

반응표면분석법에 의한 미역 포자엽의 항산화물질 추출 조건 최적화

유미영 · 김경환 · 이재우¹ · 김상권² · 양지영*

부경대학교 식품생명공학부, 수산식품연구소, ¹창원대학교 식품조리과, ²(주)청호씨푸드

Optimization of Extraction Conditions of Antioxidants from Sporophyll of *Undaria pinnatifida* by Response Surface Methodology. Yoo, Mi-Young, Kyoung-Hwan Kim, Jae-Woo Lee¹, Sang-Kwon Kim², and Ji-Young Yang*. Division of Food science & Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea, Institute of Seafood Science, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea, ¹Department of Food Preparation, Changwon College, Changwon 741-771, Geongnam, ²Chung-Ho Sea Food Co., Ltd, Kijang-gun, Busan 619-900, Korea – We selected a solvent for producing antioxidants from sporophyll of *Undaria pinnatifida*. Optimum extraction condition for antioxidant ability(Y) of sporophyll of *U. pinnatifida* was investigated using response surface methodology(RSM). A compound central design was used with variables (X₁)temperature(°C) (3.4; 20; 60; 100; 116.6); (X₂)pH(1.8; 3; 6; 9; 10.2) and (X₃)treatment time(min) (1.7; 10; 30; 50; 58.3). Antioxidant activities were increased with decreasing pH and increasing temperature. The optimal extraction conditions for antioxidant ability(Y) of sporophyll of *U. pinnatifida* were found to be temperature 51.55°C, pH 4.2 and treatment time 28.2 min. Among the variables tested, pH showed greater significant factor in extraction of antioxidants from sporophyll of *U. pinnatifida*.

Key words: Sporophyll, *Undaria pinnatifida*, antioxidant activity, response surface methodology

최근 현대인들은 과도한 스트레스, 흡연, 음주, 방사선 및 대기오염 물질에 노출되어 생체 내 과다 free-radicals이 생성되어 지고 있다. 물론 이러한 free-radicals을 방어하기 위한 생체 내 효소적 비효소적 방어 기작들이 있음에도 불구하고 많은 사람들은 free-radicals들의 공격으로 인해 생체막이나 지단백질로 존재하는 지질의 과산화를 초래하여 생체 내 만성 질환들이 야기되고 있다[4]. 이러한 지질의 과산화는 한국의 사망요인 1순위인 고지혈증, 동맥경화증, 뇌혈관 질환, 심장병과 같은 심혈관계 질환의 중요한 위험인자로 알려져 있다. 이에 free-radicals을 방어하기 위한 기능성 항산화 물질들에 대한 활발한 연구가 진행 중이다[5, 12, 15]. 천연물 중에 대표적인 항산화 물질로는 비타민 C, β -carotene, tocopherol, polyphenol류, 아미노산, 펩타이드, aromatic compound등이 보고되어 지고 있다[10, 13, 16].

미역(*U. pinnatifida*)은 우리나라 바다에서 생육하기 때문에 일찍부터 산모의 건강을 증진시키기 위하여 애용된 기호 식품으로, 우리 생활과 깊은 연관을 맺고 있다. 또한 미역(*U. pinnatifida*)은 다른 갈조류와 비교해서 단백질, 지질, 당질, 비타민등 모든 영양소를 고루 함유하고 있을 뿐 아니라 무기질 성분인 칼슘 및 요오드가 풍부하게 들어있어 성장기 어린이에게 필수적인 식품으로 여겨져 왔다[6]. 미역 포자엽에

