

## 초임계 이산화탄소를 이용한 Resveratrol 함유 포도씨유 추출

<sup>1</sup>우 문 제 · 서 장 원 · † 변 상 요  
<sup>1</sup>광동제약(주), 아주대학교 생명분자공학부 생명공학전공  
(접수 : 2005. 9. 30., 게재승인 : 2005. 10. 23.)

### Extraction of Resveratrol Containing Grape Seed Oil with Supercritical Carbon Dioxide

Moon Jae Woo<sup>1</sup>, Jang-Won Seo, and Sang Yo Byun<sup>†</sup>

<sup>1</sup>Kwang Dong Pharmaceutical Co., Ltd., Department of Biotechnology, Ajou University

(Received : 2005. 9. 30., Accepted : 2005. 10. 23.)

Grape seed oil made by press or organic solvent extraction does not contain resveratrol, a bioactive compound. Supercritical carbon dioxide could extract oil containing resveratrol from grape seed. The extraction efficiency was mainly dependent on the water content in grape seed. More resveratrol was contained in the oil extracted with un-dried grape seed. No resveratrol was extracted with dried grape seed. Time course changes of grape seed oil extraction also resulted that resveratrol could be extracted by supercritical carbon dioxide with the positive influence of water.

**Key Words :** Supercritical fluid extraction, resveratrol, grape seed oil

#### 서 론

포도는 세계적으로 광범위하게 재배되는 덩굴성과수로 우리나라에서는 연간 약 30~40만 톤의 포도가 생산되고 있으며 포도의 가공과정에서 약 천 톤 정도의 포도씨가 부산물로 배출되는 것으로 추정된다. 하지만 아직 까지 우리나라에서는 버려지는 포도씨에 대해서 활용도가 거의 없다(1, 2). 포도 종자는 전체 포도 중량의 3-5%를 차지하며 항산화, 항암, 혈중콜레스테롤 저하 및 방부작용 등 여러 생리활성효과가 있고, 좋은 지방산을 구성으로 하는 오일을 함유하고 있다. 이렇게 많은 천연 항산화물질을 함유하고 있는 관계로 포도씨유는 다른 오일에 비해 산패가 늦게 일어나고 높은 온도에서 조리 시에도 휘발성이 강한 합성 항산화제와 달리 꾸준하게 산패를 방지해 준다(3-5). 일반적으로 식용지방 중 불포화 지방산은 혈청 콜레스테롤, 중성지방, VLDL, LDL의 수준을 낮추고 HDL의 수준은 증가시키거나 거의 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있다. 반대로 포화지방산은 반대의 결과를 불러온다.

포도씨유는 구성 지방산 중 linoleic acid가 65% 이상으로 대부분을 차지하며 불포화 지방산이 전체의 85% 이상을 가

지고 있어 anticholesterolemic diet의 좋은 소재로 이용될 가능성이 크다. 또한 다른 식물성 유지에 비해  $\beta$ -sitosterol 등의 phytosterol을 많이 함유하고 있다(6). 이러한 생리활성 물질 외에 resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene,  $C_{14}H_{12}O_3$ )도 포도의 각 부분에 분포되어 있는데, 이는 지방 과산화 억제, 자유 라디칼 소거, 항염작용, 항암작용, 암예방에 이르기까지 많은 생리활성을 지닌 물질이다. 포도 종자에도 종별에 따라 차이가 있기는 하지만 약 5  $\mu$ g/g (dry weight)정도를 함유하고 있는 것으로 알려졌다(7-9).

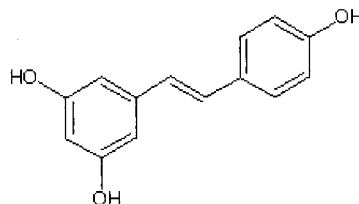


Figure 1. Resveratrol.

