

포도산업 고도화를 위한 포도 페놀계
추출물의 생산 시스템 개발
Development of a System to Produce
Phenolic Extracts from Grapes

연구기관
한국식품개발연구원

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “포도산업 고도화를 위한 포도 껍질계 추출물의 생산 시스템 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 8월 19일

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원

총괄연구책임자 : 조용진

연 구 원 : 김철진

연 구 원 : 김종태

연 구 원 : 전향숙

연 구 원 : 김성수

연 구 원 : 김재은

연 구 원 : 홍지영

위탁연구기관명 : 이화여자대학교

위탁연구책임자 : 이상국

연 구 원 : 민혜영

요 약 문

I. 제 목

포도산업 고도화를 위한 포도 폐놀계 추출물의 생산 시스템 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

국내에서 레스베라트롤과 같은 폐놀계 화합물의 약리 효과에 대한 연구는 일부 수행되었으나, 생산기술에 관한 연구는 전혀 수행된 적이 없다. 포도의 폐놀계 천연물 생산기술을 확보한다면 부가가치가 매우 큰 가공제품을 생산할 수 있어 우리 나라의 포도산업을 고도화하는 데 크게 기여할 것으로 기대된다. 본 연구에서는 국내산 포도를 원료로 하여 레스베라트롤이 다량 함유된 폐놀계 추출물의 생산시스템을 개발하고, 기능성 화장품의 소재로서 추출물의 생물활성 효능을 평가하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 국내산 포도의 주요 품종에 대해서 부위별 레스베라트롤의 함량 분석, 원료의 종류 및 형태별 전처리 시스템, 레스베라트롤의 추출 시스템, 레스베라트롤의 분리 및 정제 시스템, 추출물의 후처리 시스템 등을 개발하고, 추출물의 특성을 분석하고자 폐놀계 추출물의 성분 분석 및 생물활성 효능 평가하며, 레스베라트롤을 대량 생산할 수 있는 공정기술에 대해 다루고, 끝으로 소재의 활용 방안 및 소재 생산의 산업적 효과 분석을 실시하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

□ 국내산 주요 포도 품종에 대해서 부위별 레스베라트롤 함량을 HPLC 분석법을 이용하여 측정하였다. 거봉, 캠벨, 세리단 포도의 과육, 과피, 씨, 송이 가지에 함유되어 있는 레스베라트롤의 함량은 품종간 차이는 거의 나타나지 않았으나 부위별로 차이가 매우 큰 것으로 나타났다. 송이 가지에 함유되어 있는 레스베라트롤의 함량은 과피에 비해 34~55배나 많고 씨에 비해서는 43~73배나 많은 수준이었다. 레스베라트롤을 생산하기 위한 자원으로

로서 포도를 활용하기 위해서는 송이가지가 적합한 것으로 나타났다.

- 포도의 껍질, 씨 및 송이가지의 분쇄특성을 분석하고, 그것을 반영한 분쇄 모형을 제시하고자 하였다. 분쇄비는 포도의 송이가지, 씨, 그리고 껍질의 순으로 크게 나타났으며, 분쇄기의 충진율 증가에 따라 동반하여 분쇄비는 증가하였다. 포도의 껍질, 씨 및 송이가지에 대한 분쇄상수를 비교한 결과, Kick의 분쇄상수에서는 동일한 충진율에서 송이가지, 껍질, 씨의 순으로 크게 나타났으나, Rittinger의 분쇄상수에서는 송이가지, 씨, 껍질의 순으로 크게 나타났다. 포도의 껍질, 씨 및 송이가지 부위에 대한 분쇄상수 모형을 지수함수 모형으로 설정하였을 때 충진율의 영향을 평방근으로 반영한 모형이 가장 양호한 것으로 나타났다.
- 포도로부터 레스베라트롤을 함유한 페놀계 추출물을 효과적으로 추출하는 방법을 찾고자 하였다. 초음파 추출법이 캠벨 및 거봉 포도에 적용되었을 때, 기존의 용매 추출법에 비해 24~30%의 수율 향상을 얻을 수 있었다. 기존 방법은 알코올/물(80:20%, v/v) 혼합 용매를 이용하여 60℃에서 30분간 추출하였을 최고의 수율을 얻을 수 있었으나, 본 연구에서 개발된 초음파 추출법은 실온에서 약 5분 추출하여 기존의 방법보다 더 높은 수율을 얻을 수 있었다. 초음파 추출시 추출 반응을 제 1차 반응속도론을 적용하여 추출공정을 모형화할 수 있었다.
- 포도의 추출물에 함유되어 있는 레스베라트롤의 함량을 향상시키기 위해 원심분리, MF, SPE, 수용화 분획 등 몇 가지 분리정제법을 적용한 결과, 대량생산시의 비용 등을 고려하였을 때 수용화 분획법이 매우 효과적인 것으로 판단되었다. 수용화 분획법을 이용하여 추출물에서의 레스베라트롤의 순도를 약 10배 증가시킬 수 있는 것으로 평가되었다.
- 포도에는 다량의 페놀성 화합물이 함유되어 있는 것으로 분석되었다. 가지, 껍질, 씨, 과육 등 부위별로 추출물을 제조하여 분석하였을 때, 과육에는 약간의 procyanidins을 제외하면 페놀성 화합물이 거의 발견되지 않았으나 가지, 껍질, 씨에는 다양한 페놀성 화합물이 다량 함유되어 있는 것으로 나타났다. 특히, 가지에는 procyanidins, catechin, chlorogenic-like compounds가 다량 함유되어 있는 것으로 분석되었다.
- 국내에서 생산된 거봉 및 캠벨 포도의 씨, 줄기 및 껍질 추출물에 대하여 항산화 작용, 염증 관련 인자 생성에 미치는 활성 및 암세포 성장에 대한 영향 등을 resveratrol과 비교하여 평가하였다. 그 결과 포도 추출물 중 거

봉줄기, 캬벨줄기, 캬벨씨 및 거봉씨 추출물들이 항산화 능력을 나타내었고 그 중 거봉씨 추출물은 vitamin C와 효력이 유사하게 나타나 항산화 효능이 우수함을 알 수 있었다. 또한 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 cell을 이용하여 포도 추출물들의 LPS 처리에 의한 PGE₂ 및 NO 생성을 저해 여부를 확인한 결과, 거봉줄기, 거봉씨, 및 캬벨씨 추출물이 50 µg/mL에서 PGE₂ 및 NO 생성을 50% 가량 저해하는 효능을 나타내었다. 또한 사람 폐암 및 대장암 세포주를 이용하여 포도 추출물들이 암세포 성장 저해 효과를 나타내는지를 확인하였는데 거봉줄기 및 씨 추출물 50 µg/mL에서 30% 정도의 암세포 성장 저해 작용을 나타내었다.

- 정제한 포도가지 추출물의 효능을 평가한 바, 500 µg/mL의 농도에서 70~80%의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity의 효능을 보였으며, 특히 세리단 추출물은 레스베라트롤과 유사한 효능을 보였다. 또한, 정제한 추출물은 macrophage cells에서 lipopolysaccharide-induced nitric oxide의 생성을 저해하는 효과를 보인 바, 거봉 및 캬벨 가지 추출물은 각각 22.4 µg/mL 및 28.5 µg/mL IC₅₀ 값을 나타냈다. 그리고, 50 µg/mL의 농도에서 human cancer cells에 대한 cell proliferation의 억제 효과를 대조구와 비교하였을 때 30~40%의 효과를 보였다.
- 레스베라트롤을 고함유한 포도 껍질계 추출물 생산용 공정을 시뮬레이션에 의해 평가하고 현장에 적용한 결과, 대량 생산이 가능한 것으로 평가되었다. 생산된 추출물을 기능성 화장품의 원료로 활용하여 시제품을 제조하였다. 추출물 생산기술은 관련 산업체에 이미 기술이전 하였으며, 화장품 시제품은 업체와 공동으로 개발하였다. 포도는 우리 나라의 과실 산업에서 차지하는 비중이 매우 높다. 본 연구에서 개발된 기술이 포도 산업에서 적극 활용되어 추출물이 다량 생산될 경우, 포도와 관련하여 새로운 고부가가치 생산품이 창출되므로 포도산업의 고도화에 기여하는 바가 매우 클 것으로 전망된다.

SUMMARY

(영문 요약문)

I. Title

Development of a System to Produce Phenolic Extracts from Grapes

II. Objective and Significance

This study was performed to develop a system for production of grape phenolic extracts with resveratrol and evaluate their effects on the biological activities.

III. Scope of Research

- Analysis of resveratrol content in different parts of grapes
- Development of a preparation system of raw materials
- Development of an extraction system
- Development of a separation system
- Evaluation of effects of grape extracts on biological activities
- Analysis of an economical effect

IV. Results and Proposal for Practical Use

- When the contents of resveratrol in different parts of Gerbong, Campbell and Sheridan grapes produced in Korea were measured using HPLC analysis, resveratrol contents in the flesh, skin, seed and fruit stem of each grape showed large difference while there is a little difference among three cultivars. In fruit stem, and skin and seed, resveratrol contents were 170 to 440 $\mu\text{g/g}$ -dry weight (or 39 to 121 $\mu\text{g/g}$ -fresh weight) and 4 to 8 $\mu\text{g/g}$ -dry weight (or 1 to 4 $\mu\text{g/g}$ -fresh weight),

respectively. The fruit stem may be a good resource for resveratrol production.

- The characteristics of size reduction of grape skin, seed and fruit stem and model an operation of size reduction were analyzed. Among three components, the size reduction ratio of fruit stem was largest and followed by those of seed and skin. They increased with charge rate in a crusher. When Kick's constants for grape skin, seed and fruit stem were evaluated, the constant of fruit stem was largest and followed by those of skin and seed in the order. For Rittinger's constants, the constant of seed was larger than that of skin while that of fruit stem was largest among three grape components. The models of Kick's and Rittinger's constants were described in the forms of exponential functions with a parameter of charge rate reflected by the square root.

- In order to search an effective extraction of resveratrol from grapes, superior to a conventional solvent extraction, an ultrasonication-assisted method was explored. When the new extraction of resveratrol was applied to fruit stem of *Campbell* and *Gerbong* grapes, the recovery yield was increased by 24 to 30%, compared to that by the conventional solvent extraction with ethanol/water (80:20%, v/v) maintained at 60°C for 30 min. The ultrasonication-assisted extraction of resveratrol was modeled by the first-order reaction kinetics with reaction rate constants for extraction and degradation of resveratrol. For fruit stem of *Campbell* grape, the reaction rate constants k_1 and k_2 for extraction and degradation of resveratrol were 0.7797 min^{-1} and 0.06481 min^{-1} , respectively, while the parameters for fruit stem of *Gerbong* grape were 0.4773 min^{-1} and 0.03713 min^{-1} . In spite of the difference between two cultivars, the ratio of k_1 to k_2 was about 12 for both the cultivars. In simulation with the models for extraction and degradation of resveratrol, the maximum recovery of resveratrol from fruit stem of *Campbell* grape was $489.4 \mu\text{g/g}$ -dry material at the extraction time of 3.48 min. During this time, the amount of degraded compounds was shown with $83.1 \mu\text{g/g}$ -dry material. These figures indicated 79.8% and 13.6% of the total resveratrol in fruit stem of *Campbell* grape. Similarly, the maximum recovery of resveratrol for fruit stem of *Gerbong* grape and the amount of degraded compounds were 80.6% and 13.1%, respectively, of the total

resveratrol, which were calculated with 194.8 $\mu\text{g/g}$ -dry material and 31.6 $\mu\text{g/g}$ -dry material.

- It has been well known that reactive oxygen species (ROS) are implicated in many human diseases. Moreover, overproduced prostaglandins (PGs) by inducible cyclooxygenase (COX-2) and NO by inducible nitric oxide synthase (iNOS) cause tissue damages, chronic inflammation, and carcinogenesis. Therefore, free radical scavenger or the potential COX-2 or iNOS inhibitors have been considered as preventive or therapeutic agents for several diseases. In this study, the antioxidant and anti-inflammatory potentials of various grape extracts were evaluated. Extracts from Kyho seed, Kyho stem, and Campbell seed showed potent 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activities compared to resveratrol (IC_{50} = 16.9, 21.5, 21.9, 34.6 $\mu\text{g/mL}$, respectively). Especially, antioxidant effect of Kyho seed extract appeared similar to vitamin C (IC_{50} =12.2 $\mu\text{g/mL}$). Moreover, these extracts also exhibited inhibitory activities of lipopolysaccharide (LPS)-induced prostaglandin E_2 production and nitrite formation in mouse macrophage RAW 264.7 cells at 50 $\mu\text{g/mL}$. In addition, Kyho stem and seed extracts showed growth inhibitory activities in human lung and colon cancer cells. These results suggest that grape extracts have potential activities as antioxidants and anti-inflammatory agents.

- Since reactive oxygen species, prostaglandins, and nitric oxide are closely involved in various pathological conditions and play important roles in the initiation, promotion, and progression of carcinogenesis, agents that modulate the production or activity of them might be considered as cancer chemopreventive agents. In the present study, we evaluated chemopreventive potential of some grape shoot extracts and their refined materials using various *in vitro* assay systems. As a result, both grape shoot extracts and refined materials possessed effective radical scavenging activities about 70~80% at the concentration of 500 $\mu\text{g/mL}$, and especially, the Sheridan shoot extract showed the most potent 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity that was similar to resveratrol. In addition, refined materials from grape shoot extracts suppressed lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in macrophage cells,

and refined materials from Kyoho and Campbell shoot extracts exhibited similar inhibitory activities with IC_{50} value of 22.4 $\mu\text{g/mL}$ and 28.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively. In addition, at the concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$, all of refined materials inhibited cell proliferation against various human cancer cells about 30~40% compared to control. These findings suggest that grape shoot extract and their refined materials might be useful sources for the development of chemopreventive agents and/or functional foods.

- When a system developed in this study was simulated with mathematical models and applied to the field, it was concluded that a production-scaled system be available. The related technology have been transferred to a company.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1 Introduction	11
Section 1 Background and Significance	11
Section 2 Objective and Scope	13
Chapter 2 The State-of-the-art Report	15
Chapter 3 Contents and Results	17
Section 1 Resveratrol Contents of Grape Components	17
Section 2 Size Reduction and Drying of Raw Materials	22
Section 3 Extraction of Resveratrol	34
Section 4 Separation of Extracts	43
Section 5 Characteristics of Extracts (1)	49
Section 6 Characteristics of Extracts (2)	67
Section 7 Scale-up of Process	81
Section 8 Application of Extracts	89
Chapter 4 Achievement and Contribution to the Filed	94
Chapter 5 Utilization of the Results	95
Chapter 6 Collected Technical Information	98
Chapter 7 References	99

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	11
제 1 절 연구개발의 필요성	11
제 2 절 연구개발의 목표 및 범위	13
제 2 장 국내외 기술개발 현황	15
제 1 절 현황	15
제 2 절 문제점	16
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	17
제 1 절 포도의 부위별 레스베라트롤 함량	17
제 2 절 원료 전처리 시스템	22
제 3 절 레스베라트롤 추출 시스템	34
제 4 절 레스베라트롤 분리정제 및 후처리 시스템	43
제 5 절 추출물의 특성 (1)	49
제 6 절 추출물의 특성 (2)	67
제 7 절 레스베라트롤 생산공정의 scale-up	81
제 8 절 소재의 활용 및 산업적 효과	89
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	94
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	95
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	98
제 7 장 참고문헌	99

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

- 우리 나라에서 포도는 1997년 기준으로 95.7%가 생식용으로 소비되고 있어 포도 산업의 고도화에 기여하는 가공생산기술의 개발이 절실히 요구되고 있다. 나머지 4.3%의 포도는 가공용으로 소비되는데, 주스, 통조림, 포도주, 넥타, 식초, 잼 등이 주요 가공품이다.
- 현재의 포도 가공제품은 생산기술이 잘 알려져 있거나 부가가치가 다소 떨어지는 형태에 머무르고 있어 저조한 가공률로 인해 우리 나라 포도산업의 안정적 지지 역할을 제대로 하지 못하고 있는 실정이다.
- 포도의 과실, 줄기, 씨 등에는 약리 효과가 매우 뛰어난 페놀계 화합물들이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 그 중에서도 포도의 레스베라트롤(resveratrol)은 항산화 작용, 종양의 발생 및 억제 효과가 있으며 독성은 나타나지 않는 것으로 보고되고 있다. 또한, 저밀도 지방단백질 콜레스테롤(low density lipoprotein cholesterol)을 감소시키는 효과가 탁월하다고 알려져 있다.
- 우리 나라의 경우, 레스베라트롤과 같은 페놀계 화합물의 약리 효과에 대한 연구는 일부 수행되었으나, 생산기술에 관한 연구는 전혀 수행된 적이 없다. 포도의 페놀계 천연물 생산기술을 확보한다면 부가가치가 매우 큰 가공제품을 생산할 수 있어 우리 나라의 포도 산업을 고도화하는 데 크게 기여할 것으로 기대된다.
- 국내 천연물 소재의 분석기술은 선진국에 뒤지지 않는 수준이나 생산기술은 크게 미치지 못하는 수준이다. 이는 대량생산에 필요한 추출, 분리, 정제 등 공정의 스케일업(scale-up) 기술 및 생산시스템의 뒷받침이 부족한 탓이다. 가공산업의 고도화를 위해서는 공정기술 및 시스템의 질적 수준을 시급히 향상시켜야 한다.

2. 경제·산업적 측면

- 포도는 국내 과실 생산액의 20%를 차지하는 주요 경제 작물로서 1990년을 기점으로 급성장을 하여 매년 재배면적과 생산량이 증가하고 있으며, 1997년 기준으로 재배면적이 28,290 ha, 생산량이 393,195 톤에 이르고 있다. 이러한 양은 금액으로 6,088억 원에 해당한다.
- 세계무역의 자유화 물결로 인하여 국내 농산물의 경쟁력 확보는 매우 어려운 입장에 처해 있으며, 포도도 예외는 아니다. 그 동안 국내산 농산물 중에서 포도산업의 상대적 안정성은 유지되었으나 그것이 오히려 과잉생산을 촉발하는 조짐을 보이고 있을 뿐만 아니라, 칠레와의 자유무역협정 체결에 의한 포도 수입의 확대는 포도의 과잉 공급에 관한 시비를 불러일으키고 있다. 결국 과잉생산의 논란 속에서 국내 포도산업의 기반은 크게 약화될 우려가 있다.
- 우리 나라에서 포도는 주로 생식용으로 소비되고 있어 다른 과실에 비해 가공비율이 매우 저조한 편이다. 1997년 기준으로, 배의 가공률은 11.2%, 사과 9.3%, 복숭아 5.1%에 비해 포도의 가공률은 4.3%에 불과하다. 더욱이 포도의 주 가공품인 포도주스와 포도주의 국제경쟁력은 계속 약화되고 있는 추세에 있다. 주스류나 포도주의 경우, 품질과 가격 면에서 국제적으로 경쟁력을 갖춘 외국산 완제품 또는 원료가 국내로 쏟아져 들어오고 있다. 이러한 포도 산업의 구조는 우리 나라 포도 산업의 국제경쟁력을 크게 약화시키는 요인이다.
- 따라서, 포도 산업의 경쟁력 강화를 위하여 가공률을 크게 신장시켜야 하며, 주스류나 포도주와 같이 기존의 가공제품 이외에 현재보다 부가가치가 높고 국제경쟁력이 있는 제품에 대한 가공 및 생산기술이 절실히 요구되고 있다.

3. 사회·문화적 측면

- 포도의 1인당 연간 소비량은 1980년 이후 꾸준히 증가하여 1990년 3.1 kg에서 1997년 8.7 kg으로 281%나 증가하였다. 포도의 소비량 증가는 포도에 대한 기호뿐만 아니라 포도의 건강에 미치는 영향에 기인한다고 볼 수 있다.

- 포도의 소비 형태를 보면, 1997년 기준으로 생식용 소비율이 95.7%, 가공용 소비량이 4.3%를 구성하고 있다. 가공용 소비 형태를 구체적으로 살펴보면, 가공용 소비량 중에서 주스의 비율이 30.7%, 통조림 17.1%, 술 7.6%, 넥타 5.2%, 식초 5.1%, 잼 4.2%, 그리고 기타(1차 가공 또는 즙 제품) 30.1%로 나타났다. 이와 같이 포도의 저조한 가공률이나 저부가가치의 가공 형태로는 포도산업의 안정적 지지 효과를 기대하기가 어려운 형편이다.
- 포도가 건강에 미치는 유익한 효과는 예로부터 잘 알려져 있다. 최근에는 포도에 함유되어 있는 레스베라트롤의 효과가 알려지면서 포도에 대해 주어지는 관심이 새로워지고 있다. 레스베라트롤은 페놀계 화합물의 일종으로서 저밀도 지방단백질 콜레스테롤을 감소시키는 반면에 고밀도 지방단백질 콜레스테롤을 증가시키는 효과가 있는 것으로 보고되고 있어, 포도를 적당량씩 자주 섭취할 경우 고지혈증이나 심장병 치료에 매우 유익한 물질로 알려져 있다.
- 포도가 아무리 건강에 유익하다고 하더라도 생식용의 연중 소비는 포도의 생산과 저장성 문제로 인하여 한계가 있다. 1인당 포도 소비량이 우리와 비슷한 외국 중에서 이러한 문제를 극복하기 위하여 많은 양을 가공제품으로 소비하고 있어, 독일의 포도 가공률은 65.6%, 미국 56.0%, 스위스 68.0%, 오스트리아 82.4%, 일본은 30.4%에 이르고 있다.
- 우리 나라의 경우, 포도 산업을 안정적으로 지지할 수 있도록 기존의 포도 소비 유형 이외에 새로운 소비 유형을 창출할 필요가 있으며, 레스베라트롤과 같은 페놀계 추출물을 생산하여 식품, 의약품, 화장품의 소재로 활용하게 되면 국내 포도 산업의 고도화는 크게 확대될 수 있을 것이다.

제 2 절 연구개발의 목표 및 범위

1. 연구개발의 목표

국내산 포도를 원료로 하여 레스베라트롤이 다량 함유된 페놀계 추출물의 생산시스템을 개발하고, 기능성 화장품의 소재로서 추출물의 생물활성 효능을 평가한다.

2. 연구개발의 내용

- 국내산 포도의 주요 품종에 대해서 부위별 레스베라트롤의 함량 분석 : 포도의 과실 껍질, 씨, 송이가지 등에 함유된 레스베라트롤의 함량 및 유도체 분석

- 원료의 종류 및 형태별 전처리 시스템 개발 : 저장성이 매우 불량한 포도를 원료로 하므로 안정적 원료 확보 및 처리를 위한 원료의 농축, 냉동 등의 전처리 시스템

- 레스베라트롤의 추출 시스템 개발

- 레스베라트롤의 분리 및 정제 시스템 개발

- 추출물의 후처리 시스템 개발

- 추출물의 특성 분석: 폐놀계 추출물의 성분 분석 및 생물활성 효능 평가

- 레스베라트롤 생산공정의 scale-up 기술 개발

- 소재의 활용 방안 및 소재 생산의 산업적 효과 분석

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 현황

- 포도에는 많은 종류의 페놀계 화합물을 함유하고 있다. 그 중에서 레스베라트롤은 대표적인 스틸벤(stilbene) 계열의 페놀계 화합물이다. 레스베라트롤의 분자구조는 비교적 간단하고 이미 잘 알려져 있다. 그러나, 포도와 같은 천연물에는 여러 가지 유도체가 있는 것으로 알려져 있으며, 이에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.
- 레스베라트롤은 1970년대에 발견된 성분으로서 여러 가지 식물들에서 존재한다. 포도의 경우, 식물생장 중 오염될 수 있는 곰팡이에 대한 자기방어 물질로 만들어지는 것으로 알려져 있다. 미국 일리노이 대학의 Jang 등은 1997년 1월호의 Science에 발표한 레스베라트롤에 관한 연구에서 포도에서 추출하여 정제한 레스베라트롤이 항산화 작용과 종양 발생 및 진행의 억제 효과가 있으며 독성은 나타나지 않았다고 보고하였다.
- 미국 UC Davis의 Waterhouse 등은 레스베라트롤이 인체의 혈액에서 분리해 낸 저밀도 지방단백질 콜레스테롤의 산화를 방지하는 항산화 효과는 식이성 항산화제로서 현재까지 가장 효과가 좋은 것으로 알려진 비타민 E보다 5배나 높다고 하였다.
- 미국의 위스콘신대학의 Folts 등은 포도주스, 오렌지주스 및 자몽주스에 대한 심장병 예방 효과를 조사한 결과, 포도주스가 가장 좋다고 하였으며, 포도주의 알코올에 의한 해악을 고려한다면 포도주스가 더 유리하다고 하였다.
- 포도로부터 천연 레스베라트롤의 대량 생산을 위한 기술개발은 국내에서 전혀 시도된 적이 없으며, 프랑스와 같은 외국에서 생산기술을 확보하고 있으나 관련 기술의 공개를 차단하고 있다.

