

이산화탄소 유체를 이용한 녹차의 용매 추출물의 래디칼 소거 기능

강 옥 주
경남대학교 식품영양학과

Effect of Free Radical Scavenging from Green Tea Extraction using Carbon Dioxide Fluid

Ok-Ju Kang

Department of Food and Nutritional Science, Kyungnam University

Abstract

Green tea was extracted with different solvents such as hot water, varying concentrations of ethanol and carbon dioxide fluid. The carbon dioxide fluid extraction of green tea was a very effective extraction method in terms of antioxidant yield and stability. At pressure of 125kgf, antioxidant extract of green tea produced a yield 1.87 and 2.8 times higher than hot water and 95% ethanol extract, respectively. Antioxidant extract of carbon dioxide fluid was also very stable during 7-day storage at 35?.

Key words : Green tea, extraction method, carbon dioxide fluid extraction, antioxidant.

1. 서 론

녹차의 생엽은 75-80%가 수분으로 구성되어 있고, 고형물에는 폴리페놀, 카페인, 단백질, 아미노산, 탄수화물(덱스트린, 전분, 셀룰로오스, 펙틴)과 색소성분(엽록소, 카로티노이드, 플라보노이드 유도체, 안토시안) 등이 함유되어 있다(Choi HJ 1977). 특히 녹차에는 일반 식물 성분에 비하여 테아닌과 카페인을 많이 함유하고 있고 폴리페놀 함유량이 높은 특징을 지닌다.

폴리페놀인 카테킨류에 관한 생리활성 연구는 다양하게 이루어지고 있다. 녹차, 오롱차 및 홍차 추출물의 항산화 효과를 비교한 연구(Yeo S 등 1995)에서 항산화 작용은 반발효차인 오롱차가 높았으나, free radical 소거 작용은 녹차와 오롱차 모두 우수하다고 하였다. 또한, 녹차의 항균(Hara Y와 Ishigami T 1989) 및 항종

양(Sazuka M 1997, Hibasami H 등 1996)도 입증되었으며, 차에 의한 생체 내에서의 활성 중 혈청 콜레스테롤의 억제 작용(Muramatsu K 등 1986)과 혈당저하작용(Matsumoto M 등 1993) 등이 연구되었다. 이와 같이 차의 폴리페놀 화합물은 천연 항산화제로써 이용될 가치가 매우 높다.

차의 기능성에 관한 연구는 활발히 이루어진 반면, 녹차로부터 항산화물질을 추출하는 공정 기술에 관한 연구는 그리 많지 않은 것이 현실이다. 침출 조건인 열수 추출 온도 및 시간에 따른 녹차 추출물의 성분 중 카테킨과 비타민 C의 함량 변화를 살펴 본 연구(Choi HJ 등 2000)와 녹차, 우롱차, 홍차를 유기용매 종류별로 추출한 후 카테킨 함량과 항산화 효과(Lee YJ 등 1998)를 비교한 연구 등이 있으며, 녹차에서 열수와 용매 분획을 이용한 카테킨류의 추출(Row KH와 Jin Y 2005) 및 차 폴리페놀과 카페인의 동시추출(Hai L 등 1998) 등이 보고된 정도이다. 이러한 연구는 항산화물질의 효율적인 추출에 대한 좋은 정보를 제공하고 있으나, 생산 공정 기술에 필요한 수율에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

Corresponding author: Ok-Ju Kang, Kyungnam University,
Masan 631-701, Korea
Tel: 82-55-249-2235
Fax: 82-55-244-6504
E-mail: koj117@kyungnam.ac.kr

현재까지 녹차 항산화물질 추출방법은 물 추출, 알코올 추출 등이 주류를 이루며, 이러한 과정에서 항산화 활성 소실률이 매우 높다. 따라서 녹차 항산화물질을 소재로 생산할 경우, 그 생산 가격이 높아 우수한 생리 활성에도 불구하고 제품에 적용이 저조한 편이다. 이러한 점에 착안하여 본 연구에서는 이산화탄소 유체를 순환시키는 공정을 기본으로 하는 추출 장치를 활용하여 저 비용으로 효율적인 녹차 항산화물질을 추출하는 공정을 개발하고자 한다. 동시에 타 추출 방법과 비교하여 래디칼 소거기능을 기준으로 한 기능성의 보존과 수율을 비교 조사함으로써 향후 개발 공정의 상용화를 위한 기초 자료로 삼고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

녹차 잎은 하동에서 6월 중 수확하는 하품으로 하여 건조 후 분쇄하여 입자의 크기를 분별하였으며, 진공으로 포장하여 냉암소에 보관하면서 사용하였다.

