

반응표면분석법을 이용한 안젤리카로부터 폴리페놀 성분의 추출공정 최적화

이승범 · 박보라 · 홍인권[†]

단국대학교 화학공학과
(2018년 2월 19일 접수, 2018년 3월 7일 심사, 2018년 3월 17일 채택)

Optimization of Extraction Process for Total Polyphenols from Angelica Using Response Surface Methodology

Seung Bum Lee, Bo Ra Park, and In Kwon Hong[†]

Department of Chemical Engineering, Dankook University, Gyeonggi 16890, Korea
(Received February 19, 2018; Revised March 7, 2018; Accepted March 17, 2018)

초 록

본 연구에서는 항산화성분함량이 높다고 알려진 안젤리카를 이용하여 폴리페놀을 추출하고 반응표면분석법을 이용하여 추출과정을 최적화하였다. 반응표면분석법의 반응치로는 추출수율과 폴리페놀함량을 설정하였고, 추출공정의 계량인자로는 추출시간, 주정/초순수 부피비, 추출온도를 이용하였다. 추출수율과 폴리페놀함량 모두 계량인자의 주효과도와 교호효과도를 모두 고려하였을 때 가장 큰 영향을 미치는 인자는 추출시간이었다. 또한 반응표면분석 결과 안젤리카의 최적추출조건은 추출시간이 2.8 h, 주정/초순수 부피비 64.0 vol%, 추출온도 56.6 °C로 나타났다. 이 조건의 추출수율은 24.6%, 폴리페놀함량은 8.76 mg GAE/g으로 산출되었다. 추출수율과 폴리페놀함량에 대한 회귀방정식의 결정계수 R^2 은 각각 81.4%와 75.4%이었으며, 종합 만족도는 $D = 0.80$, 유의성은 5% 이내의 수준에서 인정되었다.

Abstract

In this study, polyphenols were extracted from Angelica, which are known to have a high antioxidant content and the extraction process was optimized using the response surface methodology. The extraction yield and the total polyphenols were set as response values for the methodology. Quantitative factors in the extraction process were the extraction time, volume ratio of alcohol/ultrapure water, and extraction temperature. When considering both the main and interaction effects, the greatest influence factor on the extraction yield and total polyphenols was the extraction time. The optimum extraction time and temperature and alcohol/ultrapure water volume ratio for angelica were 2.8 h, 56.6 °C and 64.0 vol% respectively. The extraction yield and total polyphenols when using the conditions were calculated to be 24.6% and 8.76 mg GAE/g. respectively. Determination coefficients of regression equations for the extraction yield and total polyphenols were 81.4 and 75.4%, respectively. Also the overall satisfaction level was found to be 0.80 and the significance was confirmed within 5%.

Keywords: total polyphenols, extraction yield, angelica, response surface methodology

1. 서 론

고령화 사회에서 노화방지에 대한 관심이 급증하면서 노화를 일으키는 원인인 세포 내의 활성산소(reactive oxygen species)의 생성을 예방하는 항산화물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 세포 내에 활성산소가 지나치게 많이 축적될 경우 항산화 시스템의 균형이 깨지게 된다. 생체 내에는 항산화 효소 및 천연 항산화제가 존재하지만 더욱 효과적으로 예방하기 위해 항산화 물질을 섭취하는 것이 좋다 [1-3]. 대표적으로 잘 알려진 항산화 물질로는 폴리페놀(polyphenol)이

있으며, 폴리페놀을 함유한 천연물에는 녹차, 블루베리, 안젤리카 등이 있다[4-5]. 이 중 안젤리카(angolica)는 미나리과 식물로 프랑스나 벨기에 등지에서 서식한다. 허브의 한 종류로 약재 및 요리용으로 사용하는데 대부분 잎, 줄기, 뿌리 등을 섭취한다. 안젤리카의 주성분으로는 비타민A, 게르마늄, 철분 등이 있으며, 혈액순환강화, 빈혈, 류마티스성 염증과 기관지염 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다[6].

