

강황(*Curcuma longa* L.)으로부터 초임계 유체 추출한 curcumin의 생리활성

정승현 · 장규섭^{1,*} · 고경희
(주)오투기, ¹충남대학교 식품공학과

Physiological Effects of Curcumin Extracted by Supercritical Fluid from Turmeric (*Curcuma longa* L.)

Seung-Hyeon Jung, Kyu-Seob Chang^{1,*}, and Kyung-Hee Ko
Ottoji Co. Ltd.

¹Department of Food Science and Technology, Chungnam National University

Physiological effects of curcumin, major yellow-colored pigment in tumeric (*Curcuma longa* L.), extracted by traditional extracting methods, ethanol and hot-water extractions, and supercritical fluid extraction (SFE) using supercritical carbon dioxide as new extracting method. Antioxidative activity of ethanol extract was higher than those of SFE and hot-water extracts. Results of Ames mutagenicity test on SFE, ethanol, and hot-water extracts revealed no mutagen in the extracts. Antimutagenicity rates of SFE, ethanol, and hot-water extracts against direct mutagen, 2-nitrofluorene (2-NF), were 20.1, 9.3, and 15.2%, respectively. Antimutagenicity rate of SFE extract against TA98 derived from indirect mutagen, 2-acetamidofluorene (2-AF), was 12.2%, whereas none was observed in ethanol and hot-water extracts. Nitrite-scavenging ability of SFE extract was higher than those of ethanol and hot-water extracts.

Key words: physiology effects, curcumin, turmeric, supercritical fluid extraction

서 론

강황은 생강과(Zingiberaceae)의 강황속(*Curcuma*)으로 분류되는 다년생 식물로서 학자들에 따라 30~70여종의 독립종이 존재한다고 밝히고 있지만 정확한 종의 수는 알려지지 않고 있으며, 대부분 외관상 형태는 비슷하다(1). 강황은 향기성분 보다는 curcuminoids에 의한 착색 효과(2)가 중요한 것으로 평가되어온 향신료로 추출 등의 가공없이 강황분만으로도 식품의 색상을 조절할 수 있어 추출에 관한 연구가 다른 향신료에 비해 적었다. 그러나 최근 강황의 생리활성물질인 curcumin이 항산화성, 항돌연변이성, 항암효과, 항염증 등 여러 가지 기능성이 밝혀지면서 의학분야를 중심으로 활발한 연구가 진행되고 있다. 이에 따라 강황의 생리활성 물질 추출분야도 초임계 유체를 이용한 정유성분 및 curcuminoids 추출이 산업적 응용 측면에서 매우 중요하리라 사료된다.

초임계 유체(3,4)를 이용한 추출법은 물질의 기상과 액상의 상경계지점인 critical point 이상의 압력과 온도를 설정해 줌으로써 액상의 용해력과 기상의 확산계수와 점도의 특성을 지니게 하여 신속한 추출과 선택적 추출이 가능하게 하는 방법이다. 또한 초임계 유체는 주로 이산화탄소 혹은 이산화탄소와 미량의 보조용매로 형성되기 때문에 용매추출법에 비해 유해성 용매의 잔존 위험이 없을 뿐만 아니라 상온부근에서 추출 조작이 이루어질 수 있기 때문에 천연물 또는 식품과 같이 열에 민감한 물질의 추출에 유용한 방법이다. 그러나 아직까지 강황의 생리활성 물질인 curcumin에 대한 산업적 응용을 위한 초임계 추출의 최적조건이 확립되지 않았으며, 강황의 초임계 추출물과 다른 추출 방법으로 추출된 강황 추출물의 생리적 특성을 비교한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구는 예비 실험을 통해 최적 초임계 추출조건으로 추출한 curcumin과 열수 및 에탄올로 추출한 curcumin의 생리활성 효과를 조사·비교하여 초임계 유체 추출한 curcumin의 활용가능성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

