포 사멸 유도 활성은 나타나지 않는 것으로 확인되었다. UV를 처리한 포도껍질의 추출물은 UV를 처리하지 않은 포도껍질의 추출물에 비해 암세포 전이 및 침윤에 관한 활성 효과가 다소 더 높은 것으로 나타났으며 이는 암세포 전이 관련 유전자의 발현정도, migration assay, gelatin zymography, colony dispersion assay를 통하여 확인할 수 있었다. 이 중 특히 포도 추출물에 의한 MMP-2 유전자의 발현 저해가 뚜렷이 나타났으며 migration assay 및 colony dispersion assay에서는 UV처리 포도추출물의 migration 억제 효능이 대조군에 비하여 뛰어난 것으로 확인되었다.
- LPS 처리에 의해 생성된 iNOS(Inducible nitric oxide synthase) 저해 효과를 살펴보면 UV처리 포도껍질들 중 UV-A 200W와 UV-C 40W를 처리한 시료가 다른 시료에 비해 세포 독성은 크게 나타나지 않으면서 높은 저해 효과를 나타내었다. 결과적으로 본 연구는 UV처리에 따른 포도의 생물활성효능평가를 성공적으로 수행하였으며 UV처리를 한 포도의 항산화, 암세포 전이 및 침윤, 항염증의 효능은 UV처리를 하지 않은 포도에 비하여 전체적으로 더 높은 것으로 사료된다.

#### 나. 활용에 대한 건의

- 자동화된 resveratrol 고함유 포도생산기계에 포도 내 최적의 resveratrol 함성 처리 조건을 접목함으로써 항암 등의 효과가 있는 resveratrol 함량을 포도 과실 내에서 증진시켜 수입산 포도와 차별화를 두고 이러한 고부가가치 과실을 국내 포도 농가에서 직접생산 및 포도즙과 같은 가공 과정을 하여 농가수입증대에 기여하고자 한다.
- 또한 이러한 특허 기술을 기업에 이전하여 새로운 과수 또는 과채류에 응용하고 stress에 반응하는 stsy promoter를 이용한 expression system을 개

밭 및 식물에 형질전환하여 resveratrol처럼 고부가가치를 가지는 물질을 생산하거나 발현시기 조절이 가능한 신품종을 육성하여 국내 농업경쟁력을 강하는 데 기여하고자 한다.



# SUMMARY

## (영문 요약문)

### I. Title

Development of a System to Enrich Resveratrol Content of Harvested Grapes Using Metabolism Modulation

### II. Objective and Significance

Recently, Fruits with high contents of health components like fruit phenolics is being recognized as premium produces. As for grapes, resveratrol is one of the key health component among fruit phenolics. This study was performed to develop a system for enrichment of resveratrol content in harvested grapes using metabolism modulation and evaluate improvement of biological activities by metabolism-modulated grapes.

### III. Scope of Research

- To design, manufacture and test a system to enrich resveratrol content of harvested grapes using metabolism modulation
- To study biosynthesis of resveratrol in grapes by metabolism modulation and its stability
- To evaluate improvement of biological activities by metabolism-modulated grapes

### IV. Results and Proposal for Practical Use

<Metabolism modulation of resveratrol in grape>

- In grapevine, resveratrol (stilbene), a phytoalexin, is produced by stilbene synthase (STSY) from malonyl-CoA and  $p$ -coumaroyl-CoA. Its

biosynthesis is induced by fungal elicitor, ozone, UV, AlCl<sub>3</sub> and methyljasmonate. Genomic Southern blot analysis showed the presence of at least 4 homologous genes encoding stilbene synthase on the grapevine genome. In order to understand the mechanism of *STSY* gene expression at the transcription level, 4 *STSY* promoters were isolated from *Vitis vinifera* L. × *Vitis labrusca* L. cv Kyoho grape skin. Deletion series of the *STSY* promoter 1, the longest one, were fused with the GUS reporter gene and introduced into Arabidopsis. Analysis of the promoter activity in transgenic Arabidopsis provided identification of the sequences to be required for responsiveness to AlCl<sub>3</sub>, UV and yeast extract respectively. Treatment of the transgenic Arabidopsis carrying the deleted series of the *STSY* promoter 1 with either salicylic acid (SA) or methyljasmonic acid (MJ) induced expression of the reporter gene. The results demonstrated that SA and MJ play an important role in the signal transduction pathway for *stsy* gene expression. *STSY* promoters 1, 2, 3 and 4 showed spatially different expression patterns in addition to inducibility by environmental factor. RT-PCR analysis showed that *STSY* promoter 1 was especially highly expressed by treatment with UV and ozone for 2 hours and that its induction was also obtained with MJ treatment.

- Grape berries were harvested and treated for post-harvest induction of *STSY* gene expression with UV, yeast extract, ozone, AlCl<sub>3</sub>, SA, MJ, or 6-benzylamino purine alone or by combination of them and resveratrol content was analyzed after various period of storage at different temperature. Storage at 4°C provided the best condition for *STSY* gene induction with all of the treatments. However, post-harvest treatment of the stress except for UV showed some negative effect on the fruit quality. Therefore, UV was finally selected as a main treatment factor for field application. UV treatment for 30 minutes provided the best condition for induction of *STSY* gene expression. After UV stress, resveratrol content in grape berry appeared to be increased upto 5 - 15 fold during storage at 23°C but the level decreased after 3-5 days.
- The optimized condition of UV treatment was applied to 'Campbell Early' and 'Muscat Belly Early' grape berries which were harvested from several vineyards in Youngcheon-si using a post-harvest treatment

system. The resveratrol level varied very much depending on the storage condition including temperature and period. 'Muscat Belly Early' contained less amount of resveratrol than 'Campbell Early'. However, its induction after UV treatment was high enough for application and the level did not change during storage at 2-6°C. These results suggest that UV treatment at the optimized condition and storage at the cold temperature will maintain the level of resveratrol content.

<A system to enrich resveratrol in harvested grape>

- When the ultra violets in classes A and C were applied to harvested grapes, there was little impact on their quality. Particularly, while UV A affected somewhat b value in Hunter color system, UV C had no effects on that. Also, some certain cleaning processes such as ozone water cleaning and ultrasonication cleaning had hardly effects on grape quality.
- UV in classes A and C had an ability to enrich resveratrol in harvested grapes. In investigation on the effect of UV on enrichment of resveratrol, class C was better than class A. Enrichment of resveratrol increased with UV intensity and UV treatment time. After treatment with UV C, some additional enrichment of resveratrol was acquired during storage at 20°C, compared to storage at 0°C. When a cleaning process was introduced, resveratrol content in grapes increased somewhat by ultrasonication cleaning. The maximum enrichment of resveratrol by UV treatment was acquired when the UV-treated grapes were stored at 20°C for 5 to 6 days after irradiation with 400 to 600 mJ/cm<sup>2</sup>.
- The two types of equipments with pilot plant scale were manufactured to enrich resveratrol of harvested grapes. The second version was obtained by modification of the first version in which there were a few problems such as insufficient cooling. These equipments could cover 10 ton for 8 hours, based on fresh grape weight. Grapes treated by these equipments had 10 times more resveratrol content than untreated grapes.

<Biological activity of UV-treated grape>

- Antioxidant potential: Grape skins showed DPPH-free radical scavenging activity, and the activity of UV-treated sample was stronger than that of UV-untreated one.
- Antiinflammatory activity: Grape skins suppressed LPS-induced prostaglandin E<sub>2</sub> production in mouse macrophage cells, and UV-treated samples showed the stronger inhibition of COX-2 activity than UV-untreated grape skins. Grape skins also inhibited nitric oxide production in LPS-stimulated macrophage cells and UV-treated samples showed a relatively better on LPS-induced NO production activity compared with UV-untreated grape skins. In addition, compared with control, UV-treated sample highly down-regulated the mRNA expression of iNOS in LPS-stimulated macrophage cells.
- Antiproliferative activity against human cancer cells: The grape skins suppressed the proliferation of various human cancer cell lines. As compared with UV untreated grape skins, UV treated grape skins showed stronger growth inhibitory effect. However, the mechanism underlying anti-proliferative effect of grape skins might not be related to apoptosis.
- Antimetastatic effects: The grape skins inhibited the migration and MMPs activity of HT-1080 human fibrosarcoma cell and inhibitory activities of UV-treated sample was stronger than control sample.

# CONTENTS

## (영 문 목 차)

Chapter 1 Introduction .....	13
Section 1 Background and Significance .....	13
Section 2 Objective and Scope .....	15
Chapter 2 The State-of-the-art Report .....	17
Chapter 3 Contents and Results .....	21
Section 1 Metabolism Modulation of Resveratrol in Grape .....	21
Section 2 A System to Enrich Resveratrol in Harvested Grape .....	54
Section 3 Biological Activity of UV-Treated Grape .....	87
Chapter 4 Achievement and Contribution to the Filed .....	113
Chapter 5 Utilization of the Results .....	114
Chapter 6 Collected Technical Information .....	116
Chapter 7 References .....	117

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	13
제 1 절 연구개발의 필요성 .....	13
제 2 절 연구개발의 목표 및 범위 .....	15
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	17
제 1 절 현황 .....	17
제 2 절 문제점 .....	20
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	21
제 1 절 포도의 레스베라트롤 대사 연구 .....	21
제 2 절 포도의 세정 및 생체대사 조절 연구 .....	54
제 3 절 포도의 생물활성 평가 .....	87
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	113
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	114
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	116
제 7 장 참고문헌 .....	117

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

- 우리나라에서 생산되는 포도의 약 95%가 생식용으로 소비되고 있어 포도 수확 후 품질관리에 관한 기술이 중요한 자리를 차지하고 있다(한국농촌경제연구원, 1999).
- 포도, 특히 과피에는 레스베라트롤을 비롯한 건강기능성 페놀계 화합물이 다량 함유되어 있다. 포도의 레스베라트롤은 항산화 작용, 종양의 발생 및 억제 효과가 있고 독성은 나타나지 않는 것으로 보고되고 있으며, 저밀도 단백지질 콜레스테롤을 감소시키는 효과가 탁월하다고 알려져 있다(Meskin 등, 2002).
- 레스베라트롤은 포도에서와 같이 매우 제한된 식물체에서만 생성되며, 그 양도 매우 적다(조용진 등, 2002). 국내산 주요 포도 품종에 대해서 부위별 레스베라트롤 함량을 HPLC 분석법을 이용하여 측정한 결과를 보고한 바에 의하면, 거봉, 캠벨, 세리단 모두의 경우 부위별 레스베라트롤 함량은 큰 차이를 보였으나, 품종 간 차이는 크지 않은 것으로 나타났다. 포도 과피와 씨에는 레스베라트롤의 함량이 매우 적어 4~8  $\mu\text{g/g-dry weight}$ (1~4  $\mu\text{g/g-fresh weight}$ )의 레스베라트롤을 함유하고 있는 것을 나타났다.
- 포도를 포함하여 식물체는 수확 후에도 생명활동을 유지하고 있어 생체대사에 의한 생합성이 계속 일어난다. 포도의 경우도 예외가 아니어서 수확 후 생체대사를 제어하게 되면 레스베라트롤을 비롯한 생합성 물질을 증강시킬 수 있는 것으로 분자생물학적 연구가 보고되고 있다(Cantos 등, 2002).
- 포도 수확 후, 생식용 고급브랜드 제품을 개발하기 위해 건강기능성 물질이 고함유된 포도를 생산할 수 있는 생체대사 조절용 수확 후 처리기계의 개발이 필요하다(조용진, 2003).

- 특히, 본 연구에서 다루고자 하는 기술은 생체대사 조절기법을 이용하는 것으로서, 최근 관심의 대상이 되고 있는 유전자조작과는 전혀 다른 기법이며, 따라서 식품의 안전성 문제는 근원적으로 발생하지 않는 접근방법이다.

## 2. 경제·산업적 측면

- 포도는 국내 과실 생산액의 20%를 차지하는 주요 경제작물로서 1990년을 기점으로 생산규모가 급성장하여 매년 생산량이 증가하고 있으며, 2001년 기준으로 재배면적이 26,803 ha, 생산량이 453,578 톤에 이르고 있다(농림부, 2002).
- 세계무역의 자유화 물결로 인하여 국내 농산물의 경쟁력 확보는 매우 어려운 입장에 처해 있으며, 포도도 예외는 아님. 그 동안 국내산 농산물 중에서 포도산업의 상대적 안정성은 유지되었으나 그것이 오히려 과잉생산을 촉발하는 조짐을 보이고 있을 뿐만 아니라, 칠레와의 자유무역협정(FTA) 체결에 의한 포도 수입의 확대는 포도의 과잉 공급에 관한 시비를 불러일으키고 있음. 결국 과잉생산의 논란 속에서 국내 포도산업의 기반은 크게 약화될 우려가 있다.
- 우리나라에서 생산된 포도는 대부분 생식용으로 소비되고 있어 수입 포도에 대한 경쟁력을 확보하기 위해서는 고급 브랜드화 된 생식용 포도의 생산이 절실히 요구되고 있다.
- 최근 농산물의 고급 브랜드화를 통한 경쟁력 강화는 매우 활발하게 이루어져 농업경쟁력 강화의 주요 수단으로 자리 잡고 있음. 국내산 포도의 경우, 가장 주된 관심사는 수확후 선도유지에 머물고 있어(최태동 등, 2002), 생식용 포도의 고급화를 위한 새로운 접근이 필요하다.
- 국내산 생식용 포도의 경우, 단순히 선도유지에 의한 경쟁력 강화보다는 포도 수확 후 생체대사 조절기법을 적용하여 건강기능성 물질이 고함유된 고급 브랜드 포도를 생산하게 되면 국내산 생식용 포도의 경쟁력은 배가적으로 제고될 것으로 기대된다(조용진, 2003).

## 3. 사회·문화적 측면



- 포도의 1인당 연간 소비량은 1980년 이후 꾸준히 증가하여 1990년 3.1 kg에서 1998년 8.7 kg으로 2.8배나 증가하였다. 포도의 소비량 증가는 포도에 대한 기호뿐만 아니라 포도가 건강에 미치는 영향에 기인한다고 볼 수 있다.
- 포도가 건강에 미치는 유익한 효과는 예로부터 잘 알려져 있을 뿐만 아니라, 최근 포도주의 건강기능성 효과가 새롭게 알려지면서 포도에 대한 관심이 더한층 고조되고 있다. 그러나 포도주의 경우, 'French Paradox'로 알려진 바와 같이 포도주의 유익한 건강기능성 물질이 강조되고 있기는 하나 술의 폐해가 서로 상충하고 있어 일방적으로 권장할 형편이 못된다.
- 포도의 건강기능성 물질 즉, 포도주의 'French Paradox'의 주요 인자로 알려진 물질로서 대표적인 성분은 레스베라트롤로 알려져 있다(Meskin 등, 2002). 레스베라트롤은 폐놀계 화합물의 일종으로서 저밀도단백지질 콜레스테롤을 감소시키는 반면에 고밀도단백지질 콜레스테롤을 증가시키는 효과가 있는 것으로 보고되고 있어, 포도를 적당량씩 자주 섭취할 경우 고지혈증이나 심장병 치료에 매우 유익한 물질로 검증되고 있다.
- 포도 수확 후 생체대사 조절기법을 통해 레스베라트롤의 함량을 강화하게 되면 생식용 포도의 섭취를 통해 포도의 건강기능성을 더욱 효과적으로 얻을 수 있다.

## 제 2 절 연구개발의 목표 및 범위

### 1. 연구개발의 목표

본 과제는 항암 기능성 물질인 레스베라트롤이 고함유된 생식용 청정 포도 생산을 위해 수확후 세정 및 생체대사 조절처리용 기계를 개발하는 것을 최종 목표로 하며 이 장치를 통해 포도 과피에 잔류된 농약 및 불순물이 제거되고 reveratrol 함량이 증폭되어 과피까지 먹을 수 있는 생식용 포도를 생산하고자 한다.

## 2. 연구개발의 내용

(제1과제: 주관연구기관) Resveratrol 고함유 청정 포도 생산기계 개발 및 품질 평가 연구(한식연)

- 수확후 포도의 세정 및 생체대사 조절장치의 기본설계
- 수확후 포도의 세정 및 생체대사 조절을 위한 레스베라트롤 고함유 청정 포도 생산기계 시제품 개발 및 현장 검증
- 수확후 세정 및 생체대사 조절처리 포도의 품질 평가

(제2과제: 협동연구기관) 포도 수확 후 기능성 물질 생합성 유도 시스템 개발 및 resveratrol 대사 안정성 연구 (단국대)

- 포도 수확 후 resveratrol 함량 증진을 위한 유전자 발현 조절 인자 탐색
- 포도 수확후 처리 기간 및 방법에 따른 resveratrol 생합성 유전자 발현 변화 분석 및 최적 환경 조건 확립
- 포도 수확 후 처리에 따른 resveratrol 함량 분석 및 대사 안정성 연구

(제3과제: 위탁연구기관) 처리된 포도의 생물활성 효능 평가 (이화여대)

- 항산화 효능 평가
- 암세포전이 및 침윤에 관한 효능 평가
- 항염증 효능 평가

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 현황

- 포도의 약리적 작용은 주로 페놀성 화합물(phenolic compounds)에 의하여 얻어지며, stilbene계 화합물인 resveratrol과 trans-pterostilbene, 그리고 비 stilbene계 화합물인 ellagic acid 등을 예로 들 수 있다.
- Resveratrol 및 그 중합체인 viniferin은 원래 식물체에서 외부에서 침입한 곰팡이의 성장을 억제하는 방어물질인 phytoalexin으로 알려져 있다. 1992년 Siemann 및 Creasy(1992)에 의해 포도주에서 *trans*-resveratrol이 발견되고, 적절한 포도주 섭취가 coronary heart disease (CHD)에 의한 사망율을 낮춘다는 역학적인 보고가 나온 이후, resveratrol의 약리효과에 대한 많은 실험결과가 발표되기 시작하였다.
- 적포도주가 혈액 LDL(저비중 리포단백질)을 낮추고, 이로써 콜레스테롤을 증가시킨다는 보고(Maxwell 등, 1994; Fuhrman 등, 1995)로 보아, 이는 아마도 동맥내 지방 침적물을 정화시키기 때문이라고 보이며, 포도 과실의 표피에 주로 나타나는 resveratrol이 그 활성 성분이라고 예상되고 있다.
- Resveratrol은 쥐의 간에서 지방 침적 형성을 억제할 뿐만 아니라 fungitoxin으로서의 작용을 나타낸다는 것이 확인되었고, 포도에서 발견되는 스트레스 대사물질인 trans-pterostilbene은 resveratrol에 비해 효능(영향력; potent)이 뛰어나다는 보고도 있다(Langcake 등, 1979).
- 최근에는 resveratrol이 세포변이를 억제하고 p53 경로를 통해 apoptosis를 유도함으로써 항암효과를 나타낸다는 실험결과가 보고되었다(Carbo et al., 1999; Clement et al., 1998; Huang et al., 1999).
- 그외 resveratrol은 항알러지 작용과 cell division cycle 조절작용 등의 활성을 보였다(Ragione et al., 1998; Cheong et al., 1999).
- 자연계에는 약 30 여종의 stilbene 혹은 stilbene glycoside가 존재하며 이들은 spermatophyte에 속하는 식물체에서만 발견되었다(Gorham, 1980). Resveratrol을 포함한 stilbene계 화합물은 극히 일부 식물에서만 생성되는

데, 지금까지 포도과 이외에 소나무, 땅콩, *Polygonum cuspidatum*, 유칼리 나무(eucalyptus), 그리고 백합과의 박새(*Veratrum gradiflorum*), 루바브(*Rheum rhaponticum*) 등에서 보고되고 있다.

- Resveratrol은 shikimate pathway를 거쳐 생성된 p-coumaroyl CoA 한 분자와 malonyl CoA 세 분자로부터 stilbene synthase에 의해 합성되며 그동안 땅콩, 소나무, 포도 등으로부터 그 유전자가 분리되어 보고되었다.
- Resveratrol은 외부 환경 스트레스에 의해 그 합성이 유도되는데, 예를 들면, pine seedling의 경우 UV, fungal infection, ozone 처리에 의해 합성이 유도되었다(Schoeppner와 Kindl, 1979; Fliegmann 등, 1992).
- 포도에서의 resveratrol에 관한 연구도 오래 전부터 시작되어, 이 화합물이 phytoalexin으로 식물 방어 작용에 관여한다고 알려져 왔으며(Langcake 등, 1979), UV 및 fungal infection에 의해 합성이 유도된다는 사실은 이를 더욱 뒷받침 해준다고 보고하였다(Langcake와 McCarthy, 1979; Langcake와 Pryce, 1977).
- 조직의 stilbene 농도차이에 따른 곰팡이 침입에 대한 감수성은 서로 반비례 관계가 있음이 확인되었다. 따라서 병해를 입지 않은 건강한 포도 잎이나 과실에서는 매우 적은 양의 resveratrol이 검출되었다(Dercks와 Creasy, 1989).
- 포도 과피에서의 stilbene 생성량이 포도와 *Botrytis cinerea* 간의 상호반응에 미치는 영향에 대한 연구결과, 감염이 일어난 부위로부터 멀리 떨어진 알에서 가장 많은 stilbene이 검출되었고(Jeandet 등, 1995), 감염이 실제로 일어난 부위에서는 오히려 *B. cinerea*에 의해 resveratrol이 산화되어 불활성화됨이 확인되었다(Hoos와 Blaich, 1990; Sbaghi 등, 1996).
- 따라서 resveratrol 합성에 관여하는 유전자의 분리와 상기 유전자의 환경 스트레스에 의한 발현 조절에 대한 보고들은 다수 있으나, 환경 스트레스를 유발하는 다양한 인자를 정량적으로 처리하거나 또는 이들 환경인자를 복합적으로 처리하여 resveratrol 함량을 증가시킨 예는 보고된 바가 없으며, 다만 자외선을 처리하여 생식용 포도의 resveratrol 함량을 3-4배 증폭시킨 보고가 2건 있을 뿐이다(Cantos 등, 2001, Cantos 등, 2002).
- 포도에서 resveratrol은 과실의 표피 또는 잎조직에서 발견되는데 잎조직에

는 90,000ppm이상으로 존재한다는 것이 밝혀졌다(Duke, 1992b). 포도주 30종의 resveratrol 함량 조사에서 red Bordeaux가 가장 높은 함량을 나타내었고 white Bordeaux가 가장 낮은 함량을 나타내었다.

- 포도 조직별 resveratrol 생성 potential을 비교하면, 과실의 과육에서는 resveratrol이 전혀 검출되지 않으며, 과피에서 과실성숙기 바로 직전에 가장 많이 생성된다. 그리고 다른 조직, 예를 들면, 꽃이나 성숙한 과실에서는 매우 적은 양이 생성되었다(Creasy와 Coffee, 1988; Jeandet 등, 1991).
- 또한 유전자 발현 조절에 관한 연구는 땅콩 세포배양시 이 유전자의 발현 양상 변화를 관찰한 것(Lanz et al., 1990)과 포도에서 fungal elicitor에 의해 stilbene synthase 유전자와 phenylalanine ammonia lyase 유전자가 동시에 활성화된다는 보고(Melchior and Kindle, 1991)를 제외하면 거의 없는 실정이며, 따라서 resveratrol 합성 유전자의 발현을 향상시키기 위해서는 이에 대한 분자생물학적인 연구가 시급히 요청되고 있다.
- 위와 같은 연구결과를 종합해 보면, 스틸베계의 레스베라트롤은 포도의 생체방어물질로서 수확 후 잔존하는 레스베라트롤을 인간이 섭취하여 활용할 수 있음이 밝혀졌다. 그러나, 생육상태가 양호한 포도가 수확되었을 때는 그 함량이 생육이 부실한 포도보다 오히려 낮아 인간의 이용성이 낮은 상태이다.
- 생육상태가 양호한 포도를 수확한 후 생체대사 조절기법을 활용하여 레스베라트롤의 함량을 강화시키는 기술을 적용하게 되면 더욱 양질의 포도를 생산할 수 있다.
- 과학기술의 발달과 경제수준의 향상에 따라 식문화는 인간의 건강과 긴밀한 유대를 갖게 되었다. 즉, 식품은 단순히 영양섭취의 차원을 넘어 인간의 건강을 유지하는 식품의 기능이 더욱 중요하게 부각될 것을 전망된다.
- 과실류, 채소류와 같은 신선 식품의 산업규모는 계속 확대되고 있는 추세이며, 신선 식품의 건강기능적 측면은 더욱 중요하게 대두될 것으로 예상되고 있다.
- 생체대사 조절기법은 안전성 문제가 대두되는 유전자조작과는 달리 자연현상을 선택적으로 이용하기 때문에 안전성 문제를 근원적으로 회피할 수 있는 방법으로서 양질의 신선식품을 생산하는 좋은 수단이 될 것으로 전망된다.

다.

## 제 2 절 문제점

- 농업 생산물의 고부가가치를 창출하기 위하여 기존의 단순가공을 지양하고 기능성 생물소재를 생산하려는 노력은 국제적으로 활발히 경주되고 있다. 특히, 21세기의 생물산업시대에 걸맞은 경쟁력을 확보하기 위해서 생산기술의 경쟁이 더욱 치열해지고 있다.
- 우리 나라 과실의 국제경쟁력은 가공식품의 원료로서보다는 고급 브랜드화된 신선식품으로써 확보될 것으로 기대된다. 특히, 포도는 생식용 소비가 대부분을 차지하고 있어 고급 브랜드 제품의 개발이 절실히 요구될 것이다.
- 유전자 조작에 의해 건강기능성 물질이 강화된 작물을 생산할 수는 있으나 안전성 문제 제기로 인하여 GM 식품에 대한 소비자의 불안 심리가 고조되고 있어 유전자 조작기법을 지양하는 기술의 개발이 요구되고 있다.
- 포도의 레스베라트롤 함량을 증폭하는 방법으로서, 생물학적 방법, 화학적 방법, 물리적 방법 등 여러 가지 방법이 기초연구의 결과로서 제시되고 있으나 아직 현장에서 대량 생산용으로 사용할 수 있는 기술은 개발되어 있지 않다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 포도의 레스베라트롤 대사 연구

#### 1. 유전자 발현조절 인자

##### 가. 서론

수확후 포도의 레스베라트롤 함량 증진을 위하여 관련 유전자의 발현 조절 인자를 탐색하고자 하였다.

이를 위한 구체적인 연구내용은 다음과 같다.

##### ① stsy-GUS transient expression system 개발

이미 genomic Southern blot 분석을 통해서 찾아낸 4개의 stsy 유사 유전자군을 PCR-based DNA walking 통해 각각을 cloning하고 promoter를 분석 및 GUS reporter gene construct를 제작하였다.

##### ② 유전자 발현 분석

GUS reporter gene construct들이 형질전환된 Arabidopsis에서 stsy 유전자 발현 양상분석을 통해 promoter별 조직특이적인 발현을 확인하고 stress 처리에 의해서 발현양이 증가함을 확인하였다 또한 bombardment를 이용한 transient assay로 실제 포도에서도 stress에 의해 stsy 유전자가 발현이 증가하는 것을 확인하였다.

##### ③ 유전자 발현 최적인자 탐색

포도에 UV, yeast extract(YE), ozone, aluminum chloride, salicylic acid(SA), methyljasmonate(MJ), 6-benzylamino purine(BA) 등의 다양한 stress들을 세기와 농도를 달리하여 처리하고 RT-PCR을 이용하여 stsy 유전자 발현양을 분석하고 stress 별 stsy 유전자 발현 최적 조건을 탐색하였다.

##### 나. 재료 및 방법

#### 1) stsy-GUS transient expression system 개발

##### 가) Library 제작 및 PCR-based DNA walking

거봉 포도의 잎에서 분리한 2.5  $\mu$ g의 genomic DNA를 EcoRV, PvuII,

DraI(Clontech, Universal GenomeWalker kit)의 제한 효소로 자른 후, 동량의 phenol/chloroform으로 extraction하였다. 원심분리하여 얻은 상층액은 2배의 에탄올, 1/10 volume의 3 M sodium acetate, 20  $\mu$ g glycogen을 첨가하여 잘 섞어 주고 10,000  $\times$ g으로 10분간 원심분리하여 DNA를 수거하였다. 형성된 pellet은 80% 에탄올로 씻어 주고 TE buffer(10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA)에 녹여서 -20 $^{\circ}$ C에 보관하고, 소량의 digested DNA에 GenomeWalker Adaptor primer(Clontech, Universal GenomeWalker kit)를 넣어 16 $^{\circ}$ C에서 16시간 이상 ligation을 유도하였다. 마지막으로 75 $^{\circ}$ C에서 5분간 방치하여 반응을 정지시키고 PCR의 template로 사용하였다.

제조된 GenomeWalker library는 다음과 같은 조건으로 primary PCR을 실시하였다. Deionized H<sub>2</sub>O, 1/10 vol. 10X Tth PCR buffer, 1.1 mM magnesium acetate, 0.2 mM dNTP, 10 $\mu$ M adaptor primer 1, 50X Advantage Genomic polymerase Mix, 10 $\mu$ M gene specific primer 1, each Genome Walker library; 7 cycle: 94 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 3분; 32 cycle: 94 $^{\circ}$ C 30초, 67 $^{\circ}$ C 3분, 67 $^{\circ}$ C 7분. 형성된 PCR 산물은 1/10로 희석하여 동일 조건으로 primer를 바꾸어 secondary PCR을 실시하였다. PCR로 얻은 각각의 product는 1% agarose gel에서 확인한 다음, pCR2.1-TOPO vector(Invitrogen)를 사용하여 subcloning하였다.

#### 나) Constructon of stsy promoter-GUS fusion gene

pCR2.1-TOPO vector(Invitrogen)에 subcloning 되어 있는 genomic clone에서 promoter만을 증폭, 사용하기 위하여 PCR primer를 새롭게 제작하였다. primer는 5' end sense에 XbaI 제한 효소 site를, 3' end sense에는 Bam HI 제한 효소 site를 첨가하여 해당 primer로 증폭하여 얻은 산물은 다시 pCR2.1-TOPO vector(Invitrogen)에 subcloning하고 제한 효소를 처리하고 agarose gel에 걸어 해당 절편만을 elution(Viogene, DNA.RNA extraction kit)하여 소량의 TE buffer에 녹였다. 준비한 DNA 시료는 동일 제한 효소를 처리한 pBI IOI.1(CLONETECH)과 vector:insert 비율을 1:8로 1 unit의 T4 DNA ligase을 첨가하여 16 $^{\circ}$ C에서 16시간 반응을 유도하고 E. coli에 형질 전환하였다

#### 2) 유전자 발현 분석

##### 가) E. coli의 형질 전환

E. coli 형질 전환은 TOPO TA cloning kit(Invitrogen)에서 제공되는 방법



에 기초하여 수행하였다. TOPO TA cloning은 ligase나 제한 효소부위를 첨가한 primer 없이 Taq-polymerase에 의해 증폭된 PCR 산물을 수분내에 cloning하는 특징을 지닌다. 증폭된 PCR 산물은 pCR2.1-TOPO vector와 섞어서 상온에서 5분간 방치한 후, 얼음에 방치하여 ligation을 종료하였다. Ligation 혼합물의 일부를 50  $\mu$ l의 competent cell(TOP 10)과 섞어 얼음에 30 분간 방치한 후, 250  $\mu$ l의 SOC 액체 배지를(2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glucose) 넣고 37°C에서 1 시간 동안 200 rpm으로 배양 시켰다. 배양액 100  $\mu$ l를 50  $\mu$ g/ml의 ampicillin이 함유된 LB 고체 배지에 X-gal과 같이 도말하여 37°C에서 16 시간 이상 배양함으로써, insert가 ligation이 된 형질 전환체인 white colony를 선별하였다.

#### 나) Agrobacterium 형질 전환

E. coli에 형질전환 한 후, 해당 construct이 들어감을 확인하고 1 $\mu$ g의 DNA를 분리하여 Agrobacterium tumefaciens LBA 4404는 freeze-thaw 방법으로 형질전환하였다. competent cell은 얼음에 꽂아 두고 1  $\mu$ g의 해당 construct DNA를 첨가한 후, 얼음에 5분간 방치하고 액체 질소에 5분, 37°C에 5분간 반응시켰다. 1 ml의 YMB 액체 배지를 섞어서 27°C, 170 rpm으로 2-4시간을 진탕 배양 후 kanamycin이 첨가된 MS 고체 배지에 도말하고 27°C에서 이틀 정도 배양하여 형질 전환된 colony를 얻었다. 형질 전환된 colony는 YMB 액체 배지에서 키우고 DNA를 추출하여 확인 한 후, 담배 형질 전환에 사용하였다.

#### 다) Arabidopsis 형질 전환

해당 construct로 형질 전환된 Agrobacterium을 23°C에서 약 2주간 키운 Arabidopsis ecotype Col-0에 flow-dip method를 사용하여 형질전환 하였다. seed를 다시 kanamycin이 들어간 MS 배지에서 selection 해서 Gus assay에 사용하였다.

#### 라) GUS staining

MS 최소 배지에서 이틀간 배양한 stsy promoter-GUS가 들어간 조직을 두 그룹으로 나뉘어서 한 그룹은 UV를 20분간 처리하였다. UV 처리 및 비처리 조직을 1 mM X-glucuronic acid(X-gluc)를 포함한 GUS solution(50 mM phosphate buffer(pH 7.4), 3 mM potassium ferricyanide, 3 mM potassium

ferrocyanide)에 37°C에서 24시간 반응시켰다. Dehydration은 50%, 70%, 90% 에탄올에 각각 30분씩 방치한 후, 마지막으로 70% 에탄올에 넣어서 색소를 완전히 제거하고 GUS 발현을 확인하였다.