초임계 유체 추출 (SFE, supercritical fluid extraction) 공정은 최근 정정 기술로 각광 받고 있는 추출 공정이다. 이는 추출 용매로 임계온도와 임계압력 부근과 이상의 상태인 초임계 유체를 이용하는 것으로 기체와 비슷한 점도와 액체의 밀도를 지닌 유체로 높은 용해도와 액체의 100배에 달하는 확산계수로 빠른 물질 전달 속도를 나타낸다. 또한 온도와 압력의 변화, 보조용매의 사용으로 용매력의 변화가 용이하다는

† Corresponding Author : Department of Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon, Kyunggi 443-749, Korea  
Tel : +82-31-219-2451, Fax : +82-31-219-2394  
E-mail : sybyun@ajou.ac.kr

장점이 있다. 보통 사용하는 용매로는 이산화탄소를 많이 이용하는데 이는 임계온도가 낮음으로 추출과정 중 열에 의한 파괴를 최소화하며 제품으로부터 분리 배출이 쉽고, 환경오염에 대한 걱정을 줄일 수 있다. 게다가 가격도 저렴해서 산업화하기에도 부족함이 없다(10, 11).

본 연구에서는 초임계 이산화탄소를 이용하여 포도씨유를 추출하고, 기존 생산방법에 의하여 생산된 포도씨유와 생산수율 및 다양한 생리활성물질 추출 효율을 비교하고자 하였다. 또한 압착이나 유기 용매추출 같은 기존의 방법으로 생산되지 않는 포도의 유력한 생리활성물질인 resveratrol의 추출 가능성도 연구하였다.

### 재료 및 방법

#### 재료 및 시약

포도씨는 Campbell 종으로 김천 농장에서 구매하여 수세 후 그늘에서 말려 냉동 보관 하였다. 이후 분쇄하여 60℃에서 건조하여 시료의 수분량을 조절하여 사용하였다. Resveratrol은 순도 99% (Sigma, USA)를 구입하여 표준품으로 사용하였다. 용매추출을 위한 hexane과 HPLC 이동상은 99.5% 이상의 HPLC급 용매를 사용하였고, 이산화탄소는 99.9% 이상의 고순도를 사용하였다.

#### 기존 추출방법

기존 추출방법으로 SFE 방법으로 추출한 기름과 서로 비교하기 위한 대조군으로 사용하기 위해 expeller type 착유기(깨돌이, OED-3000, 신한일공업(주))를 사용하여 가열 압출방법으로 포도씨유를 얻었으며, 용매 추출법으로는 soxhlet장치를 이용하여 10시간 환류 추출하였다.

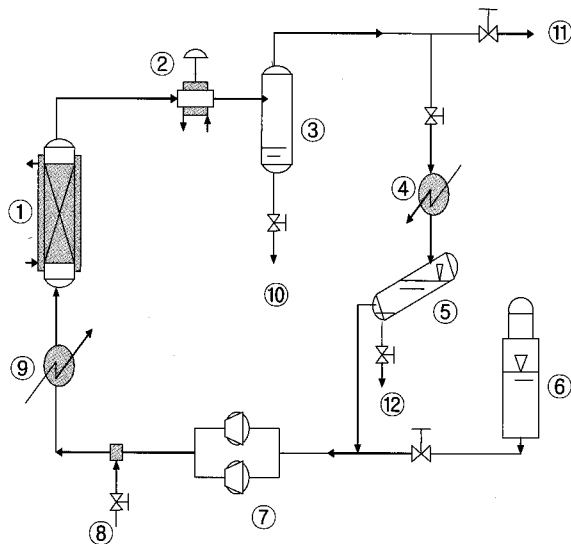


Figure 2. Flow diagram of SFE system used (① Extractor, ② Back pressure regulator, ③ Separator, ④ Chiller, ⑤ Working tank, ⑥ CO<sub>2</sub> make-up tank, ⑦ CO<sub>2</sub> pump, ⑧ Modifier, ⑨ Heat exchanger, ⑩ Product, grape seed oil, ⑪ CO<sub>2</sub> vent, ⑫ Drain).

