

반응표면분석법을 이용한 오디 안토시아닌의 초음파 추출법 최적화

Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Anthocyanins from Mulberry, Using Response Surface Methodology

김영언 | 기능소재연구단

Young-Eon Kim | Functional Materials Research Group

서론

뽕나무의 열매인 오디는 다양한 약리효과 때문에 중국에서 주로 한약에 사용되고 있다. 사람이 가장 많이 섭취하는 플라보노이드인 안토시아닌은 여러 가지 색을 가진 과일, 채소, 적포도주와 곡물에 많이 존재한다. 많은 실험 결과에서 안토시아닌은 항균, 항염증, 항산화, 항돌연변이 특성 등의 생리활성을 나타낸다. 오디에는 안토시아닌이 풍부한데 cyanidin-3-glucoside와 cyanidin-3-rutinoside가 대부분인 것으로 보고되어 있다. 안토시아닌의 분리, 정제 및 이용을 위해서 추출과정은 매우 중요하다. 문헌에서 추출 메커니즘을 설명하기 위해서는 확산 현상에 대한 Fick의 제2법칙이 보통 사용된다. 안토시아닌의 회수는 주로 용매추출과정을 거치는데, 이때 용매의 종류, 용매의 농도, 액체와 고체의 비율, 온도과 시간 등이 최적화에 중요한 요소가 된다. 좀 더 효율적인 방법을 찾기 위해서는 용매 사용량을 줄이고 추출시간은 단축시키면서 추출수율은 향상시켜야 한다. 식물에서 활성물질을

추출하기 위해 ultrasound-assisted extraction(UAE), supercritical fluid extraction, enzymatic extraction, soxhlet extraction 등의 여러 가지 새로운 추출기술들이 개발되었다. 이들 방법 중 초음파 추출법(ultrasound-assisted extraction, UAE)은 비용이 저렴하고 간편하며 효율적인 추출 기법이다. 초음파를 이용하였을 때 추출 수율이 향상되는 것은 초음파가 용매를 통과하면서 생성되는 cavitation(공동현상) 때문이다. 초음파는 역학적 효과도 나타내는데, 즉 조직 사이로 용매가 더 많이 침투하도록 하여 시료와 용매 사이의 접촉 면적을 증가시키게 된다. 그 결과 시료의 용질이 용매로 더 빨리 확산되는 것이다.

표면반응분석법(RSM)은 복잡한 공정을 최적화 하는데 매우 효과적인 통계 기술이다. RSM은 많은 약용 식물로부터 총 플라보노이드 화합물을 최적화 하는데 적합한 방법인 것으로 많은 자료들을 통해 입증되었다. 본 연구에서는 안토시아닌을 초음파 추출법으로 추출하고 HPLC-DAD(high-performance liquid chromatography with diode array detec-

tion)로 정량하였다. 오디로부터 안토시아닌 최적 조건을 설정하기 위해 메탄올 농도, 추출 온도, 용매와 시료의 비율 등을 변수로 하고 RSM을 사용하여 최적화 하였다. 추출을 통해 얻어진 조추출물은 오디 관련 제품 또는 특정 안토시아닌의 분리, 정제 시료로 사용하였다. 얻은 결과는 오디의 이용에 큰 도움이 될 것이다.

Chromatographic Results

표준물질과 시료의 크로마토그램은 Fig. 1과 같다. 순수한 cyanidin-3-glucoside와 cyanidin-3-rutinoside의 retention time은 각각 9.4분(Fig. 1A)과 10.3분(Fig. 1B)이었다. 초음파로 추출한 시료의 크로마토그램은 Fig. 1C와 같다. 안토시아닌 수율은 calibration curves를 사용하여 정량하였으며 mg/g으로 표기하였다.

