

폴리에틸렌글리콜과 구연산 나트륨을 이용하여 포도껍질 추출물에서 항산화물질과 포도당 분리

신은민¹, 주영은¹, 정수민¹, 서재찬³, 김창준^{1,2*}

¹경상국립대학교 화학공학과 및 공학연구원

²경상국립대학교 나노신소재융합공학과

52828 경상남도 진주시 진주대로 501

³주반석인더스트리즈

김해시 장유로 373번길 50

(2023년 5월 11일 접수; 2023년 5월 25일 수정본 접수; 2023년 5월 26일 채택)

Separation of Antioxidants and Glucose from Grape Skin Extract Using Polyethylene Glycol and Sodium Citrate

Eun Min Shin¹, Yeong Eun Joo¹, Su Min Jung¹, Jaechan Suh³, and Chang-Joon Kim^{1,2*}

¹Department of Chemical Engineering and ERI

²Department of Materials Engineering and Convergence Technology

Gyeongsang National University

501 Jinju-daero, Jinju, Gyeongnam, 52828, Korea

³Bansuk Industries, Inc., Gimhae, Korea

(Received for review May 11, 2023; Revision received May 25, 2023; Accepted May 26, 2023)

요 약

본 연구의 목적은 포도껍질 추출물에서 항산화 물질과 당을 분리하기 위한 방법을 개발하는 것이다. 먼저, 다양한 유기용매를 추출용매로의 사용 가능 성을 조사하였다. 아세톤, 에탄올, DMSO 또는 DMF 사용 시 유기용매-추출물 혼합물은 단일 상으로 존재하였고 벤젠, 에틸아세테이트, 또는 n-헥산을 추출물에 첨가 시 유기용매 상과 수용액 상으로 분리되었으나 색소물질은 여전히 수용액 상에 잔류하였다. 한편 폴리에틸렌 글리콜-2,000(PEG-2,000)과 구연산 나트륨을 추출물에 첨가 시, 혼합액은 세 개의 층으로 분리되었고 추출물에 존재하는 대부분의 플라보노이드가 상층액으로 이동한 반면 추출물 포도당의 53%가 하층액으로 이동하였다. 하층액에서는 항산화 활성이 관찰되지 않은 반면 상층액은 강한 항산화 활성을 나타내었다. PEG 분자량이 증가함에 따라 하층액의 포도당 회수율이 증가하여 PEG-8,000을 첨가하여 얻은 하층액의 포도당 회수율은 가장 높은 67%였다. 플라보노이드 분리는 PEG-2,000 > PEG-8,000 > PEG-400 순서로 높았다. 그리고 PEG-2,000을 사용하여 얻은 상층액과 하층액의 플라보노이드 회수율은 각각 48과 0.2%였다. 아가 디스크 확산법을 이용하여 분리액이 효모균 생장에 미치는 영향을 조사한 결과, 추출물, 상층액, 및 하층액 첨가가 효모균 생장을 저해하지 않음을 확인하였다.

주제어 : 포도껍질 추출물, 항산화물질, 포도당, 분리, 폴리에틸렌 글리콜

Abstract : The purpose of this study is to develop a method for separating antioxidants and sugars from grape skin extract. The extract was first mixed with a variety of organic solvents to investigate whether the separation was feasible. When employing acetone, ethanol, dimethylsulfoxide, or dimethylformamide, the organic solvent-extract combination formed a single phase. However, when benzene, ethyl acetate, or n-hexane was added to the extract, the mixture separated into an organic and an aqueous phase and the pigments remained in the aqueous phase. On the other hand, when polyethylene glycol-2,000 (PEG-2000) and sodium citrate were added to the extract, the mixture was separated into three layers, with the majority of the flavonoids migrating to the top layer and 53% of the extract's glucose migrating to the bottom layer. The top layer had significant antioxidant

* To whom correspondence should be addressed.

E-mail: cj_kim@gnu.ac.kr; Tel: +82-55-772-1787; Fax: +82-55-772-1789

doi: 10.7464/ksct.2023.29.2.109 pISSN 1598-9712 eISSN 2288-0690

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.

activity, whereas the bottom layer showed no antioxidant activity. The glucose recovery in the bottom layer increased as the molecular weight of PEG increased and the highest recovery (67%) was observed when PEG-8,000 was added. The highest flavonoid separation was observed with PEG-2,000, followed by PEG-8,000 and PEG-400. The flavonoid separation when PEG-2,000 was added resulted in a flavonoid recovery of 48% and 0.2% from the top and bottom layers, respectively. Examining the effect of the separated solution using the agar disc diffusion method on yeast cell growth confirmed that the addition of the extract, the top, and the bottom layer did not inhibit cell growth.

Keywords : Grape-skin extract, Antioxidant, Glucose, Separation, Polyethylene glycol

1. 서 론

포도껍질에는 항산화물질인 폴리페놀(polyphenol)과 플라보노이드(flavonoid) 화합물이 다량으로 포함되어 있는데[1-3], 이들은 다양한 종류의 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)들을 효과적으로 제거하는 강력한 항산화제이다[4]. 활성 산소종들은 피부의 콜라겐(collagen)과 엘라스틴(elastin)을 분해하는 효소들의 발현을 유도하여 피부 처짐, 주름 생성, 피부톤 저하 등 피부노화를 촉진시킨다[1,5]. 이러한 잇점으로 인하여, 피부노화 방지를 위한 기능성 화장품 또는 의약품 원료로 항산화 물질들을 활용할 수 있다[6]. 좋은 천연 생리활성물질을 포함한 포도껍질의 유용성에도 불구하고 포도주 양조장에서 대량의 포도껍질이 폐기물의 형태로 배출되고 있다[7]. 포도껍질을 원료로 사용하여 항산화 효과와 피부노화방지 효능이 있는 고부가가치의 기능성 물질을 생산할 수 있다면 폐기물의 유용자원화를 통해 경제적 이익을 도모할 수 있을 것으로 사료된다. 기존 연구에서 본 연구팀은 포도껍질의 증류수 추출물이 폴리페놀과 플라보노이드를 다량으로 포함하며 항산화능과 주름개선 활성이 있음을 발견하였다[8]. 포도껍질에는 상당량의 과당과 포도당이 포함되어 있고[9] 추출물의 점도를 증가시킨다. 당은 용액을 끈적거리게 만들어 발림성을 나쁘게 만들 수 있어 포도껍질 추출물을 화장품 원료로 사용하기 위해서는 추출물에서 항산화능을 갖는 폴리페놀/플라보노이드를 당과 분리시켜야 한다.

