

## 포도씨 추출물의 항산화 효과 및 소화효소 저해 효과

장영선<sup>1</sup> · 정종문<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>(주)벤스랩 중앙연구소

<sup>2</sup>수원대학교 생명과학과

### Antioxidative Effect and Digestive Enzyme Inhibition of Grape Seed Extract (GSE)

Young-Sun Jang<sup>1</sup> and Jong-Moon Jeong<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Technology Research Center, Ben's Lab Co., Ltd., Gyeonggi-do 445-743, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Life Science, The University of Suwon, Gyeonggi-do 445-743, Korea

#### Abstract

The purpose of this study is to investigate the antioxidative activity and digestive enzyme inhibition of grape seed extract (GSE). The GSE was tested for its effect on various antioxidative potentials (scavenging activities of DPPH radical, superoxide anion radical and hydroxyl radical) and inhibitory effect of various digestive enzymes (trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin,  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -glucosidase and lipase). DPPH radical scavenging activity ( $SC_{50}$ , 50% scavenging concentration) of GSE was  $4.76 \pm 0.27$  ppm while those of positive controls (EGCG and vitamin C) were  $2.22 \pm 0.12$  ppm and  $9.50 \pm 0.72$  ppm, respectively.  $SC_{50}$  value of GSE against superoxide anion radical and hydroxyl radical were  $3.82 \pm 0.07$  ppm and  $803.23 \pm 27.16$  ppm, respectively. In addition,  $IC_{50}$  values of GSE against trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin,  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and lipase were  $2.17 \pm 0.59$  ppm,  $7.46 \pm 1.25$  ppm,  $18.25 \pm 3.54$  ppm,  $12.30 \pm 1.12$  ppm, and  $653.23 \pm 79.34$  ppm, respectively. These results suggest that GSE may be useful for the prevention or treatment of obesity.

**Key words:**  $\alpha$ -amylase, trypsin, lipase, DPPH, grape seed extract

#### 서 론

포도는 갈대나무목(*Rhamnaceae*) 포도과(*Vitaceae*)에 속하며 포도과에는 11속 700여종이 있다. 포도열매는 주로 식용으로 이용되며 음료, 주류가공 등에도 이용되고 있는데, 이 과정에서 배출되는 포도씨의 중량은 전체 포도열매 중량의 3~5%를 차지하고 있어(1), 이 포도씨를 약용자원으로 이용하려는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 국내에서 포도씨 추출물은 1998년 5월에 식품첨가물 기준규격에 등재되어서 사용에 대한 허가가 인정되어 있다. 포도씨에 함유되어 있는 프로안토시아니딘(proanthocyanidin)이라는 성분은 축합형 탄닌의 일종으로 관능적으로는 떫거나 쓴맛을 나타내며(2), 동맥경화억제, 노인성치매예방, 항당뇨, 대장암 예방 등에 관한 생체 내의 효과에 대한 많은 연구가 행해지고 있다(3,4).

현대인은 산소에 의한 산화적 스트레스에 항상 노출되어 있으며, 이러한 산화적 스트레스는 정상적인 경우 생체 내 항산화계에 의해 제거된다. 하지만 산업화 이후 계속적으로 증가하는 각종 환경 오염물질, 흡연, 알코올 및 방사선 등은 인체에 산화적 스트레스를 가중시키고 있으며, 이러한 산화적 스트레스가 제거되지 못하면 생체막의 손상, 고분자 단백

질 및 DNA의 변형과 기능 상실 등으로 인한 동맥경화증, 암, 신경퇴행성 질환, 노화 등 여러 질병이 유발될 수 있으므로 산화적 스트레스를 해결하기 위한 항산화제에 대한 관심이 집중되고 있다(5,6). 현재, 천연 항산화제로서 페놀성 화합물(phenolic acid 등 phenylpropanoid류), 플라본 유도체, 아미노산, 펩타이드,  $\alpha$ -토코페롤 등이 사용되고 있으며, 합성 항산화제로서는 BHT(butylated hydroxytoluene), BHA(butylated hydroxyanisole) 등이 허용되고 있다. 그러나 BHT와 BHA는 변이원성 및 독성이 지적되어 사용량이 격감되고 있기 때문에 안전성과 관능상 문제가 되지 않는 식물 기원의 천연 항산화제의 개발을 위한 많은 연구가 시도되고 있다(7,8).

