

Optimization of the Conditions of Flavonoid Extraction From Tartary Buckwheat Sprout Using Response Surface Methodology

Jiyoung Shin, Iseul Choi, Jinwoo Hwang, Junho Yang, Yoonhyeong Lee, So-i Kim, Eunji Cha and Ji-Young Yang*

Department of Food Science & Technology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Received October 15, 2020 / Revised November 9, 2020 / Accepted November 10, 2020

Tartary buckwheat is a grain with many flavonoids, such as rutin, quercetin, kaempferol, and myricetin. This study aimed to optimize extraction conditions to maximize the rutin, quercetin, and myricetin contents of tartary buckwheat sprout extracts using response surface methodology. A Box-Behnken design containing 15 experiments was employed to evaluate the effects of extraction conditions, such as temperature (X_1 , 50~70 °C), extraction time (X_2 , 5~9 hr), and ethanol concentration (X_3 , 60~90%). The coefficients of determination (R^2) for all the dependent variables (extraction temperature, extraction time, and extraction ethanol concentration) were determined to be over 0.95, indicating significance. The p -value of the model in lack of fit was over 0.1 than means, indicating that the model was well predicted. The optimal extraction conditions for rutin, quercetin, and myricetin contents were obtained at $X_1 = 51.03$, $X_2 = 6.62$, and $X_3 = 69.16$, respectively. Under these optimal conditions, the predicted rutin, quercetin, and myricetin contents were 808.467 µg/ml, 193.296 µg/ml, and 37.360 µg/ml, respectively. For the validation of the model, ten experiments were performed and the experimental rutin and quercetin contents were measured at 802.84±8.49 µg/ml, 193.76±2.80 µg/ml, and 34.84±0.43 µg/ml, respectively. The experimental rutin and quercetin contents were similar to the predicted contents, but the experimental myricetin content was lower than predicted.

Key words : Myricetin, quercetin, response surface methodology, rutin, tartary buckwheat sprout

서 론

메밀은 마디풀과(Polygonaceae)에 속하는 일년초로서 시원하고 습한 기후에서 자라는 작물로서 알려져 있다[21]. 본초강목에서는 메밀은 정신을 맑게 해주고, 오장에 존재하는 노폐물을 훑어내린다고 쓰여 있으며, 고혈압 환자나 동맥경화증과 같은 혈관계 환자에게 권장하는 식품으로 알려져 있다. 국내에서 성장하는 메밀은 크게 일반메밀(common buckwheat, *Fagopyrum esculentum* Moench)와 타타리메밀(tartary buckwheat, *Fagopyrum tatarium* Gaertn.)으로 나뉘어진다. 일반적으로 생리활성 물질은 일반메밀에 비하여 타타리메밀에 많이 포함이 되어 있으며, 6가지의 플라보노이드를 포함한 폴리페놀류가 풍부하다. 메밀의 주요 플라보노이드는 rutin, orientin, quercetin, vitexin, isovitexin, isoorientin 등이 있다[8, 12, 18, 23].

메밀의 플라보노이드 중 rutin (quercetin-3-rutinoside)은

항산화, 항염, 항암 등의 기능성이 가장 잘 알려진 물질이다. Rutin은 sophrin이라고도 불리며, quercetin에 rutinose (rhamnose와 glucose가 결합된 이당류)가 결합된 것으로 황색에서 담황색을 띠고 있다. Rutin은 강력한 항산화, 항염증, 항암 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다[4, 13]. 그 외의 Rutin에 대한 기능성 연구는 감마선 조사로 인한 조혈계 및 간세포 손상에 대한 보호 효과에 대한 연구와 혈관의 투과성 조절 및 모세혈관 강화 효과, 항염증성 성질 등에 대한 연구가 있었다[12, 15, 17]. Rutin은 현재 130개 이상의 의약품의 원료로 사용되는 물질일 뿐만이 아니라, 식품산업과 음료산업에서도 관심을 가지는 원료 물질이다.

Quercetin (3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavone)은 과일이나 채소에서 발견되는 생리활성 물질로서 현재까지의 연구결과에 따르면 항염, 항암, 항바이러스, 심장기능 보호 및 신경계 보호 기능을 가지고 있다고 알려져 있다[2, 6, 9, 22]. 이외에도 quercetin은 세포내 미토콘드리아의 생합성에 관여하는 것으로 알려져 있다[1]. 최근 연구에서는 카페인과 같이 신체적능력을 향상시키고, 정신적 자극을 줄 수 있는 것으로 나타났다[7].

