

포도부산물인 과피로부터 항산화 물질 최적 추출방법 확립

유미애 · 정혜경 · 강명화*

호서대학교 자연과학부 식품영양전공

Optimal Extract Methods of Antioxidant Compounds from Coat of Grape Dreg

Mi Ae Yoo, Hae Kyung Chung, and Myung Hwa Kang*

Department of Food Science & Nutrition, College of Natural Science, Hoseo University

Optimal extraction method for antioxidant compounds from coat of grape dreg was established. Extracts were prepared with ethanol solutions containing phosphoric, formic, acetic, HCl, TFA, and citric acids. Antioxidant compounds of grape coat were determined by HPLC analysis and evaluated for antioxidantizing effects using *in vitro* model system. Peonidin-3-glucoside content was the highest in 0.1% HCl-added ethanol extract. The extract prepared from pure ethanol without organic acids showed the highest content of cyanidin-3-glucoside among samples tested. Resveratrol and quercetin contents, the most important antioxidants, were highest in 0.1% HCl-added extract. Electron-donating ability was high in 0.1% acetic acid-added extract. SOD-like activities were 95.08% and 94.39% in 0.1% formic and 0.1% citric acid extracts, respectively. Inhibitory effects on peroxidation of egg yolk lecithin were observed in phosphoric (60.51%), citric (59.27%), and formic acid (56.77%) extracts. Hydrogen radical-scavenging activity was 59.47% in 0.1% HCl extract. Results suggest addition of 0.1% HCl in ethanol solution affords the highest yield in antioxidant compounds and antioxidant activities.

Key words: antioxidant, grape coat, resveratrol, cyanidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside

서 론

포도는 전 세계적으로 가장 많이 소비되는 과일 중의 하나이다. 포도는 폴리페놀성분이 풍부하여 여러 가지 생체조절 기능을 나타낸다고 알려져 있는데 이들의 대부분은 씨(60-70%)와 과피(30%)에 함유되어 있어 최근에는 생과보다 포도씨와 과피 추출물을 이용한 포도주스 및 포도주와 같은 가공식품으로 선호도가 증가하였다. 포도 가공 공정 중 포도씨는 생과 중량의 약 3%, 포도과피는 약 15% 정도가 폐기물로 생산되는데 이를 자원화 하려는 연구가 다각적으로 이루어지고 있으며, 포도 폐기물, 토마토 폐기물, 코르크 폐기물, 올리브 겹질, 커피 펄프 및 사탕수수 폐기물의 퇴비화를 위한 연구가 많이 진행되었다(1). 포도씨 및 과피와 같은 폐기물들은 미생물 분해가 용의하게 진행되어 환경적인 측면과 경제적인 면에서도 매우 효율적이라 한다. 포도 폐기물은 프랑스(2), 스페인(3), 유고슬라비아(4) 등 다수의 국가에서 퇴비화를 위한 연구가 진행되었다. 그러나 포도과피에는 적색소가 함유되어 있어 이들 색소가 생

체 내에서 생리활성을 나타낸다고 보고됨에 따라 포도과피에 함유된 색소에 많은 관심이 집중되고 있다.

Anthocyanin은 포도(5-7), 나무딸기(8), 적양배추(9), 꽃양배추(10) 등의 과채류와 유색미(11,12) 등의 곡류, 자색감자(13), 자색고구마(14,15)와 같은 뿌리 또는 줄기의 저장기관 및 꽃이나 열매 등에 존재하고, pH에 따라 주황에서부터 적색, 분홍색, 보라색 및 청색의 다양한 수용성 색소로서 자연계에 약 300여종의 anthocyanin이 존재하는 것으로 알려져 있으며, 이들 색소원의 이용가능성에 대한 연구가 이루어진 바 있다(16). Lee 등(17)의 연구에 따르면, anthocyanin의 색소원에 따라 광의 최대 흡수파장이 514 nm에서 538 nm까지 다르게 나타나는데 이러한 분광학적인 특성의 차이는 색소원에 따라 각기 다른 형태의 anthocyanin이 존재하기 때문이며(18) 또한, Hendry(19)는 산성화된 methanol에 용해시킨 cyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, petonidin, petunidin의 최대 흡수파장이 각각 535, 546, 542, 520, 532, 543 nm라고 하였다.

Koeppen 등(20)은 Barlinka 포도로부터 5종의 결정화된 anthocyanin, 즉 onein (malvidin-3-glucoside), mono-p-coumaroyl onein, peonidin, petunidin, delphinidin계를 분리하였으며, Shim 등(21)은 포도과피에 함유되어 있는 총 anthocyanin 함량 중의 절반수준인 48% 이상이 malvidin-3,5-diglucoside와 peonidin-3,5-diglucoside임을 보고하였다. 또한 Frankel 등(22)은 적포도주 속에 함유된 폐놀성분이 *in vitro*상에서 구리와 반응한 LDL의 산

*Corresponding author : Myung-Hwa Kang, Hoseo University, 29-1 Sechul-ri, Baebang-myeon, Asan 336-795, Korea
Tel: 82-41-540-5973
Fax: 82-41-548-0670
E-Mail: mhkang@office.hoseo.ac.kr

화를 50-98%까지 억제시킨다고 보고한 바 있다. Frankel 등⁽²³⁾은 20종류의 캘리포니아산 포도주의 항산화활성을 측정한 결과, 적포도주는 37-65%까지, 백포도주는 3-7%까지 LDL산화를 억제하였다고 보고하였다. 이러한 항산화활성은 포도주의 총 페놀함량, gallic acid, catechin, malvidin 3,5-diglucosides의 농도와 상관관계가 있다고 밝혔다.

