

trans-resveratrol 고함유 적포도주의 기능성 및 저장 특성

안준배

서원대학교 의식산업학과

Properties of Functionalities and Storage of Red Wine Containing High Level of *trans*-Resveratrol

Jun-Bae Ahn

Department of Food Service Industry, Seowon University

Abstract

Among functional components in grape, *trans*-resveratrol has been known for its many pharmacological effects. In this study, 100 kg of red wine containing 4.89 mg/L of *trans*-resveratrol was produced. In order to investigate feasibility of commercialization, total polyphenol content, antioxidative effect and tyrosinase inhibition effect of the red wine were compared with several domestic and foreign red wines. The red wine from this study contained 3.49 g/L of polyphenol and removed 95.2% of free radical. These results showed that the polyphenol content and antioxidative effect of the red wine were much higher than those of several domestic and foreign red wines. Tyrosinase inhibition effect of the red wine was 62.4% and similar to that of several domestic and foreign red wines. As an initial step to evaluate stability of *trans*-resveratrol during long term storage (180 days of storage), changes of *trans*-resveratrol content were investigated at various temperature. After 180 days of storage at 4°C, 15°C and 30°C, the percentages of residual *trans*-resveratrol were 91%, 84% and 70%, respectively.

Key words: red wine, *trans*-resveratrol, antioxidative effect, tyrosinase inhibition effect

서 론

포도의 유익한 성분들 중 *trans*-resveratrol (3,5,4-trihydroxystilbene)은 UV조사, 금속이온 혹은 *Botrytis cinerea*나 *Plasmopara viticola* 감염에 의한 비생물학적 또는 생물학적 스트레스에 반응하여 여러 종류의 식물에서 생산되는 방어물질이다 (Adrian *et al.*, 1996; Jeandet *et al.*, 1991; Langcake와 Pryce, 1979; Paul *et al.*, 1998; Sarig *et al.*, 1997). *trans*-resveratrol은 항산화작용 (Lee *et al.*, 2003; Han *et al.*, 1984; Hascalik *et al.*, 2004), 항염증작용 (Hur *et al.*, 2001; Leiro *et al.*, 2004; Szewczuk *et al.*,

2004), 암세포 성장억제작용 (Carbo *et al.*, 1999; Hurh *et al.*, 1999; Jang *et al.*, 1997; Liontas와 Yeager, 2004; Le Corre *et al.*, 2004), 혈소판 응집 억제 및 심장질환 예방효과 (Pace-Asciak *et al.*, 1995; Pendurthi *et al.*, 1999; Renaud & De Lorgeril, 1992) 등 다양한 생리활성이 발견되면서 기능성 식품 또는 의약품 소재로 주목 받고 있다.

선행 연구(Ahn, 2006)를 통해 고부가가치 포도가 공품을 개발하기 위하여 국내산 포도 및 *trans*-resveratrol이 다량 함유된 것으로 알려진 송이가지를 활용하여 생리활성 성분인 *trans*-resveratrol이 다량 함유된 적포도주 제조 조건이 확립된 바 있다.

본 연구에서는 개발된 적포도주의 산업적 유용성과 경쟁력을 검토하기 위하여 100 kg 대량 발효 시험을 행하여 *trans*-resveratrol 고함유 적포도주를 제조하였고 국내의 적포도주들과 총 폴리페놀 함량, 항산화효과 및 tyrosinase저해효과를 비교 측정하여 보았다. 또한 유통시 생리활성 성분의 안정성을 확

Corresponding author: Jun-Bae Ahn, Professor, Department of Food Service Industry, Seowon University, 231 Mochung-dong, Heungduk-gu, Cheongju-shi, Chungbuk, 361-742, Republic of Korea.
Phone: +82-43-299-8461, Fax: +82-43-299-8460
E-mail: given@seowon.ac.kr

인하기 위하여 저장 온도에 따른 *trans-resveratrol*의 함량 변화를 추적하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용된 포도는 충북 영동에서 생산된 엠비에이(Muscat Bailey A, MBA)를 사용하였다.

