

## 포도박이 고지방식을 섭취한 흰쥐의 체내 지질대사와 간조직의 형태학적 변화에 미치는 영향

장선화 · 최수경 · 서정숙<sup>†</sup>  
영남대학교 식품영양학과

### Effect of Dietary Grape Pomace on Lipid Metabolism and Hepatic Morphology in Rats Fed a High Fat Diet

Xian-Hua Zhang, Soo-Kyong Choi, and Jung-Sook Seo<sup>†</sup>

Dept. of Food and Nutrition, Yeungnam University, Gyeongbuk 712-749, Korea

#### Abstract

The present study was conducted to investigate the effect of dietary grape pomace on lipid metabolism and hepatic morphology of rats fed a high fat diet. The high fat diet contained additional 15% lard to AIN 93-based diet. Male Sprague-Dawley rats were fed experimental diets containing 5% grape pomace for 4 weeks. Serum activities of glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic-pyruvic transaminase (GPT) were not changed by high fat and grape pomace feeding. Serum concentration of triglyceride in rats fed a high fat diet was decreased significantly by dietary grape pomace. Hepatic concentrations of total lipid, total cholesterol and triglyceride were reduced in grape pomace groups with a high fat diet. Fecal concentrations of total cholesterol and triglyceride were increased in grape pomace groups with a high fat diet. The fecal content of coprostanol was not different among the groups. Dietary grape pomace increased the fecal excretion of cholesterol and coprostanone in rats fed a high fat diet. The fecal excretion of bile acid was not affected by feeding grape pomace in rats fed a high fat diet. Light micrographs of liver tissue revealed lipid droplets were increased by a high fat diet, but dietary supplementation of grape pomace tended to alleviate such changes.

**Key words:** grape pomace, high fat diet, lipid metabolism, hepatic morphology

#### 서 론

2008년 한국인 사망원인 통계자료에 의하면(1) 암, 뇌혈관 질환과 심장질환으로 인한 사망자수가 전체 사망자수의 48.1%를 차지한 것으로 조사되었다. 이는 현대인들의 식생활 양식이 서구화되면서 음식으로부터 과잉의 에너지를 섭취하는 반면에 신체 운동량의 부족과 밀접한 연관이 있으며 이러한 만성질환을 예방할 수 있는 생리활성물질과 건강기능성 식품에 대한 관심이 점차 높아지고 있다. 특히 과일과 채소는 폴리페놀 등 생리활성물질을 다량 함유하여 인체의 생리기능을 증진시키는 중요한 식품으로 부각되고 있다(2-4).

포도는 세계적으로 광범위하게 재배되고 있고 세계 과일 생산량의 약 30%를 차지하고 있는 기호도가 높은 과일이다(5). 포도는 무기질이 풍부한 알칼리성 식품으로 피로회복, 피부미용, 이뇨작용에 효과적인 것으로 알려져 있다(6). 포도 중에 함유된 피토케미칼(phytochemicals) 성분이 건강에 유익한 생리활성을 가지는 것으로 인식되면서 소비량이 증가하고 있다(7).

포도는 생산량의 약 80%가 가공되며 포도주스와 포도주를 생산하는 과정에서 많은 양의 포도 폐기물이 발생한다(8). 이러한 포도 폐기물인 포도박은 포도 과피, 씨, 과육, 줄기를 포함하며, 외국에서는 흔히 동물사료, 토양 비료로 사용된다(9). 최근 포도 가공업의 발전과 더불어 포도의 가공형태가 다각적으로 개발되고 있으나 가공품 생산 과정 중에 폐기되는 포도박에 관한 연구는 포도 부위별 생리활성물질에 관한 연구에 비해 아직 미흡한 실정이다.

포도박은 phenolic acids, phenolic alcohol, flavan-3-ols, flavanols, gallic acid, anthocyanins, resveratrol 등 중요한 생리활성물질을 포함한다(10,11). Um과 Kim(12)은 Campbell Early (*Vitis labruscana* Bailey) 중 포도를 전체 포도, 포도박, 포도즙으로 전처리하였을 때 포도 시료 분말 1 g 당 총 플라보노이드, 식이섬유, 비타민 A 및 E 함량은 포도박에서 더 높았다고 보고하였다. 또한 포도박 중의 식이섬유는 소화관의 운동을 촉진하며 체내에서 중성지질, 콜레스테롤, 담즙산의 흡수를 저해시켜(13) 지질과 중성 스테로이드가 변으로 배설되는 것을 촉진하므로 고지혈증, 당뇨병 및 대장암

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: jsseo@ynu.ac.kr  
Phone: 82-53-810-2875, Fax: 82-53-810-4768

등을 예방할 수 있다고 보고되었다(14-16). 포도 중의 생리 활성물질과 식이섬유는 두 가지 중요한 요소로서 관상동맥 질환의 위험 감소에 관여할 수 있다고 보고되었다(17). 따라서 본 연구에서는 한국에서 주로 재배하고 있는 Campbell Early 종의 포도를 이용하여 포도박 분말을 제조하고 고지방 식이와 포도박 식이를 흰쥐에게 동시 급여함으로써 포도박이 흰쥐의 지질대사와 간조직 형태에 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 포도박 시료 준비

본 실험에서는 Campbell Early 종 포도를 구입하여 포도박을 제조하였다. 부패과와 미숙과를 제거한 포도를 낱알로 알알이 따서 식초 물에 한 시간 정도 담가두었다가 다시 흐르는 물로 씻은 다음 물기를 제거하였다. 물기를 제거한 포도를 믹서기로 갈아 포도즙을 짜고 30 mesh의 체를 통과하도록 하였다. 남은 찌꺼기인 포도박을 동결 건조한 다음 40 mesh의 testing sieve를 통과할 수 있도록 분말화 하였다. 동결건조 된 포도박 분말의 수율은 6.1%이었다.

### 실험동물의 사육 및 식이

실험동물은 4주령 된 Sprague-Dawley종(50~60 g) 수컷 흰쥐를 구입(Orientbio, Seongnam, Korea)하여 1주 동안 사육실 환경에 적응시켰다. 평균 체중이 약 90 g이 되는 흰쥐를 정상식이 대조군(C), 정상식이에 포도박을 첨가한 군(CP), 고지방식이 대조군(HF), 고지방식이에 포도박을 첨가한 군(HFP)의 4개 군으로 임의 배치하여 4주간 사육하였다. 사육실의 온도는 18~24°C, 상대습도 50~60%로 유지하였으며 명암은 12시간 주기(8:00~20:00)로 조절하였다.