2. 추출공정

이산화탄소 유체 추출기는 한국 초임계 추출(주)에서 생산한 KSC 250 형(Fig. 1)을 이용하였다. 이산화탄소가 고압펌프에 의하여 압력이 65~125 kgf 범위로 조절되며, 이산화탄소유체가 condenser에 응축되어 아래의 저장고에 모이게 된다. 시료저장소에 유체가 들어가기 전 히터로 온도를 15~40℃까지 조절할 수 있다. 시료를 통과한 이산화탄소 유체 추출물은 증발조 1에서 일부 분리되고, 제 2 증발조에서 완전히 이산화탄소와 분리된다. 이렇게 분리된 기체 이산화탄소는 다시 condenser에서 냉각되어 유체상태로 돌아가 다시 순환하게 된다.

본 실험에서는 25℃에서 65~125 kgf 압력 범위에서 각각 24시간 추출하면서 최적 추출 압력과 시간을 결정하고, 같은 조건하에서 온도 15~35℃ 범위로 추출 수율을 평가하였다. 그리고 이러한 조건에서 녹차분말 입자 크기(40/80~100/200 mesh)에 따른 추출 효율을 비교하여 최적추출조건을 결정하였다. 또한 Kuhr 등(1991)의 방법에 따라 알코올 추출 방법으로 녹차 잎을 추출한 후 이산화탄소 유체 추출법과 수율을 비교 평가하였다.

3. 래디칼소거능

래디칼 소거능 실험은 Blois 등(1958)에 의한 방법에 따라 DPPH법으로 측정하였다. 즉, DPPH 15 mg을 100 mL absolute ethanol에 용해한 후 증류수 100 mL로 정용하여 DPPH 시약으로 사용하였다. 수소 공여능의 측정은 이 시약 3 mL에 시험용액 30 μL를 가하여 혼합하고 30초 후에 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며 래디칼 소거능(%)는 대조구의 흡광도와 비교하여 아래 식으로 계산하였다.

$$\text{래디칼 소거능(\%)} = \{1 - (\text{시료 흡광도} / \text{대조구 흡광도})\} \times 100$$

4. 래디칼 소거기능 추출 수율과 안정성

이산화탄소 유체 추출기는 시료 중 비극성물질을 추출하는데 이용한다. 따라서 이 경우 추출수율은 건조 녹차 분말 중 함유된 oil 양을 soxhlet법(Folch 등 1951)으로 측정된 값 1.2%를 100% 수율로 하여 이산화탄소유체로 추출된 정유의 양과 비교하여 백분율로 표시하였다.

$$\text{추출수율} = (\text{CO}_2 \text{ fluid extracted oil} / \text{Soxhlet extracted oil}) \times 100$$

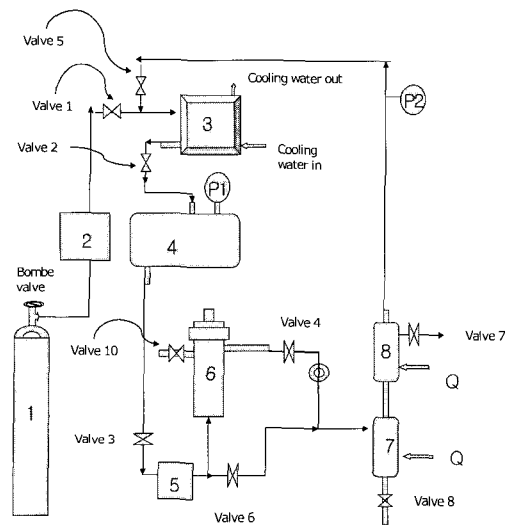


Fig. 1. Diagram of carbon dioxide fluid extractor used in this experiment.