제 2 절 문제점

- 농업 생산물의 고부가가치를 창출하기 위하여 기존의 단순가공을 지양하고 기능성 생물소재를 생산하려는 노력은 국제적으로 활발히 경주되고 있다. 특히, 21세기의 생물산업시대에 걸맞은 경쟁력을 확보하기 위해서 생산기술의 경쟁이 더욱 치열해지고 있다.
- 천연물 소재의 생산 및 활용 기술은 자국의 기술기반이 튼튼할 때 획득될 수 있다는 인식 아래 국제적으로 기술보호 및 은닉 경향이 더욱 심화될 것으로 예측되고 있다.
- 농산물을 원료로 하는 천연물 소재의 생산기술을 확보할 경우, 단순가공에 비해 높은 부가가치의 가공제품을 생산할 수 있을 뿐만 아니라 자국의 농업을 더욱 공고히 할 수 있으나, 핵심기술의 확보가 용이하지 않다.
- 생물소재의 생산기술은 각국의 기술보호주의 아래 놓여 있어 외국으로부터의 기술도입이 용이하지 않다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 포도의 부위별 레스베라트롤 함량

1. 서론

포도가 건강에 미치는 유익한 효과는 예로부터 잘 알려져 있다. 최근에는 포도에 함유되어 있는 레스베라트롤의 효과가 알려지면서 포도에 대한 관심이 새로워지고 있다. 레스베라트롤(*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene, $C_{14}H_{12}O_3$)은 스틸벤 계열의 물질로서 포도 등 식품의 여러 부위에 존재하며, 지방 과산화 억제 및 프리 라디칼 소거 기능과 같은 항산화 작용, cyclooxygenase 저해 등의 항염증 작용, 암세포 성장 억제 및 암 예방 효능 등 다양한 생리 활성을 지니고 있다고 알려져 있다⁽¹⁻⁵⁾. 이와 같이 레스베라트롤을 다량 함유하고 있는 것으로 알려진 포도는 기능성 식품이나 의약품의 원료로서 가치가 크다고 할 수 있다.

한편, 포도는 국내 과실 생산액의 20%를 차지하는 주요 경제 작물로서 1995년부터 생산 규모가 급증하였고, 2001년도에는 26,803 ha의 재배 면적에서 453,578 톤이 생산되었다⁽⁶⁾. 그 동안 국내산 농산물 중에서 포도 산업의 상대적 안정성은 잘 유지 되었으나 그것이 오히려 과잉 생산을 불러 일으키는 조짐을 보이고 있다. 뿐만 아니라 칠레와의 자유무역협정 체결에 따른 포도 수입의 확대는 국내 포도 산업의 위기를 초래할 우려가 있다. 이에 국내 포도 산업의 경쟁력 강화를 위한 여러 가지 방안을 강구할 필요가 있다. 이와 관련하여 레스베라트롤을 생산하기 위한 자원으로 포도를 활용할 수 있을 것이다.

그러나, 국내산 주요 포도 품종의 레스베라트롤 함량에 대한 정보는 거의 없는 형편이다.

따라서, 본 연구는 국내산 주요 포도 품종을 대상으로 부위별 레스베라트롤 함량을 분석하여 국내 포도 산업의 고도화 방안 마련을 위한 기초 자료를 확보하고자 수행되었다.

2. 재료 및 방법

가. 포도

레스베라트롤 함량 분석을 위해 국내에서 생산되고 있는 포도 중 주요 품종으로 알려진 거봉(천안, 2001년 9월산), 캠벨(영동, 2001년 9월산) 및 세리단(영동, 2001년 10월산)을 수집하였다. 포도를 과육, 과피, 씨 및 송이가지로 분리하여 동결건조하여 실험에 사용하였다.

나. 레스베라트롤 추출

레스베라트롤은 Adrian 등⁽⁷⁾의 방법을 변형하여 추출하였다. 즉, 막자 사발을 이용하여 동결건조된 시료에 액체 질소를 투입하면서 분쇄하였다. 분쇄된 시료 1 g에 메탄올-증류수(8:2 v/v) 용액 10 mL를 가하여 현탁시킨 후 초음파 처리기(Branson 5210, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, USA)로 10분간 처리하여 추출하였다. 추출물을 함유한 용액을 10,000 g에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 취하고 Sep-Pak C₁₈(Waters, Milford, MA, USA)을 이용하여 용출하였고, 용출액을 40℃ 이하에서 감압증발하여 포도 추출물을 얻었다. 한편, 시료를 추출하는 동안 트랜스형 레스베라트롤이 시스형으로 변환하는 것을 방지하기 위하여 빛이 차단된 환경에서 시료 처리가 이루어졌다.

다. HPLC

포도의 레스베라트롤 함량은 HPLC 분석법에 의해 측정되었다. 추출된 시료를 200 µL의 메탄올에 녹여 HPLC에 주입하였다. HPLC는 펌프(Jasco PU-98), 인젝트(Jasco AS-950-10), 감지기(Jasco UV-975), 적분기(Computer-Brown software), 컬럼(XTerra™ RP18: 4.6 mm×250 mm, 5 µm) 등으로 구성되었다. HPLC 분석 조건은 다음과 같다. Acetonitrile/water를 용매로 하여 gradient 조건 하에서 0.6 mL/min의 유동속도로 50분간 작동시켰다. 이때 시료 주입량은 20 µL이었고, 용매의 gradient 조건은 8분까지 4:6의 acetonitrile/water, 35분까지 1:9, 그리고 50분까지 다시 4:6으로 조정되었으며, 레스베라트롤 함량은 308 nm에서 측정되었다. 한편, 표준물질로는 Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA)의 레스베라트롤을 구입하여 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

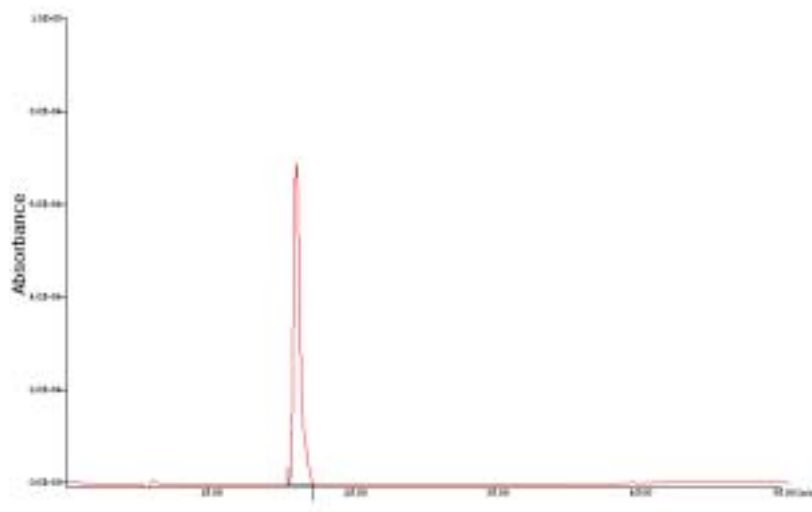
Fig. 1-1은 표준물질로 사용한 레스베라트롤과 캠벨 포도의 송이가지로부터

추출한 추출물에 대한 HPLC 분석 예를 나타낸 것이다. 트랜스형 레스베라트롤은 체류시간이 15.87분 경과하였을 때 피크를 보였다.

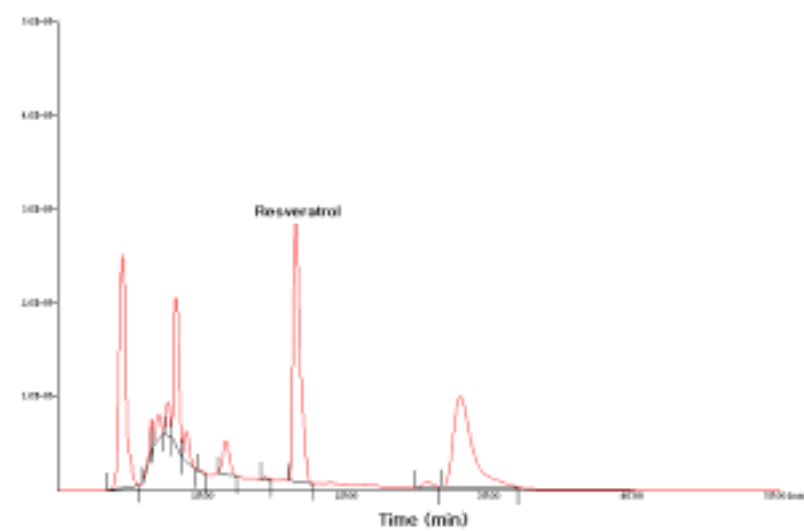
Table 1-1. Contents of resveratrol in different parts of grapes

Cultivar	Component	Resveratrol content	
		µg/g-dry weight	µg/g-fresh weight
Gerbong	Flesh	<1	<1
	Skin	5	<1
	Seed	6	4
	Fruit stem	170	39
Campbell	Flesh	<1	<1
	Skin	5	<1
	Seed	5	3
	Fruit stem	411	121
Sheridan	Flesh	3	<1
	Skin	8	1
	Seed	4	2
	Fruit stem	440	110

Notes) Each value represents the mean of 4 observations.



(a)



(b)

Fig. 1-1. HPLC analysis of (a) standard *trans*-resveratrol and (b) a grape extract from Campbell fruit stem. Retention time for *trans*-resveratrol: 15.87 min.

Table 1-1은 국내산 주요 포도 품종에 대해서 부위별 레스베라트롤 함량을 건물중량 기준과 생체중량 기준으로 나타낸 것이다. 거봉, 캠벨, 세리단 모두의 경우 부위별 레스베라트롤 함량은 큰 차이를 보였으나, 품종간 차이는 크지 않은 것으로 나타났다. 가장 많은 레스베라트롤을 함유하고 있는 부위는 송이가지로 나타나 세리단의 송이가지에는 440 $\mu\text{g/g-dry weight}$ (또는 110 $\mu\text{g/g-fresh weight}$)의 레스베라트롤이 함유되어 있고, 캠벨과 거봉의 송이가지에는 각각 411 $\mu\text{g/g-dry weight}$ (또는 121 $\mu\text{g/g-fresh weight}$) 및 170 $\mu\text{g/g-dry weight}$ (또는 39 $\mu\text{g/g-fresh weight}$)가 함유되어 있는 것으로 분석되었다. 반면에 포도 과피와 씨의 경우 송이가지에 비해 레스베라트롤의 함량이 매우 적어 4~8 $\mu\text{g/g-dry weight}$ (1~4 $\mu\text{g/g-fresh weight}$)의 레스베라트롤을 함유하고 있는 것을 나타냈다. 한편, 포도 과육에는 레스베라트롤이 거의 함유되어 있지 않은 것으로 나타났다. Jeandet 등⁽⁸⁾은 포도의 발달 단계별로 레스베라트롤의 함량을 측정한 결과, 포도가 성숙할수록 레스베라트롤의 함량은 감소하는 것으로 나타났으며 포도 열매의 레스베라트롤 함량은 3 $\mu\text{g/g-fresh weight}$ 이하로 나타났다고 하였다. 이러한 결과는 본 연구에서 측정한 레스베라트롤 함량과 유사함을 알 수 있다. 이와 같은 결과를 볼 때, 레스베라트롤을 생산하기 위한 자원으로는 포도의 송이가지가 유용한 것임을 알 수 있다.

4. 요약

국내산 주요 포도 품종에 대해서 부위별 레스베라트롤 함량을 HPLC 분석법을 이용하여 측정하였다. 거봉, 캠벨, 세리단 포도의 과육, 과피, 씨, 송이가지에 함유되어 있는 레스베라트롤의 함량은 품종간 차이는 거의 나타나지 않았으나 부위별로 차이가 매우 큰 것으로 나타났다. 송이가지에 함유되어 있는 레스베라트롤의 함량은 과피에 비해 34~55배나 많고 씨에 비해서는 43~73배나 많은 수준이었다. 레스베라트롤을 생산하기 위한 자원으로서 포도를 활용하기 위해서는 송이가지가 적합한 것으로 나타났다.

제 2 절 원료 전처리 시스템

1. 서론

분쇄는 농산물과 생물자원을 활용함에 있어 필수적으로 요구되는 단위조작 중의 하나이다. 우리 나라의 산지 가공공장의 실태 조사에서도 분쇄 작업은 가장 빈도수가 많은 단위조작의 하나로 조사된 바 있다. 그럼에도 불구하고 분쇄 공정의 설계는 거의 경험에 의존하고 있으며, 국내 식품기계산업의 취약한 구조로 인하여 경험마저도 부족한 형편에서 현장에서는 많은 어려움을 호소하고 있는 실정이다(조용진과 곽창근, 2000).

분쇄 작업에서는 목표로 하는 입도를 얻기 위해 소요되는 에너지가 우선 분석되어야 한다. 이에 관한 이론적 토대는 이미 오래 전에 확립되어 있다. 즉, 분쇄에 소요되는 에너지는 Kick의 법칙, Rittinger의 법칙, Bond의 법칙 등에 의해 해석되고 있다(Brennan et al., 1976; Fellows, 1988). 이러한 이론적 바탕이 마련되어 있음에도 불구하고 분쇄 공정에 대한 설계시 제대로 활용되고 있지 못한 것은 각 원료에 대한 분쇄상수(Kick의 상수, Rittinger의 상수, Bond의 상수 등)가 충분히 구명되어 있지 않기 때문인 것으로 파악되고 있다(조용진과 곽창근, 2000).

최근, 생물자원으로부터 유용한 기능성 소재를 탐색하고 대량생산하는 기술에 대한 관심은 국내외적으로 고조되어 있다. 그 중에서도 천연물 자원에서 유용 소재를 추출하는 분야는 매우 중요한 위치를 차지하고 있다. 여기서 추출 작업이 효과적으로 이루어지기 위해서는 추출 과정 못지 않게 원료 조제 즉, 건조, 분쇄 등의 작업이 잘 뒷받침되어야 한다. 많은 경우 추출 공정에서 사용되는 원료의 형태가 분말이기 때문이다. 그런데 원료 분말의 입도는 추출 효과에 매우 큰 영향을 미치게 되는데, 원료의 입도가 작을수록 추출 성능에 유리하게 작용하게 되나 지나치게 작은 입도는 용매의 순환에 저항을 주게 되어 오히려 불리하게 작용할 수 있다(Charm, 1971). 결국, 추출용 원료의 입도와 분쇄에 소요되는 에너지에 대한 고찰은 추출물 제조의 생산성의 평가와 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다.

한편, 건조는 가공용 원료의 저장, 처리, 조제 등과 관련하여 필요한 전처리 과정이다.

따라서, 본 연구에서는 최근 관심의 대상이 되고 있는 포도의 폐놀성 추출물을 생산하는 공정 개발과 관련하여 포도의 분쇄 특성을 파악하고, 적절한 건조 조건을 찾고자 하였다. 특히, 포도에는 스틸베노이드계 물질인 레스베라트롤이 많이 함유되어 있으며, 부위별로 함유량이 큰 차이를 보이고 있음이 보고된 바 있어(조용진 등, 2003), 포도의 부위별로 자원을 활용하고자 할 때 그에 따른

분쇄 특성의 이해가 요구되는 바, 포도의 껍질, 씨 및 송이가지의 분쇄 특성을 분석하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 공시재료

실험에 사용한 포도는 2001년도 및 2002년도에 생산된 캠벨(영동산)과 거봉(천안산), 세리단(영동산)으로서 서울 가락동 농수산물시장에서 구입하였다.

나. 건조

대량처리가 가능한 동결건조기를 이용하여 거봉, 캠벨, 세레단의 과피, 씨, 줄기, 과육의 동결건조조건 및 건조후 수분함량을 측정하였다.

다. 분쇄

포도는 껍질, 씨 및 송이가지의 부위별로 분리하여 동결건조한 후 분쇄하였다. 분쇄 작업에는 분석용 분쇄기(Samsung MC-903)를 사용하였다. 분쇄기의 정격 전력과 용량은 각각 190 W와 900 mL이다. 포도의 분쇄 특성을 분석하기 위해 적용된 절차는 다음과 같다. 먼저 거칠게 분쇄하여 초기 입도를 임의로 설정하였고, 충진율을 달리하여 90초 동안 분쇄된 분말의 입도를 분석하였다.

라. 입도 분석

포도의 부위별로 분쇄 작업을 한 후, ASAE Standard S319.2(ASAE, 1994)에 근거하여 체 분석을 실시하고, 그 자료를 이용하여 입도를 분석하였다. Table 2-1은 표준 체 목록을 나타낸 것이며, (1) 식과 (2) 식은 각각 분말의 평균 입도와 표준편차를 구하는 방법을 나타낸 것이다(ASAE, 1994).

Table 2-1. Standards sieves for determining fineness of pulverized materials

US standards sieve no.	Tyler designation	Nominal sieve opening	
		mm	inch
4	4	4.76	0.187
6	6	3.36	0.132
8	8	2.38	0.0937
12	10	1.68	0.0661
16	14	1.19	0.0469
20	20	0.841	0.0331
30	28	0.595	0.0234
40	35	0.420	0.0165
50	48	0.297	0.0117
70	65	0.210	0.0083
100	100	0.149	0.0059
140	150	0.105	0.0041
200	200	0.074	0.0029
270	270	0.053	0.0021
Pan			

$$d_{gw} = \log^{-1} \left[\frac{\sum (w_i \log \bar{d}_i)}{\sum w_i} \right] \quad (1)$$

$$s_{gw} = \log^{-1} \left[\frac{\sum w_i (\log \bar{d}_i - \log d_{gw})^2}{\sum w_i} \right]^{1/2} \quad (2)$$

여기서, d_i : i 번째 체의 명목 체눈의 크기(mm)

d_{i+1} : i+1 번째 체의 명목 체눈의 크기(mm)

d_{gw} : 시료의 기하평균 직경(mm)

\bar{d}_i : i 번째 체에 있는 입자의 기하평균 직경(mm) 즉, $(d_i \times d_{i+1})^{1/2}$

S_{gw} : 시료의 기하 표준편차

w_i : i 번째 체에 있는 질량(g)

마. 분쇄비

분쇄 특성을 파악하는 하나의 방법으로서 분쇄비를 분석하였다. 분쇄비(size reduction ratio)는 초기 입도에 대비한 분쇄 후 입도의 비를 나타내며, (3) 식으로 표시하였다. 여기서 초기 입도는 거칠게 예비분쇄를 한 시료의 입도를 의미한다.

$$\text{Size reduction ratio} = \frac{L_1}{L_2} \quad (3)$$

여기서 L_1 : 초기의 평균 입도
 L_2 : 분쇄후 평균 입도

바. 분쇄상수

분쇄 특성을 파악하는 또다른 방법으로서 분쇄상수를 분석하였다. 분쇄상수는 Kick의 상수와 Rittinger의 상수를 산출하여 비교하였다(Charm, 1971; Fellows, 1988). (4) 식과 (5) 식은 각각의 Kick의 법칙과 Rittinger의 법칙을 나타낸 것이다.

$$E = K_K \ln\left(\frac{L_1}{L_2}\right) \quad (4)$$

여기서 E : 단위 무게당 분쇄 에너지
 K_K : Kick의 상수
 L_1 : 초기의 평균 입도
 L_2 : 분쇄후 평균 입도
 $\frac{L_1}{L_2}$: 분쇄비

$$E = K_R \left(\frac{1}{L_2} - \frac{1}{L_1}\right) \quad (5)$$

여기서 E : 단위 무게당 분쇄 에너지
 K_R : Rittinger의 상수
 L_1 : 초기의 평균 입도

L_2 : 분쇄후 평균 입도

3. 결과 및 고찰

가. 동결건조 특성

초기함수율은 과육이 가장 높아 82.6~84.4%(wb) 범위였고, 씨가 가장 낮아 26.2~42.0%(wb) 범위였다. 그리고 과피와 가지의 함수율은 각각 80.5~81.9%(wb), 70.6~77.0%(wb) 범위로 나타났다. 이와 같이 포도의 수분함량은 품종별 차이로 거의 없었으나 부위별 차이는 매우 크게 나타났다. 이러한 원료를 장기저장과 분쇄작업을 용이하게 하기 위해 동결건조 하였다. 건조조건은 실용화를 위한 대량작업을 고려하여 Table 2-2와 같이 설정하였을 때 건조 작업이 원활히 이루어졌으며, 건조소요시간은 24시간이 적당한 것으로 나타났다. Table 2-3은 원료의 전처리를 위해 동결건조를 한 포도의 함수율을 나타낸 것이다.

Table 2-2. Freezing dry conditions for grape

Drying parameter	Condition
Freezing temperature	-35℃
Maximum pressure during drying	1.0 torr in 5 hr
Ending pressure	0.29 torr in 20 hr
Total drying time	24 hr

Table 2-3. Moisture content before and after freezing drying

Cultivar	component	Moisture content (% , wb)	
		Initial	Final
Gerbong	Flesh	83.9	6.60
	Skin	80.6	3.77
	Seed	26.2	2.42
	Fruit stem	77.0	5.57
Campbell	Flesh	82.6	4.72
	Skin	81.9	3.36
	Seed	37.0	3.35
	Fruit stem	70.6	8.71
Sheridan	Flesh	84.4	5.56
	Skin	80.5	5.20
	Seed	42.0	5.81
	Fruit stem	75.0	4.80

Notes) Moisture content: 3 replications

가. 포도의 분쇄비

Fig. 2-1은 분쇄기의 충전율에 따른 포도의 껍질, 씨 및 송이가지의 분쇄비를 나타낸 것이다. 분쇄비는 분쇄후 평균 입도에 대한 분쇄전의 평균 입도의 비를 나타낸 것으로서 분쇄 효과를 나타내는 주요 척도 중의 하나이다. 포도의 부위별 분쇄비를 분석한 결과, 포도 송이가지의 분쇄비가 가장 큰 것으로 나타났다. 이러한 결과를 볼 때, 포도의 송이가지는 포도의 껍질이나 씨보다 분쇄에 의한 입도 변화가 더 큼을 알 수 있다. 거봉 포도의 송이가지를 분쇄기 용적 대비 중량 즉, 충전율을 0.05 kg/L로 하여 원료를 투입하였을 때 분쇄비는 1.378로 나타났다. 반면에 캠벨 포도의 껍질과 씨의 경우 동일한 충전율에서 분쇄비는 각각 1.107 및 1.128로 나타나 송이가지보다 작은 값을 보였다. 그런데, 포도 껍질과 씨의 경우, 충전율이 0.05 이하에서는 씨의 분쇄비가 껍질보다 크게 나타나, 이러한 충전율 범위에서는 씨의 분쇄 효과가 껍질보다 큼을 알 수 있다. 그런데 충전율이 0.1이 되었을 때는 오히려 껍질의 분쇄비가 씨보다 크게 나타났다. 종합적으로 볼 때, 포도의 3가지 부위 모두 충전율이 증가함에 따라 분쇄비가 증가하는 것으로 나타났다. 즉, 분쇄기에 원료를 적합하게 충전해야 양호한 분쇄 효과를 얻을 수 있음을 알 수 있다.

