

최 중
연구보고서

산머루 유래 procyanidin의 항암성을
활용한 기능성식품 개발

Development of functional food using
anticarcinogenic properties of procyanidin from
wild grape (*Vitis amurensis*)

연구기관
인제대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “산머루 유래 procyanidin의 항암성을 활용한 기능성식품 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008 년 4 월 24 일

주관연구기관명 : 인제대학교
총괄연구책임자 : 정 우 식
세부연구책임자 : 정 우 식
협동연구기관명 : 경북대학교
협동연구책임자 : 정 신 교
협동연구기관명 : 한국식품연구원
협동연구책임자 : 김 영 찬
연 구 원 : 이 영 철
연 구 원 : 노 정 해
연 구 원 : 홍 희 도
연 구 원 : 최 상 윤

요 약 문

I. 제 목

산머루 유래 procyanidin의 항암성을 활용한 기능성식품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

2006년 9월에 발표된 우리나라 2005년 사망원인 통계결과(통계청) 자료에 의하면, 3대 사망원인인 암, 뇌질환, 심장질환 사망자 수가 전체 사망자 수의 47.3%를 차지하며, 이 중 암 사망자 수는 전체에서 26.7%로 10년 전과 마찬가지로 사망원인 1위로 나타났다. 특히, 인구10만 명당 암 사망자의 비율은 10년 전과 비교 시 23.7%나 증가하였으며 이러한 결과는 의료기술의 발달에도 불구하고 암으로 인한 사망자가 매년 꾸준히 증가하고 있는 사실을 보여주고 있다. 지속적인 환경 오염 물질에 대한 노출과 서구 식단의 폐해 중 하나인 패스트푸드의 섭취 증가 등이 암 사망률 또는 발생율의 증가에 일조하고 있다. 최근 인체에 유입되는 발암물질의 배출을 촉진하는 세포방어기전의 활성화 및 유도에 도움을 주는 여러 가지 천연식품들에 관한 연구가 세계적으로 진행되고 있고 일반 국민들 또한 웰빙문화의 급속한 전파로 인해 암 예방에 도움이 되는 식품에 관심을 가지게 되어 향후 몇 십 년 내에 암의 발병율/사망율은 궁극적으로는 감소할 수 있을 것으로 예상된다. 따라서 국내 부존자원을 이용한 천연 항암물질 또는 식품에 대한 연구는 가속화 될 것으로 기대되며 관련 제품의 출시 또한 가까운 장래에 가능할 것으로 예상된다.

산머루 유래 procyanidin의 항암성을 활용한 기능성식품 개발에 관한 본 연구는 국내산 산머루(*Vitis amurensis*)에 존재하는 procyanidin의 조성을 분석하고 항암성 및 항암 메커니즘을 연구하여 이를 바탕으로 세포방어기작을 활성화시켜 암 예방에 기여하는 세계적 수준의 산머루 기능성식품의 제품화에 목적을 둔다. Procyanidin은 (+)-cathchin 또는 (-)-epicathchin 등 flavan-3-ol의 oligomer 및 polymer로서 강력한 항산화작용 및 콜레스테롤 저하 효과 등 심장혈관계질병의

예방효과 등으로 생리활성물질로 알려져 있다. 이러한 생리활성을 바탕으로 유럽, 미국, 일본 등지에서 포도 씨 유래 procyanidin 추출물 또는 소나무 껍질 유래 oligomeric procyanidin 추출물 등의 형태로 제품화 되어 거대한 시장을 형성해 가고 있는 상황이다. 산머루는 일명 산포도라고도 불리며 일반 포도에 비해 짙은 맛이 강해 생식보다는 주스 또는 머루주의 형태로 주로 가공되고 있다. 따라서 본 연구 과제를 통해 국내 산머루의 가공부산물인 산머루 씨로부터 procyanidin을 분리하고 이의 생리활성 특히, 항암성 및 항산화성과 분자수준에서의 작용기전을 연구하고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 산머루 씨 및 발효박으로부터 procyanidin을 분리, 정제, 분석하고 항암 및 항산화활성을 검증 및 분자수준의 작용기전을 규명하여 기능성식품 소재로 개발하고자 하였다.

1차년도에서는 산머루 씨와 발효박으로부터의 활성물질의 분리·정제 및 구조 분석을 위해 활성분획에서 chromatography를 이용하여 물질을 분리하고 기기분석 방법을 통한 활성물질의 구조 확인 및 동정을 하여 물질구조를 확인하였다. 또한 procyanidin의 존재를 확인하기 위해 phloroglucinol을 이용한 중합도 측정, BuOH-HCl hydrolysis, Vanillin assay 등을 실시하였다. 산머루에서 추출된 procyanidin 추출물 및 용매분획의 항암 및 항산화활성을 세포모델계를 통해 확인하였으며 분자수준에서의 작용기전으로 Nrf2/ARE 신호전달경로에 미치는 영향에 대해 연구하였다.

2차년도에는 산머루 씨 procyanidin의 항암활성 및 메커니즘을 *in vivo* 동물모델을 이용하여 규명하였으며, 산머루 씨의 기능성식품소재화 연구의 일환으로 유효성분의 대량추출 및 분리공정 확립 및 procyanidin 고함유 시제품 개발을 실시하였다.

또한 2차년도에서는 당초 연구개발계획에 포함되어 있지 않았던 항염증활성 및 메커니즘에 대한 연구도 부가적으로 수행하였으며 산머루 씨 procyanidin의 우수한 항염증활성을 확인하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

산머루에 존재하는 생리활성 성분의 조성파 구조분석을 하였고, *in vitro* 및 *in vivo*에서 항암성 및 항암기작을 연구하였다. 산머루 유래 procyanidin의 적정 추출 및 분리 기술을 설정하고 특정 성분을 선택적으로 분리, 정제할 수 있는 공정을 개발하였다. 또한, 산머루의 생리기능성(항산화, 항암 및 항염증 활성)을 규명함으로써 산머루를 다양한 건강기능/보조식품 소재로 개발 가능하도록 하였으며 본 연구를 통한 세포 및 동물모델계에서 분자수준에서의 항암기작 연구는 기초학문분야에 중요한 정보제공 뿐만 아니라 잠재적인 국내 항암 부존 자원의 탐색 및 실용화에 기반을 제공할 것으로 기대된다.

따라서 본 과제로부터 얻어진 산머루 씨 procyanidin의 우수한 생리활성이 널리 알려질 수 있도록 언론매체를 통한 홍보가 필요하다. 현재 식약청 기능성 식품 원료로 포도종자추출물은 등록되어 있으나 산머루종자 추출물의 경우 아직 전례가 없으므로 산머루종자 추출물에 대한 기능성식품원료 인증이 필요하다. 산머루종자 추출물의 기능성식품원료 등재를 위해 본 연구진뿐만 아니라 농림수산식품부 및 농림기술관리센터의 협조 또한 요청하는 바입니다.

SUMMARY

In this study, we aimed to develop a functional food and/or functional food material based on the cancer chemopreventive and antioxidant properties of procyanidin from wild grape (*Vitis amurensis*). We first performed the separation, purification and structure determination of procyanidins from wild grape seeds using various chemical, chromatographic and instrumental techniques. The isolated procyanidin was then examined for various biological activities such as chemopreventive, antioxidant and anti-inflammatory activities. The mode of actions of the biologically active procyanidin from wild grape seeds were also analyzed in vitro cell culture models as well as in vivo animal model systems. The procyanidin from wild grape seeds displayed strong antioxidant, chemopreventive and anti-inflammatory potentials. The antioxidant activity of wild grape seed procyanidin was better than those of vitamin C and BHT. It also had potent antioxidant activity in cell culture model. The cellular defense mechanism through Nrf2/antioxidant response element(ARE) was strongly induced by the procyanidin. Moreover, the procyanidin down-regulated inflammatory target proteins such as COX-2 and iNOS. Finally, the wild grape seed-based functional food product was developed under various manufacturing processes.

CONTENTS

Chapter 1	Introduction	8
Chapter 2	Current status of the technology	14
Chapter 3	Results and contents of the study	16
I.	(Sub-project 1) Isolation, purification and structure determination of procyanidin from wild grape	16
II.	(Sub-project 2) Anti-carcinogenic effects and it's mechanisms of procyanidin from wild grape	41
III.	(Sub-project 3) Development of healthy functional food using wild grape.....	85
IV.	Conclusions	105
Chapter 4.	Research achievement and contribution to the related field ..	108
Chapter 5.	Application	110
I.	Future application	110
II.	The results from this study	111
Chapter 6.	Current technology in the world	113
Chapter 7.	References	114

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	8
제 2 장	국내외 기술개발 현황	14
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과.....	16
제 1 절	(제1세부과제) 산머루 procyanidin 분리, 동정	16
제 2 절	(제2세부과제) 산머루 procyanidin의 항암성 및 항암기작	41
제 3 절	(제3세부과제) 산머루를 이용한 기능성제품개발	85
제 4 절	결론	105
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	108
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	110
제 1 절	활용에 대한 건의	110
제 2 절	본 연구로부터 발생한 업적.....	111
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	113
제 7 장	참고문헌.....	114

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구 개발의 목적

국내에서 암 예방 관련 연구는 최근 빠르게 활성화되고 있으며, 그 탐색 범위도 동물, 식물 등 전 범위에 걸쳐 진행되었고, 1970년도부터 1995년 말까지 약 175종의 식품과 500여종의 한약재에 대하여 항암, 항돌연변이, 항산화효과 등이 검색되었다. 상당한 규모의 연구임에도 불구하고 몇 가지 중요한 개선해야 할 문제점이 제기되었는데 첫째, 검색방법이 통일되어 있지 못하고, 상당수의 연구가 유효성 확보되지 않은 검색시스템을 사용하고 있는 점. 둘째, 대부분 검색단계에 머물고 있으며, 활성성분을 분리하여 물질 특허로 까지 이어진 경우가 적은 점. 셋째, 관련소재들을 이용한 건강기능성 식품 등 제품화가 거의 이뤄지지 못한 점이다. 항암효과를 주장하는 많은 종류의 식품소재들이 난립하고 있지만, 이들에 대한 체계적인 비교 평가가 이뤄져 있지 않아 국민들의 건강에 해를 줄 염려가 있어 타당성이 입증된 assay방법을 이용하여 우리나라에서 주로 소비되는 식품들에 대한 발암예방효능의 평가가 필요하다고 사료된다. 그러므로 식용 가능한 천연물 중 항산화력, 항암능력이 우수한 천연물을 선별하여 이를 이용한 건강식품의 개발을 개발하는 것이 시급한 과제로 다가서고 있다.

국내에서 자생하는 산머루(*Vitis amurensis*, 산포도라고도 함)는 강원도, 경북, 경남 등지의 산기슭에서 최근 재배되고 있으며, 포도과(*Vitis*)에 속하나 흔히 소비되고 있는 포도들(*Vitis vinifera*, *Vitis labrusca*)과는 달리 떫고 신맛이 강해 식용으로 거의 소비되지 않고 대부분이 wine, 즙, 주스의 형태로 가공되어 시판되고 있다. 국내에 산머루의 이용은 산머루 포도주, 산머루 즙의 형태로 거의 전량 가공되고 있으며 이러한 가공 후 막대한 양의 발효박, 착즙박 및 산머루 씨가 부산물로 생성되어 오물로 폐기되거나 일부 가축사료로 이용되고 있는 실정이다. 이를 극복하기 위해서는 산머루로부터 생리 기능적 활성을 탐색하고 생리활성 물질을 과학적으로 검증하여 건강식품으로서의 가치를 입증하여, 이를 토대로 다양한 가공식품을 개발함으로써 산머루의 새로운 수요를 창출하는 것이 절실히 요구되고 있다.

따라서 본 연구개발과제에서는 산머루의 가공부산물인 산머루 씨를 이용한 기능성 식품의 창출에 앞서 선행되어야 할 것으로서 기능성 인자들과 소재들에 대한 탐색, 생리활성의 규명에서부터 기능성식품 소재화 및 제품화에 이르는 연구개발을 목표로 하였다.

제 2 절 연구 개발의 필요성

Procyanidin은 (+)-catechin 또는 (-)-epicatechin 등 flavan-3-ol의 oligomer 및 polymer로서 각종 식물의 껍질, 씨 부위등에 분포되어 있으며 특히, 포도 씨, 포도껍질, 적포도주 등에는 대량으로 존재하여 이들의 주요 생리활성물질로 알려져 있다. Procyanidin의 생리활성은 강력한 항산화 작용 및 콜레스테롤 저하효과 등 심장혈관계질병의 예방효과 등이 널리 알려져 있으며 일명 French Paradox라 불리며 고지방 식이의 프랑스인들이 심장혈관계질병의 유병률이 적은 이유 중 하나로 여겨지고 있다. 포도 또는 적포도주에서 발견된 항암 생리활성물질로는 resveratrol이 가장 많이 연구된 것 중 하나이나 그 함량이 적포도주에서는 0.5~10ppm (또는 0.1~15mg/L) 정도로 극히 낮은 것이 문제가 되고 있다. 한편 monomeric flavan-3-ol, oligomeric, 및 polymeric procyanidin은 포도 씨의 경우 2.3~8.2mg/g, 적포도주의 경우 77~133 mg/L, 포도껍질의 경우 0.1~0.4mg/g 정도로 함유되어 있는 것으로 보고된 바 있고, 이중 polymeric procyanidin이 총 flavan-3-ol fraction에서 차지하는 비율은 적포도주에서는 77~84%, 포도 씨에서는 75~81%, 포도껍질에서는 95~98% 정도로 대부분을 차지한다. Oligomeric 및 polymeric procyanidin은 monomeric phenolics에 비해 수~수십배 강력한 항산화능을 가진 것으로 보고 되고 있어 적포도주 또는 포도의 심장혈관계질병 예방효과와 주된 생리활성물질로 인식되고 있다. 최근에는 심장혈관계질병 이외에도 oligomeric 및 polymeric procyanidin 추출물의 여러 가지 다른 생리활성이 추가적으로 연구되고 있으며 특히 *in vitro* 및 *in vivo*에서 항고혈압, 항암작용 등이 보고되고 있다. 그러나 지금까지 procyanidin의 항암작용에 관한 연구는 단지 암세포 증식을 억제하거나 항암과 관련된 일부 down stream biological marker에 관한 연구 등에 국한되어 있는 실정으로 procyanidin의 up stream 신호전달체계를 포함한 항암 메커니즘에 대한 연구는 극히 미비한 실정이다.

천연물을 이용한 수많은 항암 연구에도 불구하고 천연물질을 선도물질로 하여 합성한 유도체가 아닌 천연화합물 그 자체로서 항암의약품으로 사용된 것은 taxol 이 거의 유일한데, 이는 지금까지의 천연 항암제가 관한 연구가 세포의 방어기작에 중점을 두지 않고, 주로 암세포를 괴사시키거나 하는 등의 치유에 연구가 치중되어 왔기 때문이며, 따라서 식용 가능한 천연물을 이용한 항암 연구는 암세포를 사멸시키는 의약품으로서의 작용기작보다는 발암의 시작단계에 대한 예방적 차원에서의 기작에 관해 미치는 영향을 중심으로 진행될 때 보다 가시적인 성과를 얻을 것이라 사료된다. 식용자원 등의 천연물을 이용하여 항암을 실현할 수 있는 최선의 전략들 중 하나는 인체의 세포나 조직들을 여러 가지 발암물질 또는 발암성 대사산물들로부터 보호 또는 방어하는 것이고, 이러한 세포 수준에서의 방어는 glutathione S-transferase(GST), NAD(P)H quinone oxidoreductase 1(NQO1), heme oxygenase-1(HO-1) 등의 제 2상 해독 효소 (phase 2 detoxifying enzymes) 및 항산화 효소 (antioxidant enzymes)의 유도 또는 활성화에 의해 가능하며, 이러한 효소들의 발현유도는 이들 유전자의 promoter 영역에 존재하는 antioxidant response element (ARE)에 의해 매개되는 것으로 알려져 있다.

최근 수년 간, ARE를 통하는 세포방어관련 신호전달경로, 특히 ARE에 binding하여 ARE함유 유전자들 (phase 2 detoxifying and antioxidant genes)의 발현을 유도하는 transcription factor Nrf2 (nuclear factor E2-related factor 2) 및 그 upstream signaling pathway에 관한 연구가 세계적인 여러 선도연구진에 의해 활발하게 진행되고 있다. 최근 발표된 논문으로는 포도 씨 유래 procyanidin 추출물이 GST, Gpx, GR 등의 항산화효소 활성 유도능 및 mRNA 수준에서의 유전자 발현에 관한 연구 정도가 있으나 (puiggros 등. 2005 JAgric Food Chem), 항암의 지표가 되는 기타 제 2상효소계에 관한 연구 및 Nrf2/ARE 관련 신호전달체계에 대한 메커니즘 연구는 거의 없는 실정이며, 더구나 산머루 또는 산머루 procyanidin을 이용한 항암 또는 항암 메커니즘 연구는 거의 없는 실정이다. 이뿐만 아니라 국민소득이 증가되고 식생활이 변화하여 고혈압, 동맥경화증, 심장병 질환 등 성인병 질환이 증가하게 되었고 약물치료보다는 식생활의 조절에 의한 치료와 예방에 관심이 증대되면서 한방이나 민간약으로만 이용되어 오던 식품의 이용과 식품의 특정한 생리적 기능에 대한 관심이 고조되어 가고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서 수행될 산머루박 및 산머루 씨 유래 procyanidin의 효능평가는 Nrf2/ARE 및 제 2상호소계, 그리고 이들의 상위 신호전달경로 규명에 초점을 맞추어 하고자 하였다.

1) 기술적 측면

포도에는 아몬드 껍질에서 발견되는 procyanidin보다 훨씬 다양한 procyanidin 조성이 보고되었으며, 산머루는 떫은맛이 일반 포도보다 강하므로 더 많은 양의 procyanidin이 존재할 것으로 기대되므로 반드시 연구할 필요성이 있다. Procyanidin의 생리활성을 바탕으로 유럽, 미국, 일본 등지에서 포도 씨 유래 procyanidin 추출물 (grape seed procyanidin extract, GSPE) 또는 소나무 껍질 유래 oligomeric procyanidin 추출물 (pine bark oligomeric procyanidin, OPC) 등의 형태로 제품화 되어 거대한 시장을 형성해 가고 있는 상황이다. 그 외 천연물질에서 유래되는 생리활성 물질을 기술적으로 이용하여 암 예방 및 노화방지용 식품 등 다양한 목적으로 고안된 식품이 개발되고 있다. 소비자들이 식품이나 기능성 식품을 섭취함으로써 질병의 예방, 치료 및 건강의 유익을 위해 기능성 식품을 선호한다. 따라서 본 연구에서는 국내산 산머루의 가공 부산물인 발효박, 씨 및 착즙액으로부터 고순도 산머루 procyanidin 추출물을 획득하여 그 조성 및 함량을 조사하고, 항암특성 및 항암 메커니즘을 연구하며, 세계시장에 출시할 수 있는 procyanidin 제품을 제조하여 국내산 산머루의 부가가치를 극대화하고 인류 건강 증진에 기여하고자 한다.

2) 경제적 측면

기능성 식품 산업은 식품산업 중에서도 가장 빠른 속도로 성장하고 있는 분야로 미국의 경우 1995년 이래로 2003년 까지 10배나 성장하였으며 2003년에는 120억 달러의 시장을 형성하고 있으며 전 세계적으로 2005년에는 1550억 달러에 이를 것으로 추정된 바 있다(2003년 STAR-USA Market Research Reports). 2000년 procyanidin을 주원료로 한 미국의 포도 씨 추출물 시장은 4천만~5천만 달러에 이른 것으로 집계되었으며 (Technical Resources International, Inc 2000), 선두주자인 소나무 껍질 추출물 procyanidin 등의 제품까지 고려했을 때 procyanidin을

원료로 한 기능성식품 시장은 최소한 이의 두세 배에 이를 것으로 추정된다. 현재 해외에서 시판되고 있는 procyanidin 추출물 건강기능성식품 또는 건강보조식품은 여러 종류가 있으며 대표적인 것으로는 ① *Vitis vinifera* 포도에서 추출한 Grape Seed Extract 또는 Grape seed OPCs(oligomeric procyanidins)로 포도 씨뿐만 아니라 껍질, 줄기 등에서도 추출이 되고 있고, 이탈리아 Indena사의 LeucoselectTM, 미국 InterHealth Nutraceuticals Inc사의 ActiVin (GSPE) ② 소나무 (*Pinus maritima*) 껍질 유래의 Pycnogenol[®] (프랑스 교수 Jacques Masquelier에 의해 개발되어 영국 Horphag Ltd of Guernsey사에서 시판) 등의 제품이 시장에 나와 있으나, 각 제품마다 추출방법 및 원료에 따라 procyanidin의 함량 및 조성이 다소 상이하다. 국내에서도 2004년 식품음료신문에 포도 씨 procyanidin 추출물이 각광 받고 있는 해외건가이능식품 소재로 집중 소개된 바 있어 향후 외국산 포도유래 procyanidin 추출물이 국내 건강기능식품 시장을 잠식할 가능성이 큰 것으로 사료된다. 따라서 국내산 산머루의 가공 부산물을 이용하여 만성질환 특히, 암, 노화, 심장혈관계질병 등의 예방효과가 있는 건강기능성식품을 개발할 경우 산머루 농가 및 산머루 가공업체의 소득 및 부가가치 증대에 크게 기여할 것으로 기대된다. 또한 전 세계적으로 일고 있는 교역자유화에서 생존하기 위해 자국 내에 존재하는 부존자원을 발굴하여 세계적인 상품으로 개발할 경우 수입대체효과 및 수출증진효과를 유도할 것으로 사료된다. 현재 국내에서는 procyanidin을 이용한 건강기능성제품이 거의 없으므로 국내 부존자원을 이용한 각종 procyanidin 제품의 활발한 개발 및 시장개척을 유도할 것으로 기대된다. 본 연구에서는 이미 시판되고 있는 해외의 procyanidin 제품들과 본 연구에서 개발될 산머루 유래 procyanidin제품을 비교 연구하여 외국산 제품과 견줄 수 있거나 이들의 효능을 증가하는 시제품을 개발하는 것을 목표로 한다.

3) 사회·문화적 측면

현대에 이르러 각종 환경오염물질이 증가하고 환경오염물질들 중에서도 발암성이 있는 화합물들이 도처에 존재하고 있으나 현대인은 이러한 발암성 물질들에 노출될 수밖에 없는 현실이므로 현대인에 있어 최선의 암 예방 전략은 체내에 유입된 각종 발암 및 독성물질을 체외로 배출하는 기전을 활성화시키는 것이고 따라서 이러한 생체방어메커니즘을 활성화시키는 식이 및 건강기능성식품의 소비 증대는

필수적일 것으로 사료된다. 국내 부존자원을 이용한 건강증진 식품 소재의 발굴은 최근의 웰빙 문화와 맞물려 자국의 식품에 대한 국민의 관심을 증대시키고 나아가 건강에 대한 국내 소비자의 지식수준을 높을 것으로 기대된다. 소비자의 건강 및 영양관련 지식이 선진화됨으로써 가족력 등의 유전적인 요인에 의해 만성 질병 또는 성인병에 걸리기 쉬운 집단의 경우 그에 맞는 식품섭취 및 건강기능성 식품의 적절한 선택으로 장기적으로 국민보건향상 및 의료비 절감도 예상된다.

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

1. 국내 ·외 기술개발 현황

1) 국내

현재 국내에서는 procyanidin을 재료로 식약청 개별인정 되어 있는 건강기능식품은 기꼬망 포도종자추출물(제2006-25호) 및 피크노제놀-프랑스해안송겉질추출물(제2007-3호) 정도이며 두 제품 모두 국내산은 아니다. 국내산 재료를 이용한 procyanidin 기능성식품은 아직 개발되지 않은 것으로 조사되었다.

2) 국외

현재 해외에서 시판되고 있는 procyanidin 추출물 건강기능성식품 또는 건강보조식품은 그 종류가 다양한데 대표적인 것으로는 ① *Vitis vinifera* 포도에서 추출한 Grape Seed Extract 또는 Grape seed OPCs(oligomeric procyanidins)로 포도 씨뿐만 아니라 껍질, 줄기 등에서도 추출이 되고 있고, 이탈리아 Indena사의 LeucoselectTM, 미국 InterHealth Nutraceuticals Inc사의 ActiVin (GSPE) ② 소나무 (*Pinus maritima*) 껍질 유래의 Pycnogenol[®] (프랑스 교수 Jacques Masquelier에 의해 개발되어 영국 Horphag Ltd of Guernsey사에서 시판) 등의 제품이 시장에 나와 있으나, 각 제품마다 추출방법 및 원료에 따라 procyanidin의 함량 및 조성이 다소 상이하다. 해외에서 시판되고 있는 procyanidin추출물 제품의 procyanidin함량은 포도 씨 추출물의 경우 92~95%이며, 소나무껍질 추출물의 경우 80~85%로 제품별로 procyanidin의 함량이 표준화되어 있으므로 국내산 산머루를 이용한 제품을 만들 경우, 국제특허 등을 고려하여 효능을 극대화할 수 있는 독창적이고 표준화된 함량의 제품을 제조하는 것이 관건이다.

3) 국내 ·외의 연구현황

일반 포도 및 소나무 껍질 유래의 procyanidin추출물에 대한 연구는 국외에서 활발하게 진행되어 왔는데, 특히 항산화효과, 콜레스테롤저하효과 등 심장혈관계질병의 연구가 주를 이루어 왔고, 최근 항암효과에 대한 연구가 활발히 진행되기 시작했다. 국내에서는 procyanidin의 생리활성연구는 주로 항산화효과에 대한 것이다. 그러나 국내외를 막론하고 산머루 유래의 procyanidin의 항암효과 및 분자

수준에서의 항암, 항산화, 항염증 메커니즘에 관한 연구는 거의 없는 실정이며, 특히 국내산 산머루의 procyanidin의 함량 및 조성에 대한 연구 또한 부족한 상황이다.

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
University of Bordeaux (프랑스)	French maritime pine bark에서 생리활성물질 연구 중 oligomeric procyanidin 발견	Pycnogenol®이라는 제품명으로 미주 및 유럽 등 전 세계적으로 시판되고 있는 기능성 식품으로 개발

2. 앞으로의 전망

국민의 건강에 대한 인식과 삶의 질이 향상되면서 웰빙이 시대적 코드로 대두되고 있다. 이에 따라서 건강유지와 체질개선을 위한 기능성 식품에 대한 수요가 앞으로도 계속 급증할 것으로 보인다. 따라서 건강유지를 위한 식품보조제나 질병의 치료 및 예방효과를 얻을 수 있는 생리활성물질의 생산성을 크게 향상시킬 수 있는 기술 개발이 필요할 것으로 전망된다. 또한 생리활성물질의 구체적인 효능연구를 통하여 보다 정제된 고순도, 고효능 활성물질을 분리함으로써 국내에서 뿐만 아니라, 국외의 제품들과 경쟁력을 갖추어 나가는데 도움을 줄 수 있을 것이다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 (제1세부과제) 산머루 procyanidin 분리, 동정

제 1 협동과제 연구기관	경 북 대 학 교
연구 과제명	산머루 procyanidin 분리 동정
연구책임자	정 신 교

제 1 항 재료 및 방법

1. 실험재료 및 시약

본 실험에 사용한 산머루 (*Vitis amurensis*)씨는 경남 함양군에 있는 두레마을 회사에서 04년도 착즙한 씨를 구입해 음건 (陰乾)하여 4℃에서 보관하며 사용하였다.

실험에 사용한 2,4,6-tripyridyl-s-triazine(TPTZ), 1,1-diphenyl-2-picryldydrazyl (DPPH), folin-ciocalteu's phenol reagent 2N, sephadex LH-20 gel (25~100 μ m), gallic acid(GA), (+)-catechin(CT), (-)-epicatechin, phloroglucinol, trolox, vanillin는 Sigma Chemical Co.의 제품을 사용하였고, HPLC용 메탄올은 J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)의 제품을 사용하였으며, 기타 시약류는 분석용 특급 시약을 사용하였다.

