

추출방법에 따른 미숙사과 추출물의 유용성분 함량 및 항산화 활성

†홍정진 · 설희경* · 오주열 · 정은호** · 장영호***

경상남도농업기술원 사과이용연구소 농업연구사, *경상남도농업기술원 사과이용연구소 연구원,
경상남도농업기술원 사과이용연구소 농업연구관, *경상남도농업기술원 연구개발국 농업연구관

Effective Component Contents and Antioxidative Activities of Unripe Apple by Extraction Methods

†Jeong Jin Hong, Hui Gyeong Seol*, Ju Youl Oh, Eun Ho Jeong** and Young Ho Chang***

Associate Researcher, Apple Utilization Research Institute, Gyeongsangnam-do Agricultural Research & Extension Services, Geochang 50124, Korea

*Researcher, Apple Utilization Research Institute, Gyeongsangnam-do Agricultural Research & Extension Services, Geochang 50124, Korea

**Senior Researcher, Apple Utilization Research Institute, Gyeongsangnam-do Agricultural Research & Extension Services, Geochang 50124, Korea

***Senior Researcher, Dept. of Research & Development, Gyeongnam Agriculture Research and Extension Services, Jinju 52733, Korea

Abstract

The purpose of this study was to determine the optimum extraction method suitable for the availability of biological activities in unripe apples known to be rich in functional components. Unripe apples 'Hongro' picked on May 28th, 2019 were extracted by various extraction methods (hot water, ethanol, enzymatic pre-treatment, ultrasonic wave, and subcritical water) and their extracts were investigated yield, effective component contents, and antioxidant activities. Overall, the yields by the extraction solvent were higher in water than in organic solvent(ethanol) because water-soluble compounds were eluted from a polar solvent. Total phenol contents of the ultrasonic wave (ethanol) extracts were significantly higher in 6 times than hot water extract. Contents of flavonoid were highest in the ethanol extract at 29.14 mg QE/g. Contents of tannin and ursolic acid were also significantly higher in the ultrasonic wave (ethanol) extract. The DPPH radical and ABTS radical scavenging activities were the strongest in the ultrasonic wave (ethanol) extract. Correlation between effective components and antioxidant activities was high in the total phenol content with ABTS and the ursolic acid content with DPPH ($p<0.01$). The above results suggested that ultrasonic wave (ethanol) extract of unripe apples has the potential to act as a functional material.

Key words: unripe apple, extraction method, effective component, antioxidant activity

서 론

사과의 주된 성분은 단당류, 미네랄, 식이섬유, 그리고 천연 항산화제로 알려진 비타민 C, polyphenol 화합물로 사과가 가지고 있는 다양한 기능성에 대한 연구들이 보고되어 있다(Wu 등 2007; Kalinowska 등 2014). 사과에 함유된 polyphenol은 사람의 장내에서 혹은 체내로 흡수되었을 때 산화방지제로 작용하며, 항돌연변이성 및 항암에도 효과적인 것으로 알려졌다(Miller & Rice-Evans 1997; Boyer & Liu 2004). 사과의 주요 flavonoid인 quercetin, cyanidin, epicatechin 등은 노화나

질환에 기인하는 쥐의 뇌신경세포 파괴를 막는 작용을 하여 퇴행성 뇌질환인 알츠하이머형 치매나 파킨슨병을 예방하고, 항산화 기전을 통해 만성질환을 예방하는 효과가 있음이 보고되었다(Lotito & Frei 2004; Kalinowska 등 2014). 또한 사과 과육에는 거의 없고 껍질에 다량 함유된 ursolic acid는 pentacyclic triterpenoid로서 항균, 항염증, 심혈관 효과 등이 있는 것으로 알려졌다(Cargnin & Gnoatto 2017). 한편, 미숙과실 중에는 polyphenol류의 함량이 성숙과실의 10배 이상의 농도로 존재하며 미숙사과의 주된 polyphenol 화합물은 chlorogenic acid인 것으로 보고(Park 등 2004)되어 기능성을 가진 천연소재

† Corresponding author: Jeong Jin Hong, Associate Researcher, Apple Utilization Research Institute, Gyeongsangnam-do Agricultural Research & Extension Services, Geochang 50124, Korea. Tel: +82-55-254-1653, Fax: +82-54-254-1659, E-mail: jjhong7911@korea.kr

로써 탐색되어 진 바 있다.

