

반응표면분석에 의한 유자씨 에탄올 추출물의 항산화활성

우관식² · 정지영¹ · 황인국¹ · 이윤정¹ · 이연리¹ · 박희정³ · 박의석⁴ · 정현상^{1*}

¹충북대학교 식품공학과, ²농촌진흥청 국립식량과학원
³농촌진흥청, ⁴(주)미드미

Antioxidant Activity of Ethanol Extraction on Citron Seed by Response Surface Methodology

Koan Sik Woo², Ji Young Jeong¹, In Guk Hwang¹, Yoon Jeong Lee¹, Youn Ri Lee¹,
Hee-Jeong Park³, Eui Seok Park⁴, and Heon Sang Jeong^{1*}

¹Dept. of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Korea

²National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Gyeonggi 441-857, Korea

³Rural Development Administration, Gyeonggi 441-857, Korea

⁴Metome Food Co. Ltd., Chungbuk 363-883, Korea

Abstract

Extraction characteristics of citron (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka) seeds and functional properties of corresponding extract were monitored by response surface methodology (RSM). Maximum extraction yield of 20.23% was obtained at extraction temperature of 50.23°C, extraction time of 3.03 hr, and shaking velocity of 400.06 rpm. At extraction temperature, extraction time, and shaking velocity of 49.88°C, 2.72 hr, and 400.39 rpm, respectively, maximum polyphenol content was 4.37 mg/g. At extraction temperature, extraction time, and shaking velocity of 50.28°C, 3.42 hr, and 399.96 rpm, respectively, maximum electron donating ability (EDA) was 49.69%. Maximum nitrite scavenging activity (NSA) was 47.79% at extraction temperature, extraction time, and shaking velocity of 49.19°C, 0.68 hr, and 602.95 rpm, respectively. Based on superimposition of 3-dimensional RSM with respect to extraction yield, polyphenol, EDA, and NSA, optimum ranges of extraction conditions were extraction temperature of 50°C, extraction time of about 3 hr, and shaking velocity of 400 rpm.

Key words: citron (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka) seeds, polyphenol, DPPH radical scavenging activity, response surface methodology (RSM)

서 론

유자(*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka)는 우리나라, 중국, 일본을 비롯해 동북아시아에서 생산되는 감귤류 중에 하나이다(1). 특히 우리나라에서는 독특한 풍미와 찬 성질로 음료나 약초로 이용되고 있으며, 성숙도에 따라 표면이 거칠고 황색 또는 녹색을 띠고 자몽과 비슷한 특이하고 자극적인 풍미는 우리나라 사람들에게 아주 인기가 높은 과일이다(2-4). 유자는 감기 등에 효과가 있다고 알려져 있으며, 우리나라에서는 유자 과피를 잘게 잘라 설탕이나 꿀에 재워 겨울철에 차로 음용하고 있어 대부분의 유자는 과육과 과피만 이용되고 있는 실정이다.

유자에 대한 연구를 살펴보면 유자씨 중의 apigenin, naringenin, hesperidin 및 nobiletin 등과 같은 플라보노이드는 대장암 치료효과가 있다고 보고하였으며(5), 유자오일에 함

유되어 있는 limonene, g-terpinene 및 myrcene 등과 같은 monoterpene hydrocarbon류의 휘발성분에 대한 연구(6), 유자 과피 오일의 독특한 방향성분이 6-methyl-5-hepten-2-ol 및 dimethyl trisulfide임을 확인한 연구(7), 일본산 유자씨에 함유된 limonoid를 분석한 연구(8) 등이 진행되었다. 유자씨에는 bioflavonoid와 limonoid 등의 유효성분을 포함하고 있으며, bioflavonoid는 flavonoid에 속하는 flavanone으로서 hesperidin, naringin, neohesperidin, quercetin, erio-citrin, narirutin, nobiletin 및 tangeretin 등이 알려져 있다(9). Bioflavonoid의 대표 성분인 hesperidin과 naringin은 항산화효과(10), 발암개시작용 억제효과(11,12), 혈압저하 및 이뇨효과(13), 항균효과(14) 등이 있는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 유자씨의 유효성분과 생리활성 등에 대한 연구는 많이 진행되고 있으나 유자 중 10%에 상당하는 유자씨를 활용하기 위한 유효성분의 추출조건에 대한 연구는 미비한

*Corresponding author. E-mail: hsjeong@chungbuk.ac.kr
Phone: 82-43-261-2570, Fax: 82-43-271-4412

실정이다.

따라서 본 연구에서는 유자제품 제조 시 부산물로 폐기되고 있는 유자씨를 식품소재로 활용할 수 있는 기초 자료로 제공하고자 유자씨의 유용성분 추출을 위한 최적조건을 반응표면분석법을 통해 살펴보았으며, 추출물에 대한 총 폴리페놀 함량과 DPPH 라디칼소거활성 및 아질산염소거활성을 분석하였다.

