

미강의 γ -oryzanol 및 생리활성물질의 에탄올 추출공정 최적화

조인희 · 최용희[†]
경북대학교 식품공학과

Optimization of Ethanol Extraction of γ -Oryzanol and Other Functional Components from Rice Bran

In-Hee Jo and Yong-Hee Choi[†]

Department of Food Science & Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Abstract

We determined the optimum ethanolic conditions for extraction of γ -oryzanol and other functional components from rice bran, using response surface methodology (RSM). A central composite design was used to investigate the effects of the independent variables of solvent ratio (X_1), extraction temperature (X_2), and extraction time (X_3), on dependent variables including yield (Y_1), total phenolic content (Y_2), electron-donating activity (Y_3), ferulic acid level (Y_4), and γ -oryzanol concentration (Y_5). Solvent ratio and extraction temperature were the most important factors in extraction. The maximum yield was at 22.56 mL/g (X_1), 78.19°C (X_2), and 522.15 min (X_3), at the saddle point. Total phenolic levels were little affected by solvent ratio or extraction temperature. The maximum concentration of extracted total phenolics was 90.78mg GAE/100 g at 21.26 mL/g, 94.65 °C, and 567.97 min. A maximum electron-donating ability of 54.72% was obtained with the parameters 20.20 mL/g, 81.89 °C, and 701.87 min, at the highest point. The maximum level of ferulic acid components was 210.47 mg/100g at 5.22 mL/g, 79.66 °C, and 575.24 min. In addition, the maximum γ -oryzanol concentration was 660.39 mg/100g at 5.10 mL/g, 81.83 °C, and 587.39 min. The optimum extraction conditions were a solvent ratio of 10.45 mL/g, 80 °C extraction temperature, and 535 min extraction time. Predicted extraction levels under optimized conditions were in line with experimental values.

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

서 론

미강이란 현미에서 백미로 도정하는 과정에서 생기는 부산물로서 현미의 껍질인 과피, 중피, 호분층을 포함한 겨층과 쌀눈으로 구성된 가루를 말한다. 이러한 미강에는 식이섬유와 양질의 단백질 및 각종 비타민과 미네랄이 함유되어 있을 뿐만 아니라 지용성 생리활성물질인 γ -oryzanol, tocopherol, tocotrienol, lecithin, sterol 등이 다량 함유되어 있다(1). 하지만 미강이 식감을 떨어뜨리고 불필요한 것으로 여겨져 일부만 미강유로 제조되고 대부분은 사료 및 비료 제조 등에 사용되거나 폐기하고 있는 실정이다.

미강으로부터 얻은 기름을 미강유라고 하는데 이는 쌀겨로부터 풍부하게 얻을 수 있는 유지자원의 하나로 근래 많은 연구에서 미강의 영양소 및 유효성분 등에 대한 효능이 규명되고 산업적인 이용가치를 비추어 볼 때 미강유산업은 매우 중요한 과제이다.

정제된 미강유는 중성지질 (88~89%), waxes (3~4%), free fatty acid (2~4%), 비비누화물질 (약 4%)로 구성되어 있는데 특히 비비누화물질 부분에 천연항산화제인 비타민 E와 γ -oryzanol이 포함되어 있다(2). 미강의 지용성 생리활성 물질 중 하나인 γ -oryzanol은 campesterol, β -sitosterol 등의 sterol과 trierpenoid alcohol이 모핵인 ferulic acid와 ester 결합을 하고 있는 무색, 무취의 혼합물질(3)로 유지 및 유지식품의 산화방지제로서 이용될 뿐만 아니라(1) 화장

[†]Corresponding author. E-mail : yhechoi@knu.ac.kr,
Phone : 82-53-950-5777, Fax : 82-53-950-6772

품 및 의약품의 원료로서 널리 사용되고 있다(4). 선행연구에 따르면 γ -oryzanol은 혈중 콜레스테롤 감소(5-7)시키고 항산화 기능(8) 및 항궤양작용(9)이 있다고 보고되었다.

또한 쌀과 미강의 주요 phenolic acid이며 γ -oryzanol의 모핵인 ferulic acid는 LDL (low density lipoprotein) 산화억제(10,11), radicals에 의한 세포손상 보호(12)등 항산화 효과가 우수할 뿐만 아니라 당뇨 유도 쥐의 혈중 지질 개선 효과(13)등 여러 생리활성이 보고되었다.

Oyzanol 추출시 일반적으로 가장 많이 사용하는 용매는 hexane이지만 이는 환경이나 보건적인 측면에서 위험성을 내포(14,15)하고 있기 때문에 근래에는 추출용매로 ethanol 및 isopropanol 등 short-chain alcohol류를 사용하는 경우가 있다(16,17). Short-chain alcohol류는 hexane보다 높은 극성을 가지고 있어서 nonglyceride 물질을 추출하는데 효율적이고 안정성이 높다고 알려져 있고(14), phosphatide와 비비누화물질이 alcohol을 추출용매로 사용하여 추출된 oil에 일반적으로 좀 더 많이 함유(18)되어 있어 alcohol이 γ -oryzanol추출에 더 효율적이라고 보고되고 있다. 그러나 대부분 isopropanol을 용매로 추출을 한 보고는 있으나 ethanol을 용매로하여 추출한 경우는 자료가 부족한 실정이다.

