

흑미 미강의 기능성 성분 추출 공정 최적화

조인희 · 최용희*

경북대학교 식품공학과
경북대학교 식품생물산업연구소

Optimization of Extraction of Functional Components from Black Rice Bran

In-Hee Jo and Yong-Hee Choi*

Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University
Food & Bio-Industry Research Institute, Kyungpook National University

Abstract

The purpose of this study was to determine the optimum ethanol extraction conditions for maximum extraction of functional components such as ferulic acid, oryzanol, and tocopherol from black rice bran using Response Surface Methodology (RSM). A central composite design was applied to investigate the effects of the independent variables of solvent ratio (X_1), extraction temperature (X_2) and extraction time (X_3) on the dependent variables such as total phenol components (Y_1), total flavonoids compounds (Y_2), electron donating ability (Y_3), γ -oryzanol (Y_4), ferulic acid (Y_5) and α -tocopherol components (Y_6). ANOVA results showed that coefficients of determination (R-square) of estimated models for dependent variables ranged from 0.8939 to 0.9470. It was found that solvent ratio and extraction temperature were the main effective factors in this extraction process. Particularly, the extraction efficiency of ferulic acid, γ -oryzanol and α -tocopherol components were significantly affected by extraction temperature. As a result, optimum extraction conditions were 20.35 mL/g of solvent ratio, 79.4°C of extraction temperature and 2.88 hr of extraction time. Predicted values at the optimized conditions were acceptable when compared with experimental values.

Key words: black rice bran, ferulic acid, γ -oryzanol, optimization, ethanol extraction

서 론

우리의 주식인 쌀에는 tocopherol, tocotrienol, γ -oryzanol 및 ferulic acid 등의 항산화 성분을 비롯하여 식이섬유와 다양한 생리 활성 성분이 함유되어있으며, 이들 성분의 대부분은 쌀의 배아, 호분층 및 과피를 포함하는 미강층에 분포되어 있다. 근래 많은 연구에서 도정과정에서 버려지는 미강의 영양소 및 유효성분 등에 대한 효능이 규명되고 산업적인 이용가치가 높은 것으로 생각되어 미강에 대한 재고찰이 이루어지고 있다. 그 중 흑미는 검정약쌀이라 불리며 시판되고 있는데 우리나라에서는 진도군 지산면에서

처음 재배가 되어 점차 재배지역이 확산되고 있으며 그 생산량도 늘고있고, 그뿐만 아니라 최근에는 개량종의 개발도 활발해지고 있다. 최근 연구에서 미강 비누화물의 항산화효과가 보고되었고(Lee et al., 2005), 유색미로부터 미강 추출은 암 발생 저해를 보여주었다(Nam et al., 2005). 또한 이러한 성분들은 혈중 콜레스테롤 저하효과, 항산화 효과, 혈압상승 억제 효과가 우수하다고 보고되기도 하였다(Nicolsi et al., 1993; Capro et al., 1977). 특히 미곡 부산물인 미강으로부터 다양한 유효성분들이 확인되어 그 효능이 보고되었고(Xu et al., 2001), 일부가 기능성 소재로서 제품화되기도 하였다.

한편 흑미와 관련된 연구로 흑진주벼 미강으로부터 생리 기능성 물질의 탐색 및 추출조건(Lee et al., 2001)과 흑미 미강 추출물과 색소 분획의 항산화, 항암 및 항염증 활성이 백미보다 우수하다고 보고된 바 있다(Nam & Kang, 1997; Nam & Kang, 1998). 그리고 Choi(2007)등의 연구에 의하면 흑미가 백미나 현미보다 높은 항산화 활성을 나타내었다고 보고되었다.

*Corresponding author: Yong-Hee Choi, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture and Life and Science, Kyungpook National University, 1370 Sangyoek-dong, Buk-gu, Daegu, 702-701, Korea
Tel: +82-53-950-5777; Fax: +82-53-950-6772
E-mail: yhechoi@knu.ac.kr
Received October 13, 2011; revised November 14, 2011; accepted November 14, 2011

Ultrasound-Assisted Extraction(UAE)는 초음파를 이용한 추출법으로 최근 정밀 화학분야 및 생물분리공정에서 천연물을 대상으로 균일/비균일한 생물활성 물질을 얻기 위한 고효율의 추출로 잘 알려져있다. 전통적인 추출방법으로 유용성분을 추출하려면 조건이 까다로운 경우가 많은데 UAE의 경우 식품 및 기능성 소재 산업공정에서는 20-24 KHz의 저주파 에너지와 30 분 이내의 짧은 시간과 2-4 시간의 추출시간이 적용되어 최적의 에너지 효율로 인한 유용성분들의 높은 영양학적 안정성과 경제적으로도 우수한 효율성을 나타낸다(Lee & Um, 2008). 또한 초음파 추출법과 soxhlet의 추출 함량비교에서도 UAE법에 의한 추출법의 우수성이 보고된 바 있다(Haiwhou et al., 2004).

본 연구자들은 이전의 연구에서 일반미 미강의 기능성 성분의 에탄올 추출공정 최적화 조건을 확립(Jo & Choi, 2010)한 바 흑미 추출물의 기능성 성분도 최적화 조건의 탐색이 가능하다고 생각된다. 백미미강에 대한 연구보다 흑미 미강에 대한 연구는 매우 미미한 실정이었으나 최근 흑미의 생산량 및 기능성이 강화된 개량종도 늘고 있고 그 부산물인 흑미 미강 생성도 늘고 있어 그에 따른 연구도 점차 활발해지고 있다. 이에 본 연구에서는 쌀의 도정 과정 중 폐기물화 되고 있는 흑미 미강을 적극 활용함으로써 새로운 가공제품을 효율적으로 개발, 적용을 가능하게 함과 동시에 국내산 쌀의 고부가가치화를 하기 위한 기초연구의 일환으로서 Ultrasound-Assisted Extraction(UAE)를 이용한 전처리 공정을 수행한 흑미 미강 시료를 각 변수별 처리한 후 흑미 미강 내의 기능 성분 특성을 분석하여 이러한 성분들의 최적 추출 조건을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

흑미 미강은 2009년 8월 전라남도 진도군 진도 정미소 영농조합법인으로부터 분쇄된 시료를 공급받았으며, 표준망체 No. 40(aperture 425 μm)을 통과한 분말을 취하여 -20°C의 암소에 보관하면서 실험에 사용하였다.

