Korean Journal Of Food Preservation Vol. 9. No. 3, pp.338~344 (2002) 한국식품저장유통학회지

거봉 포도종의 에탄올 추출물 및 분획물에 대한 생리활성 효능

박성진 · 박부길 · 이현용 · 오덕환
강원대학교 바이오산업공학부

Biological Activities of Ethanol Extracts and Fractions of Black Olympia Grape (*Vitis labruscana* L.)

Sung-Jin Park, Boo-Kil Park, Hyeon-Yong Lee and Deog Hwan Oh
School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, ChunChon, 200-701, Korea

Abstract

This study was conducted to determine biological activities, such as lipid peroxidation inhibition and cytotoxic effect of ethanol extracts of Black Olympia grape seeds and skins, and of organic solvent fractionated ethanol extracts obtained from grape seeds and skins at different temperatures. Among different extraction temperatures, the ethanol extract of grape seed obtained at 30℃ had the strongest lipid oxidation inhibition of 60.1%, while the strongest lipid oxidation inhibitory effect of 71.2% was observed in the presence of 20 μg/mL ethylacetate fraction obtained from ethanol extract of grape seeds at 30℃. The ethanol extract of grape seeds showed more strong lipid oxidation inhibition than that of skin extracts. Similar results were observed in cytotoxic effects. The ethanol extract of grape seeds at 30℃ exhibited more strong cytotoxicity than that of skin extracts on MCF-7, Hep3B, and A549 cell lines. Among organic solvent fractions extracted from the ethanol extracts of grape seeds and skins, the hexane fraction showed the strongest cytotoxic inhibition of 75.15% and 62.50% on MCF-7 and Hep3B cell in the presence of 1.0 mg/mL respectively. On the other hand, the water fraction showed the strongest cytotoxic inhibition of 65.41% on A549 cell in the presence of 1.0 mg/mL. Overall, the ethanol extracts and their fractions of Black Olympia grape seeds showed strong lipid oxidation inhibition and cytotoxicity than those of grape skins.

Key words : Black Olympia grape seed and skin, lipid peroxidation inhibition, cytotoxicity

서 론

최근 건강에 대한 지대한 관심과 함께 각 종 건강 기능성 식품과 원료에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 원인들로 소득 증가와 함께 식생활 등의 생활 환경의 변화와 공업화에 의한 환경오염들을 들 수 있으며 결국 이러한 환경 변화와 오염으로 인한 질병들은 과거와는 다른 양상을 나타내어 현대인들에게 건강에 대한 다양한 요구 사항을 만들게 하였다. 그에 따라 많은 연구자들이 약용 및 식용 작물들이 발현하는 다양한 생리활성에 대한 연구를 진행하였다. 이러한 천연물 중에서 강력한 생리활성을 발현하는 물질들로는 식물계에 널리 분포하면서 2차 대사 산물 중의 하나로서 다양한 구조와 분자량을 가지며 식물체에 특수한 색깔을 부여하고 미생물의 공격을 막아 식물 자체를 보호하는 동시에 떫은 맛, 쓴맛과 같은 식물성 식품의 고유한 맛에 관여하는 폴리페놀 화합물이 생체 내에서 암발생을 억제하고 산화 방지 효과가 아주 우수한 것으로 알려져 있다(1-3).

최근 포도(*Vitis vinifera*)에 함유되어 있는 페놀성 화합물의 천연항산화제로서 가치에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다. 특히 (+)-catechin, (-)-epicatechin, procyanidin, viniferin 및 resveratrol 등의 polyphenol 물질들이 포도의 주요 생리활성 물질로 알려져 있으며, 포도 과피와 종자 추출물의 oral tumor cell에 대한 선택적 세포 독성(4), proanthocyanidin의 free radical 소거능(5), 포도 종자로부터 분리한 polyphenolic fraction의 antitumor 촉진 활성(6), 그리고 resveratrol의 암세포 성장 억제(7) 등의 생리활성 포도 종자로부터 폴리페놀 화합물을 추출(8)하기 위한 연구가 진행되었다. 가장 오랫동안 식용된 과일 중의 하나인 포도는 음료 및 주류 가공 등의 원료로 많이 이용되고 있으며, 그 중 종자는 전체 중량의 3~5%를 차지하며 (+)-catechin 등의 폴리페놀 화합물이 풍부하게 존재하는데 전체 polyphenol 존재 비율을 살펴보면 과육에는 2~5%, 과피에는 25~50%, 그리고 종자에는 50~70%가 존재하고 있으나, 이러한 기능성 페놀성 물질이 다량 함유되어 있는 종자와 과피는 거의 버려지는 실정이다.