비만이란 신체의 에너지 요구량보다 과잉으로 영양을 섭취하였을 때 그 넘쳐난 에너지가 체지방의 형태로 인체에 축적되어 체중이 증가되는 영양불량 상태를 말한다(9). 최근 비만의 증가로 비만과 관련된 질병인 고지혈증, 당뇨병, 고혈압 및 관상동맥질환과 같은 성인병의 발병율이 증가하며 그로 인한 사망률 역시 증가하고 있다(10). 이러한 비만을 치료하기 위한 여러 가지 약물개발이 진행되고 있으며, 그중 하나의 방법으로 췌장 지방분해효소 저해제(pancreatic

\*Corresponding author. E-mail: jmjeong@suwon.ac.kr  
Phone: 82-31-222-6514, Fax: 82-31-222-6552

lipase inhibitor)를 이용한 비만 치료법에 대한 연구가 주를 이루고 있다. 지방분해효소를 저해하는 대표적인 화합물로는 *Streptomyces toxitricini*로부터 유래된 lipstatin의 유도체인 tetrahydrolipstatin(Orlistat, Ro 18-0647)이 있으며, 그 효능이 매우 우수하여 섭취된 지방의 30%까지 흡수를 저해하는 것으로 제시되어 현재 의약품(Xenical, Roche Co.)으로도 시판되고 있다(11,12). 그러나 위장장애, 과민증, 담즙분비장애, 지용성 비타민 흡수억제 등의 부작용이 문제가 되고 있어 최근 부작용이 없는 식품 및 천연물로부터 지방분해효소 저해제를 개발하여 비만 예방 및 치료제로 사용하고자 하는 연구가 꾸준히 진행되고 있다(13). 또한 우리나라 식습관의 특성상 육류 위주의 식사를 하는 서구와 달리 곡류 즉, 탄수화물 위주의 식사를 하기 때문에 국내에서의 비만을 개선하기 위해서는 기존의 지방흡수억제기전 뿐만 아니라 탄수화물 및 단백질의 흡수억제기전까지 겸비되어야 한다.

따라서 본 연구에서는 포도씨 추출물(GSE)의 항산화 효과를 확인하기 위해 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거효과와 SOD(superoxide anion dismutase) 유사활성 및 hydroxyl radical 포착효과를 확인하였으며, 여러 소화효소(단백질분해효소: trypsin과  $\alpha$ -chymotrypsin, 탄수화물분해효소:  $\alpha$ -amylase와  $\alpha$ -glucosidase, 지방분해효소: lipase) 억제효과 측정을 통해 지방 흡수를 억제할 뿐만 아니라 탄수화물 및 단백질 흡수 억제까지 겸비한 비만 예방 및 치료제로 이용 가능성을 *in vitro*에서 확인하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 기기

본 실험에 사용된 포도씨추출분말(proanthocyanidin 95% 이상)은 (주)진용내츨렬사(Suwon, Korea)에서 분양받았다. DPPH, trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin,  $\alpha$ -amylase, lipase, Folin-Ciocalten, xanthine, nitro blue tetrazolium, xanthine oxidase 등의 시약은 Sigma사(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 흡광도 측정에 사용된 UV-VIS 흡광계는 Spectronic Genesys 5(Milton Roy, Ivyland, PA, USA) 모델을 사용하였다. 그 이외의 시약은 1급 또는 특급을 사용하였다.

### 총 페놀 함량

총 페놀 함량은 Gutfinger(14)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 1%(w/v) GSE 1 mL에 2%(w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액 1 mL를 가하여 3분간 상온에서 반응시킨 후, 50% Folin-Ciocalten 0.2 mL을 첨가하여 30분간 상온에서 반응시켰다. 이 혼합물을 10분간 13,000×g에서 원심분리한 후, 상등액 1 mL을 취하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준곡선은 녹차 카테킨인 EGCG(epigallocatechin gallate)를 이용하여 작성하였다.

### DPPH radical 소거효과 측정

GSE의 DPPH radical 소거효과를 확인하기 위하여 Yasushi 등(15)의 문헌을 변형하여 실험하였다. 0.2 mM 농도가 되도록 ethanol에 용해한 DPPH를 1.5 mL, 각 농도별로 용해한 GSE 0.15 mL, 증류수 1.35 mL을 첨가하여 30분 동안 상온에서 반응시킨 후, 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거효과(%)는 (1-시료를 첨가한 반응군의 흡광도/시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도)×100 식으로부터 구하였다. 그 결과는 50% radical 소거효과를 나타낼 때의 sample 농도 즉, 50% scavenging concentration(SC<sub>50</sub>) 값으로 나타내었다. 양성대조군으로 EGCG와 항산화제로 알려진 vitamin C를 사용하였다.