추출공정의 최적화 설계방법으로 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 이용하였다. 반응표면분석법이란 최적화 실험 계획법으로 반응치(response)에 영향을 주는 실험인자를 찾은 후 소수의 주요인자를 이용하여 최적반응치를 찾는다. 이것은 현재보다 더 나은 공정을 원할 때 사용하는 분석방법이며, 수리 통계적 기술로 실험설계법에 의해 실험하여 얻은 데이터를 모델함수에 최적화시킨다. 반응표면분석법은 실험목적 달성을 위한 품질특성값(y)의 반응치와 반응치에 영향을 주는 변수(x)를 나타내는 계량인자(quantitative fac-

[†] Corresponding Author: Dankook University,
Department of Chemical Engineering, Gyeonggi 16890, Korea
Tel: +82-31-8005-3544 e-mail: khong@dankook.ac.kr

Table 1. Experimental Data on Extraction Yield and Total Polyphenols of Angelica Based on Central Composite Design by Response Surface Method

Exp. No.	Extraction conditions			Experimental data	
	Time (h)	EtOH (vol%)	Temp (°C)	Extraction yield (wt%)	Total polyphenols (mg GAE/g)
1	2.5	55	50	22.90	8.901
2	3.5	55	50	23.15	9.337
3	2.5	65	50	19.35	9.546
4	3.5	65	50	23.75	8.587
5	2.5	55	60	22.75	8.030
6	3.5	55	60	22.85	7.207
7	2.5	65	60	22.55	9.482
8	3.5	65	60	21.25	7.498
9	2.159	60	55	22.05	7.401
10	3.841	60	55	20.80	6.675
11	3	51.591	55	20.35	6.603
12	3	68.409	55	24.05	8.498
13	3	60	46.591	20.45	7.933
14	3	60	63.409	22.20	7.473
15	3	60	55	25.25	9.579
16	3	60	55	23.35	8.336
17	3	60	55	24.40	9.457
18	3	60	55	23.95	8.426
19	3	60	55	24.15	7.086
20	3	60	55	22.90	8.540

tor)와 계수인자(qualitative factor)로 구성된다[7-10].

따라서 본 연구에서는 천연물 중 폴리페놀함량(total polyphenols)이 높은 안젤리카를 선정하여 안젤리카로부터 유효성분을 추출하기 위한 공정에 반응표면분석법을 적용시키고자 하였다. 추출공정의 계량인자로는 추출시간, 추출온도, 주정/초순수 부피비 등을 이용하였고, 반응치로는 추출수율(extraction yield)과 폴리페놀함량 등을 설정하였다.

2. 실험방법

2.1. 천연물로부터 유효성분의 추출

안젤리카로부터 유효성분을 추출하기 위해 용매 500 mL를 기준으로 분쇄된 시료의 양을 20 g으로 고정하여 실험을 수행하였다. 실험에 사용된 용매로는 초순수와 95%-주정을 이용하였으며, 주정/초순수 부피비, 추출온도, 추출시간 등에 따라 추출된 유효성분을 정량하였다. 안젤리카로부터 추출된 유효성분의 정량은 냉동건조법(freeze drying method)을 이용하였다. 추출된 유효성분은 여과과정 후 진공증류를 통해 농축하였으며, -10 °C로 6 h 동결한 후 냉동건조장치를 이용하여 0.9 bar, -20 °C의 조건에서 24 h 건조하였다.

2.2. 폴리페놀함량 분석

안젤리카로부터 추출된 유효성분의 폴리페놀함량은 자외선 분광광도계를 이용하여 분석하였다. 폴리페놀함량은 Folin-Ciocalteu micro method에 의해 수행되었으며[11], 검정곡선을 작성하기 위해 표준물질로 gallic acid (Sigma-Aldrich, G7384)를 이용하였다. 표준용액의 농도범위는 15~60 µL/mL이고, 자외선 파장은 765 nm에서 측정하였다.

