

반응표면분석법에 의한 동충하초 열수추출공정의 최적화

윤광섭 · 정용진* · 이기동** · 신승렬*** · 구재관****

대구가톨릭대학교 식품공학과, *계명대학교 식품가공학과, **경북과학대학 첨단발효식품과,
경산대학교 생명자원학부, *KBF(주)

Optimization for Hot Water Extraction Process of *Cordyceps militaris* using Response Surface Methodology

Kwang-Sup Youn, Yong-Jin Jeong*, Gee-Dong Lee**, Seung-Ryeul Shin*** and Jae-Gwan Ku****

Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyungsan 712-702, Korea

*Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

**Department of Fermented Food, Kyongbuk College of Science, Chilgok 718-850, Korea

***Faculty of Life Resources Engineering, Kyungsan University, Gyungsan 712-715, Korea

****KBF(Co. Ltd), Kyungnam 621-840, Korea

Abstract

This study was conducted to optimize hot water extraction process of *cordyceps militaris* for development beverage. Optimal condition for hot water extraction was investigated with changes in extraction concentration and temperature by response surface methodology. The content of soluble solid was effected with concentration. The efficiency of extraction for turbidity, total sugar, reducing sugar and protein increased with low concentration. The response variables had significant with concentration and the established polynomial model was suitable ($p>0.05$) model by lack-of-fit analysis. Optimal extraction conditions as the limited conditions of 2.0~2.4% extractable solids, 1.5~2.0% brix, 114~120 $\mu\text{g/g}$ total sugar, 10.5~11.0 $\mu\text{g/g}$ reducing sugar and 110~115 $\mu\text{g/g}$ protein were 95~100 $^{\circ}\text{C}$ and 4.0~4.1% of concentration.

Key words : *cordyceps militaris*, extraction, RSM, optimization

서 론

동충하초는 분류학적으로 볼 때 자낭균강 맥각균목에 속하며 일반적 의미로서의 동충하초(冬蟲夏草)란 말은 중국에서 유래된 것으로 겨울에는 곤충의 몸에 살면서 양분을 흡수하여 곤충을 죽게 한 후 여름이 되면 죽은 곤충의 몸에서 버섯을 만든다는 뜻에서 붙여졌다. 즉, 동충하초균의 포자나 균사가 곤충이나 균핵, 식물의 종자 등에 들어가서 기주 안에 있는 물질을 영양원으로 이용하여 내생균핵을 만든 다음 밖으로 자실체를 형성하는데, 이것이 바로 동충하초 버섯이다. 전세계적으로 곤충에 기생하는 곰팡이는 약 800여종이 있으며 그 중 자낭균류의 동충하초 속에 속하는 곰팡이는 약 300 여종이 보고되어 있으며 국내에서는 76종이 채집되어 정리되어 있다(1). 국내에서는 최근 잠사곤충연구소에서

누에동충하초 인공재배에 성공하였으며 1998년 7월에 보건복지부가 동충하초 중 안전성이 확인된 누에동충하초(*Paecilomyces japonica*)를 식품원료로 허가하였다.

동충하초(*Cordyceps Sinensis*)의 성분을 보면 수분 18.84%, 조단백질 25.32%, 조지방 8.4%, 탄수화물 28.90%, 조섬유 19.53%, 회분 4.10%등으로 구성되어 있으며 아미노산이 18종이 함유되어 있고 지방 중에는 포화지방산 13%, 불포화지방산 82.2%가 들어 있다. 또한 동충하초에는 cordycepin, cordycepic acid, cordyceps polysaccharide, 비타민 B₁₂ 등의 유용물질이 함유되어 있어 동충하초의 효능으로는 자양강장효과, 신장과 간기능개선, 면역기능강화, 항균성 및 항종양작용, 생체산화방지, 혈당강하 및 콜레스테롤과 중성지질저하 효과 등의 효능이 알려져 있다(2,3).