식물로부터 유용물질을 획득하기 위한 다양한 방법이 있는데, 일반적으로 사용되는 열수 추출법은 높은 에너지 및 열에 의해 유용성분이 파괴되는 단점을 가지고 있으며(Kwon & Youn 2017) 에탄올, 아세톤 등 유기용매 추출법은 추출 용매의 잔류성 및 사용상의 법적 규제 등 여러 가지 적용 한계를 보이고 있는 실정이다(Cheigh 등 2011). 이에 따라 최근에는 천연물의 추출효율을 증가시키기 위하여 마이크로웨이브(Choi 등 2000), 초음파(Jo 등 2017), 효소(Park & Kim 2009), 아임계(Cheigh 등 2011) 등 여러 가지 물리·화학적 추출방법이 시도되고 있다. 특히 초음파를 활용한 추출법은 20 kHz 이상 음파의 진동에 의한 공동현상(cavitation)으로 빠른 반응시간 동안 높은 효율을 얻을 수 있는 장점이 있으며(Shin & Lee 2011), 아임계 추출법은 아임계 상태의 순수한 물(subcritical water)을 추출 용매로 사용하는 것으로 플라보노이드와 같은 비극성 화합물을 추출하는데 매우 효과적인 것으로 밝혀졌다(Ramos 등 2002). 또한 식품 가공 중 발생하는 부산물로부터 기능성 물질을 추출하기 위해 cellulase와 pectinase를 전처리함으로써 유기용매에 의한 polyphenol 성분 등의 추출 수율이 증가하는 것으로 보고된 바 있다(Meyer 등 1998; Santamaría 등 2000).

따라서 본 연구는 사과의 유용성분을 기능성 소재로 활용하기에 적합한 품종과 수확 단계에 대한 선행연구(Hong 등 2019)에서 제시된 5월 말경 적과한 미숙사과 ‘홍로’ 품종을 다양한 추출방법별로 추출물을 제조하여 총 phenol, 총 flavonoid, tannin, ursolic acid 함량과 항산화 활성을 비교 조사하여 적합한 추출방법을 제시하고자 수행되었다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 시료는 2020년 사과이용연구소(거창군)에서 5월 28일경에 적과된 중생종 ‘홍로’ 품종으로, 이는 선행연구(Hong 등 2019)에서 유용성분 함량이 가장 높은 품종 및 생육단계로 보고된 바 있어 선택하였으며, 이것을 동결건조(FDT-8632, Operon, Gimpo, Korea)한 다음 분쇄(HR 2860, Philips, Guangdong, China)한 것을 사용하였다.

2. 추출물의 제조 및 수율 측정

미숙사과 추출물은 분쇄한 건조시료를 열수 및 95% 에탄올, 효소(물, 에탄올), 초음파(물, 에탄올), 아임계(물) 추출방법으로 제조하였다. 열수 추출(hot water extraction) 및 에탄올 추출(ethanol extraction)은 환류냉각 추출관을 이용하여 건조시료 10 g에 20배(w/v)의 증류수와 95% 에탄올을 가하여 각

각 100°C 및 50°C의 맨틀 상에서 6시간 추출하였다. 효소 추출(enzyme pre-treatment extraction)은 사과 껍질을 분해하기 위해 cellulase와 pectinase 활성이 있는 효소로 알려진 viscozyme (Viscozyme[®] L, Novozymes, Bagsvaerd, Denmark)을 사용하였으며(Park & Kim 2009), 건조시료 10 g에 20배(w/v)의 증류수와 95% 에탄올을 각각 가한 후 viscozyme 2%(v/v)를 첨가하고 진탕항온수조(BS-21, Jeiotec, Daejeon, Korea)를 이용하여 50°C에서 회전속도 100×g의 조건에서 6시간 반응시켜 추출하였다. 초음파 추출(ultrasonic extraction)은 건조시료 6 g에 20배(w/v)의 증류수와 에탄올을 각각 첨가하고 ultrasonic bath(UCP-02, Jeiotec, Daejeon, Korea)에서 50°C, 40 kHz 초음파로 1시간 동안 추출하였다. 아임계 추출은 건조시료 1 g과 규조토 2 g을 혼합한 후 아임계 추출기(Speed Extractor E-914, BUCHI, Flawil, Switzerland) 내부에 충전하고 추출 압력 50 bar, 추출 온도 100°C로 일정하게 조절하여 추출하였다.

