

침지조작에 의한 레스베라트롤 증가조건의 최적화

- 연구노트 -

이선숙¹ · 서선정¹ · 이부용² · 이희봉¹ · 이준수^{1*}

¹충북대학교 식품공학과

²포천중문의과대학교 대체의학대학원

Optimization for the Post-Harvest Induction of *trans*-Resveratrol by Soaking Treatment in Raw Peanuts

Seon-Sook Lee¹, Sun-Jung Seo¹, Boo-Yong Lee², Hee-Bong Lee¹ and Junsoo Lee^{1*}

¹Dept. of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Korea

²Graduate School of Complementary Alternative Medicine, Pochun CHA University, Gyeonggi 463-836, Korea

Abstract

In this study, the effects of varying the amount of water, soaking time at 25°C and drying time after soaking at 45°C on the induction of resveratrol were evaluated to optimize the soaking treatment by response surface methodology (RSM). After response surface regression (RSREG), the second-order polynomial equation was fitted to the experimental data. The analysis of variance showed that the model appeared to be adequate ($R^2 = 0.9547$) with no significant lack of fit ($p > 0.1$). From statistical analysis, amount of water and soaking time were found to be significant factors. On the other hand, drying time was not significant. Ridge analysis showed that the optimized parameters were 67.15% for amount of water, 19.58 hr for soaking time, 65.56 hr for drying time. It was confirmed that resveratrol content was increased from 0.1 µg/g to 4.55 µg/g under the optimized conditions. In addition, the experimental values at the optimized condition agreed with values predicted by ridge analysis. The analytical method validation parameters such as accuracy, precision, and specificity were calculated to ensure the method's validity.

Key words: *trans*-resveratrol, induction, response surface methodology (RSM), peanut, optimization

서 론

땅콩은 풍부한 영양성분을 가지고 있음에도 불구하고 지방함량이 높고 콜레스테롤을 많이 함유하고 있으며 *trans* 형태의 지방산이 많아 영양학적으로 나쁘다는 인식을 소비자 분들이 가지고 있는 실정이다. 따라서 땅콩과 땅콩 가공품의 소비는 줄고 있다. 그러나 실제로 땅콩은 콜레스테롤을 함유하고 있지 않으며 다른 식품에 비해 양질의 단백질을 함유하고 있고, oleic acid, arginine, folic acid, vitamin E 그리고 vitamin B₆ 등의 영양성분을 풍부하게 함유하고 있다(1). 또한 최근 들어 항암 작용을 가진 레스베라트롤(*trans*-resveratrol)의 존재도 확인되었다(2-4).

레스베라트롤은 식물체에서 UV조사, 금속이온 혹은 곰팡이에 의한 감염 등의 생물학적, 미생물학적 스트레스에 대항해서 만들어내는 항독성물질(stilbene phytoalexin) 중의 하나이다(2,5). 레스베라트롤은 땅콩뿐만 아니라 포도와 포도 가공품인 포도 주스, 와인 등에도 함유되어 있으며 와인을 꾸준히 소량 섭취하는 사람들과 낮은 심혈관계질환 발

병률의 인과관계를 설명하는 중요한 성분중의 하나이다(6, 7). 그 작용은 정상세포가 암세포로 되는 것을 막고 암세포의 증식을 억제하는 등 암 발생과 진행의 3단계를 제어하는 작용이 있으며 독성은 확인되고 있지 않다고 보고되고 있다(8). 또한 저밀도지단백질(low density lipoprotein, LDL)의 산화를 방지하여 심혈관계 질환의 발병을 낮추는 작용을 하고(9) 최근에는 생명 연장의 한 물질로 보고된 바 있다(10).