동충하초는 환자들이나 일반인들에게 건강식품으로서 자리잡을 수 있는 충분한 가치가 있을 것으로 생각된다. 따라서 동충하초의 유용성분을 추출하여 여러 가지 형태의 식품으로 개발하거나 기타 식품의 첨가물로 활용한다면 그 가치를 높일 수 있을 것으로 판단된다. 그러므로 본 연구에서는 동충하초로부터 유용성분을 추출하기 위한 한 방법으로 열

Corresponding author : Kwang-Sup Youn, Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, 330 Kumrak 1-ri, Hayang-up, Gyungsan 712-702, Korea
E-mail : ksyoun@cataegu.ac.kr

수추출공정을 고려하여 열수추출공정의 최적조건을 반응표면분석법으로 최적화하여 추출최적조건을 얻고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용된 동충하초 균사체(*Cordyceps militaris*)는 (주)고려식료로부터 제공받아 사용하였다.

열수추출

열수추출공정의 조건을 수립하고자 추출시간, 추출회수, 추출온도를 달리하여 총당, 환원당, 단백질을 분석하였다. 가장 영향이 적은 것으로 나타난 추출시간을 3시간으로 결정하고 추출온도(85, 90, 95, 100 and 105°C)와 농도(2, 3, 4, 5 and 6%)를 달리하여 중심합성법(4)으로 실험계획을 수립하여 열수추출을 행하였다.

열수추출공정의 최적화 실험계획

반응표면분석법을 이용하여 열수추출공정의 최적화를 실시하였다. 즉, 열수추출시 추출시간을 3시간으로 고정하고 추출온도(extraction temperature ; X_1)와 농도(extraction concentration ; X_2)를 요인변수로 하여 Table 1과 같이 -2, -1, 0, +1, +2의 다섯단계로 부호화하였다. 또 추출액의 품질특성에 관련된 반응변수(Y_n)로는 brix(Y_1), turbidity(Y_2), soluble solid(Y_3), hue angle(Y_4), total sugar(Y_5), reducing sugar(Y_6), protein(Y_7)이었으며 2개의 요인변수를 5수준으로 하는 실험영역으로 10개의 선정된 조건에서 실험을 실시하였다. SAS (Statistical Analysis System)의 RSREG procedure를 사용하여 동충하초 열수추출시 품질특성이 최대가 되게 하는 최적조건을 설정하는 최적화를 시도하였다.

Table 1. The changes of total sugar, reducing sugar and protein content of hot water extraction from *Cordyceps militaris* by extraction time

Temperature (°C)	Concentration (%)	Extract Component (mg/ml)	Extraction time(hr)				
			1	2	3	4	5
105	4	total sugar	7.342	7.524	8.143	6.432	7.864
		reducing sugar	0.822	0.861	0.889	0.887	0.950
		protein	3.792	3.645	3.667	3.654	3.885
100	2	total sugar	2.568	2.959	3.057	3.018	-
		reducing sugar	0.417	0.371	0.384	0.412	-
		protein	1.951	1.960	1.960	2.080	-
90	4	total sugar	7.039	7.330	7.500	7.767	7.525
		reducing sugar	3.909	3.826	3.607	3.672	3.952
		protein	5.063	4.859	4.885	4.903	5.081

당도 및 고형물 측정

추출액의 brix 농도는 굴절당도계(ATAGO refractometer)로 측정하였다. 추출액의 고형물 함량은 적외선 수분 측정기(HG53, Mettler Toledo, USA)를 사용하여 건조시킨 후 남은 고형물의 양으로 표시하였다.

탁도 및 색도 측정

추출액의 탁도는 여과지(Toyo, No. 2)로 여과한 후 탁도계(HACH-Model 2100A, Turbidimeter, USA)를 사용하여 cell당 약 25 mL를 취하여 측정하였다. 추출액의 색도는 색차계(ChromaMeter, CR 200, Minolta, Japan)로 측정하였으며, L(lightness), a(redness), b(yellowness)값과 색도(Hue angle)로 나타내었다.

