

초음파추출 공정을 이용한 아가위나무 열매의 항산화 활성 증진

— 연구노트 —

박성진¹ · 권성필² · 나영아³

¹한림성심대학교 관광외식조리과

²(주)제이앤팜유한책임회사

³을지대학교 식품산업외식학과

Enhancement of Antioxidant Activities of *Crataegus pinnatifida* Bunge Fruit by Ultrasonification Extraction Processes

Sung-Jin Park¹, Sung-Pil Kwon², and Young-Ah Rha³

¹Department of Tourism Food Service Cuisine, Hallym Polytechnic University

²JNPharm LLC.

³Department of Food Technology and Services, Eulji University

ABSTRACT This study was performed to investigate enhancement of antioxidant activities of *Crataegus pinnatifida* Bunge fruit by different extraction processes. Extracts were SE (stirrer extraction; 70% ethanol extract at 25°C, control), RE (reflux extraction at 60°C), and USE (ultrasonification for 3 h at 60°C with 70% ethanol), respectively. Compared to SE, total phenolic and flavonoid contents in USE increased to 104.03% and 302.4%, respectively. USE showed the highest activity at 1.0 mg/mL concentration for 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging activity. Our results suggest that extracts from the ultrasonification process have relatively high antioxidative activities, and that fruit of *Crataegus pinnatifida* Bunge could be considered as a candidate functional antioxidant agents. These results would be useful for chemical and biological studies on natural plants and its products.

Key words: *Crataegus pinnatifida* Bunge fruit, ultrasonification, antioxidant, extraction

서 론

아가위(*Crataegi fructus*)는 우리나라 각지의 산야와 계곡에서 자생하는 산사나무(*Crataegus pinnatifida* Bunge) 및 동속 근연식물의 성숙한 과실로 장미과(Rosaceae)에 속하며, 성분으로는 citric acid, crataegolic acid, succinic acid, chlorogenic acid 등의 유기산과 quercetin, quercitrin, epicatechin, rutin 등의 flavonoids 화합물을 함유하고 비타민과 카로틴이 풍부하다(1). 특유의 향긋한 냄새와 단맛 및 신맛을 가지고 있으며 건위, 소화, 수렴, 진통, 살균, 살충에 효능이 뛰어나고 숙취에도 좋은 효과가 있으며, tri-glyceride 대사(2) 능력을 좋게 하고, low density lipoprotein(LDL) 대사(3)를 향상시키는 등 지질대사 개선에 뛰어난 효능이 있다고 알려져 있다. 또한, scopolamine으로 유도시킨 동물모델에서 기억능력 개선 및 인지능 향상(4), 항산화 효과(5), 혈압저하 효과(6), α -amylase와 α -glucosidase 억제 효과(7) 등이 보고되었다. 이외에도 산사 첨가

식빵의 품질특성(8), 산사 첨가량에 따른 산사편의 품질특성(9), 산사를 이용한 돈육 불고기 양념의 품질특성과 항산화 활성(10) 등 조리과학 부분의 연구에도 활발히 진행되고 있다.

체내 활성산소는 생체조직을 공격하여 정상 세포를 손상시키며, 피부노화, 고지혈증, 동맥경화, 당뇨 등 다양한 질병을 유발하게 하므로 이를 방지하기 위한 항산화제에 대한 연구가 이루어지고 있다(11). 따라서 산화적 손상을 줄일 수 있는 항산화제의 강화는 체내 자유 라디칼과 지질 과산화물의 증가로 인해 발생하는 합병증 발생 예방에 매우 중요하다(12).