### SOD 유사활성 측정

GSE의 SOD 유사활성 측정은 nitro blue tetrazolium (NBT) 환원법을 이용하여 측정하였다. 각 농도별 GSE 0.05 mL, 발색액(0.4 mM xanthine, 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 8.0), 0.24 mM nitro blue tetrazolium) 0.5 mL, 효소액(0.048 unit/mL xanthine oxidase, 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 8.5)) 0.5 mL을 첨가하고 잘 혼합하여 37°C에서 20분 동안 반응시킨 후, 70 mM SDS(sodium dodecyl sulfate) 1 mL을 첨가하여 효소 반응을 정지시켜 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성 측정결과를 통해 superoxide anion radical 포착효과(%)를 다음과 같은 식으로부터 구하였으며, 그 결과는 SC<sub>50</sub>값으로 나타내었다. (1-시료를 첨가한 반응군의 흡광도/시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도)×100

### Hydroxyl radical 소거효과 측정

Hydroxyl radical 소거효과 측정은 Fenton 반응으로 생성된 ·OH에 의해 핵산의 구성당인 deoxyribose가 분해되는 정도를 TBA 발색법을 이용하여 측정하였다. 농도별 GSE 0.15 mL, 10 mM  $\text{FeSO}_4/\text{EDTA}$  0.075 mL, 10 mM 2-deoxyribose 0.075 mL, 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.0) 0.225 mL과 증류수 0.15 mL을 첨가하여 잘 혼합한 후, 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.075 mL을 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 2.8%(w/v) TCA(trichloroacetic acid) 0.375 mL과 1%(w/v) TBA(thiobarbituric acid) 0.375 mL을 첨가하여 100°C에서 10분간 가열하고 충분히 냉각시켜 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. Hydroxyl radical 소거효과(%)는 (1-시료를 첨가한 반응군의 흡광도/시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도)×100 식으로부터 구하였으며, 그 결과는 SC<sub>50</sub> 값으로 나타내었다.

### Trypsin 저해효과 측정

GSE가 trypsin의 활성에 미치는 영향은 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 0.01%가 되도록 10 mM sodium acetate buffer(pH 7.5)에 용해한 trypsin 0.015 mL에 GSE 0.185 mL을 혼합하여 37°C에서 10분간 전 처리한다. 3% 농도가 되도록

록 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.5)에 용해한 azocasein 0.8 mL을 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 뒤 110 mM trichloroacetic acid reagent(TCA) 1.0 mL을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 상온에서 15분간 반응액을 정지하여 단백질을 침전시키고 10,000×g에서 20분간 원심분리한 뒤 상등액 1.2 mL에 1 N NaOH 1.4 mL을 혼합하여 440 nm에서 흡광도를 측정하였다. Trypsin 저해효과(%)는  $\{1 - (\text{시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도} - \text{시료를 첨가한 반응군의 흡광도}) / \text{시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도}\} \times 100$  식으로부터 구하고 그 결과를 IC<sub>50</sub>(50% inhibitory concentration) 값으로 나타내었다.

#### α-Chymotrypsin 저해효과 측정

GSE가 α-chymotrypsin의 활성에 미치는 영향은 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 0.01%가 되도록 10 mM sodium acetate buffer(pH 7.5)에 용해한 α-chymotrypsin 0.04 mL에 GSE 0.16 mL을 혼합하여 37°C에서 10분간 전 처리한다. 3%가 되도록 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.5)에 용해한 azocasein 0.8 mL을 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 뒤 110 mM trichloroacetic acid reagent(TCA) 1.0 mL을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 상온에서 15분간 반응액을 정지하여 단백질을 침전시키고 10,000×g에서 20분간 원심분리한 뒤 상등액 1.2 mL에 1 N NaOH 1.4 mL을 혼합하여 440 nm에서 흡광도를 측정하였다. α-Chymotrypsin 저해효과(%)는  $\{1 - (\text{시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도} - \text{시료를 첨가한 반응군의 흡광도}) / \text{시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도}\} \times 100$  식으로부터 구하고 그 결과를 IC<sub>50</sub> 값으로 나타내었다.

#### α-Amylase 저해효과 측정

α-Amylase 저해효과는 Lim 등(16)의 방법을 변형하여 측정하였다. GSE 20 μL에 1 unit/mL porcine pancreas 기원의 α-amylase 5 μL와 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.9) 25 μL를 혼합하여 37°C에서 20분간 전 처리한 후 0.5% starch를 25 μL 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시켰다. 그 반응액에 48 mM 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 발색 시약을 100 μL 넣고 100°C에서 10분간 끓여 발색시킨 후 충분히 냉각시킨다. 이 반응액에 1 mL 물을 가하고 잘 교반한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. α-Amylase 저해효과(%)는  $\{1 - (\text{시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도} - \text{시료를 첨가한 반응군의 흡광도}) / \text{시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도}\} \times 100$  식으로부터 구하고 그 결과를 IC<sub>50</sub> 값으로 나타내었다.

