

포도주에 함유된 항보체 활성 다당류

박소연¹, 이준수², 유광원³, 한남수², 이 호¹, 고종호⁴, 신광순^{1†}

¹경기대학교 식품생물공학과, ²충북대학교 식품공학과
³충주대학교 식품생명공학부, ⁴인성제약

Anti-Complementary Polysaccharides in Grape Wines

SoYeon Park¹, Junsoo Lee², Kwang-Won Yu³, Nam Soo Han²,
Ho Lee¹, JongHo Koh⁴ and Kwang-Soon Shin^{1†}

¹Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea

²Dept. of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

³Division of Food and Biotechnology, Chungju National University, Chungju 368-701, Korea

⁴Insung Pharm Co., Ltd., Chungbuk 369-823, Korea

Abstract

Crude polysaccharide fractions of commercially available grape wines (red wine, white wine and wild grape wine) were prepared by evaporation and ethanol precipitation to confirm and identify anti-complementary polysaccharides in the wines. When these fractions were evaluated for their anti-complementary activity, crude polysaccharide fractions of red wine (RW-0) and wild grape wine (WGW-0) showed higher anti-complementary activities than those of white wine (WW-0). RW-0 and WW-0 were further fractionated into RW-1, WW-1 as high-molecular fractions, and RW-2, WW-2 as low-molecular fractions through gel permeation column chromatography on Sephadex G-75. RW-1 had the most potent activity with the highest carbohydrate content (91.3%). Anti-complementary activity of red wine was higher than that of white wine, suggesting that active polysaccharides such as pectin and hemicellulose are mainly distributed in the grape skin which is removed during white wine making. In addition, high-molecular fractions, RW-1 and WW-1 with high contents of carbohydrate and high yields showed higher activities than those of low-molecular fractions, RW-2 and WW-2.

Key words: grape wine, anti-complementary activity, polysaccharide, gel permeation chromatography

서 론

보체계(complement system)는 고등생물에서 체액성 면역계의 일부를 담당하는 인자로서 C1부터 C9까지의 기본성분을 포함하는 약 20여종의 혈중 순환 단백질로 구성되어 있다(1). 보체계는 항원 침입 시 비 특이적으로 활성화되어 세균이나 virus 등의 표적세포를 분해하고, 대식세포와 림프구의 활성화, 화학 주화능 및 opsonization 등을 통해 체내 병원균을 제거하는 생체방어기구이다. 특히 이들은 숙주가 면역화되기 이전에 즉각 반응한다는 점에서 중요한 방어기구라 할 수 있으며(2,3), 이러한 보체 성분 중 일부가 결손된 유전적 질환자의 경우, 자기면역질환의 발병률이 높다는 사실에서 보체계가 건강유지에 필수적이라는 사실을 추측할 수 있다(4-6). 보체계는 감염방어, 염증방어, 알레르기 반응 등에 작용하고 있다고 알려져 있다. 천연물 중에는 주로 저분자 희분보다 고분자 희분에서 그 활성을 나타낸다고 보

고된 바 있으며, 최근 보체계를 활성화하는 물질(혹은 항보체 활성물질)들이 생체의 면역 부전 상태를 개선하거나 치료하는 면역 요법제로 개발되어 질병의 예방과 치료에 효과적으로 이용될 수 있는 가능성이 제시되고 있고 항보체 활성물질이 생체 내 대식세포 등의 면역세포들을 자극하여 임파구의 증식 및 활성화에 필요한 cytokine의 분비를 유도하여 암 치료에 도움이 될 수 있다는 가능성도 제시되고 있다(7,8).

과실류는 가장 널리 소모되고 있는 식물성 천연 식품소재의 하나로, 각종 색소, flavonoid, vitamin류, 무기질 및 식이 섬유가 다량 존재하여 균형 있는 영양원 공급에도 필수적인 재료로 알려져 있다. 이러한 과실을 기반으로 한 과실주 또한 웰빙 식품의 하나로 자리잡아가고 있다. 과실주 중에서도 가장 널리 알려진 포도주는 전 세계적으로 생산량과 소모량이 가장 많은 술로써, 현재 1년에 약 3억 kL가 생산되는 것으로 추정되고 있다. 우리나라의 2000년 포도주 총 소비량은 약 6,850 kL이고, 일인당 평균 0.24 L로 아직 미미한 실정이

†Corresponding author. E-mail: ksshin@kyonggi.ac.kr
Phone: 82-31-249-9655, Fax: 82-31-249-9655