#### 초임계 추출장치

Fig. 2와 같은 초임계 추출장치를 사용하였다. 액체상태의 이산화탄소를 pump로 가압하고 BPR (back pressure regulator)을 이용하여 압력을 조절하였다. 초임계 이산화탄소가 추출기를 통과하며 추출이 일어나고 추출기 뒤쪽에서 압력을 조절하는 BPR을 통하여 감압된 후 separator에서 추출물과 이산화탄소로 분리된다. 이때 이산화탄소는 기체 상태로 분리되어 chiller를 통과하면서 액체로 바뀌고 working tank에 저장되며 이는 다시 pump로 가압하여 추출기에서 다시 추출에 사용되어, 이산화탄소는 계속 recycle되어 사용된다.

#### 분석방법

Resveratrol 분석을 위하여 초임계유체로 추출한 포도씨유를 메탄올에 일정 농도 (0.1 g/ml)로 녹인다. 그 후 원심분리한 뒤 상등액 메탄올 층을 취하여 60℃에서 감압 농축한 후 0.45 μm membrane filter를 이용하여 filtering한 후에 HPLC에 injection하였다. 검출기는 UV 검출기 (UV 3000, Spectra SYSTEM, USA)를 사용하였고 검출 파장은 308 nm이었다. 분리용 column은 역상 (Synergi 4u fusion RP-80 (25 cm, 4.6 mm, 4 μm), Phenomenex, USA)을 사용하였다. 이동상은 water와 acetonitrile을 gradient 조건으로 사용하였다. 10분 동안 water : acetonitrile 70 : 30 (v/v)으로 흘려주고 10분에서 20분까지 50 : 50 (v/v)으로, 20분에서 30분까지 10 : 90 (v/v)로 linear gradient하게 올린다. 이후 5분간 초기 조건 water : acetonitrile 70 : 30 (v/v)으로 5분 동안 돌아간다. 유속은 1 ml/min으로 일정하게 하고 실온에서 실행하였다.

### 결과 및 고찰

#### 초임계 이산화탄소를 이용한 포도씨유 추출

건조하지 않은 포도씨를 분쇄하여 초임계 이산화탄소로 추출하였다. 추출 조건은 400 bar, 50℃이었고, 초임계유체의 유속은 3 ml/min로 하였다. 추출 결과, Fig. 2에서 보듯이 포도씨유는 초반에 대부분이 추출되어 나오다가 급격하게 추출 포화되는 추세를 보였다. 하지만 추출이 더 진행되었을 때 추출이 포화되지 않고 계속적으로 추출량이 증가되는 특이한 결과를 보였다. 이는 건조하지 않은 포도씨 시료를 분쇄하여 사용하였기 때문인데, 초기에는 포도씨유가 주로 추출되지만 이후 수분이 오일과 함께 추출되어 전체 추출량은 계속적으로 증가하는 결과를 얻었다. 초임계 이산화탄소를 이용하여 오일을 추출하는 경우 시료의 수분 함량 특성에 따라 추출 결과가 많이 달라지는데, 순수한 오일만 추출하려면 초기 시료의 수분 함량을 조절하여야 한다. 실험에 이용한 포도씨를 시료로 하여 수분을 제거하고 순수한 오일을 추출하면 약 7.7%의 추출 효율을 보였다. 하지만 수분을 함유하고 있는 시료로부터 추출하는 경우 12% 정도까지 추출 효율을 얻었다.