Myricetin (3,3',4',5,5',7-Hexahydroxyflavone)은 역시 차, 베리류, 과일, 채소 등의 식물에 널리 포함되어 있는 물질이다. Myricetin이 가지고 있는 기능성 중에 항산화능과 관련된 것이 다른 물질에 비하여 우수하다. 항산화 기작 중 효소적 기작과 비효소적 기작에서의 radical을 제거하는 능력이 우수하다

*Corresponding author

Tel : +82-51-629-5828, Fax : +82-51-629-5824

E-mail : jyyang@pknu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

고 알려져 있다[20]. 이와 동시에 myricetin은 prooxidant로서의 역할을 한다. Prooxidant는 산화적 손상을 유발하는 화학물질을 말하는데 보통 주변 환경에 따라서 다르게 작용할 수 있고, 이 작용을 통해 특정 종류의 암을 완화시키는 작용을 한다는 연구결과가 존재한다[3, 5]. 또한, 피부암의 발생 위험을 줄이고, 피부암의 발병과 이어서 일어나는 발달과정을 지연시킨다는 보고가 있다[19].

이에 본 연구에서는 타타리메밀씨를 재배하였고, 재배한 타타리메밀씨으로부터 기능성 물질인 rutin, quercetin, myricetin 등의 플라보노이드의 용출 함량을 최대화할 수 있도록 반응표면분석법(Response Surface Methodology, RSM)을 통해서 각각의 물질에 대한 추출 조건에 대한 최적화를 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

시료는 제주산 타타리메밀(*Fagopyrum tatarium* Gaertn.)을 이용하여 메밀씨를 재배하여 실험에 사용하였다. 타타리메밀 열매를 24시간 실온에서 침지한 후, 물기를 제거하고 식물생장상(JSPC-420C, JS Research Inc., Gongju, Korea)에서 24시간 암조건에서 발아를 시켰다. 발아시에는 메밀이 완전히 물에 잠기지 않을 정도의 수분을 유지하였다. 8일이 경과한 후, 뿌리를 제거한 후 약간 수확하였고, 이를 열풍건조기를 이용하여 40℃, 24시간 동안 건조하였다. 건조 후에는 분말화하여 냉동(-20℃)에 보관하면서 실험에 사용하였다.

분석을 위한 표준물질 rutin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone 3-rutinoside), quercetin (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-

trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one), myricetin (3,3',4',5,5',7'-Hexahydroxyflavone)은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였고, HPLC 분석을 위한 용매, methanol과 water는 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였다.

타타리메밀씨 에탄올 추출

타타리메밀씨의으로부터 플라보노이드의 추출을 위하여 건조 타타리메밀씨 1 g을 50 ml의 conical tube에 넣고 20배수에 달하는 20 ml의 에탄올을 첨가하여 교반이 가능한 항온수조(BS-21, Jeio tech, Daejeon, Korea)에서 추출온도와 시간을 달리하면서 교반 속도 130 rpm으로 진탕추출을 진행하였다. 추출 후에는 여과지(No. 3, quantitative, Adventec Co., Tokyo, Japan)을 이용하여 여과하였고, 여과액을 분리하여 분석에 사용하였다.

추출 최적화를 위한 실험설계

각 분석 조건을 위하여 추출온도(40, 50, 60, 70, 80, 90℃), 추출시간(3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 시간), 추출용매인 에탄올의 농도(50, 60, 70, 80, 90%), 시료와 용매와의 비율(1:5, 1:10, 1:15, 1:20)으로 달리하여 예비실험을 진행하였다.

메밀씨에서 플라보노이드 3가지 rutin, quercetin, myricetin을 추출하기 위한 최적 조건을 탐색하기 위해 반응표면분석법(RSM)을 활용하였다. Box-Behnken design (BBD)에 따라 3가지의 독립변수 추출온도(X_1 , 40~60℃), 추출시간(X_2 , 3~7 hr), 추출용매인 에탄올의 농도(X_3 , 50~90%)의 세가지 변수를 -1, 0, 1의 3단계로 나누었다. Table 1에서 제시된 15가지의

Table 1. Box-Behnken design and responses of dependent variables for optimization of extraction conditions considering 3 independent variables

Order	Independent variables			Responses		
	X_{11}	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_3
1	40 (-1)	3 (-1)	70 (0)	627.53	138.42	27.21
2	60 (+1)	3 (-1)	70 (0)	813.48	153.50	37.26
3	40 (-1)	7 (+1)	70 (0)	751.30	195.77	33.27
4	60 (+1)	7 (+1)	70 (0)	812.50	178.75	38.81
5	40 (-1)	5 (0)	50 (-1)	735.46	156.04	31.40
6	60 (+1)	5 (0)	50 (-1)	811.12	138.43	37.42
7	40 (-1)	5 (0)	90 (+1)	665.44	169.54	22.26
8	60 (+1)	5 (0)	90 (+1)	804.07	189.97	31.77
9	50 (0)	3 (-1)	50 (-1)	707.57	153.81	29.05
10	50 (0)	7 (+1)	50 (-1)	768.66	168.29	33.88
11	50 (0)	3 (-1)	90 (+1)	713.92	187.90	20.22
12	50 (0)	7 (+1)	90 (+1)	761.89	209.94	28.81
13	50 (0)	5 (0)	70 (0)	782.20	180.67	36.69
14	50 (0)	5 (0)	70 (0)	792.30	185.30	35.62
15	50 (0)	5 (0)	70 (0)	785.90	190.92	35.07

¹⁾ X_1 , temperature (℃); X_2 , time (hr); X_3 , ethanol concentration (%); Y_1 , rutin content (μg/ml); Y_2 , quercetin content (μg/ml); Y_3 , myricetin content (μg/ml).