#### 마) Transient analysis

Stsy promoter의 기능을 확인하기 위한 transient assay는 해당 construct(stsy promoter-GUS)와 함께 대조군으로 pBI 121을 사용하였다. Particle bombardment assay를 실시하기 위하여 거봉 과피를 직경 1 cm가 되도록 잘라서 MS 최소 배지에(Duchefa, MS including vitamin, 30% sucrose, 0.8% agar pH 5.6-5.8) 올려서 Bio-Rad Biolistic PDS-1000/HE Particle Delivery System에 장착하였다. 15-in Hg의 chamber vacuum으로 target distance를 3 cm로 잡고 1,500-psi particle acceleration pressure를 걸어 주었다. 해당 plasmid DNA는 Bio-Rad의 방법대로 3 mg microcarrer를, DNA 5  $\mu$ g과 50  $\mu$ l CaCl<sub>2</sub>(2.5M), 20  $\mu$ l spermidine(0.1 M)을 첨가하여 상온에서 침전시킨 후 각각 70%, 100% 에탄올로 wash하고 최종 100% 에탄올에 녹여 사용하였다.

Particle Delivery System을 사용하여 stsy promoter-GUS 및 pBI 121이 일시적으로 도입된 조직은 MS 최소 배지에서 이틀간 배양 후 histochemical analysis를 실시하였다.

### 3) 유전자 발현 최적인자 탐색

#### 가) Campbell early에 대한 stress 처리

수확 후의 campbell early 포도의 berry를 UV는 254nm 파장, 30cm 거리에 서 시간별로(5분, 10분, 30분)간 처리하고 상온에 24시간 방치한 것과 48시간 방치한 포도를 액체 질소를 사용하여 급냉하였다. 0.1%,0.5% yeast extract 용액에 berry를 24시간 담구었고 MJ, BA, SA hormone은 농도와 시간 별로 담가 처리한 후 동일한 방법으로 급냉하여 -70°C에 보관하였다.

#### 나) RNA 분리

Campbell early 포도송이를 stress를 처리한 후 skin, flesh를 분리하여 -80°C에 보관하였다. Skin을 막자사발로 고운 가루로 만든 후 조직 gram 당 5 ml의 extraction buffer(2% CTAB, w/v; 1.4 M NaCl; 1% PVP, w/v; 0.2%  $\beta$ -mercaptoethanol, v/v; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl, pH 9.0; 0.4 g

PVPP/g)를 첨가하였다. 그리고 막자를 이용하여 갈려진 조직과 buffer를 잘 섞어 주었다. 그런 뒤 1.5 ml의 microcentrifuge tube로 옮겨 60℃의 항온 수조에서 10분간 정치시켰다. 동량 phenol:chloroform: isoamylalcohol(25:24:1, v/v/v)을 첨가하여 혼합시킨 뒤 12,000 ×g로 원심 분리했으며 이 과정을 두 번 반복하였다. 상층액은 새로운 tube로 옮겨서 0.6 배의 isopropanol을 넣고, -20도씨에서 40 분간 침전시킨 뒤, 12,000 ×g로 20분간 원심분리 하여 nucleic acid pellet을 얻었다. Pellet은 0.6 ml의 DEPC(diethyl pyrocarbonate) 처리가 된 멸균된 증류수를 넣고 녹인 뒤 동량의 4 M LiCl를 넣고 4℃에서 침전을 시킨 뒤, 70% ethanol로 씻고 10 μl의 DEPC 처리 멸균 증류수에 녹여서 -80℃에 보관하며 사용하였다. UV 정량은 UV spectrophotometer(Perkin elmer, USA)를 사용하였고, 1.8%의 formyldehyde가 들어있는 denaturing agarose gel에서 RNA 분리 상태를 확인하였다. Total RNA 등 RNA 시료는 UV Spectrophotometer와 RNA gel을 사용하여 그 질을 측정하였다.

#### 다) Reverse transcription - polymerase chain reaction

Skin에서 분리한 2 μg의 total RNA를 oligo dT primer를 첨가하여 75℃ 5분간 반응시키고 M-MLV reverse transcriptase(Promega)를 첨가하여 37℃ 1시간 반응하여 cDNA를 합성하고, PCR의 template로 사용하였다. 이미 보고된 Shiraz 포도의 stilbene synthase cDNA의 염기 서열을 분석하여 open reading frame의 시작 및 끝 부위로부터 PCR primer를 구상하여 제조하였다. Sense 및 antisense 방향의 primer는 각각 다음과 같다; 5' ATGGC TTCAG TCGAG GAAATT 3', 5' TTAAT TTGTC ACCAT AGGAAAG 3'. PCR 반응은 일반적인 방법에 따라 수행하였으며, 94℃에서 40 초, 51℃에서 40초, 그리고 72℃에서 40 초, 27 cycle을 반복하였다. PCR product를 gel에서 확인하였다.

#### 다. 연구결과

##### 1) stsy-GUS transient expression system 개발

포도 수확 후 resveratrol 합성 유전자의 조절인자를 탐색하기 위한 reporter gene construct를 제작하고자 stsy 유전자를 클로닝하였다. 이미 genomic Southern blot 분석을 통해 포도 게놈내에는 적어도 3-4 개 이상의 stsy 유사 유전자군이 존재하는 것을 알았다. 이들 유전자 중 특히 포도 과실에서 주로 발현되는 유전자를 선별하고 유전자의 발현을 조절하는 부위인 promoter를 분

리하고자 PCR-based DNA walking 방법을 사용하여 promoter 부위를 포함하는 4개의 서로 다른 genomic clone을 얻었다. 이들 clone의 ORF간의 DNA 염기 서열은 100% 일치하며, promoter region은 90% 이상의 유사성을 가지고 있었다(Figure 1-1).

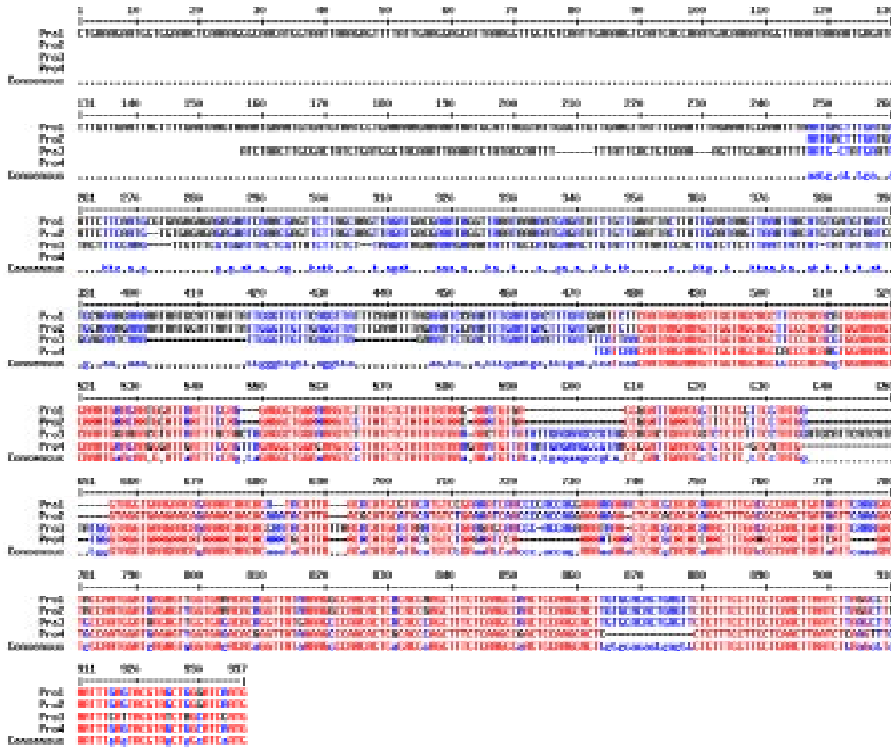


Figure 1-1. Comparison of the nucleic acid sequences of the grape *stsy* promoters 1, 2, 3, 4.

Pro1, *stsy* promoter 1 amplified from PvuII libraries; pro2, *stsy* promoter 2 amplified from DraI libraries; pro3, *stsy* promoter 3 amplified from EcoRV libraries; pro4, *stsy* promoter 4 amplified from EcoRV libraries.

먼저 4개의 clone 중 가장 긴 clone(pro1이라 명명)의 DNA 염기 서열을 분석한 결과, transcription start site로부터 95 bp의 untranslated leader sequence와 coding region의 첫번째 codon(Met)을 포함하고 있었다. 그리고 transcription start site로부터 33 bp 떨어진 곳에 TATA box를 시작으로 GATA motif와 , ethylene에 반응하는 GCC-box, CAAT, HES(heat response element, position at -317,-112,-98), WUN(wound response element, position

at -665,-583,-453,-370,-265), G box(position at -426,-294,-151,-105), GT 1(GGTTAA, position at -691,-479,-372), AS-1(position at -89)이 존재하고 있으며 promoter 전체에 걸쳐 light에 반응하는 I box, AE box, GAG motif 등의 cis-acting element들이 분포되어 있다. 그리고 -702--532 (X1이라고 명명), -490--319(X2라고 명명) 부위에는 2 개의 repeat 구조가 존재한다. 이 repeat 구조의 염기서열은 서로 98% 일치하며 2%의 차이에 의해 X2에는 G box가 한 개 있고 GT 1은 2개 있다.

분리된 4 개 유전자의 ORF의 염기서열이 같아서 일반적인 northern blot 분석 방법이나 RT-PCR 방법으로는 각 유전자의 조직 특이성을 구별할 수 없어서, 4개의 promoter를 각각 GUS와 fusion시킨 reporter gene construct를 제작한 다음 transient assay 혹은 transgenic assay를 통해 이들 promoter의 활성을 분석하고자 하였다(Figure 1-2).

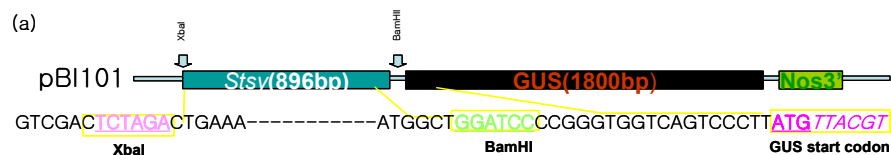


Figure 1-2. The physical map of the *stsy* promoter 1-GUS construct.

## 2) 유전자 발현 분석

promoter-GUS fusion gene construct(Figure 2)를 particle delivery system을 사용하여 포도에 주입함으로써 transient analysis를 수행하였다. Transient expression을 통한 *stsy* promoter 1의 기능을 알아보기 위하여 대조군으로 사용된 pBI 121(CaMV 35S promoter::GUS)은 거봉 과피 및 과육에서 GUS 발현을 보임으로 transient expression assay에 사용된 조건이 거봉의 생장에 영향 없이 제대로 기능함을 확인하였다. *stsy* promoter 1::GUS도 거봉 과피 부위에서 GUS를 발현함으로써 확보한 *stsy* promoter 1이 in vivo에서도 기능하는 clone임을 확인할 수 있었다. 또한 *stsy* promoter 1::GUS는 거봉의 과피에서 뿐만 아니라 과육 부위에서도 GUS 발현을 보임으로 해당 promoter에 의한 과육에서의 *stsy* 발현이 가능할 수 있음을 시사해 준다(Figure 1-3).

(a)



(b)



(c)



Figure 1-3. Histochemical analysis of stsy promoter 1 in grapevine by transient expression.

(a) pBI 121 as a positive control

(b) stsy promoter 1/GUS - no UV treatment

(c) stsy promoter 1/GUS - 20 min UV-treatment

이러한 실험 결과는 stable transformation을 통하여 완전한 개체를 만든다면 환경 stress에 따라 promoter의 activity가 어떻게 달라질 수 있는지를 실험하여 promoter를 최상으로 activation시킬 수 있는 인자를 개발 할 수 있게 될 것으로 생각된다. 다만, transient expression 유도 시 UV에 의한 발현 증가는 보이지 않았다. 이는 UV 및 fungal infection 등의 환경 stress가 가해질 경우, stsy transcript 양이 급격히 증가했다가 빠르게 감소한다는 연구 결과를 볼 때, 실험과정 중 이틀간의 배양 시간 동안 stsy promoter 1에 의한 GUS 발현도 증가했다가 다시 급격히 감소했을 가능성이 크다고 판단된다.

한편, 4개의 promoter를 각각 GUS와 fusion시켜 Arabidopsis에 형질전환한 후 GUS assay를 수행한 결과, stsy promoter 1이 silique에서 발현되는 것을

확인할 수 있었다(Figure 1-4).

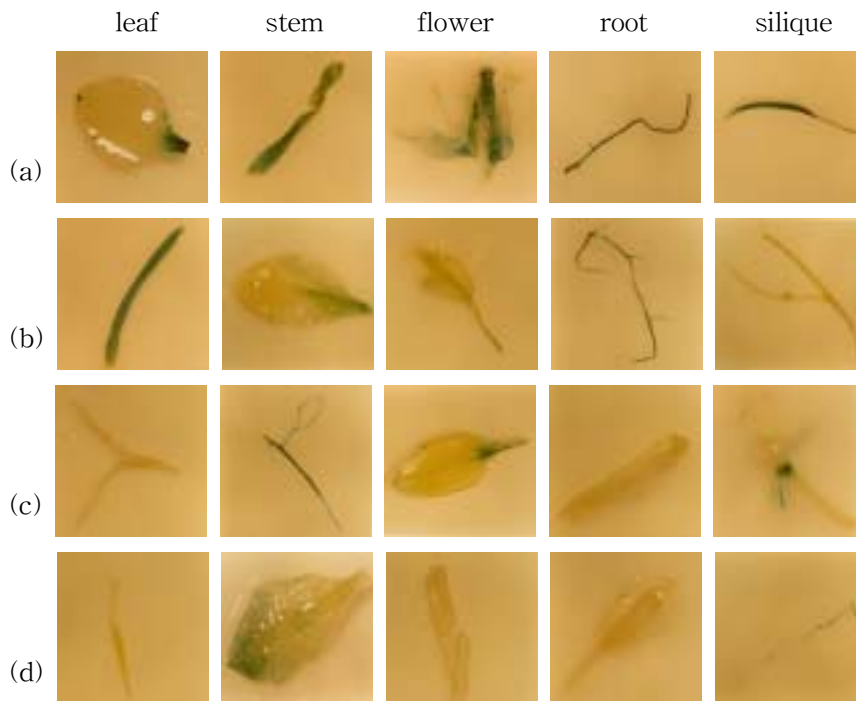


Figure 1-4. Histochemical assay of *stsy* promoters 1, 2, 3, 4.

(a), *stsy* pro1; (b), *stsy* pro2; (c), *stsy* pro3; (d), *stsy* pro4

그러므로 비록 *Arabidopsis*는 과실이 없지만, 4개의 *stsy* gene promoter 중 적어도 *stsy* pro1이 과실에서도 발현할 가능성이 높을 것으로 사료되었다. 따라서 promoter1::GUS fusion gene construct(Figure 1-2)를 도입한 *Arabidopsis* 형질 전환체에 외부 환경 stress를 처리하여 promoter 1이 환경 stress에 의해 조절되는 정도를 비교하였다(Figure 1-5).



Figure 1-5. GUS expression in wild type and transgenic seedlings treated with UV,  $\text{AlCl}_3$  and yeast extract.

1,transgenic seedlings without any treatment; 2,transgenic seedlings treated with UV (304 nm) for 15 min; 3,transgenic seedlings treated with 0.1% yeast extract for 24 hr; 4,transgenic seedlings treated with 0.5% yeast extract for 24 hr; 5,transgenic seedlings treated with 75 mM  $\text{AlCl}_3$  for 24 hr; 6,transgenic seedlings treated with 100 mM  $\text{AlCl}_3$  for 24 hr.

환경stress를 처리하지 않은 형질 전환체에서는 뿌리에서 약한 발현을 보였으나, UV, yeast extract 등을 처리하면 잎과 뿌리에서 모두 GUS 유전자의 발현이 유도되었다. UV를 처리했을 때는 뿌리와 잎에서 강하게 발현했고 yeast extract의 경우에는 0.5% 농도에서 가장 잘 유도되었다. 그러나  $\text{AlCl}_3$ 의 경우에는 75 mM 농도에서 발현이 더 잘 유도되지만 UV나 yeast extract에 비해서는 약하였다. 이와 같이 유도 양상이 조금씩 다른 이유는 각각의 stress 처리를 인지하는 receptor 혹은 세포내 신호 전달 인자가 각 stress마다 다르다는 것을 제시하는 결과라고 사료된다.

포도에서는 본래 UV나 곰팡이 감염과 같은 stress에 의해 잎이나 과실에서 stsy 유전자의 발현이 유도된다고 보고되었다. 모델 식물인 *Arabidopsis* 형질 전환체를 사용한 본 실험으로부터 UV 등과 같은 환경 인자에 의해 잎, 줄기, 뿌리에서도 stsy 유전자의 발현이 유도된다는 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 형질전환체의 반응을 분석하면 resveratrol의 합성을 유도하는 다양한 환경인자를 탐색할 수 있다는 것을 제시해 주는 것이다.



### 3) 유전자 발현 최적인자 탐색

stsy 유전자의 promoter를 도입한 Arabidopsis 형질전환체를 분석한 결과를 바탕으로 stsy 유전자가 UV, yeast extract, AlCl<sub>3</sub> 등에 의해서 유도된다는 것을 확인하였다. 앞의 실험에서 사용한 stress 조건을 이용하여 포도 과실에서 stsy transcript의 합성이 유도되는지를 RT-PCR로 확인하였다.

먼저 가장 크게 stsy transcript의 합성을 유도하는 UV의 경우 5분, 10분, 30분 등 처리 시간대별로 stsy transcript 합성의 정도를 비교하였다(Figure 1-6).

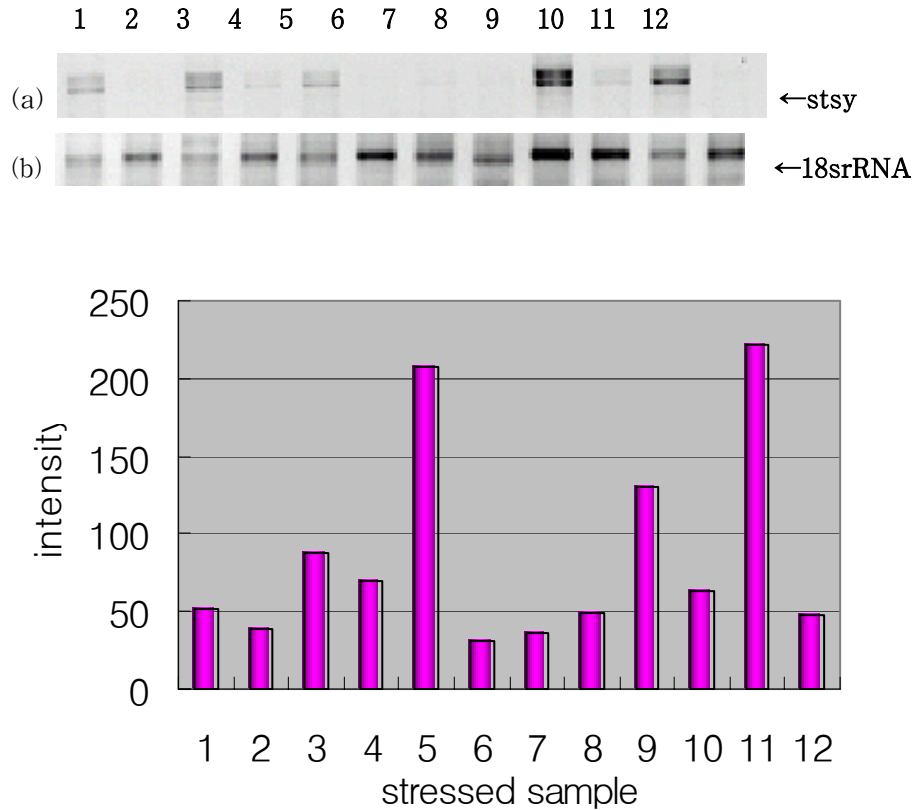


Figure 1-6. Grapevine berries treated with UV.

1, UV5min; 2, Control; 3, UV 10min; 4, Control; 5, UV30min; 6, Control,(after 24hr freezed); 7, UV 5min; 8, control; 9, UV10min; 10, control; 11, UV 30min; 12, control (after 48hr freezed)

UV 5분 처리 후 24시간이 지나면 stsy transcript는 사라진다. 그러나 UV를 10분 이상 처리하였을 경우에는 48시간이 지나서도 stsy 유전자 발현이 계속

유도되었다. 따라서 UV의 경우 10분이상 처리해야 할 것으로 생각된다. 그리고 UV를 처리한 후 방치하는 시간은 24 시간과 48 시간의 차이가 거의 없었다. 또한 UV와 오존을 함께 2 시간 처리했을 때는 UV를 단독 처리했을 때 보다 stsy transcript의 합성이 더 많이 유도되었다(Figure 1-7).

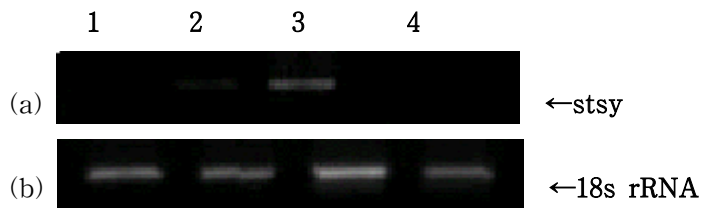


Figure 1-7. Grapevine berries treated with stresses for 2hour.  
 1. control in R.T ; 2. control in water ; 3, UV 10min+O3 ; 4. UV 10min+0.1%Yeast Extract

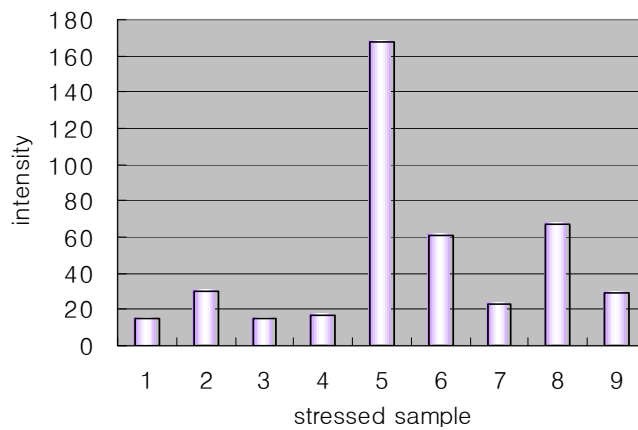
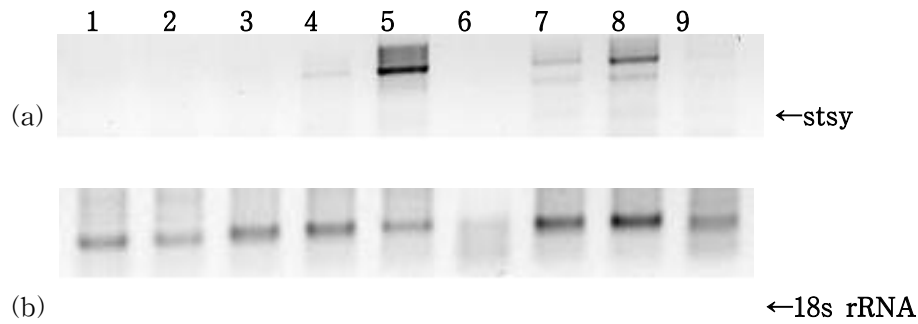


Figure 1-8. Grapevine berries treated with 200uM methyl jasmonate(MJ).  
 1, MJ 1h; 2, UV 15min+MJ 1h; 3, control; 4, MJ 6h; 5, UV15+MJ 6h; 6,

control; 7, MJ 24h; 8, UV15+MJ 24h; 9, control

200 uM methyl jasmonic acid(MJ)의 경우에는 단용 처리에 비해 UV와 함께 혼용처리했을 때 stsy transcript의 합성이 더 많이 유도되는 것을 확인하였다(Figure 1-8). 그리고 1시간, 6시간, 24시간 처리한 결과, 6시간 때 가장 많이 stsy transcript가 합성된 것으로 보아, UV를 15분간 처리한 후 6시간 동안 MJ를 처리하는 것이 가장 효율적으로 stsy 유전자를 유도하는 것으로 생각된다.

BA의 경우 100 uM 농도에서 처리 시간이 5시간 이상 되면 stsy transcript가 합성되었다. 그러나 200 uM 농도로 1시간 처리했을 때는 50 uM과 100 uM을 24시간 처리한 것보다 훨씬 많은 stsy transcript의 합성이 유도되었다(Figure 1-9). 따라서 저장 과정 중 BA를 처리하려면 100 uM 농도에서는 12시간을, 200 uM 농도에서는 1시간을 처리할 때 stsy 유전자가 가장 효율적으로 유도될 것으로 사료된다.

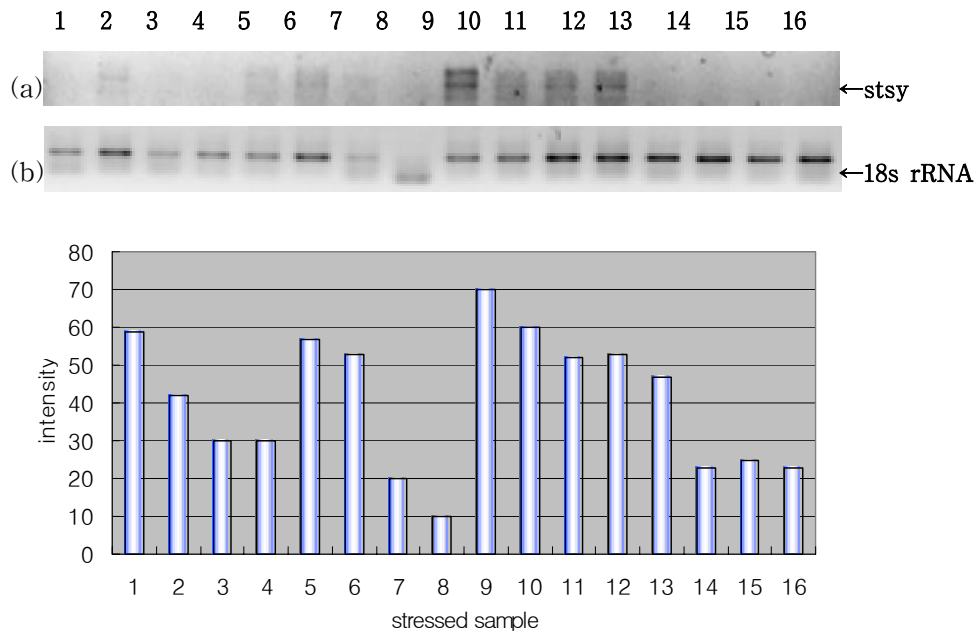


Figure 1-9. Grapevine berries treated with BA(6-benzylamino purine).

1, BA 50uM 1h; 2, 5h; 3, 12h; 4, 24h; 5, BA 100uM 1h; 6, 5h; 7, 2h; 8, 24h; 9, BA 200uM 1h; 10, 5h; 11, 12h; 12, 24h; 13, control 1h; 14, 5h; 15, 12h; 16, 24h

SA의 경우에는 100 uM 농도에서 처리 시간이 24시간 되어야 stsy 유전자

가 induction 되지만 200 uM과 500 uM 농도에서는 1시간 처리했을 때 가장 많은 stsy transcript의 합성을 유도하는 결과를 얻었다(Figure 1-10).

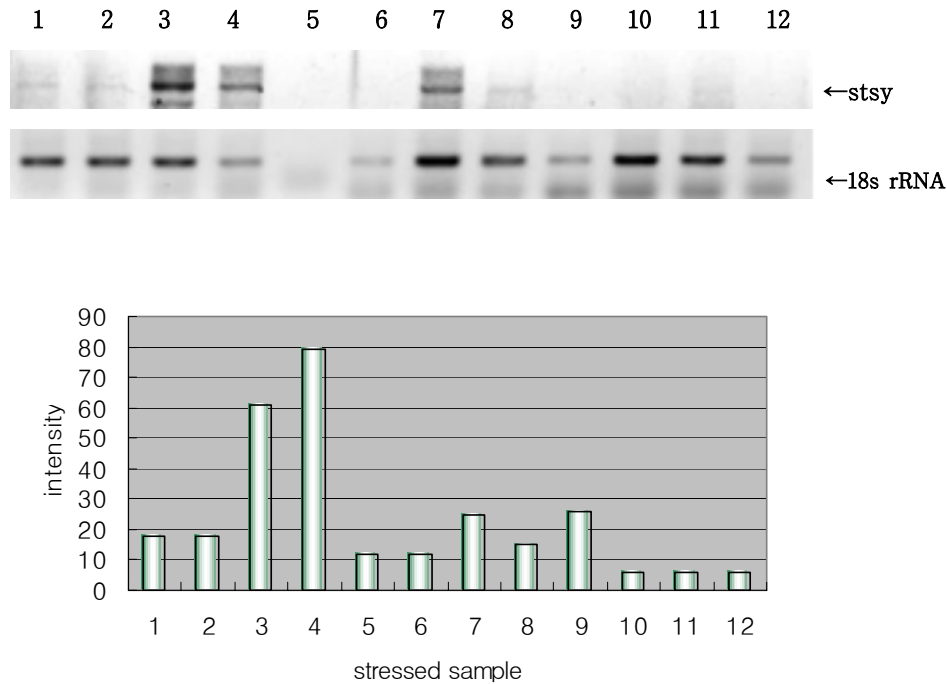


Figure 1-10. Grapevine berries treated with SA(salicylic acid).

1, SA 100uM 1h; 2, 6h; 3, 24h; 4, 200uM 1h; 5, 6h; 6, 24h; 7, 500uM 1h; 8, 6h; 9, 24h; 10, control 1h; 11, 6h; 12, 24h

종합해 보면, UV를 15분간 처리했을 때 stsy transcript를 가장 많이 유도하였으며 O<sub>3</sub>과 UV를 함께 2시간 처리하고, UV 15분 및 200 uM 농도에서 MJ를 6시간 혼용 처리하거나, 200 uM 농도에서 BA를 1시간, 200-500 uM 농도에서 SA를 1시간 처리하는 것이 stsy transcript의 합성이 가장 많이 유도되었다. UV, O<sub>3</sub>, yeast extract 등 외부 환경 stress 반응에 관련된 것으로 알려진 SA, MJ, BA의 처리는 UV, yeast extract 등을 처리한 것과 비슷하게 stsy의 합성을 유도하면서 합성 시간을 줄여주었다. 이는 포도 수확 후 저장 기간 중에도 위와 같은 물리적 인자, 화학적 인자, 생물 인자를 사용함으로써 resveratrol의 함량을 증진시킬 수 있음을 보여주는 결과라 하겠다.

## 2. 레스베라트롤 생합성 유전자 발현 변화 및 환경 조건

### 가. 서론

포도 수확후 레스베라트롤 함량 증진을 위한 유전자 발현 조절 인자를 탐색한 결과를 바탕으로 처리 방법에 따른 레스베라트롤 유전자 발현 변화를 분석하고 환경 조건을 확립하고자 하였다. 이를 위해 다음과 같은 연구를 실시하였다.

#### ① 포도 수확 후 처리 기간 및 방법에 따른 resveratrol 생합성 유전자 발현 변화 분석

포도에 UV, yeast extract(YE), salicylic acid(SA), methyljasmonate(MJ), 6-benzylamino purine(BA) 등의 다양한 stress들을 농도, 세기, 저장온도, 저장기간 등의 조건을 달리하여 처리하고 RT-PCR을 이용하여 stsy 유전자 발현양 분석 resveratrol 합성유도를 위한 최적 조건을 탐색하였다.

#### ② 환경인자 처리별 resveratrol 함량 분석

포도에 UV, yeast extract(YE), salicylic acid(SA), methyljasmonate(MJ), 6-benzylamino purine(BA) 등의 다양한 stress들을 농도, 세기, 저장온도, 저장기간 등의 조건을 달리하여 처리하고 HPLC를 이용하여 resveratrol 함량을 측정하고 환경인자 처리별 resveratrol 합성유도를 위한 최적 조건을 탐색하였다.

#### ③ stsy-GUS 유전자 도입 포도 과실 내 유전자 발현 변화 분석

4가지의 stsy promoter-GUS reporter gene construct들을 bombardment를 이용하여 포도의 과피와 과육에 도입시키고 stress를 처리하여 promoter별 포도 과실 내 유전자 발현 변화를 분석하고 더불어 stress에 의해서 그 양이 증가되는 것을 확인하였다.

### 나. 재료 및 방법

#### 1) 포도 수확 후 처리 시간 및 방법에 따른 resveratrol 생합성 유전자 발현 변화 분석

##### 가) campbell early에 대한 stress 처리

수확 후의 포도 berry를 UV 254nm 파장, 60cm 거리에서 시간별로(5분, 10분, 30분)간 처리하고 4℃에서 24시간 방치한 것과 48시간 방치한 포도를 과피

부분을 분리하여 액체 질소에 담가 급냉하였다. MJ, SA, BA hormon은 1년차와 동일한 농도와 시간으로 4℃에서 처리한 후 동일한 방법으로 급냉하여 -80℃에 보관하였다.