1. carbon dioxide tank
2. pump
3. condenser
4. reservoir
5. heater
6. sample reservoir
7. 1st evaporator
8. 2nd evaporator

그러나 물과 에탄올 추출의 경우에는 극성물질이 대부분 추출되므로 추출수율을 표시할 때 이산화탄소유체추출과는 달리 녹차를 무수 메탄올로 추출한 래디칼 소거능을 100으로 대조구로 삼아 물과 에탄올 추출물의 래디칼소거능을 각각 비교하여 백분율로 표시하였다.

이산화탄소유체추출물과 물 그리고 에탄올추출물의 래디칼소거능을 비교하여 % antioxidant power로 표시하였는데 이때 비교 방법은 다음과 같다. 시료의 래디칼 소거능은 그 값이 90%가 넘으면 정비례하지 않는다. 따라서 추출물을 에탄올로 희석하여 비교군 모두의 값이 50~90% 값을 나타내는 희석배수에서 래디칼 소거능을 비교하였다. 가장 값이 낮은 열수 추출물의 래디칼 소거능을 100%로 하여 비교하였다. 또한, 동일 시료를 20 mL 앰플에 넣어 35°C에서 7일간 저장한 후 래디칼 소거능을 DPPH법으로 측정하여 저장 전과 비교하여 가장 높은 값을 100%로 하여 상대적 래디칼 소거기능 안정성을 구하였다.

5. 통계처리

실험 결과는 3회 반복 실험에 의해 행해졌으며, 데이터의 통계처리는 SAS 프로그램(SAS institute, 1985)을 이용하여 평균값±표준편차로 표시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 이산화탄소 유체 추출을 이용한 녹차 잎 정유의 추출

항산화성이 크다고 밝혀진 카테킨류는 뜨거운 물이나 알코올로 추출하고 있으나 공정의 안정성에 많은 문제를 안고 있다. 이산화탄소 유체는 추출 공정 중 공기와 접촉이 없으므로 항산화력의 소실이 없으며 추출 후에 대부분이 추출액 분리 과정에서 공기 중으로 증발되고 일부는 추출액 중에 용해되어 산화를 방지하는 기능을 한다. 본 실험에서 사용한 이산화탄소 유체 추출기는 한국초임계추출(주)에서 개발하여 특허 등록된 기계로서, 150 kgf 이하의 압력에서 효율적으로 정유를 추출하는 기기로서 이산화탄소유체를 순환시켜 사용하는 특징을 갖고 있다.

입자크기가 80/100 mesh 인 녹차분말을 사용하여 추출온도 25°C에서 압력에 따른 추출 효율을 조사하였

다. 이때 수율 %는 건조 녹차 분말 중 함유된 oil 양을 속시렛으로 측정된 값 1.2%를 기준으로 하여 추출된 정유의 % 농도를 비교하였으며, 이를 백분율로 표시하였다.

Fig. 2는 추출 시간과 압력에 따른 추출 효율을 나타낸 것으로 추출 시간이 증가하면 할수록 추출 효율이 높음을 알 수 있었으나, 12시간의 추출 시간 이후에는 추출 효율이 더 이상 증가하지 않는 것으로 나타났다. 즉, 추출 시간을 2배로 늘린 24시간 추출 이후에도 추출 효율에는 큰 증가가 없으므로 추출 공정 조건으로는 12시간 추출이 가장 적합한 것으로 판단되었다. 또한 적정 압력을 살펴본 결과, 125 kgf가 65와 85 kgf에 비하여 각각 1.98 및 1.33배 높은 수율을 보였다. 따라서 이산화탄소유체 추출을 통한 녹차의 추출 조건은 125 kgf 압력에서 12시간 추출하는 것이 가장 적절할 것으로 판단된다.

녹차 추출의 효율성에서 결정된 추출 조건인 12시간의 추출 시간 동안 추출 온도를 달리하여 측정된 추출 효율은 Fig. 3과 같다. 추출 온도가 낮을 경우 그 효율 또한 낮았으나, 25°C와 35°C에서의 추출 효율은 오히려 다소 감소하였다. 따라서 추출 최적 온도는 25°C로 결정하였다.

