

반응표면분석법(RSM)을 이용한 두릅의 유용성분 환류추출공정의 최적화

조정석¹ · 정제석¹ · 류시은 · 이미현 · 최용희*

경북대학교 응용생명과학부 생명식품공학전공, ¹경북대학교 식품공학과

Optimization of the Reflux Extraction Process of Functional Components from *Aralia elata* Using a Response Surface Methodology

Jeong Seok Cho¹, Jae Seok Jeong¹, Si Eun Ryu, Mi Hyun Lee, and Yong Hee Choi*

Faculty of Life and Food Sciences, Kyungpook National University

¹Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University

Abstract

Response surface methodology (RSM) was used to monitor the characteristics of a return current extracts from *Aralia elata*. A central composite design was used to investigate the effects of the independent variables of extraction time (X_1), ethanol concentration (X_2) and extraction temperature (X_3) on the dependent variables yield (Y_1), total phenolics (Y_2), electron donating ability (Y_3), browning color (Y_4) and reducing sugar contents (Y_5) of extracts. The maximum yield was at 316.58 min (X_1), 15.68% (X_2) and 93.49°C (X_3) in saddle point. Total phenolics were highly affected by ethanol concentration. The maximum total phenolics were at 94.78°C (X_1), 22.9% (X_2), 323.05 min (X_3) in saddle point. The maximum electron donating ability was at 94.78°C (X_1), 29.82% (X_2), 323.05 min (X_3) and was highly affected by ethanol concentration. The maximum browning color was at 97.00°C (X_1), 38.35% (X_2), 321.82 min (X_3). The browning color was highly affected by ethanol concentration. The reducing sugar content was at 97.00°C, 38.35%, When the extraction temperature, ethanol concentration, and extraction time were 87.62°C (X_1), 24.62% (X_2), 339.39 min (X_3). The optimal conditions of extraction conditions for response variables by superimposing of contour maps were 263.5 min (X_1), 14% (X_2) and 89.5°C (X_3).

Key words: *Aralia elata*, reflux extraction process, RSM

서 론

최근 식품 섭취와 건강 간의 관련성에 대한 관심이 높아지면서 식품 선택 기준이 영양, 맛, 가격에서 건강지향으로 이동하고 있다. 특히 우리나라 사람들은 전통적으로 약식 동원을 식생활의 기본 바탕에 두고 있어 식품에 대한 내재된 신념과 함께 최근의 식품 소비 트렌드로 인해 한국인의 건강기능식품에 대한 선호도는 높게 유지되고 있다(Kim et al., 2010).

특히 식물줄기에서 항산화 활성을 가지는 생리활성 물질은 잎, 꽃, 열매, 줄기, 뿌리 및 수피 등의 모든 부분에 존재하는데 주로 페놀성 화합물에 의한 것으로 알려져 있는데(Shin, 2006), 두릅에는 폴리페놀, 사포닌, 알칼로이드, 강심배당체, 정유 등의 생리활성물질을 비롯하여, 비타민,

무기질 등의 영양소가 풍부하게 함유되어 있다(Han, et al., 2007).

최근 들어 식용 가능한 약리식물들이 새로운 식품학적 가치가 인정되어 농가소득 증대를 위한 대체 작물로 생산량이 점점 증가하고 있는 실정이다(Lee et al., 2009). 두릅의 수요도 증대하여 재배를 통한 농한기 단기 소득 수준으로 장려되고 있으며(Moon et al., 1999), 야생약용작물로 국민소득의 향상과 함께 건강에 대한 관심도가 높아짐에 따라 작물학적 및 생물학적으로 연구가 활발해지고 있다(Han et al., 2007).

두릅에 관한 연구는 주로 약리학적 측면에서 수행되어(Jung et al., 1993) 예부터 동의보감에서 민간과 한방에서 당뇨병의 주 증상인 갈증을 해소하거나 갈증의 대사적 원인을 제거하는데 효과가 있고, 혈당강하 및 혈장 바이오마커의 변화 개선에 효과적인 것으로 보고되었다(Shin et al., 2004).

위와 같은 두릅에 대한 연구는 대부분 약리학적인 측면에서 수행되었고, 생리활성을 갖는 유용성분 추출물을 이용한 가공제품 개발이 요구되어지나 우리나라에서는 아직까지 미약한 실정이다.

