

# 포도가공 부산물로부터 화장품용 항산화물질의 추출 및 분리

김의진 · 이태호 · 신현재\*

조선대학교 공과대학 생명화학공학과

## Extraction and Isolation of Antioxidant Fraction from Waste of Grape Products for Cosmetic Application

Eui Jin Kim, Tae Ho Lee, and Hyun-Jae Shin\*

Department of Chemical & Biochemical Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

**Abstract** Anthocyanin and oligomeric proanthocyanidin (OPC) fractions showing antioxidizing activity are present in grape extracts. Grape extracts are widely used in cosmetic applications as functional ingredients. The aim of our study is to isolate the antioxidant fraction from waste of grape products. The extraction was done using soxhlet apparatus. Next, the extraction was subjected for identification of antioxidants by using HPLC. Antioxidant assay was performed by using 2,2-diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH) and superoxide dismutase (SOD) method. Antioxidizing activity was found to be higher in grape seed extract when compared to grape skin extract. Using the extract, a novel formula with multi lamella emulsion structure has been developed and its safety and stability were confirmed by standard protocols.

**Keywords:** Extraction, antioxidant fraction, grape waste, anthocyanin, OPC

### 서 론

포도는 전 세계적으로 가장 많이 소비되는 과일 중의 하나이다. 국내 포도의 이용 실태를 보면 2001년 포도 총 생산량 454,000 ton 중 14,800 ton (총생산량 대비 3.3%)만 가공에 이용되고 나머지는 생식용으로 이용되어 타 국가에 비해 특이한 소비구조를 가지고 있으며 (유럽이나 남미의 경우 생식용 20%, 가공용 80%) 이에 따라 작황이나 기타 외부 요인에 민감하게 소비시장이 움직이는 열악한 판매 구조가 형성되어 있다 [1]. 국내 포도가공 산업은 대부분 포도주, 포도즙, 포도잼에 국한되어 있으며 포도즙의 경우 가정이나 비인가 업소에서 한약 추출기를 사용하여 비위생적으로 생산되어 품질이 열악하다. 더욱이 우리나라 기후적 특징 상 8, 9월에 포도수확이 집중되면서 생과용으로 일시에 출고되므로 가격 등락이 심하고 생산 능가

들이 피해를 보는 경우가 많다. 또한 외국으로부터 생과가 수입되고 가공 투입량은 매년 줄어들어 포도가격은 더욱 하락하고 더불어 재배 면적이 감소되는 등 총체적인 포도 산업의 위기가 예상된다. 따라서 고품질, 고부가가치 포도가공품을 적극 생산하여 가공용 수요를 확대하고 국내 포도 산업의 안정을 도모 할 필요가 있다. 포도 가공 산업의 주된 원료는 포도의 과육, 과즙이며 가공도중 발생하는 포도 과피, 포도씨, 포도송이가지는 사료용으로 소량 이용되거나 전량 폐기되고 있고 이를 처리하는 비용도 막대하다 [2]. 특히 포도즙가공의 경우 이용률이 전체 중량의 약 70%로 나머지 전량은 폐기되므로 환경오염의 가능성도 크다고 볼 수 있다. 이러한 생산 구조적 약점을 가지고 있는 포도에는 건강에 미치는 유익한 성분인, 전화당을 비롯한 유기산과 미네랄, 탄닌, 각종 비타민 등이 다량 함유되어 있다. 또한 포도송이 가지에 존재하는 미량 성분으로서 항산화 물질로 알려진 resveratrol이 있으며, 포도과피에는 플라보노이드계 식물화학 성분인 anthocyanin이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다 [10-13]. 일반적으로 anthocyanin은 천연 항산화제로서 생명체의 노화와 질병을 유발하는 산

### \*Corresponding author

Tel: +82-62-230-7518, Fax: +82-62-230-7226

e-mail: shinhj@chosun.ac.kr

화물질 (free-radical : 자외선, 중금속, 활성산소, 아세테이트알디히드 등) 혹은 활성산소를 중화하거나 제거시키는 항산화 작용으로 피부 노화방지는 물론 주름개선에 효과가 있으며, 근시, 원시, 난시를 비롯하여 야맹증, 안정피로, 중심 및 주변망막변성 등의 안과질환으로 인한 시력저하를 개선하는 효과가 뛰어나다는 것이 알려져 있다 [3]. 포도과피에서 anthocyanin의 추출방법이 Sandra 등 [4]과 Mauro 등 [5]의 연구에 언급되어 있으나, 보다 간편하고 효율적으로 포도과피의 유효성분을 추출하는 방법의 제시가 필요한 실정이다. 또한 포도씨에는 oligomeric proanthocyanidins (OPCs)이라는 항산화물질이 함유되어 있다. 근래에 들어서는 포도씨에 포함된 항산화제를 추출한 후 고부가가치의 식품첨가물 및 화장품의 원료로 사용되고 있다 [6,7]. 본 연구에서는 포도과피 및 씨의 항산화 활성을 탐색하고 항산화 성분을 동정하였다. 또한 이를 이용하여 화장품제형도 개발하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