각 추출물은 5,000×g에서 5분간 원심분리(Centrifuge S810R, Eppendorf, Harburg, Germany)한 후 상등액을 여과하여 감압농축(SB-100, EYELA, Tokyo, Japan)한 것을 동결건조하여 분말시료를 제조하였으며, -50°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 각 추출물들의 수율은 추출액을 동결 건조시켜 건물 중량을 구한 다음 추출액 조제에 사용한 원료 건물량에 대한 백분율(%)로 나타내었다.

3. 총 phenol 및 총 flavonoid 함량

총 phenol 함량은 Folin-ciocalteu법(Lachman 등 2006)에 따라 1 mg/mL 농도로 희석한 시료액 1 mL를 증류수 4 mL로 희석시키고 Folin-Ciocalteu 시약 0.5 mL를 넣고 3분간 방치한 다음 sodium carbonate 포화용액 1 mL와 증류수 3.5 mL를 가하고 혼합하여 실온에서 1시간 동안 반응시켜 spectrophotometer (Libra S22, Biochrom, Cambridge, England)로 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 gallic acid(Sigma Co., Darmstadt, Germany)를 사용하여 동일한 방법으로 작성된 검량선으로부터 총 phenol 함량으로 환산하였다.

총 flavonoid 함량은 Choi 등(2011)의 방법을 응용하여, 시료 0.5 mL를 취하여 10% aluminum nitrate 0.1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL를 혼합한 후, 80% 에탄올 4.3 mL 가하여 혼합한 것을 상온에서 1시간 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 quercetin(Sigma Co., Pune, India)을 사용하여 동일한 방법으로 작성된 검량선으로부터 총 flavonoid 함량으로 환산하였다.

4. 총 tannin 함량

Tannin 함량은 Kim 등(2019)의 방법을 응용하여 측정하였다. 시료액 0.1 mL를 증류수 6 mL에 희석시키고 Folin-Ciocalteu 시

약 0.5 mL와 15% sodium carbonate 포화용액 1.5 mL를 순서대로 첨가한 후 최종 볼륨이 10 mL가 되도록 증류수 1.9 mL를 추가로 첨가하였다. 암조건의 실온에서 2시간 동안 반응시켜 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 tannin acid(Sigma Co., Darmstadt, Germany)를 사용하여 검량선을 작성하였다.

5. Ursolic acid 함량

Ursolic acid는 Kang 등(2014)의 방법에 따라 동결건조 시료 중량의 10배의 에탄올과 초산 혼합용매(8:2)에 60분간 교반추출한 후 Whatman No. 2 여과지로 여과하여 감압 농축시켜 얻은 추출물을 0.45 µm 필터로 2차 여과하여 사용하였다. Column은 C₁₈(5 µm, 250×4.6 mm), 칼럼온도 40°C에서 이동상 용매(MetOH:0.02 M Sodium phosphate=12:88 pH 2.4)를 유속 1.0 mL/min으로 흘리면서 HPLC(Shimadzu, Kyoto, Japan)로 분석하였다. 검출기는 UV-Visible detector를 사용하여 210 nm에서 모니터링하여 10.5분에서 11.0분 사이에 측정하였고, 표준물질은 ursolic acid(Sigma Co., St. Quentin, France)로 검량선을 작성하였다.

6. 항산화활성

DPPH 라디칼 소거능은 Blois MS(1958)의 방법을 응용하여, 각 추출물 0.1 mL에 0.1 mM 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl 용액 2.9 mL를 혼합하여 10분간 상온에서 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료대신 80% EtOH을 취하여 동일한 과정으로 실험하였으며, 계산식은 DPPH 라디칼 소거능(%)=[1 - (시료흡광도/대조구흡광도)×100]에 의해 산출하였다.

ABTS 라디칼 소거능은 Re 등(1999)의 방법에 따라, 7 mM ABTS(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)와 2.6 mM potassium persulfate를 섞은 후 상온에서 빛을 차단하여 ABTS 양이온을 형성시킨 다음 16시간 후 732 nm에서 흡광도 값이 1.5가 되도록 증류수로 희석하였다. 조제된 희석용액 950 µL와 각 추출물 50 µL를 혼합한 후 상온에서 10분간 반응시킨 다음 732 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 계산식 ABTS 라디칼 소거능(%)=[1 - (시료흡광도/대조구흡광도)×100]에 의하여 산출하였다.