본 연구의 목적은 미강을 보건적으로 안전하고 고부가가치의 새로운 가공제품을 효율적으로 개발, 적용을 가능하게 하기 위하여 쌀겨에만 존재하는 물질로서 지용성 생리활성물질인 oryzanol과 그 모핵인 ferulic acid 및 생리활성 물질을 hexane 대체 용매로 ethanol을 용매로하여 추출공정을 최적화하고, 추출조건에 따른 생리활성을 모니터링하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

미강은 2008년 8월 경상북도 김천 건양RPC(주)로부터 분쇄된 시료를 공급받았으며, 표준망체 No. 40 (aperture 425 μ m)을 통과한 분말을 취하여 -20 $^{\circ}$ C의 암소에 보관하면서 실험에 사용하였다.

미강의 기능성분 추출 공정 최적화 실험계획

미강의 기능성분의 최적 추출 조건을 확립하기 위해 예비실험의 결과를 바탕으로 중심합성계획법(central composite design)을 사용하여(19), 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 이용한 회귀분석을 위해 SAS (statistical analysis system, Version 9.1) program을 이용하였다. 추출공정의 독립변수(Xn)는 시료에 따른 용매비(X₁)와 추출 온도(X₂), 추출 시간(X₃)에 대한 실험범위를 선정하여 5단계(-2, -1, 0, 1, 2)로 부호화하였으며 Table 1과 같다.

또한 이들의 독립변수에 영향을 받는 종속변수(Yn)는 추출 수율(Y₁), 총페놀 함량(Y₂), 전자공여능(Y₃), 미강의 지용성 생리활성물질인 ferulic acid(Y₄), γ -oryzanol(Y₅)를 측정하여 각각 회귀분석을 실시하였다. 회귀분석 결과 임계점이 최대점이거나 최소점이 아니고 안장점일 경우에는 능선 분석을 하여 최적점을 구하였다. 회귀식은 다음과 같다.

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

Table 1. Independent variables and their coded and actual values used for analysis

Symbol	Independent variable	Coded level				
		-2	-1	0	1	2
X ₁	Solvent to sample ratio (mL/g)	5	10	15	20	25
X ₂	Extraction temperature ($^{\circ}$ C)	60	70	80	90	100
X ₃	Extraction time (min)	480	540	600	660	720

미강의 기능성분 추출

본 연구에서 미강으로부터의 기능 성분 추출 방법은 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 미강 10 g에 ethanol을 가하여 Table 1에 나타낸 각각 변수별로 환류냉각기를 이용하여 추출한 후 32 $^{\circ}$ C에서 진공농축(Model 2007GV, H.S.Co., Deagu, Korea)시킨 추출물을 사용하였다.

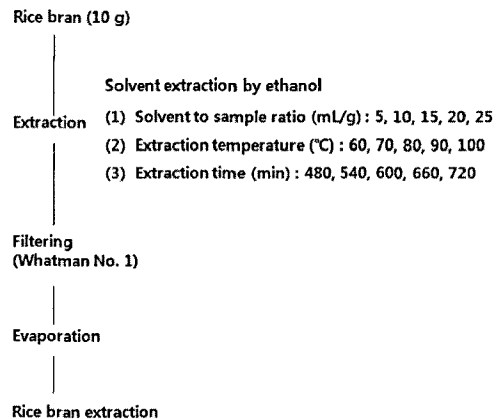


Fig. 1. Scheme for extraction process from rice bran.

수율 측정

수율은 항량을 구한 수기에 추출액 10 mL를 취하고 60 $^{\circ}$ C에 1차 증발시킨 후 105 $^{\circ}$ C에서 증발 건조시켜 무게를 측정하여, 사용된 원료 양의 백분율로 나타내었다.

Total phenol 함량 측정

Total phenol 함량은 Folin-Denis법(20)을 변형한 방법을 이용하여 비색정량 하였다. 일정하게 희석한 검액 1 mL에

Table 2. Experimental points of the central composite design and the experimental data of Rice bran under different conditions based on central composite design for response surface analysis

No.	X ₁ ¹⁾	X ₂ ²⁾	X ₃ ³⁾	Yield (%)	Total phenolics (mg GAE/100 g)	Electron donating ability (%)	Ferulic acid (mg/100g)	γ -oryzanol (mg/100g)
1	10(-1)	70(-1)	540(-1)	28.7	52.28	38.79	144.91	427.42
2	10(-1)	70(-1)	660(1)	30.2	52.13	43.30	115.60	388.44
3	10(-1)	90(1)	540(-1)	29.9	72.78	44.81	140.18	499.34
4	10(-1)	90(1)	660(1)	35.1	62.13	46.42	125.83	448.19
5	20(1)	70(-1)	540(-1)	36.3	63.43	44.99	81.13	218.92
6	20(1)	70(-1)	660(1)	34.4	64.88	47.71	83.39	205.51
7	20(1)	90(1)	540(-1)	39.0	86.70	51.09	60.26	221.22
8	20(1)	90(1)	660(1)	38.9	80.03	54.91	81.26	212.34
9	15(0)	80(0)	600(0)	32.5	75.75	49.01	106.63	277.31
10	15(0)	80(0)	600(0)	29.8	77.71	51.14	113.27	320.61
11	5(-2)	80(0)	600(0)	17.2	46.19	34.85	209.15	653.08
12	25(2)	80(0)	600(0)	39.4	85.75	51.66	65.07	166.91
13	15(0)	60(-2)	600(0)	27.2	55.61	34.16	62.57	278.39
14	15(0)	100(2)	600(0)	15.5	79.88	34.20	11.21	184.34
15	15(0)	80(0)	480(-2)	34.5	67.93	48.75	86.56	294.72
16	15(0)	80(0)	720(2)	31.5	66.77	50.31	83.73	279.99

¹⁾X₁ : Solvent to sample ratio (mL/g).²⁾X₂ : Extraction temperature (°C).³⁾X₃ : Extraction time (min).