trans-resveratrol 고함유 적포도주의 제조

선행연구의 결과 (Ahn, 2006)에 따라 엠비에이 포도에 *trans-resveratrol* 및 polyphenol이 다량 함유된 송이가지(fruit stem)를 1%(w/w)되게 첨가한 후 분쇄하여 균질화하고 발효 중에 포도 및 송이가지 분쇄물이 상부로 떠오르지 않도록 침지하여 30°C에서 8일간 발효하여 *trans-resveratrol*이 고농도로 함유된 적포도주를 제조하였다. 즉, MBA 포도 알갱이 89 kg과 송이가지 1 kg을 혼합하고 설탕 10 kg을 첨가하여 가당한 후 양조용 효모 20 g을 접종하였다. 30°C에서 8일간 배양 한 후 거즈로 걸러 발효액을 회수하여 공기가 닿지 않도록 밀봉한 후 4°C에서 90일간 숙성시켜 적포도주를 제조하였다.

trans-resveratrol 추출 및 정량

*trans-resveratrol*의 추출을 위하여 Kim 등(1999)의 방법을 변형하여 사용하였다. 포도주 50 mL에 동량의 에테르를 가한 후 3분간 격렬히 교반하고 에테르 층을 회수하였다. 같은 조작을 5회 반복하여 에테르 층을 회수 한 후 진공농축기를 사용하여 40°C에서 에테르를 휘발시켰다. 전 과정은 빛이 차단된 갈색 용기에서 수행되었으며 농축물을 5 mL acetonitrile에 용해 한 후 원심분리하여 상등액을 HPLC를 사용하여 *trans-resveratrol* 함량을 정량하였다. HPLC(Waters 2695, Milford, USA) 분석 장치를 사용하여 전처리된 시료의 *trans-resveratrol* 함량을 분석하였다. 컬럼은 GROM-SIL (250 mm×4 mm, Futecs, Daejeon, Korea)이었으며 photodiode array detector(Waters 2996, Milford, USA)를 검출에 사용하였다. 용매는 acetonitrile/water를 혼합하여 gradient 조건 하에서 흘려주었다. 유속은 0.3 mL/min으로 하고 20분까지 acetonitrile:water 비율을 3: 7, 45분까지 5:5, 55분까지 3:7로 조절하여 분석하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

시료 0.5 ml에 증류수 6.5 ml를 첨가하고 Folin-

ciocalteu's phenol reagent 0.5 ml를 가하여 3분간 방치하였다. Sodium carbonate 포화 용액 1 ml를 첨가하고 30분간 발색시킨 후 725 nm에서 흡광도를 측정하여 폴리페놀 함량을 정량하였다. 표준물질로는 포도에 많이 함유된 gallic acid를 사용하였다. 사용한 시료는 본 연구의 결과물, 국내산 포도주 3종, 프랑스산(2004), 칠레산(2003) 및 미국산(2003) 포도주를 시중에서 구입하여 사용하였다.

항산화 효과의 측정

항산화 효과는 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) free radical 소거법(Abe *et al.*, 2000)을 사용하여 측정하였다.

시료를 표준화하기 위하여 시료 100 ml를 감압 증류장치로 40°C에서 20분간 농축하여 에탄올을 휘발시키고 99.9% 에탄올을 15 ml 첨가한 후 증류수로 100 ml까지 정용한 후 1N NaOH를 사용하여 pH를 6.8로 조정하였다. 시료 0.5 ml에 DPPH 용액 4.5 ml를 넣고 10분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정된 값(S)과 시료 대신 15% ethanol을 사용하여 측정된 값(C)으로 부터 항산화 효과는 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{Antioxidative effect (\%)} = \{1 - (S / C)\} \times 100$$