*Corresponding author: Yong-Hee Choi, Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, 702-701, Korea
Tel: +82-53-950-5777; Fax: +82-53-950-6772
E-mail: yhechoi@knu.ac.kr
Received July 21, 2011; revised November 21, 2011; accepted November 24, 2011

따라서 본 연구에서는 두릅의 유용성분의 최적 추출조건을 설정함으로써 추출공정에 있어서 효율성을 높이고자 하였으며, 이에 따른 시료에 대한 추출 시간, 에탄올 농도, 추출 온도에 따른 유용성분을 반응표면분석법으로 모니터링 하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용된 두릅은 북한산에서 재배 후 건조시킨 것을 2009 년에 구입하였으며, 이를 분쇄하여 분말화한 후 표준 망체(40 mesh)를 이용하여 통과한 분말을 연어냉장 보관하여 실험에 사용하였다.

수율 측정

수율은 항량을 측정된 수기에 추출액 3 mL를 취하여 60°C에서 하루 동안 1 차 증발 시키고, 30분간 냉각시킨 후 무게를 측정하였고 그 후 105°C에서 1 시간 증발 건조 시키어 30분간 냉각시킨 후 다시 무게를 측정하였다. 결과는 사용된 원료 양의 백분율로 나타내었다.

Total phenolics 측정

각 추출물의 총 페놀양 측정은 Folin-Denis법(Amerine & Ough, 1980)에 따라 비색정량 하였다. 즉, 일정비로 희석한 sample 100 µL에 Folin-Ciocalteu시약(Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, USA) 50 µL, 2% Na₂CO₃ 300 µL을 넣어 실온에서 15분간 방치한 후 1 mL 증류수를 가하여 UV-visible spectrophotometer(TU-1800 Human Crop. Co., Seoul, Korea)를 이용하여 735 nm에서 흡광도

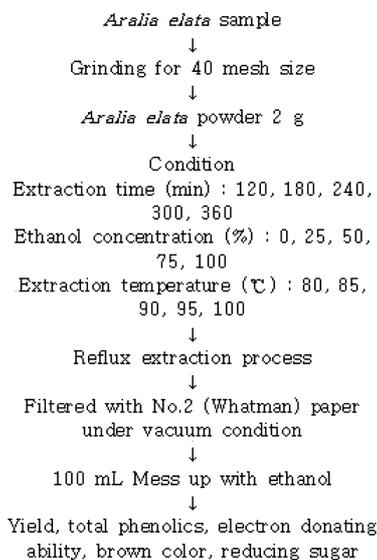


Fig. 1. Scheme for extraction process from *Aralia elata*.

Table 1. Central composite design for optimization of ethanol extraction conditions using response surface methodology.

Exp No.	Independent variables		
	Extraction time (min)	Ethanol concentration (%)	Concentration temperature (°C)
1	180(-1)	25(-1)	85(-1)
2	180(-1)	25(-1)	95(1)
3	180(-1)	75(1)	85(-1)
4	180(-1)	75(1)	95(1)
5	300(1)	25(-1)	85(-1)
6	300(1)	25(-1)	95(1)
7	300(1)	75(1)	85(-1)
8	300(1)	75(1)	95(1)
9	240(0)	50(0)	90(0)
10	240(0)	50(0)	90(0)
11	120(-2)	50(0)	90(0)
12	360(2)	50(0)	90(0)
13	240(0)	0(-2)	90(0)
14	240(0)	100(-1)	90(0)
15	240(0)	50(0)	80(-2)
16	240(0)	50(0)	100(2)

를 측정하였다. 이 때 표준물질로 gallic acid(Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 농도별로 조제하여 standard curve를 작성한 후 정량분석 하였다.

전자공여능측정(Electron donating ability, EDA)

1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH) 12 mg을 absolute methanol 100 mL에 용해하여 0.4 nM의 DPPH용액을 만든 다음 methanol 용액을 blank로 하여 520 nm에서 흡광도가 0.95-0.99가 되도록 absolute methanol을 넣어가며 조정하였다. 이렇게 조제한 DPPH시약 900 µL와 추출물 100 µL를 혼합하여 vortex한 후 30분간 암실에 보관하여 sample 첨가구와 무첨가구를 520 nm에서 UV-visible spectrophotometer로 각각의 흡광도를 구해 그 차이를 백분율(%)로 표시하여 전자공여능을 측정하였으며 아래와 같이 계산하였다.

$$EDA(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료첨가의 흡광도} - \text{공시험의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

갈색도 측정

두릅 추출물의 갈색화 반응 생성물질의 농도를 나타내는 갈색도는 420 nm에서 측정하였다.