#### 나) RNA 분리

포도송이에 stress를 처리한 후 skin, flesh를 분리하여 -80℃에 보관하였다. Skin을 막자사발로 고운 가루로 만든 후 조직 2.5 gram에 25ml의 extraction buffer(2% CTAB, w/v; 1.4 M NaCl; 1% PVP, w/v; 0.2%  $\beta$ -mercaptoethanol, v/v; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl, pH 9.0; 2.5 g PVPP/g)를 첨가하였다. 그리고 막자를 이용하여 갈려진 조직과 buffer를 잘 섞어 주었다. 그런 뒤 40 ml의 tube로 옮겨 68℃의 항온 수조에서 10분간 정치시켰다. 10ml의 chloroform: isoamylalcohol(25:24:1, v/v/v)을 첨가하여 혼합시킨 뒤 13,000rpm으로 원심 분리했으며 10ml의 phenol:chloroform: isoamylalcohol(25:24:1, v/v/v)을 첨가하여 혼합시킨 뒤 13,000 rpm으로 원심 분리후 다시 10ml의 chloroform: isoamylalcohol(25:24:1, v/v/v)을 첨가하여 혼합시킨 뒤 13,000rpm으로 원심 분리를 했다. 상층액은 새로운 tube로 옮겨서 0.6 배의 isopropanol을 넣고, -20도씨에서 90분간 침전시킨 뒤, 13,000rpm으로 20분간 원심분리 하여 nucleic acid pellet을 얻어 1 ml 70% ethanol을 이용 5분간 원심분리를 통해 씻고 Pellet은 0.6 ml의 DEPC(diethyl pyrocarbonate) 처리가 된 멸균된 증류수를 넣고 녹인 뒤 동량의 4 M LiCl를 넣고 4℃에서 침전을 시킨 뒤, 70% ethanol로 씻고 10  $\mu$ l의 DEPC 처리 멸균 증류수에 녹여서 -80℃에 보관하며 사용하였다. UV 정량은 UV spectrophotometer(Perkin elmer, USA)를 사용하였고, 1.8%의 formaldehyde가 들어있는 denaturing agarose gel에서 RNA 분리 상태를 확인하였다. Total RNA 등 RNA 시료는 UV Spectrophotometer와 RNA gel을 사용하여 그 질을 측정하였다.

#### 다) Reverse transcription - polymerase chain reaction

Skin에서 분리한 2  $\mu$ g의 total RNA를 primer를(oligo dT-UV; random-BA, SA, MJ) 첨가하여 75℃ 5분간 반응시키고 M-MLV reverse transcriptase (Promega)를 첨가하여 37℃ 1시간 반응하여 cDNA를 합성하고, PCR의 template로 사용하였다. 이미 보고된 Shiraz 포도의 stilbene synthase cDNA의 염기 서열을 분석하여 open reading frame의 시작 및 끝 부위로부터 PCR primer를 구상하여 제조하였다. Sense 및 antisense 방향의 primer는 각각 다음과 같다; 5' ATGGC TTCAG TCGAG G 3', 5' AC TCTTC TAACA GATGG CTC 3'. PCR 반응은 일반적인 방법에 따라 수행하였으며, 94℃에서

30 초, 53°C에서 30초, 그리고 72°C에서 30 초, 25 cycle을 반복하였다. PCR product를 gel에서 확인하였다.

## 2) 환경인자 처리별 resveratrol 함량 분석

가) 1)의 가)와 동일

나) HPLC 분석

식물체의 resveratrol 함량은 HPLC 분석법에 의해 측정되었다. 추출된 시료를 0.1g당 1ml의 Acetonitrile을 가하여 0.45 $\mu$ m Nylon filtering하여 diode-array UV detector를 가진 HPLC(Agilent 1100 Series)에 주입하였다. 컬럼은 reverse-phase C-18(5 $\mu$ m, 4.6 × 150mm, Hewlett Packard)를 사용하였다. HPLC 분석 조건은 다음과 같다. Acetonitrile/water를 용매로하여 gradient 조건 하에서 0.5 ml/min의 유동속도로 35분간 작동시켰다. 이때 시료 주입량은 25 $\mu$ l이었고, 용매의 gradient 조건은 55:45 acetomitrile/water로 하였으며, resveratrol peak은 18분에서 측정되었다. 한편, 표준물질로는 Sigma-Aldrich (USA)의 reveratrol을 구입하여 사용하였다.

## 3) stsy-GUS 유전자 도입 포도 과실 내 유전자 발현 변화 분석

가) Transient analysis

Stsy promoter의 기능을 확인하기 위한 transient assay는 해당 construct (stsy promoter-GUS)와 함께 대조군으로 pBI 121을 사용하였다. Particle bombardment assay를 실시하기 위하여 포도 과피를 직경 1 cm가 되도록 잘라서 MS 최소 배지에(Duchefa, MS including vitamin, 30% sucrose, 0.8% agar pH 5.6-5.8) 올려서 Bio-Rad Biolistic PDS-1000/HE Particle Delivery System에 장착하였다. 15-in Hg의 chamber vacuum으로 target distance를 3 cm로 잡고 1,500-psi particle acceleration pressure를 걸어 주었다. 해당 plasmid DNA는 Bio-Rad의 방법대로 3 mg microcarrer를, DNA 5  $\mu$ g과 50  $\mu$ l CaCl<sub>2</sub>(2.5M), 20  $\mu$ l spermidine(0.1 M)을 첨가하여 상온에서 침전시킨 후 각각 70%, 100% 에탄올로 wash하고 최종 100% 에탄올에 녹여 사용하였다. Particle Delivery System을 사용하여 stsy promoter-GUS 및 pBI 121이 일시적으로 도입된 조직은 MS 최소 배지에서 이틀간 배양 후 histochemical analysis를 실시하였다.

## 나) GUS staining

MS 최소 배지에서 이틀간 배양한 stsy promoter-GUS가 들어간 조직을 두 그룹으로 나뉘어서 한 그룹은 UV를 20분간 처리하였다. UV 처리 및 비처리 조직을 1 mM X-glucuronic acid(X-gluc)를 포함한 GUS solution(50 mM phosphate buffer(pH 7.4), 3 mM potassium ferricyanide, 3 mM potassium ferrocyanide)에 37°C에서 24시간 반응시켰다. Dehydration은 50%, 70%, 90% 에탄올에 각각 30분씩 방치한 후, 마지막으로 70% 에탄올에 넣어서 색소를 완전히 제거하고 GUS 발현을 확인하였다.

## 다. 연구결과

### 1) 포도 수확 후 처리 시간 및 방법에 따른 resveratrol 생합성 유전자 발현 변화 분석

Stsy 유전자의 promoter를 도입한 Arabidopsis 형질전환체를 분석한 결과를 바탕으로 stsy 유전자가 UV, yeast extract, AlCl<sub>3</sub> 등에 의해서 유도된다는 것을 확인하였다. 앞의 실험에서 사용한 stress 조건을 이용하여 4°C에서 처리시에 포도 과실에서 stsy transcript의 합성이 얼마나 유도되는지를 RT-PCR을 통해서 확인하였다.

먼저 가장 크게 stsy transcript의 합성을 유도하는 UV의 경우 5분, 10분, 30분 등 시간대별로 처리한 후 4°C에서 0시간, 24시간, 48시간만큼 incubation 하여 stsy transcript 발현 정도를 RT-PCR한 결과 각 control에 비해 1.03-2배 증가하였다. 그 중 UV를 5분 처리한 후 48시간 incubation한 것이 2배로 stsy transcript의 양이 가장 많이 증가하였다. 반면에 몇 가지 조건에서는 0.54-0.91 배로 감소된 경우도 있었다(Figure 1-11).



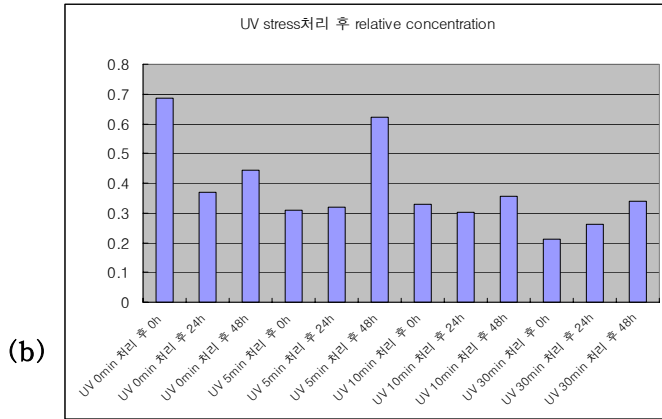
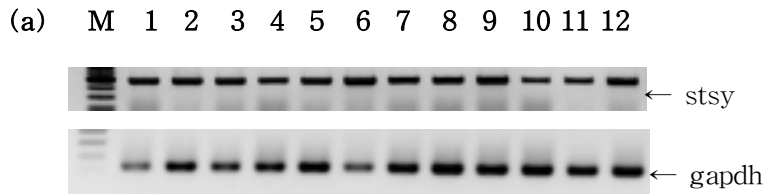


Figure 1-11. Grapevine skin treated with UV (a) RT-PCR band (b) RT-PCR graph.

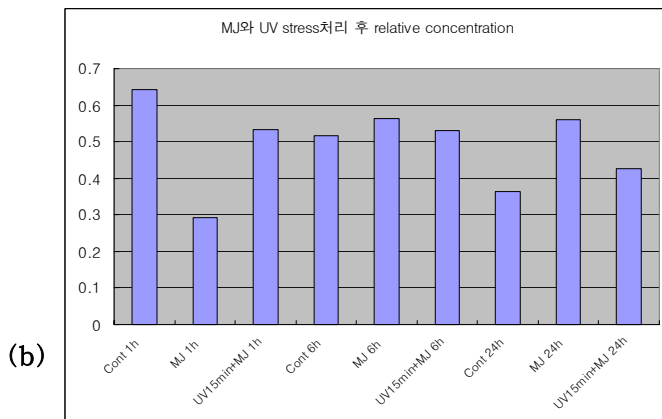
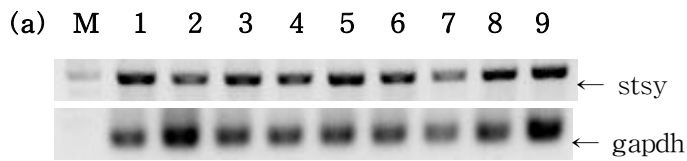


Figure 1-12. Grapevine skin treated with 200uM methyl jamonate(MJ). (a) RT-PCR band (b) RT-PCR graph

200 uM methyl jasmonic acid (MJ)을 4°C에서 각 1시간, 6시간, 24시간 단용 처리한 경우와 UV를 15분 처리한 것에 MJ를 4°C에서 각 1시간, 6시간, 24시간 혼용 처리한 것을 RT-PCR한 결과 각 control에 비해 1.02-1.54배의 증가가 되었다. 그중 MJ를 24시간 단용 처리한 경우가 1.54배로 stsy transcript의 양이 가장 많이 증가하였다. 반면에 몇 가지 조건에서는 0.45-0.83배로 감소된 경우도 있었다(Figure 1-12).

SA의 경우에 4°C에서 100uM, 200uM, 500uM의 SA를 각 1시간, 6시간, 24시간으로 처리한 것을 RT-PCR한 결과 각 control에 비해 1.01-1.08배의 증가가 되었다. 그중 SA를 500uM을 24시간 처리한 경우가 1.08배로 stsy transcript의 양이 가장 많이 증가하였다. 반면에 몇 가지 조건에서는 0.4-0.97배로 감소된 경우도 있었다(Figure 1-13).

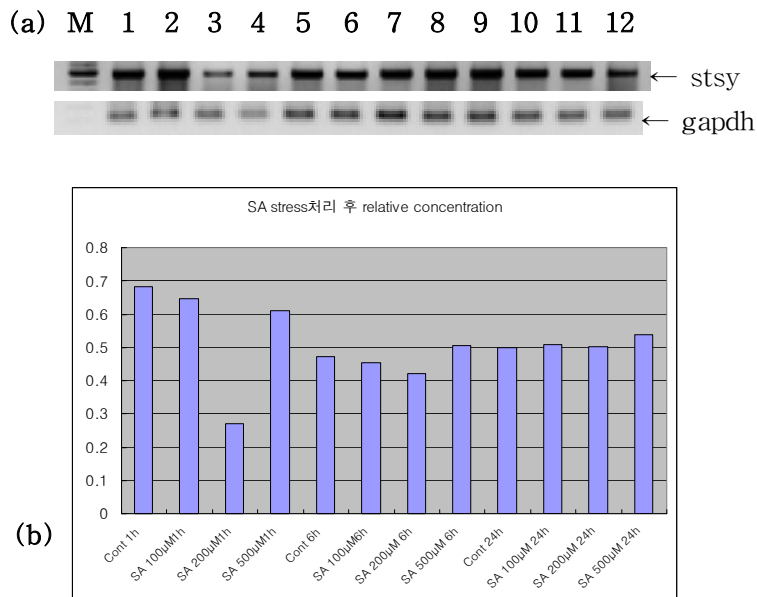
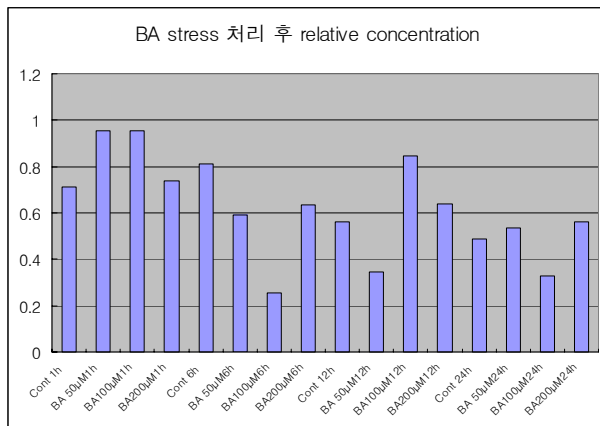
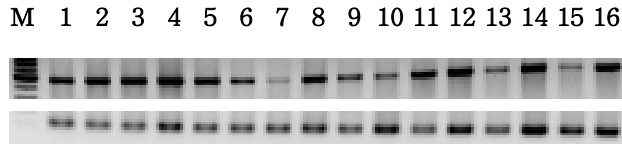


Figure 1-13. Grapevine skin treated with SA(salicylic acid)

(a) RT-PCR band (b) RT-PCR graph

BA의 경우에 4°C에서 50uM, 100uM, 200uM의 BA를 각 1시간, 6시간, 12시간, 24시간으로 처리한 것을 RT-PCR한 결과 각 control에 비해 1.04-1.5배의 증가가 되었다. 그중 BA를 100uM을 12시간 처리한 경우가 1.5배로 stsy transcript의 양이 가장 많이 증가하였다. 반면에 몇 가지 조건에서는 0.31-0.78배로 감소된 경우도 있었다(Figure 1-14).

(a)



(b)

Figure 1-14. Grapevine skin treated with BA(6-benzylamino purine).

(a) RT-PCR band (b) RT-PCR graph

## 2) 환경인자 처리별 resveratrol 함량 분석

RT-PCR분석과 동일한 stress 조건을 처리한 samples의 resveratrol 함량을 HPLC 분석을 통하여 확인하였다.

UV의 경우 HPLC 분석 결과 각 control에 비해 1.09-3.02배 증가가 되었다. 그 중 UV를 10분 처리한 후 4°C에서 24시간 incubation한 것이 3.02배로 resveratrol 함량이 가장 많이 증가하였다. 감소된 경우는 없었다(Figure 1-15).

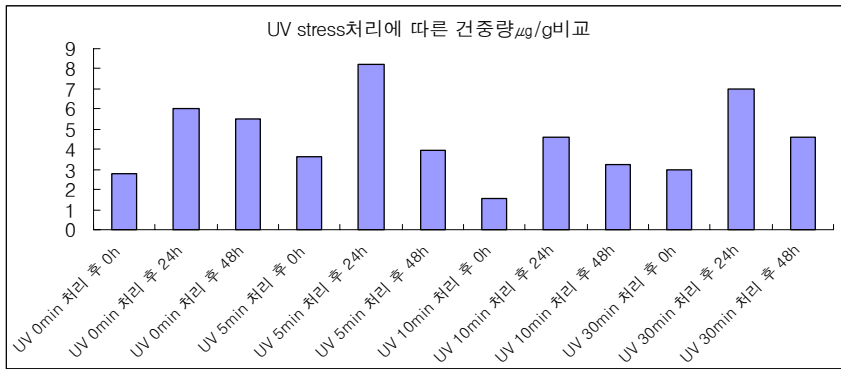


Figure 1-15. Resveratrol content of grapevine skin treated with UV

MJ의 경우 HPLC 분석 결과 각 control에 비해 2.13-8배 증가가 되었다. 그 중 MJ를 6시간 단용 처리한 것이 8배로 resveratrol 함량이 가장 많이 증가하였다. 반면에 몇 가지 조건에서는 0.2-0.75배로 감소된 경우도 있었다(Figure 1-16).

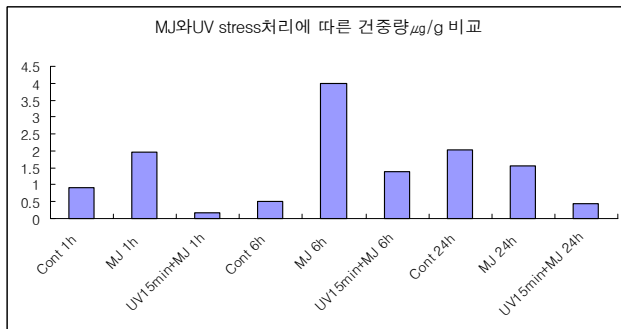


Figure 1-16. Resveratrol content of grapevine skin treated with 200uM methyl jamonate(MJ)

SA의 경우 HPLC 분석 결과 각 control에 비해 1.07-4.84배 증가가 되었다. 그 중 500uM SA를 1시간 처리한 것이 4.84배로 resveratrol 함량이 가장 많이 증가하였다. 반면에 500uM SA를 24시간 처리한 조건에서는 0.4배로 감소되었다(Figure 1-17).

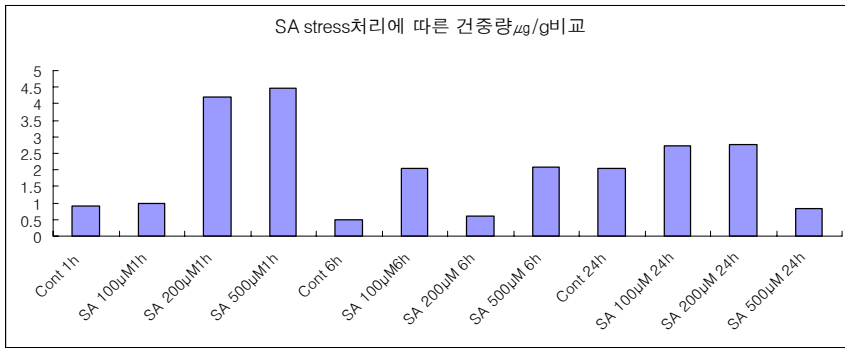


Figure 1-17. Resveratrol content of grapevine skin treated with SA(salicylic acid).

BA의 경우 HPLC 분석 결과 각 control에 비해 1.21-11.59배 증가가 되었다. 그 중 100 $\mu\text{M}$  BA를 6시간 처리한 것이 11.59배로 resveratrol 함량이 가장 많이 증가하였다. 반면에 100 $\mu\text{M}$  BA를 24시간 처리한 조건에서는 0.38배로 감소되었다(Figure 1-18).

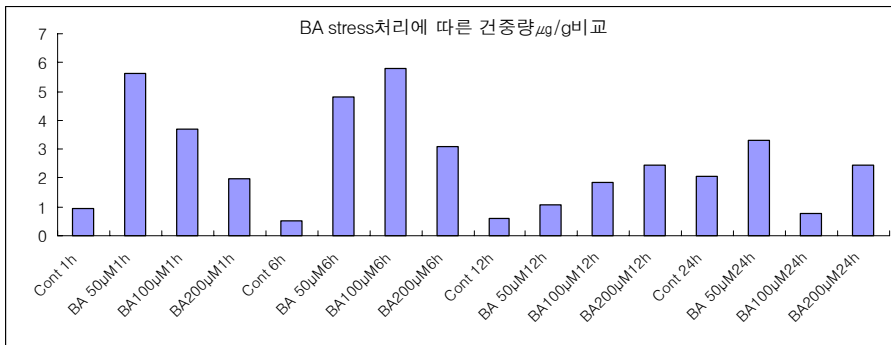


Figure 1-18. Resveratrol content of grapevine skin treated with BA(6-benzylamino purine)

포도의 품질의 유지하기 위해서는 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관 하여야하기 때문에 위의 결과를 보았을 때 stsy transcript의 발현양은 UV를 5분 처리한 후 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 48시간 incubation한 조건에서 2배 증가했었고 resveratrol 함량은 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 100 $\mu\text{M}$  BA를 6시간 처리한 조건에서 11.59배 증가한 결과를 보았을 때 기존에 포도 수확 후 저장 기간 중 물리적 인자, 화학적 인자, 생물 인자를 처리하

여 stsy transcript의 발현양과 resveratrol의 함량을 증진시키고자할 경우 이 두 조건으로 처리하는 것이 이상적일 것이다.

### 3) 청정포도 내 stsy-GUS 유전자 발현 안정성 평가

stsy-GUS construct를 이용하여 포도내 resveratrol 합성 유전자의 발현이 안정적으로 지속되는 것을 간접적으로 확인하였다.

## 3. 포도 수확후 처리에 따른 레스베라트롤 함량 분석 및 대사 안정성 평가

### 가. 서론

포도 수확후 레스베라트롤 함량 증진을 위한 처리를 한 후 증진된 레스베라트롤 함량을 분석 하고 대사 안정성을 평가하고자 하였다. 구체적인 연구의 내용은 다음과 같다.

#### ① 환경 인자 처리별 resveratrol 함량 분석

포도에 UV stress 처리 후 SA, YE, BA, MJ등을 추가적으로 처리하여 UV 단용 처리 보다 induction 효과가 더 증가되는지 HPLC로 resveratrol의 함량을 측정하였다. UV와 다른 stress를 혼용 처리한 결과 UV 단용처리에 비해 resveratrol의 함량은 소량 증가하거나 오히려 감소하였으며 특히 호르몬과 YE에 의한 negative effect가 관찰되었다.

#### ② resveratrol 고함유 과실의 저장 기간별 resveratrol 대사 활성 분석

포도에 최적의 UV stress 조건을 탐색하기 위하여 UV 세기와 처리 후 저장 온도를 달리하여 처리하고 최적 조건에 의한 저장기간별 resveratrol 함량을 측정하였다. resveratrol은 UV 1분 당 141J의 에너지를 기준으로 UV를 30분 처리하여 23℃에서 저장했을 때 3-5일에 가장 높은 함량을 가진 후 감소한다.

#### ③ 청정포도 내 resveratrol 함량 및 안정성 평가

경북 영천에서 생산되어 포도생산기계에 의해 최적 조건으로 처리된 청정포도를 저장 기간과 온도를 달리하여 resveratrol의 함량을 측정하였다.

#### ④ 청정포도 내 stsy-GUS 유전자 발현 안정성 평가

경북 영천에서 생산되어 포도생산기계에 의해 최적 조건으로 처리된 청정포도에 bombardment를 이용한 transient assay로 stsy promoter 1-GUS를 도입하여 저장기간에 따른 stsy promoter 1 유전자 발현의 안정성을 평가하였다.

## 나. 재료 및 방법

### 1) 환경 인자 처리별 resveratrol 함량 분석

#### 가) 포도에 대한 stress 처리

수확 후의 포도 berry에 254nm 파장의 UV를 60cm 거리에서 30분간 처리한 후 4°C와 상온에서 저장한 것과 UV 30분 + 100uM SA 24hr or 100uM BA 6시간 or 200uM MJ 6시간을 처리한 것을 상온에 저장하여 5일동안 일일 일회 과피 부분만 sampling하여 액체 질소를 사용하여 급냉하고 -80°C에 보관하였다. 또한 포도를 0.1%, 0.5%, 1%, 2% YE에 담가 4일간 처리한 후 같은 방법으로 sample하여 저장하였으며 UV 30분을 처리한 후 0.5% YE를 4일간 1-4회 분무식으로 처리한 것도 동일한 방법으로 sampling을 하였다.

#### 나) HPLC 분석

식물체의 resveratrol 함량은 HPLC 분석법에 의해 측정되었다. 추출된 시료를 0.1g당 1ml의 MeOH을 가하여 0.45µm HN<sub>13</sub> filtering하여 diode-array UV detector를 가진 HPLC(Agilent 1100 Series)에 주입하였다. 컬럼은 reverse-phase C-18 (5µm, 4.6 × 150mm, Hewlett Packard)를 사용하였다. HPLC 분석 조건은 다음과 같다. MeOH/water를 용매로하여 gradient 조건 하에서 1 ml/min의 유동속도로 35분간 작동시켰다. 이때 시료 주입량은 20µl이었고, 용매의 gradient 조건은 15:85 → 40:60 MeOH/water로 하였으며, resveratrol peak은 23분에서 측정되었다. 한편, 표준물질로는 Sigma-Aldrich(USA)의 resveratrol을 구입하여 사용하였다.

### 2) resveratrol 고함유 과실의 저장 기간별 resveratrol 대사 활성 분석

#### 가) Campbell early에 대한 stress 처리

수확 후의 포도 berry에 254nm 파장의 UV를 60cm 거리에서 세기를 달리하여(5분, 15분, 30분, 45분, 60분) 처리한 후 2일과 5일에 과피만을 액체 질소로 급냉하여 -80°C에 보관하였다. 또한 포도에 UV 30분을 처리 후 저장 온도를 달리하여(4°C, 18°C, 23°C, 28°C, 37°C) 5일간 보관하여 위와 동일한 방법으로 sampling 하였고 UV 30분이 처리된 포도를 23°C에 5일간 저장하여 일일 일회 과피부분을 sampling 하였다.

나) HPLC 분석: 1)의 나)와 동일

3) 청정포도 내 resveratrol 함량 및 안정성 평가

가) Muscat에 대한 stress 처리

경북 영천에서 수확된 포도에 최적의 stress 조건을 처리하였다. 23일간 stress가 처리되지 않은 군과 UV 30분이 처리되어 4℃에 저장된 군 UV 30분을 처리하여 상온 1일과 4℃ 3-4일을 번갈아 저장한 군을 각기 0일, 1일, 4일, 5일, 8일, 9일, 13일, 14일, 18일, 19일, 23일의 날짜에 과피만을 액체질소로 급냉하여 -80℃에 보관하였다.

나) HPLC 분석: 1)의 나)와 동일

4) 청정포도 내 stsy-GUS 유전자 발현 안정성 평가

가) 청정포도에 대한 stress 처리

경북 영천 농가에서 생산된 muscat 청정포도를 최적 stress 조건으로 setting된 포도생산기계로 처리하여 사용하였다.

나) Transient analysis

Stsy promoter의 기능을 확인하기 위한 transient assay는 해당 construct (stsy promoter-GUS)와 함께 대조군으로 pBI 121을 사용하였다. Particle bombardment assay를 실시하기 위하여 포도 과피를 직경 1 cm가 되도록 잘라서 MS 최소 배지에 (Duchefa, MS including vitamin, 30% sucrose, 0.8% agar pH 5.6-5.8) 올려서 Bio-Rad Biolistic PDS-1000/HE Particle Delivery System에 장착하였다. 15-in Hg의 chamber vacuum으로 target distance를 3 cm로 잡고 1,500-psi particle acceleration pressure를 걸어 주었다. 해당 plasmid DNA는 Bio-Rad의 방법대로 3 mg microcarrer를, DNA 5  $\mu$ g과 50  $\mu$ l CaCl<sub>2</sub>(2.5M), 20  $\mu$ l spermidine(0.1 M)을 첨가하여 상온에서 침전시킨 후 각각 70%, 100% 에탄올로 wash하고 최종 100% 에탄올에 녹여 사용하였다. Particle Delivery System을 사용하여 stsy promoter-GUS 및 pBI 121이 일시적으로 도입된 조직은 MS 최소 배지에서 이틀간 배양 후 histochemical analysis를 실시하였다.



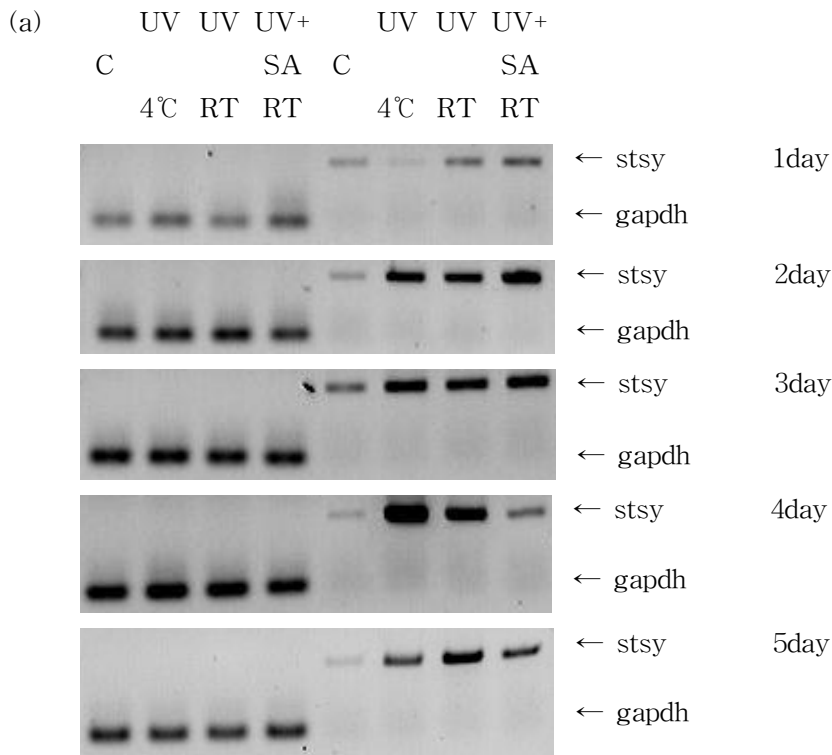
#### 다) GUS staining

MS 최소 배지에서 이틀간 배양한 stsy promoter-GUS가 들어간 조직을 두 그룹으로 나뉘어서 한 그룹은 UV를 20분간 처리하였다. UV 처리 및 비처리 조직을 1 mM X-glucuronic acid (X-gluc)를 포함한 GUS solution (50 mM phosphate buffer (pH 7.4), 3 mM potassium ferricyanide, 3 mM potassium ferrocyanide)에 37°C에서 24시간 반응시켰다. Dehydration은 50%, 70%, 90% 에탄올에 각각 30분씩 방치한 후, 마지막으로 70% 에탄올에 넣어서 색소를 완전히 제거하고 GUS 발현을 확인하였다.

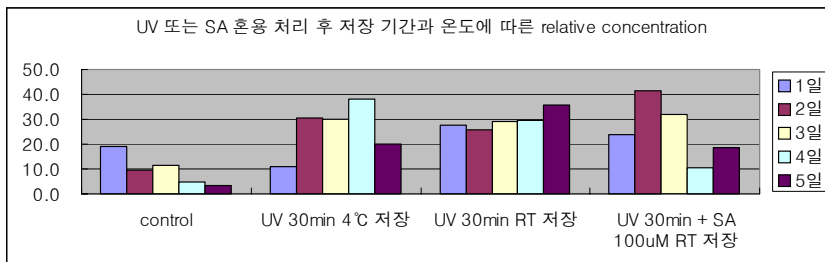
#### 다. 연구결과

##### 1) 환경 인자 처리별 resveratrol 함량 분석

$AlCl_3$ ,  $O_3$ , UV 등은 phytoalexin의 분해를 막는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 이중 처리가 간편하고 안전하며 효과도 뛰어난 UV를 선택하여 UV와 함께 phytoalexin의 합성을 자극하는 YE나 그와 관련된 SA, BA, MJ를 혼용으로 처리하여 혼용처리가 UV 단독처리에 비해서 resveratrol 합성 유도 효과가 더 좋은지 측정해보았다. UV는 254nm 파장 60cm 거리에서 1분간 141J의 에너지가 측정되는 장소를 선택하여 30분간 상온에서 처리하였으며 YE, SA, BA, MJ 등은 2년차 실험 결과에서 stsy 유전자 발현이 증가되었던 농도와 시간을 선택하여 추가적으로 처리하였다(Figure 1-19).



(b)



(c)

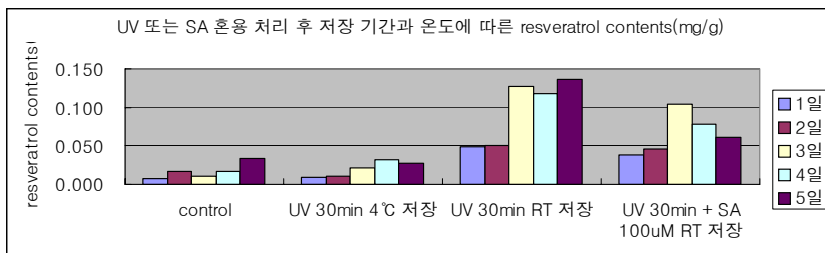


Figure 1-19. Grapevine skin treated with UV 30min(4°C or RT) or UV 30min + 100uM SA 24hr(RT).