다양한 생리활성을 지닌 아가위나무 열매를 기능성 식품 소재로 활용하기 위해 효율적인 성분의 추출방법 확립은 산업적으로 매우 중요한 요소이다. 일반적으로 식물체로부터 유용성분의 추출은 열수추출법, 상온교반추출법, 환류냉각추출법, 초음파추출법, 고온가압추출법 그리고 저온고압추출법 등의 방법을 사용하고 있다(13-15). 주파수가 약 20 kHz 이상인 음파를 지칭하는 초음파는 반사되는 성질을 이용하여 식품의 성분과 구조 등의 비파괴 검사에 적용되는 low-intensity(<1 W/cm²)와 물체를 전단 및 압축시켜 조직의 물리적 파괴, 유화형성, 화학반응 촉진 등의 성질을 가져

Received 12 April 2017; Accepted 28 June 2017

Corresponding author: Sung-Jin Park, Department of Tourism Food Service Cuisine, Hallym Polytechnic University, Chuncheon, Gangwon 24210, Korea
E-mail: sjpark@hsc.ac.kr, Phone: +82-33-240-9234

천연물로부터 유용성분 추출에 이용되는 high-intensity (10~1,000 W/cm²) 초음파 등이 여러 분야에서 활용되고 있다(16-18). 식물체로부터 폴리페놀, 단백질, 당, 전분, 오일과 향기성분 등의 추출공정에서 초음파 처리는 추출효율과 속도 증대, 추출온도 저하, 용매 절약 등의 효과를 가지는 것으로 알려져 있다(19).

따라서 본 연구에서는 아가위나무 열매의 기능성 식품소재로서 활용 가능성과 유용성분을 보다 많이 확보할 수 있는 효율적인 추출방법을 구명하기 위하여 추출방법에 따른 추출물의 항산화 활성을 비교 검토하였다.

재료 및 방법

재료

강원도 춘천에서 채취한 아가위 열매(*Crataegi fructus*) 중 외관이 건전한 것을 선별하여 세척한 후 불순물을 제거하고 동결건조(PVTF A 10AT, ILSIN, Suwon, Korea) 하였으며, 건조한 시료는 분쇄기(IKA M20, IKA, Staufen, Germany)를 이용하여 20~30 mesh로 조분쇄 한 후 -20°C에서 보관하면서 추출물 제조에 사용하였다.

추출방법

아가위나무 열매의 추출은 시료 100 g에 15배의 70% 에탄올을 가한 후 상온교반추출(SE, stirrer extraction)은 25 ± 2°C의 실온에서 교반기(Hanbak Scientific Co., Bucheon, Korea)를 이용하여 150 rpm으로 24시간, 3회 반복 추출하였고, 환류냉각추출(RE, reflux extraction)은 냉각관을 부착하여 60°C의 항온수조에서 3시간, 3회 반복 추출하였다. 초음파추출(USE, ultrasonification extraction)은 시료를 넣은 유리병을 초음파 추출기(AUG-R3-900, ASIA ULTRASONIC, Gyeonggi, Korea)를 이용하여 120 kHz의 조건으로 6시간, 3회 반복 추출하였다. 얻어진 각각의 추출물은 감압여과펌프(KNF Laboport Pressure Pump, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA)와 Whatman사(Piscataway, NJ, USA)의 20~25 µm 여과지를 이용하여 여과한 후, 여과한 추출물들을 감압회전농축기(Rotary Vacuum Evaporator N-N series, EYELA, Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용해 농축한 다음 동결건조기(PVTF A 10AT, ILSIN)를 이용하여 건조하였으며, 각 추출물의 수율은 동결 건조 후 건물 중량을 구한 다음 원료 건물량에 대한 백분율로 나타내었다.

총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis(20) 방법에 따라 실험하였다. 시료 1 mL에 0.2 N Folin-Ciocalteu's phenol reagent(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 1 mL를 가하여 실온에서 3분간 반응시킨 후, 7.5% Na₂CO₃ 1 mL를 가하여 암소에서 1시간 동안 방치한 다음 765 nm에서 흡광

도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 0~200 ppm 농도로 조제하여 작성한 검량선에 의하여 총 폴리페놀 함량을 산출하였다.