추출 조건을 3반복 실험을 진행하였고, 종속변수로서는 메밀에 함유된 플라보노이드인 rutin, quercetin, myricetin의 함량을 각각 측정하였다.

플라보노이드 함량 분석

플라보노이드의 정량 분석은 HPLC (U-3000, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 분석하였다. 여과된 추출물은 0.45 μm의 cellulose acetate membrane filter (Adventec, Japan)를 이용하여 여과하여 HPLC로 분석하였다. 분석에 이용된 column은 Acclaim C18 column (250×4.6 mm, 5 μm, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)을 이용하였고, 이동상은 0.03 M phosphoric acid와 methanol을 이용하여 multi gradient 조건으로 분석하였다. 이동상은 분석하는 0, 10, 15, 20, 25분 동안 0.03 M phosphoric acid의 비율을 60, 0, 0, 60, 60%로 흘려주었다. 유속은 1.0 ml/min, injection volume은 30 μl, UV detector의 검출 파장은 360 nm이었다.

최적 추출 조건 예측 및 검증

추출온도, 시간 및 에탄올농도를 변수로 하여 타타리메밀씨에서의 rutin, quercetin, myricetin의 추출 함량을 최대화할 수 있는 최적의 추출 조건을 설정하였다. 모든 종속 변수의 반응표면이 중복되는 범위에서 최적범위를 설정하였고, 최적 추출 조건에서 얻어진 예측값과 검증 과정에 의해 얻어지는 실측값을 비교하였다. 실측값은 최적화된 같은 조건에서 10회 반복하여 비교하였다.

통계처리

반응표면분석법을 이용하여 실험 결과를 분석하고 최적 추출 조건을 얻기 위하여 Design-Expert 7.0 software (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, U.S.A)가 사용되었다. 실험결과는 다음의 식에 적용하였고, 독립변수 X_i 와 X_j 에 대한 종속변수 Y (rutin, quercetin, myricetin의 함량)은 다음과 같은 2차 회귀식으로 나타내었으며, β_0 는 상수이고, β_i , β_{ii} , β_{ij} 는 회귀계수이다.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j$$

분산 분석(ANOVA)을 통해서 모델의 통계적 유의성, 적합성, 결여 및 회귀 계수를 결정하였다. 모든 실험은 3회 반복되었으며, p -value가 0.05 이하인 것을 통계적으로 유의미하다고 판단하였다.

결과 및 고찰

타타리메밀씨의 추출 조건 최적화 모델의 적합성

타타리메밀씨에서 추출된 rutin, quercetin, myricetin의 함

량을 관찰한 결과, 온도가 증가함에 따라 각각의 함량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 70℃ 이상의 온도에서는 에탄올 증발이 일어나 추출이 제대로 이루어지지 않았다. 추출 시간에 따른 함량을 비교해 보았을 때, 추출온도와 유사하게 시간이 늘어날수록 각 물질의 함량의 증가는 보였으나, 7시간 이후에는 함량이 더 이상 증가하지 않고, 유지하는 경향을 나타내었다. 그 결과, 에탄올의 증발을 억제하고 추출을 효과적으로 하기 위하여 온도 범위를 40~60℃로 하였고, 추출 시간을 비교적 짧은 시간인 3시간에서 변화량이 선명하게 보이는 7시간까지로 설정하였다. 그리고 에탄올의 농도는 넓은 범위로 50~90% 까지로 설정하여 반응 표면 분석을 진행하였다.

타타리메밀씨에서 rutin, quercetin, myricetin 량을 최대화하는 최적 추출 조건을 설명하기 위하여 추출온도(40~60℃), 추출시간(3~7 hr), 에탄올의 농도(50~90%)를 독립변수로 설정하였다. 추출 조건에 따라 BBD 방법에 따라 측정한 실험 값은 Table 1과 같았다. 지정된 추출 조건에 따라서 최대값은 각각 rutin이 813.48 μg/ml, quercetin이 209.94 μg/ml, myricetin이 38.81 μg/ml이었다. 최소값은 rutin이 627.53 μg/ml, quercetin이 138.42 μg/ml, myricetin이 20.22 μg/ml으로 어느 특정 조건에서 최대값을 보이거나, 최소값을 보이지는 않았다. 다만, rutin과 quercetin은 동일한 조건 40℃에서 3시간 동안 70%의 에탄올을 이용하여 추출한 것이 가장 낮은 값을 나타내었다.

각각의 종속변수(추출온도, 추출시간, 추출에탄올농도)에 대한 모델의 R²의 값이 0.9 이상으로 유의성을 보였다. 그리고 각각의 적합성 결여 검정(lack of fit)에서 $p > 0.1$ 로 유의성이 기각되어 반응표면모델이 rutin, quercetin, myricetin의 함량의 변화를 설명하는데 적합한 것으로 판단되었다.