시료제조

본 실험에서 사용한 강황은 2001년 인도에서 재배된 Madras 산 finger형을 분쇄하여 알미늄 파우치에 밀봉한 상태로 4°C 냉

*Corresponding author : Kyu-Seob Chang, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture and Life sciences, Chungnam National University, 220 Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea
Tel: 82-42-821-7876
Fax: 82-42-822-2153
E-mail: changks@cnu.ac.kr

장 보관하면서 공시재료로 사용하였다. 초임계 추출물은 예비 실험을 통해 curcumin 추출 수율이 높았던 압력 250 bar, 온도 40°C, 보조용매(에탄올) 유속 3 mL/min 조건에서 3시간 추출하고 보조용매 에탄올을 가하여 200 mL로 정용하였고, 에탄올 추출물은 에탄올 100 mL에 강황분 5 g을 첨가하여 70°C 온도에서 2시간 동안 추출하였고, 열수 추출물은 증류수 200 mL에 강황분 10 g을 첨가하여 100°C에서 2시간 동안 추출하였다. 모든 추출물은 12,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 membrane filter (0.45 µm)로 여과하여 시료용액으로 사용하였다.

HPLC에 의한 curcumin 함량 분석

전처리된 거친 시료를 HPLC(Agilent, 1100 Series, Hewlett Packard, USA)로 curcumin의 함량을 분석하였다. Column은 Zorbax Eclipse C18(4.6 mm×150 mm×5 µm)을 사용하였고, Mobile phase는 Methanol 100%, 유속은 0.8 mL/min 으로 하였다. DAD(UV 424 nm)로 검출하였고, Injection volume은 10 µL 였다. Standard curcumin은 Sigma사의 curcumin을 사용하였다.

항산화 효과

Rancimat(Model743, metrohm, Switzerland)를 이용한 conductometric determination method(CDM)(5)으로 평가하였다. 반응조에 시료인 우지를 3 g 취한 후 120°C로 조절된 aluminium heating block상에서 시간당 20 L의 여과된 공기를 주입하여 산화시켰다. 항산화력은 추출물을 첨가하지 않은 유지시료를 대조구로 하여 유도기간(hour)을 계산하였다.

돌연변이성 및 항돌연변이성(Mutagenicity and antimutagenicity test)

시험균주: Maron과 Ames(6)의 방법에 따라 실험하였다. *Salmonella typhimurium* TA98(KCTC2053), *Salmonella typhimurium* TA 100(KCTC2054)는 유전형질 등을 확인한 후 실험에 사용하였다.

S9 mixture 제조: 간접 돌연변이원을 활성화시키기 위해서 Maron과 Ames(6)의 방법에 따라 조제하였다. S9 mixture는 S9 fraction(10%)을 MgCl-KCl염(2%), 1 M glucose-6-phosphate (0.5%), 1 M NADP(4%), 0.2 M phosphate buffer(pH 7.4)와 멸균수와 혼합하여 실험에 사용하였다.

돌연변이성 시험

Maron과 Ames(6)의 방법에 따라 실험하였는데, 미리 멸균한 cap tube에 시료농도의 증가에 따른 돌연변이성을 확인하기 위해 분석시료제조 방법에 따라 제조한 sample 용액을 농도별로 preincubation시킨 후 이것을 top agar 2 mL와 혼합한 후 최소 평판배지(minimal glucose agar plate)에 도말하여 37°C에서 48 시간 배양 후 배지상의 revertant colony 숫자를 계수하였다. 이 때 spontaneous colony의 개수보다 2배 이상이면 돌연변이성이 있는 것으로 판단한다.

항돌연변이성 시험

Maron과 Ames(6)의 방법을 이용하여 preincubation mutagenicity test로 검토하였다.

