

Flavonoid and Phenol Contents and Antioxidant Effect of Wine By-product Extracts

Jae Yeol Baek and Sun-Young Lim*

Division of Marine Bioscience, Korea Maritime and Ocean University, Busan 49112, Korea

Received April 7, 2016 / Revised June 24, 2016 / Accepted July 5, 2016

We investigated the flavonoid and phenol contents and antioxidant effect of wine by-product extract. Antioxidant effects were measured with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt radical cation (ABTS+) assays. Cellular reactive oxygen species (ROS) were measured with the dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) assay. 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*-BuOH fraction had more phenol contents. In the DPPH and ABTS assays, the MeOH extract showed a scavenging effect greater than that of the A+M extract ($p < 0.05$). The *n*-BuOH fraction (0.5 mg/ml concentrations) showed scavenging effects of 72% and 92%, respectively, in the DPPH and ABTS assays ($p < 0.05$). However, the 85% aq. MeOH fraction showed a 90% scavenging effect in the DPPH assay only. In 120 min ROS production assay, all tested fractions dose-dependently decreased cellular 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 *n*-BuOH fraction (0.1 mg/ml concentrations) inhibited cellular ROS production by 60%. These results indicate that the *n*-BuOH fraction of wine by-product extract inhibited cellular oxidation and may contain valuable bioactive compounds such as flavonoids and phenols.

Key words : Antioxidant, flavonoids, phenols, reactive oxygen species, wine by-product

서 론

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[23], 이러한 자유라디칼은 세포막 손상, 단백질 분해, 지질 산화, DNA 변성 등을 초래하여 각종 성인병을 유발한다[10]. 최근 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라 이러한 노화억제와 성인병 예방을 위한 항산화물질에 대한 관심도 함께 높아져 자유라디칼을 방어하는 항산화물질에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다[13, 27]. 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 BHA (butylated hydroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene) 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[1, 4, 14]. 그에 따라 기능성과 안전성면에서 두각을 나타내는 식물유래 천연항산화제의 연구가 활발히 진행되고 있는 추세이다[16, 24, 28].

과일은 여러 식물성 자원 중 가장 항산화능력이 뛰어난 천연자원으로 여러 가지 생리활성 작용을 나타내는 물질로 밝혀진 페놀성 화합물을 함유하고 있으며[21], 페놀성 화합물에 존재하는 phenolic hydroxyl (OH)기는 단백질 등과 결합하는 성질을 가지고 항산화, 항암 및 항균 효과 등의 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있다[7, 10]. 특히, 포도 열매에는 안토시아닌(anthocyanin), 프로시아니딘(procyanidin), 카테킨(catechin), 퀘세틴(querctetin), 레스페라트롤(resveratrol) 등 우리 몸에 이로운 폴리페놀 성분이 풍부하게 존재하기 때문에 국내외에서 성분분석, 항산화, 항암, 항균 활성을 포함한 다양한 생물학적 효능 연구가 이루어지고 있다[2, 17, 29, 31]. 이러한 다양한 생리활성을 가진 포도는 세계 과일 생산량 중 약 30%를 차지하며[20], 그 중 약 80%가 포도주 제조에 사용

*Corresponding author

Tel : +82-51-410-4757, Fax : +82-51-404-4750

E-mail : sylim@kmou.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

되고, 이로 인해 약 천만 톤의 포도주 부산물(포도 과피, 씨, 과육, 줄기 포함)이 짧은 수확기 동안 발생한다[24]. 한국의 경우, 2013년 생산량은 약 26만 톤, 2012년 생산량은 27만 8천 톤으로 그 중 약 7천 톤이 가공되었으며, 이에 따라 매년 수천 톤의 포도주 부산물이 발생하고 있는 실정이다[25]. 가공과정 중에 나오는 포도주 부산물은 폴리페놀류, 안토시아닌, 레스베라트롤 등의 생리활성물질을 높은 수준으로 함유하고 있는 것으로 보고되고 있으며[9, 11, 22], 플라보노이드, 식이섬유, 비타민 A 및 비타민 E 등도 함유하고 있다고 보고되었다[33].