포도과피 속에 다량 함유되어 있는 anthocyanin 색소의 추출용매는 주로 methanol이나 ethanol을 사용하는데, 이때 추출 효과를 높이기 위해 pH가 낮을수록 선명한 적색을 나타내는 anthocyanin 색소의 특성을 이용하여 HCl이나 유기산을 첨가하여 용매를 산성으로 조절하여 사용한다(24,25). 따라서 본 실험에서는 부산물로 발생되고 있는 campbell early 포도과피의 최적조건을 확립하기 위하여, ethanol에 TFA, HCl, phosphoric acid, acetic acid, formic acid, citric acid를 각각 0.1%씩 첨가하여 추출한 뒤, HPLC를 이용하여 이들 추출물에 함유되어 있는 anthocyanin색소 중 peonidin-3-glucoside, cyanidin-3-glucoside의 함량과 페놀성분으로 알려져 있는 resveratrol, quercetin의 함량을 측정하였고, 또한 이를 추출물의 항산화 효과를 분석하였다.

재료 및 방법

재료

본 시험에 사용한 공시재료는 2002년도에 옥천 포도 시험장 포장에서 재배된 campbell early 품종을 수집하여 과피와 씨를 분리한 뒤 음건한 후, -20°C 냉동고에 보관하면서 각종 실험에 사용하였다.

추출

실온에서 음건시킨 campbell early 과피를 분쇄한 후, 2g을 용매를 달리하여 0.1% TFA, 0.1% acetic acid, 0.1% formic acid, 0.1% phosphoric acid, 0.1% HCl, 0.1% citric acid이 첨가된 ethanol을 30 mL 넣고, 25°C의 수욕조에서 3시간 동안 교

반(100 rpm)하면서 3회 반복 추출하여 Whatman No. 2 여과지로 여과한 다음 진공회전 감압장치를 이용하여 50 mL까지 농축하였다. 대조군은 산을 첨가하지 않은 ethanol을 이용하여 위와 같은 방법으로 추출하였다.

총 페놀함량 측정

시료에 2% Na₂CO₃를 가하고 2분간 실온에 정치한 후 50% Folic-ciocalieciec(2 N)시약을 첨가하여 잘 혼합하고 실온에서 30분 정치한 다음, 750 nm에서 흡광도를 측정하였다(26). 표준곡선은 catechin을 0-1.0 mg/mL의 농도로 조제하여 $y = 7.362x + 0.2023(R^2 = 0.9565)$ 에서 작성하여 검량하였고, 모든 처리는 3회 반복하여 평균으로 나타내었다.

색소농도 측정

추출물을 Ultra Spectrophotometer 3000(Pharmacia사)을 이용하여 UV 532 nm에서 3회 측정하여 평균으로 나타내었다.

Resveratrol, quercetin 함량 분석(27)

산의 종류에 따라 추출한 campbell early 과피 추출물의 resveratrol과 quercetin 함량 분석은 HPLC(Young-lin associates)를 이용하여 Table 1과 같이 측정하였다. Resveratrol과 quercetin의 표준물질은 sigma에서 구입하였으며, 각각 0-1.0 mg/mL 농도로 조제한 뒤, 표준곡선 $y = 8599330.0x - 9644.4(R^2 = 1.0)$ 와 $y = 2819066.0x - 77173.4(R^2 = 1.0)$ 에서 검량하였다.

Cyanidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside 함량분석(28)

7종류의 유기산을 달리한 용매로 추출한 포도과피 추출물의 Cyanidin-3-glucoside, Peonidin-3-glucoside 함량분석은 HPLC (Young-lin associates) system를 이용하여 Table 2와 같은 조건으로 2개의 peak를 분리하여 각각의 peak를 분취하여 LC-mass 및 H¹-NMR에 의해 구조를 확인한 후 표준품으로 사용하여 표준 검량선을 작성하여 계산하였다.

Table 1. HPLC operating conditions of resveratrol and quercetin

	Resveratrol	Quercetin
Mobil phase	MeOH : Water = 40 : 60, v/v	MeOH : Water = 65 : 35, v/v
Column	μ-C18 Bondapak (4.6Φ × 150 mm)	μ-C18 Bondapak (4.6Φ × 150 mm)
Flow rate	0.8 mL/min	0.8 mL/min
Detector	UV 320 nm	UV 370 nm

Table 2. HPLC operating conditions of cyanidin-3-glucoside and peonidin-3-glucoside

Items	Conditions
Column	μ-C18 Bondapak (4.6Φ × 150 mm)
Mobile phase	A- 100% acetonitrile B- 1% phosphoric acid 10% acetic acid 5% acetonitrile
Detector	UV 520 nm
Time (min)	A (%)
0	100
10	90
20	80
30	70
	B (%)
	0
	10
	20
	30
	Flow rate (mL/min)
	0.4
	0.6
	0.8
	1.0

항산화효과 분석

전자공여능(Electron donating activity) 측정: 각 추출물에 DPPH 용액(DPPH 3 mg을 25 mL의 ethanol에 완전히 용해시킨 후 25 mL 증류수 첨가액)을 가하여 잘 섞은 후 517 nm에서 20 분간 흡광도의 변화를 측정하여 다음과 같이 계산하여 나타내었다(29).