추출 조건이 rutin의 추출 함량에 미치는 영향

Rutin의 추출 함량(Y_1)에 대한 이차다항식 모델을 이용하여 ANOVA 분석을 수행한 결과는 Table 2와 Fig. 1에 나타내었다. 모델의 F-value는 41.52이었고, p -value가 0.0004($p < 0.05$)로서 유의성이 있다는 것으로 나타났다. 전체 모델의 결정계수, R² 값이 0.9786이었고, 적합성 결여 검정(lack of fit)에서의 p -value는 0.3332로 유의하지 않아 전체 모델에서는 추출 조건을 완벽하게 예측할 수 있음을 시사하였다. Adj-R² 값이 0.9401로서 전체 모델에서의 변화 가능성은 5.99%만을 가진다고 판단하였다. Pred-R²는 0.6740으로 충분히 가까운 값은 아닌 것으로 판단되었다. Rutin 추출 함량에 대한 ANOVA 분석에 의한 3가지의 변수(온도, 시간, 에탄올 농도)에 대한 이차다항식은 다음에 나타내었다.

$$Y_1 = -370.89124 + 17.84889X_1 + 162.90749X_2 + 4.03506X_3 - 1.55934X_1X_2 + 0.078712X_1X_3 - 0.081988X_2X_3 - 0.097941X_1^2 - 6.45113X_2^2 - 0.057464X_3^2$$

Table 2. ANOVA for response surface quadratic model: regression model of relationship between response variables and rutin

Source	Sum of squares	df	Mean square	F Value	p-value	Prob > F	Remark
Model	43255.27	9	4806.14	25.42		0.0012	significant
X ₁	26615.71	1	26615.71	140.78		< 0.0001	
X ₂	6718.91	1	6718.91	35.54		0.0019	
X ₃	750.57	1	750.57	3.97		0.1029	
X ₁ X ₂	3890.45	1	3890.45	20.58		0.0062	
X ₁ X ₃	991.29	1	991.29	5.24		0.0707	
X ₂ X ₃	43.02	1	43.02	0.23		0.6535	
X ₁ ²	354.18	1	354.18	1.87		0.2294	
X ₂ ²	2458.61	1	2458.61	13.00		0.0154	
X ₃ ²	1950.81	1	1950.81	10.32		0.0237	
Residual	945.32	5	189.06				
Lack of Fit	893.12	3	297.71	11.41		0.0817	not significant
Pure Error	52.20	2	26.10				
Cor Total	44200.59	14					

¹⁾X₁, temperature (°C); X₂, time (hr); X₃, ethanol concentration (%)

* R², 0.9786; Adj-R², 0.9401, Pred-R², 0.6740; Adq precision, 16.425

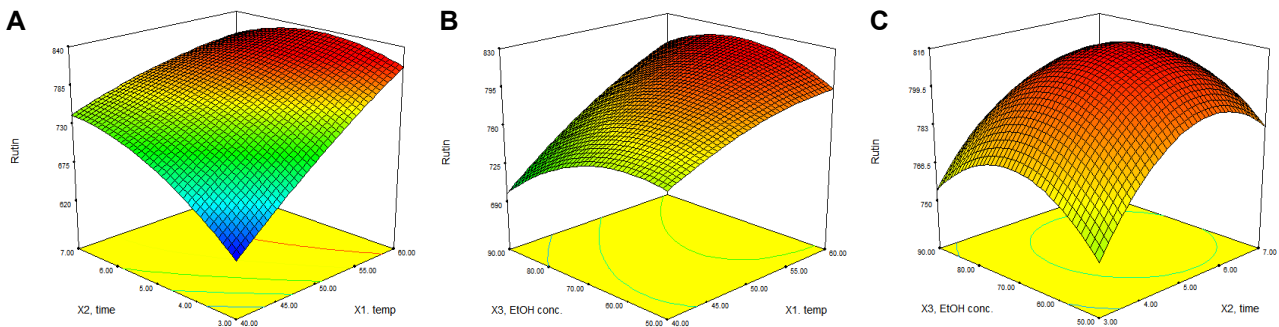


Fig. 1. Response surface plots for the effects of time, temperature and ethanol concentration on rutin content of extract. A, time-temperature; B, ethanol concentration-temperature; C, Ethanol concentration-time

일차항 중 추출온도(X₁), 추출시간(X₂)에 대한 유의성이 인정되었다. 상호항의 경우 온도(X₁)와 시간(X₂)의 상호항에서만 유의적인 의미를 나타내었다. 이중항에서는 시간(X₂²)과 에탄올 농도(X₃²)이 유의적 의미를 지닌다고 할 수 있었다. 하지만 위의 인자를 제외하고는 유의적 의미를 지니지 않았다. Kraujalis 등(2015)[16]의 연구에 따르면 아마란스의 잎에서 고압하에서 rutin을 추출할 경우 에탄올과 물의 비율 즉, 에탄올의 농도가 가장 큰 영향을 끼치는 것으로 나타나, 본 연구 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