지만(9), 장수와 건강유지를 위한 그 효능은 널리 알려지고 있다. 과실주는 생과와 비교할 때 발효과정에 기인하여 상당히 상이한 화학조성으로 구성되어 있으며, 생과에는 함유되어 있지 않은 미지의 물질과 생리활성을 가지는 성분을 함유할 가능성이 높다. 최근 과실주의 약리기능이 점차 과학적으로 입증되고 있는데 그 중 대표적인 것은 이른바 'French Paradox'로 알려져 있는데 포도주 속에 존재하는 polyphenol이 강력한 항산화작용에 의해 심장질환 등과 같은 각종 만성질환에 대해 예방효과를 갖는다는 연구가 그 대부분을 차지하고 있다(10). 그러나 polyphenol이 포도주의 모든 약리활성을 책임진다고는 볼 수 없으며, 포도주 중 존재하는 다당류 등의 타 성분에서도 새로운 생리활성이 존재할 가능성이 크다. 따라서 본 연구에서는 시판되고 있는 포도주를 대상으로 최근 다양한 생리활성이 있다고 보고되고 있는 항보체 활성 다당류를 분리하여 이들의 생리활성을 살펴보는 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에서 사용한 포도주는 적포도주(red wine), 백포도주(white wine)와 머루주(wild grape wine)가 사용되었으며, 일반 시판되고 있는 제품을 구입하였다. Gel permeation column chromatography를 위한 시약으로 사용된 Sephadex G-75는 Amersham Biosciences사로부터 구입하여 사용하였고, 그 밖의 시약은 시판되는 1급 이상의 분석용 시약을 사용하였다. 항보체 활성에 사용된 양의 감작적혈구(IgM-hemolysin sensitized sheep erythrocyte, EA cell)는 농촌진흥청에서 직접 수혈 받아온 양의 적혈구와 Sigma사에서 구입한 Hemolysin을 조합하여 사용하였으며, EDTA(ethylene-diamine tetraacetic acid)는 Sigma사 제품을 구입하여 사용하였다.

일반 분석 방법

총당 함량은 galactose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법으로(11), 산성당 함량은 β -D-galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxybiphenyl법으로(12), 단백질 함량은 bovine albumin을 표준물질로 하여 Lowry법으로(13), KDO(3-deoxy-D-manno-2-octubsonic acid)는 KDO를 표준물질로 하여 thiobarbituric acid법으로(14) 각각 정량 분석하였다.

시료의 조다당 획분의 조제

각각의 포도주 1 L를 5배 정도로 농축하고 부피의 4배에 해당되는 에탄올을 첨가하여 24시간 이상 교반한 후 7,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 침전물과 상등액을 분리하였다. 침전물은 dialysis를 거친 후 다시 농축하고 동결건조하여 시료의 조다당 획분을 조제하였다(Fig. 1).

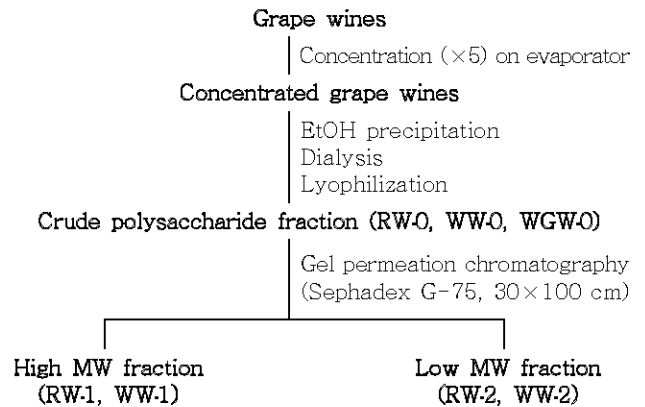


Fig. 1. Preparation procedure of crude polysaccharide fractions from grape wines.

Gel permeation column chromatography

Sephadex G-75를 acetate buffer에 넣어 90~100°C에서 3시간 정도 가열하여 12~15배 정도 부풀린다. 이 겔을 buffer와 함께 column(30×100 cm)에 넣고 충분한 양의 acetate buffer로 겔을 세척한다. RW-0와 WW-0 조다당 획분을 소량의 증류수에 녹여 column에 loading한 후 분획된 RW-1과 RW-2 및 WW-1과 WW-2의 획분을 회수, 투석하고 동결건조하여 각 획분의 구성분 함량과 함께 활성을 측정하였다.