천연물에서 폴리페놀을 포함한 항산화물질들을 추출·분리하기 위하여 액-액 추출, 고상(solid-phase) 추출, 초음파 추출, 초음파-유기용매 추출(ultrasonically assisted solvent extraction) 등 다양한 방법들이 사용되었다. 그러나 이 방법들은 폐쇄 회수율이 낮고 고가의 장비가 필요하며 많은 에너지를 공급해야 하는 문제점들이 있다[10,11]. 최근에는 수성 이상 계(aqueous two-phase systems, ATPS) 방법이 식물유래 천연물에서 생리활성 성분을 분리하는데 널리 사용된다[12]. 특히, 친수성 고분자와 염 기반 ATPS가 주목을 받고 있는데, 이는 저비용으로 타겟 물질을 쉽게 분리할 수 있고 스케일-업과 조업이 쉽기 때문이다[12]. 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG)은 저렴하고 생분해성이라 환경친화적이고 구연산나트륨(sodium citrate)은 식품 첨가물로 널리 사용되는 안전한 물질이므로 이 두 물질은 ATPS에 적합한 물질로 주목받고 있다[13,14].

본 연구의 목적은 포도껍질 증류수 추출물에서 항산화 물질과 당을 분리하는 것이다. 다양한 유기용매를 추출물에 첨가하여 분리 가능 여부를 조사하였다. 궁극적으로 PEG-구연산나트

륨 시스템을 개발하였고, 이를 최적화하기 위하여 PEG 분자량에 따른 분리성능을 조사하였다. 분리된 물질들의 항산화 활성과 독성 여부를 조사하였다.

2. 실험방법

2.1 실험재료

경남 거창군 감악산 사과·포도 영농조합에서 판매하는 캠벨엘리(*Vitis labruscanan* B.) 포도를 진주시 농산물 도매시장에서 구입하였다. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, 044150)를 각각 Alfa Aesar (MA, USA)에서 구입하였다. 3,4,5-Trihydroxybenzoic Acid Hydrate (Gallic Acid Hydrate, G0011), 3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavone Hydrate (Quercetin Hydrate, P0042), L-threo-Hex-2-enono-1,4-lactone (L-Ascorbic Acid, A0537)를 TCI (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. PEG-400 (P0638)과 PEG-2000 (P0616)은 SAMCHUN (Pyeongtaek, Korea), PEG-8000 (6556-1405)은 DAEJUNG (Siheung, Korea)에서 구매하였다. Bacto™ Yeast Extract (212750), Bacto™ Malt Extract (218630), Bacto™ Peptone (211677), Difco™ Dextrose (215530), Bacto™ Agar (214010)은 BD (Becton, Dickinson and Company, NJ, USA)에서 구매했고 기타 시약들을 Sigma-Aldrich 사(MO, USA)에서 구입하였다.

2.2 포도껍질 추출물 제조

포도껍질을 과육에서 분리·수거하고 깨끗이 세척한 뒤 80°C 건조기에서 24시간 건조한 후 분쇄기(HR1372, Philips, Netherlands)에 넣고 최대 회전수로 5분간 분쇄하였다. 이를 막자사발에 옮겨 곱게 갈아서 분말형태로 만들었다. 포도껍질 분말 10 g을 200 mL 비이커에 넣고 증류수 100 mL를 첨가한 후 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 이를 정성여과지(No. 2, ADVENTEC, Tokyo, Japan)에 통과시켜 필터에 걸러진 고형물을 제거하고 필터를 통과한 여액(filtrate)을 회수하여 추출물로 사용하였다. Figure 1은 추출물 제조과정을 보여준다.

2.3 추출물에서 항산화물질과 당 분리

추출물에 제 3의 성분을 첨가하여 두 개의 상(층)을 형성시키고 항산화 물질과 당을 서로 다른 층으로 이동시켜 분리시키는 전략을 사용하였다. 첫 번째, 추출물 10 g에 다양한 유기용매(아세톤, 에탄올, 벤젠, 에틸아세테이트, Dimethylsulfoxide (DMSO), Dimethylformamide (DMF), n-헥산) 5 g을 첨가하여 이를 실온에 12시간 동안 방치하여 상분리 및 색소이동을 관찰

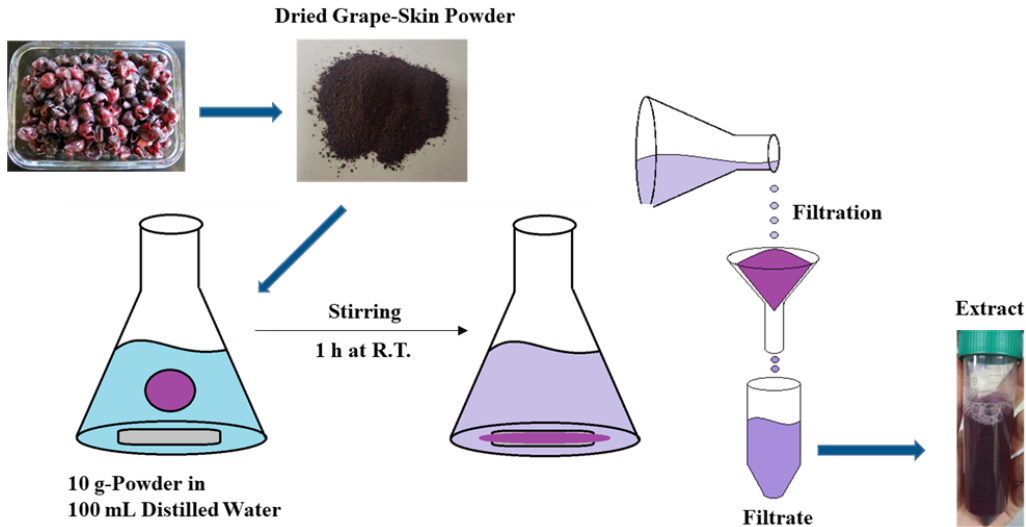


Figure 1. Scheme of the process for producing grape skin extract.

하였다. 두 번째, Rodriguez-Salazar 등[14]이 제안한 방법을 수정한 것으로 추출물 5 g에 PEG-2,000 0.79 g, 구연산나트륨 1.25 g을 첨가하여 상분리 및 색소이동을 관찰하였다.