흑미 미강의 용매 추출공정

본 연구에서 흑미 미강으로부터의 기능 성분 추출 방법은 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 미강 10g에 ethanol을 가한 후 선행 연구로 Ultrasound-Assisted Extraction(UAE)를 이용한 전처리공정의 최적조건(40°C, 20 분)에서 전처리 추출을 수행한 시료를 즉시 환류추출기(DH.WEB01006, DAIHAN SCIENTIFIC, Seoul, KOREA)를 이용하여 Table 1에 나타낸 각각의 변수별로 추출한 후 32°C에서 진공농축(Model 2007GV, H.S.Co., Deagu, Korea)시킨 추출물을 시

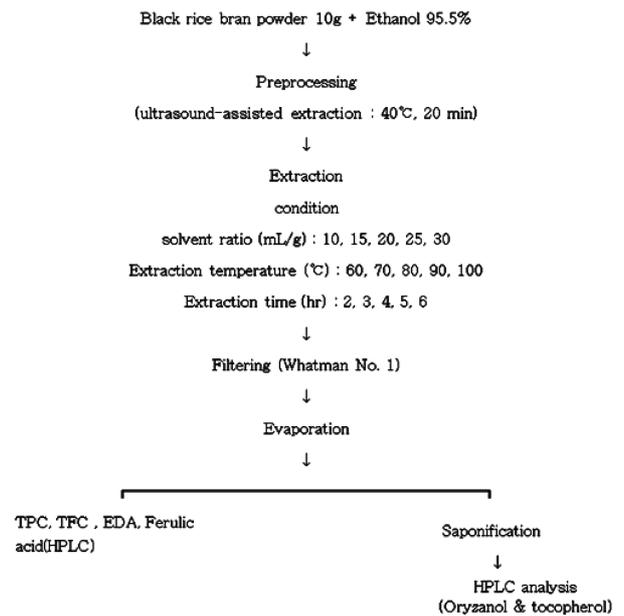


Fig. 1. Scheme for extraction process from black rice bran.

Table 1. Level of leaching condition of black rice bran in experimental design.

Leaching condition		-2	-1	0	1	2
X ₁	Solvent ratio (mL/g)	10	15	20	25	30
X ₂	Extraction temperature (°C)	60	70	80	90	100
X ₃	Extraction time (hr)	2	3	4	5	6

험용액으로 사용하였다.

용매 추출 공정 최적화를 위한 실험 계획

흑미 미강의 기능성분들의 최적 추출 조건을 확립하기 위해 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 이용하였으며 예비실험의 결과를 바탕으로 중심합성계획법(central composite design)을 실시하였다. 추출공정의 독립변수(Xn)는 시료에 따른 용매비(X₁)와 추출 온도(X₂), 추출 시간(X₃)에 대한 실험범위를 선정하여 5 단계(-2, -1, 0, 1, 2)로 부호화하였으며 Table 1에 나타낸 바와 같다. 또한 이들의 독립변수에 영향을 받는 종속변수는 총 페놀 함량, 총 플라보노이드 함량, 전자공여능, γ-oryzanol 및 ferulic acid를 3 회 반복 측정하여 각각 회귀분석을 실시하였다. 회귀분석에 대한 최적조건은 SAS(statistical analysis system, Version 9.1) program을 이용하여 예측하였으며 회귀분석 결과 임계점이 최대점이거나 최소점이 아니고 안장점일 경우에는 능선분석을 하여 최적점을 구하였고 사용한 회귀식은 다음과 같다(1).

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{21}X_2X_1 + b_{22}X_2^2 + b_{31}X_3X_1 + b_{32}X_3X_2 + b_{33}X_3^2 \quad (1)$$

추출특성의 모니터링과 최적조건범위 예측은 각 종속변수의 contour map을 이용하여 분석하였다.

추출물의 기능성 성분 측정

Total phenolics 측정

Total phenol 함량은 Folin-Denis법(Amerine & Ough, 1980)을 변형하여 비색정량 하였다. 즉, 일정하게 희석한 검액 1 mL에 Folin-Ciocalteu시약(Sigma-Aldrich Chemical Co., U.S.A) 1 mL를 가하여 혼합하고 3분 후 10% Na₂CO₃ 1 mL를 넣어 진탕한 후 1시간 실온에 방치하여 UV-visible spectrophotometer(TU-1800 Human Crop. Co., Beijing, China)를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준물질로 gallic acid(Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, U.S.A)를 농도별로 조제하여 표준 검량선을 작성한 후 정량 분석하였다.

Total flavonoids 측정

Total flavonoid의 함량은 modified colorimetric 방법(Baker et al., 2009)에 의해 측정하였다. 각 추출액 70 µL를 50% ethanol 430 µL에 희석하여 5% Sodium nitrite 50 µL를 혼합 후 상온에서 1시간 동안 방치하였다. 그 다음 10% Al(NO₃)₃ 9H₂O를 50 µL를 가하여 상온에서 6분 동안 다시 방치한 후 여기에 1 N NaOH 500 µL를 넣고 510 nm에서 UV-visible spectrophotometer(TU-1800, Human Crop. Co., Beijing, China)로 흡광도를 측정하였다. 이 때 표준시약은 Rutine(Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, U.S.A)을 이용하여 표준곡선으로 함량을 구하였다.

전자공여능 측정

DPPH(α , α '-diphenyl- β -picrylhydrazyl)는 항산화능을 가진 물질의 전자공여능에 의해 환원되어 탈색이 되는데 이 탈색의 정도로 항산화능을 측정할 수 있다. 전자공여능(Electron donating ability, EDA)시험은 DPPH 12 mg을 absolute ethanol 100 mL에 용해하여 4×10⁻⁴ M의 DPPH용액을 조제한 다음 ethanol 용액을 blank로 하여 525 nm에서 흡광도가 0.95-0.99가 되도록 50% ethanol을 첨가하여 조정하였다. 그 다음 추출물 1 mL에 조제한 DPPH시액 4 mL를 혼합하여 10초간 강하게 진탕한 후 상온에서 10분간 방치하였다. 이를 520 nm에서 UV-visible spectrophotometer(TU-1800, Human Crop. Co., Beijing, China)로 흡광도를 측정한 후 대조구에 대한 흡광도의 감소 정도를 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{ABS}{ABC}\right) \times 100 \quad (2)$$

ABS : Absorbance of DPPH solution with sample at 518 nm

ABC : Absorbance of DPPH solution without sample at 518 nm

Ferulic acid 함량 측정

미강 시료에서 추출한 추출물에 ethanol 100 mL로 정용화한 후 HPLC(Agilent 1100 series, Agilent Technologies, Santa Clara, USA)를 사용하여 분석을 하였다. Ferulic acid 함량 분석을 위한 HPLC 분석 조건은 column은 YMC pack pro C18 RS(250, 4.6 mm I.d., YMC Inc., Wilmington, NC, USA)을 사용하였고 mobile phase로 Acetonitrile/dichloromethane/ acetic acid(88:6:6) : methanol/ n-butyl alcohol/ water (90:2:8)=72:25가 되도록 하여 사용하였다. Flow rate는 1 mL/min, injection volume은 10 µL로 하여 325 nm에서 분석하였다. 이 때 표준 용액의 검량선은 ferulic acid(Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, USA)로 검량선을 작성하여 시료 중의 ferulic acid를 계산하였다.