7. 통계처리

본 실험 결과에 대한 자료의 처리와 분석은 SPSS software (Version 20 SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였다. one-way ANOVA를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 다중범위검정 (Duncan's multiple range test)에 의해 각 시료간의 유의적인 차이를 검증하였고, 유효성분과 항산화 활성간의 상관관계 분석

은 Pearson's correlation coefficient(r)를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 수율

추출방법별 수율은 Table 1에서 보는 바와 같이 열수 추출이 30.3%, 물을 용매로 하는 효소 추출이 36.9%, 초음파 추출이 37.2%, 아임계 추출이 36.0%로 전반적으로 추출용매가 물인 경우가 에탄올보다 수율이 높았다. 이것은 Yang & Park (2011)의 연구에서 흑양파 물 추출물의 수율이 에탄올 추출물에 비해 높았다는 결과와 Kwon 등(2009)의 용매별 마카 추출 수율이 물에서 높았다는 결과와 유사하였는데, 미숙사과에 존재하는 수용성 화합물의 용출이 극성용매인 물에서 증가하여 추출 수율이 더 높기 때문인 것으로 판단되었다(Kwon & Youn 2017). 또한 같은 물을 용매로 한 추출방법 중에서는 열수 추출보다 효소, 초음파, 아임계 추출이 수율 면에서 더 효과적이었는데, 이는 단순한 열처리보다 효소나 초음파 등 물리적인 처리에 의해 세포막이 비가역적으로 분해되어 막 투과성이 증가됨에 따라 물질 이동이 용이하게 되어 보다 많은 성분이 세포 밖으로 용출된 것으로 추정된다(Kang & Lee 2013).

2. 총 phenol 및 총 flavonoid 함량

추출방법별 미숙사과의 총 phenol 및 총 flavonoid 함량을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 총 phenol 함량은 에탄올 용매의 초음파 추출이 32.63 mg GAE/g으로 유의적으로 가장 높은 함량이었으며($p < 0.05$), 아임계 추출과 에탄올 용매 추출은 각각 15.03 mg GAE/g, 13.96 mg GAE/g으로 비슷한 함량이었다. 에탄올 용매의 초음파 추출은 에탄올 추출과 아임계 추출의 2배 정도, 열수 추출의 6배 정도 높은 함량을 보였다. Jo 등(2017)은 탈지미세조류로부터 에탄올을 이용한 초음파

Table 1. Extraction condition and yield of unripe apple extract by various extraction methods

Extraction method		Extraction condition	Extraction yield (%)
Hot water		100°C×6 hr	30.3±0.12 ^b
Ethanol		50°C×6 hr	29.6±0.16 ^b
Enzymatic pre-treatment	Water	vicozyme 2%,	36.9±0.18 ^a
	Ethanol	50°C×12 hr	26.5±0.15 ^c
Ultrasonic wave	Water	40 kHz, 50°C×1 hr	37.2±0.10 ^a
	Ethanol		26.3±0.19 ^c
Subcritical water		100°C, 50 bar	36.0±0.13 ^a

Table 2. Total polyphenol and flavonoid contents in unripe apple extracts by various extraction methods

Extraction method		Total polyphenol (mg GAE/g)	Total flavonoid (mg QE/g)
Hot water		5.99 ^c	1.25 ^e
Ethanol		13.96 ^b	29.14 ^a
Enzymatic pre-treatment	Water	5.17 ^d	0.84 ^e
	Ethanol	7.70 ^c	13.10 ^e
Ultrasonic wave	Water	5.75 ^c	1.54 ^e
	Ethanol	32.63 ^a	17.24 ^b
Subcritical water		15.03 ^b	2.99 ^d

^{a-c}Indicate significant difference Duncan's multiple comparison at $p < 0.05$.

추출을 적용했을 때 polyphenol 추출 시 기존의 열수 추출에 비해 1.8배 이상 높은 추출성능을 확인하였다고 하여 보고하였으며, Ranjha 등(2020)은 사과 과피와 석류 과피를 각각 에탄올 등 유기용매에서 초음파 추출한 경우 일반 열수 추출보다 총 phenol 수율이 더 높은 것으로 보고하여 본 연구와 유사한 결과를 나타내었다.