추출 조건이 quercetin의 추출 함량에 미치는 영향

Quercetin (Y₁)에 대한 이차 다항식 모델에서의 ANOVA 분석 결과는 Table 3과 Fig. 2에 나타내었다. 모델에서의 F-value는 40.81이었고, p-value가 0.0102(<0.05)로 유의성을 가지는 것으로 판단되었다. 그리고 모델의 결정계수(R²)은 0.9478이었고, 적합성 결여 검증(lack of fit)에서의 p-value는 0.6643으로 0.1보다 커서 유의성이 기각되어 반응표면모델이 quercetin의 함량의 변화를 설명하는데에 적합하다고 판단하였다. Quer-

etin의 추출 함량에 대한 ANOVA 분석에 의한 3가지의 변수(온도, 시간, 에탄올 농도)에 대한 이차다항식은 다음에 나타내었다.

$$Y_2 = -336.61147 + 16.44504X_1 + 27.37256X_2 - 0.19994X_3 - 0.40144X_1X_2 + 0.047532X_1X_3 + 0.047215X_2X_3 - 0.17754X_1^2 - 0.31608X_2^2 - 0.010949X_3^2$$

일차항 중 시간(X₂)과 에탄올 농도(X₃)에 대하여 각각 유의성이 인정되었다. 상호항의 경우 온도(X₁)와 시간(X₂)의 상호항에서만 유의적인 의미를 나타내었다. 이중항에서는 온도(X₁²)만이 유의적 의미를 지닌다고 할 수 있었다. 하지만 위의 인자를 제외하고는 유의적 의미를 지니지 않았다. Heo 등(2019)[10]의 연구 결과에서는 양과겹질에서 초음파 추출을 통해서 quercetin을 추출하는 경우 에탄올의 농도와 추출 시간, 초음파의 세기가 추출된 quercetin의 농도에 크게 작용하지 않다고 보고하였고, Jang 등(2012)[11]의 연구에서도 양과겹질에서의 quercetin 추출에는 추출 시간이 유의적으로 관여하지 않는다고 하였다. 하지만 본 연구에서는 시간과 에탄올의

Table 3. ANOVA for response surface quadratic model: regression model of relationship between response variables and quercetin

Source	Sum of squares	df	Mean square	F Value	p-value	Prob > F	Remark
Model	6082.46	9	675.83	10.08	0.0102		significant
X ₁	0.10	1	0.10	0.00	0.9712		
X ₂	1773.73	1	1773.73	26.46	0.0036		
X ₃	2477.06	1	2477.06	36.95	0.0017		
X ₁ X ₂	257.84	1	257.84	3.85	0.1071		
X ₁ X ₃	361.49	1	361.49	5.39	0.0679		
X ₂ X ₃	14.27	1	14.27	0.21	0.6640		
X ₁ ²	1163.85	1	1163.85	17.36	0.0088		
X ₂ ²	5.90	1	5.90	0.09	0.7786		
X ₃ ²	70.83	1	70.83	1.06	0.3512		
Residual	335.23	5	67.05				
Lack of Fit	282.46	3	94.15	3.57	0.2266		not significant
Pure Error	52.77	2	26.38				
Cor Total	6417.69	14					

¹⁾X₁, temperature (°C); X₂, time (hr); X₃, ethanol concentration (%)

* R², 0.9478; Adj-R², 0.8537, Pred-R², 0.2773; Adq precision, 11.646

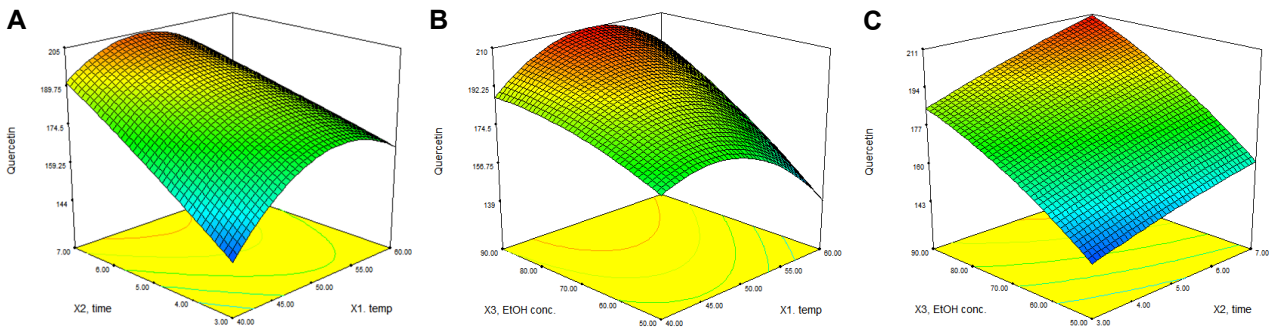


Fig. 2 Response surface plots for the effects of time, temperature and ethanol concentration on quercetin content of extract. A, time-temperature; B, ethanol concentration-temperature; C, Ethanol concentration-time

농도가 추출에서 quercetin의 농도에 영향을 미치는 주요 요인으로 판단되었다.