Corresponding author : School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, ChunChon, 200-701, Korea
E-mail : deoghwa@kangwon.ac.kr

따라서 본 연구에서는 부산물을 이용한 자원 활용을 위한 거봉종 포도 종자와 과피의 에탄올 추출물과 분획물들의 지질과산화 억제 효과와 암세포들에 대한 세포 독성을 살펴봄으로서 포도 거봉종의 생리활성을 탐색하고자 한다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용된 포도 거봉종의 종자와 과피는 춘천 지역의 포도 재배 농가에서 재배된 것으로 각 부위별로 나누어 건조하고 분쇄한 후 수직으로 환류냉각관을 부착시킨 flask와 water bath를 이용하여 분말시료에 시료중량의 10배량의 ethanol를 가하여 온도별(78℃, 50℃, 30℃)로 12시간동안 2회 반복 추출한 후 감압 여과 장치로 여과하고 rotary vacuum evaporator (EYELA N-N-SERIES, Japan)를 사용하여 농축하고 이를 동결 건조하였다. 또한 ethanol 추출물은 hexane, 증류수와 1:10:9의 비율로 혼합하여 추출 분획한 후 rotatory vacuum evaporator로 농축하여 hexane 분획물을 얻은 후 수층 분획은 분획여두에서 다시 chloroform, ethylacetate 및 butanol로 체계적으로 용매 분획하여 chloroform 분획물, ethyl acetate 분획물, butanol 분획물 및 물 분획물을 얻어 농축하고 이를 동결건조하였다.

지질 과산화 측정

간장 조직의 지질과산화는 thiobarbituric acid reacting substance(TBARS)방법(9)을 이용하여 측정하였다. 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)와 시료에 homogenate 100 μL, 1.7 mM ADP 20 μL, 0.1 mM $FeCl_3$ 20 μL를 가한 후 0.1 mM NADPH 100 μL를 첨가하여 37℃ shaking water bath에서 60분간 지질 과산화를 유도하였다. 다시 20 mM EDTA 100 μL를 가해 반응을 정지시킨 후 thiobarbituric acid(TBA)-trichloroacetic acid(TCA)-HCl(2% Butylated hydroxytoluene 포함)용액 2ml를 가하여 95℃에서 10분간 끓인 다음 3000×g에서 10분간 원심분리하여 상등액의 흡광도를 535 nm에서 spectrophotometer (UVIKON 922, Kontron Co., Japan)를 사용하여 측정한 후 시료를 첨가하지 않은 대조구와 농도별 지질과산화를 비교하였다.

세포주 및 배양

본 실험에 사용된 세포주는 암세포로 인간 폐암 세포 A549(lung carcinoma, human), 인간 유방암 세포 MCF-7(breast adenocarcinoma, human), 인간 간암 세포 Hep3B(human hepatocellular carcinoma)를 이용하였고, 정상세포로는 293 (transformedprimary human embryonal kidney)을 사용하였다. A549, MCF-7은 RPMI1640 복합배지를, Hep3B는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)를, 293은 MEM(Minimum Essential Medium)를 이용하여 10% fetal bovine serum을 첨가하여 37℃, 5% CO_2 incubator에서 적응시켜 배양하였다.

세포독성 측정

세포독성 측정은 SulfoRhodamine B(SRB) 분석을 이용하였으며, SRB 방법은 세포 단백질 염색을 이용하여 세포 생육정도를 측정하는 방법(10)으로 10% fetal bovine serum과 각 암세포(A549, MCF-7, Hep3B)와 정상세포(293)를 함유하는 RPMI1640, DMEM, MEM 배지를 5×10^4 cells/mL 농도로 100 μL씩 각 well에 분주하여 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양한 후, 시료를 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mg/mL 농도로 50 μL씩 첨가하여 48시간 동안 다시 배양하였다. 미리 냉장 저장된 10%(v/v) Trichloroacetic acid를 100 μL씩 첨가한 후 1시간 동안 4℃에서 방치한 후 증류수로 5회 세척하였다. 건조한 다음 1%(v/v) acetic acid에 녹인 0.4%(w/v) SRB 용액을 100$\mu\ell$씩 첨가해 30분간 염색시킨 후 1%(v/v) acetic acid로 5회 세척하여 건조하였다. 건조된 plate에 10 mM tris buffer 100 μL를 첨가하여 540 nm에서 Microplate reader(UVT 05975, Molecular Devices, USA)를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