#### 생산방법에 따른 포도씨유의 resveratrol 함량

현재 포도씨유는 다양한 방법으로 생산 시판되고 있는데, 대부분 압착, 용매추출 방법으로 생산한다. 압착식 생산은 유기용매를 사용하지 않는다는 장점이 있지만 수율이 높지

않은 단점이 있다. 용매추출은 유기용매 핵산을 사용하여 수율을 높게 추출하지만 잔류 유기용매가 있어 이에 관한 다양한 문제의 소지가 있는 것이 단점이라 할 수 있다. 이에 비하여 초임계 추출은 유기용매를 사용하지 않으며 수율을 높게 추출할 수 있어 압착과 유기용매 추출의 문제점을 해결 보완하는 추출법이라 할 수 있다. 또한 기존 방법에 의하여 생산된 포도씨유에는 포도씨에 존재하는 resveratrol이 전혀 검출되지 않는 단점도 있었다. 이에 초임계유체로 추출한 포도씨유에는 resveratrol이 함유되어 있는지 분석하였다. 초임계 추출한 포도씨유 10 g을 100 ml의 메탄올로 교반 추출하였다. 4000 rpm, 15분간 원심분리 하고 상등 액을 취하여 분석에 사용하였다. HPLC 분석 결과 압착식과 용매 추출한 포도씨유에서는 resveratrol이 전혀 검출되지 않았으나 초임계 추출한 오일에는 0.2 mg/l이 검출되었다. 한편 resveratrol 추출 효율은 시료에 존재하는 resveratrol을 메탄올 추출 분석하여 비교한 결과 1.67%이었다. 이는 그리 높지 않은 추출 효율이지만 resveratrol이 오일과 성질이 다른 극성 물질임을 감안하면 추출효율이 높지 않은 결과를 이해할 수 있다. 하지만 동일 시료를 사용하였음에도 압착이나 용매추출 방법으로는 resveratrol이 전혀 추출되지 않았는데 초임계 추출을 통해서만 resveratrol이 추출 가능한 것은 초임계 추출의 특이성을 보여준다. 실험에 사용한 초임계 이산화탄소는 전형적인 비극성 용매이지만 400 bar 조건에서 일부 극성을 가지게 되어 결과적으로 resveratrol 추출이 가능해졌음을 알 수 있다. 이러한 결과로 resveratrol 외에도 카테킨과 같은 포도씨에 존재하는 다른 극성 유용성분들도 함께 추출 되었을 가능성이 높음을 어렵지 않게 추측할 수 있었다.

**시료 수분 함량에 따른 resveratrol 추출 효율**

초임계유체에 의한 resveratrol에는 시료에 존재하는 시료의 수분 함량이 영향을 미칠 것으로 판단하여 각기 달리 건조한 포도씨에서 resveratrol을 추출 비교하였다. 건조 전도는 세가지로 구분하였다. 포도씨를 분쇄하고 60℃ 오븐에서 건조시키면서 무게가 감소하지 않을 때까지 건조한 시료를 완전건조 (dried) 시료로 하고, 그 절반을 건조한 시료를 반건조 (half-dried) 시료로 하였다. 또한 전혀 건조하지 않은 (undried) 시료도 추출에 사용하여 비교 분석하였다. Fig. 3에서 보듯이 시료를 완전히 건조 하여 추출한 포도씨유에서는 resveratrol이 검출되지 않았다. 하지만 반건조 시킨 것에서 104 µg/l 그리고 전혀 건조하지 않은 시료에서 추출한 오일에는 212 µg/l의 resveratrol을 함유하고 있었다. 결국 시료의 수분 함량이 많을수록 resveratrol이 많이 추출되어짐을 알 수 있었다. 극성물질인 resveratrol은 비극성을 갖는 초임계 이산화탄소에 잘 용해되지 않는다. 하지만 물은 초임계 이산화탄소에 소량 용해가능하기 때문에 시료내의 수분이 보조 용매의 성격으로 작용하여 전체 초임계유체의 성질을 변형시켜 resveratrol이 추출된 것으로 생각된다. 이는 수분 함량에 따라 추출 효율이 증가하는 결과에 비추어 볼 때 가능성이 높다할 수 있다. 유기 용매를 보조 용매로 사용하지 않고 극성 물질을 용해할 수 있다는 것은 초임계 이산화탄소 추출에 있어서 커다란 단점을 줄여주는 역할을 할 수 있다. 특히 식품 산업에서 초임계유체추출을 활용할 때 유기용매를 사용하지 않는다는 것은 큰 이점으로 작용할 수 있다. 메탄올이나 에탄올 같은 경우 보조 용매로 사용하여 초임계 성질을 많이 바꿀 수 있지만 후의 유기용매의 제거 과정이 반드시 필요하고 완전히 제거하기 힘들 경우 식품으로 질이 떨어지기 때문이다. 하지만 물의 경우는 오일과 밀도 차이가 크고 간단한 원심분리 과정으로 분리 가능하다. 게다가 잔류량이 있더라도 식품으로 사용하기에 전혀 문제가 되지 않기 때문에 적절한 양의 물을 보조용매로 사용해서 추출하는 방법은 큰 장점을 가진다 할 수 있다.