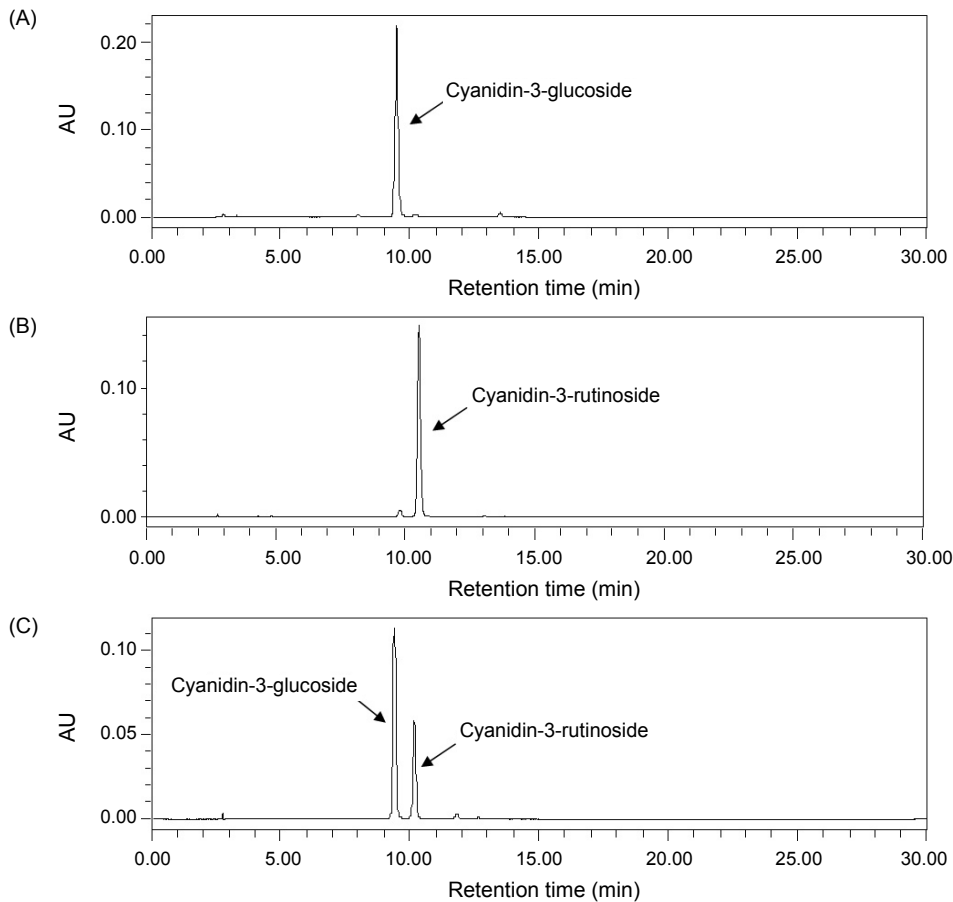


Fig. 1. The chromatograms of cyanidin-3-glucoside (A), cyanidin-3-rutinoside (B), standard substance and mulberry extract (C) at $\lambda = 520$ nm.

Selection of Solvent

추출 용매의 선택은 매개 변수 최적화를 위한 첫 번째 중요한 과정이다. 안토시아닌은 보통 산성 용매로 추출하는데 이것은 pH 변화에 민감하고 pH 변화에 따라 활성화 되는 화합물이기 때문이다. 이 연구에서는 acidified methanol(1% TFA, v/v)을 추출 용매로 사용하였다. 또한 메탄올 농도에 따른 추출 수율을 조사하기 위해 여러 가지 농도의 메탄올을 사용하였으며 결과는 Fig. 2A와 같다. 안토시아닌의 수율은 메탄올 농도를 10%(27.56 ± 1.53 mg/g)에서 50%(46.12 ± 0.82 mg/g)까지 하였을 때 메탄올 농도의 증가에 따라 비례적으로 상승하였다. 그러나 50%부터 90%까지는 증가폭이 매우 작게 나타났다. 수율과 비용을 감안할 때 50% acidified methanol을 적합한 용매로 선정하였다.