2. 산머루 씨로부터 procyanidin 분리 및 정제

가. 조추출물 조제 및 용매 분획

산머루부산물로부터 추출 분리 과정은 Fig. 1과 같다. 산머루 씨를 건조 후 분쇄한 것을 사용하여 시료 분말 100 g에 헥산을 첨가하여 waring blender로 2시간 균질화 시킨 다음 지질을 제거 한 후 탈지된 분말에 10 배량의 70% 아세톤을

가하여 12시간 2회 추출 한 후 여과하고 rotary vacuum evaporator (Eyela, N-N-series, Tokyo, Japan)를 사용하여 농축하여 아세톤 조추출물을 얻었다. 아세톤 조추출물은 비극성 용매로부터 극성이 높은 용매까지 순차적으로 분획하였다. 즉 10% 메탄올로 녹인 후, 헥산, 에틸아세테이트 및 물층으로 순차적으로 용매 분획한 다음 각 획분을 농축하여 이것들은 각각 밀봉하여 4℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

나. Chromatography에 의한 procyanidin의 분리

1) Sephadex LH-20 column chromatography

에틸아세테이트 분획물은 sephadex LH-20 column chromatography로 분리하였다. 메탄올에 충분히 swelling한 sephadex LH-20 gel slurry를 칼럼(ϕ 25×500 mm)에 충전하였다. 칼럼 안을 이동상으로 치환한 후 시료를 켈에 흡착시키고, 이동상으로 50% 메탄올, 75% 메탄올, 75% 아세톤 순으로 각 300 mL씩을 순차적으로 가하여 용출하여 각 획분을 얻었다.

2) Preparative thin layer chromatography (TLC)

용매분획 후의 에틸아세테이트층 16.7 mg을 분취용 TLC (silica gel 60 20 × 20 cm, 0.5 mm ,thickness, Merck, Darmstadt, Germany)에 banding한 후 toluene/acetone/formic acid (6:6:1, v/v/v) 혼합 용매를 이동상으로 이용하여 전개하고 사전에 70% hydrochloric acid에 녹인 1% vanillin 용액을 발색제로 사용하여 전개한 plate에 분무하여 발색된 부분의 Rf 치를 구하여 계산된 밴드 부분의 silica gel을 긁어 모았다. 또한 회수된 silica gel에 에틸아세테이트를 가하여 흡착성분을 용출시킨 후 얻어진 용출액을 농축하였다.

3. 분리한 산머루 씨의 procyanidin 구조분석

가. TLC

산머루부산물의 획분에 유도된 성분의 확인 및 분리성분의 정제도를 TLC로 확인하였다. TLC의 조건은 Emile 등²³⁾의 방법을 변형하였다. TLC (silica gel 60 F₂₅₄, 20 x 20 cm, Merck, Darmstadt, Germany)에 spot 하여

toluene/acetone/formic acid (6:6:1, v/v/v) 혼합용매로 전개한 후 70% hydrochloric acid에 녹인 1% vanillin 용액을 발색제로 사용하여 전개한 plate에 분무하여 발색시킨 후 표준품과 Rf 치를 비교하였다.

나. UV/Vis spectroscopy

분리된 각 성분의 구조분석을 위하여 먼저 자외선 및 가시광선영역의 흡수 스펙트럼을 조사하였다. 분리된 물질을 메탄올에 100 ppm의 농도로 용해한 용액을 stock solution으로 하여 UV spectrophotometer (UV 1601 PC, Shimadzu CO., Kyoto, Japan)를 이용하여 200~600 nm에서의 흡수패턴을 조사하였다.

다. MS spectrometry

산머루 씨로부터 분리한 성분의 질량분석을 위하여 이중질량분석기 (API™ 2,000 LC/MS/MS System, USA) 이용하였고, 기기 사용조건은 cunτανin (CUR 800) 20, ion apaay uoltage 5,500, temperature 0℃, ion source gas 1은 20, ion source gas 2는 0, declustering potential (DP) 50, focusing potential (FP) 400, entrance potential (EP)는 10, deflector(DF)은 0, CEM은 2100으로 하여 분석하였다.

4. 분리한 산머루 씨의 procyanidin 특성

가. Vanillin-H₂SO₄ assay

분리한 산머루 씨의 proanthocaynidin 정량은 다음의 방법²⁴⁾으로 시험하였다. Vanillin-H₂SO₄ assay는 식물 원료에서의 procyanidin를 빠르게 정량하기 위해 가장 일반적으로 사용되는 방법이다. 메탄올에 녹인 시료 200 μL에 메탄올에 녹인 1.2% vanillin 용액 500 μL와 메탄올에 녹인 20% H₂SO₄ 용액 500 μL을 가하여 혼합하여 20분간 방치한 다음 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 매 실험시에 (+)-catechin를 이용하여 얻은 단순 회귀식으로 시료의 procyanidin의 함량을 구하였다.

나. BuOH-HCl method

탄닌은 종류가 다양하므로 일률적으로 분석하는 방법은 없다. 시료를

BuOH-HCl용액과 95°C에서 가열하여 생성되는 anthocyanidin을 측정함으로써 procyanidin의 상대적 함유량을 추정할 수 있는 Nicolas 등²⁵⁾의 방법에 따라 측정하였다. 즉 메탄올에 100 ppm의 농도로 용해한 용액을 stock solution으로 한 시료 500 µL에 BuOH/HCl (95:5)용액 3 µL와 2% FeSO₄ 용액 100 µL을 가한 다음 혼합하여 95°C 항온 수조에 40min동안 방치한 후 급냉 시켰다. 반응액은 물로 분획하여 BuOH-HCl 분액을 UV-Vis spectrophotometer (UV 1601 PC, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 이용하여 자외선 및 가시광선의 흡수패턴을 조사하였다.

다. Phloroglucinol reaction method

Procyanidin polymer에 대해 phloroglucinol 반응은 Rachid 등²⁶⁾의 방법으로 분석하였다. procyanidin polymer (1 mg)은 phloroglucinol 0.5 mg을 메탄올에 녹인 1% HCl 1 mL에 가하여 실온에서 2시간 동안 shaking을 한다. 그리고 혼합 용액은 질소 기류 하에서 농축시킨 후 증류수 1 mL를 가한 다음 에틸아세테이트 (3 × 1 mL)로 추출한다. 추출물은 질소 기류 하에서 농축시켜 최종적으로 물: 메탄올 (1:1, v/v) 용매에 녹인 후 0.45 µm membrane을 통과시킨 후 High Performance Liquid Chromatograph (LC-10A, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 이용하여 분석하였다.

라. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

사용된 HPLC는 Shimadzu LC-10A system에서 ODS column (Thermo Hypersil Gold, i.d.; 5µM, 250×4.6 mm)을 이용하여 1 mL/min의 유속으로 280nm의 검출파장에서 분석을 행하였으며, 검액 10 µL를 주입하였다. 이동상으로는 1% aqueous formic acid (solvent A) 와 메탄올 (solvent B)을 두 용매를 이용해 gradient 조건으로 분석하였으며, 프로그램조건은 다음과 같다. gradient : (A:B) 100:0 → 70:30 (30min) → 40:60 (50min)

5. 총 페놀 함량 분석

총 페놀의 함량은 Folin-Ciocalteu 법²⁷⁾에 의하여 측정하였다. 시료 100µL에 2N folin-ciocalteu시약 50µL를 가하여 발색시키고, 20% Na₂CO₃ 300µL를 가하여 15분 동안 실온에서 방치시켰다. 그리고 방치 후 1 mL 증류수를 넣은 다음 1250

rpm으로 5분 동안 원심분리 한 후 급냉하여 상등액의 흡광도를 725nm에서 측정하였다. 매 실험 시에 표품 gallic acid를 이용하여 얻은 단순 회귀식으로 시료의 총 페놀의 함량을 구하였다.

6. 항산화 활성 검정

가. DPPH radical 소거 활성

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 자체가 매우 안정한 free radical로서 517nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 보라색 화합물이다. DPPH는 알코올 등의 유기용매에서 매우 안전하며 항산화 기작 중 proton-radical scavenger에 의하여 탈색되기 때문에 항산화 활성을 육안으로도 쉽게 관찰할 수 있는 장점이 있다. 즉 유리 라디칼을 소거할 수 있는 시료의 활성 검정은 비교적 간단하고 신속하여 광범위하게 이용되고 있는 DPPH 라디칼 소거 활성법²⁸⁾을 사용하였다. 즉, 시료 100 μ L와 DPPH를 메탄올에 100 μ M의 농도로 녹인 DPPH 용액 900 μ L를 넣고 혼합하여 실온에서 암실에 30분간 방치한 다음 UV spectrophotometer(UV 1601 PC, Shimadzu CO., Kyoto, Japan)로 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 DPPH radical 소거활성 비율 (% inhibition)은 다음과 같이 계산을 하였다.

$$\% \text{ Inhibition} = [1 - (\text{Abs}/\text{Abc})] \times 100$$

Abs : Absorbance of DPPH solution with sample at 517 nm

Abc : Absorbance of DPPH solution without sample at 517 nm

나. Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP)

FRAP assay는 Benzie 등²⁹⁾의 방법을 변용하여 실험에 이용하였다. $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ 와 acetic acid ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)를 이용하여 acetate buffer (pH 3.6, 23mM)를 만든다. 이후 40mM HCl과 TPTZ(2,4,6-tripyridyl-s-triazine)를 이용하여 10mM TPTZ solution을 만들었다. 실험을 위한 반응용액 (cocktail solution)은 acetate buffer (pH 3.6, 23mM), 10mM의 TPTZ(2,4,6-tripyridyl-s-triazine) 및 20mM의 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 10 : 1 : 1의 비율로 섞어 만든 후, 실험 전까지 37 $^\circ\text{C}$ 를 유지하여 사용하였다. 96 well 마이크로 플레이트에 시료용액을 각각 25 μ L 넣은 후

cocktail solution 175 μ L를 혼합하였다. 암실에서 30분방치 한 후 Victor3 1420 multiabel counter(PerkinElmer Inc., Boston, MA, USA)로 590nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원력은 매 실험 시에 측정한 trolox의 농도에 따른 흡광도의 단순 회귀식에서 구한 trolox equivalent value (μ M)로 나타내었다.

7. 통계처리

모든 실험은 3반복 측정 후 평균치와 표준편차를 Microsoft office Excel 2000 (Microsoft, USA)에 의하여 구하였다.

제 2 항 실험결과 및 고찰

1. 산머루 부산물 (씨, 발효박)으로부터 procyanidin 분리, 구조분석 및 특성

가. procyanidin 분리 및 정제

1) 조추출물 조제 및 용매 분획

산머루부산물로부터 추출 분리 과정은 Fig. 1, 2와 같다. 산머루 씨와 과피를 건조 후 분쇄한 것을 사용하여 시료 분말 100 g에 헥산을 첨가하여 waring blender로 2시간 균질화 시킨 다음 지질을 제거 한 후 탈지된 분말에 10 배량의 70% 아세톤을 가하여 12시간 2회 추출 한 후 여과하고 rotary vacuum evaporator (Eyela. N-N-series, Tokyo, Japan)를 사용하여 농축하여 아세톤 조추출물을 얻었다. 아세톤 조추출물은 비극성 용매로부터 극성이 높은 용매까지 순차적으로 분획하였다. 즉 10% 메탄올로 녹인 후, 헥산, 에틸아세테이트 및 물층으로 순차적으로 용매 분획한 다음 각 획분을 농축하여 이것들은 각각 밀봉하여 4℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

2) Chromatography에 의한 procyanidin의 분리

가) Sephadex LH-20 column chromatography

에틸아세테이트 분획물은 sephadex LH-20 column chromatography로 분리하였다. 메탄올에 충분히 swelling한 sephadex LH-20 gel slurry를 칼럼 (ϕ 25×500 mm)에 충전하였다. 칼럼 안을 이동상으로 치환한 후 시료를 겔에 흡착시키고, 이동상으로 50% 메탄올, 75% 메탄올, 75% 아세톤 순으로 1mL/min의 유속으로 각 300 mL씩을 순차적으로 가하여 용출하여 각 획분을 얻었다.

나) Toyopeal HW-40F column chromatography

Sephadex LH-20 gel column chromatography에서 분리한 획분을 toyopearl HW-40F gel을 충전한 column (ϕ 25×500 mm)을 이용하여 재정제하였다. 이동상으로 50% 메탄올, 100% 메탄올, 75% 아세톤 순으로 1mL/min의 유속으로 각 300 mL씩을 순차적으로 가하여 용출하여 분리, 정제 하였다.

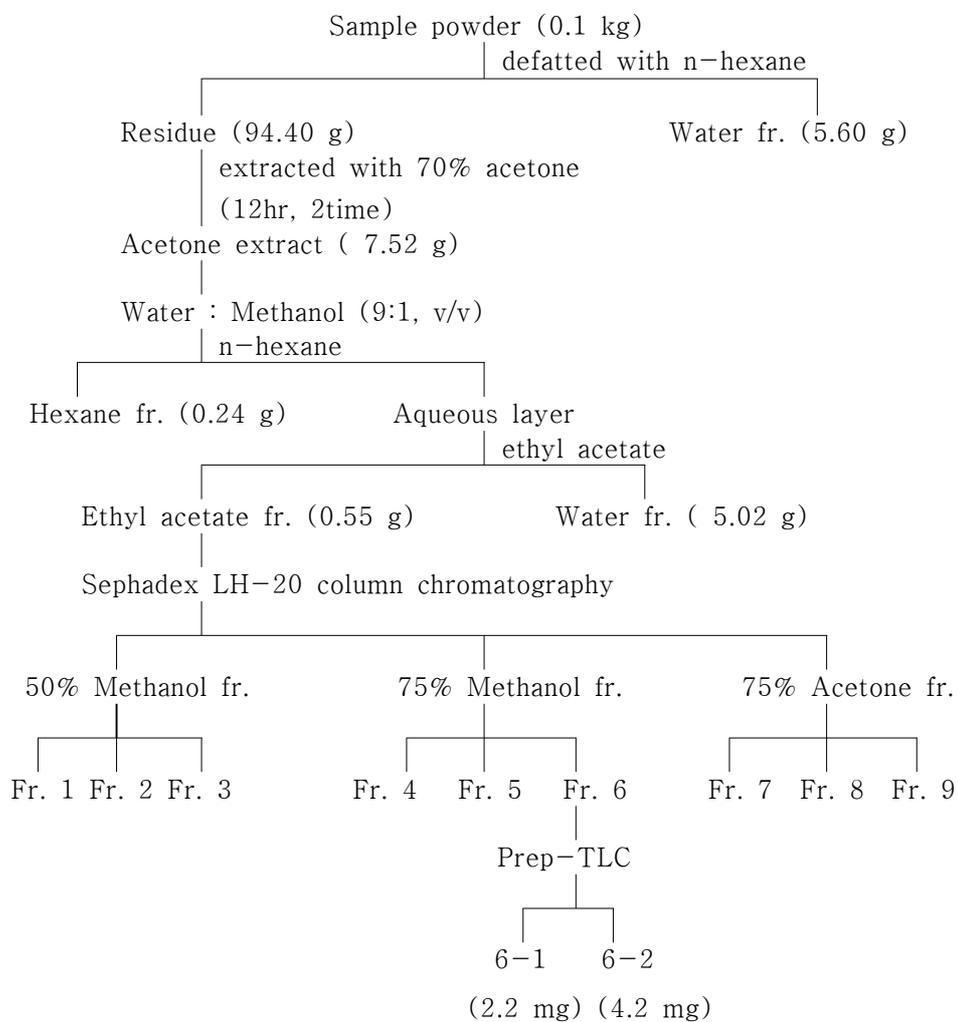


Figure. 1. Procedure of extraction, isolation and purification from wild grape (*Vitis amurensis*) seed.

다) Preparative thin layer chromatography (TLC)

용매분획 후의 에틸아세테이트층 16.7 mg을 분취용 TLC (silica gel 60 20 × 20 cm, 0.5 mm thickness, Merck, Darmstadt, Germany)에 banding한 후 toluene/acetone/formic acid (6:6:1, v/v/v) 혼합 용매를 이동상으로 이용하여 전개하고 사전에 70% hydrochloric acid에 녹인 1% vanillin 용액을 발색제로 사용하여 전개한 plate에 분무하여 발색된 부분의 Rf 치를 구하여 계산된 밴드 부분의 silica gel을 긁어 모았다. 또한 회수된 silica gel에 에틸아세테이트를 가하여 흡착성분을 용출시킨 후 얻어진 용출액을 농축하였다.

Sephadex LH-20 column을 이용하여 정제하여 얻은 분획물 결과는 Table 1과 같다. 각 fraction 중 75% 메탄올 fraction (NO.5)의 수율이 22%로 가장 높았다. 다음으로 75% 아세톤 fraction 8, 7 순으로 높았고, 이 둘 fraction이 가장 진한 갈색을 나타내었다. 각 fraction들은 TLC에 spot 하여 혼합용매에 전개한 후 발색제를 사용하여 분무하였다. 그 결과는 fraction 5 ~8 에서 선명한 적색을 나타내었다. Fraction 5(No.5)는 1종의 spot이, fraction 6은 2종의 spot이, fraction 7,8 은 5종 이상의 spot이 미량 검출되었다. 검출된 화합물의 구조를 해명하기 위하여 fraction 6(No.6)은 16.7 mg을 분취용 TLC로 전개한 후 두개의 band를 긁어모은 silica gel을 에틸아세테이트로 추출하였다. 여기서 임의로 원점에서 가까운 band 부터 6-1, 6-2로 정하였고, 각각 2.2 mg, 4.2 mg의 흡착물질을 회수하였다.

Table 1. Yield of sephadex LH-20 fractions from ethyl acetate fraction of wild grape (*Vitis amurensis*) seed

Fraction (No.)	Yield (%)
1 (50% MeOH)	2.41
2 (50% MeOH)	4.13
3 (50% MeOH)	2.31
4 (75% MeOH)	2.80
5 (75% MeOH)	22.01
6 (75% MeOH)	10.32
7 (75% Acetone)	11.11
8 (75% Acetone)	19.07
9 (75% Acetone)	1.47

2. 분리한 산머루 씨의 procyanidin 구조분석

가. UV/Vis 흡수 특성

산머루 씨의 에틸아세테이트 획분으로부터 sephadex LH-20 column을 이용하여 정제한 9개의 fraction으로부터 UV-Vis absorption spectrum을 관찰한 결과는 Fig. 3과 같이 (50% 메탄올 fr. 2, 3) 280, 275nm, (75% 메탄올 fr. 4, 5, 6) 268, 281, 280nm, (75% 아세톤 fr. 7, 8, 9) 277, 280, 277nm에서 흡수스펙트럼을 보였다. fraction 1(No.1)은 뚜렷한 흡수스펙트럼이 관찰되지 않았고, 2~8 fraction spectrum에서는 280nm 파장으로 flavanol monomer인 (+)-catechin과 동일한 type의 흡수스펙트럼을 나타내었다.

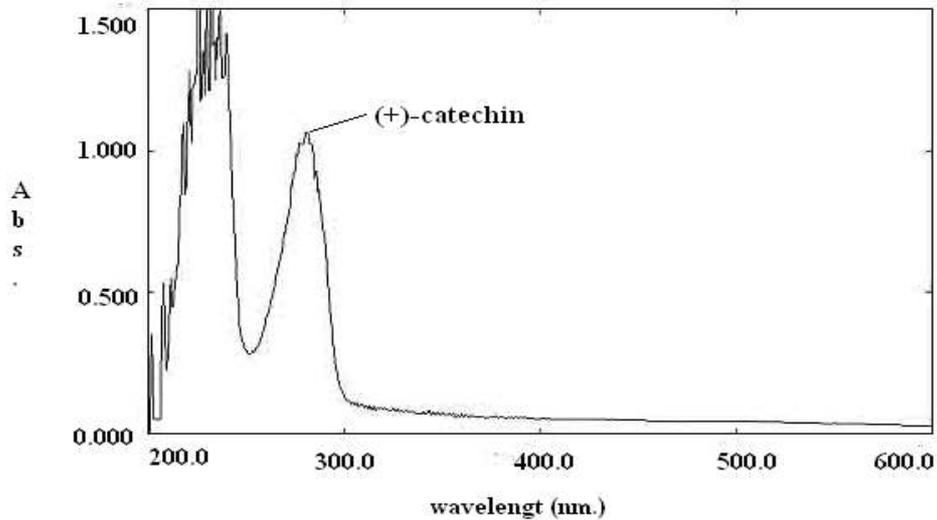


Figure. 3.1. UV-Vis absorption spectrum of (+)-catechin.

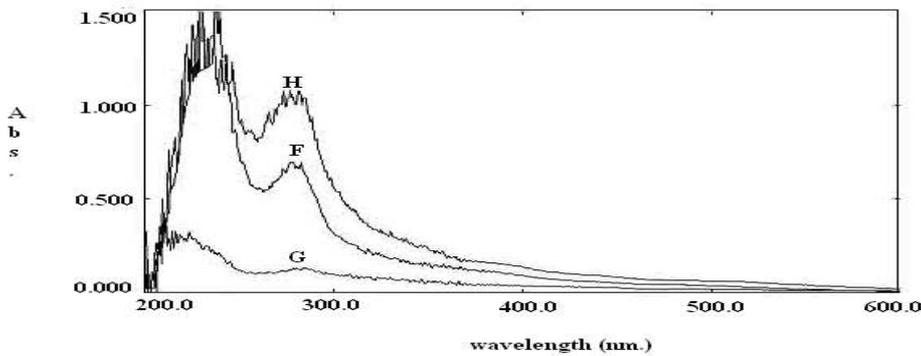
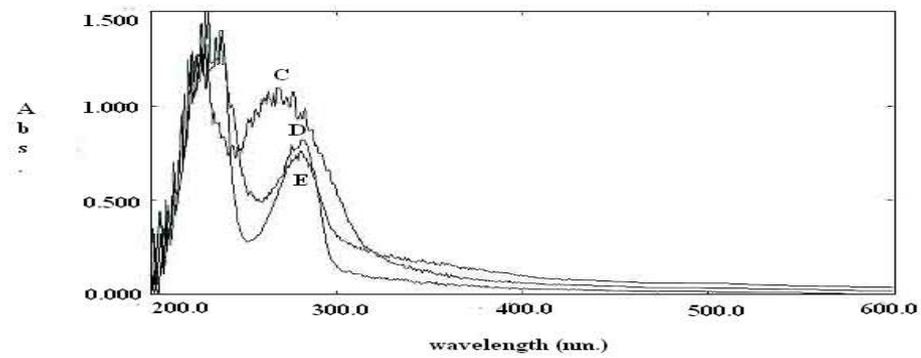
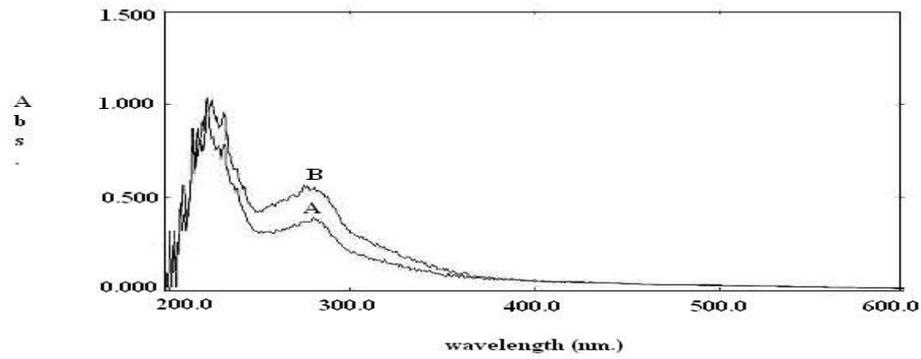


Figure. 3.2. UV-Vis absorption spectra of sephadex LH-20 fractions from wild grape (*Vitis amurensis*) seed. (1, A; 50% MeOH fr. 2, B; 50% MeOH fr. 3, C; 75% MeOH fr. 4, D; 75% MeOH fr. 5, E; 75% MeOH fr. 6, F; 75% Acetone fr. 7, G ; 75% Acetone fr. 8, H ; 75% Acetone fr.9)

나. MS 분석

산머루 씨의 ethyl acetate 분획으로부터 sephadex LH-20 column을 이용하여 정제하였고, 9개의 fraction 중 fraction 6(No.6)을 분취용 TLC로 전개 하여 6-1, 6-2의 band를 회수하였다. LC-MS를 행한 결과, Fig. 4과 같이 6-2는 m/z가 289(M+1)이므로 분자량은 290이었다. 이를 보아, TLC 상에서 fraction 6-2와 catechin이 거의 같은 위치에서 spot이 나왔으며, MS 결과 6-2의 분자량이 290인 것으로 보아 catechin임을 추정할 수 있다.

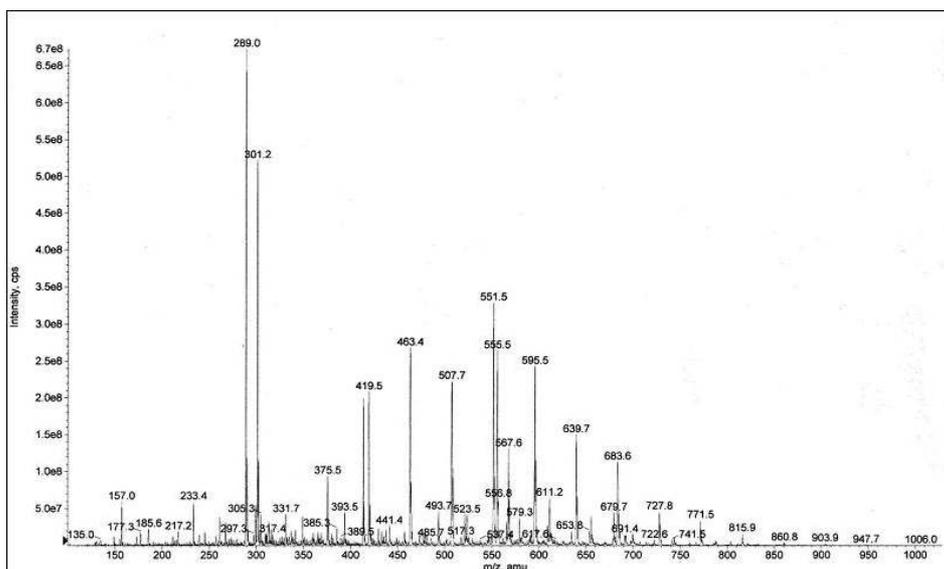


Figure 4. LC-MS spectrum of 6-2 isolated from wild grape (*Vitis amurensis*).

다. 분리한 산머루 씨의 procyanidin 특성

가) Vanillin-H₂SO₄ assay

Vanillin-H₂SO₄ assay는 식물 원료에서의 proanthocyanidin를 빠르게 정량하기 위해 가장 일반적으로 사용되는 방법이다¹⁹⁾. Sephadex LH-20으로부터 분리한 산머루 씨의 procyanidin함량을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 0.33 ~86.00 mg% 이었다. 9개의 각 fraction은 같은 농도에서 75% 메탄올 fraction (NO.5)가 가장 진한 적색으로 높은 함량을 얻었다. 그리고 모든 fraction의 반응물들은 적색이 나타났고, 이는 procyanidin의 독특한 반응 특성과 일치하였다.

Table 2. procyanidin contents of sephadex LH-20 fraction from wild grape (*Vitis amurensis*) seed by vanillin-H₂SO₄ assay

Fraction(No.) ¹⁾	procyanidin contents (unit : mg/100g)
1	—
2	—
3	0.33 ± 0.16
4	1.05 ± 0.04
5	86.00 ± 6.74
6	60.09 ± 3.88
7	50.82 ± 1.44
8	64.70 ± 4.35
9	3.58 ± 1.126

Values present the means ± SD (n=3) ; ¹⁾ 1000 ppm of test concentration was used.

나) BuOH -HCl method

Sephadex LH-20 column을 이용하여 정제한 산머루 씨의 9개의 fraction 중에서 Fig. 5와 같이 6, 7, 8 fraction에서 이들 fraction들은 BuOH-HCl method에서 적색으로 나타났고, UV-Vis absorption spectrum로 550nm 부근에서 흡광도를 확인하여 뚜렷한 BuOH-HCl반응의 특성을 확인 할 수 있었다.