총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 Abdel-Hameed의 방법(21)에 따라 시료 1 mL에 5% sodium nitrite 0.15 mL를 가하여 25°C에서 6분간 방치한 후 10% aluminium chloride 0.3 mL를 가하여 25°C에서 5분간 방치하였다. 다음 1 N NaOH 1 mL를 가하고 교반한 후 510 nm에서 흡광도를 측정하였으며, rutin hydrate(Sigma-Aldrich Co.)를 0~200 ppm 농도로 조제하여 작성한 검량선에 의해 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

DPPH 라디칼 소거 활성 측정

DPPH법은 자유 라디칼(free radical)로 특유의 색을 나타내게 되나 전자나 수소원자에 의해 전자가 쌍이 되어 비라디칼이 되면 특유의 색이 사라지게 되는 DPPH의 화학적 성질을 이용한 방법으로, DPPH 라디칼 소거능의 측정은 Blois의 방법(22)을 변형하여 10, 50, 100, 500, 1,000 µg/mL의 농도로 제조된 시료 0.4 mL에 0.4 mM DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich Co.) 에탄올 용액 0.8 mL를 진탕 혼합하고, 10분간 방치 후 분광광도계를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하여 계산식, DPPH radical scavenging ability(%)=100 - [(OD of sample/ OD of control) × 100]에 의하여 활성을 산출하였다.

통계처리

통계적 분석은 Micro Office Excel 2010(Microsoft Inc., Redmond, WA, USA) *t*-test를 이용하여 분석하였으며 항산화 활성 효과 결과값의 통계처리는 SAS version 9.2(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 분석하였다. 유의성 분석은 ANOVA 검정을 실시하였으며 Duncan의 다중범위 검정법(Duncan's multiple range test)으로 유의성은 *P*<0.05 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

추출수율

Fig. 1은 아가위나무 열매의 추출공정별 수율을 나타낸 것이다. 모든 추출조건에서 초음파 추출물이 18.8%로 가장 높은 수율을 나타내었으며, 일반 추출물이 7.6%로 가장 낮은 수율을 나타내었다. 기존의 열수 추출물에 비해 초음파 추출물의 수율이 높게 나타나는 것은 초음파 조사 시 형성된 공동현상(cavitation)에 의한 높은 압력으로 세포 내부조직이 파괴되어 추출물의 이동거리가 짧아지고 확산이 용이하게 일어나기 때문이다. 또한, 고분자 등은 원자 간의 결합이 끊어지게 되어 기존의 추출방법으로 용출이 어려웠던 성분

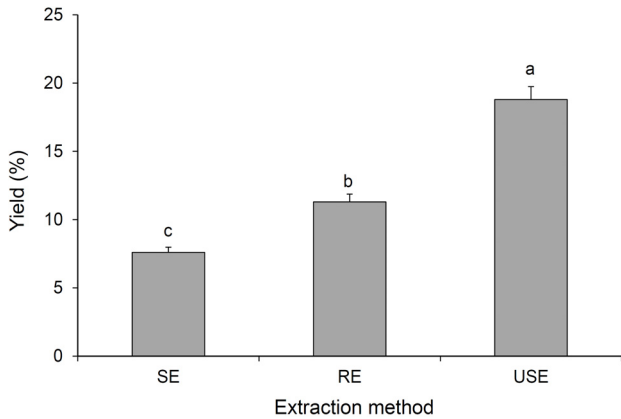


Fig. 1. Comparison of the extraction yields from *Crataegus pinnatifida* Bunge fruit according to different extraction processes. SE, stirrer extraction at 25°C (control); RE, reflux extraction at 60°C; USE, ultrasonification extraction for 6 hours at 60°C. Each value is the mean±SD. Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA ($P<0.05$).

의 용출 가능성(23) 및 초음파 에너지에 의한 조직의 파괴에 기인되는 것(24)으로 판단되며 초음파 처리에 의한 고형분 추출수율의 증대 효과가 확인되었다는 보고(25)가 있다. Kim과 Lee(26)가 연구한 추출방법을 달리한 달맞이꽃 추출물의 항산화 및 항균 활성 연구 결과 상온교반추출보다 초음파추출의 방법이 추출효율 및 폴리페놀, 플라보노이드 등 유효성분이 더 높게 나타나는 결과를 나타내었다. 이상의 결과를 통해 초음파추출 공정이 아가위나무 열매 추출수율 증가에 기여하였음을 확인할 수 있었으며, 또한 초음파추출 공정을 통한 추출물에 더욱 많은 유효성분이 함유되어 추출물의 생리활성에도 영향을 끼칠 것으로 생각된다.