대한 연구는 미역 포자엽에서 추출한 fucoidan의 납 및 카드뮴 흡착에 대한 연구가 보고되고 있다[8, 9]. 미역 포자엽의 지방산 조성은 포화 지방산이 미역(*U. pinnatifida*)과 유사한 경향을 보이고 있으나, 불포화지방산의 조성에 있어서는 oleic acid(18:1)의 함량이 6배 ~7배이상 함유하고 있다고 보고하고 있으며, 또한 동맥경화 및 혈전 등과 같은 심장질환의 예방과 치료에 큰 효과가 있다고 보고되어 진 eicosapentaenoic acid (C20:5)의 함량이 미역 성엽에 비해서 3배가량 많이 함유되어 있다고 보고하고 있다[7, 14]. 그러나 생체 내에서 과다 생성된 free-radicals등에 의해 지질분자의 경우 제일 쉽게 공격을 받는 것은 불포화지방산으로 알려져 있으며, 초기반응에서 lipid radical을 생성한 후, 자동연쇄반응으로 지질과산화물을 형성하고, 이는 다시 독성이 큰 aldehyde나 간단한 탄소수소들로 분해된다. 이 과정에서 철이나 구리와 같은 금속이온이 존재할 경우 반응이 촉진되며, free-radical scavenger로 작용하는 물질은 저분자의 비타민 E에 의하여 억제된다고 보고되어 지고 있다[4].

미역 포자엽은 일부 건조되어 식용으로 이용되는 이외에는 특별한 용도가 없어 새로운 이용 방안에 대한 연구가 필요한 실정에 있는 재료로서, 미역 포자엽은 free-radicals의 공격을 받기 쉬운 불포화 지방산의 함유량이 다른 해조류에 비해 아주 높음에도 불구하고, 건조 미역 포자엽의 산화 속도는 다른 식물성 유지류에 비해 아주 천천히 이루어지고 있는 편이다. 이는 높은 불포화 지방산의 조성에 따른 항산화 물질을 미역 포자엽 자체가 가지고 있을 것으로 추정되는 바

*Corresponding author

Tel: 82-51-620-6419, Fax: 82-51-622-9248

E-mail: jyyang@pknu.ac.kr

미역 포자엽의 활용도를 높이고 부가가치를 위한 기능성소재의 재료로서 항산화물질의 생산을 위한 연구가 필요하다고 할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 미역 포자엽으로부터 항산화물질 추출에 영향을 미치는 변수들 간의 상호 관계를 분석하여, 반응표면 분석법을 이용하여 항산화 물질 추출조건의 최적화조건을 구하고자 하였다

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용한 미역 포자엽(sporophyll of *U. pinnatifida*)은 기장지역에서 재배된 북방산 개량종으로서 2003년도 2월에 채취하여 (주)청호물산으로부터 제공받았다. 미역포자엽 시료는 음건 후 세절하여 사용하였으며, 미역 포자엽의 일반적인 조성은 수분 26.75%, 조지방 6.61%, 조단백질 12.23%, 조회분 18.70% 및 탄수화물 35.71%을 함유하고 있었다. 본 실험에 사용된 시약은 특급시약이었으며, DPPH(1,1-diphenyl-picrylhydrazyl)는 Sigma Chemical Co.에서 구입하여 사용하였다.

추출조건의 예비설정

미역 포자엽의 항산화물질 추출 조건의 예비 설정에 필요한 기초실험으로 추출 용매종류에 따른 효과를 조사하기 위해 butanol, hexane, ethanol, chloroform, 증류수에 시료 10 g을 넣어 300 rpm으로 하룻밤 진탕 추출후 여과하여 여액의 항산화효과를 측정하여 추출용매를 선정하였다. 선정된 추출용매를 사용하여 pH, 처리시간 및 처리온도를 달리하여 실험하여 pH는 3에서 10까지, 처리온도는 3.4°C에서 115°C 까지, 처리시간은 60분까지 변화시켜 추출조건의 최적화 실험의 기본 조건으로 설정하였다. 이때 pH 3-6은 20 mM citrate-Na₂HPO₄ buffer, pH 7과 8은 20 mM Tris-HCl, pH 9와 10은 20 mM Na₂CO₃-NaHCO₃ 완충액을 각각 사용하였다.