사용한 변이원은 직접변이원으로 2-nitrofluorene(3 µg/plate; Aldrich Co.; 2-NF)을 사용하였고 간접변이원으로는 2-acetamido fluorene(10 µg/plate; Sigma Co.; 2-AF)을 사용하였다. 돌연변이

억제 효과(inhibition rate)는 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Inhibition rate(\%)} = [(a - b)/(a - c)] \times 100$$

- a: 돌연변이원에 의해 유도된 복귀 돌연변이수
- b: 시료를 처리하였을 때의 복귀 돌연변이수
- c: 돌연변이원과 시료가 없을 경우의 자연복귀 돌연변이수

Nitrite scavenging activity: nitrite 분해능은 Kato(7)의 방법으로 실험하였다. 1 mM NaNO₂ 용액 1 mL에 시료용액 0.6 mL을 가하고 여기에 0.1 N HCl 및 0.2 M 구연산 완충용액을 사용하여 반응용액의 pH를 각각 1.2, 4.2 및 6.0으로 조정된 후 반응용액을 10 mL로 제조하였다. 이 용액을 37°C에서 1시간동안 반응시킨 후 1 mL를 취하고 여기에 2% acetic acid 5 mL과 Griess 시약 0.4 mL을 가하여 15분간 실온에서 방치시킨 다음 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 nitrite량을 구하고, nitrite 분해능을 다음과 같이 시료용액을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우의 nitrite 백분율(%)로 나타낸다.

$$\text{Nitrite 분해율(\%)} = 1 - \frac{A - C}{B} \times 100$$

- A: 1 mM NaNO₂ 용액에 시료용액을 첨가하여 1시간 방치시킨 후의 흡광도
- B: 1 mM NaNO₂ 용액의 흡광도
- C: 시료자체의 흡광도

결과 및 고찰

HPLC에 의한 curcumin 함량분석

초임계 추출, 에탄올 추출, 열수 추출에 의한 각 추출물의 curcumin 함량을 HPLC로 분석한 결과, 초임계 추출물은 1.89%, 에탄올 추출물은 2.55%, 열수 추출물은 0.004%로 열수 추출물의 함량이 가장 낮게 나타났다. 이는 curcumin이 소수성의 물에 녹지 않는 물질이므로 일반적인 열수 추출 조건에서는 추출되지 않는 것으로 생각된다.

항산화효과

초임계, 에탄올, 열수로 추출한 추출물을 우지에 0.1%, 0.5% 농도로 첨가하여 Rancimat으로 유도 기간을 측정된 결과는 Table 1과 같다. 추출물 중 에탄올 추출물이 항산화 효과가 다소 높게 나타났으나, 첨가 농도의 증가에 따른 유도기간의 차이는 미미하였다. 추출방법에 따른 시료간의 항산화 효과는 비슷한 유도기간 증가 양상을 나타내었다.

Table 1. Antioxidative effects of the turmeric extracts at concentration (0.1, 0.5%) on beef tallow

Concentration	Extracts	Induction periods (hr)
0.1%	Control	1.17
	SFE extracts	2.04
	Ethanol extracts	2.19
	Water extracts	1.94
0.5%	Control	1.17
	SFE extracts	2.10
	Ethanol extracts	2.22
	Water extracts	2.10

Table 2. Reverse mutation test of turmeric extracts in *Salmonella typhimurium* TA98

Dose of extracts (mL/plate)	His+Revertants/plate	
	TA98	
Spontaneous ¹⁾	59 ± 17	
SFE extracts	0.05	46 ± 10
	0.1	43 ± 6
	0.2	30 ± 7
Ethanol extracts	0.05	59 ± 14
	0.1	68 ± 10
	0.2	38 ± 7
Water extracts	0.05	47 ± 6
	0.1	60 ± 1
	0.2	78 ± 12

¹⁾The values are mean ± S.D. of 4 replications.

Table 3. Reverse mutation test of turmeric extracts in *Salmonella typhimurium* TA100

Dose of extracts (mL/plate)	His+Revertants/plate	
	TA98	
Spontaneous ¹⁾	57 ± 13	
SFE extracts	0.05	35 ± 8
	0.1	45 ± 6
	0.2	46 ± 8
Ethanol extracts	0.05	67 ± 7
	0.1	64 ± 4
	0.2	52 ± 14
Water extracts	0.05	50 ± 10
	0.1	76 ± 16
	0.2	62 ± 15

¹⁾The values are mean ± S.D. of 4 replications.