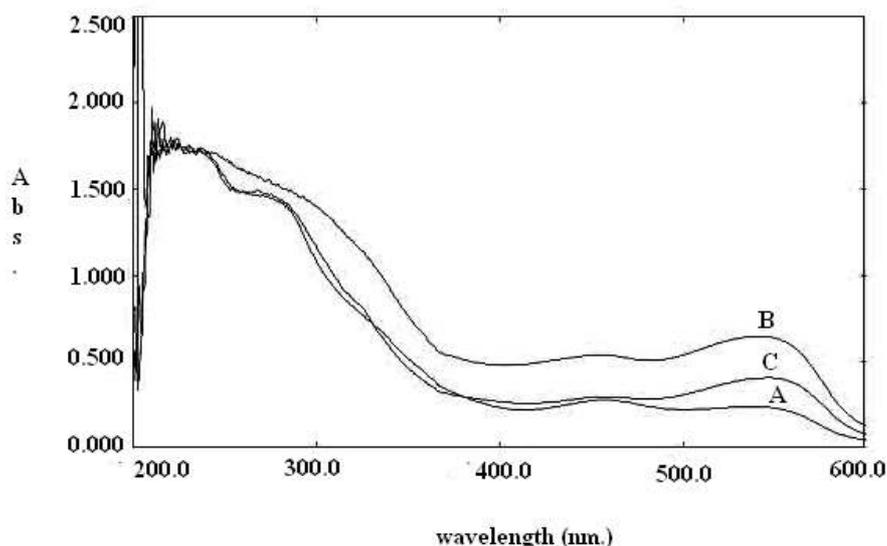


Figure 5. UV-Vis absorption spectra for BuOH-HCl reaction of sephadex LH-20 fractions from wild grape (*Vitis amurensis*) seed. [A, fraction 6 ; B, fraction 7 ; C, fraction 8 (2 times diluted)]

다) Phloroglucinol reaction method

Rachid 등²⁰⁾에 의해 서술된 HPLC 분석에 의해 phloroglucinol과 반응 시킨 후 280nm에서 측정된 fraction 8(No.8)은 5~45분 사이에 주요 peak가 떴고, 280nm에서의 크로마토그램은 8개의 화합물에 상응하는 terminal 과 extension units을 나타내었다. Fig.6 (b)는 phloroglucinol을 반응시킨 fraction 8 (No.8)에 대한

HPLC 크로마토그램으로 (-)-epicatechin-4-phloroglucinol, (+)-catechin-4-phloroglucinol, (+)-catechin, (-)-epicatechin을 확인 할 수 있었다. Fig .6 (a)는 phloroglucinol을 반응시키지 않은 것으로 크로마토그램에 phloroglucinol과 결합한 (-)-epicatechin-4-phloroglucinol, (+)-catechin-4-phloroglucinol의 peaks가 확인 되지 않았다. 그리고 기본적으로 procyanidin의 주요성분인 (+)-catechin과 비교해서 procyanidin함량을 측정하였다. 동등한 농도인 fraction 8(No.8)과 (+)-catechin은 1:3.2의 면적비로 구해졌으며, 이는 fraction 8(No.8)속에는 31%의 procyanidin의 함량이 존재한다고 추정할 수 있다.

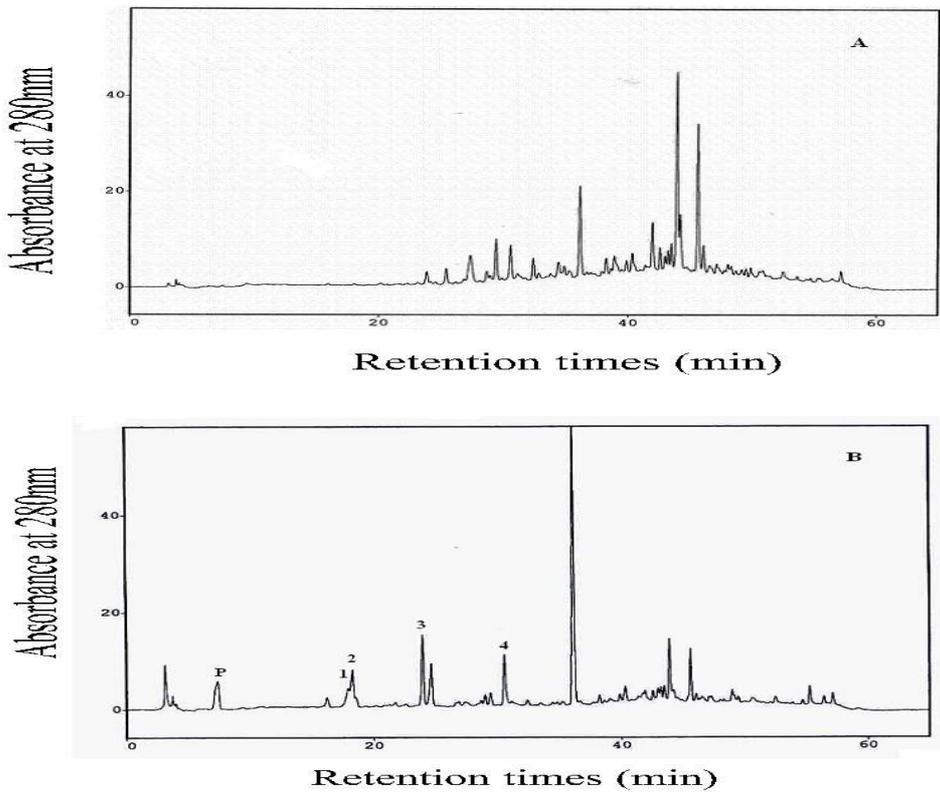


Figure 6. HPLC chromatograms of sephadex LH-20 fractions from wild grape (*Vitis amurensis*) seed. (a) unreacted (b) phloroglucinol adducts of 8 fr. 1, (-)-epicatechin-4-phloroglucinol, 2, (+)-catechin-4-phloroglucinol; 3, (+)-catechin; 4, (-)-epicatechin.

라. 산머루 씨의 총 페놀 함량

총 페놀 함량은 sephadex LH-20으로부터 분리한 산머루 씨의 페놀성 화합물의 총 함량을 측정한 결과는 Table 3과 같다. 페놀성 화합물의 총 함량은 1.89 ~ 53.02 mg/100mL으로 fraction 8(No.8)이 53.02 mg/100mL로 가장 높았고, fraction 5, 6, 7, 순으로 함량이 높았다

Table 3. Total phenolics contents of sephadex LH-20 fractions from wild grape (*Vitis amurensis*) seed

fraction(No.) ¹⁾	Total phenolics (unit : mg/100mL)
1	1.89 ± 0.13
2	6.60 ± 0.26
3	24.02 ± 0.61
4	24.98 ± 0.32
5	49.86 ± 1.09
6	41.66 ± 0.32
7	40.09 ± 1.73
8	53.02 ± 0.35
9	10.79 ± 0.50

Values present the means ± SD (n=3) ; ¹⁾ 1 mg/mL concentration was used .

마. 산머루 씨의 항산화 활성 검정

가) DPPH radical 소거 활성

Sephadex LH-20 column chromatography를 통해 얻은 획분의 DPPH 라디칼 소거 활성을 알아본 결과는 Fig. 7과 같다. 페놀성 화합물 총 함량 결과와 마찬가지로 75% 아세톤으로 용출시킨 fraction 8(No.8)이 90%이상으로 가장 높았고, fraction 5, 6, 7, 순으로 함량이 높았다. 또한 이들 fraction들은 100 µM gallic acid, trolox와 비교해 훨씬 더 높은 항산화 활성을 보였다. 이러한 결과는 일반적으로 catechin이 단량체로 존재할 때보다 다량체 형태의 procyanidin으로 존재하는 경우가 항산화 효과가 강한 것을 고려할 때²¹⁾ 높은 항산화 효과는

procyanidin의 존재나 높은 중합도를 예견할 수 있다.

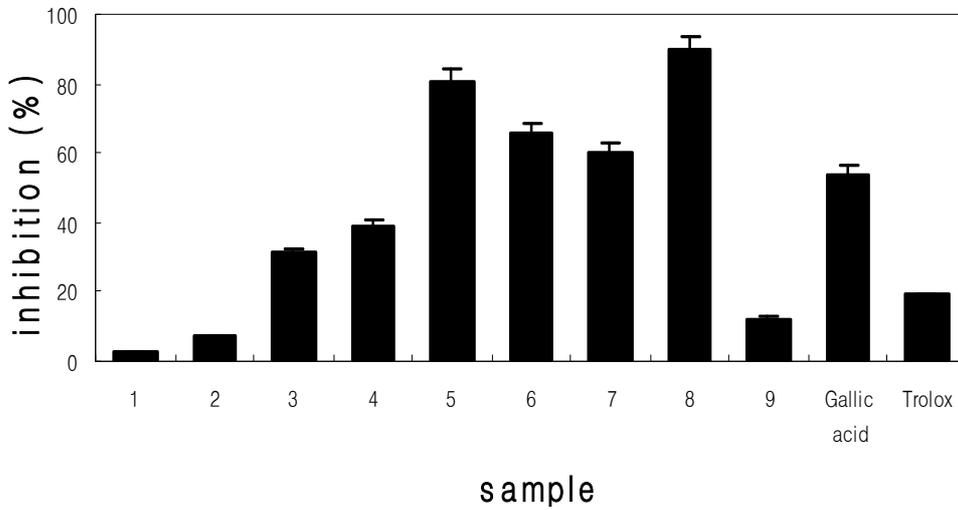


Figure 7. DPPH radical scavenging activities of sephadex LH-20 fractions from wild grape (*Vitis amurensis*) seed.; Test solutions were 100ppm. Gallic acid and Trolox were 100 μ M

나) Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP)

FRAP 방법으로 sephadex LH-20으로 정제한 산머루 씨의 항산화활성을 Table 4에 나타내었다. 표준물질인 trolox의 일정 농도가 발현하는 활성의 기준치로 나타내었는데, fraction 8(No.8)이 가장 높은 함량으로 이는 그만큼 환원력이 높다는 것을 뜻한다. fraction 5, 6, 순으로 함량이 높았다. 이는 앞에서의 총 페놀 함량, DPPH 라디칼 소거 활성과 유사한 결과이었다.

3. 산머루 과피로부터 procyanidin 분리 , 구조분석 및 특성

가. 산머루 과피로부터 procyanidin 분리 및 정제

얻은 분획물 결과는 Table 5와 같다. 각 fraction 중 75% 아세톤 fraction (NO.8)의 수율이 34.66%로 가장 높았다. fraction 3은 분홍색, fraction 6,7,8 갈색을 용출액을 얻었으며, fraction 8이 가장 진한 갈색을 나타내었다. 각 fraction들은 TLC에 spot 하여 혼합용매에 전개한 후 70% hydrochloric acid에 녹인 1% vanillin 용액을 발색제로 사용하여 분무하였다. 그 결과는 모든 fraction에서 선명한 적색을 나타내고, fraction 6은 catechin과 비슷한 band 위치에서 확인되었다. fraction 7,8 에서 5종 이상의 미량의 spot을 확인하였다. 중 이상의 미량의 spot을 확인하였다.

나. 산머루 과피의 procyanidin 특성

가) Vanillin-H₂SO₄ assay

Procyanidin 함량을 측정한 결과는 Table 6와 같다. 2.81 ~ 49.35 mg%이었다. 9개의 각 fraction은 같은 농도에서 75% 메탄올 fraction 6(NO.6)이 가장 진한 적색으로 높은 함량을 얻었다. 그리고 모든 fraction의 반응물들은 적색이 나타났고, 이는 procyanidin의 독특한 반응 특성과 일치하였다.

Table 5. Procyanidin contents of sephadex LH-20 fraction from wild grape (*Vitis amurensis*) skin by vanillin-H₂SO₄ assay

(unit : mg/100g)	
Fraction(No.) ¹⁾	procyanidin contents
1	2.81 ± 0.388
2	3.46 ± 0.482
3	31.81 ± 1.940
4	49.00 ± 4.381
5	23.62 ± 3.103
6	49.35 ± 2.753
7	33.35 ± 3.073
8	41.37 ± 3.061
9	34.74 ± 2.266

Values present the means ± SD (n=3) ; ¹⁾ 1000 ppm of test concentration was used.

나) BuOH-HCl method

Sephadex LH-20 column을 이용하여 정제한 산머루 씨의 9개의 fraction 중에서 Fig. 8과 같이 1, 2을 제외한 모든 fraction에서 뚜렷한 BuOH-HCl반응의 특성을 확인 할 수 있었다. 이들 fraction들은 BuOH-HCl method에서 적색으로 나타났고, UV-Vis absorption spectrum로 550nm 부근에서 흡광도를 확인하였다. fraction 4가 550nm 부근에서 가장 높은 흡광도를 나타내었고 다음으로 fraction 3, 8, 5, 7, 9, 6 순이었다. 또한 vanillin-H₂SO₄ assay와 마찬가지로 procyanidin 존재의 특성을 확인 할 수 있었다.

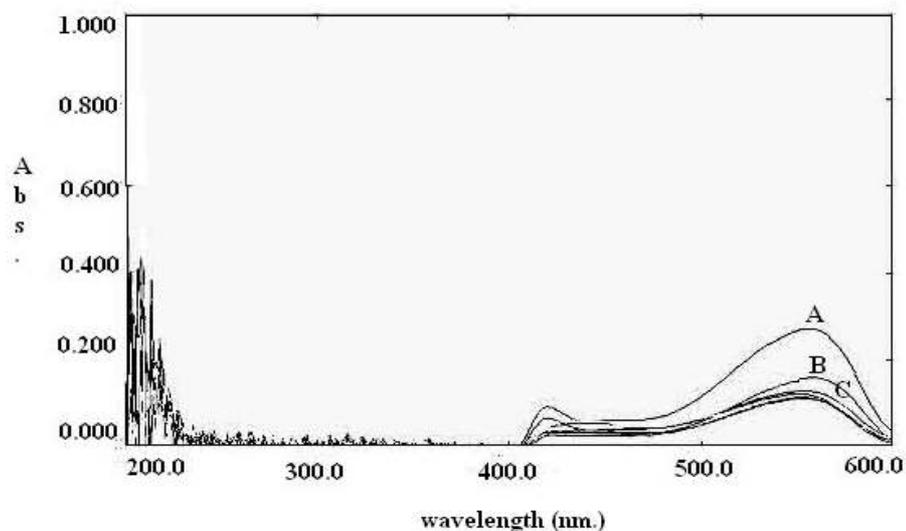


Figure 8. UV-Vis absorption spectra for BuOH-HCl reaction of sephadex LH-20 fractions from wild grape (*Vitis amurensis*) skin. (A, fraction 4 ; B, fraction 3 ; C, fraction 8)

Table 6. Yield of sephadex LH-20 fractions from ethyl acetate fraction of wild grape (*Vitis amurensis*) skin

Fraction (No.)	Yield (%)
1 (50% MeOH)	0.67
2 (50% MeOH)	19.47
3 (50% MeOH)	5.90
4 (75% MeOH)	5.88
5 (75% MeOH)	7.97
6 (75% MeOH)	12.63
7 (75% Acetone)	5.37
8 (75% Acetone)	34.66
9 (75% Acetone)	0.75

다. 산머루 과피의 총 페놀 함량

Sephadex LH-20 column chromatography 으로부터 분리한 산머루 과피의 페놀성 화합물의 총 함량을 측정한 결과는 Table 7과 같다. 페놀성 화합물의 총 함량은 4.48 ~ 50.80 mg/100mL으로 fraction 8(No.8)이 50.80 mg/100mL로 가장 높았고, fraction 6, 9, 7 순으로 함량이 높았다.

Table 7. Total phenolics contents of sephadex LH-20 fractions from wild grape (*Vitis amurensis*) skin

fraction(No.) ¹⁾	Total phenolics (unit : mg/100mL)
1	6.91 ± 0.380
2	4.48 ± 0.973
3	22.75 ± 0.680
4	32.99 ± 0.625
5	37.47 ± 0.293
6	44.04 ± 0.973
7	38.65 ± 0.588
8	50.80 ± 3.746
9	43.62 ± 3.116

Values present the means ± SD (n=3) ; ¹⁾ 1000 ppm concentration was used .

라. 항산화 활성 검정

가) DPPH radical 소거활성

DPPH 라디칼 소거 활성을 알아본 결과는 Fig. 9와 같다. 페놀성 화합물 총함량 결과와 마찬가지로 75% 메탄올로 용출시킨 fraction 6(No.6)이 85%이상으로 가장 높았고, fraction 7, 8, 순으로 함량이 높았다. 또한 이들 fraction들은 100 µM gallic acid, trolox와 비교해 훨씬 더 높은 항산화 활성을 보였다.

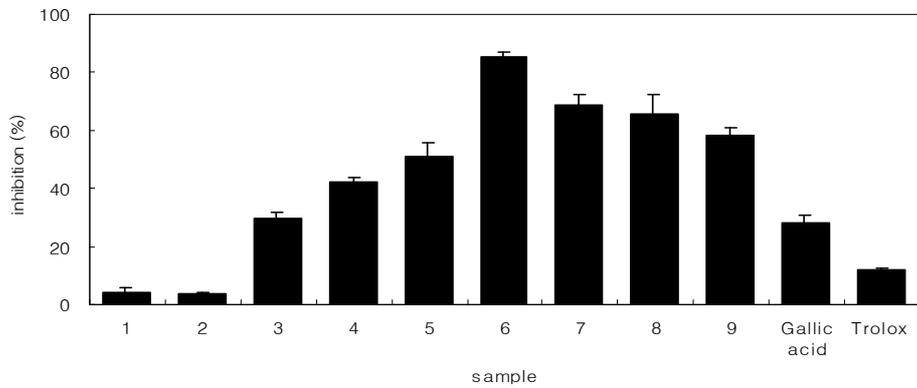


Figure 9. DPPH radical scavenging activities of sephadex LH-20 fractions from wild grape (*Vitis amurensis*) skin.; Test solutions were 100ppm. Gallic acid and Trolox were 100 μ M

나) Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP)

Sephadex LH-20 column chromatography으로 정제한 산머루 과피의 항산화활성을 Table 8에 나타내었다. fraction 4(No.4)가 322.53의 농도로 가장 높은 함량을 나타내었다. 다음으로 fraction 6, 5, 7, 8 순으로 함량이 높았다.

Table 8. Trolox equivalent values of reaction with the FRAP assay of sephadex LH-20 fractions from ethyl acetate fraction of wild grape (*Vitis amurensis*) skin

(unit : μM)		
Fraction(No) ¹⁾	Con ²⁾	Trolox equivalent
1	—	62.12 \pm 1.687
2	—	35.35 \pm 0.974
3	0.9	171. 41 \pm 10.349
4	2.1	322. 53 \pm 14.948
5	3.6	309. 80 \pm 9.594
6	4.8	310. 81 \pm 1.948
7	4.4	229.80 \pm 1.669
8	5.9	254. 34 \pm 0.350
9	4.1	209.09 \pm 8.969
Standard		
Gallic acid		137.20 \pm 13.04
Quercetin	50	134.87 \pm 4.55
Ascorbic acid		51.74 \pm 1.05

¹⁾ Test solutions were 100ppm

²⁾ Total phenolic concentration equivalent to 100 ppm of test solutoion.

본 연구는 산머루부산물로부터 항산화물질 procyanidin을 분리하여 화학적 구조와 특성을 밝히고, 나아가 생리활성효능을 탐구하여 건강기능식품 등의 제조에 기여할 것으로 생각된다. 따라서 현재 식용되지 않고 거의 버려지고 있는 산머루 과피 뿐만 아니라 씨의 실정을 감안할 때 이의 생리활성효능 규명과 이를 활용한 각종 질병의 예방 및 치료에 필요한 기능성 식품 또는 의약품으로의 개발에 필요한 프리라디칼 소거 활성의 주성분 물질의 분리, 구조 해석 및 기타 생리활성에 대한 추가적인 연구가 필요하다 하겠다.

제 2 절 (제2세부과제) 산머루 procyanidin의 항암성 및 항암기작

세부과제 연구기관	인 제 대 학 교
세부 과제명	세포 및 동물 모델계에서 산머루 procyanidin의 항암기작규명
연구책임자	정 우 식

제 1 항 실험재료 및 방법

1. 산머루 씨 및 발효박의 추출 및 분획

가. 시료

경남 함양 소재 지리산 두래마을로부터 산머루 씨 및 발효박을 공급받아 통풍이 잘 되는 곳에서 음건하여 분쇄기로 갈아 분말로 만들었다.

나. 재료

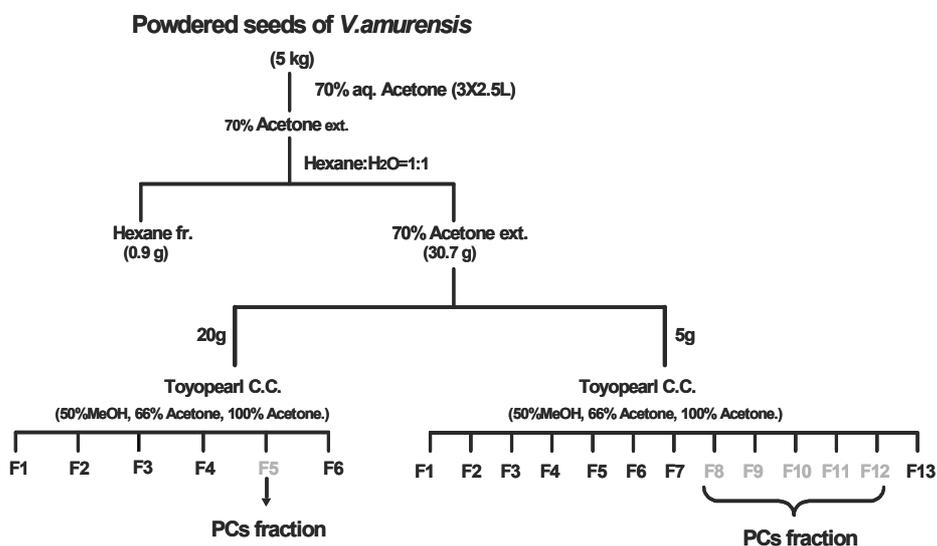
HPLC분석에 사용된 모든 용매(HPLC grade)는 덕산 (DUKSAN, Korea)에서, (+)-Catechin, (-)-epicatechin, ascorbic acid, butylated hydroxyanisol (BHA)는 Sigma (MO, USA) 제품을 사용하였다.

다. 용매 추출 조건

산머루(*Vitis amurensis*) 씨 및 발효박을 통풍이 잘 되는 곳에서 음건하여 분쇄기로 갈아 분말로 만들었다. 분말 500 g을 70% acetone에 24시간 동안 침지하는 과정을 3회 반복하여 추출하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 40°C에서 농축하여 70% acetone 추출물을 얻었다. 70% acetone 추출물을 물에 녹인 후 *n*-Hexane을 동량 첨가하여 분액깔때기에서 *n*-Hexane (0.8897 g) 가용성 분획물을 나누었으며, 물 층에 있는 분획물은 70% acetone 분획물이며, 두 층 사이의 불용성층을 interface 분획물로 나누었다 (Scheme 1).

라. 산머루 씨 70% acetone 분획물의 칼럼 크로마토그래피

산머루 씨의 70% acetone 추출물 20g과 5g 을 50% MeOH과 66% acetone, 100% acetone을 용매로 하여 각각 Toyopearl HW-40F (Tosoh, Tokyo, Japan) 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 6개와 13개의 subfraction을 각각 얻었다 (Scheme 2). 70% 아세톤 추출물의 칼럼 크로마토그래피는 일반적인 지름 3cm, 길이 30 cm의 칼럼과 지름 15cm, 길이 10cm의 칼럼 두 가지를 이용하였으며 이는 전통적인 분석을 위한 칼럼 크로마토그래피의 결과와 차후 대량추출시의 결과를 예측해 보기 위한 방편으로 수행되었다. 추출용매는 동일한 용매를 사용하였고 두 가지 방법으로 분리한 각 fraction에 대해 TLC 분석 및 항암활성을 비교 실험하였다.



Scheme 1. Extraction and fractionation procedure of the powdered seed of *Vitis amurensis*

2. 산머루의 항암 효과 및 기작 연구

가. 산머루 추출물의 세포수준 항암 효과 및 작용기작 (*In vitro*)

1) 재료

세포 배양을 위해서 F-12 medium, 10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin은 HyClone (Logan, UT)의 제품을 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)은 Gibco BRL (NY, USA)의 제품을 사용하였다. Western blotting을 위한 시약은 BioRad (Hercules, CA, USA)에서 Nrf2, NQO1 와 β -actin primary antibody는 Santa Cruz Biotechnology (CA, USA), HO-1은 Calbiochem (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. Anti-phospho-extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)1/2, phospho-JNK, phospho-p38 polyclonal antibodies와 LY294002 (PI3 kinase inhibitor)/UO126 (MEK1/2 inhibitor) Cell Signaling Technology (Beverly, MA)에서 구입하였다. Horse radish peroxidase (HRP) conjugated secondary antibody는 Santa Cruz Biotechnology (CA, USA)에서 그리고 chemiluminescent 기질은 supersignal (Pierce, Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

2) 세포 배양 및 처리

HepG2 human hepatoma cell line은 ACTT(American Type Culture Collection)에서 구입하였으며 HepG2-C8 cell은 Kong,A.N.교수로부터 제공받았다. 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 10% FBS(Fetal bovine serum)와 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, L-glutamin, amino acid가 첨가된 F-12 medium에 배양하였다. 세포를 10mm dish 나 24-well plate에 부착시켜 배양하고 overnight starvation 시킨 뒤 여러 농도의 시료를 처리하였다.

3) MTS assay

농도 및 시간에 따른 산머루 procyanidin 추출물의 인간 유래 HepG2 hepatoma cell에 대한 증식 (cell proliferation) 억제 효과를 MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2

H-tetrazolium, inner salt] assay (Promega Corporation, Madison, USA)를 이용하여 조사했다. HepG2 cell을 24-well plate에 24시간 배양하여 overnight starvation 시킨 뒤 각각 다른 농도로 샘플 투여하고 48시간 동안 배양한 뒤 CellTiter 96 Aqueous nonradioactive cell proliferation assay kit (Promega Corp.)를 이용하여 암세포 증식 억제 효과를 microplate reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) ARE-luciferase activity assay

산머루 procyanidin이 antioxidant response element(ARE) gene 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 HepG2 cells에 pARE-T1-luciferase reporter gene을 transfection시켜 stable clone을 얻은 뒤 12-well plate에 24시간 배양하여 overnight starvation 시킨 뒤 여러 농도의 procyanidin 추출물을 투여하여 12시간 경과 후 추출물의 ARE-luciferase activity에 미치는 효과를 조사하였다. ARE-luciferase activity는 Promega사(Madison, USA)의 luciferase assay kit를 사용하여 SIRIUS luminometer로 3회 이상 반복 측정했다. 단백질 분석 정량하여 specific activity 값으로 보정하였다.

5) Western blot analysis

가) Total protein 분리

세포로부터 protein을 분리하는 과정으로 cell culture plate로부터 배양액을 제거하고 ice-cold PBS로 2회 세척하였다. Plate를 얼음 위에 올려 놓은 채 cell lysis buffer (50mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 0.02% sodium dodecyl sulfate, 0.1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 1mM PMSF)을 넣어주고 cell scraper로 긁어주어 세포를 수집한다. 이를 얼음 상태에서 1시간 방치한 후 4°C, 13,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액만을 모아 새 튜브로 옮긴다. 단백질 정량은 BCA protein assay방법으로 측정하였다.

나) 전기영동

다양한 농도로 처리한 HepG2를 수집한 다음 protein assay kit (Pierce, Rockford, USA)의 방법에 따라 단백질 정량을 하였다. 40µg의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리한 다음

polyvinylidene fluoride membrane (PVDF)로 transfer하였다. Transfer가 완료된 PVDF membrane을 5% non-fat dry milk를 함유한 PBST로 비특이적 단백질을 차단하기 위하여 한 시간 정도 반응시켰다. 계속하여 Nrf2, β -actin, NQO1, HO-1, p-JNK, p-ERK, p-p38에 대한 항체와 하룻밤 반응시킨 후, 각 항체에 대한 이차항체인 anti-rabbit IgG 또는 anti-goat IgG에 1시간 반응시켰다. 각 반응 사이 PBST로 5분씩 5번 washing 하였다. 마지막 washing이 끝나면 각 항체에 대한 대응 단백질 band는 Supersignal west pico chemiluminescent substrate (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 발현시켰다.

6) RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction)

총 RNA는 Tri-reagent(Molecular Research Centre, Inc.)로 추출하고 2 μ g의 total RNA를 SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System(Invitrogen)을 이용하여 First strand cDNA를 만든다. 1/10 diluted first strand cDNA 2 μ l, 10xBuffer II 5 μ l, 각각 2.5mM의 dNTPs mixture 4 μ l, 각각 10mM의 primer set 1 μ l, Taq DNA polymerase 0.4 μ l을 넣은 후 최종 부피가 50 μ l 되도록 맞춘 다음 Thermocycler (Eppendorf Gradient PCR System)로 PCR을 수행한다. Amplification profile은 94 $^{\circ}$ C에서 2분간 denaturation, 각각의 annealing temperature에서 30초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 polymerization의 30 cycle을 수행하고 최종 cycle에서는 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 더 연장하였다. PCR 결과는 2% metaphor agarose gel에 PCR product 5 μ l과 loading dye 1 μ l을 잘 섞은 후 loading 하고 50V에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하고 Gel-Documentation System (Gel-Doc EQ, Bio-Rad)를 사용하여 목표 유전자의 발현을 확인하였다. 본 실험에 사용한 primer sequence와 annealing temperature는 Table 1에 제시하였다.

Table 1. List of primer sequence and product size

Name	Product size (bp)	Sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)
NQO1	235	F 5'-GCC TAG CAC AAG TAC CAC TCT TGG TC-3' R 5'-CTG AGG CAG GAG AAT TGC TGG AAC C-3'	57
HO-1	555	F 5'-CAG GCA GAG AAT GCT GAG TTC-3' R 5'-GAT GTT GAG CAG GAA CGC ACT-3'	57
β -actin	446	F 5'-AGA GAT GGC CAC GGC TGC TT-3' R 5'-ATT TGC GGT GGA CGA TGG AG-3'	60

나. 산머루 씨 procyanidind의 동물모델 항암 효과 (*In vivo*)

1) 실험동물 및 식이재료

실험동물은 체중 18~21g의 6주령 Balb/c mice, 수컷을 효창 사이언스 (Daegu, Korea)로부터 구입하여 물과 식이의 접근이 자유로운 상태에서 12시간 light/dark cycle로 키우며 2주간 환경적응기간을 가졌다. 환경적응기간 동안 AIN-76A diet를 투여하며 사육하였다. mice는 7그룹 (5 animals per group)을 나누어 실험하고, 산머루 유래 procyanidin을 50% PEG 400용액에 20 mg/ml의 농도로 제조하여 50,200mg/kg의 농도로 oral gavage로 투여하였다. Control group은 vehicle (50% PEG 400 solution)만을 투여하고, 샘플은 매 24시간 마다 투여하며 샘플 또는 vehicle 투여 72시간 이후에 희생시켰다.

2) 식이 조성

본 실험에서 사용한 식이는 환경적응기간 동안 AIN-76A diet를 실험동물에게 급여하였으며 식이의 조성은 Table 2.에 나타내었다.

Table 2. Composition of the experimental diets (%)

Ingredient	g/kg
Casein	200.0
DL-Methionine	3.0
Cornstarch	150.0
Sucrose	500.0
Cellulose	50.0
Corn oil	50.0
Salt Mix	35.0
Vitamin mix	10.0
Choline Bitartrate	2.0

3) 실험방법

가) 생존율 평가

시료를 투여한 이후 매일 mice를 관찰하여 죽거나 행동의 변화가 나타나는가를 살펴보았다.

나) 시료채취

실험동물을 하루 밤 절식 시킨 후 드라이아이스로 마취시키고 개복하여 간을 적출하였다. 전체 간(liver) 중 100mg을 취하여 cell lysis buffer를 사용하여 단백질을 분리한 후 BCA protein assay를 이용하여 단백질을 측정하였다. 세포방어기작 관련 protein의 발현여부를 Western bolt을 통해 조사하였다.

3. 산머루의 항염증 효과 및 기작 연구

가. 산머루 분획물이 RAW 264.7 murine macrophage cell line에서 항염증 효과 및 기작 규명 (*In vitro*)

1) 세포 배양 및 처리

RAW 264.7 murine macrophage cell line은 ACTT(American Type Culture Collection)에서 구입하였으며, 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 10% FBS(Fetal bovine serum)와 100 units/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin, L-glutamin가 첨가된 DMEM(Dulecco's modified eagle medium)에 배양하였다. 세포를 10mm dish 나 24-well plate에 부착시켜 배양하고 overnight starvation 시킨 뒤 여러 농도의 산머루시료를 처리하고 2시간 배양한 후 산화적 손상을 유발하기 위해 LPS (Lipopolysaccharide) 1µg/ml를 첨가하고 12시간 배양하였다.

2) NO formation

Nitric oxide(NO) 생성 평가는 RAW 264.7 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10⁵ cells/mL로 조절한 후 24 well plate 에 부착하고, 추출물 시료처리하고 2시간 후에 LPS(1 µg/mL)를 처리하여 12시간 배양하

였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약 [1%(w/v) sulfanilamide, 0.1%(w/v) naphylethylenediamine in 2.5%(v/v) phosphoric acid]을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 μL와 Griess 시약 100 μL를 혼합하여 96well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 sodium nitrite(NaNO₂)를 standard로 비교하였다.

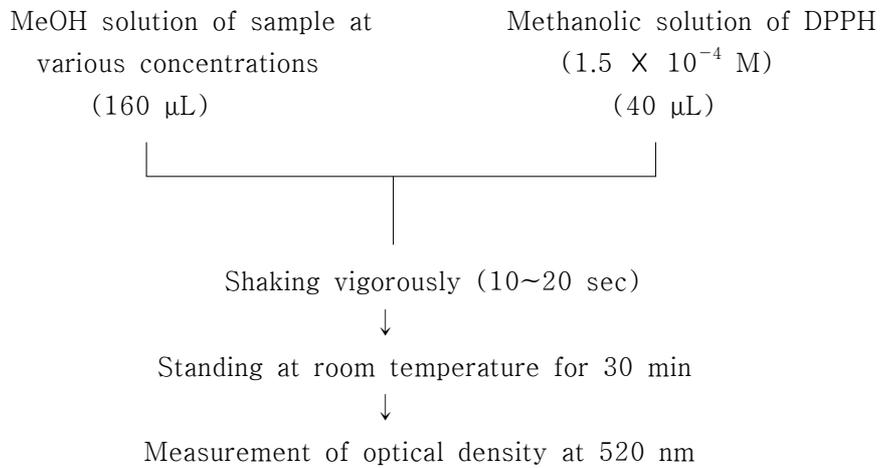
3) ROS formation

Reactive oxygen species(ROS) 생성 평가를 하기 위해 fluorescent probe DCF-DA (dihydrodichlorofluoresceindiacetate; Sigma, USA)를 사용하였다. 96-well plate에 cell을 부착시키고 20μM DCF-DA (dissolved in DMSO)를 처리하고 37°C에 1시간 배양하였다. PBST로 washing하고 여러 농도의 시료를 처리하여 1시간 배양하고 H₂O₂(1mM)를 처리하여 2시간 배양한다. 2시간 후에 media 제거하고 PBST로 2번 washing한다. 생성된 ROS는 fluorescence multi-detection reader (Synergy HT™ Multi-Detection Microplate Reader, BIO-TEK Instruments, Inc, USA)에서 excitation 485nm와 emission wavelength 528nm에서 측정하였다.

4. 산머루의 항산화효과

가) 항산화활성 측정

시료의 분획물에 대한 항산화 활성은 DPPH free radical의 소거활성 (전자공여능)으로 검정하였다. DPPH radical 소거 실험은 광범위하게 쓰이는 간단하고 편리한 항산화 검색법으로 항산화능 측정에 많이 사용된다. 각 시료의 DPPH radical에 대한 소거능 측정은 각 농도별 시료를 MeOH에 녹여 160 μL 취하여 1.5×10^{-4} M의 DPPH MeOH 용액 40 μL와 잘 혼합한다. 이 반응 혼합액을 실온에서 30분간 방치한 후, microplate reader로 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 음성대조군과 비교하여 free radical 소거활성을 백분율로 나타내고, 50% 저해 농도(IC₅₀)를 계산하였다. 측정치는 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다.



Scheme 2. Measurement of DPPH radical scavenging activity

5. 산머루의 procyanidin 구조분석

가) High pressure liquid chromatography의 분석

TLC에서 single spot으로 보이는 단일 물질(Fraction 4)의 순도를 알아보기 위해, HPLC를 Table. 3과 같은 조건으로 분석하였다.

Table 3. Conditions of HPLC for Fraction 4 isolated from wild grape seed

Item	Condition
Stationary phase	Phenomenex Gemini C18 Column (5 μ m, 4.6 X 250 mm)
Mobile phase	50% Methanol
Detector	Diode array detector (DAD)
Flow rate	1ml/min
Injection volume	5 μ l
Sample	Fraction 4

나) 분리한 산머루 씨의 procyanidin 특성

1) Vanillin assay

Vanillin-H₂SO₄ assay는 식물 원료에서의 procyanidin (for terminal unit)을 빠르게 정량하기 위해 가장 일반적으로 사용되는 방법이다. MeOH에 녹인 각각의 sample과 glacial acetic acid를 넣고 1ml을 만든다. 이 sample solution에 vanillin reagent (1% vanillin and 8% conc.HCl in glacial acetic acid (1:1, v/v) 5ml을 넣고 30°C water bath에 20분간 반응시킨 후 510 nm에서 흡광도 측정한다. Catechin을 positive control로 사용하였다.

2) BuOH-HCl assay

산머루 추출물과 fraction에서 procyanidin (for interflavan units)을 알아보기 위해 BuOH-HCl assay를 이용하였다. glass screw capped test tube에 acidic BuOH [5% (v/v) conc. HCl in n-BuOH] 6ml, Iron reagent [2% solution of FeNH₄(SO₄)₂12H₂O in 2N HCl] 200 μ l, sample 1ml을 넣고 50°C water bath에 50분간 반응시킨 후 식힌 다음 550 nm에서 흡광도 측정한다.

3) Phloroglucinol reaction method

산머루 procyanidin의 depolymerization을 알아보기 위해 phloroglucinol을 반응시켜 LC-MS로 분석하였다 (fig.1). Fraction 5 (5 mg), phloroglucinol (5 mg)과 ascorbic acid (10 mg)을 MeOH에 녹인 0.1N HCl 1ml에 넣고 격렬히 흔들어

준 다음 50°C water bath에 20분간 반응시켰다. 반응 시킨 후 질소가스를 이용해 용매를 증발시킨 다음 증류수 500µl에 녹여준다. 이 solution은 ethyl acetate 1ml를 이용해 5번 추출한 다음 질소가스를 이용해 용매를 증발시킨다. 증발시키고 남은 물질을 70% aqueous methanol 500µl에 녹이고 LC-MS로 분석했다. LC-MS 분석 조건은 Table 4에 나타냈다.

Table 4. Conditions of phloroglucinol LC-MS for Fraction 5

Time	Solvent A (%)		Solvent B (%)	
	-Water containing 1% acetic acid		-Methanol	
0	95		5	
10	95		5	
30	80		20	
55	60		40	
55.1	10		90	
65	10		90	
70	95		5	

Detector: 280 nm, Flow meter: 1ml/min

6. procyanidin을 함유하는 제품과 활성 비교

1) 재료

NO	제조회사	Product name
1	TRUNATURE	Grape Seed with Whole Grape
2	GNC Herbal Plus	GRAPE SEED EXTRACT
3	The Vitamin Shoppe	Standardized Grape Seed 60mg
4	SOLGAR	GRAPE SEED EXTRACT 100mg
5	NATROL	Activin Grape Seed Extract 50mg
6	Nature's Plus	GRAPE SEED
7	NATROL	Grape Seed Extract 50mg
8	TwINLAB	Grape Seed EXTRACT

2) 방법

가. ARE-luciferase assay: 상동

나. Nrf2 expression : 상동

제 2 항 실험결과 및 고찰

1. 산머루 씨 및 발효박의 추출조건 확립

가 산머루 씨 및 발효박의 추출 및 분획

산머루(*Vitis amurensis*) 씨 및 발효박을 통풍이 잘 되는 곳에서 음건하여 분쇄기로 갈아 분말로 만들었다. 분말 500 g을 70% acetone에 24시간 동안 침지하는 과정을 3회 반복하여 추출하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 40°C에서 농축하여 70% acetone 추출물을 얻었다. 70% acetone 추출물을 물에 녹인 후 *n*-Hexane을 동량 첨가하여 분액깔때기에서 *n*-Hexane (0.8897 g) 가용성 분획물을 나누었으며, 물 층에 있는 분획물은 70% acetone 분획물이며, 두 층 사이의 불용성층을 interface 분획물로 나누었다.

나. 산머루 씨 70% acetone 분획물의 칼럼 크로마토그래피

산머루 씨의 70% acetone 추출물 20g과 5g 을 50% MeOH과 66% acetone, 100% acetone을 용매로 하여 각각 Toyopearl HW-40F (Tosoh, Tokyo, Japan) 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 6개와 13개의 subfraction을 각각 얻었다 (Scheme 1). 70% 아세톤 추출물의 칼럼 크로마토그래피는 일반적인 지름 3cm, 길이 30 cm의 칼럼과 지름 15cm, 길이 10cm의 칼럼 두 가지를 이용하였으며 이는 전통적인 분석을 위한 칼럼 크로마토그래피의 결과와 차후 대량추출시의 결과를 예측해 보기 위한 방편으로 수행되었다. 추출용매는 동일한 용매를 사용하였고 두 가지 방법으로 분리한 각 fraction에 대해 TLC 분석 및 항암활성을 비교 실험하였다.

2. 산머루의 항암효과 및 기작 연구

가. 산머루 추출물이 HepG2 cell line에서 항암효과 및 기작 규명 (*In vitro*)

1) 산머루 Extracts

가) 암세포 증식억제

산머루 씨의 EtOH extract를 비롯하여 산머루 발효박 70% acetone extract, 산머루 씨 ethanol extract, 산머루 씨 70% acetone fraction의 농도별 간암세포 증식억제 효과를 관찰한 결과를 Figure 1에 나타내었다. 산머루 씨 70% acetone fraction은 100 µg/ml의 농도 이상에서 암세포 증식억제 효과를 나타내었으며, 산머루 발효박 70% acetone 추출물의 경우는 25~300 µg/ml 농도에서 농도의존적인 증식억제효과를 나타내었다.

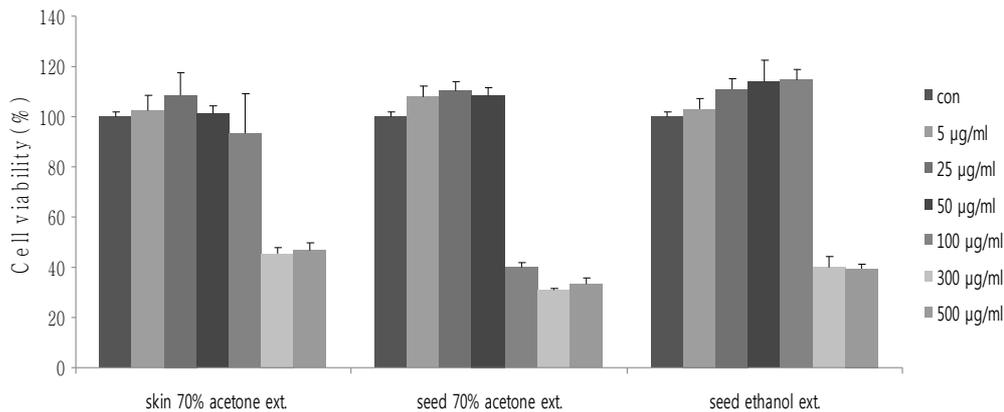


Figure 1. Effects of *Vitis amurensis* extracts on cell viability of HepG2 human hepatoma cells in the MTS assay.

나) ARE-luciferase activity assay

산머루 추출 분획이 antioxidant response element (ARE) gene의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 HepG2 cell에 pARE-TI-luciferase reporter gene을 transfection 시켜 stably transfected cell line (HepG2-ARE-C8)을 얻은 뒤 6-well plate에 24시간 배양하고 serum-free media로 overnight starvation 시킨 후 여러 농도의 산머루 추출물을 처리하여 12 시간 경과 후 추출물의 ARE-luciferase activity에 미치는 효과를 관찰하였다. 산머루에서 추출한 산머루 발효박, 산머루 씨 70% Acetone, 산머루 씨 EtOH 각 fraction을 25, 50, 100 μ g/ml로 처리한 후 ARE의 반응성을 luciferase activity로 측정한 결과 모든 fraction에서 ARE의 반응성을 보였으며, 특히 고농도 처리에서 높은 반응성을 보였고, 이러한 반응성은 농도 의존적으로 증가되는 것으로 나타났다 (Fig. 2).

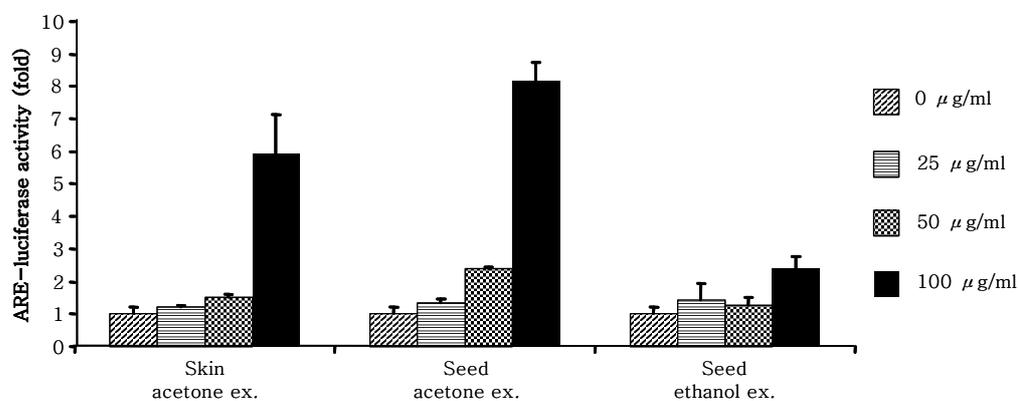


Figure 2. ARE-luciferase activity by *Vitis amurensis* (산머루) extracts in HepG2-ARE-C8 cells. HepG2-C8 cells stably transfected with pARE-TI-luciferase reporter gene were treated with vehicle (DMSO, 0.1%) or each extract for 12 hours. Luciferase activity was normalized with protein content and expressed as fold induction against vehicle-treated control. Values are means of two to four independent experiments \pm SD.

다) Nrf2 발현

ARE gene에 binding하여 ARE를 함유한 phase II detoxifying enzymes 및 antioxidant enzymes의 발현을 직접적으로 유도하는 것으로 알려진 전사인자 (transcription factor) nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)에 대한 산머루 추출물의 영향을 조사하였다. HepG2 cells에 산머루 추출물을 농도 별로 처리한 뒤 일정 시간 후 세포를 수확하여 whole cell lysate를 얻은 다음 Nrf2 expression level을 Western blotting 기법을 이용하여 측정하였다.

산머루 발효박, 머루 씨 70% Acetone, 머루 씨 EtOH extract를 50, 300 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 2 hr, 6 hr, 24 hr 동안 처리한 결과 처리한 모든 fraction에서 Nrf2의 단백질 발현 유도를 나타냈으며, 특히 6 h에서는 산머루 씨 70% acetone extract에서 Nrf2 protein expression이 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 증가하는 것으로 나타났다. (Fig. 3)

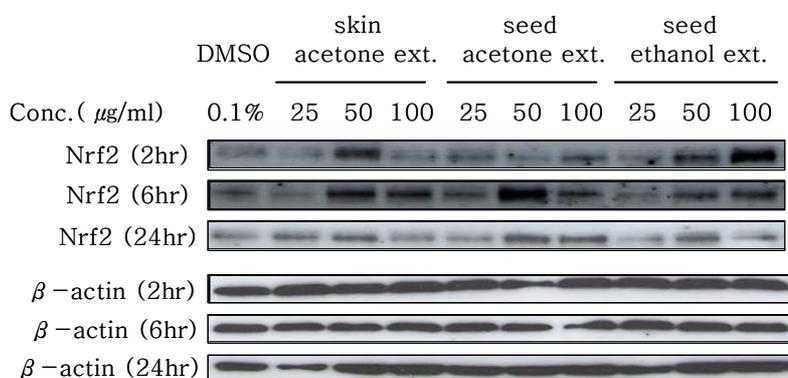


Figure 3. Nrf2 protein expression by *Vitis amurensis* extracts in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with vehicle (DMSO, 0.1%) or different concentrations of extracts and then equal amount of proteins from whole cell lysates were analyzed by Western blotting.

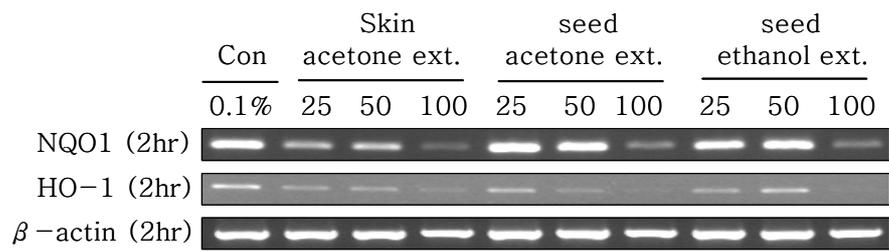


Figure 4. Effect of wild grape extracts on NQO1, HO-1 mRNA gene expression in HepG2 cells.

2) 산머루 씨 70% acetone seed Toyopearl column fraction

가) 암세포 증식억제

70% acetone fr.의 toyopearl 칼럼 크로마토그래피를 통해 얻은 subfraction의 간암세포 증식억제 효과는 Figure 2와 3에 각각 나타내었다. 66% acetone에서 용출된 fraction인 5g-10과 5g-11, 20g-5 fr.에서는 5 μ g/ml 농도에서부터 세포 증식억제효과를 나타내었으며 50 μ g/ml 이상의 농도에서는 50~60%의 cell viability를 보이고 있다. 또한 Fr. 5g-1,2,4 (Fig. 5)과 Fr. 20g-3 (Fig. 6)을 제외한 모든 subfraction에서 농도의존적인 세포증식억제를 보이고 있다.

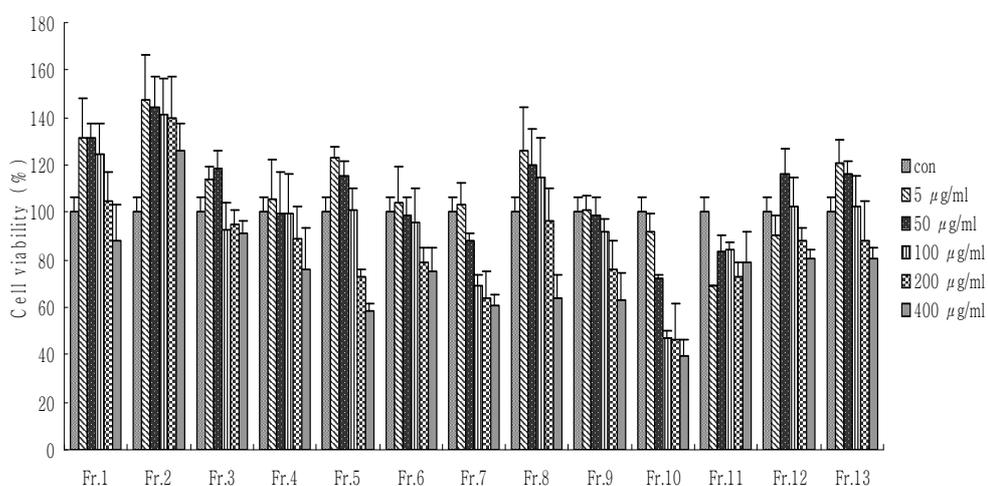


Figure 5. Effects of wild grape 70% Acetone 5g-fraction on cell viability of HepG2 human hepatoma cells in the MTS assay.

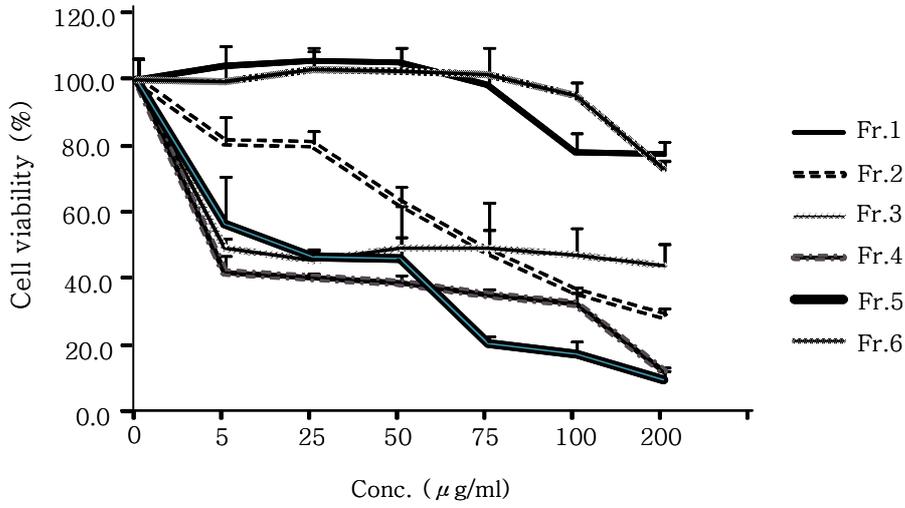


Figure 6. Effects of *Vitis amurensis* (산머루) 70% Acetone 20g-fraction on cell viability of HepG2 human hepatoma cells in the MTS assay.

나) ARE-luciferase activity

산머루 씨 70% Acetone에서 추출한 13 종의 sub-fraction 5g과 20g에 대한 ARE 반응성 유도능을 조사한 결과 대부분의 fraction에서 ARE 에 대한 반응성을 나타냈으며 특히 5g에서는 9,10,11에서 2배 이상의 ARE 반응성 유도를 관찰할 수 있었다(Fig. 7). 20g에서는 5에서 2배 이상의 ARE 반응성 유도를 관찰할 수 있었다 (Fig. 8).

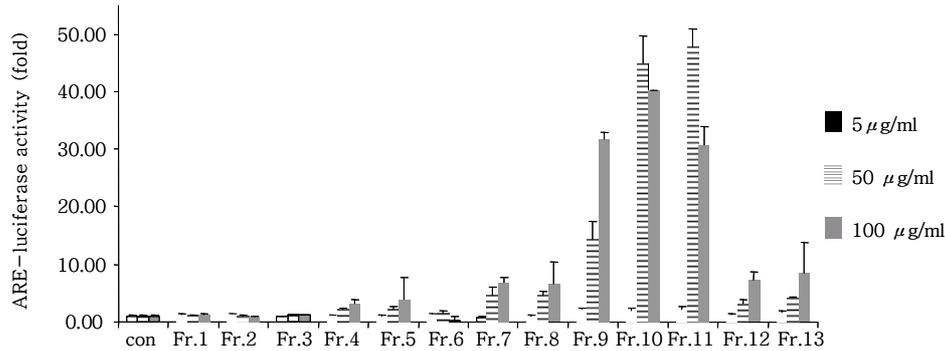


Figure 7. ARE-luciferase activity by *Vitis amurensis* 70% Acetone 5g toyopearl fraction in HepG2-ARE-C8 cells. HepG2-C8 cells stably transfected with pARE-TI-luciferase reporter gene were treated with vehicle (DMSO, 0.1%) or each extract for 12 hours. Luciferase activity was normalized with protein content and expressed as fold induction against vehicle-treated control. Values are means of two to four independent experiments±SD.

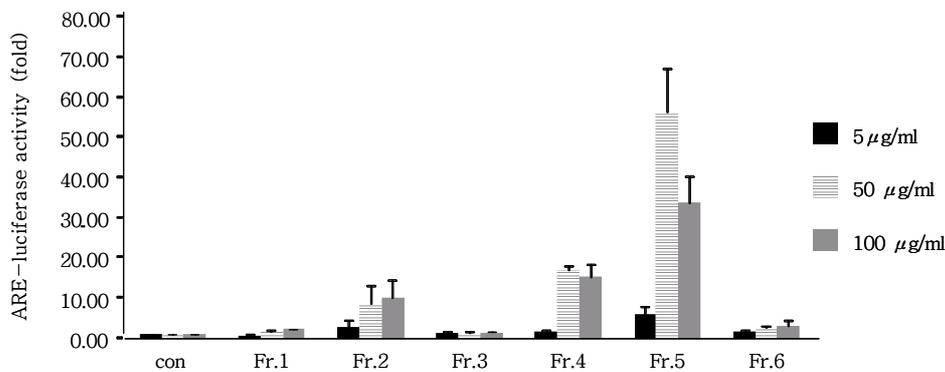


Figure 8. ARE-luciferase activity by *Vitis amurensis* (산머루)씨 70% Acetone 20g toyopearl fraction in HepG2-ARE-C8 cells.