본 실험에 사용한 실험식은 AIN-93(18) 식이 조성에 준하여 배합하였고 고지방식은 총 열량의 약 40%가 지방으로 공급되도록 15%의 lard를 기본식이에 추가로 첨가하였으며, 포도박 분말은 식이무게의 5% 수준으로 첨가하였다(Table 1). 포도의 생리활성에 관한 대부분의 연구에서는 포도박의 식이 첨가 수준을 2~10%로 설정하였는데(12,19), 만성질환과 flavonoid 섭취에 관한 연구 결과(20-23)를 참조하여 본 연구에서는 5% 수준으로 급여하였다. 조제한 실험식은 4°C에 냉장 보관하면서 식이를 급여하였고, 체중은 일주일에 한 번씩 측정하였다.

### 시료 채취 및 처리

실험동물은 희생하기 4일 전부터 3회에 걸쳐 변을 채취하였다. 이 기간 중 물은 제한 없이 공급하였고 채취한 변은 무게를 측정한 후 -70°C deep freezer(MDF-U53V, Sanyo, Osaka, Japan)에 냉동 보관하였으며 분석하기 전에 변을 동결건조 하여 지질측정에 사용하였다. 혈액은 실험동물을 12시간 절식시킨 후 diethyl ether로 마취시켜 개복한 즉시 복

Table 1. Composition of experimental diets (%)

Ingredient	Group <sup>1)</sup>			
	C	CP	HF	HFP
Grape pomace	—	5	—	5
Casein	20	20	20	20
Lard	—	—	15	15
Corn oil	5	5	5	5
Corn starch	55	50	40	35
Sucrose	10	10	10	10
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
α-Cellulose	5	5	5	5
Mineral mix <sup>2)</sup>	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mix <sup>3)</sup>	1	1	1	1

<sup>1)</sup>C: normal diet, CP: normal diet with grape pomace, HF: high fat diet, HFP: high fat diet with grape pomace.

<sup>2)</sup>Mineral mixture according to AIN-93 (Teklad, USA).

<sup>3)</sup>Vitamin mixture according to AIN-93 (Teklad, USA).

부 하대정맥에서 채취하였다. 실온에서 30분간 방치한 혈액은 3,000 rpm에서 10분간 원심분리(MF-300, Hanil, Incheon, Korea)하여 혈청을 분리하였으며, 일정량씩 나누어 분석하기까지 -70°C deep freezer에 냉동 보관하였다. 간조직은 혈액 채취 후 즉시 1.15% KCl 완충용액으로 관류시켜 적출한 후 여러 번 세척하고 여과지로 수분을 제거하고 액화질소로 급속 냉동시켜 -70°C deep freezer에 냉동 보관하였다가 분석에 사용하였다.

### 생화학적 분석

**혈청 GOT, GPT 활성 측정:** 혈청 중 GOT와 GPT 활성은 측정용 kit(Asan, Hwaseong, Korea)를 사용하여 분석하였다.

**혈청과 간조직 중 지질 함량 측정:** 혈청 중 중성지질, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 함량은 측정용 kit(Asan)를 사용하여 분석하였으며 LDL-콜레스테롤 함량은 Friedewald에 의한 계산법(24)에 의하여 산출하였다.

간조직 중의 총 지질 함량은 Folch와 Mec(25)의 방법에 준하여 정량하였다. 중성지질 함량(26)은 총 지질 중 일부를 isopropanol 2.0 mL로 잘 섞은 혼합액을 시료로 하여 측정하였으며 표준시약으로는 triolein(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 사용하였다. 간조직 중의 총 콜레스테롤과 인지질 함량은 총 지질 중 일부를 glacial acetic acid 3.0 mL로 잘 섞은 혼합액을 시료로 하여 측정하였다. 총 콜레스테롤 함량은 Zlatkis와 Zak(27)의 방법에 준하였고 표준시약으로는 cholesterol (Sigma)을 사용하였다. 인지질 함량은 Eng와 Noble(28)의 방법에 준하여 측정하였고 표준시약으로는 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(Junsei, Tokyo, Japan)를 사용하였다.

**변 중 지질 함량 측정:** 변 중의 총 지질 함량은 Folch와 Mec(25)의 방법으로 측정하였다. 동결 건조된 변 0.5 g을 취한 후 chloroform-methanol(2:1)의 혼합용액 15.0 mL과 증류수 3.0 mL를 첨가하였다. 마쇄한 혼합물은 3,000 rpm에서 20분간 원심분리(Supra 21K, Hanil)하여 얻은 지질층을 농

측시켜 총 지질 함량을 정량하였다. 변 중의 중성지질과 총 콜레스테롤 함량은 총 지질을 메탄올 1.0 mL로 잘 혼합한 용액을 시료로 하였으며 측정용 kit(Asan)로 분석하였다.

**변 중 중성 스테로이드 함량 측정:** 변 중 주요 중성 스테로이드인 cholesterol, coprostanol과 coprostone의 정량은 Crowell과 Macdonald(29)의 방법에 의하여 분석하였다. 동결 건조된 변을 막자사발에 갈아서 0.3 g을 취한 후 internal standard로 1.0 mg/mL의 5 $\alpha$ -cholestane 100  $\mu$ L를 첨가하였다. 여기에 glycerol 100 mL에 KOH를 4.0 g 녹인 용액을 1.0 mL 첨가하여 잘 혼합하고 3시간 동안 autoclave(HVE-50, Hirayama, Kasukabe, Japan)에서 가열시킨 다음 NaCl 용액 1.0 mL, ethyl ether 20.0 mL를 넣고 2회 반복해서 추출하였다. 이 추출액을 rotary evaporator용 flask에 옮겨 감압건조하고(Buchi R-124, Flawil, Switzerland) N<sub>2</sub> gas로 건조시킨 다음 chloroform에 녹인 용액을 gas chromatography(6890N, Agilent, Santa Clara, CA, USA)로 측정하였다. 본 실험에서는 capillary column(HP-5, 30 m $\times$ 0.321 mm $\times$ 0.25  $\mu$ m)과 flame ionization detector를 사용하였으며 280°C에서 30분 holding하여 검출된 중성 스테로이드 크로마토그램의 peak 면적을 internal standard의 peak 면적과 비교하여 계산하였다.