γ -oryzanol 함량 측정

Oryzanol은 Hu(Hu et al., 1996) 등의 방법을 이용하여 추출된 rice bran oil 0.1 g에 ethanol 5 mL와 ascorbic acid 0.1 g을 첨가하여 혼합한 후 KOH 0.15 mL를 첨가하여 water bath에서 80°C로 10분간 비누화(saponification)시켰다. 그 후 냉각한 후 hexane 5 mL와 distilled water 5 mL를 첨가하여 혼합하였다. 이 용액을 분액여두에 취하여 진탕한 후 두층으로 분리될 때까지 방치하였다. 분리된 상층액을 취하고 남은 시료에 hexane 5 mL를 재첨가하여 위 과정을 2 차례 반복하였으며 수집한 상층액은 32°C에서 진공농축한 후 hexane 3 mL를 가하여 HPLC 분석을 하였다. γ -oryzanol 함량 분석을 위한 HPLC 분석 조건으로 column은 YMC pack pro C18 RS(250, 4.6 mm I.d., YMC Inc., Wilmington, NC, USA)을 사용하였고 mobile phase는 methanol/ acetonitrile/ dichloromethane/ acetic acid=50:44:3:3가 되도록 하여 사용하였다. Flow rate는 1 mL/min, injection volume은 10 µL로 하여 330 nm에서 분석하였다. 표준용액 조제는 γ -oryzanol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)을 사용하였고 검량선을 작성하여 시료 중의 γ -oryzanol을 계산하였다.

α -tocopherol 함량 측정

Tocopherol도 oryzanol과 같은 방법으로 비누화한 후 농축물을 isooctane 3 mL에 녹여 분석 시료로 사용하였다. Tocopherol 함량 분석은 보통 FID detector를 이용한 연구가 많은데 본 실험에서는 Kim et al.(2005)의 분석 조건을 참고하여 UV detector를 이용하여 분석하였다. Column은 Agilent TC-C18(4.6 mm I.D. × 150 mm L, 5 µm, Agilent Inc.,

Santa Clara, CA, USA)을 사용하였고 mobile phase는 hexane : isopropanol (98:2)가 되도록 하여 사용하였다. Flow rate는 1.6 mL/min, injection volume은 20 µL로 하여 290 nm에서 분석하였다.. 표준용액 조제는 α-tocopherol (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, USA)을 사용하여 검량선을 작성한 후 각 함량을 계산하였다.

결과 및 고찰

추출조건이 total phenolics 함량에 미치는 영향

추출 조건에 따른 추출물의 total phenolics 결과값은

Table 2에 나타내었다. 회귀식은 Table 3에 나타낸 바와 같 으며 그에 대한 회귀식의 R²값은 0.9085로 높은 상관관계 를 보였고 p<0.01 이내에서 유의성이 인정되었다. Fig. 2 에 나타난 반응표면 그래프를 보면 시료에 대한 용매비와 추출온도가 total phenolis 함량에 유의하게 영향을 주는 것 으로 나타났다. 본 연구자들에 의해 수행된 일반 미강의 추출조건 최적화에 대한 총 페놀 함량의 반응표면 분석 결 과 시료에 대한 용매비와 추출온도에 유의하게 영향을 받 았는데 본 실험의 흑미 미강도 유사한 결과를 나타내었다. 또한 Table 2를 보면 일반미강의 경우 52.13-86.70 mg GAE/100g으로 일반 미강보다 흑미미강의 추출함량이 높게

Table 2. The central composite design for the optimization of leaching condition of black rice bran.

No. ¹⁾	X ₁ ²⁾ (mL/g)	X ₂ (°C)	X ₃ (hr)	TPC ³⁾ (mg GAE/100 g)	TFC ⁴⁾ (mg/100 g)	EDA ⁵⁾ (%)	Oryzanol (mg/100 g)	Ferulic acid (mg/100 g)	α-Tocopherol (mg/100 g)
1	15	70	3	137.986	251.872	91.326	209.838	181.535	8.253
2	15	70	5	132.934	188.402	87.784	187.461	181.053	7.871
3	15	90	3	161.440	245.936	92.461	204.566	229.420	8.374
4	15	90	5	165.211	160.548	85.559	177.162	213.169	7.815
5	25	70	3	137.459	249.132	86.104	189.079	224.186	9.106
6	25	70	5	139.118	169.680	82.243	181.649	220.223	8.869
7	25	90	3	144.548	241.370	90.509	175.480	160.680	9.165
8	25	90	5	139.872	188.858	88.556	151.813	143.856	8.680
9	20	80	4	183.612	243.653	92.234	220.877	283.274	9.106
10	20	80	4	170.038	264.201	92.734	220.161	264.281	9.571
11	10	80	4	160.385	228.128	91.190	207.613	247.891	8.899
12	30	80	4	138.363	206.210	86.376	199.406	218.684	9.123
13	20	60	4	114.005	200.731	79.882	206.268	137.694	6.214
14	20	100	4	110.535	143.653	78.565	123.945	92.413	6.042
15	20	80	2	163.552	279.269	90.599	206.613	254.593	9.243
16	20	80	6	148.318	192.055	86.921	137.867	227.712	9.932

¹⁾The number of experimental conditions by central composite design.

²⁾X₁: Solvent to sample ratio (mL/g), X₂: Extraction temperature (°C), X₃: Extraction time (hr)

³⁾ Total Phenol Components ⁴⁾Total Flavonods Compounds, ⁵⁾ Electron Donating Ability

Table 3. Polynomial equation calculated by RSM program for extraction of black rice bran.

Responses	The second order polynomial ¹⁾	R ²	significance
TPC (mg GAE/100 g)	$Y_1 = -1235.852000 + 19.723875X_1 + 28.445963X_2 + 37.987125X_3 - 0.274510X_1^2 - 0.119720X_2X_1 - 0.161388X_2^2 - 0.043400X_3X_1 + 0.031100X_3X_2 - 5.222500X_3^2$	0.9085	0.0160
TFC (mg/100 g)	$Y_2 = -850.640375 + 3.453175X_1 + 29.329288X_2 - 5.392125X_3 - 0.367580X_1^2 + 0.113015X_2X_1 - 0.204338X_2^2 + 0.422350X_3X_1 + 0.062775X_3X_2 - 4.566250X_3^2$	0.9118	0.0145
EDA (%)	$Y_3 = -91.079438 - 1.586025X_1 + 4.830113X_2 + 5.109125X_3 - 0.037010X_1^2 + 0.029520X_2X_1 - 0.033151X_2^2 + 0.115750X_3X_1 - 0.018150X_3X_2 - 0.931000X_3^2$	0.9314	0.0072
Oryzanol (mg/100 g)	$Y_4 = -898.536250 + 9.291375X_1 + 23.225062X_2 + 94.836875X_3 - 0.170100X_1^2 - 0.069675X_2X_1 - 0.138537X_2^2 + 0.467250X_3X_1 - 0.265875X_3X_2 - 12.070000X_3^2$	0.8939	0.0240
Ferulic acid (mg/100 g)	$Y_5 = -3444.423125 + 59.140125X_1 + 74.973688X_2 + 90.210625X_3 - 0.404900X_1^2 - 0.549625X_2X_1 - 0.396812X_2^2 - 0.101750X_3X_1 - 0.357875X_3X_2 - 8.156250X_3^2$	0.9470	0.0035
α-Tocopherol (mg/100 g)	$Y_6 = -45.085359 + 0.197116X_1 + 1.312449X_2 - 0.200837X_3 - 0.003270X_1^2 - 0.000485X_2X_1 - 0.008025X_2^2 + 0.005480X_3X_1 - 0.005322X_3X_2 + 0.062393X_3^2$	0.9285	0.0081