지질 과산화 억제 효과

간장 조직의 지질 과산화물을 측정하여 포도 종자 및 과피 에탄올 추출물과 유기 용매별 분획물의 지질과산화 억제 효과를 시료를 첨가하지 않은 대조구와 비교하였다. Fig. 1은 각 추출 온도에 따른 포도 종자 및 과피 에탄올 추출물의 지질과산화물을 비교한 것이다. 종자 및 과피 에탄올 추출물 모두, 추출온도에 의한 지질과산화물의 영향은 없는 것으로 나타났으며 농도 의존적으로 지질과산화물이 감소하였다. 전반적으로, 종자 에탄올 추출물이 과피 에탄올 추출물보다 지질과산화물의 감소에 더 효과적인 것으로 나타났다. Fig. 2는 종자 및 과피 에탄올 추출물들의 유기 용매별 분획물에 대한 지질 과산화물을 비교한 것이다. 종자 및 과피 유기 용매별 분획물 역시 농도 의존적으로 지질 과산화물이 감소하였으며, 종자 에탄올 추출물의 분획물이 과피 에탄올 추출물의 분획물보다 전반적으로 지질과산화물 감소 효과가 더 좋은 것으로 나타났다. 분획물 중에서는 종자 에탄올추출물로 분획한 ethyl acetate 분획물이 20 μg/mL의 농도에서 71.2%로 가장 높은 지질과산화물 감소를 보였다.

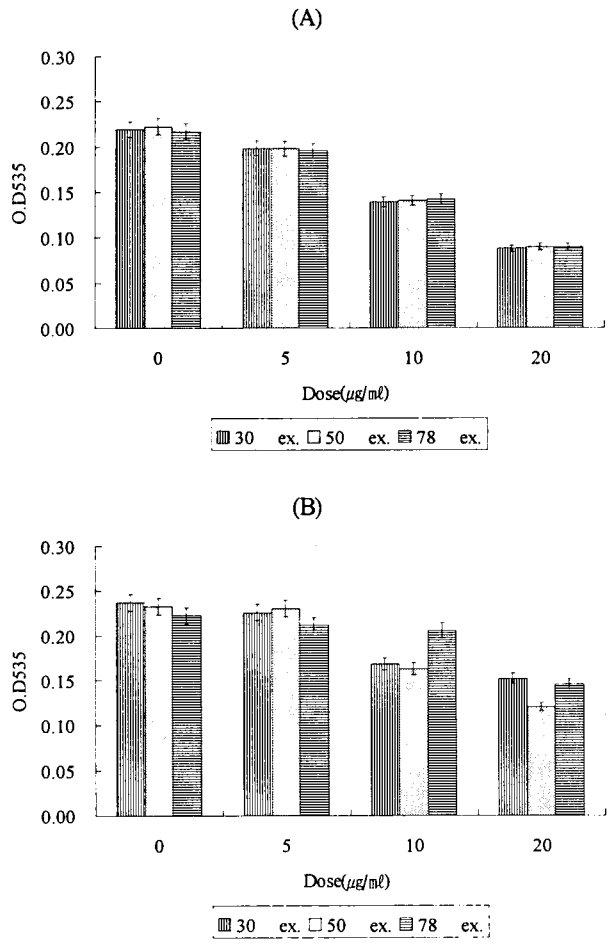


Fig. 1. Effect of ethanol extracts of grape seed(A) and skin(B) on lipid peroxidation at various extraction temperatures.

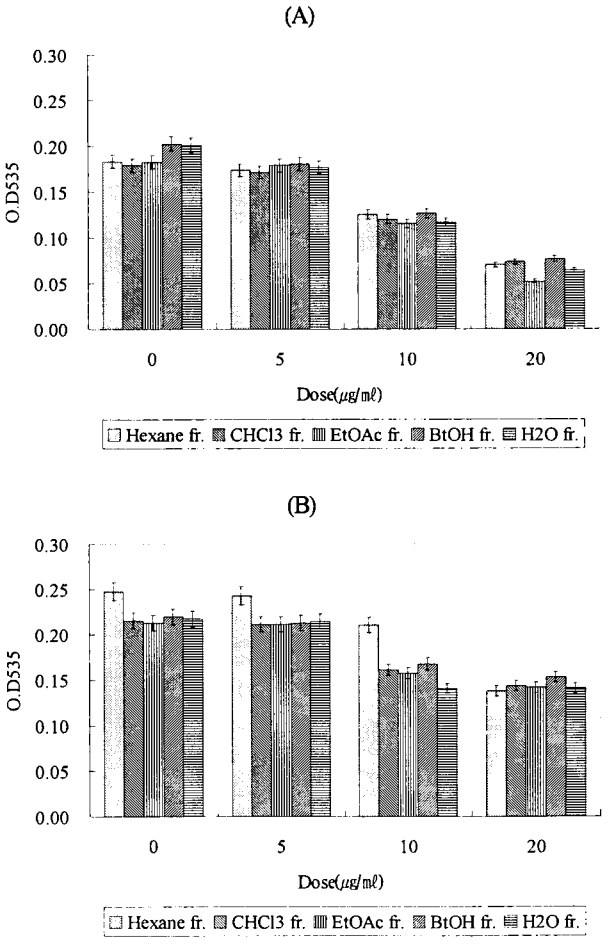


Fig. 2. Effect of organic solvent fractions from ethanol extracts of grape seed(A) and skin(B) on lipid peroxidation.