Volume of Solvent

용매와 시료 비율은 상업적인 추출 공정에서 또 다른 주요 요소이다. 일반적으로 용매의 양이 많을수록 성분들을 더 효과적으로 용해할 수 있으며 추출 수율도 높아진다고 알려져 있다. 그러나 이것은 용매의 낭비를 초래한다. 반대로 적은 양의 용매를 사용할 경우에는 목적하는 성분의 추출 수율도 낮아지는 결과를 가져온다. 이 실험에서는 최적의 용매와 시료 비율을 산정하였다. Fig. 2B에 안토시아닌의 추출 수율에 대한 용매와 시료의 비율 효과를 나타내었다. 다른 조건들을 고정한 조건에서 추출 효율은 시료에 대한 용매의 비율이 커질수록 증가하였으며, 특히 5:1(36.42 ± 1.15 mg/g)에서 20:1

(51.20 ± 0.92 mg/g)의 구간에서 뚜렷하게 나타났다. 그래서 시료에 대해 20배의 용매량을 최적 조건으로 하였다.

Extraction Time

추출 시간 또한 추출 수율에 영향을 미친다. 식물 세포에서 목적하는 성분들이 안팎으로 평형을 이루기 전까지는 추출 수율은 시간에 비례하여 증가한다. 그러나 평형에 도달한 이후에는 더 이상 증가하지 않는다. 추출 수율에 대한 시간의 영향을 조사하기 위해 20~100분까지 실험하였다. 결과는 Fig. 2C와 같다. 수율은 시간에 따라 빠르게 증가하였으며 40분에서 56.14 ± 1.20 mg/g에 도달하였으나 40~100분까지는 더 이상 증가하지 않았다.

Extraction Temperature

온도는 열에 민감한 성분의 추출 시 중요한 요소이다. 목적하는 성분의 용해 정도는 온도, 용매 확산 속도와 물질 이동 변화의 증가에 따른다. 그 사이에 불순물의 용해도가 증가할 수 있고 안토시아닌과 같은 열에 불안정한 성분들이 분해될 수도 있다. 이 연구에서는 추출을 여러 가지 온도(20~60℃)에서 실시한 반면 다른 조건들은 고정하였다. 안토시아닌의 추출 수율에 대한 온도의 효과는 Fig. 2D와 같다. 수율은 추출 온도가 20℃에서 40℃로 상승했을 때 54.09 mg/g에서 62.58 mg/g으로 급격히 증가하였고, 반면에 온도가 40℃에서 60℃로 상승하였을 때에는 안토시아닌의 분해로 인해 감소하기 시