충북 옥천에 위치한 옥천농협 농산물가공공장에서 수매한 캠벨포도 (campbell early) 로 포도즙을 착즙하고 남은 부산물인 포도가공박을 입수하여 세척 후 40°C dry oven에서 수분이 완전히 없어질 때 까지 건조한 뒤 포도씨와 포도과피를 분리하여 가정용 믹서기 (LG전자, CM-9000, 정격시간 3분, 용량 500 mL)를 이용해 파쇄한 후 -4°C에 보관하여 사용하였다.

본 실험에서 사용된 시약으로는 HPLC 분석용 용매로서 acetonitrile (HPLC J.T. Baker, USA, CH<sub>3</sub>CN), water (HPLC 100% J.T. Baker, USA, H<sub>2</sub>O), membrane filter (Pall Gelman Lab, USA, pore size 0.45 µm, diameter 4 mm)를 사용하였다.

사용된 표준시약과 표준물질 및 유기용매는 Sigma-Aldrich사에서 구입하여 사용하였으며, 분석을 위한 표준물질들은 초저온냉장고 -70°C에서 보관하였다.

### 사용장비

본 실험에서 가용된 장비로는 동결건조기 (모델-PVTE100 R, 일신랩), HPLC (모델-LC-10AT, Shimadzu), dry oven (모델-DA-00-SP, Dong-A, 220 V/2.5 kW), rotary evaporator (모델-SB-1000, Eyla, Japan), 원심분리기 (5415R, Eppendorf, Germany)가 사용되었다.

### 포도과피로부터 anthocyanin의 추출

포도가공후 남은 포도가공박 30 kg을 세척, 건조하여 포도과피를 분리한 후 분쇄한다. 분쇄된 포도과피는 50% 에탄올을 포도과피 분말에 1 : 10의 비율로 첨가하여 침지

한다. 에탄올에 침지된 포도과피 분말을 70-80°C에서 24시간 환류추출 (reflux) 한다. 24시간 이후 에탄올과 과피분말을 착즙기 및 여과필터를 이용하여 분리하고, 분리된 상등액을 농축하여 와인색의 추출물 3.6 kg을 얻었다. 농축된 농축액에 2배의 증류수를 첨가한 후 5시간 방치한다. 이를 3000 rpm으로 원심분리한 후 감압여과를 수행하여 상등액을 회수한다.

### 포도씨로부터 oligomeric proanthocyanidins (OPCs)의 추출조건

포도가공 후 남은 포도가공박 60 kg을 세척, 건조하여 포도씨를 분리하여 분쇄하였다. 분쇄된 포도씨 분말을 3시간 동안 hexane에 침지시켜 탈지처리를 한다. 수세한 후 탈지하여 수득된 분쇄된 포도씨분말을 80% 에탄올과 1 : 10의 부피비로 혼합하여 3시간 동안 환류추출 (reflux) 한다. 여과된 추출물은 30°C 이하에서 감압농축 하여 포도씨의 에탄올 분획을 추출하여, 이를 Diaion HP 20 수지를 이용하여 분획하고 30°C 이하에서 감압농축 하여 11.4 g의 갈색 분말형태의 추출물을 얻었다.

### HPLC를 이용한 항산화물질의 분석

추출한 항산화물질의 정량분석은 high performance liquid chromatography (HPLC)법으로 정량하였다. 자세한 분석 조건은 Table 1과 같다.