Folin-Ciocalteu시약(Sigma-Aldrich Chemical Co., U.S.A) 1 mL를 가하여 혼합하고 3분 후 10% Na₂CO₃ 1 mL를 넣어 진탕하고 1시간 실온에 방치하여 UV-visible spectrophotometer (TU-1800 Human Crop. Co., Deagu, Korea)를 사용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준물질로 gallic acid (Sigma-Aldrich Chemical Co., U.S.A)를 농도별로 조제하여 표준 검량선을 작성한 후 total phenol 함량을 계산하였다.

전자공여능 측정

DPPH (α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl)는 항산화능을 가진 물질의 전자공여능에 의해 환원되어 탈색이 되는데 이 탈색의 정도로 항산화능을 측정할 수 있다(21). 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 525 nm에서 UV-visible spectrophotometer (TU-1800 Human Crop. Co., Deagu, Korea)로 흡광도를 측정 한 후 sample 첨가구와 무 첨가구의 흡광도 차이를 백분율 (%)로 표시하여 전자공여능을 측정하여 아래와 같이 계산 하였다.

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

ABS : Absorbance of DPPH solution with sample at 525nm

ABC : Absorbance of DPPH solution without sample at 525nm

Ferulic acid 함량 측정

미강 시료에서 추출한 추출물에 ethanol 100 mL로 정용화한후 HPLC(Agilent 1100, Hewlett Packard, Germany)를 사용하여 분석을 하였다. Ferulic acid 함량 분석을 위한 HPLC 분석 조건은 column은 Agilent TC-C18 (4.6 mm I.D. \times 150 mm L, 5 μ m, Agilent Inc., U.S.A)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 μ L로 하여 325 nm에서 분석하였다. 이 때 표준 용액의 검량선은 Ferulic acid (Sigma Chemical Co., U.S.A)로 200 mg/mL stock solution을 만든 뒤 희석하여 100~400 mg/kg 정도의 범위가 되도록 조제한 후 검량선을 작성하여 시료 중의 ferulic acid를 계산하였다.

γ -Oryzanol 함량 측정

Oryzanol은 Hu등(16)의 방법을 이용하여 추출된 rice bran oil 0.1 g에 ethanol 5 mL와 ascorbic acid 0.1 g을 첨가하

여 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 2차례 반복하였다. 수집한 상층액은 32°C에서 진공농축한 후 hexane 3 mL를 가하여 HPLC 분석을 하였다. γ -Oryzanol 함량 분석을 위한 HPLC 분석 조건으로 column은 Agilent TC-C18 (4.6 mm I.D. × 150 mm L, 5 μ m, Agilent Inc., U.S.A)을 사용하였고 mobile phase는 methanol/acetonitrile/dichloromethane/acetic acid=50:44:3:3가 되도록 하여 사용하였다. Flow rate는 1 mL/min, injection volume은 10 μ L로 하여 330 nm에서 분석하였다. 표준용액 조제는 γ -oryzanol (Wako Pure Chemical Industrieds, Ltd., Japan)을 사용하였고 검량선을 작성하여 시료 중의 γ -oryzanol을 계산하였다.

결과 및 고찰

추출조건이 수율에 미치는 영향

각 추출 조건에 따른 추출 수율의 결과에 대한 반응표면 회귀식은 Table 3에 나타내었으며 반응표면 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 반응표면 그래프에 따르면 시료에 대한 용매비가 수율에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 용

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

Responses	The second order polynomial ¹⁾	R ²	significance
Yield	$Y_1 = -64.425000 + 3.673750X_1 + 3.123125X_2 - 0.192312X_3 - 0.023500X_1^2 + 0.002750X_2X_1 - 0.024500X_2^2 - 0.003625X_3X_1 + 0.001146X_3X_2 + 0.000125X_3^2$	0.6592	0.3913
Total phenolics	$Y_2 = -541.347826 + 1.939312X_1 + 6.360054X_2 + 1.035421X_3 - 0.107609X_1^2 + 0.019746X_2X_1 - 0.022464X_3^2 + 0.002325X_3X_1 - 0.003550X_3X_2 - 0.000652X_3^2$	0.9558	0.0021
Electron donating ability	$Y_3 = -263.329001 + 1.844271X_1 + 6.571367X_2 + 0.089163X_3 - 0.068226X_1^2 + 0.010396X_2X_1 - 0.039744X_3^2 + 0.000180X_3X_1 - 0.000379X_3X_2 - 0.000037603X_3^2$	0.9010	0.0199
Ferulic acid	$Y_4 = -937.909375 - 25.536000X_1 + 25.325575X_2 - 1.060021X_3 + 0.271600X_1^2 - 0.071250X_2X_1 - 0.182650X_3^2 - 0.027333X_3X_1 - 0.007021X_3X_2 - 0.001723X_3^2$	0.9557	0.0021
γ -Oryzanol	$Y_5 = -537.698125 - 49.234250X_1 + 32.292625X_2 + 0.522625X_3 + 1.110350X_1^2 - 0.306350X_2X_1 - 0.165958X_3^2 + 0.028267X_3X_1 - 0.001592X_3X_2 - 0.000506X_3^2$	0.9621	0.0013

X₁ : Solvent to sample ratio (mL/g).

