

고려엉겅퀴로부터 폴리페놀과 플라보노이드 염기 열수추출 조건 최적화

정 현 진*, 한 여 정*, 이 도 경*, 감 다 혜*, 김 진 우†

*†선문대학교 식품과학과

Optimization of alkaline hot-water extraction conditions for production of polyphenolic compounds and flavonoids from Korean thistle (*Cirsium japonicum*)

Hyun Jin Jung*, Yea Jeng Han*, Do Kyoung Lee*, Da Hae Gam*, Jin Woo Kim†

*†Department of Food Science, Sunmoon University, Asan, 31460, Korea

(Received : May. 22, 2018, Revised : Jun. 18, 2018, Accepted : Jun. 25, 2018)

Abstract : In this study, we developed a method for improving the production of polyphenol compounds and flavonoids from Korean thistle (*Cirsium japonicum*) extracts using hot-water extraction. In order to enhance the production of polyphenol compound and flavonoids, five independent variables (solvents, concentration, extraction time, extraction temperature, and solid-liquid ratio) were optimized. The results showed hot-water extraction using NaOH solution provided a higher total phenolic compounds (TPC) extraction than the organic solvents and the extraction using 1 N NaOH showed the highest production of TPC of 5.18 mg GAE/g DM. Among the tested variables, extraction temperature and time showed positive effects within tested levels of variables. The optimum extraction condition for TPC and flavonoids was obtained as follows: 1 N NaOH, extraction time of 40 min, reaction temperature of 120°C, and solid-liquid ratio of 10%(w/v). Under the optimum conditions of alkaline hot-water extraction, experimentally obtained TPC and flavonoid concentrations were 9.71 mg GAE/g DM and 2.23 mg QE/g DM, respectively. Therefore, alkaline hot-water extraction under mild condition was confirmed as an effective process for polyphenolic compounds and flavonoid production from Korean thistle.

Keyword : *cirsium japonicum*, total phenolic compounds (TPC), Flavonoid

1. 서 론

인간의 노화현상을 포함한 심혈관 질환, 신경퇴행성 질환 및 암은 인체 내에서 생성된 자유라디칼(free radical)인 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의해 세포가 반복적으로 공격당하는 산화적 스트레스에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다[1]. 이러한 산화적 스트레스의 직접적 원인이 되는 ROS는 반응성이 매우 높고 불안정하여 생체물질과 쉽게 반응

하며 연속적인 세포손상을 발생시켜 세포와 조직에 비가역적인 손상을 일으키게 된다. 인체 내에는 ROS와 산화억제물질의 균형을 통해 ROS를 제어하는 방어시스템을 가지고 있다. 하지만, 자외선, 면역 이상 및 스트레스 등에 의해 방어시스템이 약화되면 ROS가 과다하게 생성되고 항산화 체계의 균형이 깨지게 되어 세포손상과 병리적 질환의 확률이 높아진다[2]. 비정상적인 환경으로 인해 증가한 ROS를 제거하기 위한 방법으로 합성 항산화제를 이용한 ROS제거가 널리 사용되어 왔으나, 인공합성물에 대한 거부감과 함께 독성 및 발암성 등의 안전성의 논란이 제기되면서 식물과 같은 안전한 천연물로부터 이를 대처하고자 하는 노력이 많이 시도되고 있다[3]. 식물에 널리 존재하는 천연 색소인 폴리페놀은 스트레스와 자외선 등에 의해 발생된 ROS의 전자수용체로 작용하여 생체막 구성물질의 산화를 억제하여 막 유동성 저하, 효소 및 수용체의 활성 저해, 막 단백질의 손상에 의한

† Corresponding Author

성 명 : 김 진 우

소 속 : 선문대학교

주 소 : 충남 아산시 탕정면 선문로 221번길 70

전 화 : 82-41-530-2226

E-mail : kimjw1028@sunmoon.ac.kr

세포 불활성화 등을 방지한다고 알려져 있다[4]. 식물체에 존재하는 많은 색소들은 폴리페놀 화합물을 포함하고 있고, 대표적인 식물유래 폴리페놀 화합물은 flavonoids, anthocyanins, tannins, catechins, isoflavones, lignans과 resveratrols 등으로 과일 및 엽채류에 다량 함유되어 있다[5].