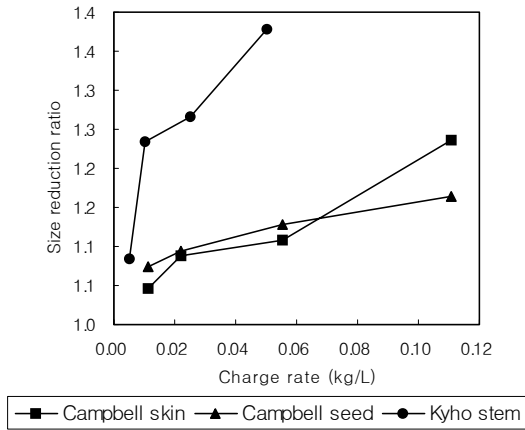


Fig. 2-1. Size reduction ratio with respect to charge rate for different components of grapes.

나. 포도의 분쇄상수

Fig. 2-2와 Fig. 2-3은 각각 Kick의 분쇄법칙과 Rittinger의 분쇄법칙에서의 분쇄상수를 구하여 나타낸 것이다. 일반적으로 Kick의 법칙은 거친 분쇄를 잘 묘사하고, Rittinger의 법칙은 미분쇄를 잘 묘사하는 것으로 알려져 있다 (Charm, 1971; Fellows, 1988). 포도의 경우, 부위별 원료를 수백 μm 의 입도로 분쇄하였을 때 나타나는 분쇄상수를 보면, Kick의 분쇄상수와 Rittinger의 분쇄상수에 대한 경향 비교에서 껍질과 씨 사이에는 큰 차이를 보였으나 송이까지는 유사한 것으로 나타났다. 충전율이 0.01~0.05 kg/L의 범위에서, 껍질의 Kick 분쇄상수는 3.36~38.20 kJ/g으로 나타나 씨의 2.84~24.09 kJ/g보다 크게 나타났으나, 충전율이 0.11 kg/L에서는 씨의 Kick 분쇄상수가 1.13 kJ/g으로서 껍질의 0.81 kJ/g보다 오히려 크게 나타났다. 반면에 Rittinger의 분쇄상수는 충전율 0.01~0.11 kg/L의 범위에서 씨의 경우 0.79~17.65 kJmm/g으로 나타났고, 껍질의 경우 0.31~16.21 kJmm/g으로 나타났다. 이와 같이 포도의 껍질 및 씨의 분쇄상수는 적용한 분쇄법칙에 따라 상이한 특징을 보였다. 한편, 전체적으로 두 유형의 분쇄상수 모두 분쇄기의 충전율이 증가할수록 분쇄상수는 급격하게 감소하는 것으로 나타났다. 여기서 분쇄상수가 작을 경우 분쇄에 소요되는 에너지도 비례하여 작게 산출되는 점을 고려한다면 분쇄기의 충전율을 적절하게 조절함으로써 분쇄를 보다 효과적으로 수행할 수 있음을 알 수 있다.

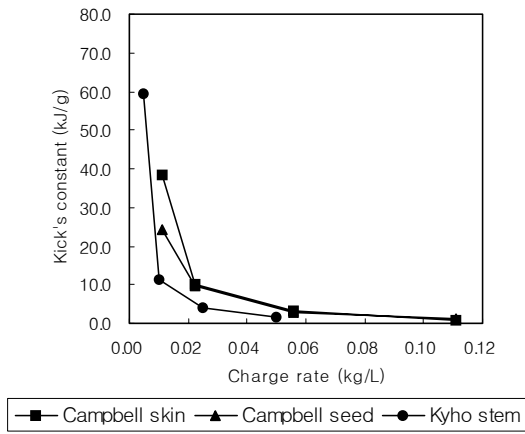


Fig. 2-2. Kick's constant versus charge rate in pulverization of different components of grapes.

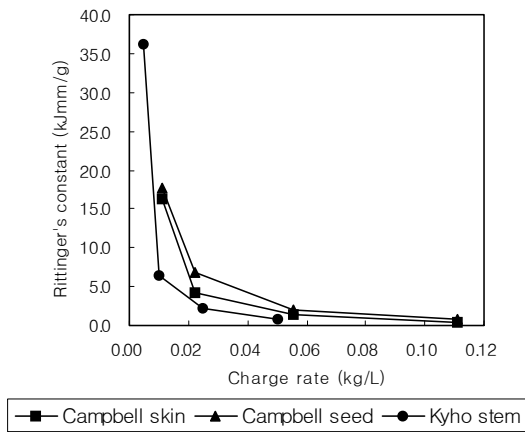


Fig. 2-3. Rittinger's constant versus charge rate in pulverization of different components of grapes.

다. 분쇄 모형

여기서는 포도의 부위별 분쇄특성을 예측할 수 있는 모형을 제시하고자 한

바, 포도의 부위별로 Kick의 분쇄법칙과 Rittinger의 분쇄법칙을 각각 적용하여 충전율에 따른 분쇄상수를 수학적 모형으로 나타내고 각 모형을 평가하였다. 앞에서 분석한 결과에 근거하여, Kick의 분쇄상수와 Rittinger의 분쇄상수를 충전율의 증가에 따라 지수함수적으로 감소하는 모형으로 설정하였으며, 충전율의 영향을 1차승, 평방근 및 제곱승으로 반영하여 평가한 결과를 Table 2-4~2-9에 나타내었다. 표에 나타낸 모든 모형은 5% 유의수준에서 모두 유의한 모형으로 평가되었으며, 포도의 껍질, 씨 및 송이가지에 대한 충전율의 영향을 평방근으로 반영한 모형이 가장 양호한 것으로 나타났다. 한편, 모형에 대한 결정계수 측면에서 포도의 껍질, 씨 및 송이가지에 대한 Kick의 모형과 Rittinger의 모형 사이에는 차이가 거의 없는 것으로 나타났다.

Table 2-4. Models of Kick's constant with charge rate for *Compbell* grape skin

Model	Coefficient of determination
$K_K = 33.02e^{-35.18q}$	0.927
$K_K = 155.40e^{-16.07\sqrt{q}}$	0.975
$K_K = 16.05e^{-258.80q^2}$	0.809

Notes) K_K : Kick's constant (kJ/g)
q: charge rate (kg/L)

Table 2-5. Models of Kick's constant with charge rate for *Compbell* grape seed

Model	Coefficient of determination
$K_K = 21.85e^{-28.70q}$	0.916
$K_K = 78.73e^{-13.19\sqrt{q}}$	0.976
$K_K = 11.99e^{-208.06q^2}$	0.777

Notes) K_K : Kick's constant (kJ/g)
q: charge rate (kg/L)

Table 2-6. Models of Kick's constant with charge rate for *Kyho* grape stem

Model	Coefficient of determination
$K_K = 39.77e^{-71.37q}$	0.840
$K_K = 173.99e^{-22.32\sqrt{q}}$	0.919
$K_K = 39.77e^{-71.37q^2}$	0.840

Notes) K_K : Kick's constant (kJ/g)
 q : charge rate (kg/L)

Table 2-7. Models of Rittinger's constant with charge rate for *Compbell* grape skin

Model	Coefficient of determination
$K_R = 14.11e^{-35.98q}$	0.930
$K_R = 68.51e^{-16.42\sqrt{q}}$	0.976
$K_R = 6.76e^{-265.11q^2}$	0.814

Notes) K_R : Rittinger's constant (kJ · mm/g)
 q : charge rate (kg/L)

Table 2-8. Models of Rittinger's constant with charge rate for *Compbell* grape seed

Model	Coefficient of determination
$K_R = 16.02e^{-29.09q}$	0.917
$K_R = 58.67e^{-13.37\sqrt{q}}$	0.977
$K_R = 8.71e^{-211.00q^2}$	0.778

Notes) K_R : Rittinger's constant (kJ · mm/g)
 q : charge rate (kg/L)

Table 2-9. Models of Rittinger's constant with charge rate for *Kyho* grape stem

Model	Coefficient of determination
$K_R = 23.81e^{-73.64q}$	0.839
$K_R = 109.18e^{-23.03\sqrt{q}}$	0.918
$K_R = 11.74e^{-1168.76q^2}$	0.692

Notes) K_R : Rittinger's constant (kJ · mm/g)
 q : charge rate (kg/L)

Table 2-10은 본 연구에서 개발한 포도의 각 부위별 분쇄모형의 예측 능력을 비교한 예를 나타낸 것이다. 포도의 껍질, 씨 및 송이가지를 분말 원료로 제조하였을 때 실제로 얻은 평균 입도를 2종의 분쇄모형과 비교하였을 때 예측 입도가 측정 입도와 잘 일치하는 것으로 나타났다. 수분함량이 7.7%인 캠벨 포도의 껍질을 분쇄하였을 때 평균 입도가 0.351 mm이었으며, 예측 입도는 Kick의 모형에서 0.346 mm, Rittinger의 모형에서 0.347 mm로 산출되었다. 캠벨 씨의 경우, 측정 입도는 0.652 mm, Kick의 모형에 의한 예측 입도는 0.639 mm, Rittinger 모형에 의한 예측 입도는 0.640 mm로 산출되었다. 거봉 포도의 송이가지도 경우에서도 측정 입도와 예측 입도는 서로 유사한 값을 가지는 것으로 나타났다.

Table 2-10. Measured and predicted fineness of pulverized grape components

Grape component	Moisture content (%)	Measured diameter (mm) (standard deviation)	Predicted diameter ¹⁾ (mm)	
			by Kick's model	by Rittinger's model
<i>Campbel</i> skin	7.7	0.351 ²⁾ (2.50)	0.346	0.347
<i>Campbel</i> seed	7.6	0.652 ²⁾ (2.03)	0.639	0.640
<i>Kyho</i> stem	9.8	0.460 ³⁾ (2.39)	0.424	0.429

Notes) ¹⁾ The diameters were predicted by using $K = ae^{-b\sqrt{q}}$.

²⁾ Charge rate is 0.11 kg/L.

³⁾ Charge rate is 0.05 kg/L.

4. 요약

식품 및 생물재료의 분쇄 작업은 가장 흔히 사용되는 단위조작 중의 하나임에도 불구하고 국내산 농산물의 자원화와 관련하여 공정설계를 위해 활용할 수 있는 구체적 자료는 제대로 마련되어 있지 않다. 본 연구에서는 포도의 껍질, 씨 및 송이가지의 분쇄특성을 분석하고, 그것을 반영한 분쇄모형을 제시하고자 하였다. 분쇄비는 포도의 송이가지, 씨, 그리고 껍질의 순으로 크게 나타났으며, 분쇄기의 충진율 증가에 따라 동반하여 분쇄비는 증가하였다. 포도의 껍질, 씨 및 송이가지에 대한 분쇄상수를 비교한 결과, Kick의 분쇄상수에서는 동일한 충진율에서 송이가지, 껍질, 씨의 순으로 크게 나타났으나, Rittinger의 분쇄상수에서는 송이가지, 씨, 껍질의 순으로 크게 나타났다. 포도의 껍질, 씨 및 송이가지 부위에 대한 분쇄상수 모형을 지수함수 모형으로 설정하였을 때 충진율의 영향을 평방근으로 반영한 모형이 가장 양호한 것으로 나타났다.

한편, 포도의 부위별로 동결건조를 실시한 결과 분쇄에 적절한 함수율을 얻기 위해서는 약 20시간이 소요되었다.

제 3 절 레스베라트롤 추출 시스템

1. Introduction

Resveratrol, trans-3,5,4-trihydroxystilbene, which is formed by the Shikimic pathway with three molecules of malonyl-CoA and one molecule of p-coumaroyl-CoA, is one of antifungal compounds in grapes (Langcake & Pryce, 1976; Jeandet, Bessis, & Gautheron, 1991; Gerats & Martin, 1992; Jeandet, Bessis, Sbaghi, Meunier, & Trollat, 1995). In 1997, resveratrol got a lot of press as a heart-healthy anticancer compound and the press promoted the fruit of grape as the best source of the resveratrol (Cseke & Kaufman, 1999). Grape wine which is known to have resveratrol extracted from fruit skin of grape is being believed to be a very healthy beverage, even though it may actually cause so-called French Paradox (Lamuella-Raventós & Waterhouse, 1993; Goldberg, Tsang, Karumanchiri, Diamandis, Soleas, & Ng, 1996; Pezet & Cuenat, 1996).

In grape, however, other parts may also be a source of resveratrol rather than its fruit including flesh, skin and seed. Cho, Kim, Chun, Kim, Kim, & Kim (2003) reported that the contents of resveratrol in peduncle, or fruit stem, were 170 to 440 $\mu\text{g/g}$ -dry material whereas those in skin and seed were 4 to 8 $\mu\text{g/g}$ -dry material and that in flesh was hardly detected.

Resveratrol can be extracted with alcoholic solvents. Of them, ethanol is being mainly utilized due to the use of resveratrol as a food and health ingredient as well as the efficiency of extraction. Romero-Pérez, Lamuela-Raventós, Andrés-Lacueva, & Carmen de la Torre-Boronat (2001) had investigated the effects of solvent type, time and temperature on the extraction of resveratrol from grape berry skins. In their study, the highest yield of resveratrol was obtained with ethanol/water 80:20% (v/v), out of 5 different types of solvents such as ethanol/water 80:20% (v/v), ethanol 100%, ethyl acetate/methanol 50:50% (v/v), acetone/water 75:25% (v/v), and acetone 100%. In addition, they reported that the maximum recovery for extraction of resveratrol was obtained at 60°C in 30 min because a severe condition in extraction with an ethanol/water could cause an adverse effect due to its degradation.

In order to extract phytochemicals from plants, several different methods are being utilized, including chemical methods (Romero-Pérez,

Lamuela-Raventós, Andrés-Lacueva, & Carmen de la Torre-Boronat, 2001; Cho & Hwang, 2000), physical methods (Cho, Kim, Kim, & Hwang, 1999), enzymatic methods (Renard, Thibault, Voragen, van den Broke, & Pilnik, 1993; Sakamoto, Hours, & Sakai, 1995; Cho & Lee, 2002), and so on. In general, chemical methods are more popular to obtain phytochemicals from plants. Physical and enzymatic methods are being concerned as alternative methods to solve problems related to environment and safety. Cho, Lee, Ahn, & Pyee (2003) had studied on ultrasonication-assisted extraction of pinosylvin, a stilbenoid phytoalexin, from pine leaves. They reported the ultrasonication-assisted extraction at a room temperature was very effective.

In this study, therefore, an ultrasonication-assisted extraction was investigated to obtain resveratrol, a stilbenoid phytoalexin, from fruit stem of grapes with an ethanol/water solvent at a lower temperature. Especially, a new extraction was modeled with reaction kinetics.

2. Materials and method

2.1. Mathematical modeling

In this study, it was assumed that resveratrol bound within cells could be solubilized to free resveratrol by ultrasonication treatment in a chamber with an ethanol/water solvent and then part of the solubilized resveratrol would be degraded into lower molecular compounds. From this assumption, the mathematical model for extraction of resveratrol can be described as follows:



where R_b is the resveratrol bound within cells, R_s is the solubilized resveratrol, C_d is the lower molecular compounds degraded from the free resveratrol, k_1 is the reaction rate constant for extraction of resveratrol, and k_2 is the reaction rate constant for degradation of resveratrol into lower

molecular compounds.

Using first-order reaction kinetics, the differential equations for the concentrations of the components involved within the reaction system are:

$$\frac{d[R_b]}{dt} = -k_1[R_b] \quad (2)$$

$$\frac{d[R_s]}{dt} = k_1[R_b] - k_2[C_d] \quad (3)$$

$$\frac{d[C_d]}{dt} = k_2[R_s] \quad (4)$$

Meanwhile, the law of mass conservation is:

$$[R_{bo}] = [R_b] + [R_s] + [C_d] \quad (5)$$

where $[R_{bo}]$ is the initial concentration of the bound resveratrol, and $[R_b]$, $[R_s]$ and $[C_d]$ are, respectively, the concentrations of the bound resveratrol, solubilized resveratrol and degraded compounds at an arbitrary time.

Using equations (2) to (5), the following solutions are obtained.

$$[R_b] = [R_{bo}]e^{-k_1t} \quad (6)$$

$$[R_s] = [R_{bo}] \frac{k_1}{k_2 - k_1} (e^{-k_1t} - e^{-k_2t}) \quad (7)$$

$$[C_d] = [R_{bo}] \left(1 + \frac{k_2}{k_1 - k_2} e^{-k_1t} + \frac{k_1}{k_2 - k_1} e^{-k_2t} \right) \quad (8)$$

2.2. Materials

The fruit stem of grape was used as a resource of resveratrol. The Campbell and Gerbong grapes which were two major cultivars in Korea were selected. The materials were used in experiments after drying and pulverizing. The prepared materials of Campbell and Gerbong fruit stems had the moisture content of 7.7% (wet basis) and mean particle size of 0.319 mm, and the moisture content of 9.8% (wet basis) and mean particle size of 0.329 mm, respectively.

2.3. Ultrasonication-assisted extraction

A solvent extraction system assisted by ultrasonication was introduced to run at room temperature. An ethanol/water 80:20% (v/v) solution was used as a solvent according to the previous study (Romero-Pérez, Lamuela-Raventós, Andrés-Lacueva, & Carmen de la Torre-Boronat, 2001). The solvent ratio, or the ratio of sample weight to solvent volume, was 8 g/L. 14 W/L was the ultrasonic power provided by a ultrasonic processor having the frequency of 47 kHz (Bransonic 5210, Branson Ultrasonic Corporation, USA). After extraction, centrifugation (10,000 g, 15 min) and evaporation were followed. Meanwhile, the recovery by the ultrasonication-assisted extraction was compared with that by the traditional solvent extraction at 60°C in 30 min

2.4. Analysis of resveratrol content

The content of resveratrol in the extract was determined by the HPLC system composed of pump (Jasco PU-98), injector (Jasco AS-950-10), detector (Jasco UV-975), integrator (Computer-Browin software), and column (Xterra™ RP18, 4.6 mm x 250 mm, 5 μm). The extract was solved in methanol and the solution of 20 μL was injected. The elution profile was acetonitril/water 40:60% (v/v) for 8 min, acetonitril/water 10:90% (v/v) for 27 min, and acetonitril/water 40:60% (v/v) for 15 min under the flow rate of 0.6 mL/min. The peak for resveratrol was detected at 308 nm.

2.5. Estimation of reaction rate constants

Experimental data on the ultrasonication-assisted extraction of resveratrol were analyzed to determine the reaction rate constants, k_1 and k_2 , using the Marquardt method (Draper & Smith, 1981) which was a linearization technique for estimating the parameters of a non-linear equation.

3. Results and discussion

3.1. Effect of ultrasonication-assisted extraction

In order to analyze the effect of ultrasonication-assisted extraction, the recovery by this method was compared to that by the conventional solvent extraction (Table 3-1). Romero-Pérez, Lamuela-Raventós, Andrés-Lacueva, & Carmen de la Torre-Boronat (2001) had already reported that the adequate extraction was attained with ethanol/water (80:20%, v/v) maintained at 60°C for 30 min and the severe extraction condition which had higher temperature or longer time than the optimum condition caused the degradation of solubilized resveratrol.

As shown in Table 3-1, the ultrasonication-assisted extraction for resveratrol solubilized more than the solvent extraction with the condition of 60°C and 30 min, except for some conditions. As for fruit stem of Campbell grape, the amount of resveratrol solubilized by the ultrasonication-assisted extraction for 3 min was 438 µg/g-dry material, which was 1.241 times as much as 353 µg/g-dry material by the solvent extraction with the condition of 60°C and 30 min. As for fruit stem of Gerbong grape, the recovery, or 171 µg/g-dry material, by the new method for 10 min was increased by 30.5%, compared to that, or 131 µg/g-dry material, by the traditional method. Similar to the traditional solvent extraction, of course, the ultrasonication-assisted extraction had a constraint in the aspect of extraction time because longer duration might cause the degradation of solubilized resveratrol.

Table 3-1. Comparison of the recoveries by the ultrasonication-assisted extraction with the conventional solvent extraction at 60°C for 30 min

Raw material	Extraction time [min]	Resveratrol content [μg/g dry material]	Relative recovery [%]
Fruit stem of <i>Campbell</i> grape	1	354	100.3
	3	438	124.1
	5	413	117.0
	10	397	112.5
	15	279	79.0
Fruit stem of <i>Gerbong</i> grape	1	123	93.9
	3	158	120.6
	5	166	126.7
	10	171	130.5
	15	167	127.5

Notes) Relative recovery is the percentage of resveratrol recovery by ultrasonication-assisted extraction over that by solvent extraction with the condition of 60°C and 30 min (353 μg/g-dry material for *Campbell* grape and 131 μg/g-dry material for *Gerbong* grape).

3.2. Estimation of parameters in the models

Table 3-2 shows the statistical estimation of parameters in equations 6, 7 and 8. The reaction rate constants k_1 and k_2 for the extraction and degradation of resveratrol were 0.7797 min^{-1} and 0.06481 min^{-1} , respectively, for fruit stem of *Campbell* grape, the standard errors of which were 0.1795 and 0.01510, respectively. Herein, the ratio of extraction rate to degradation rate, or $0.7797/0.06481$, is 12.0. This means that the degradation of solubilized resveratrol is negligible within a certain extraction duration because the ratio is very large. However, the amount of degradation might still be seriously considered beyond it.

For fruit stem of *Gerbong* grape, the reaction rate constants k_1 and k_2 , or

0.4773 min⁻¹ and 0.03713 min⁻¹, for the extraction and degradation of resveratrol were about a half values compared to fruit stem of Campbell grape. The difference between two cultivars might be due to hardness of tissue. The standard errors for these parameters were 0.1051 and 0.00989, respectively. Also, the ratio of k₁ to k₂, or 12.9, was very high, similar to that for fruit stem of Campbell grape.

Table 3-2. Statistical estimation for reaction rate constants in the models for ultrasonication-assisted extraction of resveratrol

Fruit stem of <i>Campbell</i> grape				Fruit stem of <i>Gerbong</i> grape			
Reaction rate constant k ₁ [min ⁻¹]		Reaction rate constant k ₂ [min ⁻¹]		Reaction rate constant k ₁ [min ⁻¹]		Reaction rate constant k ₂ [min ⁻¹]	
Estimate	Standard error	Estimate	Standard error	Estimate	Standard error	Estimate	Standard error
0.7797	0.1795	0.06481	0.01510	0.4773	0.1051	0.03713	0.00989

Notes) k₁ and k₂ designate the reaction rate constants for the solubilization and degradation of resveratrol in the reaction kinetics of extraction, respectively.

Table 3-3. Statistical evaluation on the models for resveratrol extraction

Fruit stem of <i>Campbell</i> grape			Fruit stem of <i>Gerbong</i> grape		
Coefficient of determination	F value	Significant probability	Coefficient of determination	F value	Significant probability
0.941	64.5	0.0013	0.915	42.9	0.0028

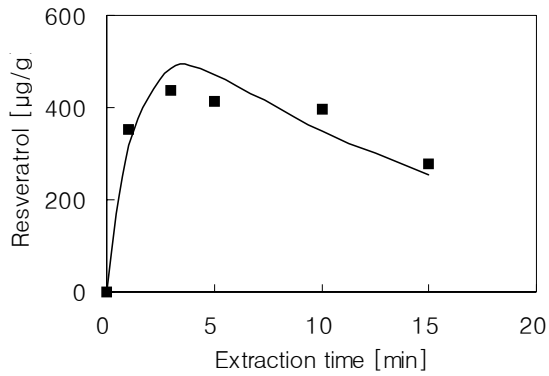


Fig. 3-1. Measured and predicted amounts ($\mu\text{g/g}$ -dry material) of resveratrol extracted from fruit stem of *Campbell* grape with respect to time when the ultrasonication-assisted extraction was applied.