다) Nrf2 발현

Nrf2는 ARE가 활성화되는데 transcriptional activator로 작용한다. 일반적으로, Nrf2는 cytosol 구획에서는 Keap1과 결합하고 있으나, inducer에 의해 Nrf2가 Keap1과 분리되면 Nrf2가 핵 내로 유입되고 이러한 Nrf2는 ARE promotor와 결합하여 phase 2 detoxifying/antioxidant 효소의 발현을 유도하는 것으로 보고되고 있다. 산머루 씨 70% acetone 추출물의 toyopearl column fraction에 대해 Nrf2 단백질 발현 유도활성을 조사한 결과 6시간 처리 시 procyanidin이 주로 함유되어 있는 fractions 9, 10, 11 (Fig 9) 과 fraction 5 (Fig 10)와 같은 66% 아세트톤 fraction에서 가장 강한 유도활성이 나타났다. 또한 산머루 씨 fraction이 Nrf2의 핵 내로의 유입을 유도하는지를 조사한 결과, Fig 11과 같이 F5에서 Nrf2의 핵내로의 유입을 증가시켰다. 이 fraction들의 Nrf2 유도활성은 가장 강력한 Nrf2 inducer인 sulforaphane과 유사한 정도이며, 따라서 세포방어기전을 활성화시키는 우수한 천연항암제로서의 역할이 기대된다.

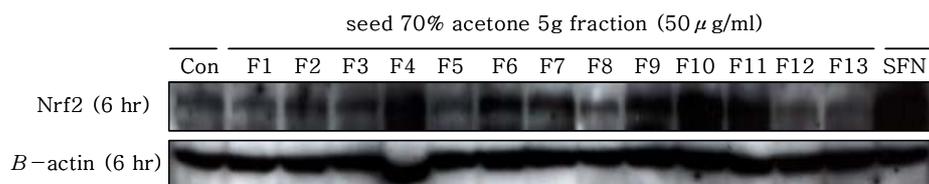


Figure 9. Nrf2 protein expression after 6 h treatments of *Vitis amurens* Toyopearl column fractions(5g loading) in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with vehicle (DMSO, 0.1%) or fractions (25ug/ml) and then equal amount of proteins from whole cell lysates were analyzed by Western blotting.

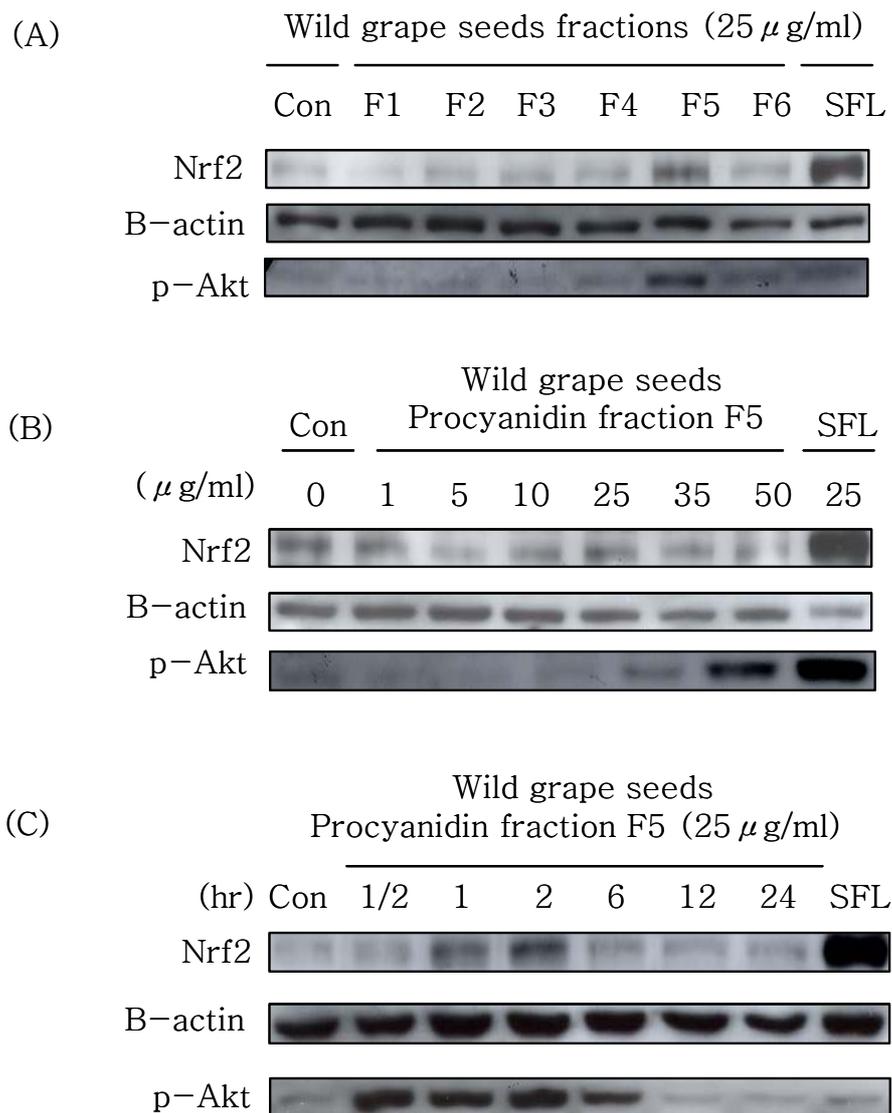


Figure 10. Nrf2, p-Akt protein expression (A) 6 h treatments of *Vitis amurensis* Toyopearl column fractions(5g loading) (B) 6 h treatments of F5 dose-dependent (C) F5 time-dependent in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with vehicle (DMSO, 0.1%) or fractions and then equal amount of proteins from whole cell lysates were analyzed by Western blotting.

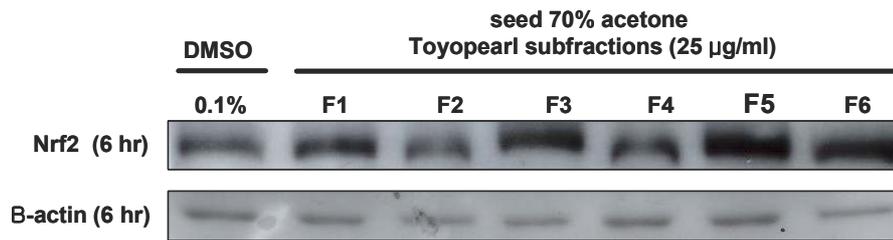


Figure 11. Effect of *Vitis amurensis* 70% acetone Toyopearl subfractions on nuclear translocation in HepG2 cells. Nuclear translocation of Nrf2 by *Vitis amurensis* was determined by western blot.

라) Phase 2 detoxifying/ antioxidant enzyme expression

산머루 procyanidin의 Phase 2 detoxifying/ antioxidant enzyme 발현을 조사한 결과, F5는 NQO1 protein 발현을 증가시켰으나 HO-1에서는 유의적 차이를 볼 수 없었다. 하지만 mRNA 발현에서 F5의 HO-1과 NQO1의 높은 발현을 볼 수 있었다.

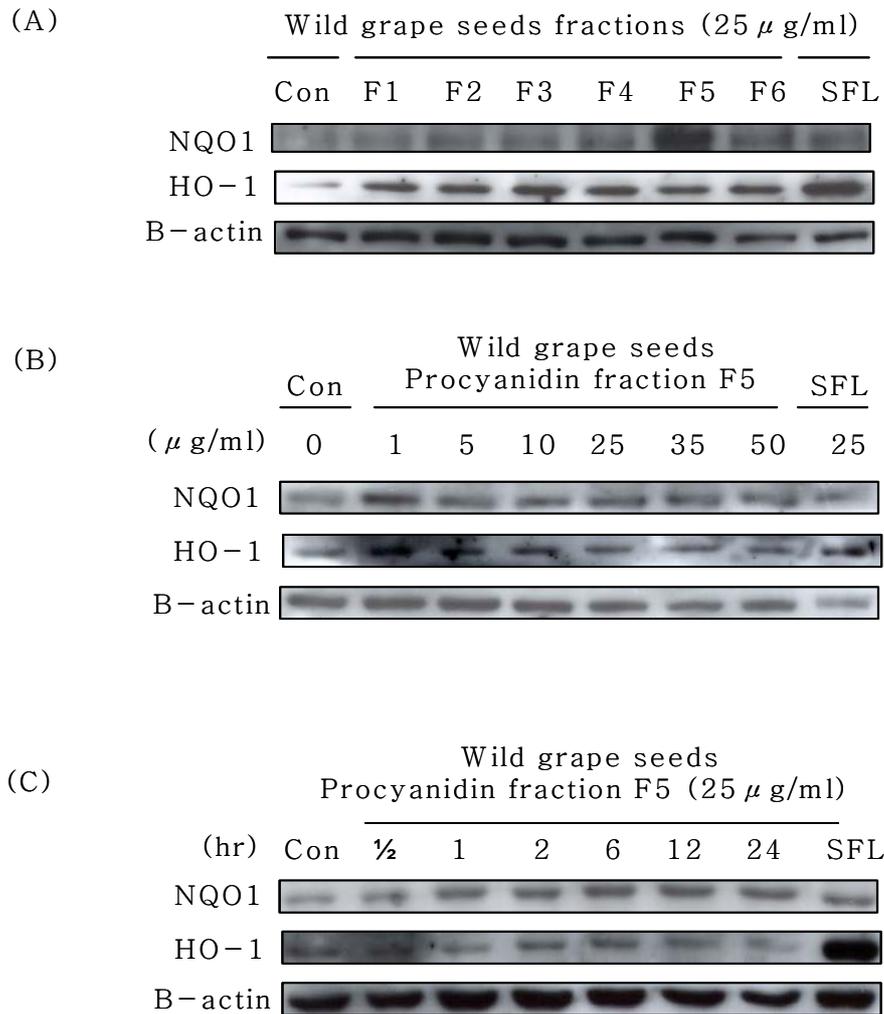


Figure 12 .Wild grape seeds induced HO-1 and NQO1 protein expression in HepG2 cells. Protein expression was detected by western blot. (A) HepG2 cells were exposed to the 25 μ g/ml of wild grape seeds column fractions (F1~F6) for 6 hr. (B) To test the dose-response, the cells were exposed to the indicated concentration of wild grape procyanidins fraction for 6 hr. (C) To investigate the time course, the cells were exposed to 25 μ g/ml of wild grape procyanidins fraction for 30 min ~ 24 hr

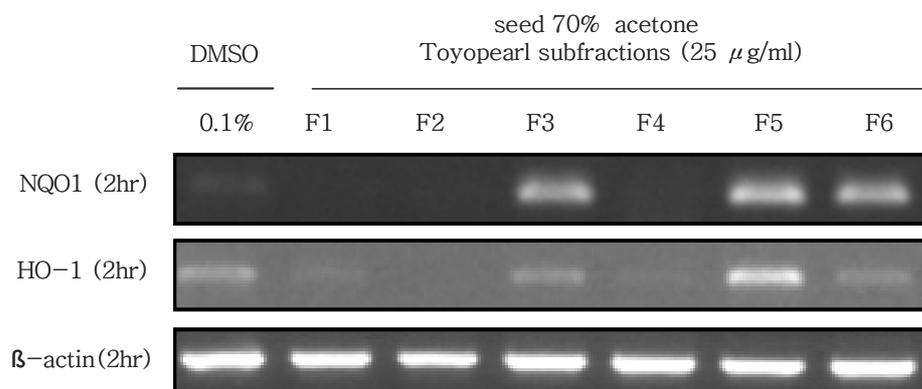


Figure 13. Effect of wild grape seed column fractions on NQO1, HO-1 mRNA gene expression in HepG2 cell for 2 hr.

마) Up-stream signaling pathway

Nrf2와 phase 2 detoxifying/antioxidant enzyme의 상위신호전달인 MAPKs인 p-ERK, p-JNK, p-p38의 발현을 확인 한 결과, fraction 중 F5에서 MAPKs 발현을 유도했으며 F5는 농도의존적으로 MAPKs 발현이 증가함을 볼 수 있었다. 따라서 상위신호경로인 MAPKs에 의해 Nrf2, HO-1과 NQO1이 조절될 수 있는 것으로 추측된다.

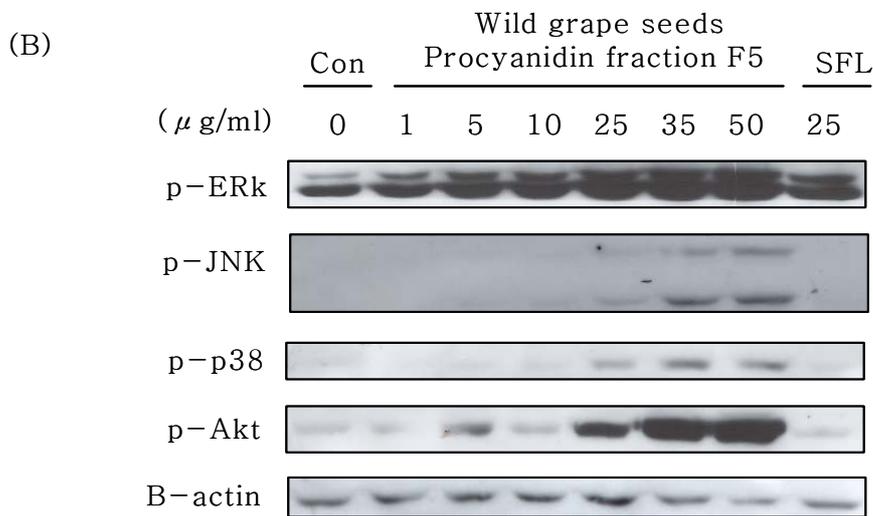
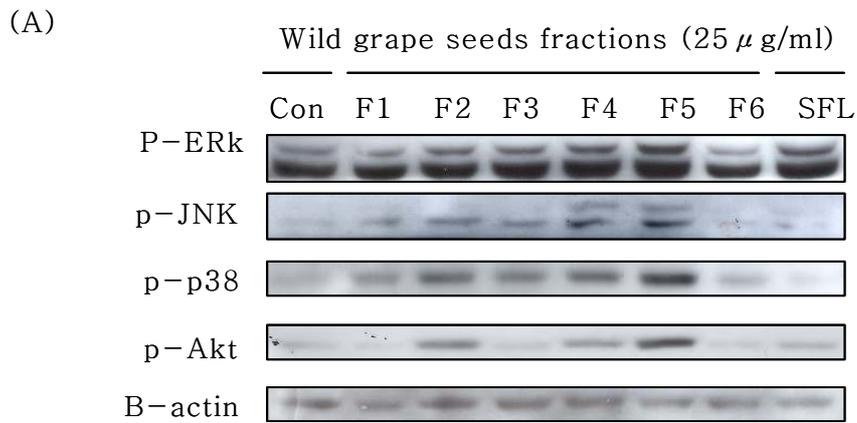


Figure 14. Phosphorylation of MAPKs (A) wild grape seeds column fractions (B) dose-dependent effects of procyanidins fraction.

바) 산머루 procyanidin에 의해 유도되는 단백질들의 신호전달 경로 규명

F5에 의한 HO-1과 Nrf2의 발현이 PI3K inhibitor인 LY294002에 의해 억제됨을 보였다 (Fig. 15). 이는 HO-1과 Nrf2의 발현이 Akt/PI3K pathway를 통해 조절됨을 의미한다. 한편, F5에 의한 HO-1과 Nrf2이 발현 증가가 MEK 1/2 inhibitor에서는 억제되지 않는 것으로 나타나 HO-1과 Nrf2의 발현이 ERK/MEK1/2 pathway에 의해서는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 15).

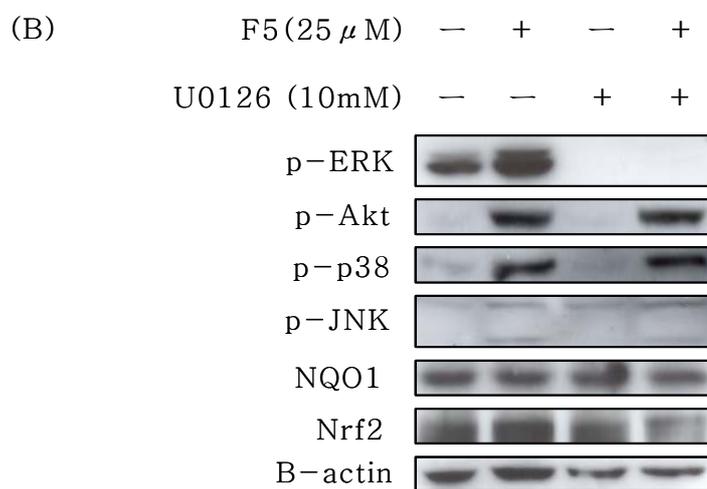
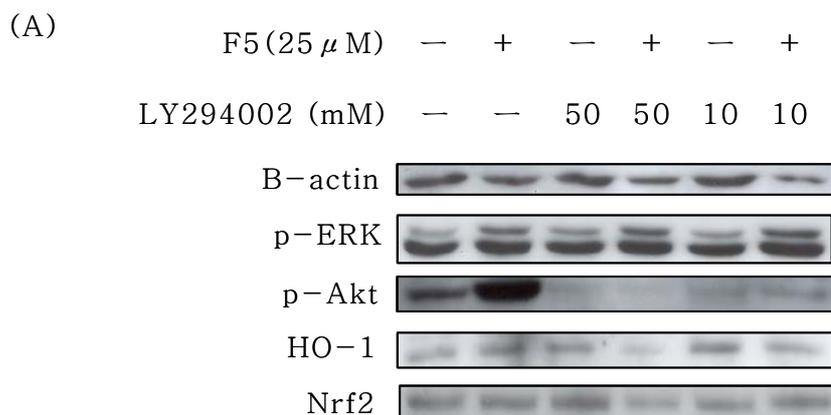


Figure 15. Effects of the MAPK inhibitors (A) LY294002 (PI3 kinase inhibitor) (B) U0126 (MEK1/2 inhibitor) induced wild grape procyanidins fractions on HepG2 cells. LY294002 and U0126 were added as 1hr pre-treatment at the indicated concentrations. Cells were then treated with 25 μ g/ml of wild grape for 6 hr and examined by western blot.

나. 동물모델 활성 및 작용기작

Balb/c mice에서 oral gavage를 통해 산머루 70% acetone 추출물과 procyanidin fraction (F5)을 50/200 mg/kg 농도로 투여했다. 그 결과, Nrf2, NQO1, HO-1, p-Akt의 target에서 control group보다 높은 발현을 볼 수 있었다. 특히, 저농도인 50 mg/kg에서 두 그룹 모두 고농도 보다 높은 발현을 볼 수 있었다.

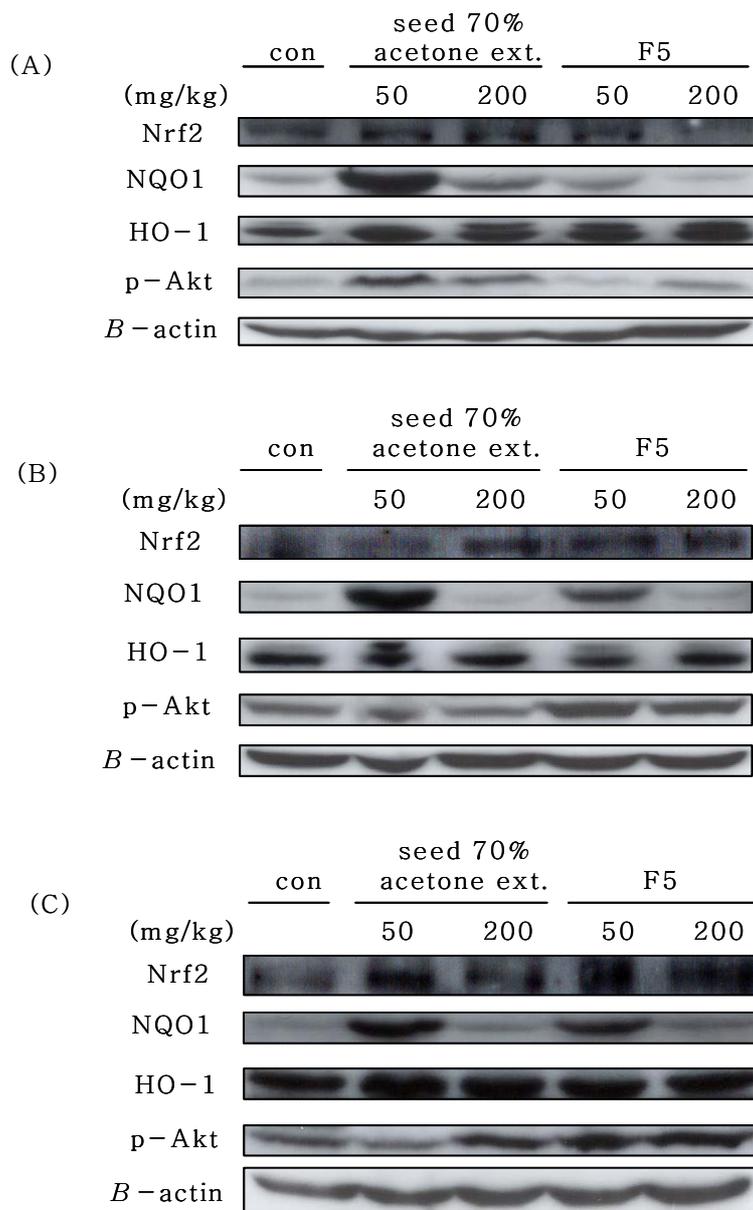


Figure 16. Effect of wild grape seed extract and procyanidin fraction on Nrf2, NQO1, HO-1 and β -actin protein expression in Balb/c mice for 3 weeks.

3. 산머루의 항염증 효과 및 기작연구

본 연구는 당초 연구계획에 포함되지 않았던 내용이나 재료의 활성이 우수하여 추가적으로 연구한 결과임

가. Nitric Oxide (NO) 생성 억제

LPS로 산화적 스트레스를 유발시킨 RAW 264.7 cell에서 산머루 씨 Fraction 5가 NO 생성에 미치는 영향을 확인한 결과 산화적 스트레스 유발 상황에서 F5는 NO 생성을 농도 의존적으로 억제하였다 (Fig. 17).

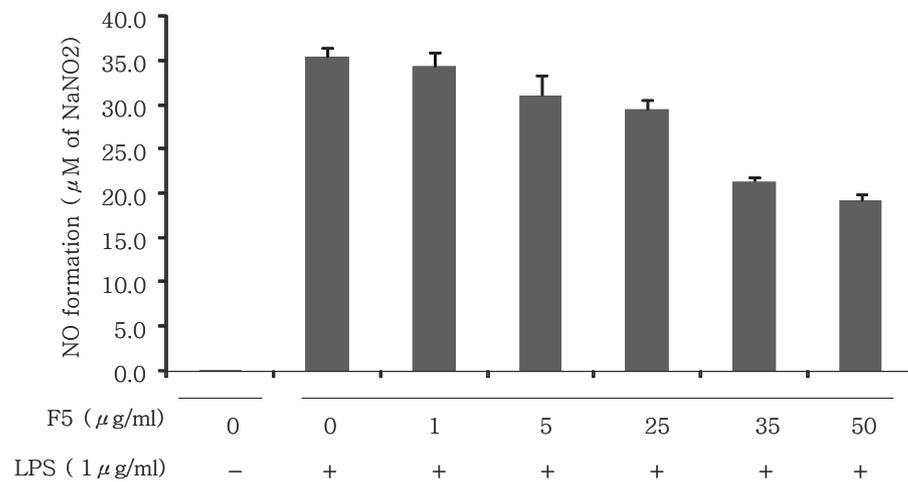


Figure 17. Effect of procyanidin on LPS-induced nitric oxide formation. RAW 264.7 cells were treated with various doses of wild grape seeds procyanidin fraction for 1 hr and then treated with LPS ($1\ \mu\text{g/ml}$) for 6 hr more.

나. ROS 생성 억제

Hydrogen Peroxide (H₂O₂)로 유발시킨 HepG2에서 산머루 씨 column fractions 이 ROS 생성에 미치는 영향을 확인한 결과 F1, F2, F4, F5에서 ROS 생성 억제효과를 보였으며 (Fig. 18) F5는 ROS 생성을 농도 의존적으로 억제함을 볼 수 있었다.

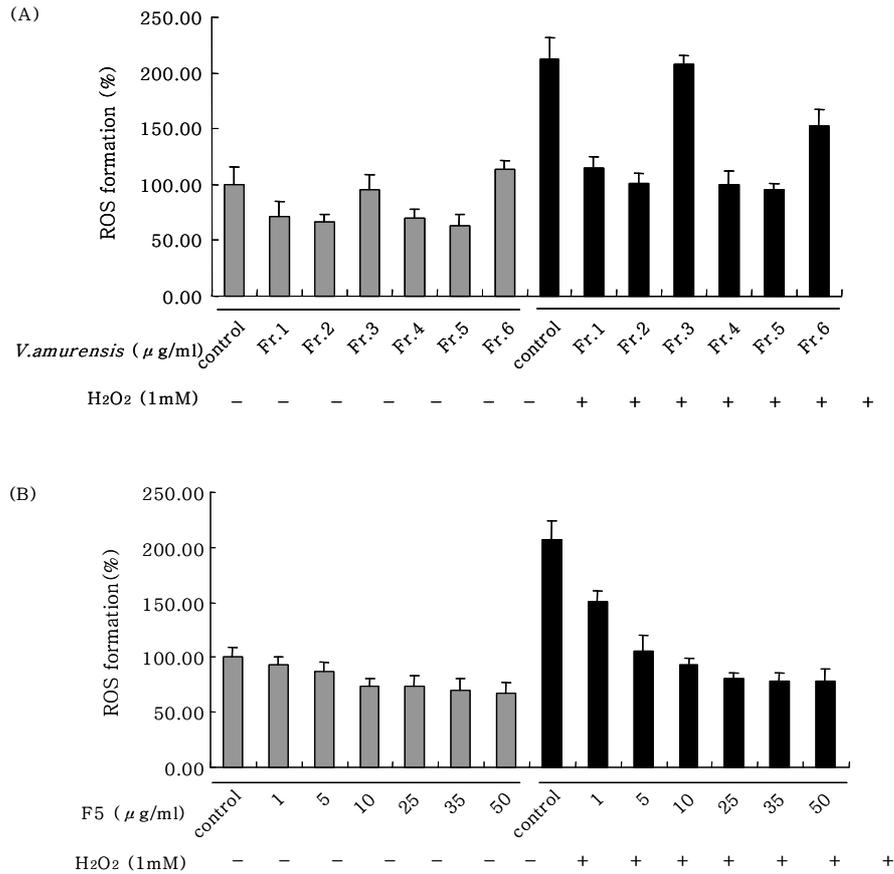


Figure 18. Effect of (A) wild grape seed column fractions (B) wild grape procyanidin fraction on H₂O₂-induced reaction oxide species(ROS) formation. HepG2 cells were treated with wild grape seeds for 1 hr and then treated with H₂O₂ (1mM) for 12 hr.

다. iNOS, COX-2 expression

LPS로 산화적 스트레스를 유발시킨 RAW 264.7 cell에서 산머루 씨 Fraction 5을 처리했을 때 LPS에 의해 증가된 염증유발효소인 iNOS와 COX-2 protein 발현을 저해하였고, 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다. (Fig. 19)

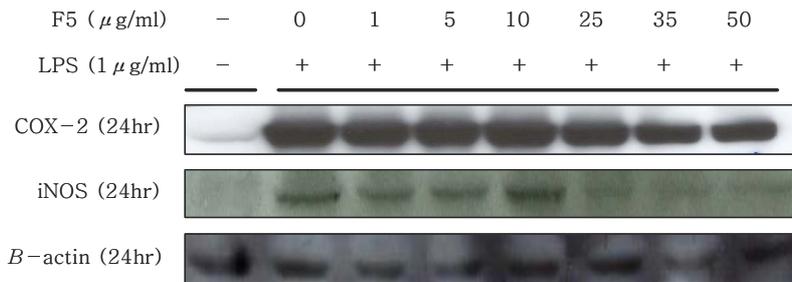


Figure 19. Effect of procyanidin on LPS-induced expression of iNOS, COX-2 and HO-1. Cells were treated with LPS ($1\ \mu\text{g/ml}$) alone (positive control) or LPS with various concentrations of wild grape seeds procyanidin fraction for 24 hr. Equal amount of proteins from whole cell lysates were analyzed for COX-2, iNOS and HO-1 proteins as a normalization control by Western blot. The data shown are representative of three independent experiments with similar results.

