



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

포도주 부산물의 화학성분 분석 및
생리활성

Chemical Components and Biological Activities of
Wine By-product



지도교수 임 선 영

2017년 2월

한국해양대학교 대학원

해양생명환경학과

백 재 열

본 논문을 백재열의 이학석사 학위논문으로 인준함.

위원장 서 영 완 (인)

위 원 박 인 석 (인)

위 원 임 선 영 (인)



2016년 12월 15일

한국해양대학교대학원

목 차

List of Tables	iv
List of Figures	v
Abstract	1
1. 서 론	4
2. 재료 및 방법	7
2.1. 재료	7
2.2. 포도주 부산물의 추출 및 분획	7
2.3. 포도주 부산물의 활성 성분 분리	8
2.4. 포도주 부산물의 총 플라보노이드 함량 측정	11
2.5. 포도주 부산물의 총 페놀 함량 측정	12
2.6. 포도주 부산물의 지질 및 지방산 추출	13
2.7. 포도주 부산물의 Gas chromatography를 이용한 지방산 분석	15
2.8. 포도주 부산물의 생리활성 측정	16
2.8.1. 항암 실험	16
① 세포 배양	16
② MTT assay	17
2.8.2. 항산화 실험	19
① 세포 배양	19
② 세포 내 활성산소종 (Reactive oxygen species) 측정	20
③ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거 활성 측정	22
④ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt radical cation (ABTS+) 라디칼 소거활성 측정	24
⑤ Genomic DNA 추출 및 DNA 산화 생성물 측정	26
⑥ 세포 내 Glutathione (GSH) 함량 측정	26

2.8.3. 항염증 실험	27
① 세포 내 Nitric oxide (NO) 생성 측정	27
② 사이토카인 생성 측정	28
2.9. 통계 분석	29
3. 결과 및 고찰	30
3.1. 포도주 부산물의 총 플라보노이드 및 페놀 함량	30
3.2. 포도주 부산물의 지방산 조성	32
3.3. 포도주 부산물 추출물 및 분획물의 생리활성	34
3.3.1. 포도주 부산물 추출물 및 분획물의 항암 효과	34
3.3.2. 포도주 부산물 추출물 및 분획물의 항산화 효과	45
① 세포 내 활성산소종 (Reactive oxygen species) 생성 억제 효과	45
② DPPH 라디칼 소거활성	48
③ ABTS+ 라디칼 소거 활성	51
④ Genomic DNA 산화 억제 효과	53
⑤ Glutathione (GSH) 생성 상승 효과	55
3.3.3. 포도주 부산물 추출물 및 분획물의 항염증 효과	58
① 세포 내 Nitric Oxide (NO) 생성 저해효과	58
② 사이토카인 생성에 미치는 효과	65
4.1. 포도주 부산물로부터 분리한 화합물의 생리활성	81
4.1.1. 포도주 부산물로부터 분리한 화합물의 항암 효과	81
4.1.2. 포도주 부산물로부터 분리한 화합물의 항산화 효과	84
① 세포내 활성산소종 (ROS) 생성 억제 효과	84
① DPPH 라디칼 소거활성	86
② ABTS+ 라디칼 소거활성	88
③ Glutathione (GSH) 생성 증가 효과	90
4.1.3. 포도주 부산물로부터 분리한 화합물의 항염증 효과	93
① 세포 내 Nitric oxide (NO) 생성 저해효과	93

4. 요약 및 결론	96
참고문헌	99
감사의 글	111



List of Tables

Table 1. Contents of total flavonoids and phenols of extracts and fractions from wine by-product	31
Table 2. Fatty acid composition (% area) of wine by-product	33
Table 3. IC ₅₀ values of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from wine by-product on the growth of AGS, HT-29 and HT-1080 cells	38
Table 4. IC ₅₀ values of solvent fractions from wine by-product on the growth of AGS, HT-29 and HT-1080 cells	44
Table 5. DPPH radical scavenging effect of solvent extracts and fractions from wine by-product	50
Table 6. ABTS radical scavenging effect of solvent extracts and fractions from wine by-product	52
Table 7. Effect of 85% aq. MeOH fraction from wine by-product on the production of lipopolysaccharide (LPS) induced interukine-2 at different times in mouse spleen cells	67
Table 8. Effect of 85% aq. MeOH fraction from wine by-product on the production of concanavalin A (Con A) induced interukine-2 at different times in mouse spleen cells	68
Table 9. Effect of 85% aq. MeOH fraction from wine by-product on the production of lipopolysaccharide (LPS) induced interukine-5 at different times in mouse spleen cells	69
Table 10. Effect of 85% aq. MeOH fraction from wine by-product on the production of concanavalin A (Con A) induced interukine-5 at different times in mouse spleen cells	70
Table 11. Effect of 85% aq. MeOH fraction from wine by-product on the	

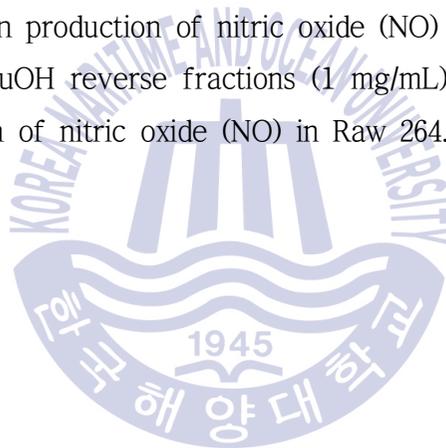
	production of lipopolysaccharide (LPS) induced interleukin-6 at different times in mouse spleen cells	71
Table 12.	Effect of 85% aq. MeOH fraction from wine by-product on the production of concanavalin A (Con A) induced interleukin-6 at different times in mouse spleen cells	72
Table 13.	Effect of 85% aq. MeOH fraction from wine by-product on the production of lipopolysaccharide (LPS) induced interleukin-12 and interleukin-20(P40) at different times in mouse spleen cells ·	73
Table 14.	Effect of 85% aq. MeOH fraction from wine by-product on the production of concanavalin A (Con A) induced interleukin-12 and interleukin-20(P40) at different times in mouse spleen cells ·	74
Table 15.	Effect of 85% aq. MeOH fraction from wine by-product on the production of lipopolysaccharide (LPS) induced interleukin-4 at different times in mouse spleen cells.	76
Table 16.	Effect of 85% aq. MeOH fraction from wine by-product on the production of concanavalin A (Con A) induced interleukin-4 at different times in mouse spleen cells.	77
Table 17.	Effect of 85% aq. MeOH fraction from wine by-product on the production of lipopolysaccharide (LPS) induced interferon- γ at different times in mouse spleen cells.	78
Table 18.	Effect of 85% aq. MeOH fraction from wine by-product on the production of concanavalin A (Con A) induced interferon- γ at different times in mouse spleen cells.	79
Table 19.	DPPH radical scavenging effect of reverse fraction of <i>n</i> -BuOH fraction and 85% MeOH fraction from wine by-product.	87
Table 20.	ABTS radical scavenging effect of reverse fraction of <i>n</i> -BuOH fraction and 85% MeOH fraction from wine by-product.	89

List of Figures

Fig. 1. Preparation of crude extraction and solvent fractions from wine by-product	9
Fig. 2. Isolation of the reverse fraction from wine by-product	10
Fig. 3. Procedure of extracts of lipids and fatty acids	14
Fig. 4. Metabolization of MTT to a MTT formazan by viable cells	18
Fig. 5. Degradation pathway of DCFH-DA in an oxidation-induced cellular system	21
Fig. 6. Scavenging of the DPPH radical by phenol	23
Fig. 7. Scavenging of the ABTS radical	25
Fig. 8. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from wine by-product on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells	35
Fig. 9. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from wine by-product on the growth of HT-29 human colon cancer cells	36
Fig. 10. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from wine by-product on the growth of HT-1080 cell line	37
Fig. 11. Inhibitory effect of solvent fractions of extracts from wine by-product on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma	41
Fig. 12. Inhibitory effect of solvent fractions of extracts from wine by-product on the growth of HT-29 human colon cancer cells	42
Fig. 13. Inhibitory effect of solvent fraction of extracts from wine by-product on the growth of HT-1080 cell line	43
Fig. 14. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol	

	(MeOH) extracts from wine by-product on levels of reactive oxygen species in HT-1080 human fibrosarcoma cells	46
Fig. 15.	Inhibitory effect of solvent fractions of extracts from wine by-product on levels of reactive oxygen species in HT-1080 human fibrosarcoma cells	47
Fig. 16.	Antioxidant effect of crude extracts and solvent fractions from wine by-product on genomic DNA in HT-1080 human fibrosarcoma cells ..	54
Fig. 17.	Effect of acetone/methylen chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from wine by-product on GSH level in HT-1080 human fibrosarcoma cells	56
Fig. 18.	Effect of solvent fractions of extracts from wine by-product on GSH level in HT-1080 human fibrosarcoma cells	57
Fig. 19.	Effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from wine by-product on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells	59
Fig. 20.	Effect of <i>n</i> -Hexane fraction from wine by-product on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells	61
Fig. 21.	Effect of 85% aq. MeOH fration from wine by-product on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells	62
Fig. 22.	Effect of <i>n</i> -BuOH fration from wine by-product on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells	63
Fig. 23.	Effect of Water fration from wine by-product on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells	64
Fig. 24.	Inhibitory effect of 85% aq. MeOH and <i>n</i> -BuOH reverse fractions (0.1 mg/mL) from wine by-product on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma	81
Fig. 25.	Inhibitory effect of 85% aq. MeOH and <i>n</i> -BuOH reverse fractions (0.1 mg/mL) from wine by-product on the growth of HT-29 human colon cancer cells	82

Fig. 26. Inhibitory effect of 85% aq. MeOH and <i>n</i> -BuOH reverse fractions (0.1 mg/mL) from wine by-product on the growth of HT-1080 cell line	83
Fig. 27. Inhibitory effect of 85% aq. MeOH and <i>n</i> -BuOH reverse fractions (0.1 mg/mL) from wine by-product on the levels of reactive oxygen species in HT-1080 human fibrosarcoma cells	85
Fig. 28. Effect of 85% MeOH reverse fraction from wine by-product on GSH level in HT-1080 human fibrosarcoma cells	91
Fig. 29. Effect of <i>n</i> -BuOH reverse fraction from wine by-product on GSH level in HT-1080 human fibrosarcoma cells	92
Fig. 30. Effect of 85% aq. MeOH reverse fractions (1 mg/mL) from wine by-product on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells	94
Fig. 31. Effect of <i>n</i> -BuOH reverse fractions (1 mg/mL) of from wine by-product on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells	95



Chemical Components and Biological Activities of Wine By-product

Baek, Jae Yeol

Division of Marine Bioscience and Environment, Graduate School of
Korea Maritime and Ocean University, Busan 49112, Korea
(Advisor : Prof. Sun-Young Lim)



Abstract

This study analyzed flavonoid and phenol contents and fatty acid composition of wine by-product and investigated biological activities of crude extracts and fractions of wine by-product. The flavonoid and phenol contents of the methanol (MeOH) extract were greater than those of the acetone+methylene chloride (A+M) extract. Among fractions, the 85% aqueous methanol (85% aq. MeOH) fraction contained the highest flavonoid contents, while the *n*-butanol (*n*-BuOH) fraction had more phenol contents. In fatty acid composition, the percentages of linoleic acid, linolenic acid and oleic acid were 47.8%, 3.3% and 5.98%, respectively.

In anticancer activity of wine by-product, treatments of crude extracts and

fractions significantly inhibited the growth of HT-29, AGS and HT-1080 human cancer cell lines ($p < 0.05$). The A+M and MeOH extracts showed an inhibitory effect on growth by more than 50% at the concentrations of 0.5 mg/mL. Among the fractions, the 85% aq. MeOH and *n*-Hexane fractions exhibited a higher inhibitory effect on proliferation of three types of cancer cells.

In antioxidant activity of wine by-product, all tested extracts and fractions dose-dependently decreased cellular reactive oxygen species (ROS) production induced by H_2O_2 in comparison with that produced by exposure to the extract-free control. The MeOH extract showed a higher inhibitory effect on cellular ROS producing than that of the A+M extract at all concentrations tested. Treatment with the BuOH fraction (0.1 mg/mL concentration) inhibited cellular ROS production by 60% ($p < 0.05$). In DPPH and ABTS radical scavenging assay, the MeOH extract showed a scavenging effect greater than that of the A+M extract ($p < 0.05$). The *n*-BuOH fraction showed stronger radical inhibitory effect than dibutyl hydroxy toluene (BHT). The A+M and MeOH extracts from wine by-product significantly inhibited genomic DNA oxidation ($p < 0.05$). The 85% aq. MeOH and *n*-BuOH fractions showed a higher DNA oxidation effect compared with control ($p < 0.05$). In addition, the crude extracts and fractions increased levels of intracellular glutathione (GSH) in a dose manner.

In anti-inflammatory activity, the productions of nitric oxide (NO) assay showed that the extracts and fractions significantly reduced NO production induced by lipopolysaccharide (LPS) ($p < 0.05$). The *n*-BuOH fraction showed the highest reduction of NO production by 61.3% and then A+M and MeOH extracts showed reduced NO production by 52.3% and 50.1%, respectively ($p < 0.05$). In cytokine production assay, the treatment with 85% aq. MeOH fraction (3 μ g/mL concentration) significantly reduced concanavalin A (Con

A)-induced IL-2 expression at 6 h and LPS-induced IL-2 expression at 48 h, as compared to treatment with stimulant (Con A or LPS) ($p < 0.05$). IL-6 expression after 48 h of treatment with LPS was significantly reduced by 85% aq. MeOH fraction (10 $\mu\text{g/mL}$) ($p < 0.05$). The 85% aq. MeOH fraction (10 $\mu\text{g/mL}$) with LPS reduced IL-12/IL-20(p40) expression after 24 h and 72 h of treatment ($p < 0.05$). The 85% aq. MeOH fraction plus Con A significantly increased IL-4 (3 $\mu\text{g/mL}$) and IFN- γ (10 $\mu\text{g/mL}$) expression at 24 h ($p < 0.05$).

These results suggested that 85% aq. MeOH and *n*-BuOH fractions of wine by-product inhibited cellular oxidation and growth of human cancer cells and their activity may be associated with the contents of flavonoids and phenols. Thus, the recycling of winery co-products or side streams constitutes an opportunity for providing valuable materials to the pharmaceutical, cosmetic nutraceutical, and food industries, contributing to reductions in both the costs and environmental impact linked to the disposal of these by-products in the production areas.

제 1 장 서 론

포도는 갈대나무목(Rhamnales) 포도과(Vitaceae)에 속하는 낙엽성 덩굴성 과수로, 포도과에는 11 속 700 여종이 있으며 주로 열대, 아열대 지역에서 자생하며 일부는 온대지방까지 분포한다(Bulkley, 1983).

세계적으로 널리 알려진 포도주의 원 재료인 포도는 세계 과일 생산량 중 약 30 %를 차지하며(Lee & Kwon, 2006) 그 중 약 80%가 포도주 제조에 사용되고, 이로 인해 약 천만 톤의 포도주 생산시 부산물(포도 과피, 씨, 과육, 줄기 포함)이 짧은 수확기 동안 발생한다(Maier, et al., 2009). 한국의 경우, 2013년 생산량은 약 26만 톤, 2012년 생산량은 27만 8천 톤으로 그 중 약 7천 톤의 포도가 가공 되었으며, 이에 따라 매년 수천 톤의 포도주 부산물이 발생하고 있는 실정이다(MAFRA, 2014). 이러한 포도 품종 가운데 Campbell early는 우리나라의 포도 생산량의 80%를 차지하는 가장 대중적인 포도종으로 포도주 생산에 주로 이용된다(Lee & kim 2016; Yook, et al., 2008). 전 세계적으로는 포도주 부산물을 이용하여 새로운 가치를 얻기 위해 에탄올로 추출하거나 바이오매스나 비료의 사용 및 개발 중에 있다(Jara, et al., 2014). 포도주 부산물은 폴리페놀류, 안토시아닌, 레스베라트롤 등의 생리활성물질을 높은 수준으로 함유하고 있는 것으로 보고되고 있으며(Francis, 1992; Halliwell, et al., 1995; Hogan, et al., 2010), 플라보노이드, 식이섬유, 비타민 A 및 비타민 E 등을 함유하고 있다고 밝혀졌다(Zhu, et al., 2015).

과일은 여러 식물성 자원 중 가장 항산화 및 항암 작용이 뛰어난 천연자원으로 여러 가지 생리활성 작용을 나타내는 물질로 밝혀진 페놀성 화합물을 함유하고 있으며(Lee & Lee, 1994), 페놀성 화합물에 존재하는 phenolic hydroxyl (OH)기는 단백질 등과 결합하는 성질을 가지고 항산화, 항암 및 항균 효과 등의 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있다(Droge, 2001; Halliwell, et al., 1995).

특히, 포도 열매에는 안토시아닌(anthocyanin), 프로시아니딘(procyanidin), 카테킨(catechin), 퀘세틴(querceetin), 레스베라트롤(resveratrol) 등 우리 몸에 이로운 폴리페놀 성분이 풍부하게 존재하기 때문에 국내외에서 성분분석, 항산화, 항암 및 항균 활성을 포함한 다양한 생물학적 효능 연구가 이루어지고 있다(Stojanovic, et al., 2001; Brito, et al., 2002; Um & Kim, 2002; Kim, et al., 2006). 특히 대표적인 포도 성분중 하나인 레스베라트롤의 경우 심혈관 질환 뿐만아니라 항암활성이 체내에서 매우 우수하며 이와 관련하여 연구가 진행되고 있으며(Scarlati, et al., 2003; Alkhalaf, 2007; Jason, et al., 2007)퀘세틴의 경우 혈소판 응집반응을 막고 암세포 성장을 억제시킨다고 보고하였다(Flamini, 2003).

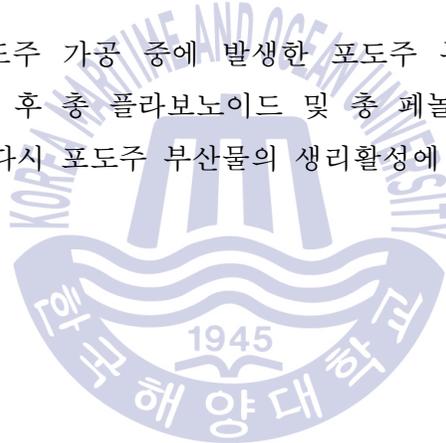
최근 생활환경과 식습관 변화와 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라 노화억제와 성인병 예방을 위한 이러한 항산화물질에 대한 관심도 함께 높아져 자유라디칼을 방어하는 항산화물질에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Imai, et al., 1994; Re, et al., 1999).

인간의 노화와 질병의 주요 원인으로 알려진 자유라디칼(free radical)은 생체 내에서 산화되는 생리기능에 스트레스를 가하는 현상인 산화스트레스(oxidative stress)를 유발하는 것으로 알려져 있으며(Macrae, et al., 1993), 이러한 자유라디칼은 세포막 손상, 단백질 분해, 지질 산화 및 DNA 변성 등을 초래하여 각종 성인병을 유발한다(Halliwell, et al., 1995). 현재 산화스트레스를 막기 위해 천연항산화제 및 합성항산화제가 사용되고 있는데, 이러한 항산화제는 산소를 제거하거나 흡수하는 것이 아니라 자유기와 반응함으로써 특정 비타민류와 필수 아미노산 등의 손실을 최소화 하거나, 유지 제품의 산패를 지연 또는 방지하는 목적으로 사용된다. 합성항산화제로는 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxy toluene (BHT)등이 있으며, 특히 BHT는 여러 연구 결과 실험동물의 간에서 마이크로솜 효소 활성(microsomal enzyme activity)을 증가시킨다는 것이 알려지면서, 이들 합성항산화제의 안전성에 대한 논란이 제기되어 현재는 그 사용량이 법적으로 규제되어 있다(Brannen, 1975; Ito, et al., 1983; Chan, et al., 1993). 그에 따라 기능성과 안전성 면에서 두각을

나타내는 식물유래 천연항산화제의 연구가 활발히 진행되고 있는 추세이다(Kim, et al., 2012; Maier et al., 2009; Rice-Evans, et al., 1997).

최근 사회의 고령화는 가속화됨에 따라 퇴행성 뇌질환 관련 연구는 지속적으로 이루어져 있고(Sohn & Sohn, 2011), 척수와 뇌의 신경세포들이 파괴됨에 따라 발생하는 파킨슨 병, 알츠하이머 등 퇴행성 뇌질환의 원인인 nitric oxide (NO) prostaglandin E2 (PGE₂) 및 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대해 (Kreutzberg, 1996; Yan, et al., 2003; Tremblay, et al., 2011) 포도의 대표적 성분인 레스베라트롤과 퀴시틴의 알츠하이머 개선효과(Ho, et al., 2013)가 알려져 있고 RAW 264.7 세포와 human macrophage 에서 이들의 항염증효과(Derlindati, et al., 2012)가 있다고 보고되었다.

본 연구에서는 포도주 가공 중에 발생한 포도주 부산물을 이용하여 극성이 다른 유기용매로 추출 후 총 플라보노이드 및 총 페놀 함량을 측정하고 지방산 조성을 검토하였으며 다시 포도주 부산물의 생리활성에 대해 알아보하고자 하였다.



제 2 장 재료 및 방법

2.1 재료

본 실험에 사용한 campbell early (*Vitis. labrusca*)를 사용한 포도주 부산물은 까브스토리(경상북도 영천시)로 부터 제공받아 사용하였다. 포도주 부산물을 자연 건조시킨 후, 실험 사용 전까지 -70°C 의 deep freezer (NF-400SF, Nihon freezer, Japan)에 냉동 보관하였다.

2.2 포도주 부산물의 추출 및 분획

포도주 부산물의 유기용매 추출을 위하여 acetone:methylene chloride 를 1:1 비율로 혼합하여 포도주 부산물이 충분히 잠기도록 하여 24 시간 방치한 후 추출하였다. 이 과정을 2회 반복하여 얻은 여액은 40°C 수욕 상에서 rotary vacuum evaporator (N-1000, Eyela, Japan)로 농축하여 acetone/methylene chloride (A+M) 추출물을 얻었다. A+M 용매로 추출되지 않은 성분을 methanol (MeOH)로 추출하고자 남은 잔사에 A+M 과 동량의 MeOH 을 부어 위와 동일한 방법으로 2회 반복한 후 농축하여 MeOH 추출물을 얻었다. 두 용매로부터 최대 수득한 추출물을 혼합하여 다시 용매 극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hexane, 85% aq. MeOH, *n*-buthanol (*n*-BuOH), Water 분획물을 얻었다. 실험에는 각각의 추출물을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 세포배지로 필요한 농도로 희석하여 사용하였다. 세포배양에 사용된 DMSO 의 최종 농도는 0.1% 이하가 되도록 하였다(Fig. 1).

2.3 포도주 부산물의 활성 성분 분리

85% aq. MeOH 분획층과 *n*-BuOH 분획층은 methanol과 H₂O의 혼합용매를 사용하여 C₁₈ reverse-phase vacuum flash chromatography 하였고, 이 실험으로 50% aq. MeOH, 60% aq. MeOH, 70% aq. MeOH, 80% aq. MeOH, 90% aq. MeOH, 100% MeOH, 100% EtOAc로 총 7개의 fraction을 얻었다(Fig. 2).