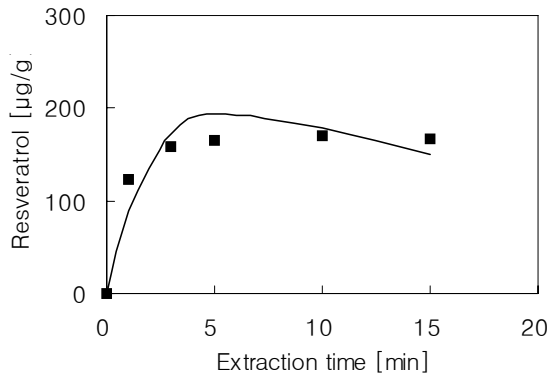


Fig. 3-2. Measured and predicted amounts ($\mu\text{g/g}$ -dry material) of resveratrol extracted from fruit stem of *Gerbong* grape with respect to time when the ultrasonication-assisted extraction was applied.

When the models for extraction of resveratrol were statistically evaluated, it appeared to be highly significant. Table 3-3 shows their coefficients of determination and F values. In the analysis of variance on the models for resveratrol extraction from Campbell and Gerbong grapes, F values were 64.5 and 42.9, respectively, indicating the highly significant difference at the

level of 0.01. The coefficients of determination in the models analysis for two cultivars of grapes were 0.941 and 0.915. Fig. 3-1 and 3-2 show the measured and predicted amount of extracted resveratrol for Campbell and Gerbong grapes, respectively.

4. Conclusion

Fruit stem contains more resveratrol, a stilbenoid phytoalexin, which will be used as a health ingredient, than other parts such as fruit skin and seed in grapes. Since resveratrol is well-solubilized in a solution with ethanol and water 80:20% (v/v), the solvent is being frequently used to extract resveratrol. When an ultrasonication-assisted extraction of resveratrol was investigated in this study, this method exhibited more efficiency than the conventional solvent extraction with ethanol/water (80:20%, v/v) maintained at 60°C for 30 min. The recovery of resveratrol was increased by 24 to 30%, and also, particularly, the new method is very safe because of operating in the room temperature.

The reaction rate constant for extraction of resveratrol from fruit stem of grapes was 10 times more than that for its degradation during extraction. In an ultrasonication-assisted extraction of resveratrol, its degradation may be negligible within a certain extraction time. In this study, the recovery of solubilized resveratrol was 80% of the total resveratrol while its degradation was 13%. The ultrasonication-assisted extraction of resveratrol in this study was considered to be very effective.

제 4 절 레스베라트롤 분리정제 및 후처리 시스템

1. 서론

크로마토그래피 분리의 원리는 수지(고정상)가 채워진 긴 column에서 용리액(이동상)을 오른쪽에서 왼쪽으로 흘려 보내면서 column 중간 부분에서 feed를 주입하여 전개시키면 feed 속의 2가지 물질은 수지(고정상) 또는 용리액(이동상)과의 친화력 차이에 따라 각기 다른 이동 속도로 전개되며, 이에 따라 두 물질은 시간 차이를 두고 column을 빠져 나와 분리가 이루어지는 것이다. 작업 방법에 따라 배치식과 연속식으로 구분된다. 크로마토그래피는 원리상 생산능력의 제한성을 받을 우려가 있을 뿐만 아니라 운전비용이 많이 소요되는 단점이 있다.

보다 신속한 분리를 위해 최근에는 SPE(solid phase extraction)가 활용되고 있으며, C18 디스크가 흔히 사용되고 있다.

한편, 막 분리(membrane separation)는 비교적 저렴한 비용으로 신속하게 물질을 분리하고자 할 때 효과적으로 이용되고 있다. 여과 공정에는 두 가지 부류가 있는데 기존에 널리 쓰이는 방법으로는 고형물을 포함하는 액체를 통과시키는 동안 액체에 포함된 고형 불순물을 여과재(filter media)로 포집하는 방식으로 흔히 구조토 필터, 백(bag) 필터, 카본 필터, 부직포 등을 이용한 카트리지(cartridge) 필터 등이 여기에 속한다. 반면 불순 고형물을 포집하지 않고, 여과재의 표면에 형성된 공동의 크기(pore size)에 따라 표면에서부터 차단하여 분리하는 방식으로 이런 종류의 필터를 멤브레인(membrane)이라 한다.

막 분리에서는 구조토, 카본과 같은 여과 보조재(filter aid)를 필요로 하지 않으며, 생물 공정, 농산물 가공 공정의 경우 분리된 고형물은 다시 사료 등 자원으로 활용할 수 있다. 막을 이용한 여과 정제 공정은 생산 단계부터 오염물질의 발생을 억제하고 폐기물로부터 유해성분을 회수하여 자원화할 수 있어 청정 생산기술의 취지에 부합하는 환경 친화적 공정이라 할 수 있다. 막 분리법에는 정밀여과법(microfiltration, MF), 한외여과법(ultrafiltration, UF), 나노연과법(nanofiltration, NF), 역삼투여과법(reverse osmosis, RO) 등이 있다.

본 연구에서는 포도 추출물에 대해서 원심분리, 막 분리, SPE, 수용화 분획 등의 방법을 이용하여 추출물의 분리정제 효과를 분석하였다. 또한, 추출물의 후처리를 위한 증발 과정을 검토하였다.

2. 재료 및 방법

가. 실험재료

실험에 사용된 재료는 거봉 포도의 송이가지와, 주스생산후 부산물로 생산된 포도박이 사용되었다. 원료는 앞에서 개발된 초음파 추출방법에 의해 처리되어 분리실험에 사용되었다.

나. 원심분리

원심분리에서는 레스베라트롤의 분자량을 고려한 선행연구의 사례를 따라서 10,000 g에서 15분간 실시하는 조건으로 실험하였다.

다. 막 분리

막분리 효과를 평가하기 위하여 공극의 크기가 0.025, 0.05, 0.10, 0.22 μm 인 MF 막분리 실험을 실시하였다. 실험에 사용된 막은 cellulose nitrate 재질의 plain type이었으며, 85 kPa의 진공도로 유지하여 작동되었다.

라. SPE

SPE에서는 C_{18} 디스크가 되었으며, 제작사의 사용지침에 따라 실험이 이루어졌다. SPE는 25 kPa의 진공도에서 작동되었으며, C_{18} 디스크에서의 여과액과 용리액이 각각 회수되어 분석에 사용되었다.

마. 수용화 분획

레스베라트롤이 물에 잘 녹지 않는 성질을 이용하여 수용화 분획을 적용하여 분리 효과를 분석하였다.

바. 추출물 수율

추출물의 수율은 시료의 최초 무게에 대한 회수된 추출물의 무게를 건량기준으로 산출하여 나타내었다.

사. 레스베라트롤 정량

추출물의 레스베라트롤 함량은 HPLC 분석법에 의해 측정되었다. 추출된 시료를 200 μL 의 메탄올에 녹여 HPLC에 주입하였다. HPLC는 펌프(Jasco PU-98), 인젝트(Jasco AS-950-10), 감지기(Jasco UV-975), 적분기(Computer-Brown software), 컬럼(XTerraTM RP18: 4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) 등으로 구성되었다. HPLC 분석 조건은 다음과 같다. Acetonitrile/water를 용매로 하여 gradient 조건 하에서 0.6 mL/min의 유동속도로 50분간 작동시켰다. 이때 시료 주입량은 20 μL 이었고, 용매의 gradient 조건은 8분까지 4:6의 acetonitrile/water, 35분까지 1:9, 그리고 50분까지 다시 4:6으로 조정되었으며, 레스베라트롤 함량은 308 nm에서 측정되었다. 한편, 표준물질로는 Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA)의 레스베라트롤을 구입하여 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 분리정제방법에 따른 수율 및 순도

Table 4-1은 포도박 및 포도 송이가지를 원료로 하여 추출한 후 분리정제방법별 산출한 수율 및 순도를 나타낸 것이다. 포도박을 원료로 하였을 때, 분리정제물의 수율은 C₁₈ 디스크에 의한 용리법에서의 0.5%를 제외하고는 32.7~45.7%로 나타났으나 이러한 추출물에는 레스베라트롤이 거의 함유되어 있지 않은 것으로 나타났다.

반면, 포도의 송이가지를 원료로 하였을 때, 여러 가지 분리방법으로 추출물을 처리하게 되면 원리분리법에 의한 수율이 25.0%, MF 분리법에 의한 수율이 21.6~23.9%, C₁₈ 디스크에 의한 여과시 수율이 22.6%로 나타났으며, 레스베라트롤 함량은 분리방법에 따른 영향을 크게 받지 않고 0.222~0.285 $\mu\text{g/mL}$ 의 범위로 나타났다.

Table 4-1. Yield and purity of extracts of *Gerbong* grape

Raw Material	Separation method	Yield ¹⁾ (%)	[R] ²⁾ (µg/mL)
Grape pomace	Centrifugation	32.7	N/A
	MF with 0.22 µm	45.7	N/A
	MF with 0.10 µm	45.1	N/A
	MF with 0.05 µm	40.4	N/A
	MF with 0.025 µm	37.2	N/A
	Filtration with C ₁₈	39.0	N/A
	Elution with C ₁₈	0.5	N/A
Fruit stem	Centrifugation	25.0	0.225
	MF with 0.22 µm	23.9	0.267
	MF with 0.10 µm	23.7	0.285
	MF with 0.05 µm	21.6	0.222
	MF with 0.025 µm	21.6	0.229
	Filtration with C ₁₈	22.6	0.229
	Elution with C ₁₈	0.4	N/A

Notes) ¹⁾ Recovery yield based on raw material

²⁾ Resveratrol concentration based on recovered material

나. 수용화 분획법

본 연구에서는 추출물의 정제를 위하여 막분리, 원심분리, 크로마토그래피 및 수용화 분획의 4가지 방법을 이용하여 정제과정을 실험한 결과, 수용화 분획법이 매우 양호할 뿐만 아니라 대량생산에 적합한 것으로 평가되어 그림 4-1과 같은 수용화 정제법을 개발하였다. 즉, 레스베라트롤의 용해도를 고려하여 추출물과 물을 1:30의 비율로 혼합하고, 실온에서 30분간 교반한 후, 원심분리하여 불용성 물질을 회수하는 방법이다. 이러한 방법을 이용하여 캠벨과 거봉 포도의 송이가지 추출물 및 정제물의 수율과 레스베라트롤 함량을 평가한 결과를 Table 4-2에 나타내었다. 즉, 캠벨과 거봉의 추출물의 수율은 원료의 건물중 대비 각각 35.7%와 31.3%로 나타났으며, 정제물의 수율은 각각 2.6%와 2.9%로 나타났다. 이와 같이 수율은 약 1/10로 감소한 반면, 순도는 각각 1.23 mg/g과 0.51 mg/g에서 16.8 mg/g과 5.45 mg/g으로 약 10배 증가하였다.

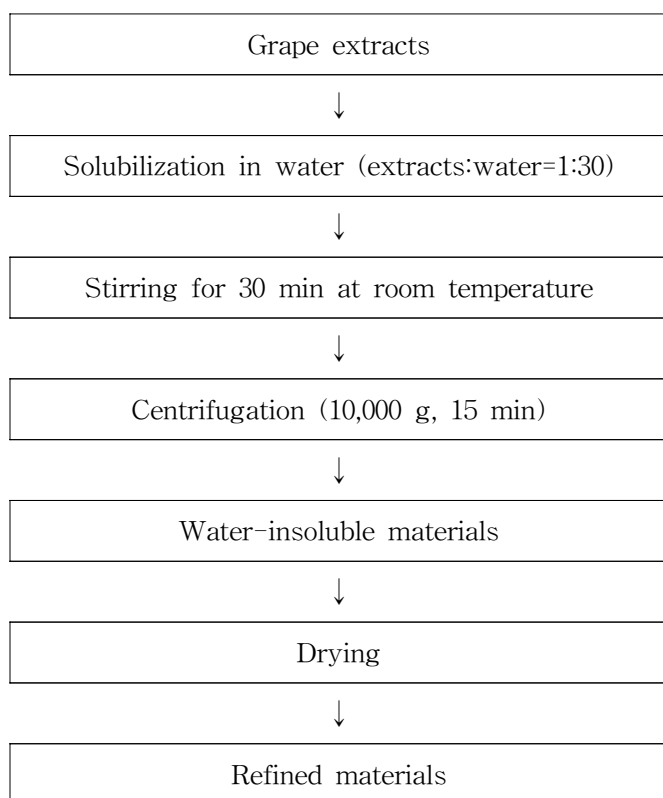


Fig. 4-1. A purifying procedure of grape extracts.

Table 4-2. Yield and purity of extracts and refined materials of grape peduncle

	Campbell grape		Gerbong grape	
	Extracts	Refined materials	Extracts	Refined materials
Yield* (%)	35.7	2.6	31.3	2.9
Content of resveratrol (mg/g)	1.23	16.8	0.51	5.45

Notes) * based on raw materials

다. 증발농축공정

추출물을 분말제품으로 제조하기 위해 증발농축 조건을 검토하였다. 73 cmHg의 진공도에서 증발농축하였을 때 증발은 약 20분간 소요되었다. 회수된 증발농축물의 상태는 Table 4-3에 나타내었다.

Table 4-3. Yield and moisture content of evaporated extracts

Cultivar	component	Moisture content (%)	Yield* (%)
	Skin	7.61	46.15
Gerbong	Seed	5.36	12.97
	Fruit stem	7.69	21.03
	Skin	7.57	60.24
Campbell	Seed	4.59	7.01
	Fruit stem	7.66	20.36

Notes) * Based on dry weight of raw material

4. 결론

포도의 추출물에 함유되어 있는 레스베라트롤의 함량을 향상시키기 위해 원심분리, MF, SPE, 수용화 분획 등 몇 가지 분리정제법을 적용한 결과, 대량생산시의 비용 등을 고려하였을 때 수용화 분획법이 매우 효과적인 것으로 판단되었다. 수용화 분획법을 이용하여 추출물에서의 레스베라트롤의 순도를 약 10배 증가시킬 수 있는 것으로 평가되었다.

제 5 절 추출물의 특성 (1)

1. 서론

프로스타글란딘류 (prostaglandins, PGs), 일산화질소 (nitric oxide, NO), 및 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)는 체내 항상성 유지 및 세포 신호 전달 (signal transduction)에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(1-3). 하지만 ROS는 조직손상, 염증 발현, 각종 퇴행성 질환 및 암화 (carcinogenesis)를 매개하는 인자로 작용하며(4-6), 또한 유도성 cyclooxygenase (COX-2) 및 nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 과다하게 생성된 PGs와 NO에 의해 염증 반응의 악화 및 암화가 촉진되는 것으로 보고되고 있다(3, 8-10, 12-13). ROS에는 superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), 그리고 hydroxy radical (OH) 등이 포함되는데, 이들은 호흡 및 대사 과정을 통해 지속적으로 생성되므로 체내에는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPxes), catalase와 같은 효소를 이용하여 ROS에 의한 손상을 막는다. 하지만 ROS에 의하여 장기간에 걸친 DNA, 세포막 및 단백질 손상이 일어나게 되면 각종 염증 질환 및 퇴행성 질환 등을 유발하는 원인이 된다(4-6). 또한, PGs는 세포막 구성 성분인 arachidonic acid를 기질로 하여 cyclooxygenase (COX)라는 효소에 의해 합성된다. COX는 cyclooxygenase-1 (COX-1) 및 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 두 이성 효소로서 존재한다(3,7). COX-1은 대부분의 체내 조직에서 일정 수준을 유지하여 발현되어 혈관 확장, 신혈류량 유지, 위점막 보호 작용 등 항상성 유지에 필수적인 PGs를 생성한다. 반면 COX-2는 정상 조직에서는 거의 발현이 되지 않다가 염증성 인자, 세포 성장 인자, 발암원 및 종양 촉진 인자 등에 의해 유도되어 다량의 PGs를 순간적으로 생성시켜 각종 염증 반응을 일으킨다. 또한 여러 암세포에는 COX-2가 과다하게 발현되어 암세포의 증식 및 전이를 촉진하고 apoptosis를 억제하는 역할을 한다(8-10). 한편, NO의 경우에도 PGs와 마찬가지로 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 만들어지며, NOS도 항상성 유지에 필요한 NO를 생성하는 endothelial NOS (eNOS) 및 neuronal NOS (nNOS)와 염증성 인자 등에 의해 유도되는 inducible NOS (iNOS)로 분류할 수 있는데 (11), iNOS도 COX-2와 마찬가지로 여러 염증 질환, 순환계 질환 및 암과 밀접한 연관이 있는 것으로 알려지고 있다(12-13).

이와 같이, ROS, PGs 및 NO가 여러 질병 및 암화 과정에 밀접한 연관이 있기 때문에 이들을 조절할 수 있는 물질이 각종 질환의 치료제 또는 예방제로서 주목을 받고 있다. 그리하여 기존의 물질을 구조 변형하여 효과가 개선된 새로운 물질을 합성하거나 천연물 및 각종 식품류에서 새로운 물질을 탐색하

는 방향으로의 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 특히 식품류는 의약품에 비해 장기간 섭취 시에도 안전하고 친숙하게 접할 수 있다는 장점 때문에 암을 비롯한 각종 질환의 예방 목적으로 각광을 받고 있으며 실제로 차류의 polyphenol, 콩류의 isoflavone, curcumin, sulforaphane, resveratrol 등 식품 및 천연물 유래 물질들이 암예방제로서 임상 시험 중에 있다(14). 최근에 적포도주가 동맥 경화와 같은 심장병 예방에 효과가 있다는 보고가 등장하면서 포도 및 그 관련 제품 또는 추출물에 대하여 관심이 높아지고 있다. 적포도주의 이러한 약리작용은 procyanidin, anthocyanin, viniferine, resveratrol 등 다가 페놀성 물질 (polyphenolics)에 의한 것으로 알려지고 있다(15). 그 중에서 resveratrol은 stilbene 계열의 물질로서 포도 껍질에 주로 분포하며, 지방 과산화 억제 및 free radical 소거 기능과 같은 항산화 작용, COX 저해 등의 항염증 작용, 암세포 성장 억제 및 암예방 효능 등 다양한 생리활성을 지니고 있어 (16-20), 기능성 식품 및 의약품의 원료로서 가치가 크다고 할 수 있다. 하지만 포도 껍질로부터의 수득률이 낮고 추출에 많은 시간이 소요되므로 포도 자체에서부터 다량을 확보하는 데에는 어려움이 있다. 따라서 포도 껍질로부터 resveratrol을 높은 농도로 함유한 추출물을 정제하고 관련 공정을 개발하는 데에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다.

이러한 배경을 바탕으로 하여, 본 연구에서는 국내 포도 관련 산업의 고도화에 기여하기 위하여 국내에서 생산되는 포도의 씨, 껍질 및 송이줄기로부터 추출된 추출물에 대하여 먼저, 구성성분을 분석하고, 항산화 작용, 염증 관련 인자 생성에 미치는 활성 및 암세포 성장에 대한 영향들의 생리 활성을 측정하였다.

2. 실험 방법

가. 포도 추출물 제조

수확적기에 생산된 거봉(천안, 2001년 9월산)과 캠벨(영동, 2001년 9월산)을 껍질, 씨 및 송이줄기로 분리하여 냉동건조 후 분쇄하여 실험에 사용하였다. 각 포도 부위별 분쇄 시료를 에탄올/물(8:2 v/v) 용액에 현탁하고 실온에서 47 kHz의 초음파처리기(Branson 5210)로 현탁액 1 L당 0.04 kW의 초음파 에너지를 3분간 가하여 추출하고, 원심분리(10,000g, 15분) 후 상층액을 감압증발시켜 추출물을 제조하였다.

나. 시약

Dulbeccos modified Eagle medium (DMEM), Minimum essential medium with Earles salt (MEME), fetal bovine serum, non-essential amino acid solution, L-glutamine, trypsin-EDTA 등은 GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), vitamin C, lipopolysaccharide (LPS), N-(1-naphthyl)ethylenediamine, sulfanilamide, sodium nitrite, MTT, sulforhodamine B (SRB) 등은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Prostaglandin E₂ (PGE₂)와 PGE₂-acetylcholinesterase tracer는 Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였고, 항-PGE₂ 항체는 (주)태평양기술연구원으로부터 제공받아 사용하였다.

다. 구성성분 분석

레스베라트롤을 제외한 페놀릭 성분을 분석하였다. 분석은 HPLC법(Oregon State University에서 실시)으로 이루어졌다. 시료를 물에 녹여 원심분리한 후 필터링(0.45 μm)하여 HPLC 시스템에 주입하였다.

라. 세포 배양

마우스 대식세포주인 RAW 264.7은 10% FBS가 함유된 Dulbeccos modified Eagle medium (DMEM)에서 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 계대 배양하였고, 사람 폐암세포주인 A549 및 대장암세포주인 Col2는 10% FBS가 포함된 Minimum essential medium with Earles salt (MEME)를 이용하여 같은 조건에서 계대 배양하였다.

마. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 프리 라디칼 소거법에 의한 항산화 능력 평가

시료를 농도가 10 mg/mL이 되도록 Dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹인 다음 5배씩 연속적으로 희석하여 각각을 96 well plate에 넣었다. 그 다음 순수한 에탄올에 녹인 DPPH 용액을 최종 농도가 300 μM이 되도록 가하였다. 이후 37°C에서 30분 동안 반응시키고 Microplate reader (Bio-Rad)를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 DMSO를 사용하였으며 % Inhibition은 대조군의 흡광도와 시료의 흡광도를 비교하여 구하였다. 실험결과

는 IC₅₀ 값으로 표시하여 각 시료의 효력을 평가하였다.

바. Lipopolysaccharide (LPS)에 의해 유도된 cyclooxygenase-2 (COX-2) 저해 활성 검색

RAW 264.7 세포를 1mL 당 5×10^5 개로 희석하여 96 well plate에 부착시켰다. 이때 세포에 잔존하는 cyclooxygenase (COX) 효소의 활성을 억제하기 위하여 최종 농도가 500 μ M이 되도록 aspirin을 2시간 동안 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후, 부착된 세포를 phosphate-buffered saline (PBS)로 2번 세척하고 5% FBS-DMEM을 가하고 LPS (1 μ g/mL)와 검색 시료를 동시에 처리하였다. 이 때 대조군에는 LPS를 처리하지 않았으며 대조군 및 LPS 처리 대조군에는 DMSO를 가하였다. 시료 처리 후 20시간이 지난 다음 상층액을 회수하여 상층액에 유리된 prostaglandin E₂ (PGE₂)의 양을 다음의 효소면역분석법으로 정량하였다. 즉, 항-PGE₂ 항체가 부착되어 있는 plate의 각 well에 회수한 상층액과 PGE₂-acetylcholinesterase tracer를 넣어 상온에서 18시간 이상 배양한 다음, 각 well을 0.05% Tween-20-PBS로 5회 세척하고 Ellmann 시약을 가하여 7시간 동안 배양하고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. PGE₂ 표준품으로 검량선을 작성하여 각 시료 처리군에서의 PGE₂ 생성량을 구하였으며, LPS를 처리한 대조군과 LPS를 처리하지 않은 대조군에서 생성된 PGE₂ 양의 차이를 기준으로 하여 각 시료의 PGE₂ 생성 억제율을 구하였다.

사. LPS에 의해 유도된 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 저해 활성 검색

RAW 264.7 세포를 phenol red가 포함되어 있지 않은 DMEM에 1 mL 당 5×10^5 개가 되도록 현탁하여 24 well plate에 24시간 동안 부착시켰다. 부착된 세포를 PBS로 2회 세척한 다음 FBS가 함유되어 있지 않은 DMEM을 가하고 LPS (1 μ g/mL)와 시료를 동시에 처리하여 20시간 동안 배양하였다. 이 때 대조군에는 LPS를 처리하지 않았으며 대조군 및 LPS 처리 대조군에는 DMSO를 가하였다. 배양 후 96 well plate에 well당 상층액을 100 μ L씩 가하고 Griess 시약 (5% H₃PO₄ 용액에 녹인 0.2% N-(1-naphthyl) ethylenediamine 용액과 0.2% sulfanilamide 용액을 같은 비율로 섞은 것)을 180 μ L씩 가하여 10분간 가볍게 흔들어 준 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite를 표준품으로 하여 검량선을 작성하여 시료 처리군에서의 흡광도를 nitrite의 농도로서 환산하여 정량하였고, LPS를 처리한 대조군과 LPS를 처리하지 않은 대조군에서 생성된 nitrite 양의 차이를 기준으로 하

여 각 시료의 NO 생성 저해 활성을 구하였다.