¹⁾ $Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{21}X_2X_1 + b_{22}X_2^2 + b_{31}X_3X_1 + b_{32}X_3X_2 + b_{33}X_3^2$

X₁: Solvent to sample ratio (mL/g)

X₂: Extraction temperature (°C)

X₃: Extraction time (hr)

나타났다.

추출조건이 total flavonoids 함량에 미치는 영향

추출 조건에 따른 추출물의 total flavonoid 함량을 측정 한 결과는 Table 2에 나타내었고 이에대한 회귀식은 Table 3에 나타낸 바와 같다. 회귀식의 R²값은 0.9118로 높은 상관관계를 보였고 p < 0.01 이내에서 유의성이 인정되었다. Fig. 3에 나타낸 반응표면 그래프를 보면 시료에 대한 용매비가 total flavonoid 함량에 가장 영향을 많이 주는 것으로 나타났고 추출온도도 유의적으로 영향을 받았다. 반응 표면 분석에 따라 예측된 정상점은 최대점(Maximum point)이고 최대값은 291.09 mg GAE/100g로 예측되었다.

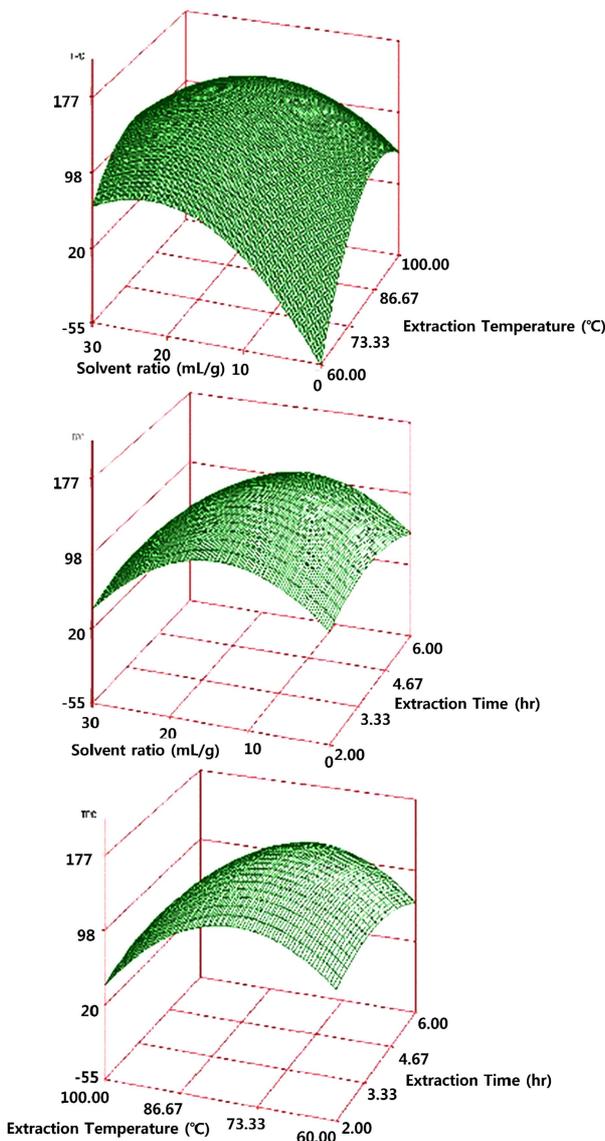


Fig. 2. Response surface for the effects of extraction conditions on total phenolic compounds (mg GAE/100 g).

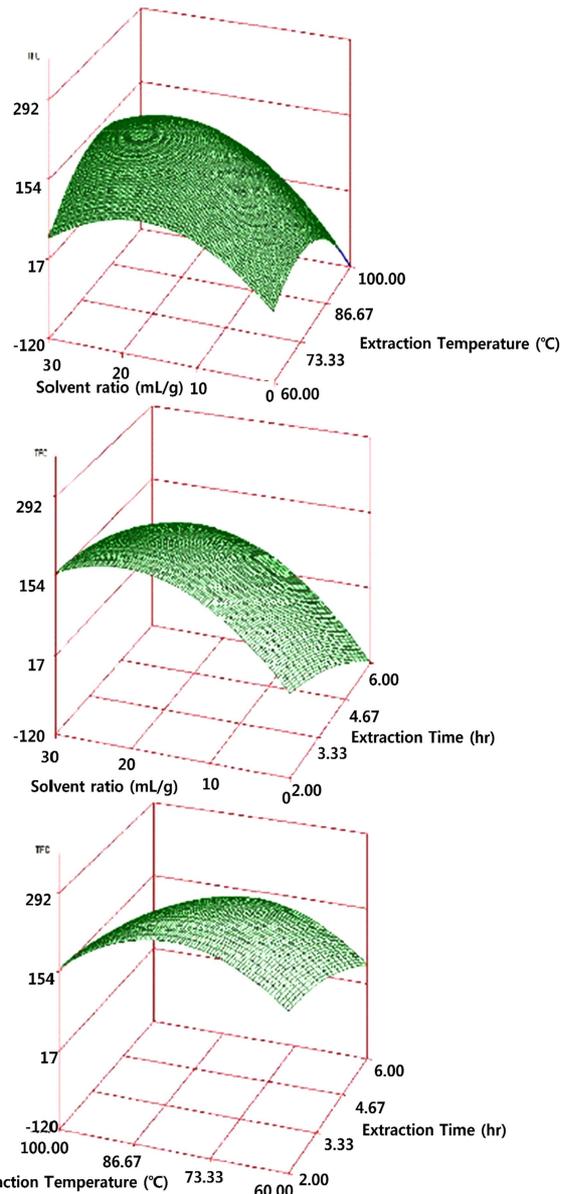


Fig. 3. Response surface for the effects of extraction conditions on total flavonoids components (mg/100 g).

이때의 추출조건은 시료에 대한 용매비 18.32 mL/g, 추출 온도 77.51°C, 추출시간 2.04 시간이었다(Table 4).