X₂ : Extraction temperature (°C).

X₃ : Extraction time (min).

¹⁾Y = b₀+b₁X₁+b₂X₂+b₃X₃+b₁₁X₁²+b₂₂X₂X₁+b₂₂X₂²+b₃₃X₃X₁+b₃₃X₃X₂+b₃₃X₃².

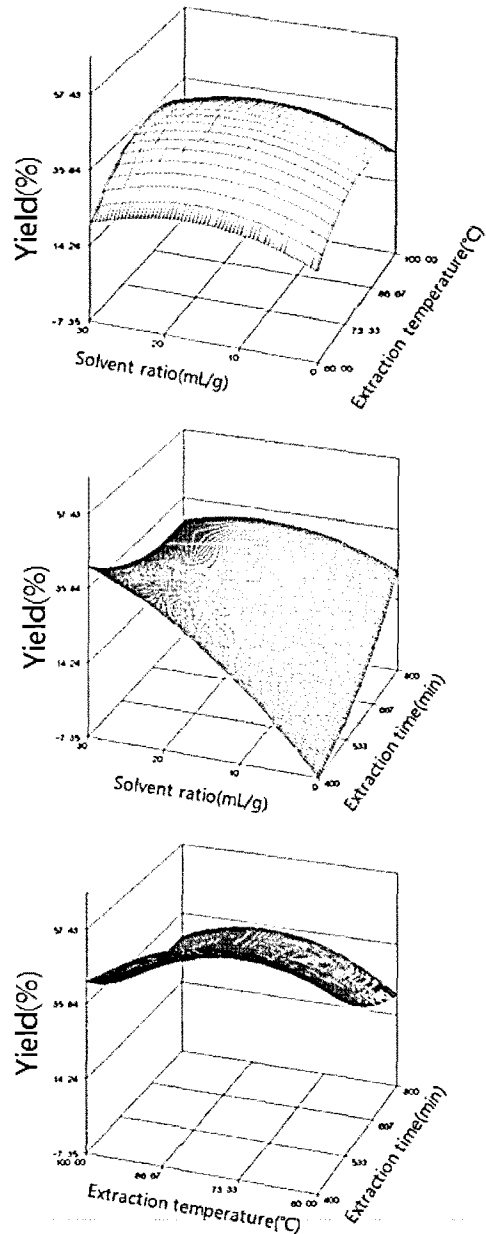


Fig. 2. Response surface for the effects of extraction conditions on Yield(%).

매비와 추출 온도가 높을수록 추출 시간은 감소할수록 수율이 높게 나타났다. 추출 수율에 대한 R²값은 0.6592으로 예측된 정상점은 안장점(saddle point)으로 시료에 대한 용매비 22.56 mL/g, 추출 온도 78.19°C, 추출 시간 522.15 min에서 최대값 42.03%로 나타났다.

추출조건이 Total phenolics에 미치는 영향

추출 조건에 따른 추출물의 total phenolics를 측정 한 결과에 대한 회귀식의 R²값은 0.9558로 높은 상관관계를 보였고 5% 이내에서 유의성이 인정되었다. Fig. 3에 나타난 반응표면 그래프를 보면 시료에 대한 용매비가 total phenolis 함량

에 가장 영향을 많이 주는 것으로 나타났고 추출온도도 유의적으로 영향을 받았다. 반응표면 분석에 따라 예측된 정상점은 최대점(Maximum point)이고 최대값은 90.78 mg GAE/100 g로 예측되었다. 이때의 추출조건은 시료에 대한 용매비 21.26 mL/g, 추출온도 94.65°C, 추출시간 567.97 min이었다(Table 4).

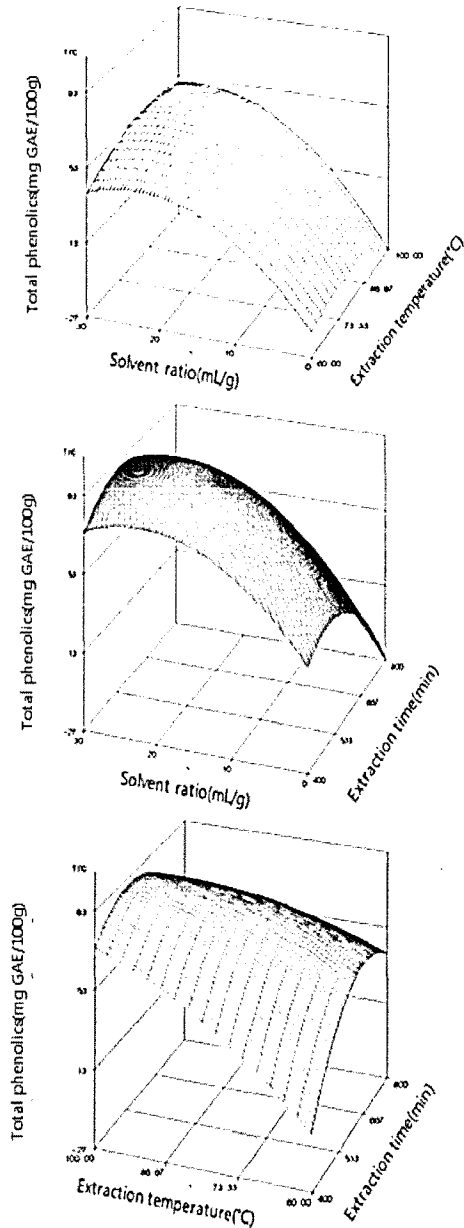


Fig. 3. Response surface for the effects of extraction conditions on total phenolics (mg GAE/100 g).