아. Sulforhodamine B (SRB) 법을 이용한 암세포 성장 저해 평가

사람 폐암세포주인 A549 및 대장암세포주인 Col2를 1 mL 당 5×10^4 개가 되도록 MEME 배지로 희석하여 시료와 함께 96 well plate에 넣고 3일 동안 배양하였다. 또한 최소 16 well에 실험에 사용하였던 세포현탁액을 넣고 30분 동안 배양하여 zero day control로 하였다. 배양한 세포에 대하여 TCA를 최종 농도가 10%가 되도록 가한 다음 4°C에서 1시간 동안 반응시켜 세포를 고정시켰다. 고정 후 0.4% SRB 용액으로 염색하고 염색된 세포를 10 mM Tris-base (pH 10)을 가하여 용해시킨 다음 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 10% DMSO를 처리한 군을 대조군으로 하여, 대조군과 zero-day control의 차이를 기준으로 시료를 처리한 군에서의 세포 생존률을 구하였다.

자. 마우스 피부에서 TPA 처리에 의한 COX-2 발현 저해 활성평가

ICR 마우스 등의 털을 동물용 clipper를 이용하여 깎아 제거하고 24시간 후 포도가지 정제물을 두 가지 농도(10 mg, 50 mg/0.2 mL)로 acetone에 녹여 마우스 등에 국소 도포하고 1시간 후 acetone에 녹인 TPA(10 nmol/0.2 mL)를 다시 도포하였다. 4시간 후 ICR 마우스를 희생시켜 피부를 잘라내고 얼음 위에서 connective tissue, fats를 제거한 후 유발에 옮기고 액체 질소와 함께 유봉으로 분쇄시켰다. 거의 분말 상태가 된 피부를 TRI REAGENT™에 넣어 1분간 균질화시킨 후, chloroform과 isopropanol을 이용하여 RNA를 추출한 다음, 260 및 280 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA의 농도 및 순도를 결정하였다. RT system(Promega)을 이용하여 RNA 1 μ g을 cDNA로 역전사시킨 다음, 그 중 1 μ g을 Taq DNA polymerase를 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR 반응 조건은 COX-2의 경우 94°C에서 45초간 denaturation 후, 매 cycle 당 94°C에서 15초, 57°C에서 1분, 72°C에서 1분이 되도록 조정하여 총 33 cycle을 수행하였고, β -actin도 같은 조건에서 33 cycle을 수행하였다. PCR products는 2% agarose gel로 90V에서 45분 동안 전기영동 시킨 다음, SyBR Gold로 1시간 동안 염색시킨 후 관찰하였다. 사용한 primer의 sequence는 다음과 같다.

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

차. 통계 처리

모든 시험은 적어도 2회 이상 반복하였고, 그 결과는 반복 시험에서의 평균 값±SEM으로 구하였다. 또한 대조군과 처치군의 차이는 Students t-test로 비교하였으며 대조군과 비교하여 $p < 0.05$ 일 때 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

3. 실험 결과

가. 추출물의 성분

Table 5-1은 추출물의 phenolics와 procyanidins에 대한 성분분석을 한 결과이다. 페놀계 화합물의 총량을 부위별로 살펴보면, 포도의 송이가지가 1185.1 mg/100g으로 가장 많았고, 씨 470.1 mg/100g, 껍질 122.8 mg/100g의 순으로 많았으며, 과육은 49.8 mg/100g으로 가장 적었다. 이러한 결과를 볼 때, 1차년도에서 분석한 레스베라트롤의 함량을 같이 고려해 보더라도 포도의 가지가 가장 양호한 원료로 활용될 수 있음을 알 수 있다.

Table 5-1. Contents of phenolics and procyanidins in the different parts of Campbell grapes

Unit: mg/100g

Component	Chlorogenic acid	Chlorogenic-like compounds	Catechin	Epicatechin	Coumaric acid	Caffeic acid	Procyanidins	Total
Stem	36.2	115.7	211.9	98.5	3.0	-	719.8	1185.1
Skin	5.5	68.0	28.6	-	5.1	15.6	-	122.8
Seed	1.0	-	69.4	99.7	-	-	300.0	470.1
Flesh	-	1.4	-	-	-	-	48.4	49.8

나. 포도 추출물들의 DPPH 프리 라디칼 소거 활성

여러 포도 추출물들의 항산화 효능을 알아보기 위하여 수용액 또는 에탄올 중에서 비교적 안정된 프리 라디칼을 형성하는 DPPH를 이용하여 추출물들의 라디칼 소거 능력을 측정하였다. 양성 대조군으로는 vitamin C를 이용하였다. 그 결과 Table 5-2 및 Fig. 5-1에 나타난 바와 같이 거봉줄기, 캠벨줄기, 캠벨씨 및 거봉씨 추출물들은 500 µg/mL에서 70~80% 정도의 프리 라디칼 소거능을 나타내었다. 이 중 거봉줄기, 캠벨씨, 거봉씨 추출물들은 IC₅₀ 값이 20 µg/mL 전후로 나타나 resveratrol (IC₅₀ =34.6 µg/mL)보다 항산화 작용이 우수하였고, 특히 거봉씨 추출물은 vitamin C와 거의 유사한 효력을 나타내었다.

Table 5-2. Effect of various grape extracts on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity

Sample	Free radical scavenging activity (% Inhibition)	IC ₅₀ (µg/mL)
Kyho stem	89.9 ± 0.2	21.5
Kyho seed	72.9 ± 2.3	16.9
Kyho skin	41.7 ± 3.1	> 500
Campbell stem	71.9 ± 1.4	87.3
Campbell seed	76.9 ± 0.7	21.9
Campbell skin	54.1 ± 1.4	446.7
Resveratrol	77.5 ± 0.1	34.6
Vitamin C	89.9 ± 0.2	12.2

Notes) Free radical scavenging activity of test sample was determined relative to DMSO-treated control groups. Each value represents mean ± SEM (n=2).

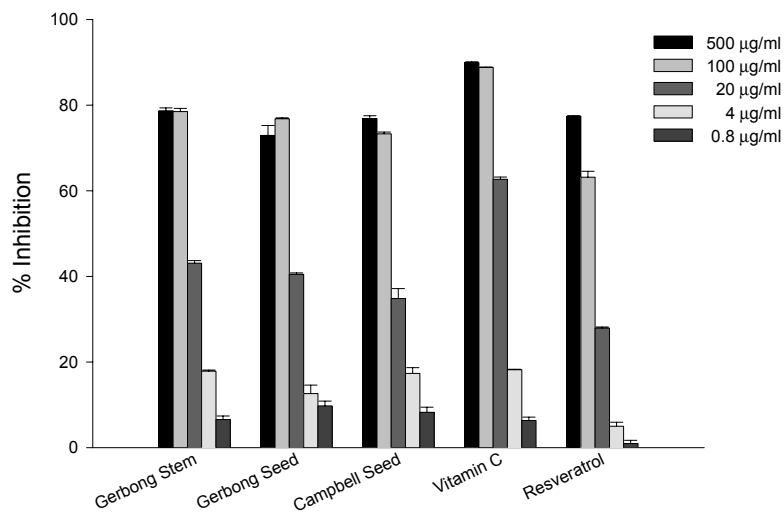


Fig. 5-1. Effect of various grape extracts on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity. Grape extracts were incubated with DPPH ethanolic solution (300 μ M) at 37°C. After 30 min, absorbance was measured at 515 nm. Free radical scavenging activity of each sample was determined relative to DMSO-treated control groups. Each value represent mean \pm SEM (n=2).

다. 포도 추출물들의 lipopolysaccharide (LPS) 처리에 의한 PGE₂ 생성 저해 활성

Table 5-3 및 Fig. 5-2에 나타난 바와 같이, 포도 추출물들은 50 µg/mL의 농도에서 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의한 prostaglandin E₂ (PGE₂)의 생성을 억제하였다. 거봉줄기, 거봉씨, 캠벨씨 추출물은 50 µg/mL에서 60~70% 정도의 PGE₂ 생성 억제 효과를 나타내었고, 캠벨줄기 추출물은 40% 정도의 억제율을 나타내었다. 양성 대조군으로 사용된 celecoxib 및 resveratrol은 IC₅₀이 각 0.9 ng/mL과 1.9 µg/mL로 나타나 PGE₂ 생성을 효과적으로 억제하였다.

Table 5-3. Effect of various grape extracts on LPS-induced prostaglandin E₂ (PGE₂) production in RAW 264.7 cells

Sample	% Inhibition at 50 µg/mL	IC ₅₀ (µg/mL)
Kyho stem	72.0 ± 3.3	NT ³⁾
Kyho seed	61.3 ± 1.3	NT
Kyho skin	11.2 ± 11.1	> 50
Campbell stem	41.9 ± 0.8	> 50
Campbell seed	59.4 ± 0.8	NT
Campbell skin	0.0 ± 1.4	> 50
Resveratrol	100.0 ± 0.1 ¹⁾	1.9
Celecoxib	100.0 ± 0.3 ²⁾	0.9 ⁴⁾

Notes) Each value represents mean ± SEM (n=3).

- ¹⁾ % Inhibition at 10 µg/mL
- ²⁾ % Inhibition at 100 ng/mL
- ³⁾ Not tested
- ⁴⁾ Concentration: ng/mL

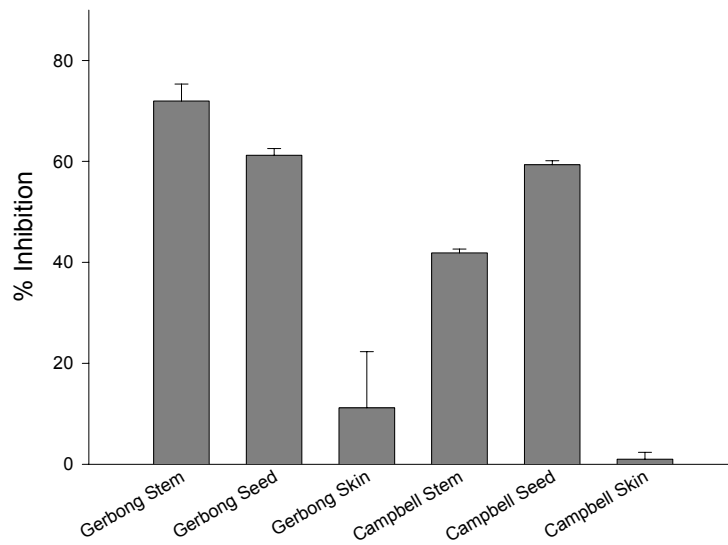


Fig. 5-2. Effect of various grape extracts on lipopolysaccharide (LPS)-induced prostaglandin E₂ (PGE₂) production. RAW 264.7 cells were stimulated with LPS (1 μg/mL) in the presence or absence of test samples. After 20 hr, the amount of PGE₂ in the supernatants was determined by enzyme immunoassay. Each value represent mean ± SEM (n=3)

라. LPS 처리에 의해 유도된 inducible nitric oxide synthase(iNOS)에 대한 포도 추출물들의 저해 활성

포도 추출물들이 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 생성되는 NO의 양을 얼마나 감소시키는지를 마우스 대식세포인 RAW 264.7 cell을 이용하여 확인하여 보았다. 실험 결과, Table 5-4 및 Fig. 5-3에서 알 수 있듯이 거봉줄기와 거봉씨 추출물들은 50 µg/mL에서 NO 생성을 50% 정도 저해하였고, 캠벨씨 추출물도 약간의 NO 생성 저해 작용을 나타내었다. 이 실험조건에서 resveratrol은 IC₅₀이 2.1 µg/mL로 나타났다.

Table 5-4. Effect of various grape extracts on nitrite formation in LPS-stimulated mouse macrophage cells

Sample	% Inhibition at 50 µg/mL	IC ₅₀ (µg/mL)
Kyho stem	57.7 ± 0.9	NT ²⁾
Kyho seed	50.8 ± 7.5	NT
Kyho skin	17.0 ± 4.6	> 50
Campbell stem	11.0 ± 3.8	> 50
Campbell seed	45.5 ± 2.6	> 50
Campbell skin	28.4 ± 1.2	> 50
Resveratrol	89.5 ± 0.7 ¹⁾	2.1

Notes) Each value represents mean ± SEM (n=4).

¹⁾ % Inhibition at 10 µg/mL

²⁾ Not tested

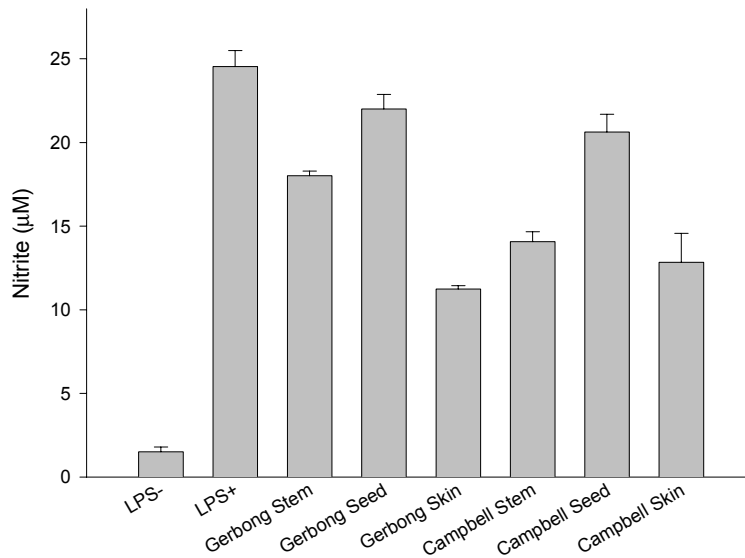


Fig. 5-3. Effect of grape extracts on nitrite accumulation in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (5×10^5 cells/ml) were plated in 24 well plate for 24 hr and then incubated with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) and test samples simultaneously. After 20 hr, the nitrite accumulation of cultured media was determined by Griess reaction. Each value represent mean \pm SEM (n=4).

마. 포도 추출물들의 암세포 성장에 대한 영향 조사

각종 포도 추출물들이 암세포 성장에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 사람 폐암세포주인 A549와 대장암세포주인 Col2를 이용하여 세포 생존율을 관찰하였다. Table 5-5 및 Fig. 5-4에서 나타난 것과 같이, 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 거봉줄기 및 거봉씨 추출물은 폐암세포의 성장을 대조군에 비하여 30% 가량 억제하였고, 결장암세포의 성장은 20~30% 정도 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 이러한 효과는 resveratrol 20 μM 에서의 암세포 성장 저해 효과와 유사하였다.

Table 5-5. Effect of grape extracts on cancer cell proliferation

Cell line	A549 ¹⁾		Col2 ²⁾	
Sample	% Survival at 50 µg/mL	EC ₅₀ (µg/mL)	% Survival at 50 µg/mL	EC ₅₀ (µg/mL)
Kyho stem	67.1 ± 2.2	> 50	72.0 ± 1.2	> 50
Kyho seed	70.6 ± 3.4	> 50	74.3 ± 0.7	> 50
Kyho skin	90.9 ± 3.4	> 50	87.6 ± 8.4	> 50
Campbell stem	86.3 ± 1.0	> 50	91.2 ± 3.4	> 50
Campbell seed	76.7 ± 2.5	> 50	85.2 ± 2.7	> 50
Campbell skin	88.9 ± 1.9	> 50	87.4 ± 2.8	> 50
Resveratrol	68.2 ± 6.6 ³⁾	> 20 ⁵⁾	81.8 ± 1.4 ³⁾	> 20 ⁵⁾
Ellipticine	0.0 ± 0.3 ⁴⁾	0.2	0.0 ± 1.3 ⁴⁾	0.8

Notes) Human cancer cells were incubated with or without test samples for 72 hr. Cell viability was determined by sulforhodamine B (SRB) dye staining method and calculated relative to DMSO-treated control groups. Data represent as mean ± SEM (n=3).

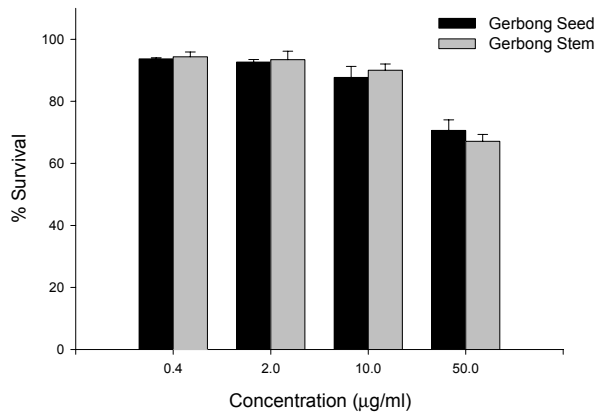
¹⁾ A549: Human lung carcinoma

²⁾ Col2: Human colon carcinoma

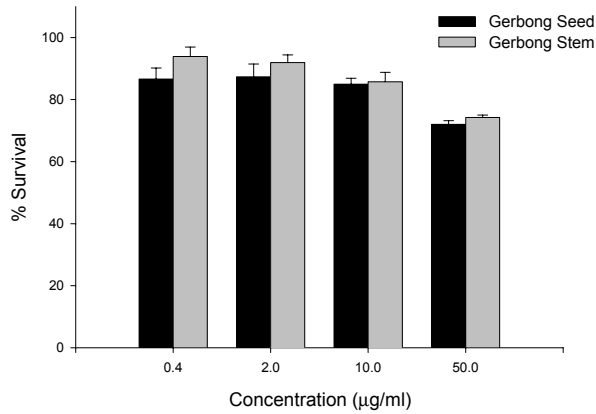
³⁾ % Survival at 20 µM

⁴⁾ % Survival at 10 µg/mL

⁵⁾ Concentration: µM



(A)



(B)

Fig. 5-4. Effect of Kyho stem and Kyho seed extracts on proliferation of A549 (A) and Col2 (B). A549 (human lung carcinoma) and Col2 (human colon carcinoma) cells were incubated in the presence or absence of test samples for 72 hr. Then, cells were fixed by 10% TCA and stained with 0.4% SRB solution. Dye was dissolved with Tris base (pH 10), and the absorbance was measured at 515 nm. Cell viability was determined relative to DMSO-treated control groups. Each value represent mean \pm SEM (n=3).

바. 마우스 피부에서 TPA 처리에 의한 COX-2 발현 저해 활성평가

기존 여러 연구에서 염증 반응은 암화와 밀접한 관계가 있으며 여러 비스테로이드성 소염 진통제들이 암세포 사멸을 유도하며 암화를 억제하는 것으로 보고되고 있다. 이들의 항염증 활성에 따라 in vivo에서 mouse skin을 이용한 skin carcinogenesis model에는 어떠한 저해 활성을 나타내는지 확인하여 보았다. Fig. 5-5와 같이 TPA 10 nmol 처리에 의해 COX-2 발현이 유도되는 것으로 나타났으며 TPA에 의해 유도된 COX-2의 발현을 농도의존적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 따라서 이들 정제물들은 항염증 및 암예방 효능이 있는 것으로 여겨진다.

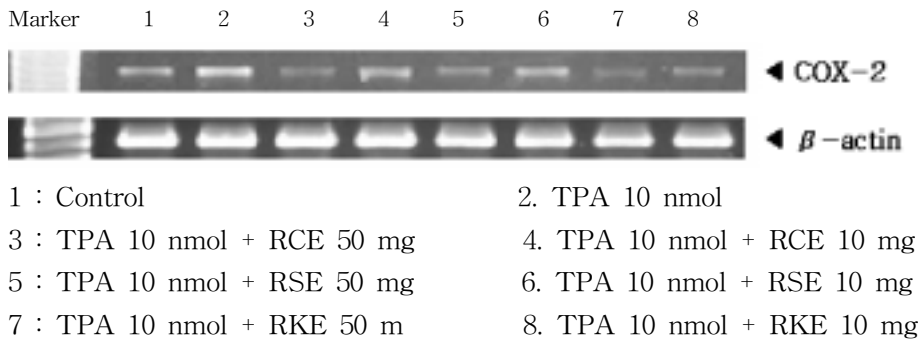


Fig. 5-5. Effects of test materials on expression of COX-2 and β -actin.

4. 고찰

식품류를 포함한 천연물은 예로부터 건강 증진 및 질병 치료를 위하여 다양하게 이용되어 왔고, 실제로 aspirin, morphine, ephedrine 등과 같이 천연물에서 유래한 의약품이 현재에도 질병 치료에 널리 응용되고 있다. 최근 ROS 및 여러 염증 관련 매개체들이 각종 질병에 밀접하게 연관되어 있다는 여러 연구 결과가 발표되면서 항산화 및 항염증 효능을 가진 물질들이 질병 치료 및 예방제로서 주목을 받고 있는데, 특히 식품류 및 천연물에 포함되어 있는 polyphenol성 화합물들은 항산화, 항돌연변이, 암세포 성장 억제 등 다양한 생리활성을 나타내어 심혈관계 질환 및 암의 치료 및 예방제로서의 가능성에 대하여 많은 연구가 이루어지고 있다(21-22). 이 중 포도의 주요 polyphenol 성분인 resveratrol은 포도주의 심혈관계 질환 예방 작용의 주요 효능 물질로 여겨지고 있으며 항산화, 항염증, 암세포 성장 억제 등 다양한 약리 작용이 있

는 것으로 알려지고 있으므로, 포도로부터 resveratrol을 높은 농도로 함유한 추출물을 확보하여 식품 및 의약품으로 응용하는 데 대하여 많은 관심이 주어지고 있다. 본 연구에서는 포도 관련 산업의 고도화의 일환으로 기능성 물질의 확보와 가공을 통한 원료의 고부가가치 창출을 목표로 국내에서 생산되는 대표적인 포도종을 중심으로 추출물을 제조하여 약리활성을 평가하고자 하였다. 일차적으로거봉 및 캠벨 포도의 씨, 줄기 및 껍질 추출물에 대하여 항산화 작용, 염증 관련 인자 생성에 미치는 활성 및 암세포 성장에 대한 영향 등을 resveratrol과 비교하여 평가하였다. ROS는 세포 내 세포막, 단백질 및 DNA의 손상 및 변이를 일으켜 여러 심혈관계 질환, 퇴행성 질환 및 암의 원인이 되는 것으로 알려져 있으므로, 본 연구에서는 ethanol 용액 중에서 안정된 free radical을 형성하는 DPPH를 이용하여 포도 추출물들의 항산화 능력을 평가하였는데, 포도 추출물 중 거봉줄기, 캠벨줄기, 캠벨씨 및 거봉씨 추출물들이 DPPH free radical을 소거하는 능력을 나타내었고 그 중 거봉씨 추출물은 vitamin C와 효력이 유사하게 나타나 항산화 효능이 우수함을 알 수 있었다. ROS와 더불어 PGs 및 NO와 같은 염증 반응 매개체들도 과다하게 생성될 경우 각종 질환의 원인으로 알려져 있으므로, 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 cell을 이용하여 포도 추출물들의 LPS 처리에 의한 PGE₂ 및 NO 생성을 저해하는지를 확인하였으며, 그 결과 거봉줄기, 거봉씨, 및 캠벨씨 추출물이 50 µg/mL에서 PGE₂ 및 NO 생성을 50% 가량 저해하는 효능을 나타내었다. 한편, resveratrol이 암세포 성장을 억제하는 효능을 가지고 있다는 여러 연구 보고에 따라 사람 폐암 및 대장암 세포주를 이용하여 포도 추출물들이 암세포 성장 저해 효과를 나타내는지를 확인하였는데 거봉줄기 및 씨 추출물 50 µg/mL에서 30% 정도의 암세포 성장 저해 작용을 나타내었다. 따라서 포도 추출물들은 효과적인 암세포 성장억제 작용을 나타낼 수 있는 자원으로서 이용 가치가 크다고 할 수 있다. 그러나 포도 추출물들의 항산화 효과와는 달리 염증 반응 매개체 생성 및 암세포 성장 저해 효과는 resveratrol에 비하여 그 활성이 떨어지는 결과가 나왔는데 이는 포도 추출물의 정제가 아직 완전하지 못하여 유효 성분의 세포 내 침투 능력이 resveratrol에 비하여 떨어지기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 유효 추출물들의 정제를 통하여 resveratrol과 유사한 작용을 나타낼 수 있는 추출물의 획득이 이루어질 수 있을 것으로 생각되며, 이에 따라 포도 추출물들은 resveratrol에서 기대되는 항산화, 항염증 및 암예방 효능을 지닐 수 있는 기능성 식품 및 의약품의 원료로서의 다양하게 이용될 수 있을 것으로 전망된다.