항보체 활성 측정

정상인 혈청(normal human serum, NHS)의 제조: 건강한 성인의 혈액을 채취하여 실온에서 약 30분씩 방치하여 응고시킨 후, 응고된 혈액을 절단하고 약 5분간 상온에서 방치시킨다. 이 혈액을 다시 4°C에서 약 20분간 방치한 다음 원심분리(3,000 rpm, 20 min, 4°C)하여 혈청을 분리한 뒤 미량 원심분리용 튜브에 1 mL씩 분주하여 -70°C에서 냉동 보관하면서 실험에 사용하였다.

항보체 활성의 측정: 항보체 활성은 Mayer방법(15)을 이용하여 시료에 의한 보체 소비(complement consumption) 후 잔존하는 보체에 의한 적혈구 용혈 정도에 근거를 둔 complement fixation test로 측정하였다. 즉, 여러 농도(100, 500, 1,000 μ g/mL)로 증류수에 녹인 시료에 정상인의 혈청과 GVB⁺⁺(gelatin veronal buffered saline, pH 7.4, 2% gelatin, 500 μ M Ca⁺⁺, 2 mM Mg⁺⁺ 함유) 완충액을 각각 50 μ L씩 혼합하여 37°C에서 30분간 1차 반응시키고 GVB⁺⁺를 350 μ L를 가한 후 이를 10~160배로 연속 희석하였다. 여기에 다시 750 μ L의 GVB⁺⁺를 가한 후 양의 감작적혈구(IgM-sensitization sheep erythrocyte, EA Cell, 1×10^8 cell/mL) 250 μ L를 가해 37°C에서 60분간 2차 반응시키고 PBS 2.5 mL를 넣어 반응을 정지시켰다. 반응액을 2,500 rpm에서 약 10분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 412 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존 용혈활성을 측정하였다. 항보체 활성은 NHS와 buffer, 증류수만을 반응시킨 대조군의 총보체 용혈(50% total complement hemolysis, TCH₅₀, %)에 대한 저지율

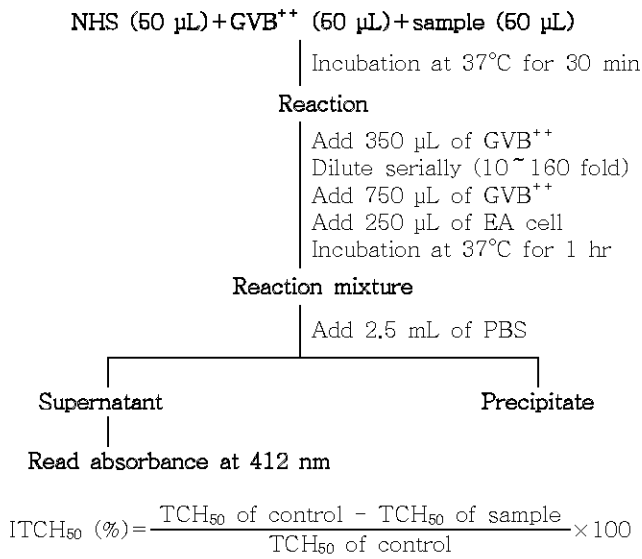


Fig. 2. Scheme of assay procedure for the anti-complementary activity.

NHS, normal human serum; GVB⁺⁺, gelatin veronal buffered saline; PBS, phosphate buffered saline; TCH₅₀, 50% total complement hemolysis; ITCH₅₀, inhibition of 50% total complement hemolysis; EA cell, IgM-hemolysis sensitized sheep erythrocyte (1 × 10⁸ cell/mL).

(inhibition of 50% total complement hemolysis, ITCH₅₀, %)로서 나타내었다(Fig. 2).

결과 및 고찰

포도주별 조다당 획분 수율과 항보체 활성 검토

각 포도주 별로 조다당 획분 수율과 항보체 활성능을 비교하기 위하여 일반적으로 시판되고 있는 적포도주, 백포도주 및 머루주의 과실주를 사용하여 측정하여 보았다. 조다당 획분의 수율은 각 과실주 1 L를 5배 농축하고 부피의 4배에

Table 1. Yields and anti-complementary activities of the crude polysaccharides from grape wines (at sample 1,000 μ g/mL)

Crude polysaccharide from fruit wines	Yield (mg/L)	Anti-complementary activity (ITCH ₅₀ , %)
Red wine (RW-0)	366	52.1
White wine (WW-0)	185	30.3
Wild grape wine (WGW-0)	125	71.8
PSK ¹⁾		60.0