환원당 측정

각 추출물의 시료 300 µL를 test tube에 DNS(Miller, 1959) reagent 300 µL를 가하여 vortex한 후 끓는 물에서 15분간 중탕시켰다. 얼음물에서 충분히 식힌 후 증류수 3 mL을 넣고 546 nm에서 흡광도를 측정하여 발색된 정도

Table 2. Polynomial equation calculated by RSM program for extraction of *Aralia elata*.

Responses	The second order polynomial ¹⁾	R ²	significance
Yield (Y) (%)	$Y_1 = -396.100000 + 0.263594X_1 + 1.210125X_2 + 8.009375X_3 - 0.000161X_1^2 - 0.000796X_2X_1 - 0.003530X_2^2 - 0.001521X_3X_1^2 - 0.009250X_3X_2 - 0.039250X_3^2$	0.8646	0.0459
Total phenolics (Y) (mg GAE/100 g)	$Y_2 = -23631 + 6.544589X_1 + 33.908371X_2 + 512.867647X_3 - 0.020425X_1^2 - 0.008484X_2X_1 - 0.200000X_2^2 + 0.044306X_3X_1 - 0.169683X_3X_2 - 2.828054X_3^2$	0.9750	0.0004
Electron donating ability (Y) (%)	$Y_3 = -504.752604 - 0.007595X_1 + 1.726869X_2 + 10.834099X_3 - 0.000166X_1^2 - 0.001220X_2X_1 - 0.005564X_2^2 + 0.001557X_3X_1 - 0.011458X_3X_2 - 0.058211X_3^2$	0.9341	0.0064
Brown color (Y) (O.D.)	$Y_4 = -5.538219 - 0.000278X_1 + 0.003131X_2 + 0.128544X_3 - 0.000004948X_1^2 + 0.000001542X_2X_1 - 0.000049600X_2^2 + 0.000029375X_3X_1 + 0.000006500X_3X_2 - 0.000748X_3^2$	0.9414	0.0046
Reducing sugar (Y) (%)	$Y_5 = -16.259982 + 0.019426X_1 + 0.011519X_2 + 0.316256X_3 + 0.000000560X_1^2 - 0.000038784X_2X_1 - 0.000081706X_2^2 - 0.000196X_3X_1 + 0.000036967X_3X_2 - 0.001462X_3^2$	0.8987	0.0212

¹⁾ X₁ : extraction time (min), X₂ : ethanol concentration (%), X₃ : extraction temperature (°C) $Y = b_0X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3$

를 알고 glucose standard curve를 이용하여 환원당 함량(%)을 구하였다.

환류 추출 공정 최적화를 위한 실험 계획

반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 통해 환류추출을 이용한 두릅의 최적 추출 조건을 확립하였고, 예비실험의 결과를 중심으로 중심합성계획(central composite design)을 실시하였다. 추출공정의 독립변수(Xn)는 추출 시간(X)과 에탄올 농도(X), 추출 온도(X)에 대한 실험 범위를 선정하여 5 단계로 나누었으며 Table 1에 나타내었다. 또한 각각의 변수에 영향을 받는 추출 수율, 총 페놀 함량, 전자공여능, 갈색도, 환원당 함량으로 3 회 반복 측정하여 각각 회귀분석을 실시하였다. SAS(statistical analysis system, Version 9.1) program을 이용하여 회귀분석에 의한 최적조건을 예측하였으며 회귀분석 결과 임계점이 최대점 혹은 최소점이 아니고 안장점일 경우에는 능선 분석을 통하여 최적점을 구하였다. 회귀식은 다음과 같다.

$$Y = b_0X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3$$

추출특성의 모니터링과 최적조건범위 예측은 각 변수의 contour map을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

추출 조건이 추출 수율에 미치는 영향

각 추출조건에 따른 두릅의 수율에 대한 회귀식은 Table 2와 같다. 반응표면 분석에 따라 예측된 정상점은 안장점으로 (Table 3) 추출시간 316.58 분, 에탄올 농도 15.68%, 추출시간 316.58 분에서 최대값 32.94%로 예측되었다.