재료 및 방법

시료 및 추출

본 실험에 사용한 유자는 전라남도 고흥에서 2007년 10월에 수확된 것으로 (주)미드미에서 가공부산물로 얻어진 유자씨를 제공받아 수세한 후 수분함량 10%로 건조하여 -20°C의 냉동고에 보관하면서 사용하였다. 유자씨는 분쇄기로 분쇄하여 18 mesh 체를 통과시켜 균일한 입자 크기로 만들어 추출에 사용하였으며, 지용성 성분을 제거하기 위하여 5배량의 hexane을 가하여 3시간 동안 환류추출하고 남은 잔사를 50°C의 진공건조기(Townson Mercer Ltd., Manchester, UK)에서 건조하여 용매를 완전히 제거한 후 추출시료로 사용하였다. 추출은 전보(15)에서 결정된 60% ethanol을 탈지된 시료에 20배량 가하여 추출하였다. 추출이 끝난 후 advantec 5C(Advantec Toyo Kaisha Ltd., Tokyo, Japan) 여과지를 사용하여 여과하였다. 각 조건에서 얻어진 추출물의 수율은 회전진공농축기(Eyela N-1000, Tokyo, Japan)를 사용하여 40°C에서 감압농축한 후 진공건조기로 용매를 완전히 제거한 다음 중량법으로 측정하였다. 제조된 추출물은 유용성분의 손실을 방지하기 위하여 -20°C에서 보관하면서

실험에 사용하였다.

추출 조건

유자씨로부터 유용성분의 추출은 추출온도(30~70°C; X_1), 추출시간(1~5 hr; X_2) 및 교반속도(200~600 rpm; X_3)를 변수로 하여 중심합성계획법에 따라 실험설계를 하였다. 독립변수(X_n)는 Table 1과 같이 5단계로 부호화하여 설정하였다. 각각의 추출조건에서의 종속변수(Y_n)는 추출 수율(Y_{yield}), 총 polyphenol 함량($Y_{polyphenol}$), DPPH에 의한 EDA(Y_{EDA}) 및 아질산염소거활성(Y_{NSA})으로 하였고, 독립변수와 종속변수간의 관계를 조사하였다.

총 폴리페놀 화합물

처리조건별 유자씨 추출물의 총 폴리페놀 함량은 Dewanto 등(16)의 방법에 따라 Folin-Ciocalteu phenol reagent가 추출물의 폴리페놀성 화합물에 의해 환원된 결과 몰리브덴 청색으로 발색하는 것을 원리로 분석하였다. 즉, 각 추출물 100 μ L에 2% Na_2CO_3 용액 2 mL를 가한 후 3분간 방치하여 50% Folin-Ciocalteu reagent(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 100 μ L를 가하였다. 30분 후 반응액의 흡광도 값을 750 nm에서 측정하였고, 표준물질인 garlic acid(Sigma-Aldrich)를 사용하여 검량선을 작성하였으며, 총 폴리페놀 함량은 시료 g 중의 mg garlic acid로 나타내었다.

DPPH radical 소거활성 측정

처리조건별 유자씨 추출물의 DPPH radical 소거활성은 Choi 등(17)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 0.1 mM DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich) 용액(99.9% methanol에 용해) 0.8 mL에 시료 0.2 mL를 첨가한

Table 1. Extraction yields, polyphenol contents, electron donating ability (EDA), and nitrite scavenging activity (NSA) of citron seed by the central composite experimental design for response surface analysis

Exp. No. ¹⁾	Independent variables			Response variables			
	Extraction temp. (°C)	Extraction time (hr)	Shaking velocity (rpm)	Yields (%)	Polyphenol (mg/g)	EDA (%)	NSA (%)
1	30 (-2)	3 (0)	400 (0)	19.22±0.56 ^{2(d3)}	4.63±0.24 ^{cdef}	43.04±1.10 ^d	40.72±0.85 ^f
2	40 (-1)	2 (-1)	300 (-1)	19.47±0.56 ^{cd}	4.57±0.47 ^{cdef}	43.40±3.93 ^d	41.61±1.10 ^f
3	40 (-1)	2 (-1)	500 (+1)	19.72±0.40 ^{cd}	4.93±0.37 ^{abcd}	44.29±2.16 ^{cd}	42.81±1.34 ^{def}
4	40 (-1)	4 (+1)	300 (-1)	19.74±0.14 ^{cd}	4.58±0.80 ^{cdef}	46.49±5.49 ^{cd}	41.84±2.11 ^{ef}
5	40 (-1)	4 (+1)	500 (+1)	19.83±0.33 ^{abcd}	5.03±0.08 ^{abc}	46.65±4.77 ^{cd}	44.77±1.19 ^{de}
6	50 (0)	1 (-2)	400 (0)	20.13±0.14 ^{abcd}	4.83±0.40 ^{bcde}	48.26±2.99 ^{abcd}	51.22±1.11 ^{bc}
7	50 (0)	3 (0)	200 (-2)	20.29±0.32 ^{abcd}	4.23±0.08 ^{def}	47.43±4.96 ^{abcd}	51.74±0.89 ^{bc}
8	50 (0)	3 (0)	400 (0)	20.31±0.21 ^{abcd}	4.19±0.37 ^{ef}	49.36±5.41 ^{abcd}	52.49±0.87 ^b
9	50 (0)	3 (0)	600 (+2)	20.20±0.56 ^{abcd}	4.43±0.17 ^{cdef}	45.15±2.79 ^{cd}	52.21±1.47 ^b
10	50 (0)	5 (+2)	400 (0)	21.49±0.80 ^a	4.28±0.18 ^{gdef}	52.02±2.20 ^{abc}	48.78±3.57 ^c
11	60 (+1)	2 (-1)	300 (-1)	21.05±0.90 ^{ab}	5.67±0.47 ^a	56.02±6.45 ^a	50.92±1.52 ^{bc}
12	60 (+1)	2 (-1)	500 (+1)	20.69±0.38 ^{abc}	4.56±0.42 ^{cdef}	55.59±6.62 ^{ab}	50.36±2.10 ^{bc}
13	60 (+1)	4 (+1)	300 (-1)	20.35±1.08 ^{abcd}	4.03±0.41 ^f	47.48±4.04 ^{abcd}	64.56±1.27 ^a
14	60 (+1)	4 (+1)	500 (+1)	19.77±0.55 ^{cd}	4.92±0.26 ^{abcd}	48.36±4.37 ^{abcd}	62.37±2.08 ^a
15	70 (+2)	3 (0)	400 (0)	19.43±0.60 ^{cd}	5.43±0.08 ^{ab}	48.36±3.26 ^{abcd}	45.70±1.76 ^d