$$\text{EDA}(\%) = 100 - (A/B \times 100)$$

A: 시료 무 첨가군의 흡광도

B: 시료 첨가군의 흡광도

SOD(Superoxide dismutase) 유사활성 측정: SOD 유사활성 측정은 Marklund과 Marklund의 방법(30)에 따라 각 시료에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer(50 mM tris(hydroxymethyl) aminomethane + 1 mM EDTA)과 0.2 mM pyrogallol을 가하고 25°C에서 10분간 방치 후 1 N HCl 첨가로 반응을 정지시켜 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{SOD-like activity}(\%) = 100 - (A/B \times 100)$$

A: 시료 무 첨가군의 흡광도

B: 시료 첨가군의 흡광도

Lecithin oxidation system을 이용한 항산화효과 측정: Egg yolk lecithin을 chloroform에 녹인 후, 0.2 mL 취하여 질소가스로 용매를 완전히 제거, 각 추출물을 넣고, pH 7.4로 보정한 Tris-KCl buffer에 FeSO₄(2 mM), ascorbic acid(2 mM)를 첨가하여 잘 섞은 후 37°C에서 2시간 incubation한 뒤(shaking), 0.7% TBA(2-thiobarbituric acid), 1% phosphoric acid, 5 mM EDTA를 첨가, 100°C 30분 동안 끓이고 잘 섞은 후 냉각, 원심 분리하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다(31). 각 추출물의 항산화 효과는 시료대신 ethanol을 첨가(대조군)하여 비교하였고, 계산은 다음과 같이 하였다.

$$\text{Relative antioxidative effect(RAE) TBARS}(\%) =$$

$$(A - B)/A \times 100$$

A: 시료 무 첨가군의 흡광도

B: 시료 첨가군의 흡광도

Hydrogen peroxide 소거활성 측정: Hydrogen peroxide 소거활성은 Muller의 방법(32)을 약간 변형하여 측정하였다.

시험관에 PBS, Ethanol 또는 시료를 첨가한 후 1.0 mM의 H₂O₂를 가하고 5분 동안 방치한 후, 1.25 mM ABTS [2,2' azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)]와 1 U/mL peroxidase를 가하고 37°C에서 10분간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Hydrogen radical scavenging activity}(\%) =$$

$$(A - B)/A \times 100$$

A: 시료 무 첨가군의 흡광도

B: 시료 첨가군의 흡광도

Hydroxyl radical 소거활성 측정: 시험관에 0.1 mM FeSO₄/EDTA 용액, 10 mM 2-deoxyribose, 시료액, 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4) 및 10 mM H₂O₂를 가하고, 37°C 수욕조에서 2시간 반응시킨 후 20% TCA(trichloroacetic acid)용액을 가하여 반응을 중지시키고, 0.67%의 TBA(thiobarbituric acid)용액을 첨가하여 100°C에서 15분 가열시킨 후 급속히 냉각하고 532 nm에서 흡광도를 측정하였다(33).

$$\text{Hydroxyl radical scavenging activity}(\%) =$$

$$(A - B)/A \times 100$$

A: 시료 무 첨가군의 흡광도

B: 시료 첨가군의 흡광도

통계처리

본 연구의 결과는 평균±SD로 나타내었고, 각 실험군 간의 비교분석은 SAS system을 이용하여 ANOVA 분석 후 $\alpha=0.05$ 에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의적 수준을 검증하였다.

결과 및 고찰

총 페놀성 화합물

본 연구에서는 산의 종류가 다른 7가지 종류의 campbell early 포도 과피 추출물의 총 페놀성 화합물의 함량을 측정한 결과, Fig. 1과 같이 산의 종류에 따라 0.1 mg/mL-0.3 mg/mL까지 다양하게 나타났다. 0.1% acetic acid가 첨가된 campbell early 과피 추출물이 0.1 mg/mL로 가장 낮았고, 0.1% HCl이 첨가된 경우 0.3 mg/mL로 가장 높은 함량을 나타내었다. Katalinic(34)은 10가지 종류의 포도과피 추출물로부터 catechin monomer ((+)-catechin, (-)-epicatechin)과 procyanidin dimer(B₁, B₂, B₃, B₄)를 분리하였고, Miceli 등(35)은 포도폐기물로부터 총 페놀함량을 측정하였으며 그 결과, 포도씨에는 2.9 g/L, 포도과피에는 1.1 g/L 함유되어 있다고 보고하였다.

Resveratrol, quercetin 함량 분석

7가지의 산을 달리한 각각의 용매에 따라 0.5-8.1 mg/100 g coats로 그 함량의 차이가 비교적 커졌으며, 0.1% citric acid를 첨가한 경우 0.5 mg/100 g coats로 가장 낮았고, 0.1% HCl을 첨가한 경우 8.1 mg/100 g coats로 가장 높았다. Kim 등(36)은 HPLC를 이용하여 한국에서 널리 시판되고 있는 9가지 종류의

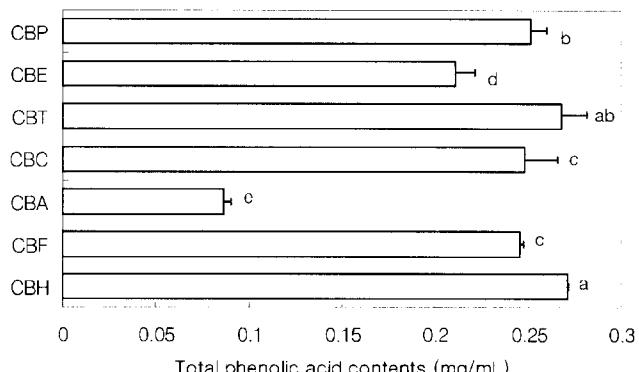


Fig. 1. Total phenolic acid contents of grape coat extracts prepared from solution prepared with/without 6 different organic acid such as phosphoric, formic, acetic, HCl, TFA, citric acid in ethanol by Folin-Denis methods.