총당 및 환원당 정량

추출액의 총당은 phenol-sulfuric 법(6)으로 정량하였다. 즉 추출용액 1 mL에 5% 페놀 1 mL를 가한 다음 진한 황산 5 mL를 가하여 혼합하고 15분간 방치한 후 분광광도계로 550 nm에서 비색 측정하였다. 추출액의 환원당 함량은 DNS 방법(5)으로 정량하였다. 즉, 추출액을 100배로 희석한 검액 1 mL에 DNS 시약 3 mL를 가하고 5분간 끓인 다음, 냉각한 후 물을 25 mL로 채우고 550nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

단백질 정량

추출액의 단백질은 정량은 Lowry 법(7)으로 정량하였다. 즉, 시료용액 1 mL를 취하여 알칼리성 구리시약 5 mL를 가하여 혼합하여 실온에서 10분간 방치한 다음 희석 folin시약 0.5 mL를 신속히 첨가하여 혼합하고 실온에서 30분 이상 방치한다. 혼합액은 750 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질을 정량하였다.

결과 및 고찰

추출시간에 따른 추출액의 품질 변화

동충하초 열수추출시 적절한 추출시간과 추출방법을 얻기 위하여 추출조건을 달리하여 추출액의 품질을 평가하였다. 먼저 추출온도와 농도를 각기 달리하여 추출한 결과 총당과 환원당 및 단백질함량의 변화는 추출시간에 따라 큰 변화가 없는 것으로 나타났다(Table 1). 100°C, 2%의 경우, 총당은 2시간 후 약간 증가하였으나 환원당과 단백질함량은 큰 변화가 없었으며, 105°C, 4%의 경우도 총당의 함량은 약간의 증감이 있었으나 환원당과 단백질의 함량은 변화가 없

었다. 추출용기를 각기 달리한 경우(90℃, 4%)에도 시간에 따른 변화는 거의 없었으며, 추출 1시간까지 각 10분 단위로 추출액의 품질 변화를 보았으나 추출시간에 따른 큰 변화는 없었다. 이는 통상적으로 추출시간이 증가함에 따라 추출수율이 증가한다고 알려져 있으나(8) 본 실험에서는 추출시간에 따라서는 큰 차이가 없었지만 추출회수에는 큰 영향이 있는 것으로 나타났다. 따라서 동충하초 열수추출의 경우 추출시간에 따른 영향은 크지 않은 것으로 나타나 반응표면분석법에 의한 최적화시 추출시간을 요인변수에서 제외하였다. 추출회수에 따른 추출액의 성분 변화를 Fig. 1에서 살펴본 결과, 1회 추출이 2회, 3회에 비하여 총당의 경우 7.6배, 환원당은 5배, 단백질은 약 5배정도 추출량이 많음을 알 수 있어 1회 추출만으로도 대부분의 유용성분이 추출됨을 확인할 수 있었다.

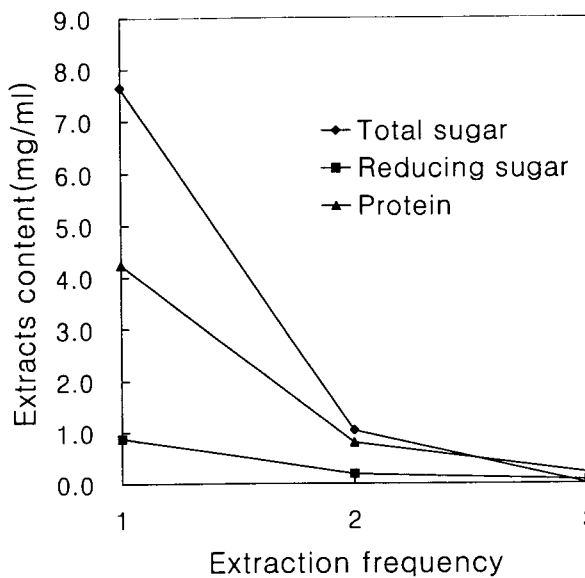


Fig. 1. Changed of total sugar, reducing sugar and protein of hot-water extraction from *Cordyceps militaris* dependent on extraction frequency for 2 hours at 105℃ and 4% concentration.