2.4 미생물에 대한 분리액의 독성평가

아가 디스크 확산법을 사용하여 분리액이 미생물의 생장에 미치는 영향을 조사하였다. 배지제조와 미생물 접종을 포함한 모든 작업을 무균 작업대(Laminar clean bench)에서 실시하였다. 고체배지 제조를 위하여 증류수 1 L에 yeast extract 3 g, malt extract 3 g, peptone 5 g, glucose 10 g, agar 20 g을 첨가하고 용액의 pH를 6.2로 조절하였다. 용액을 120°C에서 멸균한 후 Petri dish에 20 mL씩 분주하고 상온에 방치하여 고형화시켰다. 고체배지와 동일한 조성의 액체배지를 제조하고 초저온 냉동고(deep freezer)에 보관된 효모균(*Saccharomyces cerevisiae*)의 glycerol stock 100 µL를 접종하였다. 효모균(KCCM 11351)은 (사)한국중균협회(서울, 한국)에서 분양받았다. 배양액의 균체 밀도(OD₆₀₀)가 0.8-1.0에 도달한 후, 고체배지 당 배양액 100 µL를 접종하였다. 접종된 고체배지를 건조시킨 후 배지 표면에 filter paper disc(외경, 6 mm)를 올려놓고 시료 용액 20 µL를 주입하였다. 이를 25°C에서 24시간 배양한 후 디스크 주변에 환의 생성여부를 관찰하여 저해 여부를 판단하였다.

2.5 분석방법

2.5.1 회수율 측정

포도껍질로부터 얻은 추출물의 회수율을 측정하였다. 추출물 5 mL를 알루미늄 접시(지름 50 mm)에 붓고 80°C 건조기에서 12시간 동안 건조시켜 수분을 제거하였다. 건조물이 포함된 알루미늄 접시 질량에서 빈 알루미늄 접시의 질량을 빼어 건조물의 질량을 계산하였다. 식 (1)에 나타내었듯이 건조 후 잔류 건조물 함량을 투입된 포도껍질 분말의 질량으로 나눈 값의 백분율로 추출 수율을 정의하였다. 모든 분석은 3회 이상 수행되었다.

$$\text{추출수율(\%)} = \frac{A}{B} \times 100 \quad (1)$$

A: 추출물의 건조질량

B: 포도껍질 분말의 건조질량

추출물에 PEG와 구연산 나트륨을 첨가하여 세 개의 상으로 분리되면 상층액과 하층액의 부피, 폴리페놀, 플라보노이드, 포도당 농도를 측정하고 이를 이용하여 회수율을 계산하였다. 예로 식 (2)는 폴리페놀의 회수율을 계산하는 식이다.

$$\text{회수율} = \frac{\text{상의 폴리페놀 농도} \times \text{상부피}}{\text{추출물의 폴리페놀 농도} \times \text{추출물 부피}} \quad (2)$$

2.5.2 총 플라보노이드 함량 측정

Formagio 등[15]의 방법을 변형하여 총 플라보노이드 함량을 측정하였다. 에탄올(순도 ≥ 95%) 1500 µL, 100 g/L 염화알루미늄(AlCl₃) 100 µL, 1 M 아세트산나트륨(C₂H₃NaO₂) 100 µL, 증류수 2.8 mL, 및 추출물 500 µL를 순서대로 첨가하였다. 이 혼합물을 상온에서 40분 동안 반응시킨 후, 415 nm 파장에서 반응 혼합물의 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 정량을 위하여 퀘르세틴을 표준물질로 사용하여 표준 검량곡선을 작성하였다. 총 플라보노이드 함량은 추출물 1 g 건조중량에 대한 mg quercetin equivalent (QE)로 환산하여 표시하였다. 모든 분석은 3회 이상 수행되었다.

2.5.3 총 폴리페놀 함량 측정

Jing 등[16]의 방법을 따라 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. 본 시험법은 추출물에 존재하는 폴리페놀 화합물에 의해 Folin-Ciocalteu reagent가 환원되어 파란색으로 발색되는 원리를 이용한 것이다. 증류수로 10배 희석된 Folin-Ciocalteu reagent 1.0 mL에 추출물 100 µL을 혼합하여 5분 간 반응시켰다. 반응 혼합물에 탄산수소나트륨(NaHCO₃, 75 g/L) 1.0 mL를 첨가하고 상온의 암실에서 90분간 반응시킨 후, 725 nm 파장에서 반응 혼합물의 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 화합물의 정량을

위하여 메탄올에 농도별로 용해시킨 갈릭산을 표준물질로 사용하여 표준곡선을 작성하였다. 총 폴리페놀 함량은 추출물 1 g 건조중량에 대한 mg gallic acid equivalent (GAE)로 환산하여 나타내었다. 모든 분석은 3회 이상 수행되었다.

2.5.4 추출물의 항산화능 측정

추출물의 라디칼 소거활성을 측정함으로써 항산화능을 평가하였다. Kilani 등[17]과 Choi 등[18]이 제안한 DPPH법을 변형하여 추출물의 자유라디칼(free radical) 소거 활성을 측정하였다. 즉, 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 180 μ L에 추출물 20 μ L, 그리고 메탄올에 녹인 0.2 mM DPPH 800 μ L을 혼합하여 상온의 암실에서 20분간 반응시킨 후, UV/Vis 분광광도계(UV spectrophotometer, Mega-U600, Scinco, Seoul, Korea)를 사용하여 517 nm 파장에서 반응 혼합물의 흡광도를 측정하였다. 농도별로 제조된 L-ascorbic acid를 양성대조군으로 사용하였고 모든 분석은 3회 이상 수행되었다. 측정데이터를 식 (3)에 대입하여 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성을 계산하였다. 식에서 $OD_{control}$ 은 추출물을 같은 양의 100 mM Tris-HCl buffer로 대체한 반응 혼합물의 517 nm 파장에서 흡광도를 나타낸다.

DPPH radical scavenging activity (%)

$$= \frac{OD_{control} - OD_{sample}}{OD_{control}} \times 100 \quad (3)$$

2.5.5 포도당 농도 측정

포도당 측정키트(주) 아산제약)에 동봉된 설명서를 따라 분석용 시약을 제조하였다. 시료 20 μ L와 시약 3.0 mL를 유리 시험관에 넣고 이를 37°C 항온조에 5분간 방치하였다. 시료에 존재하는 포도당이 시약과 반응하여 혼합용액을 붉은색으로 변화시킨다. 포도당 농도 증가에 따라 시료-시약 혼합액의 색은 더욱 진해진다. 이를 정량화하기 위하여 분광광도계를 이용하여 500 nm 파장에서 반응 혼합액의 흡광도를 측정하였고 검량선을 이용하여 이를 농도로 변환하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 포도껍질 추출물의 항산화활성

건조된 포도껍질 분말 10 g으로부터 45(\pm 2) mL 추출물을 얻었는데, 그중 5 mL 용액을 알루미늄 디쉬에 옮겨 담은 후 이를 건조기에 넣고 수분을 증발시켜 제거하였다. 이를 통해 측정된 건조물의 질량은 152.9(\pm 0.7) mg이었다. 이로부터 계산된 추출물의 농도는 30.6(\pm 0.1) mg/mL였다. 추출물에 포함된 포도당은 3.1(\pm 0.02) mg/mL이고 폴리페놀과 플라보노이드는 각각 565.6(\pm 7.4)과 79.4(\pm 4.8) μ g/mL이었다.