4. 항산화 효과

가. DPPH radical 소거 활성

산머루 씨의 EtOH extract를 비롯하여 산머루 발효박 70% acetone extract, 산머루 씨 70% acetone 추출물의 항산화 능력을 측정하였다. 이들은 조추출물 수준에서도 양성 대조군인 Vitamin C의 효과에 근접하는 DPPH 소거능력을 나타내었다 (Fig. 20). Column chromatography를 통해 얻은 획분의 DPPH 라디칼 소거 활성을 알아 본 결과는 Fig. 21와 같다. 70% acetone fr.의 Toyopearl 칼럼 크로마토그래피를 통해 얻은 subfraction의 DPPH radical 소거능력은 20g-3 fr.과 5g-1 fr.을 제외하고 뛰어난 항산화력을 가짐을 볼 수 있었다. 특히 66% acetone 으로 용출된 fraction인 20g-5 fr.과 5g-9~11 fr.에서는 양성대조군인 vitamin C 보다 뛰어난 활성을 보였으며 (Fig. 21), 이는 procyanidins에 기인한 radical 소거 활성으로 생각된다. 또한 5g-6 fr.과 5g-7 fr.에서도 높은 활성을 나타내고 있는데 이는 condensed tannin의 단량체인 catechin과 기타 flavonoids에 기인한 활성으로 생각된다.

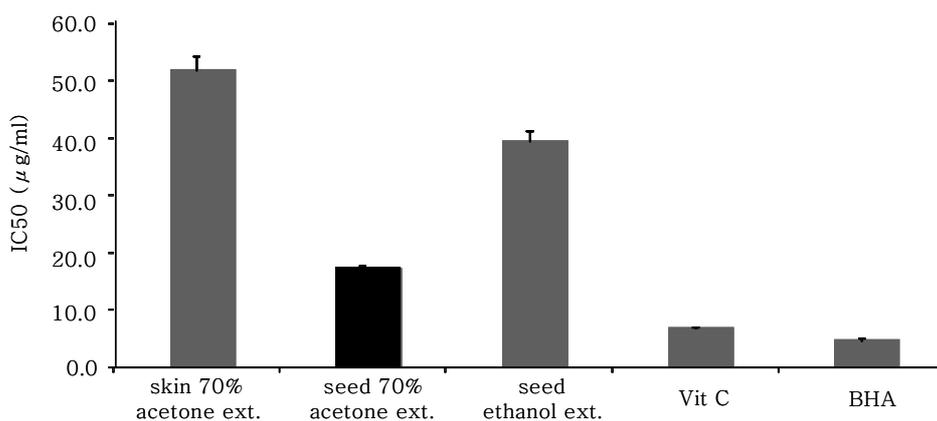


Figure 20. Antioxidant activity of wild grape extracts. Several tannins were incubated with DPPH solution for 30 min at room temperature. Each value is the mean±SD (n=4)

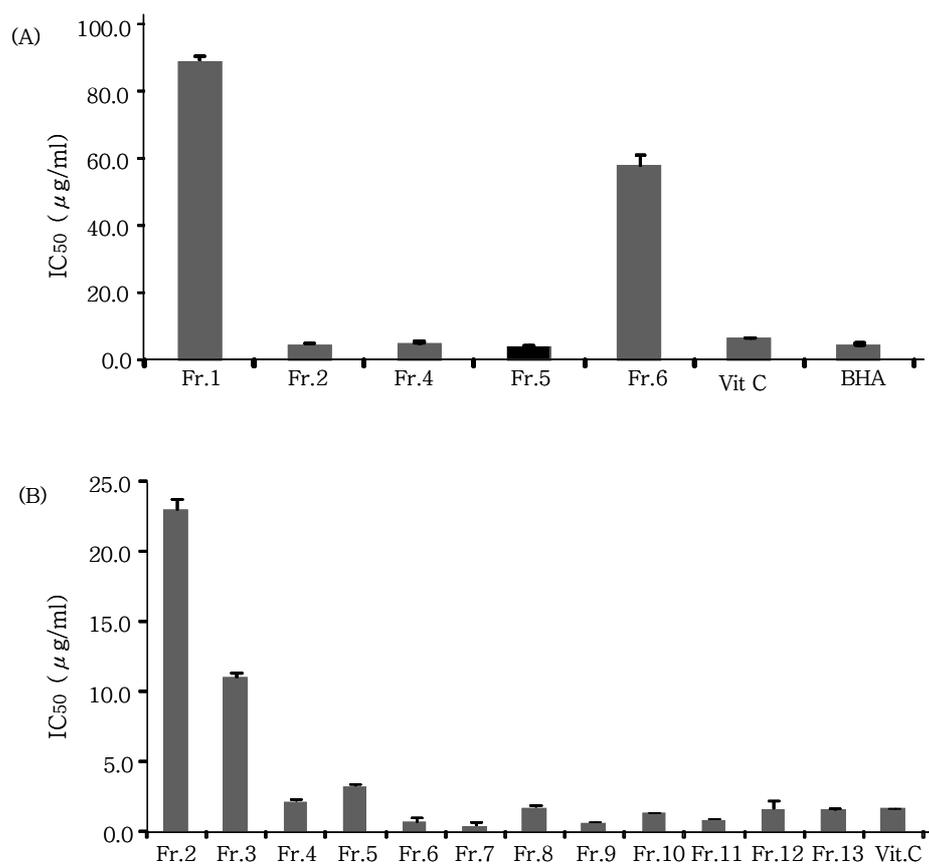


Figure 21. Antioxidant activity of (A) wild grape seed column fractions (20g) (B) wild grape seeds column fractions (5g). Several tannins were incubated with DPPH solution for 30 min at room temperature. Each value is the mean \pm SD (n=4)

5. 산머루 procyanidin의 구조 분석

가. F4의 flavan-3-ol monomers 확인

항산화효과와 ARE활성이 높게 나온 F4가 함유하는 물질을 알아보기 위해 HPLC로 분석한 결과 표준물질인 catechin과 epicatechin의 peak와 같았다. F4로부터 분리된 procyanidin의 monomeric unit는 catechin과 epicatechin으로 procyanidin을 얻기 위한 fractionation이 잘 되었다고 보인다.

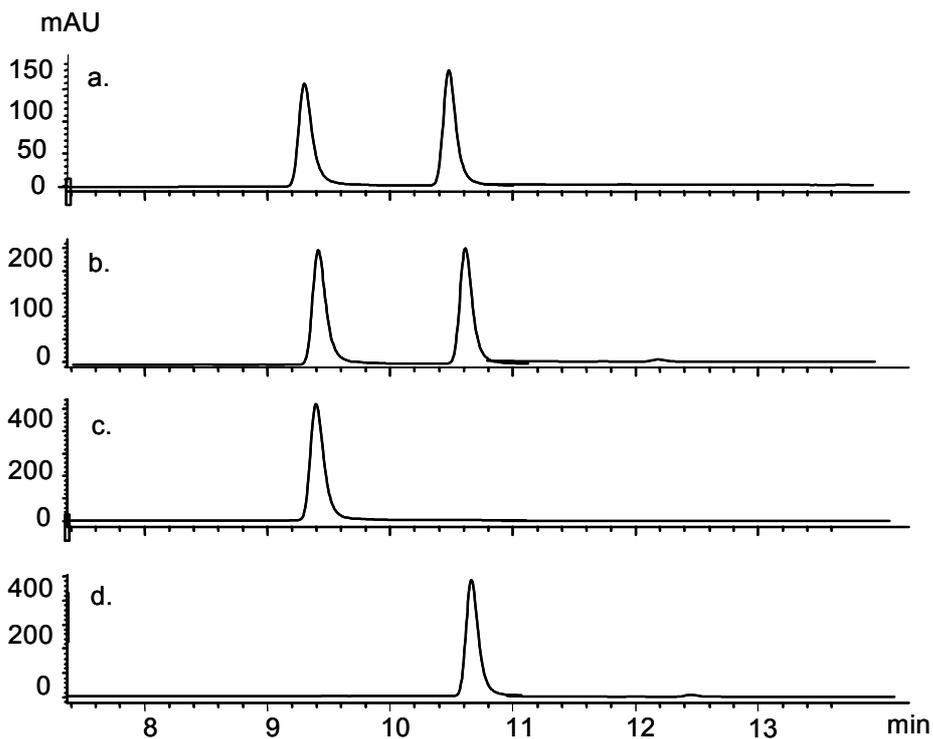


Figure 22. HPLC chromatograms detected by UV at 280nm of monomeric units isolated from wild grape seeds eluted from the Sephadex LH-20 column - (A) monomeric units of procyanidins from wild grape; (B) standard mixture of catechin and epicatechin; (C) catechin; (D) epicatechin.

나. 산머루 procyanidin의 존재확인

1) 산머루 추출물

Vanillin assay와 BuOH-HCl assay는 procyanidin을 빠르게 정량하기 위해 가장 일반적으로 사용되는 방법이다. 즉, vanillin assay는 catechin, epicatechin 등과 같은 terminal unit을 BuOH-HCl assay는 interflavan unit를 측정하는 방법이다. 산머루 추출물의 procyanidin을 함량을 측정한 결과는 Fig. 23 와 같다. 산머루 씨 70% acetone 추출물에서 많은 procyanidin이 존재함을 확인 하였다.

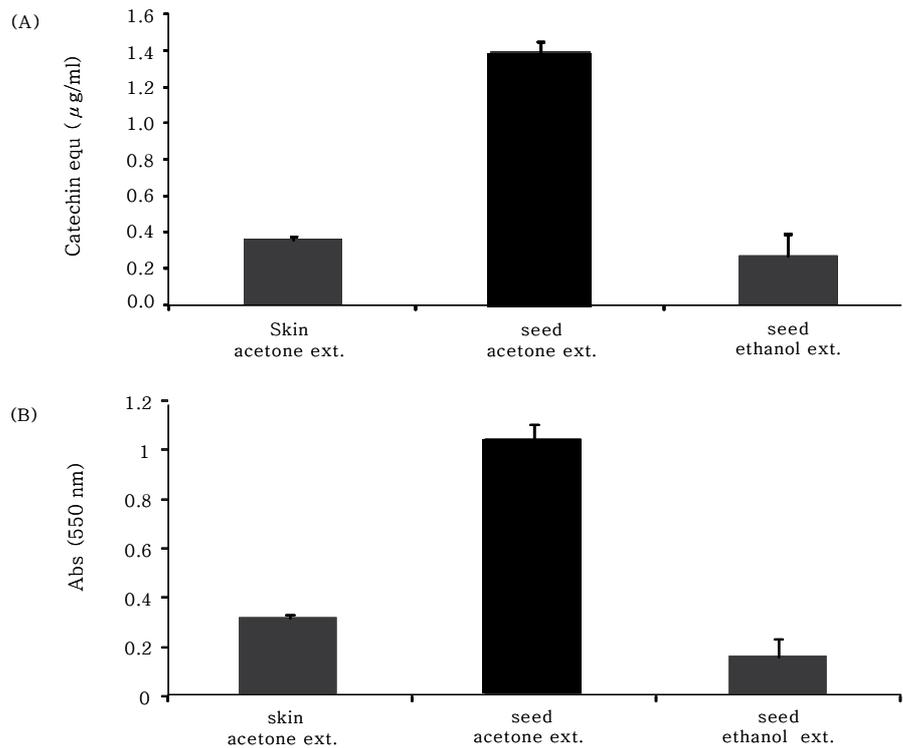


Figure 23. Determination of procyanidins from wild grape extracts (a) presence of terminal units (b) presence of interflavan units obtained from the H₂SO₄ assay and the BuOH-HCl assay.

2) 산머루 씨 column subfractions

산머루 씨 column subfraction (F1~F6)의 procyanidin을 함량을 측정한 결과는 Fig. 24와 같다. 산머루 씨 fractions 중 F5에서 많은 procyanidin이 존재함을 확인 할 수 있었다.

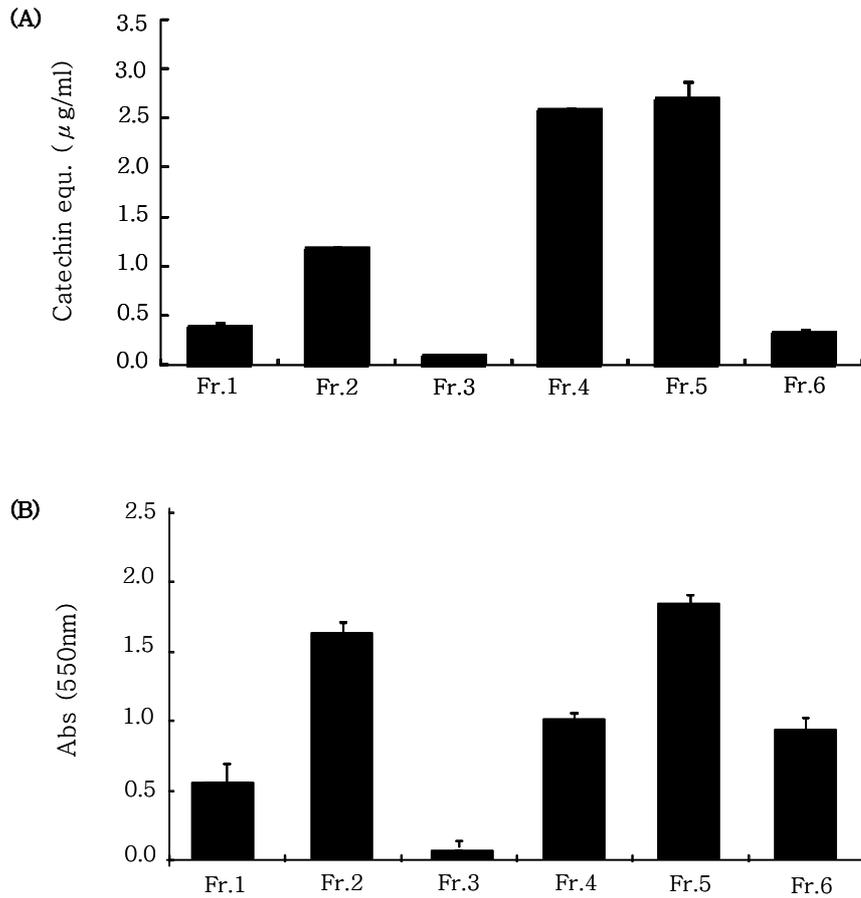


Figure 24. Determination of procyanidins from wild grape extracts (A) presence of terminal units (B) presence of interflavan units obtained from the H_2SO_4 assay and the BuOH-HCl assay.

3) Procyanidins fraction (F5) 분석

Procyanidin fraction인 F5에서 procyanidin(condensed tannin)의 존재를 알아보기 위해 Phloroglucinol과 반응시킨 후 HPLC로 분석하였다. Acidic condition에서 phloroglucinol과 반응하면 procyanidin은 interflavan bond는 깨어지고 phloroglucinol adduct를 만든다는 이론에 근거하여 실험하였다. F5는 polymeric procyanidin이기 때문에 개별 peak가 나오지 않았고 (fig. 25(A)) interflavan bond를 깨기 위해 phloroglucinol과 반응시켰다. Fig. 25(B)는 phloroglucinol을 반응 시킨 F5에 대한 HPLC 크로마토그램으로 Catechin-phloroglucinol adduct, catechin, catechin gallate-phloroglucinol adduct, epicatechin, epicatechin gallate를 확인할 수 있었다.

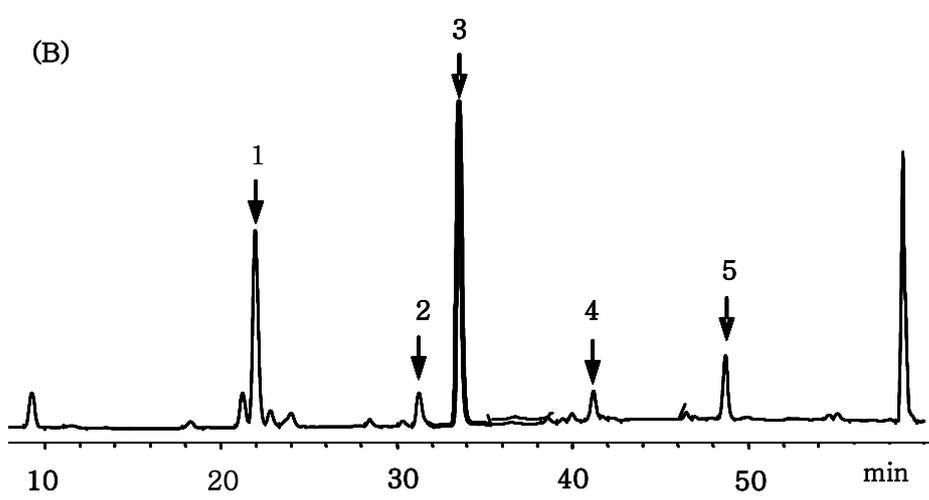


Figure 25. HPLC chromatograms measured with a UV detector at 280nm of (A) procyanidin fractions from wild grape seeds (B) procyanidin fractions after phloroglucinol reaction (1) catechin–phloroglucinol adduct; (2) catechin; (3) catechin gallate–phloroglucinol adduct; (4) epicatechin; (5) epicatechin gallate.

6. Procyanidin을 함유하는 국외제품과 활성 비교

가. ARE-luciferase activity

제품화된 8개의 procyanidin관련 제품과 ARE-luciferase 활성을 비교해 본 결과 procyanidin fraction (F5)는 제품 중 가장 높은 활성을 보인 No.8 (Grape Seed EXTRACT, TwiNLAB사)와 비교해 보았을 때 95%이상의 유사활성을 확인하였다 (Fig. 26).

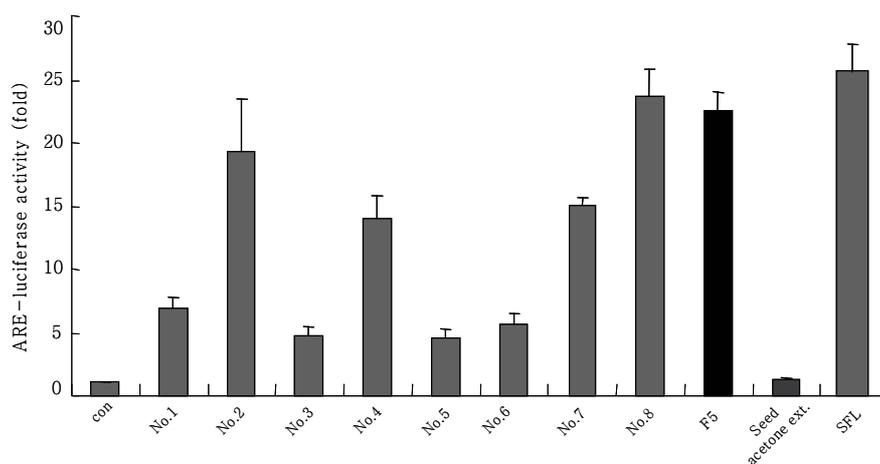


Figure 26. Comparison of ARE-luciferase activity between wild grape seed procyanidin fraction (F5) and foreign grape seed products.

나. Western blot analysis

제품화된 8개의 국외 procyanidin 관련 제품과 Nrf2 protein 발현을 비교해 본 결과 procyanidin fraction (F5)와 No.2, No.6, No.7, No.8가 대조군에 비해 Nrf2의 높은 발현을 보였다 (Fig. 27).

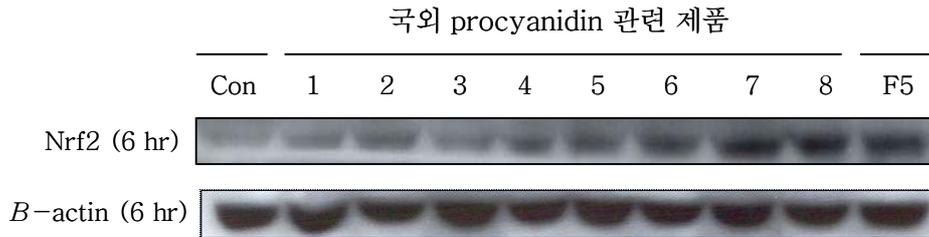


Figure 27. Comparison of ability to induce Nrf2 expression between wild grape seed procyanidin fraction (F5) and foreign grape seed products.

다. 본 과제 개발제품의 활성

본 과제의 협동연구자가 개발한 7개의 산머루 씨 procyanidin 제품과 분리한 procyanidin fraction (F5)와의 ARE-luciferase 활성 유도능력을 비교해 본 결과 sample B의 활성이 procyanidin fraction (F5)의 70% 정도에 해당하는 활성을 나타내었다 (Fig. 26). 이러한 결과는 F5의 경우 초기 추출용매가 procyanidin의 최적 추출용매인 70% 아세톤인데 반해 개발제품의 추출에 사용한 용매가 우리나라 기능성식품 제조에 허가된 용매 중 하나인 에탄올을 사용하였기 때문에 procyanidin의 추출수율이 다소 저하되었기 때문으로 판단된다.

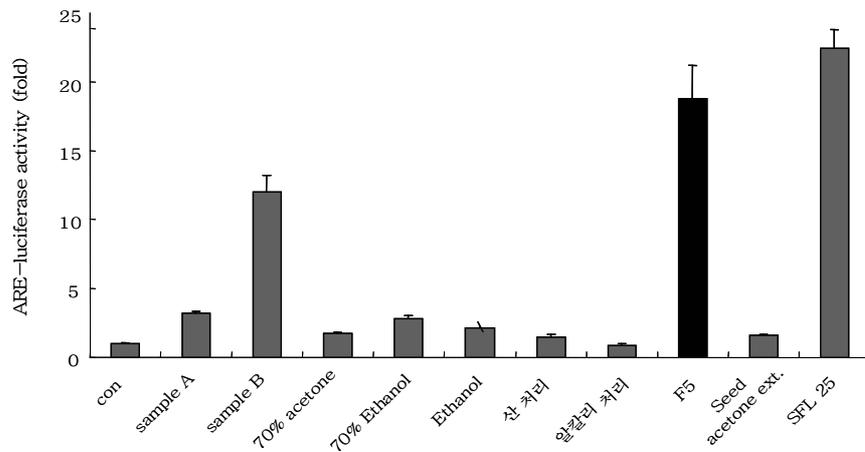


Figure 28. Comparison of ARE-luciferase activity between wild grape seed procyanidin fraction (F5) and wild grape seed products.

제 3 절 (제3세부과제) 산머루를 이용한 기능성제품개발

제 1 협동과제 연구기관	한 국 식 품 연 구 원
연구 과제명	산머루를 이용한 기능성제품 개발
연구책임자	김 영 찬

제 1 항 재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 산머루 발효박은 산머루 와인 제조업체인 두레마을(경남 함안)에서 산머루 제조후 발생한 발효박을 사용하였다. 산머루 발효박은 50℃ 열풍 건조기를 이용하여 수분함량이 10% 이하까지 건조한 후 roll mill을 이용하여 분쇄한 후 4℃에서 보관하면서 추출용 시료로 사용하였다.

2. 용매추출

건조된 산머루 분쇄물 일정량에 20배의 n-hexane을 가하여 24시간 추출여과하여 탈지시킨 후 잔사를 상온에서 건조한 후 각 용매별 추출 시료로 사용하였다. 추출용매는 에탄올, 70% 에탄올, 70% 아세톤을 사용하여 시료 대비 10배의 용매를 가하여 상온에서 4시간 동안 200 rpm의 속도로 진탕하여 2회 반복 추출하였다. 가수분해는 2 N HCl 4 N NaOH를 사용하여 각각 4시간과 12시간을 진탕 추출하였다. 조추출물은 rotary vacuum evaporator(Rotavapor, Büchi, Germany)로 감압 농축한 후 시료 일정량을 취하여 105℃ 상압건조법으로 수율을 구하였다.

3. 흡착제를 이용한 procyanidin의 농축

산머루 procyanidin의 비용, 고효율적인 분리 방법을 찾기 위하여 활성탄, 활성백토, 산성백토를 이용한 흡착 및 탈착시험을 수행하였다. 9.5 °Bx로 조정된 산머루 조추출물에 각 흡착제를 1%, 5%, 10% 처리하여 2시간 동안 shaking 시킨 후

여과하여 여액과 잔사를 얻었다. 잔사는 70% 에탄올을 가하여 shaking 시킨 후 여과하여 여액의 수율과 procyanidin의 함량을 측정하였다.

4. C₁₈ cartridge를 이용한 분리

산머루 조추출물(9.5 °Bx)을 C₁₈ cartridge(1,000 mg)를 이용하여 각각 1, 5, 10, 20 mL을 이용하여 흡착시킨 후 물로 세척한 후 각 첨가량의 2배의 70% 에탄올을 가하여 용출시킨 후 수율과 procyanidin의 함량을 측정하였다.

5. SPE(solid phase extraction) Disk를 이용한 분리

High performance extraction disk(EmporeTM C₁₈, 3M)를 이용하여 산머루 조추출물(9.5 °Bx)을 감압여과기를 부착하여 disk에 흡착시킨 후 2배량의 증류수로 세척하였다. disk에 흡착된 procyanidin은 동량의 70% 에탄올을 가하여 배치식으로 4회 용출시켰다. 용출된 여액은 105°C 상압건조법으로 수율을 구하였으며, 각 배치별 procyanidin 함량을 측정하였다.

6. Procyanidin 함량 측정

시료중 procyanidin 함량은 vanillin-HCl 측정법을 이용하였다. 빙초산에 바닐린 1g을 용해시킨 후 8% 빙초산/HCl 용액과 1:1로 혼합한 것을 발색시약으로 하였다. 시험용액을 1ml에 발색시약 5ml를 넣고 30°C에서 20분간 반응시킨다. 반응이 끝난 시험액은 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 표준 용액은 catechin을 사용하여 검량곡선을 작성한 후 프로시아니딘의 함량을 계산하였다.

7. 산머루 농축액의 SD 분말화

가. 실험 재료

산머루 농축액을 이용하여 분무건조 하기 위한 부형제로는 maltodextrin (MD: D.E. 16~19이상)은 (주)대상 제품을 사용하였으며, coating material로 corn starch, gelatin, karaya gum, dextran을 사용하였다. 이때 유화제는 0.5% PGMO를 사용하였다.

나. 분무건조 조건 실험

산머루 농축액의 분말화에 사용된 분무건조기는 disk-type spary dryer (L-8, Okawara Kokohki, Japan)를 사용하였고(Fig. 1) 분무조건은 inlet 온도는 180℃, 이때의 outlet 온도는 95~110℃였으며 atomizer 속도는 10,000 rpm이었고 flow rate는 20 mL/min로 하여 분말 건조 하였다.

산머루 엑기스와 부형제들간의 배합비 및 분무건조 조건은 Table 1과 같다. 산머루 농축액(60 °Bx 200 g)에 부형제로 matodextrine(D.E = 16-20) 20 g과 coating material(corn starch, gelatin, karaya gum, dextran) 50 g을 교반하여 섞은 후 PGM0(polyglycerinmonooleate)를 중량대비 0.5% 첨가하여 최종 농도가 40 °Bx가 되게 증류수를 첨가하여 16,000 rpm에서 3분간 교반하여 유화시켰다.

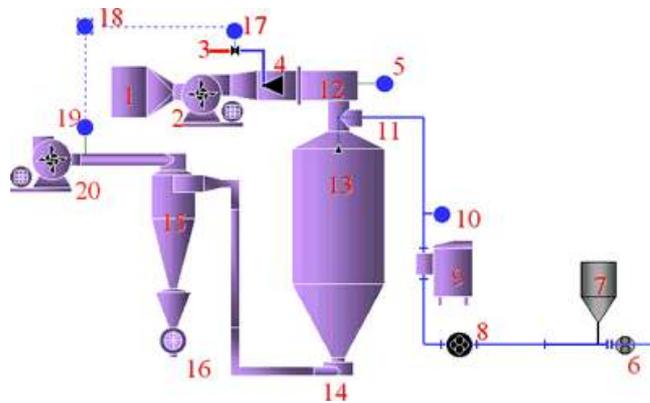


Figure 1. 1. Inlet Filter System, 2. Inlet Supply, 3. Heater Fuel Train, 4. Heater Unit, 5. Temperature Probe, 6. Liquid Feed Transfer Pump, 7. Batch Feed Tank, 8. Booster Pump, 9. High Pressure Feed Pump, 10. Feed Line Pressure Monitor, 11. Atomiser Assembly, 12. Inlet Air Header, 13. Drying Chamber, 14. Powder Conveying Line, 15. High Efficiency Cyclone Collector /Bag Filter Options Available, 16. Rotary Valve / Blow Seal, 17. Fuel Control Valve, 18. Temperature Controller, 19. Exhaust Temperature Probe, 20. Exhaust Air Fan

Table 1. Spray drying conditions for extract of *Vitis amurensis*.