총 flavonoid 함량은 에탄올 추출이 29.14 mg QE/100 g으로 가장 높은 함량이었으며, 다음은 에탄올 용매의 초음파 추출과 효소 추출, 아임계 추출 순이었다. 아임계 추출을 제외한 열수 추출, 물을 용매로 하는 효소 추출과 초음파 추출 간에는 유의적인 차이가 없이 모두 낮은 함량을 보였다. Duh 등(1992)은 과실류로부터 플라보노이드를 포함한 페놀계 성분의 유기용매 추출 시 순수한 물보다는 수용성 메탄올 또는 에탄올을 사용한 경우 추출물의 활성이 더욱 증가하였다고 보고하여 본 연구 결과와 유사하였다. Cheigh 등(2011)은 사과 과피로부터 아임계 추출 시 열수, 메탄올, 그리고 에탄올 추출물에 비해 각각 4.7배, 2.2배, 그리고 1.3배 더 높은 플라보노이드를 함유하고 있어 기존의 전통적인 추출법인 열수 및 에탄올 추출에 비해 더 우수하다고 제시한 바 있으나 본 연구 결과와는 차이를 보였다.

3. 총 tannin 및 ursolic acid 함량

추출방법별 미숙사과의 총 tannin과 ursolic acid 함량을 조사한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. 총 tannin 함량은 에탄올 용매의 초음파 추출이 10.99 mg/g으로 열수 추출의 6배, 에탄올 추출의 2.2배 정도 높은 함량이었으며($p < 0.05$), 다른 추출방법 간에는 유의적인 차이가 없었다. Ursolic acid 함량은 에탄올 용매의 초음파 추출이 5.76 mg/g, 에탄올 추출이 5.06 mg/g, 에탄올 용매의 효소처리 추출이 4.54 mg/g 순으로 높은 함량을 보였다. 초음파 추출의 경우 총 tannin과

Table 3. Total tannin and ursolic acid contents in unripe apple extracts by various extraction methods

Extraction method		Total tannin (mg/g)	Ursolic acid (mg/g)
Hot water		1.78 ^b	0.13 ^e
Ethanol		4.89 ^b	5.06 ^b
Enzymatic pre-treatment	Water	0.65 ^b	0.19 ^e
	Ethanol	1.24 ^b	4.54 ^e
Ultrasonic wave	Water	2.29 ^b	0.48 ^d
	Ethanol	10.99 ^a	5.76 ^a
Subcritical water		4.13 ^b	0.43 ^d

^{a-c}Indicate significant difference Duncan's multiple comparison at $p < 0.05$.

ursolic acid 함량 모두 용매에 따라 큰 차이를 보였는데, 에탄올 용매의 초음파 추출이 물 용매의 초음파 추출보다 각각 5배, 12배 높은 것으로 나타났다. Shin & Lee(2011)는 청나래 고사리를 메탄올, 에탄올 및 물 등을 용매로 초음파 추출한 경우 에탄올 용매의 초음파 추출 시 tannin acid를 표준물질로 하는 총 폴리페놀 함량이 가장 높은 것으로 나타났다고 보고하여 본 연구와 유사한 결과를 보였다. 이것은 초음파 추출이 생리활성 물질의 용출을 효과적으로 증가시킬 수 있으나 추출 용매에 따라 추출 중 발생하는 공동현상(cavitation)으로 인하여 형성된 hydroxy radical이 추출물의 생리활성 물질에 영향을 줄 수 있기 때문인 것으로 생각되었다(Kim 등 2006)

4. 항산화활성 및 상관관계

추출방법에 따른 DPPH radical 및 ABTS radical 소거 활성을 측정된 결과는 Fig. 1, Fig. 2와 같다. 1 mg/mL 농도에서 에탄올 용매의 초음파 추출이 DPPH radical 및 ABTS radical 소거 활성이 각각 80.26%, 87.83%로 가장 높게 나타났다. 같은 초음파 추출이더라도 DPPH radical 및 ABTS radical 소거 활성 모두 물을 용매로 하는 경우는 낮은 활성을 보여 용매