총 페놀 및 플라보노이드 함량

식물성 식품 속에 함유된 페놀화합물은 화학적으로 이질적인 물질들이 포함되는데, 유기용매에만 녹는 지용성인 것도 있고, 수용성의 카르복실산이나 배당체, 그리고 크기가 큰 중합체도 이에 포함되어 이들의 기능은 그 구조적 다양성 만큼이나 다양하다. 또한, 페놀성 화합물의 phenolic hydroxyl기는 다른 성분들과 쉽게 결합되어 항암, 항산화 등 다양한 생리활성을 지니는 것으로 알려져 있다(27). 페놀화합물은 일반적으로 물 또는 에탄올, 메탄올, 아세톤과 물의 혼합으로 추출된다. 추출공정별 아가위나무 열매의 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량을 분석한 결과는 Table 1에 나타내었다. 총 폴리페놀 함량은 초음파 추출물인 USE, RE, SE

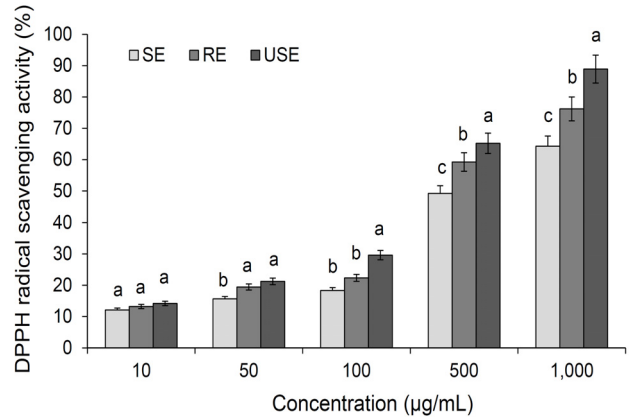


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity from *Crataegus pinnatifida* Bunge fruit according to different extraction processes. SE, stirrer extraction at 25°C (control); RE, reflux extraction at 60°C; USE, ultrasonification extraction for 6 hours at 60°C. Each value is the mean±SD. Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA ($P<0.05$).

의 순으로 각각 84.20 GAE mg/g, 61.31 GAE mg/g, 41.27 GAE mg/g으로 나타났다. 한편 플라보노이드의 함량은 총 폴리페놀 함량과 비슷한 경향을 보였으나 함량 면에서 다소 적게 나타났으며, USE, RE, SE가 각각 41.27 RE mg/g, 25.42 RE mg/g, 10.26 RE mg/g으로 측정되었다. 먼나무 추출에 초음파를 이용한 연구 결과 지표물질인 syringin의 함량의 증가(28)에 관한 연구와 유사한 결과를 나타내었다. 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량은 서로 밀접한 상호관계가 있다는 보고(29)가 있으며, 아가위나무 열매의 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량을 회귀분석으로 분석한 결과 결정계수 R^2 은 0.87로 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량의 연관성이 높게 나타났다($P<0.05$).

DPPH 라디칼 소거능

전자공여능은 항산화 측정에 가장 많이 쓰이는 방법의 하나이다. 이 실험에서 사용되는 DPPH는 항산화 활성을 측정하기 위한 기질로 사용되며, 페놀, 플라보노이드와 같은 페놀성 물질에 대한 항산화 작용의 지표로 알려져 있다(30). 아가위나무 열매의 추출 공정별 추출물의 DPPH 소거능은 USE 10, 50, 100, 500, 1,000 µg/mL의 농도에서 각각 14.20, 21.24, 29.61, 65.21, 88.91%로 확인되어 USE가 가장 높게 나타났다(Fig. 2). 식용 및 한약재로 상용하는 아가위나무 열매는 우수한 전자공여 활성을 나타내므로 향후 천연 항산화제 소재 개발에 유용하게 사용될 것으로 생각된다.