이러한 결과는 조 등(9)이 250 μg/mL의 농도에서 표준 물질로 사용한 L-ascorbic acid가 33.90%의 지질과산화물 감소를 나타냈다는 보고와 비교할 때 종자 및 과피 에탄올 추출물의 지질과산화물 감소효과가 더 높은 것으로 나타났다. 현재, 미국이나 일본에서는 포도종자 추출액을 이용하여 이미 기능성식품으로 상품화 하고 있다. 지질과산화물의 억제 및 조절은 결국, 노화와 관련된 여러 질병의 예방적 차원으로서 중요성을 고려할 때 국내에서도 그냥 버려지고 있는 포도종자와 과피를 이용하여 부산물의 효능성을 높이는 것은 물론 기능성 식품의소재로서 개발에 박차를 가하여야할 것으로 사료된다.

Cytotoxicity 측정

본 연구에서는 각 시료의 농도를 0, 0.25, 0.50, 0.75 및 1.00 mg/mL로 조절하여 각 암세포에 대한 성장 저해 효과와 정상 세포에 대한 독성을 확인하였다. Fig. 3과 4는 유방암 세포(MCF-7)에 대한 결과이다. 종자 에탄올 추출물 경우, 30℃에서 추출한 추출물(1.00 mg/mL)이 77.45%, 과피 에탄올 추출물 경우, 78℃에서 추출한 추출물(1.00 mg/mL)이 75%로 가장 강한 생육 억제 활성을 보였다. 유방암 세포에 대한 독성은 종자 에탄올 추출물과 과피 에탄올 추출물간에 유의적인 차이는 보이지 않았으나, 정상 세포에 대한 selectivity는 종자 에탄올 추출물이 높게 나타났다. 종자 및 과피 에탄올 추출물의 유기 용매별 분획물에 대한 생육 억제 활성에서, 종자 분획물에서는 hexane 분획물(1.00 mg/mL)이 75.15%, 과피 분획물에서는 ethyl acetate 분획물(1.00 mg/mL)이 74.55%로 생육을 억제하였고, 종자 에탄올 추출물의 hexane 분획물은 1.48~4.50, 과피 에탄올 추출물의 ethyl acetate 분획물은 1.97~4.32로 정상 세포에 대한 높은 selectivity를 나타내었다. Fig. 5와 6은 간암 세포(Hep3B)에 대한 결과이다. 종자 에탄올 추출물에서는 30℃에서 추출한 추출물(1.00 mg/mL)이 63.24%로, 과피 에탄올 추출물에서는 78℃에서 추출한 추출물(1.00 mg/mL)이 67.65%로 가장 높은 생육 억제 활성을 보였다. 정상 세포에 대한 selectivity는 종자 에탄올 추출물이 과피 에탄올 추출물보다 다소 높게 나타났다. 종자 및 과피 에탄올 추출물의 유기 용매별 분획물에 대한 생육 억제 활성에서, 종자 분획물과 과피 분획물 모두에서는 hexane 분획물(1.00 mg/mL)이 62.50%와 61.54%로 가장 높은 생육

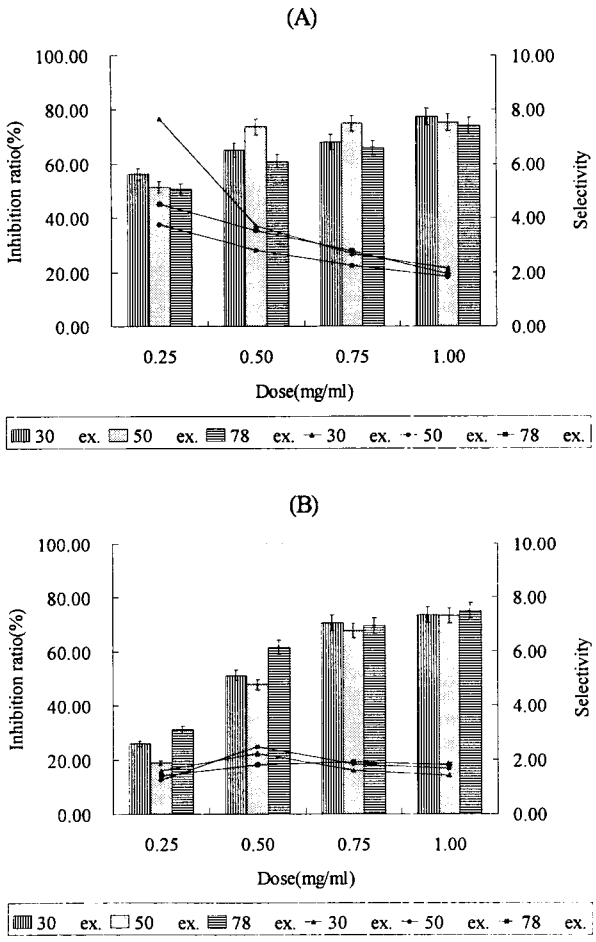


Fig. 3. Inhibitory effect of ethanol extracts of grape seed(A) and skin(B) on the the growth of MCF-7(bar %) cell.