(a) RT-PCR band, (b) RT-PCR graph, (c) Resveratrol contents

포도에 UV 단용처리 or UV + 100uM SA 24hr을 처리하여 RT-PCR을 한 경우 UV 30분을 처리하여 4℃에 저장한 것과 UV + 100uM SA 24hr를 처리하여 RT에 저장한 것은 stsy 유전자 발현율이 약 2.7배 증가하였고 UV 30분 처리한 것은 약 3배 증가하여 UV 단용처리 후 저장 온도의 차이나 UV + SA의 혼용처리에 의한 stsy 유전자 발현율의 차이는 미미하였지만 HPLC를 이용한 실제적인 resveratrol의 함량의 측정하였을 때는 저장온도에 따라 큰 차이를 보였다. UV를 30분 단용 처리한 경우 4℃에 저장하였을 때는 resveratrol의 함량이 최대 1.8배 증가한데 비해서 상온에 저장하였을 때는 7.9배 증가하였으며 추가적으로 100uM SA 24hr을 혼용 처리하였을 경우 오히려 6배로 UV 단용처리에 비해 증가량이 감소하였을 뿐만 아니라 SA에 의해서 야기되는 negative effect를 관찰할 수 있었다. 특히 SA에 의한 cell death 현상으로 낙과와 갈변이 일어나 포도의 품질 저하가 일어났다. 이는 SA에 비해서는 약하지만 100uM BA 6hr, 200uM MJ 6hr을 처리한 것에서도 관찰이 되었으며 (data not shown) 포도의 상품성을 위해서 호르몬 처리는 부적절하다고 판단된다.

포도에 대한 YE 처리는 두 가지 방식으로 이루어졌다. 첫째는 호르몬처리와 같은 방식으로 0.1%, 0.5%, 1%, 2% 농도의 YE에 4일간 담가 HPLC로 resveratrol의 함량을 측정하였으며(Figure 1-20) 둘째는 YE 단용처리에서 가장 효율적인 결과가 나왔던 0.5% 농도를 분무식으로 횡수를 달리하여 UV와 혼용처리 한 것의 resveratrol 함량을 측정하였다(Figure 1-21).

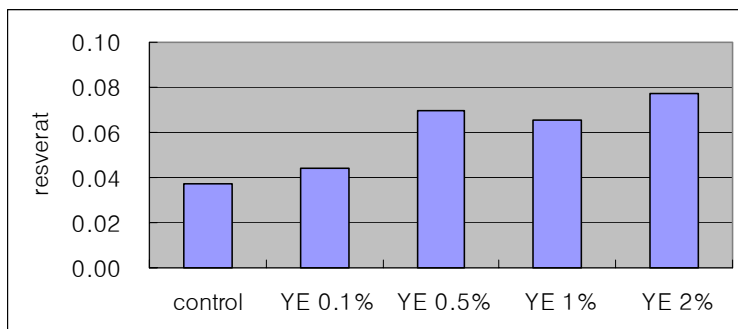


Figure 1-20. Grapevine skin treated with YE(0.1%, 0.5%, 1%, 2%).

YE를 농도별로 처리한 결과는 0.5% 이상에서는 resveratrol의 함량이 약 2배 증가한 것으로 측정되어 YE 처리시에는 0.5%가 가장 효율적인 처리 방법으로 생각되었다. 그러나 호르몬 처리에 비해서 정도는 약하지만 과실과 가지가 연결되는 부분이나 상처가 있던 부분에 cell death 현상이 관찰되어 포도를

용액에 처리할 시 다른 방법을 모색하여 보았다.

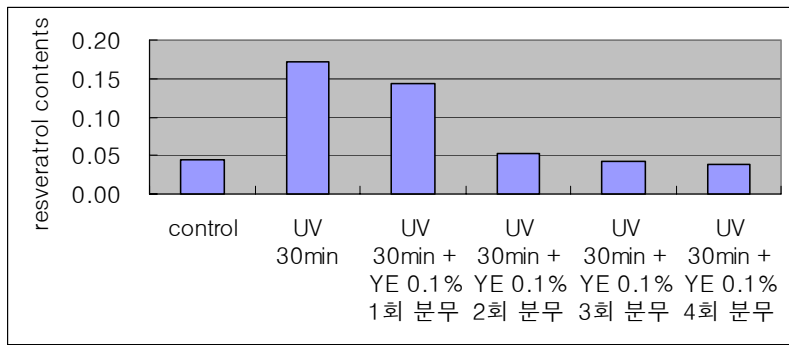


Figure 1-21. Grapevine skin treated with UV + YE.

Figure 1-21의 결과는 UV 30분 단용처리 된 포도와 UV 30분 + YE 혼용 처리된 것을 5일간 상온에 저장하여 비교한 것으로 YE의 처리는 4일간 일일 1회 분무식으로 처리하였으며 1회 처리된 것은 둘째 날 1회 처리 후 4일간 상온에 저장한 것이다. YE는 포도의 stsy 유전자를 induction 시키는 것으로 UV는 phytoalexin의 분해를 막는 역할과 더불어 혼용처리에 의한 resveratrol 함량증가가 기대되었으나 UV 단용처리에(3.8배) 비해 오히려 YE의 처리 횟수가 늘어날수록 UV 처리에 의한 효과가 감소되는 현상을(1배-3.2배) 관찰 할 수 있었으며 Figure 1-19과 Figure 1-20에서 실험시에 보였던 용액 처리에 의한 negative effect는 보이지 않았지만 YE 처리에 의해 곰팡이가 생성되는 것을 관찰할 수가 있었다.

## 2) resveratrol 고함유 과실의 저장 기간별 resveratrol 대사 활성 분석

호르몬과 YE에 의한 negative effect 발견으로 UV 단용처리에 의한 최적 조건 재탐색 및 저장 기간에 따른 resveratrol 함량을 측정하였다. 포도에 대한 UV 처리는 1)에서 처리된 조건과 동일하게 처리하였으며 UV 처리 시간에 변화를 주어 5분, 15분, 30분, 45분, 60분을 처리 후 각각 2일과 5일간 상온에 보관하여 과피만 sampling 하여 HPLC로 resveratrol의 함량을 측정하였다 (Figure 1-22).

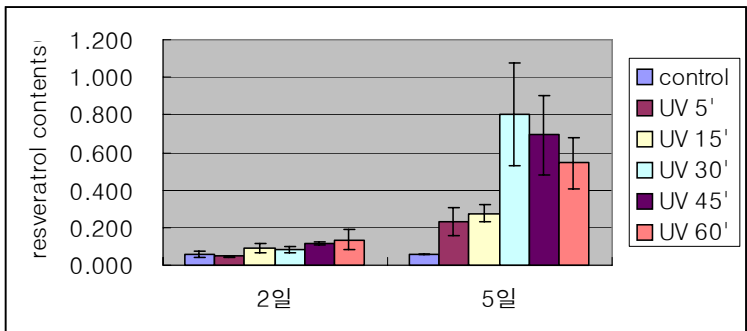


Figure 1-22. Grapevine skin treated with UV(5, 15, 30, 45 and 60 min.).

UV 처리 후 2일까지는 대조군에 비해서 거의 증가하지 않았으나(UV 60' 2배) 5일 후에는 대조군에 비해서 UV 30분을 처리한 경우 14.2배(0.805mg/g)로 가장 많은 증가량을 보였으며 그보다 오랜 시간에서는 서서히 감소되는 것이 관찰되었다.

Figure 1-19에서 같은 stress 조건을 처리하였을 경우 저장온도에 따라 resveratrol의 함량이 달라지는 것이 관찰되어 Figure 1-22 실험에서 가장 많은 resveratrol 함량을 보였던 UV 30분을 처리 후 4°C, 18°C, 23°C, 28°C, 37°C에서 5일간 저장하여 HPLC로 resveratrol의 함량을 측정해 보았다(Figure 1-23).

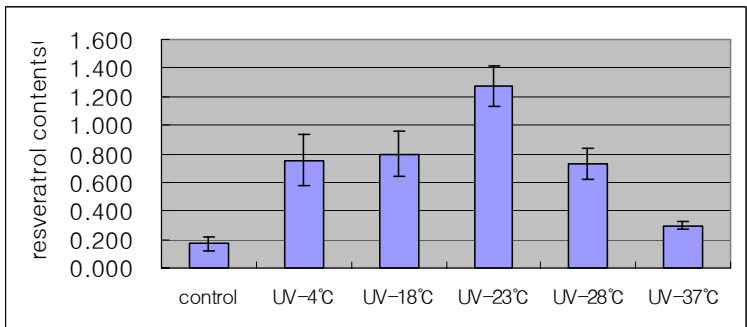


Figure 1-23. Grapevine skin treated with UV(5-day stored at 4°C, 18°C, 23°C, 28°C, 37°C).

Figure 1-19(a)의 RT-PCR 결과와 비교해 보았을 때 동일한 stress를 처리 시 저장온도는 stsy 유전자의 발현양에는 큰 영향을 주지 못하였지만 resveratrol 합성에 많은 차이가 났다. 이를 좀 더 세부적인 온도로 나누어 보았을 때 23°C에서 대조군과 비교해 7.4배로(1.277mg/g) 가장 많은 resveratrol 합성률을 보였으며 37°C에서는 1.7배로 소량 증가하였으며 또한 높은 온도에

의해 포도의 품질에 쉽게 손상이 생기는 것을 관찰할 수 있었다.

포도를 탐색된 최적 조건인 UV 30분 처리 후 23℃에 저장하여 5일간 저장하여 resveratrol의 함량을 측정하였다(Figure 1-24).

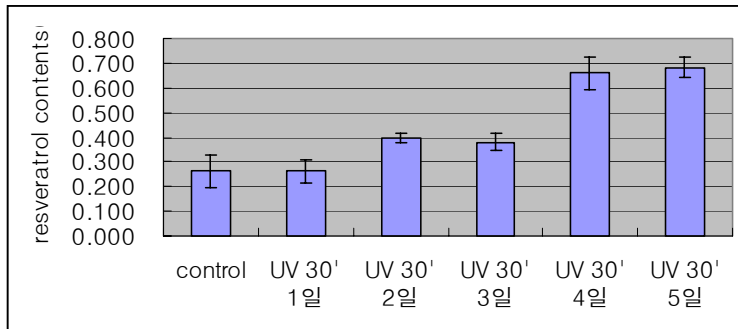


Figure 1-24. Grapevine skin treated with UV.

최적 조건인 UV를 30분 처리한 후 23℃에 저장하여 resveratrol을 일일 단위로 측정한 결과 Figure 1-24의 실험에서는 3일까지 별다른 증가를 보이지 않다가 4일부터 2.5배(0.659mg/g) 이상증가를 하였다. 포도는 재배환경에 따라 resveratrol의 함량에 큰 차이를 보이므로 대조군에서도 많은 양의 resveratrol이 측정될 수 있으며 동일한 UV stress를 처리하여도 실험상 직접적인 영향을 받는 부분은 과피의 절반이하에 국한되므로 UV 처리에 의한 signal이 직접적으로 처리되지 않은 부분에 전해진다 하더라도 그것을 측정할만한 기준이나 정량적인 data는 아직 없다.

### 3) 청정포도 내 resveratrol 함량 및 안정성 평가

경북 영천에서 재배되어 최적 조건으로 처리된 포도의 resveratrol의 함량을 측정하고 안정성을 평가하여 농가에서 실제적으로 재배된 고부가가치 포도가 상품성을 지니는지 검증하고 합성된 resveratrol과 포도가 장기간 저장됨에 따라 안정한지를 알아보았다. 경북 영천에서 재배된 포도는 muscat으로 자동화된 포도생산기계를 통해 최적조건으로 처리되어 저장온도에 변화를 주며 23일간 resveratrol의 함량 변화를 측정하였다(Figure 1-25).

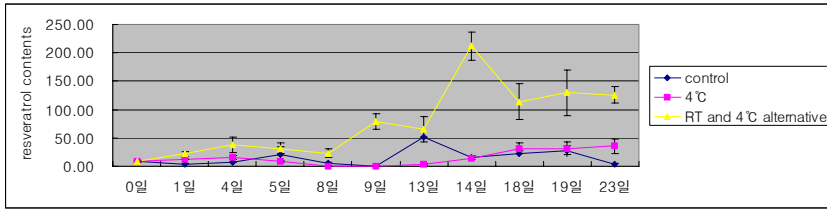


Figure 1-25. Grapevine skin treated with UV.

Red arrow: 1 day storage with 23°C; blue arrow: 3-4 days storage with 4°C

최적 조건으로 처리된 영천포도를 대조군과 4°C에 저장한 군 그리고 23°C와 4°C에 번갈아 저장한 군으로 나누어 resveratrol의 함량을 측정하였다. 4°C에서 저장한 포도는 UV 처리에도 불구하고 대조군과 별다른 차이점을 발견할 수 없었으나 상온과 저온에 번갈아 저장한 실험군에서는 14일 (상온에서 보관 4일)에서 대조군에 비해 13.2배의 증가량을 보였다. 그러나 이러한 결과는 campbell early에 비해서는 적은 양인 0.211mg/g이었으며 처리되지 않은 대조군 또한 평균 0.015mg/g으로 매우 적은 resveratrol 함량을 보였다. 주목할 점은 4°C의 저장온도가 resveratrol의 합성을 저해하는 온도가 아니라 resveratrol 합성은 되지 않지만 induction 효과가 유지되는 온도로 포도의 상품성을 위한 저장온도가 2-6°C인 점을 감안할 때 포도 수확 후 포도생산기계로 처리하여 저온 저장하여도 충분한 resveratrol 고함유 포도를 생산할 수 있다 생각되며 상온 저장 3-5일시 최고 함량을 보이는 resveratrol은 그 양이 서서히 감소하는 것으로 생각된다.

최적 조건 처리 및 저장된 포도는 resveratrol이 빠르면 3일 보통 4-5일 사이에 최고치를 이루게 되며 그 양은 대조군에 따라 많은 차이가 있지만 5-15배 가량 증가하고 가장 많이 합성되었을 때의 양은 1.277mg/g 이었다. 이는 campbell early에서 측정된 결과로 영천의 muscat에서는 이보다 적은 0.211mg/g로 이러한 차이는 품종이 다르거나 재배환경의 차이 또는 수확 후 stress 처리 시기(campbell은 수확 직후인 9월, muscat은 끝물인 11월에 처리 및 실험)에 따른 induction potential이 달라지기 때문이라 생각된다.

## 제 2 절 포도의 세정 및 생체대사 조절장치

### 1. 서론

레스베라트롤(resveratrol, 3,5,4'-trihydroxy stilbene,  $C_{14}H_{12}O_3$ , 분자량: 228)이란 물질은 3,5,4'-트리히드록시stilben 구조의 폴리페놀 항산화물질이며 주요 발암 단계를 억제하여 암 예방 기능이 있다고 1997년 과학전문지 '사이언스'에 보고된 이후 큰 관심의 대상이 되었으며, 최근 포도주의 인기도 이 물질에 기인하고 있다. 또한, 2004년 '네이처'에서는 레스베라트롤이 효모의 평균 수명을 70% 증가시킨다고 보고된 사례도 있다.

포도의 레스베라트롤은 포도나무의 생육 중 *Botrytis cinerea* 등의 세균(곰팡이) 또는 UV의 공격에 대한 방어기작으로서 시킴산 회로의 의해 만들어진다.

그런데, 수확 후에도 포도의 과피 등에서는 살아있는 세포의 대사에 의해 시킴산 회로가 작동하여 레스베라트롤 등과 같은 생체방어물질을 만들 수 있다고 알려져 있다. 즉, 수확 후에는 세포구성의 기본물질인 당인산, 아미노산, 단백질, 지질, 핵산 등과 같은 1차 대사물질의 생성은 거의 중지되는 것에 반하여 수확된 포도가 특정한 환경에 노출되었을 때 생체방어물질로서 레스베라트롤과 같은 2차 대사물질이 생성될 수 있음을 밝힌 연구가 보고되고 있다.

현재까지 수확물 관리기술은 시대적 요구에 따라 몇 단계의 주요 관심 기술을 거쳐서 오늘에 이르고 있다. 즉, 1970년대까지는 주로 농산물의 수확 이후 양적인 손실을 줄이는 과제가 주요 관심사였으며, 90년대 중반까지는 맛과 같은 품질 향상 또는 유지가 주요 관심사였다. 90년대 이후에는 경제적 수준 향상에 따른 삶의 질에 대한 요구가 반영되어 식품의 안전에 관한 관심이 크게 부각되었다. 21세기 들어서는 안전한 농산물의 건강기능성에 대한 관심이 최대의 이슈로 부각되면서 수확 후 관리기술의 관심도 여기로 집중되어 농산물의 수확 후 건강기능성 성분을 조절하는 '제4세대 수확 후 관리기술'이 관심을 가지게 되었다.

따라서, 본 연구에서는 포도를 수확한 후 생체대사를 조절하는 방법에 의해 포도의 대표적인 건강기능성 성분인 레스베라트롤을 증폭하는 장치를 개발하고자 하였다.

### 2. 재료 및 방법

#### 가. 공시재료

실험에는 경기 안성에서 생산된 캠벨얼리, 거봉과 경북 영천에서 생산된 MBA와 거봉을 사용하였다. 각 품종별로 수확적기에 수확하여 실험에 사용하



였다.

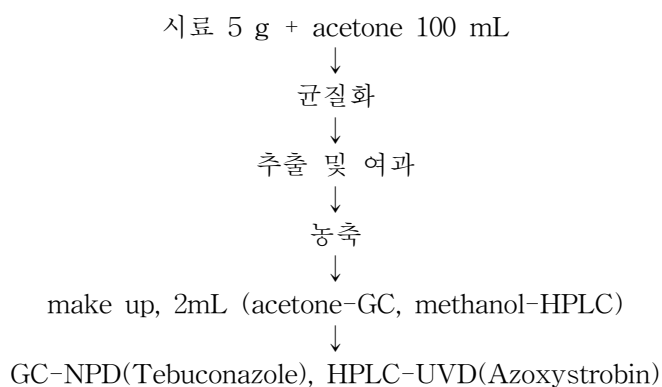
#### 나. 세정방법별 품질 및 레스베라트롤 함량 분석

세정방법에 따른 포도 품질과 레스베라트롤 함량 변화를 분석하기 위하여 1 분간 살수 세정, 초음파 세정(47 kHz), 오존수 세정(오존 농도: 약 0.03 ppm)을 실시하였다. 세정에 따른 영향을 비교하기 위하여 세정전, 세정직후의 품질을 측정하였다. 잔류농약은 식품공전에 따른 시험법을 이용하여 분석하였다.

-분석 항목 : 호리쿠어 (Tebuconazole), 아미스타 (Azoxystrobin) 분석

-전처리방법(식품공전2003, 식품중 잔류농약시험법, 58)다중다성분농약 동시 시험법)

-분석절차



-GC-NPD 조건

Inlet temp. : 260°C (splitless mode)

Detector temp. : 280°C (H2 flow : 3.5 mL/min, air flow : 60 mL/min)

Oven temp : 120°C (2 min) - 10°C/min - 280°C(20min)

Flow gas : He, 1.5 mL/min

Column : ultra-1 (50m × 0.32mm)

-HPLC-UVD 조건

이동상 A : Acetonitrile, B : Water

flow rate : 1.0 ml/min

Column : HiQ sil C<sub>18</sub> (4.6 × 250 mm)

Wavelength for uv detector : 254nm

한편, 세정후 UV에 의한 대사조절처리(UV-C 230 W, 1 min)를 한 후, 처리 직후 및 처리 5일후의 포도 품질 및 레스베라트롤 함량을 분석하였다.

#### 다. 대사조절에 따른 품질 및 레스베라트롤 함량 분석

포도의 대사조절을 위해 자외선 방사 시스템을 제작하였다. 254 nm 영역의 UV C의 경우, 40, 75, 115, 190, 230 W의 방사체를 선정하였으며, 365 nm 영역의 UV A의 경우에는 40, 60, 100, 160, 200 W의 방사체를 선정하였다. 각 UV 세기 하에서 0.5, 1, 3, 5, 10 분간 처리하였으며, UV 처리된 포도는 저장에 따른 영향을 분석하기 위하여 0℃ 및 20℃의 저장고에서 1, 2, 3, 4, 5, 6일 저장후 품질과 레스베라트롤 함량을 분석하였다.

#### 라. 포도 품질측정

포도의 품질을 평가하기 위하여 포도알의 크기, 무게, 색상(Hunter L, a, b), 기계적 강도(극한력, 극한변형량), 당도, 수분함량을 측정하였다.

포도의 색상은 chromameter(미놀타, 일본)를 이용하여 Hunter 색지수로 표시하였다.

과실의 압축특성은 원추형 플런저(직경 3.0 mm, 높이 4.0 mm)가 장착된 압축시험기(Model Compac-100, Sun Scientific)로 분석하였다. 압축속도는 10 mm/min로 하였다.

과육의 수분함량은 실험에 이용한 부위에서 약 2 g을 취하여 70℃의 오븐에서 20시간 건조한 후 수분의 무게를 습량기준의 %로 나타내었다.

당도를 측정하기 위해 포도알을 homoeniger를 이용하여 분쇄하고 miracloth로 불용성 고형분을 제거한 후 굴절당도계로 측정하였다.

#### 마. resveratrol 분석을 위한 HPLC법

시료 5g을 동결건조기로 18시간 건조시킨 후 에탄올:물(1:1)의 용액을 시료 1g당 10ml씩 넣고 상온에서 10분간 초음파세정기(Branson Co.)를 이용하여 추출한다. 추출한 시료를 감압 여과하여 내린 추출물을 50℃ 중탕 감압 증발시킨다. 남은 추출물을 에탄올로 1g당 10ml씩 넣고 용출시킨 뒤 acetonitrile로 10배 희석하여 sample을 준비한다. HPLC는 Agilent사의 1100Series 이며, DAD(Diode Array Detector) 308nm로 분석하였다. 컬럼은 Extend C-18 5um 4.6x150mm 이며, 용매의 분석조건은 acetonitrile과 물을 용매로 하여 기울기 조건 하에서 1.0 ml/min의 유동속도로 35분간 실시하였다. 이때 시료 주입량은 20ul이었고, 용매의 기울기 조건은 최초 5:95의 acetonitrile/물에서 35분까지

30:70으로 조정되었다. resveratrol의 RT 값은 17분 48초에 검출되었으며 표준 물질로 Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA)의 것을 구입하여 사용하였다.

바. 시작기 제작

대량처리를 위한 기계개발을 위해 시작기를 제작하여 성능을 평가하였다.

3. 연구결과 및 고찰

가. UV 강도

실험에 사용된 UV 방사 시스템에서의 UV 강도를 UV meter를 이용하여 측정하였다. 표 2-1에서 보는 바와 같이 실제 UV 강도는 명목상의 출력과 크게 다른 것으로 나타났다.

표 2-1. 시료 조사점에서의 UV 강도

UV 영역	명목 출력(W)	실제 UV 강도(mW/cm <sup>2</sup> )
C	40	0.356
	75	0.681
	115	0.001
	190	0.651
	230	1.017
A	40	0.198
	60	0.007
	100	0.444
	160	0.439
	200	0.646

나. 세정 효과

과실의 세정 방법으로 살수세정, 초음파 세정, 오존수 세정 등이 이용되고 있다. 포도를 수확한 후 세정 과정을 도입하는 것을 전제로 하였을 때 세정 효과를 살펴보고자 하였다.

표 2-2는 일반수, 초음파, 오존수를 이용하여 포도를 세정한 후의 잔류농약을 분석한 결과를 나타낸 것이다. 모든 방법에서 잔류농약은 검출되지 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 세정 효과를 기대할 수 있다는 측면보다는 정상적으로 재배된 포도의 경우 잔류농약은 검출되지 않는 것으로 이해된다고 할

수 있다.

표 2-2. 세정 방법에 따른 잔류농약 분석결과

세정 방법		농약		시험법
		Tebuconazole	Azoxystrobin	
캠벨얼리	대조구	불검출	불검출	식품공전
	살수	불검출	불검출	
	오존수	불검출	불검출	
	초음파	불검출	불검출	
거봉	대조구	불검출	불검출	
	살수	불검출	불검출	
	오존수	불검출	불검출	
	초음파	불검출	불검출	

그림 2-1에서 2-5 및 그림 2-6에서 2-10은 각각 캠벨얼리 및 거봉 포도에 대해서 세정방법을 달리 한 후 UV 처리를 하였을 때 세정효과를 나타낸 것이다. 여기서는 처리직후와 20℃에서 5일간 저장한 후의 결과를 비교한 것을 나타내었다. 약간의 색상 변화를 제외하면 대부분의 품질인자는 세정효과에 따른 영향이 크지 않은 것으로 나타났다.

반면에 레스베라트롤 함량은 초음파 세정을 실시하였을 때 비교적 크게 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 볼 때, 포도의 세정작업이 필요한 경우 초음파 세정을 사용하게 되면 레스베라트롤 함량의 증폭 효과도 얻을 수 있는 것을 알 수 있다.

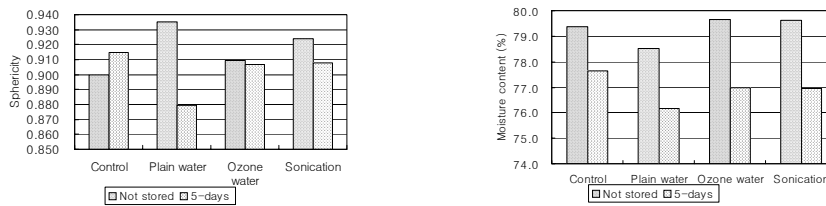


그림 2-77. 캠벨얼리 포도의 세정효과(좌: 구형도; 우: 수분함량).

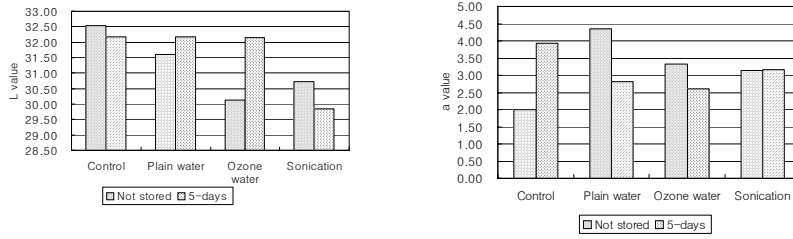


그림 2-78. 캠벨얼리 포도의 세정효과(좌: Hunter L ; 우: Hunter a).

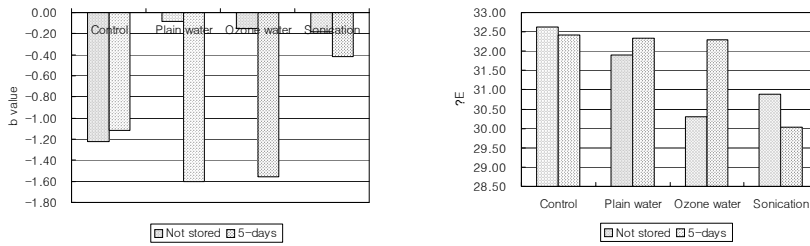


그림 2-79. 캠벨얼리 포도의 세정효과(좌: Hunter b; 우: Hunter 색상차).

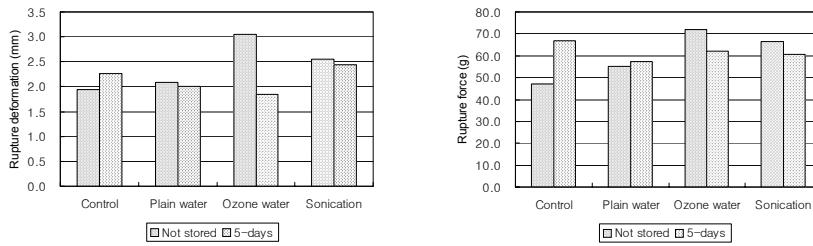


그림 2-80. 캠벨얼리 포도의 세정효과(좌: 극한변형량; 우: 극한력).

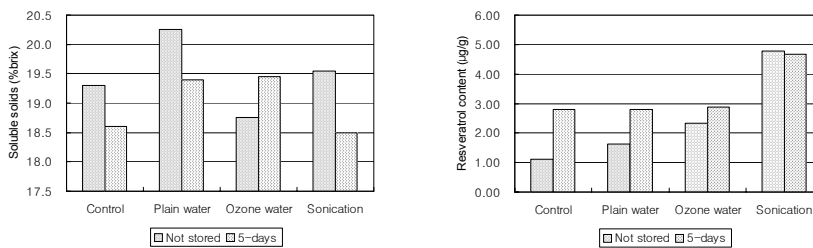


그림 2-81. 캠벨얼리 포도의 세정효과(좌: 당도; 우: 레스베라트롤 함량).

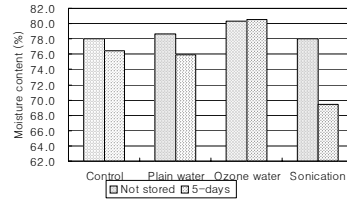
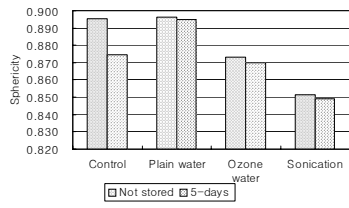


그림 2-82. 거봉 포도의 세정효과(좌: 구형도; 우: 수분함량).

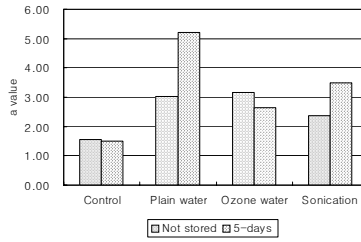
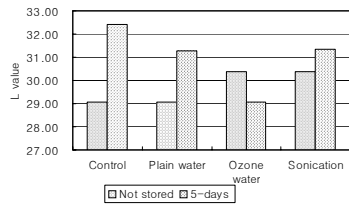


그림 2-83. 거봉 포도의 세정효과(좌: Hunter L; 우: Hunter a).

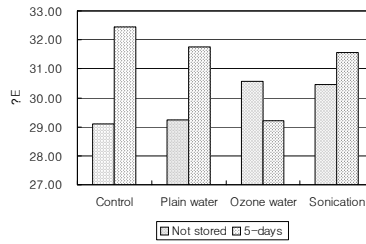
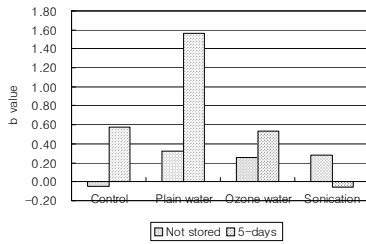


그림 2-84. 거봉 포도의 세정효과(좌: Hunter b; 우: Hunter 색상차).

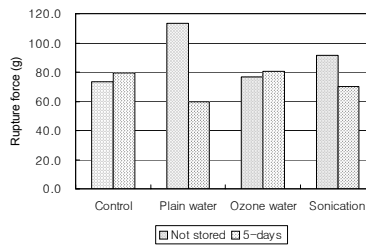
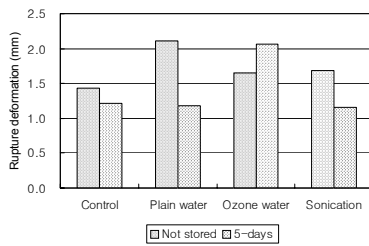


그림 2-85. 거봉 포도의 세정효과(좌: 극한변형량; 우: 극한력).

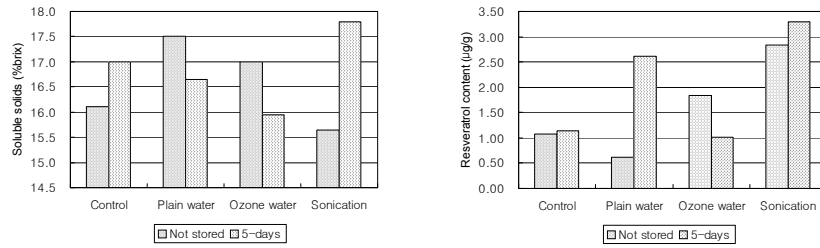


그림 2-86. 거봉 포도의 세정효과(좌: 당도; 우: 레스베라트롤 함량).

다. UV 처리 효과 예비분석

그림 2-11에서 2-16 및 그림 2-17에서 2-22는 각각 MBA 및 거봉 포도에 대해서 UV A와 UV C 처리에 따른 품질 및 레스베라트롤 함량의 변화를 나타낸 것이다. 약간의 색상의 변화를 제외하면 대부분의 품질인자는 UV 처리에 따른 영향이 크지 않은 것으로 나타났다. UV 처리가 색상 변화에 미치는 영향에서도 UV A가 Hunter b의 값에 약간의 영향을 미치는 것으로 나타난 반면에 UV C는 Hunter b 조차도 큰 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 그러나 UV 처리는 레스베라트롤의 함량 변화에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났는데 특히, UV C가 레스베라트롤 함량을 증폭시키는 데 있어 더 효과적인 것으로 나타났다.

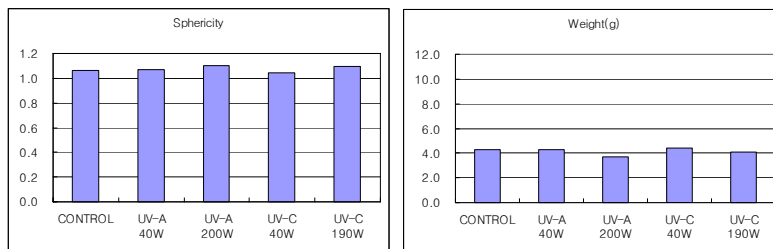


그림 2-87. MBA 포도의 UV처리 효과(좌: 구형도; 우: 포도알 당 무게).