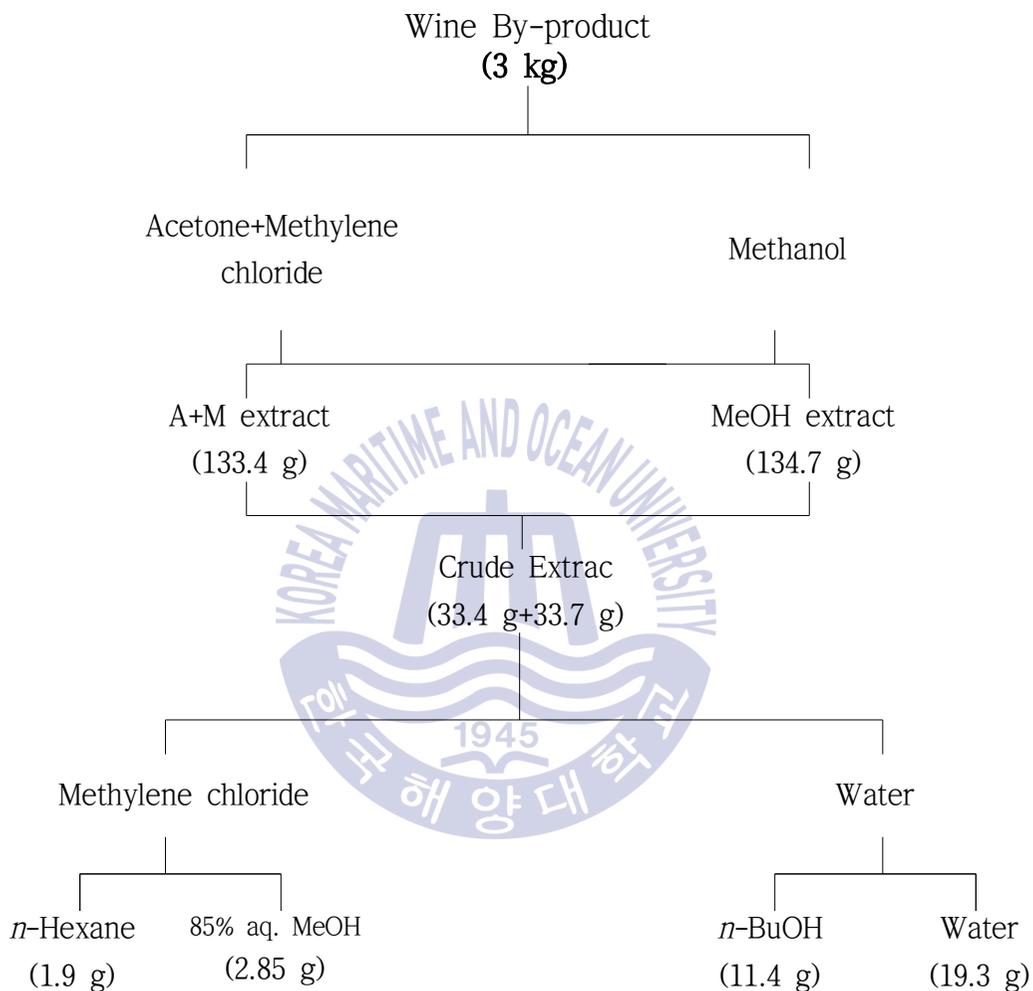


Fig. 1. Preparation of crude extraction and solvent fractions from wine by-product

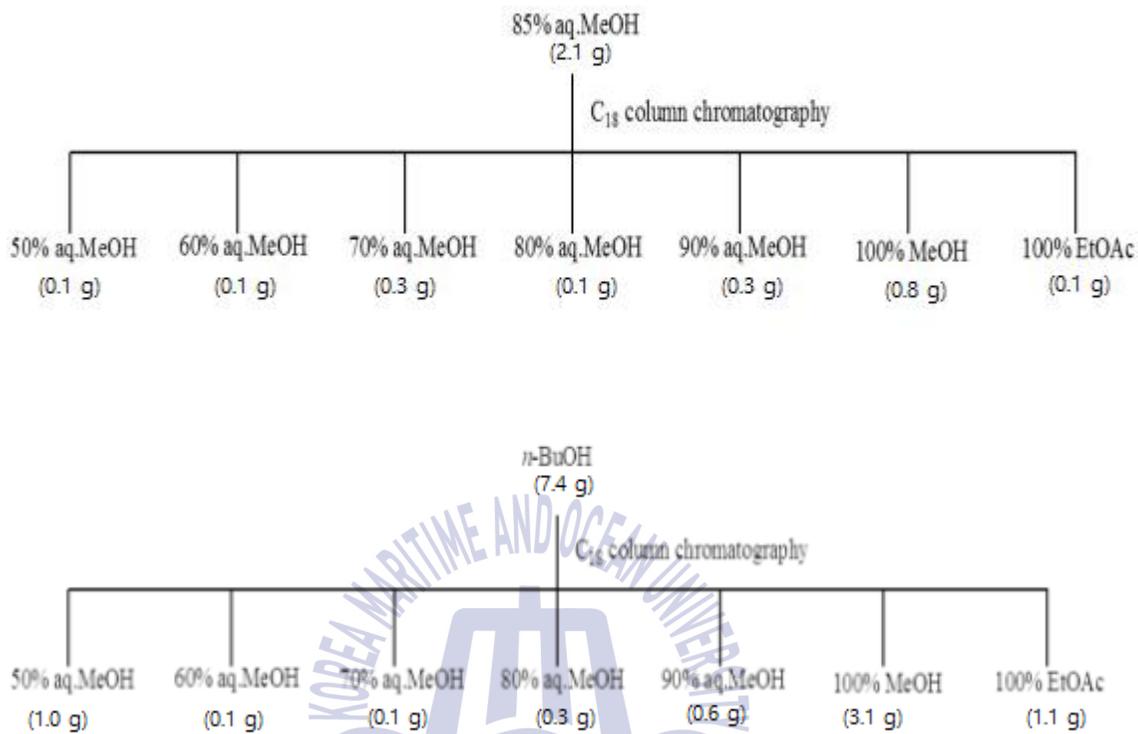


Fig. 2. Isolation of the reverse fraction from wine by-product

2.4 포도주 부산물의 총 플라보노이드 함량 측정

시료 중 총 플라보노이드(flavonoid) 함량은 Davis 방법을 변형하여(Chae, et al., 2002) 다음과 같이 측정하였다. 포도주 부산물 용매별 추출물 및 분획물 1 mg 을 MeOH 1 mL 에 녹여 시험관에 취하고 10 mL 의 diethylene glycol 을 가하여 잘 혼합한 후 1 N NaOH 1 mL 첨가하여 37°C 에서 1 시간 동안 반응 시킨다. 반응이 끝난 후 UV-visible spectrometer (Helios beta, Thermo electron corporation, USA)를 사용하여 420 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준물질은 rutin (Sigma Co., USA)을 사용하여 표준곡선에 의해서 총 플라보노이드 함량을 측정하였다.



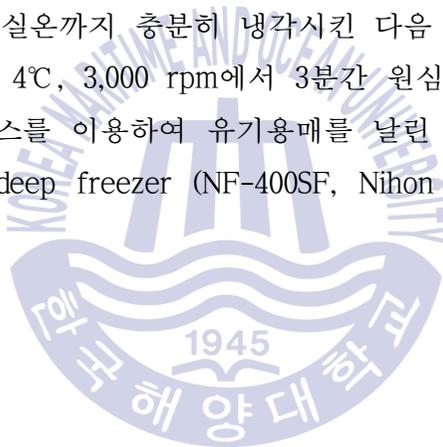
2.4. 포도주 부산물의 총 페놀 함량 측정

총 페놀(phenol) 화합물 함량은 Folin-Denies 법 (Folin & Denies, 1912)을 응용하여 측정하였다. 추출물 및 분획물 1 mg 을 MeOH 1 mL 에 녹이고, 10 배 희석한 희석액 2 mL 에 2 배 희석한 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 2 mL 을 첨가하여 혼합한 다음 3 분 동안 방치한 후 10% Na₂CO₃ 용액 2 mL 을 넣고 1 시간 동안 반응 시킨다. 반응이 끝난 후 UV-visible spectrometer (Helios beta, Thermo electron corporation, USA)를 사용하여 750 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준물질로 tannic acid 를 사용하였으며 시료와 동일한 방법으로 분석 후 얻은 표준곡선으로부터 총 페놀성 화합물 함량을 측정하였다.



2.6. 포도주 부산물의 지질 및 지방산 추출

지질 추출은 Folch, et al. (1957)의 방법을 변형하여 실시하였으며 간단히 요약하면 다음과 같다. 조직을 butyl hydroxy toluene (BHT)을 함께 함유한 methanol로 교반하여 균질화하였다. 균질물을 1 mL 취한 후 chloroform 2 mL와 0.2 M NaH_2PO_4 1.4 mL를 넣고 교반하여 4°C, 3,000 rpm에서 3분간 원심분리 후 지질층을 얻었다. 이와 같은 방법을 한 번 더 진행한 뒤 질소가스를 이용하여 지질층의 유기용매를 완전히 날린 다음 지질을 얻었다. Morrison & Smith. (1957)의 방법에 따라 추출된 지질에 methylation용 시약인 boron trifluoride (BF_3) methanol 1 mL와 *n*-Hexane 0.4 mL를 가한 후 1시간 동안 100°C에서 가열하였다. 1시간 후 실온까지 충분히 냉각시킨 다음 *n*-Hexane 2 mL와 증류수 2 mL를 가한 후 다시 4°C, 3,000 rpm에서 3분간 원심분리 후 상등액을 얻었다. 이 상등액에서 질소가스를 이용하여 유기용매를 날린 후 얻은 지방산은 지방산 분석 전 까지 -75°C deep freezer (NF-400SF, Nihon freezer, Japan)에 보관하였다(Fig. 3).



Sample + BHT/MeOH 1 mL
 ↓
 Add chloroform 2 mL + 0.2 M NaH₂PO₄ 1.4 mL
 ↓ ←N₂ gas, vortexing
 Centrifuge (3,000 rpm, 4°C, 3 min)
 ↓
 Place lower chloroform layer in another tube
 ↓
 Add chloroform 2 mL + 0.2 M NaH₂PO₄ 1.4 mL again
 ↓ ←N₂ gas, vortexing
 Centrifuge (3,000 rpm, 4°C, 3 min)
 ↓
 Combine the 2 chloroform layers
 ↓
 Dry to completeness using nitrogen
 ↓
 Add BF₃/MeOH 1 mL + *n*-Hexane 0.4 mL
 ↓ ←N₂ gas, vortexing
 heating (100°C, 1 hr)
 ↓
 Take tube out and cool
 ↓
 Add *n*-Hexane 2 mL + DW 2 mL
 ↓
 Centrifuge (3,000 rpm, 4°C, 3 min)
 ↓
 Remove upper *n*-Hexane layer into tube
 ↓
 Add *n*-Hexane 2 mL + D.W 2 mL again
 ↓ ←N₂ gas, vortexing
 Centrifuge (3,000 rpm, 4°C, 3 min)
 ↓
 Combine the 2 *n*-Hexane layers
 ↓
 Purge with gentle nitrogen until dry and keep in deep freezer

Fig. 3. Procedure of extracts of lipids and fatty acids

2.7. 포도주 부산물의 Gas chromatography 를 이용한 지방산 분석

샘플에서 분리된 지방산을 1 μ L 취하여 지방산 분석용 gas chromatography에 주입하여 지방산을 분석하였다(Salem, et al., 1996). 지방산 분석에 사용한 표준 용액은 미국 Nu-Chek-Prep사의 462 standard이며, 이용된 column은 silica capillary column (CP-7856, 60 m \times 0.32 mm inner diameter \times 0.10 μ m film thickness)이다. 기기의 분석조건은 injector 250 $^{\circ}$ C, detector (FID) 250 $^{\circ}$ C, oven (initial 130 $^{\circ}$ C, 분당 증가율은 175 $^{\circ}$ C 까지 4 $^{\circ}$ C/min, 210 $^{\circ}$ C 까지 1 $^{\circ}$ C/min, 245 $^{\circ}$ C 까지 30 $^{\circ}$ C/min), carrier gas는 헬륨을 사용하였다. 지방산 분석은 표준용액의 retention time과 비교하여 정성하였고, 내부 표준물질(22:3n-3, methyl ester)을 이용하여 총 지방산을 정량하였으며 각각의 지방산들은 전체 peak area의 퍼센트로 산출하였다.



2.8 포도주 부산물의 생리 활성 측정

2.8.1 항암실험

① 세포배양

한국 세포주 은행(서울의대)으로부터 인체 섬유종세포(HT-1080)를 분양받아 본 실험실에서 배양하면서 실험에 사용하였다. HT-1080 세포는 100 units/mL의 penicillin-streptomycin (Gibco, USA)과 10% fetal bovine serum (FBS, Corning Cellgro, USA)가 함유된 RPMI 1640 (Lonza, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator (MCO-15AC, Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd., Japan)에서 배양하면서 배양 중인 세포를 일주일에 2번 새로운 배지로 교환하였다. 일주일 후 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 뒤 0.05% trypsin-0.02% EDTA (Gibco, USA)로 부착된 세포를 분리하여 원심분리 한 후 집적된 세포에 배지를 넣고 피펫으로 세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 cell culture flask 에 10 mL 씩 일정한 세포수로 분할하여 주입하고, 6~7 일마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

② MTT assay

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 이용하여 각 시료의 암세포 억제에 미치는 영향을 살펴보았다. MTT assay는 세포의 증식과 세포의 살아있는 정도를 간접적으로 측정하는 것으로 항암제의 감수성에 대한 1차 선별검사의 목적으로 많이 사용된다. 대사과정이 온전한 암세포의 경우 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan 결정으로 환원시킨다(Fig. 4). 생성된 MTT formazan의 흡광도는 540 nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아 있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다. 따라서 각 well에 존재하는 세포 생존 수와 비례한다. 배양된 암세포는 96 well cell culture plate에 5×10^4 cells/mL이 되도록 100 μ L씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 배지를 제거한 뒤 각 시료를 배지로 희석하여 각 well당 시료를 100 μ L씩 첨가하고, control에는 시료 대신 PBS를 100 μ L씩 첨가하였다. 이 plate를 다시 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배양 후 MTT assay를 위하여 MTT 시약 5 mg을 1 mL PBS로 녹인 후, 10% FBS가 함유된 배지 9 mL와 희석하여 각 well에 100 μ L를 첨가하고 3 ~ 4시간 동안 더 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다.

배양종료 후 생성된 formazan 결정을 가라앉힌 후 각 well에 형성된 결정이 흐트러지지 않도록 주의하면서 반응 후 남은 MTT 처리 배지를 제거하였다. 배지가 제거된 각 well에 formazan 결정을 용해시키기 위하여 DMSO를 100 μ L씩 분주하여 5 ~ 10분간 반응시켜 microplate reader (Victor3, Perkin Elmer, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(Denizot & Lang, 1986).

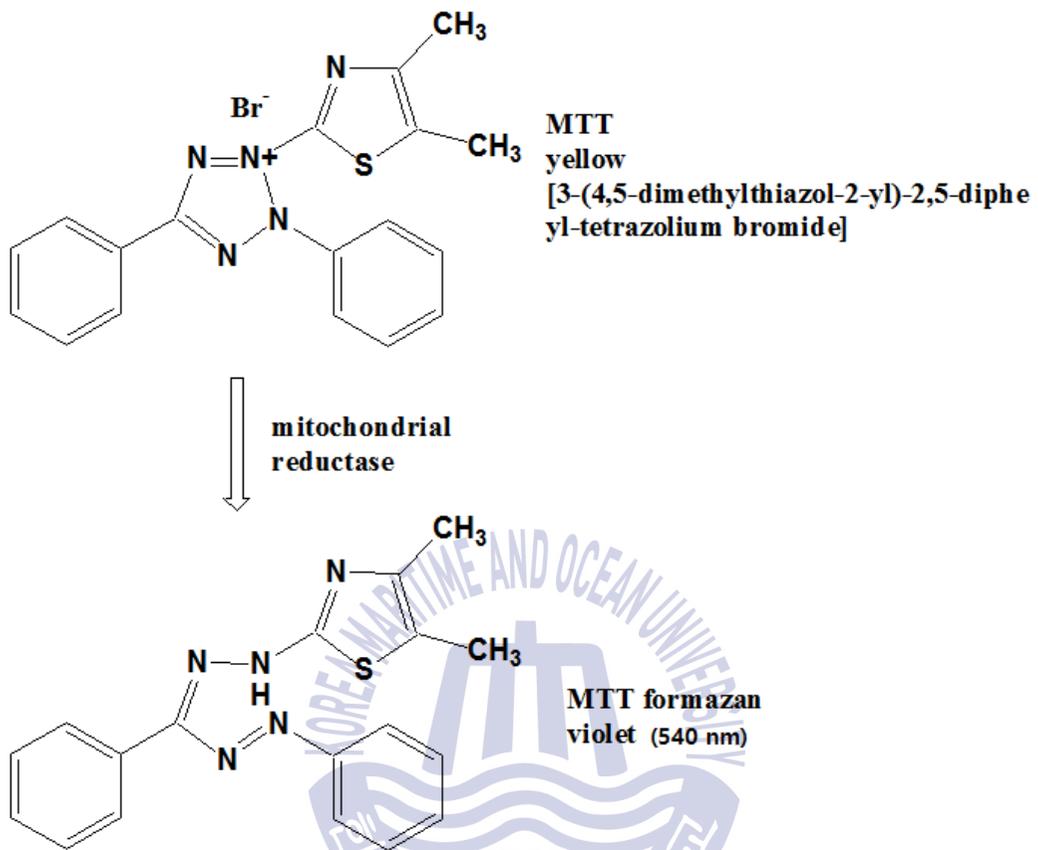
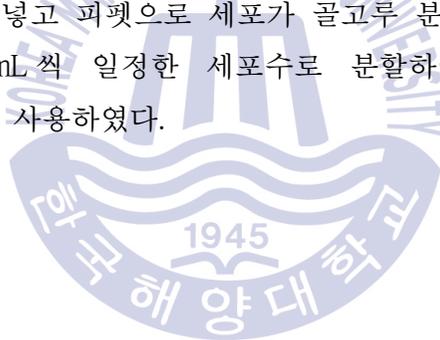


Fig. 4. Metabolization of MTT to a MTT formazan by viable cells

2.8.2 항산화 실험

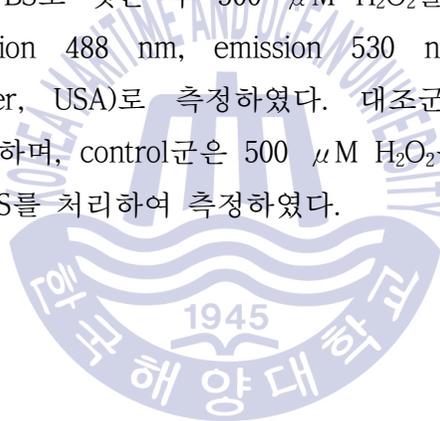
① 세포배양

한국 세포주 은행(서울의대)으로부터 인체 섬유종세포(HT-1080)를 분양받아 본 실험실에서 배양하면서 실험에 사용하였다. HT-1080 세포는 100 units/mL의 penicillin-streptomycin (Gibco, USA)과 10% fetal bovine serum (FBS, Corning Cellgro, USA)가 함유된 RPMI 1640 (Lonza, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator (MCO-15AC, Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd., Japan)에서 배양하면서 배양 중인 세포를 일주일에 2번 새로운 배지로 교환하였다. 일주일 후 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 뒤 0.05% trypsin-0.02% EDTA (Gibco, USA)로 부착된 세포를 분리하여 원심분리 한 후 집적된 세포에 배지를 넣고 피펫으로 세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 cell culture flask에 10 mL씩 일정한 세포수로 분할하여 주입하고, 6~7일마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다.



② 세포 내 활성산소종(Reactive oxygen species) 측정

세포 내 활성산소종은 DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) assay로 측정하였다(Lebel, et al., 1992; Tsuchiya, et al., 1994). DCFH-DA (Sigma, USA)는 세포 내 활성산소종과 반응하여 형광물질 (dichlorofluorescein, DCF)을 만들어 내는 것으로 이 시약을 세포 속에 넣어 발생하는 형광을 측정함으로써 세포 내의 활성산소종을 측정할 수 있다(Fig. 5). 세포를 96 well cell culture plate에 분주한 후 24시간 배양하고, PBS로 씻은 후 20 μ M DCFH-DA를 각 well에 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 20분간 pre-incubation 하였다. 각 well에 시료를 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1시간 배양한 후, DCFH-DA를 제거하고 세포는 다시 PBS로 씻은 후 500 μ M H₂O₂를 처리하여 시간별로 DCF fluorescence를 excitation 488 nm, emission 530 nm에서 microplate reader (Victor3, Perkin Elmer, USA)로 측정하였다. 대조군들(blank군과 control군)은 시료 대신 PBS를 처리하며, control군은 500 μ M H₂O₂를 처리를 하고, blank군은 500 μ M H₂O₂ 대신 PBS를 처리하여 측정하였다.



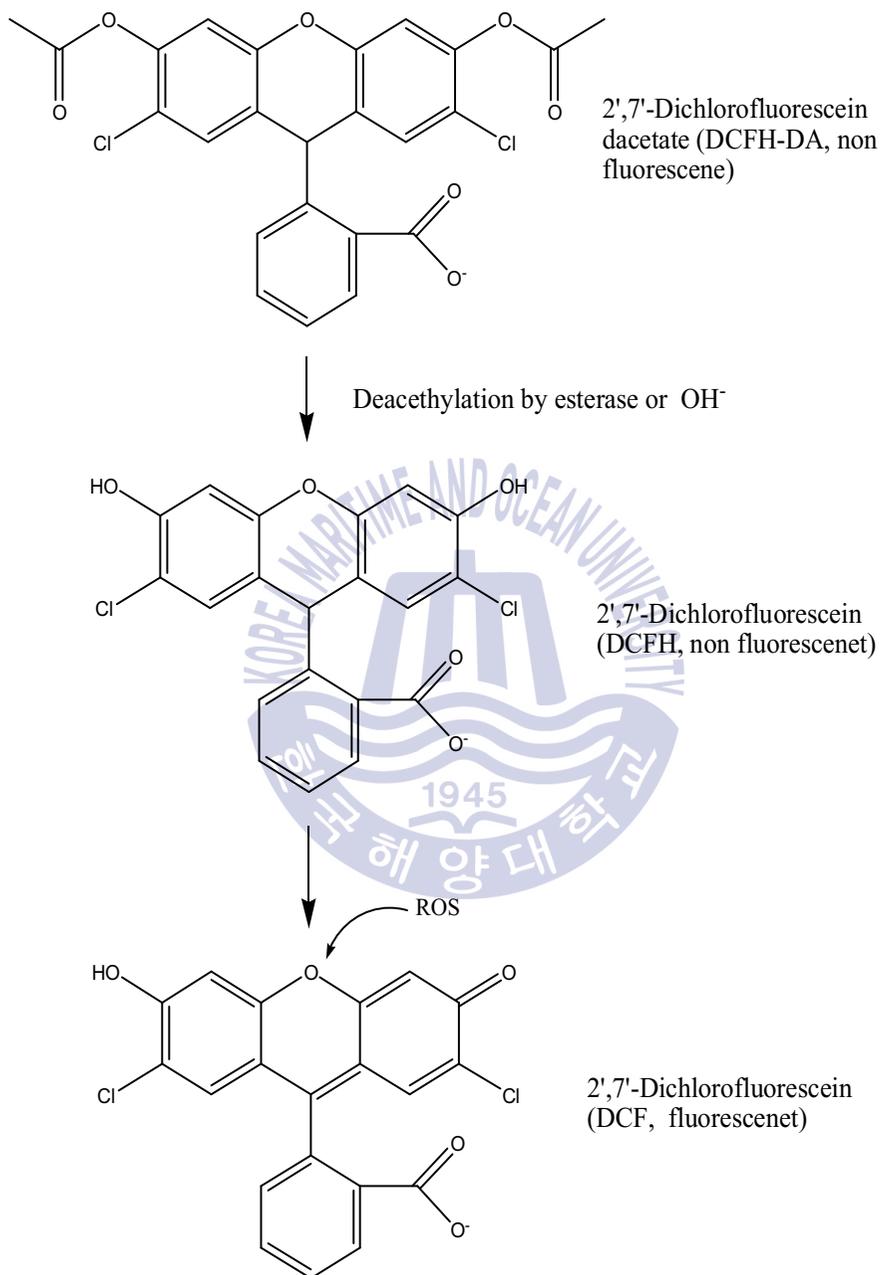
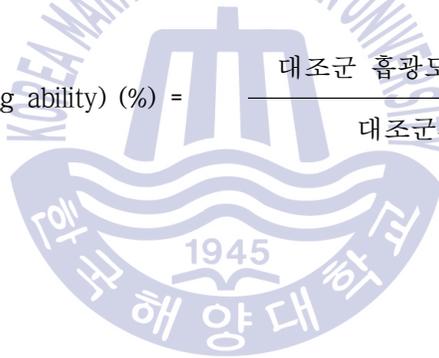


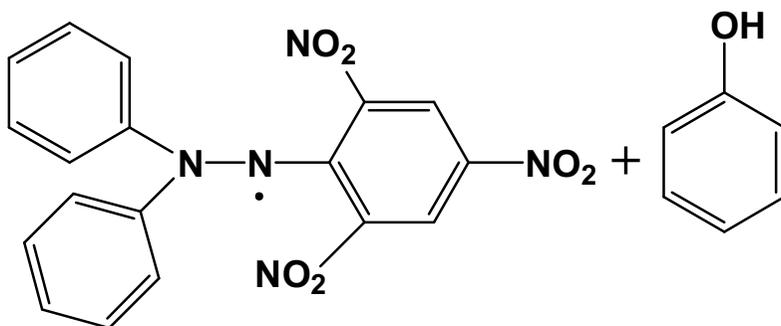
Fig. 5. Degradation pathway of DCFH-DA in an oxidation-induced cellular system

③ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거활성

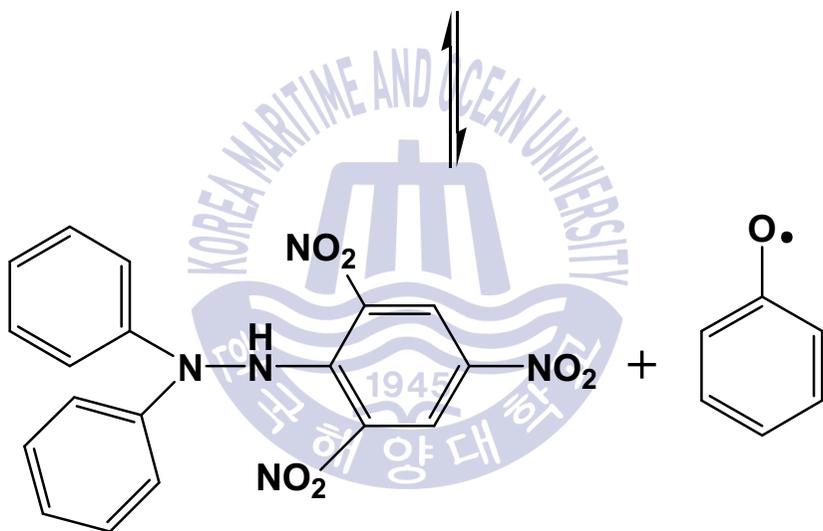
시료의 DPPH 라디칼 소거활성 (Chen, et al., 1995) 측정을 위해 먼저 각 추출물 및 분획물을 MeOH 로 희석하여 농도별로 준비하였다. DPPH 2 mg 을 ethanol 15 mL 에 녹여 DPPH 원액을 만든다. 원액 1.2 mL 에 DMSO 0.5 mL 와 EtOH 를 3 mL 를 혼합하여 DPPH 희석액을 준비하였다. 준비된 DPPH 희석액은 cuvette 에 넣고 흡광도를 측정하여 흡광도가 0.94~0.97 이 되도록 맞춘다. 준비한 시료 0.1 mL 와 DPPH 희석액 0.9 mL 를 섞은 후 10 분 후 UV-visible spectrophotometer (Helios beta, Thermo electron corporation, USA)로 518 nm 에서 측정하였다(Fig. 6). 이때 control 은 천연항산화제인 L-ascorbic acid 와 합성항산화제인 dibutyl hydroxy toluene (BHT)를 사용하였다. 포도주 부산물의 DPPH 라디칼 소거활성은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{EDA (electron donating ability) (\%)} = \frac{\text{대조군 흡광도} - \text{실험군 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$