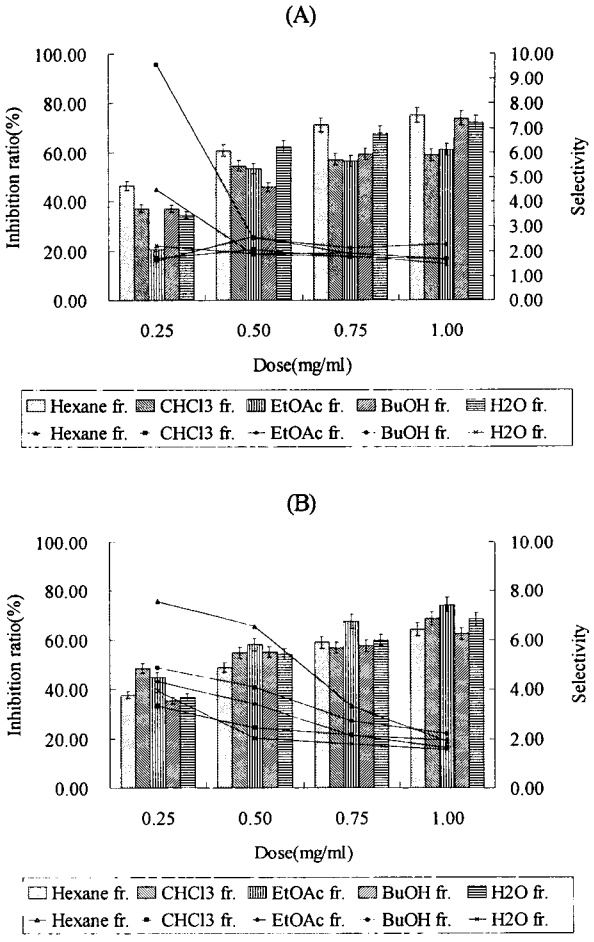


Fig. 4. Inhibitory effect of organic solvent fractions from ethanol extracts of grape seed(A) and skin(B) on the the growth of MCF-7(bar %) cell.

억제를 보였으며, 정상 세포에 대한 selectivity는 종자 에탄올 hexane 분획물은 1.23~1.63으로 낮은 값을, 과피 에탄올 추출물은 1.78~6.49으로 높은 값을 나타내었다. Fig. 7과 8은 폐암 세포(A549)에 대한 결과이다. 종자 및 과피 에탄올 추출물 모두에서는 30℃에서 추출한 추출물(1.00 mg/mL)이 67.96%와 67.68%로 가장 높은 생육 억제 활성을 보였으며, 생육 억제 활성은 종자 에탄올 추출물과 과피 에탄올 추출물간의 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 정상 세포에 대한 selectivity는 종자 에탄올 추출물이 과피 에탄올 추출물보다 높게 나타났다. 종자 및 과피 에탄올 추출물의 유기 용매별 분획물에 대한 생육 억제 활성에서, 종자 분획물에서는 hexane 분획물(1.00 mg/mL)이 63.98%, 과피 분획물에서는 water 분획물(1.00 mg/mL)이 65.41%의 생육을 억제하였고, 종자 에탄올 추출물의 hexane 분획물은 1.26~1.98, 과피 에탄올 추출물의 물 분획물은 1.18~1.71의 정상 세포에 대한 selectivity를 나타내었다.

Shirataki 등(4)은 종자 methanol 추출물이 과피 methanol 추출물보다 여러종류의 암세포에서 더 높은 생육 억제 효과를 나타내었으나, 본 연구에서는 간암 세포(Hep3B)에서만 종자 에탄올 추출물이 과피 에탄올 추출물보다 높은 생육 억제 효과를 보였고, 나머지 유방암 세포(MCF-7)와 폐암 세포(A549)에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 추출 조건에서는 30℃에서 추출한 추출물이 다른 온도 조건의 추출물보다 높은 생육 억제 효과를 나타내었는데, 암세포들에 대한 생육 억제 효과를 나타내는 물질이 열에 민감하여 추출 온도 조건이 증가할수록 영향을 받는 것으로 사료된다. 또한 정상 세포에 대한 selectivity가 추출물의 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 나타내는 것은 추출물의 농도가 증가할수록 정상 세포에 대한 영향이 증가하는 것으로 이에 따른 추가적인 연구가 필요하다. 그리고 종자 및 과피 에탄올 추출물이 각 유기 용매별 분획물보다 다소 높은 생육 억제 효과를 나타내었는데, 이는 각 분획물들의 여러 생육 억제 물질들이 함께 암세포의 생육에 영향을 준 것으로 사료된다. 또한 Carnesecchi 등(11)은 cocoa 추출물이 인간의 결장암 세포인 Caco-2 cell에 대하여 50㎍/㎖의 농도에서 70%의 생육을 억제하였으며, 이는 코코아 추출물이 포도 종자와 마찬가지로 폴리페놀 화합물을 다량 함유하고 있기 때문인 것으