**변 중 담즙산 함량 측정:** 변 중 담즙산 함량은 Crowell과 Macdonald(29)의 방법에 의하여 추출한 후 담즙산 분석용 kit(450-A, Biotech, St. Louis, MO, USA)로 측정하였다. 중성 스테로이드의 추출 단계 중 원심분리 하여 얻어진 물 층에 HCl 0.2 mL를 첨가하여 잘 혼합하여 산성화한 다음 ethyl ether 20.0 mL씩을 사용하여 반복 추출하였다. 그런 다음 rotary evaporator용 flask에 시료를 옮겨 감압건조(Buchi)하고 N<sub>2</sub> gas로 최종적으로 건조시킨 다음 메탄올과 물 혼합액(5:1) 1.0 mL를 넣은 후 희석하여 시료로 사용하였다. 이중 200  $\mu$ L를 취하여 효소시약 500  $\mu$ L와 혼합한 다음 37°C에서 5분간 방치하고 triton X-100 20.0  $\mu$ L를 혼합한 후 530 nm에서 흡광도를 측정(U1700, Hitachi, Tokyo, Japan)하였다.

#### 간조직의 형태학적 관찰

간의 형태학적 관찰은 흰쥐의 개복 즉시 일부분을 적출하여 10% neutral formalin 용액에 고정한 다음 수세, 탈수과정

을 거친 후 xylol/hard paraffin(2:1), xylol/paraffin(1:2) 및 hard paraffin 용액으로 3시간 처리하였다. Paraffin block은 4~5  $\mu$ m 두께로 박절하여 hematoxylin eosin으로 염색하여 광학현미경(BX50, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

#### 자료처리 방법

통계처리는 SPSS 통계 프로그램(version 18.0)을 이용하여 분석하였다. 통계분석은 이원배치 분산분석(two-way analysis of variance)을 실시한 후 Duncan's multiple range test로 실험군 간의 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

#### 흰쥐의 식이섭취량, 체중증가량 및 식이효율

실험기간 동안의 식이섭취량, 체중증가량과 식이효율은 Table 2와 같다. 식이섭취량은 정상식이군(C, CP)에 비하여 고지방식이군(HF, HFP)이 적은 양을 섭취하였는데 이는 고지방 식이가 gastric emptying을 지연시키고 열량 밀도가 높기 때문인 것으로 여겨진다. Yunoki 등(30)의 연구에서도 고지방식이에 의해 식이 섭취량이 유의적으로 감소한 것으로 나타나 본 연구 결과와 같은 경향이였다. 식이효율은 고지방식이군이 정상식이군보다 유의적으로 높았다( $p < 0.05$ ). 실험기간 동안 실험동물의 체중 변화는 모든 실험군 간 유의적인 차이는 없었다.

#### 혈청 GOT와 GPT 활성

간조직 손상의 지표로 이용되는 효소인 GOT와 GPT의 활성은 Fig. 1에 나타내었다. 고지방식이의 급여로 인하여 GOT와 GPT 활성은 HF군에서 가장 높게 나타났고 HF군에 비하여 CP군에서 효소 활성이 감소하였다. 고지방식이나 알코올 등의 섭취로 인하여 지방간이 유발되거나 간 유해물질이 존재할 때 간 실질세포가 손상되어 혈액 속으로 유리되면서 이 효소들의 활성이 높아진다(31). 본 실험에서는 고지방 식이로 효소 활성이 증가되고 포도박 첨가에 따라 두 효소의 활성이 낮아지는 경향을 보였으나 유의적인 차이를 나타내지는 않았다.

Table 2. Effect of dietary supplementation of grape pomace on feed intake, weight gain and feed efficiency ratio in rats fed a normal or high fat diet

Variable	Group <sup>1)</sup>			
	C	CP	HF	HFP
Feed intake (g/day)	21.72 $\pm$ 0.98 <sup>a</sup>	21.72 $\pm$ 1.42 <sup>a</sup>	18.34 $\pm$ 0.88 <sup>b</sup>	17.98 $\pm$ 1.29 <sup>b</sup>
Initial body weight (g)	94.6 $\pm$ 7.13 <sup>NS</sup>	93.3 $\pm$ 3.81	93.9 $\pm$ 4.65	93.2 $\pm$ 4.77
Final body weight (g)	324.4 $\pm$ 28.2 <sup>NS</sup>	324.1 $\pm$ 16.9	334.8 $\pm$ 15.4	314.8 $\pm$ 24.4
Weight gain (g/day)	7.92 $\pm$ 0.51 <sup>NS</sup>	7.96 $\pm$ 0.51	8.31 $\pm$ 0.48	7.63 $\pm$ 0.72
FER <sup>2)</sup>	0.36 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.37 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.45 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.43 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>C: normal diet, CP: normal diet with grape pomace, HF: high fat diet, HFP: high fat diet with grape pomace.

<sup>2)</sup>FER: feed efficiency ratio.

Values are mean $\pm$ standard deviation. Values with the same superscript letter in the row are not significantly different at  $\alpha=0.05$  by Duncan's multiple range test. <sup>NS</sup>Not significant.

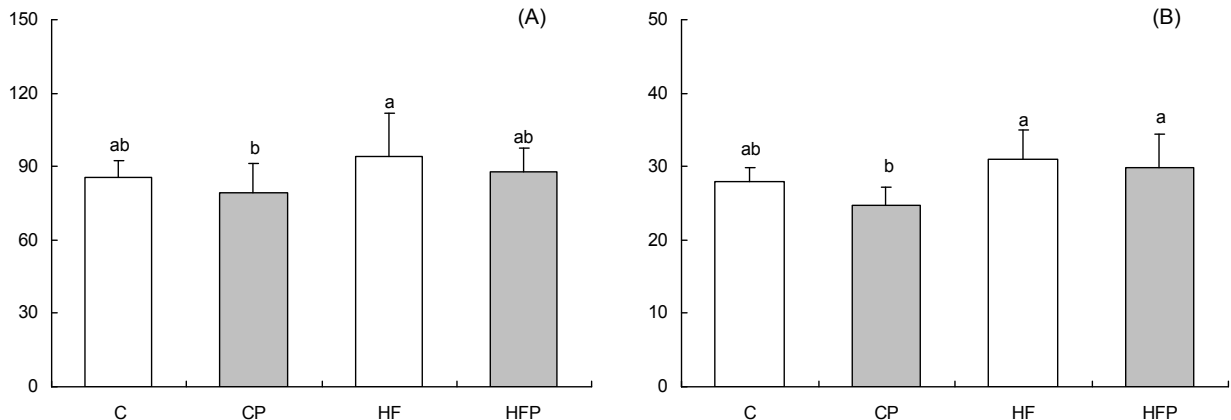


Fig. 1. Effect of dietary supplementation of grape pomace on serum activities of GOT (A) and GPT (B) in rats fed a normal or high fat diet. C: normal diet, CP: normal diet with grape pomace, HF: high fat diet, HFP: high fat diet with grape pomace. Values are mean  $\pm$  standard deviation. Values with the same superscript letter are not significantly different at  $\alpha=0.05$  by Duncan's multiple range test.