이에 따라 본 연구에서는 포도주 가공 중에 발생하는 포도주 부산물의 항산화활성 검토를 위해 포도주 부산물을 유기용매로 추출 및 분획하여 총 플라보노이드 및 페놀 함량을 측정하고 포도주 부산물의 항산화 효과를 알아보려고 한다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 포도주 부산물은 까브스토리(경상북도 영천시)로부터 제공받아 사용하였다. 포도주 부산물을 자연 건조시킨 후, 실험 사용 전까지 -70℃의 deep freezer (NF-400 SF, NIHON FREEZER, Japan)에 냉동 보관하였다.

추출 및 분획

포도주 부산물의 유기용매 추출을 위하여 acetone:methylene chloride를 1:1 비율로 혼합하여 포도주 부산물이 충분히 잠기도록 하여 24시간 방치한 후 추출하였다. 이 과정을 2회 반복하여 얻은 여액은 40℃ 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+M과 동량의 MeOH을 부어 위와 동일한 방법으로 2회 반복한 후 농축하여 MeOH 추출물을 얻었다. 두 용매로부터 최대한 추출물을 혼합하여 다시 용매 극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hexane, 85% aq. MeOH, *n*-butanol (*n*-BuOH), water 분획물을 얻었다. 실험에는 각각의 추출물을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 세포배지로 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

총 플라보노이드 함량 측정

시료 중 총 플라보노이드(flavonoid) 함량은 Davis 등[3]의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 포도주 부산물 용매별 추출물 및 분획물 1 mg을 MeOH 1 ml에 녹여 시험관에 취하고 10 ml의 diethylene glycol을 가하여 잘 혼합한 후 1N NaOH 1 ml 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 반응 시킨다. 반응이 끝난 후 UV-visible spectrometer (Helios beta, Thermo electron corporation, USA)를 사용하여 420 nm에서 흡광도

를 측정하였다. 이때 표준물질은 rutin (Sigma Co., USA)을 사용하여 표준곡선에 의해서 총 플라보노이드 함량을 측정하였다.

총 페놀 함량 측정

총 페놀(phenol) 화합물 함량은 Folin-Denies법[28]을 응용하여 측정하였다. 추출물 및 분획물 1 mg을 MeOH 1 ml에 녹이고, 10배 희석한 희석액 2 ml에 2배 희석한 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 2 ml을 첨가하여 혼합한 다음 3분 동안 방치한 후 10% Na₂CO₃ 용액 2 ml을 넣고 1시간 동안 반응 시킨다. 반응이 끝난 후 UV-visible spectrometer (Helios beta, Thermo electron corporation, USA)를 사용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준물질로 tannic acid를 사용하였으며 시료와 동일한 방법으로 분석 후 얻은 표준곡선으로부터 총 페놀성 화합물 함량을 측정하였다.

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

시료의 DPPH 라디칼 소거활성[5] 측정을 위해 먼저 각 추출물 및 분획물을 MeOH로 농도 별로 희석하여 사용하였다. DPPH 2 mg을 ethanol (EtOH) 15 ml에 녹여 DPPH 원액을 조제하였다. DPPH 용액 1.2 ml에 DMSO 0.5 ml와 EtOH를 3 ml를 혼합하여 DPPH 희석액을 사용하였다. DPPH 희석액의 흡광도가 0.94~0.97이 되도록 하여 실험에 사용하였다. 시료 0.1 ml와 DPPH 희석액 0.9 ml를 섞은 후 10분 후 UV-visible spectrophotometer (Helios beta, Thermo electron corporation, USA)로 518 nm에서 측정하였다. 이때 대조군은 천연 항산화제인 L-ascorbic acid와 합성항산화제인 2,6-Ditertbutyl-4-methylpheno (BHT)를 사용하였다. 포도주 부산물의 DPPH 라디칼 소거활성은 다음의 식에 따라 계산하였다.

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

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

포도주 부산물에 대한 ABTS+ 라디칼 소거활성은 Re등의 방법[27]으로 측정하였다. 7 mM의 ABTS+와 2.45 mM의 potassium persulfate를 첨가하여 radical생성을 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. 대조군으로는 천연항산화제인 L-ascorbic acid와 합성항산화제인 BHT를 사용하였다. 포도주 부산물의 ABTS+ 라디칼 소거활성은 다음의 식에 따라 계산하였다.