Equipment condition	Formular
Inlet Temp. 180°C Outlet Temp. 95°C - 110°C Atomizer speed 18,000 rpm) Flow rate 20 mL/min	산머루 농축액 60 °Bx 200 g 유화제 0.5% (PGMO) coating material (corn starch, gelatin, karaya gum, dextran) 50 g 부형제 20 g (matodextrine D.E = 16-20) Water 200 g Final concentration 40 °Bx

다. SD 분말의 품질 특성

1) SD 분말의 입도분석

산머루 엑기스 SD 분말의 입도는 particle analyzer(Analysette 22, frisch, Japan)을 사용하여 평균입도와 입도 분포를 구하였다.

2) SD 분말의 미세구조

SD 분말의 미세 구조는 이온 코팅기(Ion-Sputtering Device : JEOL, JEC1100E)로 금이온 코팅기(id-2, eikoeng., Japan)로 피복 한 후 주사전자 현미경(SEM, Scanning Electronic Microscopy, JSM-5400, JEOL Co., Japan)으로 10 kv의 가속 전압에서 200, 500배로 확대하여 시료의 표면구조를 관찰하였다.

3) 관능평가

산머루 SD 분말 1% 수용액을 제조한 후 패널 20명을 대상으로 맛, 향, 색과 종합적 기호도 4가지 항목에 대하여 9점 척도의 관능검사를 실시하였다. 이 때 아주 좋다를 9점으로, 보통이다 5점, 아주 나쁘다를 1점으로 하였다.

4) SD 분말 색도

산머루 엑기스 SD 분말의 색도와 1% 수용액의 색도는 색차계(Color difference meter, Color Quest II HunterLab, USA)를 사용하여 명도(L, lightness), 적색도(a, redness), 황색도(b, yellowness)를 측정하고 색의 변화를 조사하였다. 이때 사용된 표준백색판의 명도, 적색도, 황색도는 각각 92.68, 0.81, 0.86이었다.

8. 산머루 농축액 연질 캡슐 제조

산머루 농축액 연질캡슐을 제조하기 위하여 (주) 서흥캡슐에 의뢰하여 산머루 엑기스의 첨가량, 부형제 첨가량을 결정하였으며, 연질캡슐 피막의 조성비를 결정하였다. 캡슐의 형태는 oblong type으로 사이즈 14로 평균 내용물 함량은 0.709-0.863 mL이었다.

제 2 항 결과 및 고찰

1. 산머루 추출 공정 확립

가. 용매별 추출 수율

산머루 발효박의 추출용매별 수율과 procyanidin 함량을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 추출용매로는 에탄올, 70% 에탄올, 70% 아세톤을 사용하였으며, 2 N HCl과 4 N NaOH를 이용하여 가수 분해시켰다. 용매별 추출수율은 70% 에탄올(6.08%)>70% 아세톤(5.49%)>에탄올(4.60%) 순이었다. 산과, 알칼리를 이용하여 가수분해한 경우 수율의 증가를 가져왔는데, 알칼리 처리의 경우 12.6%의 수율을 보여 가장 높게 나타났다.

Procyanidin 함량은 70% 아세톤 추출물에서 66.9 mg%로 가장 높았으며, 70% 에탄올(43.4 mg%), 에탄올(18.6 mg%)였다. 추출 수율이 높게 나온 산과 알칼리 가수분해 추출물에서는 procyanidin 함량이 각각 10.6 mg%, 2.4 mg%로 추출 수율에 비하여 낮은 함량을 보였다.

Procyanidin 함량은 70% 아세톤 추출 시 가장 높게 나타났으나, 추출수율과 식

품으로서의 이용가능성을 고려할 때 70% 에탄올을 사용하는 것이 유리할 것으로 판단되어 향후 엑기스 제조 시 추출용매는 70% 에탄올을 이용하였다.

Table 2. Yields and procyanidin contents of *Vitis amurensis* extracted with various solvents

	Yields(%)	procyanidin content(mg%)
EtOH	4.60±0.8	18.6±0.7
70% EtOH	6.08±1.2	43.4±1.9
70% Acetone	5.49±1.1	66.9±3.4
Acid Hydrolysis	7.43±0.6	10.6±0.7
Alkali hydrolysis	12.6±1.3	2.4±0.3

나. 추출 횟수에 따른 추출 수율

산머루 엑기스의 추출 횟수에 따른 추출 수율을 조산 결관 Fig. 2와 같다. 시료에 20배의 용매를 가하여 4시간 동안 1회 추출 시 추출수율은 60분에서 120분 사이에서 추출수율이 급격히 증가하는 경향을 보였으며, 150분 추출 시 5% 이상의 추출 수율을 보인 후 240분까지는 추출 수율이 거의 증가하지 않았다. 잔사를 2회 추출 시에도 120분을 기점으로 추출 수율의 증가가 나타나지 않았다. 산머루 발효박의 경우 1회 추출 시 전체 추출량의 85% 이상이 추출되며, 2회 추출 시 약 10% 정도가 추출되는 것으로 나타났다.

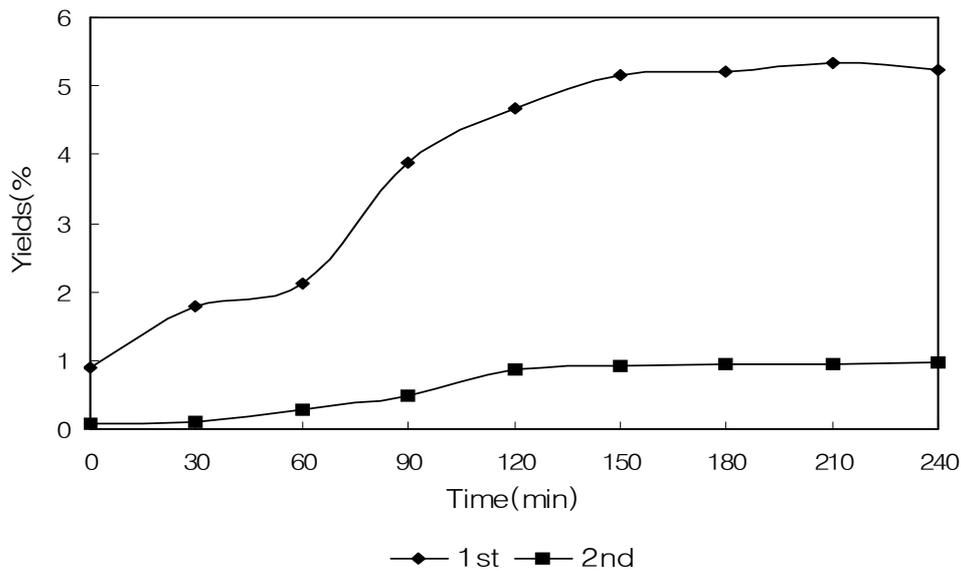


Figure 2. Extraction yields of *Vitis amurensis*. according to extraction time using 70% ethanol.

2. 산머루 procyanididin의 농축 공정 확립

가. 흡착제 처리에 의한 procyanidin 농축

산머루 발효박 70% 에탄올로부터 procyanidin의 함량을 높이기 위하여 저비용의 흡착제를 이용하여 분순물의 제거 및 procyanidin 함량을 측정한 결과는 Table 3과 같다. 70% 에탄올 추출을 감압농축하여 에탄올을 제거한 후 증류수를 가하여 최종농도를 10 °Bx로 조정한 후 활성탄, 활성백토, 산성백토를 1%, 5%, 10%(V/V) 첨가하여 2시간 동안 shaking하여 여과 한 후 잔사에 동량의 70% 에탄올을 가하여 추출하였다. 여액과 추출액의 procyanidin 함량을 측정하였다.

Stock solution의 procyanidin의 농도는 0.43 mg/mL이었으며, 활성탄 처리 여액의 경우 0.012-0.109 mg/mL였으며, 회수한 용출액의 경우 0.007-0.010 mg/g으로 대부분의 procyanidin 화합물이 활성탄에 의해 흡착이 된 후 용출이 되지 않은 것으로 나타났다. 활성백토 처리 시 여액의 경우 0.075-0.259 mg/mL였으며, 회수한 용출액의 경우

0.066–0.075 mg/g으로 대부분의 procyanidin 화합물이 50–80% 정도 흡착이 되고, 흡착된 procyanidin은 10% 정도 탈착되는 것으로 나타났다. 산성백토 처리 시에는 여액이 0.019–0.043 mg/mL였으며, 회수한 용출액의 경우 0.024–0.072 mg/g으로 대부분의 procyanidin 화합물이 90% 정도 흡착이 되고, 흡착된 procyanidin은 20% 정도 탈착되는 것으로 나타났다.

따라서, 5% 활성백토를 처리할 경우 수율 25%를 고려할 때 여액에서 4배 가량의 procyanidin 농축 효과가 있는 것으로 나타나 가장 효과가 좋은 것으로 판단된다.

Table 3. Procyanidin content after removal of impurity

		Eluent		Recovery	
		Procyanidin	Yields(%)	Procyanidin	Yields(%)
		content (mg/mL)		content (mg/mL)	
Activated carbon	1%	0.012	20.2	0.007	5.7
	5%	0.015	17.3	0.009	6.3
	10%	0.019	10.3	0.010	4.8
Activated clay	1%	0.075	28.1	0.066	10.3
	5%	0.259	25.3	0.075	12.4
	10%	0.089	29.3	0.073	10.8
Acid clay	1%	0.043	26.4	0.072	12.1
	5%	0.019	26.8	0.024	10.3
	10%	0.048	23.6	0.070	14.1

나. C₁₈ cartridge를 이용한 procyanidin 농축

C₁₈ cartridge(1,000 mg)를 이용하여 산머루 농축액을 1, 5, 10, 20 mL(procyanidin 함량 0.43 mg/mL) 씩 흡착 증류수로 세척하여 여액(eluent)을 얻은 후 70% 에탄올을 이용하여 회수한 용출액(recovery)의 수율과 procyanidin 함량을 측정한 결과는 Table 4와 같다. 각 시료의 여액 회수율은 28.4-32.4%였으며, 용출액의 회수율은 3.4-7.05%였다. 여액의 경우 시료별 차이가 거의 없었으며, 용출액의 경우 1 mL을 사용한 경우를 제외하고는 큰 차이를 보이지 않았다. 여액의 procyanidin 함량은 1 mL을 사용하였을 경우 0.004 mg/mL로 거의 모든 양이 흡착이 이루어졌으며, 다른 처리구의 경우에도 85% 이상의 흡착이 이루어졌다. 용출액의 경우 1 mL 처리 시 거의 대부분이 흡착은 잘 되었으나 용출량 또한 10% 미만으로 나타났으며, 5 mL과 10 mL 처리 시 각각 50%와 25%의 용출량을 보였다.

용출액의 수율을 감안하면 5 mL 처리 시 최초 stock solution보다 10배 이상의 procyanidin 함량을 가진 농축액을 얻을 수 있는 것으로 나타났다.

Table 4. Recovery of *Vitis amurensis* extract prepared with C₁₈ cartridge

	Eluent		Recovery	
	procyanidin content (mg/mL)	Yields(%)	procyanidin content (mg/mL)	Yields(%)
	C ₁₈ 1mL	0.004	30.2	0.014
C ₁₈ 5 mL	0.013	28.4	0.259	5.5
C ₁₈ 10 mL	0.071	32.4	0.111	6.7
C ₁₈ 20 mL	0.035	31.8	0.057	7.9

다. SPE(Solid phase extraction) disk를 이용한 procyanidin 농축

SPE disk를 이용한 산머루 농축액 중 procyanidin 함량을 높이기 위하여 10 °Bx(procyanidin 함량, 4.3 mg/g) 농축액을 SPE disk에 흡착한 후 증류수로 세척하여 당 성분 등을 제거하였다. 흡착된 procyanidin은 70% 에탄올을 가하여 배치형태로 4회 반복 용출시킨 결과는 Table 5와 같다. SPE disk에 흡착되지 않고 elution된 것과 물에 의해 용출된 수율은 약 66%였으며, 70% 에탄올에 의하여 1.77%가 회수되었다. 회수율은 1회 용출시 0.78%로 가장 높았으며, 4회 용출 시는 0.04%의 회수율을 보였다.

Procyanidin의 함량을 측정한 결과에서는 disk에 흡착되지 않은 procyanidin 함량이 0.48 mg/g으로 disk의 흡착능이 우수한 것으로 생각되며, 물에 의해서도 0.17 mg/g 정도 용출되었다. 반면, 70% 에탄올로 1회용출시 수율을 고려하였을 때 56.35 mg/g의 procyanidin 함량을 가진 농축액을 회수할 수 있는 것으로 나타났다. 2회와 3회 회수 시 각 8.93 mg/g, 17.59 mg/g의 procyanidin 농축액을 얻을 수 있었으며, 4회 용출시 80.36 mg/g의 농축액을 얻을 수 있었으나 용출 수율이 0.04%임을 감안하면 효율성이 낮은 것으로 판단된다.

따라서 SPE disk를 사용할 경우 70% 에탄올로 2회 용출시 80% 이상의 회수율을 얻을 수 있으며, 이는 초기 농축액보다 procyanidin 함량을 15배 정도 농축할 수 있다.

Table 5. Yields and procyanidin contents of *Vitis amurensis* concentrate prepared with solid phase extraction system

	Yields(%)	procyanidin content(mg/g)
Eluent	20.92	0.48
Water	46.52	0.17
70% Ethanol -1	0.78	56.35
70% Ethanol -2	0.63	8.93
70% Ethanol -3	0.32	17.59
70% Ethanol -4	0.04	80.36

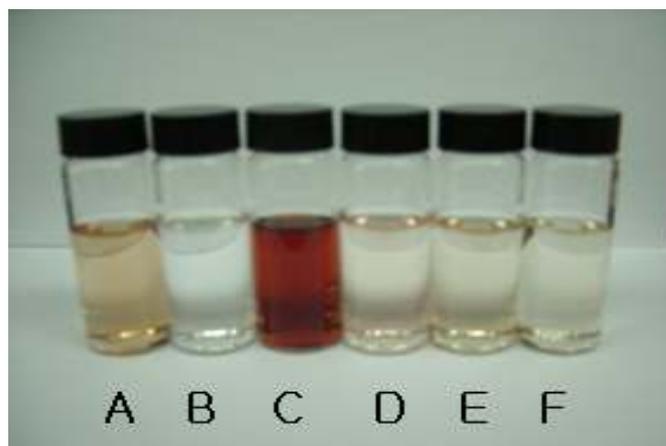


Figure 3. Photography of procynidin rich recovery solution using SPE system. A: eluent, B: washing with water, C: 1st recovery solution with 70% ethanol, D: 2nd recovery solution with 70% ethanol, E: 3rd recovery solution with 70% ethanol, F: 4th recovery solution with 70% ethanol.

3. 산머루 엑기스의 SD 분말화

산머루 농축 엑기스(procyanidin 함량을 50mg/g 이상)를 분말화 하기 위하여 coating material로 corn starch, gelatin, karaya gum, dextran을 사용하여 spray dry한 분말과 이들의 1% 수용액의 그림은 Fig. 4와 같다. 사용된 coating material은 SD 분말시 암갈색으로 분말성과 흐름성이 우수한 것으로 판단된다.

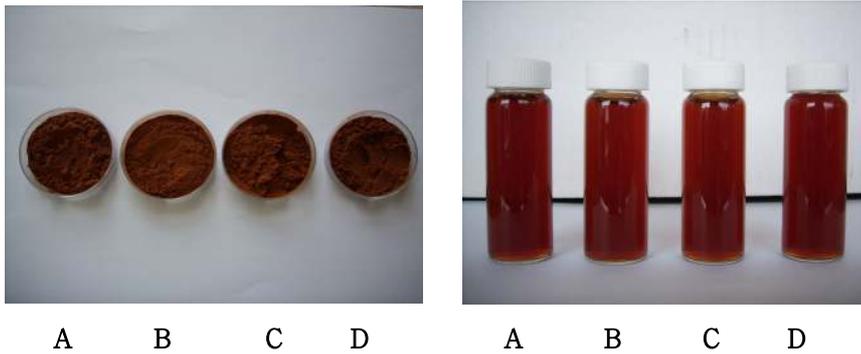


Figure 4. Photograph of powder and 1% solution of *Vitis amurensis*
A: corn starch, B: gelatin, C: karaya, D: dextran

가. SD 분말의 입도 분석

산머루 농축액 coating material에 따른 SD 분말의 입도를 분석한 결과는 Fig. 5와 같다. 먼저 corn starch의 경우 $d_{0.1} = 1.03 \mu\text{m}$, $d_{0.5} = 4.94 \mu\text{m}$, $d_{0.9} = 13.80 \mu\text{m}$ 로 평균 입도는 $5 \mu\text{m}$ 정도로 조사되었다. Gelatin의 경우 입도 분포가 $d_{0.1} = 0.85 \mu\text{m}$, $d_{0.5} = 3.61 \mu\text{m}$, $d_{0.9} = 10.41 \mu\text{m}$ 였으며, dextran의 경우 $d_{0.1} = 0.82 \mu\text{m}$, $d_{0.5} = 2.91 \mu\text{m}$, $d_{0.9} = 8.41 \mu\text{m}$ 이었다. 반면 karaya gum의 경우 $d_{0.1} = 4.98 \mu\text{m}$, $d_{0.5} = 69.21 \mu\text{m}$, $d_{0.9} = 121.89 \mu\text{m}$ 로 다른 코팅 물질에 비하여 큰 차이를 보였다.

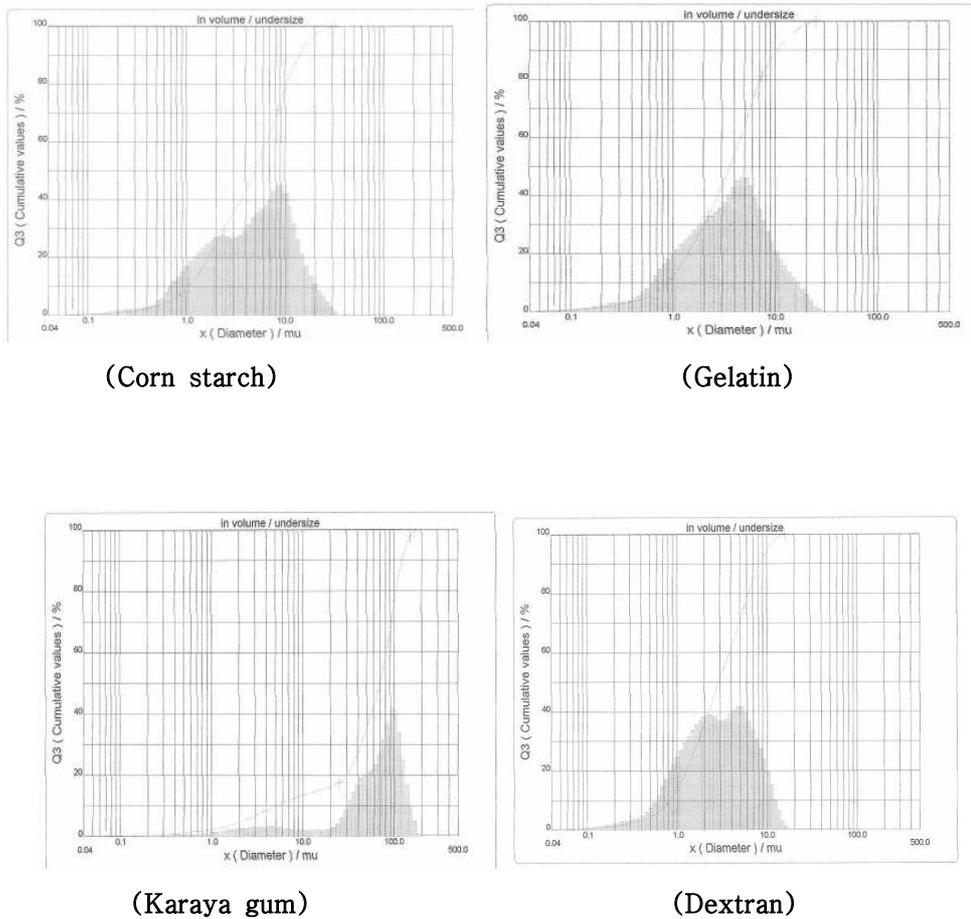


Figure 5. particle size distribution of *Vitis amurensis* powder.

나. SD 분말의 미세구조

산머루 엑기스 SD 분말의 미세구조를 SEM을 이용하여 관찰한 결과는 Fig. 6과 같다. 피복물질로 gelatin과 karaya gum을 사용한 경우 비교적 균일한 입도를 가지는 것으로 조사되었고, corn starch와 dextran을 사용한 경우는 입자의 균일성과, 피복 효율이 떨어지는 것으로 판단된다. 입자의 크기 또한 앞서 입도분석기를 이용한 결과와 유사하게 gelatin의 경우가 karaya gum보다 작은 입자를 형성하는 것을 알 수 있다.

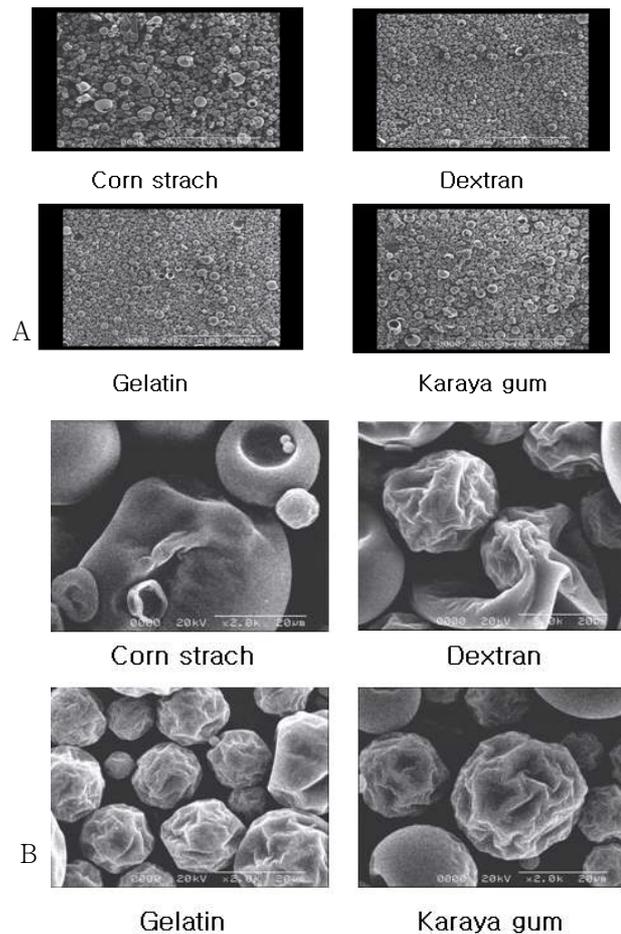


Figure 6. Micrograph of powder prepared various coating materials
(A: $\times 200$, B: $\times 500$)

다. SD 분말 색도

산머루 농축액 SD 분말의 색도와 1% 수용액의 색도를 측정한 결과는 Table 6 과 같다. 분말의 L 값은 46.04~46.41, a 값은 11.27~11.68, b 값은 16.60~17.89로 coating material에 따라 차이가 없는 것으로 나타났다. 1% 수용액의 경우 L 값이 24.46~25.99, a 값이 35.91~36.67, b 값이 38.75~41.09로 나타났다.

Table 6. Color value of powder and 1% solution of *Vitis amurensis*

	Powder			1% Solution		
	L	a	b	L	a	b
Karaya	46.04	11.32	16.79	24.70	35.91	39.32
Gelatin	46.34	11.59	17.76	25.99	36.67	41.09
Dextran	46.41	11.68	17.89	24.96	35.72	39.60
Corn starch	46.20	11.27	16.60	24.46	36.00	38.75

라. SD 분말의 관능평가

산머루 농축액 SD 분말의 관능평가를 1% 수용액을 제조하여 맛, 향, 색, 전반적인 기호도를 조사한 결과는 Table 7와 같다. 맛의 경우 유의적인 차이는 없었으나 con starch로 피복한 경우 가장 낮은 점수를 얻었으며, 향과 색의 경우 karaya gum으로 피복한 SD 분말이 가장 높은 관능 점수를 얻었다. 전체적인 기호도 또한 karaya gum을 사용한 경우가 가장 높은 점수를 얻었다.

Table 7. Sensory evaluation of 1% solution prepared from *Vitis amurensis*

Group	Taste	Flavor	Color	Overall acceptance
Karaya	4.3 ± 1.337 ^a	6.1 ± 1.524 ^a	6.0 ± 1.247 ^a	5.1 ± 1.287 ^a
Gelatin	4.1 ± 0.994 ^a	5.5 ± 1.179 ^a	5.7 ± 1.059 ^{ab}	4.3 ± 1.252 ^a
Dextran	4.0 ± 1.247 ^a	5.1 ± 1.524 ^a	5.6 ± 1.350 ^{ab}	4.3 ± 1.636 ^a
Corn Starch	3.5 ± 1.841 ^a	5.1 ± 1.101 ^a	5.5 ± 1.581 ^{ab}	4.2 ± 1.476 ^a

1) Mean ±S.D.

2) Values within a column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. (NS: not significant)

4. 산머루 농축액을 이용한 연질 캡슐 제조

산머루 농축액(procyanidin 50 mg/g 이상)을 이용하여 연질캡슐을 제조하기 위한 내용물과 피복물질의 배합비는 Table 8과 같다. 본 실험에서 성형한 연질 캡슐의 형태는 oblong 형태로 사이즈 14사이즈 였으며, 내용물과 피복제의 중량은 각각 660 mg과 310 mg으로 개당 중량은 970 mg이었다.. 산머루 성형을 위하여 부형제로 대두유를 사용하였으며, 농축액 함량은 250 mg으로 하였는데, 농축액 함량을 늘일 경우 성형체대로 이루어지지 않고 건조 공정 중 함몰되는 현상이 발생하였다. 본 실험에서 제조한 연질 캡슐 1개당 10 mg이상의 procyanidin을 함유 하도록 하였다. 연질 캡슐의 제조 공정은 Fig. 8과 같다.



Figure 7. Photograph of *Vitis amurensis* extract soft capsule.

Table 8. Formular for *Vitis amurensis* concentrate soft capsule

	함량(mg)	함량비(%)	
내용물	산머루농축액	250.14	37.9
	대두유	314.16	47.6
	팜유	66	10
	밀납(황납)	297.7	4.5
	계	660	100
	젤라틴	215	69.355
	글리세린	66.7	21.447
피막	D-솔비톨	24.5	8.064
	에틸바닐린	0.65	0.161
	이산화티타늄	1.04	0.347
	식용색소 청색 1호	0.11	0.047
	식용색소 황색 5호	0.5	0.128
	식용색소 적색 40호	1.5	0.451
	계	310	100

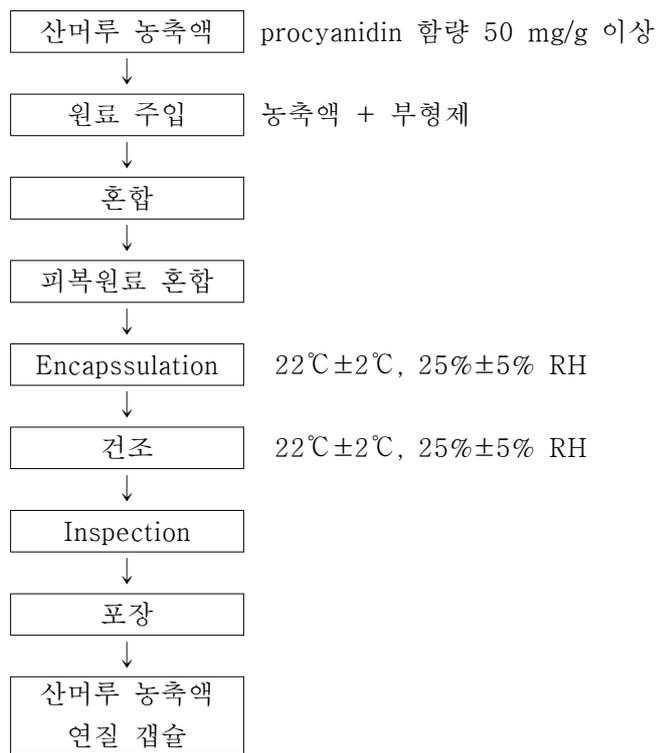


Figure 8. Procedure for manufacturing of *Vitis amurensis* concentrate soft capsule

제 4 절 결 론

본 연구에서는 산머루 (*Vitis amurensis*)의 씨로부터 프로시아니딘을 분리하여 Nrf2/ARE 경로를 위주로 항암효과를 연구하였다. 발암물질에 대한 인체 세포 또는 조직의 방어기작의 일환으로 hemeoxygenase 1 (HO-1)과 NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1)등의 제2상 해독효소 (phase 2 detoxifying enzymes) 및 항산화 효소 (antioxidant enzymes)의 발현 또는 활성화가 중요한 역할을 하는 것을 알려져 있으며 이들 효소 발현의 조절은 그 프로모터영역에 있는 ARE(antioxidant response element) sequence에 전사인자 Nrf2(nuclear factor E2-related factor 2)가 결합함으로써 매개된다.