폴리페놀의 정량을 위해 냉동건조한 시료 1 mL (1 mg/mL)에 20% sodium carbonate 0.4 mL와 1 M phenol reagent 1 mL를 혼합한 후 메탄올을 이용하여 총부피를 5 mL로 제조하였다. 제조된 시료는 암실에서 2 h간 방치한 후 자외선 분광광도계를 이용하여 정량하였다. 측정된 흡광도는 검정곡선을 이용하여 gallic acid equivalents (mg GAE/g)로 환산하였다[12].

3. 결과 및 고찰

3.1. 반응표면분석법의 변수설정

본 연구에서는 반응표면분석법을 이용하여 추출공정의 추출조건을 최적화하였다. 실험계획법은 중심합성계획법을 이용하였으며 추출공정에서 중요하게 고려되는 계량인자는 기초실험 결과를 바탕으로 추출시간(2.5~3.5 h), 주정/초순수 부피비(55~65 vol%), 추출온도(55~65 °C)로 선택하였다[13]. 안젤리카에서 추출시간, 주정/초순수 부피비, 추출온도에 대한 최적의 조건을 찾기 위해 사용한 중심합성계획법에 따라 설계된 20개의 조건을 이용하여 각 실험을 진행하였다. 반응표면분석법에 의해 측정된 추출수율과 폴리페놀함량의 결과값을 Table 1에 나타내었다.

3.2. 안젤리카로부터 유효성분의 추출특성

Table 1의 실험결과를 바탕으로 반응표면분석법에 의해 산출된 안젤리카의 추출수율에 관한 회귀방정식은 다음과 같다.

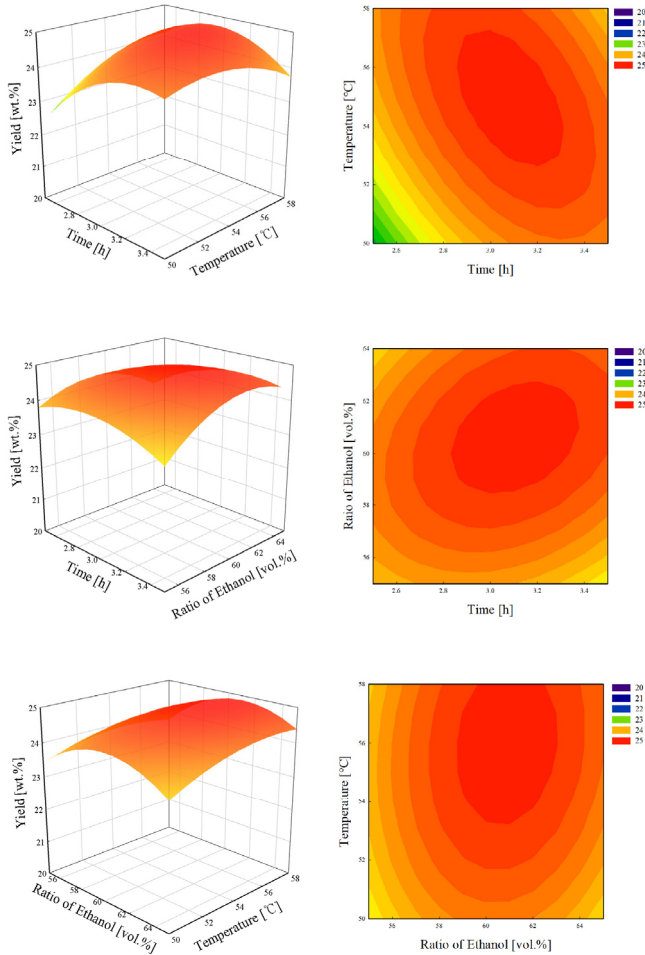


Figure 1. Response surface for extraction yield of angelica as a function of time, ethanol concentration and temperature.