추출조건이 전자공여능에 미치는 영향

미강의 추출조건에 따른 전자공여능의 결과에 대한 회귀식은 Table 3와 같다. 이에 대한 반응표면은 Fig. 4에 나타내었고, Table 4에 나타낸 바와 같이 최대값 54.72%로 나타났

다. 전자공여능도 total phenolics와 유사한 특성을 보였는데 이는 항산화작용이 페놀성 물질 등과 밀접한 관계가 있음을 보여준다(23). Ferulic acid는 phenolic acid로서 phenol ring의 hydroxyl기가 항산화 성질을 가진다고 보고되었다(24). Nenadis와 Tsimidou(26)의 실험에서 에탄올을 용매로 전자공여능을 실험한 결과 ferulic acid의 전자공여능은 30.9%였다. Table 2에 나타낸 바와 같이 본 실험에서는 전자공여능이 31.20-51.6%로 ferulic acid 이외에 다른 페놀성 물질등의 영향을 받아 높은 항산화능을 보인 것으로 사료된다. 예측된 정상점은 최대점(Maximum point)으로 이 때 추출조건은 시료에 대한 용매비 20.20 mL/g, 추출온도 81.89°C, 추출시간 701.87 min이었고 시료에 대한 용매비와 추출온도에 유의적으로 영향을 받았다.

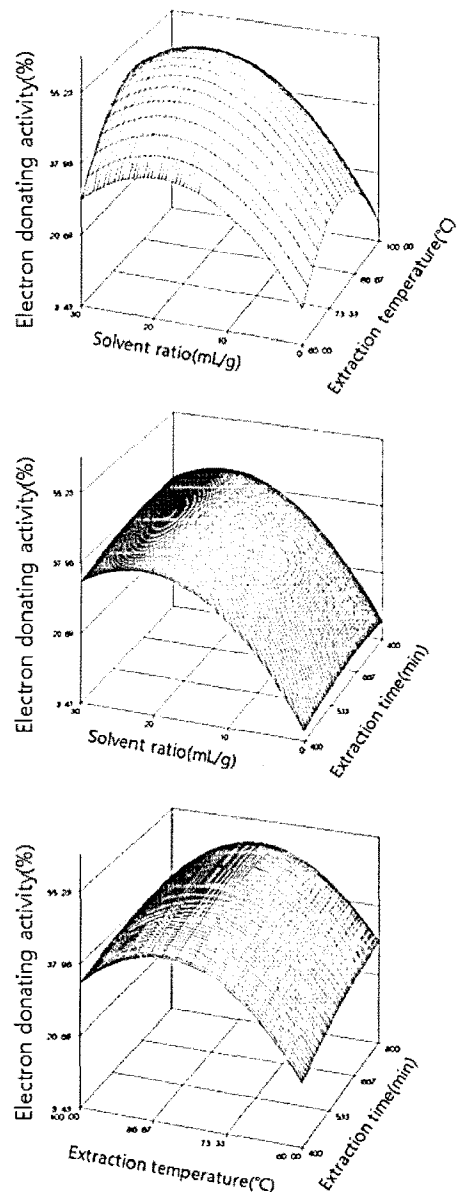


Fig. 4. Response surface for the effects of extraction conditions on electron donating activity (%).

추출조건이 Ferulic acid 함량에 미치는 영향

Ferulic acid 함량에 대한 R²값은 0.9557로 1%의 수준에서 유의성이 인정되었으며 예측된 회귀식은 Table 3와 같고 반응표면은 Fig. 5에 나타내었다. Ferulic acid 함량은 시료에 대한 용매비가 높아질수록 감소하는 경향을 보였고, 추출온도가 높아질수록 ferulic acid 함량이 증가하다 감소하였다. 이는 온도가 높아짐에 따라 추출용매의 증발과 같은 손실을 가져와 함량이 감소하는 것으로 사료된다. 온도가 예측된 정상점은 안장점(saddle point)으로 이때의 추출조건은 시료에 대한 용매비 5.22 mL/g, 추출 온도 79.66°C, 추출 시간 575.24 min이고 최대값 210.47 mg/100g이었다.

Table 4. Predicted values of optimum condition for the maximized and minimized responses to variables by the ridge analysis by their response surface

Responses	Extraction condition			Estimated Responses	Morphology
	X ₁ ¹⁾	X ₂ ²⁾	X ₃ ³⁾		
Yield (%)	9.05	95.69	578.81	19.79(min)	saddle point
	22.56	78.19	522.15	42.03(max)	
Total phenolics (mg GAE/100 g)	6.67	68.96	596.91	44.84(min)	Maximum point
	21.26	94.65	567.97	90.78(max)	
Electron donating ability (%)	12.40	60.76	589.90	31.68(min)	Maximum point
	20.20	81.89	701.87	54.72(max)	
Ferulic acid (mg/100g)	18.67	98.17	576.16	11.61(min)	Saddle
	5.22	79.66	575.24	210.47(max)	
γ-oryzanol (mg/100g)	21.68	94.88	598.57	129.79(min)	Saddle
	5.10	81.83	587.39	660.39(max)	

¹⁾X₁ : Solvent to sample ratio (mL/g).

²⁾X₂ : Extraction temperature (°C).

³⁾X₃ : Extraction time (min).