레스베라트롤은 항산화활성, 항암활성, 항혈전활성 등 그 약리작용이 우수하나 레스베라트롤을 함유하고 있는 상용 식품으로는 포도와 그 가공품, 땅콩과 땅콩버터 등으로 한정되어 있으며 그 함유량 역시 매우 낮아 레스베라트롤의 생리활성을 기대하기는 어려운 실정이다. 그러나 레스베라트롤은 위에서 언급했듯이 외부의 물리, 화학적 또는 생물학적 자극에 의해서 유도되는 phytoalexin의 한 종류로 임의로 자극을 주었을 때 그 함유량을 증가시킬 수 있음을 시사한다. 따라서 본 연구에서는 물리적 자극 중의 하나인 침지조작을 통해 땅콩의 레스베라트롤 함량을 증가시키고자 하였으며 그 조건을 반응표면분석법을 이용하여 최적화 하고자 하였다.

*Corresponding author. E-mail: junsoo@chungbuk.ac.kr
Phone: 82-43-261-2566, Fax: 82-43-271-4412

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 땅콩은 가공처리를 하지 않은 생땅콩이었으며 2004년에 청주지역에서 구입하였다.

실험계획

땅콩에 함유되어있는 레스베라트롤의 함량을 증가시키기 위한 침지조건을 검토하기 위하여 침지 시 물의 양, 침지 시간, 침지 후 건조 시간의 3가지 변수를 독립변수로 한 실험을 설계하였다(11,12). 이때 반응표면분석(RSM)은 3-level-3-factor design 조건은 침지 시 물의 양(X_1)은 30, 60, 90% (w/w), 침지시간(X_2)은 10, 15, 20 hr, 침지 후 건조시간(X_3)은 48, 72, 96 hr로 하였다(Table 1). 침지조작에 사용한 물은 멸균수를 이용하였으며, 침지온도는 30°C, 건조온도는 45°C 이었다. 실험결과는 SAS(Statistical Analysis System) 프로그램을 이용하여 반응표면분석을 행하였으며, 모델식은 다음과 같이 2차 다항회귀모형을 사용하였다.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ij} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

여기서, Y 는 종속변수이고 β_0 , β_i , β_{ij} 는 상수이며, X_i , X_j 는 독립변수를 나타낸다.

레스베라트롤 추출방법

땅콩 일정량을 분쇄기(SMT Process Homogenizer, Japan)로 1분간(15,000 rpm) 분쇄 후 7 g을 취하여 추출용매(acetonitrile:water, 9:1, v/v) 18 mL을 가하였다. 이것을 Polytron[®] 균질기(Ultra Turrax T25 basic IKA Labor Technik, Malaysia)로 2분간 균질화한 후 여과(Whatman No.2. Whatman International Ltd, Maidstone, UK)하고 25 mL로 정용하였다. 이 추출액 10 mL을 취해 Econo-column(0.8×4 cm,

Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)에 통과시켰다. 이 Econo-column은 aluminium oxide(Neutral, Brockman activity 1, 60-325 mesh Fisher ChemAlert[®], Pittsburgh, PA, USA)와 AccuBOND[®] ODS C18(59 μm, Agilent Technologies, West Lothian, UK)의 혼합물(1:1, w/w)을 약 1~1.2 cm를 충전하여 제조하였다. Econo-column 통과 후 다시 10 mL로 정용하였으며 이를 최종추출액으로 하였다. 최종 추출액 4 mL을 취해 질소가스로 증발시키고 다시 1 mL의 methanol과 물 1:1 혼합액에 녹여 high performance liquid chromatography(HPLC)에 주입하였다(4). 레스베라트롤의 분석에 사용된 표준품은 Sigma(Louis, MO, USA), HPLC 용매는 J. T. Baker(Phillipsburg, NJ, USA) 회사로부터 HPLC 등급을 구입하여 이용하였다.

High performance liquid chromatography(HPLC) 조건 땅콩에 함유되어 있는 레스베라트롤의 함량은 HPLC (Young-Lin, M930, Korea)를 이용하여 분리·정량하였으며 column은 Nucleosil 100-5 C18(4.0×250 mm, 5 μm, Agilent Technologies, USA), 검출기는 UV(Young-Lin, M720, Korea)검출기를 사용하여 306 nm의 파장에서 측정하였다. 이동상은 acetonitrile:water(40:60, v/v), 유속은 0.3 mL/min이었으며 최종 주입되는 양은 20 μL이었다(4).