#### α-Glucosidase 저해효과 측정

농도별 GSE 0.05 mL, 1 unit/mL α-glucosidase 0.05 mL과 200 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 0.05 mL을 잘 혼합하여 37°C에서 10분간 전 처리한 후 3 mM pNPG(p-nitrophenyl α-D-glucopyranoside) 0.1 mL을 첨가하여 37

°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.75 mL로 반응을 정지시켜 405 nm에서 흡광도를 측정된 값으로부터 저해효과(%)를 구하고, 그 결과를 IC<sub>50</sub> 값으로 나타내었다.  $\{1 - (\text{시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도} - \text{시료를 첨가한 반응군의 흡광도}) / \text{시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도}\} \times 100$

#### Lipase 저해효과 측정

Lipase 저해효과 측정은 Saisuburamaniyan 등(17)의 방법을 변형하여 사용하였다. 농도별 GSE 0.25 mL, 800 unit/mL lipase 0.5 mL과 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 6.5) 0.5 mL을 혼합하여 37°C에서 15분간 전 처리한 후 10%로 isooctane에 용해시킨 olive oil 1.25 mL을 첨가하여 37°C에서 20분간 진탕배양 하였다. Acetone 5 mL로 반응을 정지시킨 후 5% cupric acetate 1 mL을 첨가하여 혼합한 뒤 상온에서 정지하여 상등액 1 mL을 720 nm에서 흡광도를 측정하였다. Lipase 저해효과(%)는  $\{1 - (\text{시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도} - \text{시료를 첨가한 반응군의 흡광도}) / \text{시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도}\} \times 100$  식으로부터 구하여 IC<sub>50</sub> 값으로 나타내었다.

#### 통계분석

본 연구의 실험 결과는 3회 반복하여 실험군 당 평균과 표준편차를 계산하였고, SPSS(version 10) 통계프로그램의 Student's *t*-test를 이용하여 *p*<0.05일 때 유의한 것으로 판정하였다.

## 결과 및 고찰

#### 총 페놀 함량

페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 다양한 구조와 분자량을 갖는다. 이들은 phenolic hydroxyl기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대분자들과 쉽게 결합하여 항암, 항고혈압, 항염증 및 항산화 등의 다양한 생리활성 기능을 갖는다(18). 본 실험에서 사용된 GSE는 77.88±1.32 mg/g의 페놀화합물을 함유하고 있는 것으로 나타났다. 물을 용매로 추출한 산수유의 페놀화합물 함량이 32.25 mg/g이며, 사상자와 오미자의 페놀화합물 함량은 각각 15.72 mg/g, 12.69 mg/g으로 보고된 것과 비교하면 GSE의 페놀성 화합물의 함량이 한방생약재로 사용하는 약용식물 추출물보다 높은 것으로 나타났다(19). GSE에 함유된 페놀성 화합물로부터 여러 가지 생리활성 기능을 기대할 수 있다.

#### DPPH radical 포착효과

DPPH는 안정한 free radical로서, 항산화 물질에 의해 환원되어 탈색되므로 항산화 물질의 항산화 효과를 측정할 때 DPPH 라디칼 포착효과 측정법이 많이 이용된다(20). Fig. 1에서 정리한 바와 같이 GSE의 SC<sub>50</sub>값 측정결과 4.76±0.27

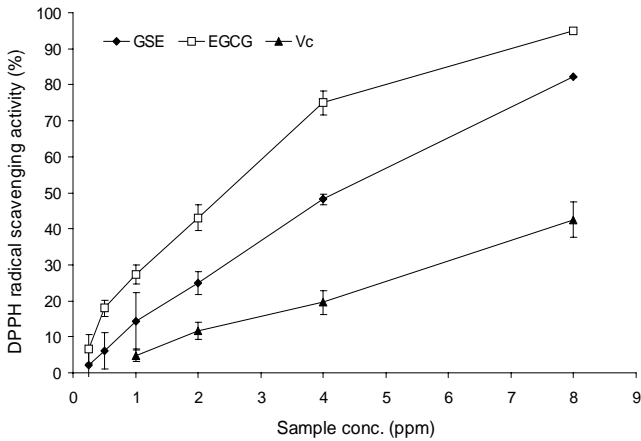


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of grape seed extract. GSE: grape seed extract, EGCG: epigallocatechin gallate, Vc: vitamin C. All bars were expressed as mean±SEM (n=3).

ppm을 나타냈고, 양성대조군으로 사용된 녹차카테킨인 EGCG와 대표 항산화제인 vitamin C의 SC<sub>50</sub>값은 각각 2.22 ± 0.12 ppm, 9.50 ± 0.72 ppm으로 나타났다. 따라서 GSE는 EGCG보다 약 2.1배 낮은 DPPH 라디칼 포착효과를 나타냈지만 vitamin C보다는 약 2배 우수한 DPPH radical 포착효과를 나타냈다.