$$Y = -172 + 25.8t + 1.53E + 3.99T - 2.96t^2 - 0.0186E^2 - 0.0310T^2 + 0.138tE - 0.293tT + 0.0058ET \quad (1)$$

이 회귀방정식을 활용하여 추출수율에 따른 인자에 대한 영향을 Figure 1에 3차원 그래프와 등고선도를 나타내었다. 여기서 두 가지 인자에 대한 나머지 한 가지 인자의 고정값은 추출시간(3.0 h), 주정/초순수 부피비(60 vol%), 추출온도(55 °C)로 하였다. 이러한 회귀 방정식을 통해 변수의 주효과, 교호효과, 적합성 결여 등을 판단할 수 있다. 본 연구의 추출수율에 대한 주효과도인 추출시간, 주정/초순수 부피비, 추출온도가 반응치에 영향을 끼치는 정도를 회귀방정식에 따른 값으로 수치화하면 추출시간 : 주정/초순수 부피비 : 추출온도 = 16.86 : 1.0 : 2.60이다. 또한 교호효과도인 추출시간 × 주정/초순수 부피비 : 추출시간 × 추출온도 : 주정/초순수 부피비 × 추출온도의 비율은 23.79 : -50.50 : 1.0로 나타났다. 주효과도만을 고려하면 추출시간이 절대적으로 큰 영향을 끼치지만, 두 가지 인자의 조합에 따라 일어나는 교호효과도를 고려한다면 추출시간과 추출온도의 조합이 가장 큰 영향을 끼치는 것을 알 수 있다. 또한 주효과도에서 상대적으로 낮은 값을 갖는 주정/초순수 부피비와 추출온도는 교호효과도에서 가장 낮은 값을 나타냈다.

Figure 2는 한 가지 인자에 대한 나머지 두 가지 인자의 값을 고정

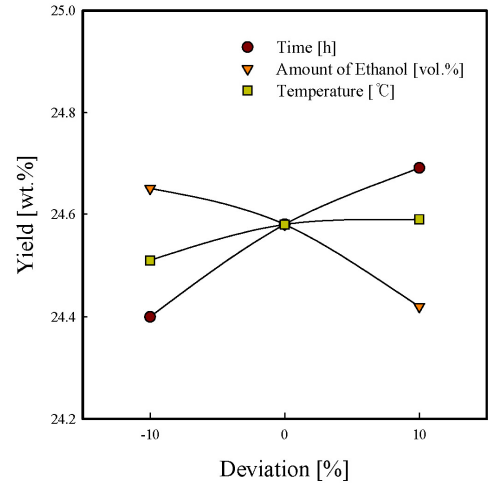


Figure 2. Perturbation plot for the effect of variables on extraction yield.

하고 한 가지 인자의 값을 변화함에 따라 추출수율의 변화율을 나타낸 그래프이다. 한 가지 인자에 대한 나머지 두 가지 인자의 고정값은 추출시간 2.8 h, 주정/초순수 부피비 64.0 vol%, 추출온도 56.6 °C로 하였다. 각 인자의 실험범위는 추출시간(2.5~3.5 h), 주정/초순수 부피비(55~65 vol%), 추출온도(55~65 °C)이며 동일한 변화 범위를 위해 최적값을 기준으로 전체실험범위의 10% 전·후로 설정하였다. 위에서 나타난 추출수율에 관한 회귀방정식을 하나의 인자에 대한 2차 함수로 변환함으로써 3인자 모두 최적값을 갖는 지점에서의 접점에 대한 기울기를 수치화하였다. 이때 추출시간에 대한 최적값에서의 기울기는 1.527이고, 주정/초순수 부피비에 대한 기울기는 -0.137, 추출온도에 대한 기울기는 0.0338이 계산되었다. 이는 반응표면분석법을 이용하여 얻은 추출수율에 대한 각 인자의 최적값은 기울기 값이 0에 가까운 추출온도가 가장 근접하게 도출되었다고 해석할 수 있으며 추출시간에는 비례하는 경향을, 주정/초순수 부피비에는 반비례하는 경향을 나타내는 것을 의미한다. 따라서 추출수율에 대한 계량인자의 주효과도와 교호효과도를 모두 고려하였을 때 가장 큰 영향을 미치는 인자는 추출시간인 것을 확인할 수 있었다.