추출조건이 전자공여능에 미치는 영향

흑미 미강의 추출조건에 따른 전자공여능의 결과에 대한 회귀식은 Table 3에 나타내었고 R²값은 0.9314였고 p < 0.005 이내의 유의성을 보였다. Table 4에 나타낸 바와 같이 시료에 대한 용매비 14.37 mL/g, 추출온도 78.46°C, 추출시간 2.87 시간일 때 최대값 94.34%로 예측되었다. Nenadis & Tsimidou(2002)의 실험에서 에탄올을 용매로 전자공여능을 실험한 결과 ferulic acid의 전자공여능은 30.9%였다. Table

Table 4. Predicted levels of extraction condition for the maximum responses of variables by the ridge analysis.

Response	X ₁ *	X ₂	X ₃	Maximum	Morphology
TPC (mg GAE/100 g)	17.43	82.13	3.76	176.57	maximum
TFC (mg/100 g)	18.32	77.51	2.04	291.09	maximum
EDA (%)	14.37	78.46	2.87	94.34	maximum
oryzanol (mg/100 g)	16.39	76.45	3.41	226.46	maximum
Ferulic acid (mg/100 g)	17.71	80.58	3.62	265.18	maximum
α-Tocopherol (mg/100 g)	25.00	79.18	5.73	9.71	saddle

*X₁: Solvent ratio (mL/g) X₂: Extraction temperature (°C) X₃: Extraction time (hr)

2에 나타낸 바와 같이 본 실험에서는 전자공여능이 78.56-2.73%로 일반 백미 미강 연구에서 나타낸 34.20-54.91% (Jo & Choi, 2010)보다 전자공여능이 높게 나타났는데 이는 다른 폐놀성 물질들뿐 아니라 색소성분의 영향을 받아 높은 항산화능을 보인 것으로 생각된다. 반응표면 분석 결과는 Fig. 4에 나타낸 바와 같으며 흑미 미강의 전자공여능에서도 추출온도에 가장 유의적으로 영향을 받았으며 온도가 높아짐에 따라 전자공여능이 증가하다 감소하였다.

추출조건이 oryzanol 함량에 미치는 영향

추출 조건에 따른 미강으로부터의 γ -oryzanol 함량에 대한 회귀식을 Table 3에 나타내었으며 이 때 R²는 0.8939로 p<0.01 이내의 유의성이 인정되었다. γ -oryzanol함량의 반응표면분석을 한 결과는 Fig. 5에 나타내었다. Oryzanol 함량의 반응표면 그래프를 보면 추출온도를 고정시켰을 때 시료에 대한 용매비가 감소할수록 추출 함량은 증가하였으며 추출 시간이 길어질수록 함량은 증가하다 감소하였다. 추출온도가 높아질수록 함량이 증가하다 감소하였다. Xu & Godber(1999)의 실험에서 추출온도가 높아질수록 추출되는 oryzanol 함량이 증가한다고 보고되었는데 본 실험에서도 온도가 높아질수록 추출 함량이 조금씩 증가한 결과와 유사하였다. 그러나 추출온도가 81.83°C보다 높아질 때 추출함량이 낮아지는데 이는 끓는점 이상으로 온도가 높아짐에 따라 추출용매의 증발과 같은 손실을 가져와 oryzanol 함량이 감소하는 것으로 생각된다. Britz et al.(2007)의 실험에서는 종(種)별로 분류된 6 가지 현미 시료에 ethanol을 사용하여 oryzanol 추출을 한 결과 japonica종은 220-383 mg/100 g으로 나왔다. 본 실험에는 Table 2에서 나타낸 바와 같이 123.945-220.877 mg/100 g으로 japonica종의 oryzanol함량과 유사한 결과를 나타내었으나, 일반 미강추출물의 oryzanol 평균함량(317.30 mg/100 g) 보다 낮은 함량을 나타내었다(Jo & Choi, 2010). 이는 oryzanol이 미강의 지용성 성분으로 미강의 oil함량에 영향을 받는 것으로 생각된다. 본 실험에서 미강추출 후 농축 시 일반미 미강 농축물에서는 비교적 oil성분이 많이 보였는데 흑미 미강의 농축물에서는 일반 미강의 oil성분보다 상대적으로 oil성분이 더 적은 것이 육안으로도 확인되었다.

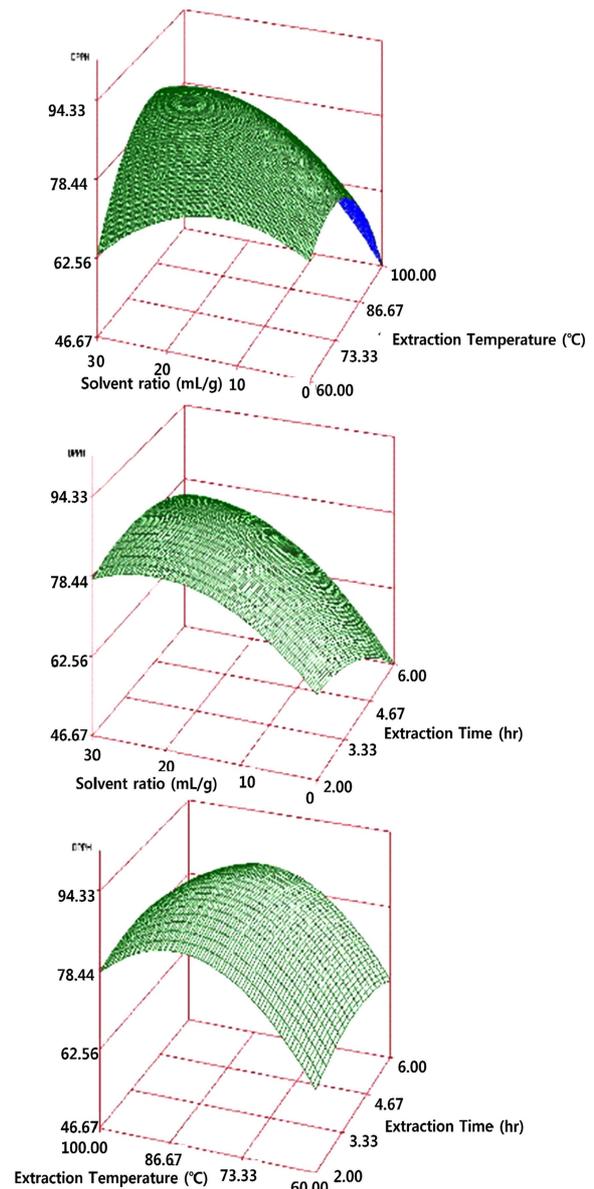


Fig. 4. Response surface for the effects of extraction conditions on electron donating ability (%).