#### 혈청, 간조직 및 변 중 지질 함량

혈청, 간조직 및 변 중 지질 함량은 Table 3에 나타내었다. 혈청 중 총 콜레스테롤 함량은 정상식이군에서는 유의적인 차이가 없지만 고지방식이군에서는 HF군에 비하여 HFP군이 유의적으로 감소하였으며( $p<0.05$ ) 고지방식이와 포도박 분말의 급여에 의한 상호작용을 나타내었다. 혈청 중의 중성지질 함량은 대조군에 비하여 포도박 첨가군에서 유의적으로 감소하였다. 고지방식이군에서 HDL-콜레스테롤 함량은 유의적인 차이가 없었지만 정상식이군에서 C군에 비하여 CP군이 유의적으로 증가하였으며( $p<0.05$ ) LDL-콜레스테롤 함량은 이와 상반되는 결과를 나타내었다. 간조직 중 총지질 함량과 총 콜레스테롤 함량에서도 정상식이군에서는 유의적인 차이가 없었지만 고지방식이 대조군인 HF군에 비하여 HFP군이 유의적으로 감소하였다( $p<0.05$ ). 중성지질

함량은 대조군에 비하여 포도박을 첨가한 군이 모두 유의적으로 감소하였으며( $p<0.05$ ) 고지방식이와 포도박 분말의 급여에 따른 상호작용을 나타내었다. 인지질 함량은 고지방식이군에서는 유의적인 차이가 없었지만 정상식이군에서는 C군에 비하여 CP군이 유의적으로 증가하였다( $p<0.05$ ).

본 실험에서 포도박을 첨가한 군에서 혈청과 간조직 중 지질의 저하효과가 나타난 것은 포도박 중에 포도 과육과 과피, 씨를 포함하여 시료에 다량의 폴리페놀과 식이섬유가 포함되어 있기 때문으로 생각된다. Martin-Carron 등(19)의 연구에 의하면 고지방식이와 고콜레스테롤식이에 식이섬유와 폴리페놀이 풍부한 포도 부산물을 10% 첨가하였을 때 대조군에 비하여 혈청 중의 중성지질과 HDL-콜레스테롤 함량은 차이가 없었지만 총 콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤 함량은 유의적으로 감소하였다고 하였다. 또한 식이섬유와

Table 3. Effect of dietary supplementation of grape pomace on serum, liver and fecal lipid levels in rats fed a normal or high fat diet

Variable <sup>1)</sup>	Group <sup>2)</sup>			
	C	CP	HF	HFP
<b>Serum</b>				
TC (mg/dL)	79.6 $\pm$ 13.63 <sup>ab</sup>	86.6 $\pm$ 14.19 <sup>a</sup>	87.2 $\pm$ 9.03 <sup>a</sup>	69.8 $\pm$ 18.24 <sup>b</sup>
TG (mg/dL)	75.2 $\pm$ 7.35 <sup>a</sup>	56.2 $\pm$ 6.25 <sup>b</sup>	67.5 $\pm$ 12.18 <sup>a</sup>	53.7 $\pm$ 5.68 <sup>b</sup>
HDL-C (mg/dL)	22.4 $\pm$ 5.05 <sup>b</sup>	33.5 $\pm$ 8.73 <sup>a</sup>	20.2 $\pm$ 3.33 <sup>b</sup>	24.6 $\pm$ 4.07 <sup>b</sup>
LDL-C (mg/dL)	49.0 $\pm$ 11.68 <sup>a</sup>	42.2 $\pm$ 10.36 <sup>ab</sup>	52.8 $\pm$ 9.55 <sup>a</sup>	34.6 $\pm$ 11.86 <sup>b</sup>
<b>Liver</b>				
TL (mg/g)	32.5 $\pm$ 8.86 <sup>b</sup>	30.0 $\pm$ 10.69 <sup>b</sup>	48.8 $\pm$ 9.91 <sup>a</sup>	36.3 $\pm$ 11.88 <sup>b</sup>
TC (mg/g)	3.38 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	3.20 $\pm$ 0.54 <sup>b</sup>	4.07 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	3.47 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>
TG (mg/g)	11.59 $\pm$ 3.36 <sup>b</sup>	7.86 $\pm$ 2.16 <sup>c</sup>	18.51 $\pm$ 2.15 <sup>a</sup>	9.09 $\pm$ 4.32 <sup>bc</sup>
PL (mg/g)	0.64 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.78 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.61 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	0.68 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>
<b>Feces</b>				
TL (mg/g)	22.9 $\pm$ 11.51 <sup>b</sup>	35.5 $\pm$ 15.81 <sup>a</sup>	38.0 $\pm$ 9.07 <sup>a</sup>	38.7 $\pm$ 10.27 <sup>a</sup>
TC (mg/g)	3.05 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	3.35 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup>	2.14 $\pm$ 0.74 <sup>b</sup>	2.92 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup>
TG (mg/g)	1.51 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	2.21 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>	1.56 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	2.38 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>TC: total cholesterol, TG: triglycerides, HDL-C: HDL-cholesterol, LDL-C: LDL-cholesterol, TL: total lipid, PL: phospholipid.

<sup>2)</sup>C: normal diet, CP: normal diet with grape pomace, HF: high fat diet, HFP: high fat diet with grape pomace.

Values are mean  $\pm$  standard deviation. Values with the same superscript letter in the row are not significantly different at  $\alpha=0.05$  by Duncan's multiple range test.

폴리페놀을 함유한 적포도, 백포도의 과피와 백포도씨를 먹인 쥐의 혈청 중 총 콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤의 함량이 감소되었다고 보고되었다(32).