반응표면분석법에 의해 계산된 안젤리카로부터 추출된 유효성분의 폴리페놀함량에 관한 회귀방정식은 다음과 같다.

$$P = -32.7 + 20.1t + 0.45E - 0.06T - 1.14t^2 - 0.0042E^2 - 0.0020T^2 - 0.128tE - 0.114tT + 0.0092ET \quad (2)$$

이 회귀방정식식을 활용하여 추출수율에 따른 인자에 대한 영향을 Figure 3에 3차원 그래프와 등고선도를 나타내었다. 주효과도인 추출시간, 주정/초순수 부피비, 추출온도가 반응치에 영향을 끼치는 정도를 식 (2)의 폴리페놀함량에 관한 회귀방정식으로 수치화하면 추출시간 : 주정/초순수 부피비 : 추출온도 = 335 : 7.5 : -1이다. 또한 교호효과도인 추출시간 × 주정/초순수 부피비 : 추출시간 × 추출온도 : 주정/초순수 부피비 × 추출온도의 비율은 -13.91 : -12.39 : 1로 나타났다. 주효과도만을 고려하면 추출시간이 절대적으로 큰 영향을 끼치지만, 두 가지 인자의 조합에 따라 일어나는 교호효과도를 고려하면 추출시간 × 주정/초순수 부피비와 추출시간 × 추출온도의 영향은 거의 동일하게 나타난 것을 알 수 있다. 이는 추출시간에 비해 다른 두 인자의 영향

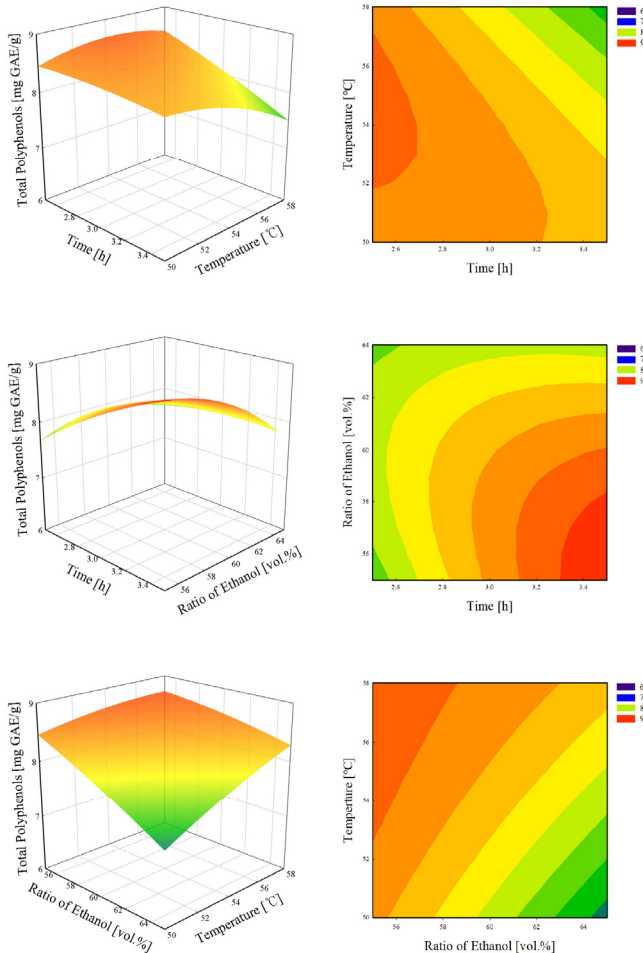


Figure 3. Response surface for total polyphenols of angelica as a function of time, ethanol concentration and temperature.