결과 및 고찰

침지조작에 의한 레스베라트롤 증가조건의 최적화

땅콩에 함유되어있는 레스베라트롤은 UV조사, 금속이온 혹은 곰팡이에 의한 감염 등의 생물학적, 비생물학적 스트레스에 대항해서 만들어내는 항독성물질(stilbene phytoalexin) 중의 하나이기 때문에(13-15) 땅콩에 이러한 자극을 임의로 주었을 때 그 함량이 증가할 수 있음을 시사한다.

Table 1. Soaking treatment variables, levels and experimental data

Treatment no ¹⁾	Variables			<i>trans</i> -Resveratrol (μg/g sample dry weight)
	Amount of water (% w/w) X_1	Soaking time (hr) X_2	Drying time (hr) X_3	
1	90 (1) ²⁾	20 (1)	72 (0)	3.93
2	90 (1)	10 (-1)	72 (0)	1.27
3	30 (-1)	20 (1)	72 (0)	3.08
4	30 (-1)	10 (-1)	72 (0)	0.72
5	90 (1)	15 (0)	96 (1)	2.85
6	90 (1)	15 (0)	48 (-1)	3.56
7	30 (-1)	15 (0)	96 (1)	1.98
8	30 (-1)	15 (0)	48 (-1)	2.07
9	60 (0)	20 (1)	96 (1)	4.56
10	60 (0)	20 (1)	48 (-1)	5.01
11	60 (0)	10 (-1)	96 (1)	1.40
12	60 (0)	10 (-1)	48 (-1)	0.83
13	60 (0)	15 (0)	72 (0)	3.12
14	60 (0)	15 (0)	72 (0)	2.96
15	60 (0)	15 (0)	72 (0)	3.58

¹⁾Treatment were run in a random order (n=1).

²⁾(-1), (0), and (1) are coded levels.

본 실험에서는 땅콩에 함유되어 있는 레스베라트롤의 최적증가조건을 찾기 위하여 반응표면분석법을 이용하여 침지조건에 따른 레스베라트롤의 함량증가를 조사하였다. 레스베라트롤의 함량증가에 있어서 세 가지 요인변수인 침지시 물의 양(X_1 , 30~90%), 침지시간(X_2 , 10~20 hr) 및 침지 후 건조시간(X_3 , 48~96 hr)에 따른 레스베라트롤의 함량은 Table 1에 나타내었으며 이에 대한 반응표면회귀식(2차 다항회귀곡선식)은 다음과 같다.

$$Y = -9.919 + 0.110667X_1 + 0.813X_2 + 0.029375X_3 - 0.000725X_1^2 - 0.0127X_2^2 + 0.000082465X_3^2 + 0.0005X_1X_2 - 0.000215X_1X_3 - 0.002125X_2X_3$$

레스베라트롤의 증가에 대한 반응표면회귀식(이차 다항회귀곡선식)의 적합도를 검사한 결과 결정계수(R^2)는 0.9547로 높은 적합도를 나타내었으며 일차 다항회귀식이 결정계수를 주도하였다(Table 2). 통계결과로부터 세 가지 요인 중 침지시간이 레스베라트롤의 증가에 가장 큰 영향을 미침을 알 수 있고($p < 0.01$) 그 다음으로 침지시 물의 양(농도)이 영향을 주며($p < 0.1$) 침지 후 건조시간은 레스베라트롤의 함량증가에 별 영향을 주고 있지 않음을 알 수 있다(Table 3). 레스베라트롤의 함량증가에 미치는 세 가지 요인들의 상호관계를 살펴보면 침지시의 물의 양(농도)을 고정시켰을 때

Table 2. Analysis of variance for soaking treatment variables as linear, quadratic term and interactions on *trans*-resveratrol content

Source	Degree of freedom	Sum of square	Significance
Model	9	23.1882	0.0073
Linear	3	20.9212	0.0011
Quadratic	3	1.8883	0.1438
Cross product	3	0.3787	0.6569
Lack of fit	3	0.8937	0.2686
Pure error	2	0.2072	
Total error	5	1.1010	
R^2		0.9547 ¹⁾	

¹⁾Coefficient of determination.