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

²⁾Results were expressed as the average of triplicate samples with mean±SD.

³⁾Any means in the same column followed by the same letter are not significantly ($p<0.05$) different by Duncan's multiple range test.

후, 520 nm에서 정확히 60분 후에 흡광도 감소치를 측정하였다. DPPH radical 소거활성은 전자공여능(electron donating ability, EDA)으로 표현하였으며, 흡광도를 측정할 때 셀에 분주되는 각 시료에 의한 흡광도의 차이는 methanol만의 흡광도를 측정하여 보정해 주었고, 이때 시료 첨가구와 비첨가구의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

아질산염소거활성(nitrite scavenging activity) 측정

각각의 추출 조건에서 추출된 시료의 아질산염소거활성은 Kato 등(18)의 방법에 따라 시료의 1 mL에 1 mM 아질산나트륨(Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan) 용액 1 mL를 가한 후, 0.1 N HCl 완충액 및 0.2 M 구연산 완충용액으로 각각 반응용액을 pH 1.2로 조정해 다음 반응용액의 총 부피를 10 mL로 하였다. 이 용액을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 각 반응액 1 mL를 취하여 2% 초산용액 5 mL, 30% 초산용액으로 조제한 Griess 시약 0.5 mL를 차례로 가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 15분간 방치시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산 양을 산출하였다. 아질산염소거활성은 시료의 첨가 전과 후에 잔존하는 아질산염의 백분율(%)로써 나타내었다.

통계분석

모든 데이터는 3회 반복 측정하였으며, mean±SD로 표현하였다. 또한 각각의 추출조건에서 얻어진 결과를 통계프로그램(Statistical Analysis System; version 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA)을 이용하여 추출변수가 추출물의 수율 및 성분의 변화에 미치는 영향을 분석하였다.

결과 및 고찰

추출수율

추출조건에 따른 유사씨 추출물의 추출수율을 측정해 본 결과 Table 1과 같다. 추출수율은 추출온도 30°C, 추출시간 3시간 그리고 교반속도 400 rpm에서 19.22%로 가장 낮았으며, 50°C, 5시간 및 400 rpm 추출에서 21.49%로 가장 높았지만 추출조건에 따라 큰 차이는 없었다. 각각의 변수가 추출수율에 미치는 영향을 분석한 결과 Table 2와 같이 추출온도(sum of square: 7.31)의 영향이 추출시간(sum of square:

Table 2. Analysis of variance for yield, polyphenol, electron donating ability (EDA), and nitrite scavenging activity (NSA) of extracts on citron seed

	Factor	df	Sum of squares	F-value
Yield	Extraction temperature (X ₁)	4	7.31	3.00*
	Extraction time (X ₂)	4	2.72	1.12
	Shaking velocity (X ₃)	4	2.31	0.95
Poly-phenol	Extraction temperature (X ₁)	4	37,804	5.11**
	Extraction time (X ₂)	4	37,600	5.08**
	Shaking velocity (X ₃)	4	22,899	3.11*
EDA	Extraction temperature (X ₁)	4	470.06	6.02***
	Extraction time (X ₂)	4	172.42	2.21
	Shaking velocity (X ₃)	4	30.26	0.39
NSA	Extraction temperature (X ₁)	4	1,292.41	17.56***
	Extraction time (X ₂)	4	324.99	4.42**
	Shaking velocity (X ₃)	4	19.68	0.27