열수추출조건에 따른 품질의 변화

동충하초 열수추출공정의 최적조건을 얻기 위하여 추출 온도와 농도를 Table 2의 조건에 따라 설정한 후 실험에서 얻어진 결과를 Table 3에 나타내었다. 추출온도와 농도에 따른 동충하초 추출액의 당도(brix)와 가용성 고형분의 함량은 추출온도의 영향은 크게 받지 않았으나 농도에 따라서는 큰 영향을 받는 것으로 나타나 추출농도가 증가함에 따라 가용성고형분 함량은 비례적으로 증가하였다. 추출액의 색상을 나타내는 hue angle도 대체적으로 추출온도와 농도가 증가함에 따라 90° 에 가까운 값을 보여 색상이 붉어지는 것으로

나타났으나 추출액의 탁도는 오히려 추출농도와 추출온도가 낮을수록 높게 나타나 혼탁물질이 많음을 알 수 있었다. 총당과 환원당, 단백질의 함량은 낮은 농도에서의 추출이 고농도보다 오히려 높은 함량을 보였는데 이와 같은 이유는 함량의 표시를 시료 g당으로 나타내었기 때문으로, 추출농도가 추출물의 특성에 미치는 영향을 감안하면 수율이 높은 적절한 추출농도를 찾을 수 있을 것으로 생각된다.

Table 2. Levels of extraction conditions in experimental design for extraction from *Cordyceps militaris*

X _i	Extraction condition	Level				
		-2	-1	0	1	2
X ₁	Temperature(℃)	85	90	95	100	105
X ₂	Concentration(%)	2	3	4	5	6

Table 3. Experimental data for brix, turbidity, soluble solid, hue angle, total sugar, reducing sugar and protein for different coded values of treatment conditions of hot water extraction from *Cordyceps militaris*

No.	Temp.	Conc.	Variables						
			Brix (bx)	Turbidity	Soluble solid (%)	Hue angle	Total sugar (μg/g)	Reducing sugar (μg/g)	Protein (μg/g)
1	90	3	1.0	4.5	1.429	77.4	124.11	12.10	122.20
2	90	5	2.1	2.4	2.714	78.5	110.59	9.98	97.99
3	100	3	1.0	3.8	1.240	76.8	132.11	12.22	124.64
4	100	5	2.1	1.5	2.881	79.7	102.87	9.81	109.60
5	95	4	1.5	2.9	2.066	82.8	117.22	10.93	114.76
6	95	4	1.5	2.8	2.049	83.0	109.47	10.26	106.30
7	105	4	1.5	2.1	2.282	81.4	113.79	11.38	120.33
8	85	4	1.4	3.8	1.793	68.7	112.82	11.33	142.68
9	95	6	2.5	2.6	3.272	81.2	105.43	9.19	102.24
10	95	2	0.4	5.8	1.035	61.3	122.47	12.08	136.46

열수추출공정의 최적화

동충하초 열수추출공정의 최적조건을 찾기 위하여 Table 3의 실험결과를 이용하여 반응표면분석법에 의해 수립된 2 차 회귀모형에 적합하여 얻은 회귀계수값들을 Table 4에 나타내었다. 이들 계수값을 이용하여 반응변수의 예측은 물론 반응표면의 형성도 가능하다(9). 수립된 회귀식에 대하여 각 요인변수가 반응변수에 미치는 영향을 분석한 결과를 Table 5에 나타내었는데 각 반응변수 모두 추출온도에 대해서는 유의성이 인정되지 않았으나 추출농도에 대하여는 유의성이 있는 것으로 나타나 동충하초 열수추출의 경우 추출농도가 가장 중요한 변수임을 알 수 있었다. 각 반응변수에 대하여

분산분석한 결과를 알아보면 brix, 탁도, 가용성고형분, hue angle에 대하여 수립된 회귀모형은 1%이내의 유의수준을 나타내어 유의성이 인정되었으나 환원당 및 단백질함량에 대해서는 5%이내의 유의수준을 나타내었고 총당에 대하여는 다소 높은 값을 보여 유의성이 인정되지 않았다. 수립된 이차 회귀식에 대한 적합성 결여분석 결과 hue angle을 제외한 반응변수 모두 유의성이 없어(p>0.05) 수립된 반응표면 모형이 통계적으로 유의하다고 할 수 있으며 특히, 대부분의 반응변수 모두 일차항만으로도 회귀식을 수립할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 각 반응변수의 최대, 최소점을 나타내는 요인변수의 값을 Table 6에 나타내었다. 정상점이 안장점으로 나타난 가용성고형분과 총당 그리고 환원당에 대해서는 다시 능선분석을 통하여 최적점을 얻을 수 있었으며 대부분의 반응변수 모두 주어진 실험조건 내에서 최적조건을 찾을 수 있었다.