추출 조건이 total phenolics에 미치는 영향

두릅의 각 추출조건에 따른 총 페놀 함량을 측정 한 결과는 Table 2에 나타냈으며 R²값은 0.9750으로 측정되었다. Total phenolics는 세 가지 조건 모두에 영향을 받는 것으로 나타났지만 특히 에탄올 농도에 더 많은 영향을 받았다 ($p < 0.01$). 반응표면 분석으로 예측된 정점은 안장점으로 Table 3에 나타난 바와 같이 추출 온도 97.41°C, 에탄올 농도 28.46%, 추출시간 301.89 분에서 최대값 1169.61 mg GAE/100 g 으로 나타났다.

추출 조건이 전자공여능에 미치는 영향

전자공여능이 있는 성분은 활성 라디칼에 전자를 공여하고 식품 중의 지방질 산화를 억제하는 목적으로 사용되며, 인체 내에서는 활성 라디칼에 의한 노화를 억제시키는 작용을 한다(Kang et al., 1996).

Table 3. Predicted values of optimum conditions for the maximized responses to variables by the ridge analysis by their response surface.

Responses	Extraction conditions ¹⁾				
	X ₁	X ₂	X ₃	Estimated responses	Morphology
Yield (%)	316.58	15.68	93.49	32.49 (max.)	saddle point
Total phenolics (mg GAE/100 g)	301.89	28.46	97.41	1169.61 (max.)	saddle point
Electron donating ability (%)	323.05	22.96	94.78	29.82 (max.)	saddle point
Brown color (O.D.)	321.82	38.35	97.00	0.30 (max.)	saddle point
Reducing sugar (%)	339.39	24.62	87.62	1.04 (max.)	saddle point

¹⁾ X₁ : extraction time (min), X₂ : ethanol concentration (%), X₃ : extraction temperature (°C)

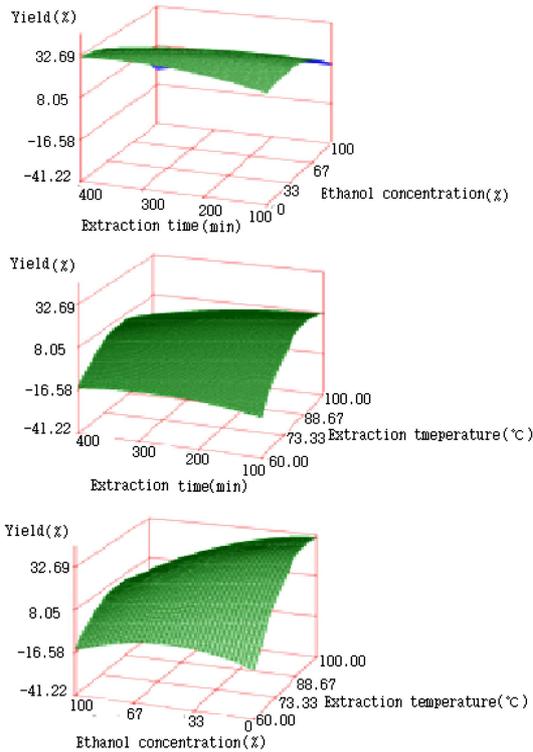


Fig. 2. Contour maps for the effects of extraction conditions on yield(%).

DPPH 라디칼 소거법으로 전자공여능(electron donating ability, EDA)을 측정 하였다. 항산화능을 가진 물질의 전자 공여능에 의해 DPPH가 환원되어 탈색이 되는데, 이때의 탈색 정도로 그 물질의 항산화능을 측정할 수 있다.

각 추출조건에 따른 전자공여능을 측정한 결과 에탄올 농도에 가장 많은 영향을 받았고($p < 0.01$), 각각의 추출조건에 따른 추출물의 전자공여능에 대한 회귀식은 Table 2에 나타냈으며 R^2 는 0.9341로 나타났다. 반응표면 분석의 결과 예측된 정상점은 안장점으로 Table 3에 나타난 바와 같다. Table 3에 따르면 추출 온도는 94.78°C, 에탄올 농도 22.96%, 추출 시간은 323.05 분에서 최대값 29.82%로 나타났다.