본 연구의 제1세부과제(산머루 procyanidin의 분리, 분석 및 구조동정: 1차년도 경북대)에서는 산머루 씨를 추출하고 column을 이용하여 프로시아니딘 획분을 얻었다. 각 획분 중 75% 메탄올 F5의 수율이 가장 높았고 TLC상에서는 1종의 spot이 F6은 2종의 spot을 나타내었다. 9개의 fraction으로부터 UV/Vis 흡수스펙트럼을 관찰한 결과 260~280nm의 흡수스펙트럼을 보여 flavonoid 관련 화합물로 추정되었다. F2~8 스펙트럼에서는 단과장이 (+)-catechin과 동일한 280nm으로 나타났다. Vanillin assay를 이용하여 procyanidin함량을 측정한 결과 9개의 획분 중 F5이 가장 진한 전색으로 높은 함량을 얻었다. Fraction 8을 phloroglucinol 반응하여 HPLC 분석한 결과 280nm에서의 크로마토그램은 8개의 화합물에 상응하는 terminal과 extension units을 나타내었다. Catechin과 비교해서 procyanidin 함량을 측정하였으며, 동등한 농도인 F8과 (+)-catechin은 1:3.2의 면적비로 구해졌으며 이는 1mg/ml속에는 31% procyanidin의 함량이 존재한다고 추측할 수 있다. 또한 F8이 DPPH 라디칼 소거 활성이 가장 높았으며 표준물질인 trolox의 일정 농도가 발현하는 활성의 기준치로 나타낸 FRAP 방법에서도 가장 높은 활성을 보였다.

제2세부과제(산머루 procyanidin의 암예방 기작연구: 1,2차년도 인제대)에서는 분리한 산머루 씨 프로시아니딘은 ARE-luciferase gene이 stable하게 transfection 된 세포(HepG2-C8 cells)에서 ARE-luciferase 활성을 크게 유도하였으며, 또한 HepG2 cell에서 Nrf2 단백질 및 NQO1, HO-1 mRNA 발현을 강력하게 유도하였고 HepG2 cell의 증식을 농도의존적으로 억제하였다. 또한 *In vivo* 실험으로

Balb/c mice에 산머루 씨 추출물을 oral gavage로 투여시킨 후 mice 간 protein에서 Nrf2 발현 효과를 조사한 결과, 산머루 씨 추출물에서 단백질의 발현을 확인하였다. DPPH test를 통해 알아본 산머루 씨 프로시아니딘의 항산화 활성은 vitamin C와 BHA보다 우수하였다. 산머루 씨 프로시아니딘은 LPS로 유도된 Mouse macrophage cells에서 염증유발효소인 cyclooxygenase-2(COX-2)와 inducible nitric-oxide synthase(iNOS) 발현 억제 효과를 나타내었으며 nitric oxide의 형성을 농도의존적으로 감소시켰다. 프로시아니딘의 존재 유무는 vanillin assay와 BuOH-HCl test를 이용하여 확인한 결과 F5에서 가장 많은 procyanidin을 함유하였고, phloroglucinol 반응산물을 LC-MS로 분석함으로써 평균 중합도 및 구성단위를 측정하였다. 산머루 씨 프로시아니딘은 catechin, epicatechin 및 epicatechin gallate를 terminal unit으로 (epi)catechin 및 (epi)catechin gallate를 extension unit으로 구성되어 있는 것으로 분석되었다. 기존에 나와있는 제품화된 procyanidin 관련 제품과 활성 비교 결과, 95%이상의 활성을 보였다. 결과를 통해 산머루 씨로부터 얻은 프로시아니딘은 항산화, 항암, 항염증과 같은 다양한 생리활성을 지니고 있으며 천연 항암물질로의 활용이 크게 기대된다.

제3세부과제(산머루 procyanidin을 이용한 건강기능제품의 개발: 2차년도, 한국식품연구원)에서는 용매별 추출수율은 70% 에탄올(6.08%)>70% 아세톤(5.49%)>에탄올(4.60%) 순이었다. 산과, 알칼리를 이용하여 가수분해한 경우 수율의 증가를 가져왔는데, 알칼리 처리의 경우 12.6%의 수율을 보여 가장 높게 나타났다. 하지만 procyanidin 함량은 70% 아세톤 추출 시 가장 높게 나타났으나, 추출수율과 식품으로서의 이용가능성을 고려할 때 70% 에탄올을 사용하는 것이 유리할 것으로 판단되어 향후 엑기스 제조 시 추출용매는 70% 에탄올을 이용하였다. 산머루 발효박 70% 에탄올로부터 procyanidin의 함량을 높이기 위하여 저비용의 흡착제를 이용하여 분순물의 제거 및 procyanidin 함량을 측정한 결과 5% 활성백토를 처리할 경우 수율 25%를 고려할 때 여액에서 4배 가량의 procyanidin 농축 효과가 있는 것으로 나타나 가장 효과가 좋은 것으로 보여졌으며 C₁₈ cartridge(1,000 mg)를 이용하여 산머루 농축액을 1, 5, 10, 20 mL(procyanidin 함량 0.43 mg/mL) 씩 흡착 증류수로 세척하여 여액(eluent)을 얻은 후 70% 에탄올을 이용하여 회수한 용출액(recovery)의 수율과 procyanidin 함량을 측정한 결과용출액의 수율을 감안하면 5 mL 처리시 최초 stock solution보다 10배 이상의 procyanidin 함량을 가진 농축액을 얻을 수 있는 것으로 나타났다. SPE disk를 사용

할 경우 70% 에탄올로 2회 용출시 80% 이상의 회수율을 얻을 수 있으며, 이는 초기 농축액보다 procyanidin 함량을 15배 정도 농축할 수 있다. 산머루 농축 엑기스(procyanidin 함량을 50mg/g 이상)를 분말화 하기 위하여 coating material로 corn starch, gelatin, karaya gum, dextran을 사용하였고 그 중 coating material은 SD 분말시 암갈색으로 분말성과 흐름성이 우수한 것으로 판단된다. 또한 산머루 엑기스 SD 분말의 미세구조를 SEM을 이용하여 관찰한 결과는 피복물질로 gelatin과 karaya gum을 사용한 경우 비교적 균일한 입도를 가지는 것으로 조사되었고, corn starch와 dextran을 사용한 경우는 입자의 균일성과, 피복 효율이 떨어지는 것으로 판단된다. 입자의 크기 또한 앞서 입도분석기를 이용한 결과와 유사하게 gelatin의 경우가 karaya gum보다 작은 입자를 형성하는 것을 알 수 있다. 산머루 농축액 SD 분말의 관능평가를 1% 수용액을 제조하여 맛, 향, 색, 전반적인 기호도를 조사한 결과는 맛의 경우 유의적인 차이는 없었으나 con starch로 피복한 경우 가장 낮은 점수를 얻었으며, 향과 색의 경우 karaya gum으로 피복한 SD 분말이 가장 높은 관능 점수를 얻었다. 전체적인 기호도 또한 karaya gum을 사용한 경우가 가장 높은 점수를 얻었다. 최종적으로 산머루 농축액(procyanidin 50 mg/g 이상)을 이용하여 연질캡슐을 제조하기 위해 성형한 연질 캡슐의 형태는 oblong 형태로 사이즈 14사이즈 였으며, 내용물과 피복재의 중량은 각각 660 mg과 310 mg으로 개당 중량은 970 mg이었다. 산머루 성형을 위하여 부형제로 대두유를 사용하였으며, 본 실험에서 제조한 연질 캡슐 1개당 10 mg이상의 procyanidin을 함유하도록 하였다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 1차년도 과제 목표달성도

구분	연구개발 목표	기여도	달성도 (%)
1차년도 (2006년)	산머루 procyanidin의 분리, 분석 및 구조동정 -산머루 유래 생리활성물질 추출물 획득과 procyanidin 조성, 구조 확인	○ 산머루 procyanidin 추출, 분리, 정제 - 용매를 이용한 procyanidin 추출과 Column chromatography를 이용한 분리 및 정제 ○ 산머루 procyanidin 조성 및 구조분석 - HPLC, LC-MS, NMR 등의 기기분석을 통한 procyanidin의 조성분석, 구조 확인 및 동정	100%
	산머루 procyanidin의 암 예방 기작 연구 -산머루 유래 procyanidin의 암예방 기작 검증 및 기전확인	○ 산머루 procyanidin의 세포 수준 항암성연구 -간암세포 증식억제효과 조사 ○ 산머루 procyanidin의 세포 방어유도 및 방어기작 연구 -ARE/Nrf2 등의 유전자발현에 미치는 영향연구 -Phase II 및 항산화효소계 유도활성 조사 -세포방어기작 관련 상위 신호전달경로 규명	100%

2. 2차년도 과제 목표달성도

구분	연구개발 목표	기여도	달성도 (%)
2차년도 (2007년)	<p>산머루 발효박, 씨 및 농축액을 이용한 procyanidin 고함유 건강기능제품의 개발</p> <p>-저비용, 고효율 분리공정 확립과 procyanidin 고함유 제품의 제형 및 가공적성 개선</p>	<p>○ 산머루 가공 부산물로부터 procyanidin의 대량 분리 공정 확립</p> <p>-적정 추출조건 확립</p> <p>-유효 성분의 대량 분리 정제 공정 개발</p> <p>○Procyanidin 고함유 제품 개발</p> <p>-procyanidin 고함유 엑기스의 SD 분말화</p> <p>-액상 연질캡슐 제조</p> <p>○가공제품의 품질 표준화</p> <p>-Procyanidin oligomer 함량 측정</p>	100%
	<p>산머루 procyanidin의 <i>in vivo</i> 암예방 기작 연구</p> <p>-<i>in vivo</i> 모델에서의 항암성 여부 및 항암기작 확인</p>	<p>○동물모델을 이용한 세포방어 기작 관련 신호전달경로에 미치는 영향 검토</p> <p>-Nrf2/ARE 및 phase 2 detoxifying/antioxidant enzyme에 대한 영향 확인</p> <p>○항염증 효과 및 작용 메커니즘 규명</p> <p>-세포내 NO, ROS 생성 억제 및 염증관련 분자지표 COX-2, iNOS 발현억제 확인</p>	150%

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구과제에서 수행으로 획득한 산머루로부터 분리 정제한 물질의 항암효능작용을 바탕으로 하여 고부가가치 창출을 위한 기능성식품 개발기술의 활용가능성은 다음과 같다.

제 1 절 활용에 대한 건의

산머루 씨에 존재하는 phytochemicals (procyanidin)의 생리기능성 구멍은 산머루 및 그 부산물을 다양한 건강보조 식품소재 및 기능성 제품으로 개발 가능하도록 한다. 항암, 항산화, 항염증 활성을 근거로 한 건강기능식품 소재화 및 성인병 예방을 위한 건강기능성 제품 개발 및 암 질환에도 적용될 수 있는 기초자료가 된다. Procyanidin 성분이 anti-oxidant, anti-mutagenic, anti-cytotoxic, cardioprotective의 능력이 있는 것으로 보고되어 있으며 산머루 씨로부터 얻어진 procyanidin의 생리활성을 통해 기능성 식품소재로의 개발 성공 가능성이 높다. 산머루 씨 procyanidin의 생리활성 탐색 방법, 기전의 규명 방법의 정립으로 향후 다양한 농산자원에 대한 항염증 및 암 예방 활성 평가 시스템을 구축한다. 산머루 씨에서 분리되는 항암, 항산화 및 항염증 물질의 특허출원 및 건강기능성 식품의 제품화 기술의 특허를 출원을 받도록 할 것이다.

산머루 및 산머루 씨를 이용한 제품을 산업화하는데 기초자료로 활용한다. 먼저, 산머루의 생리활성 물질에 대한 가공처리 기술 개발에 따른 산머루 관련 가공제품의 기능성 증대에 활용하고, 참여기업인 지리산 두레마을에 기술을 이전하여 생리활성 물질의 분리정제 공정 최적화에 따른 생산비용 절감기술과 함께 고품질의 기능성 가공제품 생산하는데 활용한다. 개발된 최적의 생산기술을 다양한 기능성 가공제품 생산성 향상에 활용한다.

산머루 씨의 유용한 성분을 활용한 건강기능제품의 산업화는 참여기업인 지리산 두레마을와의 협력 또는 신규 제조업체로의 기술이전을 통해 가능할 것으로 사료된다.

제 2 절 본 연구로부터 발생된 업적

1. 국내·외 전문학술지 논문 발표

가. Min-Ji Park, Hye-Sook Kang, Kyong-Suk Jin, Young-Hun Kim, Sun Ok, Jae-Han Jeong, Hye-Ryun Lee, Ho-Jin Lim, Wan-Keun Jo, Young-Chan Kim, Shin-Kyo Chung, Woo-Sik Jeong. Chemopreventive Properties of Wild Grape (*Vitis amurensis*) Extracts. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition. 2008 (게재확정, 출판중)

2. 국내·외 학술대회 발표 논문

A. 국외학술대회 구두발표

가. Min-Ji Park, Kyong-Suk Jin, Hye-Sook Kang, Young-Hun Kim, Ho-Jin Lim, Wan-Keun Jo, Young-Chan Kim, Shin-Kyo Chung, Woo-Sik Jeong. Induction of Nrf2/antioxidant response element pathway by procyanidins from wild grape (*Vitis amurensis*) seeds. International conference on Food Factors for Health Promotion. Kyoto, Japan (2007)

B. 국내학술대회 구두발표

가. 정우식. 항산화 및 항암 기능성식품소재로서의 procyanidin. Korea. 한국식품저장유통학회. 2007

C. 국내학술대회발표

가. 이혜련, 황인욱, 정신교, 정우식. 산머루 (*Vitis amurensis*) 의 과피에서 proanthocyanidin의 분리 및 항산화 특성 (Isolation and Antioxidant Properties of Proanthocyanidin from Wild Grape (*Vitis amurensis* Skin) (한국식품과학회 제 74 차 학술대회, 2007 0622, 부산, 초록집 p207)

나. Hye-Ryn Lee, In-Wook Hwang, Min-Ji Park, Woo-Sik Jeong, Young-Chan Kim, Shin-Kyo Chung. Isolation of proanthocyanidin from the seed of wild grape (*Vitis amurensis*) and their antioxidative activities. 2006 International Symposium and Annual Meeting of the Korean Society of Food Science and Nutrition (2006)

다. 이해련, 황인욱, 박민지, 정우식, 김영찬. 산머루의 씨로부터 분리한 procyanidin의 특성과 항산화 활성. 2006 한국식품저장유통학회 한일공동심포지엄.

3. 전시회 참가

가. 이해련, 황인욱, 김영찬, 정우식, 정신교. 산머루 (*Vitis amurensis*) 씨에서 분리한 프로시아니딘의 항산화적 특성, 2007 대구 경북 웰빙바이오대전 20070518

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

2000년 procyanidin을 주 원료로 한 미국의 포도 씨 추출물 시장은 4천만~5천만달러에 이른 것으로 집계되었으며, 선두주자인 소나무 껍질 추출물 procyanidin 등의 제품까지 고려했을 때 procyanidin을 원료로 한 기능성식품 시장은 최소한 이의 두세 배에 이를 것으로 추정했다. 현재 해외에서 시판되고 있는 procyanidin 추출물 건강기능성식품 또는 건강보조식품은 여러 종류가 있으며 대표적인 것으로는 ① *Vitis vinifera* 포도에서 추출한 Grape Seed Extract 또는 Grape seed OPCs(oligomeric procyanidins)로 포도 씨 뿐만 아니라 껍질, 줄기 등에서도 추출이 되고 있고, 이탈리아 Indena사의 Leucoselect™, 미국 InterHealth Nutraceuticals Inc사의 ActiVin (GSPE) ② 소나무 (*Pinus maritima*) 껍질 유래의 Pycnogenol® (프랑스 교수 Jacques Masquelier에 의해 개발되어 영국 Horphag Ltd of Guernsey사에서 시판) 등의 제품이 시장에 나와 있다. 그러나 산머루로부터 얻은 procyanidin을 이용한 건강기능성제품은 없어 산머루 procyanidin 제품의 활발한 개발이 필요하다고 사료된다.

제 7장 참고문헌

1. Li, H., Z. Wang, and Y. Liu, [Review in the studies on tannins activity of cancerprevention and anticancer]. Zhong Yao Cai, 2003. **26**(6): p.444-8.
2. Cos, P., et al., Proanthocyanidins in health care: current and new trends. CurrMedChem, 2004. **11**(10): p.1345-59.
3. Bagchi, D., et al., Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds. Ann N Y Acad Sci, 2002. **957**: p.260-70.
4. Stoner, G.D. and H. Mukhtar, Polyphenols as cancer chemopreventive agents. J Cell Biochem Suppl, 1995. **22**: p.169-80.
5. Damianaki, A., et al., Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. J Cell Biochem, 2000. **78**(3): p.429-41.
6. Yang, C.S., et al., Tea and tea polyphenols inhibit cell hyper proliferation, lung tumorigenesis, and tumor progression. Exp Lung Res, 1998. **24**(4): p.629-39.
7. Dell'Agli, M., A. Busciala, and E. Bosisio, Vascular effects of wine polyphenols. Cardiovasc Res, 2004. **63**(4): p.593-602.
8. Vinson, J.A., et al., Polyphenol antioxidants in citrus juices :in vitro and in vivo studies relevant to heart disease. Adv Exp Med Biol, 2002. **505**: p.113-22.
9. Bode, A.M. and Z. Dong, Targeting signal transduction pathways by chemopreventive agents. Mutat Res, 2004. **555**(1-2): p.33-51.
10. Keum, Y.S., W.S. Jeong, and A.N. Kong, Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms. Mutat Res, 2004. **555**(1-2): p.191-202.
11. Surh, Y.J., Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(10): p.768-80.
12. Jeong, W.S., M. Jun, and A.N. Kong, Nrf2: apotential molecular target for cancer chemoprevention by natural compounds. Antioxid Redox Signal, 2006.

- 8(1-2): p.99-106.
13. Prochaska, H.J. and P. Talalay, *Regulatory mechanisms of mono functional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver*. *Cancer Res*, 1988. **48**(17): p.4776-82.
 14. Hayes, J.D. and M. McMahon, *Molecular basis for the contribution of the antioxidant responsive element to cancer chemoprevention*. *Cancer Lett*, 2001. **174**(2): p.103-13.
 15. Itoh, K., et al., *An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **236**(2): p.313-22.
 16. Kong, A.N., et al., *Induction of xenobiotic enzymes by the MAP kinase pathway and the antioxidant or electrophile response element(ARE/EpRE)*. *Drug Metab Rev*, 2001. **33**(3-4): p.255-71.
 17. Chen, C., et al., *Induction of detoxifying enzymes by garlic organosulfur compounds through transcription factor Nrf2: effect of chemical structure and stress signals*. *Free Radic Biol Med*, 2004. **37**(10): p.1578-90.
 18. Obata, T., G.E. Brown, and M.B. Yaffe, *MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway*. *Crit Care Med*, 2000. **28**(4Suppl): p.N67-77.
 19. Murakami, A. and H. Ohigashi, *Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals*. *Int J Cancer*, 2007. **121**(11): p.2357-63.
 20. Chen, J.X., et al., *Glutathione mediates LPS-stimulated COX-2 expression via early transient p42/44 MAPK activation*. *J Cell Physiol*, 2003. **197**(1): p.86-93.
 21. Moncada, S., Palmer, R.-M., Higgs, E.-A.,, *Nitric oxide: Physiology and pathophysiology and pharmacology*, *Pharmacol. Rev.*, 1991. **43**: p.109-142.
 22. MacMicking, J., Q.W. Xie, and C. Nathan, *Nitric oxide and macrophage function*. *Annu Rev Immunol*, 1997. **15**: p.323-50.

23. Vane, J.R., et al., *Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation*. Proc Natl Acad Sci USA, 1994. **91**(6): p.2046-50.
24. Wink, D.A., et al., *DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors*. Science, 1991. **254**(5034): p.1001-3.
25. Miura, T., et al., *Apple Procyanidins Induce Tumor-Cell Apoptosis through Mitochondrial Pathway Activation of Caspase-3*. Carcinogenesis, 2007.
26. Bagchi, D., et al., *Mechanistic pathways of antioxidant cytoprotection by a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract*. Indian J Exp Biol, 2002. **40**(6): p.717-26.
27. Faria, A., et al., *Procyanidins as antioxidants and tumor cell growth modulators*. J Agric Food Chem, 2006. **54**(6): p.2392-7.
28. Llopiz, N., et al., *Antigenotoxic effect of grape seed procyanidin extract in Fao cells submitted to oxidative stress*. J Agric Food Chem, 2004. **52**(5): p.1083-7.
29. Joshi, S.S., et al., *Amelioration of the cytotoxic effects of chemotherapeutic agents by grape seed proanthocyanidin extract*. Antioxid Redox Signal, 1999. **1**(4): p.563-70.
30. Karthikeyan, K., B.R. Bai, and S.N. Devaraj, *Cardioprotective effect of grape seed proanthocyanidins on isoproterenol - induced myocardial injury in rats*. Int J Cardiol, 2007. **115**(3): p.326-33.
31. da Silva Porto, P.A., J.A. Laranjinha, and V.A. de Freitas, *Antioxidant protection of low density lipoprotein by procyanidins : structure/activity relationships*. Biochem Pharmacol, 2003. **66**(6): p.947-54.
32. Chang, W.C. and F.L. Hsu, *Inhibition of platelet aggregation and arachidonate metabolism in platelets by procyanidins*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1989. **38**(3): p.181-8.
33. Sharma, S.D., S.M. Meeran, and S.K. Katiyar, *Dietary grape seed*

- proanthocyanidins inhibit UVB-induced oxidative stress and activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappa B signaling in in vivo SKH-1 hairless mice.* Mol Cancer Ther, 2007. **6**(3): p.995-1005.
34. Terra, X., et al., *Grape-seed procyanidins act as anti-inflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW264.7 macrophages by inhibiting NFkB signaling pathway.* J Agric Food Chem, 2007. **55**(11): p.4357-65.
35. Ugartondo, V., et al., *Comparative antioxidant and cytotoxic effect of procyanidin fractions from grape and pine.* Chem Res Toxicol, 2007. **20**(10): p.1543-8.
36. Agarwal, C., Y. Sharma, and R. Agarwal, *Anticarcinogenic effect of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in human prostate carcinoma DU145 cells: modulation of mitogenic signaling and cell-cycle regulators and induction of G1 arrest and apoptosis.* Mol Carcinog, 2000. **28**(3): p.129-38.
37. Shao, Z.H., et al., *Cytotoxicity induced by grape seed proanthocyanidins: role of nitric oxide.* Cell Biol Toxicol, 2006. **22**(3): p.149-58.
38. Jorgensen, E.M., A.B. Marin, and J.A. Kennedy, *Analysis of the oxidative degradation of proanthocyanidins under basic conditions.* J Agric Food Chem, 2004. **52**(8): p.2292-6.
39. Igartuburu, J.M., et al., *Structure of a hemicellulose A fraction in dietary fiber from the seed of grape variety Palomino (Vitis vinifera cv. palomino).* J Nat Prod, 1998. **61**(7): p.876-80.
40. Igartuburu, J.M., et al., *Structure of a hemicellulose B fraction in dietary fiber from the seed of grape variety Palomino (Vitis vinifera cv. palomino).* J Nat Prod, 1998. **61**(7): p.881-6.
41. Fitzpatrick, D.F., et al., *Isolation and characterization of endothelium-dependent vasorelaxing compounds from grape seeds.* J Agric Food Chem, 2000. **48**(12): p.6384-90.

42. Lee, E.O., et al., *Potent inhibition of Lewis lung cancer growth by resveratrol A from the roots of Vitis amurensis through apoptotic and anti-angiogenic activities*. *Carcinogenesis*, 2006. **27**(10): p.2059-69.
43. College, J.N.M., *Dictionary of Chinese Traditional Medicine* Shanghai Science and Technology Press, Shanghai, China, 1997. **2**: p.2315.
44. Huang, K.S., M. Lin, and G.F. Cheng, *Anti-inflammatory tetramers of resveratrol from the roots of Vitis amurensis and the conformations of the seven-membered ring in some oligostilbenes*. *Phytochemistry*, 2001. **58**(2): p.357-62.
45. Jang, M.H., et al., *Resveratrol oligomers from Vitis amurensis attenuate beta-amyloid-induced oxidative stress in PC12 cells*. *Biol Pharm Bull*, 2007. **30**(6): p.1130-4.
46. MS, B., *Antioxidant determinations by the use of as table free radical*. *Nature*, 1958. **181**: p.1199-1200.
47. Porter LJ, H.L., Chan BG, *The conversion of procyanidins and prodephnindins to cyanidin and delphinidin*. *Phytochemistry*, 1986. **25**(1): p.223-230.
48. Kennedy, J.A. and G.P. Jones, *Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol*. *J Agric Food Chem*, 2001. **49**(4): p.1740-6.
49. Creaser, C.S., M.R. Koupai-Abyazani, and G.R. Stephenson, *Gas chromatographic-massspectrometric characterization of flavanones in citrus and grape juices*. *Analyst*, 1992. **117**(7): p.1105-9.
50. Yu, R., et al., *Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase II detoxifying enzymes by chemicals*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(39): p.27545-52.
51. Souquet JM, C.V., Brossaud F, Moutounet M, *Polymeric proanthocyanidins from grape skin*. *Phytochemistry*, 1996. **43**: p.504-512.

52. Kusuda, M., et al., *Polyphenolic constituent structures of Zanthoxylum piperitum fruit and the anti bacterial effects of its polymeric procyanidin on methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Biosci Biotechnol Biochem, 2006. **70**(6): p.1423-31.
53. Shahat, A.A., et al., *Antiviral and antioxidant activity of flavonoids and proanthocyanidins from Crataegus sinensis*. PlantaMed, 2002. **68**(6): p.539-41.
54. Aldini, G., et al., *Procyanidins from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium-dependent relaxation in human artery: new evidences for cardio-protection*. LifeSci, 2003. **73**(22): p.2883-98.
55. Ray, S.D., M.A. Kumar, and D. Bagchi, *A novel proanthocyanidin IH636 grape seed extract increases in vivo Bcl-XL expression and prevents acetaminophen-induced programmed and unprogrammed cell death in mouse liver*. Arch Biochem Biophys, 1999. **369**(1): p.42-58.
56. Erlejtman, A.G., C.G. Fraga, and P.I. Oteiza, *Procyanidins protect Caco-2 cells from bile acid-antioxidant-induced damage*. Free Radic Biol Med, 2006. **41**(8): p.1247-56.
57. Schmidt, B.M., et al., *Effective separation of potent antiproliferation and antiadhesion components from wild blueberry (Vaccinium angustifolium Ait.) fruits*. J Agric Food Chem, 2004. **52**(21): p.6433-42.
58. Ye, X., et al., *The cytotoxic effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells*. Mol Cell Biochem, 1999. **196**(1-2): p.99-108.
59. Khan, N., et al., *Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate*. Cancer Res, 2006. **66**(5): p.2500-5

주 의

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