

Optimization of microwave-assisted extraction process for blue honeysuckle (*Lonicera coerulea* L.) using response surface methodology

Daehee Park¹, Jae-Jun Lee¹, Jongjin Park¹, Sanghwan Park², Wonyoung Lee^{1,3*}

¹School of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

²Muhak Co., Ltd., Changwon 51341, Korea

³Food and Bio-industry Research Institute, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

반응표면분석법을 이용한 땡땡이 기능성성분의 마이크로웨이브추출조건 최적화

박대회¹ · 이재준¹ · 박종진¹ · 박상환² · 이원영^{1,3*}

¹경북대학교 식품공학부, ²(주)무학, ³식품생물산업연구소

Abstract

Functional compounds including flavonoids, anthocyanins, polyphenols and antioxidants were extracted from blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) using highly efficient microwave-assisted extraction. And extraction process was modeled and optimized according to response surface methodology (RSM). The independent variables (X_n) were ethanol concentration (X_1 : 0, 25, 50, 75, 100%), irradiation time (X_2 : 1, 3, 5, 7, 9 min), and microwave power (X_3 : 60, 120, 180, 240, 300 W). Dependent variables (Y_n) were total flavonoid contents (Y_1), total anthocyanin contents (Y_2), total polyphenol contents (Y_3) and antioxidant activity (Y_4). Four-dimensional response surface plots were generated based on the fitted second-order polynomial models to get optimal conditions. Estimated optimal conditions for 4 responses were ethanol concentration of 54-72%, irradiation time of 7.1-7.6 min, and microwave power of 243-251 W. Ridge analysis predicted the maximal responses of total flavonoid content, total anthocyanin content, total polyphenol content and antioxidant activity were 38.00 mg RE/g, 6.80 mg CGE/g, 14.90 mg GAE/g, 89.10%, respectively. Verification experiment was carried out at predicted optimal conditions and experimental values for total flavonoid content, total anthocyanin content, total polyphenol content and antioxidant activity were 38.10 mg RE/g, 6.72 mg CGE/g, 14.91 mg GAE/g and 89.13%, respectively. No significant difference was observed between predicted and experimental values, indicating good fitness of fitted model and successful application of RSM.

Key words : *Lonicera coerulea* L, microwave-assisted extraction, phenolic compound, response surface methodology

서 론

땡땡이(*Lonicera coerulea* L.)는 인동과(*Caprifoliaceae*) *Lonicera*속에 속하는 쌍떡잎식물의 열매이며, 땡땡이 나무

는 시베리아, 사할린, 중국북부, 티베트, 북한 등지에 약 180여 종 생육하고 있는 냉대성 식물이다(1). 국가생물종지식정보시스템에 따르면, 주요 품종에는 개들쭉(*Lonicera coerulea* var. *emphyllocalyx*), 넓은잎땡땡이(*Lonicera coerulea* var. *longibracteata*), 둥근잎땡땡이(*Lonicera coerulea* var. *venulosa*) 등이 있다. 땡땡이의 주성분은 saccharides(7.2%), lipids(1.52%), organic acids(12.2%)이며, 기능성 성분으로는 polyphenols, ascorbic acid, vitamin B, magnesium, phosphorus, calcium, potassium 등이 포함되어 있다(2). 땡땡이는 헛개나무 추출물과 함께 섭취하면 급성 알코올 중독을

*Corresponding author. E-mail : wonyoung@knu.ac.kr

Phone : 82-53-950-7763, Fax : 82-53-950-7762

Received 14 June 2017; Revised 10 July 2017; Accepted 8 August 2017.

Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

해소하는 데 도움이 되며(3), 또한 허혈성 뇌혈관질환의 예방 또는 개선에도 도움을 줄 수 있다(4). 땀샘의 주요 약리성분에는 phenolic acids, anthocyanins, flavonoids 등 phenolic compounds가 다량 함유되어 있으며 phenolic acids 중에는 chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid 등이 있고, anthocyanins에는 cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-rutinoside, cyanidin-3,5-diglucoside, peonidin-3,5-diglucoside, peonidin-3-glucoside 등이 있으며, flavonoids에는 rutin, quercetin, epicatechin 등을 포함한다(2). 이 화합물들은 과일이나 채소에 색을 부여하며 인간의 건강에 유익한 영향을 주는데, 구체적인 이들의 생리활성으로는 항산화, 항암, 항균, 항알러지, 항변이원성 및 항염증 효과 등이 있으며, 심혈관 질환 및 심장병의 위험도를 감소시킨다는 임상 결과도 보고된 바 있다(5). 천연자원에서 보다 많은 기능성 성분을 추출하기 위해 주로 이용되고 있는 추출방법은 압착법(expression), 환류추출법(reflux extraction), 압력추출법(pressure heating water extraction) 및 초임계유체추출법(supercritical fluid extraction)이 많이 사용되고 있다(6). 압착법은 장치와 조작이 간단하나 수율이 낮으며, 환류추출법은 많은 용매가 필요하며 추출 및 농축과정에서도 많은 시간을 필요로 한다. 압력추출법은 100°C 이상의 고온에서 추출하므로 열에 민감한 성분은 분해되어 소실되기 쉬우며, 초임계유체추출법은 추출속도가 빠르며 용매의 소비가 적지만 비용이 많이 든다. 이러한 추출방법의 문제점을 보완하기 위하여 마이크로웨이브추출법(microwave-assisted extraction, MAE)이 사용되고 있다(7). MAE 추출은 적은 용매와 에너지를 사용하여 단시간에 원하는 물질을 추출할 수 있어 기존의 환류추출법을 비롯한 soxhlet추출법, 압력추출법, 초임계유체추출법 등에 비해 추출 효율 및 에너지효율이 우수하며, 순도 높은 기능성성분을 추출할 수 있어 환경친화적인 특징과 경제성을 지니고 있는 것으로 보고되고 있다. 이러한 microwave 처리 및 추출법의 특성으로 인하여 단백질의 변성이나 비타민의 파괴를 감소시킬 수 있고, 향기성분의 손실이나, 색소의 파괴를 막을 수 있는 장점으로 주로 식품의 조리, 가공, 건조, 살균, 보존 및 효소의 불활성화를 위해 다양하게 사용되고 있다(8). 이에 본 연구는 땀샘의 기능성성분을 추출하기 위한 최적의 추출조건을 알아보기 위하여 기존의 추출방법보다 추출효율 및 에너지효율이 좋은 것으로 알려져 있는 MAE 추출장치로 에너지강도와 추출시간을 상이하게 하여 에탄올을 용매로 추출하고, 실험구간의 유의성을 확인하기 위해 SAS software(SAS, Version 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 사용하여 수학적 통계방법에 의해 모델링을 한 뒤 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 이용해 추출조건을 최적화하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구의 실험재료인 땀샘이는 경북 문경에서 2014년 5월 말에 갓 수확한 것을 구입하였다. 땀샘이 시료는 동결건조를 한 뒤 분쇄하여 40 mesh 통과분을 지퍼백에 넣어 극저온냉동고(SW-UF-500P, Samwon Co., Busan, Korea)에 보관하였다.

마이크로웨이브 추출장치 및 추출방법

마이크로웨이브 추출은 2,450 MHz 주파수의 실험용 상압형 추출장치(Soxwave 100, Prolab, Fontenay, France)를 이용하여 programmable power(60-300 W)와 시간제어가 가능하고 환류냉각관이 장착된 추출장치를 사용하였다. 추출방법은 Fig 1과 같이 extraction vessel에 1 g의 시료와 용매 50 mL를 가한 후 추출공정에 변수를 조절하여 추출하고 여과지(Whatman No. 1, Whatman Co., Maidstone, UK)를 사용하여 흡입여과 한 후 100 mL의 부피로 하여 분석용 시료로 사용하였다.

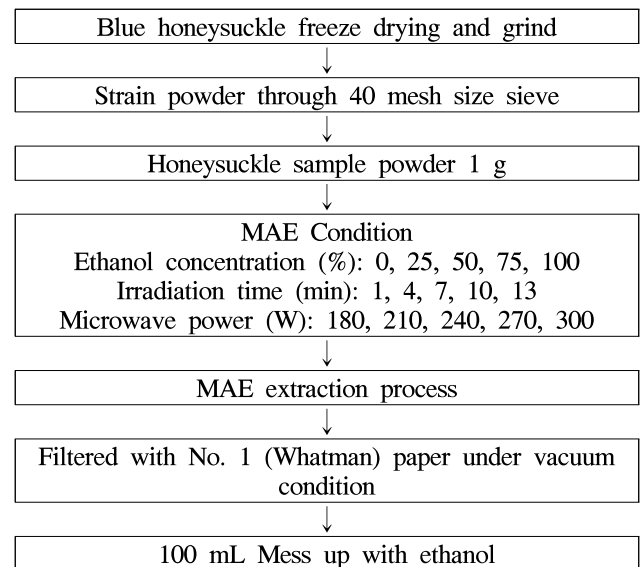


Fig. 1. Scheme for microwave-assisted extraction process for blue honeysuckle.

추출조건 설정을 위한 실험계획

본 실험은 반응표면분석법(RSM)을 이용하여 최적 추출조건의 예측과 추출조건에 따른 추출물의 기능성 성분 함량을 모니터링 하였다. 본 실험에서 중심합성계획법(central composite design, CCD)를 통해서 추출공정에 중요한 독립변수(X_i)로 고려되는 인자 즉, 용액 농도(X_1), 추출시간(X_2) 및 microwave power(X_3)에 대한 실험범위를 설정하여 각각을 5단계로 부호화 하였으며(Table 1) 중심합성계획에 따라 Table 2와 같이 20구로 설정하여 추출실험을 하였다. 또한 이들 독립변수에 영향을 받는 종속변수(Y_n) 즉, 총 플라보

노이드 함량(Y₁), 총 안토시아닌 함량(Y₂), 총 폴리페놀 함량(Y₃), DPPH 라디칼 소거능(Y₄)을 측정하여 그 값을 회귀 분석에 사용하였다. 또한 추출조건이 땡덩이의 기능성성분의 추출특성에 미치는 영향을 예측된 모델식을 바탕으로 mathematica program(Mathematica, Wolfram, Champaign, IL, USA)을 이용하여 4차원 반응표면분석으로 해석하였다.