안(8)은 메탄올, 에틸아세테이트, 헥산을 용매로 추출한 강황 추출물을 1,500 ppm 농도로 미강유에 첨가하여 시험한 결과 대조구의 유도기간이 22.6시간 이었으며, 메탄올 추출물을 첨가 시에는 유도기간이 26.9시간, 에틸 아세테이트 추출물은 25.6 시간으로 증가하였으나 헥산 추출물은 유도기간이 22.7시간으로 대조구와 유사한 결과를 보여 항산화 효과가 없었다고 보고하였다. 강 등(9)은 강황의 에탄올 추출물을 팜유에 저농도인 0.02-0.10% 범위와 고농도인 0.1-0.5% 범위로 농도를 달리 하여 항산화성을 조사한 결과 농도가 증가함에 따라 항산화성이 증가함을 보고한 바 있으나 본 연구에서는 농도 증가에 따른 항산화 효과는 미약하였다. 강황의 항산화 효과는 phenol기를 가지고 있는 curcumin 및 향기성분이 항산화성에 밀접한 관련이 있는 것으로 판단된다.

돌연변이성 및 항돌연변이성

강황 추출물의 돌연변이성: 에탄올 추출물, 열수 추출물, 초임계 추출물의 돌연변이성 유무를 확인한 결과 Table 2, 3와 같이 강황 추출물들은 his⁺ revertant colony수의 증감이 대조구, TA98, TA100의 자연돌연변이 수 59, 57보다 2배 이상 증가시킨 추출물은 없는 것으로 확인 되었다. 따라서 강황추출물이 원인이 되어 돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단되었다.

Table 4. Antimutagenic effects of turmeric extracts against the mutagenicity of 2-nitrofluorene (2-NF) in *Salmonella typhimurium* TA98

Dose of extracts (0.1 mL/plate)	Revertants/plate TA98	Inhibition rate (%)
Spontaneous ¹⁾	45 ± 2	-
2-nitrofluorene	810 ± 28	-
SFE extracts	656 ± 83	20.1
Ethanol extracts	738 ± 34	9.3
Water extracts	693 ± 92	15.2

¹⁾The values are mean ± S.D. of 4 replications.

Table 5. Antimutagenic effects of turmeric extracts against the mutagenicity of 2-acetamidofluorene (2-AF) in *Salmonella typhimurium* TA98

Dose of extracts (0.1 mL/plate)	Revertants/plate TA98	Inhibition rate (%)
Spontaneous ¹⁾	35 ± 3	-
2-acetamidofluorene	136 ± 12	-
SFE extracts	124 ± 24	12.2
Ethanol extracts	157 ± 17	-
Water extracts	149 ± 26	-

¹⁾The values are mean ± S.D. of 4 replications.

직접변이원에 대한 항돌연변이 효과: 세포내의 DNA에 직접적으로 손상을 주어 돌연변이를 유발하는 물질로 알려진 변이원 2-nitrofluorene(3 µL/plate; 2-NF)으로 유도된 *Salmonella typhimurium* TA98에 대한 강황 추출물의 항돌연변이율은 Table 4와 같다. 3종의 추출물 중 초임계추출물의 저해율이 20.1%로 가장 높은 항돌연변이율을 나타냈으며, 에탄올과 열수추출물은 각각 9.3%, 15.2%의 항돌연변이율을 나타내었다. 이(10)는 직접변이원 2-NF로 유도된 *Salmonella typhimurium* TA98에서 강황의 열수 추출물을 0.1 mL 처리시 돌연변이수가 924에서 719로 감소하여 23%의 돌연변이 억제효과를 보고한 바 있어 본 시험결과보다 다소 높은 결과를 나타내었다.