이 아주 미미하여 이러한 결과가 나온 것으로 판단된다. 또한 추출수율과 마찬가지로 주효과도에서 상대적으로 낮은 값을 갖는 주정/초순수 부피비와 추출온도는 교호효과도에서 가장 낮은 값을 나타내었다.

Figure 4는 한 가지 인자에 대한 나머지 두 가지 인자의 값을 고정하고 한 가지 인자의 값을 변화에 따른 폴리페놀함량 변화율을 나타낸 그래프이다. 추출효율과 마찬가지로 추출시간, 주정/초순수 부피비, 추출온도의 범위를 최적값을 기준으로 전체실험범위의 10% 전·후로 설정하였다. 위에서 나타난 폴리페놀함량에 관한 회귀방정식을 하나의 인자에 대한 2차 함수로 변환함으로써 3인자 모두 최적값을 갖는 지점에서의 접점에 대한 기울기를 수치화하였다. 이때 추출시간에 대한 최적값에서의 기울기는 -0.904이고, 주정/초순수 부피비에 대한 기울기는 0.076, 추출온도에 대한 기울기는 -0.0158이었다. 이는 반응표면분석법을 이용하여 얻은 폴리페놀함량에 대한 각 인자의 최적값은 기울기 값이 0에 가까운 추출온도가 가장 근접하게 도출되었고 해석할 수 있으며 추출시간에는 반비례하는 경향을, 주정/초순수 부피비에는 비례하는 경향을 나타내는 것을 의미한다. 또한 주효과도와 교호효과도를 모두 고려하였을 때 가장 큰 영향을 미치는 인자는 추출수율과 마찬가지로 추출시간인 것을 확인할 수 있다.

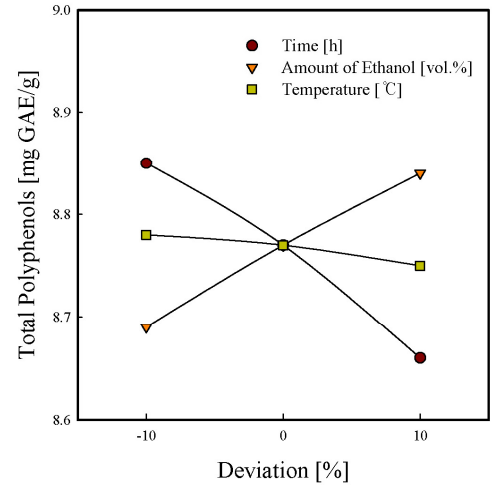


Figure 4. Perturbation plot for the effect of variables on total polyphenols.

3.3. 종합만족도 및 유의확률 평가

앞서 세 가지 인자(추출시간, 주정/초순수 부피비, 추출온도)에 따른 두 가지 요인(추출수율과 폴리페놀함량)에 대한 회귀식을 각각 얻었으며, 그에 따른 표면도를 3차원 그래프와 등고선도로 나타내었다. 또한 선택된 그래프를 통해 각 인자의 변화에 따른 반응치의 경향을 나타내었다. 최종적으로 인자에 따른 요인에 대한 최적화를 하고자 한다. 추출수율과 폴리페놀 모두 최대값을 가질 수 있는 세 가지 인자에 대한 최적 조건 그래프를 Figure 5에 나타내었다. 추출공정의 최적조건은 추출시간 2.8 h, 주정/초순수 부피비 64.0 vol%, 추출온도 56.6 °C로 나타났다. 이 조건으로부터 예상되는 요인의 값으로 추출수율은 24.6%, 폴리페놀함량은 8.76 mg GAE/g으로 산출되었다. 또한 추출수율에 관한 회귀방정식의 결정계수(coefficient of determination, R^2)는 81.4%이고, 폴리페놀함량에 관한 회귀방정식의 결정계수 R^2 은 75.4%이었다. 이를 통해 결정계수 R^2 이 1에 더 가까운 값을 갖는 추출수율에 관한 회귀방정식이 더 예측성이 좋은 모델이라 판단할 수 있다. 통계학적 측면에서 귀무가설이 참일 때 귀무가설을 기각할 확률의 최대값인 유의수준 α 보다 유의확률 P-value가 더 작은 값을 갖을 때, 귀무가설을 기각하고 대립가설을 채택한다. 이는 기존에 믿었던 사실보다 새로운 실험을 통해 증명된 내용에 대해 더 높은 신뢰성을 부여한다는 것을 의미한다. 본 연구에서 수율에 대한 P-value는 0.039가 나왔고, 폴리페놀함량에 대한 P-value는 0.044가 나왔으며 이는 유의수준 α (= 0.05)보다 더 작은 값을 나타내므로 그 유의성은 5% 이내에서 인정되었다. 또한 회귀방정식에 대한 종합만족도 $D = 0.80$ 이 산출되었다.