¹⁾PSK: positive control, Krestin[™] (active polysaccharide) from *Coliolum versicolor*

해당하는 에탄올을 첨가하여 희수한 침전물을 투석, 동결건조하여 조제한 후 측정하였으며, 항보체 활성은 Mayer의 방법(15)에 따라 위와 같은 방법으로 조제한 조다당 획분을 대상으로 측정하였다. Table 1에 나타낸 것처럼 적포도주의 조다당 획분(RW-0)의 수율이 가장 높게 나타났으며(366 mg/L), 항보체 활성에 있어서도 백포도주의 조다당 획분(WW-0)을 제외하고 머루주(WGW-0)와 RW-0의 조다당 획분이 시료 농도 1,000 μ g/mL에서 positive control인 PSK(16)와 유사하거나 높은 수준의 활성을 갖는 것으로 나타났다(ITCH₅₀ 71.8%와 52.1%).

항보체 활성 다당류의 분리

적포도주와 백포도주 시료의 조다당 획분을 Sephadex G-75를 이용하여 gel permeation chromatography를 실행하였다. 각 그래프마다 peak의 앞부분을 고분자, 뒷부분을 저분자의 다당으로 간주하여 시료를 분리한 결과, RW-0은 RW-1과 RW-2의 2개 획분으로, WW-0은 WW-1과 WW-2의 2개 획분으로 분획되었으며(Fig. 3), 머루주는 분획되지 않았다(data not shown).

분리된 포도주 획분의 화학적 분석 및 항보체 활성 측정 분리된 적포도주 및 백포도주의 획분에 대한 일반적인 화

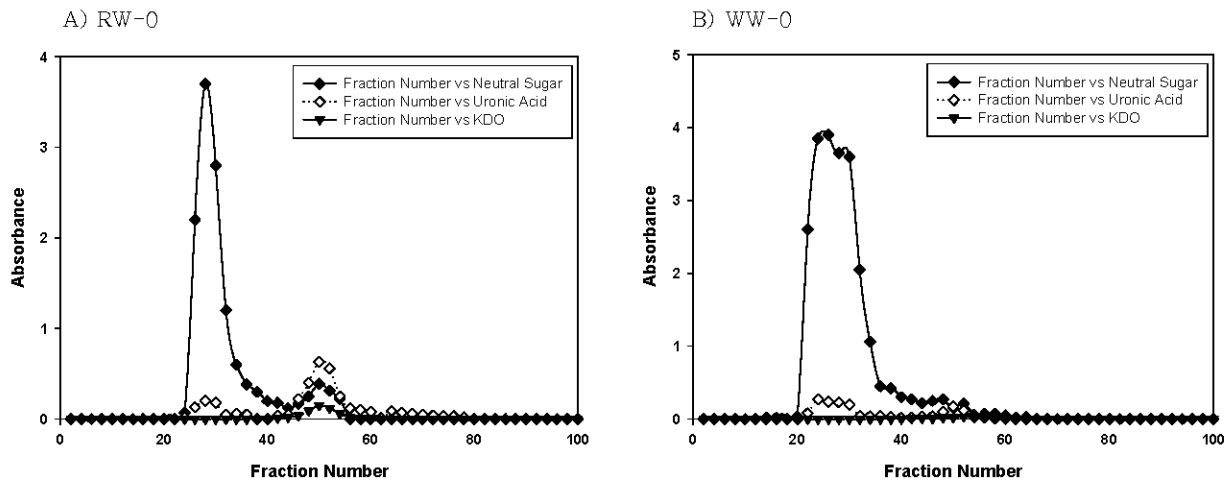


Fig. 3. Gel permeation column chromatography profile of crude polysaccharides, A) RW-0 and B) WW0, on Sephadex G-75.