DPPH • (Violet, 518 nm)



**Diphenylpicrylhydrazine
(yellow)**

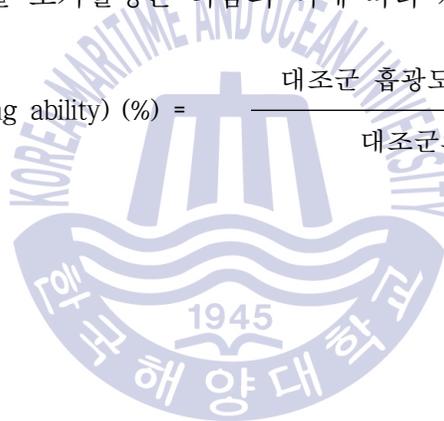
**Phenoxy
radical**

Fig. 6. Scavenging of the DPPH radical by phenol

④ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt radical cation (ABTS+) 라디칼 소거활성

포도주 부산물에 대한 ABTS+ 라디칼 소거활성은 Re, et al. (1999)으로 측정하였다. 7 mM의 ABTS+와 2.45 mM의 potassium persulfate를 첨가하여 radical 생성을 위해 암소에서 16시간 방치한 후, 734 nm에서 흡광도가 0.68~0.72가 되도록 EtOH로 희석하였다. ABTS+ 희석액 0.98 mL와 추출물 및 분획물 0.02 mL를 혼합하여 암소에서 10분간 방치 후 UV-visible spectrophotometer 732 nm에서 흡광도를 측정하였다(Fig. 7). control으로는 천연항산화제인 L-ascorbic acid와 합성항산화제인 BHT를 사용하였다. 포도주 부산물의 ABTS+ 라디칼 소거활성은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{EDA (electron donating ability) (\%)} = \frac{\text{대조군 흡광도} - \text{실험군 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$



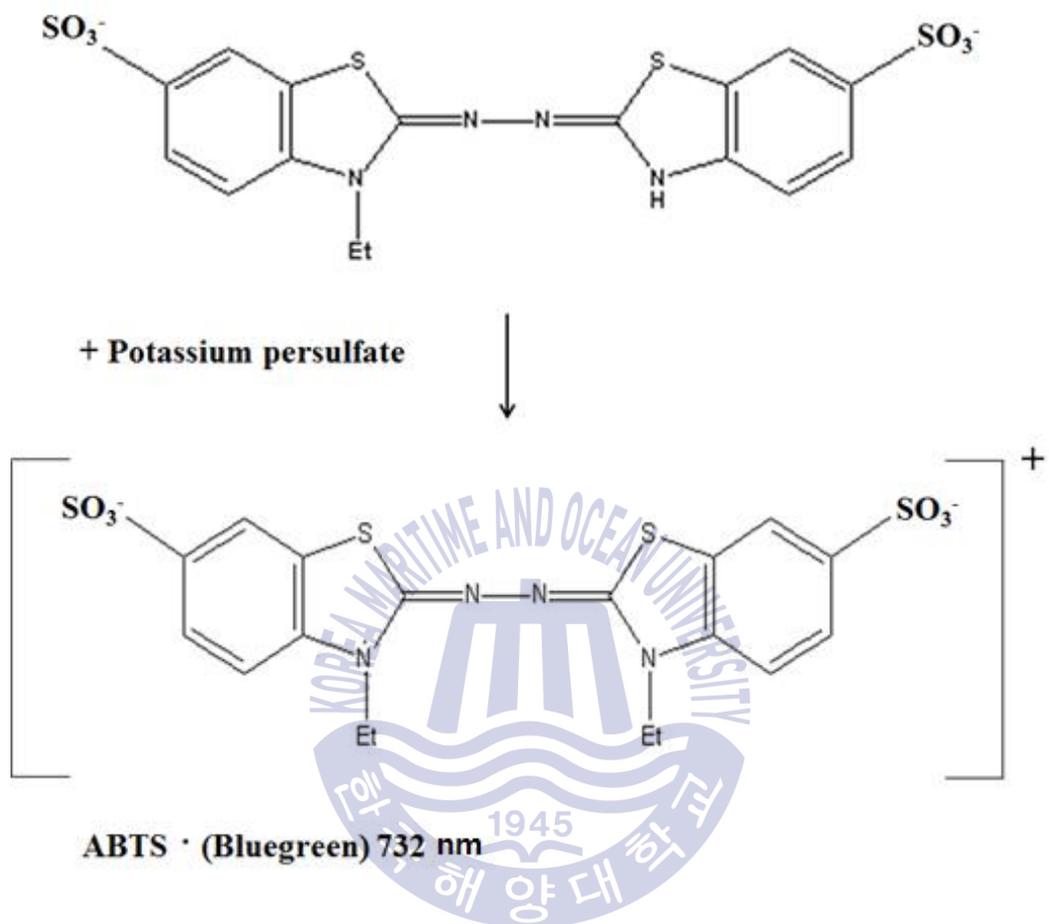


Fig. 7. Scavenging of the ABTS radical

⑤ Genomic DNA 추출 및 DNA 산화 생성물 측정

HT-1080 세포로부터의 genomic DNA의 추출은 AccuPrep[®] Genomic DNA Extraction kit (USA Bioneer, Inc.)를 이용하여 순차적인 방법에 따라 추출하였다. 추출되어진 genomic DNA의 산화 정도는 Milne, et al. (1993)의 방법을 이용하여 측정하였다. 어떤 일정농도의 시료, genomic DNA, FeSO₄ 및 H₂O₂를 물에 녹여 100 μ L의 혼합물을 만들고 각각의 최종농도가 genomic DNA, FeSO₄ 및 H₂O₂의 최종 농도가 50 μ g/mL, 200 μ m, 그리고 0.1 μ m이 되도록 준비하였다. 이 혼합물을 30분간 실온에서 반응시키고 10 mM의 EDTA를 첨가하여 반응을 중지 시켰으며 반응물은 1% agarose gel을 이용하여 100 V에서 30분 동안 전기영동하였다. 전기영동한 gel은 1 mg/mL ethidium bromide로 염색하고 Alpha Ease gel image analysis software (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA)를 이용하여 UV로 관찰하였다.

⑥ 세포 내 Glutathione (GSH) 함량 측정

세포 내에 축적된 GSH 함량은 thiol-staining reagent인 mBBr (monobromobimane)을 이용하여 측정하였다(Poot, et al., 1986). 세포는 96 well cell culture plate에 well 당 5×10^4 cells/mL가 되도록 분주하여 24시간 배양한 후, 각 well에 농도별로 시료를 처리하여 다시 37°C, 5% CO₂ incubator에서 30분간 배양하였다. 다시 각 well은 PBS 완충액으로 씻은 후 40 μ M mBBr을 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 30분간 반응시킨 후 시료처리에 의한 GSH 함량의 변화를 시간별로 excitation 360 nm, emission 465 nm에서 microplate reader (Victor3, Perkin Elmer, USA)로 측정하였다.

2.8.3 항염증 실험

① 세포 내 Nitric oxide (NO) 생성 측정

NO reduction assay는 대식세포의 중요한 기능 중의 하나인 phagocytosis와 관련된 간접적인 활성측정의 한 방법으로 대식세포가 그 활동을 얼마나 활발하게 하고 있는지를 알아보는 방법이다(Kong, et al., 2005). Raw 264.7 세포를 96 well cell culture plate에 well 당 5×10^4 cells/mL가 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 10% FBS가 함유된 MEM 배지로 교체한 후 준비된 시료를 1시간 동안 전처리하고, NO 생성을 유도하기 위해 LPS (1 μ g/mL = 1 ppm)를 처리한 후, 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 이 후 생성된 NO의 양은 Griess 시약(0.1% N-(1-naphtyl)ethylenediamine : 1% sulfanilamide = 1:1)을 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. sodium nitrate를 사용하여 측정된 흡광도로 표준곡선을 작성하여 NO의 농도별 흡광도를 얻었으며, 표준곡선을 실험결과에 적용하여 생성된 NO의 함량을 정량하였다.

Over night 후 plate를 세척용 완충액으로 4번 세척한 후 assay diluent 200 μ L를 분주한 후 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 4번 세척한 후 plate의 각 well에 시료 100 μ L를 적하하여 실온에서 2시간 동안 방치하였다. 세척용 완충액을 4번 세척한 후 avidin-horseradish peroxidase액 100 μ L을 적하하여 다시 실온에서 30분 동안 방치하였다. 세척용 완충액을 5번 세척한 후 tetramethylbenzidine이 포함된 기질액 100 μ L을 적하하여 실온에서 15분 동안 방치한 후 stop액을 100 μ L씩을 가하여 반응을 정지시켰다. optical density는 ELISA (Bio-Rad, Model 500, Hercules, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다(Kim, et al., 2001)

② 사이토카인 생성 측정

수컷 Balb/c 마우스를 희생시킨 후 비장을 분리하고, RPMI 1640 배지로 균질화한 후 상층액이 2×10^6 /mL가 되도록 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 (Gibco, Buffalo, NY, USA) 배지로 조절한다. 24 wells tissue culture plate (Costar, Corning, NY, USA)에 1 mL 씩 분주한 후 자극제 (LPS $2 \mu\text{g}$ 나 Con-A $2 \mu\text{g}$)와 포도주부산물의 85% aq. MeOH 분획물을 농도별로 작용시켜 37°C , 5% CO_2 배양기에 배양하였다. control은 0.01% DMSO가 되도록 사용하였으며 배양시간은 상기의 조건에 6, 24, 48 및 72시간으로 하였다. 배양이 끝난 후 전량 배양액을 수거한 다음 $300 \times g$ 에서 10분간, $10,000 \times g$ 에서 30분간 원침시킨 후 그 상층액을 수거하여 -70°C 에서 보관하였다(Hwang, et al., 2004). 미리 96 wells microplate에 mouse 사이토카인에 대한 capture 항체를 coating buffer에 희석하여 $100 \mu\text{L}$ 씩을 분주한 후 4°C 에서 하룻밤 방치하였다. 다음날 plate를 세척용 완충액으로 4번 세척한 후 assay diluent $200 \mu\text{L}$ 를 분주한 후 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 4번 세척한 후 plate의 각 well에 시료 $100 \mu\text{L}$ 를 적하하여 실온에서 2시간 동안 방치하였다. 세척용 완충액을 4번 세척한 후 avidin-horseradish peroxidase액 $100 \mu\text{L}$ 를 적하하여 다시 실온에서 30분 동안 방치하였다. 세척용 완충액을 5번 세척한 후 tetramethylbenzidine이 포함된 기질액 $100 \mu\text{L}$ 를 적하하여 실온에서 15분 동안 방치한 후 stop액을 $100 \mu\text{L}$ 씩을 가하여 반응을 정지시켰다. Optical density는 ELISA (Bio-Rad, Model 500, Hercules, CA, USA)를 이용하여 450 nm 에서 측정하였다(Kim, et al., 2001)

2.9. 통계분석

실험결과는 각 항목에 따라 Mean±SEM (Standard Error of Mean)으로 나타내었고 분석된 실험 데이터는 control 과 각 시료의 비교를 위해 statistica program 을 이용하여 $p<0.05$ 수준에서 one-way ANOVA 를 실시하여 유의성을 검증하였다.



제 3 장 결과 및 고찰

3.1. 포도주 부산물의 총 플라보노이드 및 총 페놀 함량

포도주 부산물의 용매별 추출물 및 분획물들의 총 플라보노이드 및 총 페놀 함량은 Table 1에 나타내었다. 포도주 부산물 A+M 및 MeOH 추출물들의 총 플라보노이드 함량은 각각 26.4 ± 0.77 및 56.1 ± 1.87 mg/g으로 MeOH 추출물의 총 플라보노이드 함량이 높았다. 분획물들 중에서는 85% aq. MeOH 분획물이 105.1 ± 0.93 mg/g으로 가장 높은 플라보노이드 함량을 나타내었으며, 다음으로 *n*-BuOH, Water 및 *n*-Hexane 분획물 순이었다. 각 용매별 추출물 및 분획물의 총 페놀 함량 또한 MeOH 추출물(4.35 ± 0.04 mg/g)이 A+M 추출물(0.38 ± 0.00 mg/g)보다 높은 페놀 함량을 나타내었으며 분획물들 중에서 *n*-BuOH 분획물이 5.47 ± 0.04 mg/g으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 이에 따라 총 플라보노이드 및 페놀 함량은 MeOH 추출물, 85% aq. MeOH 및 *n*-BuOH 분획물에서 높게 나타남을 알 수 있었다. Lazze, et al. (2009)은 포도주 부산물 추출물은 malvidin, catechin, epicatechin 및 gallic acid를 각각 34.86, 69.53, 50.9 및 18.64 mg/kg 함유하고 있다고 보고하였다. Tournour, et al. (2015)은 포르투갈산 포도주 부산물의 총 페놀 함량은 69.3 mg/gallic acid equivalents (GAE) g 이었고 주요 페놀화합물은 synerigni acid와 (+)-catechin이었다고 보고하였다. Hwang, et al. (2008)은 포도씨의 품종에 따른 총 페놀 함량과 프로안토시아니딘(proanthocyanidin)의 함량을 측정한 결과 총 페놀 함량은 16.71~28.60 mg/100 g, 프로안토시아니딘 함량은 18.36~55.30 mg/100 g을 나타내었다고 보고하였다.

Table 1. Contents of total flavonoids and phenols of extracts and fractions from wine by-product*

Samples	Total flavonoid contents (mg/g)	Total phenol contents (mg/g)
A+M extract	26.4 ± 0.77 ^e	0.4 ± 0.00 ^e
MeOH extract	56.1 ± 1.87 ^c	4.4 ± 0.04 ^c
<i>n</i> -Hexane fraction	20.2 ± 0.12 ^f	0.4 ± 0.01 ^f
85% aq. MeOH fraction	105.1 ± 0.93 ^a	3.6 ± 0.01 ^a
<i>n</i> -BuOH fraction	65.3 ± 0.21 ^b	5.5 ± 0.04 ^b
Water fraction	34.4 ± 0.12 ^d	2.8 ± 0.01 ^d

*Values are expressed as mean ± SD and ^{a-f}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test



3.2. 포도주 부산물의 지방산조성

포도주 부산물을 지방산 추출 후 gas chromatography 를 이용하여 지방산 조성을 분석한 결과를 Table 2 에 나타내었다. 포도주 부산물의 지방산 조성은 n-6 지방산(47.8%) > 포화지방산(38.9%) > n-9 지방산(6.0%) > n-3 지방산(3.3%) 순으로 나타났으며, 함유량이 가장 높은 n-6 계 지방산인 linoleic acid (18:2n-6)가 47.8%로 가장 높은 함량을 나타내었고 oleic acid (18:1n-9)가 5.98%, linolenic acid (18:3n-3)가 3.3%의 함량을 가진 것으로 나타났다. 많은 연구는 자가 면역 질환에 대한 oleic acid 의 유의한 항염증 효과를 보고하였고 면역력 개선 또한 발견하였다(Linos, et al., 1991; Kremer, et al., 1990). 지중해식 식단의 항염증 특징은 높은 양의 oleic acid 와 연관되어 있다고 보고되었다(Sales, et al., 2011). 더욱이 n-3 지방산을 포함한 올리브 오일의 섭취는 만성 염증과 관련 질환을 낮추고 예방하는데 도움을 준다고 보고되었다(Wardhana & Surachmanto, 2011).

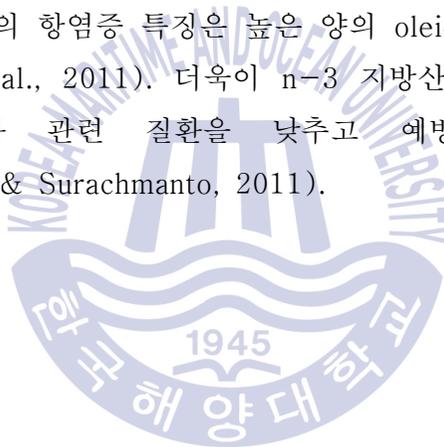


Table 2. Fatty acid composition (% area) of wine by-product

Fatty Acid	%
12:0	0.36
14:0	0.59
16:0	12.37
18:0	19.38
20:0	3.32
22:0	1.78
24:0	1.05
Total Sat.¹⁾	38.85
18:1n-9	5.98
Total Mono.²⁾	5.98
18:2n-6	47.83
Total n-6	47.83
18:3n-3	3.30
Total n-3	3.30

1) Sat, saturated fatty acids 2) Mono, monounsaturated fatty acids

3.3 포도주 부산물의 추출물 및 분획물의 생리활성

3.3.1 포도주 부산물 추출물 및 분획물의 항암효과

포도주 부산물 추출물의 인체 유래 암세포에 대한 증식 억제효과를 알아보기 위해 MTT assay 를 통해 측정하였다. 실험 대상 세포들은 인체 위암세포(AGS)와 인체 결장암세포(HT-29) 그리고 인체 섬유육종세포(HT-1080)을 이용하였으며 각 세포별 샘플의 농도는 0.025, 0.05, 0.1 0.25 및 0.5 mg/mL 의 농도로 실험하였다.

AGS 암세포에 포도 부산물 A+M 추출물과 MeOH 추출물을 처리했을 때 암세포 증식 억제효과를 나타내었으며 0.025 mg/mL 농도부터 농도 의존적으로 세포 증식 억제효과가 증가하는 것을 알 수 있었으며 0.25 mg/mL 농도에서는 A+M 과 MeOH 추출물의 세포 증식 억제효과가 각각 39.1%와 32.7%이며 0.5 mg/mL 의 농도에서는 각각 72.8%와 81.8%의 높은 세포 증식 억제효과를 나타내었다(Fig. 8).

HT-29 암세포에 대한 포도 부산물 A+M 과 MeOH 추출물은 0.25 mg/mL 의 농도에서는 각각 33.6% 33.0% 그리고 0.5 mg/mL 의 농도에서는 각각 61.7% 47.4%로 AGS 위암세포에 비해 낮은 세포 증식 억제효과를 보여주었다(Fig. 9).

A+M 과 MeOH 추출물의 HT-1080 암세포 증식 억제효과의 경우 0.25 mg/mL 의 농도에서 각각 50.5%, 50.8% 그리고 0.5 mg/mL 의 경우에는 각각 85.7% 77.1%로 AGS 및 HT-29 암세포와 비교했을 때 상대적으로 높은 억제효과를 보였다(Fig. 9).

각 세포별 포도주 부산물의 A+M 추출물과 MeOH 에 대한 IC_{50} 값을 Table 3 에 나타내었다. 포도주 부산물의 A+M 추출물의 AGS, HT-29 및 HT-1080 에 대한 IC_{50} 각각 0.34, 0.40 그리고 0.27 mg/mL 이며 MeOH 추출물의 경우에는 각각 0.30, 0.53 그리고 0.28 mg/mL 이었다

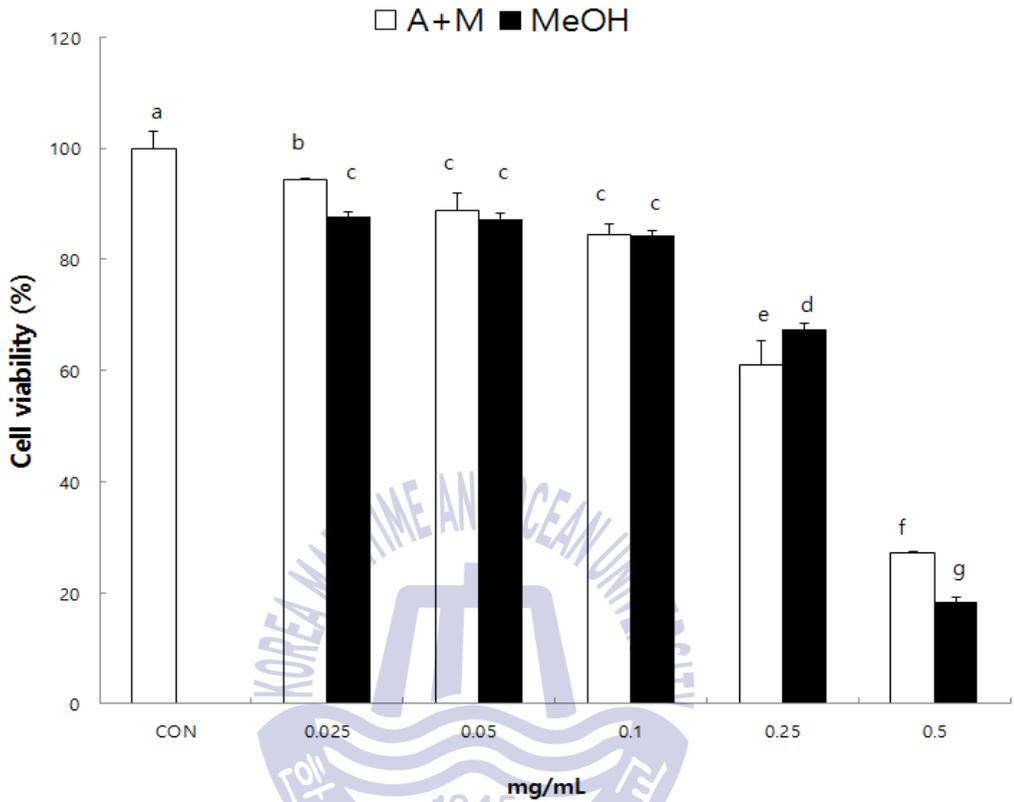


Fig. 8. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from wine by-product on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells

^{a-g}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

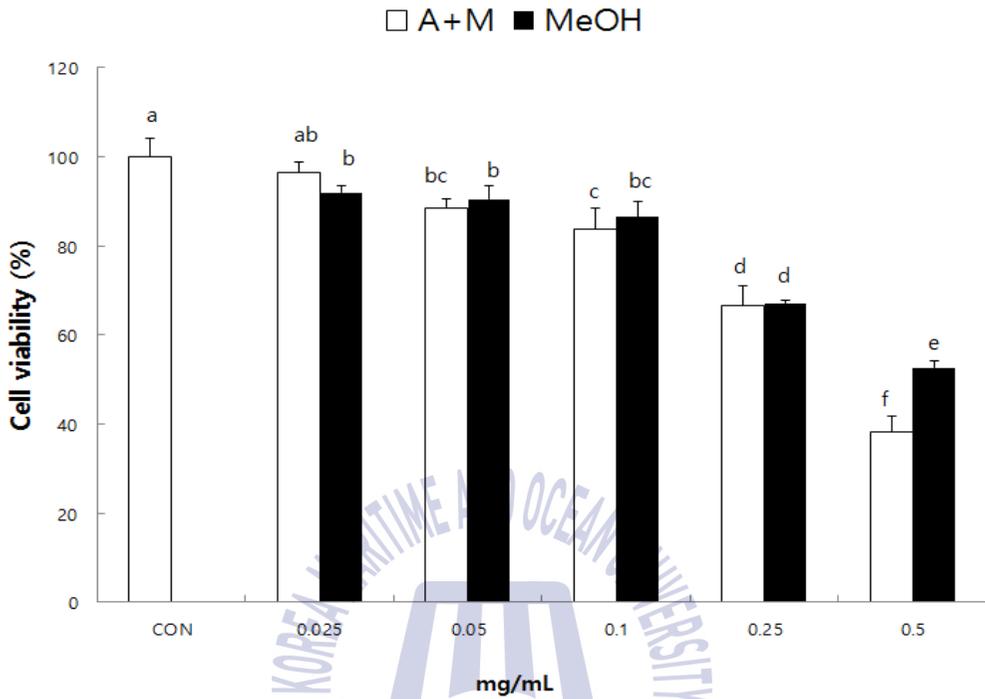


Fig. 9. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from wine by-product on the growth of HT-29 human colon cancer cells

^{a-f}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

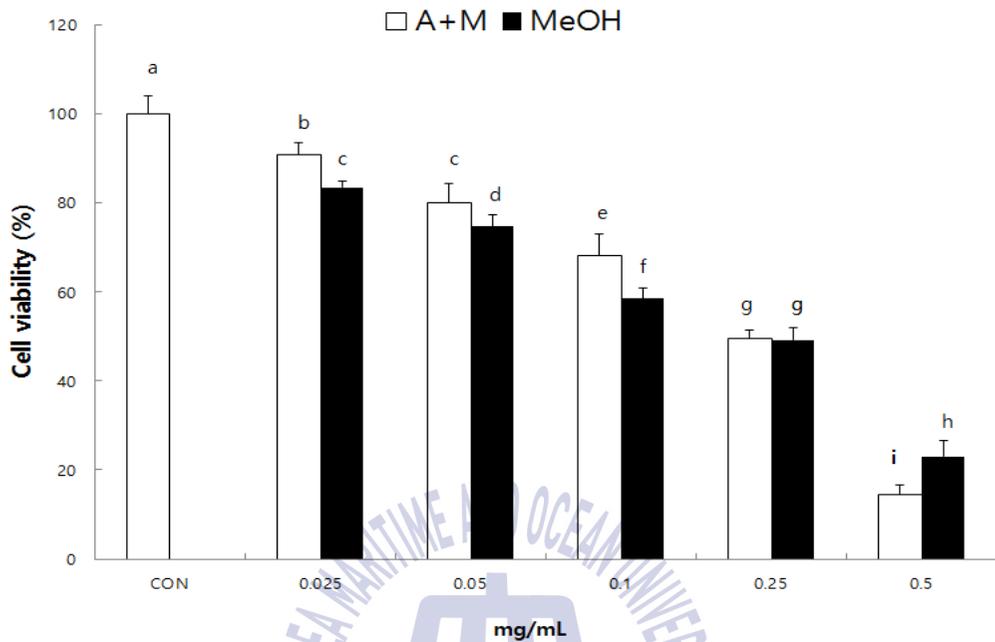


Fig. 10. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from wine by-product on the growth of HT-1080 cell line

^{a-i}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

Table 3. IC₅₀ values of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from wine by-product on the growth of AGS, HT-29 and HT-1080 cells

Samples	AGS ¹⁾	HT-29	HT-1080
A+M extract	0.34 ²⁾	0.40	0.27
MeOH extract	0.30	0.53	0.28

¹⁾AGS-human gastric carcinoma cell, HT-29-human colonic cancer cell, HT-1080-fibrosarcoma cell ²⁾mg/mL



포도부산물의 추출물을 *n*-Hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH 그리고 Water로 다시 분획하여 얻어진 각 분획물을 AGS 암세포에 처리한 결과 모든 0.05 mg/mL의 농도에서 분획물들 모두 유의적인 차이를 보였으나 특히 85% aq. MeOH 분획물의 경우에는 암세포 증식 억제 효과가 0.05 mg/mL에서 82.5%, 0.5 mg/mL의 농도에서는 92.0%의 매우 높은 억제 효과를 나타내었다(Fig. 11).