고려영귀는 곤드레나물로 잘 알려져 있으며 전 세계적으로 우리나라에서만 자생하고 있는 특산 종 식물이다. 이 식물에는 폴리페놀 성분을 비롯한 식이섬유, 무기질 및 비타민 등이 함유되어 항암활성을 비롯한 다양한 생리활성이 있다고 보고되고 있어 한방 소재로 사용될 뿐만 아니라 식품원료로도 널리 활용되고 있다[6]. 성분 연구에 있어 고려영귀는 생리활성이 뛰어난 apigenin, luteolin, myricetin, kaempferol, pectolinarin, 5,7-dihydroxy-6,4'-dimethoxyflavone, hispidulin-7-neo-hesperioside 등 약 78종의 flavonoid를 포함하여 항산화능과 항균활성, 지질산화 억제 등의 효과가 보고되고 있다[7]. 이처럼 영귀는 폴리페놀 성분을 다량 함유하고 천연 항산화제로서의 기능이 알려져 있지만, 비빔밥과 같은 식품류의 원료로만 한정적으로 사용되고 있어 부가가치가 높은 식품 및 화장품 소재로 활용성을 넓힐 필요성이 있다. 이를 위해 주요성분들의 추출특성과 추출조건 최적화가 필요한데 고려영귀로부터 유용물질인 폴리페놀 추출에 대한 연구는 보고되지 않는 실정이다[8].

따라서 본 연구의 목적은 예전부터 식용과 민간요법으로 사용되어 온 고려영귀로부터 폴리페놀과 플라보노이드 성분의 추출조건을 최적화하고 상업화에 적합한 추출공정을 제안함에 있다. 이를 위해 열수추출공정의 주요 인자인 용매, 농도, 추출온도, 추출시간과 고액비를 최적화하여 영귀로부터 생리활성을 가진 고부가가치 소재 생산공정 조건을 도출하여 기능성 식품소재 개발의 기초자료를 제공하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험 재료

본 연구에서 사용된 시료는 충청남도 천안시 성거읍의 성거산약초(株)에서 재배하는 고려영귀를 2017년 9월에 수확하여 60°C 드라이 오븐(VS-1202D3, VISION, Korea)에서 12시간 건조 후, 가정용 분쇄기(SFM-0505S, J-ONE Co., Korea)로 분쇄하고 50mesh 이하의 분말로 제조한 뒤 -70°C에서 냉동 보관하였다. 추출용매로 사용한 유기용매는 Sigma-Aldrich 사(St. Louis, USA)와 Samchun Pure Chemical 사(Seoul, Korea)의 순도 95% 이상 시약을 사용하였으며 분석에 사용된 시약은 Sigma-Aldrich사의 일급 이상 시약을 사용하였다.

2.2 추출 조건

건조 시료 중의 유용성분 추출을 위해 25 ml 밀폐형 유리튜브(PYREX-1636, Scilab., Korea)를 이용하여 샌드베스(CSBD2, VISION, Korea)에 건조

시료와 용매를 혼합한 후 최적화 추출 조건에 따라 온도, 시간과 고액비를 변화시켜 진행하였다. 추출 후, 1 ml의 추출시료를 원심분리한 뒤 상등액을 회수하였고, 필요에 따라 증류수에 희석하여 총 폴리페놀과 플라보노이드 농도를 측정하였다. 단일변수 최적화 실험을 위해 사용된 추출조건은 Table 1과 같다.