간접변이원에 대한 항돌연변이 효과: Table 4에 간접변이원 2-AF에 유도된 TA98의 항돌연변이율을 나타내었다. 2-AF로 유도된 TA98은 SFE extract를 0.1 mL/plate로 처리시 12.2%의 항돌연변이율을 보였으며, 또한 알코올 추출물과 수용성 추출물은 간접변이원 2-AF에 유도된 TA98에 0.1 mL/plate로 처리시 항돌연변이 효과가 나타나지 않았다. Soni 등(11)은 tumeric의 알코올 및 수용성 추출물에서 S9대사 aflatoxin에 의해 유도된 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100에서 80%의 돌연변이 억제효과가 있음을 보고하였고, Nagabhusan 등(12)은 tumeric을 알코올로 추출한 추출물의 농도가 125 µg/plate에서는 benzo(α)pyrene, dimethyl benzantracene 변이원에서는 50%의 돌연변이 억제효과가 있었으며, 500 µg/plate 농도는 benzo(α)pyrene의 경우 75%, dimethylbenzantracene는 80%의 돌연변이 억제효과가 있었음을 보고하였다.

Nitrite scavenging activity

강황추출물 3종을 사용하여 nitrosamine생성 원인물질인 nitrite의 분해능을 확인한 결과는 다음과 같다. pH 1.2 조건하에서 반응시킨 경우 대조군으로 사용한 vitamin C 10 mg의 nitrite 분

해율은 $99.60 \pm 0.21\%$ 이었고, 초임계 추출물은 에탄올, 열수 추출물에 비하여 높게 나타났으며, 이 때 분해율은 $95 \pm 0.25\%$ 였다. 에탄올 추출물은 nitrite 분해율 $74.3 \pm 0.37\%$ 를 나타냈으며, 열수추출물은 $42.8 \pm 0.63\%$ 로 추출물 중 가장 낮은 분해율을 나타내었다. 김 등(13)은 강황을 25°C 물과 열수를 이용하여 추출한 추출물의 nitrite 분해율을 측정 한 결과 25°C 물을 이용한 추출물은 35% 이상, 열수 추출물은 40% 이상의 분해율을 나타내 본 실험의 열수 추출물과 유사한 결과를 나타냈다. pH 4.2에서 반응시킨 경우 대조구로 사용한 vitamin C 10 mg의 nitrite 분해율이 $88.1 \pm 0.13\%$ 였으며, 초임계 추출물은 $61.4 \pm 0.41\%$, 에탄올 추출물은 $45.4 \pm 0.52\%$, 열수 추출물은 $35.7 \pm 0.35\%$ 의 분해율을 나타냈다. pH 6.0에서 반응시킨 경우 대조구로 사용한 vitamin C 10 mg의 nitrite 분해율이 $78.8 \pm 0.32\%$ 였고, 초임계 추출물은 $48.6 \pm 0.55\%$, 에탄올 추출물은 $36.9 \pm 0.26\%$, 열수 추출물은 $18.3 \pm 0.71\%$ 의 분해율을 나타냈다. Nitrite 분해율은 pH가 1.2일 때 가장 우수하였고, pH가 높아질수록 분해율이 낮았다. 이 결과는 김 등(13)이 강황 추출물과 카레 원료인 여러 향신료 추출물의 nitrite 분해율이 pH 1.2에서 효과가 높았다는 결과와 Kyrtopoulos 등(14)이 N-nitroso compounds 형성에 대한 연구에서 nitrosamin 은 pH 2.5-3.0이 최적 조건으로 pH의존적이며 pH가 낮을수록 nitrite 분해율이 증가한다는 보고와 동일한 경향을 나타냈다.

본 실험의 pH 1.2, 4.2, 6.0 조건 모두에서 초임계 추출물이 에탄올 추출물, 열수 추출물 보다 nitrite 분해율이 우수하였다.