추출 조건이 갈색도에 미치는 영향

일부 갈색화 반응들은 항산화 효과를 나타내는데, 두릅의 추출조건에 따른 추출물의 갈색도에 대한 회귀식은 Table 2에 나타냈으며 R^2 값은 0.9414로 나타났다. 갈색도는 모든 조건에 영향을 받았으나 특히 에탄올 농도에 가장 많은 영향을 받은 것으로 나타났다($p < 0.01$). Table 3에서는 반응표면 분석의 결과로 예측된 정상점이 안장점임을 알 수 있으며 또한 Table 3에 나타난 바에 따르면 추출 온도 97.00°C, 에탄올 농도 38.35%, 추출 시간 321.82 분에서 최대값인 0.3 O.D.를 나타낸다.

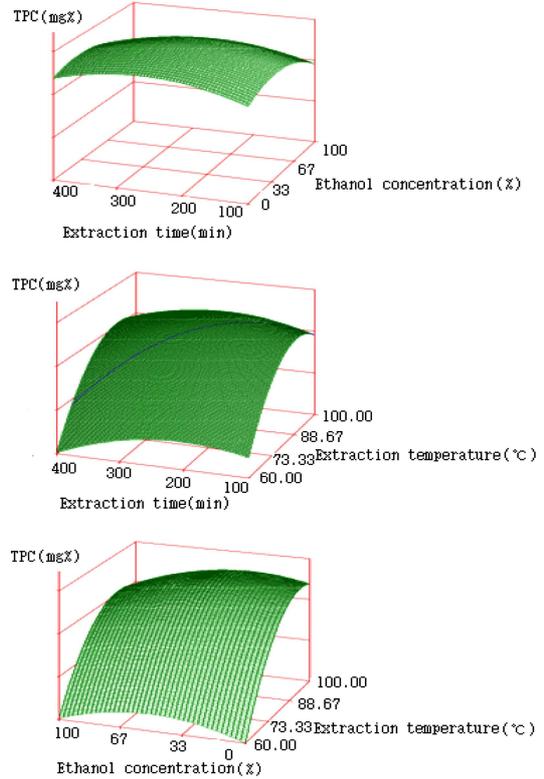


Fig. 3. Contour maps for the effects of extraction conditions on total phenolics(mg GAE/ 100 g).

추출 조건이 환원당에 미치는 영향

각각의 추출조건에 따른 추출물들의 환원당을 측정한 결과에 대한 회귀식의 R^2 값은 0.8987로 나타났다. 반응표면 분석의 결과에 의해 예측된 정상점은 Table 3에 나타난 바와 같이 안장점이고 추출 온도 87.62°C, 에탄올 농도 24.62%, 추출 시간 339.39 분에서 최대값 1.04%로 나타났다.

최적 추출 조건 예측

추출 시간과 에탄올 농도, 추출 온도를 추출 조건으로 하

Table 4. Regression analysis for regression model of variables in extraction condition.

Response conditions	F-ratio		
	X ₁	X ₂	X ₃
Yield (%)	0.57	9.14*	0.81
Total phenolics (mg GAE/100 g)	14.04**	55.03***	14.74**
Electron Donating Ability (%)	1.57	19.47***	2.55
Brown color (O.D.)	5.81*	22.29***	6.73*
Reducing sugar content (%)	3.40	8.48*	4.52

*** $p < 0.001$ ** $p < 0.005$ * $p < 0.01$

Table 5. The optimum condition of extraction conditions for response variables by superimposing of contour maps for *Aralia elata*.

	Leaching condition	Optimum range	Optimum condition
X ₁	Extraction Time (min)	220-307	263.5
X ₂	Ethanol Concentration (%)	0-28	14
X ₃	Extraction Temperature (°C)	88-91	89.5

여 이로부터 추출 조건 최적화를 위해 추출물의 특성인 yield(Y₁), total phenolics(Y₂), electron donating ability(Y₃), browning color(Y₄), reducing sugar(Y₅)의 contour map을 superimposing하여 Fig. 3과 같이 최적 추출조건 범위를 예측하였다. 이때, 반응표면이 중복된 부분은 추출 시간 263.5 분, 에탄올 농도 14%, 추출 온도 89.5°C로 나타났다.