5. 요약

국내에서 생산된 거봉 및 캠벨 포도의 씨, 줄기 및 껍질 추출물에 대하여 항산화 작용, 염증 관련 인자 생성에 미치는 활성 및 암세포 성장에 대한 영향 등을 resveratrol과 비교하여 평가하였다. 그 결과 포도 추출물 중 거봉줄기, 캠벨줄기, 캠벨씨 및 거봉씨 추출물들이 항산화 능력을 나타내었고 그 중 거봉씨 추출물은 vitamin C와 효력이 유사하게 나타나 항산화 효능이 우수함을 알 수 있었다. 또한 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 cell을 이용하여 포도 추출물들의 LPS 처리에 의한 PGE₂ 및 NO 생성을 저해 여부를 확인한 결과, 거봉줄기, 거봉씨, 및 캠벨씨 추출물이 50 µg/mL에서 PGE₂ 및 NO 생성을 50% 가량 저해하는 효능을 나타내었다. 또한 사람 폐암 및 대장암 세포주를 이용하여 포도 추출물들이 암세포 성장 저해 효과를 나타내는지 확인하였는데 거봉줄기 및 씨 추출물 50 µg/mL에서 30% 정도의 암세포 성장 저해 작용을 나타내었다.

제 6 절 추출물의 특성 (2)

1. Introduction

Cancer chemoprevention is defined as the use of non-toxic bioactive compounds derived from natural products or synthetic molecules to retard, reverse, or suppress the process of carcinogenesis (Morse and Stoner, 1993; Surh, 1999). It has been known that carcinogenesis is a multi-step process that progress gradually for over twenty years, and it may have limitations to the treatment of cancer, especially at a late stage. In this respect, chemoprevention have been regarded as a novel strategy to control, and ultimately, overcome cancer.

Chemopreventive agents can affect in each step of carcinogenesis with unique mechanism of action to modulate related biomarkers. Recent studies suggest that reactive oxygen species (ROS), prostaglandins (PGs), and nitric oxide (NO) play important roles in the process of carcinogenesis (Dreher and Junod, 1998; Dubois *et al.*, 1998; Dannenberg *et al.*, 2001; Kröncke *et al.*, 1998). Although these molecules have been known to mediate tissue homeostasis and cellular signal transduction (Lander, 1997), they can also participate in various pathological conditions. For example, sustained damages of DNA, cell membrane, and protein, which are caused by ROS, can initiate and promote the transformation of normal cells to cancerous cells (Dreher and Junod, 1998). In addition, over-expression of inducible isoforms of cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) can produce PGs and NO excessively, and over-produced NO and PGs can be important mediators to promote and progress carcinogenesis as well as to provoke chronic inflammatory responses (Dannenberg *et al.*, 2001; Kröncke *et al.*, 1998). Thus, agents that modulate the production or activity of ROS, NO, and PGs, including free radical scavengers and inhibitors of COX-2 or iNOS, might be considered as cancer chemopreventive agents.

It has been known that natural products have served as a source of lead compounds for developing new therapeutic agents. Many efforts are also in progress to develop cancer chemopreventive agents from natural products and dietary substances, which isolate active principles or synthesize compounds by the modification of compounds from natural products, and

evaluate their biological activities using various *in vitro* assay systems (Kinghorn *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998; Gerhauser *et al.*, 2002; Rimando *et al.*, 2002). Recently, naturally occurring compounds, such as polyphenols, isoflavones, curcumin, sulforaphane, and resveratrol, have been shown to possess cancer chemopreventive activities (Surh, 1999; Kelloff *et al.*, 2000; Kwak *et al.*, 2001; Lambert and Yang, 2003). Among them, resveratrol is a phytoalexin that occurs in grapes and roots of *Polygonum* species (Fremont, 2000). Resveratrol shows various biological properties, including antioxidant effects such as free radical scavenging and inhibition of lipid peroxidation, anti-inflammatory activities through inhibition of COX and/or iNOS, anti-proliferative effects against various human cancer cells, and cancer chemopreventive activities (Jang *et al.*, 1997; Martinez and Moreno, 2000; Gusman *et al.*, 2001; Joe *et al.*, 2002). Therefore, resveratrol may be a lead principle for developing new therapeutics, preventive agents, and functional foods. However, it is difficult to obtain large amount of resveratrol from grapes themselves because of low yield and time-consuming extraction processes. In accordance with this respect, many studies are underway to develop more effective processes for which are able to produce and extract larger amount of resveratrol from grapes.

Previously we reported antioxidant and anti-inflammatory potential of some grape extracts (Min *et al.*, 2003). On the basis of this, in this study, we further developed a refining process of grape shoot extracts, and evaluated chemopreventive potential of various grape shoot extracts and their refined materials with antioxidant, anti-inflammation, and growth-inhibition against human cancer cells.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Dulbeccos modified Eagle medium (DMEM), minimum essential medium with Earles salt (MEME), Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI medium 1640), fetal bovine serum (FBS), non-essential amino acid solution, sodium pyruvate, L-glutamine, antibiotics-antimycotics solution, and trypsin-EDTA were purchased from Invitrogen Co. (Grand Island, NY,

USA). 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), vitamin C, gallic acid, lipopolysaccharide (LPS, *E. coli* 0111: B4), N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride, sulfanilamide, sodium nitrite, bovine serum albumin, sulforhodamine B, and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were from Sigma (St. Louis, MO, USA). L-N^G-mono-methyl arginine (L-NMMA), prostaglandin E₂ (PGE₂), and PGE₂-acetylcholinesterase tracer (PGE₂-AChE tracer) were from Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA). Anti-PGE₂ antibody was kindly provided from Pacific Corporation R&D Center (Kyounggi, Korea).

2.2. Cell culture

Murine macrophage RAW 264.7 cells, human lung carcinoma (A549), colorectal carcinoma (HCT 116), colorectal adenocarcinoma (HT-29), fibrosarcoma (HT-1080), and stomach adenocarcinoma (SNU-638) cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) or Korean Cell Line Bank (KCLB, Seoul, Korea). RAW 264.7 and HT-1080 cells were cultured in DMEM. HCT 116, HT-29, and SNU-638 cells were maintained in RPMI medium 1640, and A549 cells were cultured in MEME. All media were supplemented with 10% heat-inactivated FBS and antibiotics. Cells were incubated at 37°C, 5% CO₂ in the humidified air.

2.3. Preparation of test materials

Dried Campbell, Kyoho, and Sheridan grape shoots were pulverized, and then mixed solvent (ethanol: H₂O = 8: 2) was added to each pulverized shoot in the ratio of 8 g of shoots with 1 L of solvent. The suspension was sonicated for 10 min and filtered off non-extractable materials using Whatman No. 2 filter papers. The filtrate was centrifuged at 10,000 g for 15 min, and the supernatant was collected and then concentrated in a decompressed condition at 40°C. Extracts were dried in the oven for 4 hr, weighed, and then stored at a low temperature. For preparing refined materials, 1 g of extracts from grape shoots was added to 30 g of water and mixed well at room temperature. The mixture was centrifuged at

10,000 g for 15 min, and then non-extractable materials were collected. Thereafter, the refined materials were dried and stored at a low temperature.

2.4. Evaluation of the antioxidant potential of test materials

The antioxidant properties of test materials were evaluated by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity (Lee et al., 1998). Test materials, dissolved in DMSO, were incubated with 300 μ M of DPPH ethanol solution at 37°C for 30 min in 96 well plates. The absorbance was measured at 515 nm. % Inhibition, the degree of radical scavenging by test groups, was determined by comparison with vehicle-treated control group. IC₅₀ values, which denote the concentration of test samples for bringing to scavenge 50% of DPPH radicals, were calculated using non-linear regression analysis (% inhibition versus concentration). Vitamin C and gallic acid were used as positive controls.

2.5. Nitrite assay

To evaluate the inhibitory activity of test materials on LPS-induced NO production, RAW 264.7 cells in 10% FBS-DMEM without phenol red were plated in 24 well plates (5×10^5 cells/ml), and incubated for 24 hr. After incubation, cells were washed with PBS, replaced with fresh media, and then incubated with 1 μ g/ml of LPS in a presence or absence of test samples. After additional 20 hr incubation, the media were collected and analyzed for nitrite accumulation as an indicator of NO production by the Griess reaction (Green et al., 1982). Briefly, 180 μ l of Griess reagents (0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride in H₂O and 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄) were added to 100 μ l of each supernatant from LPS or sample-treated cells in 96 well plates. The absorbance was measured at 540 nm using microplate reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), and nitrite concentration was determined by comparison with a sodium nitrite standard curve. % Inhibition was expressed as $[1 - (\text{NO level of test samples} / \text{NO levels of vehicle-treated control})] \times 100$. The IC₅₀ value, the sample concentration resulting in 50%

inhibition of NO production, was determined using non-linear regression analysis (% inhibition versus concentration). N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) was used as a positive control.

2.6. Measurement of cell viability (MTT assay)

To examine whether the inhibitory effects of test samples on LPS-induced NO production were related to their cytotoxicity, cell viability was determined directly by the mitochondrial-dependent reduction of MTT to formazan (Alley et al., 1988) in this assay system. After Griess reaction, MTT solution was added to the media (final 500 µg/ml) and then incubated at 37°C for 4 hr. The media were discarded, 1 ml of DMSO was added each well to dissolve the formazan, and then absorbance was measured at 570 nm.

2.7. Measurement of the inhibitory activity of test samples on LPS-induced PGE₂ production

RAW 264.7 cells (5×10^5 cells/ml) were seeded and incubated in 96 well plates for 24 hr. Cells were washed with PBS, and then replaced with fresh medium containing 1 µg/ml of LPS with or without test materials. After 20 hr, the supernatants were collected, and the amount of PGE₂ in this media was measured by enzyme-linked immunosorbent assay as follows. Briefly, the supernatants were incubated with PGE₂-AChE tracer in 96 well plates coated with PGE₂ antibody for more than 18 hr. Plates were washed with PBST (PBS with 0.05% Tween-20) five times, and then incubated with Ellmanns reagent for 5 hr. The absorbance was measured at 405 nm. PGE₂ levels in the supernatants of test groups were determined using a PGE₂ standard curve, and compared with those of vehicle-treated control group.

2.8. Evaluation of growth-inhibitory activities of test samples against various human cancer cells

The growth-inhibitory potential of test materials against human cancer cells was examined by sulforhodamine B (SRB) assay. Various human cancer cells ($3\sim 5\times 10^4$ cells/ml) were incubated with test materials in 96 well plates for 72 hr. For zero-day control, cells were incubated for 30 min at 37°C in CO_2 incubator. After indicated incubation time, cells were fixed by the addition of cold 50% trichloroacetic acid (TCA) solution in each well (final 10% TCA solution), incubated for 30~60 min at 4°C , washed with tap water five times, and then dried in the air. The fixed cells were stained with 0.4% SRB solution (0.4% w/v SRB in 1% acetic acid solution) for 30~60 min. Unbound SRB solution was removed by washing with 1% acetic acid solution five times, and plates were dried again in the air. The bound dye was dissolved in 10 mM Tris solution (pH 10.0), and the absorbance was measured at 515 nm. Absorbance data from all groups were averaged, and that of zero-day control group was subtracted from those of each test group. % Survival was calculated compared with vehicle-treated control group.

3. Results and Discussion

It has been reported that ROS and pro-inflammatory mediators such as PGs and NO are closely implicated in various pathological processes, including atherosclerosis, several degenerative diseases, and cancer (Ames et al., 1993; Patel et al., 2000). Thus, the process that inhibits generation of free radicals, production of PGs and NO, and/or expression of COX-2 and iNOS might be a strategy for the treatment and prevention of many human diseases such as neurodegenerative diseases and cancer.

Natural products have been received much attention to be a source of lead candidates for developing new therapeutic or preventive agents. Recent studies suggest that naturally occurring substances, which include polyphenols, stilbenoids, and organosulfur compounds, possess various pharmacological properties including prevention of cancer (Surh, 1999; Kelloff *et al.*, 2000). The biological mechanism of these substances is varying, which includes scavenging free radicals, suppressing pro-inflammatory processes, and inhibiting proliferation against human cancer cells. Especially, according to the protective effect of red wine against cardiovascular diseases, resveratrol, a naturally occurring stilbenoid

from grapes, has extensively studied to evaluate its biological properties and elucidate the mechanism of action (Gusman *et al.*, 2001).

Table 6-1. Antioxidant potential of grape shoot extracts or their refined materials. Test materials were incubated with 300 μ M of DPPH ethanol solution at 37°C. After 30 min, absorbance was measured at 515 nm. DPPH radical scavenging activity of each sample was determined in comparison with vehicle-treated control group. Values of % inhibition represent mean \pm S.E.M.(n=3)

Test samples	% Inhibition at 500 μ g/ml	IC ₅₀ (μ g/ml)
Campbell shoot extract (CSE)	85.3 \pm 0.1	89.7
Sheridan shoot extract (SSE)	80.1 \pm 1.2	39.2
Kyoho shoot extract (KSE)	85.3 \pm 0.4	60.4
Refined material from Campbell shoot extract (RCE)	81.3 \pm 1.8	144.6
Refined material from Sheridan shoot extract (RSE)	81.5 \pm 2.1	109.2
Refined material from Kyoho shoot extract (RKE)	81.1 \pm 0.6	65.8
Resveratrol	78.4 \pm 0.7a)	33.2
Vitamin C	81.1 \pm 0.9	5.9
Gallic acid	88.3 \pm 1.1	4.7

Notes) ^{a)}% Inhibition at 500 μ M

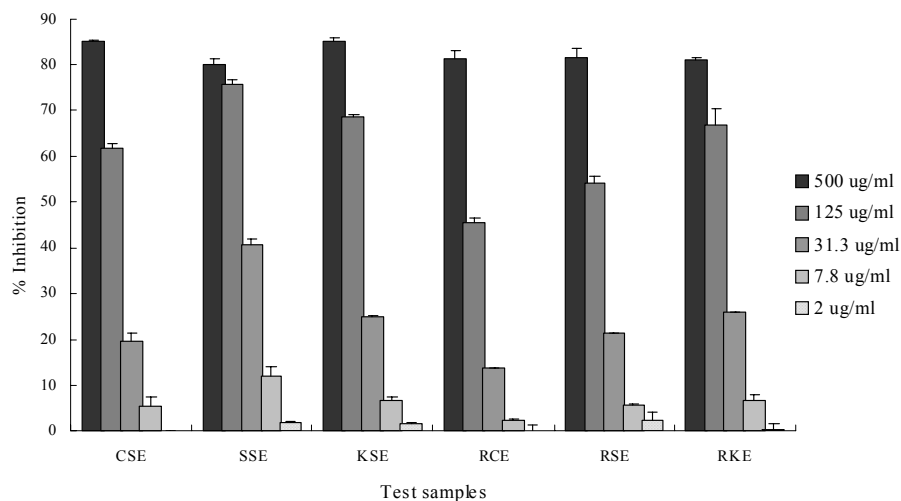


Figure 6-1. DPPH radical scavenging activity of test materials. Test materials were incubated with 300 μM of DPPH ethanol solution at 37°C for 30 min. The absorbance was measured at 515 nm, and DPPH radical scavenging activity of each sample was determined in comparison with vehicle-treated control group. Abbreviations are as follows: CSE, Campbell shoot extract; SSE, Sheridan shoot extract; KSE, Kyoho shoot extract; RCE, Refined material from Campbell shoot extract; RSE, Refined material from Sheridan shoot extract; RKE, Refined material from Kyoho shoot extract

In the present study, we developed a refining process of grape shoot extracts to produce enrichment of polyphenols, and evaluated chemopreventive potential of various grape shoot extracts and their refined materials using *in vitro* bioassay systems. First, we examined antioxidant potential of grape shoot extracts and refined materials by the use of DPPH that stably generates free radicals in ethanol solution. As a result, all of test materials possessed radical scavenging activities about 70~80% at the concentration of 500 $\mu\text{g/ml}$, and the activity is corresponding to 500 μM of resveratrol (Table 6-1). Accordingly, dose-responses on radical scavenging were also investigated and subsequently IC_{50} values were determined. Among the extracts and refined materials, the Sheridan shoot extract (SSE) showed the most potent DPPH radical scavenging activity

that was similar to that of resveratrol. In addition, the Kyoho shoot extract (KSE) and the refined material from Kyoho shoot extract (RKE) effectively scavenged DPPH free radical generation. Other materials also exhibited moderate scavenging properties, however, these activities were less potent than those of positive controls, vitamin C, gallic acid, and resveratrol. The mechanism of antioxidant effects of these materials is probably related to their direct radical scavenging activities because resveratrol, a main active principle contained in these materials, possessed direct radical scavenging activity *in vitro* (Rimando *et al.*, 2002). This result suggests that grape shoots extracts and their refined materials may possess antioxidant potential by scavenging free radical generation.

Table 6-2. Inhibitory effects of test materials on LPS-induced nitrite formation in cultured mouse macrophage cells. Cells were stimulated by treatment of LPS (1 µg/ml) in a presence or absence of test samples. After 20 hr, supernatants were collected and analyzed to determine the level of NO accumulation using Griess reaction. Values of % inhibition represent mean ± S.E.M.(n=4)

Test samples	% Inhibition at 50 µg/ml	IC ₅₀ (µg/ml)
Campbell shoot extract (CSE)	1.0 ± 6.6	> 50
Sheridan shoot extract (SSE)	1.0 ± 5.3	> 50
Kyoho shoot extract (KSE)	26.3 ± 6.0	> 50
Refined material from Campbell shoot extract (RCE)	64.7 ± 0.7	28.5
Refined material from Sheridan shoot extract (RSE)	56.7 ± 4.7	46.1
Refined material from Kyoho shoot extract (RKE)	65.9 ± 1.2	22.4
Resveratrol	78.4 ± 2.3	3.6

Notes) ^{a)}% Inhibition at 50 µM

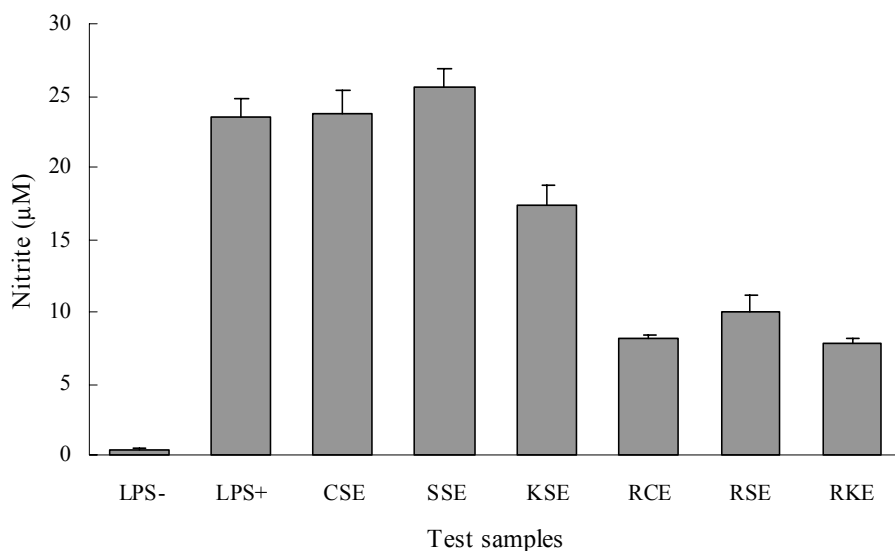


Figure 6-2. Inhibitory effects of test materials on iNOS-mediated NO accumulation in LPS-stimulated mouse macrophage cells. Cells (5×10^5 cells/ml) were incubated in 24 well plates for 24 hr, then stimulated by the treatment of LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) with or without test samples. After 20 hr, the media were collected and examined the amount of NO production using colorimetric Griess reaction. Abbreviations are as follows: CSE, Campbell shoot extract; SSE, Sheridan shoot extract; KSE, Kyoho shoot extract; RCE, Refined material from Campbell shoot extract; RSE, Refined material from Sheridan shoot extract; RKE, Refined material from Kyoho shoot extract

Next, we investigated anti-inflammatory effects of test materials by the inhibition of NO and PGE₂ production as parameters. iNOS and COX-2, which produce NO and PGE₂, respectively, are induced by the response of several pro-inflammatory stimuli such as bacterial lipopolysaccharide (LPS), interleukin-1 (IL-1), and interferon- γ (IFN- γ) (Dubois *et al.*, 1998; Kröncke *et al.*, 1998). These enzymes and their products, NO and PGE₂, may play important roles in chronic inflammatory responses and promotion and/or progression of cancer (Kröncke *et al.*, 1998; Dannenberg *et al.*, 2001). According to this, we evaluated the inhibitory effects of test materials by the determination of NO and PGE₂ accumulation in the

cultured media using colorimetric chemical reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. As shown in Table 6-2 and Figure 6-2, all of refined materials showed inhibitory activities on LPS-induced NO accumulation. At the concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$, they inhibited iNOS-induced NO production about 60~70%. However, grapes shoot extracts did not suppress the NO production in this assay system. Among the refined materials, Kyoho and Campbell refined materials showed similar inhibitory potency, and Sheridan refined materials were about twice less potent than Kyoho and Campbell. In addition, the inhibitory activities of NO production by these refined materials were not related to their cytotoxicity. However, all of test materials did not show any significant inhibitory effects on LPS-induced PGE₂ production (Table 6-3). The difference of results between these assay systems might be due to the difference of assay procedure and/or the relevant signaling to regulate the expression of iNOS and COX-2 and the production of NO and PGE₂. This result indicates that refined materials from grape shoot extracts may possess anti-inflammatory potential on the basis of the inhibition of LPS-induced NO production.

Table 6-3. Effects of test materials on LPS-induced PGE₂ production in RAW 264.7 cells. Cells were stimulated by the treatment of LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) with or without test samples. After 20 hr, supernatants were collected and analyzed to determine the amount of PGE₂ production using enzyme immunoassay

Test samples	% Inhibition at 50 $\mu\text{g/ml}$
Campbell shoot extract (CSE)	16.7
Sheridan shoot extract (SSE)	26.1
Kyoho shoot extract (KSE)	27.2
Refined material from Campbell shoot extract (RCE)	22.8
Refined material from Sheridan shoot extract (RSE)	45.7
Refined material from Kyoho shoot extract (RKE)	1.0

Further, we examined the anti-proliferative activities of grape shoot extracts and refined materials against several human cancer cells. Previous studies demonstrate that resveratrol inhibited cell proliferation against human cancer cells and induced apoptosis, and these anti-proliferative mechanisms of resveratrol were diverse depending on cell lines and experimental conditions (Ahmad *et al.*, 2001; Joe *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2003). Accordingly, we evaluated the inhibitory effects of test materials on the proliferation of human lung, colon, stomach cancer cells, and fibrosarcoma cells compared with resveratrol. As a result, at the concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$, all of refined materials showed the growth-inhibitory activities about 30~40% compared to control, but any of shoot extracts did not significantly inhibit cell proliferation against human cancer cells (Table 6-4), and inhibitory activities of refined materials were less potent than resveratrol. Although the difference of inhibitory potency either species of grapes or cancer cell lines tested was not significant, the refined material from Campbell shoot extract (RCE) was the most potent than other refined materials. This result suggests that refined materials from grape shoot extracts may have anti-proliferative potential against various human cancer cells.