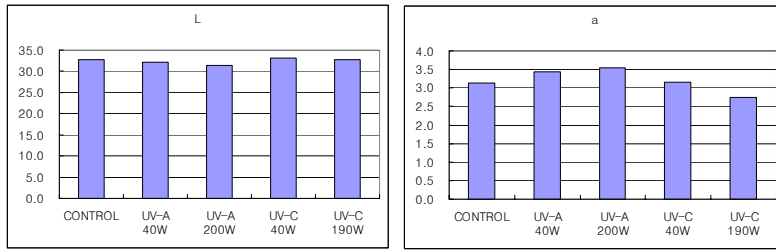


그림 2-88. MBA 포도의 UV처리 효과(좌: Hunter L; 우: Hunter a).

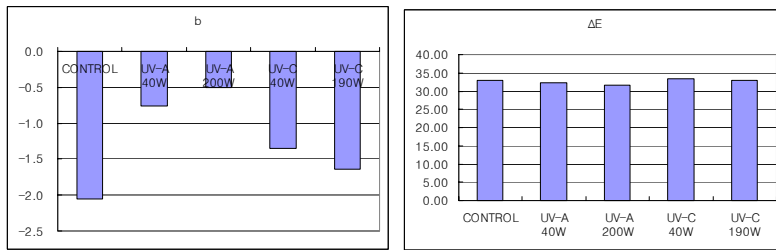


그림 2-89. MBA 포도의 UV처리 효과(좌: Hunter b; 우: Hunter 색상차).

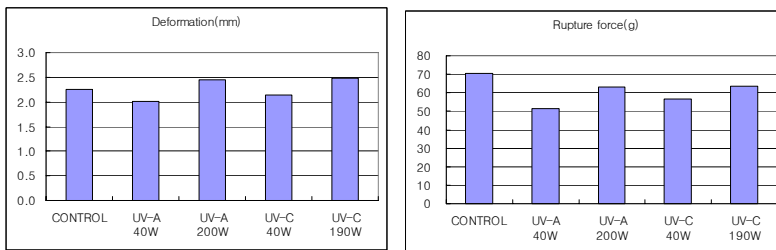


그림 2-90. MBA 포도의 UV처리 효과(좌: 극한변형량; 우: 극한력).

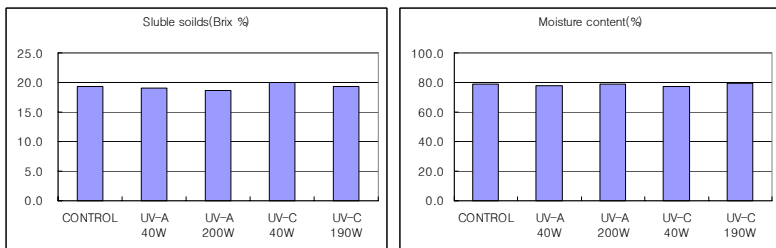


그림 2-91. MBA 포도의 UV처리 효과(좌: 당도; 우: 수분함량).



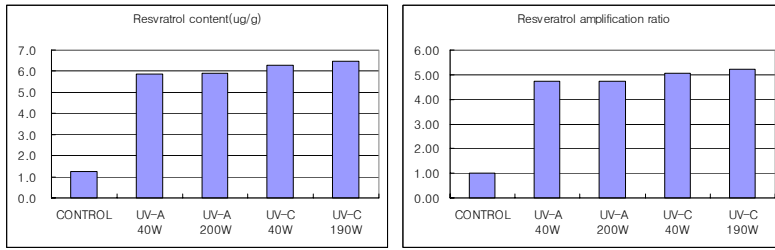


그림 2-92. MBA 포도의 UV처리 효과(좌: 레스베라트롤 함량; 우: 레스베라트롤 증폭비).

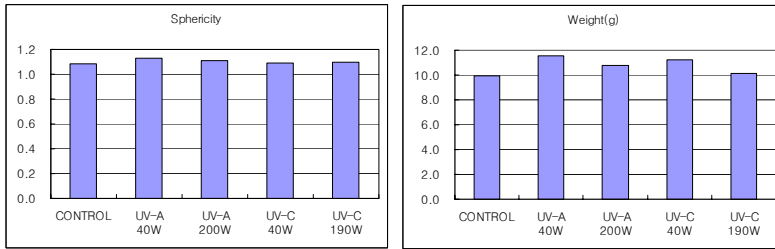


그림 2-93. 거봉 포도의 UV처리 효과(좌: 구형도; 우: 포도알 당 무게).

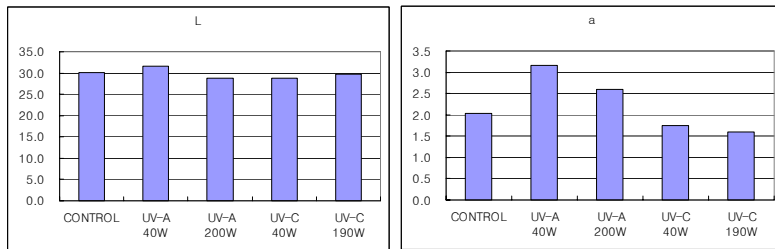


그림 2-94. 거봉 포도의 UV처리 효과(좌: Hunter L; 우: unter a).

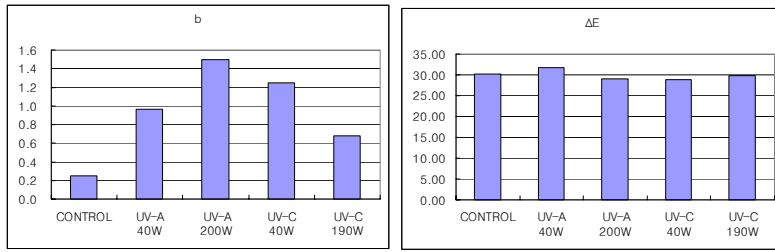


그림 2-95. 거봉 포도의 UV처리 효과(좌: Hunter b; 우: Hunter 색상차).

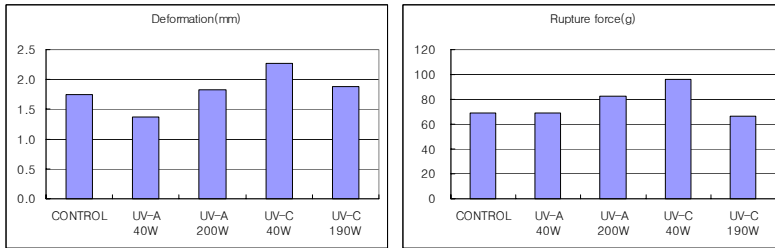


그림 2-96. 거봉 포도의 UV처리 효과(좌: 극한변형량; 우: 극한력).

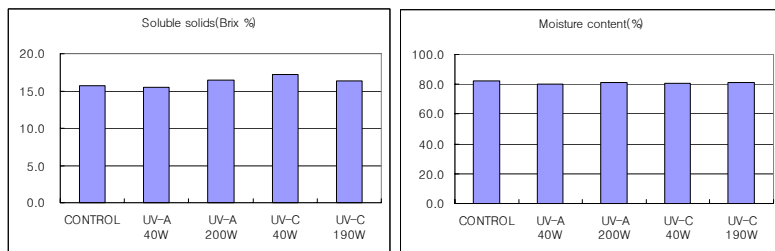


그림 2-97. 거봉 포도의 UV처리 효과(좌: 당도; 우: 수분함량).

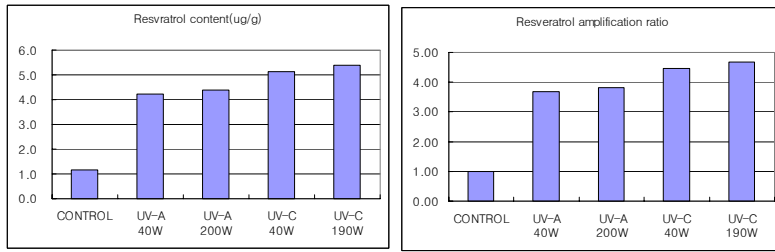


그림 2-98. 거봉 포도의 UV처리 효과(좌: 레스베라트롤 함량; 우: 레스베라트롤 증폭비).

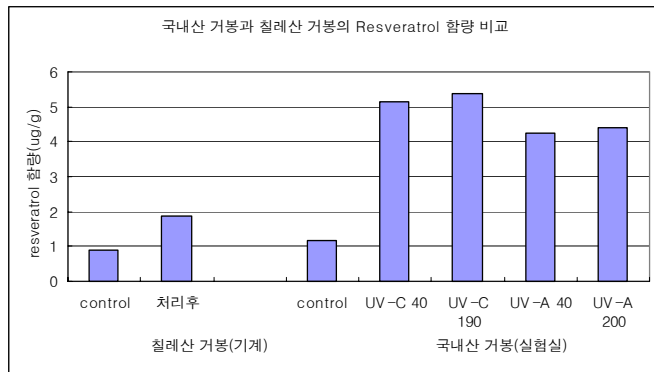


그림 2-99. 국내산 포도와 수입산 포도의 레스베라트롤 증폭 효과 비교

그림 2-23은 수입 포도(칠레산)에 대해서 UV 처리에 의한 레스베라트롤 증폭 효과를 나타낸 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 국내산 포도에 비해 증폭 효과가 매우 낮은 것을 알 수 있다. 이러한 결과가 나타난 이유는 수입 포도의 경우 이송 등의 이유로 수확이후 많은 시간이 경과하여 포도 세포의 활성이 매우 저조한 상태라서 수확직후의 국내산 포도에 비해 UV 처리에 의한 대사 조절이 용이하지 못한 것으로 짐작된다.

라. 시작기 제원 및 성능

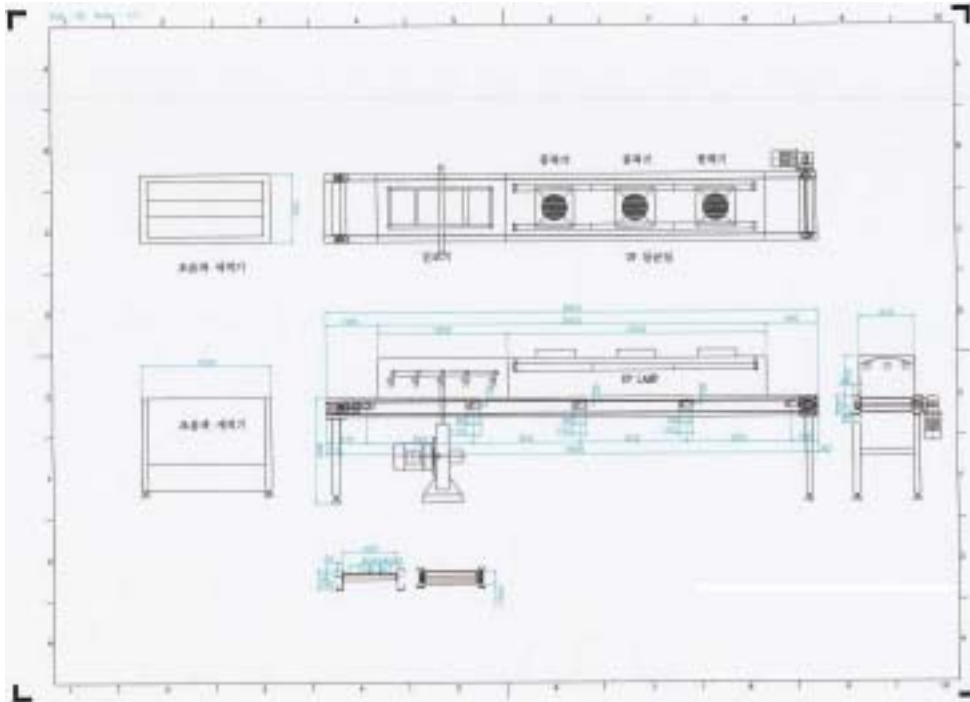


그림 2-100. 수확 후 포도의 대사조절용 처리기계 제원

- 초음파 처리기 제원: 220V, 8A, 35 kHz
- UV 램프 제원: UV 155 W X 10개 (상부: 6개; 하부 4개)
- 상부면 UV 최대강도: 입구: 1.180 mW/cm<sup>2</sup>; 중앙: 10.320 mW/cm<sup>2</sup>; 출구: 1.838 mW/cm<sup>2</sup>
- 하부면 UV 최대강도: 입구: 1.123 mW/cm<sup>2</sup>; 중앙: 2.755 mW/cm<sup>2</sup>; 출구: 1.565 mW/cm<sup>2</sup>
- 포도 체류시간: 최저: 16초; 최고 130초
- 처리용량: 10톤/8시간



그림 2-101. 수확 후 포도의 대사조절용 처리기계 전경



그림 2-102. 투입구



그림 2-103. 배출구



그림 2-104. 냉각용 송풍기



그림 2-105. 건조용 송풍기



그림 2-106. 세정용 초음파 수조

마. UV C 처리에 따른 포도의 품질 변화

앞에서 분석한 내용을 바탕으로 UV C를 처리하였을 때 UV 세기 및 처리 시간의 영향과 처리 직후, 0℃ 저장(6일까지), 20℃(6일까지)에서 저장한 후 품질에 미치는 영향을 식(1)의 모형을 이용하여 통계적 분석을 실시하고 그 결과 표 4에서 31까지 나타냈었다.

수학적 모형:  $Q = a + bP + ct + dPt$  (1)

여기서, Q: UV 처리 후 품질 인자 값(예, 포도의 brix)

P: UV 세기(0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>)

t: UV 처리시간(30~600 s)

a, b, c, d: 상수값

표 2-3. UV 처리전 포도의 품질 인자 값

품종	크기(mm)		무게 (g)	색상			기계적 강도		Brix(%)	수분함량 (%)
	직경	높이		L	a	b	변형량 (mm)	극한력(g)		
MBA	14.3	20.7	4.26	30.97	4.48	0.27	1.08	52.50	18.83	80.14
거봉	21.3	27.3	10.49	30.98	3.86	0.67	1.17	84.25	16.13	79.75

표 2-4. 거봉 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s)한 후 0℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 색상 변화(Hunter L)에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	28.3	2.10	4.6	0.1409	0.282
1	26.5	2.47	2.4	0.0991	0.316
2	26.6	1.79	2.1	0.1888	0.251
3	26.4	0.38	2.7	0.7655	0.067
4	26.2	0.78	3.1	0.5235	0.127
5	26.4	0.46	2.3	0.7131	0.079
6	26.0	0.88	2.8	0.4709	0.142

표 2-5. 거봉 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s)한 후 0℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 색상 변화(Hunter a)에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	5.27	5.52	22.5	0.0085	0.508
1	2.57	1.80	28.8	0.1876	0.252
2	2.88	0.92	25.8	0.4531	0.147
3	2.22	2.22	25.0	0.1252	0.294
4	2.41	0.56	48.9	0.6485	0.095
5	2.68	2.24	26.9	0.1236	0.295
6	2.18	1.20	26.0	0.3418	0.183

표 2-6. 거봉 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s)한 후 0℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 색상 변화(Hunter b)에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	1.02	6.11	49.5	0.0057	0.534
1	0.38	4.89	82.8	0.0134	0.478
2	0.38	1.36	54.6	0.2904	0.203
3	0.28	6.71	59.8	0.0038	0.557
4	0.43	1.14	77.9	0.3643	0.175
5	0.58	1.96	47.8	0.1606	0.268
6	0.61	0.68	43.3	0.5787	0.112

표 2-7. 거봉 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s)한 후 0℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 극한변형량에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean (mm)	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	1.77	0.27	19.4	0.8480	0.047
1	1.81	0.64	17.3	0.6017	0.106
2	1.89	3.17	20.5	0.0532	0.372
3	1.71	3.01	21.0	0.0611	0.360
4	1.67	0.83	23.5	0.4988	0.134
5	1.79	1.08	20.6	0.3861	0.168
6	1.62	0.05	22.6	0.9857	0.008

표 2-8. 거봉 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s)한 후 0℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 극한력에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean (gr)	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	73.6	0.44	16.2	0.7251	0.076
1	71.7	4.16	15.4	0.0233	0.438
2	71.8	2.39	17.6	0.1073	0.309
3	67.0	1.92	16.6	0.1667	0.264
4	64.1	4.59	16.0	0.0167	0.462
5	74.9	1.07	22.0	0.3890	0.167
6	68.2	0.45	25.0	0.7222	0.077

표 2-9. 거봉 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s)한 후 0℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 당도(%brix)에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean (%brix)	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	17.4	0.78	4.4	0.5237	0.127
1	16.9	0.45	2.9	0.7198	0.078
2	16.9	3.14	3.8	0.0546	0.370
3	16.8	1.44	3.7	0.2670	0.213
4	16.7	0.56	3.4	0.6499	0.094
5	16.6	1.39	2.7	0.2812	0.207
6	17.1	1.22	3.3	0.3361	0.185



표 2-10. 거봉 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s)한 후 0℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 수분함량에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean (%wb)	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	78.2	1.20	2.5	0.3526	0.286
5	46.2	0.14	5.4	0.7346	0.044

표 2-11. 거봉 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s)한 후 20℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 색상 변화(Hunter L)에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	28.3	2.10	4.6	0.1409	0.282
1	27.2	0.89	3.2	0.4670	0.143
2	27.7	0.53	3.2	0.6682	0.090
3	28.2	3.20	2.6	0.0516	0.375
4	28.4	1.58	3.3	0.2335	0.228
5	28.4	0.63	3.8	0.6072	0.105
6	28.2	1.21	3.4	0.3372	0.185

표 2-12. 거봉 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s)한 후 20℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 색상 변화(Hunter a)에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	5.27	5.52	22.5	0.0085	0.508
1	2.34	0.51	46.0	0.6818	0.087
2	2.67	0.91	28.5	0.4578	0.145
3	1.86	2.00	48.9	0.1541	0.273
4	2.23	0.52	45.9	0.6774	0.088
5	2.16	0.86	48.1	0.4800	0.139
6	1.93	2.13	32.4	0.1367	0.285

표 2-13. 거봉 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s)한 후 20℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 색상 변화(Hunter b)에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	1.02	6.11	49.5	0.0057	0.534
1	0.36	0.63	63.5	0.6039	0.106
2	0.64	2.66	36.2	0.0837	0.332
3	0.84	1.65	35.1	0.2169	0.236
4	0.80	0.41	54.8	0.7468	0.071
5	0.85	0.31	55.1	0.8207	0.054
6	0.92	0.57	40.0	0.6439	0.096

표 2-14. 거봉 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s)한 후 20℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 극한변형량에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean (mm)	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	1.77	0.27	19.4	0.8480	0.047
1	2.16	0.01	35.9	0.9988	0.001
2	1.68	0.88	19.4	0.4701	0.142
3	1.68	0.09	15.1	0.9654	0.016
4	1.60	2.43	17.0	0.1034	0.312
5	1.66	1.59	15.7	0.2320	0.229
6	1.46	1.24	21.0	0.3270	0.188

표 2-15. 거봉 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s)한 후 20℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 극한력에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean (g <sub>f</sub> )	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	73.6	0.44	16.2	0.7251	0.076
1	76.3	1.45	22.2	0.2663	0.213
2	67.0	4.17	17.5	0.0231	0.439
3	74.6	0.64	13.9	0.5985	0.107
4	67.1	0.80	16.0	0.5120	0.130
5	69.0	1.70	21.7	0.2077	0.241
6	68.5	1.48	13.2	0.2571	0.217

표 2-16. 거봉 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s)한 후 20℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 당도(%brix)에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean (%brix)	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	17.4	0.78	4.4	0.5237	0.127
1	16.9	0.49	3.9	0.6928	0.0844
2	16.7	0.33	4.5	0.8022	0.058
3	16.8	0.39	3.4	0.7649	0.067
4	16.9	0.07	3.5	0.9755	0.012
5	15.9	0.11	24.3	0.9545	0.019
6	16.6	0.69	3.9	0.5705	0.114

표 2-17. 거봉 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s)한 후 20℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 수분함량에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean (%wb)	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	78.2	1.20	2.5	0.3526	0.286
5	78.0	0.21	5.2	0.6752	0.066

표 2-18. MBA 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s)한 후 0℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 색상 변화(Hunter L)에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	29.3	1.71	4.3	0.2051	0.242
1	28.6	3.03	3.0	0.0599	0.362
2	29.1	2.87	2.9	0.0692	0.349
3	30.1	1.88	8.0	0.1743	0.260
4	28.9	0.31	4.4	0.8184	0.054
5	29.1	0.43	4.0	0.7317	0.075
6	29.0	1.06	4.4	0.3940	0.165

표 2-19. MBA 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s) 한 후 0℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 색상 변화(Hunter a)에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	5.00	0.60	33.6	0.6244	0.101
1	4.55	0.81	37.9	0.5059	0.132
2	.91	1.81	24.8	0.1850	0.253
3	3.59	0.74	30.5	0.5444	0.121
4	3.37	1.08	19.6	0.3852	0.168
5	3.74	1.62	22.4	0.2234	0.233
6	3.41	1.72	25.8	0.2029	0.243

표 2-20. MBA 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s) 한 후 0℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 색상 변화(Hunter b)에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	0.88	0.62	113.7	0.6106	0.104
1	0.53	2.00	122.3	0.1545	0.272
2	-1.01	1.38	-5173.2	0.2861	0.205
3	-0.23	0.73	-315.6	0.5514	0.119
4	-0.32	0.72	-214.5	0.5547	0.118
5	-0.18	1.23	-273.4	0.3305	0.187
6	-0.31	1.53	-220.0	0.2445	0.223

표 2-21. MBA 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s) 한 후 0℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 극한변형량에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean (mm)	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	1.91	0.48	16.1	0.6984	0.083
1	1.90	2.22	17.9	0.1251	0.294
2	2.09	1.70	19.5	0.2070	0.241
3	2.08	1.51	14.8	0.2490	0.221
4	2.04	0.89	17.1	0.4667	0.143
5	1.96	0.36	20.4	0.7793	0.064
6	2.12	2.21	13.3	0.1260	0.293

표 2-22. MBA 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s) 한 후 0℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 극한력에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean (g <sub>f</sub> )	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	54.6	0.77	15.4	0.5279	0.126
1	59.2	1.25	12.2	0.3235	0.190
2	60.7	0.46	18.7	0.7107	0.080
3	55.6	0.53	19.6	0.6712	0.089
4	56.2	0.37	18.0	0.7754	0.064
5	54.7	0.82	26.1	0.5029	0.132
6	60.4	1.07	19.3	0.3894	0.167

표 2-23. MBA 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s) 한 후 0℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 당도(%brix)에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean (%brix)	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	18.7	0.46	4.0	0.7119	0.079
1	18.8	1.37	3.0	0.2871	0.204
2	18.9	1.16	3.6	0.3540	0.179
3	19.2	0.28	4.4	0.8362	0.050
4	19.1	1.52	3.5	0.2478	0.221
5	18.8	0.94	4.2	0.4438	0.150
6	18.6	0.47	6.3	0.7086	0.080

표 2-24. MBA 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s) 한 후 0℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 수분함량에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean (%wb)	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	80.0	0.81	0.9	0.4357	0.211
5	76.6	0.00	13.5	0.9715	0.000

표 2-25. MBA 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s) 한 후 20℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 색상 변화(Hunter L)에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	29.3	1.71	4.3	0.2051	0.242
1	30.1	9.56	2.6	0.0007	0.641
2	29.8	2.14	3.7	0.1351	0.286
3	29.1	2.83	3.6	0.0713	0.346
4	29.7	1.95	3.9	0.1619	0.267
5	29.8	6.86	3.2	0.0035	0.562
6	30.2	2.86	3.6	0.0699	0.348

표 2-26. MBA 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s) 한 후 20℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 색상 변화(Hunter a)에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	5.00	0.60	33.6	0.6244	0.101
1	4.50	3.16	31.4	0.0536	0.371
2	4.14	1.40	27.0	0.2805	0.207
3	4.66	2.82	28.6	0.0725	0.345
4	3.02	0.40	32.0	0.7557	0.069
5	3.15	1.93	24.3	0.1650	0.266
6	3.85	1.05	21.6	0.3960	0.165

표 2-27. MBA 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s) 한 후 20℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 색상 변화(Hunter b)에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	0.88	0.62	113.7	0.6106	0.104
1	0.52	0.30	234.2	0.8253	0.053
2	0.09	3.46	556.5	0.0413	0.393
3	0.59	1.88	93.4	0.1733	0.260
4	-0.30	0.85	-235.0	0.4871	0.137
5	-0.26	1.40	-171.3	0.2784	0.208
6	0.09	1.92	534.3	0.1675	0.264

표 2-28. MBA 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s) 한 후 20℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 극한변형량에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean (mm)	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	1.91	0.48	16.1	0.6984	0.083
1	1.82	0.63	14.7	0.6084	0.105
2	1.85	1.57	21.5	0.2345	0.227
3	1.99	0.97	13.1	0.4331	0.153
4	2.09	1.97	15.2	0.1594	0.269
5	2.10	1.71	12.3	0.2048	0.242
6	2.20	0.62	35.8	0.6138	0.103

표 2-29. MBA 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s) 한 후 20℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 극한력에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean (gr)	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	54.6	0.77	15.4	0.5279	0.126
1	58.3	0.51	16.2	0.6793	0.087
2	57.5	0.58	18.8	0.6366	0.098
3	57.8	0.35	16.3	0.7923	0.060
4	61.8	0.48	20.8	0.7016	0.082
5	64.1	0.14	14.5	0.9360	0.025
6	60.5	3.83	14.3	0.0301	0.418

표 2-30. MBA 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s) 한 후 20℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 당도(%brix)에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean (%brix)	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	18.7	0.46	4.0	0.7119	0.079
1	118.6	0.43	4.2	0.7354	0.074
2	18.6	0.40	4.9	0.7558	0.069
3	18.6	1.94	3.8	0.1633	0.267
4	19.1	0.18	4.7	0.9094	0.032
5	18.8	3.62	3.7	0.0361	0.404
6	18.9	1.12	3.0	0.3693	0.173

표 2-31. MBA 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s) 한 후 20℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 수분함량에 대한 UV 처리 효과 분석

Storage period (days)	Mean (%wb)	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	80.0	0.81	0.96	0.4357	0.211
5	72.2	0.00	14.7	0.9802	0.000

표 2-5에서 2-31까지 나타낸 바와 같이 UV C 처리가 포도의 품질에 미치는 영향을 보면, UV 처리 직후 약간의 색상 변화에 영향을 미치는 것을 제외하면 저장에 따른 영향은 거의 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 볼 때, 포도 수확 이후 레스베라트롤의 함량을 증폭시키기 위하여 UV 처리를 하고 저장을 하더라도 포도의 품질 변화는 염려할 수준이 아님을 알 수 있다.

#### 바. UV 처리에 따른 포도의 레스베라트롤 증폭 효과

앞에서 분석한 결과를 종합하면, 포도를 수확한 이후 UV C를 처리하여 포도의 품질에는 큰 영향을 주지 않으면서 레스베라트롤의 함량을 증폭할 수 있음을 알 수 있었다. 여기서는 UV C를 처리하여 포도의 레스베라트롤의 함량을 증폭함에 있어 UV의 세기 및 처리시간, 그리고 UV 처리후 저장조건에 따른 효과를 최적화하고자 하였다. 각 처리 조건의 영향을 분석하기 위하여 식 (2)의 모형에 근거하여 통계적 분석을 실시하였으며, 분석 결과를 표 2-33, 2-34 및 2-35에 나타내었다.

$$\text{수학적 모형: } [R] = a + bP + ct + dPt \quad (2)$$

여기서, [R]: UV 처리 후 포도의 레스베라트롤 함량(μg/g)

P: UV 세기(0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>)

t: UV 처리시간(30~600 s)

a, b, c, d: 상수값

표 2-32. UV 처리전 포도의 레스베라트롤 함량

품종	레스베라트롤 함량(μg/g)
MBA	1.24
거봉	1.15



표 2-33. 거봉 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s)한 후 0℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 레스베라트롤 함량에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean (µg/g)	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	6.57	13.02	11.8	0.0001	0.709
1	6.51	13.67	11.8	0.0001	0.719
2	6.54	13.32	11.8	0.0001	0.714
3	6.56	12.67	11.6	0.0002	0.703
4	6.57	12.23	11.7	0.0002	0.696
5	6.58	13.35	12.0	0.0001	0.714
6	6.61	13.46	11.9	0.0001	0.716
Storage period (days)	$[R] = a + bP + ct + dPt$				
	a	b	c	d	
0	5.82	-0.675	0.00581	-0.000948	
1	5.86	-0.843	0.00579	-0.000841	
2	5.85	-0.782	0.00561	-0.000585	
3	5.85	-0.652	0.00582	-0.001264	
4	5.73	-0.471	0.00614	-0.001786	
5	5.84	-0.728	0.00573	-0.000587	
6	5.73	-0.554	0.00603	-0.001004	

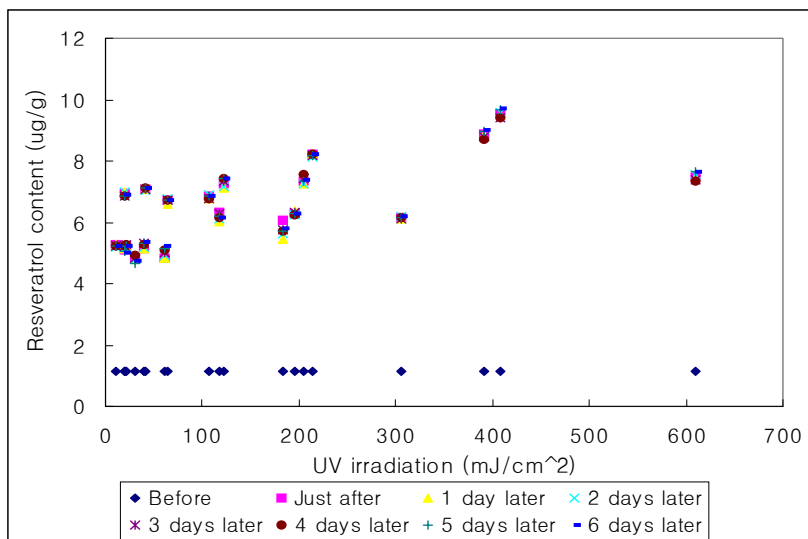


그림 2-107. 거봉 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s)한 후 0℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 레스베라트롤 함량 변화.

표 2-34. 거봉 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s)한 후 20℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 레스베라트롤 함량에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean (µg/g)	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
0	6.57	13.02	11.8	0.0001	0.709
1	6.54	16.25	11.2	0.0001	0.752
2	7.12	19.21	10.3	0.0001	0.782
3	7.53	19.88	8.68	0.0001	0.788
4	7.53	19.88	8.68	0.0001	0.788
5	7.65	19.30	8.94	0.0001	0.783
6	7.70	19.46	8.87	0.0001	0.784
Storage period (days)	$[R] = a + bP + ct + dPt$				
	a	b	c	d	
0	5.82	-0.675	0.00581	-0.000948	
1	5.78	-0.745	0.00612	-0.00020	
2	6.50	-1.159	0.00409	0.002859	
3	7.05	-1.143	0.00470	0.000980	
4	7.05	-1.143	0.00470	0.000980	
5	7.10	-1.118	0.00474	0.001204	
6	7.16	-1.128	0.00471	0.001280	

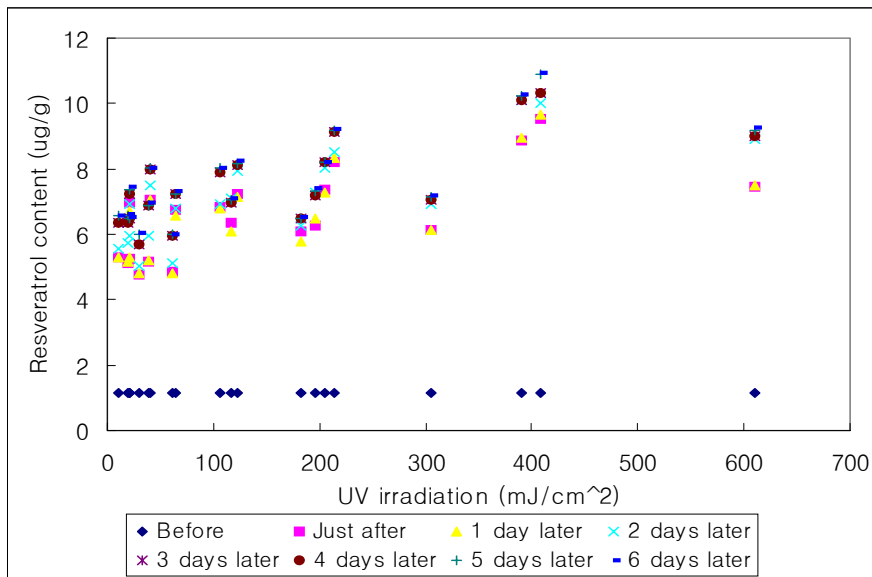


그림 2-108. 거봉 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s)한 후 20℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 레스베라트롤 함량 변화.