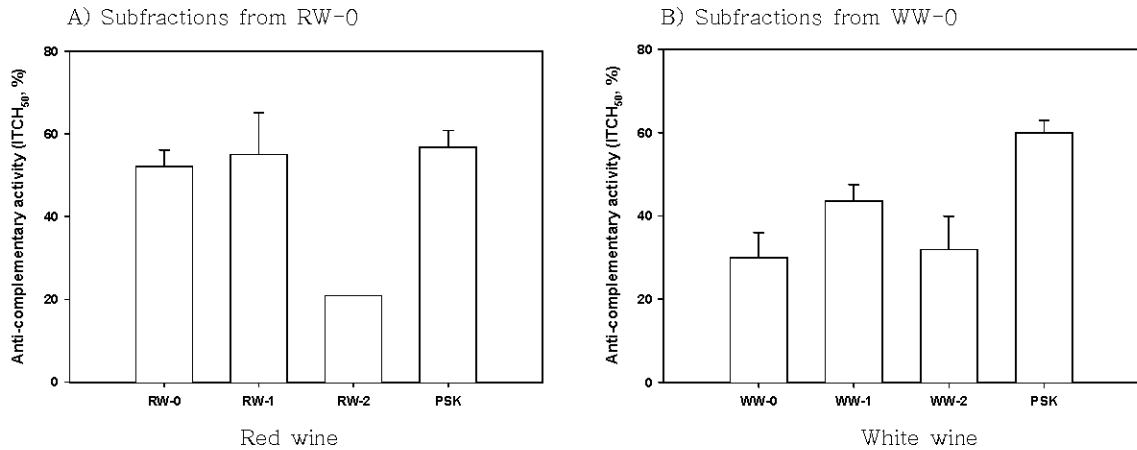


Fig. 4. Anti-complementary activities of subfractions from crude polysaccharides, A) RW-0 and B) WW-0, on Sephadex G-75.

Table 2. Chemical properties of subfractions from RW-0 and WW-0 on Sephadex G-75

Component	RW-1	RW-2	WW-1	WW-2
Yield	56.3	26.2	71.2	3.5
Carbohydrate ¹⁾	91.3	63.0	94.9	80.2
Uronic acid ²⁾	8.7	34.4	5.1	19.1
KDO ³⁾	0	2.7	0	0.7
Protein ⁴⁾	0	0	0	0

¹⁾Carbohydrate determination; phenol-sulfuric acid method.

²⁾Uronic acid determination; *m*-hydroxybiphenyl method.

³⁾KDO determination; thiobarbituric method.

⁴⁾Protein determination; Lowry method.

학적 분석을 하기 위하여 중성당, 산성당, 단백질 함량 등을 측정하였다(Table 2). RW-1, 2의 중성당과 산성당의 함량은 각각 91.3%와 8.7% 및 63.0%와 34.4%였으며, 단백질의 함량은 거의 측정되지 않았다. WW-1, 2의 중성당과 산성당의 함량은 각각 94.9%와 5.1% 및 80.2%와 19.1%였으며 단백질은 함유되지 않았다. 한편, RW-2, WW-2에서는 KDO가 측정되었는데 이러한 특이당은 Albersheim 등(17)이 무화과(*Acer pseudoplatanus*)와 벼(*Oryza sativa*) 등의 액체 세포 배양액에서 추출한 rhamnogalacturonan II(RG-II)의 구조에 독특하게 함유하고 있는 당으로서 RW-2 및 WW-2에 이러한 RG-II의 구조가 함유되어 있음을 추정할 수 있게 해준다. 한편 Table 1에서 살펴보았듯이 머루주와 적포도주 조다당획분의 항보체 활성능은 positive control인 PSK와 비교하여 보았을 때 유사하거나 높은 활성을 가지고 있는 것으로 확인되었다. 그러나 이를 Fig. 3의 결과에서 보여주는 것처럼 Sephadex G-75에 의해 분획하여 고분자 및 저분자의 획분으로 회수한 RW-1과 WW-1 및 RW-2와 WW-2를 조제한 경우, 시료의 조다당획분(RW-0, WW-0)과 gel permeation chromatography에 의한 분리한 RW-1과 2 및 WW-1과 2의 항보체 활성능을 비교해 보았을 때, Fig. 4에서 보는 바와 같이 분리 전의 조다당획분보다 분리된 RW-1과

WW-1획분의 활성이 유의적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다. 즉, RW-0은 약 52.1%의 ITCH₅₀의 활성을 보였으나 RW-1과 RW-2는 각각 55.0%와 20.9%의 활성을 나타내었으며, WW-0은 약 30.0%의 활성을 가졌으나, WW-1과 WW-2는 각각 43.5%와 31.9%를 보여주었으며, 특히 RW-1획분이 가장 높은 활성을 나타내었다. 활성이 높은 RW-1을 농도를 달리하여 항보체 활성을 측정해 본 결과(data not shown) 시료의 농도를 100, 500, 1,000 µg/mL로 달리하였을 때, 가장 높은 농도인 1,000 µg/mL의 농도에서 활성이 가장 강함을 알 수 있었다.