**Table 1.** HPLC analysis conditions for anthocyanin and oligomeric proanthocyanidin identification

Anthocyanin	Oligomeric proanthocyanidin
Model : LC-10AT (Shimadzu co.)	Model : LC-20AD (Shimadzu co)
Column : Lichrosrb RP 18, (250 mm x 4 mm)	Column : Prontosil 120-5 C18 SH, (250 mm x 4.6 mm)
Flow rate : 2.5 mL/min	Flow rate : 1 mL/min
Solvent A : acetonitrile	Solvent A : 10% formic acid
Solvent B : 10% acetic acid 5% acetonitrile 1% phosphoric acid	Solvent B : 22.5% methanol 22.5% acetonitrile 10% formic acid
Detector : Shimadzu CBM-20A	Detector : Shimadzu CBM-20A
Detection Wavelength : 535 nm	Detection Wavelength : 270 nm
Injection Volume : 20 µL	Injection Volume : 10 µL

### 포도 추출물의 DPPH에 의한 free radical 소거 활성 측정

포도부산물로부터 추출한 유용성분에 대한 항산화 활성을 측정하기 위하여 2,2-diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH) 법을 사용하였다. DPPH 소거 활성도는 96 well microplate를 이용하여 측정하였으며, 실험에 사용된 DPPH solution은 15 mM의 농도에서 사용하였다. 대조군인 butylated hydroxy anisole (BHA), ascorbic acid는 1 mg/mL의 농도로 희석



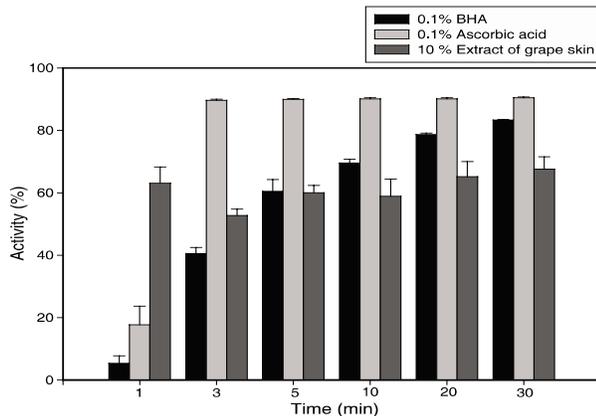


Fig. 2. DPPH activity assay of grape skin extract.

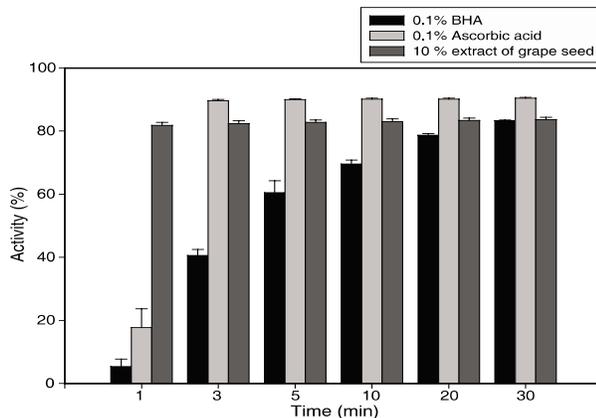


Fig. 3. DPPH activity assay of grape seed extract.

항산화 효소의 하나인 superoxide dismutase (SOD)는 세포에 해로운 환원산소종을 과산화수소로 전환시키는 반응 ( $2O_2 + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ )을 촉매하는 효소이며, SOD에 의해 생성된  $H_2O_2$ 는 peroxidase나 catalase에 의해 무해한 물분자와 산소분자로 전환된다. 포도추출물에 대한 SOD 유사활성을 측정할 결과 OPC가 높은 SOD 유사활성을 나타내었다. OPC의 경우 대조군으로 사용된 ascorbic acid와 chlorogenic acid와 거의 대등한 항산화력을 나타내어 천연 항산화소재로서 적합한 것으로 판단된다 (Fig. 4).

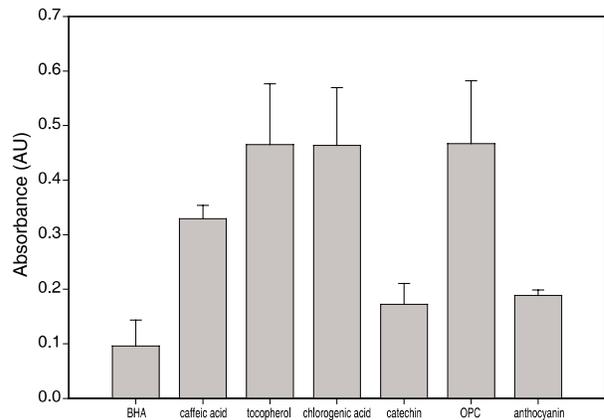


Fig. 4. SOD activity assay of grape skin and seed extract.