Table 1. The central composite design for optimization of microwave-assisted extraction of blue honeysuckle

X _n	Response variables	Levels				
		-2	-1	0	1	2
X ₁	Ethanol concentration (%)	0	25	50	75	100
X ₂	Irradiation time (min)	1	4	7	10	13
X ₃	Microwave power (W)	180	210	240	270	300

Table 2. Central composite design (CCD) matrix for total flavonoid content (TFC), total anthocyanin content (TAC), total polyphenol content (TPC), DPPH radical scavenging (DPPH) of blue honeysuckle under ethanol concentration, irradiation time and microwave power

Exp No.	Extraction conditions			Responses			
	Ethanol concentration (%)	Irradiation time (min)	Microwave power (W)	TFC (mg GAE/g)	TAC (mg CGE/g)	TPC (mg GAE/g)	DPPH (%)
1	25	4	210	63.54±0.38	0.33±0.00	13.79±0.39	91.22±0.39
2	25	4	270	62.96±0.67	0.35±0.00	13.96±0.35	91.39±0.55
3	25	10	210	62.51±0.67	0.36±0.02	14.51±0.38	91.50±0.23
4	25	10	270	63.97±1.24	0.38±0.01	14.45±0.43	91.60±0.27
5	75	4	210	63.11±1.02	0.35±0.01	13.81±0.11	91.46±0.50
6	75	4	270	63.26±0.81	0.37±0.00	14.4±0.12	91.77±0.44
7	75	10	210	64.03±0.80	0.36±0.00	14.29±0.13	92.11±0.17
8	75	10	270	64.17±1.17	0.4±0.01	14.35±0.14	92.28±0.06
9	0	7	240	61.75±1.11	0.3±0.01	13.83±0.38	91.46±0.17
10	100	7	240	62.51±1.10	0.36±0.00	14.38±0.12	92.01±0.12
11	50	1	240	63.38±0.67	0.32±0.00	13.78±0.31	91.22±0.39
12	50	13	240	63.52±1.05	0.34±0.00	14.11±0.02	91.46±0.11
13	50	7	180	64.02±1.09	0.33±0.01	13.82±0.19	91.39±0.49
14	50	7	300	64.26±1.26	0.38±0.01	14.28±0.12	91.32±0.22
15	50	7	240	65.97±0.80	0.44±0.00	14.62±0.39	92.32±0.00
16	50	7	240	65.61±1.46	0.47±0.00	14.68±0.02	92.55±0.43
17	50	7	240	65.73±1.53	0.46±0.00	14.68±0.22	92.59±0.12
18	50	7	240	65.76±1.07	0.44±0.01	14.69±0.21	92.41±0.21
19	50	7	240	65.8±1.61	0.44±0.01	14.65±0.17	92.55±0.43
20	50	7	240	65.87±0.91	0.45±0.01	14.65±0.28	92.45±0.17

총 플라보노이드 함량 측정

땡덩이 내 총 플라보노이드 함량(TFC)의 측정은 aluminum colorimetric assay(9)를 사용하였다. 땡덩이 추출물 70 µL에 증류수 430 µL를 가한 뒤 5% NaNO₂ 50 µL를 첨가하였다. 그리고 10% Al(NO₃)₃ · 9H₂O를 가한 뒤 상온에서 6분간

반응시킨 후 1 N NaOH 500 µL를 첨가하였다. 반응액의 흡광도는 510 nm에서 UV-spectrophotometer(Shimadzu Co., UV-2550, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 표준물질로 rutin(Sigma-Aldrich)을 이용하여 검량곡선의 작성에 사용하였다.

총 안토시아닌 함량 측정

총 안토시아닌 함량(TAC) 측정은 Truong 등(10)의 실험 방법을 참고하여 측정하였다. 땡덩이 추출물을 각각 500 µL 0.025 M potassium chloride(pH 1.0)와 0.4 M sodium acetate(pH 4.5)를 가하여 10배 희석한 1 mL 반응액을 만들고 상온에서 15분간 반응시킨 후 UV-spectrophotometer (Shimadzu Co.)를 이용해 흡광도 값 530 nm, 700 nm에서

각각 측정하였다. 측정된 값을 다음 산도차등분석식을 이용하여 산출하였다.

$$TAC(mg \text{ cyaniding-3-glucoside/L}) = \frac{A \times 445 \times DF}{26900}$$

$$A=(A_{530\text{ nm}}-A_{700\text{ nm}})_{\text{pH1.0}}-(A_{530\text{ nm}}-A_{700\text{ nm}})_{\text{pH4.5}}$$

DF : dilution factor of the sample

총 폴리페놀 함량 측정

맹맹이 추출액의 총 폴리페놀 함량(TPC)은 Folin-Denis 법(11)을 변형시켜 측정하였다. 먼저 추출액 100 μL 에 50 μL Folin-Ciocalteu reagent(Sigma-Aldrich)용액을 가한 뒤 300 μL 의 2% Na_2CO_3 를 넣고 실온에 15분간 반응시켰다. 반응이 종료되면 1 mL의 증류수를 넣은 후, UV-spectrophotometer(Shimadzu Co., UV-2550, Tokyo, Japan)를 이용해 흡광도 값을 725 nm에서 측정하였다. 검량곡선은 gallic acid(Sigma-Aldrich)를 표준물질로 작성하였으며, 측정결과는 mg of gallic acid equivalent per g(mg GAE/g)로 나타내었다.