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

2.72)이나 교반속도(sum of square: 2.31)보다 큰 것으로 나타났으며, 추출온도에 대한 F-value는 3.00(p<0.05)으로 유의적으로 영향을 미치고 있지만 추출시간 및 교반속도의 F-value는 각각 1.12 및 0.95로 유의성이 없는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 60°C까지는 추출온도가 증가할수록 수율이 증가하는 경향을 보였으나 그 이후에는 추출온도가 증가함에 따라 추출수율은 오히려 감소되는 경향을 나타내었다. 또한 동일 온도에서 비교해 봤을 때 추출시간이 길어질수록, 교반속도가 증가할수록 50°C까지는 추출수율이 증가하는 경향을 보였으나 60 및 70°C에서는 거의 일정하거나 약간 감소하는 경향을 보였다. 이는 추출온도가 높을수록 열에 의해 용출성분이 파괴되어 나타나는 현상으로 보이며, 이에 대한 성분 연구가 필요할 것으로 보인다. 추출수율에 대한 최적추출조건을 통계적으로 구한 결과를 보면(Table 3) 추출온도, 추출시간 및 교반속도가 각각 50.23°C, 3.03시간 및 400.06 rpm이었으며, 이때의 추출수율은 20.23%로 예측되었다. 추출온도에 따라 가용성 고형분의 함량이 증가하고, 낮은 추출온도에서는 추출시간이 증가할수록 가용성 고형분 함량이 증가한다는 Kang 등(19)의 보고와 유사하나, 동충하초 열수추출공정에서 추출온도에 영향을 받지 않는다는 Youn 등(20)의 결과와는 상이하게 나타났다.

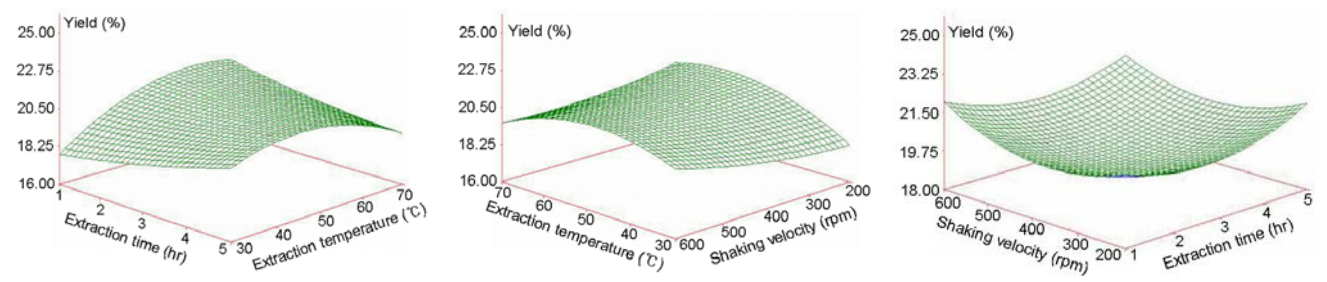


Fig. 1. Response surface for the effects of extraction conditions on yield of citron seed.

Table 3. Predicted levels of extraction condition for the maximum responses of variables by the ridge analysis

Response variables	Independent variables ¹⁾			Maximum	Morphology
	X ₁	X ₂	X ₃		
Extraction yield (%)	50.23	3.03	400.06	20.23	Saddle point
Polyphenol (mg/g)	49.88	2.72	400.39	4.37	Saddle point
Electron donating ability (%)	50.28	3.42	399.96	49.69	Saddle point
Nitrite scavenging activity (%)	49.19	0.68	602.95	47.79	Saddle point

¹⁾X₁, extraction temperature (°C); X₂, extraction times (hr); X₃, shaking velocity (rpm).

총 폴리페놀 함량

각각의 추출조건에 따른 총 폴리페놀 함량을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 추출물의 총 폴리페놀 함량은 추출온도 60°C, 추출시간 4시간 그리고 교반속도 300 rpm에서 4.03 mg/g으로 가장 낮았으며, 60°C, 2시간 그리고 300 rpm 추출에서 5.67 mg/g으로 가장 높게 나타나 추출조건에 따라 약간의 차이를 보였다. 소국(21) 및 팽이버섯(22)의 에탄올 추출물에서 에탄올의 농도가 높을수록 총 페놀성 화합물의 함량이 증가하는 것으로 보고하였고, Kim 등(23)은 계피의 경우 70% 에탄올 추출물에서 총 폴리페놀 함량이 가장 높다고 보고하였으며, Choi 등(24)은 페놀성 화합물의 함량이 에탄올 농도가 낮을수록, 시료 용매비가 높을수록 그 함량이 증가하는 것으로 보고하였는데 에탄올의 농도보다는 시료 용매비에 더 큰 영향을 받는다고 보고하였으나 본 연구에서는 예비실험을 통하여 에탄올 농도와 용매량을 선정하여 추출 온도, 시간, 교반속도를 변수로 추출하였기 때문에 각 처리구간 별 폴리페놀 함량에 유의적인 차이가 크지 않은 것으로 생각된다. 각각의 변수가 총 폴리페놀의 추출에 미치는 영향을 분석한 결과 추출온도(sum of square: 37,804) 및 추출시간(sum of square: 37,600)의 영향이 교반속도(sum of square: 22,899)보다 큰 것으로 나타났으며, 추출온도 및 시간에 대한 F-value는 5.11 및 5.08(p<0.01)이었으며, 교반속도의 F-value는 3.11(p<0.05)로 유의성이 높게 나타났다 (Table 2). 반응표면분석 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 추출온도, 추출시간 및 교반속도가 증가할수록 총 폴리페놀 함량은 증가하는 경향을 나타내었다. 총 폴리페놀 함량에 대한 최적추출조건을 통계적으로 산출한 결과(Table 3) 추출온도, 추출시간 및 교반속도는 각각 49.88°C, 2.72시간, 400.39 rpm이었으며, 이때의 총 폴리페놀 함량은 4.37 mg/g으로 예측되었다.