CBF: 0.1% Formic acid in ethanol, CBA: 0.1% Acetic acid in ethanol, CBC: 0.1% Citric acid in ethanol, CBH: 0.1% HCl in ethanol, CBP: 0.1% Phosphoric acid in ethanol, CBT: 0.1% TFA in ethanol, CBE: Ethanol.

All values are Mean ± SD, n=3, different alphabet letters are significantly different by Duncan's multiple range test after ANOVA analysis at $\alpha=0.05$.

Table 3. UV Spectra and Anthocyanin contents by HPLC system

Pigment (OD/ λ = 532 nm)	Anthocyanin (mg/100 g coats)		
	P3G	C3G	Total
CBF	1.4	17.4	19.2
CBA	0.1	13.8	14.0
CBC	1.7	16.8	17.2
CBH	19.7	17.6	17.2
CBP	3.0	17.2	17.9
CBT	15.7	12.7	12.1
CBE	0.5	16.4	18.2

CBF: 0.1% Formic acid in ethanol, CBA: 0.1% Acetic acid in ethanol, CBC: 0.1% Citric acid in ethanol, CBH: 0.1% HCl in ethanol, CBP: 0.1% Phosphoric acid in ethanol, CBT: 0.1% TFA in ethanol, CBE: Ethanol, P3G: Peonidin-3-glucoside, C3G: Cyanidin-3-glucoside.
All values are Mean, n=3.

Table 4. Resveratrol and quercetin contents by HPLC system
(mg/100 g coats)

	Resveratrol	Quercetin
CBF	5.3	0.2
CBA	2.1	0.1
CBC	0.5	0.2
CBH	8.1	0.2
CBP	4.4	0.2
CBT	2.5	0.2
CBE	1.1	0.1

CBF: 0.1% Formic acid in ethanol, CBA: 0.1% Acetic acid in ethanol, CBC: 0.1% Citric acid in ethanol, CBH: 0.1% HCl in ethanol, CBP: 0.1% Phosphoric acid in ethanol, CBT: 0.1% TFA in ethanol, CBE: Ethanol.

All values are Mean.

포도주에서 resveratrol 농도를 측정하여, Noul 포도주(1998, Vintage)가 3.3 mg/L로 다른 와인(0.2-2.5 mg/L)보다 더 높은 함량을 나타냈고, 경산지역에서 재배된 Sheridan종에는 6.4 mg/kg의 trans-resveratrol이 함유되어 있다고 보고하였다.

Campbell early 포도 과피 추출물에 함유되어 있는 quercetin의 함량은, 0.1%의 HCl을 첨가한 경우 quercetin이 0.2 mg/100 g coats로 가장 높은 것으로 나타났고, 0.1%의 acetic acid를 첨가한 추출물이 0.1 mg/100 g coats로 가장 낮은 함량을 나타내어, 첨가된 산의 종류에 따라서 추출되는 quercetin의 함량에 큰 차이가 있는 것으로 나타났다(Table 3). Quercetin은 flavonoid 성분 중 하나로서, 어성초나 양파와 같은 채소 등에서의 함량분석에 대한 연구는 이미 이루어진 바 있다. 생육초기의 어성초에는 quercetin이 0.7% 함유되어 있으며, 잎, 줄기, 뿌리 중 잎에 0.8%로 가장 많이 함유되어 있는 것으로 나타났고(27), 양파에는 부위별로 가식, 비가식 부위를 구분하여 측정결과, 비가식부위에서 208.8 mg%, 가식부위에서 2.3 mg%로 비가식 부위에 많은 양의 quercetin이 함유되어 있음을 보고하였다(37).

Anthocyanin 색소

산의 종류를 달리한 ethanol 용매를 이용하여 추출한 campbell early 과피의 anthocyanin 함량을 측정하여 Table 4에 나타내었다. UV-visible spectrophotometer를 이용하여 532 nm에서 측정한 결과, pH가 2.2로 가장 낮은 0.1% HCl를 첨가한 경우 19.7

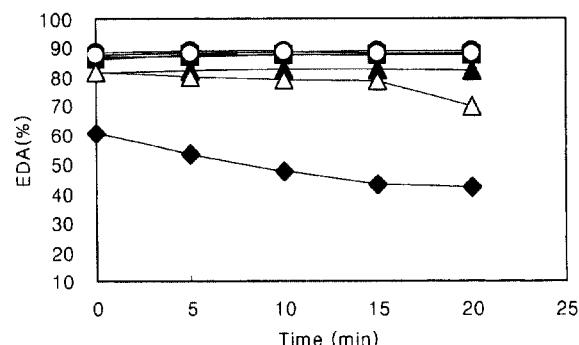


Fig. 2. Electron donating ability (%) of grape coat extracts prepared with/without 6 different organic acids such as phosphoric, formic, acetic, HCl, TFA, citric acid in ethanol by DPPH methods.