요 약

두릅을 반응표면 분석법을 이용하여 최적의 환류 추출 조건을 설정하였다. 중심합성계획법에 따라 추출 시간(X), 에탄올 농도(X), 추출 온도(X)를 요인변수로 설정하고 수율(Y), 페놀 함량(Y), 전자공여능(Y), 갈색도(Y), 환원당(Y)

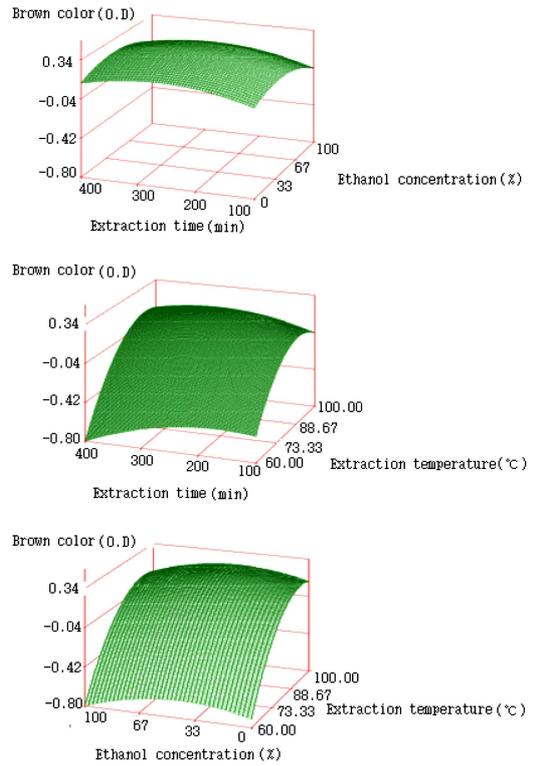


Fig. 5. Contour maps for the effects of extraction conditions on browning color (O.D).

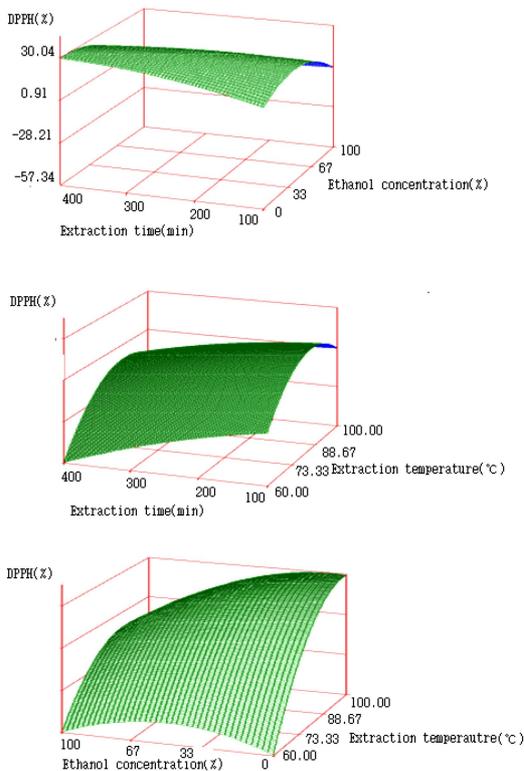


Fig. 4. Contour maps for the effects of extraction conditions on electron donating activity (%).

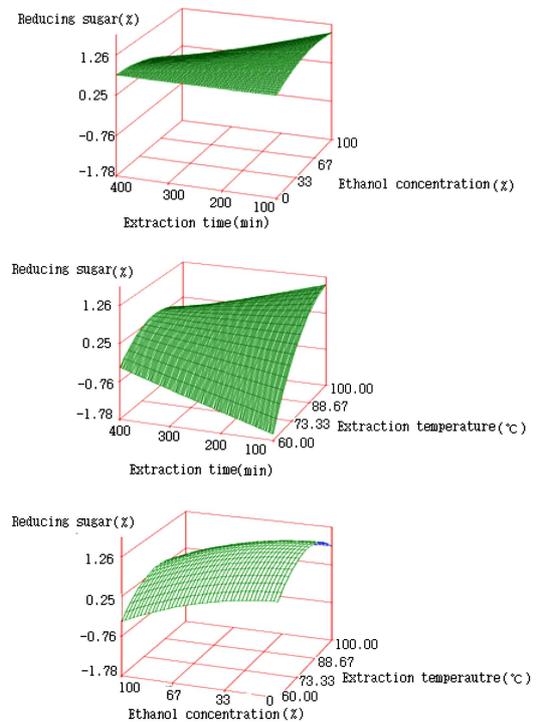


Fig. 6. Contour maps for the effects of extraction conditions on reducing sugar (%).