DPPH radical 소거활성

천연물의 전자공여능은 활성 radical에 전자를 공여하고 식품 중의 지방질 산화를 억제하는 특성을 가지고 있고 인체 내에서는 활성 radical에 의한 노화를 억제시키는 역할을 하고 있으며, radical 소거작용은 인체의 질병과 노화를 방지하는데 대단히 중요한 역할을 한다(25). 추출조건에 따른 유자씨 추출물의 DPPH radical 소거활성을 측정된 결과는 Table 1과 같다. 추출물의 DPPH radical 소거활성은 추출온도 30°C, 추출시간 3시간 그리고 교반속도 400 rpm에서 43.04%로 가장 낮았으며, 60°C, 2시간 및 300 rpm 추출에서 56.02%로 가장 높게 나타났다. DPPH radical 소거활성은 60°C 이후 추출시간이 증가할수록, 교반속도가 빠를수록 감소되는 경향을 나타내었다. 이는 유자씨의 항산화 효과를 나타내는 화합물들이 온도에 의한 영향을 받는 것으로 생각되며, Yoo 등(26)이 미역 포자엽의 항산화물질 추출 조건에서 30°C에서 115°C까지 진탕 추출한 결과 50~60°C 부근에서 항산화 활성 가장 높다는 보고와 유사한 경향을 보였다. 각 변수별로 DPPH radical 소거활성에 미치는 영향을 분석한 결과 Table 2와 같이 추출온도(sum of square: 470.06)의 영향이 추출시간(sum of square: 172.42)이나 교반속도(sum of square: 30.26)보다 큰 것으로 나타났으며, 추출온도에 대한 F-value는 6.02(p<0.001)로 고도의 유의성이 있었으나 추출시간(F-value: 2.21) 및 교반속도(F-value: 0.39)는 유의성이 없는 것으로 나타났다. 반응표면분석 결과 Fig. 3과 같이 추출온도가 증가함에 따라 DPPH radical 소거활성은 증가하는 경향을 보였으며, 30~50°C의 온도에서 추출시간이 증가함에 따라 항산화활성이 증가하는 것으로 나타났고 동일한 온도에서 교반속도 400 rpm까지는 항산화활성이 증가하는 것으로 나타났다. DPPH radical 소거활성에 대한 최적추출조건을 통계적으로 산출한 결과(Table 3) 추출온도 50.28°C,

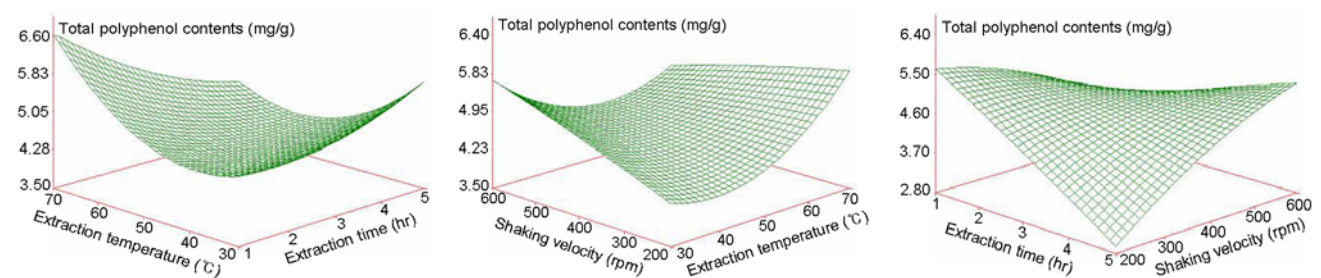


Fig. 2. Response surface for the effects of extraction conditions on polyphenol contents of citron seed.