Table 1. Total polyphenol and flavonoid contents of *Crataegus pinnatifida* Bunge fruit according to different extraction processes

Sample	SE	RE	USE
Phenol contents (GAE ¹) mg/g)	41.27±1.01 ^c	61.31±1.90 ^b	84.20±0.21 ^a
Flavonoid contents (RE ²) mg/g)	10.26±0.29 ^c	25.42±1.22 ^b	41.27±1.47 ^a

¹)Gallic acid equivalent. ²)Rutin equivalent.

Values are mean±SE of triplicates.

Values with different letters (a-c) within a row are significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

요 약

본 연구에서는 아가위나무 열매를 초음파 공정과 기존의 추출 공정을 비교하여 항산화 증진효과에 대해 연구하였다. 초음파 공정이 기존의 추출공정과 비교해 추출수율이 높게 나타났으며 이는 많은 유용활성 성분이 용출된 것으로 생각된다. 또한, 총 페놀 함량에서는 상온교반추출물보다 초음파 공정을 거친 추출물이 약 2배 정도의 함량 증가를 보였으며, 총 플라보노이드에서도 함량의 증가를 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 초음파 공정을 이용해 활성물질들의 파괴 없이 초음파의 높은 에너지로 인하여 더 많은 활성물질들을 추출하여 효능의 증대가 이루어질 것으로 생각된다. 따라서 실제적인 천연물 추출공정에서도 유용성분의 초음파추출은 많은 실험을 통하여 확인해야 할 것이며, frequency(kHz)와 intensity(Watt)의 조절, 시간(min)과 온도(°C) 그리고 시료의 형태에 따라 추출효율 및 유용성분의 영향은 다양한 변수에 의하여 편차가 클 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서 수행된 아가위나무 열매의 추출가공 연구는 식품 및 소재 개발 시 기초자료로 이용될 수 있으며 기능성 소재 연구에 충분한 가치가 있다고 판단된다.