노화과정 중의 흰쥐에게 포도식이를 장기간 급여한 연구에 의하면 포도에 다량 함유한 식이섬유가 소장에서 담즙산, 콜레스테롤과 결합하여 micelle의 형성을 방해하여 소장 내 지질 흡수를 저해함으로써 혈중 지질 수준을 낮추었으며 포도시료 중에 함유한  $\beta$ -carotene, 비타민 C 및 비타민 E가 폴리페놀과 더불어 LDL-콜레스테롤의 함량 감소에 효과적으로 작용하였다고 하였다(14). 적포도주에 많이 함유된 catechin, quercetin과 resveratrol을 동맥경화 유도식이와 함께 Syrian Golden hamsters에게 12주간 급여하였을 때 대조군에 비하여 phenolics 물질을 첨가한 군에서 혈장 중의 총콜레스테롤 함량이 유의적으로 감소하였다(33). 고지방식이를 급여한 4주령 수컷 흰쥐에게 포도주박 추출물을 4주 동안 급여하였을 때 혈장 중의 중성지질 함량이 대조군에 비하여 유의적으로 감소하였다(34). Bobek(35)은 고콜레스테롤식이에 포도박을 5%와 15%를 첨가하였을 때 혈청과 간조직 중의 콜레스테롤 함량이 셀룰로오스를 첨가한 대조군에 비하여 유의적으로 감소하였고, LDL-콜레스테롤 함량은 대조군에 비하여 15% 포도박을 첨가한 군이 유의적으로 감소한 반면에 HDL-콜레스테롤 함량은 증가하였다고 보고하였다. 또한 25%의 lard를 포함한 고지방식으로 비만 흰쥐에게 5% 포도박을 첨가하여 4주 동안 급여하였을 때 간조직 중 지질 함량은 정상식이 대조군에 비하여 정상식이에 포도박을 첨가한 군이 유의적으로 감소하였으며 중성지질 함량은 고지방식이 대조군에 비하여 고지방식이에 포도박을 첨가한 군이 유의적으로 감소하였다고 하였다(36).

변 중 총 지질 함량은 정상식이군에서 C군에 비하여 CP군이 유의적으로 증가하였으며( $p < 0.05$ ) 고지방식이군에서는 실험군 간의 유의적인 차이가 없었다. 변 중 총콜레스테롤 함량은 HFP군이 HF군에 비하여 유의적으로 증가하였으며( $p < 0.05$ ) 중성지질 함량은 대조군에 비하여 포도박 첨가군이 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ). 이러한 결과는 4주령의 C57BL/6 마우스를 고지방식으로 비만을 유도한 후 포도씨 열수추출물 1%를 급여하였을 때 고지방식이 대조군에 비하여 포도씨 열수추출물을 급여한 군에서 변으로의 중성지질 함량이 약 1.2배 유의적으로 증가하였다는 Cho 등(37)의 결과와 같은 경향이였다. Chau 등(13)의 연구에 의하면 1% 콜레스테롤식이에 5% 셀룰로오스를 첨가한 식이를 6주령 된 Syrian Golden hamsters에게 급여하였을 때 변으로 배설되는 총 지질과 총 콜레스테롤 함량은 셀룰로오스를 첨가하지 않은 대조군에 비하여 유의적으로 증가하였다. 포도박은 식이섬유를 다량 함유하고 있으므로(16) 변으로의 지질 배설을 촉진시킴으로써 식이지방의 흡수를 억제하는데 효과적인 것으로 생각되며, 이 결과는 혈청과 간조직 중의 지질 함량이 감소된 결과를 뒷받침하는 것으로 여겨진다.

### 변 중 중성 스테로이드와 담즙산 함량

생체 내 콜레스테롤 함량은 간에서의 합성과 분해, 소장에서의 흡수와 배설에 의해 조절되는데 정상적인 경우 간에서 합성된 콜레스테롤은 담즙을 경유하여 장으로 이동되어 재흡수되거나 대장 미생물에 의해 sterol로 전환된 후 마지막에는 변으로 배설된다(38). 콜레스테롤의 주요 대사산물인 중성 스테로이드와 담즙산의 함량은 Fig. 2~4에서 나타내었다. 변 중 coprostanol 함량은 모든 실험군 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았고(Fig. 2) cholesterol과 coprostanone 함량의 합은 고지방식이의 급여로 인해 정상식이군보다 고지방식이 군이 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ). 특히, 고지방식이에 포도박을 첨가한 경우 cholesterol과 coprostanone 함량의 합은 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ )(Fig. 3). 본 실험에서 변 중의 담즙산의 함량은 HF군과 HFP군 간에는 유

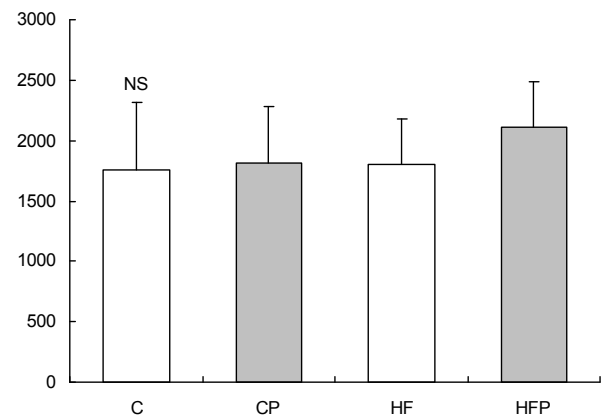


Fig. 2. Effect of dietary supplementation of grape pomace diet on fecal concentration of coprostanol in rats fed a normal or high fat diet. C: normal diet, CP: normal diet with grape pomace, HF: high fat diet, HFP: high fat diet with grape pomace. Values are mean  $\pm$  standard deviation. NS: not significant.

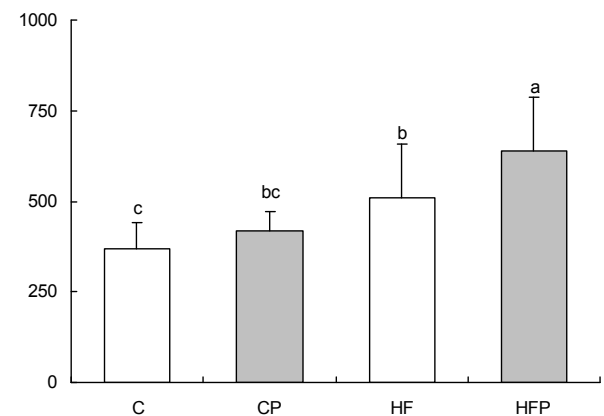


Fig. 3. Effect of dietary supplementation of grape pomace on fecal concentration of cholesterol and coprostanone in rats fed a normal or high fat diet. C: normal diet, CP: normal diet with grape pomace, HF: high fat diet, HFP: high fat diet with grape pomace. Values are mean  $\pm$  standard deviation. Values with the same superscript letter are not significantly different at  $\alpha = 0.05$  by Duncan's multiple range test.