추출조건이 ferulic acid 함량에 미치는 영향

Ferulic acid 함량에 대한 R²값은 0.9470로 5%의 수준에

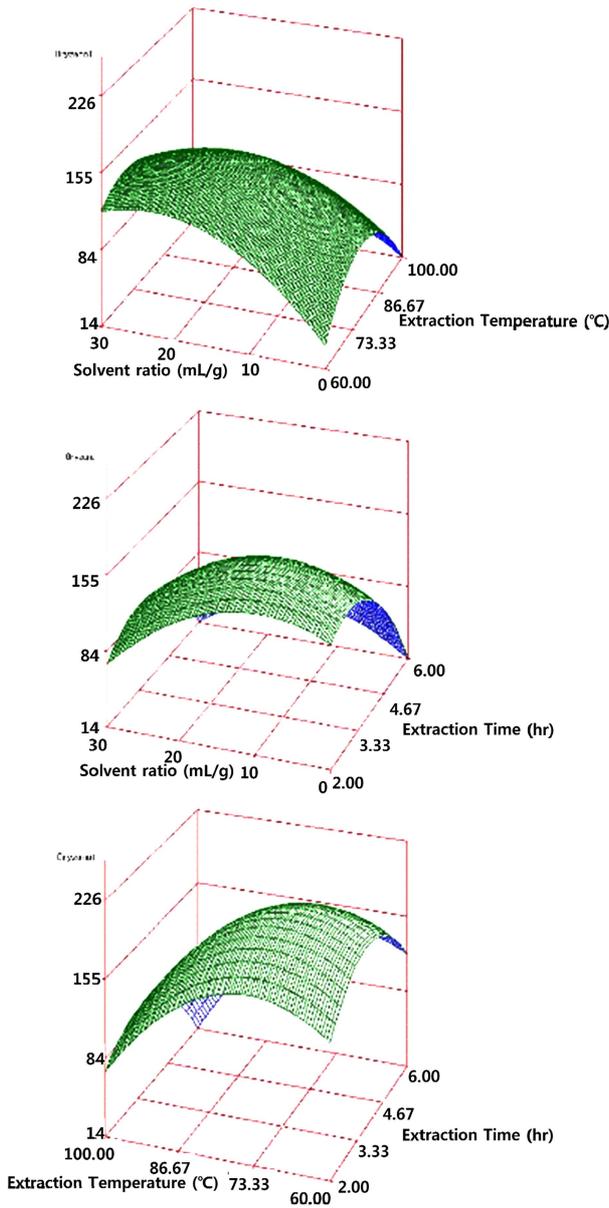


Fig. 5. Response surface for the effects of extraction conditions on γ -oryzanol (mg/100 g).

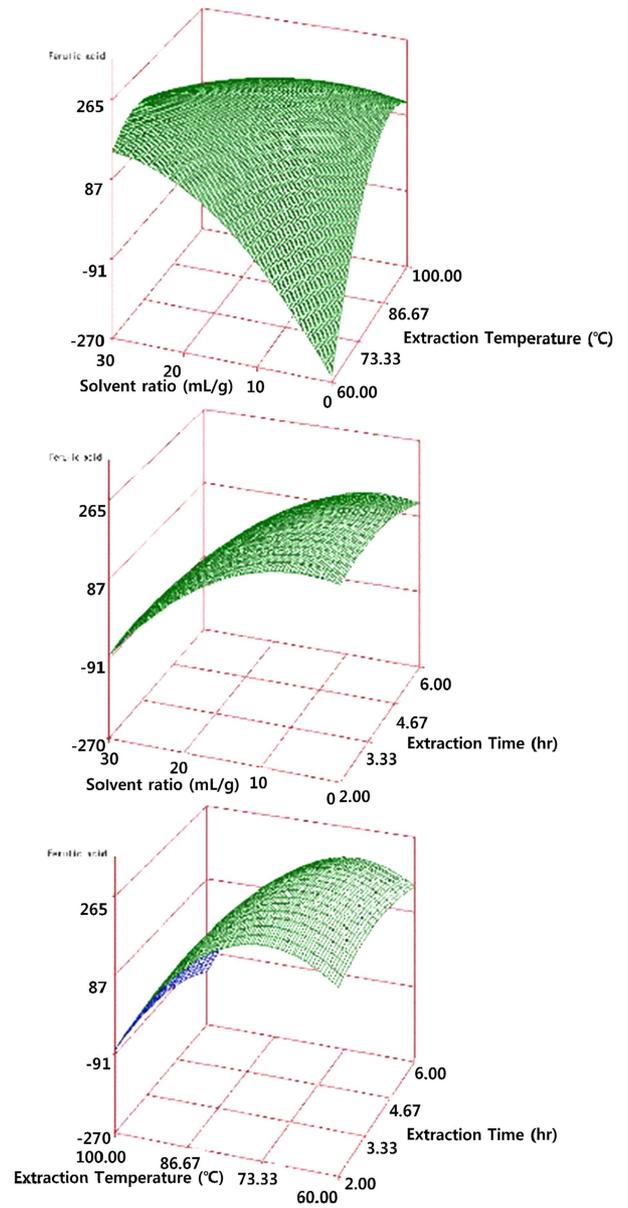


Fig. 6. Response surface for the effects of extraction conditions on ferulic acid (mg/100 g).

서 유의성이 인정되었다. 예측된 회귀식은 Table 3에 나타낸 바와 같다. 본 실험에서 ferulic acid 함량결과는 Table 2에 나타낸 바와 같으며 일반 미강(Jo & Choi, 2010)의 실험과 비교했을 때 일반 미강의 경우 11.21-209.15 mg/100 g으로 나타났는데 본 실험의 ferulic acid 함량이 약 30-43 mg정도 적은 함량을 나타내었다. 추출시간이 단축되었음에도 이와 같은 결과를 나타낸 것은 Ultrasound-Assisted Extraction(UAE)를 이용한 전처리공정의 수행에 인한 것으로 생각된다. Fig. 6에 나타낸 바와 같이 ferulic acid 함량은 추출온도가 고정되었을 때 시료에 대한 용매비가 증가할수록 함량이 감소하였고, 추출온도는 시간과

용매비에 관계없이 온도가 높아질수록 함량이 증가하다 감소하였다. Ethanol의 끓는 점인 약 80°C까지는 함량이 높아지다가 그 이상으로 온도가 높아질수록 ferulic acid 함량이 감소하는 것을 알 수 있는데 이 또한 oryzanol과 유사하게 온도가 높아짐에 따라 추출용매의 증발과 같은 손실을 가져와 함량이 감소하는 것으로 생각된다. Ferulic acid 함량은 시료에 대한 용매비와 온도에 유의적으로 영향을 받는 것을 알 수 있었다(Table 5).

추출조건이 α -tocopherol 함량에 미치는 영향
 각 추출 조건에 따른 α -tocopherol의 결과에 대한 반응

Table 5. Regression analysis for regression model of variables in extraction condition.