Table 6-4. Effects of test materials on the proliferation of various human cancer cells. Cells were incubated with test materials for 72 hr. After incubation, the inhibitory effects of test materials on the cell proliferation were examined by SRB assay. Values represent mean \pm S.E.M.(n=3). Abbreviations are as follows: CSE, Campbell shoot extract; SSE, Sheridan shoots extract; KSE, Kyoho shoot extract; RCE, Refined material from Campbell shoot extract; RSE, Refined material from Sheridan shoot extract; RKE, Refined material from Kyoho shoot extract

Test samples	% Survival at 50 μ g/ml				
	A549	HCT 116	HT-29	HT-1080	SNU-638
CSE	83.4 \pm 5.0	83.3 \pm 6.4	95.9 \pm 2.6	84.7 \pm 1.5	93.0 \pm 3.1
SSE	100.0 \pm 2.2	100.0 \pm 5.5	97.4 \pm 3.3	100.0 \pm 1.1	99.9 \pm 5.8
KSE	94.7 \pm 8.7	97.7 \pm 9.3	87.1 \pm 3.7	97.8 \pm 3.1	94.4 \pm 11.8
RCE	59.8 \pm 2.7	55.2 \pm 4.2	59.4 \pm 2.6	71.1 \pm 3.5	61.5 \pm 2.4
RSE	61.2 \pm 6.5	59.9 \pm 2.2	68.3 \pm 3.8	69.4 \pm 1.8	60.5 \pm 3.0
RKE	62.5 \pm 1.9	61.0 \pm 4.9	70.5 \pm 2.8	74.3 \pm 3.2	69.3 \pm 2.9
Resveratrol ^{a)}	21.2	19.8	20.0	18.6	7.0

Notes) ^{a)}represented as EC₅₀ values(μ M)

4. Conclusion

In summary, we evaluated chemopreventive potential of some grape shoot extracts and their refined materials using *in vitro* assay system. Both grape shoot extracts and their refined materials effectively showed scavenging activities on generated DPPH free radicals, and also refined materials from grape shoot extracts suppressed LPS-induced NO production in macrophage cells, and also moderately inhibited cell proliferation against human cancer cells. Although biological activities of these materials were less effective than those of a positive control, resveratrol, it is more reasonable to evaluate their biological potential considering the possibility of co-existence of some substances that may inhibit biological activities in

grape shoot extracts and refined materials. Further studies are underway to investigate additional biological effects of shoot extracts and their refined materials. In conclusion, these grape shoot extracts and their refined materials might be useful sources for the development of chemopreventive agents and/or functional foods.

제 7 절 레스베라트롤 생산공정의 scale-up

1. 레스베라트롤 제조공정

그림 7-1은 레스베라트롤을 함유한 포도 껍질 추출물을 생산하는 제조공정을 나타낸 것이다. 원료로는 포도 가지, 포도 씨, 포도 껍질 등이 활용될 수 있으며, 여기서는 포도 가지를 활용하는 방법에 대해서 다루고자 한다.

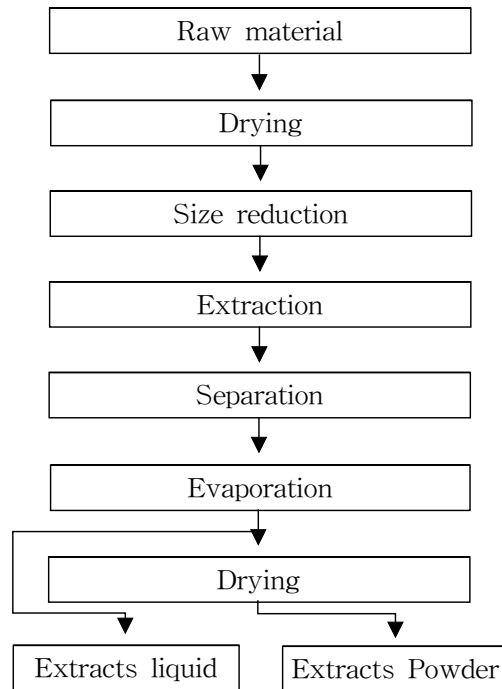


Fig. 7-1. Process to extract resveratrol from grape vine.

그림 7-1의 공정에 의거한 작업 요령은 다음과 같다. 포도 산지에서 원료를 수분함량이 10% 정도가 되도록 천일 건조하고, 조파쇄기를 이용하여 1차 분쇄한 분쇄물을 저온저장한다. Rittinger 법칙에 의해 분쇄에너지를 추정하고자 할 때, 포도 가지의 분쇄상수는 $630 \text{ kJ} \cdot \text{mm/kg}$ 이다. 추출 작업을 위한 원료는 입도가 $0.3 \sim 0.5 \text{ mm}$ 가 적합하며, 초음파 추출법을 이용하여 상온에서 물/알코올 혼합용매 추출한다. 이때 추출 시간은 10분 이내로 한다. 추출 후, 원심분리 또는 여과에 의해 불용성 물질을 제거하고 용해성 물질을 회수한다. 회수된 용액

을 증발에 의해 용매의 함량이 약 70%까지 농축하여 액상형 추출물을 얻는다. 또는 분무건조를 실시하여 분말형 추출물을 제조한다.

2. 추출 공정의 시뮬레이션

레스베라트롤 추출 공정은 다음의 식 (1)~(3)을 이용하여 시뮬레이션할 수 있다.

$$[R_b] = [R_{b0}]e^{-k_1t} \quad (1)$$

$$[R_s] = [R_{b0}] \frac{k_1}{k_2 - k_1} (e^{-k_1t} - e^{-k_2t}) \quad (2)$$

$$[C_d] = [R_{b0}] \left(1 + \frac{k_2}{k_1 - k_2} e^{-k_1t} + \frac{k_1}{k_2 - k_1} e^{-k_2t} \right) \quad (3)$$

여기서, $[R_{b0}]$ 은 추출되기 전의 초기 레스베라트롤 함량을 나타내며, $[R_b]$, $[R_s]$ 및 $[C_d]$ 는 각각 추출 반응 중에 임의의 시간에서 결합된 레스베라트롤 함량, 추출되어 용해된 레스베라트롤 함량, 그리고 용해된 레스베라트롤 중에서 저분자 물질로 분해된 물질의 함량을 나타낸다. 또한, 식 (1)~(3)에서 k_1 과 k_2 는 캠벨 포도의 경우 각각 0.780 min^{-1} 및 0.0648 min^{-1} 이며, 거봉 포도의 경우에는 각각 0.477 min^{-1} 및 0.0371 min^{-1} 이다.

그림 7-2과 7-3은 캠벨 및 거봉 포도의 가지를 원료로 하였을 때 추출 반응 동안 변화하는 각 성분의 함량을 나타낸 것이다. 세포 내에서 결합되어 있던 레스베라트롤이 용해성 레스베라트롤로 추출되는 양은 시간에 따라 크게 변하는 것으로 나타났으며, 또한 용해된 레스베라트롤의 일부는 용액 중에서 다른 물질로 분해되는 것을 알 수 있다. 결국, 추출 작업을 지나치게 길게 유지하게 되면 레스베라트롤의 수율은 오히려 감소하게 됨을 알 수 있다.

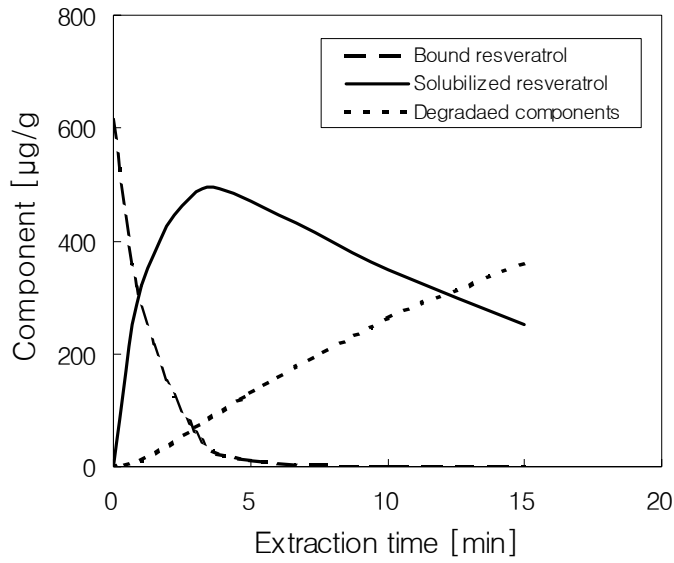


Fig. 7-2. Simulation on variation of each component content with respect to time during extraction of resveratrol from fruit stem of *Campbell* grape when the ultrasonication-assisted extraction was applied.

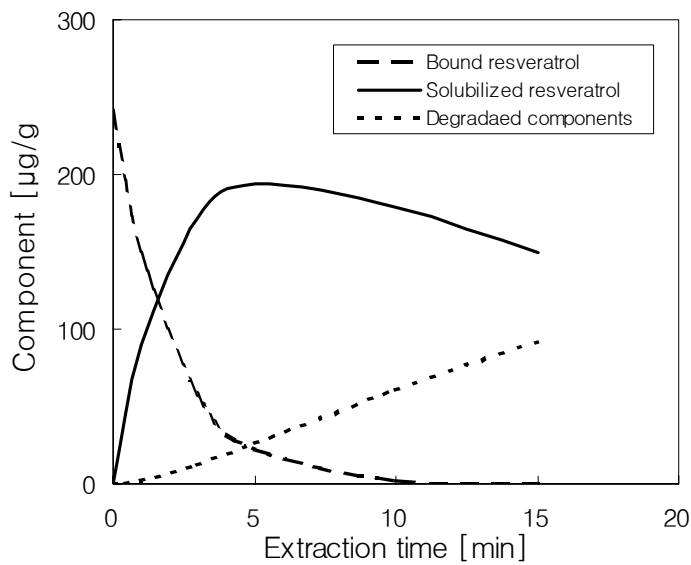


Fig. 7-3. Simulation on variation of each component content with respect to time during extraction of resveratrol from fruit stem of *Gerbong* grape when the ultrasonication-assisted extraction was applied.

즉, 식 (1)~(3)의 시뮬레이션 모델에 의하면, 추출된 용해성 레스베라트롤이 분해되어 소실되는 양은 시간이 증가함에 따라 점점 크게 증가하는 것으로 나타났다. 이와 같이 용해성 레스베라트롤의 함량을 특정한 시간까지는 점점 증가하다가 최고치를 보인 후 점점 감소함을 알 수 있다. 따라서, 레스베라트롤 추출 공정은 최적화가 필요하게 되는 바, 식 (2)를 미분하여 최적 추출시간을 식 (4)와 같이 얻을 수 있다.

$$t_{|RS|_{\max}} = \frac{1}{k_2 - k_1} \ln\left(\frac{k_2}{k_1}\right) \quad (4)$$

Table 7-1. Composition of components related to resveratrol at the extraction time with the maximum recovery

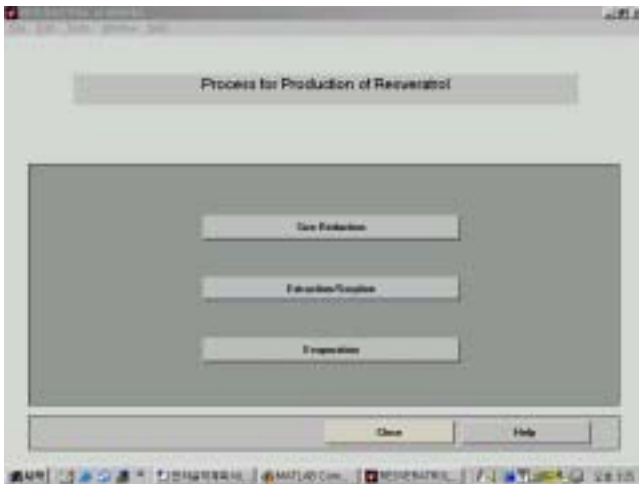
Fruit stem of <i>Campbell</i> grape (initial content of bound resveratrol = 613.2 µg/g-dry material)			
Extraction time with maximum recovery [min]	Solubilized resveratrol [µg/g]	Bound resveratrol [µg/g]	Degraded compounds [µg/g]
3.48	489.4 (79.8%)	40.7 (6.6%)	83.1 (13.6%)
Fruit stem of <i>Gerbong</i> grape (initial content of bound resveratrol = 241.6 µg/g-dry material)			
Extraction time with maximum recovery [min]	Solubilized resveratrol [µg/g]	Bound resveratrol [µg/g]	Degraded compounds [µg/g]
5.80	194.8 (80.6%)	15.2 (6.3%)	31.6 (13.1%)

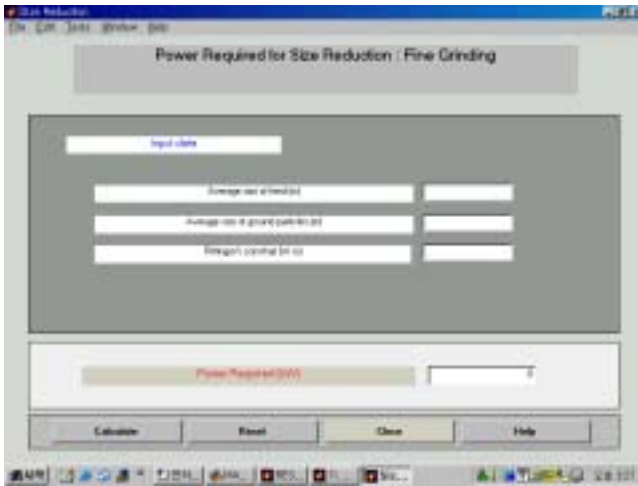
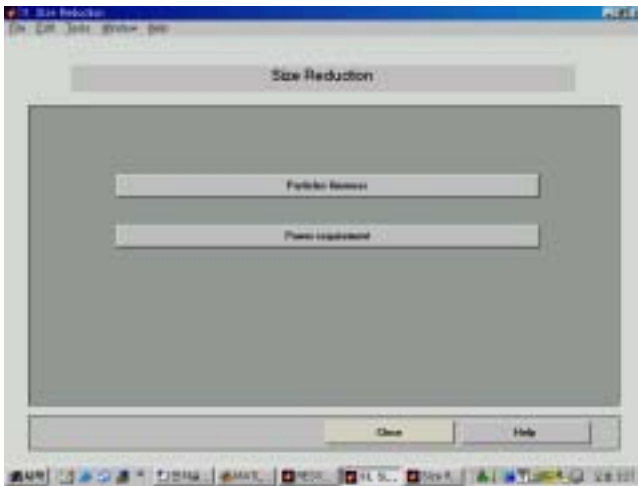
표 7-1은 레스베라트롤 추출에 관한 시뮬레이션에서 최적화된 결과를 나타낸 것이다. 원료의 초기 레스베라트롤 함량은 캠벨 포도가 613.2 $\mu\text{g/g-dry material}$ 이고, 거봉 포도가 241.6 $\mu\text{g/g-dry material}$ 이다. 캠벨의 경우, 3.48 분 경과하였을 때, 최고 수율은 489.4 $\mu\text{g/g-dry material}$ 으로 나타났으며, 이러한 양은 원료에 함유되어 있던 총 레스베라트롤의 79.8%에 해당한다. 이때, 추출되지 않고 원료에 남아 있는 결합된 레스베라트롤의 함량은 70.7 $\mu\text{g/g-dry material}$ 이며, 용매 속으로 추출된 용해성 레스베라트롤 중에서 83.1 $\mu\text{g/g-dry material}$ 은 분해되어 저분자 물질로 소실된 것으로 나타났다.

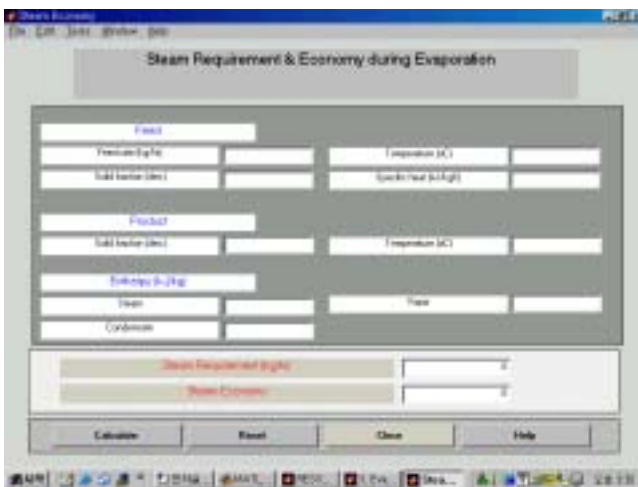
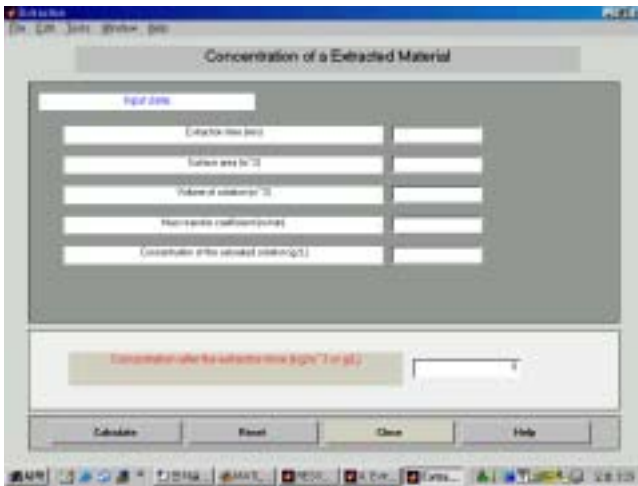
거봉 포도의 경우, 추출 시간이 5.80 분 경과하였을 때 레스베라트롤의 추출이 최적화된 결과를 얻을 수 있었다. 즉, 회수된 레스베라트롤의 최고 수율은 194.4 $\mu\text{g/g-dry material}$ 이었으며, 이때까지 남아 있는 결합된 레스베라트롤의 함량은 15.2 $\mu\text{g/g-dry material}$ 이고 추출된 레스베라트롤 중에서 분해되어 저분자로 변화된 물질의 양은 31.6 $\mu\text{g/g-dry material}$ 로 나타난 바, 이러한 양은 각각 초기의 전체 레스베라트롤 양의 80.6%, 6.3% 및 13.1%에 해당하는 것이다.

3. Matlab을 이용한 시스템 설계

본 연구에서는 포도에서 레스베라트롤을 고함유하는 추출물을 생산하는 시스템을 분석하고 설계하기 위해 주요 단위조작을 Matlab 프로그램을 이용하여 평가할 수 있도록 하였다. Matlab 환경에서 “Resveratrol”을 실행하면 분쇄 공정, 추출 공정, 증발 공정을 분석하는 단위 프로그램을 실행할 수 있는 버튼을 볼 수 있으며, 각 단위조작 프로그램을 이용하여 단위조작별로 단위 시스템을 분석, 설계할 수 있도록 하였다.







4. 현장 평가

현장 평가를 위하여 기 운영 중인 추출물 제조공장을 임차하여 현장실험을 실시하였다. 실험을 위해 1,000 kg의 원료가 조제되었으며, 추출 공정에는 100 kg의 원료가 사용되었다.

건조 공정은 포도 산지에서 천일 건조가 효과적이었으며, 2개월 동안 천일 건조를 실시하였을 때 최종 수분함량은 캠벨 가지 11.69%, 거봉 가지 12.86%, 세리단 16.14%로 나타났다.

분쇄 공정의 경우, 포도 산지에서 조파쇄기를 이용하여 1차 분쇄한 가지를 수집하여 저온저장고에 보관하면서 해머 밀과 롤 밀을 이용하여 분쇄하였다. 추출 작업을 위해 준비된 원료의 평균 입도는 0.3 mm이었다.

추출 후 회수된 추출물의 수율은 캠벨 27.9%, 거봉 23.6%, 셰리단 29.3%로 나타났으며, 이때 레스베라트롤의 함량은 추출물 건물중 대비 캠벨 3.04 mg/g-dry material, 거봉 0.97 mg/g-dry material, 셰리단 1.79 mg/g-dry material로 나타났다.

분리·정제과정 후의 수율은 최초 원료의 건물중 대비 캠벨 2.74%, 거봉 2.23%, 셰리단 2.10%로 나타났으며, 이때의 레스베라트롤 함량은 캠벨 17.01 mg/g-dry material, 거봉 16.06 mg/g-dry material, 셰리단 16.83 mg/g-dry material로 나타났다(표 7-2).

한편, 증발 과정 후 회수된 추출물의 액상형 제품의 수분함량(에탄올 일부 포함)은 캠벨 78.2%, 거봉 75.3%, 셰리단 77.7%로 나타났다.

Table 7-2. Recovery yield and resveratrol content of refined extracts of grape vine

Cultivar	Recovery yield (%)	Resveratrol content (mg/g-dry material)
Campbell	2.74	17.0
Gerbong	2.23	16.1
Sheridan	2.10	16.8

Notes) $yield = \frac{\text{dry weight of extracts}}{\text{dry weight of raw material}} \times 100$

제 8 절 소재의 활용 및 산업적 효과

1. 시제품 제조

그림 8-1과 8-2는 레스베라트롤 등 페놀계 화합물을 다량 함유하고 있는 포도가지 추출물과 정제물을 보여주는 것이다. 정제물의 성상은 분말로서 갈색을 띠고 있으며, 냄새가 없고, 밀도는 약 450 kg/m^3 이며, 수분함량은 9% 이하이다. 그림 8-3은 이러한 소재를 활용하여 피부의 노화방지용 기능성 화장품을 제조한 시제품의 형태를 보여주고 있다.



Fig. 8-1. Left: Crude extracts of grape vine in bottles; right: refined extracts.



Fig. 8-2. Left: Crude extracts of grape vine in dishes; right: refined extracts.



Fig. 8-3. Functional skin cream with natural antiaging materials.

2. 산업적 효과 분석

표 8-1~8-4는 우리 나라에서 생산되고 있는 주요 과실의 생산, 소비, 가공 현황을 나타낸 것이다. 포도를 비롯하여 사과, 배, 복숭아, 감귤 등은 우리 나라에서 생산되는 과실류 중에서 농업 부문에서 차지하고 있는 비중이 매우 높기 때문에 이들 품목의 생산, 소비, 가공 현황을 비교해 보고, 포도 폐놀계 추출물을 생산하였을 때, 예상되는 경제적 효과를 검토해 보고자 한다.

Table 8-1. Production of major fruits in Korea (unit: 1,000ha, 1,000ton)

Year	Grape		Apple		Pear		Peach		Tangerine	
	Area	Weight	Area	Weight	Area	Weight	Area	Weight	Area	Weight
1996	27	357	44	651	18	219	10	128	25	514
1997	28	393	40	652	22	260	11	147	26	649
1998	30	398	35	459	25	260	12	151	26	512
1999	31	470	31	490	26	259	13	157	26	624
2000	29	476	29	489	26	324	14	170	27	563
2001	27	454	26	404	26	417	14	166	27	645
2002	26	422	26	433	25	386	16	188	26	643

Table 8-2. Consumption per capita of major fruits in Korea (unit: kg)

Year	Grape	Apple	Pear	Peach	Tangerine
1996	7.9	14.2	4.7	2.8	11.7
1997	8.8	14.1	5.6	3.2	14.9
1998	8.6	9.8	5.5	3.3	11.8
1999	10.2	10.5	5.5	3.4	13.9
2000	10.3	10.4	6.7	3.6	14.0
2001	9.7	8.4	8.6	3.5	15.5
2002	9.0	9.0	7.8	4.0	15.5

Table 8-3. Producer's price of major fruits in Korea (unit: Won/kg)

Year	Grape	Apple	Pear	Peach	Tangerine
1996	1,620	935	1,715	1,441	1,083
1997	1,536	1,031	1,870	1,519	1,069
1998	1,277	1,166	1,745	1,275	1,156
1999	1,253	1,504	1,988	1,362	1,197
2000	1,262	1,066	1,127	1,125	1,052
2001	621	1,120	1,046	1,003	638
2002	1,371	1,583	959	882	689

Table 8-4. Processed rate of major fruits in Korea (unit: %)

Year	Grape	Apple	Pear	Peach	Tangerine
1996	7.03	9.44	12.0	11.8	4.12
1997	4.24	9.26	11.2	5.03	0.97
1998	4.59	7.03	2.53	5.09	1.97
1999	1.91	4.69	1.54	9.55	7.37
2000	1.61	7.77	1.23	6.05	5.34
2001	3.25	8.39	1.07	5.96	7.68

Notes) $processed\ rate = \frac{Amount\ utilized\ in\ processing}{Total\ production} \times 100$

포도는 우리 나라에서 재배 면적과 생산량 측면에서 가장 중요한 과실 중의 하나로서 단위 무게당 가격이 사과 다음으로 비싼 1,371 원/kg(2002년 기준)을 기록하고 있으며, 1인당 소비량도 감귤에 이어 2위를 차지하여 9.0 kg/인(2002년 기준)에 이르고 있다. 생산된 포도의 대부분은 생식용으로 소비되고 있어 가공비율은 전체 생산량의 3.25%(2001년 기준)에 불과하여 사과, 복숭아, 감귤 등의 가공비율에 비해 낮은 수준을 보이고 있다. 이와 같은 현황을 볼 때, 포도 과실을 주스, 통조림 등과 같이 단순 가공품으로 가공할 경우 원료 가격이 다른 과실에 비해 상대적으로 높기 때문에 고부가가치를 기대하기 어려움을 알 수 있다.