Table 1. Physico-chemical conditions for one factor at a time optimization

Conditions	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5	Level 6	Level 7
Concentration (N)	0.0	0.1	0.3	0.5	1.0	2.0	-
Extraction time (min)	0	10	20	30	40	50	60
Temperature (°C)	30	60	75	100	120	-	-
Solid liquid ratio (%)	2	3.3	5	10	13.3	-	-

2.3 폴리페놀 함량 분석

총 폴리페놀의 함량은 Folin-Denis법을 사용해 측정하였다[9]. Folin-Ciocalteu's 페놀용액을 추출물에 첨가하여 폴리페놀 화합물에 의해 청색으로 환원 발색하는 원리에 근거하여 흡광도 변화로 폴리페놀 농도를 측정하였다.[10]. 각 추출물 0.14mL에 0.2N Folin-Ciocalteu reagent 시료 0.7ml를 가하여 6분간 반응시킨 후 NaCO₃ 용액 0.56ml를 가해 상온에서 1시간 반응을 진행시킨 후 UV/VIS spectrophotometer (Optizen 2120UV, Mecasys Co., Korea)로 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정치는 농도별 gallic acid를 조제한 후 0-80µg/ml의 농도범위에서 검량선을 작성하여 시료추출물의 총 페놀함량을 mg GAE (galic acid equiv)/g DM (dry matter)으로 정량하였다.

2.4 플라보노이드 함량 분석

총 플라보노이드 함량은 aluminium chloride colorimetric method의 방법을 일부 변경하여 측정하였으며 시료의 추출은 총 페놀함량의 전처리와 동일한 방법을 적용하였다. 추출물 0.5 mL에 1 mol potassium acetate와 10% aluminum chloride 각 0.1 ml와 증류수 2.8 mL, 99.5% 에탄올 1.5 mL을 첨가한 다음 30분간 상온에서 정치 반응시킨 후, UV/VIS spectrophotometer (Optizen 2120UV, Mecasys Co., Korea)로 반응액의 흡광도 값을 415 nm에서 측정하였다. 플라보노이드의 정량분석을 위해 표준물질로 quercetin (Sigma Chemical Co.)를 이용하여 12.5-100 µg/ml의 범위에서 검량선을 이용하여 정량하였고, 플라보노이드 함량은 건조 시료 중량 당 mg QE (quercetin equivalent)/g DM (dry matter)로 나타내었다.

2.5 통계처리

모든 실험은 3회 반복 실시하여 평균±표준편차로 나타내었으며, 자료의 통계분석은 PASW Statistics 18.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 ANOVA test와 Duncan's multiple range test 등으로 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 추출 용매 선정

고려엉겅퀴로부터 폴리페놀과 플라보노이드 추출을 위한 기본용매 선정을 위해 9가지 용매를 이용하였으며 플라보노이드를 폴리페놀의 일종으로 본 추출용매 선정 실험에서는 폴리페놀 추출을 우선적으로 비교하였다. 추출효율을 비교하기 위해 60°C 에서 30분간 추출을 진행하였을 때 (Figure. 1). 에 보는 바와 같이 ethyl acetate, acetone과 acetonitrile 등을 포함한 모든 유기용매에서는 낮은 폴리페놀 함량을 확인할 수 있었다. 반면 증류수를 기본 용매로 한 추출군(증류수, 0.1 N H₂SO₄, 0.1 N NaOH)에서 폴리페놀 함량이 상대적으로 높은 것으로 나타났다. 폴리페놀 함량은 NaOH를 이용한 추출에서 3.04 mg GAE/g DM로 가장 높았으며, H₂SO₄와 물을 이용한 추출에서 각각 2.75 와 2.26 mg GAE/g DM의 폴리페놀 함량을 나타내 0.1 N NaOH를 이용한 추출의 농도가 증류수와 H₂SO₄를 이용한 추출에 비해 각각 1.4와 1.1배 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이처럼 추출능이 우수한 증류수, H₂SO₄와 NaOH이 폴리페놀 추출에 미치는 유의성을 평가했을 때, NaOH가 추출에 미치는 영향이 더 유의한 것으로 판정되었다($p=0.008$).