Extraction conditions	F-Ratio		
	X ₁	X ₂	X ₃
TPC (mg GAE/100 g)	4.06*	13.05**	1.44
TFC (mg/100 g)	1.24	5.74*	9.44**
EDA (%)	4.24*	14.58**	3.83*
Oryzanol (mg/100 g)	1.18	7.30*	6.22*
Ferulic acid (mg/100 g)	6.03*	23.22**	1.20
α -Tocopherol (mg/100 g)	1.29	12.15**	0.11

** means $p < 0.001$, * means $p < 0.05$

표면 회귀식은 Table 3에 나타내었으며 반응표면 결과는 Fig. 7에 나타내었다. Park et al.(2003)의 벼 품종에 따른 tocopherol 및 tocotrienol 함량 평가에서 α -tocopherol 함량 2.36-0.59 mg/100 g으로 Table 2에 나타낸 바와 같이 본 실험에서도 유사한 결과를 나타내었다. Fig. 7에 나타낸 반응표면 그래프를 보면 시료에 대한 용매비가 증가할수록, 추출온도가 높아질수록 함량이 증가하는 경향을 보이다가 시료에 대한 용매비 25 mL/g, 추출온도 80°C 이상에서는 추출함량이 감소하였다. 한편, 추출온도가 100°C로 높아질수록 함량이 조금씩 줄어들었는데 이는 고온에서 추출용매의 손실에 따른 것으로 생각된다.

최적 추출조건의 예측

미강의 γ -oryzanol의 최적 추출조건 설정을 위해 추출조건에 따른 기능성 성분의 contour map을 superimposing하여 최적 추출조건의 범위를 예측하였다. Fig. 8에서 시료에 대한 용매비(X₁)와 추출 온도(X₂), 시료에 대한 용매비(X₁)와 추출시간(X₃), 추출온도(X₂)와 추출시간(X₃)의 조건에 따른 변화를 알아본 결과 최적조건은 어두운 부분에 나타난 바와 같다. 최적 추출조건은 17.05 mL/g, 78.65°C, 3.36 시간이었고 Table 6에 나타내었다. 이들을 각 회귀식에 대입하여 구한 예측값을 Table 7과 같이 설정하여 실제 추출 실험을 실시하여 분석한 결과, 실제 값들은 예측된 값들과 유사한 수준을 나타내었다. 본 연구자들에 의한 이전 실험 (Jo & Choi, 2010)에 의하면 일반미 미강의 경우 예측된 최적 조건은 시료에 대한 용매비가 1:10, 추출온도 80°C, 추출시간 8.91 시간이었는데 본 실험에서는 추출온도는 유사한 수준이었는데 시료에 대한 용매비는 약 10 mL, 추출시간 약 6 시간 차이가 있었다. 이는 Ultrasound-Assisted Extraction(UAE)를 이용한 전처리공정으로 인해 차이가 생긴 것으로 생각되며 특히 추출시간의 단축에 영향을 많이 준 것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서는 추출시간을 단축시키고자 Ultrasound-Assisted Extraction(UAE)를 이용한 전처리 추출공정을 수행 후 기능성 성분 추출 시 시료에 대한 용매비와 추출 온도, 추출 시간의 영향을 알아보기 위하여 용매비는 10-30 mL/g, 추출온도 60-100°C, 추출시간 2-6 시간으로 하여 각 조건에서 추출함량을 측정하였으며 최적 추출 조건을 구하기 위해 반응표면 분석을 실시하였다. 그 결과, 미강의 기능성 성분의 추출 시 추출온도에 가장 영향을 많이 받았으며 추출시간은 크게 영향을 받지 않았다. 시료에 대한 용매비는 추출온도 다음으로 종속변수에 비교적 유의하게 영향을 주었다. 총페놀함량의 추출조건은 시료에 대한 용매비 17.43, 추출온도 82.13°C, 추출시간 3.76 시간일 때 최

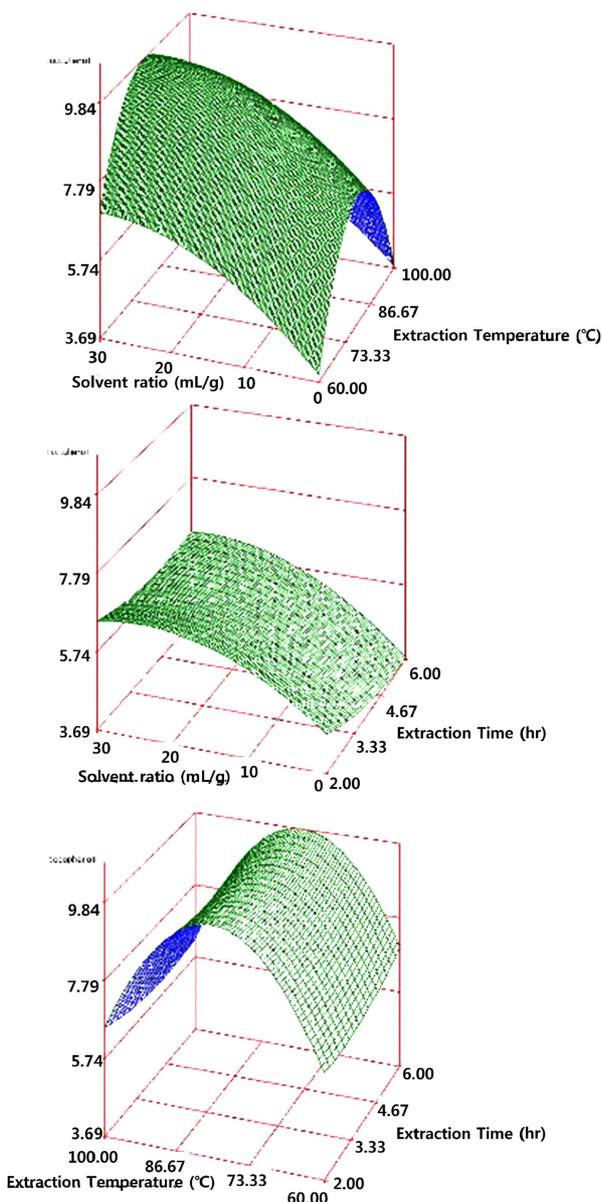


Fig. 7. Response surface for the effects of extraction conditions on α -tocopherol (mg/100 g).

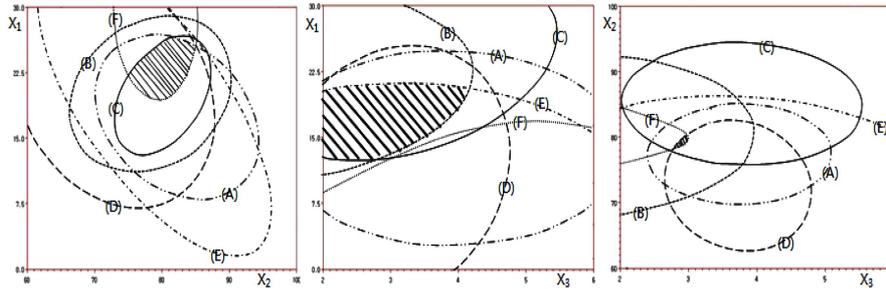


Fig. 8. Superimposing contour map of optimized conditions. (A): TPC, (B): TFC, (C): EDA, (D): γ -Oryzanol, (E): Ferulic acid, (F): α -tocopherol.