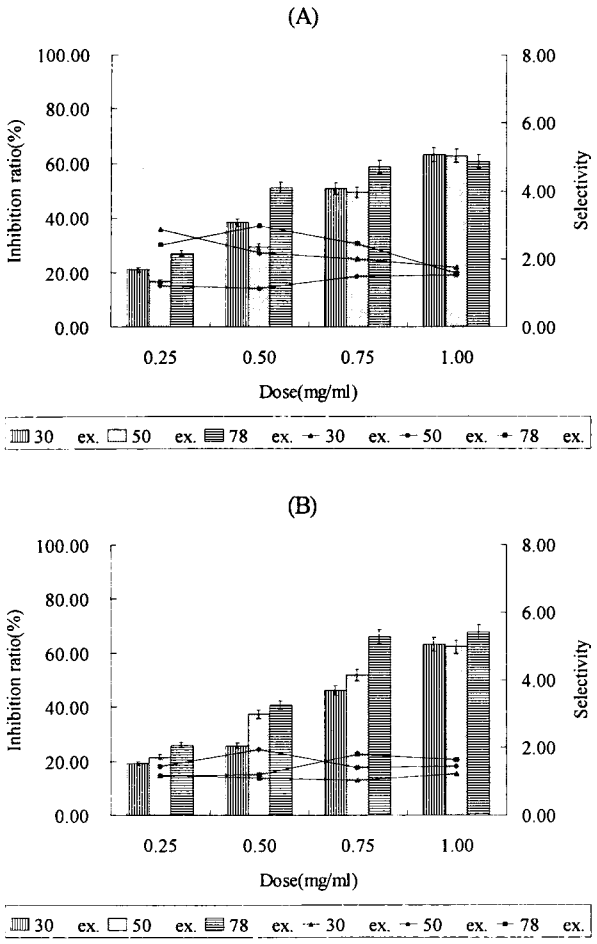


Fig. 5. Inhibitory effect of ethanol extracts of grape seed(A) and skin(B) on the the growth of Hep3B(bar %) cell.

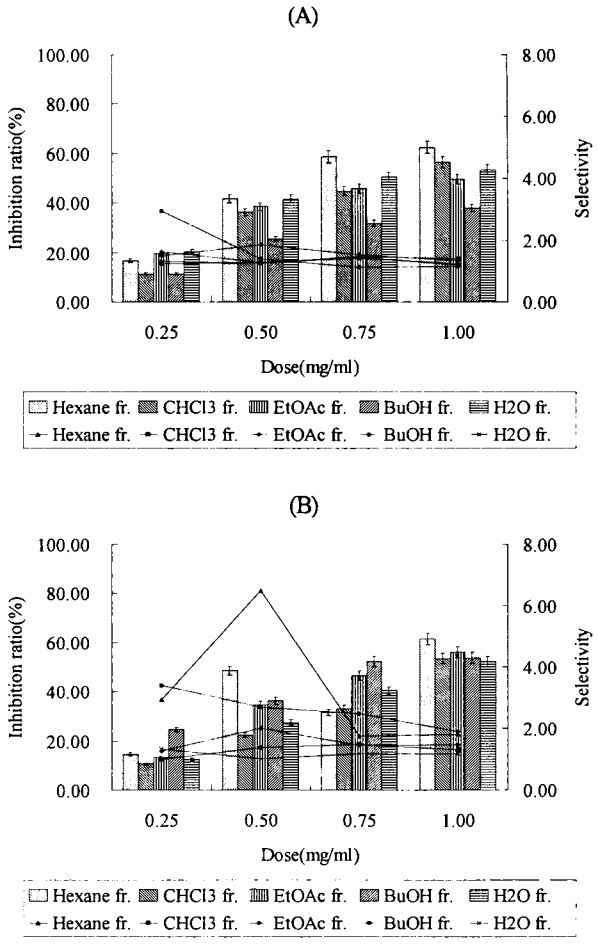
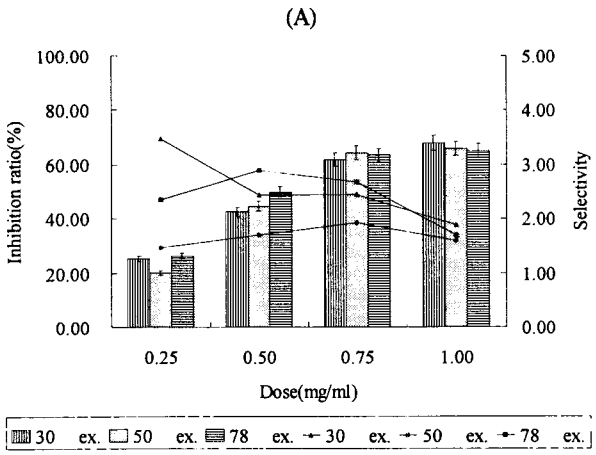