추출 시 분말 입자의 크기가 감소하면 표면적이 커지기 때문에 일반적으로 추출 효율이 높아지나 너무 작은 입자는 가공 공정에서 오히려 멍침 현상이 발생하기 때문에 추출 효율이 떨어질 수도 있다. 가장 적절한 추출 조건을 찾기 위해 녹차 분말을 메쉬별로 세

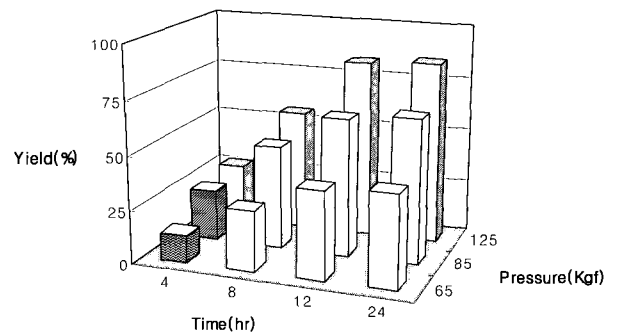


Fig. 2. Extraction yield (%)^a of green tea oil using CO₂ extractor with pressure change at 25°C.

^a Values are mean values of triplicate.

종류로 나누어 앞에서 결정된 적정 추출 조건으로 추출한 결과는 Fig. 4와 같다. 예측한대로 40/80 mesh의 입자 분말에서 추출 효율이 가장 낮았으며, 미세 분말인 100/200 mesh 입자 분말은 40/80 mesh 분말보다는 추출효율이 높았으나 80/100 mesh 입자 분말에 비하여 추출 효율이 현저히 떨어졌다. 따라서 최적분말입자의 크기는 80/100 mesh로 결정하였다.

이산화탄소유체를 이용한 녹차 분말의 최대 추출 조건은 녹차 분말을 80/100 mesh의 크기로 분쇄하고, 추출 온도와 압력을 각각 25℃와 125 kgf으로 하여 12시간 추출하는 것이었다.

2. 물과 용매를 이용한 래디칼 소거기능 추출

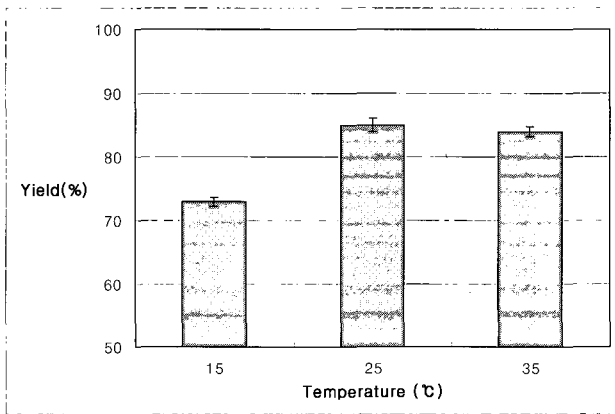


Fig. 3. Extraction yield(%)^a of green tea oil using CO₂ extractor with temperature change at 125 kgf for 12 hr.
^a Values are mean±S.D. values of triplicate.

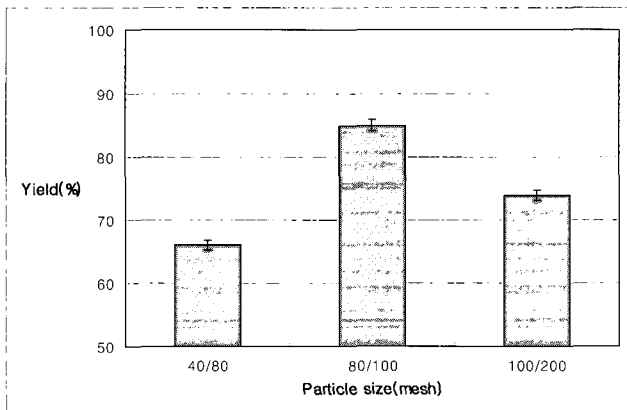


Fig. 4. Extraction yield(%)^a of green tea oil using CO₂ extractor with particle size change.
^a Values are mean±S.D. values of triplicate.

조건 비교

물과 에탄올을 이용하여 녹차 래디칼 소거기능의 추출 조건을 비교하기 위하여 녹차 추출액을 밀폐한 앰플 용기 내에서 추출 온도를 상온, 100℃, 121℃로 달리 하면서 분석 비교하였으며, 녹차 중량에 대하여 물 또는 에탄올의 비율은 1:10으로 희석하여 사용하였다.