추출조건의 최적화를 위한 중심합성계획

미역 포자엽의 항산화물질 생산을 위한 최적화를 위하여 예비실험을 기초로 하여 반응표면분석법(RSM : response surface methodology)을 이용하였으며, 실험계획은 중심합성계획(central composite design)을 적용하였다[1, 3]. 추출 과정의 독립변수로는 처리온도(X1), pH(X2), 처리시간(X3) 그리고 종속변수로는 항산화능(Y)을 각각 설정하였다. 실험계획은 -α, -1, 0, 1, α로 다섯 단계로 code값을 정하였으며, 직교중심합성(orthogonal central composite center)에 따라서 축점인 α값은 독립변수의 수 3개와 중심점의 수 4개에 대한 α값으로 1.414로 하였다. 중심합성계획에 의하여 18개의 항산화능 추출조건을 설계하여 나타내었다. 모든 실험의 결

과는 statistical analysis system(version 8.01, SAS Institute Inc., U.S.A)을 사용하여 통계처리를 하였다. 모든 실험은 3 반복 측정하여 그 평균값을 회귀분석에 사용하였으며, 2차 회귀방정식은 다음과 같았다.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_{12} + \beta_{22} X_{22} + \beta_{33} X_{32}$$

DPPH에 대한 수소공여능에 의한 항산화 활성 측정

미역 포자엽 추출물의 항산화능을 측정하기 위하여 free radical 소거능을 측정하는 방법으로 Blois의 방법[2]을 변형하여 사용하였다. 시료 0.2 mL에 2×10⁻⁴ M 1,1-diphenyl-picrylhydrazyl(DPPH)를 0.8 mL를 넣고 vortex한 후, 10분 동안 실온에서 방치한 후, 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로서 시료 용액 대신에 같은 양의 에탄올을 가하여 진탕하고 방치한 후 흡광도를 측정하였다.

$$\text{DPPH radical 소거능 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료의 흡광도}}{\text{대조구 흡광도}}\right) \times 100$$

결과 및 고찰

추출용매에 따른 미역 포자엽의 항산화 활성

추출용매의 종류에 따라 미역 포자엽의 항산화물질 추출에 미치는 영향을 조사한 결과 Fig. 1과 같았다. 조사한 5개의 추출용매 중 증류수로 추출한 시료가 95%로 가장 좋았으며 hexane이나 chloroform으로는 거의 추출되지 않았다. 이는 미역 포자엽의 항산화물질은 극성이 높은 물질로 추측된다. Lim[11] 등의 보고에 의하면 미역의 용매분획별 추출에 있어서는 dichloromethane이 가장 높은 superoxide anions 제거 효과를 가지고 있다고 보고하고 있으나, 본 실험에서는 유기 용매보다는 증류수를 이용한 추출에서 더 높

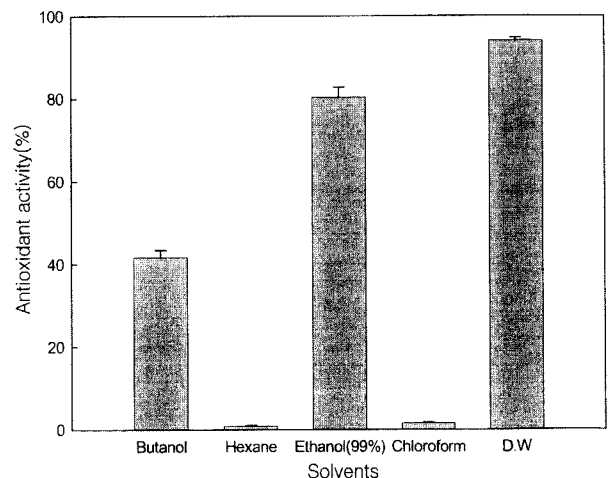


Fig. 1. Effect of solvents on extraction of antioxidants from sporophyll of *U. pinnatifida*.

은 free radical 제거 효과를 나타내었다.

추출물의 항산화 효과 최적화

미역 포자엽의 항산화물질 추출을 위한 최적화실험을 위해 각각의 독립변수에 대한 최적으로 판단되는 값을 각 변수의 중심영역에 0으로 설정하고, $-\alpha, -1, 0, 1, \alpha$ 로 다섯 단계로 code값을 구한 결과는 Table 1과 같았으며 이 결과로 중심합성에 의해 설계된 조건으로 무작위로 온도, pH, 처리 시간의 18개 추출 조건에 따른 항산화 효과의 실험결과는 Table 2와 같았다. 반응표면식의 처리간 유의차 검증을 위해

여 SAS system(Version 8.01, SAS Institute Inc., U.S.A)을 사용하였으며, 다중회귀분석결과 3개의 독립변수들 즉 온

Table 1. Coded levels of independent variables for extraction of antioxidants from sporophyll of *U. pinnatifida*.