Table 3. Regression coefficients and analysis of variance (ANOVA) results for the MAE models for dependent responses

Coefficients	TFC ¹⁾	TAC	TPC	DPPH
Intercept	65.71 ^{**3)}	0.449 ^{**}	14.663 ^{**}	92.467 ^{**}
ETOH ²⁾	0.19	0.011 ^{**}	0.078 ^{**}	0.188 ^{**}
TIME	0.13	0.009 ^{**}	0.144 ^{**}	0.133 ^{**}
POWER	0.10	0.013 ^{**}	0.105 ^{**}	0.038
ETOH*ETOH	-0.95 ^{***}	-0.030 ^{***}	-0.139 ^{***}	-0.191 ^{***}
ETOH*TIME	0.23	-0.003	-0.010 ^{**}	0.084
ETOH*POWER	-0.07	-0.003	0.068	-0.026
TIME*TIME	-0.62 ^{***}	-0.030 ^{***}	-0.179 ^{***}	-0.290 ^{***}
TIME*POWER	0.25	0.223	-0.095 ^{**}	-0.026
POWER*POWER	-0.45 ^{**}	-0.024 ^{***}	-0.153 ^{***}	-0.286 ^{***}
R square	0.95	0.97	0.94	0.95
Lack of fit	0.36	0.28	0.34	0.41
Model significance	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Stationary points	maximal	maximal	maximal	maximal

¹⁾TFC, total flavonoid content; TAC, total anthocyanin content; TPC, total polyphenol content; DPPH, DPPH radical scavenging activity.

²⁾ETOH, ethanol concentration; TIME, irradiation time; POWER, microwave power.

³⁾*** p<0.001, ** 0.001<p<0.05, * 0.05<p<0.1.

DPPH 라디칼 소거능 측정

맹맹이 추출액의 DPPH 라디칼 소거능 측정은 Blois의 방법(12)을 변형하여 사용하였다. DPPH radical scavenging activity 측정을 위해 DPPH 시약은 빛을 차단한 상태에서 0.0039 g에 에탄올 100 mL를 가한 후 magnetic stirrer(PC-420D, Corning Co., NY, USA)을 이용하여 2시간 동안 용액을 안정화시켜 사용하였다. 그리고 제조한 DPPH용액 900 μL 에 맹맹이 추출물 100 μL 을 가한 뒤 30분 동안 암실에서 반응시켰다. 반응이 완료된 시약은 UV-spectrophotometer를 사용해 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 값은 다음과 같은 식을 이용해 DPPH 라디칼 소거능을 산출하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity(\%)}=(1-\frac{\text{sample absorbance}}{\text{blank absorbance}})\times 100$$

통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복 측정하였다. 그리고 조건 별 유의적 차이를 확인하기 위해 IBM SPSS software(version 22, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 Duncan's multiple range test를 실시하였으며 유의성 분석은 p<0.05 수준에서 진행되었다.

결과 및 고찰

총 플라보노이드 함량 변화

각 조건에 따른 맹맹이 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Table 2와 같으며 적합 모델식은 아래에 나타내었다.

$$Y_{\text{TFC}}=65.71+0.19X_1+0.13X_2+0.10X_3-0.95X_1^2+0.23X_1X_2-0.07X_1X_3-0.62X_2^2+0.25X_2X_3-0.45X_3^2$$

맹맹이 추출물의 적합 모델의 R²은 0.95이었으며 0.1%이내에서 유의성을 나타내었다. 이러한 회귀식을 바탕으로 총 플라보노이드 함량의 최대값은 에탄올의 농도 52.9%,

Table 4. Predicted levels of microwave extraction of blue honeysuckle extract for the maximum responses of total flavonoid contents (TFC), total anthocyanin contents (TAC), total polyphenol contents (TPC), DPPH radical scavenging activity (DPPH) by the ridge analysis

Responses	R ²	Pro>F	X ₁ (%)	X ₂ (min)	X ₃ (W)	Maximum Predicted	Morphology
TFC	0.95	0.0001	52.9	7.5	244	65.74 mg GAE/g	Maximum
TAC	0.97	0.0001	54.8	7.4	248	0.45 mg CGE/g	Maximum
TPC	0.94	0.0001	56.9	7.7	250	14.71 mg GAE/g	Maximum
DPPH	0.95	0.0001	64.1	7.9	242	92.54%	Maximum

추출시간 7.5 분 및 microwave power는 248 W일 때 65.74 mg RE/g로 예측되었다(Table 5). 총 플라보노이드 함량에 영향을 미치는 조건은 에탄올의 농도와 추출 시간이었으며 microwave power는 플라보노이드 함량에 큰 영향을 나타내지 않았다(Fig. 2). Kim 등(13)의 야관문의 경우에도 에탄올 농도가 영향을 준다고 보고를 하였으며, 용매의 농도가 결정적인 요인이었다는 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다. 반면에 Lee 등(14)의 결과에서는 마이크로웨이브 파워가 쥐깨풀 유용성분을 추출하는데 영향을 미친다고 보고하여 본 실험과는 반대의 결과를 나타내었다.