추출 온도를 실온으로 하여 4시간 추출한 결과는 Fig. 5와 같다. 물에 의한 추출은 에탄올 추출에 비하여 다소 낮은 효율을 보여 50% 에탄올 추출과 유사한 값을 띠었다. 추출 효율이 가장 높은 조건은 95% 에탄올을 용매로 사용한 경우였으며, 추출 시간에 따른 변화는 추출 1시간에서 4시간까지 유의적인 변화가 없었다. 즉, 실온에서는 1시간 이상 추출할 필요성을 의미하였으며, 물과 50% 에탄올 추출물보다는 95% 에탄올로 추출하는 것이 효율적임을 입증하였다. 이에 이후 실험에서는 열수 추출은 제외되었다.

Lee 등(1998)의 연구에서는 추출 용매를 ethanol이나 methanol로 추출하는 것보다는 물추출물을 다시 에틸아세테이트로 추출한 후 분리 정제하여 얻은 조카테킨이 더 순도가 높다고 하였다. 이는 물추출 후 또 다른 공정이 한 단계 더 요구되는 관계로 효율적인 면에서 다소 단점이 되고 있다.

녹차의 래디칼 소거기능 추출 효율을 알아보기 위하여 온도를 100℃로 높이고 에탄올만을 용매로 하여 최대 2시간 추출한 결과는 Fig. 6과 같다. 100℃에서 추출한 결과, 실온에 비하여 추출 효율이 현저히 높았으며 실온과 같이 95% 에탄올을 용매로 사용한 경우 추

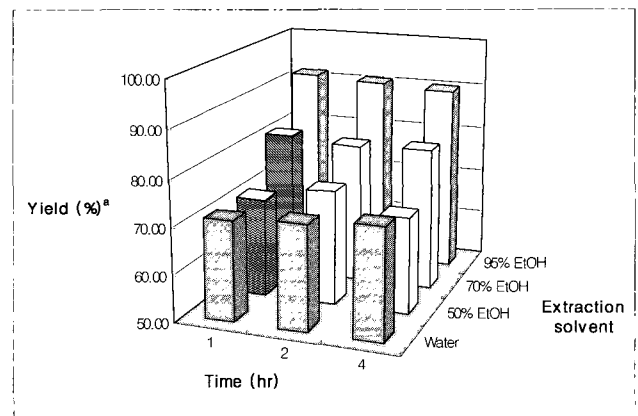


Fig. 5. Effect of solvent for the extraction of green tea antioxidant at room temperature.
^a Values are mean values of triplicate. ^bEtOH: ethanol

출 효율이 가장 효과적이었다. 또한, 추출 시간은 30분 추출에서 가장 높은 효율을 보여 30분에 추출이 종료됨을 알 수 있었다. 특이할 점은 추출 효율이 실온에서는 용매 농도별 차이가 현저한 것에 비해, 100°C에서 추출한 경우 용매인 알코올 농도별 추출 효율에 큰 차이가 없다는 점이었다. 따라서 용매와 시간을 효율적으로 사용하면서 녹차의 래디칼 소거기능을 추출할 수 있을 것으로 생각된다.

추출 온도를 오토클레이브 조건인 121°C에서 최대 30분간 추출하면서 항산화 물질의 추출 효율을 비교한 결과는 Fig. 7과 같다. 121°C의 추출 온도는 너무 높은 탓에 실온과 100°C에서 추출한 래디칼 소거기능에 비해 그 효율이 감소하였다. 그리고 추출 시간이 10분

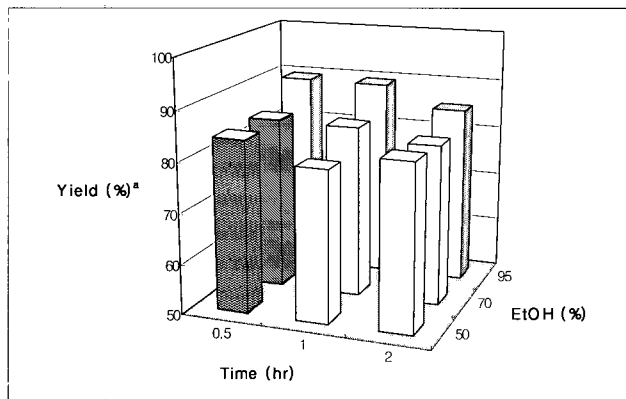


Fig. 6. Effect of solvent for the extraction of green tea antioxidant at 100°C.