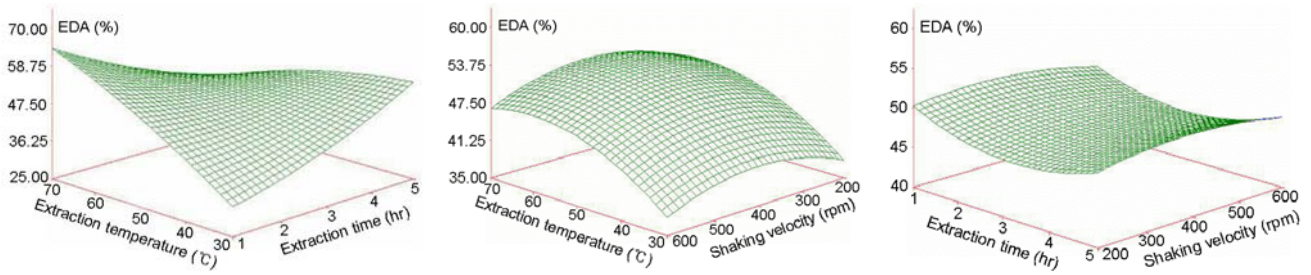


Fig. 3. Response surface for the effects of extraction conditions on EDA of citron seed.

추출시간 3.42시간 및 교반속도 399.96 rpm으로 나타났으며, 이때의 항산화활성은 49.69%로 예측되었다.

아질산염소거활성

아질산염은 체내 암의 발생과 관련된 대표적인 물질로서 산성 조건 하에서 아질산 이온이 되거나 양이온과 반응하여 nitrous acid를 형성하게 되고 이들로부터 생성되는 nitrous anhydride와 강산성 조건 하에서 생성되는 nitrous acidium ion이나 nitrosonium ion으로 전환되어 강력한 니트로화 물질이 됨으로써 체내에서 발암물질인 N-nitrosamine의 전구 물질이 된다(27). 따라서 아질산염소거활성은 pH 1.2의 반응조건에서 시료의 첨가 전후에 잔존하는 아질산염의 백분율(%)으로써 유사씨의 추출조건별 아질산염소거활성을 측정 한 결과 Table 1과 같이 시료 10 mg/mL의 농도에서 40.72~64.56%의 범위를 나타내었다. 가장 높은 아질산염소거활성은 60°C, 4시간 및 300 rpm 조건에서 64.56%이었다. Kurechi 등(28)은 일본산 무즙의 아질산염소거활성은 시료 중에 함유된 phenol 화합물의 영향인 것으로 보고하였으며, Kim 등(29) 또한 야채 추출물의 아질산염소거활성은 야채류에 존재하는 비타민 C, 페놀 화합물 등과 상관관계가 높은 것으로 보고하였는데 본 연구에서는 폴리페놀 함량이 높은 50°C, 5시간, 400 rpm 처리(21.49 mg/g)와 60°C, 2시간, 300 rpm 처리(21.05 mg/g)에서는 아질산염소거활성이 낮게 나타났고 활성이 높게 나타난 60°C, 4시간, 300 rpm 처리(64.56%) 및 500 rpm 처리(62.37%)는 폴리페놀 함량이 각각 20.35 및 19.77 mg/g을 보여 유사씨에서는 폴리페놀 성분 이외에 다른 성분의 영향에 의한 것으로 보이며 이에 대한

연구가 필요할 것이다. 각각의 변수가 아질산염소거활성에 미치는 영향을 분석한 결과 Table 2와 같이 추출온도(sum of square: 1,292.41)의 영향이 추출시간(sum of square: 324.99)이나 교반속도(sum of square: 19.68)보다 큰 것으로 나타났으며, 추출온도 및 추출시간에 대한 F-value는 17.56 (p<0.001) 및 4.42(p<0.01)로 유의성이 높은 것으로 나타났으나 교반속도(F-value: 0.27)는 유의성이 없는 것으로 나타났다. 반응표면분석 결과 Fig. 4와 같이 60°C까지 추출온도가 증가함에 따라 아질산염소거활성은 증가하는 경향을 보였으며, 추출시간이 증가함에 따라 활성이 감소하는 경향을 보였다. 아질산염소거활성에 대한 최적추출조건을 통계적으로 계산한 결과(Table 3) 추출온도 49.19°C, 추출시간 0.68시간 및 교반속도 602.95 rpm으로 이때의 활성은 47.79%로 예측되었다.

최적 추출조건 선정

추출조건에 따른 유사씨 추출물의 추출수율, 총 폴리페놀 함량, DPPH radical 소거활성 및 아질산염소거활성을 측정하여 최적 조건을 통계적으로 산출한 결과 Table 3과 같이 추출수율은 추출온도, 추출시간 및 교반속도가 각각 50.23°C, 3.03시간 및 400.06 rpm이었으며, 총 폴리페놀 함량은 각각 49.88°C, 2.72시간, 400.39 rpm, DPPH radical 소거활성은 각각 50.28°C, 3.42시간, 399.96 rpm, 아질산염소거활성은 각각 49.19°C, 0.68시간, 602.95 rpm으로 나타났다. 이상의 결과를 바탕으로 유사씨 추출물의 항산화활성을 위한 최적 조건을 도출한 결과 추출온도, 추출시간 및 교반속도가 각각 50°C, 3시간, 400 rpm로 결정하였으며, 이 조건에서 추출물을 제조