추출물의 농도를 변화시키며 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였고 그 결과를 Figure 2에 나타내었다. 추출물의 농도를 증가 시킴에 따라 DPPH 라디칼 소거활성이 증가하였다. 이와 같이 농도에 따른 항산화 활성의 증가는 항산화 물질들의 전형적인 특징이다[19]. 대조군으로 사용된 아스코르빈산(비타민 C)도

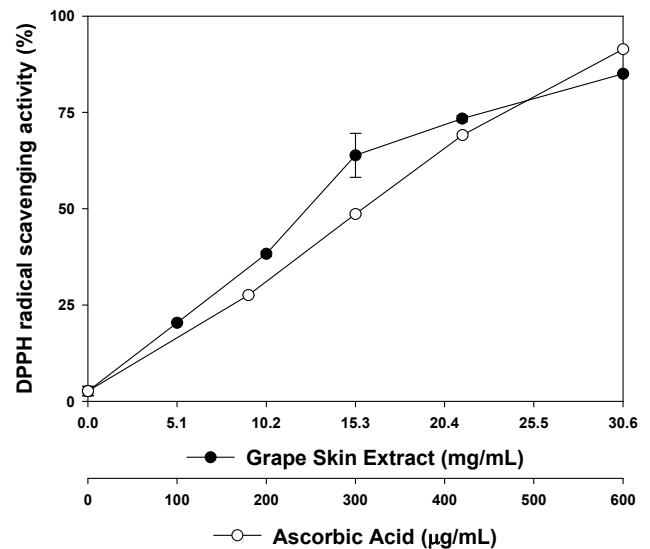


Figure 2. DPPH radical scavenging activity of grape skin extract and ascorbic acid.

농도 증가에 따라 DPPH 라디칼 소거활성이 증가하는 거동을 보였다. 그러나 아스코르빈산은 약 300 μ g/mL에서 DPPH 라디칼 소거활성의 50%(E_{50} =300 μ g/mL)를 나타낸 반면 추출물은 1200 μ g/mL(E_{50} =1,200 μ g/mL)에서 동일한 효과를 나타내었다. 본 실험결과는 추출물에 함유된 폴리페놀과 플라보노이드가 높은 항산화 활성을 갖는 것을 보여준다. 그러나 추출물은 대조군인 아스코르빈산의 1/4 수준의 성능을 나타내었는데, 이는 추출물을 더욱 정제하여 고순도의 항산화 물질들을 포함한다면 정제물의 항산화활성은 더욱 향상될 것이다.

3.2 추출물의 항산화 물질과 포도당 분리

일반적으로 포도껍질에 포도당과 과당(프럭토오스)이 존재하는 것으로 알려져 있어서[9], 포도껍질 추출물에 존재하는 항산화 물질과 당을 분리하기 위하여 다양한 유기용매들을 테스트하였다. 추출물은 짙은 보라색의 색소를 포함하였다. 일반적으로 식물성 천연 색소는 생리활성기능과 함께 유해 활성산소를 제거하는 항산화 효과가 탁월하다고 알려졌다[20]. 따라서 색소성분들의 이동을 육안으로 모니터링하며 항산화 물질의 분리 여부를 판단하였다. Figure 3(a)는 유기용매와 추출물 혼합액의 상분리 거동을 보여준다. 수용액인 추출물을 유기용매와 혼합 시 유기용매 상과 수용액 상으로 분리되고 색소들은 유기용매 상으로 이동하는 반면 포도당은 수용액 상에 잔류할 것으로 예상하였다. 그러나 아세톤-, 메탄올-, DMSO-, 또는 DMF-추출물 혼합물은 단일 상으로 존재하였다. 벤젠, 에틸아세테이트, 또는 n-헥산을 추출물에 첨가 시 유기용매 상과 수용액 상으로 분리되었으나 색소들은 여전히 수용액 상에 잔류하였다. 본 결과는 추출물에 존재하는 색소들이 수용성 물질임을 시사한다. 일반적으로 폴리페놀은 방향족 고리에 수산기와 카르복시기기가 붙어있는 구조로 반수용성 물질로 알려졌다. 다양한 화학적 구조를 갖는 폴리페놀들은 화학적 구조와 분자량에 따라 수용성, 반수용성, 소수성 특성을 나타낸다고 알려졌다