Tyrosinase 저해 활성의 측정

Tyrosinase 저해활성은 Kim 등(1997)의 방법을 변형하여 사용하였다. 시료 100 ml를 감압증류장치로 40°C에서 20분간 농축하여 에탄올을 휘발시키고 증류수로 100 ml까지 정용한 후 1N NaOH를 사용하여 pH를 6.8로 조정하였다. Tyrosinase의 작용산물인 dopachrome의 생성억제 정도를 비색법으로 정량하여 각 시료의 저해 정도를 측정하였다. 상기 표준화된 시료의 tyrosinase 저해 활성을 측정하기 위하여 35°C 항온 수조에서 미리 조정 한 0.1 M phosphate buffer(pH 6.8) 0.2 ml, 5 mM L-DOPA 용액 0.2 ml 및 시료 0.5 ml의 혼합액에 tyrosinase (1,000 units/ml) 20 µl를 첨가하여 2분간 반응시킨 후 끓는 물에서 1분간 반응을 정지시켰다. 시료를 첨가하여 반응시킨 후 475 nm에서 흡광도를 측정 한 값 (S)과 시료 용액 대신 증류수를 첨가하여 흡광도를 측정 한 값 (C) 및 시료를 포함한 반응용액에 효소 대신 증류수를 첨가하여 측정 한 값 (B)으로부터 다음 식에 의해 저해율을 측정하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibition effect (\%)} = \{1 - (S - B) / C\} \times 100$$

저장 온도에 따른 *trans-resveratrol* 함량의 변화
90일간 숙성된 적포도주를 여과기(ABC cork Inc., Ontario, Canada)로 청정한 후 750 ml씩 갈색병에 병입하고 코르크 마개로 막아 4°C, 15°C, 30°C에서 저장하면서 10일 - 30일 간격으로 180일간 *trans-resveratrol* 함량을 측정하였다.

결과 및 고찰

trans-resveratrol 고함유 적포도주의 제조

엠비에이 포도 및 송이가지 혼합물 100 kg을 8일간 발효하고 90일간 숙성하여 적포도주를 얻었다. 발효 및 숙성 기간 중 *trans-resveratrol* 함량의 변화를 측정된 결과는 Fig. 1과 같았다. 발효 8일 후 최대 4.89 mg/L의 *trans-resveratrol* 함량을 보였고 4°C에서 숙성하는 동안에 다소 감소하기는 하였으나 급격한 변화는 관찰 되지 않았다. 90일 숙성 후에도 4.08 mg/L의 *trans-resveratrol*이 존재하여 83% 이상이 잔존하였다. 이는 전보(Ahn, 2006)에서 보고한 국내의 적포도주의 *trans-resveratrol* 함량 (0.19 - 3.39mg/L)에 비해 많은 양임을 알 수 있었다.

총 폴리페놀 함량

본 연구 결과물과 국내의 시판 포도주의 폴리페놀 함량을 정량한 결과는 Table 1과 같았다. 본 연구에 의해 개발된 적포도주의 총 폴리페놀 함량은 3.49 g/L에 이르러 실험에 사용한 시판 중인 국내의

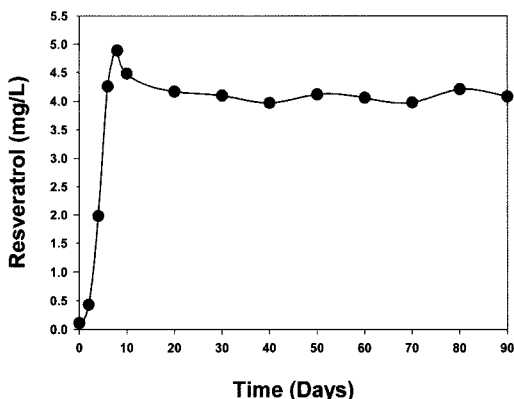


Fig. 1. Change of *trans-resveratrol* content during fermentation and aging.

Grape fruit, homogenized fruit stem and powder sugar were mixed and fermented for 8 days at 30°C. The fermented young wine was aged in cold room (4°C) for 90 days.