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

세포 배양

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 Bio-medical Co., Ltd., Japan)에서 배양하면서 배양 중인 세포를 일주일에 2번 새로운 배지로 바꿔주었다. 일주일 후 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 뒤 0.05% trypsin-0.02% EDTA (Gibco, USA)로 부착된 세포를 분리하여 원심 분리 한 후 집적된 세포에 배지를 넣고 피펫으로 세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 cell culture flask에 10 ml씩 일정한 수로 분할하여 주입하고, 6~7일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

세포 내 활성산소종(reactive oxygen species) 측정

세포 내 활성산소종은 DCFH-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) assay [19]로 측정하였다. 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. 세포를 96 well cell culture plate에 분주한 후 24시간 배양하고, PBS로 씻은 후 20 μM DCFH-DA을 각 well에 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 20분간 pre-incubation하였다. 각 well에 시료를 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1시간 배양한 후, DCFH-DA을 없애고 세포는 다시 PBS로 씻은 후 500 μM H₂O₂를 처리하여 시간 별로 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 μM H₂O₂를 처리하고, blank군은 500 μM H₂O₂ 대신 PBS를 처리하여 측정하였다.

통계분석

실험결과는 Mean±SEM (Standard Error of Mean)으로 나타내었고 분석된 실험 데이터는 대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 자료로부터 one-way ANOVA를 실시하여 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

포도주 부산물 추출물 및 분획물의 총 플라보노이드 및 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 플라보노이드를 함유하는 것으로 나타났으며, 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±0.004 mg/g)보다 높은 페놀을 함유하는 것으로 나타났으며 분획물들 중에서 *n*-BuOH 분획물이 5.47±0.04 mg/g으로 가장 높게 함유하는 것으로 나타났다. 이에 따라 총 플라보노이드 및 페놀 함량은 MeOH 추출물, 85% aq. MeOH 및 *n*-BuOH 분획물에서 높게 나타남을 알 수 있었다. Lazze 등 [18]은 포도주 부산물 추출물은 malvidin, catechin, epicatechin 및 gallic acid를 각각 34.86, 69.53, 50.9 및 18.64 mg/kg 함유하는 것으로 보고하였다. Tournour 등[30]은 포르투갈산 포도주 부산물의 총 페놀함량은 69.3 mg/ GAE g 이었고 주요 페놀화합물은 synerigni acid와 (+)-catechin 이었다고 보고하였다. Hwang 등[12]은 포도씨의 품종에 따른 총 페놀 함량과 프로안토시아닌(proanthocyanidin)의 함량을 측정한 결과 총 페놀 함량은 16.71~28.60 mg/100 g, 프로안토시아닌 함량은 18.36~55.30 mg/100 g을 나타내었다고 보고하였다.

포도주 부산물 추출물 및 분획물의 DPPH 라디칼 소거활성

포도주 부산물 추출물 및 분획물의 DPPH 라디칼 소거활성은 활성산소를 제거할 수 있는 능력인 EDA (electron donating ability, %)로 Table 2에 나타내었다. 각 용매별 추출물

Table 1. Contents of total flavonoid and phenol in solvent extracts and fractions from wine by-product^a

Samples	Total flavonoid contents (mg/g)	Total phenol contents (mg/g)
A+M extract	26.4±0.77 ^c	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

^aValues are expressed as mean±SD. Values in the same column with different letters are significantly different at *p*<0.05 using Turkey's test.

Table 2. DPPH radical scavenging effect of solvent extracts and fractions from wine by-product*

Sample	Concentration (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. Values in the same column with different letters are significantly different at $p < 0.05$ using Turkey's test.

및 분획물을 각각 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 mg/ml의 농도로 대조군 (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 대조군인 BHT보다 EDA값이 높게 나타났으며, 0.5 mg/ml의 농도에서 71.8%의 소거능을 나타냄으로써 합성항산화제인 BHT (70.2%)보다 높은 라디칼 소거 효과를 나타내었다. 이 또한 *n*-BuOH 분획물의 높은 함량의 총 플라보노이드 및 페놀과 연관되어 있다고 여겨진다. Lazze 등[18]도 포도주 부산물 추출물의 항산화력을 DPPH법으로 측정된 결과 높은 라디칼 소거능을 보였다고 보고하였다. Tournour 등[30]은 포도주 부산물의 총 페놀함량과 항산화력은 높은 상관관계를 보였고 포도주 부산물 추출물은 oxygen radical absorbance capacity (ORAC) 실험에서 55-104%의 저해효과를 나타내었다고 보고하였다. Park 등[26]은 국내산 포도 캠벨종의 종자 및 과피의 추출조건과 그에 따른 DPPH법에 의한 자유라디칼 소거활성 비교결과 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 145배 이상의 높은 활성을 나타내었다고 보고하였다. Hwang 등[12]은 포도씨의 품종에 따른 총 페놀 함량과 프로안토시아닌(proanthocyanidin)의 함량을 측정하고, 항산화 활성간의 상관성을 비교한 결과 Ferric reducing/antioxidant power(FRAP)와 DPPH에 의한 항산화 활성 간의 상관성은 모두 0.92 이상이었으며, 총 페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거활성 사이의 상관성(0.98)이 가장 높았다고 보고하였다. 본 연구결과에서는 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.