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

Responses	F-Ratio		
	X ₁ ¹⁾	X ₂ ²⁾	X ₃ ³⁾
Yield (%)	1.93*	0.65*	0.10*
Total phenolics (mg GAE/100 g)	18.47***	14.52***	2.28*
Electron donating ability (%)	6.10**	6.58**	0.37
Ferulic acid (mg/100g)	19.75***	7.29**	1.53
γ-oryzanol (mg/100g)	34.70***	0.97	0.29

¹⁾X₁ : Solvent to sample ratio (mL/g).

²⁾X₂ : Extraction temperature (°C).

³⁾X₃ : Extraction time (min).

*Significant at 10% level; **Significant at 5% level; ***Significant at 1% level.

Table 6. Predicted optimum range and optimum values for Rice Bran extraction by response surface methodology

Condition	Optimum range	Optimum value
Solvent to sample ratio (mL/g)	9.04-11.85	10.45
Extraction temperature (°C)	79-81	80
Extraction time (min)	530-540	535

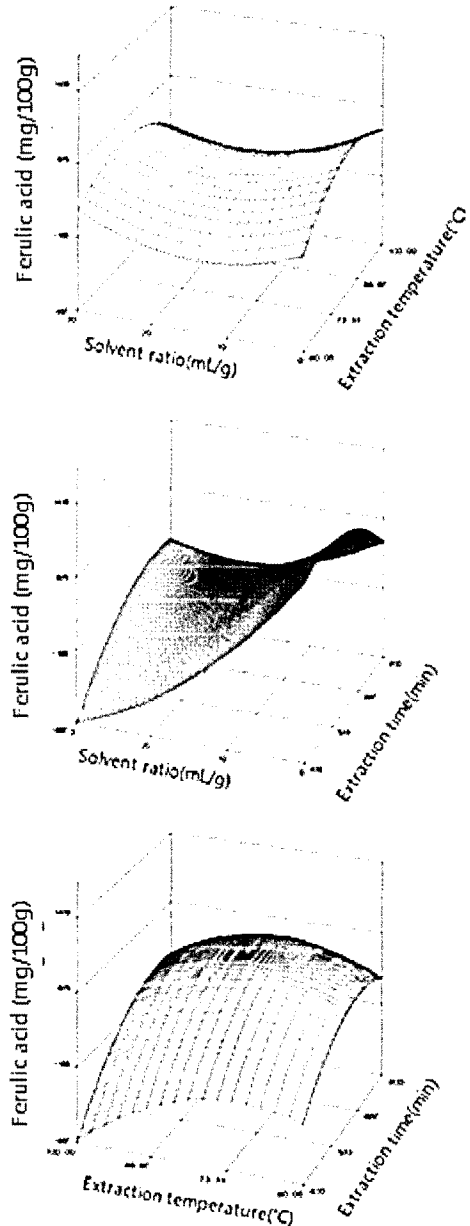


Fig. 5. Response surface for the effects of extraction conditions on ferulic acid (mg/kg).

추출조건이 γ-oryzanol 함량에 미치는 영향

추출 조건에 따른 미강으로부터의 γ-oryzanol 함량에 대한 회귀식은 Table 3에 나타내었으며 R²는 0.9621이고 5% 이내의 유의성이 인정되었다. γ-oryzanol 함량의 반응표면

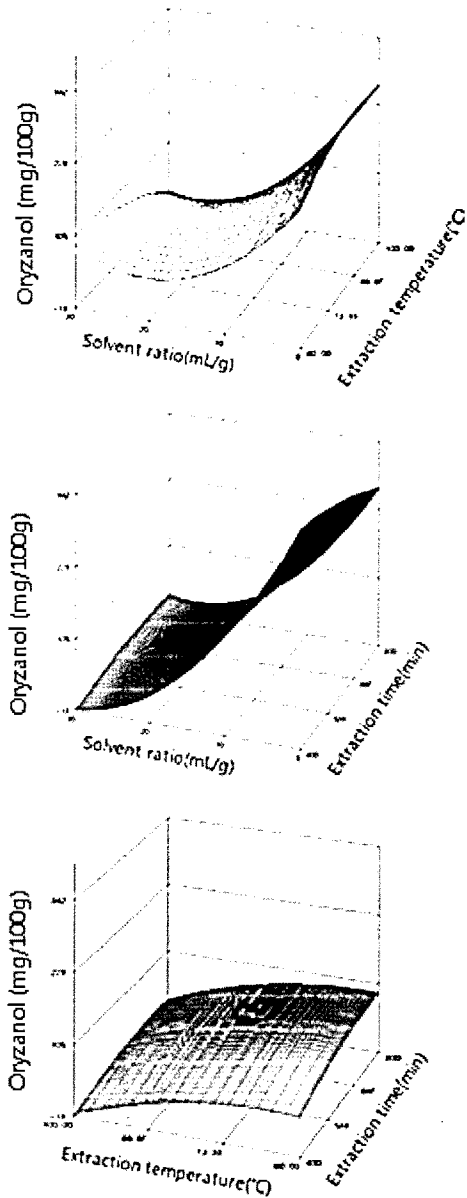


Fig. 6. Response surface for the effects of extraction conditions on γ -oryzanol(mg/kg).