Table 6. The optimum condition of extraction conditions for response variables by superimposing of contour maps for black rice bran.

	Leaching condition	Optimum range	Optimum condition
X_1	Solvent ratio (mL/g)	19.55-21.14	20.35
X_2	Extraction temperature ($^{\circ}$ C)	78.1-80.7	79.4
X_3	Extraction time (hr)	2.75-3	2.88

Table 7. The optimum condition of extraction conditions for response variables by superimposing of contour maps for black rice bran.

Leaching condition	Predicted value	Experimental value
TPC (mg GAE/100 g)	170.22	168.38
TFC (mg/100 g)	276.25	210.55
EDA (%)	93.16	93.02
oryzanol (mg/100 g)	217.81	225.98
Ferulic acid (mg/100 g)	258.94	279.09
α -Tocopherol (mg/100 g)	9.45	8.84

¹⁾ Given optimum conditions : 20 mL/g in solvent ratio, 79 $^{\circ}$ C in temperature and 3 hr in extraction time

대값 176.57 mg GAE/100g을 나타내었고, 총플라보노이드 함량은 18.32 mL/g, 77.51 $^{\circ}$ C, 2.04 시간일 때 291.09 mg/100 g으로 최대값을 나타내었다. 전자공여능은 14.37 mL/g, 78.46 $^{\circ}$ C, 2.87 시간일 때 94.34%로 최대값을 나타내었다. Ferulic acid의 추출조건은 시료에 대한 용매비 17.71 mL/g, 추출 온도 80.58 $^{\circ}$ C, 추출시간 3.62 시간일 때 최대값 265.18 mg/100 g으로 예측되었고, γ -oryzanol은 시료에 대한 용매비 16.39 mL/g, 추출온도 76.45 $^{\circ}$ C, 추출시간 3.41 시간에서 최대값 226.46 mg/100 g을 나타냈다. α -tocopherol은 시료에 대한 용매비 25 mL/g, 추출온도 79.18 $^{\circ}$ C, 추출 시간 5.73 시간일 때 최대값 9.71 mg/100 g을 나타내었다. 흑미 미강의 기능성 성분의 최적 추출 조건을 예측하기 위하여 각 종속변수에 대한 각각의 contour map을 superimposing을 한 결과 시료에 대한 용매비 20.35 mL/g, 추출 온도 79.4 $^{\circ}$ C, 추출 시간 2.88 시간으로 나타났다. 이 조건에서 실

험한 결과 각각 종속변수들의 예측값과 실제값이 유사하게 나타났다.

감사의 글

본 연구는 농심그룹 율촌재단의 재원을 지원받아 수행한 과제입니다.

참고문헌

- Amerine MA, Ough CS. 1980. Methods for Analysis of Musts and Win. New York, USA, pp. 176-180.
- Bakar MFA, Mohamed M, Rahmat M, Fry F. 2009. Phytochemicals and antioxidant activity of different parts of Bambangan (Mangifera pajang) and tarap (Atrocatpus odoratissimus). Food Chem. 113: 479-483.
- Britz SJ, Prasad PVV, Moreau RA, Allen LH, Kremer DF, Boote KJ. 2007. Influence of growth temperature on the amounts of tocopherols, tocotrienols, and γ -oryzanol in brown rice. J. Agric. Food Chem. 55: 7559-7565.
- Capro PA, Reaven G, Olefsky J. 1977. Postprandial plasma-glucose and insulin responses to different complex carbohydrate. Diabetes 26: 1178-1183.
- Choi YG, Jeong HS, Lee JS. 2007. Antioxidant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea. Food Chem. 103: 130-38.
- Haizhou L, Lester P, Jochen W. 2004. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. Food Res. Int. 37(7): 731-738.
- Hu W, Wells JH, Shin TS, Godber JS. 1996. Comparison of isopropanol and hexane for extraction of vitamin E and oryzanols from stabilized rice bran. J. Am. Oil Chem. Soc. 73: 1653-1656.
- Jo IH, Choi YH. 2010. Optimization of ethanol extraction of γ -oryzanol and other functional components from rice bran. Korean J. Food Preserv. 17: 281-289.
- Kim YS, Park SR, Lee YS, Jung H, Koh KH, Kim HS. 2005. Determination of tocopherol and tocotrienol contents in rice cooked with various cereals. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 34: 1289-1292.
- Lee JW, Lee SW, Kim MK, Rhee C, Kim IH, Lee KW. 2005.

- Beneficial effect of the unsaponifiable matter from rice bran on oxidative stress in vitro compared with tocopherol. *J. Sci Food Agr.* 85: 493-98.
- Lee KJ, Um BH. 2008. Extraction of useful component from natural plants using ultrasound system. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 23(2): 101-108.
- Lee KY, Kim JH, SON JR, Lee JS. 2001. Detection and extraction condition of physiological functional compounds from bran of Heugjinju rice (*Oryza sativa* L.). *Korean J. Food Preserv.* 8: 296-301.
- Nam SH, Kang MY. 1997. In vitro inhibitory effect of colored rice bran extracts carcinogenicity. *Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 40(4): 307-312.
- Nam SH, Kang MY. 1998. Comparison of inhibitory effect of rice bran-extracts of the colored rice cultivars on carcinogenesis. *Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 41(1): 78-83.
- Nam SH, Choi SP, Kang MY, Koh HJ, Kozukue N, Friedman M. 2005. Bran extracts from pigmented rice seeds inhibit tumor promotion in lymphoblastoid B cells by phorbol ester. *Food Chem. Toxicol.* 43: 741-45.
- Nenadis N, Tsimidou M. 2002. Observations on the estimation of scavenging activity of phenolic compounds using rapid 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) tests. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79: 1191-1195.
- Nicolsi RJ, Rogers EJ, Ausman LM, Orthefer F. 1993. Rice Bran Oil and Its Health Benefits. In: *Rice Science and Technology*. New York, USA. pp. 421-437.
- Park KY, Kang CS, Cho YC, Lee YS, Lee YH, Lee YS. 2003. Genotypic difference in tocopherol and tocotrienol contents of rice bran. *Korean J. Crop. Sci.* 48(6): 469-472.
- Xu Z, Godber JS. 1999. Purification and identification of components of γ -oryzanol in rice bran oil. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2724-2728.
- Xu Z, Hua N, Godber JS. 2001. Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and γ -oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2'-azobis (2-methylpropinamine) dihydrochloride. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2077-2081.