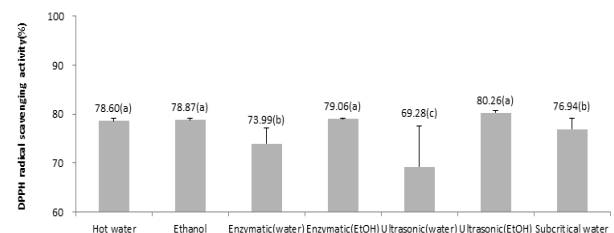


Fig. 1. ABTS radical scavenging activity in unripe apple extracts(1 mg/mL) by various extraction methods. ^{a-c}Indicate significant difference Duncan's multiple comparison at $p < 0.05$.

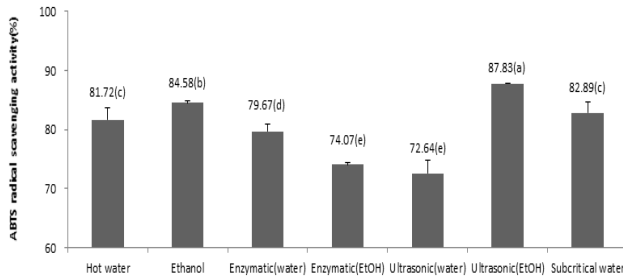


Fig. 2. ABTS radical scavenging activity in unripe apple extracts(1 mg/mL) by various extraction methods. ^{a-c} indicate significant difference Duncan's multiple comparison at $p < 0.05$.

에 따른 차이가 있었다. 추출용매에 따라 활성의 정도가 다른 것은 식물에 존재하는 다양한 항산화 물질이 추출에 사용된 용매의 극성에 의해서 용해되는 정도가 다르기 때문인 것으로 판단되었다(Naczka & Shaidi 2004).

추출방법별 미숙사과 추출물의 총 phenol, 총 flavonoid, 총 tannin, ursolic acid 함량과 DPPH radical 및 ABTS radical 소거 활성 간의 상관관계는 Table 4와 같다. 총 phenol 함량과 총 flavonoid 및 ursolic acid 함량 간의 상관관계수는 각각 0.511, 0.659($p < 0.01$)로 다소 높은 상관관계를 나타냈고, 총 phenol 함량과 총 tannin 함량 간의 상관관계수는 0.816($p < 0.01$)로 강한 상관관계를 나타냈다. Ursolic acid 함량과 DPPH radical 소거 활성 사이의 상관관계수는 0.527($p < 0.01$)로 다소 높은 상관관계를 나타냈고, 총 phenol 함량과 ABTS radical 소거활성은 0.711($p < 0.01$)로 높은 상관관계를 나타냈다. 반면 총 tannin 함량과 DPPH radical 소거활성, ursolic acid 함량과 ABTS radical 소거활성 간에는 각각 상관관계가 없었는데 이것은 항산화 정도가 항산화 유효성분 종류와 추출방법에 따라 현저한 차이가 나기 때문인 것으로 생각되었다(Kim 등, 2003). 또한 Jeong 등(2015)의 보고에 따르면 ABTS radical 소거활성은 DPPH radical 활성과 원리는 동일하지만 ABTS는 양이온

radical을, DPPH는 음이온 radical 소거활성을 측정하는 방법으로 두 방법에 대한 기질과 반응물질과의 결합정도가 다른 경우 radical 소거 활성 측정값에서 차이가 나타난다고 한 바 있어 본 연구와 일치하였다.