Multiple lamella emulsion 화장품 제형

각각의 성분들을 70-80°C 까지 가온하여 용해한 후 75°C

Table 2. Base formulation of multiple lamella emulsion cosmetics

Function	Ingredient		Cosmetic product base (%)
		INCI Name	Multiple lamella emulsion
Surfactant	Hydroxylated lecithin		1.00
Surfactant	Stearic acid		1.00
Surfactant	Glyceryl stearate SE		1.00
Surfactant	Sorbitan sesquioleate		1.00
Surfactant	Hydrogenated lecithin		0.80
Surfactant	Polysorbate 60		0.50
Emulsion stabilizer	Cetearyl alcohol		1.50
Skin conditioning agent	Water / butylene glycol / vitis vinifera (grape) vine extract		1.00
Skin conditioning agent	Caprylic/capric triglyceride		2.60
Skin conditioning agent	Squalane		2.00
Skin conditioning agent	Butylene glycol		0.50
Skin conditioning agent	Dimethicone		0.35
Skin conditioning agent	d-Panthenol		0.20
Skin conditioning agent	Dipotassium glycyrrhizate		0.15
Skin protectant	Allantoin		0.15
Humectant	Sodium hyaluronate (0.5% sol.)		6.50
Antioxidant	Tocopheryl acetate		0.50
pH adjuster	Triethanolamine		to pH 5 ~ 6
Viscosity increasing agent	Polyacrylamide / C13-14 iso-paraffin / Laureth-7		1.00
Preservative	Preservative		a suitable amount
Fragrance	Fragrance		a suitable amount
Solvent	Ethanol		1.00
Solvent	Distilled water		to 100

의 항온 조건에서 균질화기를 이용하여 (T.K. Homomixer Mark II, Tokushu Kika Kogyo Co. Ltd., Japan) 3,000 rpm 으로 유화한 후 냉각하였다. 계면활성제, 알코올, 인지질, 점 증제, 고급지방산, 비타민 등의 약효 성분과 자외선 차단제, 산화방지제, 보존제, 향료, 착색제, pH 조절제 등 일반적인 화장품 제조에 사용되는 성분을 첨가하였으며, Ethanol과 보존제는 40°C에서 첨가하였다. 본 연구를 통하여 surfactant-free, oil-free, water-in-silicone, oil-in-water 등 4종의 화장품 기초 제형들은 실온의 보관 조건과 0°C 및 40°C 이상의 가혹 조건에서도 최소 4주일 이상 안정화되어 전반적으로 안정성이 우수한 것으로 확인되었다 (data not shown). 또한 착향제, 착색제, pH 조절제 등 화장품 제조에 사용되어지는 첨가제가 소량 첨가되어도 안정성에 큰 영향을 주지 않는 것으로 관찰되었다.

Multiple lamella emulsion은 훼손된 피부 장벽 기능을 보완해 줄 수 있는 피부 관리를 목적으로 하는 화장품 제형으로서 본 연구에서는 훼손된 피부 장벽 기능의 복원을 위한 기초 제형 개발을 수행하였으며 유화제, 수상 성분, 유상 성분은 Table 2와 같다. 유상 성분과 수상 성분을 각각 70-80°C까지 가온하여 70-80°C의 항온 조건에서 균질화기로 3,000 rpm의 회전력을 이용하여 유화한 후 냉각하였다. Multiple lamella emulsion의 생성은 편광현미경 (OPTIPHOT-100, Nikon Co., JAPAN)으로 확인하였다. 편광현미경 상으로 특유의 liquid lamella crystal 구조를 가지는 것으로 확인되었다. 또한 실온의 보관 조건과 0°C 및 40°C 이상의 가혹 조건에서도 최소 4주일 이상 안정화되어 전반적으로 안정성이 우수한 것으로 확인되었다.

**화장품 제형의 안전성 및 안정도 시험**

상기 개발된 화장품 기본 제형 시료를 가지고 피부 안전성 시험을 실시하였다. 피검자 20명을 대상으로 Haye’s Test Chamber를 이용하여 상박의 피부 첩포 시험 (patch test)을 실시하였다. 단, 건선 (psoriasis), 습진 (eczema), 기타 피부 알러지 (allergy) 등의 경험이 있거나 임신, 수유모 또는

피임제, 항히스타민제 등을 복용하는 사람은 본 시험에서 제외하였다.