4. 결 론

본 연구에서는 천연물로부터 항산화물질인 안젤리카로부터 폴리페놀함량을 추출하기 위해 반응표면분석법을 사용하여 최적화된 공정을 설계하였다. 반응표면분석법을 이용하여 추출공정의 최적화과정을 수행한 결과 추출수율과 폴리페놀함량 모두 계량인자의 주효과도와 교호효과도를 모두 고려하였을 때 가장 큰 영향을 미치는 인자는 추출시간이었다. 또한 안젤리카의 최적추출조건은 추출시간이 2.8 h, 주정/초순수 부피비 64.0 vol%, 추출온도 56.6 °C이었으며, 이 조건의 추출수율은 24.6%, 폴리페놀함량은 8.76 mg GAE/g으로 산출되었다. 추

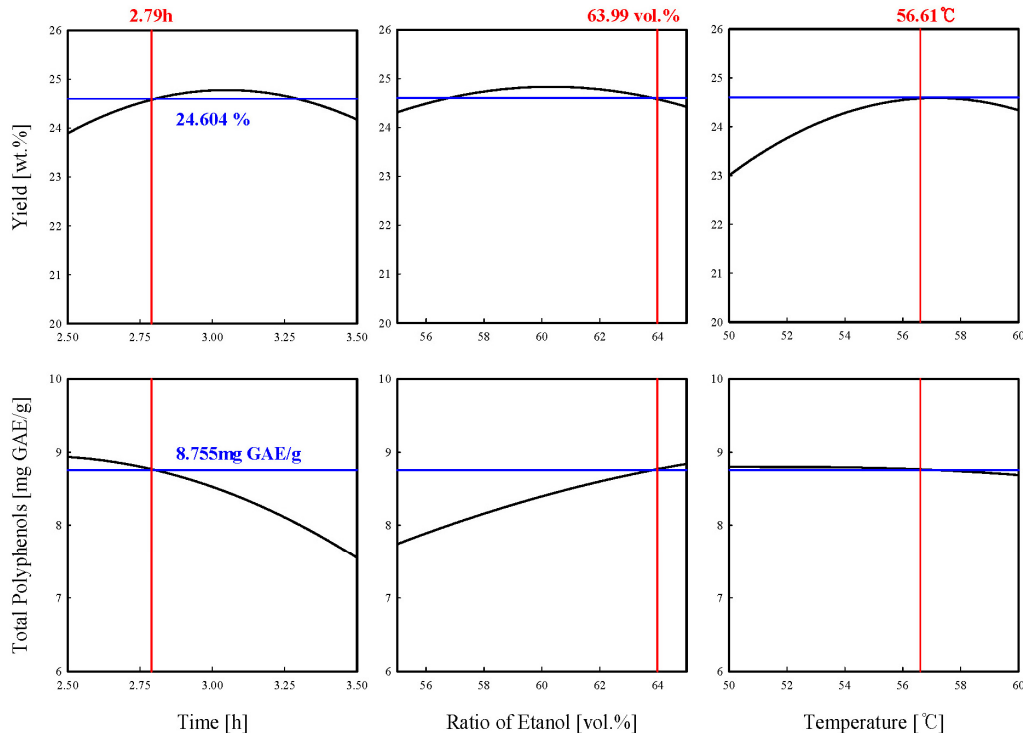


Figure 5. Multiple optimization graphs of extraction yield and total polyphenols.