Table 1. Comparison of polyphenol content of the wine from this study with several domestic and foreign wines

Wines (country, vintage)	Polyphenol content (g/l)
This study	3.49
A (France, 2004)	2.66
B (USA, 2003)	2.85
C (Chile, 2003)	1.10
D (domestic, 2003)	1.86
E (domestic, 2004)	2.19
F (domestic, 2003)	2.08

포도주의 폴리페놀 함량인 1.10 - 2.85 g/L에 비해 월등히 많은 폴리페놀을 함유한 것으로 판명되었으므로 이는 본 실험에 사용한 송이가지에 포함된 폴리페놀이 다량 용출된 결과에 기인하는 것으로 판단된다.

항산화 효과의 측정

본 실험의 결과물 및 국내외산 포도주의 항산화 활성을 측정된 값은 Table 2와 같았다. 본 연구의 결과물의 유리 라디칼 제거 활성은 95.2%로써 국내의 시판 적포도주에 비해 높음을 확인 할 수 있었다. 이와 같은 결과는 본 연구의 결과물이 French paradox(Renaud & De Lorgeril, 1992)로 알려진 적포도주의 심장질환 예방효과에서도 우수한 효과를 나타낼 가능성을 보여주는 것이라 할 수 있다.

Tyrosinase 저해 효과의 측정

본 연구 결과물이 기능성 식품뿐만 아니라 적절한 알코올 제거 과정을 통해 기능성 미용소재로 활용될 가능성을 검증하기 위하여 tyrosinase의 저해 활성을 규명하였다. 본 실험 결과물 및 국내외 포도주의 tyrosinase 저해 활성을 비교한 결과는 Table 3에 나타내었다. 시료 중에는 프랑스산 포도주와 미국산 포도주에서 각각 65.1%, 67.6%의 강한 tyrosinase

Table 2. Antioxidative effects of the wine from this study and several domestic and foreign wines

Wines (country, vintage)	Antioxidative effect (%)
This study	95.2
A (France, 2004)	87.6
B (USA, 2003)	84.1
C (Chile, 2003)	73.6
D (domestic, 2003)	71.0
E (domestic, 2004)	80.3
F (domestic, 2003)	78.3

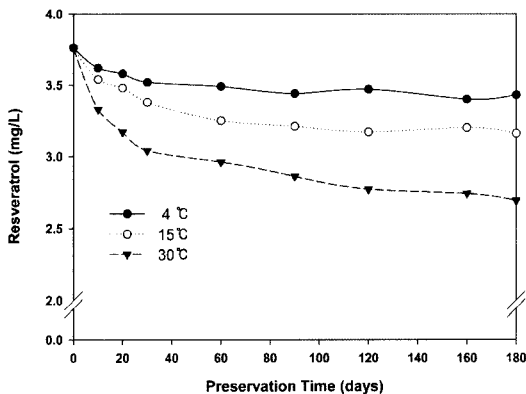
Table 3. Tyrosinase inhibition effect of the wine from this study and several domestic and foreign wines

Wines (country, vintage)	Tyrosinase Inhibition Effect (%)
This study	62.4
Wine A (France, 2004)	65.1
Wine B (USA, 2003)	67.6
Wine C (Chile, 2003)	57.3
Wine D (domestic, 2003)	37.1
Wine E (domestic, 2004)	44.9
Wine F (domestic, 2003)	40.5

저해활성이 관찰되었고 본 실험의 결과물은 이와 유사한 62.4%의 저해활성을 나타내었다. 이와 같은 결과는 프랑스와 일본에서 적포도주 추출물 또는 건조물이 미백 소재로 산업적으로 활용되고 있는 점을 감안하면 본 실험의 결과물이 미백 소재로 활용될 가능성을 보여 주는 결과라 할 수 있다.

저장 온도에 따른 *trans-resveratrol* 함량의 변화 저장시 생리활성 성분의 안정성을 확인하기 위하여 저장 온도에 따른 *trans-resveratrol*의 함량 변화를 알아본 결과는 Fig. 2와 같았다.