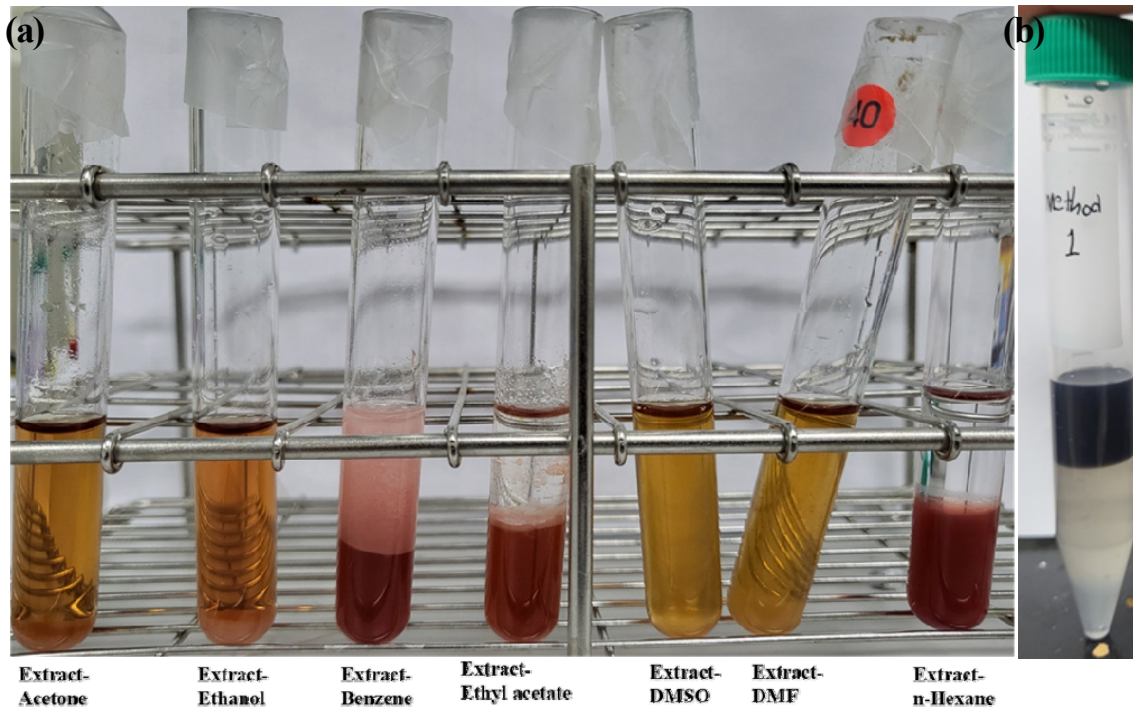


Figure 3. The effect of (a) various organic solvents and (b) polyethylene glycol-sodium citrate on the separation of pigments from grape skin extract.

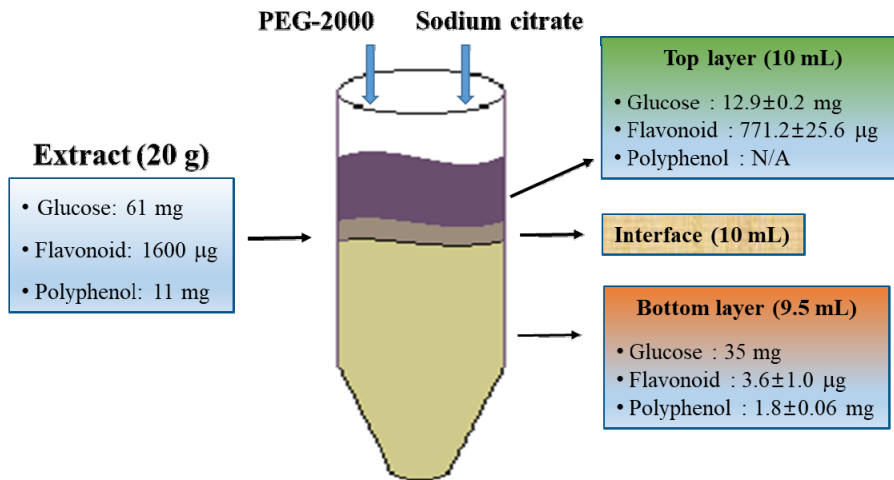


Figure 4. Distribution of glucose, flavonoids, and polyphenols in the separated layers from a mixture consisting of PEG-2,000, sodium citrate and grape skin extract.

다[21,22]. 증류수 추출물에는 극성기를 갖는 수용성 폴리페놀 성분들이 존재하는 것으로 알려졌다[23].

일반적으로 물에 잘 용해되는 폴리페놀은 분자 구조상 극성을 띠고 있기 때문에 극성의 전하를 중화시켜 줄 수 있다면 수용상에서 이들의 용해도가 낮아져 침전(salting out)될 수 있을 것이다. 즉, pH를 낮춰 추출물을 산성화시키면 폴리페놀은 양성자화되어 소수성 특징을 나타낸다고 보고되었다[24]. 따라서 추출물의 pH 조절과 적절한 용매를 선정하면 당과 항산화 물질을 분리할 수 있을 것으로 사료된다. 최근 PEG와 구연산나트륨을 이용하여 천연물에서 폴리페놀 성분을 분리한 사례가 보고되었다[14]. 본 연구팀은 이들의 방법을 수정하여 본 연구

에 적용한 결과 포도껍질 추출물로부터 폴리페놀과 당을 분리하는 데 성공하였다. Figure 3(b)는 추출물, PEG-2,000, 및 구연산나트륨으로 구성된 혼합용액의 층이 분리되었고 색소물질은 상층부로 이동하였음을 보여준다. 추출물 중의 항산화물질과 당들이 서로 다른 층으로 이동하였는지 여부를 구체적으로 조사하기 위하여 추가적인 실험을 수행하였고 그 결과를 Figure 4에 나타내었다. 추출물, PEG-2,000, 구연산나트륨으로 구성된 혼합액으로부터 상층액(10 mL), 하층액(9.5 mL) 및 상층액과 하층액이 섞여있는 경계층(10 mL)을 얻었다. 상층부는 PEG-2,000이 풍부한 층이고 하층부는 염이 풍부한 영역으로 보고되었다 [25].

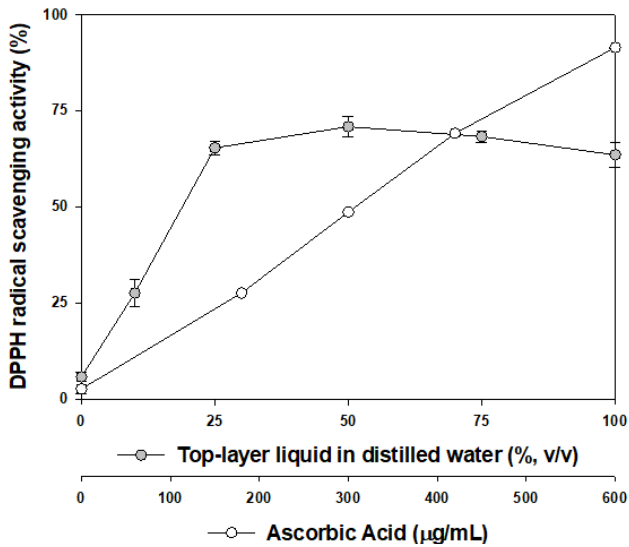


Figure 5. DPPH radical scavenging activity of top-layer liquid from a mixture consisting of PEG-2,000, sodium citrate and grape skin extract, and ascorbic acid.