HT-29 암세포에 각 분획물들을 처리한 결과는 Fig. 12에 나타내었다. HT-29 암세포에 대한 세포 증식 억제효과는 AGS 암세포와 비교했을 때 상대적으로 낮지만 0.5 mg/mL의 농도에서는 *n*-Hexane, *n*-BuOH 그리고 Water 분획물에서는 약 50% 가량의 암세포 증식 억제 효과를 나타냈으며 85% aq. MeOH 분획물에서 0.25 mg/mL 농도에서 61.4%로 높은 효과를 나타내었다.

HT-1080 암세포에 대한 세포증식 억제 효과는 Fig. 13에 나타내었다. *n*-Hexane을 제외한 85% aq. MeOH, *n*-BuOH 그리고 Water 분획물에서는 control과 유의적인 차이가 나타났으며 85% aq. MeOH의 경우 0.05 mg/mL의 농도에서 70.6%의 높은 세포 증식 억제효과를 나타내었다($p < 0.05$).

AGS, HT-29 그리고 HT-1080 암세포에 대한 각 분획물들의 IC₅₀ 값을 Table 4에 나타내었다. AGS 암세포에서 *n*-Hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH 그리고 Water 분획물들에 대한 IC₅₀ 값은 각각 0.32, 0.01 0.61 그리고 0.42 mg/mL였고 HT-29 암세포에 대한 IC₅₀ 값은 각각 0.44, 0.33 0.49 그리고 0.49 mg/mL였고 HT-1080 암세포에 대한 IC₅₀ 값은 0.33, 0.12 0.35 그리고 0.44 mg/mL로 나타났다.

포도주 제조 후 남은 포도 부산물에는 다량의 폴리페놀 성분이 남아있는데 이러한 폴리페놀 및 플라보노이드 성분은 인체 내 미량으로도 효과가 높고 암과 심혈관 질환에 긍정적인 영향을 미친다고 나타내었다(Flamini, et al., 2013; Vergara, et al., 2015). Lazze, et al. (2009)는 10 mL/L 포도주 부산물 추출물을 처리한 Caco-2 대장암세포에서 S와 G2+M기가 늘어나 G1기의 세포수가 감소한 것을 확인하였고, 또한 포도주 부산물을 처리한 세포에서 대조군 세포보다 DNA 합성이 줄어든다고 밝혔다. Jara-Palacios, et al. (2015)는 정제한 백포도

주 부산물 추출물의 주요 풍부한 flavonol은 procyanidin B1, catechin, procyanidin B2-3-O-gallate 및 procyanidin tetramer 1이다. 그리고 정제된 백포도주 부산물 추출물이 24, 48, 그리고 72시간 노출시킨 후 암세포 증식을 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였고, 포도주 제조과정으로부터 얻은 정제된 백포도주 부산물 추출물은 항 증식성 활성화와 직접적인 세포사멸 시작을 통해 선암 세포 증식을 저해하는 능력을 가졌다고 밝혔다. 특히 폴리페놀이 풍부한 음식, 올리브 오일, 레드 와인 그리고 토마토 추출물은 비슷한 시간대에 암세포 성장을 저해한다고 보고되었다(Conona, et al., 2007; Gonez-Alonso, et al., 2012; Saunders, 2009).



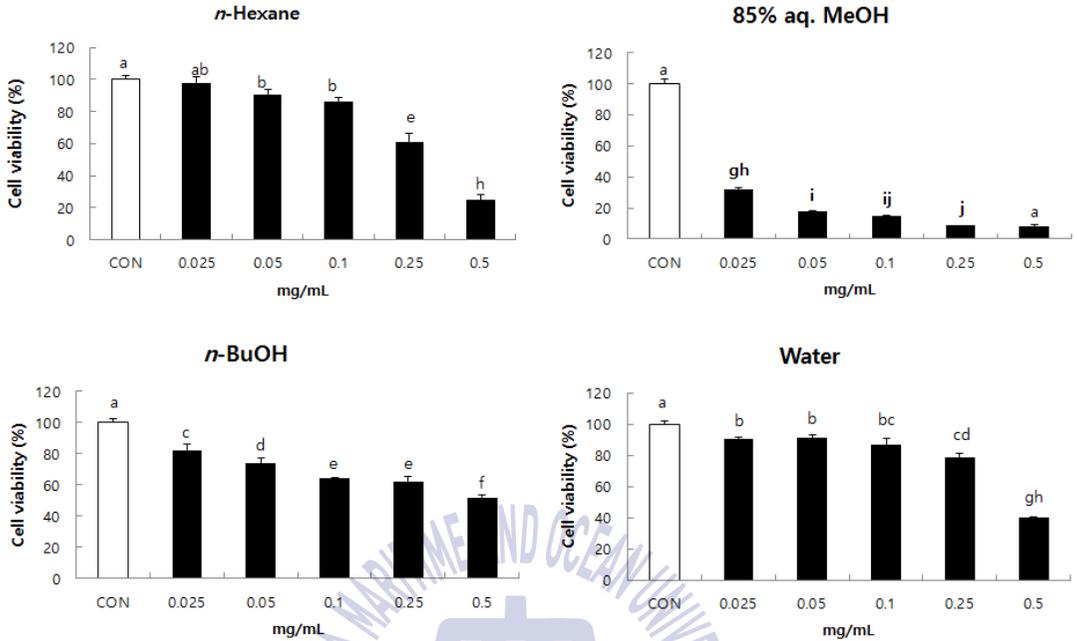


Fig. 11. Inhibitory effect of solvent fractions of extracts from wine by-product on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma

^{a-j}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

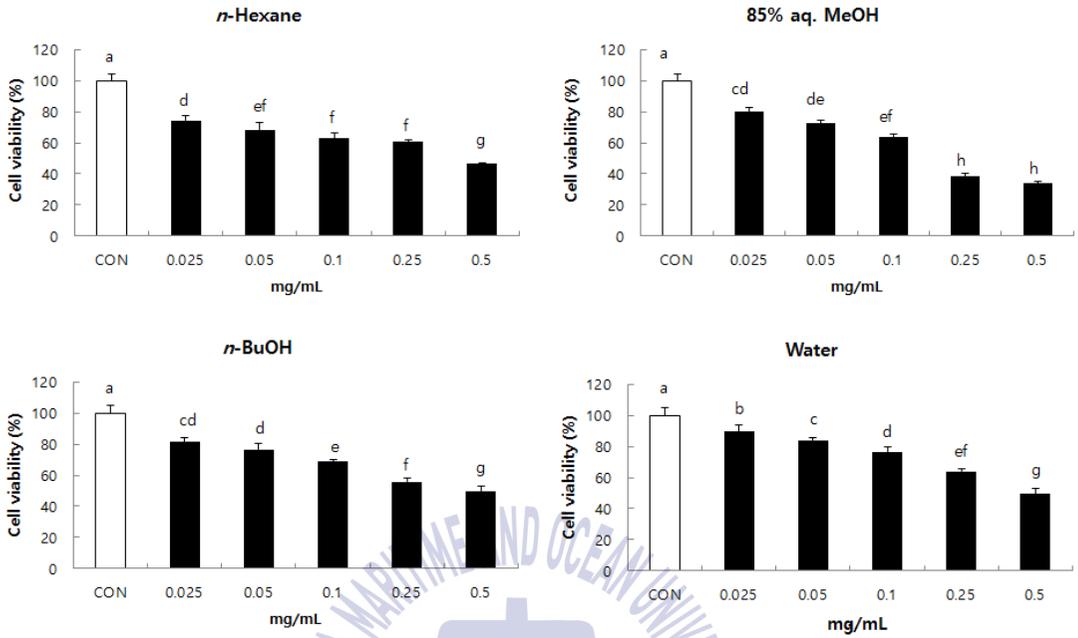


Fig. 12. Inhibitory effect of solvent fractions from wine by-product on the growth of HT-29 human colon cancer cells
^{a-h}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

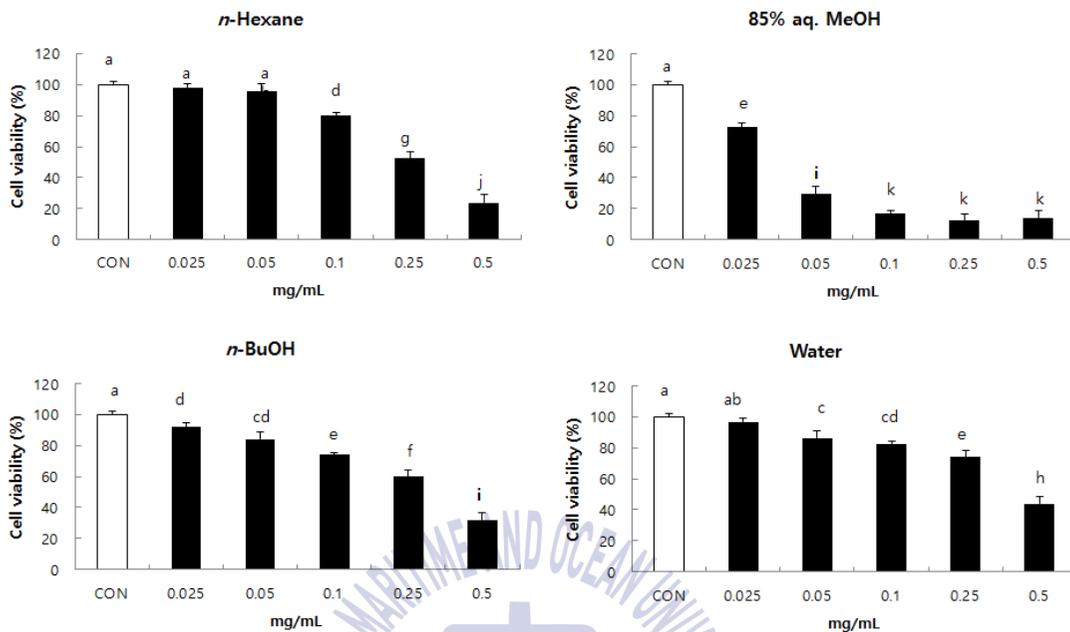


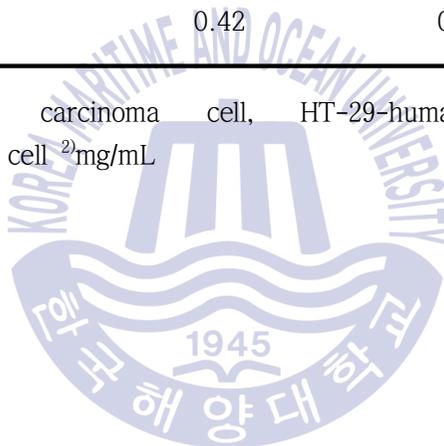
Fig. 13. Inhibitory effect of solvent fractions from wine by-product on the growth of HT-1080 cell line

^{a-i}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

Table 4. IC₅₀ values of solvent fractions from wine by-product on the growth of AGS, HT-29 and HT-1080 cells

Samples	AGS ¹⁾	HT-29	HT-1080
<i>n</i> -Hexane fraction	0.32 ²⁾	0.44	0.33
85% aq. MeOH fraction	0.01	0.33	0.12
<i>n</i> -BuOH fraction	0.61	0.49	0.35
Water fraction	0.42	0.49	0.44

¹⁾AGS-human gastric carcinoma cell, HT-29-human colonic cancer cell, HT-1080-fibrosarcoma cell ²⁾mg/mL



3.2.2 포도주 부산물의 추출물 및 분획물의 항산화 효과

① 세포 내 활성산소종(reactive oxygen species) 생성 억제 효과

포도주 부산물의 A+M 및 MeOH 추출물을 0.05 및 0.1 mg/mL의 농도로 인체 섬유유육종세포(HT-1080)에 처리하여 세포 내 활성 산소종을 측정된 결과, 두 추출물들 모두 측정시간 120 분이 지남에 따라 높은 세포 내 활성산소종 억제 효과를 나타내었다. MeOH 추출물의 경우 A+M 추출물과 비교 하였을 때 세포 내 활성산소종을 상대적으로 크게 억제하였으며, 특히 MeOH 추출물 0.1 mg/mL 농도에서는 control 과 비교하여 64%의 억제효과를 나타내었다(Fig. 14). 포도주 부산물 추출물을 *n*-Hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, Water 로 다시 추출하여 얻은 분획물을 0.05 및 0.1 mg/mL의 농도로 처리하였을 때, 두 농도에서 모두 30 분 동안 세포 내 활성산소종 억제율이 비슷하였지만, 60 분 이후에서는 *n*-BuOH > *n*-Hexane > 85% aq. MeOH > Water 분획물 순으로 세포 내 활성산소종 억제율이 높게 나타났다. 이들 중 가장 높은 세포 내 활성산소종 억제 효과를 나타낸 *n*-BuOH 분획물의 경우 60%의 억제율을 보였다(Fig. 15). Lebel, et al. (1992)역시 Caco-2 세포를 이용하여 포도주 부산물 추출물에 의한 항산화 효과를 조사한 결과, *tert*-butylhydroperoxide (TBHP)로 유도된 ROS를 농도 의존적으로 저해했다고 보고하였다. Wang, et al. (2016)도 Caco-2 세포에서 포도주 부산물 페놀추출물을 20 시간 전 처리한 후 TBHP로 유도된 ROS 생성을 측정된 결과 세포 내 ROS 과생성을 억제하였고 환원 glutathione (GSH) 생성을 증가시킴을 확인하여 포도주부산물 페놀추출물이 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하였다고 보고하였다. 또한 Choi, et al. (2012)등은 동물실험에서 포도씨 공급은 혈청 지질산화물 생성을 감소시켰고 catalase 및 glutathione-S-transferase 활성을 상승시켰다고 보고하였다.

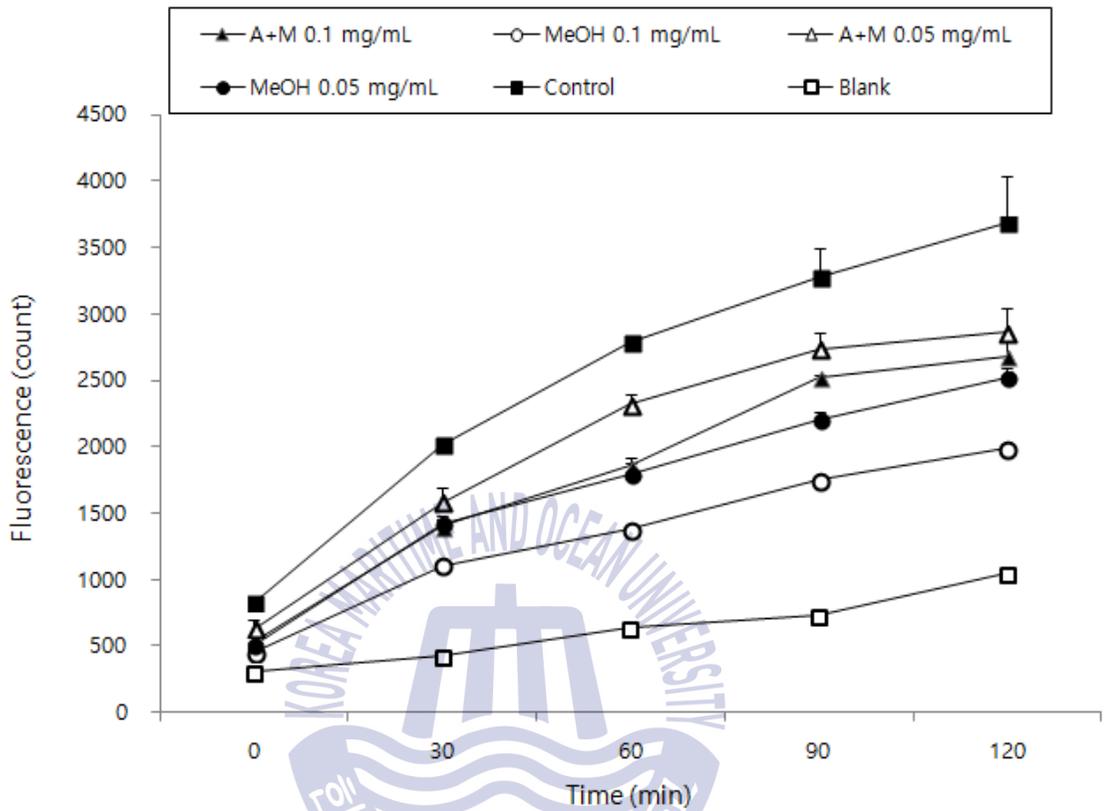


Fig. 14. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from wine by-product on levels of reactive oxygen species in HT-1080 human fibrosarcoma cells

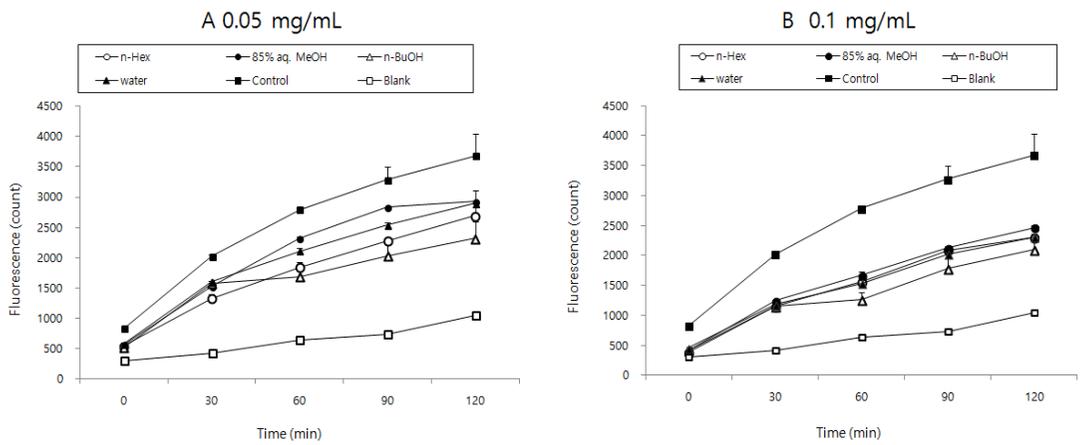
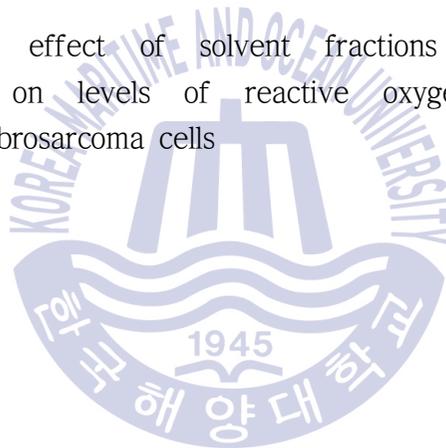


Fig. 15. Inhibitory effect of solvent fractions from wine by-product extracts on levels of reactive oxygen species in HT-1080 human fibrosarcoma cells



② DPPH 라디칼 소거활성

포도주 부산물 추출물 및 분획물의 DPPH 라디칼 소거활성은 활성산소를 제거할 수 있는 능력인 EDA (electron donating ability, %)로 Table 5에 나타내었다. 각 용매별 추출물 및 분획물을 각각 0.05, 0.1, 0.25 그리고 0.5 mg/mL의 농도로 control(L-ascorbic acid, BHT)과 비교하였다. 먼저 추출물들과 비교했을 때 MeOH 추출물은 A+M 추출물과 비교했을 때 활성산소 소거능이 우수하였다. 이는 앞서 MeOH 추출물의 높은 총 플라보노이드 및 총 페놀 함량과 연관있는 것으로 여겨진다. 분획물들 중 *n*-BuOH 분획물은 실험한 모든 농도에서 control인 BHT보다 EDA 값이 높게 나타났으며, 0.5 mg/mL의 농도에서 71.8%의 소거능을 나타냄으로써 합성항산화제인 BHT (70.2%)보다 높은 라디칼 소거효과를 나타내었다. 이 또한 *n*-BuOH 분획물의 높은 함량의 총 플라보노이드 및 페놀과 연관되어 있다고 여겨진다.

Lazze, et al. (2009)도 포도주 부산물 추출물의 항산화력을 DPPH 법으로 측정한 결과 높은 라디칼 소거능을 보였다고 보고하였다. Tournour, et al. (2015)은 포도주 부산물의 총 페놀함량과 항산화력에는 높은 상관관계가 보였고 포도주 부산물 추출물은 oxygen radical absorbance capacity (ORAC) 실험에서 55~104%의 저해효과를 나타내었다고 보고하였다. Park, et al. (2003)은 국내산 포도 캠벨종의 종자 및 과피의 추출조건과 그에 따른 DPPH 법에 의한 자유라디칼 소거활성 비교 결과 종자의 경우, 50°C 에탄올 추출물이 $RC_{50}=16.8 \mu\text{g/mL}$ 로, 분획물에서는 ethyl acetate 분획물이 $RC_{50}=15.4 \mu\text{g/mL}$ 로 가장 높은 활성을 나타내었으며, 과피의 경우, 78°C EtOH 추출물이 $RC_{50}=2437.5 \mu\text{g/mL}$, 분획물에서는 *n*-BuOH 분획물이 $RC_{50}=698.4 \mu\text{g/mL}$ 로 가장 높은 활성을 나타내었고, 자유라디칼 소거활성에서는 종자 에탄올 추출물이 과피 에탄올 추출물보다 145 배 이상의 높은 활성을 나타내었다고 보고하였다. Hwang, et al. (2008)은 포도씨의 품종에 따른 총 페놀 함량과 프로안토시아니딘(proanthocyanidin)의 함량을 측정하고, 항산화 활성간의 상관성을 비교한 결과 FRAP 과 DPPH 에 의한 항산화 활성 간의 상관성은 모두

0.92 이상이었으며, 총 페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거활성 사이의 상관성(0.98)이 가장 높았다고 보고하였다. 본 연구 결과에서는 총 플라보노이드 함량은 85% aq. MeOH 분획물에서 높았으나 DPPH 소거활성은 낮았으며 오히려 *n*-BuOH 분획물에 의한 소거활성이 높았으므로, DPPH 라디칼 소거활성은 총 페놀 함량과 상관성이 높은 것으로 여겨진다.