SOD 유사활성

SOD 유사활성 측정은 xanthine에 xanthine oxidase가 작용하면 ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>가 생성되고 생성된 ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>는 공존하는 NBT를 환원시켜 발색반응을 나타내지만 생성된 ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>의 제거능을 가진 물질로 인하여 그 발색은 저해되는 원리를 이용하여 측정한다(21). 그 결과를 통해 superoxide anion radical 포착효과를 계산하여 Fig. 2에 정리하였다. GSE의 superoxide anion radical 포착효과에 대한 SC<sub>50</sub>값은 3.82 ± 0.07 ppm이고, EGCG와 vitamin C는 각각 2.67 ± 0.09 ppm, 10.50 ± 1.12 ppm으로 나타났다. 따라서 GSE는 EGCG보다 약 1.4배 낮은

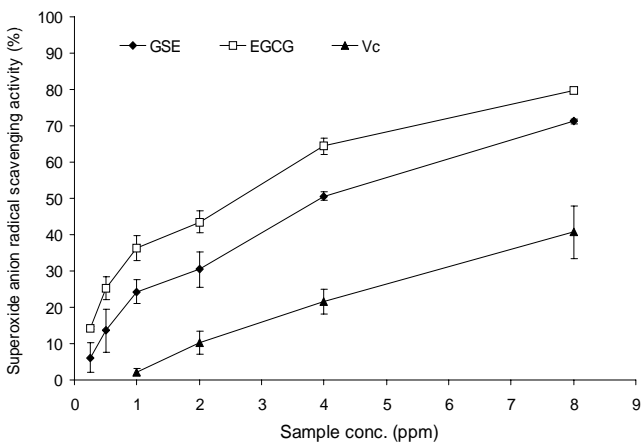


Fig. 2. Superoxide anion radical scavenging effect according to concentration of grape seed extract. GSE: grape seed extract, EGCG: epigallocatechin gallate, Vc: vitamin C. All bars were expressed as mean±SEM (n=3).

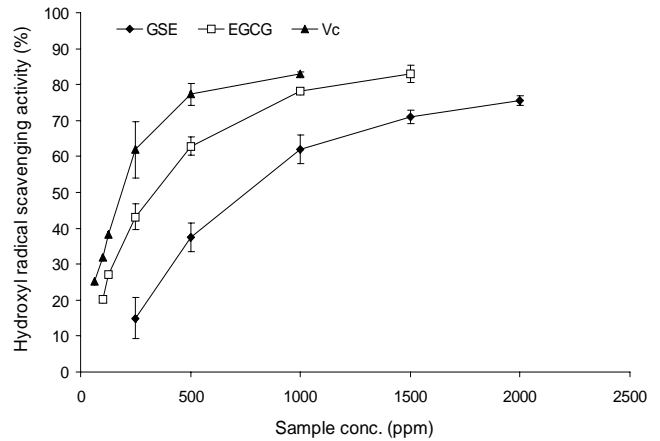


Fig. 3. Scavenging activity of hydroxyl radical by grape seed extract. GSE: grape seed extract, EGCG: epigallocatechin gallate, Vc: vitamin C. All bars were expressed as mean±SEM (n=3).

superoxide anion radical 포착효과를 나타냈지만 vitamin C보다는 약 2.7배 우수한 효과를 나타냈다.

Hydroxyl radical 소거효과

Hydroxyl radical 소거효과 측정은 Fenton 반응으로 생성된 ·OH에 의해 핵산의 구성당인 deoxyribose가 분해되는 정도를 TBA 발색법을 이용하여 측정한다. Fig. 3에서 나타난 바와 같이 GSE의 hydroxyl radical 소거효과에 대한 SC<sub>50</sub>값은 803.23 ± 27.16 ppm이며, EGCG와 vitamin C의 SC<sub>50</sub>값은 각각 358.83 ± 16.26 ppm, 187.09 ± 3.93 ppm으로 확인되었다. 따라서 GSE는 EGCG보다 약 2.2배, vitamin C보다는 약 4.3배 낮은 효과를 나타냈다.

본 연구결과들은 GSE가 높은 항산화효능을 나타내고 있음을 보이고 있으며, 이는 향후 GSE의 항산화 성분 분석 및 분리 동정이 필요하며 동시에 항산화 기전 연구를 통해 천연 항산화제로서의 개발 가능성을 시사하고 있다.

단백질분해효소 저해효과

단백질분해에 관여하는 효소 trypsin은 이자에서 활성이 없는 전구물질인 trypsinogen 형태로 만들어져 이자액 속에 분비된 후 소장 에 운반되어 enterokinase 또는 trypsin 자체에 의해 활성화되어 단백질을 분해하게 된다. α-Chymotrypsin은 역시 이자에서 활성이 없는 전구물질인 chymotrypsinogen의 형태로 소장에 분비되고, trypsin이나 chymotrypsin 자체에 의하여 활성화되어 단백질을 분해한다. GSE의 단백질분해효소 저해효과를 trypsin과 α-chymotrypsin에 대한 저해효과를 통해 알아본 결과를 Table 1에 나타내었다. GSE와 EGCG의 trypsin에 대한 IC<sub>50</sub>값은 각각 2.17 ± 0.59 ppm, 371.36 ± 0.97 ppm으로 나타났으며, α-chymotrypsin에 대한 IC<sub>50</sub>값은 각각 7.46 ± 1.25 ppm, 91.32 ± 0.27 ppm으로 나타났다. 이 같은 결과를 통해 GSE는 EGCG보다 우수한 단백질분해효소 저해효과를 갖고 있음을 알 수 있다. 따라서 GSE 섭취 시 단백질분해효소를 저해함으로써 체내