상층액의 플라보노이드 함량은 771(±26) mg으로 측정되었고 하층액에서는 플라보노이드가 검출되지 않았다. 이는 추출물에 존재하는 플라보노이드의 48%가 상층액으로 이동하였다는 것을 시사한다. 한편, 상층액과 하층액의 포도당 함량은 각각 12.9(±0.2) mg과 35(±0.0) mg였는데 이는 추출물 포도당의 21%와 57%가 각각 상층액과 하층액으로 이동하였음을 의미한다. 폴리페놀 분석에서 PEG-2,000의 간섭으로 상층액의 폴리페놀 함량을 정확히 측정할 수 없었지만 하층액의 폴리페놀 함량을 측정할 수 있어서 이를 근거로 폴리페놀의 분리 여부를 판단하였다. 하층액의 폴리페놀 함량이 1.8(±0.1) mg으로 측정되었는데 이는 추출물의 폴리페놀(11 mg) 중 16%만이 하층액으로 이동하였다는 것을 의미한다. 하층액의 항산화 활성은 관찰되지 않았으나 상층액의 DPPH 라디칼 소거활성은 명확하게 관찰되었다. Figure 5에 나타내었듯이, 상층액의 DPPH 라디칼 소거활성은 63.5(±3.3)%였고 상층액을 증류수로 희석시킴에 따라 항산화 활성이 감소하였다. 이는 항산화 특성을 갖는 물질들이 나타내는 전형적인 농도 의존적 항산화 거동이다[19, 26]. 그런데 상층액 농도 25%에서 DPPH 라디칼 소거활성이 65.3(±1.8)%에 도달한 후 상층액 농도 증가에도 DPPH 라디칼 소거활성은 더 이상 증가하지 않았다. DPPH는 짙은 보라색을 나타내는 자유라디칼(free radical)로서 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 수소 라디칼의 전자를 받아들여 환원되면서 고유 색의 보라색을 잃고 노란색으로 탈색되는 특성이 있다. 탈색정도

가 크면 시료의 DPPH 라디칼 소거능이 큰 것을 의미한다. 보라색을 띄는 DPPH 용액은 517 nm에서 높은 흡광도 값을 나타내는데 탈색됨에 따라 흡광도 값은 점차 감소한다. 상층액은 색소물질을 포함하여 보라색을 띄기 때문에 DPPH가 항산화물질에 의해 탈색되더라도 상층액이 나타내는 색깔로 인하여 517 nm에서의 흡광도가 일정값 이하로 떨어지지 않아 이런 결과가 나타난 것으로 추측된다. 향후 이를 규명하기 위한 추가적인 연구가 필요하다.

비록 상층액의 폴리페놀 함량을 측정하지 못하였으나 상층액의 높은 항산화 활성과 하층액의 낮은 폴리페놀 함량을 고려해볼 때 추출물에 존재하는 대부분의 폴리페놀이 상층액으로 이동하였다고 추측된다. 본 실험결과는 PEG-2,000과 구연산나트륨을 사용하여 포도껍질 추출물에서 폴리페놀과 당을 효과적으로 분리·정제할 수 있음을 시사한다.

3.3 PEG 분자량이 항산화 물질과 포도당 분리에 미치는 영향

PEG 분자량 증가에 따라 PEG-추출물 혼합액의 상 분리가 촉진된다고 알려졌다[13]. 이는 분자량 증가에 따라 PEG 사슬들 사이에 수소결합 정도가 감소하여 소수성(hydrophobic) 환경이 조성되기 때문이다[13]. 폴리페놀과 안토시아닌 성분들을 분리하기 위하여 다양한 분자량을 갖는 PEG가 사용되었다[11, 13, 14, 27].

구연산나트륨과 분자량이 400 (PEG-400), 2,000 (PEG-2000), 또는 8,000 (PEG-8,000)의 PEG를 추출물에 첨가하고 혼합액의 분리 거동을 육안으로 관찰하며 PEG 분자량이 항산화 물질과 포도당 분리 거동에 미치는 영향을 조사하였다. PEG-400은 경계층 부피를 증가시켰고 PEG-8,000을 첨가한 경우에는 상층액 부피가 증가한 반면 하층액 부피는 감소하였다. Table 1은 동일조건에서 분자량이 다른 PEG와 구연산나트륨을 추출물에 첨가하여 얻은 분리액의 분석 데이터를 보여준다. PEG 분자량이 증가함에 따라 하층액의 포도당 함량은 증가한 반면 상층액의 포도당 함량은 감소하였다. 즉, PEG-8,000을 첨가하여 얻은 하층액의 포도당 회수율은 가장 높은 67.0(±0.3)%인 반면 상층액의 포도당 회수율은 5.4(±0.0)%였다. 이는 PEG-8,000과 구연산나트륨을 사용하여 추출물에 포함된 포도당의 대부분을 하층액으로 이동시킬 수 있음을 보여준다.

상층액과 하층액의 플라보노이드 함량을 측정하고 비교하였다. 플라보노이드 분리 정도는 PEG 분자량에 영향을 받아 PEG-2,000 > PEG-8,000 > PEG-400 순서로 높았다. 즉, PEG-2,000을 사용하여 얻은 상층액의 플라보노이드 회수율은 48.2(±1.6)로 PEG-2,000이 제일 우수한 분리성능을 보였다. 반면 PEG-400의

Table 1. The effect of molecular weight of PEG on the separation of glucose and flavonoids and polyphenol recovery

Recovery (%)	PEG-400		PEG-2,000		PEG-8,000	
	Top	Bottom	Top	Bottom	Top	Bottom
Glucose	37.1±6.6	47.9±5.3	21.1±0.3	59.1±5.8	5.4±0.0	67.0±0.3
Flavonoids	24.5±1.9	3.4±1.1	48.2±1.6	0.2±0.1	37.1±2.3	2.0±1.4
Polyphenols	N/A	8.5±1.0	N/A	16.1±0.6	N/A	23.0±0.4

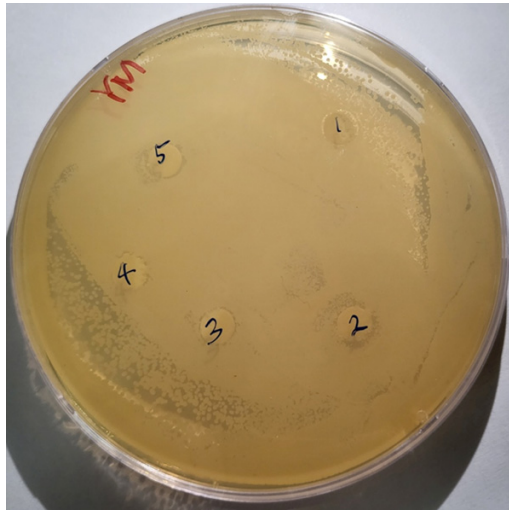


Figure 6. Agar disc diffusion assay using *Saccharomyces cerevisiae* as a test microorganism: (1) grape skin extract, (2) top layer liquid, (3 and 4) bottom layer liquid, and (5) distilled water.