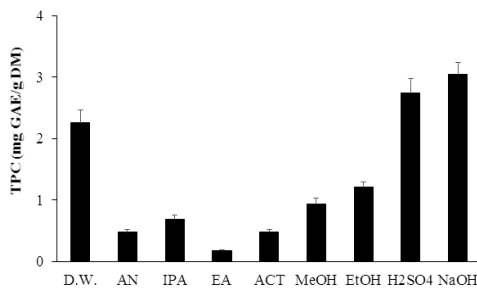


Figure 1. Total phenolic compound concentration of extracts from Korean thistle by different solvents.

일반적으로 식물체로부터 폴리페놀 추출 시, 증류수 또는 극성용매에서 추출 수율이 높아지는 것으로 알려져 있다. 보고가 있는 반면, ethanol, acetone, ethyl acetate등 유기용매에서 추출 수율이 높았다는 연구보고가 있어 폴리페놀 추출시 용매 선정은 원료물질의 특성에 따라 결정되어야 함을 확인할 수 있었다 [11-12]. 본 실험에서 확인된 바와 같이 유기용매를 이용한 추출이 증류수를 용매로 하는 3개 군에 비해 폴리페놀 추출능이 떨어지고 유기용매를 이용한 잔류

물 독성의 위험성으로 식품소재 추출에 적용시키기 어렵다. 따라서 유기용매 대비 수율이 우수한 물, 산용액과 염기용액을 이용한 열수추출을 1차 기본 추출공정으로 선정하여 연구를 진행하였다.

고려엉겅퀴의 열수추출에 있어 기본 용매 선정을 위해 실험을 수행하였으며 각 용액의 농도 최적화를 위해 NaOH와 H₂SO₄의 농도를 변화시켜 폴리페놀 추출에 미치는 영향을 실험하여 (Figure. 2). 에 나타내었다. 각 용매의 농도를 0-2.0 N로 변경하여 폴리페놀 추출을 비교했을 때, 농도변화가 폴리페놀과 플라보노이드 생산에 유의한 영향을 줄 수 있었다 ($p < 0.05$). 앞선 0.1 N 실험에서 확인한 바와 같이 H₂SO₄에 비해 NaOH에 의한 폴리페놀 추출이 보다 효과적이었으며, 1 N NaOH 열수추출에서 5.18 mg GAE/g DM의 최대값을 보였다. 동일 농도의 산 측매 보다 폴리페놀 추출 성능이 우수함을 확인해 높은 항산화 생리활성을 기대할 수 있을 것으로 판단되어 이후 추출 실험에 1 N NaOH를 기본 용매로 선정하였다.

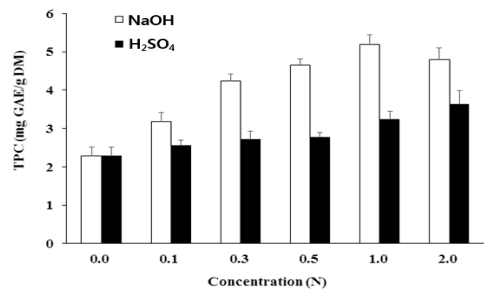


Figure 2. Total phenolic compound concentration of extracts from Korean thistle by different concentrations of acid and alkali solvents.