포도주 부산물 추출물 및 분획물의 ABTS+ 라디칼 소거활성

포도주 부산물 추출물 및 분획물의 ABTS+ 라디칼 소거활성도 DPPH 라디칼 소거활성과 마찬가지로 전자공여능인 EDA로 Table 3에 나타내었다. 각 용매별 추출물 및 분획물을 각각 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 mg/ml의 농도로 대조군(L-ascorbic

Table 3. ABTS radical scavenging effect of solvent extracts and fractions from wine by product*

Sample	Concentration (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 ^b	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. Values in the same column with different letters are significantly different at $p < 0.05$ using Turkey's test.

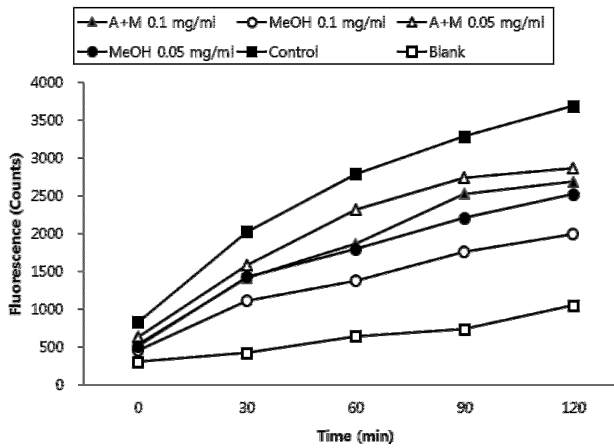


Fig. 1. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from wine by-product on levels of reactive oxygen species in HT-1080 human fibrosarcoma cells.

acid, BHT)과 비교하였다. MeOH 추출물과 *n*-BuOH 분획물은 합성항산화제인 BHT와 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 각각 92.4%로 대조군과 유사한 값을 나타내었다. 반면, 그 이하의 농도에서는 MeOH 추출물과 *n*-BuOH 분획물이 BHT와 비교하여 더 높은 EDA값을 나타내었다. Jara-Palacios 등[15]은 포도종별 백포도주 부산물 추출물의 항산화력을 ABTS법으로 측정 한 결과 총 플라보노이드와 총 페놀 함량이 높은 포도종 유래 백포도주 부산물 추출물의 라디칼 소거능이 높음을 확인하였고 보고하였다.