Table 5. DPPH radical scavenging effect of extracts and fractions from wine by-product*

Samples	Concentrations (mg/mL)			
	0.05	0.1	0.25	0.5
A+M extract	12.4 ± 0.00 ^c	16.4 ± 0.02 ^e	18.5 ± 0.01 ^e	19.2 ± 0.01 ^d
MeOH extract	26.5 ± 0.01 ^b	42.2 ± 0.02 ^{bc}	58.4 ± 0.01 ^{bc}	73.7 ± 0.01 ^b
<i>n</i> -Hexane fraction	17.0 ± 0.01 ^{bc}	15.6 ± 0.00 ^e	16.5 ± 0.01 ^e	17.9 ± 0.01 ^d
85% aq. MeOH fraction	22.3 ± 0.01 ^c	29.3 ± 0.01 ^d	42.5 ± 0.01 ^d	47.8 ± 0.00 ^c
<i>n</i> -BuOH fraction	26.1 ± 0.01 ^b	36.4 ± 0.02 ^{bc}	63.2 ± 0.01 ^b	71.8 ± 0.01 ^b
Water fraction	15.5 ± 0.02 ^c	22.2 ± 0.01 ^e	41.2 ± 0.01 ^d	49.1 ± 0.02 ^c
L-ascorbic acid	90.8 ± 0.00 ^a	91.4 ± 0.00 ^a	92.0 ± 0.00 ^a	92.3 ± 0.00 ^a
BHT	25.5 ± 0.01 ^b	37.7 ± 0.00 ^b	58.4 ± 0.02 ^{bc}	70.2 ± 0.00 ^b

*Values are expressed as mean±SD and ^{a-d}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

③ ABTS+ 라디칼 소거활성

포도주 부산물 추출물 및 분획물의 ABTS+ 라디칼 소거활성도 DPPH 라디칼 소거활성과 마찬가지로 전자공여능인 EDA 로 Table 6 에 나타내었다. 각 용매별 추출물 및 분획물을 각각 0.05, 0.1, 0.25 그리고 0.5 mg/mL 의 농도로 control(L-ascorbic acid, BHT)과 비교하였다. MeOH 추출물과 *n*-BuOH 분획물은 합성항산화제인 BHT 와 비교하여 0.25 및 0.5 mg/mL 농도에서 BHT 경우, 92.4% 및 92.3%이며, MeOH 추출물은 92.1% 및 91.4%의 소거능을 나타내었으며 *n*-BuOH 분획물은 92.4%로 control 과 유사한 값을 나타내었다. 반면, 그 이하의 농도에서는 MeOH 추출물과 *n*-BuOH 분획물이 BHT 와 비교하여 더 높은 EDA 값을 나타내었다. Jara-Palacios, et al. (2014)은 포도종별 백포도주 부산물 추출물의 항산화력을 ABTS+법으로 측정한 결과 총 플라보노이드와 총 페놀 함량이 높은 포도종 유래 백포도주 부산물 추출물의 라디칼 소거능이 높음을 확인하였고 보고하였다.

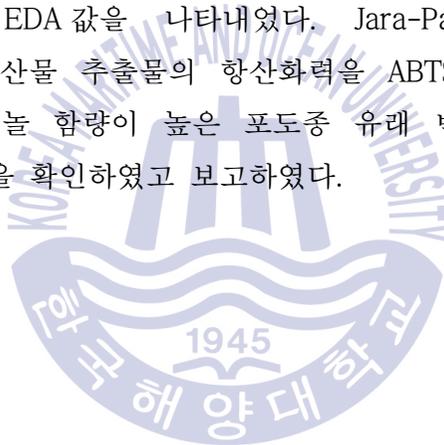


Table 6. ABTS radical scavenging effect of extracts and fractions from wine by-product*

Samples	Concentrations (mg/mL)			
	0.05	0.1	0.25	0.5
A+M extract	9.44 ± 0.00 ^f	14.0 ± 0.00 ^f	29.6 ± 0.01 ^d	46.6 ± 0.01 ^e
MeOH extract	69.6 ± 0.01 ^c	91.8 ± 0.00 ^b	92.1 ± 0.00 ^b	91.4 ± 0.00 ^{bc}
<i>n</i> -Hexane fraction	7.34 ± 0.00 ^f	10.2 ± 0.00 ^g	21.1 ± 0.01 ^e	30.7 ± 0.00 ^f
85% aq. MeOH fraction	60.0 ± 0.02 ^d	87.7 ± 0.01 ^c	91.0 ± 0.00 ^b	90.3 ± 0.00 ^c
<i>n</i> -BuOH fraction	90.4 ± 0.00 ^b	92.9 ± 0.00 ^b	92.4 ± 0.00 ^b	92.4 ± 0.00 ^b
Water fraction	42.5 ± 0.02 ^e	70.2 ± 0.00 ^e	72.9 ± 0.01 ^c	85.3 ± 0.01 ^d
L-ascorbic acid	99.7 ± 0.01 ^a	99.9 ± 0.00 ^a	99.9 ± 0.01 ^a	99.7 ± 0.00 ^a
BHT	57.5 ± 0.00 ^d	80.7 ± 0.00 ^d	92.4 ± 0.00 ^b	92.3 ± 0.01 ^b

*Values are expressed as mean ± SD and ^{a-f}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

④ Genomic DNA 산화 억제 효과

수퍼옥사이드 이온(O^{2-}), 과산화수소(H_2O_2) 그리고 하이드록시 라디칼(OH)같은 활성산소는 세포의 DNA 염기변이나 염기가닥 손상 등 DNA 를 산화시킨다. 이러한 산화적 스트레스의 요인에 의해 DNA 가 손상을 입게되면 암이나 노화 같은 생리학적 문제가 나타난다고 밝혀졌다(Halliwell, et al., 1984).

포도주 부산물의 추출물 및 분획물을 이용하여 직접적으로 DNA 산화를 억제시키는 효과를 보기위해 HT-1080 세포로부터 genomic DNA 를 추출하여 H_2O_2 와 $FeSO_4$ 를 이용하여 DNA 를 산화시켜 샘플이 DNA 산화를 방지하는 정도를 측정하였다. 대조군으로는 H_2O_2 와 $FeSO_4$ 만 넣고 산화시킨 control 과 시료와 산화제를 넣지 않은 Blank 를 사용하였다.

포도주 부산물의 DNA oxidation 실험 결과 추출물 및 분획물 모두 blank 와 비교했을 때 유의적 차이를 가졌다($p < 0.05$). 그 가운데 85% aq. MeOH 및 *n*-BuOH 분획물들의 경우 blank 과 비슷한 수준인 각각 96.5%와 96.8%의 매우 높은 산화 억제효과가 나타났다(Fig. 16).

Mehnaz, et al. (2014)도 포도 껍질에서 추출한 안토시아니딘이 H_2O_2 와 $FeSO_4$ 에 대한 plasmid DNA 손상에 대해 저해효과가 있다고 밝혔다. Devasagayam, et al. (1995)는 천연항산화제인 카로티노이드와 플라보노이드가 ROS에 대해 pBR322 plasmid DNA를 보호한다고 밝혔고, Noroozi, et al. (1998)은 플라보노이드와 카로티노이드가 인체림프구에서 H_2O_2 에 대한 DNA 산화에 대해 효과적이라고 밝혔다.

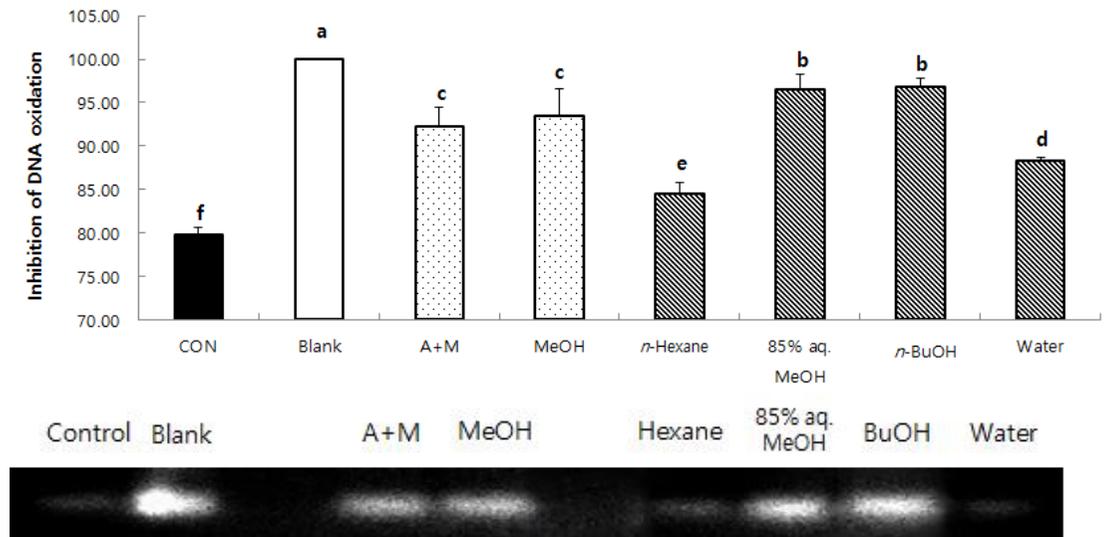


Fig. 16. Antioxidant effect of crude extracts and solvent fractions from wine by-product on genomic DNA in HT-1080 human fibrosarcoma cells
^{a-f}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

⑤ Glutathione (GSH) 생성 상승 효과

Glutathione (L- γ -glutamyl-L-cysteyl-glycine, GSH)은 thiol 기를 포함한 tripeptide 로 세포내 풍부하게 존재 하는 물질로서 체내에 산화적 스트레스의 영향으로 생성된 GSH 는 활성 산소종을 제거하거나 glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, thioltransferase 같이 항산화 효소들의 조효소로 작용하여 세포에 작용하는 산화적 스트레스를 억제시킨다(Schroeder, et al., 1996; Dickinson, et al., 2002). 그리고 높아진 GSH 는 산화적 스트레스로 유도된 세포자멸사로부터 세포를 보호하는데 세포자멸사, 괴사, 염증에 필수적인 역할을 하는 cysteins protease 인 caspases 의 촉매적 위치에 GSH 가 작용하여 세포 자멸사를 방어한다(Musallam, et al., 2002).

포도주 부산물의 추출물 및 분획물이 세포 내의 GSH 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 HT-1080 세포에 추출물 및 분획물들을 0.1, 0.25, 0.5 그리고 1 mg/mL 의 농도로 처리한 후 mBBr 처리를 하고 90 분 후 측정된 결과, Fig. 17 과 같다. 포도주 부산물 추출물들의 경우 모든 농도에서 control 보다 GSH 는 함량이 유의적으로 증가하였고 상대적으로 MeOH 추출물보다 A+M 추출물의 GSH 함량이 높은 것으로 확인되었다($p < 0.05$). Fig. 18 에서는 각 추출물을 *n*-Hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, Water 로 분획하여 GSH 함량을 측정된 것으로 *n*-Hexane 의 경우에는 1 mg/mL 의 농도에서만 control 과 차이가 났으며 85% aq. MeOH, *n*-BuOH 및 Water 분획물에서는 모든 농도에서 control 과 유의적으로 높은 GSH 함량이 나타났다($p < 0.05$).

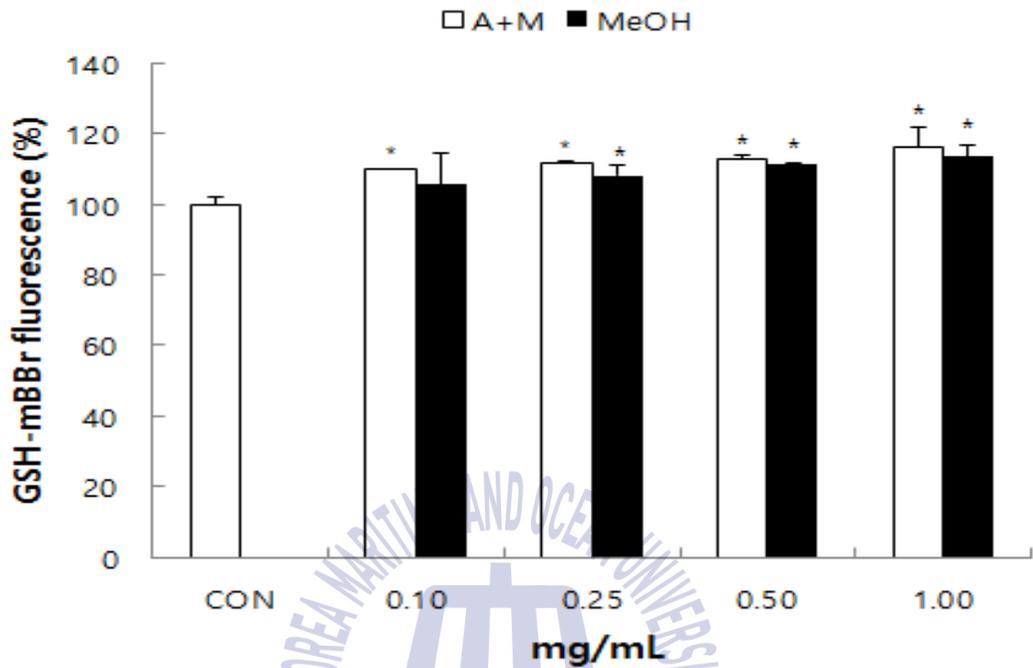


Fig. 17. Effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from wine by-product on GSH level in HT-1080 human fibrosarcoma cells
 $p < 0.05$, significant effect between the control and each extract

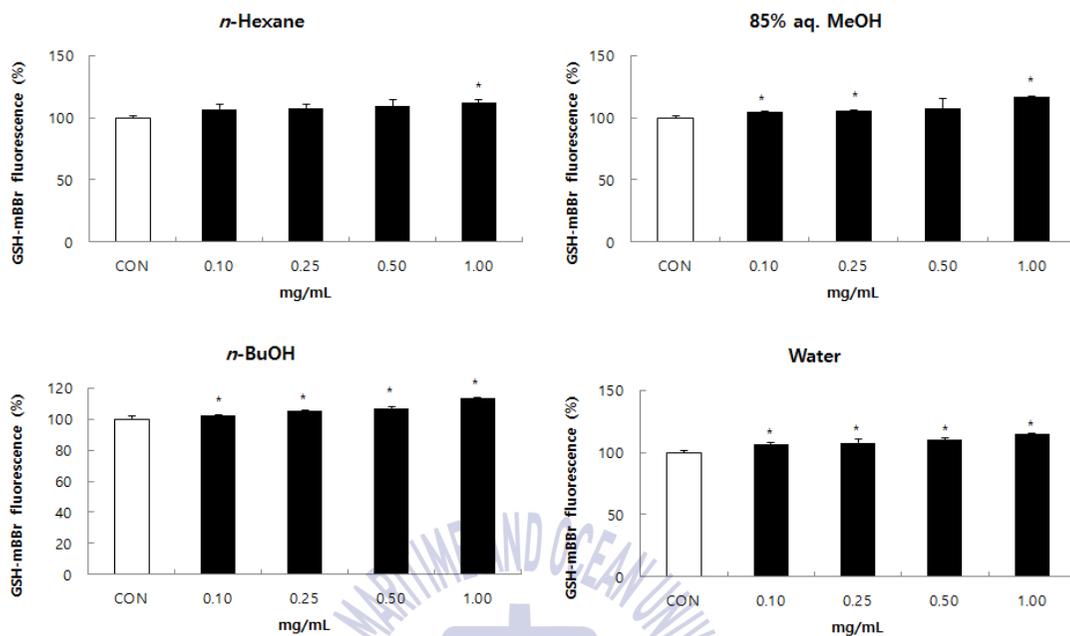


Fig. 18. Effect of solvent fractions of extracts from wine by-product on GSH level in HT-1080 human fibrosarcoma cells
 $*p < 0.05$, significant effect between the control and each fraction

3.2.3 포도주 부산물 추출물 및 분획물의 항염증 효과

① 세포 내 Nitric oxide (NO) 생성 저해효과

염증 반응이란 대식세포나 간세포에서 외부자극에 의해 NO, tumor necrosis factor α (TNF- α) 등을 분비를 통해 생체를 보호하는 방어기작 중 하나이다. 염증반응으로 분비되는 NO는 합성 효소에 의해 L-arginine에서 만들어지며 소량일 경우 혈액순환 촉진, 항균작용, 면역력 증강 등 이로운 효과를 가져오지만 과 분비시 독성이 강한 peroxynitrite (ONNOO⁻)등을 생성하여 염증 반응을 촉진시켜 여러 염증질환을 유발하는 것으로 알려져 있다(Minghetti & Levi, 1998; Radi, et al., 1991; Glezer, et al., 2007).

포도주 부산물이 NO의 생성에 얼마나 영향을 끼치는지 알아보기 위해서 포도 부산물 추출물 및 분획물들을 세포 배양액에 처리하고, 자극제인 LPS를 이용해 세포를 자극시킨 후 세포 배양액과 Griess 시약과 반응시켜 확인하였다. 시료는 0.5, 1 및 2, mg/mL의 농도로 처리하였으며 대조군으로는 시료 대신 PBS를 처리한 control군과 LPS를 처리하지 않은 blank군을 사용하였다. LPS를 처리한 control군의 경우 NO 생성량이 상대적으로 높았으며 LPS를 처리하지 않은 blank군은 NO 생성량이 상대적으로 낮게 나타났다. 포도주 부산물 A+M 추출물과 MeOH 추출물은 모두 농도 의존적으로 NO 생성을 저해하였다($P < 0.05$). 2 mg/mL의 농도에서는 control군과 비교하였을 때 A+M 추출물은 52.3% MeOH 추출물은 50.1%의 높은 NO 생성 저해 효과가 나타났다(Fig. 19). Heo, et al. (2007)은 거봉, 캠벨 및 델라웨어의 50% MeOH 추출물에서의 control과 비교해 3~4배 적은 NO 생성 저해효과가 나타났다고 밝혔다.

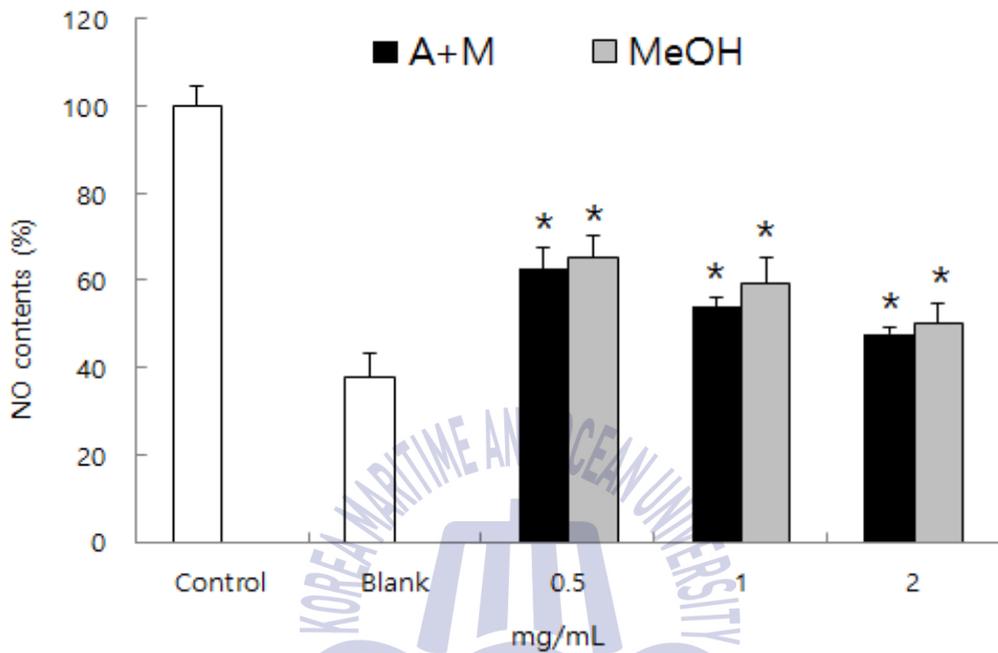
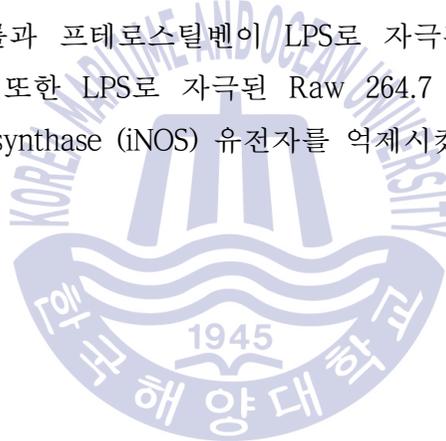


Fig. 19. Effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from wine by-product on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells

* $P < 0.05$, significant effect between the control and each extract

포도주 부산물의 추출물을 *n*-Hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH 그리고 Water로 다시 분획하여 얻어진 각 분획물을 농도별로 처리 후 NO 생성량을 측정 한 결과로 모든 분획물들이 0.5, 1 및 2 mg/mL의 농도에서 control과 유의적 차이를 보였다($p < 0.05$). 분획물들 가운데 *n*-BuOH와 Water 분획물이 2 mg/mL의 농도에서 control과 비교했을 때 각각 61.3% 및 57.2%로 추출물 보다 높은 NO 생성 저해 효과를 나타내었으며 *n*-Hexane과 85% aq. MeOH 분획물의 경우에는 각각 50% 및 53.4%의 저해 효과로 추출물들과 유사한 NO 생성 저해 효과를 나타내었다(Figs. 20~23).

Kamap, et al. (2000)은 NO 생성물의 조절인자로서 와인의 항산화 작용이 관찰된다고 나타냈고, Qureshi, et al. (2012)는 블루베리와 레드와인 그리고 포도에 존재하는 레스베라트롤과 프테로스틸벤이 LPS로 자극된 Raw 264.7 세포로부터 NO 생성을 저해하며 또한 LPS로 자극된 Raw 264.7 세포에서 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 inducible NO synthase (iNOS) 유전자를 억제시켰다고 나타냈다.



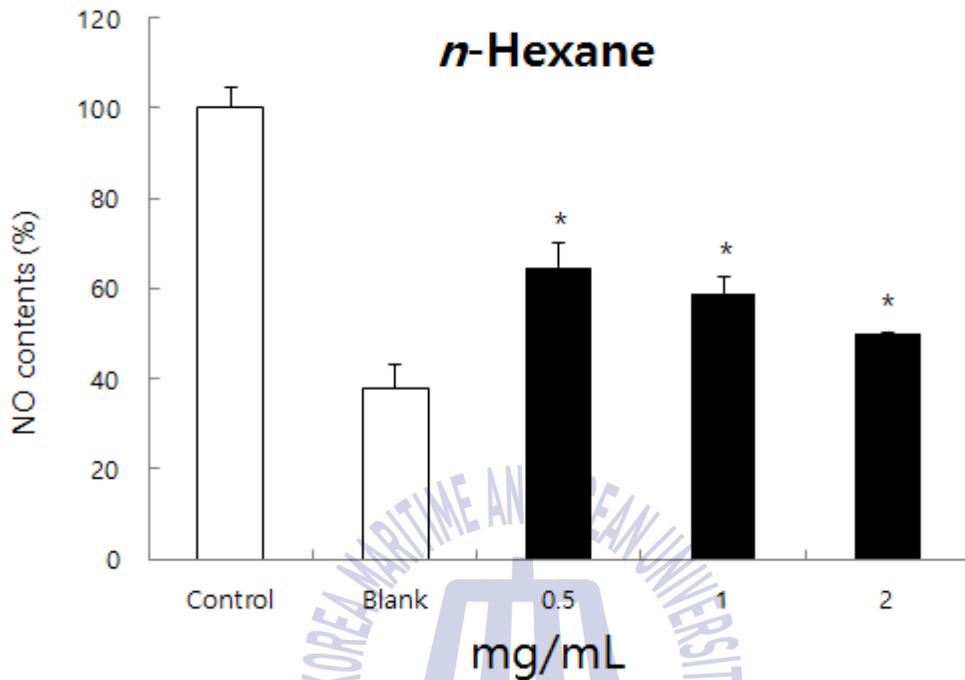


Fig. 20. Effect of *n*-Hexane fraction from wine by-product on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells
 * $p < 0.05$, significant effect between the control and fraction

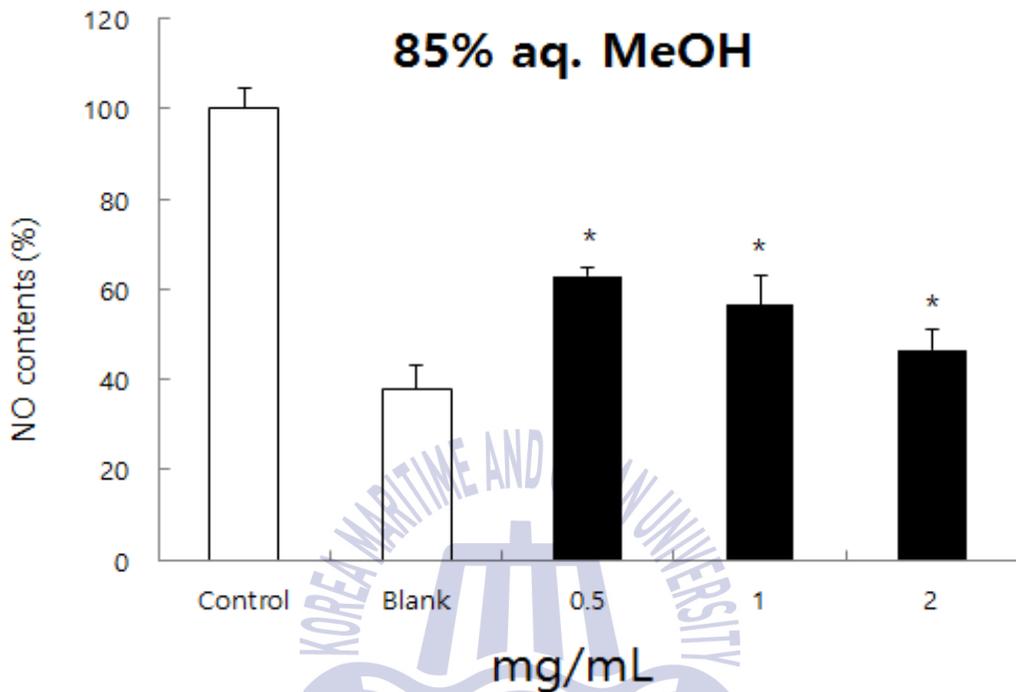


Fig. 21. Effect of 85% aq. MeOH fraction from wine by-product on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells
 * $p < 0.05$, significant effect between the control and fraction