피부 안전성 시험을 실시한 화장품 시료들 중 열에 의한 상분리 현상이 현저하게 나타날 가능성이 큰 oil in water 제형과 multiple lamella emulsion에 대하여 0°C, 25°C, 35°C, 45°C cycle의 항온기에 보관하면서 1주일 단위로 열 안정성을 하기의 평가 기준으로 평가하여 Table 3에 나타내었다. 이러한 가혹 조건에서의 제품 안정도 시험은 4계절의 변화가 뚜렷한 국내 실정과 제품의 유화 안정도 확보에 의한 유통 기간 중의 상분리 현상의 방지를 위하여 실시하는 것으로서, 가혹 조건에서 제품의 안정도를 확보하여 제품이 시장에 유통되는 기간 동안 제품의 안정성을 예측하기 위하여 통상의 화장품 산업에서 일반적으로 실시되고 있는 것이다. Table 3에 나타난 바와 같이 화장품 시료는 45°C의 보관 조건에서 미소한 차이가 있을 뿐 전반적으로 열 안정성은 우수하였다. 이러한 결과들로부터 화장품 시료의 조성을 가지는 화장품은 상온 조건에서 장기간 유통되어도 제품의 안정도가 유지되는 안정화된 화장품으로 판단된다.

**요 약**

본 연구는 포도가공부산물로부터 유용성분을 추출하여 자원의 활용과 환경오염을 줄이고, 공정을 간결하게 하여 실제산업현장에서 이용할 수 있는 공정의 개발을 목적으로 하였다. 포도가공 부산물을 포도과피와 포도씨로 나누어 과피에서는 anthocyanin을 씨에서는 oligomeric proanthocyanidin (OPC)를 주 대상물질로 하여 추출하기 위한 공정을 개발하였다. 추출된 항산화물질은 HPLC를 이용하여 정량하였으며, 이들의 효능은 DPPH법, SOD법을 이용하여 대조군들과의 비교를 통하여 확인하였다. 두 방법 모두 포도씨 추출물의 효능이 포도과피 추출물보다 뛰어난 항산화도를 보였다. 이렇게 생산된 추출물을 이용하여 multiple lamella emulsion의 화장품 제형을 개발하였고 이 제형의 안전성

**Table 3.** Stability of cosmetic formulation

Period	0°C		25°C		35°C		45°C		cycle	
	Multiple lamella emulsion	Oil in water								
1 wk	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
2 wk	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
3 wk	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
4 wk	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
6 wk	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
8 wk	○	○	○	○	○	○	○	△	○	○
10 wk	○	○	○	○	○	○	○	△	○	○
12 wk	○	○	○	○	○	○	○	△	○	○

\* Symbols : ○ stable, △ unstable, × phase separation

과 안정성을 실험적으로 확인하였다.

접수 : 2009년 4월 22일, 게재승인 : 2009년 9월 8일

## REFERENCES

1. Shin, H. J., B. S. Kang, J. B. Ahn, and B. H. Kim (2007) Isolation and purification of resveratrol from a grape twig. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 22: 351-355.
2. Luz, R., C. Erasmo, M. Julia, M. Carles, R. Joan, G. Xavier, G. Terasa, S. Xavier, and S. Antoni (2009) Recovery of organic wastes in the spanish wine industry. Technical, economic and environmental analyses of the composting process. *J. Cleaner Prod.* 17: 830-838.
3. Kim, H., J. Deshane, S. Barnes, and S. Meleth (2006) Proteomics analysis of the actions of grape seed extract in rat brain: technological and biological implications for the study of the actions of psychoactive compounds. *Life Sci.* 78: 2060-2065.
4. Sandra, P., T. L. Maria, G. Giuseppe, A. Donato, and L. N. Ennio (2009) Rapid screening for anthocyanins and anthocyanin dimers in crude grape extract by high performance liquid chromatography coupled with diode array detection and tandem mass spectrometry. *J. chromatogr. A* 1216: 3864-3868.
5. Mauro, B., C. Loredana, E. Elisa, L. Giulia, L. Luiga, R. Leonardo, S. Trifone, and V. Giuseppe (2008) An innovative method for purification of anthocyanins from grape skin extracts by liquid and sub-critical carbon dioxide. *Sep. Purif. Technol.* 64: 192-197.
6. Choi, Y. and J. Lee (2009) Antioxidant and antiproliferative properties of a tocotrienol-rich fraction. *Food Chem.* 114: 1386-1390.
7. Furiga, C., A. Lonvaud-Funel, and C. Badet (2009) *In vitro* study of antioxidant capacity and antibacterial activity on oral anaerobes of a grape seed extract. *Food Chem.* 113: 1037-1040.
8. Yang, J., T. E. Martinson, and R. H. Liu (2009) Phytochemical profile and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chem.* 116: 332-339.