3.2 추출시간 최적화

고려엉겅퀴로부터 염기 열수추출을 이용하여 폴리페놀을 추출할 때, 추출시간이 폴리페놀 추출에 미치는 영향을 파악하고자 각 추출시간에서 폴리페놀과 플라보노이드 농도를 비교하였다 (Figure. 3). 에서 나타난 바와 같이 추출 초기 10분간은 추출물이 열평형에 도달하는 시간으로 폴리페놀과 플라보노이드의 추출농도가 매우 낮은 경향을 보였으며 염기 열수추출 30분에서 6.98 mg GAE/g DM의 폴리페놀이 추출되어 추출시간 60분 대비 92.6% 수준의 추출이 이루어짐을 확인할 수 있었다. 플라보노이드 추출도 폴리페놀 추출과 비슷한 경향성을 보였는데 추출 40분에서 최대농도가 확인되었으나 이후에는 감소하는 경향을 보였다. 플라보노이드는 폴리페놀 성분 대비 25-33%의 비율로 확인되어 고려엉겅퀴의 경우 비 플라보노이드 계열의 폴리페놀의 함량이 상대적으로 높으며 폴리페놀의 주요성분이 페놀산임을 예상할 수 있었다 [13]. 폴리페놀과 플라보노이드 추출 시 40분 이후부터는 시간 증가에 따른 추출농도 상승이 크지 않아 최적추출 시간을 40분으로 정하였다. 고려엉겅퀴에서 폴리페

늘 추출을 위한 조건이 60°C의 매우 낮은 조건임에도 불구하고 초기 염기 열수를 이용한 40분 추출에 있어 각각 7.41 mg GAE/g DM과 2.41 mg QE/g DM의 폴리페놀과 플라보노이드를 추출할 수 있다는 점에서 염기를 이용한 열수추출이 고려엉겅퀴로부터 유용 물질 추출에 매우 효과적인 공정임을 알 수 있다.

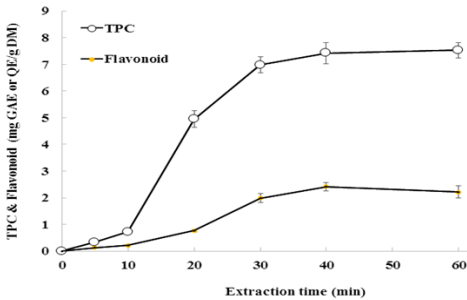


Figure 3. Time course behaviors of TPC and flavonoid productions from Korean thistle.

3.3 추출온도 최적화

고려엉겅퀴의 염기 열수추출에서 폴리페놀과 플라보노이드 추출 증대를 위해 추출 온도가 폴리페놀과 플라보노이드 추출에 미치는 영향을 평가하였다. 온도범위 30-120°C에서 고려엉겅퀴로부터 염기 열수추출 시 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 (Figure. 4)에 나타냈다. 온도가 두 물질의 추출에 유의한 영향을 미치며 ($p < 0.05$) 온도가 증가에 따라 폴리페놀과 플라보노이드 농도가 증가하는 경향성을 확인 할 수 있었다. 폴리페놀의 경우 최고 온도까지 비례하여 증가하는 경향을 보여 120°C 에서 최댓값인 9.71 mg GAE/g DM를 얻을 수 있었다. 이를 통해 60°C 추출 대비 1.34배 증가한 고려엉겅퀴 유래 폴리페놀이 열에 안정적이며 폴리페놀 추출 증대를 위해 120°C 이상의 추출온도 적용이 가능하리라 판단된다. 이는 사과 부산물로부터 폴리페놀 추출 시 추출온도가 증가할수록 총 폴리페놀 함량이 비례하여 증가한다는 보고와 합치하는 결과이며 최적 추출온도를 120°C로 결정하여 향후 추출실험에 적용하였다[14].

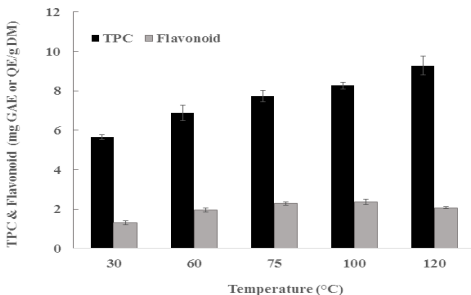


Figure 4. Effect of extraction temperature on the extraction of TPC and flavonoids from Korean thistle.