추출 조건이 myricetin의 추출 함량에 미치는 영향

Myricetin (Y₁)에 대한 이차 다항식 모델에서의 ANOVA 분석 결과는 Table 4과 Fig. 3에 나타내었다. 모델에서의 F-value는 41.52이었고, p-value가 0.0004(<0.05)로 유의성을 가지는 것으로 판단되었다. 그리고 모델의 결정계수, R²은 0.9868로 3가지의 모델중 가장 높았으며, 적합성 결여 검증(lack of fit)에서의 p-value는 0.3332으로 0.1보다 커서 유의성이 기각되어 반응표면모델이 myricetin의 함량의 변화를 설명하는데 적합하다고 판단되었다. Myricetin의 추출 함량에 대한 ANOVA 분석에 의한 3가지의 변수(온도, 시간, 에탄올 농도)에 대한 이차다항식은 다음에 나타내었다.

$$Y_3 = -37.369775 - 0.16749X_1 + 7.94953X_2 + 1.44983X_3 - 0.056265X_1^2 - 0.0043691X_1X_3 + 0.023575X_2X_3 + 0.00531957X_1^2 - 0.54729X_2^2 - 0.014039X_3^2$$

일차항은 추출온도(X₁), 추출시간(X₂)과 에탄올 농도(X₃)에 대하여 모두 유의성이 있는 것으로 판단되었다. 하지만 상호항에서는 모두 유의성을 가지지 못하였다. 이중항에서는 추출 온도(X₁²)를 제외한 추출시간(X₂²)과 에탄올 농도(X₃²)에서 유의적 의미를 가지는 것으로 판단되었다. Myricetin의 반응표면모델에서는 상호항과 추출온도(X₁²)가 유의적 의미를 가지지 못하였다.

최적화 조건 예측

각각의 플라보노이드, rutin, quercetin, myricetin의 추출 함량 최대화를 위한 최적화 조건과 예측값은 다음과 같았다. Rutin 함량의 최대화를 위하여 단일 response로 확인할 결과, 59.73°C에서 5.22시간 동안 66.07%의 에탄올을 사용하여 추출하는 것이 rutin의 함량을 최대화할 수 있는 것으로 나타났고, 이 조건에서 추출하였을 경우 rutin의 함량은 831.25 µg/ml로 예측되었다. Quercetin의 함량을 단일 조건으로 최대화하기 위하여 반응표면분석을 한 경우에는 50.00°C에서 7시간 90%의 에탄올을 이용하여 추출하는 조건을 사용하도록 판단하였

Table 4. ANOVA for response surface quadratic model : regression model of relationship between response variables and myricetin

Source	Sum of squares	df	Mean square	F Value	p-value	Prob > F	Remark
Model	423.10	9	47.01	41.52	0.0004		significant
X ₁	121.04	1	121.04	106.89	0.0001		
X ₂	55.22	1	55.22	48.76	0.0009		
X ₃	102.84	1	102.84	90.81	0.0002		
X ₁ X ₂	5.07	1	5.07	4.47	0.0881		
X ₁ X ₃	3.05	1	3.05	2.70	0.1614		
X ₂ X ₃	3.56	1	3.56	3.14	0.1365		
X ₁ ²	1.04	1	1.04	0.92	0.3809		
X ₂ ²	17.70	1	17.70	15.63	0.0108		
X ₃ ²	116.43	1	116.43	102.82	0.0002		
Residual	5.66	5	1.13				
Lack of Fit	4.32	3	1.44	2.15	0.3332		not significant
Pure Error	1.34	2	0.67				
Cor Total	428.76	14					

¹⁾X₁, temperature (°C); X₂, time (hr); X₃, ethanol concentration (%)

* R², 0.9868; Adj-R², 0.9630, Pred-R², 0.8317; Adq precision, 21.516

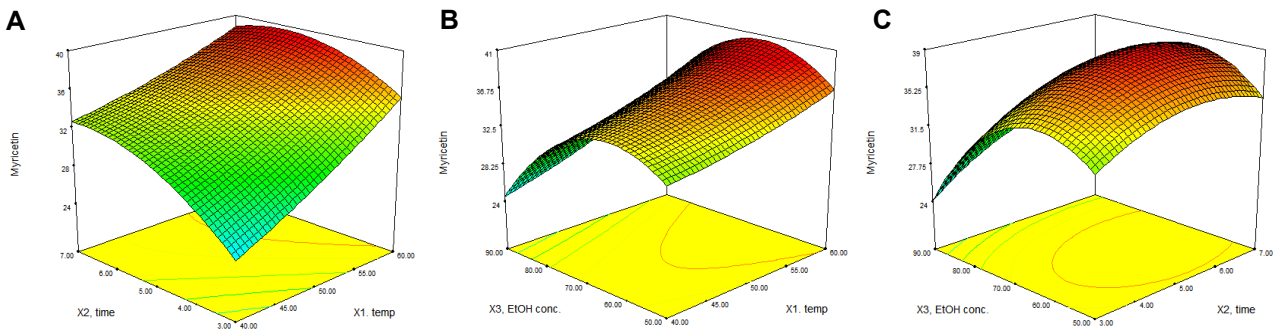


Fig. 3 Response surface plots for the effects of time, temperature and ethanol concentration on myricetin content of extract. A, time-temperature; B, ethanol concentration-temperature; C, Ethanol concentration-time