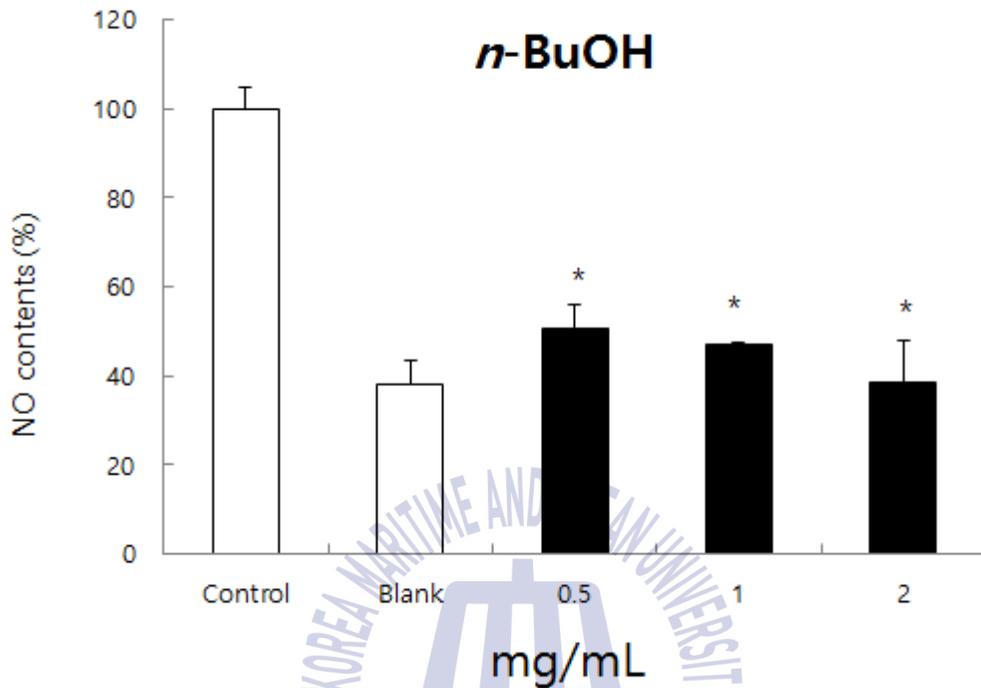


Fig. 22. Effect of *n*-BuOH fraction from wine by-product on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells

* $p < 0.05$, significant effect between the control and fraction

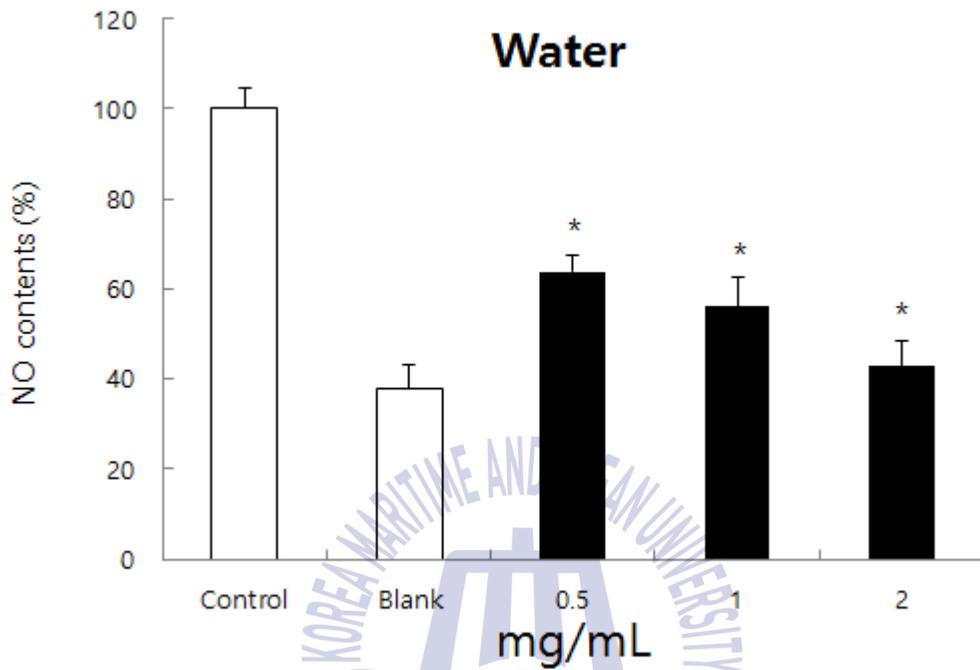


Fig. 23. Effect of Water fraction from wine by-product on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cell
 * $p < 0.05$, significant effect between the control and fraction

② 사이토카인 생성에 미치는 효과

염증반응이 일어나면 비장세포의 증식을 통해 면역 반응의 매체 사이토카인이 분비가 된다. 혈소판 arachidonic acid 대사의 phospholipase A2와 cyclooxygenase의 경로에서 활성화되는 IL-6는 T 및 B 림프구와 상피세포를 활성화시키는 tumor necrosis factor α (TNF- α)에 의해 조절되며 이들은 전염증성 사이토카인으로 초기 염증반응에 관여한다(Tizard, 1986; Trinchieri, 1995; Romani, et al., 1997). Kim, et al. (2011)과 Cho, et al. (2009)는 포도씨 프로안토시아닌 추출물에서 플라보노이드를 확인 하였고 이런 플라보노이드는 폐 상피세포에서 전염증성 사이토카인인 IL-6의 생성을 저해시키고 비장세포에서 생산된 TNF- α 와 IL-17 생성도 감소시킨다고 밝혔다. 따라서 앞선 실험의 결과로 높은 플라보노이드와 폐놀 함량을 함유한 85% aq. MeOH 분획물은 NO 생성 억제효과에 대해서도 우수한 효과를 나타내었으므로 85% aq. MeOH 분획물에 의한 비장세포의 사이토카인(IL-2, IL-5, IL-4, IL-6, IL-12/IL-20, INF- γ)의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 6, 24, 48, 그리고 72 시간대 별로 배양한 후 B 세포 자극물질인 LPS와 T 세포 자극물질인 Con A를 사용하여 포도주 부산물로부터 사이토카인 생성을 측정하였다.

Table 7은 pro-inflammatory 사이토카인인 IL-2 생성량을 나타낸 것으로 LPS만을 처리했을 때 48시간 배양까지는 생성량이 증가하는 것으로 확인되었고 85% aq. MeOH 분획물을 3 및 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 함께 처리하였을 때 24시간 배양이후부터 IL-2 생성량이 감소하였다. 48시간 배양일 경우 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리했을 때 44.4%의 IL-2 생성량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다 ($p < 0.05$). Con A와 85% aq. MeOH 분획물을 함께 처리한 경우 배양시간이 지남에 따라 IL-2 생성량이 증가하였으나 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가농도에서는 IL-2 생성량이 63.6%로 감소하였다($p < 0.05$, Table 8).

Table 9는 pro-inflammatory 사이토카인인 IL-5 생성량을 나타낸 것으로 LPS만을 처리했을 때 배양시간이 지남에 따라 생성량이 증가하는 것으로 확인되었고

85% aq. MeOH 분획물(3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)과 함께 처리했을 때 48시간 배양일 때 IL-5 생성량이 유의적으로 증가한 것을 확인하였다($p < 0.05$). Con A만 처리하였을 때 24시간 배양의 경우 IL-5 생성량이 증가하였고 85% aq. MeOH 분획물을(3 및 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 처리하였을 때 의 두 첨가농도 모두 72시간 배양에서 IL-5 생성량을 유의적으로 증가시키는 것을 확인하였다($p < 0.05$, Table 10).

Table 11는 pro-inflammatory 사이토카인인 IL-6 생성량을 나타낸 것으로 LPS만을 처리했을 때 48시간 배양까지는 생성량이 증가하였고 24시간 배양의 경우 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) LPS와 85% aq. MeOH 함께 처리하였을 때 30.3%로 유의적으로 IL-6 생성량을 감소시키는 것을 확인하였다($p < 0.05$). 하지만 85% aq. MeOH를 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가농도로 처리하였을 때 24 및 72시간 배양 후 유의적으로 상승시키는 것을 확인할 수 있었다. Con A만을 처리한 경우 배양시간이 지남에 따라 IL-6 생성량은 감소하였으나 85% aq. MeOH과 함께 처리했을 때 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 첨가농도에서는 24시간, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 첨가농도에서는 48 및 72시간 배양 후 IL-6 생성량이 유의적으로 증가한 것을 확인하였다($p < 0.05$, Table 12).

Table 13은 pro-inflammatory 사이토카인인 IL-12/IL-20(P40) 생성량을 나타낸 것으로 LPS만 처리했을 때 IL-12/IL-20(P40) 생성량은 배양시간대별로 증가했으며 85% aq. MeOH(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 함께 첨가하였을 경우 72시간 배양에서 IL-12/IL-20(P40) 생성량을 41.4%로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다($p < 0.05$). Con A만 처리 했을 때 48시간 배양까지는 증가하였고 85% aq. MeOH을 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가농도로 함께 처리했을 때 모든 배양시간대에서 유의적으로 IL-12/IL-20(P40) 생성량을 증가시킨 것을 확인하였다($p < 0.05$, Table 14).

Terra, et al. (2009)는 포도씨 프로안토시아니딘 추출물 처리가 장간막의 백색지방조직에서 IL-6 mRNA 를 감소시키고, 이 IL-6 의 발현은 아디포텍틴의 발현과 역 상관관계가 있다고 밝혔다. Mukerjee, et al. (2012)는 포도 껍질 또는 과육의 처리가 IL-4 발현을 증가시키고 TNF, interferon (IFN), transforming growth factor (TGF-1), vascular endothelial growth factor (VEGF-A)의 발현은 대조군보다 감소시킨다고 보고하였다.

Table 7. Effect of 85% aq. MeOH fraction from wine by-product on the production of lipopolysaccharide (LPS) induced interleukin-2 at different times in mouse spleen cells¹⁾

Samples ($\mu\text{g/mL}$)	Concentrations (pg/mL)			
	6 hr	24 hr	48 hr	72 hr
LPS	0.29 \pm 0.06	0.33 \pm 0.12	0.37 \pm 0.06	0.25 \pm 0.12
LPS + 85% aq. MeOH 3	0.08 \pm 0.12	0.37 \pm 0.47	0.29 \pm 0.06	0.17 \pm 0.00
LPS + 85% aq. MeOH 10	0.08 \pm 0.12	0.29 \pm 0.06	0.21 \pm 0.06*	0.08 \pm 0.00

¹⁾Values are expressed as mean \pm SD and * $p < 0.05$, significant effect between the control and fraction



Table 8. Effect of 85% aq. MeOH fraction from wine by-product on the production of concanavalin A (Con A) induced interleukin-2 at different times in mouse spleen cells¹⁾

Samples ($\mu\text{g/mL}$)	Concentrations (pg/mL)			
	6 hr	24 hr	48 hr	72 hr
Con A	0.45 \pm 0.06	0.37 \pm 0.06	0.50 \pm 0.00	0.37 \pm 0.06
Con A + 85% aq. MeOH 3	0.17 \pm 0.00*	0.25 \pm 0.23	0.21 \pm 0.18	0.41 \pm 0.00
Con A + 85% aq. MeOH 10	0.33 \pm 0.23	0.58 \pm 0.12	1.03 \pm 0.06*	1.61 \pm 0.06*

¹⁾Values are expressed as mean \pm SD and * p <0.05, significant effect between the control and fraction.



Table 9. Effect of 85% aq. MeOH fraction from wine by-product on the production of lipopolysaccharide (LPS) induced interleukin-5 at different times in mouse spleen cells¹⁾

Samples ($\mu\text{g/mL}$)	Concentrations (pg/mL)			
	6 hr	24 hr	48 hr	72 hr
LPS	0.10 \pm 0.14	0.27 \pm 0.10	0.31 \pm 0.05	0.31 \pm 0.05
LPS + 85% aq. MeOH 3	0.17 \pm 0.05	0.41 \pm 0.00	0.48 \pm 0.00*	0.61 \pm 0.10
LPS + 85% aq. MeOH 10	0.20 \pm 0.10	0.44 \pm 0.05	0.31 \pm 0.05	0.20 \pm 0.00

¹⁾Values are expressed as mean \pm SD and * $p < 0.05$, significant effect between the control and fraction.



Table 10. Effect of 85% aq. MeOH fraction from wine by-product on the production of concanavalin A (Con A) induced interleukin-5 at different times in mouse spleen cells¹⁾

Samples ($\mu\text{g/mL}$)	Concentrations (pg/mL)			
	6 hr	24 hr	48 hr	72 hr
Con A	0.20 \pm 0.10	0.44 \pm 0.05	0.31 \pm 0.14	0.31 \pm 0.05
Con A + 85% aq. MeOH 3	0.20 \pm 0.10	0.51 \pm 0.05	0.51 \pm 0.05	0.65 \pm 0.05*
Con A + 85% aq. MeOH 10	0.31 \pm 0.05	0.48 \pm 0.00	0.41 \pm 0.00	0.44 \pm 0.05*

¹⁾Values are expressed as mean \pm SD and * $p < 0.05$, significant effect between the control and fraction.



Table 11. Effect of 85% aq. MeOH fraction from wine by-product on the production of lipopolysaccharide (LPS) induced interleukin-6 at different times in mouse spleen cells¹⁾

Samples ($\mu\text{g/mL}$)	Concentrations (pg/mL)			
	6 hr	24 hr	48 hr	72 hr
LPS	0.99 ± 0.20	1.56 ± 0.20	2.08 ± 0.27	1.75 ± 0.33
LPS + 85% aq. MeOH 3	$1.56 \pm 0.20^*$	1.75 ± 0.07	2.41 ± 0.07	$3.02 \pm 0.13^*$
LPS + 85% aq. MeOH 10	0.99 ± 0.07	$1.09 \pm 0.20^*$	1.18 ± 0.07	1.13 ± 0.00

¹⁾Values are expressed as mean \pm SD and * $p < 0.05$, significant effect between the control and fraction.



Table 12. Effect of 85% aq. MeOH fraction from wine by-product on the production of concanavalin A (Con A) induced interleukin-6 at different times in mouse spleen cells¹⁾

Samples ($\mu\text{g/mL}$)	Concentrations (pg/mL)			
	6 hr	24 hr	48 hr	72 hr
Con A	0.85 \pm 0.00	0.52 \pm 0.20	0.66 \pm 0.13	0.61 \pm 0.20
Con A + 85% aq. MeOH 3	0.66 \pm 0.13	0.94 \pm 0.13*	0.94 \pm 0.00	0.66 \pm 0.13
Con A + 85% aq. MeOH 10	0.94 \pm 0.13	0.94 \pm 0.27	1.42 \pm 0.00*	1.32 \pm 0.13*

¹⁾Values are expressed as mean \pm SD and * p <0.05, significant effect between the control and fraction



Table 13. Effect of 85% aq. MeOH fraction from wine by-product on the production of lipopolysaccharide (LPS) induced interleukine-12 and interleukine-20(P40) at different times in mouse spleen cells¹⁾

Samples ($\mu\text{g/mL}$)	Concentrations (pg/mL)			
	6 hr	24 hr	48 hr	72 hr
LPS	1.16 \pm 0.07	1.81 \pm 0.07	2.09 \pm 0.20	2.70 \pm 0.26
LPS + 85% aq. MeOH 3	1.72 \pm 0.07*	2.60 \pm 0.79	2.28 \pm 0.33	2.28 \pm 0.07
LPS + 85% aq. MeOH 3	1.67 \pm 0.13*	1.63 \pm 0.07*	2.23 \pm 0.00	1.58 \pm 0.13*

¹⁾Values are expressed as mean \pm SD and * p <0.05, significant effect between the control and fraction.



Table 14. Effect of 85% aq. MeOH fraction from wine by-product on the production of concanavalin A (Con A) induced interleukine-12 and interleukine-20(P40) at different times in mouse spleen cells¹⁾

Samples ($\mu\text{g/mL}$)	Concentrations (pg/mL)			
	6 hr	24 hr	48 hr	72 hr
Con A	1.02 \pm 0.13	1.25 \pm 0.07	1.58 \pm 0.13	1.12 \pm 0.13
Con A + 85% aq. MeOH 3	1.77 \pm 0.13*	1.91 \pm 0.20	2.14 \pm 0.39	1.91 \pm 0.07*
Con A + 85% aq. MeOH 10	1.67 \pm 0.13*	1.77 \pm 0.00*	2.56 \pm 0.07*	2.46 \pm 0.07*

¹⁾Values are expressed as mean \pm SD and * $p < 0.05$, significant effect between the control and fraction.



다음은 anti-inflammatory 사이토카인인 IL-4 생성량을 측정한 결과로 Table 15에 나타내었다. LPS 자극제만을 처리했을 때 48시간 배양까지는 IL-4 생성량이 증가한 것을 확인할 수 있었고 LPS와 85% aq. MeOH (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 함께 처리하였을 때 72시간 배양 후 IL-4 생성량이 유의적으로 감소되었다($p < 0.05$). Con A를 처리했을 때 마찬가지로 48시간 배양까지는 IL-4 생성량이 증가하였고 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가농도의 85% aq. MeOH을 첨가하였을 경우 6 및 24시간 배양 후 각각 77.7%와 44.4%의 IL-4의 생성이 증가하였고 그 이후 배양시간에서도 IL-4 생성이 증가하였으나 유의적 차이는 없었다($p < 0.05$, Table 16).

Table 17은 anti-inflammatory 사이토카인중 하나인 interferone- γ (IFN- γ)의 생성량을 나타낸 것으로 LPS 자극제만을 처리했을 때 48시간 배양까지는 증가하는 경향을 보이고 LPS와 85% aq. MeOH (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 함께 처리하였을 때에는 72시간 배양 후 유의적으로 IFN- γ 생성량이 감소하였다($p < 0.05$). Con A만 자극했을 때 72시간 배양 후 IFN- γ 생성량은 증가하였으며 Con A와 85% aq. MeOH (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 함께 처리하였을 때에는 6시간 배양이후에는 IFN- γ 생성량이 일정하게 유지되었고 24시간 배양 후 IFN- γ 생성량을 23.5%까지 유의적으로 증가시키는 것을 확인할 수 있었다($p < 0.05$, Table 18).

Puertollanno, et al. (2004)는 4 주동안 oleic acid 가 풍부한 올리브오일이 함유된 식이를 섭취한 마우스에서 항염증 기능을 하는 사이토카인인 IL-4가 증가한다고 보고하였고, 같은 연구에서 마우스의 pro-inflammatory 사이토카인인 IL-12 농도가 감소한다고 밝혔다.

Table 15. Effect of 85% aq. MeOH fraction from wine by-product on the production of lipopolysaccharide (LPS) induced interleukine-4 at different times in mouse spleen cells¹⁾

Samples ($\mu\text{g/mL}$)	Concentrations (pg/mL)			
	6 hr	24 hr	48 hr	72 hr
LPS	0.34 \pm 0.36	0.56 \pm 0.18	0.94 \pm 0.36	0.77 \pm 0.12
LPS + 85% aq. MeOH 3	0.26 \pm 0.12	0.73 \pm 0.42	0.56 \pm 0.18	0.47 \pm 0.06
LPS + 85% aq. MeOH 10	0.34 \pm 0.24	0.56 \pm 0.18	0.51 \pm 0.12	0.43 \pm 0.12*

¹⁾Values are expressed as mean \pm SD and * $p < 0.05$, significant effect between the control and fraction.



Table 16. Effect of 85% aq. MeOH fraction from wine by-product on the production of concanavalin A (Con A) induced interleukine-4 at different times in mouse spleen cells¹⁾

Samples ($\mu\text{g/mL}$)	Concentrations (pg/mL)			
	6 hr	24 hr	48 hr	72 hr
Con A	0.09 \pm 0.00	0.21 \pm 0.06	0.51 \pm 0.12	0.73 \pm 0.18
Con A + 85% aq. MeOH 3	0.38 \pm 0.06*	0.38 \pm 0.06*	0.56 \pm 0.06	0.56 \pm 0.18
Con A + 85% aq. MeOH 10	0.13 \pm 0.18	0.34 \pm 0.00	0.64 \pm 0.18	0.73 \pm 0.06

¹⁾Values are expressed as mean \pm SD and * p <0.05, significant effect between the control and fraction.



Table 17. Effect of 85% aq. MeOH fraction from wine by-product on the production of lipopolysaccharide (LPS) induced interferone- γ at different times in mouse spleen cells¹⁾

Samples ($\mu\text{g/mL}$)	Concentrations (pg/mL)			
	6 hr	24 hr	48 hr	72 hr
LPS	29.27 \pm 13.80	51.22 \pm 3.45	70.73 \pm 24.15	51.22 \pm 10.35
LPS + 85% aq. MeOH 3	24.39 \pm 6.90	65.85 \pm 44.84	39.02 \pm 20.70	26.83 \pm 17.25
LPS + 85% aq. MeOH 10	48.78 \pm 0.00	58.54 \pm 6.90	51.22 \pm 17.25	27.97 \pm 6.90*

¹⁾Values are expressed as mean \pm SD and * p <0.05, significant effect between the control and fraction.



Table 18. Effect of 85% aq. MeOH fraction from wine by-product on the production of concanavalin A (Con A) induced interferone- γ at different times in mouse spleen cells¹⁾

Samples ($\mu\text{g/mL}$)	Concentrations (pg/mL)			
	6 hr	24 hr	48 hr	72 hr
Con A	31.71 \pm 3.45	31.71 \pm 3.45	46.34 \pm 3.45	70.73 \pm 3.45
Con A + 85% aq. MeOH 3	29.27 \pm 13.80	31.71 \pm 3.45	34.15 \pm 6.90	24.39 \pm 20.70
Con A + 85% aq. MeOH 10	46.34 \pm 10.35	41.46 \pm 3.45*	43.90 \pm 0.00	39.02 \pm 6.90*

¹⁾Values are expressed as mean \pm SD and * p <0.05, significant effect between the control and fraction.



4.1 포도주 부산물로부터 분리한 화합물의 생리활성

4.1.1. 포도주 부산물로부터 분리한 화합물의 항암 효과

포도주 부산물의 항암 효과가 나타난 85% aq. MeOH 분획물과 *n*-BuOH 분획물에 C₁₈ reverse-phase vacuum flash chromatography 실시하여 각 분획물에서 7 개의 reverse fraction (RF)을 얻은 후 인체유래 암세포에 대한 증식 억제효과를 알아보기위해 MTT assay 를 실시하였다. 실험 대상 세포들은 위암세포(AGS)와 인체 결장암세포(HT-29) 그리고 인체 섬유육종세포(HT-1080)을 이용하였으며 각 세포별 샘플을 0.1 mg/mL 의 농도로 실험하였다.

AGS 암세포에 85% aq. MeOH reverse fraction을 0.1 mg/mL의 농도로 처리하였을 때 85% aq. MeOH reverse fraction 중에서 RF-1과 RF-3에서 각각 21.7%와 22.5% 암세포 증식 억제효과가 나타났으며 *n*-BuOH reverse fraction 은 RF-5와 RF-6에서 각각 48.5%와 33.6%의 세포 증식 억제효과가 나타났다 (Fig. 24).

HT-29 암세포에 대해 각 reverse fraction을 처리한 결과 85% aq. MeOH reverse fraction 중에서 RF-3이 26.7%의 세포 증식 억제효과가 나타났고 *n*-BuOH reverse fraction은 RF-6에서 61.4% 세포증식억제효과가 나타났다 (Fig. 25).

HT-1080 암세포에 대해 각 reverse fraction을 처리한 결과 85% aq. MeOH reverse fraction 중에서 RF-1과 RF-3에서 각각 39.9%와 40.5%의 세포 증식 억제효과가 나타났고 *n*-BuOH reverse fraction은 RF-5와 RF-6에서 각각 35.1%와 26.8%의 세포 증식 억제효과가 나타났다(Fig. 26).