Table 5. The range of optimum MAE condition for the maximum responses of TFC, TAC, TPC, DPPH from blue honeysuckle

MAE conditions	Predicted optimal condition
Ethanol concentration (%)	53-64
Irradiation time (min)	7.4-7.9
Microwave power (W)	242-250

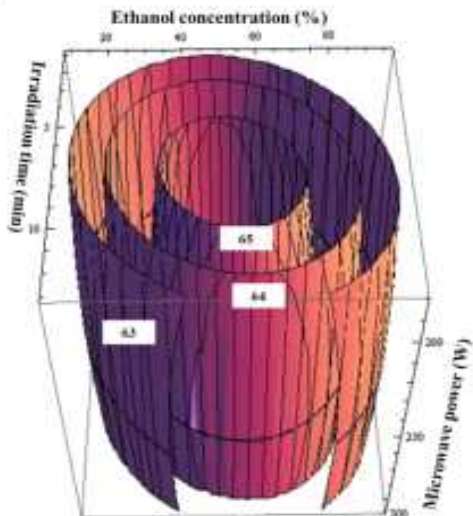


Fig. 2. Four-dimensional response surface plots for TFC (at constant values of 63, 64 and 65 mg RE/g) from blue honeysuckle as a function of microwave power, ethanol concentration, and irradiation time under microwave-assisted extraction.

총 안토시아닌 함량 변화

안토시아닌은 강력한 항산화 활성, 항염증, 항암 등 다양한 생리활성에 대한 기적이 보고되고 있다(15). 각 조건에서 추출한 땀샘이 추출물의 총 안토시아닌 함량은 Table 2와 같다. 이러한 결과를 통해 추출조건에 따른 총 안토시아닌 함량에 대한 적합 모델식은 아래와 같다.

$$Y_{TAC} = 0.449 + 0.011X_1 + 0.009X_2 + 0.013X_3 - 0.030X_1^2 - 0.003X_1X_2 - 0.003X_1X_3 - 0.030X_2^2 + 0.223X_2X_3 - 0.153X_3^2$$

땀샘이 추출물의 총 안토시아닌 함량에 따른 추출물의 회귀식의 R²은 0.97이고 유의성은 0.1%이내의 수준에서 유의성을 나타내었다. 추출물의 안토시아닌 함량에 대한 최대값은 에탄올의 농도 54.8%, 추출시간 7.4분 및 microwave power 248 W일 때 0.45 mg CGE/g으로 예측되었다(Table 5). Hong(16)의 논문에서 acai에 함유된 phenolic 성분은 에탄올 농도가 증가할수록 증가한다고 보고 하였으며 본 결과와 유사한 경향을 나타내었다(Fig. 3).

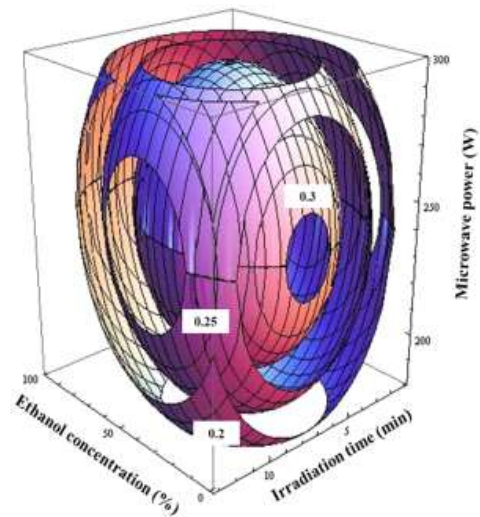


Fig. 3. Four-dimensional response surface plots for TAC (at constant values of 0.2, 0.25, and 0.3 mg CGE/g) from blue honeysuckle as a function of microwave power, ethanol concentration, and irradiation time under microwave-assisted extraction.