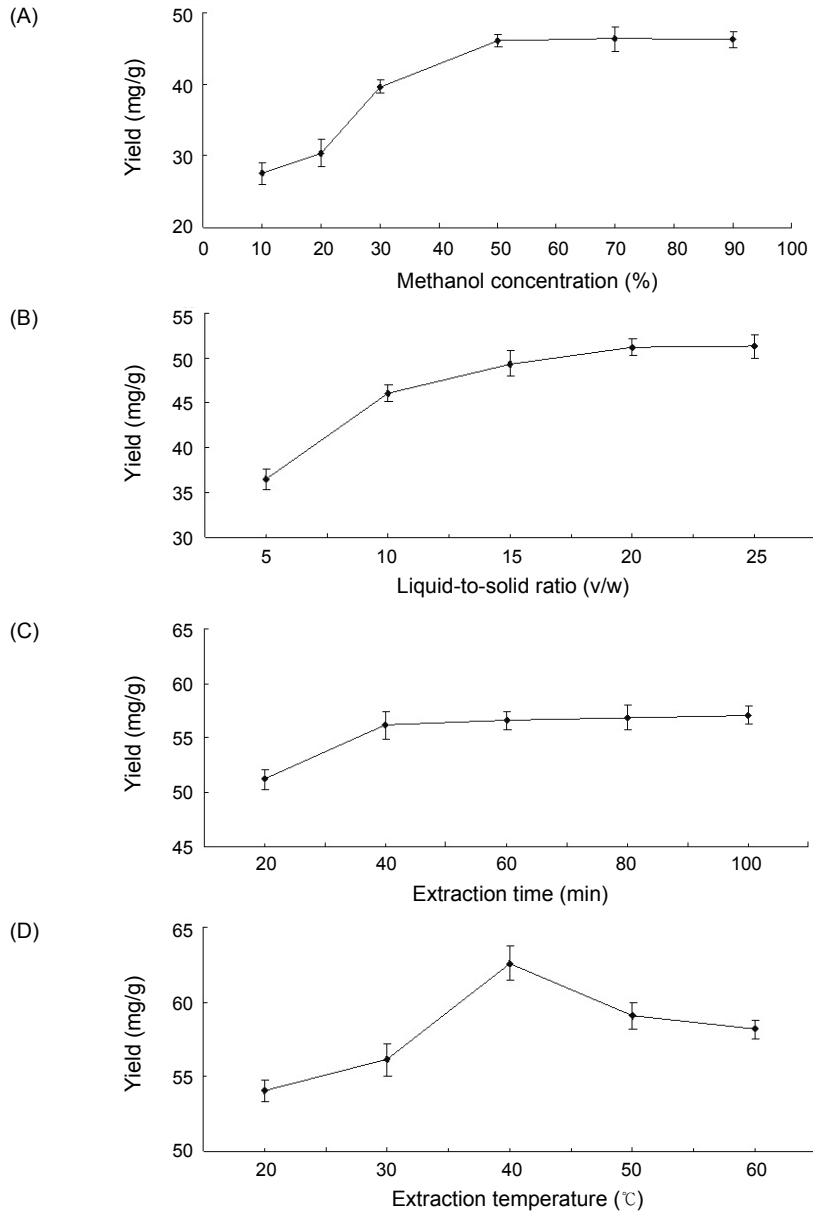


Fig. 2. The effects of extraction parameters on anthocyanin yield: (A) Effect of methanol concentration on anthocyanin yield. Other conditions were fixed at 10 liquid-to-solid ratio, 30°C extraction temperature and 20 min extraction time; (B) Effect of liquid-to-solid ratio on anthocyanin yield. Other conditions were fixed at 50% methanol, 30°C extraction temperature and 20 min extraction time; (C) Effect of time on anthocyanin yield. Other conditions were fixed at 50% methanol, 20 liquid-to-solid ratio, 30°C extraction temperature; (D) Effect of temperature on anthocyanin yield. Other conditions were fixed at 50% methanol, 20 liquid-to-solid ratio, 40 min extraction time.

Table 1. Coded and actual levels of three variables.

Independent variables	Coded Levels		
	-1	0	1
Methanol concentration (X_1)	30	50	70
Temperature (X_2)	30	40	50
Liquid-to-solid ratio (X_3)	15	20	25

작하였다. 따라서 안토시아닌 최적 추출 온도는 40°C로 나타났다.

Optimization of the Yield of Anthocyanins

오디의 안토시아닌 수율을 RSM 방법을 통하여 최적화 하였다. 추출시간은 40분으로 고정하였고

Table 1에 나타낸 세 가지 변수에 대한 coded levels와 actual levels는 수율을 극대화하도록 선택하였다. 15가지 실험을 선택하였고 이 중 12가지는 factorial experiments이며 3가지 실험은 오류를 추정하기 위한 zero-point tests이었다. Table 2에서는 coded levels 처리와 오디의 안토시아닌 수율 실험 결과를 나타내고 있으며 수율은 45.63에서 63.42 mg/g 범위였다. 최고 수율은 실험 조건이 $X_1 = 70\%$, $X_2 = 40^\circ\text{C}$ 그리고 $X_3 = 25$ 인 경우로 나타났다. 실험

Table 2. Response surface design and experimental data.