다. 이 경우 quercetin의 함량은 214.36 µg/ml로 예측되었다. Myricetin 함량만을 최대화하기 위하여 반응 표면 분석을 진행한 경우에는 59.63%의 에탄올을 이용하여 59.41°C에서 5.31시간을 추출하는 조건이 최적화 조건으로 나타났다. 이 추출 조건을 활용하여 타타리메틸착에서 myricetin을 추출할 경우 39.963 µg/ml로 확인되었다.

Rutin, quercetin, myricetin의 추출 함량을 동시에 최대화하기 위해서는 55.23°C에서 75.04%의 에탄올을 이용하여 6.37 시간 동안 추출하도록 설정되었다. 이 때의 rutin, quercetin, myricetin의 함량은 각각 808.467 µg/ml, 193.296 µg/ml, 37.361 µg/ml로 예측되었다.

최적추출 조건 검증

최적화된 조건으로 실험을 진행할 경우 예측되는 값은 rutin의 함량이 808.467 µg/ml, quercetin의 함량은 193.296 µg/ml, myricetin의 함량은 37.36 µg/ml이었다. 위의 조건으로 실제 10회 반복 실험을 진행한 결과, rutin의 함량이 802.84±8.49 µg/ml, quercetin의 함량은 193.76±2.80 µg/ml, myricetin

의 함량은 34.84±0.43 µg/ml로 측정되었다. Rutin의 함량은 기대한 것보다 낮은 수치를 기록하였다. 하지만 통계분석 결과, 예측된 값과 실측된 값의 유의적 차이가 없는 것으로 판단되었고, quercetin의 경우, 예측값과 실측값 사이의 차이가 없는 것으로 나타나 모델에서 제시하는 값에 도달하였다. 그리고, myricetin의 경우 rutin과 유사하게 예측된 값보다 실측된 값이 낮은 수치를 기록하였고, 유의적으로도 차이가 나타났다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Aguirre, L., Arias, N., Macarulla, M. T., Gracia, A. and Portillo, M. P. 2011. Beneficial effects of quercetin on obesity and diabetes. *Open Nutraceuticals J.* 4, 189-198.
2. Boots, A. W., Li, H., Schins, R. P., Duffin, R., Heemskerck,