□-CBF: 0.1% Formic acid in ethanol, ●-CBA: 0.1% Acetic acid in ethanol, ■-CBC: 0.1% Citric acid in ethanol, ▲-CBH: 0.1% HCl in ethanol, ○-CBP: 0.1% Phosphoric acid in ethanol, △-CBT: 0.1% TFA in ethanol, ◆ -CBE: Ethanol.

로 가장 높았고, 0.1% acetic acid(pH 5.6)를 첨가한 경우 0.1로 흡광도가 가장 낮았다. Campbell early 과피에는 delphinidin, malvidin, cyanidin, peonidin, petunidin 등의 anthocyanin 색소가 함유되어 있으며, 본 연구에서는 이 중 cyanidin-3-glucoside와 peonidin-3-glucoside를 HPLC를 통해 정량하였다. 그 결과, 각각 12.7-17.5 mg/100 g coats, 11.5-20.0 mg/100 g coats로 추출용매를 달리하였을 때 그 양에 다소 차이를 보였다. Anthocyanin색소는 일반적으로 pH가 낮을수록 추출효율이 우수하다(25)고 알려져 있으나 peonidin-3-glucoside는 0.1% TFA를 첨가한 ethanol 용매의 pH 3.03으로 강산임에도 불구하고 다른 산을 첨가한 용매보다 낮은 것으로 나타났다. Cyanidin-3-glucoside는 오히려 산을 첨가하지 않은 100% ethanol용매에서 20.0 mg/100 g coats로 가장 높았고 0.1% TFA를 첨가한 경우 11.5 mg/100 g coats로 가장 낮았다. Eugenio-Revilla 등(38)은 적포도주와 적포도 종에서의 anthocyanin함량의 차이를 HPLC를 이용하여 분석한 결과, anthocyanin계 중 malvidin-3-O-glucoside가 가장 많이 함유되어 있었으며, 포도에서보다 포도주에 malvidin-3-O-glucoside가 더 많이 함유되어 있다고 보고하였다.

DPPH에 의한 전자공여능

20분 동안 각기 다른 campbell early 추출물의 전자공여능을 측정한 결과 Fig. 2와 같이 산을 첨가한 6가지 추출물의 경우 산화억제성이 80% 이상으로 대조군에 비해 현저하게 높았으며 15분 이내에 모든 반응이 이루어진 반면, 산을 첨가하지 않은 대조군은 산화억제성이 산을 첨가한 비교구보다 상대적으로 낮은 것으로 나타났다. Heo 등(39)은 녹차에 함유되어 있는 catechin과 epigallocatechin gallate(EGCG)의 전자공여능을 측정한 결과, IC₅₀ 값이 catechin 29.3 µg/mL, EGCG 15.4 µg/mL으로 비타민 E 234.4 µg/mL에 비해 높은 활성을 보였으며, 500 µg/mL 농도에서 catechin 87.3%, EGCG 88.7%의 전자공여능을 보여 본 연구결과와 유사한 것으로 나타났다.

SOD 유사활성

SOD(Superoxide dismutase)는 산페로 인하여 형성된 세포에 해로운 환원산소종을 과산화수소로 전환시키는 반응($O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$)을 촉매하고, catalase는 SOD에 의해 생성된 H_2O_2 를 무해한 물분자와 산소분자로 전환시키는 역할을 하는 효소이다.

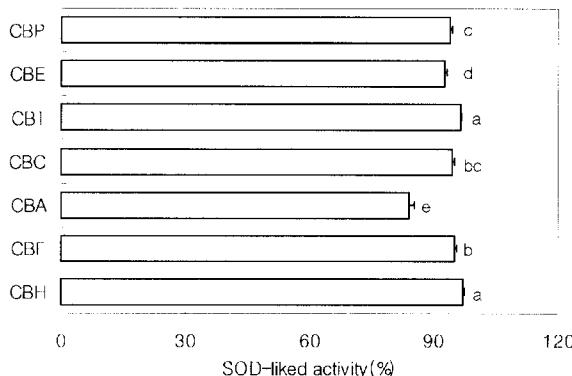


Fig. 3. SOD-like activity of grape coat extracts prepared with/without 6 different organic acids such as phosphoric, formic, acetic, HCl, TFA, citric acid in ethanol.

CBF: 0.1% Formic acid in ethanol, CBA: 0.1% Acetic acid in ethanol, CBC: 0.1% Citric acid in ethanol, CBH: 0.1% HCl in ethanol, CBP: 0.1% Phosphoric acid in ethanol, CBT: 0.1% TFA in ethanol, CBE: Ethanol.

All values are Mean \pm SD, n=3, different alphabet letters are significantly different by Duncan's multiple range test after ANOVA analysis at $\alpha=0.05$.

이러한 SOD와 유사한 역할을 하여 superoxide anion의 활성을 억제시킬 수 있는 유사물질의 활성능을 측정한 결과(Fig. 3), HCl과 TFA가 첨가된 campbell early 추출물이 유의적으로 가장 높았고, acetic acid가 첨가된 경우 84.1%로 가장 낮은 것으로 나타났다. 또한 formic acid, citric acid를 첨가한 경우 95.1%, 94.4%로 산을 첨가하지 않은 경우가 acetic acid를 첨가한 경우보다 유의적으로 높은 수준으로 나타났다. 이와 같은 결과는 녹차의 열수 추출물이 85.3%의 SOD 유사활성을 보인다고 보고한 Kim 등(40)의 연구결과와 비교하여 포도과피 추출물에서 상대적으로 더 높은 활성을 나타냈다.