요약 및 결론

본 연구는 5월 30일경에 적과된 미숙사과 '홍로' 품종의 유용성분 추출물을 기능성 소재로 활용하고자 다양한 방법으로 추출했을 때 수율과 총 phenol, 총 flavonoid, 총 tannin, ursolic acid 함량 및 항산화 활성을 비교 조사하였다. 추출방법별 수율은 26.3~37.2% 범위로 전반적으로 추출용매가 물이 에탄올보다 수율이 높았다. 또한 같은 물을 용매로 한 추출방법 중에서는 열수 추출보다 효소, 초음파, 아임계 추출이 수율 면에서 더 효과적이었다. 총 phenol 함량은 에탄올 용매의 초음파추출이 32.63 mg GAE/g으로, 에탄올 추출과 아임계 추출의 2배 정도, 열수 추출의 6배 정도 유의적으로 가장 높은 함량을 보였다($p < 0.05$). 총 flavonoid 함량은 에탄올추출이 29.14 mg QE/100 g으로 가장 높은 함량이었으며, 다음은 에탄올 용매의 초음파 추출과 효소 추출, 아임계 추출 순이었다. 총 tannin 함량은 에탄올 용매의 초음파 추출이 10.99 mg/g 으로 열수 추출의 6배, 에탄올 추출의 2.2배 정도 높은 함량이었으며($p < 0.05$), 다른 추출방법 간에는 유의적인 차이가 없었다. Ursolic acid 함량은 에탄올 용매의 초음파 추출이 5.76 mg/g, 에탄올 추출이 5.06 mg/g, 에탄올 용매의 효소처리 추출이 4.54 mg/g 순으로 높은 함량을 보였다. 1 mg/mL 농도에서 에탄올 용매의 초음파 추출이 DPPH radical 및 ABTS radical 소거 활성이 각각 80.26%, 87.83%로 가장 높게 나타났다. 총 phenol 함량과 총 flavonoid 및 ursolic acid 함량 간의 상관관계수는 각각 0.511, 0.659($p < 0.01$)로 높은 상관관계를 나타냈고, 총 phenol 함량과 총 tannin 함량 간의 상관관계수는 0.816 ($p < 0.01$)로 강한 상관관계를 나타냈다. Ursolic

Table 4. Linear correlation coefficients (r) between effective components and antioxidant activities of unripe apple extracts

Factor	Total phenol	Flavonoid	Total tannin	Ursolic acid	DPPH radical	ABTS radical
Total phenol	1	0.511**	0.816**	0.659**	0.452*	0.711**
Flavonoid	-	1	0.392*	0.896**	0.471*	0.430*
Total tannin	-	-	1	0.501**	0.272 ^{NS}	0.543**
Ursolic acid	-	-	-	1	0.527**	0.356 ^{NS}
DPPH radical	-	-	-	-	1	0.574**
ABTS radical	-	-	-	-	-	1

*Significant at $p < 0.05$.

**Significant at $p < 0.01$.

^{NS}Not significant.

acid 함량과 DPPH radical 소거활성 사이의 상관계수는 0.527($p < 0.01$)로 높은 상관관계를 나타냈고, 총 phenol 함량과 ABTS radical 소거활성은 0.711($p < 0.01$)로 강한 상관관계를 나타냈다. 이상의 결과로 미루어 볼 때, 미숙사과의 유용성분 추출물을 기능성소재 등으로 활용하기 위해서는 에탄올 용매의 초음파 추출이 가장 적합한 것으로 판단되었다.