포도주 부산물 추출물 및 분획물의 세포 내 활성산소종 (reactive oxygen species) 생성 억제효과

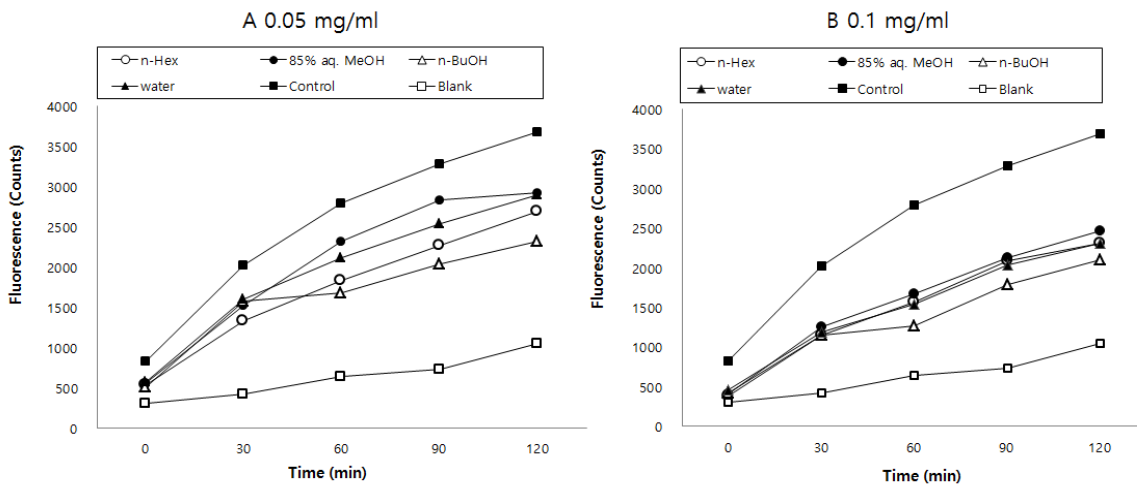


Fig. 2. Inhibitory effect of fractions from wine by-product extracts on levels of reactive oxygen species in HT-1080 human fibrosarcoma cells.

포도주 부산물의 A+M 및 MeOH 추출물을 0.05 및 0.1 mg/ml의 농도로 인체 섬유육종세포(HT-1080)에 처리하여 세포 내 활성 산소종을 측정 한 결과 두 추출물들 모두 측정시간 120분이 지남에 따라 높은 세포 내 활성산소종 억제효과를 나타내었다. MeOH 추출물의 경우 A+M 추출물과 비교 하였을 때 세포 내 활성산소종을 상대적으로 크게 억제하였으며 특히 MeOH 추출물 0.1 mg/ml 농도에서는 대조군과 비교하여 64%의 억제효과를 나타내었다(Fig. 1). 포도주 부산물 추출물을 *n*-Hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, Water로 다시 추출하여 얻은 분획물을 0.05 및 0.1 mg/ml의 농도로 처리하였을 때, 두 농도에서 모두 30분 동안 세포 내 활성산소종 억제율이 비슷하였지만, 60분 이후에서는 *n*-BuOH, *n*-Hexane, 85% aq. MeOH, water 분획물 순으로 세포 내 활성산소종 억제율이 높게 나타났다. 이들 중 가장 높은 세포 내 활성산소종 억제효과를 나타낸 *n*-BuOH 분획물의 경우 60%의 억제율을 보였다(Fig. 2). Lazz 등[18]은 Caco-2세포를 이용하여 포도주 부산물 추출물에 의한 항산화 효과를 측정 한 결과 *tert*-butylhydroperoxide (TBHH)로 유도된 ROS를 농도의존적으로 저해했다고 보고하였다. Wang 등[32]도 Caco-2 세포에서 포도주 부산물 페놀추출물을 20시간 전 처리한 후 TBHH로 유도된 ROS 생성을 측정 한 결과 세포 내 ROS 과생성을 억제하였고 환원glutathione (GSH) 생성을 증가시킴을 확인하여 포도주 부산물 페놀추출물이 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하였다고 보고하였다. 또한 Choi [6]등은 동물실험에서 포도씨 공급은 혈청 지질산화물 생성을 감소시켰고 catalase 및 glutathione-S-transferase 활성을 상승시켰다고 보고하였다. 이상의 결과들로부터 포도주 부산물로부터 얻어진 추출물은 MeOH 추출물의 총 플라보노이드 및 페놀 함량이 높게 나타났고 이는 높은 활성산소 소거능과 연관이 있었으며 분획물들 중에서는 *n*-BuOH 분획물의 항산화 효과 및 총 플라

보노이드 및 페놀 함량이 높게 나타났다. 따라서 포도 및 포도 씨와 비교했을 때 포도주 부산물의 경우 총 플라보노이드 및 총 페놀 함유량은 다소 낮게 나타났지만 항산화 효과는 지속되는 것으로 여겨지므로 향후 포도주 부산물의 응용이 기대되어진다.

감사의 글

본 과제(결과물)은 2013년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(NRF-2013R1A1A2004694)의 연구결과입니다.