Lecithin 산화방지 효과

Lecithin에 의한 과산화물가 측정 결과, phosphoric acid, citric acid, formic acid를 첨가한 추출물에서 각각 60.5, 59.3, 56.8%로 유의적으로 높은 수준을 나타냈다(Fig. 4). SOD 유사활성에서 높은 수준을 보여준 HCl이나 TFA 첨가 추출물이 TBARS 가는 유의적으로 낮았고, acetic acid를 첨가한 추출물은 46.4%로 가장 낮게 나타났다. 이와 같은 결과는 폐놀성 화합물의 함량이 높았던 추출물에서 높은 활성을 보여 서로 상관관계가 있음을 보여주었다. 폐놀성 화합물은 지방산 산화의 초기 생성물질인 hydroperoxide와 기타 반응물질과 반응하여 산화를 억제시키는 것으로 보고되어져 있고(41), 또한 폐놀성 화합물이 radical 생성촉진물질인 metal ion(Fe, Cu)과 쉽게 결합하여 macrophage나 free radical의 형성을 감소시킨다고 알려져 있다(42).

Hydrogen radical 소거활성

Hydrogen radical 소거활성은 SOD에 의해 생성된 과산화수소를 peroxidase를 첨가하여 물과 산소분자로 환원시켜 최종적으로 산폐를 억제시켜주는 능력을 측정하는 것으로 0.1% acetic acid를 첨가한 campbell early 과피 추출물이 66.0%의 소거능을 보여 유의적으로 가장 높은 수준을 보였으며, 산을 첨가하지 않은 경우에도 56.6%의 높은 활성을 나타내었다(Fig. 5). 반면 0.1%의 formic acid를 첨가한 추출물은 17.1%로 유의적으로 가장 낮은 소거능을 보였다. 특히, 0.1%의 HCl, phosphoric acid

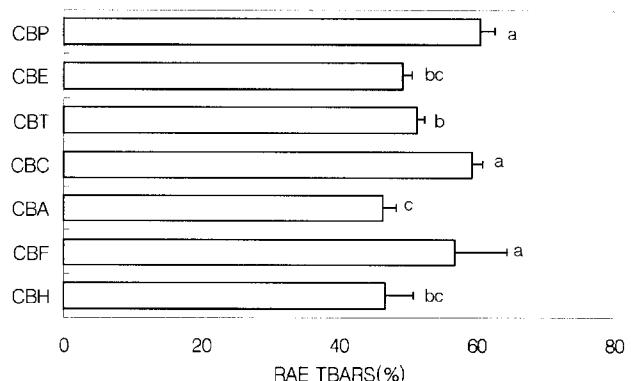


Fig. 4. Relative antioxidative effects of grape coat extracts prepared with/without 6 different organic acids such as phosphoric, formic, acetic, HCl, TFA, citric acid in ethanol on the peroxidation of egg yolk lecithin.

CBF: 0.1% Formic acid in ethanol, CBA: 0.1% Acetic acid in ethanol, CBC: 0.1% Citric acid in ethanol, CBH: 0.1% HCl in ethanol, CBP: 0.1% Phosphoric acid in ethanol, CBT: 0.1% TFA in ethanol, CBE: Ethanol.

All values are Mean \pm SD, n=3, different alphabet letters are significantly different by Duncan's multiple range test after ANOVA analysis at $\alpha=0.05$.

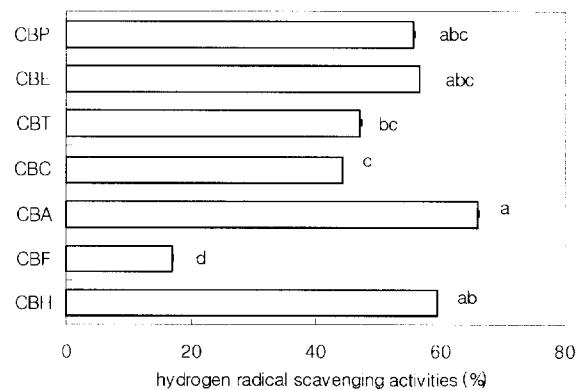


Fig. 5. Hydrogen radical scavenging activities (%) of grape coat extracts prepared with/without 6 different organic acids such as phosphoric, formic, acetic, HCl, TFA, citric acid in ethanol.

CBF: 0.1% Formic acid in ethanol, CBA: 0.1% Acetic acid in ethanol, CBC: 0.1% Citric acid in ethanol, CBH: 0.1% HCl in ethanol, CBP: 0.1% Phosphoric acid in ethanol, CBT: 0.1% TFA in ethanol, CBE: Ethanol.

All values are Mean \pm SD, n=3, different alphabet letters are significantly different by Duncan's multiple range test after ANOVA analysis at $\alpha=0.05$.

가 첨가된 추출물은 59.471%, 55.688%의 소거능을 보였다. 이는 전자환원이나 총 폐놀성 화합물 함량 및 TBARS 생성 억제능이 높은 수준인 것으로 나타나 항산화효과가 우수할 것으로 기대된다.