Test set	Coded levels			Anthocyanin yield (mg/g)
	X_1	X_2	X_3	
1	1	0	1	63.42
2	0	1	-1	52.09
3	1	-1	0	51.24
4	1	0	-1	56.73
5	-1	0	1	53.62
6	0	-1	-1	49.06
7	0	-1	1	51.05
8	-1	0	-1	50.98
9	-1	1	0	48.65
10	0	1	1	59.16
11	-1	-1	0	45.63
12	1	1	0	59.14
13	0	0	0	62.13
14	0	0	0	63.27
15	0	0	0	61.02

데이터에 다중회귀분석법을 적용하면 반응변수(수율)와 실험 변수들 사이에는 다음과 같은 2차 다항 방정식에 의한 상관관계를 가진다.

$$Y = 62.17 + 4.08X_1 + 2.76X_2 + 2.17X_3 - 1.22X_1X_2 + 1.26X_1X_3 + 1.27X_2X_3 - 3.96X_1^2 - 7.05X_2^2 - 2.28X_3^2$$

Table 3은 회귀방정식에 대한 분산분석(ANOVA) 결과를 나타낸 것이다. 일차항과 이차항은 상관관계가 매우 크게 나타났다($P < 0.01$). 모델의 적합성을 확인하기 위해 적합성 결여 검정(lack of fit)을 실시하였고 유의성이 없는 것으로 나타났으며($P > 0.05$) 이것은 이 모델이 실험 데이터와 일치할 수 있음을 나타내는 것이다.

정확성은 신호 대 잡음비로 측정하였으며 비율이 4이상이면 적합한 것이다. 이 연구에서 비율은 28.99로 나타났으며 이것은 이 모델이 공간디자인

을 처리하는데 이용할 수 있음을 의미한다. 방정식에 대한 R 스퀘어 값은 1에 거의 근접하여 실험값과 예측값 간에 높은 상관관계가 있음을 알 수 있고, 따라서 이 모델이 적합한 것으로 판정할 수 있는 것이다. 매우 낮은 분산계수(C.V.%)는 실험값이 매우 높은 정확성과 신뢰성을 가진다는 것을 의미한다.

3차원 반응표면도를 Fig. 3에 나타내었다. 메탄올 농도(X_1)와 용매와 시료 비율(X_3)의 증가는 안토시아닌 수율의 증가로 이어지는 반면, 온도(X_2)의 증가는 초기에는 안토시아닌 수율의 증가로 이어지지만 온도가 계속 상승하게 되면 오히려 감소하게 된다. 선택된 변수의 최적값은 회귀방정식을 풀면 구할 수 있다. Design Expert software를 통해 계산한 결과 안토시아닌 추출의 최적조건은 63.8% 메탄올(1% TFA, v/v), 추출 온도 43.2°C, 시료에 대한 용매의 비율이 23.8배, 추출 시간은 40분이었으며 이에 따른 Y 값은 64.84 mg/g이었다. 이 결과들을 확인하기 위해 최적조건하에서 실험을 세 번 반

Table 3. Analysis of variance (ANOVA) for the regression equation.

SD	SS	DF	MS	F value	p value
Model	485.93	9	53.99	94.32	<0.0001
X_1	133.25	1	133.25	232.79	<0.0001
X_2	60.83	1	60.83	106.27	0.0001
X_3	37.80	1	37.80	66.04	0.0005
$X_1 X_2$	5.95	1	5.95	10.40	0.0233
$X_1 X_3$	6.38	1	6.38	11.14	0.0206
$X_2 X_3$	6.45	1	6.45	11.27	0.0202
X_1^2	57.77	1	57.77	100.92	0.0002
X_2^2	183.67	1	183.67	320.87	<0.0001
X_3^2	19.20	1	19.20	33.54	0.0022
Lack of fit	0.098	3	0.033	0.024	0.9937

(SD: sources of deviation; SS: sum of squares; DF: degree of freedom; MS: mean square)

복하였다. 안토시아닌 수율은 64.70 ± 0.45 mg/g 이었고 에탄올을 이용한 침지 추출법(23.30 mg/g)에 비해 매우 높게 나타났다. 이것은 이 모델이 실험 데이터를 구하는데 적합하며 오디로부터 안토시아닌을 추출하는 공정에 최적화 되어 있다는 것을 명확히 보여주는 것이다.