References

- Brannen, A. L. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy toluene and butylated hydroxy anisole. *J. Am. Oilchem. Soc.* **52**, 59-63.
- Brito, P., Almeida, L. M. and Dinis, T. C. 2002. The interaction of resveratrol with ferrimyoglobin and peroxy-nitrite; protection against LDL oxidation. *Free Radic. Res.* **36**, 621-631.
- 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. 381-382.
- 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**, 1-4.
- 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**, 49-53.
- Choi, S. K., Zhang X. H. and Seo, J. S. 2012. Spresion of oxidative stress by grape seed supplementation in rats. *Nutr. Res. Preact.* **6**, 3-8.
- Droge, W. 2001. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**, 47-95.
- Flolin, O. and Denis, W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolydic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* **12**, 239-249.
- Francis, F. J. 1992. A new group of food colorants. *Trends Food Sci. Technol.* **3**, 27-30.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J. and Aruoma, O. I. 1995. The characterization of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* **33**, 601-617.
- 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**, 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. *Kor. J. Food Preserv.* **15**, 859-863.
- 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**, 417-420.
- Ito, N., Fukushima, S. and Hasebawa, A. 1983. Carcinogenicity of BHA in F344 rats. *J. Natl. Cancer Inst.* **70**, 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**, 150-157.
- 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. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **44**, 337-342.
- Kim, H. W., Chu, S. M. and Lee, D. J. 2006. Determination of resveratrol content in grapes and wines. *Kor. J. Crop. Sci.* **51**, 259-263.
- 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**, 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**, 227-231.
- Lee, E. J. and Kwon, J. H. 2006. Characteristics of microwave-assisted extraction for grape seed components with different solvents. *Kor. J. Food Preserv.* **13**, 216-222.
- Lee, J. H. and Lee, S. R. 1994. Analysis of phenolic substances content in Korean plant foods. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **26**, 310-316.
- Lu, Y. R. and Foo, L. Y. 1999. The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chem.* **65**, 1-8.
- 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**, 551-559.
- Ministry of agriculture, food and rural affairs. 2014. Agriculture, food and rural affairs statistics yearbook. pp. 117 Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs: Korea.
- 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. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **32**, 115-118.
- 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**, 1231-1237
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends*

- Plant Sci.* **2**, 152-159.
29. 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**, 79-89.
30. 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**, 397-406.
31. Um, M. Y. and Kim, M. K. 2002. Effect of grape intakes on lipid metabolism of rats during aging. *Kor. J. Nutr.* **35**, 713-728.
32. 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**, 65-74.
33. 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**, 207-212.

초록 : 포도주 부산물의 총 플라보노이드와 총 페놀 함량 및 항산화 효과

백재열 · 임선영*

(한국해양대학교 해양생명과학부)

포도주 가공 중에 발생하는 포도주 부산물의 항산화 활성 검토를 위해 포도주 부산물을 유기용매로 추출 및 분획하여 총 플라보노이드 및 총 페놀 함량을 측정하고 포도주 부산물의 항산화 효과를 분석하였다. 포도주 부산물의 분획 및 추출물의 총 플라보노이드의 양을 측정한 결과 MeOH 추출물은 A+M 추출물보다 높은 함량의 총 플라보노이드를 함유하는 것으로 나타났고 분획물들 중에서는 85% aq. MeOH 분획물이 105.1±0.93 mg/g으로 가장 높았으며 총 페놀 함량은 MeOH 추출물과 n-BuOH 분획물에서 높은 함량을 나타내었다. DPPH를 통한 라디칼 소거활성능을 측정한 결과, 0.5 mg/ml 첨가농도에서 MeOH 추출물은 74%의 소거율을 나타내었으며 분획물들 중에서는 n-BuOH 분획물이 72%의 소거활성을 나타내었다. 또한 ABTS+를 통한 라디칼 소거활성능을 측정한 결과, 0.5 mg/ml 첨가농도에서 85% aq. MeOH 및 n-BuOH 분획물들은 각각 90% 및 92% 소거활성을 나타내어 동일한 BHT 농도에서 92%인 것과 비교해 보았을 경우 합성항산화제만큼 높은 항산화능을 나타내었다. 세포내 활성 산소종 소거 효과를 나타내는 ROS 실험을 통해 0.1 mg/ml 첨가농도에서 MeOH 추출물과 n-BuOH 분획물은 각각 64%와 60%의 소거 활성을 나타내었다. 이상의 결과를 종합해 보면 포도 및 포도씨와 비교했을 때 포도주 부산물의 경우 총 플라보노이드 및 총 페놀 함유량은 다소 낮았지만 항산화 효과도 지속되는 것으로 여겨지므로 향후 포도주 부산물의 응용이 기대되어진다.