3.4 고액비 최적화

고액비 변화에 따른 폴리페놀과 플라보노이드 추출 농도 변화를 살펴보기 위해, 일정 용매에 첨가하는 고려엉겅퀴 고체분말의 양을 조절하여 고액비를 각각 2-13.3%(w/v)으로 실험을 진행하여 (Figure. 5)에 나타내었다. 고액비 20%에서 진행할 때 NaOH 용매 대비 고려엉겅퀴 분말의 양이 많아 혼합과 교반이 원활하지 못한 점이 있어 실험에서 제외했고 고체 첨가량 13.3% 이하의 범위에서 실험을 수행하였다. 폴리페놀과 플라보노이드 추출 시 고액비 감소에 따라 추출 농도가 증가하는 경향을 보였으나 10% 이하에서는 유의한 차이를 보이지 못했으며 플라보노이드의 경우에는 10% 이하에서 유의한 차이가 없음을 확인할 수 있었다. 이는 고체량이 용매에 비해 상대적으로 많음에 따라 추출 된 폴리페놀과 플라보노이드의 농도가 높아 추출평형에 도달하여 농도구배가 감소하고 추출 속도가 느려지게 되었을 것이라 사료되며, 추출 시 교반에 있어 낮은 고액비가 고체와 액체의 혼합에 유리함이 있어 물질 이동이 증가했을 것이라 판단된다. 농도구배 유지를 위해서 고액비를 줄여 용매의 양을 상대적으로 많게 하는 방법이 있으나 이는 재료비, 설비비와 운영비의 증가를 가져와 상업 규모 운전에서 경제성면에서 불리함으로 폴리페놀과 플라보노이드 추출 시 고액비 10%가 가장 경제적인 추출조건이라 결론지었다.

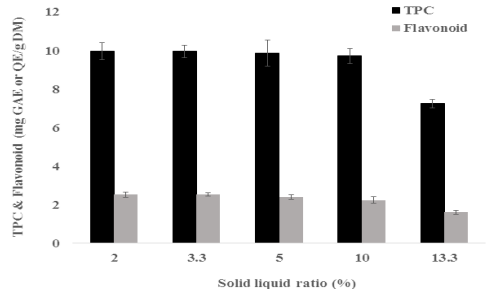


Figure 5. Effect of solid loading (solid to liquid ratio, w/v %) on the extraction of TPC and flavonoids from Korean thistle.

4. 결론

본 연구에서는 고려엉겅퀴로부터 유용물질인 폴리페놀과 플라보노이드 추출을 최대화 할 수 있는 최적 추출조건을 확립하기 위하여 용매선정(9종), 추출농도(0-2 N), 추출시간(0-60 min), 추출온도(30-120°C) 및 고액비(2-13.3% w/v)를 순차적으로 최적화하였다. 폴리페놀 대비 플라보노이드의 열 안정성이 낮은 점이 발견되었으나 전반적인 추출 경향성은 매우 유사함을 확인할 수 있었다. 폴리페놀과 플라보노이드 생산 시 1 N NaOH를 이용하여 40분, 추출온도 120°C, 고액비 10%(v/w)에서 각각 최대 9.71 mg GAE/g DM와 2.23 mg QE/g DM의 폴리페놀과 플라보노이드를 얻을 수 있었다. 고려엉겅퀴로부터 항산화제 또는

항노화제와 같은 유용물질을 생산함에 있어 추출조건 최적화를 통해 친환경 용매를 이용하여 보다 경제적인 추출공정 조건을 제시하였다는데 연구의 의의가 있으며, 유기용매에 비해 염기 열수추출이 항산화 관련 소재 개발에 있어 보다 유용하고 독성 유기용매를 대체가 가능한 친환경적 추출 공정임을 확인하였다.