총 폴리페놀의 함량 변화

식품 유래 기능성물질의 대표적인 성분 중 하나로 플라보노이드, 안토시아닌 등과 같은 페놀성분이 있다. 이들 폴리페놀은 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl를 가진 방향족 화합물이며 항암, 항염증 등의 작용을 지니고 있는 항산화성 생리활성 물질이다(17,18). 중심합성계획법에 의한 추출조건별 총 폴리페놀 함량은 Table 2에 나타내었으며, 적합 모델식은 아래와 같다.

$$Y_{TPC} = 14.663 + 0.078X_1 + 0.144X_2 + 0.105X_3 - 0.139X_1^2 - 0.010X_1X_2 + 0.068X_1X_3 - 0.179X_2^2 - 0.095X_2X_3 - 0.153X_3^2$$

땀샘이 추출물의 총 폴리페놀 함량에 대한 회귀식의 R²은 0.94이고 유의성은 0.1%이내의 수준에서 유의성을 나타내었다. 추출물의 총 폴리페놀 함량에 대한 최대점은 에탄올의 농도 56.9%, 추출시간 7.7분 및 microwave power 250 W 일 때 최대값은 14.71 mg GAE/g로 예측되었다(Table 5). Lee 등(19)의 참나무 겨우살이의 경우 물 추출물보다 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량이 높게 나타나 본 실험

과 유사한 결과를 나타내었다. 총 폴리페놀 함량의 4차원 반응표면그래프(Fig. 4)는 ethanol농도가 57%, 추출시간이 7.7분, microwave power가 250 W에 가까울수록 함량이 증가하는 것을 알 수 있었다. Pare 등(20)은 폴리페놀과 같은 목적성분을 추출하는 데 있어 마이크로웨이브 추출이 더 효과적이라고 하였으며, 이는 시료가 마이크로웨이브 에너지에 노출됨으로써 시료 내부의 목적성분이 용매에 추출되기 때문이라고 하였다.

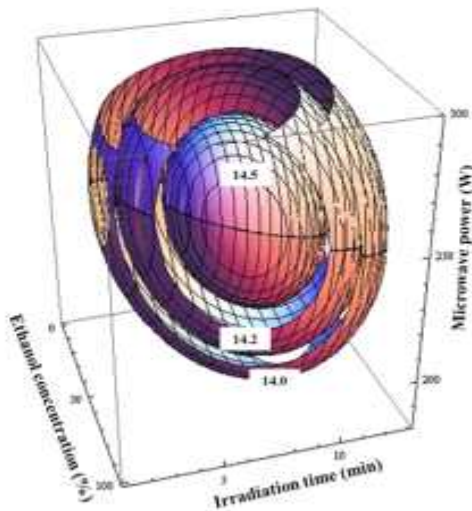


Fig. 4. Four-dimensional response surface plots for TPC (at constant values of 14, 14.2, and 14.5 mg GAE/g) from blue honeysuckle as a function of microwave power, ethanol concentration, and irradiation time under microwave-assisted extraction.

DPPH 라디칼 소거능

천연물의 DPPH 라디칼 소거능은 식품 중의 지방질 산화를 억제하는 특성을 가지고 있으며, 인체 내에서는 활성 라디칼에 의한 노화를 억제시키는 역할을 하고 있다(21). 중심합성계획법에 의한 추출조건별 DPPH 라디칼 소거능 변화는 Table 2와 같으며 에탄올 농도, 추출 시간, 마이크로웨이브 에너지에 따른 항산화능 변화의 적합 모델식은 아래와 같다.

$$Y_{DPPH} = 92.467 + 0.188X_1 + 0.133X_2 + 0.038X_3 - 0.191X_1^2 + 0.084X_1X_2 - 0.026X_1X_3 - 0.290X_2^2 - 0.026X_2X_3 - 0.286X_3^2$$

맹맹이 추출물의 항산화능에 대한 회귀식의 R^2 는 0.95이고 유의성은 0.1%이내의 수준에서 유의성을 나타내었다. 추출물의 항산화능은 에탄올의 농도 64.10%, 추출시간 7.9분 및 microwave power 242 W일 때 92.54%로 가장 높은 값을 나타내었으며(Table 5), 이러한 최대값을 나타내는 조건을 벗어날수록 항산화능은 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 5). 본 연구에서는 에탄올 농도가 30-60% 범위에서 가장 높은 항산화능을 나타냈는데(Fig. 5) Lee 등(22)의 포

도씨 추출물의 경우에도 본 연구와 유사하게 35-67% 에탄

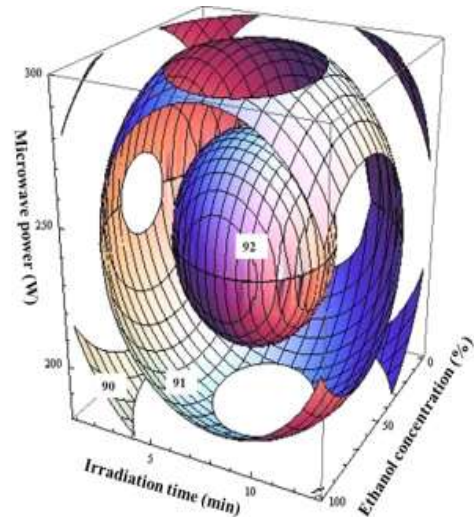


Fig. 5. Four-dimensional response surface plots for DPPH radical scavenging activity (at constant values of 90, 91, and 92%) from blue honeysuckle as a function of microwave power, ethanol concentration, and irradiation time under microwave-assisted extraction.