결론

오디의 안토시아닌을 추출하기 위해 UAE 방법을 개발하였다. 초음파는 안토시아닌 추출 효율을 크게 향상시킬 수 있는 유용한 장치이다. RSM은 추출을 최적화하는데 적용한 결과 성공적이었고

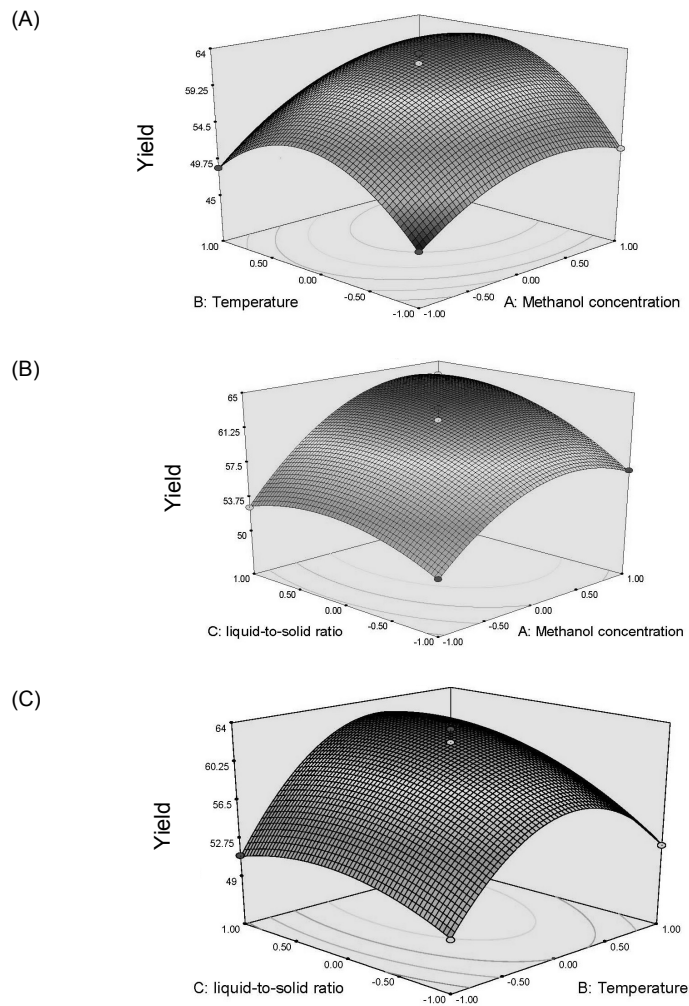


Fig. 3. Response surface graphs for the effects of methanol concentration, temperature and liquid-to-solid ratio on anthocyanin yield of mulberry extract: (A) Methanol concentration (X_1) and temperature (X_2); (B) Methanol concentration (X_1) and liquid-to-solid ratio (X_3); (C) Temperature (X_2) and liquid-to-solid ratio (X_3).

몇 가지 실험 매개변수를 평가하였다. 결과적으로는 메탄올 농도, 추출 온도와 용매와 시료의 비율 모두가 안토시아닌의 추출률에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 반응함수의 최적 조합은 63.8% 메탄올(1% TFA, v/v), 추출 온도 43.2°C, 시료에 대한 용매의 비율이 23.8배, 추출 시간은 40분이었다. 최적 조건하에서 안토시아닌 수율은 건물로 64.70 ± 0.45 mg/g이었다. 이러한 결과들은 오디를 이용하는데 있어 모든 분야에 도움이 될 수 있으며 UAE가 식물에서 중요한 phytochemicals를 추출하는데 유용한 장치가 될 수 있음을 시사하는 것이다.

● 자료출처 ●

Zou TB, Wang M, Gan RY, Ling WH, Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Anthocyanins from Mulberry, Using Response Surface Methodology, *Int J Mol Sci*, **12**(5), 3006-3017, 2011

김 영 언 이학박사

소 속 : 한국식품연구원 기능소재연구단

전문분야 : 농산식품가공 및 식품화학

E-mail : radog@kfri.re.kr

T E L : 031-780-9072

본 내용은 자료 출처의 원문을 번역 기술한 것입니다.