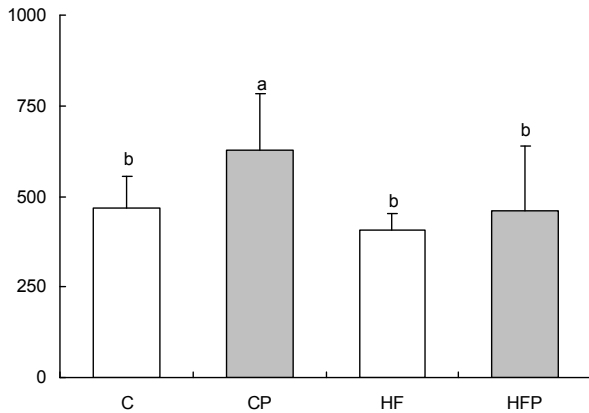


Fig. 4. Effect of dietary supplementation of grape pomace on fecal concentration of bile acid in rats fed a normal or high fat diet. C: normal diet, CP: normal diet with grape pomace, HF: high fat diet, HFP: high fat diet with grape pomace. Values are mean ± standard deviation. Values with the same superscript letter are not significantly different at  $\alpha=0.05$  by Duncan's multiple range test.

의적인 차이가 없었지만 C군에 비하여 CP군이 유의적으로 증가하였다( $p<0.05$ )(Fig. 4).

식이섬유는 콜레스테롤이 체외로 배설되는 유일한 경로인 담즙산의 소장 흡수를 방해하고 변으로의 배설을 증가시켜 체내의 콜레스테롤 pool 크기를 감소시키는 역할을 한다(39). 포도박에서 추출한 식이섬유가 풍부한 식이를 Wistar 쥐에게 급여하였을 때 변으로 배설되는 콜레스테롤, coprostanol, coprostanone, 총 중성 스테로이드와 담즙산 함량이 대조군에 비하여 유의적으로 증가하였다고 보고되었다(40). Chau 등(13)은 1% 콜레스테롤식이에 5% 셀룰로오스를 첨가한 식이를 Syrian Golden hamsters에게 급여하였을 때 변으로 배설되는 담즙산 함량은 셀룰로오스를 첨가하지 않은 대조군에 비하여 유의적으로 증가하였다고 보고하였다.

또한 Miura 등(41)은 4주령 Donryu 흰쥐에게 resveratrol 10 ppm과 50 ppm이 첨가된 식이를 급여하였을 때 변으로 배설되는 중성 스테로이드와 담즙산 함량이 정상식이 대조군에 비하여 50 ppm 첨가군에서 유의적으로 증가하였고 보고하였다. 포도박은 포도 과피와 씨를 포함하며 포도씨 중에 함유된 tannin은 변 무게를 증가시키고 장에서 담즙산의 장관 재순환을 억제함으로써 콜레스테롤의 배설량을 증가시킨다(42,43). 고지방식으로 비만이 유도된 흰쥐에게 5% 포도박을 4주 동안 급여하였을 때 변으로 배설되는 담즙산 함량이 대조군에 비하여 포도박을 첨가한 군에서 유의적으로 증가된 것은 혈청 중의 지질 함량 감소와 연관이 있으며 포도박의 첨가로 체내 콜레스테롤 대사는 물론 담즙산 배설에도 효과를 나타낸 것으로 사료된다.

간조직의 형태학적 관찰

간조직의 형태학적 관찰 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 정상식이군의 간조직은 그 표면에 윤기가 있고 탄력성도 있었으나 고지방식이군에서는 간조직의 표면이 지방 침착으로 윤기와 탄력성이 현저하게 저하된 것으로 관찰되었다. 포도박을 첨가한 군은 정상적인 구조로 간세포가 잘 배열되어 있고 간세포 핵은 중심에 위치해 있었으며 세포질은 대체적으로 균일하게 보였다. HF군은 간조직의 입자가 지방방울을 형성하여 심한 지방 침착, 괴사 및 문맥에 염증세포의 침윤현상이 관찰되었으나 HFP군에서는 세포질 내의 지방방울의 크기와 숫자는 유사하였으나 HF군에 비하여 지방세포 비대, 괴사 및 염증현상이 관찰되지 않았다(Table 4). 따라서 포도박의 급여는 고지방식으로 유도되는 간조직 중의 지방 축적을 억제하고 간 손상을 완화하는데 도움이 될 것으로 생각된다.

Lee(36)의 보고에 의하면 고지방식으로 과체중을 유도한

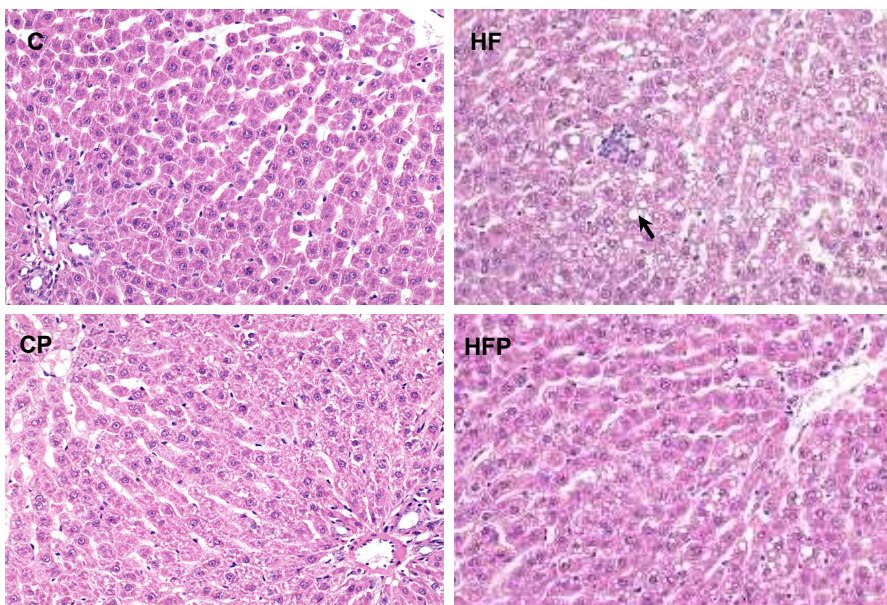


Fig. 5. Effect of dietary supplementation of grape pomace on micrographs of liver tissue in rats fed a normal or high fat diet (hematoxylin and eosin stain,  $\times 200$ ). C: normal diet, CP: normal diet with grape pomace, HF: high fat diet, HFP: high fat diet with grape pomace.



Table 4. Histopathologic findings of liver in rats fed a normal or high fat diet

Group	Fatty change <sup>1)</sup>	Fat size <sup>2)</sup>	Fat location <sup>3)</sup>	Swelling <sup>4)</sup>	Necrosis <sup>4)</sup>	Inflammation <sup>4)</sup>	Fibrosis <sup>4)</sup>
C	0	0		0	0	0	0
CP	1	1	2	0	0	0	0
HF	2	3	2	1	1	1	0
HFP	2	3	1	0	0	0	0

C: normal diet, CP: normal diet with grape pomace, HF: high fat diet, HFP: high fat diet with grape pomace.