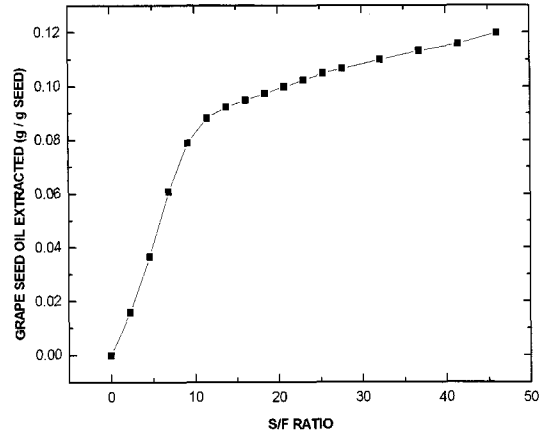


Figure 3. Kinetics of supercritical carbon dioxide extraction of grape seed oil. S/F ratio means the mass ratio of feed and supercritical carbon dioxide used for the extraction.

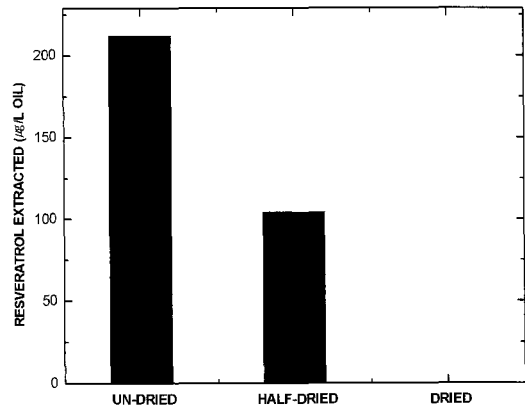


Figure 4. Resveratrol content in grape seed oil extracted from grape seed with different dryness.

**추출시간에 따른 영향**

초임계 이산화탄소를 이용하는 포도씨유 추출과정에서 어느 시기에 resveratrol이 추출되는지 실험 분석하였다. Fig. 4에서 보듯이 추출 중반으로 갈수록 resveratrol이 많이 추출되는 것을 알 수 있었다. 초반에는 초임계 이산화탄소가 쉽게 용해시킬 수 있는 오일을 먼저 추출되어 나오다가 오일이 어느 정도 추출된 후에 드러난 유용성 물질이 물과 함께 녹아서 나오는 결과라고 생각된다. 추출된 것의 fraction을 보아도

오일이 어느 정도 빠진 후에 물이 나오는 것으로 보아 초임계 이산화탄소와 친화력이 좋은 오일이 추출된 후에 물과의 용해가 용해되는 것으로 생각된다. 이러한 결과에 비추어 볼 때, resveratrol이 함유된 오일을 생산하는 방법에 있어 초반 추출에 오일을 잘 추출할 수 있는 조건으로 추출을 하되, 중반을 넘어서 물을 보조용매로 사용하면서 물을 용해시킬 수 있는 조건으로 바꾸어 추출함으로써 추출 효율을 극대화시킬 수 있을 것이라 생각된다.