본 연구를 통해 알 수 있는 바와 같이, 포도에는 항산화 효과가 탁월한 기능성 성분인 레스베라트롤이 과실의 껍질, 씨, 가지 등에 함유되어 있어 이를 원료로 한 기능성 소재 생산에 활용할 경우 고부가가치의 가공품을 생산할 수 있을 것으로 기대된다. 특히, 가지의 경우 레스베라트롤의 함량이 매우 높아 우수한 자원으로 활용 가능할 뿐만 아니라 과실을 생식용으로 소비하더라도 원료의 수급에는 전혀 문제가 되지 않기 때문에 국내 포도 산업에는 매우 긍정적인 영향을 미칠 것으로 기대된다.

Table 8-5. Weight composition in a fruit cluster of grape (unit: %)

Component	Campbell	Gerbong	Average
Seed	8.0	3.8	5.9
Skin	44.5	27.2	35.8
Fruit stem	3.8	3.1	3.5
Flesh	43.7	65.9	54.8
Total	100	100	100

표 8-5는 포도 한 송이에 대해서 각 부위별 구성 무게비를 백분율로 나타낸 것이다. 평균적으로 포도 씨는 5.9%, 껍질은 35.8%, 송이가지는 3.5%, 과육은 54.8%로 나타났다. 레스베라트롤을 생산하기 위해서 포도 씨와 껍질을 활용한다면, 2001년도 포도 총 생산량은 454,000 톤이고, 가공률은 3.25%이므로 6,150 톤의 레스베라트롤 추출용 원료를 확보할 수 있을 것으로 추정된다. 포도 가지를 원료로 사용하는 경우에는 포도 송이 중량에 상응하는 물량을 얻을 수 있으므로 레스베라트롤 추출용 원료로 454,000 톤의 가지를 활용할 수 있을 것으로 추정할 수 있다. 이러한 규모를 활용 비율에 따라 추정 가능한 포도 추출물의 생산 규모는 표 8-6과 같다. 표에서 보면, 포도 가지의 0.1%가 추출물의 원료로 활용될 경우 11.4 톤의 추출물을 생산할 수 있으며, 3%가 활용될 경우에는 342 톤의 추출물을 생산할 수 있을 것으로 추정할 수 있다.

Table 8-6. Estimated yearly production of grape extracts with resveratrol under the assumption that a total available amount of raw material is 454,000 ton per year and an average recovery of extracts yield is 2.5%

Utilization rate (%)	Amount of raw material (ton)	Amount of grape extracts (ton)
0.1	454	11.4
0.5	2,270	56.8
1	4,540	114
2	9,080	227
3	13,620	341

표 8-7. 레스베라트롤을 함유한 포도 추출물의 가격에 따른 연간 생산액 추정

추출물 가격 (원/g)	연간 생산액 (억원)		비고
	연간 10 톤 생산의 경우	연간 100 톤 생산의 경우	
100	10	100	레스베라트롤 가격('04년)
500	50	500	순도 90%: 6,500원/g
1,000	100	1,000	순도 99%: 889,800원/g

표 8-7은 레스베라트롤을 함유한 포도 추출물의 가격에 따른 연간 생산액

추정치를 나타낸 것이다. 2004년 현재, 레스베라트롤의 가격은 순도에 따라 큰 차이를 보이고 있으며, 순도가 90%일 때 6,500원/g이고, 순도가 99%일 때는 무려 889,800원/g에 거래되고 있다. 그런데, 고도로 정제된 단일 물질의 레스베라트롤은 연구용 또는 의약품용과 같이 특정한 용도로 활용되고 있으며, 식품 또는 화장품의 원료로는 레스베라트롤이 다량 함유된 복합 물질의 천연 추출물이 적합한 것으로 알려져 있다. 따라서, 1~5%의 레스베라트롤을 함유한 천연 추출물은 매우 유용한 기능성 소재로 평가받고 있다. 이러한 기능성 소재를 국내산 포도 자원을 활용하여 생산할 때, 표 8-7과 같은 규모의 생산을 창출할 수 있게 된다. 즉, 국내 포도 자원의 약 1%를 포도 추출물 생산에 활용할 경우, 100 톤의 포도 추출물을 생산할 수 있으며, 이러한 양은 추출물 가격이 1,000 원/g을 유지할 경우 1,000 억원에 이르는 규모이다. 만약, 포도 추출물의 활용이 활성화되어 추출물의 가격이 100 원/g까지 하락할 경우에는 100 억원의 규모가 되지만, 동반하여 생산량의 증가에 따라 이보다 훨씬 상회하는 시장 규모를 형성할 것으로 전망해 볼 수 있다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

- 본 연구는 2001년 8월 20일부터 2004년 8월 19일까지 3년 동안 수행되었으며, 연구의 최종 목표는 국내산 포도를 원료로 하여 레스베라트롤이 다량 함유된 페놀계 추출물의 생산시스템을 개발하고, 기능성 화장품의 소재로서 추출물의 생물활성 효능을 평가하고자 한 바, 연구 종료 시점에서 소기의 목표를 달성하였으며, 개발된 기술은 관련 산업체에 기술이전을 완료하였고, 현재 응용제품으로서 노화방지용 기능성 화장품의 시제품을 개발한 상태임.

- 국내산 포도는 생산후 대부분이 생식용으로 소비되고 있고, 148,000톤(2001년 기준)만이 가공용으로 활용되고 있어 다른 과실류에 비해 가공실적이 저조할 뿐만 아니라 주스, 통조림과 같은 단순가공이 대부분이어서 경쟁력 있는 부가가치 제품을 창출하지 못하고 있는 현실에서 본 개발기술은 새로운 고부가가치 제품을 생산할 수 있는 핵심기술을 제공하고 있는 바, 향후 국내 포도산업 및 바이오산업의 활성화에 크게 기여할 것으로 전망됨.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 실적

1. 학술발표

Effects of grape extracts on free radical scavenging activity and inhibition of pro-inflammatory mediator productio in macrophage cells. 한국식품과학회 2002년 추계학술대회. 제69차 학술발표회. 2002. 10. 24-26. 무주리조트.

국내산 포도의 부위별 레스베라트롤 함량. 한국산업식품공학회 2002년도 추계 학술대회. 2002. 11. 16. 천안 상록리조트.

2. 논문게재

포도 추출물들의 프리 라디칼 소거 작용 및 마우스 대식세포주에서의 염증 발현 매개 인자들에 대한 생성 억제 효과. 한국식품과학회지 35(1):132-137 (2003)

국내산 포도의 부위별 레스베라트롤 함량. 한국식품과학회지 35(2):306-308 (2003)

포도의 분쇄 특성 분석 및 모형 개발. 산업식품공학 7(3):154-158 (2003)

Evaluation of cancer chemopreventive potential of various grape shoot extracts and refined materials using *in vitro* bioassay systems. *The Journal of Applied Pharmacology* 12(2): 122-128 (2004)

3. 특허출원

포도로부터 레스베라트롤 추출 방법. 대한민국 특허출원 제10-2002-0044436호 (2002. 7. 27)

4. 기술이전

레스베라트롤 고탐유 포도추출물 생산기술, 실시기간: 2003.10.17 - 2013.10.16.
기술이전업체명: (주)휴시스

5. 홍보

2003년 10월 6일자 한국농어민신문: 포도송이 가지서 항암·항산화물질 추출

2003년 10월 13일자 농수축산신문: 포도송이가지서 ‘레스베라트롤’ 추출

2003년 10월 8일자 원예산업신문: 포도송이 가지서 항암물질 추출

2003년 10월 20일자 한국영농신문: "레스베라트롤" 고탐유 추출물 신속 생산 가능

2003년 10월 2일자 농축유통신문: 암예방 효과 큰 레스베라트롤 고탐유 포도가지 추출물 신속 생산기술 개발

2003년 10월 6일자 보건신문: 생리활성물질 추출 기술개발: 포도가지에서 ‘레스베라트롤’

2003년 10월 6일자 식품음료신문: 포도송이 가지 함유 레스베라트롤 짧은 시간에 대량 추출법 개발

2003년 10월 9일자 외식경제신문: 레스베라트롤 신속 생산기술 개발

2003년 12월 AgraFood 9(12):42-43: Method Developed To Obtain Resveratrol From Grapevine Branches - Quick Process Saves on Costs

제 2 절 계획

1. 논문투고

Ultrasonication-assisted extraction of resveratrol from grapes. J Food Engineering (2004, SCI 논문)

2. 홍보

2004 농림과학기술대전 우수기술전시회(2004년 9월 16일 - 17일): 기능성 화장품 시제품 출품

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- Health Ingredients Europe, Conference Proceedings: HI Europe 2002
- Tzia, C. and Liadakis, G. 2003. Extraction Optimization in Food Engineering. Marcel Dekker, Inc., New York
- Cserhati, T. Forgacs, E. 1999. Chromatography in Food Science and Technology. Technomic Publishing Co., Lancaster
- Food Ingredients Buyer's Guide 2004: The Suppliers
- Food Ingredients Buyer's Guide 2004: The Products
- Food Ingredients Buyer's Guide 2004: The Web guide

제 7 장 참고문헌

제 1 절

1. Lee, S.K., Mbwambo, Z.H., Chung, H., Luyengi, L., Gamez, E.J.C., Metha, R.G., Kinghorn, A.D. and Pezzuto, J.M. Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Comb. Chem. & High Throughput Screening* 1: 35-46 (1998)
2. Martinez, J. and Moreno, J.J. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem. Pharmacol.* 59: 865-870 (2000)
3. Joe, A.K., Liu, H., Suzui, M., Vural, M.E., Xiao, D. and Weinstein, I.B., Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin Cancer Res.* 8: 893-903 (2002)
4. Frémont, L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* 66(8): 663-673 (2000)
5. Bhat, K.P.L. and Pezzuto, J.M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 957: 210-229 (2002)
6. Ministry of Agriculture & Forestry. *Agricultural & Forestry Statistical Yearbook.* Republic of Korea (2001)
7. Adrian, M., Jeandet, P., Bessis, R. and Joubert, J.M. Induction of phytoalexin (resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated with aluminum chloride (AlCl₃). *J. Agric. Food Chem.* 44:1979-1981 (1996)
8. Jeandet, P., Bessis, R. and Gautheron, B. The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different development stages. *Am. J. Enol. Vitic.* 42: 41-46 (1991)

제 2 절

1. 조용진, 광창근. 2000. 산지 농산물 가공을 위한 농촌형 공장의 실태. *한국농업기계학회 학술회의 논문집* 5(2):191-200
2. 조용진, 김재은, 전향숙, 김종태, 김성수, 김철진. 2003. 국내산 포도의 부위별 레스베라트롤 함량. *한국식품과학회지* 35(2):306-308
3. ASAE. 1994. *ASAE Standards.* American Society of Agricultural

Engineers, St Joseph, USA

4. Brennan, J.G., J.R. Butters, N.D. Cowell and A.E.V. Lilly. 1976. Food Engineering Operations. Applied Science Publishers, London, UK
5. Charm, S.E. 1971. The Fundamentals of Food Engineering. AVI Publishing Company, Westport, USA
6. Fellows, P. 1988. Food Processing Technology: Principles and Practice. Ellis Horwood, Chichester, England

제 3 절

1. Cho, Y.J., Kim, C.T., Kim, C.J., & Hwang, J.K. (1999). Modeling of extrusion for pectin extraction from apple pomace. *Korean J Food Science and Technology*, 31, 1011-1016.
2. Cho, Y.J., & Hwang, J.K. (2000). Modeling the yield and intrinsic viscosity of pectin in acidic solubilization of apple pomace. *J Food Engineering*, 44, 85-89.
3. Cho, Y.J. & Lee, S.C. (2002). Enzymatic solubilization of cell wall materials from apple pomace. *Food Science and Biotechnology*, 11, 697-699.
4. Cho, Y.J., Kim, J.E., Chun, H.S., Kim, C.T., Kim, S.S., & Kim, C.J. (2003). Contents of resveratrol in different parts of grapes. *Korean J Food Science and Technology*, 35, 306-308.
5. Cho, Y.J., Lee, S.K., Ahn, Y.H., & Pyee, J.H. (2003). Development of ultrasonication-assisted extraction process for manufacturing extracts with high content of pinosylvin from pine leaves. *J Korean Society for Agricultural Machinery*, 28, 325-334.
6. Cseke, L.J. & Kaufman, P.B. (1999). Regulation of metabolite synthesis in plants. In P.B. Kaufman, L.J. Cseke, S. Warber, J.A. Duke, H.L. Briellmann (Eds.), *Natural products from plants* (pp. 91-121). CRC Press, Boca Raton.
7. Draper, N.R. & Smith, H. (1981). *Applied regression analysis, 2nd edn.* (pp. 458-529). Wiley, New York.
8. Gerats, A.G.M. & Martin, C. (1992). Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*: genetic and molecular biology of flower colour. In R.K. Ibrahim, H.A. Stafford (Eds.), *Recent advances in phytochemistry, vol 26, phenolic metabolism in plants* (pp. 165-199). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

9. Goldberg, D.M., Tsang, E., Karumanchiri, A., Diamandis, E.P., Soleas, G., & Ng, E. (1996). Method to assay the concentrations of phenolic constituents of biological interest in wines. *Analytical Chemistry*, 68, 1688-1694.
10. Jeandet, P., Bessis, R., & Gautheron, B. (1991). The production of resveratrol (3,5,4-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. *American J Enology and Viticulture*, 42, 41-46.
11. Jeandet, P., Bessis, R., Sbaghi, M., Meunier, P., & Trollat, P. (1995). Resveratrol content of wines of different ages: relationship with fungal disease pressure in the vineyard. *American J Enology and Viticulture*, 46, 1-4.
12. Lamuela-Raventós, R.M. & Waterhouse, A.L. (1993). Occurrence of resveratrol in selected California wines by a new HPLC method. *J Agricultural and Food Chemistry*, 41, 521-523.
13. Langcake, P. & Pryce, R.J. (1976). The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology*, 9, 77-86.
14. Pezet, R. & Cuenat, Ph. (1996). Resveratrol in wine: extraction from skin during fermentation and post-fermentation standing of must from Garmay grapes. *American J Enology and Viticulture*, 47, 287-290.
15. Renard, C.M.G.C., Thibault, J.F., Voragen, A.G.J., van den Broeke, L.A.M., & Pilnik, W. (1993). Studies on apple protopectin VI: extraction of pectins from apple cell walls with rhamnogalacturonase. *Carbohydrate Polymers*, 22, 203-210.
16. Romero-Pérez, A.I., Lamuela-Raventós, R.M., Andrés-Lacueva, C., & Carmen de la Torre-Boronat, M. (2001). Method for the quantitative extraction of resveratrol and piceid isomers in grape berry skins: effect of powdery mildew on the stilbene content. *J Agricultural and Food Chemistry*, 49, 210-215.
17. Sakamoto, T., Hours, R.A., & Sakai, T. (1995). Enzymic pectin extraction from protopectins using microbial protopectinases. *Process Biochemistry*, 30, 403-409.

제 4 절

1. Cheremisinoff, P.N. 1995. Solids/liquids Separation. Technomic Publishing Co., Lancaster, USA
2. Charm, S.E. 1971. The Fundamentals of Food Engineering. AVI

Publishing Company, Westport, USA

3. Cserhati, T. and E. Forgacs. 1999. Chromatography in Food Science and Technology. Technomic Publishing Co., Lancaster, USA
4. Fellows, P. 1988. Food Processing Technology: Principles and Practice. Ellis Horwood, Chichester, England
5. Grandison, A.S. and M.J. Lewis. 1996. Separation Process in the Food and Biotechnology Industries: Principles and Applications. Technomic Publishing Co., Lancaster, USA
6. Romero-Pérez, A.I., Lamuela-Raventós, R.M., Andrés-Lacueva, C., & Carmen de la Torre-Boronat, M. (2001). Method for the quantitative extraction of resveratrol and piceid isomers in grape berry skins: effect of powdery mildew on the stilbene content. *J Agricultural and Food Chemistry*, 49, 210-215.

제 5 절

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

- pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol.* 2: 544-551 (2001).
9. Tsujii, M., Kawano S., Tsujii, S., Sawaoka, H., Hori, M., and Dubois, R.N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 93: 705-716 (1998)
 10. Sheng, H., Shao, J., Morrow, J.D., Beachamp, R.D., and Dubois, R.N. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 58: 362-366 (1998)
 11. Stuehr, D.J. Mammalian nitric oxide synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1411: 217-230 (1999)
 12. Kröncke, K.D., Fehsel, K., and Kolb-Bachofen, V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 113: 147-156 (1998)
 13. Oshima, H., and Bartsch, H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat. Res.* 305: 253-264 (1994)
 14. Kelloff, G.J., Crowell, J.A., Steele, V.E., Lubet, R.E., Malone, W.A., Boone, C.W., Kopelovich, L., Hawk, E.T., Lieberman, R., Lawrence, J.A., Ali, I., Viner, J.L., and Sigman, C.C. Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. *J. Nutr.* 130: 467S-471S (2000)
 15. Frankel, E.N., Kanner, J., German, J.B., Parks, E. and Kinsella, J.E. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 341: 454-457 (1993)
 16. Lee, S.K., Mbwambo, Z.H., Chung, H., Luyengi, L., Gamez, E.J.C., Metha, R.G., Kinghorn, A.D., and Pezzuto, J.M. Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Comb. Chem. & High Through. Screening.* 1: 35-46 (1998)
 17. Martinez, J., and Moreno, J.J. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem. Pharmacol.* 59: 865-870 (2000)
 18. Joe, A.K., Liu, H., Suzui, M., Vural, M.E., Xiao, D. and Weinstein, I.B., Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin Cancer Res.* 8: 893-903 (2002)
 19. Frémont, L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* 66(8): 663-673 (2000)
 20. Bhat, K.P.L., and Pezzuto, J.M. Cancer chemopreventive activity of

- resveratrol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 957: 210-229 (2002)
21. Ferguson, L.R. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat. Res.* 475(1-2): 89-111 (2001)
 22. Briviba, K., Pan, L., and Rechkemmer G. Red wine polyphenols inhibit the growth of colon cancer cells and modulate the activation pattern of mitogen-activated protein kinases. *J. Nutr.* 132(9): 2814-8 (2002)

제 6 절

1. Ahmad, N., Adhami, V. M., Afaq, F., Feyes, D. K., and Mukhtar, H. (2001). Resveratrol causes WAF1/p21-mediated G1 phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Clin. Cancer Res.* 7, 1466-1473.
2. Alley, M. C., Dominic, A., and Shoemaker, R. H. (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 48, 589-601.
3. Ames, B. N., Shigenaga, M. K., and Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7915-7922.
4. Dannenberg, A. J., Altorki, N. K., Boyle, J. O., Dang, C., Howe, L. R., Weksler, B. B., and Subbaramaiah, K. (2001). Cyclooxygenase-2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol.* 2, 544-551.
5. Dreher D. and Junod, A. F. (1998). Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur. J. Cancer* 32A, 30-38.
6. Dubois, R. N., Abramson, S. B., Crofford, L., Gupta, R. A., Simon, L. S., Van De Putte, L. B., and Lipsky, P. E. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 12, 1063-1073.
7. Fremont, L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* 66, 663-673.
8. Gerhauser, C., Alt, A., Heiss, E., Gamal-Eldeen, A., Klimo, K., Knauff, J., Neumann, I., Scherf, H.-R., Frank, N., Bartsch, H., and Becker, H. (2002). Cancer chemopreventive activity of xanthohumol, a natural product derived from hop. *Mol. Cancer Ther.* 1, 959-969.
9. Green, L. C., Wanger, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., and Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126, 131-138.

10. Gusman, J., Malonne, H., Atassi, G. (2001). A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis* **22**, 1111-1117.
11. Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., Fong, H. H. S., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C., and Pezzuto, J. M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **275**, 218-220.
12. Joe, A. K., Liu, H., Suzui, M., Vural, M. E., Xiao, D., and Weinstein, I. B. (2002). Resveratrol induced growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin. Cancer Res.* **8**, 893-903.
13. Kelloff, G. J., Crowell, J. A., Steele, V. E., Lubet, R. A., Malone, W. A., Boone, C. W., Kopelovich, L., Hawk, E. T., Lieberman, R., Lawrence, J. A., Ali, I., Viner, J. L., and Sigman, C. C. Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. (2000). *J. Nutr.* **130**, 467S-471S.
14. Kinghorn, A. D., Fong, H. H. S., Farnsworth, N. R., Mehta, R. G., Moon, R. C., Moriarty, R. M., and Pezzuto, J. M. (1998). Cancer chemopreventive agents discovered by activity-guided fractionation: a review. *Curr. Org. Chem.* **2**, 597-612.
15. Kröncke, K. D., Fehsel, K., and Kolb-Bachofen, V. (1998). Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin. Exp. Immunol.* **113**, 147-156.
16. Kwak, M. K., Egner, P. A., Dolan, P. M., Ramos-Gomez, M., Groopman, J. D., Itoh, K., Yamamoto, M., and Kensler, T. W. (2001). Role of phase 2 enzyme induction in chemoprotection by dithiolethiones. *Mutat. Res.* **480-481**, 305-315.
17. Lambert, J. D., and Yang, C. S. (2003). Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols. *Mutat. Res.* **523-524**, 201-208.
18. Lander, H. M. (1997). An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J.* **11**, 118-124.
19. Lee, S. K., Mbwambo, Z. H., Chung, H., Luyengi, L., Gamez, E. J. C., Mehta, R. G., Kinghorn, A. D., and Pezzuto, J. M. (1998). Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Comb. Chem. & High Through. Screen.* **1**, 35-46.

20. Liang, Y. C., Tsai, S. H., Chen, L., Lin-Shiau, S. Y., and Lin, J. K. (2003). Resveratrol-induced G2 arrest through the inhibition of CDK7 and p34CDC2 kinases in colon carcinoma HT29 cells. *Biochem. Pharmacol.* **65**, 1053-1060.
21. Martinez, J. and Moreno, J. J. (2000). Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 865-870.
22. Min, H. Y., Park, E. J., Lee, S. K., and Cho, Y. J. (2003). Effects of grape extracts on free radical scavenging activity and inhibition of pro-inflammatory mediator production in mouse macrophage cells. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**, 132-137.
23. Morse, M. A., and Stoner, G. D. (1993). Cancer chemoprevention: principles and prospects. *Carcinogenesis* **14**, 1737-1746.
24. Patel, R. P., Moellering, D., Murphy-Ullrich, J., Jo, H., Beckman, J. S., and Darley-Usmar, V. M. (2000). Cell signaling by reactive nitrogen and oxygen species in atherosclerosis. *Free. Radic. Biol. Med.* **28**, 1780-1794.
25. Rimando, A. M., Cuendet, M., Desmarchelider, C., Mehta, R.G., Pezzuto, J. M., and Duke, S. O. (2002). Cancer chemopreventive and antioxidant activities of pterostilbene, a naturally occurring analogue of resveratrol. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3453-3457.
26. Surh, Y. J. (1999). Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat. Res.* **428**, 305-327.

주 의

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