은 Fig. 6에 나타내었다. Oryzanol 함량은 ferulic acid와 비슷한 경향을 보였다. 반응표면 그래프에 따르면 추출시간보다 시료에 대한 용매비에 영향을 많이 받았고 추출온도도 영향을 받았다. Xu 등(22)의 실험에서와 같은 온도범위에서는 추출온도가 높아질수록 추출되는 oryzanol 함량이 증가하였다는 결과와 유사하였으며, 추출온도가 81.83°C보다 높아질 때 추출함량이 낮아지는데 이는 온도가 높아짐에 따라 추출용매의 증발과 같은 손실을 가져와 oryzanol함량이 감소하는 것으로 사료된다. Lilitchan 등(25)은 hexane, ethanol 및 isopropanol 등 다양한 용매를 사용하여 oryzanol을 추출한 결과 ethanol의 경우 379 mg/100g, isopropanol의 경우 374 mg/100g으로 hexane을 비롯한 다른 용매보다 추출 함량이 높았으며 ethanol과 isopropanol의 추출함량은 비슷한 결과를 보였다. 또한 Hu 등(16)의 실험에서는 isopropanol로 추출한 oryzanol 함량이 245-293 mg/100g으로 본 실험에서 ethanol을 용매로 사용하여 추출한 oryzanol 평균 함량 317.30 mg/100g과 비슷한 결과가 나왔다. 이는 ethanol도 short-chain alcohol로 이러한 용매로 추출된 oil에 phosphatide와 비비누화물질이 좀 더 많이 함유되어 isopropanol과 유사한 결과가 나온 것으로 사료된다. 예측된 정상점은 안장점(saddle point)형태였으며 시료에 대한 용매비 5.10 mL/g, 추출온도 81.83°C, 추출시간 587.39 min에서 최대값 660.39 mg/100g를 나타냈다.

최적 추출조건의 예측

미강의 γ -oryzanol의 최적 추출조건 설정을 위해 추출조건에 따른 γ -oryzanol 함량 및 추출물의 특성의 contour map을 superimposing하여 최적 추출조건의 범위를 예측하였다. Fig. 7에서 시료에 대한 용매비(X_1)와 추출 온도(X_2), 시료에 대한 용매비(X_1)와 추출시간(X_3), 추출온도(X_2)와 추출시간(X_3)의 조건에 따른 변화를 알아본 결과 최적조건은 어두운 부분에 나타낸 바와 같다. 최적 추출조건은 10.45 mL/g, 80°C, 535 min이었고 Table 6에 나타내었다.

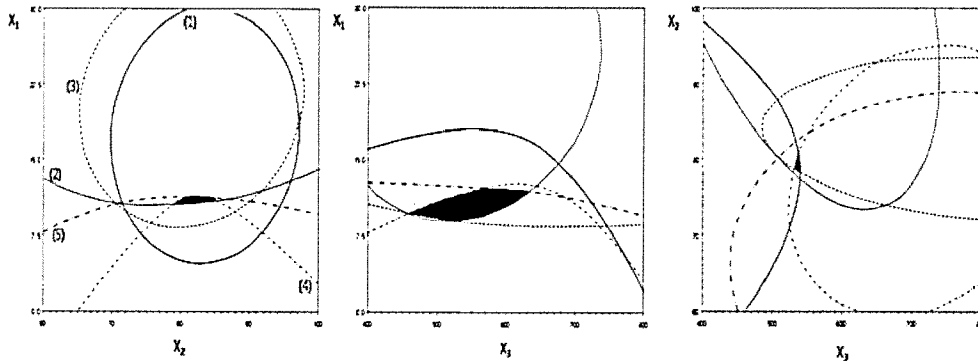


Fig. 7. Superimposing contour map of optimized conditions.

(1): Yield, (2): Total phenolics, (3): Electron donating activity, (4): Ferulic acid (5): γ -Oryzanol.

요 약

본 연구에서는 미강의 지용성 생리활성 물질인 γ -oryzanol과 그 모핵인 ferulic acid를 ethanol을 용매로 효율적으로 추출하고자 반응표면분석법을 이용하여 최적 추출조건을 설정하였다. 중심합성계획법에 따라 추출조건인 독립변수를 시료에 대한 용매비(X_1), 추출 온도(X_2), 추출 시간(X_3)으로 하고 이에 따라 영향을 받는 종속변수로 추출 수율(Y_1), 총페놀 함량(Y_2), 전자공여능(Y_3), 미강의 지용성 생리활성물질인 ferulic acid 함량(Y_4)과 γ -oryzanol 함량(Y_5)을 설정하였다. 추출 수율은 추출조건이 시료에 대한 용매비 22.56 mL/g (X_1), 추출 온도 78.19°C (X_2), 추출 시간 522.15 min (X_3)일 때 최대값 42.03%를 나타내었다. 총페놀 함량의 최대값은 90.78 mg GAE/100 g이었으며, 이때의 추출 조건은 시료에 대한 용매비 21.26 mL/g, 추출온도 94.65°C, 추출시간 567.97 min이었고, 전자공여능은 시료에 대한 용매비 20.20 mL/g, 추출온도 81.89°C, 추출 시간 701.87 min일 때 최대값 54.72%를 나타내었다. 그리고 ferulic acid 함량의 최대값은 시료에 대한 용매비 5.22 mL/g, 추출 온도 79.66°C, 추출 시간 575.24 min일 때 210.47 mg/100g이었고 γ -oryzanol 함량은 시료에 대한 용매비 5.10 mL/g, 추출온도 81.83°C, 추출시간 587.39 min에서 최대값 660.39 mg/100g을 나타내었다. 실험결과 모든 종속변수들은 시간보다는 시료에 대한 용매비와 추출온도에 영향을 많이 받았다. 특히 미강의 지용성 생리활성물질인 ferulic acid와 γ -oryzanol은 온도가 약 80°C보다 높아지면 추출함량이 감소하는데 이는 온도가 높아짐에 따라 추출용매의 증발과 같은 손실 때문인 것으로 사료된다. 이들 특성을 모두 만족시키는 최적 추출조건은 시료에 대한 용매비 10.45 mL/g, 추출온도 80°C, 추출시간 535 min으로 예측되었다. Ethanol 역시 isopropanol과 같이 hexane의 대체용매로서 미강의 추출 용매로 적합하다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업(과제번호 : 107082-3)의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Okada, T. and Yamaguchi, N. (1983) Antioxidant effect and pharmacology of oryzanol. J. Jpn. Oil Chem. Soc., 32, 305-310
- Rukmini, C. (1988) Chemical, nutritional and toxicological