출수율과 폴리페놀함량에 대한 회귀방정식의 결정계수 R^2 은 각각 81.4, 75.4%이었으며, 종합 만족도 $D = 0.80$, 유의성은 5% 이내의 수준에서 인정되었다.

감 사

이 연구는 2016학년도 단국대학교 대학연구비 지원으로 연구되었음.

References

1. D. J. Wible and S. B. Bratton, Reciprocity in ROS and autophagic signaling, *Curr. Opin. Toxicol.*, **7**, 28-36 (2018).
2. M.-Y. Lee, M.-S. Yoo, Y.-J. Whang, Y.-J. Jin, M.-H. Hong, and Y.-H. Pyo, Vitamin C, total polyphenol, flavonoid contents and antioxidant capacity of several fruit peels, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **44**(5), 540-544 (2012).
3. Y. Lu and L. Y. Foo, Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols apple pomace, *Food Chem.*, **68**, 81-85 (2000).
4. S. H. Lee, L. J. Hong, H. G. Park, S. S. Ju, and G. T. Kim, Functional characteristics from the barley leaves and its antioxidant mixture, *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, **46**, 333-337 (2003).
5. G. L. Russo, I. Tedesco, C. Spagnuolo, and M. Russo, Antioxidant polyphenols in cancer treatment, *Semin. Cancer Biol.*, **46**, 1-13 (2017).
6. S. Tian, C. Hao, G. Xu, J. Yang, and R. Sun, Optimization conditions for extracting polysaccharide from *Angelica sinensis* and its antioxidant activities, *J. Food Drug Anal.*, **25**(4), 766-775 (2017).
7. P. E. Ohale, C. F. Uzoh, and O. D. Onukwuli, Optimal factor evaluation for the dissolution of alumina from Azaraegbelu clay in acid solution using RSM and ANN comparative analysis, *S. Afr. J. Chem. Eng.*, **24**, 43-54 (2017).
8. P. Verm and M. P. Sharm, Comparative analysis of effect of methanol and ethanol on Karanja biodiesel production and its optimisation, *Fuel*, **180**, 164-174 (2016).
9. S.-M. Huang, C.-H. Kuo, C.-A. Chen, Y.-C. Liu, and C.-J. Shieh, RSM and ANN modeling-based optimization approach for the development of ultrasound-assisted liposome encapsulation of piceid, *Ultrason. Sonochem.*, **36**, 112-122 (2017).
10. P. Gu, S. Xu, S. Zhou, Z. Liu, Y. Sun, N. Ou, Y. Hu, J. Liu, Y. Wu, X. Wang, and D. Wang, Optimization of angelica sinensis polysaccharide-loaded Poly (lactic-co-glycolicacid) nanoparticles by RSM and its immunological activity in vitro, *Int. J. Biol. Macromol.*, **107**, 222-229 (2018).
11. M. S. Parco, Y. Wang, and E. A. Stephen, Apoptotic signaling induced by H_2O_2 -mediated oxidative stress in differentiated C_2C_{12} myotubes, *Life Sci.*, **84**(13-14), 468-481 (2009).
12. A. H. Clifford and S. L. Cuppett, Anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden, *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 1063-1072 (2000).
13. S. B. Lee, H. G. Kim, G. S. Jeon, and I. K. Hong, Extraction of active ingredient from angelica using microwave energy, *Appl. Chem. Eng.*, **27**(3), 280-284 (2016).