Fig. 6. Inhibitory effect of organic solvent fractions from ethanol extracts of grape seed(A) and skin(B) on the the growth of Hep3B(bar %) cell.

로 보고하였다. 또한, SingletarySingletary 등(12)은 포도 종자의 proanthocyanidin이 결장암과 유방암 세포에 대하여 생육 억제 효과를 나타냈다고 보고하였다. 현재, 본 연구팀은 포도 품종별 종자 및 과피 추출물에 대한 생리활성을 비교하고 있으며 높은 생리활성을 나차내는 폴리페놀화합물을 분리 정제 중에 있다.

요 약

본 연구는 포도 거봉종의 종자와 과피 추출물의 지질과산화 억제 효과와 암세포들에 대한 세포 독성을 살펴보았다. 추출 온도를 달리하여 추출한 종자와 과피의 에탄올 추출물과 추출물에 대한 분획물들을 이용하여 지질과산화물의 억제효과를 측정한 결과, 종자 및 과피 에탄올 추출물 모두 온도변화에 따른 영향은 없는 것으로 나타났으며, 추출물의 농도가 증가할수록 지질과산화물의 감소효과가 증가하였다. 종자 추출물의 경우, 30℃에서 추출한 에탄올추출물이 20 μg/mL농도에서 60.1%, 분획물 중에서는 ethyl acetate 분획물이 71.2%의 지질과산화를 억제하였다. 과피 에탄올 추출물의 경우, 50℃에서 추출한 추출물이 20 μg/mL 농도에서 48.1%, 분획물 중에서는 hexane 분획물이 44.4%의 지질과산화를 각각 억제하였다. 암세포 생육 억제 효과에서는 모든 암세포(MCF-7, Hep3B 및 A549)에서 포도 종자 및 과피 에탄올 추출물 및 분획물들이 1.00 mg/ML 농도에서 대부분 50% 이상의 생육 억제율을 보였으며, 암세포에 대한 생육 억제와 정상 세포에 대한 selectivity에서는 종자 에탄올 추출물과 과피 에탄올 추출물간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 본 연구 결과, 거봉포도종자 및 과피의 에탄올 추출물들과 각 분획물은 지질과산화 억제 효과와 암세포들에 세포 독성이 캠벨종의 포도종자 및 과피에 비하여 낮은 활성을 나타내었다.



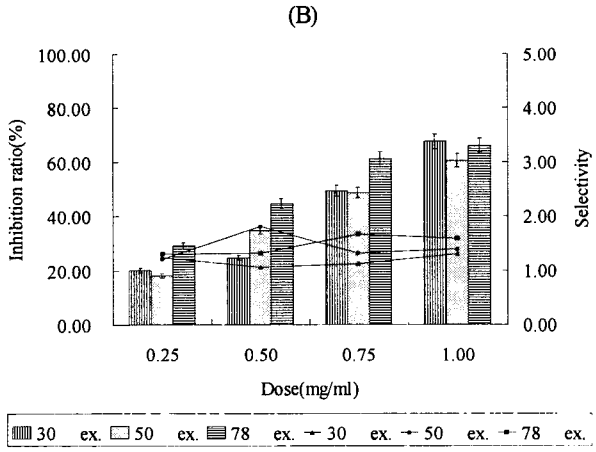
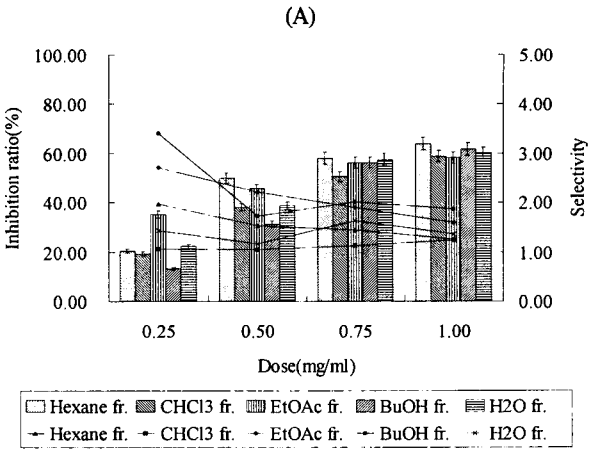


Fig. 7. Inhibitory effect of ethanol extracts of grape seed(A) and skin(B) on the the growth of A549(bar %) cell.