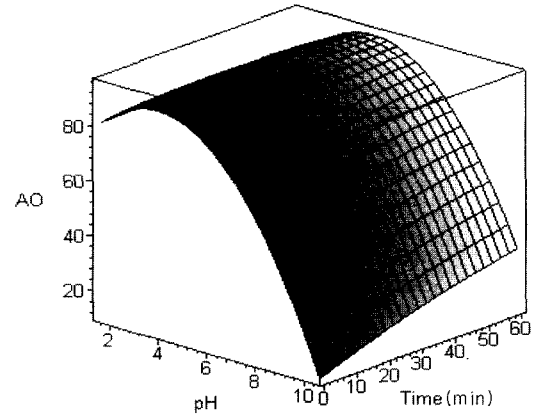
Symbol	Independent variables	Levels				
		-1.414	-1	0	1	1.414
X ₁	Temperature(°C)	3.44	20	60	100	116.56
X ₂	pH	1.76	3	6	9	10.24
X ₃	Time(min)	1.7	10	30	50	58.28

Table 2. Central composite design and response of the dependent variable for extraction of antioxidants from sporophyll of *U. pinnatifida*.

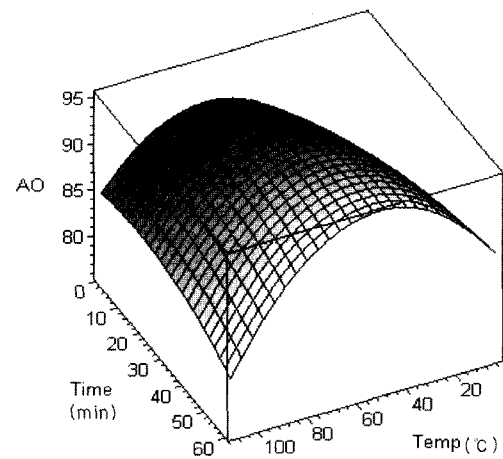
Run No.	Independent			Response
	X ₁	X ₂	X ₃	Y(%)
1	$-\alpha$	0	0	80.5
2	α	0	0	86.0
3	0	$-\alpha$	0	78.7
4	0	0	$-\alpha$	73.0
5	0	α	0	86.2
6	0	0	α	68.5
7	-1	-1	-1	80.6
8	-1	-1	1	80.7
9	-1	1	-1	82.2
10	-1	1	1	85.1
11	1	-1	-1	89.6
12	1	-1	1	80.8
13	1	1	-1	84.5
14	1	1	1	87.0
15	0	0	0	90.7
16	0	0	0	88.2
17	0	0	0	88.5
18	0	0	0	88.7

Table 3. Response surface model for extraction of antioxidants from sporophyll of *U. pinnatifida*.

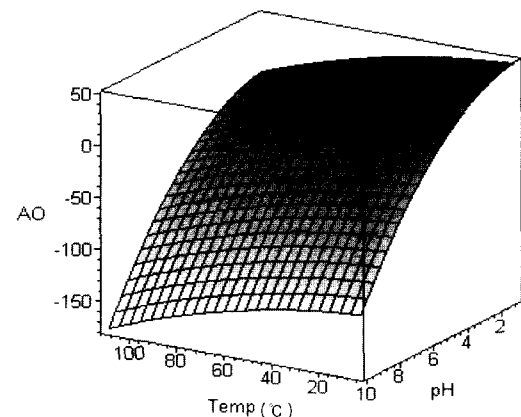
Response	Quadratic polynomial equation	R ²	p value
Antioxidant activity	$Y = 47.038491 + 0.522637X_1$	0.9812	0.0001
	$+14.272673X_2 + 0.105395X_3$		
	$-0.003698X_1^2 - 1.820269X_2^2$		
	$-0.002025X_3^2 - 0.004583X_1X_2$		
	$-0.002219X_1X_3 + 0.046250X_2X_3$		



(A)



(B)



(C)

Fig. 2. Response surface plot for extraction conditions on pH, time, and temperature in extraction of antioxidants from sporophyll of *U. pinnatifida*. Time and pH(A), time and temperature(B), and temperature and pH(C).