표 2-35. MBA 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s)한 후 20℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 레스베라트롤 함량에 대한 UV 처리효과 분석

Storage period (days)	Mean (µg/g)	F-value	Coefficient of variation	Significant probability	Coefficient of determination
1	8.26	11.91	9.43	0.0002	0.690
2	9.66	20.07	7.68	0.0001	0.790
3	10.86	50.79	7.24	0.0001	0.904
4	12.44	59.98	9.23	0.0001	0.918
5	13.83	32.15	14.2	0.0001	0.857
6	13.94	32.76	14.6	0.0001	0.860
Storage period (days)	$[R] = a + bP + ct + dPt$				
	a	b	c	d	
1	7.72	-0.802	0.00690	-0.00333	
2	8.95	-1.073	0.00510	0.00161	
3	8.98	-0.832	0.00698	0.00512	
4	8.99	-0.517	0.00854	0.01146	
5	9.42	-0.445	0.00880	0.01680	
6	9.68	-1.055	0.00909	0.01799	

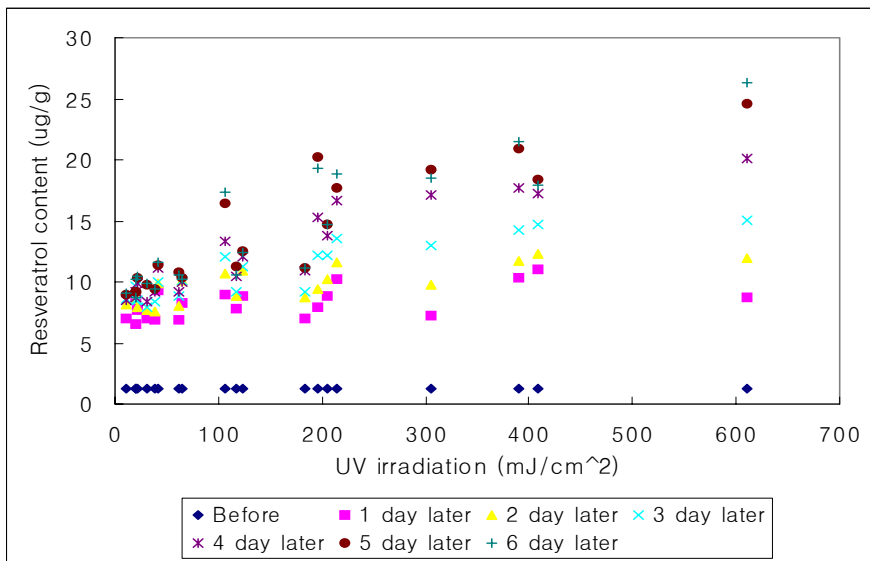


그림 2-109. MBA 포도를 UV 처리(처리조건: 0.356~1.017 mW/cm<sup>2</sup>, 30~600 s)한 후 20℃에서 저장하였을 때 저장기간별 포도의 레스베라트롤 함량 변화.

통계적 분석 결과를 볼 때, UV 세기와 처리시간이 클수록 저장기간이 길어 질수록 UV 처리에 따른 포도의 레스베라트롤의 증폭 효과는 증가하는 것으로 나타났음을 알 수 있다. 특히, UV 처리후 0℃보다는 20℃에서 저장하였을 때 UV 처리 효과는 더욱 크게 나타남을 알 수 있었다. 이러한 결과를 종합해 볼 때, 포도 수확 후 UV C를 이용하여 400~600 mJ/cm<sup>2</sup>의 에너지를 조사하고 20℃에서 5~6일 저장하였을 때 레스베라트롤의 함량 가장 많이 증폭되는 것을 알 수 있었다(그림 2-31, 2-32 및 2-33 참조). 그림 2-34는 UV 처리에 따른 레스베라트롤 증폭 효과(처리조건: MBA의 경우 610mJ/cm<sup>2</sup> 20℃ 6일저장; 거봉의 경우 408mJ/cm<sup>2</sup> 20℃ 6일저장)를 나타낸 것인데, MBA에서는 21.2배, 거봉에서는 9.5배 증폭되었음을 알 수 있다.

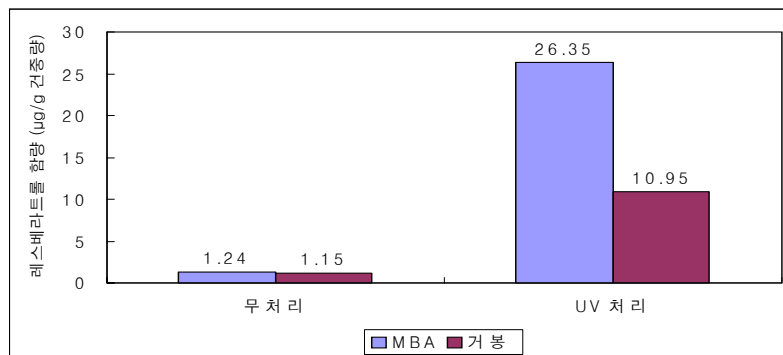


그림 2-110. UV 처리에 따른 레스베라트롤 증폭 효과(처리조건: MBA의 경우 610mJ/cm<sup>2</sup> 20℃ 6일저장; 거봉의 경우 408mJ/cm<sup>2</sup> 20℃ 6일저장).

#### 사. 2차 시작기의 제작 및 성능평가

1차 시작기를 제작하여 현장(경북 영천시 고경읍 동도리 125번지 포도농가)에서 성능평가를 실시한 결과, 다음과 같은 개선사항을 수집할 수 있었다.

개선사항:

- ① 이송: 중심부를 이탈하는 사례가 발생할 우려가 있어 가장자리 가이드 설치
- ② 냉각: 램프에서 발생한 열로 인하여 포도알의 균열 현상이 일부 발생하여 냉각 성능 보완이 필요
- ③ UV 램프: 고정이 견고하면서도 착탈이 용이하도록 개선
- ④ UV 빛 유출: 작업자의 안전을 위해 빛 차단막 개선
- ⑤ 포도 투입구 및 배출구 길이: 길게 하여 작업자의 편이 도모

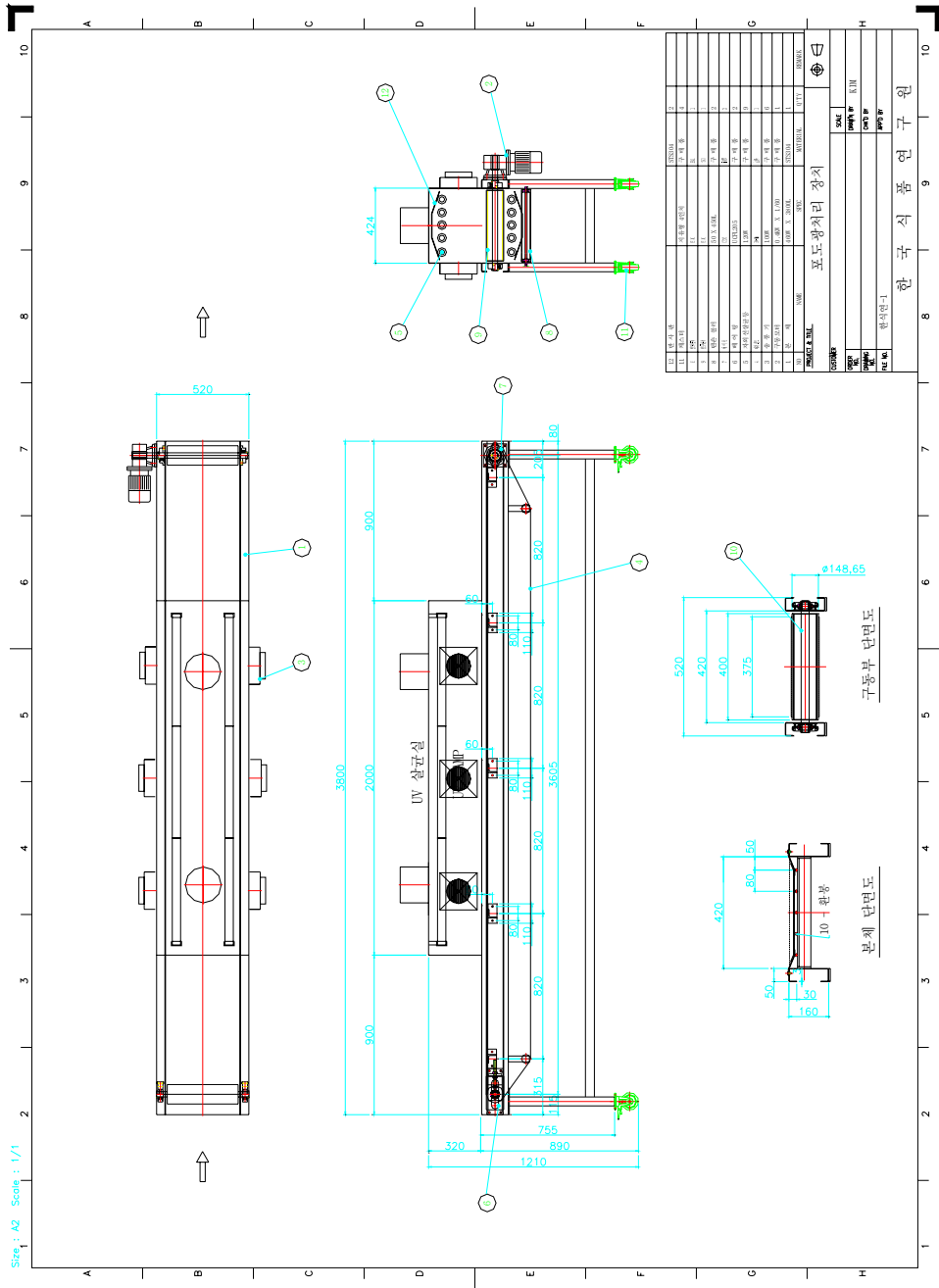


그림 2-111. 2차 시작기 제원



그림 2-112. 2차 시작기 가동준비



그림 2-113. 2차 시작기 가동중



그림 2-114. UV 처리후 포장작업



그림 2-115. 레스베라트롤 증폭 포도

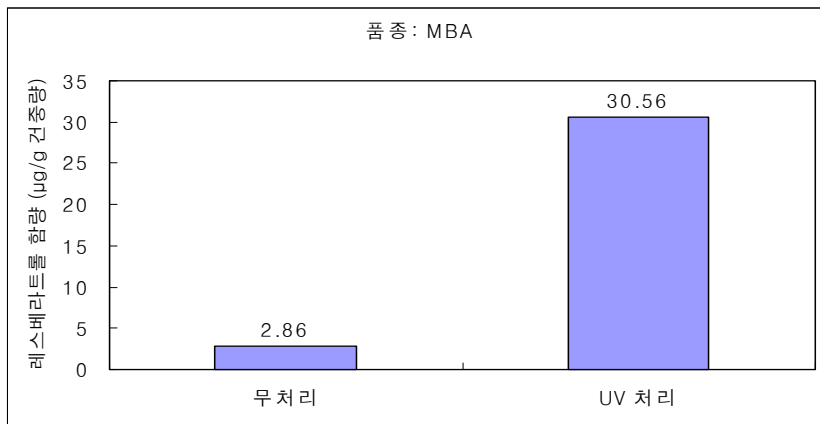


그림 2-116. UV 처리후 레스베라트롤 함량(품종: MBA)

그림 2-35는 2차 시작기의 제원을 나타낸 것이고, 그림 2-36에서 2-39는 2차 시작기를 이용하여 포도의 레스베라트롤을 증폭하는 작업을 보여주는 것이다. 한편, 그림 2-40은 UV 처리직후의 레스베라트롤 함량이 증폭된 정도를 나타낸 것이다. 현장에서 대량 처리를 한 경우, 레스베라트롤은 평균적으로 약 10배 증폭되는 것으로 나타났다. 특히, 1차 시작기를 통해 얻어진 결과를 바탕으로 개선된 2차 시작기에서는 작업의 편리성이 향상되었을 뿐만 아니라 UV 처리 시 포도의 온도 상승에 의한 포도알의 열과 현상이 전혀 나타나지 않았다. 또한, 2차 시작기에서도 1차 시작기에서와 마찬가지로 8시간 동안 약 10톤의 포도를 처리할 수 있는 것으로 검증되었다.

한편, 대규모 처리를 위해서는 작업시간 5시간 기준으로 50톤을 처리할 수 있는 시스템을 확보해야 대형 유통점에서의 요구에 따른 출하 물량을 처리할 수 있을 것으로 판단되었다(표 2-36 참조).

표 2-36. 2차 시작기의 처리용량 및 향후 설계요구 사항

작업시간	처리용량	향후 요구사항
8시간/대	10톤/대	작업시간 5시간 기준으로 50톤을 처리할 수 있는 시스템을 확보해야 대형 유통점에서의 요구에 따른 출하 물량을 처리할 수 있을 것으로 판단됨

#### 아. 기계 도입에 따른 경제성 분석

본 연구에서 개발된 기술은 관련 산업체에 이미 기술이전을 완료하여 표 2-37과 같이 제품화를 시행하고 있다. 이미 2005년도에 약 10톤의 포도를 출시하여 약 5천만원의 매출규모를 달성하였고, 2006년도에는 약 100톤의 레스베라트롤 증폭 포도를 출시할 계획을 가지고 있다. 2006년 현재, 영천시 금호읍 덕성리 20-21번지(저온창고 2동 사무실 및 100평 공장)에서 레스베라트롤 증폭을 위한 작업을 준비 중에 있다.

표 2-37. 레스베라트롤 증폭 포도의 산업화 현황

연도	처리량(톤)	매출규모(원)
2005	10	5천만
2006	100	5억

표 2-38. 레스베라트롤 증폭을 위해 투입된 기계 비용 및 수익

기계용량	제작비용(원)	유지비용 (원/년)	작업인원(명)	수익
10톤/8시간	12,000,000	3,000,000	2	무처리 포도 대비 약 50% 고가격 유지 (2005년도 시범사업 기준)

1차 및 2차 시작기를 통해서 레스베라트롤을 증폭하기 위해 도입된 기계의 비용을 개략 분석한 결과는 표 2-38과 같다. 표에서 보는 바와 같이 본 연구를 통해 개발된 기술은 매우 저렴한 비용으로 고부가가치를 창출할 수 있는 산업화 기술로 평가된다고 할 수 있다.



## 제 3 절 포도의 생물활성 평가

### 1. 서론

수확후 포도의 생체대사 조절을 이용하여 레스베라트롤의 함량을 증폭하는 방법에 따라 기능성 성분이 강화된 포도에 대해서 생물활성 효능을 평가하고자 하였다. 본 연구에서는 레스베라트롤의 함량이 증진된 포도의 생물활성은 항산화 효능, 암세포전이 및 침윤에 관한 효능, 항염증 효능 등의 관점에서 평가되었다.

### 2. 재료 및 방법

#### 가. 효능 평가 시료 제조

항암 기능성 물질인 레스베라트롤이 고함유된 생식용 청정 포도 생산을 위해 수확 후 세정 및 생체대사 조절처리용 기계개발을 최종 목표로 이 장치를 통해 포도 과피에 잔류된 농약 및 불순물이 제거되고 resveratrol 함량이 증폭되어 과피까지 먹을 수 있는 생식용 포도를 생산하고자, 2가지 품종(MBA, 거봉)의 포도를 4가지 파장으로 UV처리(UV-A 40W, 200W, UV-C 40W, 190W) 하였다. 처리된 포도를 껍질을 분리하여 동결건조시킨 시험재료인 포도 껍질을 주관연구기관으로부터 공급받았다. 공급받은 시료에 대해 mixer를 이용해 분쇄하고 200mesh의 체로 걸러 체쳐진 시료와 체쳐지지 않은 시료로 구분하였다. 이렇게 처리된 포도껍질을 여러 생물학적 활성 평가에 이용하였다. 1차년도에 사용하였던 2가지 품종(MBA, 거봉)의 포도 분쇄물을 에탄올:물(8:2, v/v) 용액에 현탁하고 실온에서 47kHz의 초음파처리기(Branson 5210)로 현탁액 1L당 0.04kW의 초음파 에너지를 1시간 가하여 추출하고 여지로 거른 후 감압 증발시켜 추출물을 제조하였다. 처리된 포도껍질추출물을 다음 1차년도 생물학적 활성 평가에 이용하였다. 2, 3차 년도에는 시험재료를 에탄올 추출물로 제조하여 효능 평가에 사용하였다. 1차년도에 사용하였던 2가지 품종(MBA, 거봉)의 포도 분쇄물을 에탄올:물(8:2, v/v) 용액에 현탁하고 실온에서 47 kHz의 초음파처리기(Branson 5210)로 현탁액 1L당 0.04kW의 초음파 에너지를 1시간 가하여 추출하고 여지로 거른 후 감압증발시켜 추출물을 제조하였다. 처리된 포도껍질추출물을 다음 2, 3차년도 생물학적 활성 평가에 이용하였다.

## 나. 항산화 효능 평가 및 암세포 사멸 유도효능 평가

### 1) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 프리 라디칼 소거법에 의한 항산화 효능 측정

시료를 DMSO로 처리 후 515 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 DMSO를 사용하며, % inhibition은 시료의 값과 DMSO 대조군과의 비교 값으로부터 구하여 계산하였다. 실험결과는 IC<sub>50</sub> 값으로 표시하여 활성도를 비교하였다.

### 2) 산화적 스트레스로 인한 세포내 reactive oxygen species (ROS) 생성 저해 효능 평가

Hepa 1c1c7 세포를 배양하고 시료를 처리하여 세포를 lysis 시켜 세포현탁액을 만들었다. 세포현탁액을 500 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hydrogen peroxide)와 15분 동안 배양한 후, H<sub>2</sub>DCF-DA와 반응시킨 다음 flow cytometry를 이용하여 분석하였다.

### 3) 암세포 성장 저해 효능 평가(MTT assay)

사람 암세포주(폐암 A549, 대장암 HT-29, 상피세포암 HT-1080, 위암 SNU-638)를 이용하여 DMSO만 처리한 군과 비교하여 세포 생존율을 계산하였다.

### 4) 세포 신호 전달 체계에 미치는 영향 평가(Western blot analysis)

HCT-116 세포를 배양하고 시료를 처리하여 세포를 lysis 시켜 단백질을 추출한 후 SDS-page를 이용하여 분리한다. 분리된 단백질을 PVDF로 옮긴 후 antibody (c-myc, p53, β-actin, p-ERK)를 배양처리 한 후 ECL kit로 단백질 발현정도를 측정하였다.

### 5) SRB assay를 이용한 세포독성 평가

사람 암세포주(폐암 A549, 대장암 HT-29, 상피세포암 HT-1080, 위암 SNU-638)를 세포 현탁액으로 처리하여 DMSO만 처리한 대조군과 zero-day control의 차이를 기준으로하여 각 시험 물질처리에 따른 세포 생존율을 환산하였다.

### 6) 세포 주기에 미치는 영향 평가

HCT-116 세포를 배양하고 시료를 처리한 후 세포현탁액을 조제하여 PI buffer로 염색한 뒤 flow cytometer를 이용하여 세포 주기를 분석하였다.

#### 7) DNA fragmentation

HCT-116 세포를 배양하고 시료를 처리한 후 세포를 모으고 DNA lysis buffer를 이용하여 세포를 lysis 시킨 후 RNA 및 단백질을 제거하고 ammonium acetate와 ice-cold ethanol을 가하여 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA를 TE buffer에 녹이고 260 및 280 nm에서 흡광도를 측정하여 DNA의 양 및 순도를 결정하였다. 10 µg의 DNA를 2% agarose gel로 전기 영동 후 SYBR Gold staining solution (Molecular Probes)로 염색하고 Alpha Imager<sup>®</sup>를 이용하여 관찰하였다.

#### 8) Caspase 활성 측정

HCT 116 세포를 60 mm cell culture dish에  $3 \times 10^5$ 개씩 넣고 24시간 동안 배양하여 부착시킨 다음, PBS로 1회 세척한 후 검색 시료를 넣고 24시간 동안 배양하였다. 세포를 모은 후 lysis buffer 로 세포를 lysis 시켰다. Cell lysate 를 caspase assay buffer 중에서 caspase-3의 기질인 Ac-DEVD-pNA와 37°C 에서 4시간 이상 배양하였다. 배양 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 따로 마련한 pNA(p-nitroaniline) standard curve에 대입하여 흡광도를 pNA의 농도로 환산하여 caspase-3 유도 활성을 평가하였다.

다. 암세포 전이 및 침윤에 관한 효능 평가

#### 1) 암세포전이 관련유전자의 발현에 미치는 영향평가(RT-PCR)

HT-1080 세포를 배양하고 시료를 처리한 후 TRI reagent를 가하여 세포를 lysis 시키고, chloroform을 처리하여 RNA를 분리하였다. 이 중 1 µg을 AMV 역전사효소 및 oligo-(dT)<sub>15</sub> primer를 이용하여 42°C에서 60분 동안 역전사 반응을 실시하여 cDNA를 생성한다. 생성된 cDNA는 Taq polymerase 및 gene 에 선택적인 primer를 이용하여 PCR 반응을 한다. 증폭된 PCR 산물은 전기 영동한 후 SYBR Gold staining solution으로 염색하여 Alpha Imager<sup>TM</sup> (Alpha Innotech Corp. USA)를 이용해 염색된 DNA를 확인한다. MMP-2, MMP-9, TIMP1, TIMP2, MT1-MMP 및 housekeeping gene인 β-actin gene 의 증폭에 이용되어진 sense/antisense primer는 다음과 같다.

Target gene	Sequences		Product size (bp)
MMP-2	Sense	5'-AGATCTGCAAACAGGACATTGTATT-3'	400
	Antisense	5'-TTCTTCTTCACCTCATTGTATCTCC-3'	
MMP-9	Sense	5'-CTGGGCTTAGATCATTCCTCAGT-3'	400
	Antisense	5'-AGTACTTCCCATCCTTGAACAAATA-3'	
TIMP1	Sense	5'-TGGGGACACCAGAAGTCAAC-3'	400
	Antisense	5'-TTTTTCAGAGCCTTGGAGGAG-3'	
TIMP2	Sense	5'-GTCAGTGAGAAGGAAGTGGACTCT-3'	400
	Antisense	5'-ATGTTCTTCTCTGTGACCCAGTC-3'	
MT1-MMP	Sense	5'-GGGCCTGCCTGCGTCCATCAACA-3'	401
	Antisense	5'-GCCGCCCTCCTCGTCCACCTCAAT-3'	
β-Actin	Sense	5'-AGCACAATGAAGATCAAGAT-3'	188
	Antisense	5'-TGTAACGCAACTAAGTCATA-3'	

## 2) Migration assay

HT1080 cells을 6 well plate에 약 90% 정도 생육시킨 후 well의 중간을 yellow tip을 이용하여 그어주었다. 그 다음 시료를 18시간 동안 처리하고 hematoxylin과 Eosin Y 용액으로 염색한 다음 실온에서 건조하여 사진 촬영하였다.

## 3) Gelatin zymography

HT-1080 세포를 배양하고 시료를 처리한 후 배양 상등액을 원심분리 하여 효소원을 얻고 Gelatin이 첨가된 SDS-PAGE gel을 이용하여 전기영동한 후 gel을 37°C에서 16~24시간동안 흔들어주면서 incubation하였다. 이후 Coomassie blue R250 용액으로 염색하고 destaining solution(MeOH 50ml, acetic acid 100ml, H<sub>2</sub>O 850ml)으로 충분히 탈색시킨 후 gel을 건조한 후 Scanner(EPSON)를 이용하여 clear zone을 관찰하였다.

4) Colony dispersion assay

24 well plate에 HT1080 cells을 well의 가운데에 조심스럽게 떨어뜨린 후 16시간동안 배양한 후 시료를 처리하고 migration assay와 동일하게 hematoxylin과 eosin Y 용액으로 염색하고 사진 촬영하였다.

5) QR 유전자의 발현에 미치는 영향평가 (RT-PCR)

HT-1080 세포를 배양하고 시료를 처리한 후 TRI reagent를 가하여 세포를 lysis 시키고, chloroform을 처리하여 RNA를 분리하였다. RT-PCR법은 위의 암세포전이 관련유전자의 발현에 미치는 영향평가와 동일하게 시행하였으며 사용된 sense/antisense primer는 다음과 같다.

Target gene	Sequences		Product size (bp)
QR	Sense	5'-TCGGAGAACTTTCAGTACCC-3'	459
	Antisense	5'-TGCAGAGAGTACATGGAGCC-3'	
β-Actin	Sense	5'-AGCACAATGAAGATCAAGAT-3'	188
	Antisense	5'-TGTAACGCAACTAAGTCATA-3'	

라. 항염증 효능 평가

1) COX-2, iNOS 유전자의 발현 억제에 미치는 영향평가(RT-PCR)

마우스 대식세포주인 RAW 264.7을 배양하고 시료를 처리한 후 TRI reagent를 가하여 세포를 lysis 시키고, chloroform을 처리하여 RNA를 분리하였다. RT-PCR법은 위의 암세포전이 관련유전자의 발현에 미치는 영향평가와 동일하게 시행하였으며 사용된 sense/antisense primer는 다음과 같다.

Target gene	Primer	Sequences	Product size (bp)
iNOS	Sense	5'-ATGTCCGAAGCAAACATCAC-3'	401
	Antisense	5'-TAATGTCCAGGAAGTAGGTG-3'	
COX-2	Sense	5'-GGAGAGACTATCAAGATAGTGATC-3'	861
	Antisense	5'-ATGGTCAGTAGACTTTTACAGCTC-3'	
β-Actin	Sense	5'-TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG-3'	514
	Antisense	5'-TTTGATGTCACGCACGATTTCC-3'	

## 2) Lipopolysaccharide 처리에 의한 cyclooxygenase-2 (COX-2) 유도 저해 활성 검색

마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 배양, 처리한 후 흡광도를 측정한다. 따로 PGE<sub>2</sub> 농도로 환산하여 시험군에서의 PGE<sub>2</sub> 생성량과 대조군의 PGE<sub>2</sub> 생성량을 비교하여 % Inhibition을 계산한다.

## 3) Inducible nitric oxide synthase(iNOS) 억제 효과 검색

마우스 대식세포의 LPS에 의한 NO 생성 저해 활성을 검색한다. RAW 264.7 세포의 세포 현탁액을 배양, 처리한 후 NaNO<sub>2</sub>를 표준품으로 하여 검량선을 작성하여 각 시료를 처리한 배양액 중의 NO 생성량을 구하고 이로부터 시험군에서의 저해 활성을 측정한다.

## 4) 마우스 피부암 억제 효과

ICR 마우스 등의 털을 동물용 clipper를 이용하여 깎아 제거한 후 시료를 acetone에 녹여 마우스 등에 국소도포하고 1시간 후 acetone에 녹인 TPA를 다시 도포하였다. 4시간 후 마우스를 희생시켜 피부를 잘라내고 액체질소와 함께 분쇄 후 TRI reagent에 넣어 균질화시킨 후 chloroform을 이용하여 RNA를 추출하였다. RT-PCR법은 위의 암세포전이 관련유전자의 발현에 미치는 영향

평가와 동일하게 시행하였으며 사용된 sense/antisense primer는 다음과 같다.

Target gene	Primer	Sequences	Product size (bp)
COX-2	Sense	5'-GGAGAGACTATCAAGATAGTGATC-3'	861
	Antisense	5'-ATGGTCAGTAGACTTTTACAGCTC-3'	
β-Actin	Sense	5'-TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG-3'	514
	Antisense	5'-TTTGATGTCACGCACGATTTCC-3'	

### 3. 연구결과

#### 가. 항산화 효능 평가 및 암세포 사멸 유도효능 평가

##### 1) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 프리 라디칼 소거법에 의한 항산화 효능 측정

UV처리한 포도껍질의 free radical scavenging 효과를 알아본 결과 UV처리 포도껍질들은 대체적으로 400µg/ml 진후에서 50%의 효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 거봉에 비해 MBA가 프리 라디칼 소거 효과가 높은 것으로 나타났다. 체척지지 않은 시료가 체척진 시료보다 높은 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다. 이 중 체척지지 않은 시료는 포도 알맹이 부분이 포함되어 곱게 갈아진 체척진 시료에 비해 껍질 부분이 많이 함유되어 있는 것으로 생각되며 따라서 더욱 높은 항산화 효과를 나타내는 것으로 확인될 수 있다. UV처리에 따른 효과는 UV처리를 하지 않은 시료에 비해 대부분 약간 높은 것으로 나타났다(그림 3-1, 표 3-1).

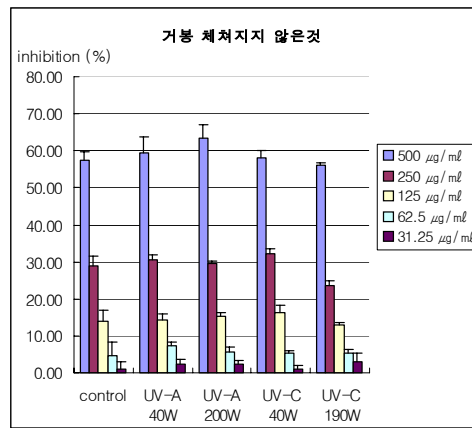
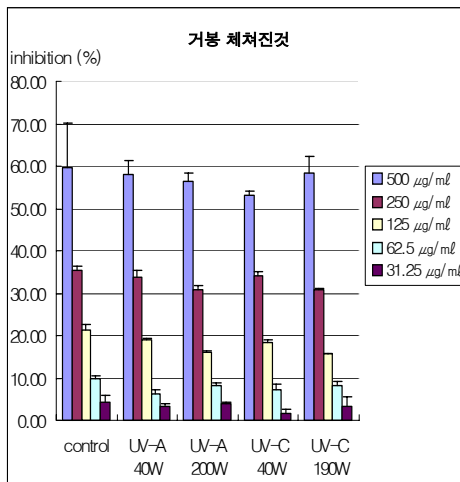
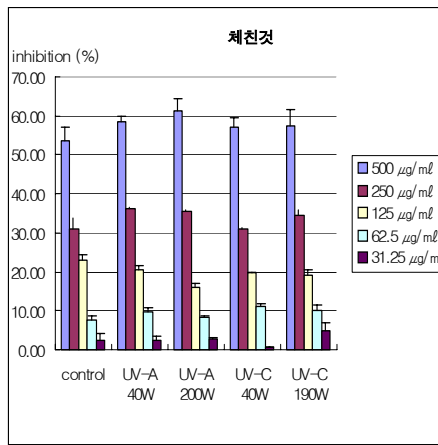
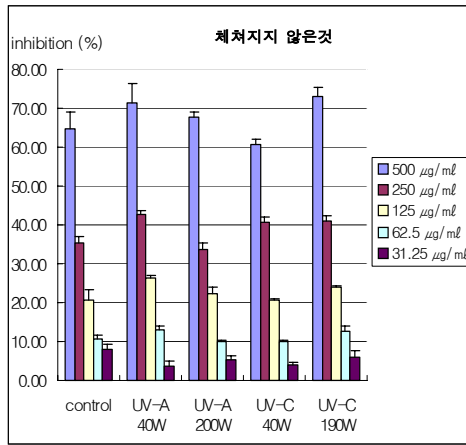


그림 3-1. UV 처리포도들의 항산화 작용(상: MBA; 하: 거봉)



표 3-1. UV 처리포도들의 항산화 작용

Sample		% Inhibition at 500 $\mu\text{g}/\text{ml}^*$	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
MBA 체진것	Control	53.49	457.41
	UV-A 40W	58.46	395.37
	UV-A 200W	61.35	389.02
	UV-C 40W	57.25	423.13
	UV-C 190W	57.38	414.55
MBA 체쳐지지 않은것	Control	64.58	373.19
	UV-A 40W	71.28	299.18
	UV-A 200W	67.60	361.19
	UV-C 40W	60.68	364.90
	UV-C 190W	73.13	312.13
거봉 체진것	Control	59.74	391.19
	UV-A 40W	57.94	411.80
	UV-A 200W	56.44	435.23
	UV-C 40W	53.26	449.07
	UV-C 190W	58.51	421.78
거봉 체쳐지지 않은것	Control	57.28	434.36
	UV-A 40W	59.44	417.06
	UV-A 200W	63.31	401.24
	UV-C 40W	58.00	417.66
	UV-C 190W	56.30	458.67
Resveratrol*		67.68	53.61
Vitamin C*		90.50	21.90
Gallic acid*		89.66	3.95

\* : Resveratrol, Vitamin C, Gallic acid는 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이 최고농도임.

2) 산화적 스트레스로 인한 세포내 reactive oxygen species (ROS) 생성 저해 효능 평가

포도에 함유되어 있는 stilbenoid인 resveratrol이 항산화 효능이 있는 것으로 보고됨에 따라, 포도 추출물들이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에 의한 세포 내 활성 산소종 (reactive oxygen species, ROS) 증가를 억제하는 활성이 있는지를 H<sub>2</sub>DCF-DA 염색법을 이용하여 평가하였다. 500 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만 처리한 세포에서는(그림 3-2)에 나타난 바와 같이 DCF에 의한 형광이 뚜렷하게 증가하는 것으로 확인되었으며, MBA control, MBA UV 200W, 거봉 control 400 μg/ml 처리시 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만 처리한 세포에 비하여 형광이 증가되는 정도가 20% 가량 감소하는 것으로 확인되었다. 이를 통하여 포도 추출물들은 약간의 항산화 효능을 지니며, 이를 통하여 산화적 스트레스에 의한 세포 손상도 다소 억제할 수 있을 것으로 여겨지며 UV처리에 의한 뚜렷한 억제 효과차이는 나타나지 않았다.