참고문헌

1. Yun S. B., Lee Y., Lee N. K., Jeong E. J., Jeong Y. S., "Optimization of Microwave Extraction Conditions for Antioxidant Phenolic Compounds from *Ligustrum lucidum* Aiton Using Response Surface Methodology", *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* Vol. 43, NO. 4, 570-576 (2014).
2. Koh Y. J., Cha D. S., Chol H. D., Park Y. K., Choi I. W., "Hot Water Extraction Optimization of Dandelion Leaves to Increase Antioxidant Activity" *Korean J. Food Sci. Technol.* Vol. 40, NO. 3, 283-289 (2008).
3. Lee Y. J., Kin E. O., Choi S. W., "Isolation and Identification of Antioxidant Polyphenolic Compounds in Mulberry (*Morus alba* L.) Seeds" *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* Vol. 40, NO. 4, 517-524 (2011).
4. Lee J. H., Son Y. L., Lee B. K., Kim H. J., Park J. Y., Lee H. S., Kim J. S., Park H. H., Han O. K., Han S. I., Lee Y., "Analysis of total polyphenol content and antioxidant activity in puffed oats" *Korean J. Food Sci. Technol.* Vol. 50, NO. 1, 117-121 (2012).
5. Kim E. J., Choi J. Y., Yu M., Kim M. Y., Lee S., Lee B. H., "Total Polyphenols, Total Flavonoid Contents, and Antioxidant Activity of Korean Natural and Medicinal Plants" *Korean J. Food Sci. Technol.* Vol. 44, NO. 3, 337-342 (2012).
6. Lee S. H., Kim Y. S., Heo S. I., Shim T. H., Sa J. H., Choi D. S., Wang M. H., "Composition Analysis and Antioxidative Activity from Different Organs of *Cirsium setidens* Nakai" *Korean J. Food Sci. Technol.* Vol. 38, NO. 4, 571-576 (2006).
7. Lee W. B., Kwon H. C., Cho O. R., Lee K. C., Choi S. U., Baek N. I., Lee K. R., "Phytochemical Constituents of *Cirsium setidens* Nakai and Their Cytotoxicity against Human Cancer Cell Lines" *Arch. Pharm. Res.* Vol. 25, NO. 5, 628-635 (2002).
8. Cho B. Y., Lee J. H., Ra M. J., Kim S. Y., Kang I. J., Han K. C., Lee O. H., "Analysis of Pectolinarin Content and Antioxidant activity in *Cirsium setidens* Nakai by Cultivars" *J. Food Hyg. Saf.* Vol. 31, NO. 3, 210-215 (2016).
9. Milutinović M., Radovanović N., Corović M., Siler-Marinković S., Rajilić-Stojanović M., Dimitrijević-Branković S., "Optimisation of microwave-assisted extraction parameters for antioxidants from waste *Achillea millefolium* dust" *Ind. Crops Prod.* Vol. 77, 333-341 (2015).
10. Min B. R., Han Y. J., Lee D. K., Jung H. H., Jo J. M., "Optimization of Microwave-assisted Extraction Conditions for Production of Bioactive Material from Corn Stover" *Korean Chem. Eng. Res.* Vol. 56, NO. 1, 66-72 (2018).
11. Cheung L. M., Cheung P. C. K., Ooi V. E. C., "Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts" *Food Chem.* Vol. 81, NO. 2, 249-255 (2003).
12. Kim M. B., Park J. S., Lim S. B., "Food Sci. Biotechnol." Vol. 18, NO. 4, 996-1000 (2009)
13. Han S. R., Kim M. J., Oh T. J., "Antioxidant Activities and Antimicrobial Effects of Solvent Extracts from *Lentinus edodes*" *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* Vol. 44, NO. 8, 1144-1149 (2015)
14. Kim Y. J., "Evaluation of Antioxidant Activity and Thermal Stability of Plant Polyphenols" *Biomater. Res.* Vol. 13, NO. 1, 30-36 (2009).