도, pH, 처리시간을 조합한 2차 회귀방정식에 대한 R²와 적합결여검증(lack of fit)을 조사한 결과는 Table 3과 같았다. 미역 포자엽의 항산화 효과에 대한 R²는 0.9812, 유의수준 α=0.010에서 기각치 5.91보다 큰 값인 46.30으로, p-value 값이 0.0001에서 유의성이 인정되었으며, 독립변수인 온도, pH, 처리시간 등의 변화에 따른 미역 포자엽의 항산화 효과 (Y)에 대한 반응표면회귀식은 $Y=47.038491+0.522637X_1+14.272673X_2+0.105395X_3-0.003698X_1^2-1.820269X_2^2-0.002025X_3^2-0.004583X_1X_2-0.002219X_1X_3+0.046250X_2X_3$ 로 나타났다. 적합결여검증(P>0.1)에 있어서는 본 실험의 2차식의 설계가 유의함을 나타내었으며, 1차항은 p<0.01에서 유의하였으며 2차항 또한 p<0.01수준에서 유의하였으나, 변수 상호간의 교차항에 있어서는 온도와 pH만이 변수들 간에 유의성이 있는 것으로 나타났다. 실험계획에 따라서 미역 포자엽의 항산화 효과의 최적 조건은 온도 51.55°C, pH 4.2 그리고 처리시간 28.2분에서 가장 높은 항산화능을 나타내었다.

추출물의 독립변수 간 항산화 효과에 미치는 영향

미역 포자엽의 항산화능에 영향을 미치는 두 독립변수 상호간의 상관관계를 알아보기 위해 나머지 다른 한 변수는 zero level에 둔 상태로 3차원 그래프를 도식화한 결과는 Fig. 2와 같았다. pH와 처리시간(treatment time)에 대한 반응표면은 Fig. 2의 (A)와 같았다. pH가 4~6사이에서 처리시간이 증가할수록 항산화 효과가 최대점을 향해 가는 것을 알 수 있으나, pH가 알칼리성쪽으로 갈수록 항산화 효과가 급격히 줄어드는 것을 알 수 있었다. 이는 항산화 효과를 보이는 물질이 약산성에서는 안정적이거나 강알칼리성에서는 항산화 효과를 나타내지 못함으로 알칼리성에서는 불안정한 물질임을 알 수 있었다.

Table 4. Regression coefficients of the second-order polynomial model for the response variable.

Factors	Coefficients
Constant	47.038491
T	0.522637**
pH	14.272673**
t	0.105395
(T) ²	-0.003698**
(pH) ²	-1.820269*
(t) ²	-0.002025
T × pH	0.046250**
T × t	-0.002219
pH × t	0.046250
R ²	0.9812
F	46.30
Probability of F	p<0.0001

Factor : T=temperature(°C); t=time(min).

*p<0.001 **p<0.01

처리시간과 처리온도와의 반응표면은 Fig. 2의 (B)와 같았으며, 50°C~60°C부근에서 항산화 효과가 크게 증가함을 알 수 있었으나 시간과는 큰 상관관계를 나타내지 않았는데, 이는 Table 4에서 보듯이 반응시간과 온도에 대한 상관관계는 다중회귀분석결과 변수 상호간의 교차항의 상관관계가 없음을 보여주고 있다.

반응온도와 pH에 대한 관계에서는 Fig. 2의 (C)에 나타내었으며, pH가 산성으로 갈수록 항산화 효과가 증가하고 있으나, 반응온도는 오히려 낮을수록 항산화 효과가 증가하고 있다. 이는 본 실험에서 디자인한 식은 1차식에서는 처리시간(T)과 pH에 영향을 받았으며, 2차식에서는 처리시간(T)과 pH만 영향을 받았다는 것을 알 수 있었다.

미역 포자엽의 항산화능은 pH에 따라 크게 영향을 받는 것으로 나타나, 미역 포자엽의 항산화물질 추출시 3개의 독립변수 중 가장 중요한 인자임을 확인할 수 있었다.