Table 4. Regression coefficients of second order polynomials^{a)} representing relationships between indicated response variables(Yn) and independent variables of extraction temperature(i or j=1) and concentration(i or j=2) of hot water extraction from *Cordyceps militaris*

Coefficients	Variables						
	Brix (bx)	Turbidity	Soluble solid (%)	Hue angle	Total sugar (μg/g)	Reducing sugar (μg/g)	Protein (μg/g)
βk0	-7.639	29.275	3.697	-695.706	-268.109	71.064	1484.120
βk1	0.139	-0.322	-0.023	15.029	5.392	-1.260	-25.649
βk2	0.676	-2.743	-1.272	18.443	69.305	0.571	-71.384
βk11	-0.001	0.001	0.000	-0.079	-0.012	0.007	0.126
βk12	0.000	-0.010	0.018	0.090	-0.786	-0.015	0.459
βk22	-0.018	0.349	0.025	-2.918	-0.130	-0.007	2.357

$$^a) Y_n = \beta_o + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \epsilon$$

Table 5. Analysis of variance showing significance of effects of processing variables on brix, turbidity, soluble solid, hue angle, total sugar, reducing sugar and protein of hot water extraction from *Cordyceps militaris*

Process variables	DF	F- Ratio						
		Brix (bx)	Turbidity	Soluble solid (%)	Hue angle	Total sugar (μg/g)	Reducing sugar (μg/g)	Protein (μg/g)
Extraction temperature	3	0.710	9.187	1.172	2.431	0.483	0.869	2.343
Concentration	3	281.5***	51.037***	49.906***	6.048*	4.204	14.838**	13.489**

*Significant at 5% ** Significant at 1%
*** Significant at 0.1%

Table 6. Predicted levels of process variables yielding optimum response of brix, turbidity, soluble solid, hue angle, total sugar, reducing sugar and protein of hot water extraction from *Cordyceps militaris*

Process variables	Levels for optimum response						
	Brix (bx)	Turbidity	Soluble solid (%)	Hue angle	Total sugar (μg/g)	Reducing sugar (μg/g)	Protein (μg/g)
Extraction temperature	97.33	129.55	64.47 (98.04)	98.14	86.76 (100.26)	63.32 (99.38)	90.35
Concentration	18.93	5.78	2.52 (5.90)	4.67	4.29 (2.30)	-26.25 (2.20)	6.36
R-square	0.9953	0.9788	0.9744	0.8458	0.7597	0.9229	0.9164
Significance	0.0001	0.0019	0.0028	0.0885	0.1947	0.0240	0.0281
Predicted value	5.53	0.52	1.352 (3.466)	84.85	114.51 (133.01)	23.71 (12.50)	98.54
Morphology	Max.	Min.	S.P. ^{a)} (Max)	Max.	S.P. (Max.)	S.P. (Min.)	Min.

^{a)} S.P.=Saddle Point

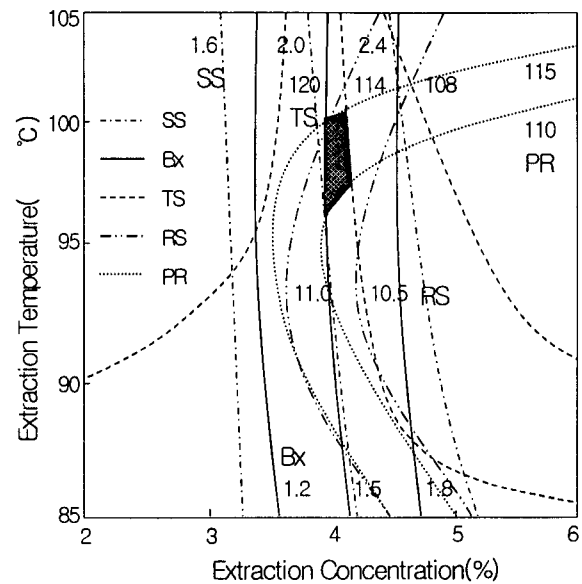


Fig. 2. Superimposed of contour map by response variables under soluble solid is 2.0~2.4%, brix is 1.5~1.8, total sugar is 114~120μg/g, reducing sugar is 10.5~11.0μg/g and protein is 110~115μg/g.