90일간 숙성된 적포도주를 여과하여 *trans-resveratrol* 함량을 측정 한 결과 3.76 mg/L이었다. 이를 병입하여 4°C, 15°C와 30°C에서 각각 저장하면서 *trans-resveratrol* 함량의 변화를 추적하였다. 각 저장 온도 모두 초기 10일간 *trans-resveratrol* 함량이 급격히 감소하였고 30일까지 감소 추세가 이어진 후 거의 변화가 없거나 감소 추세가 둔화됨을

**Fig. 2. Changes of *trans-resveratrol* content during storage at various temperatures.**

알 수 있었다. Trela와 Waterhouse(1996)는 산소가 존재 할 경우 *trans-resveratrol*이 파괴되고 빛을 조사 할 경우 *trans-resveratrol*이 *cis-resveratrol*로 변환됨을 보고한 바 있다. 저장 후 10일간 *trans-resveratrol* 함량이 급격히 감소하는 현상은 갈색 병에 병입 후 암소에 보관하였으므로 빛은 차단되었으나 병입 시 생긴 상공(head space)에 포함된 산소가 *trans-resveratrol*을 파괴 한 것으로 판단되며 저장 30일 이후에는 상공에 포함된 산소가 고갈되어 *trans-resveratrol*의 감소가 없거나 둔화되는 것으로 생각된다. 또한 저장 온도가 높아짐에 따라 *trans-resveratrol*의 감소속도가 증가한 것은 온도 증가에 따라 화학 반응 속도가 증가한데 따른 것으로 생각된다.

180일(6개월)까지 저장하였을 경우 4°C에서는 91%의 *trans-resveratrol*이 잔존하여 손실이 적었으며 15°C와 30°C에서는 각각 84%, 70%의 잔존율을 보여주었다. 추가적으로 1년 - 2년에 걸친 장기 보존시 *trans-resveratrol*의 안정성 시험이 행해지면 저장 및 유통 한도를 설정 할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

포도에 많이 함유된 *trans-resveratrol*은 항산화효과, 항염증효과 및 혈소판 응집억제 등 다양한 생리활성으로 주목 받고 있다. 전보에서는 국내에서 생산되는 포도와 송이가지를 이용하여 *trans-resveratrol*이 다량 함유된 적포도주의 생산 조건을 확립 한 바 있다. 본 연구에서는 개발된 적포도주의 산업적 유용성과 경쟁력을 검토하기 위하여 100 kg 대량 발효 시험을 행하여 4.89 mg/L의 *trans-resveratrol*을 함유하는 적포도주를 제조하였고 국내외 적포도주들과 총 폴리페놀 함량, 항산화효과 및 tyrosinase저해효과를 비교 측정하여 보았다. 또한 유통시 생리활성 성분의 안정성을 확인하기 위하여 저장 온도에 따른 *trans-resveratrol*의 함량 변화를 180일간 추적하였다. 개발된 적포도주는 총 폴리페놀 함량이 3.49 g/L, 유리 라디칼을 95.2%까지 제거하여 시판 중인 국내의 포도주에 비해 월등하게 높았다. 또한 tyrosinase 저해 활성은 62.4%로써 국내의 포도주와 비슷한 경향을 보여 주었다. 개발된 적포도주를 4°C, 15°C 및 30°C에서 180일 간 저장하였을 경우 각각 91%, 84% 및 70%의 *trans-resveratrol*이 잔존하였다.