^a Values are mean values of triplicate. ^bEtOH: ethanol

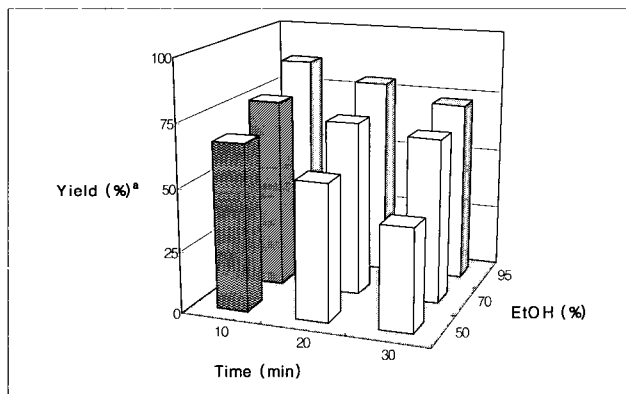


Fig. 7. Effect of solvent for the extraction of green tea antioxidant at 121°C.

^a Values are mean values of triplicate. ^bEtOH: ethanol

간격으로 길어짐에 따라 추출 효율도 크게 감소하여 10분 추출에서 가장 높은 효율을 보였다.

3. 추출방법에 따른 래디칼 소거기능 추출 효율 및 안정성 비교

열수 추출, 알코올 추출, 이산화탄소유체 추출물의 래디칼 소거능과 안정성 수율을 비교한 결과는 Table 1과 같다. 이산화탄소유체를 이용하여 추출한 정유는 고도 농축 형태이므로, 에탄올로 녹차 잎을 1:10으로 희석하여 용매 추출 할 때의 추출액과 같은 조건으로 제조한 후 DPPH법으로 래디칼 소거기능을 측정하였다. 이렇게 제조한 녹차 추출 희석액의 래디칼 소거능은 그 수치가 너무 높아 다시 2배 희석하여 측정하였으며 그 희석 배수를 곱하여 환산하였다.

열수 추출과 알코올 추출물의 래디칼 소거능을 비교한 결과 알코올 추출이 열수추출에 비해 1.5배 정도 높았으며, 이산화탄소유체의 경우 래디칼 소거능이 열수추출과 비교하여 2.8배, 알코올 추출물과는 1.87배 높아 래디칼 소거능이 가장 높은 추출 방법임을 알 수 있었다. 이는 Lee 등(1998)의 연구 결과와도 일치하였는데, ethanol 추출물, methanol 추출물, EtAc 추출물 모두 기존의 항산화제인 BHT, *dl*- α -tocopherol보다 좋은 항산화 효과를 보인다고 보고하였다.

래디칼 소거능의 안정성을 비교하기 위하여 밀폐된 앰플에 보관하면서 35°C에서 실시한 결과, 열수추출과 알코올 추출물의 래디칼 소거능이 7일째 각각 67%와 84%로 측정되었다. 즉, head space에 잔존한 산소가 추출물의 산화를 유발하는데 알코올 추출물이 열수추출물에 비해 안정적임을 알 수 있었다. 한편, 이산화탄소유체를 이용한 추출물은 7일간의 안정성 실험에서 래디칼 소거능이 전혀 소실되지 않게 나타났다. 이를 통해 이산화탄소유체 추출물에 함유된 용존 이산화탄소가 추출물의 산화를 억제함을 알 수 있어 매우 효율적인 추출 방법임을 알 수 있었다.

Table 1. Comparison of antioxidant power and stability of green tea extracts with different extraction method

Extraction method	DPPH value (Antioxidant power %)	DPPH value % Stability
Water at 100°C	54.3±0.07%(100)	36.4±0.03%(67)
95% Ethanol at 100°C	81.5±0.13%(150)	68.5±0.08%(84)
CO ₂ fluid(125Kgf) [*]	152.0±1.57%(280)	152.0±1.30%(100)

^{*} 2 fold dilution was used.

위 연구 결과를 토대로 이산화탄소유체에 의한 녹차 잎 래디칼 소거기능 추출 방법은 매우 효과적인 공정임을 알 수 있었으며, 래디칼 소거기능의 안정성도 뛰어나 상업적 가치가 높음을 알 수 있었다. 그리고 일반적으로 초임계 유체 추출은 600 kgf에 달하는 높은 압력을 사용함으로써 작업 중 안전이 항상 우려되는 추출 방법인데 반해, 본 연구의 이산화탄소유체 추출법은 150 kgf 이하의 압력으로 추출함으로써 초임계 유체 추출법에 비해 상대적으로 매우 안전한 공정으로 평가된다.