열수추출공정의 최적조건의 선정

일반적으로 음료는 열수추출하여 농축한 후 다시 적정농도로 희석하여 제품으로 만들게 되므로(8) 동충하초 열수추출의 경우, 추출액의 품질에 큰 영향을 주지 않을 것으로 판단되는 hue angle과 탁도를 제외한 가용성고형분, brix, 총당, 환원당 및 단백질의 함량을 종속변수로 하여 contour

map을 작성하였다. 각 반응변수들의 대응값이 일치하지 않아 적절한 제한조건을 필요로 하게 된다. 예비실험을 통해 얻어진 결과를 바탕으로 가용성 고형분함량은 2.0~2.4, brix 1.5~1.8bx, 총당은 114~120 $\mu\text{g/g}$, 환원당은 10.5~11.0 $\mu\text{g/g}$ 그리고 단백질함량은 110~115 $\mu\text{g/g}$ 인 영역을 제한조건으로 하여 선정된 열수추출조건은 추출온도 95~100 $^{\circ}\text{C}$, 추출농도 4.0~4.1%로 결정할 수 있었다(Fig. 2).

요 약

동충하초를 음료로 개발하기 위한 전단계로 열수추출공정을 반응표면분석법으로 최적화하였다. 추출시간에 따라서는 큰 변화가 없어 추출온도와 농도를 요인변수로 하여 실험을 수행하였다. 열수추출액의 당도(brix)와 고형분 함량은 농도에 따라서 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 추출액의 탁도와 총당, 환원당 및 단백질 함량은 낮은 농도에서 추출수율이 좋은 것으로 나타났다. 각 반응변수 모두 농도에 대하여는 유의성이 있는 것으로 나타났으며 수립된 이차 회귀식에 대한 적합성 결여분석 결과 수립된 반응표면 모형이 통계적으로 유의하였다. 동충하초 열수추출에 있어 고형분 함량은 2.0~2.4 %, brix 1.5~1.8, 총당 114~120 $\mu\text{g/g}$, 환원당 10.5~11.0 $\mu\text{g/g}$ 그리고 단백질함량 110~115 $\mu\text{g/g}$ 인 영역을 만족하는 조건은 추출온도 95~100 $^{\circ}\text{C}$, 농도 4.0~4.1%로 결정할 수 있었다.

참고문헌

1. 한대석, 송효남, 김상희 (1998) 동충하초 새로운 기능성 식품소재, 식품기술 11, 107-116
2. Han D.S., Song, A.N. and Kim Y.E. (1999) State, problem and research direction of Cordyceps sp. Food Science and Industry, 32, 67-82
3. Shim, J.Y., Lee Y.S., Lim, S.S. Shin, K.H. Hyun, J.E., Kim, S.Y. and Lee, E.B. (2000) Pharmacological activities of Paecilomyces japonica, a new type Cordyceps sp. Kor. J. Pharmacogn., 31, 163-168
4. Lee, G.D., Lee, J.E. and Kwon, J.H. (2000) Application of response surface methodology in food chemistry, Food and Industry, 33, 33-45
5. Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31, 426-428
6. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugar and related substance. Anal. Chem., 28, 350-352
7. Lowry, O.H. and Rosebrough, N.J. (1951) Protein measurement with the folin-phenol reagents. J. Biol. Chem., 193, 256-265
8. Kang, K.C., Park, J.H. Baek, S.B., Jhin, H.S. and Rhee, K.S. (1992) Optimization of bebrage preparation from Schizandra chinensis baillon by response surface methodology, Korean J. Food Sci, Technol., 24, 74-81
9. Kim, S.D., Ku, Y.S, Lee, I.Z, Park, I.K. and Youn K.S. (2001) Optimization for hot water extraction condition of Liriope spicata tuber using response surface methodology, Korean J. Postharvest Sci. Technol., 8, 157-163

(접수 2002년 2월 5일)