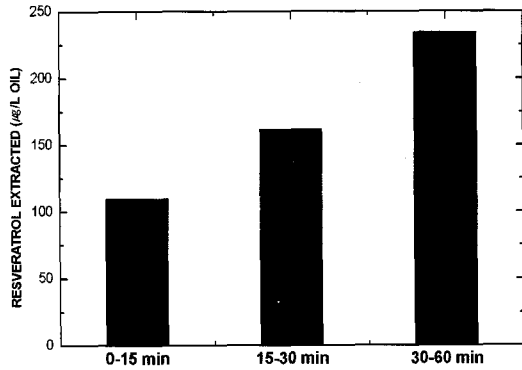


Figure 5. Resveratrol content in grape seed oil from different extraction time.

## 요약

압착이나 유기용매 추출방식으로 생산된 포도씨유에는 resveratrol이 함유되어있지 않다. 초임계 이산화탄소로 추출하는 경우 포도씨에 존재하는 resveratrol의 약 1.67%가 추출 함유됨을 확인하였다. 초임계 추출 효율은 포도씨 건조 정도에 따라서 달라졌는데, 시료에 수분이 전혀 있지 않은 경우는 resveratrol을 추출되지 않았다. 수분함량이 증가할수록 추출 효율이 증가하는데, 수분이 resveratrol을 추출에 중요한 역할을 하였다. 초임계유체 추출 시간에 따른 추출된 포도씨유의 resveratrol 함량은 초반보다 후반으로 갈수록 증가하는 경향을 나타내었다. 초반에 오일이 많이 추출되고 이후 수분이 빠져나오는 추출성향을 볼 때, resveratrol 추출에는 수분이 초임계유체의 성질에 큰 영향을 미쳐 추출 효율을 변화시키는 것으로 생각된다.

## 감사

본 연구는 한국과학재단지정 초정밀생물분리기술연구센터의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Kim, W. S. (1995), Grape processing industries, In *New Cultivation Method of grape*, Munun Publishing Co., Seoul, 58-92.
- Sung, J. K. (1996), The present of grape processing industries, In *grape, from Platation to Sales*, The Nongmin Press, Seoul, 23-41.
- Watanabe, S., J. Mesino, M. Kaka, and K. Kazama (1977), Extraction of polyphenols from the grape seeds separated from fermented pomaces into a model wine, *Studies on the polyphenols in wine (part3)*, 797.
- Yusuf Yilmaz, Romeo T. Toledo (2004), Health aspects of functional grape seed constituents, *Trends Food Sci. Technol.* **15**, 422-433.
- Hwang, J. T., H. C. Kang, T. S. Kim, and W. J. Park (1999), Lipid composition and properties of grape seed oils, *Korean J. Food Nutri.* **12**, 150-155.
- Y. C. Lee, H. J. Hwang (2002), Antioxidative properties of grape seeds extract, *Food Eng Prog.* **6**, 165-171.
- Choi, H. J., Shin H. S. (1990), Effect of dietary grapeseed oil on serum lipids in spontaneously hypertensive rats, *Korean J. Nutri.* **23** 467-476.
- Martinez, J. and Moreno, J. J. (2000), Effect of reveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production, *Biochem. Pharmacol.* **59**, 865-870.
- Fremont, L. (2000), Biological effects of resveratrol, *Life Sci.* **66**, 663-673.
- Y. J. Cho, J. E. Kim (2003), Contents of resveratrol in different parts of grapes, *Korean J. Food Technol.* **35**, 306-308.
- Taylor, L. T. (1996), *Supercritical Fluid Extraction*, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Lucien, F. P. and N. R. Foster (2000), Solubilities of solid mixtures in supercritical carbon dioxide: a review, *J. Supercrit. fluids* **17**, 111.