Table 1. Inhibition activity of trypsin and  $\alpha$ -chymotrypsin by grape seed extract (GSE)

	IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (ppm)	
	Trypsin	$\alpha$ -Chymotrypsin
GSE	2.17±0.59 <sup>2)</sup>	7.46±1.25
EGCG <sup>3)</sup>	371.36±0.97	91.32±0.27

<sup>1)</sup>IC<sub>50</sub>: The concentration of sample required for 50% inhibition.

<sup>2)</sup>Each values is expressed as mean±SEM of triplicate determinations (n=3).

<sup>3)</sup>EGCG: epigallocatechin gallate.

Table 2.  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of grape seed extract (GSE)

	IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (ppm)	
	$\alpha$ -Amylase	$\alpha$ -Glucosidase
GSE	18.25±3.54 <sup>2)</sup>	2.56±0.13
EGCG <sup>3)</sup>	106.72±6.40	11.61±1.87

<sup>1)</sup>IC<sub>50</sub>: The concentration of sample required for 50% inhibition.

<sup>2)</sup>Each values is expressed as mean±SEM of triplicate determinations (n=3).

<sup>3)</sup>EGCG: epigallocatechin gallate.

에서 분해되는 단백질의 양을 감소시켜, 과잉으로 흡수되는 단백질의 양을 제한함으로써 체중조절 및 비만 방지에 영향을 줄 것으로 생각된다. 또한 단백질분해효소 저해제는 암, 감염증, 고지혈증, 당뇨병, 자기면역 질환증, 노인성 치매 등의 치료제로도 개발되고 있다(22).

#### 탄수화물분해효소 저해효과

$\alpha$ -Amylase는 녹말(amylose 및 amylopectin)이나 glycogen과 같이  $\alpha$ -결합의 glucose로 되어 있는 다당류에 작용하여 포도당과 엿당으로 분해하는 소화효소이다. 또한  $\alpha$ -glucosidase는  $\alpha$ -amylase에 의해 분해된 당질 중 엿당을 최종적으로 단당류인 포도당으로 전환시킨다. 이러한 효소의 활성 저해는 당질 가수분해와 흡수과정을 지연시킴으로 식후 당 농도를 제한한다. Table 2에서와 같이 GSE와 EGCG의  $\alpha$ -amylase 저해효과를 측정된 결과 각각 IC<sub>50</sub>값이 18.25±3.54 ppm, 106.72±6.40 ppm으로 나타났으며,  $\alpha$ -glucosidase에 대한 IC<sub>50</sub>값은 2.56±0.13 ppm, 11.61±1.87 ppm으로 나타났다. 이 결과를 통해 GSE는 탄수화물 분해효소에 대한 저해효과가 EGCG보다 약 4~5배 우수한 것으로 확인되었다. 보통 체내에서 과량의 당질은 체중증가를 유발하는 지방으로 전환된다. 그러나 GSE를 이용하여 탄수화물 분해효소의 활성을 억제할 경우 과잉으로 섭취된 체내의 탄수화물의 분해 및 흡수율을 줄여줌으로써 비만예방에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다. 또한 탄수화물분해효소 특히  $\alpha$ -glucosidase는 식후 혈당치 증가에 밀접한 관계를 갖고 있으므로 천연물의  $\alpha$ -glucosidase 저해제를 탐색하여 혈당조절용 제품으로 개발하고자 하는 많은 연구들이 이루어지고 있다(23).

#### 지방분해효소 저해효과

식이로 섭취된 지방의 분해 및 흡수는 장내 낮은 pH에

Table 3. Inhibitory activity against pancreatic lipase by grape seed extract (GSE)

Sample	IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (ppm)
GSE	653.23±79.34 <sup>2)</sup>
EGCG <sup>3)</sup>	184.31±52.73

<sup>1)</sup>IC<sub>50</sub>: The concentration of sample required for 50% inhibition.

<sup>2)</sup>Each values is expressed as mean±SEM of triplicate determinations (n=3).

<sup>3)</sup>EGCG: epigallocatechin gallate.