이러한 결과로부터 포도주에서 항보체 활성에 관여하는 다당류는 백포도주보다는 적포도주에 많이 함유되어 있음을 알 수 있었으며 이는 제조방법에 의한 차이로서 펙틴류와 hemicellulose 등이 다량으로 함유되어 있는 포도껍질을 함께 발효시키는 적포도주가 활성 다당류의 높은 함량을 보임에서 기인하는 것으로 추정하였다. 또한 종류별 포도주의 다당류 분리를 통하여 항보체 활성을 측정된 결과, 조다당획분과 비교하여 고분자 획분에서 활성이 높음을 확인하였다. 향후 정제 및 구조분석 등을 통하여 포도주에 함유된 활성 다당류의 물질을 규명할 것이며 이를 통해 과실주로부터 보다 높은 생리활성을 갖는 물질의 분리 및 이를 기능성 식품의 소재화로 적용하고자 한다.

요 약

포도주에 함유된 항보체 활성 다당류를 규명 및 분리하기 위하여 포도와 관련된 과실주로부터 조다당획분을 시판되고 있는 적포도주, 백포도주 및 머루주로부터 농축과 에탄올 침전을 통하여 조제한 경우, 항보체 활성의 검토 결과, 적포도주의 조다당획분(RW-0)이 백포도주의 획분(WW-0)보다 더 높은 활성을 보여주었다. 항보체 활성을 갖는 포도주의 조다당획분 중 Sephadex G-75의 gel permeation chro-

matography를 통하여 고분자 획분으로 RW-1과 WW-1으로, 저분자 획분으로 RW-2와 WW-2로 분획되었으며 머루주의 경우에는 분획되지 않았다. 분획된 획분 중 RW-1이 가장 높은 활성을 보여주었으며 91.3%의 당이 함유되어 있음을 확인할 수 있었다. 적포도주의 항보체 활성이 백포도주의 획분보다 높은 활성을 갖는 것은 펙틴과 헤미셀룰로오즈 등이 함유된 포도껍질로부터 활성 다당이 기인하는 것으로 보이며, 높은 당 함량과 수율을 보이는 고분자 획분, RW-1과 WW-1이 저분자 획분보다 활성이 높음을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 농림부/농림기술센터 지정 포도연구사업단의 연구비 지원에 의해 연구되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Rus H, Cudrici C, Nucleescu F. 2005. The role of the complement system in innate immunity. *Immunol Res* 33: 103-112.
- Kim ZY. 1986. Activations of the complement system. *Allergy* 6: 61-66.
- Ptak J, Lochman J. 2005. Immunoabsorption therapy and complement activation. *Transfus Apher Sci* 32: 263-267.
- Janeway CA. 1968. Progress in immunology. Syndromes of diminished resistance to infection. *J Pediatr* 72: 885-903.
- Sinclair D, Wilde G, Bex S, Peters S. 2005. Complementing the patient: a complement component deficiency in a patient with recurrent infections and glomerulonephritis. *Clin Lab* 51: 505-507.
- Dragon-Durey MA, Frémeaux-Bacchi V. 2006. Complement component deficiencies in human disease. *Presse Med* 35: 861-870.
- Yamaguchi N, Sakai T, Yoshida S, Katayama Y, Kawai K. 1983. Anti-tumor activity of endotoxin depends on activation of serum complement fragments. *Gastroenterol Jpn* 18: 436-439.
- Jakobisiak M, Lasek W, Golab J. 2003. Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunol Lett* 90: 103-122.
- Korean Alcohol Liquor Industry Association. 2001. *Alcoholic Beverage News*. Seoul, p 11-15.
- Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. 1993. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 20: 454-457.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28: 350-356.
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal Biochem* 54: 484-489.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-274.
- Karkhanis YD, Zeltner JY, Jackson JJ, Carlo DJ. 1978. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria. *Anal Biochem* 85: 595-601.
- Mayer MM. 1971. Complement and complement fixation. In *Experimental Immunology*. 2nd ed. Kabat EA, Mayer MM, eds. Charles C Thomas Publisher, Illinois, p 133-240.
- Tsukagoshi S, Hashimoto Y, Fujii G, Kobayashi H, Nomoto K, Orita K. 1984. Krestin (PSK). *Cancer Treat Rev* 11: 131-155.
- Albersheim P, An J, Freshour G, Fuller MS, Guillen R, Ham KS, Hahn MG, Huang J, O'Neill M, Whitcombe A, Williams MV, York WS, Darvill AG. 1994. Structure and function studies of plant cell wall polysaccharide. *Biochem Soc Trans* 22: 374-378.

(2006년 8월 17일 접수; 2006년 9월 4일 채택)