분리 성능이 제일 낮았는데 이를 사용하여 얻은 상층액의 플라보노이드 회수율은 24.5(±1.9)였다. 한편, 질량수지 분석을 통해 모든 경우에서 플라보노이드 손실이 발생한 것을 파악하였는데 이러한 현상은 층분리 단계에서 일정량의 플라보노이드가 중간층으로 이동하였기 때문인 것으로 추측된다. 모든 경우에 상층액은 높은 항산화활성을 나타내었으나 하층액의 항산화활성은 검출되지 않았다. PEG-8,000과 PEG-400을 사용하여 얻은 상층액의 DPPH 라디칼 소거 활성값은 PEG-2,000에 의하여 얻은 상층액 활성값의 0.7과 0.4 수준이었다. 본 결과는 PEG를 사용하여 얻은 상층액에는 항산화 물질이 다량으로 존재한다는 것을 시사한다.

상층액의 폐놀함량을 측정하지 못하였으나 분리된 상·하 층의 플라보노이드 회수율, DPPH 라디칼 소거 활성값, 하층액의 폐놀 회수율 데이터로 부터 추출물에 존재하는 대부분의 플라보노이드/폴리페놀과 포도당은 각각 상층액과 하층액으로 이동하였음을 알 수 있다. 본 실험결과는 폴리에틸렌글리콜과 구연산나트륨을 사용하여 포도껍질 추출물로부터 항산화물질(폴리페놀/플라보이드)과 당을 성공적으로 분리할 수 있음을 시사한다.

3.4 분리 상층액과 하층액의 독성평가

추출물에 PEG-8,000과 구연산나트륨을 첨가하여 얻은 분리 상층액과 하층액의 독성평가를 수행하였다. 효모균이 접종된 고체배지에 시료를 주입하여 균주의 성장거동을 관찰하였다. 시료가 균주생장을 저해한다면 시료가 확산하면서 주변 미생물들의 성장을 억제하여 시료 주입부 근처에 투명한 환이 형성될 것이다. Figure 6은 대조군(증류수가 주입된 필터, No. 5)과 포도껍질 추출물이 주입된 필터(No. 1) 주변의 효모균들이 활발하게 성장한 것을 보여준다. 이는 포도껍질 추출물이 세포생장을 저해하지 않음을 나타낸다. 한편, 상층액 주입부(No. 2) 근처에서 작은 투명환이 관찰되었으나 그 모양이 뚜렷하지 않

아 투명한 생성여부를 판단하기 어려웠다. 하층액이 주입된 필터(No. 3, No. 4) 근처와 대조군(증류수) 주입구 근처에서의 미생물 생장은 큰 차이가 발견되지 않았다.

본 연구결과는 포도껍질 추출물, 추출물로부터 분리된 PEG-rich 영역(상층액)과 하층액이 미생물 성장을 억제하지 않음을 시사한다. 분리를 위하여 첨가된 PEG와 구연산나트륨은 안전한 물질들이지만 이들의 농도가 미생물 성장에 영향을 미칠 수 있을 것으로 여겨지는데, 평가를 위해서 사용된 고체배지에서는 물질전달 저항이 존재하여 농도 영향을 정확히 파악하기 어려울 것으로 사료된다. 향후 액체배양을 통하여 상층액과 하층액이 미생물 성장에 미치는 영향에 대한 정밀한 조사가 필요하다. 하층액은 추출물로부터 분리된 포도당을 함유하고 있으므로 미생물 성장 저해를 일으키지 않는다면 미생물 배양용 기질로 사용할 수 있을 것이다.

4. 결 론

유기용매를 사용하여 포도껍질 증류수 추출물에서 항산화 물질과 당을 분리할 수 없었다. PEG-2,000과 구연산 나트륨을 추출물에 첨가하여 층 분리를 유도하였고 항산화 물질과 당이 각각 상층액과 하층액으로 이동하였다. PEG 분자량의 영향을 조사한 결과, PEG-2,000이 제일 높은 플라보노이드 분리성능을 보였고 PEG-8,000을 사용하여 가장 높은 회수율로 포도당을 분리하였다. 추출물, 분리 상층액과 하층액이 효모균 성장을 저해하지 않았다. 본 연구결과는 천연 추출물에서 항산화 물질을 분리하고 정제하는데 널리 활용될 것이다.

감 사

본 과제(결과물)는 교육부와 한국연구재단의 재원으로 지원을 받아 수행된 3단계 산학협력 선도대학 육성사업(LINC 3.0) (과제번호: 202207820001)과 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구(2020R1F1A1054433)의 결과물입니다.

References

- Jayaprakasha, G. K., Singh, R. P., and Sakariah, K. K., "Antioxidant Activity of Grape Seed (*Vitis vinifera*) Extracts on Peroxidation Models in Vitro," *Food Chem.*, **73**(3), 285-290 (2001).
- Rockenbach, I. I., Gonzaga, L. V., Rizelio, V. M., Gonçalves, A. E. D. S. S., Genovese, M. I., and Fett, R., "Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Seed and Skin Extracts of Red Grape (*Vitis Vinifera* and *Vitis labrusca*) Pomace from Brazilian Wine Making," *Food Res. Int.*, **44**(4), 897-901 (2011).
- Moura, R. S. D., Viana, F. S. C., Souza, M. A. V., Kovary, K., Guedes, D. C., Oliveira, E. P. B., Rubenich, L. M. S., Carvalho, L. C. R. M., Oliveira, R. M., Tano, T., and Correia, M. L. G., "Antihypertensive, Vasodilator and Antioxidant