참고문헌

- Abe N, Nemoto A, Tsuchiya Y, Hojo H and Hirota A. 2000. Studies of the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging mechanism for a 2-pyrone compound. *Biosci. Biotech. Biochem.* **64**: 306-333
- Adrian M, Jeandet P, Bessis R and Joubert JM. 1996. Induction of phytoalexin (resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated with aluminum chloride (AlCl₃). *J. Agric. Food Chem.* **44**: 1979-1981
- Ahn JB. 2006. Development of red wine containing high level of trans-resveratrol with domestic grape. *Food Engineering Progress* **10**: 226-232
- Carbo N, Costelli P, Baccino FM and Lopez-Soriano FJ. 1999. Resveratrol, a natural product present in wine, decreases tumor growth in a rat tumor model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **254**: 739-743
- Han YN, Ryu SY and Han BH. 1984. Antioxidant activity of resveratrol closely correlates with its monoamine oxidase A inhibitory activity. *Arch. Pharm. Res.* **32**: 801-804
- Hascalik S, Celik O, Turkoz Y, Hascalik M, Cigremis Y, Mizrak B and Yologlu S. 2004. Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, protects from ischemia-reperfusion damage of the ovaries. *Cynecol. Obstet. Invest.* **57**: 218-223
- Hur SK, Kim SS, Heo YH, Ahn SM, Lee BG and Lee SK. 2001. Effects of the grapevine shoot extract on free radical scavenging activity and inhibition of pro-inflammatory mediator production in RAW264.7 macrophages. *J. Appl. Pharmacol.* **9**: 188-193
- Hurh YJ, Kim JH, Seo HJ, Kong G and Surh YJ. 1999. Anticarcinogenic activity of resveratrol, a major antioxidant present in red wine : Induction of apoptosis in human cancer cells. *Environmental Mutagens & Carcinogens* **19**: 56-62
- Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, Fong HHS, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC and Pezzuto JM. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **275**: 218-220
- Jeandet P, Bessis R and Gautheron B. 1991. The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. *Am. J. Enol. Vitic.* **42**: 41-46
- Kim JK, Cha WS, Park JH, Oh SL, Cho YJ, Chun SS and Choi C. 1997. Inhibition effect against tyrosinase of condensed tannins from Korean green tea. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**: 173-174
- Kim KS, Ghim SY, Seu YB and Song BH. 1999. High level of trans-resveratrol, a natural anti-cancer agent, found in Korean Noul red wine. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 691-693
- Langcake P and Pryce RJ. 1979. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.* **9**: 77-86
- Le Corre L, Fustier P, Chalabi N, Bignon YJ and Bernard-Gallon D. 2004. Effects of resveratrol on the expression of a panel of genes interacting with the BRCA1 oncosuppressor in human breast cell line. *Clin. Chim. Acta* **344**: 115-121
- Lee JC, Lee SM, Kim JH, Ahn SM, Lee BG and Chang IS. 2003. Protective effect of resveratrol on the oxidative stress-induced inhibition of gap junctional intercellular communication in HaCaT keratinocytes. *J. Appl. Pharmacol.* **11**: 224-231
- Leiro J, Alvarez E, Arranz JA, Laguna R, Uriarte E and Orallo F. 2004. Effects of cis-resveratrol on inflammatory murine macrophages. *J. Leukocyte Biol.* **75**: 1156-1165
- Liontas A and Yeger H. 2004. Curcumin and resveratrol induce apoptosis and nuclear translocation and activation of p53 in human neuroblastoma. *Anticancer Res.* **24**: 987-998
- Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G and Goldberg MD. 1995. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis implications for protection against coronary heart disease. *Clin. Chim. Acta* **235**: 207-219
- Paul B, Chereyathmanjijil A, Masih I, Chapuis L and Benoit A. 1998. Biological control of *Botrytis cinerea* causing grey mold disease of grapevine and elicitation of stilbene phytoalexin(resveratrol) by a soil bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* **165**: 65-70
- Pendurthi UR, Williams JT and Rao LVM. 1999. Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells: A possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**: 419-426
- Renaud S and De Lorgeril M. 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* **339**: 1523-1526
- Sarig P, Zutkhi Y, Monjauze A, Lisker N and Ben-Arie R. 1997. Phytoalexin elicitation in grape berries and their susceptibility to *Rhizopus stolonifer*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **50**: 337-347
- Szewczuk LM, Forti L, Stivala LA and Penning TM. 2004. Resveratrol is a peroxidase-mediated inactivator of COX-1 but not COX-2. *J. Biol. Chem.* **279**: 22729-22737
- Trela BC and Waterhouse AL. 1996. Resveratrol: Isomeric molar absorptivities and stability. *J. Agric. Food Chem.* **44**: 1253-1257