올 농도 범위에서 가장 높은 항산화능을 보였다고 한다. 반면에 Joo 등(23)이 연구한 백지 추출물의 마이크로웨이브 추출조건에 따른 DPPH 라디칼 소거능의 변화에서는 물을 용매로 사용한 추출물의 항산화능이 더 높게 나타나 본 연구와 상이한 결과를 나타내었다.

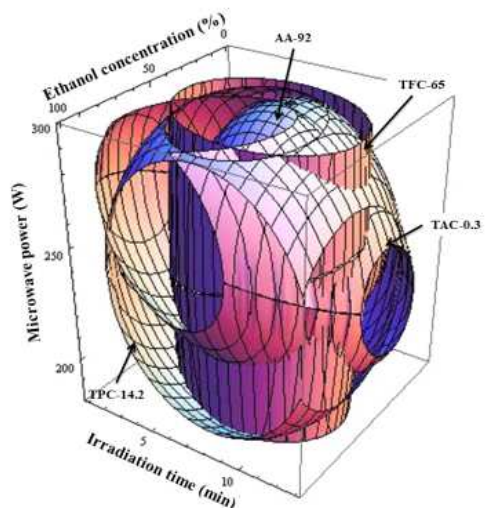


Fig. 6. Superimposed four-dimensional response surface plots for the optimization of total flavonoid content (65 mg RE/g), total anthocyanin content (0.3 mg CGE/g), total polyphenol content (14.2 mg GAE/g) and DPPH radical scavenging activity (92%) from blue honeysuckles under microwave-assisted extraction.

최적 추출조건 예측

맹맹이의 기능성성분에 대한 최적 추출조건을 설정하기

위하여 각 조건별 추출물의 총 플라보노이드 함량, 총 안토시아닌 함량, 총 폴리페놀 함량 그리고 항산화 활성의 contour maps를 superimposing하여 최적 범위를 예측하였다 (Fig. 6). 땀땀이 최적 추출조건 범위는 에탄올 농도 53-64%, 추출시간 7.4-7.9 min, microwave power 242-250 W로 나타났다 (Table 5). 최적 조건 내에서 임의의 점 에탄올 농도 60%, 추출 시간 7.5 min, microwave power 245 W에 대입한 결과, TFC는 65.74 mg RE/g, TAC는 0.45 mg CGE/g, TPC는 14.71 mg GAE/g, DPPH는 92.54%의 수치로 나타났다 (Table 6). 예측 결과에 대해 모델식을 검증하기 위해 주어진 임의의 조건에서 확인실험을 진행하였으며, 그 결과 TFC, TAC, TPC 그리고 DPPH는 각각 64.09 mg RE/g, 0.38 mg CGE/g, 14.29 mg GAE/g, 91.85%의 수치를 나타내었다 (Table 6).

Table 6. Comparison between predicted and experimental values of response variable of blue honey suckle extract at the given condition¹⁾ within the range of optimal condition

Response variables ²⁾	Predicted value	Experimental value
TFC (mg RE/g)	65.74	64.09
TAC (mg CGE/g)	0.45	0.38
TPC (mg GAE/g)	14.71	14.29
DPPH (%)	92.54	91.85

¹⁾The given conditions; 60% of ethanol concentration, 7.5 min of irradiation time, 245 W of microwave power.

²⁾TFC, total flavonoid content; TAC, total anthocyanin content; TPC, total polyphenol content; DPPH, DPPH radical scavenging activity.

요 약

본 실험은 땀땀이의 마이크로웨이브 추출장치를 활용한 플라보노이드, 안토시아닌, 폴리페놀, 항산화능 등을 반응 표면분석법을 통하여 최적추출조건의 예측과 추출조건에 따른 추출물의 기능성 성분 함량을 모니터링 하였다. 중심 합성계획법을 통해 추출공정에 중요한 독립변수인 용액농도(X_1 : 0, 25, 50, 75, 100%), 추출시간(X_2 : 1, 4, 7, 10, 13 min), microwave power(X_3 : 180, 210, 240, 270, 300 W)를 각각 독립변수로 설정하였고, 총 플라보노이드 함량(Y_1), 총 안토시아닌 함량(Y_2), 총 폴리페놀 함량(Y_3) 그리고 DPPH 라디칼 소거능(Y_4) 등을 종속변수로 하여 회귀분석을 실시하였다. 예측된 최적조건 범위는 에탄올 농도 53-64%, 추출시간 7.4-7.9 min, microwave power 242-250 W로 나타났다. 플라보노이드 함량의 최대점은 에탄올의 농도 52.9%, 추출시간 7.5분, microwave power 244 W일 때 최대값은 65.74 mg RE/g으로 예측되었다. 안토시아닌 함량의 최대점은 에탄올의 농도 54.8%, 추출시간 7.4분, microwave power 248 W일 때 최대값은 0.45 mg CGE/g으로

예측되었다. 폴리페놀 함량의 최대점은 에탄올의 농도 56.9%, 추출시간 7.7분 및 microwave power 250 W 일 때 최대값은 14.71 mg GAE/g로 예측되었다. 항산화능의 최대점은 에탄올의 농도 64.10%, 추출시간 7.9분 및 microwave power 242 W일 때 최대값은 92.54%로 예측되었다. 예측값과 실험값의 차이가 거의 없는 것으로 보아 본 실험은 정확도가 높고 신뢰성이 높음을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 땀땀이 마이크로웨이브 추출방법에 있어서 최적의 추출조건에 대한 정보를 주는 것이며, 더 나아가 고농도 땀땀이 기능성 성분이 함유된 제품 개발에 기초정보를 제공하는 결과라 사료된다.