IV. 요약

녹차 잎을 건조 분말하여 래디칼 소거기능을 추출하는 공정으로 순환 이산화탄소유체추출기를 활용할 때의 추출 최적조건을 구하였다. 건조한 녹차 잎의 분말 사이즈는 80/100 mesh로 하고, 추출 압력과 온도를 각각 125 kgf 및 25℃로 12시간 추출한 경우 가장 추출 효율이 좋았다. 또한 용매를 열수추출과 에탄올 농도를 달리한 추출 방법으로 나누어 래디칼 소거기능을 추출하였다. 그 결과, 에탄올 95% 농도에서 추출한 경우 가장 효율이 높았으며, 온도는 100℃로 30분 추출이 최적 조건이었다. 각 추출 방법에 따른 추출 수율과 안정성을 비교한 결과, 이산화탄소유체를 이용한 녹차 래디칼 소거기능 추출 공정이 열수나 에탄올에 비하여 각각 2.8배 및 1.87배 수율이 높았으며, 안정성 실험에서도 활성의 소실이 거의 없었다.

감사의 글

본 연구는 2004학년도 경남대학교 신진교수연구비에 의해 지원되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

Blois M.S. 1958. Antioxidant determination by use of stable free radical, Nature 26: 1199-1203.

Choi HJ, Lee WS, Hwang SJ, Lee IJ, Shin DH, Kim HY, Kim KU. 2000. Changes in chemical compositions of green tea(*Camellia sinensis* L.) under the different extraction conditions. Korean J Life Sci 10: 202-209.

Choi HJ. 1977. Changes in chemical compositions of green tea (*Camellia sinensis* L.) under the different extraction conditions. MS Thesis, Kyungpook National Univ., Daegu.

Hai L, Sun H, Li Z. 1998. Simultaneous extraction of tea polyphenol and caffeine from green tea. Wei Sheng Yan Jiu 27: 195-196.

Hara Y, Ishigami T. 1989. Antibacterial activities of tea polyphenols against food borne pathogenic bacteria. Nippon Shokuhin Logyo gakkaiishi 36: 996-999.

Hibasami H, Achiwa Y, Fujikawa T, Komiya T. 1996. Induction of programmed cell death (apoptosis) in human lymphoid leukemia cells by catechin compounds. Anticancer Res 16: 1942-1946.

J.I. Folch, I. Ascoll, M. Lees, J.A.Meath, F.N.Lebaron. 1951. Preparation of lipid extracts from brain tissue. J. Biol. Chem., 191: 833-841.

Kuhr S, Engelhardt U.H. 1991. Determination of flavanols, theogallin, gallic acid and caffeine in tea using HPLC, Z Lebensm untersforsch 192: 526-529.

Lee YJ, Ahn MS, Oh WT. 1998. A study on the catechins contents and antioxidative effect of various solvent extracts of green, oolong and black tea. J Fd Hyg Safety 13: 370-376.

Matsumoto M, Ishigaki F, Ishigaki A, Iwashina H, Hara Y. 1993. Reduction of blood glucose levels by tea catechin. Biosci Biotech Biochem 57: 525-527.

Muramatsu K, Fukuyo M, Hara Y. 1986. Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats. J Nutri Sci Vitaminol 32: 613-622.

Row KH, Jin Y. 2005. Recovery of catchin compounds from Korean tea by solvent extraction. Bioresource technology in Press.

SAS Institute, Inc. 1985. SAS User's Guide; Statistics. 5th ed. Cary, NC, USA.

Sazuka M, Imazawa H, Shoji Y, Mita T, Hara Y, Isemura M. 1997. Inhibition of collagenases from mouse lung carcinoma cells by green tea catechins and black tea theaflavins. Biosci Biotech Biochem 61: 1504-1506.

Yeo S, Ahn CY, Lee Y, Lee T, Park Y, Kim S. 1995. Antioxidative effect of tea extract from green tea, oolong tea and black tea. J Korean Soc Food Nutri 24(2), 299-304.

(2005년 11월 25일 접수, 2005년 12월 30일 채택)