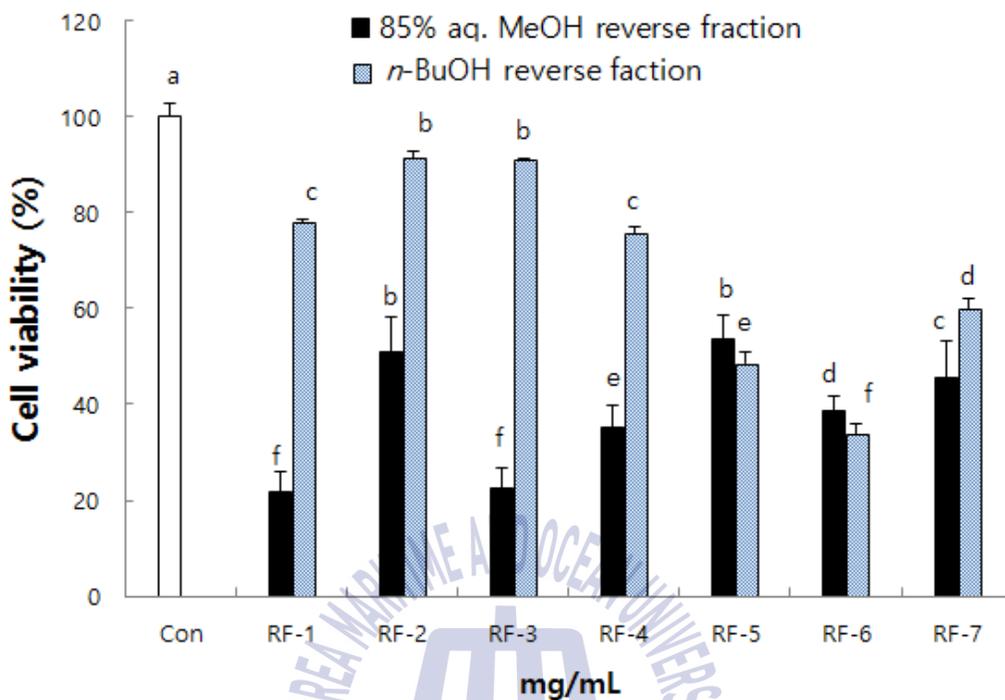


Fig. 24. Inhibitory effect of 85% aq. MeOH and *n*-BuOH reverse fractions (0.1 mg/mL) from wine by-product on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma. ^{a-f}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

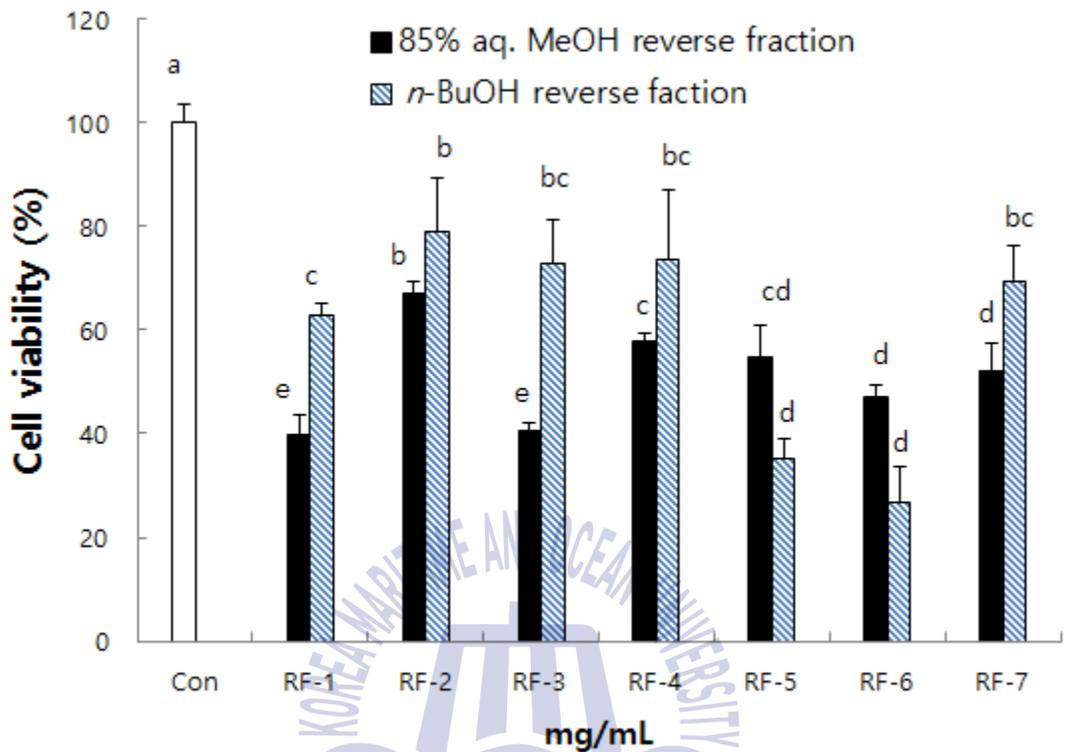


Fig. 25. Inhibitory effect of 85% aq. MeOH and *n*-BuOH reverse fractions (0.1 mg/mL) from wine by-product on the growth of HT-29 human colon cancer cells
^{a-f}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

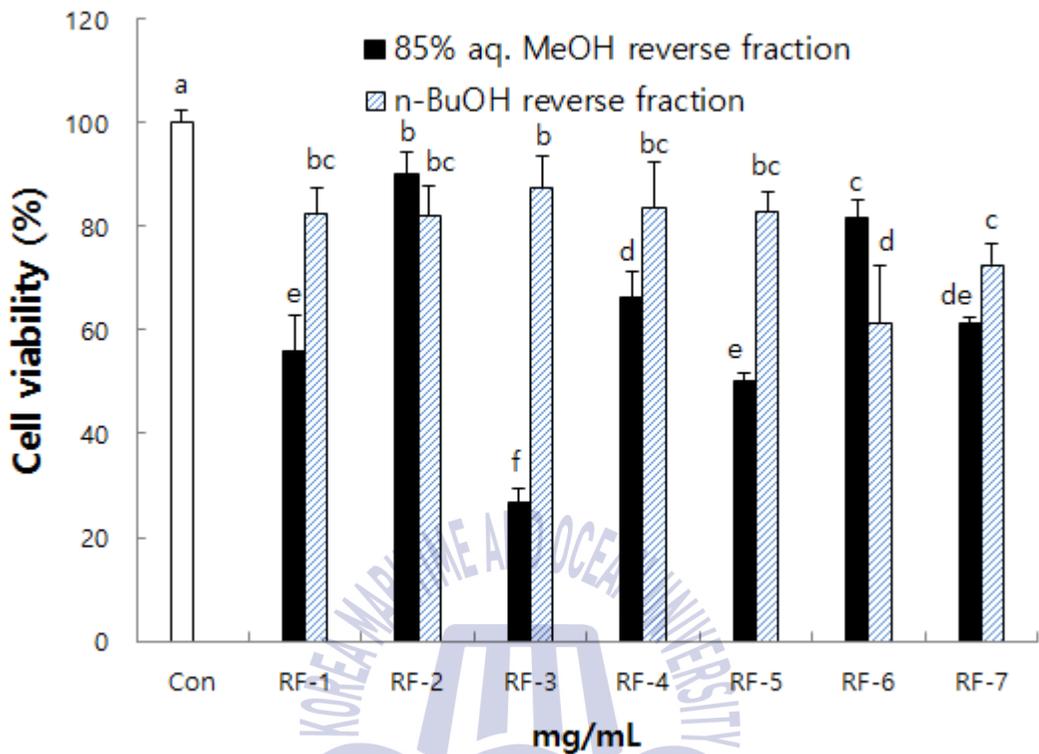


Fig. 26. Inhibitory effect of 85% aq. MeOH and *n*-BuOH reverse fractions (0.1 mg/mL) from wine by-product on the growth of HT-1080 cell line

^{a-e}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

4.1.2. 포도주 부산물로부터 분리한 화합물의 항산화 효과

① 세포 내 활성산소종(ROS) 생성 억제 효과

Fig. 27 은 포도주 부산물의 항산화 효과가 나타난 85% aq. MeOH 분획물과 *n*-BuOH 분획물에 C₁₈ reverse-phase vacuum flash chromatography 실시하여 각 분획물에 대해 새로운 7 개의 분획물을 얻은 후 세포 내 활성 산소종을 측정 한 결과이다. 두 분획물 모두 120 분이 지남에 따라 세포 내 활성 산소종 억제효과를 나타냈다. 85% aq. MeOH reverse fraction (0.1 mg/mL)에서 RF-1 과 RF-3 이 각각 67.0% 및 67.6%의 활성 산소종 억제효과가 나타났고, *n*-BuOH reverse fraction (0.1 mg/mL)에서 RF-3 과 RF-4 는 각각 72.0% 및 78.7%의 활성 산소종 억제효과가 나타났다.



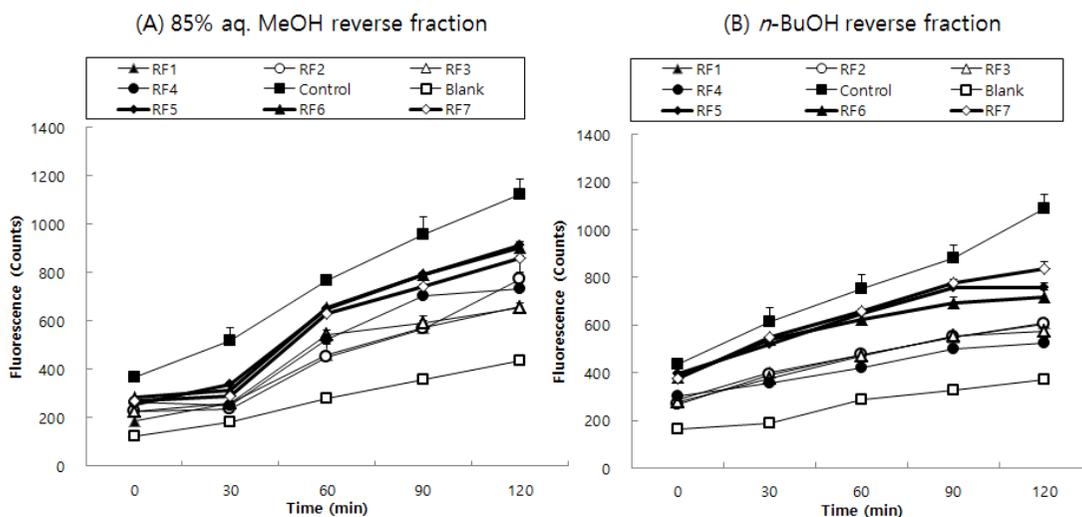
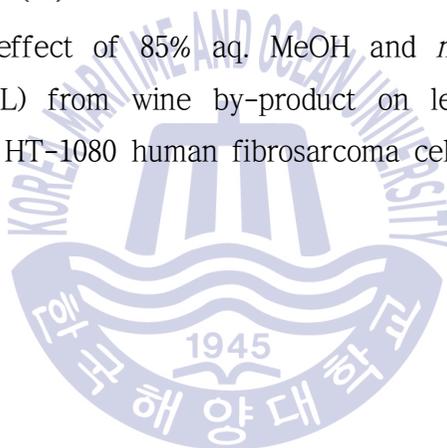


Fig. 27. Inhibitory effect of 85% aq. MeOH and *n*-BuOH reverse fractions (0.1 mg/mL) from wine by-product on levels of reactive oxygen species in HT-1080 human fibrosarcoma cells



② DPPH 라디칼 소거 활성

Table 19는 포도주 부산물의 항산화 효과가 나타난 85% aq. MeOH 분획물과 *n*-BuOH 분획물에 C₁₈ reverse-phase vacuum flash chromatography 실시하여 각 분획물에 대해 새로운 7개의 분획물을 얻은 후 새로 얻은 분획물의 활성산소를 제거할 수 있는 능력인 EDA 값으로 나타내었다. 새롭게 얻은 85% aq. MeOH reverse fraction과 *n*-BuOH reverse fraction을 각각 0.5 mg/mL의 농도에서 control (L-ascorbic acid, BHT)과 비교하였을 때 85% aq. MeOH reverse fraction 중에서 RF-1이 76.4%로 control인 BHT(77.3%)와 유사한 소거능을 나타내었고 *n*-BuOH reverse fraction 중에서 RF-1(80.1%), RF-2(81.3%), RF-3(81.1%), RF-4(83.2%) 그리고 RF-5(71.5%)가 control인 BHT와 유사한 소거능을 나타내었다.



Table 19. DPPH radical scavenging effect of 85% aq. MeOH and *n*-BuOH fractions from wine by-product*

Samples	concentration (0.5 mg/mL)							BHT	L-ascorbic acid
	RF-1	RF-2	RF-3	RF-4	RF-5	RF-6	RF-7		
85% aq. MeOH fraction	76.4±0.1 ^b	74.1±0.2 ^c	148±1.1 ^e	54.9±0.3 ^d	120±0.4 ^f	150±0.6 ^g	13.3±0.5 ^g	77.3±1.3 ^b	95.2±0.4 ^a
<i>n</i> -BuOH fraction	80.1±0.1 ^b	81.3±0.4 ^b	81.1±0.2 ^b	83.2±0.1 ^b	71.5±0.6 ^b	15.0±0.3 ^c	21.1±0.1 ^c		

*Values are expressed as mean±SD and ^{a-f}Means with the different letters are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test



③ ABTS+ 라디칼 소거 활성

ABTS+ 라디칼 소거 활성도 DPPH 와 마찬가지로 포도주 부산물의 항산화 효과가 나타난 85% aq. MeOH 분획물과 *n*-BuOH 분획물에 C₁₈ reverse-phase vacuum flash chromatography 실시하여 각 분획물에 대해 새로운 7 개의 분획물을 얻은 후 전자공여능인 EDA 값을 Table 20 에 나타내었다. 85% aq. MeOH reverse fraction 과 *n*-BuOH reverse fraction 을 각각 0.5 mg/mL 의 농도에서 control (L-ascorbic acid, BHT)과 비교하였을 때 85% aq. MeOH 분획물의 reverse fraction 중 RF-1 에서 91.5%로 가장 높은 라디칼소거활성을 나타냈고 *n*-BuOH RF 가운데 RF-1 이 control 인 BHT(93.6%)와 유사한 92.2%의 라디칼소거활성을 나타내었다.



Table 20. ABTS radical scavenging effect of 85% aq. MeOH and *n*-BuOH fractions from wine by-product*

Samples	concentration (0.5 mg/mL)							BHT	L-ascorbic acid
	RF-1	RF-2	RF-3	RF-4	RF-5	RF-6	RF-7		
85% aq. MeOH fraction	91.5±0.1 ^c	87.6±0.2 ^d	59.5±1.1 ^e	87.6±0.3 ^d	11.2±0.4 ^h	28.6±0.6 ^g	33.2±0.5 ^f	93.6±0.4 ^b	99.7±0.1 ^a
<i>n</i> -BuOH fraction	92.2±0.1 ^{bc}	70.6±2.4 ^d	90.2±0.7 ^c	65.5±1.2 ^e	32.4±0.4 ^f	2.3±0.3 ^g	3.2±0.4 ^g		

*Values are expressed as mean±SD and ^{a-f}Means with the different letters are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.



④ Glutathione (GSH) 생성 상승 효과

포도주 부산물의 항산화 효과가 나타난 85% aq. MeOH 분획물과 *n*-BuOH 분획물에 C₁₈ reverse-phase vacuum flash chromatography 실시하여 각 분획물에 대해 새로운 7 개의 분획물을 얻은 reverse fraction 이 세포내의 glutathione 생성 효과를 알아보는 실험을 한 결과이다. 실험은 0.5 mg/mL의 농도에서 실시하였으며 Fig. 28 는 85% aq. MeOH reverse fraction 에 대한 실험 결과로 7 개의 모든 85% aq. MeOH 분획물의 RF 에서 control 과 비교하여 유의적 차이가 나타났고($p < 0.05$), Fig. 29 에서는 *n*-BuOH reverse fraction 에 대한 실험 결과로 RF-1, RF-3, RF-5, RF-6 그리고 RF-7 에서 control 과 비교해 유의적 차이가 나타났다($p < 0.05$).



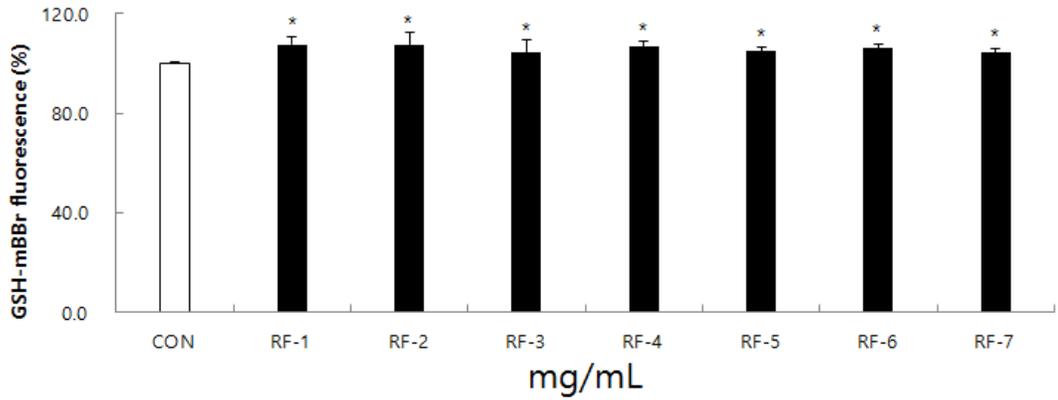
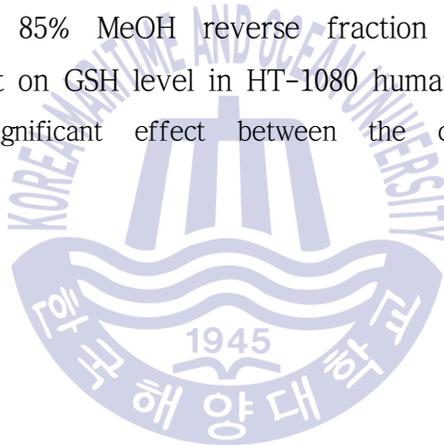


Fig. 28. Effect of 85% MeOH reverse fraction (0.5 mg/mL) from wine by-product on GSH level in HT-1080 human fibrosarcoma cells
 * $p < 0.05$, significant effect between the control and each reverse fractions



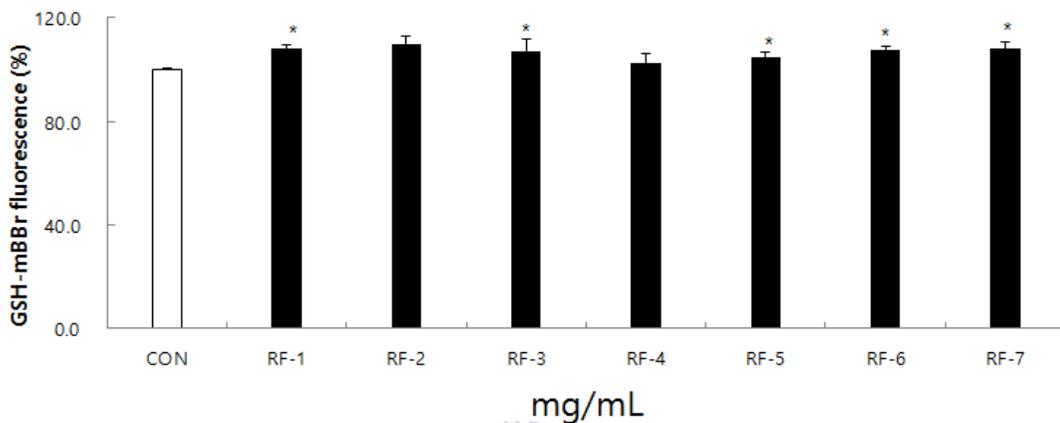
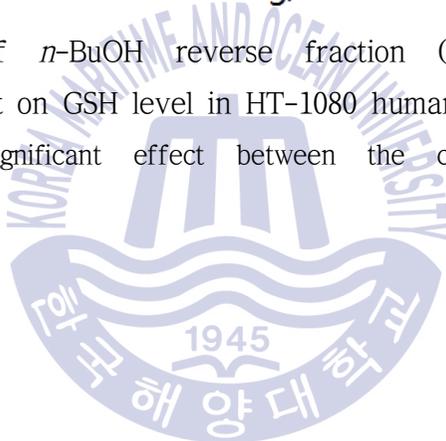


Fig. 29. Effect of *n*-BuOH reverse fraction (0.5 mg/mL) from wine by-product on GSH level in HT-1080 human fibrosarcoma cells
 $*p < 0.05$, significant effect between the control and each reverse fractions



4.1.3. 포도주 부산물로부터 분리한 화합물의 항염증 효과

① 세포 내 nitric oxide (NO) 생성 억제효과

포도주 부산물의 항염증 효과가 나타난 85% aq. MeOH 분획물과 *n*-BuOH 분획물을 자세히 분석해보기 위해 C₁₈ reverse-phase vacuum flash chromatography 실시하여 각 분획물에 대해 새로운 7개의 분획물을 얻었다. 이렇게 새로 얻은 reverse fraction 을 NO 생성에 미치는 효과를 알아보았다. 85% aq. MeOH reverse fraction 에 대한 실험 결과로 모든 RF에서 control 과 비교하였을 때 유의적 차이가 나타났으며($p < 0.05$), 특히 RF-1, RF-2, RF-3 그리고 RF-4가 각각 약 40%의 NO 생성 저해효과가 나타났고(Fig. 30) *n*-BuOH reverse fraction 에 대한 실험 결과로 모든 RF에서 control 과 비교하였을 때 유의적 차이가 나타났으며($p < 0.05$) 특히 RF-1, RF-3, RF-4, RF-5 그리고 RF-6에서 각각 약 40%의 NO 생성 저해효과가 나타났다(Fig. 31).

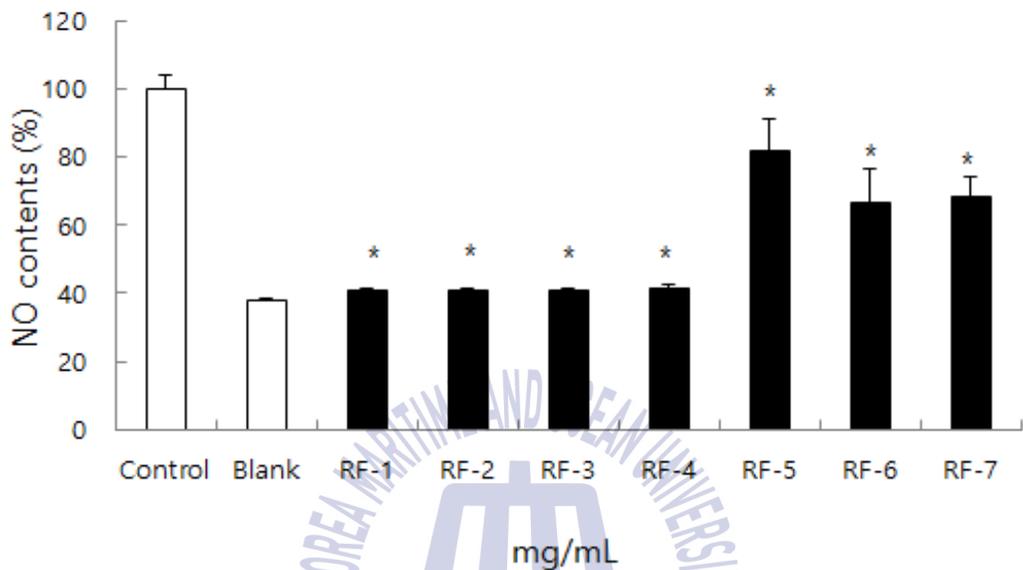


Fig. 30. Effect of 85% aq. MeOH reverse fraction (1 mg/mL) from wine by-product on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells

* $p < 0.05$, significant effect between the control and each reverse fractions

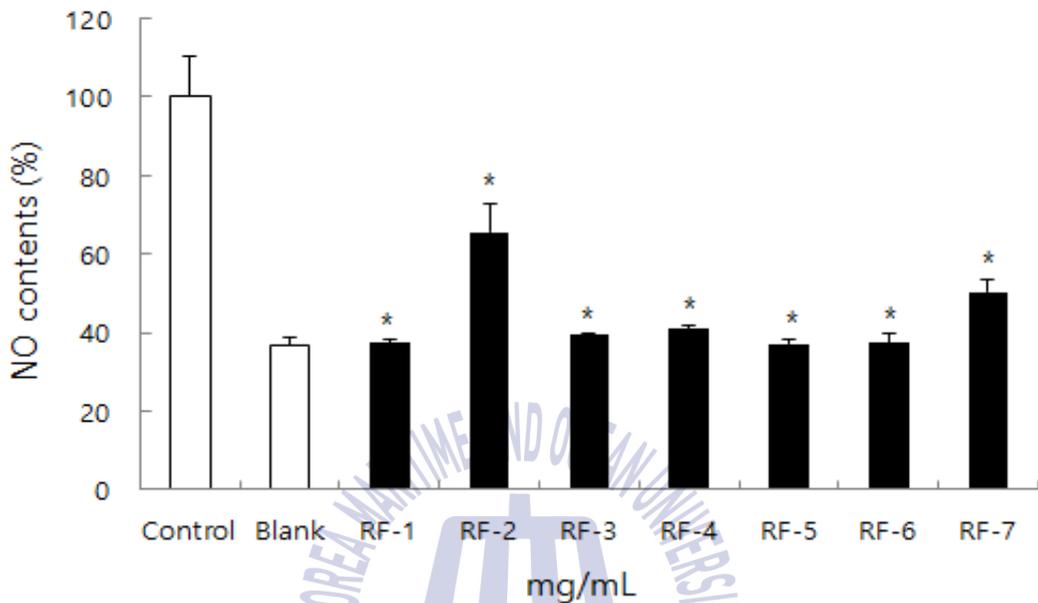


Fig. 31. Effect of *n*-BuOH reverse fraction (1 mg/mL) from wine by-product on production of nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells

* $p < 0.05$, significant effect between the control and each reverse fractions

제 4 장 요약 및 결론

본 연구에서는 국내에서 가장 많이 소비되고 있으며 매년 수 천톤 발생하는 campbell early종(*Vitis. labrusca*) 포도주부산물을 이용하여 제 2의 부가가치를 찾기 위해 포도주 부산물을 이용하여 각기 다른 용매를 이용해 추출 및 분획하여 총 플라보노이드, 총 페놀함량 및 지방산 조성을 분석하였고 포도주 부산물의 항암, 항산화 그리고 항염증 효과에 대해 연구하였다.