감사의 글

본 연구에서는 중소기업청에서 실시한 2016년도 산학연협력 기술개발사업지원(과제번호 C0442242)에 의하여 수행된 연구 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Hong SS, Hwang JS, Lee SA, Han XH, Ro JS, Lee KS. 2002. Inhibitors of monoamine oxidase activity from the fruits of *Crataegus pinnatifida* Bunge. *Kor J Pharmacogn* 33: 285-290.
- Kwon HJ, Hyun SH, Choung SY. 2005. Traditional Chinese Medicine improves dysfunction of peroxisome proliferator-activated receptor α and microsomal triglyceride transfer protein on abnormalities in lipid metabolism in ethanol-fed rats. *Biofactors* 23: 163-176.
- Chu CY, Lee MJ, Liao CL, Lin WL, Yin YF, Tseng TH. 2003. Inhibitory effect of hot-water extract from dried fruit of *Crataegus pinnatifida* on low-density lipoprotein (LDL) oxidation in cell and cell-free systems. *J Agric Food Chem* 51: 7583-7588.
- Kim JS, Lee GD, Kwon JH, Yoon HS. 1993. Antioxidative effectiveness of ether extract in *Crataegus pinnatifida* Bunge and *Terminalia chebula* Retz. *J Korean Agric Chem Soc* 36: 203-207.
- Wang JM. 1985. *Chinese herbal pharmacology*. Shanghai Science & Technology Publisher, Shanghai, China. p 67-75.
- Kim JH, Kim MU, Cho YJ. 2007. Isolation and identification of inhibitory compound from *Crataegi Fructus* on α -amylase and α -glucosidase. *J Korean Soc App Biol Chem* 50: 204-209.
- Kim JS, Jeong SH. 2007. Quality characteristics of bread added with *Crataegus pinnatifida* Bunge powder. *J East Asian Soc Diet Life* 17: 125-129.
- Shin SJ, Yoon HH. 2011. Quality characteristics of *Sansapayun* with various amounts of *Crataegi fructus* concentrate. *Korean J Culinary Res* 17: 181-190.
- Lee SH, Jeong EJ, Jung TS, Park LY. 2009. Antioxidant activities of seasoning sauces prepared with *Geranium thunbergii* sieb. et Zucc. and *Crataegi fructus* and the quality changes of seasoned pork during storage. *Korean J Food Sci Technol* 41: 57-63.
- Wang RJ, Li DF, Bourne S. 1998. Can 2000 years of herbal medicine history help us solve problems in the year 2000?. In *Biotechnology in the Feed Industry*. Proceeding of Alltech's 14th Annual Symposium. Nottingham University Press, Nottingham, UK. p 273-291.
- Thannickal VJ, Fanburg BL. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L1005-1028.
- Ahn BS, Kim JW, Kim HT, Lee SD, Lee KW. 2010. Antioxidant effects of *Hovenia dulcis* in the streptozotocin-induced diabetic rats. *J Vet Clin* 27: 366-373.
- Shin SL, Lee CH. 2011. Antioxidant activities of Ostrich fern by different extraction methods and solvents. *J Life Sci* 21: 56-61.
- Hwang IG, Woo KS, Jeong HS. 2011. Biological activity and heat treatment processing of foods. *Food Science and Industry* 44(3): 56-65.
- Kim JH, Sung NY, Kwon SK, Jung PM, Choi J, Yoon Y, Song BS, Yoon TY, Kee HJ, Lee JW. 2010. Antioxidant activity of stevia leaf extracts prepared by various extraction methods. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 313-318.
- Earnshaw RG. 1998. Ultrasound: A new opportunity for food preservation. In *Ultrasound in Food Processing*. Povey MJW, Mason TJ, eds. Blackie Academic and Professional, London, UK. p 183-192.
- Lee KJ, Um BH. 2008. Extraction of useful component from natural plants using ultrasound system. *Korean J Biotechnol Bioeng* 23: 101-108.
- Esclapez MD, Garcia-Perez JV, Mulet A, Carcel JA. 2011. Ultrasound-assisted extraction of natural products. *Food Eng Rev* 3: 108-120.
- Ma YQ, Chen JC, Liu DH, Ye XQ. 2009. Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: effect of ultrasound. *Ultrason Sonochem* 16: 57-62.
- Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12: 239-243.
- Abdel-Hameed ESS. 2008. Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chem* 114: 1271-1277.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Kim YS, Choi JM. 2009. Physicochemical properties and dyeability of safflower colorants extracted by ultrasonic treatment. *J Kor Soc Cloth Ind* 11: 337-343.
- Zhang QA, Zhang ZQ, Yue XF, Fan XH, Li T, Chen SF. 2009. Response surface optimization of ultrasound-assisted oil extraction from autoclaved almond powder. *Food Chem* 116: 513-518.
- Kim BC, Kang SW, Chung CH, Heo HJ, Lee SC, Cho SH, Choi SG. 2010. Influence of ultrasonification on extraction yield and chemical property of green tea infusion. *J Agric Life Sci* 44: 91-99.
- Kim JH, Lee SH. 2016. Antioxidative and antimicrobial activities of *Oenothera biennis* extracted by different methods.

- Korean J Food Preserv* 23: 233-238.
27. Lee SO, Lee HJ, Yu MH, Im HG, Lee IS. 2005. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung Island. *Korean J Food Sci Technol* 37: 233-240.
28. Zhao LC, He Y, Deng X, Xia XH, Liang J, Yang GL, Li W, Wang H. 2012. Ultrasound-assisted extraction of syringin from the bark of *Ilex rotunda* Thumb using response surface methodology. *Int J Mol Sci* 13: 7607-7616.
29. Jeong JA, Kwon SH, Kim YJ, Shin CS, Lee CH. 2007. Investigation of antioxidative and tyrosinase inhibitory activities of the seed extracts. *Korean J Plant Res* 20: 177-184.
30. Que F, Mao L, Zhu C, Xie G. 2006. Antioxidant properties of Chinese yellow wine, its concentrate and volatiles. *LWT - Food Sci Technol* 39: 111-117.