요 약

미역 포자엽으로부터 항산화물질 생산을 위한 용매를 선정하였으며 반응표면분석법을 사용하여 추출시 최적화조건을 구하여 항산화물질 추출에 미치는 변수들간의 상호관계를 조사하였다. 항산화물질추출에 대한 독립변수로서 처리시간, 처리온도, pH를 각각 1.7분에서 58.3분, 3.4°C에서 116.6°C 그리고 1.8에서 10.2로 5단계로 최적화 실험을 행하였다. 미역 포자엽의 항산화능은 pH가 산성으로 갈수록, 반응온도가 높을수록 항산화 효과가 증가하였으며, 미역포자엽의 항산화물질 추출을 위한 최적 조건은 처리시간 28.2분, 처리온도 51.55°C 그리고 pH 4.2로 나타났다. 또한, 미역 포자엽으로부터 항산화물질 추출을 위한 처리시간, 처리온도, pH의 변수 간 상호관계를 조사한 결과, pH가 미역 포자엽으로부터 항산화물질을 추출하는데 가장 중요한 인자로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 Brain Busan 21사업에 의하여 지원되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Box, G. E. P. and J. S. Hounter. 1957. Multifactor experimental design for exploring response surface. *Ann. Math. Stat.* **28**: 195-242.
2. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **26**: 1199-1200.
3. Cochran, W. G. and G. M. Cox. 1957. *Experimental design*, pp. 335-375. John Wiley & Sons Inc., New York, U.S.A.
4. Etsuo, N., S. Hiroyuki, and M. Makato. 1994. *Antioxidants* :

- free-radicals and biological defense*, pp. 6-8, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan
5. Han, J., S. Kang, R. Choue, H. Kim, K. Leem, S. Chung, C. Kim, and J. Chung. 2002. Free radical scavenging effect of *Diospyros kaki*, *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida*. *Fitoterapia* **73**: 710-712.
 6. Hong, J. S., Y. J. Kwon, Y. H. Kim, M. K. Kim, I. W. Park, and K. H. Kang. 1991. Fatty acid composition of miyeok (*Undaria pinnatifida*) and pare (*Enteromorpha compressa*). *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **20**: 376-380
 7. Ooishi, K. 1993. *Science of Seaweed*. pp. 61-62. Chochang Press, Tokyo, Japan
 8. Koo, J. G. 2001. Biosorption of lead and cadmium by fucoidan from *Undaria pinnatifida*. *J. Kor. Fish. Soc.* **34**: 521-525
 9. Koo, J. G., Y. S. Choi, and J. K. Kwak. 2001. Blood-anticoagulant activity of fucoidan from sporophylls of *Undaria pinnatifida*. *J. Kor. Fish. Soc.* **34**: 515-520
 10. Kwon, E. J., Y. C. Kim, M. S. Kwon, C. S. Kim, W. W. Kang, J. B. Lee, and S. K. Chung. 2001. Antioxidative activity of solvent fraction and isolation of antioxidative compounds from chestnut husk. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **30**: 726-731
 11. Lim S. N., P. C. K. Cheung, V. E. C. Ooi, and P. O. Ang. 2002. Evaluation of antioxidant of extract from a brown seaweed, *Sargassum siliuastrum*. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 3862-3866.
 12. Nam, S. H., S. M. Chang, and M. Y. Kang. 2003. Variated difference in antioxidative activity of ethanol extracts from colored rice bran. *J. Kor. Soc. Chem. Biotechnol.* **46**: 10-22.
 13. Osborn-Barnes H. T. and C. C. Akoh. 2003. Effects of α -tocopherol, β -carotene, and isoflavones on lipid oxidation of structured lipid-based emulsions. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 6856-6860.
 14. Smith, K. L. and J. L. Harwood. 1984. Lipid and lipid metabolism in the brown alga. *Phytochemistry* **23**: 2469.
 15. Sopheak, S. and L. Betty. 2002. Free radical scavenging activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 468-472.
 16. Zamora, R., M. Alaiz, and F. J. Hidalgo. 2001. Influence of cultivar and fruit ripening on olive (*Olea europaea*) fruit protein content, composition, and antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 4267-4270.

(Received Sep. 8, 2004/Accepted Nov. 8, 2004)