- studies of rice bran oil. Food Chem., 30, 257-268
- Kwak, T.S. and Park, H.J. (1997) Quantitative analysis of γ -oryzanol in rice bran. Korean J. Med. Crop Sci., 5, 113-118
- Ishitani, A. (1980) Oryzanol antioxidant for food. JPN. Kokai Tokko Kobo JP 80, 50, 094 (C.A-93:112560)
- Nicolosi, R.J., Rogers, E.J., Ausman, L.M. and Orthoefer, F.T. (1993) Rice bran oil and its health benefits. In Rice Science and Technology Marshall, W. E., Wadsworth, J. I., Eds.. Dekker, New York, p. 421
- Rukmini, C. and Raghuram, T.C. (1991) Nutritional and biochemical aspects of the hypolipidemic action of rice bran oil: a review. J. Am. Coll. Nutr., 10, 593-601
- Seetharamaiah, G.S. and Chandrasekhara, N. (1989) Studies on hypocholesterolemic activity of rice bran oil. Atherosclerosis, 78, 219-223
- Duve, J.K. and White, P.J. (1991) Extraction and identification of antioxidants in oats. J. Am. Oil Chem. Soc., 68, 365-370
- Hikino, H., Takahashi, M., Oshima, Y. and Konno, C. (1987) Isolation and hypoglycemic activity of oryzabrans A, B, C and D, Glycans of *Oryza sativa* Bran. Planta Med., 49, 1-3
- Andreasen, M.F., Landbo, A.K., Christensen, L.P., Hansen, A. and Mayer, A.S. (2001) Antioxidant effects of phenolic rye (*Secale cereale* L.) extracts, monomeric hydroxycinnamates, and ferulic acid dehydroxydimers on human low-density lipoproteins. J. Agric. Food Chem., 49, 4090-4096
- Ohta, T., Semboku, N., Kuchii, A., Egashira, Y. and Sanada, H. (1997) Antioxidant activity of corn bran cell-wall fragments in LDL oxidation system. J. Agric. Food Chem., 45, 1644-1648
- Ogiwara, T., Satoh, K., Murakami, Y., Unten, S., Atsu, T., Sakagami, H. and Fujisawa, S. (2002) Radical scavenging activity and cytotoxicity of ferulic acid. Anticancer Res., 22, 2711-2717
- Balasubashini, M.S., Rukkumani, R. and Menon, V.P. (2003) Protective effects of ferulic acid on hyperlipidemic diabetic rats. Acta Diabetol., 40, 118-122
- Johnson, L.A. and Lusas, E.W. (1983) Comparison of alternative solvents for oils extraction. J. Am. Oil Chem. Soc., 60, 229-242
- World Health Organization (1991) Health and Safety Guide No. 59 : n-Hexane health and safety guide. Geneva, p. 29
- Hu, W., Wells, J.H., Shin, T.S. and Godber, J.S. (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
17. Renuka, D. and Arumughan, C. (2007) Phytochemical characterization of defatted rice bran and optimization of a process for their extraction and enrichment. *Bioresour. Technol.*, 98, 3037-043
18. Lusas, E.W., Watkins, L.R. and Koseoglu, S.S. (1991) Isopropyl alcohol to be tested as solvent. *INFORM 2*, p. 970-976
19. Gontard, N., Guilbert, S. and Cug, J.L. (1992) Edible wheat gluten films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *J. Food Sci.*, 57, 190-196
20. Amerine, M.A. and Ough, C.S. (1980) *Methods for analysis of musts and win.* Wiley & Sons, New York., p.176-180
21. Bios, M.S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200
22. Xu, Z., Hua, N. and Godber, J.S. (2000) Comparison of supercritical fluid and solvent extraction methods in extracting γ -oryzanol from rice bran. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77, 547-551
23. Lee, J.W., Lee, S.K., Do, J.H., Sung, H.S. and Shin, K.W. (1995) Browning reaction of fresh ginseng(*Panax ginseng* C.A. Meyer) as affected by heating temperature. *Korean J. Ginseng Sci.*, 19, 249-253
24. Marinova, E.M. and Yanishlieva, N.V. (1994) Effect of lipid unsaturation on the antioxidative activity of some phenolic acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71, 427-434
25. Lilitchan, S., Tangprawat, C., Aryasuk, K., Krisnangkura, S., Chokmoh, S., Krisnangkura, K. (2008) Partial extraction method for the rapid analysis of total lipids and γ -oryzanol contents in rice bran. *Food Chem.*, 106, 752-59
26. 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

(접수 2009년 12월 17일, 채택 2010년 4월 2일)