요 약

Curcumin의 추출효율은 에탄올 추출방법이 가장 높았고, 항산화효과는 에탄올, 초임계, 열수 추출물 순으로 나타났다. Ames의 mutagenicity test를 실시한 결과 각각의 추출물은 돌연변이원이 없는 것으로 확인되었고, TA98에 직접변이원 2-NF 처리시 초임계 추출물의 저해율이 20.1%로 에탄올과 열수 추출물에 비하여 가장 높은 항돌연변이 효과를 나타냈다. 또한 간접변이원 2-acetamidofluorene($10 \mu\text{L}/\text{plate}$; Sigma Co.; 2-AF)에 대한 항돌연변이 효과를 알아본 결과 2-AF로 유도된 TA98은 초임계 추출물을 $0.1 \text{ mL}/\text{plate}$ 로 처리시 항돌연변이의 효과는 12.2%였으며, 알코올 추출물과 열수 추출물의 경우는 항돌연변이 효과가 나타나지 않았다. Nitrite의 분해능의 경우에 있어서도 에탄올 및 열수 추출물에 비하여 초임계 추출물이 높은 분해율을 나타냈으며 pH 1.2에서 가장 높은 분해율을 보였다. 이

와 같이 초임계를 이용해 추출한 curcumin은 항산화효과, nitrite 분해능, 항돌연변이효과 등에 대한 생리활성 기능을 보였으며, 기존의 에탄올이나 열수 추출법에 비하여 유사하거나 더 높은 생리활성 효과가 나타나기도 했다.

문 헌

- Purseglove JW, Brown EG, Green CL, Robbins SRJ. Spices. Longman Inc., New York, NY, USA. pp. 100-286 (1981)
- Taka H. The characterization and application of *Curcuma longa*. L extracts. New Food Ind. 40: 7-15 (1998)
- Rizvi SSH, Benado AL, Zollweg JA, Daniels JA. Supercritical fluid extraction fundamental principles and modeling methods. Food Technol. 40: 55-65 (1986)
- Rizvi SSH, Daniels JA, Benado AL, Zollweg JA. Supercritical fluid extraction operating principles and food applications. Food Technol. 40: 57-64 (1986)
- JOCS. Standard methods for the analysis of fats, oil and related materials. Japan Oil Chemists Society, Nihonbashi, TK, Japan (1996)
- Ames BN. Dietary carcinogen and anticarcinogens. Science 221: 1256-1264 (1983)
- Kato H, Lee IE, Chuyen NV, Kim SB, Hayase F. Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. Agric. Bio. Chem. 51: 1333-1338 (1987)
- Ahn CK. Antioxidative effects of spices and their synergism with catechin and ascorbic acid. PhD thesis, Sookmyung Women's University, Seoul, Korea (1998)
- Kang WS, Kim JH, Park EJ, Yoon KR. Antioxidative property of turmeric (*Curcuma Rhizoma*) ethanol extract. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 266-271 (1998)
- Lee JS. Physiological effects of Instant curry and curry raw materials. PhD thesis, Sungkyunkwan University, Seoul, Korea (2002)
- Soni KB, Lahiri M, Chackradeo P, Bhide SV, Kuttan R. Protective effect of food additives on aflatoxin-induced mutagenicity and hepato carcinogenicity. Cancer Lett. 115: 129-133 (1997)
- Huang MT, Smart RC, Wong CO, Conney AH. Inhibitory effect of curcumin, chlorgenic acid, caffeic acid and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetraphorb-13-acetate. Cancer Res. 48: 5941-5946 (1988)
- Kim JH, Park KM. Nitrite scavenging and superoxide dismutase-like activities of herbs, spices and curry. Korean J. Food Sci. Technol. 32: 706-712 (2000)
- Kyrtopoulos SA. Ascorbic acid and formation of N-nitroso compounds: possible role of ascorbic acid in cancer prevention. Am. J. Clin. Nutr. 45: 1344-1350 (1987)

(2003년 10월 21일 접수; 2004년 2월 25일 채택)