- J. W., Bast, A. and Haenen, G. R. 2007. The quercetin paradox. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **222**, 89-96.
3. Carocho, M. and Ferreira, I. C. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* **51**, 15-25.
 4. Chua, L. S. 2013. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *J. Ethnopharmacol.* **150**, 805-817.
 5. Chobot, V. and Hadacek, F. 2011. Exploration of pro-oxidant and antioxidant activities of the flavonoid myricetin. *Redox Report* **16**, 242-247.
 6. Davis, J. M., Murphy, E. A. and Carmichael, M. D. 2009. Effects of the dietary flavonoid quercetin upon performance and health. *Curr. Sports Med. Rep.* **8**, 206-213.
 7. Davis, J. M., Zhao, Z., Stock, H. S., Mehl, K. A., Buggy, J. and Hand, G. A. 2003. Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **208**, 399-404.
 8. Fabjan, N., Rode, J., Košir, I. J., Wang, Z., Zhang, Z. and Kreft, I. 2003. Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) as a source of dietary rutin and quercetin. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 6452-6455.
 9. Harwood, M., Danielewska-Nikiel, B., Borzelleca, J. F., Flamm, G. W., Williams, G. M. and Lines, T. C. 2007. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of *in vivo* toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem. Toxicol.* **45**, 2179-2205.
 10. Heo, H. J., Lee, H. N., Kim, Y. H., Jeong, H. S. and Lee, J. S. 2019. Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant compounds from onion peels using response surface methodology. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **48**, 441-446.
 11. Jang, M., Asnin, L., Nile, S. H., Keum, Y. S., Kim, H. Y. and Park, S. W. 2013. Ultrasound assisted extraction of quercetin from onion solid wastes. *Int. J. Food Sci. Technol.* **48**, 246-252.
 12. Kang, N. J. 2015. Rutin suppresses neoplastic cell transformation by inhibiting ERK and JNK signaling pathways. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 579-585.
 13. Kang, J. A., Yoon, S. H., Rho, J. K., Choi, D. S., Jang, B. S. and Park, S. H. 2015. Radioprotective effect of post-treatment with rutin on γ -irradiation-induced cellular damage in mice. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **47**, 388-393.
 14. Kim, S. J., Zaidul, I. S. M., Suzuki, T., Mukasa, Y., Hashimoto, N., Takigawa, S., Noda, T., Matsuura-Endo, C. and Yamauchi, H. 2008. Comparison of phenolic compositions between common and tartary buckwheat (*Fagopyrum*) sprouts. *Food Chem.* **110**, 814-820.
 15. Kwon, T. B. 1994. Change in rutin and fatty acids buckwheat during germination. *Kor. J. Food Nutr.* **7**, 124-127.
 16. Kraujalis, P., Venskutonis, P. R., Ibanez, E. and Herrero, M. 2015. Optimization of rutin isolation from *Amaranthus paniculatus* leaves by high pressure extraction and fractionation techniques. *J. Supercrit. Fluids* **104**, 234-242.
 17. Kreft, I., Fabjan, N. and Yasumoto, K. 2006. Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) food materials and products. *Food Chem.* **98**, 508-512.
 18. Liu, C. L., Chen, Y. S., Yang, J. H. and Chiang, B. H. 2008. Antioxidant activity of tartary (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.) and common (*Fagopyrum esculentum* Moench) buckwheat sprouts. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 173-178.
 19. Mukhtar, H., Das, M., Khan, W. A., Wang, Z. Y., Bik, D. P. and Bickers, D. R. 1988. Exceptional activity of tannic acid among naturally occurring plant phenols in protecting against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-, benzo(a)-pyrene-, 3-methylcholanthrene-, and N-methyl-N-nitrosourea-induced skin tumorigenesis in mice. *Cancer Res.* **48**, 2361-2365.
 20. Ong, K. C. and Khoo, H. E. 1997. Biological effects of myricetin. *Gen. Pharmacol.: The Vascular System.* **29**, 121-126.
 21. Przybylski, R., Lee, Y. C. and Eskin, N. A. M. 1998. Antioxidant and radical scavenging activities of buckwheat seed components. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75**, 1595.
 22. Utesch, D., Feige, K., Dasenbrock, J., Broschard, T. H., Harwood, M., Danielewska-Nikiel, B. and Lines, T. C. 2008. Evaluation of the potential *in vivo* genotoxicity of quercetin. *Mutat. Res.* **654**, 38-44.
 23. Zhang, Z. L., Zhou, M. L., Tang, Y., Li, F. L., Tang, Y. X., Shao, J. R., Xue, W. T. and Wu, Y. M. 2012. Bioactive compounds in functional buckwheat food. *Food Res. Int.* **49**, 389-395.

초록 : 반응표면분석법을 이용한 타타리메밀씨에서 플라보노이드 추출 최적화

신지영 · 최이슬 · 황진우 · 양준호 · 이윤형 · 김소이 · 차은지 · 양지영*

(부경대학교 식품공학과)

타타리메밀은 rutin, quercetin, kaempferol, myricetin 등의 플라보노이드를 함유하고 있는 곡물이다. 또한, 이러한 생리활성 물질은 곡물을 발아시키고 싹으로 재배하였을 경우 증가하는 경향을 가지게 된다. 이에 본 연구에서는 반응표면분석법을 활용하여 재배한 타타리메밀씨으로부터 생리활성 물질인 플라보노이드, rutin, quercetin, myricetin의 추출 함량이 최대로 되는 최적추출조건을 도출하였다. Box-Behnken design에 따라 함량에 영향을 끼칠 수 있는 독립변수로 추출온도(X_1 , 50~70°C), 추출시간(X_2 , 5~9 hr), 에탄올의 농도(X_3 , 60~90%)를 설정하였고, 종속변수로는 rutin, quercetin, myricetin 각각의 함량을 사용하였다. 각각의 함량에 대한 모델식의 R^2 은 0.95 이상으로 유의성을 가져 적합하다고 판단되었다. 적합성 결여 test에서의 p -value가 모두 0.1 이상을 나타내어 유의성이 기각되었고, 이는 모델이 추출조건을 잘 설명할 수 있음을 나타내었다. 최적화된 추출 방법은 추출온도 51.03°C에서 6.62시간 동안 69.16%의 에탄올을 이용하여 추출하는 것이었다. 최적 조건에서의 예측된 rutin, quercetin, myricetin의 함량은 각각 808.467, 193.296, 37.361 $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 예상된 모델을 검증하기 위하여 최적화된 추출조건을 이용하여 10회 추출을 진행한 결과, rutin, quercetin, myricetin 함량이 각각 $802.84 \pm 8.49 \mu\text{g/ml}$, $193.76 \pm 2.80 \mu\text{g/ml}$, $34.84 \pm 0.43 \mu\text{g/ml}$ 으로 측정되었다 rutin과 quercetin는 예측치와 실험치가 유의적 차이를 보이지 않았지만, myricetin의 경우에는 예상된 값에 조금 미치지 못하는 값이 측정되었다.