References

- Eum JH, Suh MC, Kwon DH, Yoon BK, Choi WJ, Kwon KM, Kim CS (2005) Food composition for improving liver function comprising a *Lonicera caerulea* L. var. *edulis* extract. Korea Patent No. 10-2005-0063031
- Svarcova I, Heinrich J, Valentova K (2007) Berry fruits as a source of biologically active compounds: the case of *Lonicera caerulea*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 151, 163-174
- Choi GH, Kim JG, Kwon ST (2011) Protective effects of food including *Hovenia dulcis* on acute alcohol intoxication, J Korean Soc Food Sci Nutr, 40, 1107-1112
- Cho SH, Kim WK, Lee JC (2012) A pharmaceutical health food for preventing or improving the brain ischemia disease containing extract of *Lonicera caerulea* L. var. *edulis* fruits. Korea Patent No. 10-2012-0027697
- Kang BT, Kwon DH, Choi WJ, Kim SH, Park DC (2008) Antioxidant and antiviral activities of polyphenolics in plum wine. Korean J Food Preserv, 15, 891-896
- Joo EY, Kim NW (2008) Polyphenol contents and antioxidant activity of extracts from *Angelica dahurica* root after different conditions of microwave-assisted extraction. Korean J Food Preserv, 15, 133-138
- Lee EJ, Choi SW, Kim HK, Kwon JH (2008) Characteristics of microwave-assisted extraction for catechins from grape seed. Korean J Food Sci Technol, 40, 510-515
- Lee DS, Ko WM, Kim KS, Kim DC, Yoon CS, Cho KH, Cui X, Oh HC, Kim YC (2014) The comparison between hot-water extracts and microwave extracts of *Scutellaria radix* for antioxidant and neuroprotective effects. Kor J Pharmacogn, 45, 55-61
- Teng H, Ghafoor K, Choi YH (2009) Optimization of

- microwave-assisted extraction of active components from Chinese quince using response surface methodology. J Korean Soc Appl Biol Chem, 52, 694-701
10. Truong VD, Hu Z, Thompson RL, Yencho GC, Pecota KV (2012) Pressurized liquid extraction and quantification of anthocyanins in purple-fleshed sweet potato genotypes. J Food Compos Anal, 26, 96-103
 11. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol, 299, 152-178
 12. Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 181, 1199-1200
 13. Kim DI, Hong JH (2012) Optimization of ethanol extraction conditions for functional components from *Lespedeza cuneata* using response surface methodology. Korean J Food Cookery Sci, 28, 275-283
 14. Lee EJ, Kwon YJ, Noh JE, Lee JE, Lee SH, Kim JK, Kim KS, Choi YH, Kwon JH (2005) Optimization of microwave-assisted process for extraction of effective components from *Mosla dianthera* M.. Korean J Food Preserv, 12, 617-623
 15. Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Huang D, Owens J, Agarwal A, Jensen GS, Hart AN, Shanbrom E (2006) Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai). J Agric Food Chem 54, 8604-8610
 16. Hong JH (2011) Optimization of extraction conditions for functional components from Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) by response surface methodology. J East Asian Soc Dietary Life, 21, 713-722
 17. An BJ, Bae MJ, Choi HJ, Zhang YB, Sung TS, Choi C (2002) Natural products, organic chemistry: isolation of polyphenol compounds from the leaves of Korean persimmon (*Diospyrus kaki L. Folium*). J Korean Soc Agric Chem Biotechnol, 45, 212-217
 18. Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H (2000) Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor κ B in cancer cells versus normal cells. Arch Biochem Biophys, 376, 338-346
 19. Lee HJ, Do JR, Kwon JH, Kim HK (2011) Physiological properties of oak mistletoe (*Loranthus yadoriki*) extracts by microwave extraction condition. Korean J Food Preserv, 18, 72-78
 20. Pare JRJ, Sigouin M, Lapointe J (1991) Microwave-assisted natural products extraction. US Patent
 21. Lim TS, Do JR, Kwon OJ, Kim HK (2007) Monitoring on extraction yields and functional properties of onion (*Allium cepa*) extracts by using response surface methodology. J Korean Soc Food Sci Nutr, 36, 105-110
 22. Lee EJ, Kim JS, Kwon JH (2008) Optimization of microwave-assisted extraction conditions for total catechin and electron donating ability of grape seed extracts. Korean J Food Preserv, 15, 840-846
 23. Joo EY, Kim NW (2008) Polyphenol contents and antioxidant activity of extracts from *Angelica dahurica* root after different conditions of microwave-assisted extraction. Korean J Food Preserv, 15, 133-138