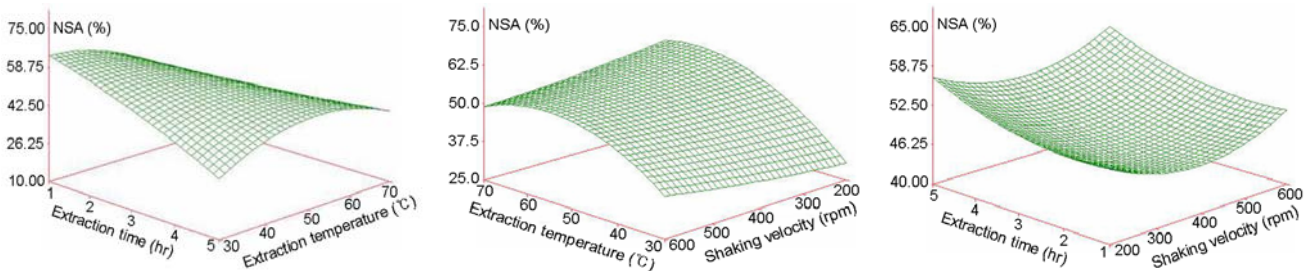


Fig. 4. Response surface for the effects of extraction conditions on nitrite scavenging activity (NSA) of citron seed.

Table 4. Predicted values of response variables at a given condition¹⁾ within the range of optimum extraction conditions

Responses variables	Predicted values
Extraction yield (%)	20.31
Polyphenol contents (mg/g)	4.22
EDA (%)	49.54
Nitrite scavenging ability (%)	44.30

¹⁾Extraction temperature 50°C, extraction time 3 hr, and shaking velocity 400 rpm.

하여 추출수율, 총 폴리페놀 함량, DPPH radical 소거활성 및 아질산염소거활성을 측정된 결과 Table 4와 같이 각각 20.31%, 4.22 mg/g, 49.54% 및 44.30%로 나타났다. 추출수율, 총 폴리페놀 함량, DPPH radical 소거활성은 예측값과 큰 차이를 보이지 않았으나 아질산염소거활성은 예측값과 차이를 보였는데 이는 통계적인 추출조건(49.19°C, 0.68시간 및 602.95 rpm)과 최적 추출조건(50°C, 3시간, 400 rpm)의 차이에 의해 발생한 오차로 생각된다.

요 약

유자씨 추출물의 항산화성분 및 항산화활성에 대한 최적 추출조건을 선정하기 위하여 추출온도(30~70°C; X₁), 추출시간(1~5시간; X₂) 및 교반속도(200~600 rpm; X₃)를 독립변수로 추출된 추출물의 추출수율, 총 polyphenol 함량, DPPH radical 소거활성 및 아질산염소거활성을 측정하였다. 추출수율의 최적조건은 추출온도, 추출시간 및 교반속도 각각 50.23°C, 3.03시간, 400.06 rpm으로 최대 20.23%로 예측되었으며, 총 폴리페놀 함량의 최적조건은 49.88°C, 2.72시간 및 400.39 rpm으로 최대 4.37 mg/g으로 예측되었다. DPPH radical 소거활성은 각각 50.28°C, 3.42시간 및 399.96 rpm으로 최대 49.69%로 예측되었으며, 아질산염소거활성은 추출온도, 추출시간 및 교반속도 각각 49.19°C, 0.68시간 및 602.95 rpm으로 최대 47.79%로 예측되었다. 이상의 결과를 바탕으로 유자씨 추출물의 항산화활성을 위한 최적 조건은 추출온도, 추출시간 및 교반속도가 각각 50°C, 3시간, 400 rpm로 결정하였으며, 이 조건에서 추출물을 제조하여 추출수율, 총 폴리페놀 함량, DPPH radical 소거활성 및 아질산염소거활성을 측정된 결과 각각 20.31%, 4.22 mg/g, 49.54% 및 44.30%로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 지방대학혁신역량강화(New University for Regional Innovation; NURI)사업의 일환으로 진행된 연구의 일부로 연구비를 지원하여 주신 (주)미드미와 바이오산업전문인력양성사업단에 감사드립니다.