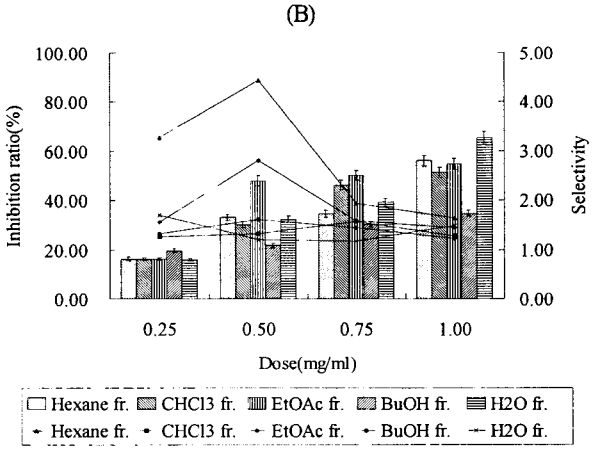


Fig. 8. Inhibitory effect of organic solvent fractions from ethanol extracts of grape seed(A) and skin(B) on the the growth of A549(bar %) cell.

감사의 글

본 연구는 과기처의 지역개발용역사업[강원도 농산자원의 고부가가치 창출을 위한 핵심기술 개발, 과제번호 0101029-1-1(2001213)]의 지원으로 수행된 것으로 이에 심심한 사의를 표합니다.

참고문헌

1. Blavo, L. (1998) Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. Nutr. Rev. 56, 317-333
2. Lee, J.H. and Lee, S.R. (1994) Some physiological activity of phenolic substances in plant foods. Korean J. Food Sci. Technol. 26, 317-323
3. Manzocco, L., Anese, M., and Nicoli, M.C. (1998) Antioxidant properties of tea extracts as affected by processing. Lebensm.-Wiss. U. Technol. 31, 694-698
4. Shirataki, Y., Kawase, M., Saito, S., Kurihara, T., Tanaka, W., Satoh, K., Sakagami, H., and Motohashi, N. (2000) Selective cytotoxic activity of grape peel and seed extracts against oral tumor cell lines. Anticancer Res. 20, 423-426
5. Bagchi, D., Garg, A., Krohn, R.L., Bagchi, M., Tran, M.X., ad n Stohs, S.J. (1997) Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol. 95, 179-189
6. Zhao, J., Wang, J., Chen, Y., and Agarwal, R. (1999) Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent. Carcinogenesis 20, 1737-1745
7. Piver, B., Berthou, F., Dreano, Y., and Lucas, D. (2001)

Inhibition of CYP3A, CYP1A and CYP2E1 activities by resveratrol and other non volatile red wine components. Toxicology Letters 125, 83-91

8. Palma, M., and Taylor, L.T. (1999) Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. J. Chromatogr. A. 849, 117-124
9. Cho, S.Y., Han, Y.B. and Shin, K.H. (2001) Screening for antioxidant activity of edible plants. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 30, 133-137
10. Kim S.K., Kim Y.G., Lee M.K., Han J.S., Lee J.H., and Lee H.Y. (2000) Comparison of biological activity according to extracting solvents of four Acanthopanax root Bark. J. Medicinal Crop Sci. 8, 21-28
11. Carnesecchi, S., Schneider, Y., Lazarus, A.S., Coehlo, D., Gosse, F., and Raul, F. (2002) Flavanols and procyanidins of cocoa and chocolate inhibit growth and polyamine biosynthesis of human colonic cancer cells. Cancer Letters 175, 147-155
12. Singletary, K.W., and Meline, B. (2001) Effect of grape seed proanthocyanidins on colon aberrant crypts and breast tumors in a rat dual-organ tumor model. Nutr. Cancer. 39, 252-258
13. Bagchi, D., Garg, A., Krohn, R.L., Bagchi, M., Bagchi, D.J., Balmoori, J., and Stohs, S.J. (1998) Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. Gen. Pharmacol. 30, 771-776
14. Ye, X., Krohn, R.L., Liu, W., Joshi, S.S., Kuszynski, C.A., McGinn, T.R., Bagchi, M., Preuss, H.G., Stohs, S.J., and Bagchi, D. (1999) The cytotoxic effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells. Mol. Cell Biochem. 196, 99-108

(접수 2002년 5월 30일)