<sup>1)</sup>0: no, 1: <5%, 2: 5~25%. <sup>2)</sup>1: macrovesicular, 2: microvesicular, 3: mixed.

<sup>3)</sup>1: centrilobular area, 2: no specific area. <sup>4)</sup>0: no, 1: mild.

흰쥐에게 고지방 식이와 포도박을 급여하였을 때 대조군에 비하여 포도박 급여군에서 지방 침착이 적었으며, 간조직 중의 크고 작은 소낭이 발견되었으나 염증과 괴사현상은 나타나지 않았다고 하였다. Feillet-Coudray 등(44)은 고지방과 고설탕식을 Wistar 쥐에게 12주 동안 급여하였을 때 고지방, 고설탕식이군에서는 지방방울의 수와 크기가 증가되었고 부피가 큰 지방 공포의 팽창으로 인하여 핵과 세포질이 옆으로 밀려서 간세포 배열이 일정하지 않았다고 하였다. 반면에 적포도주에서 추출한 polyphenol인 provinol을 0.2% 급여한 군에서는 지방 축적이 감소되어 지방간 증상을 예방할 수 있었다고 보고하였다. 본 연구에 사용된 포도박에는 다양한 polyphenol이 함유되어 있어(10,11) 고지방식에 의한 간조직의 형태적 변화에 긍정적인 효과를 보인 것으로 사료된다.

## 요 약

본 연구에서는 포도박이 고지방식을 섭취한 흰쥐의 지질대사에 미치는 영향을 조사함으로써 포도박의 생리활성과 자원화에 필요한 기초자료를 얻고자 하였다. Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 48마리를 정상식이 대조군(C), 정상식이에 포도박을 첨가한 군(CP), 고지방식이 대조군(HF), 고지방식이에 포도박을 첨가한 군(HFP)으로 나누어 4주간 실험식을 급여한 후 간 기능 관련 효소, 혈청과 간조직 및 변 중의 지질 함량, 변으로 배설되는 중성 스테로이드와 담즙산 함량을 측정하였고 간조직의 형태학적 변화를 관찰하였다. 식이섭취량은 정상식이군(C, CP)에 비하여 고지방식이군(HF, HFP)이 유의적으로 적은 양을 섭취하였으며 식이 효율은 고지방식이군에서 증가하였다. 체중증가량은 실험군 간에 유의적인 차이는 없었다. 간 기능을 나타내는 GOT와 GPT 활성은 대조군과 포도박을 첨가한 군 간의 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 혈청 중의 총 콜레스테롤 함량은 고지방식이와 포도박 분말의 급여에 의한 상호작용을 나타내었으며, HDL-콜레스테롤 함량은 CP군이 C군보다 유의적으로 증가되었다. 중성지질과 LDL-콜레스테롤 함량은 정상식이군에서는 유의적인 차이가 없었지만 고지방식이군에서는 HF군에 비하여 HFP군이 유의적으로 감소하였다. 간조직 중의 총 지질 함량과 총 콜레스테롤 함량은 고지방식이와 포도박 분말의 급여에 따른 상호작용을 나타내었으며 중

성지질 함량은 대조군에 비하여 포도박을 첨가한 군이 유의적으로 감소하였다. 인지질 함량은 고지방식이군에서는 유의적인 차이가 없었지만 정상식이 군에서는 C군에 비하여 CP군이 유의적으로 증가하였다. 변 중의 총 지질 함량은 C군에 비하여 CP군이 유의적으로 증가하였으며 총 콜레스테롤 함량은 HFP군이 HF군에 비하여 유의적으로 증가하였다. 변 중 중성지질 함량은 대조군에 비하여 포도박 첨가군에서 배설이 증가되었다. 변으로 배설되는 coprostanol 함량은 모든 실험군 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. Cholesterol과 coprostanone 함량의 합은 정상식이군보다 고지방식이군이 유의적으로 증가하였고, 고지방식이군에서 HF군보다 HFP이 유의적으로 증가하였다. 담즙산의 함량은 HF군과 HFP군 간의 유의적인 차이가 없었지만 C군에 비하여 CP군이 유의적으로 증가하였다. 간조직의 형태학적 관찰 결과를 보면 HF군의 간조직 표면이 심한 지방 침착으로 윤기와 탄력성이 저하되었다. HFP군에서는 세포질 내의 지방방울의 크기와 숫자는 유사하였으나 HF군에 비하여 지방세포 비대, 괴사 및 염증현상이 거의 관찰되지 않았다. 이상의 결과는 식이섭취와 폴리페놀 성분을 다량 함유한 포도박 식이는 혈청과 간조직의 지질 축적을 감소시키고 변으로 배설되는 지질 함량을 증가시켜 줌으로써 지질대사 관련한 만성 질환의 예방효과를 가져올 수 있는 것으로 기대되었다. 포도박의 이러한 생리활성에 대한 연구결과는 향후 포도 가공 중에 얻어지는 포도박 폐기물을 자원화 할 수 있는 기초자료로써 이용될 수 있다고 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 2005년도 농림기술개발사업의 연구비 지원에 의해 수행된 연구로 이에 감사드립니다. 또한 시료의 형태학적 관찰에 도움을 주신 영남대학교 의과대학 최준혁 교수님께 감사드립니다.

## 문 헌

1. Statistics Korea. 2009. 2008 The annual report on the cause of death statistics.
2. Bravo L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56: 317-333.