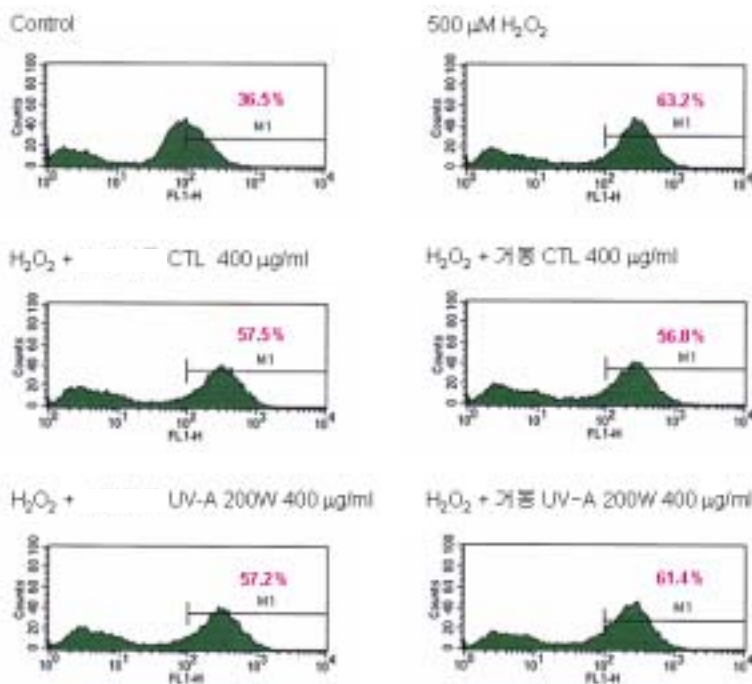


그림 3-2. 포도 추출물들의 세포 내 활성 산소 종 생성 저해 효능

3) 암세포 성장 저해 효능 평가(MTT assay)

UV처리 포도껍질들의 암세포 성장에 대한 영향을 폐암세포주인 A549와 대

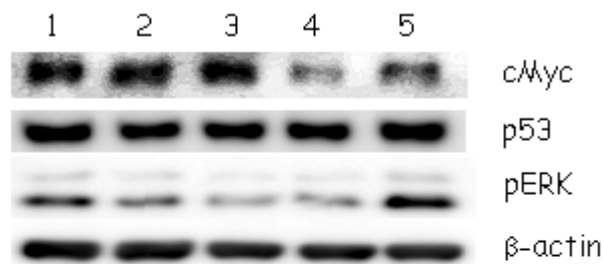
장암세포주인 HT-29를 이용하여 알아보았다. 양성 대조군으로는 Resveratrol을 이용하였다. 시험 농도 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 A549의 경우 60%정도까지 높은 성장 억제효과를 나타내었다. UV처리 효과를 보면 다른처리에 비해 UV-C 190W를 처리한 시료에서 높은 효과가 나타나는 것을 확인할 수 있다.

표 3-2. UV 처리포도들의 암세포 성장에 대한 효과

Sample		% cell proliferation at 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	
		A549	HT-29
MBA 채진것	Control	76.58	100
	UV-A 40W	79.25	100
	UV-A 200W	73.54	71.52
	UV-C 40W	76.31	83.38
	UV-C 190W	47.2	80.56
MBA 채쳐지지 않은것	Control	46.23	70.02
	UV-A 40W	48.47	100
	UV-A 200W	53.27	100
	UV-C 40W	52.47	100
	UV-C 190W	42.86	100
거봉 채진것	Control	47.81	94.03
	UV-A 40W	47.54	93.00
	UV-A 200W	41.6	87.30
	UV-C 40W	42.66	61.04
	UV-C 190W	34.67	79.98
거봉 채쳐지지 않은것	Control	47.28	84.47
	UV-A 40W	49.92	94.90
	UV-A 200W	38.14	82.11
	UV-C 40W	51.32	86.12
	UV-C 190W	43.8	100

#### 4) 세포 신호 전달 체계에 미치는 영향 평가(Western blot analysis)

세포 독성 평가와 암세포 저해 효능 평가를 통해 UV처리 포도추출물이 암세포성장억제 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 이와 같은 세포성장억제의 효과는 다양한 세포신호전달체계의 조절에 의해 이루어지므로 UV처리 포도추출물이 세포신호전달체계에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 사람 대장암세포 HCT-116에 시료를 처리하여 western blot을 실시하였다. 그 결과 세포주기에 관여하며 oncogene으로 작용하는 c-myc의 발현이 거봉을 처리한 시료에서 저해 효능을 나타내는 것을 확인하였다. 그러나 UV처리에 따른 효능 차이는 나타나지 않았으며 pERK은 MBA에서 저해 효능이 약간 보였으며 p53의 경우 시료 처리에 따른 발현차이를 나타내지 않았다(그림 3-3).



- 1 : Control
- 2 : MBA 추출물 Control 200 µg/ml
- 3 : MBA 추출물 UV-A 200W 200 µg/ml
- 4 : 거봉 추출물 control 200 µg/ml
- 5 : 거봉 추출물 UV-A 200W 200 µg/ml

그림 3-3. UV처리포도들의 세포 주기 조절 관련 단백질 발현 영향 평가

#### 5) SRB assay를 이용한 세포독성 평가

UV처리 포도껍질의 세포독성을 4가지 cell line에서 실험하여 비교해 본 결과 폐암세포주인 A549에서 가장 세포독성효과가 높은 것으로 나타났으며 약 50% 정도의 효과를 보였다. UV처리에 따른 독성효과는 control에 비해 대부분 약간 높은 것으로 나타났다(표 3-3).

표 3-3. UV 처리포도들의 세포독성 효과

Sample		% survival at 500 $\mu$ g/ml			
		A549	SNU-638	HT-29	HT-1080
MBA 체진것	Control	51.85	69.84	63.32	65.52
	UV-A 40W	60.08	76.85	71.20	71.08
	UV-A 200W	67.39	76.53	77.75	72.44
	UV-C 40W	56.35	75.15	71.84	66.41
	UV-C 190W	53.03	86.50	63.54	63.84
MBA 체쳐지지 않은것	Control	56.00	59.90	63.44	71.69
	UV-A 40W	38.45	46.13	57.21	56.33
	UV-A 200W	44.96	73.59	71.16	72.64
	UV-C 40W	46.99	66.16	61.35	69.16
	UV-C 190W	41.50	65.91	65.22	69.25
거봉 체진것	Control	64.51	72.32	74.61	83.27
	UV-A 40W	73.49	82.51	81.21	90.76
	UV-A 200W	67.66	78.47	70.09	91.61
	UV-C 40W	60.84	75.54	72.30	87.19
	UV-C 190W	69.66	78.08	84.90	100
거봉 체쳐지지 않은것	Control	56.33	68.71	68.53	86.72
	UV-A 40W	49.83	78.08	69.32	87.06
	UV-A 200W	58.99	81.84	79.21	92.27
	UV-C 40W	56.52	91.89	67.02	96.45
	UV-C 190W	49.18	90.82	72.08	100

6) 세포 주기에 미치는 영향 평가

HCT-116 세포를 배양하고 시료(농도 : 200  $\mu$ g/ml)를 24시간 처리한 후 세

포현탁액을 조제하여 PI buffer로 염색한 뒤 flow cytometer를 이용하여 세포 주기를 분석하였다. 그 결과(표 3-4)에 나타난 바와 같이 4종의 포도 추출물을 처리한 세포에서 시료를 처리하지 않은 대조군과 비슷한 세포주기 형태를 나타내었다. 따라서 포도 추출물들은 세포주기 변화에는 영향을 미치지 않는 것으로 여겨진다.

표 3-4. 포도 추출물들에 의한 세포주기 변화 분석

Phase	Control (%)	MBA CTL	MBA UV-A 200W	거봉 CTL	거봉 UV-A 200W
G0/G1	31.88	34.80	32.60	30.44	30.43
G2/M	39.30	37.59	38.64	37.21	38.16
S	28.82	27.61	28.76	32.34	31.41
Apoptosis	0	0	0	0	0

#### 7) DNA ladder fragmentation assay

포도 추출물들이 사람 대장암 세포주인 HCT 116에 대하여 apoptosis의 지표로 알려져 있는 DNA fragmentation 유도 활성이 있는지를 확인하여 보았다. 그림 3-4에 나타난 바와 같이, 4종의 포도 추출물들을 처리한 세포에서도 시료를 처리하지 않은 대조군과 마찬가지로 DNA fragmentation이 나타나지 않았다. 따라서 포도 추출물들은 apoptosis를 통한 암세포 증식 저해 활성을 지니지 않는 것으로 여겨진다.

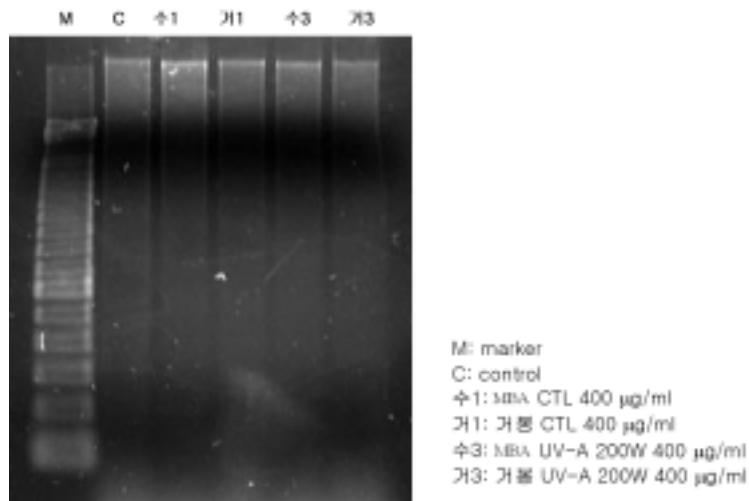
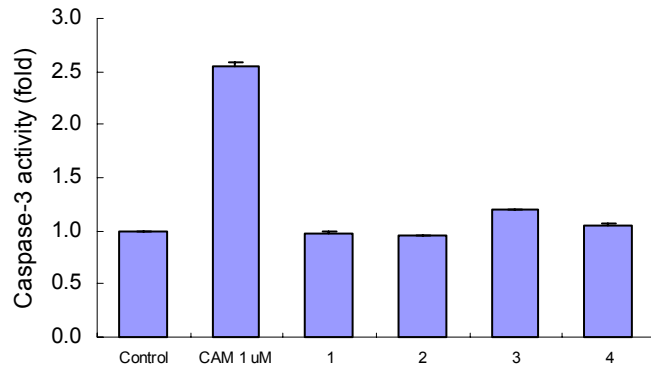


그림 3-4. 포도 추출물들의 DNA fragmentation 유도 활성

## 8) Caspase 활성화 측정

DNA fragmentation과 더불어, 일반적으로 apoptosis 유도시 활성화되는 것으로 알려져 있는 caspase-3에 대한 포도 추출물들의 활성화 유도 여부를 확인하여 보았다. 비교 시료인 camptothecin은 대조군에 비하여 3배의 caspase-3 활성화 유도 작용을 나타내었으나, 포도 추출물들은 뚜렷한 caspase-3 활성화 유도를 나타내지 못하였다(그림 3-5).



Control : control

CAM : camptothecin 1 $\mu$ M

1 : MBA CTL 400  $\mu$ g/ml

2 : 거봉 CTL 400  $\mu$ g/ml

3 : MBA UV-A 200W 400  $\mu$ g/ml

4 : 거봉 UV-A 200W 400  $\mu$ g/ml

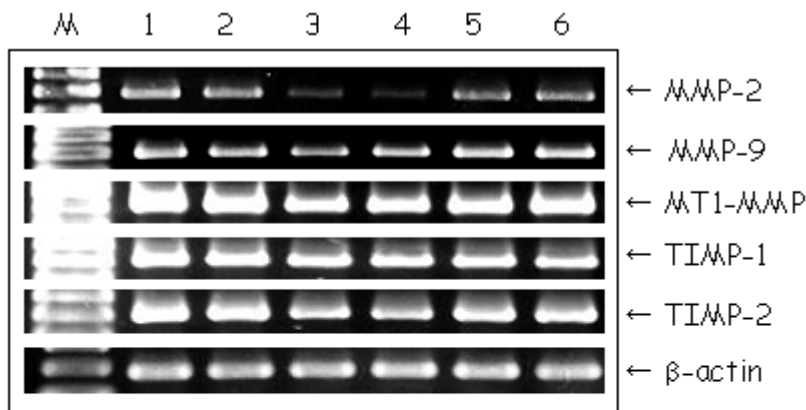
그림 3-5. UV 처리 포도 추출물들의 caspase-3 활성화 유도 작용

나. 암세포 전이 및 침윤에 관한 효능 평가

### 1) 암세포전이 관련유전자의 발현에 미치는 영향평가 (RT-PCR)

암세포의 전이와 관련한 유전자로는 extracellular matrix 및 basement membrane의 degradation에 깊이 관여하고 있는 단백질 분해 효소 중 zinc-dependent한 matrix metalloproteinases(MMPs)를 들 수 있으며 이들의

발현은 암세포 전이에 밀접한 영향이 있음이 밝혀지고 있다. 그리고 활성화된 MMP는 내인성 저해제인 tissue inhibitor of matrix metalloproteinase(TIMP)에 의해 저해된다. TIMP-1은 MMP-9과 복합체를 형성하여 저해하고, TIMP-2는 MMP-2를 선택적으로 저해하는 것으로 알려졌다. 따라서 포도추출물(최종 농도: 100 $\mu$ g/mL)이 암세포 전이에 미치는 영향을 알아보기 위하여 HT1080의 세포 배양에서 MMP 및 TIMP 발현에 대해 포도추출물 처리가 MMP-2, MMP-9, MT1-MMP, TIMP-1 및 TIMP-2의 유전자의 발현에 미치는 영향을 검토하였다. 그 결과 UV-A 200W를 처리한 MBA의 추출물이 MMP-2와 MMP-9의 발현을 현저히 저해함을 알 수 있었다. 한편 거봉 추출물의 경우 모든 시료에서 MMP-2와 MMP-9의 발현이 약간 저해됨을 확인할 수 있었다 (그림 3-6).



- 1: Control
- 2: Resveratrol 50  $\mu$ M
- 3: MBA 추출물 Control 200  $\mu$ g/mL
- 4: MBA 추출물 UV 200W 200  $\mu$ g/mL
- 5: 거봉 추출물 control 200  $\mu$ g/mL
- 6: 거봉 추출물 UV 190W 200  $\mu$ g/mL

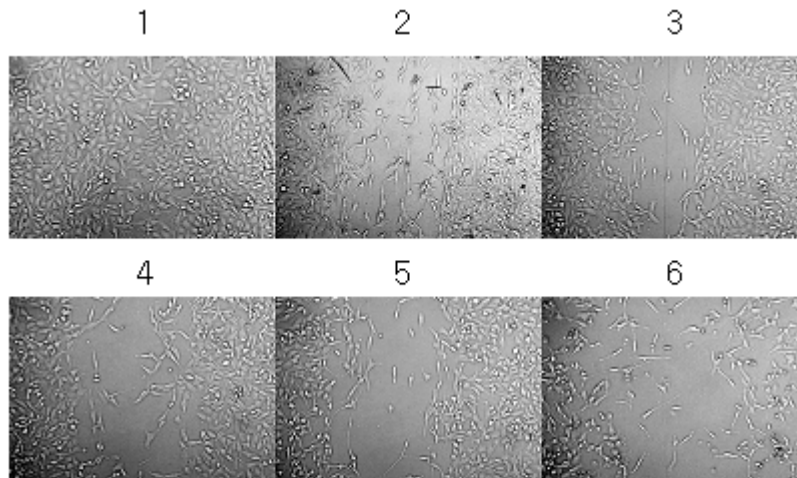
그림 3-6. UV 처리 포도 추출물들의 MMP관련 mRNA 발현 억제 작용

## 2) Migration assay

암세포 침윤(invasion)에 미치는 포도추출물의 효능 평가를 위하여 본 연구에서 2차년도에 확립한 실험법을 통하여 migration assay를 실시하였다. 암세포의 migration 운동성에 미치는 효과를 HT1080의 세포 배양에서 포도추출물의 처리에 따른 변화를 관찰하였다. 실험결과 vehicle 처리군에서는 18시간 경



과 후 세포의 migration에 의하여 wound부분이 채워진 반면 포도추출물 처리군에서는 migration억제 효능을 보였다. MBA와 거봉 두가지 추출물 모두 UV 처리군이 대조군에 비하여 높은 migration 억제 효능을 나타냈으며 거봉이 더 뛰어난 migration 억제 효능을 보였다(그림 3-7).

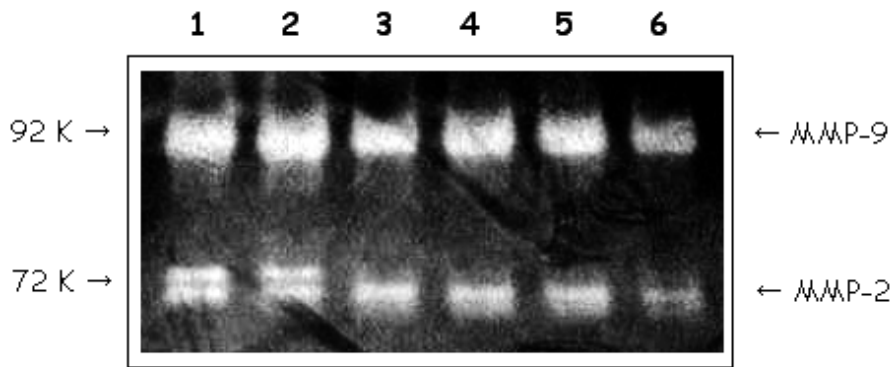


- 1 : Control
- 2 : MBA 추출물 Control 200 µg/ml
- 3 : MBA 추출물 UV-A 200W 200 µg/ml
- 4 : Resveratrol 50 µM
- 5 : 거봉 추출물 control 200 µg/ml
- 6 : 거봉 추출물 UV-A 200W 200 µg/ml

그림 3-7. UV 처리 포도추출물들의 migration 억제 활성

### 3) Gelatin zymography

포도추출물의 암세포에서 MMP-2 및 MMP-9 효소원의 세포외로의 분비에 미치는 영향을 알아보기 위하여 포도추출물 처리에 따른 gelatin zymography 실험법을 실시하였다. 포도추출물 처리에 따른 세포 배양액내의 MMP-2 및 MMP-9의 양을 관찰하였으며 실험 결과 특히 거봉의 경우 UV 처리에 따른 MMP-2와 MMP-9의 저해 효능이 큼을 알 수 있었다. 전체적으로 포도추출물들은 MMP-2 및 MMP-9의 세포외로의 분비에 대한 억제 효과가 있음을 알 수 있었으며 MMP-2의 분비에 대하여 보다 저해 효능이 큼을 알 수 있었다(그림 3-8).

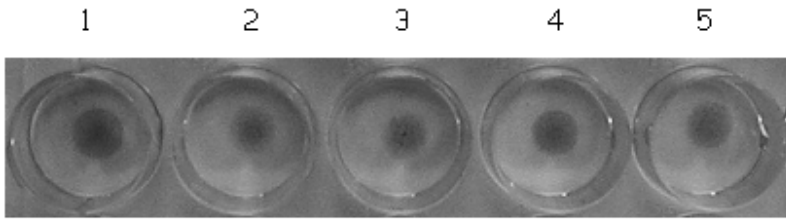


- 1 : Control
- 2 : Resveratrol 50  $\mu$ M
- 3 : MBA 추출물 Control 200  $\mu$ g/ml
- 4 : MBA 추출물 UV-A 200W 200  $\mu$ g/ml
- 5 : 거봉 추출물 control 200  $\mu$ g/ml
- 6 : 거봉 추출물 UV-A 200W 200  $\mu$ g/ml

그림 3-8. UV 처리 포도추출물들의 MMP 활성 억제 효능

#### 4) Colony dispersion assay

포도추출물의 암세포 침윤에 미치는 효능을 평가하고자 colony dispersion assay법을 실시하여 포도추출물 처리에 따른 암세포의 성장에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과 MBA는 특히 시료를 처리하지 않은 대조군에 비하여 암세포의 성장에 따른 colony의 주변으로의 퍼짐에 대하여 억제 효능이 뛰어난 것으로 나타났으며 거봉도 억제 효능이 높은 것으로 확인되었다. UV처리를 한 시료가 UV를 처리하지 않은 시료에 비하여 colony의 퍼짐에 대한 억제 효능이 더 큼을 알 수 있었다.

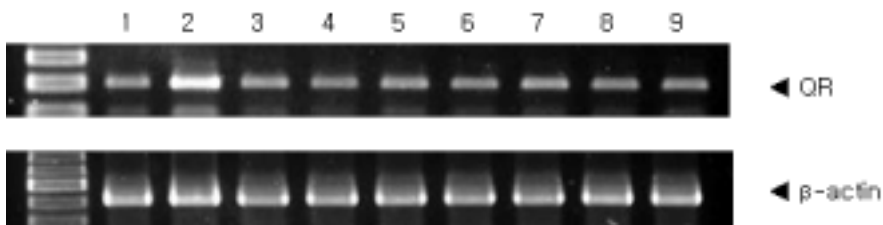


- 1 : Control
- 2 : MBA 추출물 Control 200  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$
- 3 : MBA 추출물 UV-A 200W 200  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$
- 4 : 거봉 추출물 control 200  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$
- 5 : 거봉 추출물 UV-A 200W 200  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$

그림 3-9. UV처리 포도추출물들의 colony dispersion 억제 효능

#### 5) QR 유전자의 발현에 미치는 영향평가 (RT-PCR)

Quinone reductase(QR)는 phase II enzyme의 일종으로 phase I metabolism에 의하여 생성된 반응성이 큰 중간 대사체들을 해독화하여 체외로 배설시키는 역할을 한다. 이는 발암원(carcinogen)의 해독화에 중요한 역할을 할 수 있어 이 효소의 발현 및 활성화를 증가시킬 수 있는 물질들은 암예방제로 적용될 수 있을 것으로 여겨진다. 이에 따라 포도껍질 추출물의 QR mRNA 유도 활성을 RT-PCR법으로 확인하여 보았다. 그 결과, 대조군으로 이용된  $\beta$ -naphthoflavone은 뚜렷한 QR 유도 활성을 나타낸 반면 resveratrol을 비롯한 포도껍질 추출물에서는 이보다는 미약한 QR 유도 활성을 나타내었다(그림 3-10).



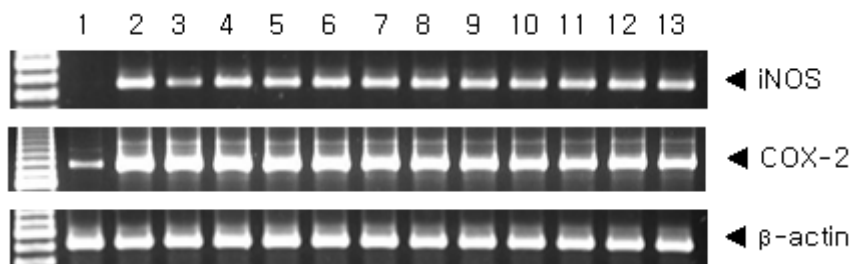
- 1. Control
- 2.  $\beta$ -naphthoflavone
- 3. Resveratrol 50mM
- 4. MBA control
- 5. MBA UV-A 200W
- 6. MBA UV-C 190W
- 7. 거봉 control
- 8. 거봉 UV-A 200W
- 9. 거봉 UV-C 190W

그림 3-10. UV처리 포도추출물들의 QR 유전자 억제 효능

다. 항염증 효능 평가

1) COX-2, iNOS 유전자의 발현 억제에 미치는 영향평가 (RT-PCR)

포도추출물 (최종 농도: 100 $\mu$ g/mL)이 LPS에 의해 유도된 COX-2, iNOS 발현 억제에 미치는 영향을 알아보기 위하여 마우스 대식세포인 Raw 264.7의 세포배양에서 포도추출물 처리가 COX-2 및 iNOS의 유전자의 발현에 미치는 영향을 검토하였다. 그 결과 resveratrol을 비롯하여 거의 모든 추출물이 COX-2의 발현을 저해하지 않는 것으로 나타났으며 iNOS의 경우 Resveratrol은 뚜렷한 저해효과를 보였으며 UV를 처리한 거봉의 추출물이 UV를 처리하지 않는 거봉 추출물에 비해 iNOS 발현을 저해하는 것으로 확인되었다(그림 3-11).



- |                      |                  |
|----------------------|------------------|
| 1. LPS (-)           | 2. LPS (+)       |
| 3. Resveratrol 50 mM |                  |
| 4. MBA control       | 9. 거봉 control    |
| 5. MBA UV-A 40W      | 10. 거봉 UV-A 40W  |
| 6. MBA UV-A 200W     | 11. 거봉 UV-A 200W |
| 7. MBA UV-C 40W      | 12. 거봉 UV-C 40W  |
| 8. MBA UV-C 190W     | 13. 거봉 UV-C 190W |

그림 3-11. UV처리 포도추출물들의 iNOS, COX2 유전자 억제 효능

2) Lipopolysaccharide 처리에 의한 cyclooxygenase-2 (COX-2) 유도 저해 활성 검색

Cyclooxygenase-2 (COX-2)는 arachidonic acid를 prostaglandins로 전환하는 과정에 관여하는 염증을 매개하는 효소이며, 암예방 지표효소로도 널리 이용된다. UV처리 포도껍질들이 LPS에 의해 유도된 COX-2를 저해하는지를 알

아본 결과 UV처리 포도껍질들은 대체적으로 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 COX-2를 약간 억제하는 것으로 나타났다. 대부분 UV처리를 하지 않은 control에 비해 더 우수한 억제효과를 나타냈다(표 3-5).

표 3-5. UV 처리포도들의 COX-2 저해 활성

Sample		% Inhibition at 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$
MBA 체진것	Control	0.00
	UV-A 40W	0.00
	UV-A 200W	0.00
	UV-C 40W	0.00
	UV-C 190W	0.00
MBA 체쳐지지 않은것	Control	38.97
	UV-A 40W	44.80
	UV-A 200W	31.60
	UV-C 40W	51.30
	UV-C 190W	44.50
거봉 체진것	Control	0.00
	UV-A 40W	23.23
	UV-A 200W	9.80
	UV-C 40W	36.22
	UV-C 190W	27.60
거봉 체쳐지지 않은것	Control	32.31
	UV-A 40W	46.76
	UV-A 200W	58.35
	UV-C 40W	40.83
	UV-C 190W	40.38
Resveratrol		IC <sub>50</sub> 4.76

### 3) Inducible nitric oxide synthase(iNOS) 억제 효과 검색

LPS 처리에 의해 생성된 Inducible nitric oxide synthase(iNOS)에 대해 UV 처리 포도껍질들이 저해 효과를 나타내는지 알아보기 위해 LPS에 의해 생성된 NO를 Griess reagent와 반응시켜 발색 정도를 확인하였다. 그 결과 UV처리 포도껍질중 UV-A 200W와 UV-C 40W를 처리한 시료가 다른 시료에 비해 높은 저해효과를 나타내었다(그림 3-12). 한편 UV처리 포도껍질들이 실험 조건에서 마우스 대식세포의 성장에 영향을 나타내는지 MTT와 반응시켜 알아보았는데 모든 추출물들에서 세포 생존률이 100% 정도 나타나 실험 조건에서 UV처리 포도껍질들의 세포 독성은 크지 않은 것으로 여겨진다(표 3-6).

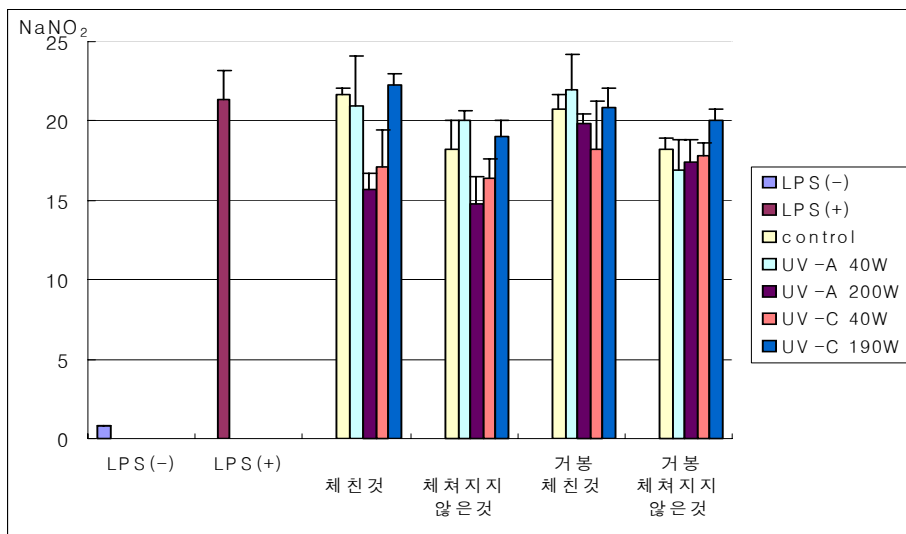


그림 3-12. UV 처리포도들의 NaNO<sub>2</sub> 생성량

표 3-6. UV 처리포도들의 NO 생성 저해 효과

Sample		% Inhibition at 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$
MBA 체진것	Control	2.95
	UV-A 40W	6.29
	UV-A 200W	31.24
	UV-C 40W	24.63
	UV-C 190W	0.00
MBA 체쳐지지 않은것	Control	19.43
	UV-A 40W	10.57
	UV-A 200W	35.74
	UV-C 40W	29.97
	UV-C 190W	15.15
거봉 체진것	Control	3.00
	UV-A 40W	0.00
	UV-A 200W	7.11
	UV-C 40W	15.18
	UV-C 190W	2.37
거봉 체쳐지지 않은것	Control	14.86
	UV-A 40W	21.42
	UV-A 200W	18.97
	UV-C 40W	17.15
	UV-C 190W	6.25

표 3-7. UV 처리 포도들의 마우스 대식세포 성장 저해 효과

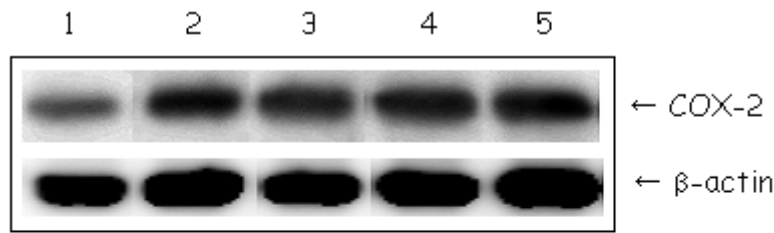
Sample		% Inhibition at 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$
MBA 체진것	Control	100
	UV-A 40W	99.46
	UV-A 200W	100
	UV-C 40W	100
	UV-C 190W	98.88
MBA 체쳐지지 않은것	Control	100
	UV-A 40W	100
	UV-A 200W	100
	UV-C 40W	100
	UV-C 190W	100
거봉 체진것	Control	100
	UV-A 40W	100
	UV-A 200W	100
	UV-C 40W	90.93
	UV-C 190W	90.75
거봉 체쳐지지 않은것	Control	99.26
	UV-A 40W	93.69
	UV-A 200W	82.5
	UV-C 40W	82.82
	UV-C 190W	82.5

4) 마우스 피부암 억제 효과

UV처리 포도추출물에 대하여 마우스 피부암 억제 활성을 평가하기 위해 COX-2 mRNA 수준에서 TPA에 의해 유도된 COX-2의 발현을 평가해보았다.



그 결과(그림 3-13)에서 나타난 바와 같이 포도추출물들과 Resveratrol은 TPA에 의해 유도된 COX-2의 발현을 억제시키지 않는 것으로 나타났다.



- 1 : Control
- 2 : TPA 10nmol
- 3 : TPA 10nmol + Resveratrol 25  $\mu$ mol
- 4 : TPA 10nmol + MBA control 50mg
- 5 : TPA 10nmol + MBA UV 200W 50mg

그림 3-13. TPA에 의해 유도된 COX-2 발현 저해를 통한 마우스 피부암 억제 활성

#### 4. 결론

본 연구는 국내 생산되는 MBA와 거봉을 신선포도 상태에서 UV처리한 포도껍질을 대상으로 항산화 효능, 암세포 전이 및 침윤에 관한 효능 항염증 효능 평가를 검토하였다. 주관연구기관에서 제공받은 동결건조된 UV처리 포도껍질을 분쇄물 또는 추출물로 제조하여 생물활성효능평가에 사용하였으며, 지금까지의 연구 결과를 종합해 보면 국내 생산되는 MBA와 거봉을 신선포도 상태에서 UV처리한 포도껍질을 대상으로 한 생물활성 시험에서 UV처리를 한 포도껍질이 UV처리를 하지 않은 시료에 비해 항산화 및 암세포 전이 및 침윤, 항염증 효과가 더 높은 것으로 나타났다. 항산화 효능 평가에서는 DPPH assay를 통해 UV처리에 따른 항산화 효능이 더 높은 것을 확인할 수 있었으며 산화적 스트레스로 인한 세포내 ROS생성 저해 효능 평가에서는 UV처리에 의한 뚜렷한 억제 효과차이는 나타나지 않았으나 전체적으로 포도 추출물들이 뚜렷한 항산화 효능을 갖는 것으로 나타났다. 암세포의 성장 및 사멸 효능평가에서는 다른 암세포주에 비해 폐암세포주인 A549에서 포도껍질의 효과가 비교적 우수하게 나타났으며 UV처리한 시료가 UV처리하지 않은 시료에 비해 약간 더 높은 암세포의 성장억제 및 사멸 효과를 보였다. 그러나 세포주기 분

석, DNA fragmentation, caspase-3 활성을 평가해 본 결과 apoptosis를 통한 암세포 사멸 유도 활성은 나타나지 않는 것으로 확인되었다. UV를 처리한 포도껍질의 추출물은 UV를 처리하지 않은 포도껍질의 추출물에 비해 암세포 전이 및 침윤에 관한 활성 효과가 다소 더 높은 것으로 나타났으며 이는 암세포 전이 관련 유전자의 발현정도, migration assay, gelatin zymography, colony dispersion assay를 통하여 확인할 수 있었다. 이 중 특히 포도 추출물에 의한 MMP-2 유전자의 발현 저해가 뚜렷이 나타났으며 migration assay 및 colony dispersion assay에서는 UV처리 포도추출물의 migration 억제 효능이 대조군에 비하여 뛰어난 것으로 확인되었다. LPS 처리에 의해 생성된 iNOS(Inducible nitric oxide synthase) 저해 효과를 살펴보면 UV처리 포도껍질들 중 UV-A 200W와 UV-C 40W를 처리한 시료가 다른 시료에 비해 세포독성은 크게 나타나지 않으면서 높은 저해효과를 나타내었다. 결과적으로 본 연구는 UV처리에 따른 포도의 생물활성효능평가를 성공적으로 수행하였으며 UV처리를 한 포도의 항산화, 암세포 전이 및 침윤, 항염증의 효능은 UV처리를 하지 않은 포도에 비하여 전체적으로 더 높은 것으로 사료된다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

- 본 연구는 2003년 7월 15일부터 2006년 7월 14일까지 3년 동안 수행되었으며, 연구의 최종 목표는 포도의 주요 건강기능성 성분인 레스베라트롤에 rg 관한 대사기작을 연구하고, 산업용 레스베라트롤 증폭 시스템을 개발하며, 레스베라트롤이 증폭된 포도의 생물활성 평가를 하고자 한 바, 연구 종료 시점에서 소기의 목표를 달성하였으며, 개발된 기술은 관련 산업체에 기술 이전을 완료하였고, ‘레스베라 포도’라는 상품명으로 2005년도 시범 출시한 후, 2006년도 현재 제품 출시를 준비하고 있는 상태임.
  