의한 물리·화학적 지방의 변화와 아울러 여러 가지 효소 작용이 동반되는 매우 복잡한 경로를 거쳐 진행된다. 이들 여러 가지 효소 중에 pancreatic lipase는 triacylglycerol을 2-monoacylglycerol과 두 분자의 fatty acid로 분해하는 핵심적인 반응을 진행시키는 효소로 작용한다(24). 즉, pancreatic lipase는 섭취된 지방의 체내 흡수에 있어 매우 중요한 효소이므로 GSE의 pancreatic lipase의 억제 활성을 *in vitro*에서 조사하였다. GSE의 lipase에 대한 IC<sub>50</sub>값은 653.23±79.34 ppm으로 EGCG의 IC<sub>50</sub>값인 184.31±52.73 ppm보다 약 3.5배 낮은 효과를 나타냈지만(Table 3), 이전의 항비만 기능성식품 소재 탐색을 위한 연구에서 총 155종류의 식물 추출물을 탐색한 결과 26종의 식물 추출물만이 lipase 저해 효과가 확인되었다. 이중에서도 10종의 식물 추출물에서만 확실한 lipase 저해효과가 확인(25)된 것에 비교하면 GSE는 효과적으로 lipase를 저해하고 있음을 알 수 있다. 또한 일반적으로 천연 식물추출물의 경우 순수하게 정제된 후에는 활성이 더욱 높아지는 경향을 보이므로 이후 GSE의 유효성분의 분리 정제 과정이 추가되면 EGCG만큼 효과적으로 lipase를 억제할 수 있을 것으로 생각된다. GSE로부터 강력한 lipase 저해제를 개발하게 된다면 기존의 tetrahydrolipstatin (Orlistat, Ro 18-0647)을 복용함에 따라 발생되었던 부작용이 상당히 줄어들 것으로 예상되어 비만과 기타 성인병 등에 대한 예방 혹은 치료효과가 있는 기능성식품으로서 뿐만 아니라 의약품 시장에서도 상당한 경쟁력을 확보할 수 있을 것으로 기대된다.

결론적으로 GSE는 다량의 폴리페놀을 함유하고 있으며, 항산화제로 알려져 있는 vitamin C보다 우수한 항산화 효능을 갖고 있는 것으로 나타났다. 또한 소화효소인 단백질분해효소, 탄수화물분해효소 및 지방분해효소에 대한 저해효능이 우수한 것으로 확인되었다. 이같이 여러 소화효소들의 억제를 통해 각각의 영양소의 흡수율을 억제함으로써 소모열량과 비교하여 과도하게 섭취되었을 때 발생하는 잉여에너지가 체내에서 지방으로 축적되는 것을 예방할 수 있어 비만 개선에 도움을 줄 수 있을 것으로 예상된다. 이러한 결과가 실제로 체내에서 적용되는가를 동물실험이나 간이 임상시험을 통해 확인하기 위한 연구가 계속될 예정에 있다. 현재까지 진행된 대부분의 항비만 관련 연구들을 살펴보면 탐색된 장내 소화 효소를 억제하는 물질이 체내에서 지방세포 분화 저해, 체지방 감소, 체중감소 등의 효과가 더불어 확

인되었다(26,27). 그러므로 본 연구를 통해 *in vitro*에서 확인한 결과로부터 GSE 역시 항비만 소재로서 직접적인 체내효과도 긍정적인 결과를 보일 것으로 기대된다.

## 요 약

본 연구에서는 GSE의 항산화제와 비만 예방 및 치료제로서의 식품적용 가능성을 알아보기 위해 DPPH radical, superoxide anion radical 및 hydroxyl radical 포착효과를 확인하였으며, 몇 가지 소화효소(단백질 분해효소, 탄수화물 분해효소, 지방분해효소)의 저해효과를 측정하였다. 그 결과 GSE는 우수한 항산화 효과를 가지고 있는 것으로 나타났으며 특히, vitamin C보다 DPPH radical 소거효과가 약 2배, superoxide anion radical 소거효과가 약 2.7배 우수한 것으로 나타났다. 또한, GSE는 소화효소인 trypsin, α-chymotrypsin, α-amylase, α-glucosidase, lipase에 대한 저해효과를 갖고 있는 것으로 확인되었다. 이상의 결과로 GSE는 항산화 효과와 비만 예방 및 개선을 위한 유용한 소재로 사용될 수 있을 것이라 생각된다.