3. Rice-Evans C. 2001. Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem* 8: 797-807.
4. Iacopini P, Baldi M, Storchi P, Sebastiani L. 2008. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: content, in vitro antioxidant activity and interactions. *J Food Compost Anal* 21: 589-598.
5. Han JY, Sung JH, Kim DJ, Jeong HS, Lee JS. 2008. Inhibitory effect of methanol extract and its fraction from grape seeds on mushroom tyrosinase. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1679-1683.
6. Park SJ, Lee HY, Oh DH. 2003. Free radical scavenging effect of seed and skin extracts from Campbell Early grape (*Vitis labruscana* B.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 115-118.
7. USDA/ERS. 2003. *Fruit and tree nuts situation and outlook yearbook*.
8. Maier T, Schieber A, Kammerer DR, Carle R. 2009. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chem* 112: 551-559.
9. Monrad JK, Howard LR, King JW, Srinivas K, Mauro-moustakos A. 2010. Subcritical solvent extraction of pro-cyanidins from dried red grape pomace. *J Agric Food Chem* 58: 4014-4021.
10. Lu YR, Foo LY. 1999. The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chem* 65: 1-8.
11. Kammerer D, Claus A, Carle R, Schieber A. 2004. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *J Agric Food Chem* 52: 4360-4367.
12. Um MY, Kim MK. 2002. Effect of grape intakes on lipid metabolism of rats during aging. *Korean J Nutr* 35: 713-728.
13. Chau CF, Chen CH, Wang YT. 2004. Effects of a novel pomace fiber on lipid and cholesterol metabolism in the hamster. *Nutr Res* 24: 337-345.
14. Burton-Freeman B. 2000. Dietary fiber and energy regulation. *J Nutr* 130: 272S-275S.
15. Kurtz RC, Zhang ZF. 2001. Gastric cardia cancer and dietary fiber. *Gastroenterology* 120: 568-570.
16. Sembries S, Dongowski G, Mehrlander K, Will F, Dietrich H. 2006. Physiological effects of extraction juices from apple, grape, and red beet pomace in rats. *J Agric Food Chem* 54: 10269-10280.
17. Perez-Jimenez J, Serrano J, Taberner M, Arranz S, Diaz-Rubio ME, Garcia-Diz L, Goni I, Saura-Calixto F. 2008. Effects of grape antioxidant dietary fiber in cardiovascular disease risk factors. *Nutrition* 24: 646-653.
18. Philip GR, Forrest HN, George CF Jr. 2003. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition AdHoc Writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951.
19. Martin-Carron N, Goni I, Larrauri JA, Garcia-Alonso A, Saura-Calixto F. 1999. Reduction in serum total and LDL cholesterol concentrations by a dietary fiber and polyphenol-rich grape product in hypercholesterolemic rats. *Nutr Res* 19: 1371-1381.
20. Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. 1993. Dietary antioxidant flavonoid and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342: 1007-1011.
21. Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, Pekkarinen M, Simic BS, Toshima H, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB. 1995. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 155: 381-386.
22. Hollman PCH, Katan MB. 1999. Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol* 37: 937-942.
23. Ross JA, Kasum CM. 2002. Dietary flavonoids: bioavailability metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 22: 19-34.
24. Friedewald WT, Levy RI, Fedreison DS. 1979. Estimation of concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499-502.
25. Folch J, Mec L, Stanly GSH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
26. Medez J, Frinklin B, Gahagen F. 1975. Sample manual procedure for determination of serum triglycerides. *Clin Chem* 21: 768-774.
27. Zlatkis A, Zak B. 1969. Study of new cholesterol reagent. *Anal Biochem* 29: 143-150.
28. Eng LF, Noble EP. 1968. The maturation of rat brain myelin. *Lipid* 3: 157-162.
29. Crowell MJ, Macdonald IA. 1980. Enzymic determination of 3 $\alpha$ -, 7 $\alpha$ -, and 12 $\alpha$ -hydroxyl groups of fecal bile salts. *Clin Chem* 26: 1298-1300.
30. Yunoki K, Sasaki G, Tokuji Y, Kinoshita M, Naito A, Aida K, Ohnishi M. 2008. Effect of dietary wine pomace extract and oleanolic acid on plasma lipids in rats fed high-fat diet and its DNA microarray analysis. *J Agric Food Chem* 56: 12053-12058.
31. Chung KH, Cho SH, Sin EN, Choi KH, Choi YS. 1988. Effects of alcohol consumption and fat content in diet on chemical composition and morphology of liver in rat. *Korean J Nutr* 21: 154-163.
32. Martin-Carron N, Saura-Calixto F, Goni I. 2000. Effect of dietary fiber and polyphenol-rich grape product on lipidaemia and nutritional parameters in rats. *J Sci Food Agric* 80: 1183-1188.
33. Auger C, Teissedre PL, Gerain P, Lequeux N, Bornet A, Serisier S, Besancon P, Caporiccio B, Cristol JP, Rouanet JM. 2005. Dietary wine phenolics catechin, and resveratrol efficiently protect hypercholesterolemic hamsters against aortic fatty streak accumulation. *J Agric Food Chem* 53: 2015-2021.
34. Yunoki K, Saaki G, Tokuji Y, Kinoshita M. 2008. Effect of dietary wine pomace extract and oleanolic acid on plasma lipids in rats fed high-fat diet and its DNA microarray analysis. *J Agric Food Chem* 56: 12052-12058.
35. Bobek P. 1999. Dietary tomato and grape pomace in rat: effect on lipid in serum and liver, and on antioxidant status. *Br J Biomed Sci* 56: 109-113.
36. Lee JK. 2008. Effect of grape pomace diet on lipid metabolism related to obesity in rats. *MS Thesis*. Yeungnam University, Gyeongsan, Korea.
37. Cho YS, Yang EM, Jang SM, Chun MS, Shon MY, Kim MJ, Lee MK. 2009. Effect of grape seed water extract on lipid metabolism and erythrocyte antioxidant defense system in high-fat diet-induced obese C57BL/6 mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1537-1543.
38. Park BS, Seong KS, Yoon CS, Hwangbo J, Lee HW, Lee NH, Rhee YC. 1992. Effect of dietary  $\omega$ -PUFA on cholesterol synthesis and steroid excretion in rats. *Kor J Anim Nutr Feed* 16: 283-290.
39. Kang HJ, Song YS. 1997. Dietary fiber and cholesterol metabolism. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 358-369.



40. Sembries S, Dongowski G, Mehrlander K, Will F, Dietrich H. 2004. Dietary fiber-rich colloids from apple pomace extraction juices do not affect food intake and blood serum lipid levels, but enhance fecal excretion of steroids in rats. *J Nutr Biochem* 15: 296-302.
41. Miura D, Miura Y, Yagasaki K. 2003. Hypolipidemic action of dietary resveratrol, a phytoalexin in grapes and wine, in hepatoma-bearing rats. *Life Sci* 73: 1393-1400.
42. Bravo L, Abia R, Eastwood M, Saura-Calixto F. 1994. Degradation of polyphenols (catechin and tannic acid) in the rat intestinal tract. Effect on colonic fermentation and faecal output. *Br J Nutr* 71: 933-946.
43. Tebib K, Besancon P, Rouanet JM. 1994. Dietary grape seed tannins affect lipoproteins, lipoprotein lipases and tissue lipids in rats fed hypercholesterolemic diets. *J Nutr* 124: 2451-2451.
44. Feillet-Coudray C, Sutra T, Fouret G, Ramos J, Wrutniak-Cabello C, Cabello G, Cristol JP, Coudray C. 2009. Oxidative stress in rats fed a high-fat high-sucrose diet and preventive effect of polyphenol: Involvement of mitochondrial and NAD(P)H oxidase systems. *Free Radic Biol Med* 46: 624-632.

(2010년 7월 2일 접수; 2010년 10월 11일 채택)