문 헌

- Shinoda N, Shiga M, Nishimura K. 1970. Constituents of yuzu (*Citrus junos*) oil. *Agric Biol Chem* 34: 234-242.
- Jeong JW, Lee YC, Lee KM, Kim IH, Lee MS. 1998. Manufacture condition of oleoresin using citron peel. *Korean J Food Sci Technol* 30: 139-145.
- Song HS, Sawamura M, Ito T, Ukeda H. 1999. Chemical compositions of the volatile part of yuzu (*Citrus junos* Tanaka) peel cold-pressed oils from Japan and Korea. *Flavour Frag J* 14: 383-389.
- Choi I, Choi S, Nam B, Kim Y, Choi H. 2008. Contents of polyphenols and limonoids in citron (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka) seed extracts and their antioxidant properties. *Food Sci Biotechnol* 17: 373-378.
- Bocco A, Cuvelier A, Richard H, Berset C. 1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *J Agric Food Chem* 46: 2123-2129.
- Njoroge SM, Ukeda H, Sawamura M. 1996. Changes in the volatile composition of yuzu (*Citrus junos* Tanaka) cold-pressed oil during storage. *J Agric Food Chem* 44: 550-556.
- Song HS, Sawamura M, Ito T, Kawashimo K, Ukeda H. 2000. Quantitative determination and characteristic flavour of *Citrus junos* (yuzu) peel oil. *Flavour Frag J* 15: 245-250.
- Hashinaga F, Herman Z, Hashegawa S. 1990. Limonoids in seeds of yuzu (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka). *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 37: 380-382.
- Jeong JY. 2008. Optimization of extraction conditions for limonin and nomilin in citron seed. *MS Thesis*. Chungbuk National University, Cheongju, Korea.
- Miyake Y, Yammamoto K, Tsujihara N, Osawa T. 1998. Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats. *Lipids* 33: 689-695.
- Berkarda B, Koyuncu H, Soybir G, Baycut F. 1998. Inhibitory effect of hesperidin on tumour initiation and promotion in mouse skin. *Res Exp Med* 198: 93-99.
- Calomme M, Pieters L, Vlietinck A, Vanden BD. 1996. Inhibition of bacterial mutagenesis by citrus flavonoids. *Planta Med* 62: 222-226.
- Galati EM, Trovato A, Kirjavainen S, Forestieri AM, Eossitto A, Monforte MT. 1996. Biological effects of hesperidin, A citrus flavonoid (note III): Antihypertensive and diuretic activity in rat. *Farmacologia* 51: 219-221.
- Basile A, Sorbo S, Giordano S, Ricciardi L, Ferrara S, Montesano D, Castaldo Cobianchi R, Vuotto ML, Ferrara L. 2000. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. *Fitoterapia* 71: S110-S116.
- Jeong JY, Woo KS, Hwang IG, Lee YR, Jeong HS. 2008. Optimization of extraction conditions for limonin and nomilin in citron seed. *Korean J Food Sci Technol* 40: 540-544.
- Dewanto V, Xianzhong W, Liu RH. 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50: 4959-4964.
- Choi Y, Lee SM, Chun J, Lee HB, Lee J. 2006. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chem* 99: 381-387.
- Kato H, Lee IE, Chuyen NV, Kim SB, Hayase F. 1987. Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric Biol Chem* 51: 1333-1338.
- Kang KC, Park JH, Back SB, Jhin HS, Rhee KS. 1992. Optimization of beverage preparation from *Schizandra chinensis* Baillon by response surface methodology. *Korean J Food Sci Technol* 24: 74-81.

20. Youn KS, Jeong YJ, Lee GD, Shin SR, Ku JG. 2002. Optimization for hot water extraction process of *Cordyceps militaris* using response surface methodology. *Korean J Food Preserv* 9: 184-188.
21. Park NY, Kwon JH, Kim HK. 1998. Optimization of extraction conditions for ethanol extracts from *Chrysanthemum morifolium* by response surface methodology. *Korean J Food Sci Technol* 30: 1189-1196.
22. Kim HK, Kim MO, Choi MG, Kim KH. 2003. Optimization of microwave extraction conditions for *Flammulina velutipes* by response surface methodology. *Korean J Food Sci Technol* 35: 222-228.
23. Kim NM, Yang JW, Kim WJ. 1993. Effect of ethanol concentration on index components and physicochemical characteristics of cinnamon extracts. *Korean J Food Sci Technol* 15: 282-287.
24. Choi MA, Park NY, Woo SM, Jeong YJ. 2003. Optimization of extractions from *Hericium erinaceus* by response surface methodology. *Korean J Food Sci Technol* 35: 777-782.
25. Kim SM, Cho YS, Sung SK. 2001. The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts. *Korean J Food Sci Technol* 33: 626-632.
26. Yoo MY, Kim KH, Lee KJ, Kim SK, Yang JY. 2004. Optimization of extraction conditions of antioxidants from sporophyll of *Undaria pinnatifida* by response surface methodology. *Korean J Microbiol Biotechnol* 32: 317-321.
27. Fan TY, Tannenbaum SR. 1973. Factors influencing the rate of formation of nitrosomorpholine from morpholine and nitrite; acceleration by thiocyanate and other anions. *J Agric Food Chem* 21: 237-240.
28. Kurechi T, Kikugawa K, Fukuda S. 1980. Nitrite-reacting substances in Japanese radish juice and their inhibition of nitrosamine formation. *J Agric Food Chem* 28: 1265-1269.
29. Kim DS, Ahn BW, Yeun DM, Lee DH, Kim SB, Park YH. 1987. Degradation of carcinogenic nitrosamine formation factor by natural food components 1. Nitrite scavenging effects of vegetable extracts. *Bull Korean Fish Soc* 20: 463-468.

(2008년 12월 18일 접수; 2009년 2월 7일 채택)