- Effects of A Vinifera Grape Skin Extract,” *J. Pharm. Pharmacol.*, **54**(11), 1515-1520 (2002).
4. Li, X., Li, J., Dong, S., Li, Y., Wei, L., Zhao, C., Li, J., Liu, X., and Wang, Y., “Effects of Germination on Tocopherol, Secoisolaricresinol Diglucoside, Cyanogenic Glycosides and Antioxidant Activities in Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.),” *Int. J. Food Sci. Technol.*, **54**(7), 2346-2354 (2019).
 5. Yun, J. W., Lee, W. S., Kim, M. J., Lu, J. N., Kang, M. H., Kim, H. G., Kim, D. C., Choi, E. J., Choi, J. Y., Kim, H. G., Lee, Y. K., Ryu, C. H., Kim, G. S., Choi, Y. H., Park, O. J., and Shin, S. C., “Characterization of A Profile of The Anthocyanins Isolated from *Vitis coignetiae Pulliat* and Their Anti-invasive Activity on HT-29 Human Colon Cancer Cells,” *Food Chem Toxicol.*, **48**(3), 903-909 (2010).
 6. Wittenauer, J., Mäckle, S., Sußmann, D., Weisz, U. S., and Carle, R., “Inhibitory Effects of Polyphenols from Grape Pomace Extract on Collagenase and Elastase Activity,” *Fitoterapia.*, **101**, 179-187 (2015).
 7. Gerardi, C., D’amico, L., Migoni, D., Santino, A., Salomone, A., Carluccio, M.A., and Giovinazzo, G., “Strategies for Reuse of Skins Separation from Grape Pomace as Ingredient of Functional Beverages,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **8**, 645-657 (2020).
 8. Shin, E. M., Kim, J. Y., Park, S. E., and Kim, C.-J., “Functional Cosmetic Characteristics of Grape Skin Extract,” *Clean Technol.*, **27**, 306-314 (2021).
 9. Varandas, S., Teixeira, M. J., Marques, J. C., Aguiar, A., Alves, A., and Bastos, M.M.S., “Glucose and Fructose Levels on Grape Skin: Interference in *Lobesia botrana* Behavior,” *Anal. Chim. Acta*, **513**, 351-355 (2004).
 10. Dang, Y.-Y., Zhang, H., and Xiu, Z.-L., “Microwave-assisted Aqueous Two-phase Extraction of Phenolics from Grape (*Vitis vinifera*) Seed,” *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **89**, 1576-1581 (2014).
 11. Chatzilazarou, A., Katsoyannos, E., Laias, O., Dourtoglou, Y., and Tsaknis, J., “Removal of Polyphenols from Wine Sludge Using Cloud Point Extraction,” *J. Air Waste Manag. Assoc.*, **60**, 2313-2324 (2020).
 12. Mai, X., Liu, Y., Tang, X., Wang, L., Lin, Y., Zeng, H., Luo, L., Fan, H., and Li, H., “Sequential Extraction and Enrichment of Flavonoids from *Euonymus alatus* by Ultrasonic-assisted Polyethylene Glycol-based Extraction Coupled to Temperature-induced Cloud Point Extraction,” *Ultrason. Sonochemistry*, **66**, 105073 (2020).
 13. Huang, Chen, D., Kong, L., Su, M., and Chen, Y., “Aqueous Two-phase Systems (Polyethylene Glycol+Ammonium Sulfate) for Thallium Extraction: Optimization of Extraction Efficiency, Structural Characterization, and Mechanism Exploration,” *Sep. Purif. Technol.*, **235**, 115740 (2020).
 14. Rodriguez-Salazar, N. and Valle-Guadarrama, S., “Separation of Phenolic Compounds from Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) Calyces with Aqueous Two-phase Extraction Based on Sodium Citrate and Polyethylene Glycol or Acetone,” *Sep. Sci. Technol.*, **55**, 2313-2324 (2020).
 15. Formagio, A. S. N., Volobuff, C. R. F., Santiago, M., Cardoso, C. A. L., Vieira, M. D. C., and Pereira, Z. V., “Evaluation of Antioxidant Activity, Total Flavonoids, Tannins and Phenolic Compounds in *Psychotria* Leaf Extracts,” *J. Antioxidants.*, **3**(4), 745-757 (2014).
 16. Jing, L., Ma, H., Fan, P., Gao, R., and Jia, Z., “Antioxidant Potential, Total Phenolic and Total Flavonoid Contents of *Rhododendron Anthopogonoides* and Its Protective Effect on Hypoxia-induced Injury in PC12 Cells,” *J. BMC Complementary Medicine and Therapies.*, **15**, 287-299 (2015).
 17. Kilani, S., Ammar, R. B., Bouhlel, I., Abdelwahed, A., Hayder, N., Mahmoud, A., Ghedira, K., and Chekir-Ghedira, L., “Investigation of Extracts from (Tunisian) *Cyperus rotundus* as antimutagens and radical scavengers,” *J. Environ Toxicol Pharmacol.*, **20**, 478-484 (2005).
 18. Choi, C. W., Kim, S. C., Hwang, S. S., Choi, B. K., Ahn, H. J., Lee, M. Y., Park, S. H., and Kim, S. K., “Antioxidant Activity and Free Radical Scavenging Capacity Between Korean Medicinal Plants and Flavonoids by Assay-guided Comparison,” *J. Plant Sci.*, **163**, 1161-1168 (2002).
 19. Hunyadi, A., “The Mechanism(s) of Action of Antioxidants: From Scavenging Reactive Oxygen/Nitrogen Species to Redox Signalling and the Generation of Bioactive Secondary Metabolites,” *Med. Res. Rev.*, **39**, 2505-2533 (2019).
 20. Boo, H.-O., Hwang, S.-J., Bae, C.-S., Park, S.-H., and Song, W.-S., “Antioxidant Activity According to Each Kind of Natural Plant Pigments,” *Korean J. Plant. Res.*, **24**, 105-112 (2011).
 21. Rasouli, H., Farzaei, M. H., and Khodarahmi, R., “Polyphenols and Their Benefits: A review,” *Int. J. Food Prop.*, **20**, S1700-S1741 (2017).
 22. Mojzer, E. B., Hrnčić, M. K., Skerget, M., Knez, Z., and Bren, U., “Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects,” *Molecules*, **21**, 901 (2016).
 23. Mangione R., Simoes R., Pereira H., Catarino S., Ricardo-da-Silva, J., Miranda, I., and Ferreira-Dias, S., “Potential Use of Grape Stems and Pomaces from Two Red Grapevine Cultivars as Source of Oligosaccharides,” *Process*, **10**, 1896 (2022).
 24. Chaves, J. O., De Souza, M. C., Da Silva, L. C., Lachos-Perez, D., Torres-Mayanga, P. C., Machado, A. P. D. F., Forster-Carneiro, T., Vazquez-Espinosa, M., Gonzalez-de-Peredo, Barbero, G. F., and Rostagno, M. A., “Extraction of Flavonoids from Natural Sources Using Modern Techniques,” *Front. Chem.*, **8**, 507887-507912 (2020).
 25. Mastiani, M., Firoozi, N., Petrozzi, N., Seo, S., and Kim, M., “Polymer-salt Aqueous Two-phase System (ATPS) Micro-

- droplets for Cell Encapsulation,” *Sci. Rep.*, **9**, 15561-15570 (2019).
26. Untea, A. E., Varzaru, I., Vlaicu, P. A., Turcu, R. P., and Panaite, T. M., “Studies on Antioxidant Activities of Grape Pomace Using in Vitro, ex Vivo, and in Vivo Models,” *J. Food. Meas. Charact.*, **17**, 121-128 (2023).
27. Salic, A., Tusek, A., Fabek, D., Rukavina, I., and Zelic, B., “Aqueous Two-Phase Extraction of Polyphenols Using a Microchannel System-Process Optimization and Intensification,” *Food. Technol. Biotechnol.*, **49**, 495-501 (2011).