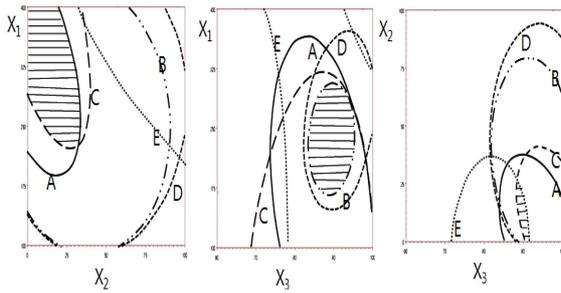


Fig. 7. Contour maps for the effects of extraction conditions on *Aralia elata* extraction. (A) yield, (B) total phenolics, (C) electron donating activity, (D) brown color, (E) reducing sugar.

을 종속 변수로 하였다.

각 추출 조건에 따른 두릅의 수율의 예측된 정상점은 추출 온도 93.49°C, 에탄올 농도 15.68%, 추출 시간 316.58 분에서 최대값 32.94%로 예측되었다. 총 페놀 함량은 모든 조건에 영향을 받았으나 특히 에탄올 농도에 큰 영향을 받았고 추출 온도 97.41°C, 에탄올 농도 28.4%, 추출 시간 301.89 분에서 1169.61 mg GAE/100 g으로 예측되었다. 각 추출 조건에 따른 전자공여능을 측정한 결과 에탄올 농도에 큰 영향을 받았고 추출 온도는 94.78°C, 에탄올 농도 22.96%, 추출 시간은 323.05 분에서 최대값 29.82%로 나타났다. 두릅의 추출 조건에 따른 추출물의 갈색도도 모든 조건에 영향을 받았으나 특히 에탄올 농도에 큰 영향을 받았고 추출 온도 97.00°C, 에탄올 농도 38.35%, 추출 시간 321.82 분에서 최대값인 0.30 O.D.를 나타냈다. 각각의 추출 조건에 따른 추출물들의 환원당을 측정한 결과 에탄올 농도에 가장 큰 영향을 받았고 추출 온도 87.62°C, 에탄올 농도 24.62%, 추출 시간 339.39 분에서 최대값 1.04%로 나타났다. 실험 결과에 비추어 볼 때 두릅의 추출 공정에서 에탄올 농도가 가장 많은 영향을 미치는 것으로 사료된다.

두릅 추출물의 특성의 contour map을 superimposing하여 최적 추출조건의 범위를 예측한 결과 최적 추출 조건은 추출 시간 263.5 분, 에탄올 농도 14%, 추출 온도 89.5°C로 예측되었다.

참고문헌

- Amerine MA, Ough CS. 1980. Methods for Analysis of Musts and Win. Wiley & Sons, New York, NY, USA, pp. 176-180.
- Han GJ, Jang MS, Shin DS. 2007. Change in the quality characteristics of *Aralia continentalis* Kitagawa pickle during storage. Korean J. Food Cookery Sci. 23: 294-301.
- Han GJ, Shin DS, Jang MS. 2008. A study of the nutritional composition of *Aralia continentalis* Kitagawa leaf. Korean J. Food Sci. Technol. 40: 680-685.
- Jung CS, Lee EB. 1993. Pharmacological studies on root bark extract of *Aralia elata*-Antigastric and antiulcerative effects in rats. Yakhak Hoeji 37: 581-590.
- Kang YH, Park YH, Lee GD. 1996. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. Korean J. Food Sci. Technol. 28: 232-239.
- Kim SH, Han JH, Kim YH. 2010. Health functional food use and related variables among the middle-aged in Korea. Korean J. Nutr. 43: 294-303.
- Lee GH, Jung JW, Ahn EM. 2009. Antioxidant activity of isolated compounds from the shoot of *Aralia elata* seem. Kor. J. Herbol-ogy 24: 137-142.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 28: 350-352.
- Moon HK, Oh KE, Son SH. 1999. Factors influencing somatic embryo induction and plant regeneration in *Aralia elata* seem. Korean J. Plant Tissue Culture 26: 275-280.
- Sin KH. 2006. Effects of Araliaceae water extracts on blood glucose level and biochemical parameters in diabetic rats. Nutr. Res. Pract. 39: 721-727.
- Sin KH, Cho SY, Lee MK, Lee JS, Kim MJ. 2004. Effect of *Aralia elata*, *Acanthopanax cortex* and *Ulmus davidiana* water extracts on plasma biomarkers in streptozotocin-induced diabetic rats. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33: 1457-1462.