포도주 부산물이 가지고 있는 성분 가운데 항암 그리고 항산화에 효과가 있는 총 플라보노이드와 페놀 함량을 측정하였다. 플라보노이드의 경우 A+M과 MeOH 추출물에서 각각 26.4 mg/g과 56.1 mg/g으로 MeOH 추출물의 플라보노이드 함량이 많았으며 85% aq. MeOH 분획물에서 105.1 mg/g, *n*-BuOH 분획물에서 65.3 mg/g으로 높은 플라보노이드 함량을 나타내었다. 페놀의 경우 A+M과 MeOH 추출물에서 각각 0.4mg/g과 4.4 mg/g으로 MeOH 추출물이 많았으며 *n*-BuOH 분획물에서 5.5 mg/g, 85% aq. MeOH 분획물에서 3.6 mg/g 순으로 페놀 함량을 나타내었다.

포도주 부산물의 지방산 분석을 한 결과 n-6계 지방산 linoleic acid (18:2n-6)가 47.8%로 가장 높은 함량을 나타내었고 그 외 불포화 지방산인 oleic acid가 5.98%, linolenic acid 3.3%의 함량을 가진 것으로 나타났다.

포도주 부산물을 A+M과 MeOH로 추출하여 인체 유래 암세포인 HT-29, AGS 그리고 HT-1080 암세포에 대한 증식 억제효과를 측정한 결과 IC₅₀ 값이 A+M 추출물에서는 각각 0.34, 0.40 그리고 0.27 mg/mL로 나타났고 MeOH 추출물에서는 0.30, 0.53 그리고 0.28 mg/mL로 나타났다($p < 0.05$). 각 추출물을 이용해 *n*-Hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH 그리고 Water로 분획을 실시한 후 동일 인체 유래 암세포의 증식 억제를 확인해 본 결과 *n*-Hexane 분획물에서는 각 세포별 IC₅₀ 값이 0.32, 0.44 그리고 0.33 mg/mL이고 85% aq. MeOH 분획물 경

우, 0.01, 0.33 그리고 0.12 mg/mL이고 *n*-BuOH 분획물의 경우, 0.61, 0.49 그리고 0.35 mg/mL, Water 분획물의 경우, 0.42, 0.49 그리고 0.44 mg/mL로 나타났다($p < 0.05$). 이상 모든 암세포에서 85% aq. MeOH 분획물이 가장 낮은 IC₅₀ 값을 나타내었기에 암세포 증식 억제 효과가 가장 우수함을 확인하였다.

항산화 효과를 알아보기 위해서 가장먼저 HT-1080세포를 이용하여 각 추출 및 분획물을 0.05 와 0.1 mg/mL의 농도에서 세포 내 생성되는 활성산소종 (ROS) 억제 효과를 본 결과 측정한 120분 시간 동안 내내 활성산소종 저해효과를 나타냈으며 A+M 추출물과 MeOH 추출물을 비교한 결과 MeOH 추출물이 상대적으로 높은 활성산소종 저해효과를 나타냈고 0.1 mg/mL의 농도에서 MeOH 추출물이 control과 비교하여 64% 억제효과를 나타내었다. 분획물의 경우 60분 이후 *n*-BuOH > *n*-Hexane > 85% aq. MeOH > Water 분획물 순으로 활성산소종 억제효과를 나타내었고 가장 효과가 좋은 *n*-BuOH 분획물은 0.1 mg/mL의 농도에서 60%의 억제효과를 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거 활성과 ABTS 라디칼 소거 활성의 경우 라디칼 소거 활성 능이 유사하게 나타냈는데 A+M과 MeOH 추출물이 DPPH 와 ABTS 라디칼 소거활성 둘 다 MeOH 추출물이 실험한 모든 농도에서 두 배 이상 차이가 난 것을 확인할 수 있었다. 분획물 가운데 *n*-BuOH 분획물의 경우 합성 항산화제인 BHT 보다 실험한 모든 농도에서 DPPH와 ABTS 라디칼 소거활성능과 유사한 라디칼 소거활성능을 가진 것이 나타났다($p < 0.05$).

HT-1080세포에서 추출한 DNA를 이용하여 DNA 산화 억제효과를 알아본 결과 A+M과 MeOH 추출물의 경우 각각 92% 및 93%의 DNA 산화 억제 효과를 나타내었고 분획물의 경우 85% aq. MeOH와 *n*-BuOH 분획물에서 각각 96.5%와 96.8 %의 매우 높은 DNA 산화 억제 효과가 나타났다($p < 0.05$). 또한 같은 세포를 이용하여 GSH 생성을 측정한 결과 A+M 과 MeOH 추출물에서 control과 비교했을 때 실험한 0.1, 0.25, 0.5 그리고 1 mg/mL 농도에서 유의적으로 증가하는 것이 나타났다($p < 0.05$). 분획물의 경우 *n*-Hexane 분획물만 1 mg/mL의 농도에서만 유의적으로 증가했으며 85% aq. MeOH, *n*-BuOH 그리고 Water 분획물에서는 모든 농도에서 GSH 생성이 유의적으로 증가한다고 나타났다($p < 0.05$).

세포 내 항염증 효과를 알아보기 위한 NO 실험에서는 LPS를 처리한 control군과 A+M과 MeOH 추출물을 비교한 결과 각각 52.3% 및 50.1%로 NO 생성 억제 효과를 나타냈으며 *n*-BuOH 분획물에서 61.3%, Water 분획물에서 57.2%, 85% aq. MeOH 분획물에서 53.4%로 높은 NO 억제 효과를 나타내었다. 사이토카인 생성 실험에서는 pro-inflammatory 사이토카인인 IL-2는 LPS 자극제와 85% aq. MeOH (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 함께 처리했을 때 48시간 배양에서 44.4%로 IL-2 생성량이 유의적으로 감소하였고 Con A 자극제와 85% aq. MeOH (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 함께 처리했을 때 6시간 배양에서 IL-2 생성량이 63.6%로 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.05$). IL-6는 LPS 자극제와 85% aq. MeOH (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 함께 처리했을 때 24시간 배양에서 IL-6 생성량이 30.3%로 감소하였다 ($p < 0.05$). IL-12/IL-20(p40)는 LPS 자극제와 85% aq. MeOH (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 함께 처리했을 때 72시간 배양에서 IL-12/IL-20(p40) 생성량이 41.4%로 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.05$). Anti-inflammatory 사이토카인인 IL-4는 Con A 자극제와 85% aq. MeOH (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 함께 처리했을 때 6 및 24시간 배양에서 IL-4 생성량이 각각 77.7% 및 44.4%로 유의적으로 증가하였다 ($p < 0.05$). IFN- γ 는 Con A 자극제와 85% aq. MeOH (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 함께 처리했을 때 24시간 배양에서 IFN- γ 생성량이 23.5%로 유의적으로 증가하였다 ($p < 0.05$).

이상의 결과로부터 사용한 포도주 부산물은 항암효과, 항산화효과 그리고 항염증 효과가 우수한 것으로 확인할 수 있었고 그중 특히 항암 및 항산화 활성이 높았던 85% aq. MeOH와 *n*-BuOH 분획물을 이용하여 분리 및 정제와 같은 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

참 고 문 헌

Alkhalaf, M., 2007. Resveratrol-induced apoptosis is associated with activation of p53 and inhibition of protein translation in T47D human breast cancer cells. *Pharmacol.*, 80, pp.134-143.

Brannen, A.L., 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy toluene and butylated hydroxy anisole. *J. Am. Oilchem Soc.*, 52, pp.59-63.

Brito, P., Almeida, L.M. and Dinis, T.C., 2002. The interaction of resveratrol with ferrimyoglobin and peroxyntirite; protection against LDL oxidation. *Free Radical Res.*, 36, pp.621-631.

Bulkley, G.B., 1983. The role of oxygen free radicals in humandisease processes. *Surgery*, 94, pp.407-411.

Chan, K.M., Decker, E.A. and Means, W.J., 1993. Extraction and activity of carnosine, a naturally occurring antioxidant in brrf muscle. *J. Food Sci.*, 58, pp.1-4.

Chae, S.K., Kang, G.S., Ma, S.J., Bang, K.W., Oh, M.M. and Oh, S.H., 2002. *Standard food analysis*. Jigu Publishing: Paju, Korea., pp.381-382.

Chen, H.H., Muranmoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K. and Nokihara. K., 1995. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragment found in the digests of a soybean protein. *J. Agri. Food Chem.*, 46, pp.49-53.

Cho, M.L., Heo, Y.J., Park, M.K., Oh, H.J., Park, J.S., Woo, Y.J., Ju,J.W.,

Park, S.W., Kim, H.Y. and Min, J.K. 2009. Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) attenuated collagen-induced arthritis. *Immunol. Letters*, 124, pp102-110.

Choi, S.K., Zhang, X.H and Seo, J.S., 2012. Suppression of oxidative stress by grape seed supplementation in rats. *Nutr. Res. Pract.*, 6, pp.3-8

Coona, G., Deiana, M., Incani, A, Vauzour, D., Dessi, M.A. and Spencer, J.P. 2007. Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 362, pp.606-611.

Denizot F. and Lang R., 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol Methods.*, 89, pp.271-277.

Derlindati, E., Dall'Asta, M., Ardigò, D., Brighenti, F., Zavaroni, I., Crozier, A. and Del Rio, D., 2012. Quercetin-3-O-glucuronide affects the gene expression profile of M1 and M2 human macrophages exhibiting anti-inflammatory effects. *Food Funct.*, 3, pp.1144-1152.

Devasagayam, T.P.A., Subramanian, M., Singh, B.B., Ramanathan, R., Das, N.P., 1995. Protection of plasmid pBR322 DNA by flavonoids against single strand breaks induced by singlet molecular oxygen. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 30, pp.97-103.

Dickinson, D.A. and Forman, H.J., 2002. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem. Pharmacol.*, 64, pp.1019-1026.

Droge, W., 2001. Free radicals in the physiological control of cell function.

Physicol Rev. 82, pp.47-95.

Flamini, R., 2003. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. *Part I: Polyphenols. Mass Spectrometry Rev.*, 22, pp.218-250.

Flamini, R., Martivi F., De Rosso, M., Arapitsas, P. and Bavaresco L., 2013. Advanced knowledge of three important classes grape phenolics: Anthocyanins, stilbenes, and flavonols. *Inter, J, Mol, Sci.*, 14, pp.19651-19669.

Flolin, O. and Denis, W., 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.*, 12, pp.239-249.

Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G.H., 1957. A Simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, pp.497-509.

Francis, F.J., 1992. A new group of food colorants. *Trends Food Sci. Technol.* 3, pp.27-30.

Glezer, I., Simard, A.R. and Rivest, S., 2007. Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience*, 147, pp.867-883.

Gomez-Alonso, S., Collins, V.J., Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G, and Spencer, J.P.E., 2012. Inhibition of colon adnocaarcinoma cell proliferation by flavonols is linked to G2/M cell cycle block and reduction in cyclin D1 expression. *Food Chem.*, 130, pp.493-500.

Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J. and Aruoma, O.I., 1995. The characterization of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.*, 33, pp.601-617.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1984. Oxygen toxicology, oxygen radicals, transition metals and disease. *J. Biochem.*, 219, pp.1-4.

Heo, J.C., Woo, S.U., Kweon, M.A., Kim, B.B. and Lee, S.H., 2007. Analysis of immunomodulating activities in methanol extracts from several kinds of grapes. *Korean J. Food Preserv.*, 14, pp.419-424.

Ho, L., Ferruzzi, M.G., Janle, E.M., Wang, J., Gong, B., Chen, T.Y., Lobo, J., Cooper, B., Wu, Q.L., Talcott, S.T., Percival, S.S., Simon, J.E. and Pasinetti, G.M., 2013. Identification of brain-targeted bioactive dietary quercetin-3-O-glucuronide as a novel intervention for Alzheimer's disease. *FASEB J.*, 27, pp.769-781.

Hogan, S., Canning, C., Sun, S., Sun, X. and Zhou, K., 2010. Effects of grape pomace antioxidant extract on oxidative stress and inflammation in diet induced obese mice. *J. Agric. Food Chem.*, 58, pp.11250-11256.

Hwang, I.W., Lee, H.R., Kim, S.K., Zheng, H.Z., Choi, J.U., Lee, S.H., Lee, S.H. and Chung, S.K., 2008. Proanthocyanidin content and antioxidant characteristics of grape seeds. *Korean J. Food Preserv.*, 15, pp.859-863.

Hwang, S.A., Dasgupta, A. and Actor, J.K., 2004. Cytokine production by non-adherent mouse splenocyte cultures to *Echinacea* extracts. *Clin Chim Acta.* 343, pp.161-166.

Imai, J., Ide, N., Nagae, S., Moriguchi, T., Matsuura, H. and Itakura, Y., 1994. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Plant. Med.*, 60, pp.417-420.

Ito, N., Fukushima, S. and Hasebawa, A., 1983. Carcinogenicity of BHA in F344 rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, 70, pp.343-352.

Jara-Palacios, M., Hernanz, D., Escudero-Gilete, M.L. and Heredia, F.J., 2014. Antioxidant potential of white grape pomaces: Phenolic composition and antioxidant capacity measured by spectrophotometric and cyclic voltammetry methods. *Food Res. Inter.* 66, pp.150-157.

Jara-Palacios M.J., Hernanz, D., Cifuentes-Gomez, T., Escudero-Gilete, M.L., Heredia F. J. and Spencer J.P.E. 2015. Assessment of white grape pomace from winemaking as source of bioactive compounds, and its antiproliferative activity. *Food Chem.*, 183, pp.78-82.

Jason, M.G., Patricia, T. and Lyndon, L.L., 2007. Anticancer effects of four varieties of muscadine grape. *J. Med. Food*, 10, pp.54-59.

Kampa, M., Hatzogiou, A., Notas, G., Damianaki, A., Bakogeorgou E., Gemetzi, C., Kouroumalis, E., Martin, O.M. and Castanas, E., 2000. Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines., *Nutr. Cancer*, 37, pp.223-233

Kim, E.J., Choi, J.Y., Yu, M.R., Kim, M.Y., Lee, S.H. and Lee, B.H., 2012. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Korean J. Food Sci., Technol.* 44, pp.337-342.

Kim, H., Song, J.Y., Song, H.S., Park, K.U., Mun, K.C. and Ha, E., 2011. Grape seed proanthocyanidin extract inhibits interleukin-17-induced interleukin-6 production via MAPK pathway in human pulmonary epithelial cells. *Naunyn-Schmied Arch. Pharmacol.* 383, pp.555-562.

Kim, H.W., Chu, S.M. and Lee, D.J., 2006. Determination of resveratrol content in grapes and wines. *Korean J. Crop. Sci.*, 51, pp.259-263.

Kim, K.H., Kim, S.H. and Park, K.Y., 2001. Effects of kimchi extracts on production of nitric oxide by activated macrophages, transforming growth factor-beta 1 of tumor cells and interleukin-6 in splenocytes. *J. Food Sci.*, 6, pp.126-132.

Kong, C.S., Bak, S.S., Jung, K.O., Kil, J.H., Lim, S.Y. and Park, K.Y., 2005. Antimutagenic and anticancer effects of salted mackerel with various kinds of salts. *J. Kor. Fish. Soc.*, 38, pp.281-285.

Kremer, J.M., Lawrence, D.A., Jubiz, W., di Giacomo, R., Rynes, R., Bartholomew, K.E. and Sherman, M. 1990. Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. Clinical and immunologic effects. *Arthritis Rheum.* 33, pp.810-820

Kreutzberg, G.W., 1996. Microglia: a sensor for pathologicalevents in the CNS. *Trends Neurosci.*, 19, pp.312-318.

Lazze, M.C., Pizzala, R., Pecharroman, F.J.G., Garnica, P.G., Rodriguez, J.M.A., Fabris, N. and Bianchi, L., 2009. Grape waste extract obtained by supercritical fluid extraction contains bioactive antioxidant molecules and induces antiproliferative effects in human colon adenocarcinoma cells. *J. Med. Food* 12, pp.561-568.

LeBel, C.P., Ischiropoulos, H. and Bondy, S.C., 1992. Evaluation of the probe 2', 7'-Dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.*, 5, pp.227-231.

Lee, E.J. and Kwon, J.H., 2006. Characteristics of microwave-assisted extraction for grape seed components with different solvents. *Korean J. Food Preserv.*, 13, pp.216-222.

Lee, J.H. and Lee, S.R., 1994. Analysis of phenolic substances content in Korean plant foods. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 26, pp.310-316.

Lee, J.K. and Kim, J.S., 2006. Study on the deacidification of wine made from Campbell Early. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 38, pp.408-413.

Linos, A., Kaklamanris, E., Kontomerkos, A., Koumantaki, Y., Gazi, S., Vaiopoulos, G., Tsokos, G.C. and Kaklamanis, P. 1991. The effect of olive oil and fish consumption on rheumatoid arthritis—a case control study. *Scand. J. Rheumatol.* 20, pp.419-426

Macrae, R.G., Robinson, R.K. and Sadler, M.J., 1993. *Encyclopedia of food science, food technology and nutrition*. pp.607-171, 1st ed., Academic Press: Waltham, MA., USA.

Maier, T., Schiever, A., Kammerer, D.R. and Carle, R., 2009. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chem.* 112, pp.551-559.

Mehnaz Pervin, Md. Abul Hasnat, Yoon Mi Lee, Da Hye Kim, Jeong E. J. and Beong O.L., 2014. Antioxidant Activity and Acetylcholinesterase Inhibition of Grape Skin Anthocyanin (GSA). *Molecules*, 19, pp.9403-9418

Milne, L., Nicotera, P., Orrenius, S. and Burkitt, M.. 1993. Effects of glutathione and chelating agents on copper-mediated DNA oxidation : pro-oxidant and antioxidant properties of glutathione. *Arch. Biochem.*

Biophys., 304, pp.102-109.

Minghetti, L. and Levi, G., 1998. Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog. Neurobiol.* 54, pp.99-125.

Ministry of agriculture, food and rural affairs: Korea, 2014. *Agriculture, food and rural affairs statistics yearbook.* pp.117.

Morrison, W.R. and Smith, L.M., 1957. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.*, 5, pp.600-608.

Mukherjee, S., Das, S.K. and Vasudevan, D.N., 2012. Dietary grapes (*Vitis vinifera*) feeding attenuates ethanol-induced oxidative stress in blood and modulated immune functions in mice. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 49, pp.379-385.

Musallam, L., Ethier, C., Haddad, P.S., Denizeau, F. and Bilodeau, M., 2002. Resistance to Fas-induced apoptosis in hepatocytes: role of GSH depletion by cell isolation and culture. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 283, pp.709-718.

Noroozi, M., Angerson, W.J. and Lean, M.E.J., 1998. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative damage to human lymphocytes. *Am. J. Clin. Nutr.*, 67, pp.1210-1218.

Osuchowski, M.F., Welch, K., Siddiqui, J. and Remick, D.G., 2006. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J. Immunol.*, 117,

pp.1967-1974.

Park, S.J., Lee, H.Y. and Oh, D.H., 2003. Free radical scavenging effect of seed and skin extracts from campbell early grape (*vitis labruscana* B.). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 32, pp.115-118.

Poot, M., Verkerk, A., Koster, J.F., Jongkind, J.F. E.e. novo, 1986. synthesis of glutathione in human fibroblasts during in vitro ageing and in some metabli diseases as measured by a flow cytomertric method. *Biochim Biophys Acta.*, 883, pp.580-584.

Puertollano, M. A., Pertollano, E., Ruiz-Bravo, A., Jimenez-Valera, M., de Pablo, N. A. and Alvarez de Cienfuegos, G. 2004. Change in the immune functions and susceptibility to *Listeria Monocytogenes* infection in mice fed dietary lipids. *Immunol. Cell Biol.*, 82, pp.370-376

Qureshi, A.F., Guan, X.Q., Reis, J.C., Papasian, C.J., Jabre, S., Norrison, D.C. and Qureshi, N. 2012., Inhibition of nitric oxide and inflammatory cytokines in LPS-stimulated murine macrophages by resveratrol, a potent protezsome inhibitor, *Lipids in Health Disease* 11:76
<http://www.lipidworld.com/contents/11/1/76>.

Radi, R., Brckman, J.S., Bush, K.M. and Freeman, B.A., 1991. Peroxynitrite oxidation of suldhdryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *j. Biol. Chem.*, 266, pp.4244-4250.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Tang, M. and Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applyinh an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 26, pp.1231-1237.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2, pp.152-159.

Sales C., Oliviero, F. and Spinella, P. 2009. The Mediterranean diet model in inflammatory rheumatic diseases. *Reumatismo.* 61, pp.10-14

Salem, N., Reyzer, M. and Karanian J., 1996. Losses of arachidonic acid in rat liver after alcohol inhalation. *Lipids.*, 31, pp.153-156.

Saunders, C. 2009. The anti-proliferative effect of different tomato varieties on the human colon adenocarcinoma cells, *Bio. Sci. Horizons*, 2, pp.172-179.

Scarlatti, F., Sala, G., Somenzi, G., Signorelli, P., Sacchi, N. and Ghidomi, R., 2003. Resveratrol induces growth inhibition and apoptosis in metastatic breast cancer cells via de novo ceramide signaling. *FASEB J.*, 17, pp.2339-2341.

Schroeder, C.P., Godwin, A.K., O'Dwyer, P.J., Tew, K.D., Hamilton, T.C. and Ozols, R.F., 1996. Glutathione and drug resistance. *Cancer Invest.*, 14, pp.158-168.

Sohn, E.S. and Sohn, E.H., 2011. A study on the R&D trend and patent analysis of treatments for degenerative brain diseases. *J. Korea Acad. Industr. Coop. Soc.*, 12, pp.4411-4417.

Stojanovic, S., Sprinz, H. and Brede, O., 2001. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 391, pp.79-89.

Terra, x., Valls, j., Vitrac, X., Merrillon, J.M., Arola, L., Ardevol, A., Blade, C., Fernandez-Larrea, J., Pujadas, G., Salvado, J. and Blay, M. 2007. Grape-seed Procyanidins act as anti-inflammatory agents in endotoxin-stimulated Raw 264.7 macrophages by inhibiting NFkB signaling pathway. *J. Agric. Food Chem.* 55, pp.4357-4365

Tizard, I.R., 1986. An introduction inflammation. Saunders College Publishing:NY, USA., pp.423-441

Tournour, H.H., Segundo, M.A., Magalhaes, L.M. and Barreiros, L., 2015. Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties. *Industrial Crops. Products*, 74, pp.397-406.

Tremblay, M. È., Stevens, B., Sierra, A., Wake, H., Bessis, A. and Nimmerjahn, A., 2011. The role of microglia in the healthy brain. *J. Neurosci.*, 31, pp.16064-16069.

Tsuchiya, M., Suematsu, M. and Suzuki, H., 1994. In Vivo visualization of oxygen radical-dependent photoemission. *Methods Enzymol.*, 233, pp.128-140.

Trinchieri, G., 1995. Interleukin-12: a pro-inflammatory cytokine with immuno-regulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 13, pp.251-276.

Um, M.Y. and Kim, M.K., 2002. Effect of grape intakes on lipid metabolism of rats during aging. *Korean J. Nutr.*, 35, pp.713-728.

Vergara-Salinas, J.R., Vergara, M., Altamirano, C., Gonzalez, A. and

Perez-Correa, J.R., 2015. Characterization of pressurized hot Water extracts of grape pomace: Chemical and biological antioxidant activity. *Food Chem.*, 171, pp.62-69.

Wang, S., Mateos, R., Goya, L., Amigo-Benavent, M., Sarria, B. and Bravo, L. 2016. A phenolic extract from grape by-products and its main hydroxybenzoic acids protect Caco-2 cells against pro-oxidant induced toxicity. *Food Chem. Toxicol.* 88, pp.65-74.

Wardhana, E. and Dauau, S.E.A. 2011. The role of omega-3 fatty acids contained in olive oil on chronic inflammation. *Acta. Med. Indones-Indones J. Intern. Med.* 43, pp.138-143

Yan, Q., Zhang, J., Liu, H., Babu-Khan, S., Vassar, R., Biere, A.L., Citron, M. and Landreth, G., 2003. Anti-inflammatory drug therapy alters β -amyloid processing and deposition in an animal model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.*, 23, pp.7504-7509.

Yook, C., Seo, M.H., Lee, J.W., Kim, Y.H. and Lee, K.Y., 2008. Quality properties of wines fermented with domestic new different grapes. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 40, pp.633-642.

Zhu, F., Du, B., Zheng, L. and Li, J., 2015. Advanced on the bioactivity and potential applications of dietary fibre from grape pomace. *Food Chem.*, 186, pp.207-212.

감사의 글

이 논문을 완성되기까지 많은 아낌없는 가르침과 조언해 주신 임선영 교수님께 먼저 깊은 감사의 말씀을 드리고 싶습니다. 그리고 연구를 위해 멀리서도 조언과 도움을 주신 장주리 선배님과 항상 옆에서 도와주신 김호준 선배님께도 깊은 감사의 인사 전하고 싶습니다.

실험실 생활하면서 의논을 많이 했던 형주누나, 실험에 대해 많은 지원을 주신 황성연 선배님께도 감사의 인사 전하고 싶습니다. 그리고 학부생 시절부터 실험실생활까지 오랜시간동안 함께 동고동락한 정우, 말하지 않아도 알아서 잘하는 재현이, 주영이 그리고 실험실 분위기를 화기애애하게 만들어준 은이에게도 고맙단 말을 전하고 싶습니다. 더불어 같은 시기에 석사생활을 하면서 시작과 끝을 함께하는 은신이와 희정이에게도 그 동안 고마웠고 수고했다라고 전해주고 싶습니다. 비록 짧은 시간이었지만 즐거운 대화 상대였던 재민이, 준세 그리고 민주에게도 소소한 고마움을 전합니다.

마지막으로 지금까지 항상 지원하고 응원해주신 가족에게 감사의 인사 꼭 전하고 싶습니다.