References

- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200
- Boyer J, Liu RH. 2004. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr J* 3:1-15
- Cargnin ST, Gnoatto SB. 2017. Ursolic acid from apple pomace and traditional plants: A valuable triterpenoid with functional properties. *Food Chem* 220:477-489
- Cheigh CI, Yoo SY, Cung MS. 2011. Efficient flavonoid extraction from apple peel by subcritical water and estimation of antioxidant activity. *Korean J Food Nutr* 24:458-463
- Choi JW, Ryu DY, Hong EH, Kwun MS, Han JS, Lee WH. 2000. Microwave assisted extraction of physiologically active materials from *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Korean J Biotechnol Bioeng* 15:307-312
- Choi SJ, Cho EA, Cho EH, Jeong YJ, Ku CS, Ha BJ, Chae HJ. 2011. Screening of functional materials from solvent fractions of apple flower leaf extract. *Korean Soc Biotechnol Bioeng J* 26:165-171
- Duh PD, Yeh DB, Yen GC. 1992. Extraction and identification of an antioxidative component from peanut hulls. *J Am Oil Chem Soc* 69:814-818
- Hong JJ, Seol HG, Kim YS, Jeong EH, Kim YB, Hong KP. 2019. Changes in effective component contents of apple cultivars by ripening. *Korean J Food Nutr* 32:364-370
- Jeong DS, Back DA, Kwon YR, Kwon GN, Youn KS. 2015. Quality characteristics and antioxidant activity of onion peel extracts by extraction methods. *Korean J Food Preserv* 22:267-274
- Jo JM, Shin SG, Jung HJ, Min BR, Kim SK, Kim JW. 2017. Process development for production of antioxidants from lipid extracted microalgae using ultrasonic-assisted extraction. *Korean Chem Eng Res* 55:542-547
- Kalinowska M, Bielawska A, Lewandowska-Siwkiewicz H, Priebe W, Lewandowski W. 2014. Apples: Content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. *Plant Physiol & Biochem* 84:169-188
- Kang DG, Kwon OH, Leu JA, Cjoi SY, Coi SY. 2014. A method for extracting ursolic acid from apple peels. KR patent 10-1393438-0000
- Kang KM, Lee SH. 2013. Effects of extraction methods on the antioxidative activity of *Artemisia* sp. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42:1249-1254
- Kim DH, Kim HJ, Cung BW. 2006. Extraction of anti-oxidative substance from *Haematococcus pluvialis* using ultrasonification. *J Eng Res* 37:79-86
- Kim HI, Hur YY, Im DJ, Lee DH, Jung SM, Park SJ, Kim SJ. 2019. Solvent extraction conditions for the analysis of condensed tannins from grape skin and seeds. *Korean J Food Preserv* 26:808-813
- Kim JG, Kang YM, Eun GS, Ko YM, Kim TY. 2003. Antioxidative activity and antimicrobial activity of extracts from medicinal plants (*Akebia quinata* Decasin, *Scirus fluvialilis* A. Gray, *Gardenia jasminoides* for. *grandiflora* Makino). *J Agric Life Sci* 37:69-75
- Kwon YR, Youn KS. 2017. Antioxidant and physiological activities of *Hijikia fusiforme* by extraction methods. *Korean J Food Preserv* 24:631-637
- Kwon YS, Jeon IS, Hwang JH, Lim DM, Kang YS, Chung HJ. 2009. Biological activities of Maca (*Lepidium meyenii*) extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38:817-823
- Lachman J, Šulc M, Sus J, Pavlíková O. 2006. Polyphenol content and antiradical activity in different apple varieties. *Hort Sci* 33:95-102
- Lotito SB, Frei B. 2004. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: Contrasting *in vitro* and *in vivo* effects. *Free Radical Biol Med* 36:201-211
- Meyer AS, Jepsen SM, Sørensen NS. 1998. Enzymatic release of antioxidants for human low-density lipoprotein from grape pomace. *J Agric Food Chem* 46:2439-2446
- Miller NJ, Rice-Evans CA. 1997. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and black-currant drink. *Food Chem* 60:331-337
- Nacz M, Shahidi F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in Food. *J Chromatogr A* 1054:95-111
- Park MK, Kim CH. 2009. Extraction of polyphenols from apple peel using cellulase and pectinase and estimation of antioxidant activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38:535-

540

- Park MW, Park YK, Kim ES. 2004. Properties of phenolic compounds in unripened apples. *J East Asian Soc Dietary Life* 14:343-347
- Ramos L, Kristenson EM, Brinkman UA. 2002. Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. *J Chromatogr A* 975:3-29
- Ranjha MAN, Amjad S, Ashraf S, Khawar L, Safdar MN, Jabbar S. 2020. Extraction of polyphenols from apple and pomegranate peel using conventional (Maceration) and innovative (sonication) techniques. Abstract, 10th Int Conf on Pharma, Food & Healthc Pakistan
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med* 26:1231-1237
- Santamaría RL, Reyes-Duarte MD, Bárzana E, Fernando D, Gama FM, Mota M, López-Munguía A. 2000. Selective enzyme-mediated extraction of capsaicinoids and carotenoids from chili guajillo puya (*Capsicumannuum* L.) using ethanol as solvent. *J Agric Food Chem* 48:3063-3067
- Shin SL, Lee CH. 2011. Antioxidant activities of ostrich fern by different extraction methods and solvents. *J Life Sci* 21: 56-61
- Wu J, Gao H, Zhao L, Liao X, Chen F, Wang Z, Hu X. 2007. Chemical compositional characterization of some apple cultivars. *Food Chem* 103:88-93
- Yang YR, Park YK. 2011. Comparison of antioxidant activities of black onion extracts. *Korean J Food Preserv* 18:954-960

Received 09 February, 2021
Revised 11 March, 2021
Accepted 22 March, 2021