Hydroxyl radical 소거활성

Hydroxyl radical 소거활성은 2-deoxyribose oxidation method에 의해 측정한 결과 산이 첨가된 campbell early 과피 추출물 모두 90% 이상의 소거능을 보여 산이 첨가되지 않은 추출물보다 유의적으로 높은 것으로 나타났다(Fig. 6). Hydroxyl radical 소거활성은 활성산소 중에서 반응성이 강하여 생체 산화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Chung 등(43)은 한국산

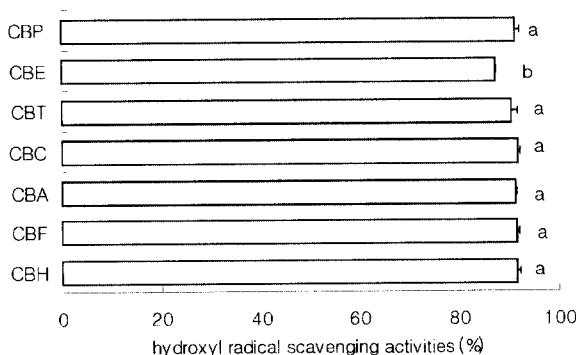


Fig. 6. Hydroxyl radical scavenging activities (%) of grape coat extracts prepared with/without 6 different organic acids such as phosphoric, formic, acetic, HCl, TFA, citric acid in ethanol.

CBF: 0.1% Formic acid in ethanol, CBA: 0.1% Acetic acid in ethanol, CBC: 0.1% Citric acid in ethanol, CBH: 0.1% HCl in ethanol, CBP: 0.1% Phosphoric acid in ethanol, CBT: 0.1% TFA in ethanol, CBE: Ethanol.

All values are Mean \pm SD, n=3, different alphabet letters are significantly different by Duncan's multiple range test after ANOVA analysis at $\alpha=0.05$ (a>b).

약초 잎의 항산화효과를 검토한 결과 삼나물, 삽주, 오갈피 나뭇잎이 90% 이상의 hydroxyl radical 소거능을 보인다고 보고한 바 있으며, Chung 등(44)은 삼과에 속하는 환삼덩굴로부터 분리한 luteolin-7-O- β -D glucoside의 hydroxyl radical 소거활성을 측정한 결과, 0.1 μ g/mL 농도에서 77.5%, 1 μ g/mL 농도에서 99.1%의 소거활성을 나타내어 α -tocopherol(0.1 μ g/mL: 36.5%, 1 μ g/mL: 72.3%)보다 활성이 우수하다고 보고하였다. 이들 연구결과와 비교해 campbell early 포도 과피 추출물이 높은 수준의 hydroxyl radical 소거활성을 보이고 있어 항산화 소재로 개발 가능성이 기대된다.

요 약

Anthocyanin색소의 추출은 일반적으로 산을 첨가하면 그 추출효율이 증가한다고 보고되어진 바가 있다. 따라서 본 실험에서는 campbell early 포도의 부산물인 과피로부터 항산화 물질을 추출하기 위한 최적추출조건을 확립하기 위하여 ethanol 용매에 산의 종류를 달리하여 추출한 후 anthocyanin, resveratrol, quercetin함량을 측정하고, 이들의 항산화 효과를 분석하였다. 그 결과, anthocyanin색소 중 peonidin-3-glucoside는 0.1% HCl 을 첨가한 추출물에서 가장 효과적이었으며, cyanidin-3-glucoside는 오히려 산을 첨가하지 않은 ethanol 용매에서 추출한 campbell early 과피 추출물이 가장 효과적이었다. 또한 항산화 활성을 가지고 있는 폐놀성 화합물인 resveratrol과 quercetin의 함량은 0.1% HCl을 첨가한 campbell early 과피 추출물에서 각각 8.1 mg/100 g coats, 0.2 mg/100 g coats로 다른 종류의 산을 처리한 것보다 더 많은 양이 함유되어 있는 것으로 나타났다. DPPH 에 의한 항산화 효과 측정에서는 산을 첨가한 추출물 모두 15 분 이내에 모든 반응이 정지되었으며, 대조군에 비해 높은 전자공여능을 보였다. Lecithin을 이용한 TBARS는 citric acid와 phosphoric acid, formic acid를 첨가한 경우 각각 59.3, 60.5, 56.8%로 유의적으로 높은 수준을 보였다. 이러한 결과로부터 campbell early 과피에 0.1% HCl가 첨가된 ethanol용매로 추출시 항산화 활성이 높은 추출물을 제조할 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 2002년도 농림부 농림기술관리센터의 연구비 지원에 의해 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Sastre I, Vicente MA, Lobo CM. Influence of the application of sewage sludges on soil microbial activity. *Bioresour. Technol.* 57: 19-23 (1996)
- Faure D, Deschamps A. Physicochemical and microbiological aspects in composting of grape pulps. *Agric. Wastes* 34: 251-528 (1990)
- Costa F, Moreno JL, Hernandez T, Lax A, Cegarra J, Roig A. Mineralization of organic materials in a calcareous soil. *Agric. Wastes* 28: 189-201 (1989)
- Stojanovic S, Stojsvljervic T, Vunurevic N, Vikicvranjes M, Mandic A. Nutritive and feeding value of dried grape pomace in feeding fattening cattle. *Stocarstvo* 43: 313-319 (1989)
- Jang JK, Han JY. The antioxidant ability of grape seed extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 524-528 (2002)
- Chung HY, Yoon SJ. Antioxidant activity of grape seed ethanol extract according to serial solvent fractionation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31: 1092-1096 (2002)
- Negro C, Tommasi L, Miceli A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresour. Technol.* 87: 41-44 (2003)
- Park JM, Joo KJ. Stability of anthocyanin pigment from juice of raspberries. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 11: 67-74 (1982)
- Murai K, Wilkins D. Natural red color derived from red cabbage. *Food Technol.* 44: 131 (1990)
- Lee JW, Lee HH, Rhim JW. Extraction characteristics of red flower cabbage pigment. *Korean J. Food Sci. Technol.* 33: 149-152 (2001)
- Oh SK, Choi HC, Cho MY, Kim SU. Extraction method of anthocyanin and tannin pigments in colored rice. *Agric. Chem. Biotechnol.* 39: 327-331 (1996)
- Kim KS, Lee JK. Effects of addition ratio of pigmented rice on the quality characteristics of seolgiddeok. *Korean J. Soc. Food Sci.* 15: 507-511 (1999)
- Rhim JW, Kim SJ. Characteristics and stability of anthocyanin pigment extracted from purple fleshed potato. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 348-355 (1999)
- Lee JW, Lee HH, Rhim JH, Cho JS. Determination of the conditions for anthocyanin extraction from purple fleshed sweet potato. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29: 790-795 (2000)
- Lee LS, Kim SJ, Rhim JW. Analysis of anthocyanin pigments from purple fleshed sweet potato. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 29: 555-560 (2000)
- Henry BS. Natural food colors. 2nd ed. pp. 39-78. In: *Natural Food Colorants*. Hendry GAF, Houghton JD (eds). Blackie and Son Ltd., Glasgow, Great Britain (1996)
- Lee HH, Lee JW, Rhim JW. Characteristics of anthocyanins from various fruits and vegetables. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* 7: 285-290 (2000)
- Yoon TH, Lee SW. Stability of anthocyanins in foods. *Korean J. Food Sci. Technol.* 11: 63-73 (1979)
- Hendry GAF. Natural pigments in biology. 2nd ed. pp. 1-38. In: *Natural Food Colorants*, Hendry GAF, Houghton JD (ed). Houghton Blackie A&P, Great Britain (1992)
- Koeppen BH, Basson DS. The anthocyanin pigments of Barlinka grapes. *Phytochemistry* (Oxford) 5: 183 (1966)
- Shim KH, Kang KS, Choi JS, Seo KI, Moon JS. Isolation and stability of anthocyanin pigments in peels. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 23: 279-286 (1994)
- Frankel E, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 34: 454-457 (1993)
- Frankel E, Waterhouse AL, Tessédro PL. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant

- activity inhibiting oxidation of human low density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.* 43: 890-894 (1995)
24. Fuleki T, Francis FJ. Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. *J. Food Sci.* 33: 72-77 (1968)
 25. Jackman RL, Yada RY, Tung MA. Separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis. A review. *J. Food Biochem.* 11: 279-308 (1987)
 26. AOAC. Official Methods of Analysis. 14th ed. Association of official Analytical Chemists, Washington, DC, USA (1980)
 27. Lee ST, Lee YH, Choi YI, Shon GM, Lee HJ, Heo JS. Comparison of quercetin and soluble tannin in *Houttuynia cordata* THUNB according to growth stages and plant parts. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 10: 12-16 (2002)
 28. Pazmino-Duran EA, Giusti MM, Wrolstad RE, Gloria MBA. Anthocyanins from banana bracts (*Musa X paradisiaca*) as potential food colorants. *Food Chem.* 73: 327-332 (2001)
 29. Kang MH, Park CG, Cha MS, Seong NS, Chung HK, Lee JB. Component characteristics of each extract prepared by different extract methods from by-products of *glycyrrhiza uralensis*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30: 138-142 (2001)
 30. Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47: 469-474 (1974)
 31. Tsuda T, Oshinori YF, Katsumi O, Yamamoto A, Kawakishi S, Osawa T. Antioxidative activity of tamarined extract prepared from the seed coat. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi* 42: 430-435 (1995)
 32. Muller HE. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganisms on an ABTS-peroxidase medium. *Zbl. Bakt. Hyg.* 259: 151-155 (1985)
 33. Chung SK. Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61: 118-123 (1997)
 34. Katalinic V. Grape catechins-natural antioxidants. *J. Wine Res.* 10: 15-23 (1999)
 35. Miceli A, Negro C, Tommasi L. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresour. Technol.* 87: 41-44 (2003)
 36. Kim KS, Ghim SY, Seu YB, Song BH. High level of trans-resveratrol, a natural anti-cancer agent, found in Korean noul red wine. *J. Microbiol. Biotechnol.* 9: 691-693 (1999)
 37. Kang SK, Kim YD, Hyun KH, Kim YW, Song BH, Shin SC, Park YK. Development of separating techniques on quercetin-related substances in Onion. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27: 682-686 (1998)
 38. Revilla E, Beneytez EG, Cabello F, Ortega GM, Ryan JM. Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *J. Chromatogr.* 915: 53-60 (2001)
 39. Heo MY, Yun YP, Park JB. Protective effects of green tea catechins and (-)-epigallocatechin gallate on reactive oxygen species induced oxidative stress. *J. Pharm. Soc. Korea* 45: 101-107 (2001)
 40. Kim SM, Cha YS, Sung SK. The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 33: 626 (2001)
 41. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7915-7922 (1993)
 42. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. An overview. *Methods Enzymol.* 186: 1-85 (1990)
 43. Kim YC, Chung SK. Reactive oxygen radical species scavenging effects of Korean medicinal plant leaves. *Food Sci. Biotechnol.* 11: 407-411 (2002)
 44. Park SW, Chung SK, Park JC. Active oxygen scavenging activity of luteolin-7-O-β-D-glucoside isolated from *Humulus japonicus*. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.* 29: 106-110 (2000)

(2003년 11월 5일 접수; 2003년 12월 29일 채택)