- 국내산 포도는 생산후 대부분이 생식용으로 소비되고 있어 포도를 통한 건강기능성을 제고함은 물론이고, 생식용 포도의 고부가가치를 창출하고자 한 바, 레스베라트롤 증폭 포도는 무처리 포도에 비해 약 50% 높은 가격을 유지할 수 있어 새로운 고부가가치 제품을 생산할 수 있는 핵심기술을 제공할 수 있는 기술로 평가되며, 향후 국내 포도산업의 활성화에 크게 기여할 것으로 전망됨.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1 절 실적

#### 1. 학술발표

The stress and storage condition for post-harvest treatment to elevate resveratrol contents of grape berries. 한국생물과학협회 정기학술발표대회, 대전대학교, 2005. 8. 18

#### 2. 특허출원

수확후 생식용 포도의 레스베라트롤 함량 증폭 방법. 대한민국 특허출원번호 10-2004-0073793 (2004. 9. 15)

#### 4. 기술이전

기술명: 수확 후 포도의 레스베라트롤 함량 증폭 방법

기술이전업체명: (주)휴시스

기술료: 3,000만원

기술이전일자: 2005년 2월 25일

#### 5. 홍보

- 1) 중앙일보 2005. 9. 5
- 2) 조선일보 2005. 9. 4
- 3) 매일경제 2005. 9. 4
- 4) 일간스포츠 2005. 9. 5
- 5) YTN 2005. 9. 2
- 6) 농민신문 2005. 9. 12
- 7) 영남일보 2005. 9. 5

- 8) 식품음료신문 2005. 9. 5
- 9) 기능식품신문 2005. 9. 5
- 10) 농축환경신문 2005. 9. 8
- 11) 메트로신문 2005. 9. 5
- 12) 연합뉴스 2005. 9. 4
- 13) KBS1 생로병사의 비밀 2006. 5. 23

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- F. Shahidi and M. Naczk, 2004, Phenolics in Food and Nutraceuticals, CRC Press,
- M. S. Meskin et al., 2004, Phytochemicals: Mechanisms of Action, CRC Press

## 제 7 장 참고문헌

### 제 1 절

1. 조용진, 김재은, 전향숙, 김종태, 김성수, 김철진. 2002. 국내산 포도의 부위별 레즈베라트롤 함량. 한국식품과학회지
2. Adrian, M., P. Jeandet, R. Bessis, and J.M. Joubert. 1996. Induction of phytoalexin (resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated with aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>). J. Agric. Food Chem. 44(8):1979-1981.
3. Adrian M, Jeandet P, Veneau J, Weston LA, Bessis R, 1997. Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Bortyitis cinerea*, the casual agent for gray mold. J Chem Ecol 23:1689-1702
4. Andrea Versari,, Giuseppina Paola Parpinello, Giovanni Battista Tornielli, Roberto Ferrarini and Claudio Giulivo 2001. Stilbene compounds and Stilbene Synthase expression during Ripening, Wilting, and UV treatment in Grape cv. Corvina J.Agric.Food Chem. 49, 5531-5536
5. Arakawa, O. 1991. Effect of temperature on anthocyanin accumulation in apple fruit as affected by cultivar stage of fruit ripening and bagging. J. Hort. Sci. 66:763-768
6. Aram M, Hayek T, Fuhrman B 1997. Red wine consumption inhibits LDL oxidation and aggregation in humans and in atherosclerotic mice. Biofactors 1;6(4):415-9.
7. Bernard, A.C. 1977. Observations histologiques sur la pellicule des baies de *Vitis vinifera* en relation avec *Botrytis cinerea* Pers. La France Viticole 1:7-20.
8. Berthier L, Marchal R, Debray H, Bonnet E, Jeandet P, Maujean A 1991. The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. Am J Enol Vitic 42; 41-46.
9. Cantos, E., C. Garcia-Viguera, S.D. Pascual-Teresa, and F.A. Tomas-Barbera'n. 2000. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. J. Agric. Food Chem. 48:4606-4612.
10. Cantos E, Espin JC, Tomas-Barberan FA. 2002. Postharvest stilbene-enrichment of red and white table grape varieties using UV-C irradiation pulses. J Agric Food Chem. Oct 23;50(22):6322-9.

11. Cantos E, Espin JC, Fernandez MJ, Oliva J, Tomas-Barberan FA. 2003. Postharvest UV-C-irradiated grapes as a potential source for producing stilbene-enriched red wines., *Agric Food Chem.* Feb 26;51(5):1208-14.
12. Chabo N, Costelli P, Baccino FM, Lopez-Soriano FJ, 1999. Resveratrol, a natural product present in wine, decreases tumor growth in a rat tumor model. *Bioche biophys Res Commun* 254:739-743
13. Cheong H, Ryu SY, Kim KM, 1999. Anti-allergis action of resveratrol and related hydroxystilbenes. *Planta Med.* 65:266-268
14. Chung, I.M., M.R. Park, J.C. Chun. and S.J. Yun. 2003. Resveratrol accumulation and resveratrol synthase gene expression in response to abiotic stress and hormones in peanut plants. *Plant Science.* 164:103-109
15. Clement MV, Hirpara JL, Chawdhury SH, Pervaiz S, 1998. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood* 92:996-1002
16. Creasy LL, Coffee M, 1998. Phytoalexin production potential of grape berries. *J Am Soc Hortic Sci* 113:230-234
17. David, M.G., Y. Joe, M. Eric, P.D. Eleftherios, K. Alex, S. George, and L.W. Andrew. 1995. A global survey of *trans-resveratrol concentrations in commercial wines.* *Am. J. Enol. Vitic.* 46(2):159-165.
18. Dercks W, Creasy LL 1989. The significance of stilbene phytoalexins in the *Plasmopara viticola* - grapevine interaction. *Plant Pathol* 34; 189-202.
19. Deyl (ed.). 1984. *Separation Methods.* Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
20. Doyle, J.J. and J.I. Doyle 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
21. Douillet-Breuil AC, Jeandet P, Adrian M, Bessis R 1999. Changes in the phytoalexin content of various *Vitis* spp. in response to ultraviolet C elicitation.. *J Agric Food Chem* 47(10):4456-61.
22. Ectorb BJ, Magee JB, Coign MJ 1996. Resveratrol concentration in muscadine berries, juice, pomace, purees, seeds, and wines. *Am J Enol Vitic* 47:57-62
23. Ernst. D., M. Schraudner, G. Langebartels, and H. Sandermann. 1992. Ozone-induced changes of mRNA level of  $\beta$ -1, 3-glucanase, chitinase and 'pathogenesis-related' protein in tobacco plants. *Plant Molecular Biology* 20:673-682.
24. Ewa Ignatowicz, Wanda Baer-Dubowska. 2001. RESVERATROL, A



NATURAL CHEMOPREVENTIVE AGENT AGAINST  
DEGENERATIVE DISEASES. Pol. J. Pharmacol. 53, 557-569

25. Fischer R, Budde I, Rudiger H 1997. Stilbene synthase gene expression causes changes in flower colour and male sterility in tobacco. The plant journal. 11(3):489-498
26. Fliegmann J, Schroder G, Schanz S, Britsch L, Schroder J 1992. Molecular analysis of chalcone and dihydropinosylvin synthase from Scots pine (*Pinus sylvestris*. and differential regulation of these and related enzyme activities in stressed plants. Plant Mol Biol 18; 489-503.
27. Fremont, L. 2000. Biological effects of resveratrol. Life Sciences 66(8):663-673
28. Fougere-Rifot, M., H.S. Park, and J. Bouard. 1995. Données nouvelles sur l'hypoderme et la pulpe des baies normales et des baies millerandées d'une variété de *Vitis vinifera* L., le Merlot noir", *Vitis* 34(1):1-7.
29. Fougere-Rifot, M., H.S. Park, and J. Bouard. 1997. Ontogenèse du péicارpe de la baie de *Vitis vinifera* L. var. Merlot de la fondation à la maturité J. Int. Sci. Vigne Vin 31(3):109-118
30. Fuhrman B et al., 1995. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. Am J Clin Nutr 61:549-554
31. Gehm BD McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL, 1997. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. Proc Natl acad Sci USA 94:14138-14143
32. Grandison, A. S. and M. J. Lewis (ed.). 1996. Separation Processes in the Food and Biotechnology Industries. Technomic Publishing Co., Lancaster.
33. Hain R et al., 1990. Expression of a stilbene synthase gene in *Nicotiana tabacum* results in synthesis of the phytoalexin resveratrol. Plant Mol Biol 15:325-335
34. Hain R, Reif HJ, Krause E, Langebartels R, Kindl H, Vornam B, Wiese W, Schmelzer E, Schreier PH, Stocker RH 1993. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. Nature.361(6408) :153-6.
35. Hofgen R, Willmitzer L 1988. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. Nucleic Acids Res 25;16(20):9877.
36. Hoo Kyoong Choi, Jin Won Yang, Keon Wook Kang. 2006. Bifunctional effect of resveratrol on the expression of ErbB2 in human breast cancer

- cell. *Cancer Letters* xx 1-9
37. Hoos G, Blaich R, 1990. Influence of resveratrol on germination of conidia and mycelial growth of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola*. *J Phytopathol* 129:102-110
  38. Huang C, Ma W, Goranson A, Dong Z, 1999. Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway. *Carcinogenesis* 20:237-242
  39. Huang C, Ma WY, Goranson A, Dong Z 1999. Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway. *Carcinogenesis* 20; 237-242.
  40. Huang, M. T., C. T. Ho and C. Y. Lee. 1992. Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health III Antioxidants and cancer Prevention. American Chemical society Symposium Series, Washington, DC.
  41. Jang, M. et al. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol , a natural product derived from grapes. *Science* 275:218-220
  42. Jeandet, J., R. Bessis, and B. Gauthier. 1991. The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. *Am. J. Enol. Vitic.* 42(1):41-46.
  43. Jeandet et al., 1995. Production of the phytoalexin resveratrol by grape berries as a response to *Botrytis* attack under natural conditions. *J Phytopathol* 143:135-139
  44. Kaufman, P. B., L. J. Cseke, S. Warber, J. A. Duke and H. L. Brielmann. 1999. Natural products from Plants. CRC Press, Boca Raton.
  45. Kamuela-Raventos, R. M. and A. L. Waterhouse. Occurrence of resveratrol in selected California wines by a new HPLC method. *J. Agric. Food Chem* 41(4):521-523
  46. Kovac V, Alonso E, Revilla E 1995. The effects of adding supplementary quantities of seeds during fermentation on the phenolic composition of wine. *Am J Enol Vitic* 46:363-367
  47. Langcake P, Pryce RJ 1977. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia* 33(2):151-2.
  48. Langcake P, McCarthy WV 1979. The relationship of resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*. *Experientia* 18; 244-253.
  49. Langcake P, Pryce RJ, 1977. The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation.

- Phytochemistry 16; 1193-1196.
50. Lanz T , Tropf S, Marner FJ, Schroder J, Schroder G 1990. Differential regulation of genes for resveratrol synthase in cell cultures of *Arachis hypogaea* L. *Planta* 181; 169-175.
  51. Lee SW, Chang MS 1994. Differential utilization of alternate initiation sites in a plant defence gene responding to environmental stimuli. *Eur J Biochem* 226; 109-114
  52. Macheix, J. J., A. Fleuriet and J. Billot. 1990. *Fruit Phenolics*. CRC Press, Boca Raton.
  53. Mannila E, Talvitie A, Kolehmainen E, 1993. Antileukemic compounds derived from stilbenes in *Picea abies* bark. *Phytochemistry* 33:813-816
  54. Mar a Elena Alvarez. 2000. Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Molecular Biology* 44: 429 442
  55. Martinez J. and J. J. moreno. 2000. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochemical Pharmacology* 59:865-870
  56. Maxwell S, Cruickshank A, Thorpe G 1994. Red wine and antioxidant activity in serum. *Lancet*. 344(8916):193-4.
  57. Melchior F, Kindl H 1991. Coordinate and elicitor dependent expression of stilbene synthase and phenylalanine ammonia lyase genes in *Vitis vinifera* cv Optima. *Arch Biochem Biophys* 288; 552-557.
  58. Okuda, T. and K. Yokotsuka. 1996. Trans-resveratrol concentrations in berry skins and wines from grapes grown in Japan. *Am. J. Enol. Vitic.*, 47(1):93-99.
  59. Palomino, P., M.P. Gomez-Serranillos, K. Slowing, E. Carretero, and A. Villar. 2000. Study of polyphenols in grape berries by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 870:449-445.
  60. Park, H.S. 1995. Le péicarpe des baies de raisin normales et millerandés: ontogenèse de la structure et évolution de quelques constituants biochimiques, notamment des tanins. Ph.D. Diss., Bordeaux I Univ.
  61. Preisig-Muller R, Schwekendiek A, Brehm I, Reif HJ, Kindl H 1999. Characterization of a pine multigene family containing elicitor-responsive stilbene synthase genes. *Plant Mol Biol* 39(2):221-9
  62. P.Coutos-The'venot, B.Poinssot, A.Bonomelli, H.Yean, C.Breda,

- D.Buffard, R.Esnault, R.Hain and M.Boulay 2001. Invitro tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *Vst1* gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promoter. *J Exp Botany* 52, 901-910
63. Ragione FD, Cucciolla V, Borriello A, Pietra VD, Racioppi L, Soldati G, Manna C, Galletti P, Zappia V, 1998. Resveratrol arrests the cell division cycle at S/G2 phase transition. *Biochem Biophys Res commun* 250:53-58
64. Romero-Perez. A. et al. 1996. resveratrol and Piceid as varietal markers of white wines. *J. Agric. Food Chem.* 44(8):1975-1978
65. R.T. Threlfall and J.R. Morris. 1996. Effect Of Viticultural And Enological Methods On The Resveratrol Content Of Wines. *CoolClimSymp.* NY VI 100-102
66. Rudiger H, Babara B, Kildle H, Ronald S 1990. Expression of a stilbene synthase in *Nicotiana tabaccum* results in synthesis of a phytoalexin resveratrol. *Plant Mol Biol* 15:325-335.
67. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 74; 5463-5467.
68. Sato M et al., 1997. Conents of resveratrol, piceid, and their isomers in commercially available wines made from grapes cultivated in Japan. *Biosci Biotechol Biochem* 61:1800-1805
69. Schoppner A, Kindl H. 1984. Purification and properties of a stilbene synthase from induced cell suspension cultures of peanut. *J Biol Chem.* 259(11):6806-11
70. Schroder et al., 1998. Molecular analysis of resveratrol synthase, cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase. *Eur J Biochem* 172:161-169
71. Schubert R, Fischer R, Hain R, Schreier PH, Bahnweg G, Ernst D, Sandermann Jr H, 1997. An ozone-responsive region of the grapevine resveratrol synthase promoter differs from the basal pathogen-responsive sequence. *Plant Mol Biol* 34:417-426
72. Siemann EH, Creasy LL 1992. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am J Enol Vitic* 43; 49-52
73. Sparvoli F et al., 1994. Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Mol Biol* 24:743-755
74. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM 1997. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J Clin Lab*

Anal. ;11(5):287-313.

75. Somogyi, L. P., D. M. Barrett and Y. H. Hui (ed.). 1996. Major Processed Products 1) Processing fruits: Science and Technology, Vol. 2). Technomic Publishing Co., Lancaster
76. Subbaramaiah K, Chung WJ, Michaluart P, Telang N, Tanabe T, Inoue H, Jang M, Pezzuto JM, Dannenberg AJ, 1998. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human ammary epithelial cells. J Biol Chem 274:21875-21882
77. XAVIER VITRAC, AUREÄ LIE BORNET,“ REGINA VANDERLINDE,§ JOSEP VALLS, TRISTAN RICHARD, JEAN-CLAUDE DELAUNAY, JEAN-MICHEL MEÄ RILLON, AND PIERRE-LOUIS TEISSEÄ DRE\*. 2005. Determination of Stilbenes ( -viniferin, trans-astringin, trans-piceid, cis- and trans-resveratrol, E-viniferin) in Brazilian Wines. J. Agric. Food Chem. 53, 5664-5669
78. Yoshikawa, M. 1978. Divers modes of action of biotic and abiotic phytoalexin elicitors. Nature. 275:546-547
79. Zoecklein, B. W., K. C. Fugelsang, B. H. Gump and F. S. Nury. 1995. Wine Analysis and Production. Champman and Hall, New York

## 제 2 절

1. 김선규, 성진근, 김성순, 최동용, 손창화. 1996. 포도:심기부터 판매까지. 농민신문사, 서울.
2. 생활개선중앙회(사). 1999. 포도. 여성농업인 전문영농기술 향상을 위한 교육교재.
3. 이중용. 1999. 포도 수급 전망과 정책 과제. 한국농촌경제연구원.
4. 조용진, 김재은, 전향숙, 김종태, 김성수, 김철진. 2002. 국내산 포도의 부위별 레스베라트롤 함량. 한국식품과학회지 35(2):306-308.
5. 조용진. 2003. BT를 이용한 생명시스템 연구방향. 한국식품개발연구원 시스템공학연구팀 세미나자료 (미간행).
6. 최태동, 박성훈, 곽창근, 장종근, 오승용, 조용제. 2002. 주요 신선과·채류 콜드체인시스템 구축의 경제성 연구. 한국식품개발연구원 연구보고서 E01304-0205.
7. 한국농업경영인경기도연합회. 1999. 포도산업의 경쟁력 제고와 발전방향. 과수분과(포도) 교육자료집, 한농연(경기) 자료집 99-13.

8. Chu, Q., M. O'Dwyer and M. G. Zeece. 1998. Direct analysis of resveratrol in wine by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.* 46:509-513.
9. Deyl, Z. (ed.). 1984. *Separation Methods*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
10. Fremont, L. 2000. Biological effects of resveratrol. *Life Sciences* 66(8):663-673.
11. Gu, X. et al. 1999. Capillary electrophoretic determination of resveratrol in wines. *J. Agric. Food Chem.* 47(8):3223-3227.
12. Grandison, A. S. and M. J. Lewis (ed.). 1996. *Separation Processes in the Food and Biotechnology Industries*. Technomic Publishing Co., Lancaster.
13. Huang, M. T., C. T. Ho and C. Y. Lee. 1992. *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II: Antioxidants and Cancer Prevention*. American Chemical Society Symposium Series, Washington, DC.
14. Jang, M. et al. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275:218-220.
15. Kaufman, P. B., L. J. Cseke, S. Warber, J. A. Duke and H. L. Brielmann. 1999. *Natural Products from Plants*. CRC Press, Boca Raton.
16. Aamuela-Raventos, R. M. and A. L. Waterhouse. Occurrence of resveratrol in selected California wines by a new HPLC method. *J. Agric. Food Chem* 41(4):521-523.
17. Macheix, J. J., A. Fleuriet and J. Billot. 1990. *Fruit Phenolics*. CRC Press, Boca Raton.
18. Martinez J. and J. J. Moreno. 2000. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochemical Pharmacology* 59:865-870.
19. Meskin, N. S. et al.(eds.) 2002. *Phytochemicals in Nutrition and Health*. CRC Press, Boca Raton.
20. Romero-Perez, A. et al. 1996. Resveratrol and piceid as varietal markers of white wines. *J. Agric. Food Chem.* 44(8):1975-1978
21. Singh, P.C. and R. K. Singh. 1996. Choosing an appropriate bioseparation technique. *Trends in Food Science and Technology* 7:49-58.
22. Somogyi, L. P., D. M. Barrett and Y. H. Hui (ed.). 1996. *Major Processed Products (Processing fruits: Science and Technology, Vol. 2)*. Technomic Publishing Co., Lancaster.

23. Zoecklein, B. W., K. C. Fugelsang, B. H. Gump and F. S. Nury. 1995. Wine Analysis and Production. Chapman and Hall, New York.
24. Adrian M, Jeandet P, Veneau J, Weston LA, Bessis R, 1997. Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the casual agent for gray mold. *J Chem Ecol* 23: 1689-1702.
25. Carbo N, Costelli P, Baccino FM, Lopez-Soriano FJ, 1999. Resveratrol, a natural product present in wine, decreases tumor growth in a rat tumor model. *Bioche Biophys Res Commun* 254: 739-743.
26. Cheong H, Ryu SY, Kim KM, 1999. Anti-allergis action of resveratrol and related hydroxystilbenes. *Planta Med.* 65: 266-268.
27. Clement MV, Hirpara JL, Chawdhury SH, Pervaiz S, 1998. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood* 92: 996-1002.
28. Creasy LL, Coffee M, 1988. Phytoalexin production potential of grape berries. *J Am Soc Hortic Sci* 113, 230-234.
29. Fliegmann J et al., 1992. Molecular analysis of chalcone and dihydropinosylvin synthase from Scots pine (*Pinus sylvestris*), and differential regulation of these and related enzyme activities in stressed plants. *Plant Mol Biol* 18, 489-503.
30. Fuhrman B et al., 1995. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr* 61, 549-554.
31. Fukuhara K, Miyata N, 1998. Resveratrol as a new type of DNA-cleaving agent. *Bioorgan Med Chem Letters* 8: 3187-3192.
32. Gehm BD McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL, 1997. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14138-14143.
33. Goldberg D et al., 1996. Method to assay the concentrations of phenolic constituents of biological interest in wines. *Anal Chem* 68: 1688-1694.
34. Hain R et al., 1990 Expression of a stilbene synthase gene in *Nicotiana tabacum* results in synthesis of the phytoalexin resveratrol. *Plant Mol Biol* 15: 325-335.
35. Hain R et al., 1993. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* 361: 153-156.
36. Hoos G, Blaich R, 1990. Influence of resveratrol on germination of

- conidia and mycelial growth of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola*. J Phytopathol 129, 102-110.
37. Huang C, Ma W, Goranson A, Dong Z, 1999. Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway. Carcinogenesis 20: 237-242.
  38. Jang M et al., 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. Science 275: 218-210.
  39. Jeandet et al., 1995. Production of the phytoalexin resveratrol by grape berries as a response to *Botrytis* attack under natural conditions. J Phytopathol 143, 135-139.
  40. Langcake P, Pryce RJ, 1977. The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. Phytochemistry 16, 1193-1196.
  41. Mannila E, Talvitie A, Kolehmainen E, 1993. Antileukemic compounds derived from stilbenes in *Picea abies* bark. Phytochemistry 33: 813-816.
  42. Pendurthi UR, Williams JT, Rao LVM, 1999. Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells: A possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19: 419-426.
  43. Ragione FD, Cucciolla V, Borriello A, Pietra VD, Racioppi L, Soldati G, Manna C, Galletti P, Zappia V, 1998. Resveratrol arrests the cell division cycle at S/G2 phase transition. Biochem Biophys Res Commun 250: 53-58.
  44. Sato M et al., 1997. Contents of resveratrol, piceid, and their isomers in commercially available wines made from grapes cultivated in Japan. Biosci Biotechnol Biochem 61: 1800-1805.
  45. Schroder et al., 1988. Molecular analysis of resveratrol synthase, cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase. Eur J Biochem 172: 161-169.
  46. Schubert R, Fischer R, Hain R, Schreier PH, Bahnweg G, Ernst D, Sandermann Jr H, 1997. An ozone-responsive region of the grapevine resveratrol synthase promoter differs from the basal pathogen-responsive sequence. Plant Mol Biol 34: 417-426.
  47. Soleas GJ et al., 1997. Resveratrol: a molecule whose time has come ? and gone ? Clin Biochem 30: 91-113.
  48. Sparvoli F et al., 1994. Cloning and molecular analysis of structural



genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Mol Biol* 24: 743-755.

49. Subbaramaiah K, Chung WJ, Michaluart P, Telang N, Tanabe T, Inoue H, Jang M, Pezzuto JM, Dannenberg AJ, 1998. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 274: 21875-21882.

### 제 3 절

1. Lander, H.M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J.* 11: 118-124 (1997)
2. Patel, R.P., Moellering, D., Murphy-Ullrich, J., Jo, H., Beckman, J.S., and Darley-Usmar, V.M. Cell signaling by reactive nitrogen and oxygen species in atherosclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 1780-1794 (2000)
3. Dubois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., Van De Putte, L.B., and Lipsky, P.E. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 12: 1063-1073 (1998)
4. Ames, B.N., Shigenaga, M.K., and Hagen, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc. Natl. Sci. USA.* 90: 7915-7922 (1993)
5. Dreher, D. and Junod, A.F. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur. J. Cancer.* 32A(1): 30-38 (1998)
6. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., and Cross, C.E. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* 119: 598-620 (1992)
7. Herschman, H.R. Prostaglandin synthase 2. *Biochim. Biophys. Acta.* 1299: 125-40 (1999)
8. Dannenberg, A.J., Altorki, N.K., Boyle, J.O., Dang, C., Howe, L.R., Weksler, B.B., and Subbaramaiah, K. Cyclo-oxygenase-2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol.* 2: 544-551 (2001).
9. Tsujii, M., Kawano S., Tsujii, S., Sawaoka, H., Hori, M., and Dubois, R.N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 93: 705-716 (1998)
10. Sheng, H., Shao, J., Morrow, J.D., Beachamp, R.D., and Dubois, R.N. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in

- human colon cancer cells. *Cancer Res.* 58: 362-366 (1998)
11. Stuehr, D.J. Mammalian nitric oxide synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1411: 217-230 (1999)
  12. Kröncke, K.D., Fehsel, K., and Kolb-Bachofen, V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 113: 147-156 (1998)
  13. Oshima, H., and Bartsch, H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat. Res.* 305: 253-264 (1994)
  14. Kelloff, G.J., Crowell, J.A., Steele, V.E., Lubet, R.E., Malone, W.A., Boone, C.W., Kopelovich, L., Hawk, E.T., Lieberman, R., Lawrence, J.A., Ali, I., Viner, J.L., and Sigman, C.C. Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. *J. Nutr.* 130: 467S-471S (2000)
  15. 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 (1993)
  16. Lee, S.K., Mbwambo, Z.H., Chung, H., Luyengi, L., Gamez, E.J.C., Metha, R.G., Kinghorn, A.D., and Pezzuto, J.M. Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Comb. Chem. & High Through. Screening.* 1: 35-46 (1998)
  17. Martinez, J., and Moreno, J.J. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem. Pharmacol.* 59: 865-870 (2000)
  18. Joe, A.K., Liu, H., Suzui, M., Vural, M.E., Xiao, D. and Weinstein, I.B., Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin Cancer Res.* 8: 893-903 (2002)
  19. Frémont, L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* 66(8): 663-673 (2000)
  20. Bhat, K.P.L., and Pezzuto, J.M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 957: 210-229 (2002)
  21. Ferguson, L.R. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat. Res.* 475(1-2): 89-111 (2001)
  22. Briviba, K., Pan, L., and Rechkemmer G. Red wine polyphenols inhibit the growth of colon cancer cells and modulate the activation pattern of mitogen-activated protein kinases. *J. Nutr.* 132(9): 2814-8 (2002)
  23. Ahmad, N., Adhami, V. M., Afaq, F., Feyes, D. K., and Mukhtar, H.

- (2001). Resveratrol causes WAF1/p21-mediated G1 phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Clin. Cancer Res.* **7**, 1466-1473.
24. Alley, M. C., Dominic, A., and Shoemaker, R. H. (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* **48**, 589-601.
  25. Ames, B. N., Shigenaga, M. K., and Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7915-7922.
  26. Dannenberg, A. J., Altorki, N. K., Boyle, J. O., Dang, C., Howe, L. R., Weksler, B. B., and Subbaramaiah, K. (2001). Cyclooxygenase-2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol.* **2**, 544-551.
  27. Dreher D. and Junod, A. F. (1998). Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur. J. Cancer* **32A**, 30-38.
  28. Dubois, R. N., Abramson, S. B., Crofford, L., Gupta, R. A., Simon, L. S., Van De Putte, L. B., and Lipsky, P. E. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* **12**, 1063-1073.
  29. Fremont, L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* **66**, 663-673.
  30. Gerhauser, C., Alt, A., Heiss, E., Gamal-Eldeen, A., Klimo, K., Knauff, J., Neumann, I., Scherf, H.-R., Frank, N., Bartsch, H., and Becker, H. (2002). Cancer chemopreventive activity of xanthohumol, a natural product derived from hop. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 959-969.
  31. Green, L. C., Wanger, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., and Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131-138.
  32. Gusman, J., Malonne, H., Atassi, G. (2001). A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis* **22**, 1111-1117.
  33. Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., Fong, H. H. S., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C., and Pezzuto, J. M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **275**, 218-220.
  34. Joe, A. K., Liu, H., Suzui, M., Vural, M. E., Xiao, D., and Weinstein, I. B. (2002). Resveratrol induced growth inhibition, S-phase arrest,

- apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin. Cancer Res.* **8**, 893-903.
35. Kelloff, G. J., Crowell, J. A., Steele, V. E., Lubet, R. A., Malone, W. A., Boone, C. W., Kopelovich, L., Hawk, E. T., Lieberman, R., Lawrence, J. A., Ali, I., Viner, J. L., and Sigman, C. C. Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. (2000). *J. Nutr.* **130**, 467S-471S.
  36. Kinghorn, A. D., Fong, H. H. S., Farnsworth, N. R., Mehta, R. G., Moon, R. C., Moriarty, R. M., and Pezzuto, J. M. (1998). Cancer chemopreventive agents discovered by activity-guided fractionation: a review. *Curr. Org. Chem.* **2**, 597-612.
  37. Kröncke, K. D., Fehsel, K., and Kolb-Bachofen, V. (1998). Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin. Exp. Immunol.* **113**, 147-156.
  38. Kwak, M. K., Egner, P. A., Dolan, P. M., Ramos-Gomez, M., Groopman, J. D., Itoh, K., Yamamoto, M., and Kensler, T. W. (2001). Role of phase 2 enzyme induction in chemoprotection by dithiolethiones. *Mutat. Res.* **480-481**, 305-315.
  39. Lambert, J. D., and Yang, C. S. (2003). Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols. *Mutat. Res.* **523-524**, 201-208.
  40. Lander, H. M. (1997). An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J.* **11**, 118-124.
  41. Lee, S. K., Mbwambo, Z. H., Chung, H., Luyengi, L., Gamez, E. J. C., Mehta, R. G., Kinghorn, A. D., and Pezzuto, J. M. (1998). Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Comb. Chem. & High Through. Screen.* **1**, 35-46.
  42. Liang, Y. C., Tsai, S. H., Chen, L., Lin-Shiau, S. Y., and Lin, J. K. (2003). Resveratrol-induced G2 arrest through the inhibition of CDK7 and p34CDC2 kinases in colon carcinoma HT29 cells. *Biochem. Pharmacol.* **65**, 1053-1060.
  43. Martinez, J. and Moreno, J. J. (2000). Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 865-870.
  44. Min, H. Y., Park, E. J., Lee, S. K., and Cho, Y. J. (2003). Effects of grape extracts on free radical scavenging activity and inhibition of pro-inflammatory mediator production in mouse macrophage cells.

- Korean J. Food Sci. Technol.* **35**, 132-137.
45. Morse, M. A., and Stoner, G. D. (1993). Cancer chemoprevention: principles and prospects. *Carcinogenesis* **14**, 1737-1746.
  46. Patel, R. P., Moellering, D., Murphy-Ullrich, J., Jo, H., Beckman, J. S., and Darley-Usmar, V. M. (2000). Cell signaling by reactive nitrogen and oxygen species in atherosclerosis. *Free. Radic. Biol. Med.* **28**, 1780-1794.
  47. Rimando, A. M., Cuendet, M., Desmarchelider, C., Mehta, R.G., Pezzuto, J. M., and Duke, S. O. (2002). Cancer chemopreventive and antioxidant activities of pterostilbene, a naturally occurring analogue of resveratrol. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3453-3457.
  48. Surh, Y. J. (1999). Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat. Res.* **428**, 305-327.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.