## 문 헌

1. Yoo MA, Chung HK, Kang MH. 2004. Evaluation of physicochemical properties in different cultivar grape seed waste. *Food Sci Biotechnol* 13: 26-29.
2. Jorge M, Richardo DS, Jacques R, Veronique C, Annie C, Michel M. 1991. Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry* 30: 1259-1264.
3. Castillo J, Benavente-García O, Lorente J, Alcaraz M, Redondo A, Ortuno A, A Del Rio J. 2000. Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavan-3-ols (procyranidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): Comparative study versus other phenolic and organic compounds. *J Agric Food Chem* 48: 1738-1745.
4. Joo SY, Choi MH, Chung HJ. 2004. Studies on the quality characteristics of functional muffin prepared with different levels of grape seed extract. *Korean J Food Culture* 19: 267-272.
5. Kim SI, Sim KH, Ju SY, Han YS. 2009. A study of anti-oxidative and hypoglycemic activities of Omija (*Schizandra chinensis* Baillon) extract under variable extract conditions. *Korean J Food & Nutr* 22: 41-47.
6. Thannickal VJ, Fanburg BL. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: 1005-1029.
7. Branen AL. 1975. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J Am Oil Chem Soc* 52: 59-63.
8. Park SJ, Oh DH. 2003. Free radical scavenging effect of seed and skin extract of black Olympia grape (*Vitis labruscana* L.). *Korean J Food Sci Technol* 35: 121-124.
9. Shin JH. 2006. A study on the extraction and properties of pancreatic lipase inhibition from *Cassia tora* Linne. *MS Thesis*. The University of Seoul, Seoul, Korea. p 1-61.
10. Yoon YS, Park YS, Hong JM, Choi SM, Lee HS, Hong SG. 2002. Development of anti-obesity dietary supplement decreasing nutrient absorption by digestive enzyme inhibition in gut. *J Korean Diet Assoc* 2: 199-205.
11. Drent ML, Larsson I, William-Olsson T, Quaade F, Czubayko F, Von Bergmann K, Strobel W, Sjötoro L, Van der Veen EA. 1995. Orlistat (RO 18-0647), a lipase inhibitor, in the treatment of human obesity: a multiple dose study. *Int J Obes* 19: 221-226.
12. Hadvay P, Lengsfeld H, Wolter H. 1988. Inhibition of pancreatic lipase *in vitro* by the covalent inhibitor tetrahydrolipstatin. *Biochem J* 256: 357-361.
13. Peter C, Williams G. 2001. Drug treatment of obesity: from past failures to future successes. *Br J Clin Pharmacol* 51: 135-140.
14. Gutfinger T. 1981. Polyphenol in olive oils. *JAOCS* 58: 966-972.
15. Yasushi S, Tsukase N, Keiko S, Hiroe Y, Hisashi Y. 1999. Stopped-flow and spectrophotometric study on radical scavenging by tea catechins and model compound. *Chem Pharm Bull* 47: 1369-1374.
16. Lim CS, Li CY, Kim YM, Lee WY, Rhee HI. 2005. The inhibitory effect of *Cornus walteri* extract against α-amylase. *J Korea Soc Appl Biol Chem* 48: 103-108.
17. Saisubramanian N, Krithika L, Dileena KP, Sivasubramanian S, Puvanakrishnan R. 2004. Lipase assay in soils by copper soap colorimetry. *Anal Biochem* 330: 70-73.
18. Lee KD, Kim JS, Bae JO, Yoon HS. 1992. Antioxidative effectiveness of water extract and ether in wormwood (*Artemisia montana* Pampan). *J Korean Soc Food Nutr* 21: 17-22.
19. Lee YS, Choi BD, Joo EY, Shin SR, Kim NW. 2009. Antioxidative activities and tyrosinase inhibition ability in various extracts of the *Vitex rotundifolia* seeds. *Korean J Food Preserv* 16: 101-108.
20. Ramarathnam N, Osawa T, Ochi H, Kawakishi S. 1995. The contribution of plant food antioxidants to human health trends. *Food Sci Technol* 6: 75-82.
21. Kim KB, Yoo KH, Park HY, Jeong JM. 2006. Anti-oxidative activities of commercial edible plant extracts distributed in Korea. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 49: 328-333.
22. Kim JB. 1998. Purification and properties of protease inhibitor from *Streptomyces* sp. SK-862. *Korean J Food & Nutr* 11: 678-682.
23. Mai TT, Thu NN, Tien PG, Van Ghuyen N. 2007. Alpha-glucosidase inhibitory and antioxidant activities of Vietnamese edible plants and their relationships with polyphenol contents. *J Nutr Sci Vitaminol* 53: 267-276.
24. Bitou N, Nimomiya M, Tsujita T, Okuda H. 1999. Screening of lipase inhibitors from marine algae. *Lipids* 34: 441-445.
25. Kim YJ, Kim BH, Lee SY, Kim MS, Park CS, Rhee MS, Lee KH, Kim DS. 2006. Screening of medicinal plants for development of functional food ingredients with anti-obesity. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 49: 221-226.
26. Kim MS, Kim BY, Park CS, Yoon BD, An SC, Oh YG, An JC. 2006. Inhibitory effect of *Thujae orientalis* semen extract on pancreatic lipase activity. *J Life Sci* 16: 328-332.
27. Yoon YS, Park YS, Hong JM, Choi SM, Lee HS, Hong SG. 2002. Development of anti-obesity dietary supplement decreasing nutrient absorption by digestive enzyme inhibition in gut. *J Korean Diet Assoc* 8: 199-205.

(2010년 2월 26일 접수; 2010년 4월 5일 채택)