Table 3. Analysis of variance showing significance of the variables on *trans*-resveratrol content

Independent variables	Degree of freedom	Sum of squares
Amount of water (%)	4	3.4578*
Soaking time (hr)	4	19.7510***
Drying time (hr)	4	0.4223

*Significant at 10% level; ***Significant at 1% level.

대체적으로 침지시간이 증가함에 따라 레스베라트롤의 함량도 증가하였으며(Fig. 1) 침지시간을 고정시켰을 때는 침지시의 물의 양(농도)에 따라 레스베라트롤의 함량이 변화하였으며(Fig. 2), 마지막으로 건조시간을 고정시켰을 때는 침지시간에 따라 레스베라트롤의 함량이 크게 변화하였다(Fig. 3).

Ridge 분석을 통하여 레스베라트롤의 최적증가조건을 알아보았다. 침지시 수분의 양이 67%, 침지시간이 19.6 hr, 그리고 침지 후 건조시간이 65.6 hr일 때 레스베라트롤의 함량이 최대로 증가됨을 알 수 있고 이 세 가지 요인을 본 실험을 통해 세운 모델식에 대입하면 레스베라트롤의 함량은 4.58 µg/g으로 처리 전 0.1 µg/g에 비해 약 46배 정도를 증가시킬 수 있음을 예측할 수 있다. 이 값은 실험식에서 예측된 값이기에 본 실험에서는 위의 조건을 이용하여 또 한번의 독립적인 실험을 수행하여 실제 실험값과 예측값을 비교하였다. 실제 독립적인 실험에서도 레스베라트롤의 함량이 4.55 µg/g으로 나타나 본 실험에서의 반응표면회귀식(2차 다항회귀곡선식)의 적합도를 검증할 수 있었다.

분석방법의 검증

본 실험에서 사용된 레스베라트롤의 분석방법을 검증하기 위해 회귀성(linearity), 정확성(accuracy) 및 정밀성(precision)과 분석된 레스베라트롤 peak의 순도 등이 검토되었다. 반복성과 재현성의 변동계수(coefficient of variation, CV)는 각각 8.75%와 7.69%이었다(Table 4). 이는 기타의 다른 분석방법에 비해 그 CV(%)가 다소 높은 편인데 그 이유는 땅콩에 함유되어 있는 레스베라트롤의 함량이 매우

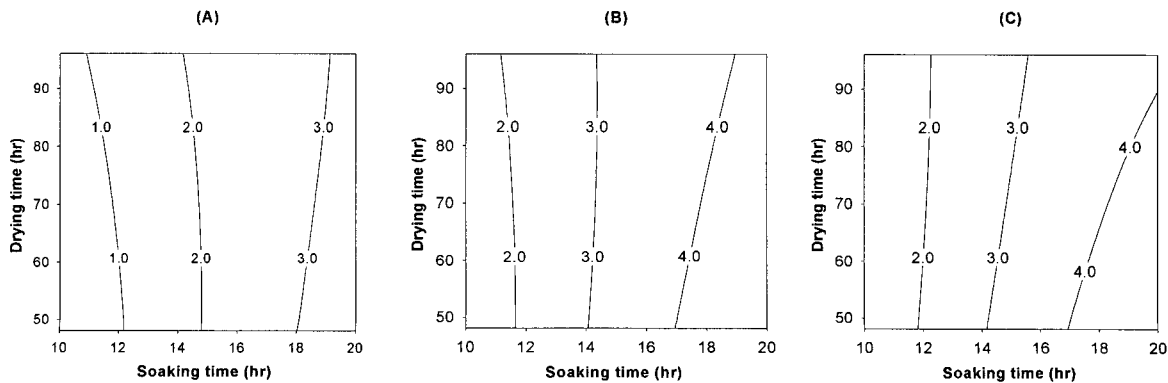


Fig. 1. Response surface plots of *trans*-resveratrol showing effects of soaking time and drying time under constant amount of water.

The numbers inside plots represent µg *trans*-resveratrol in 1 g sample: Amount of water (A) 30%, (B) 60%, (C) 90%.

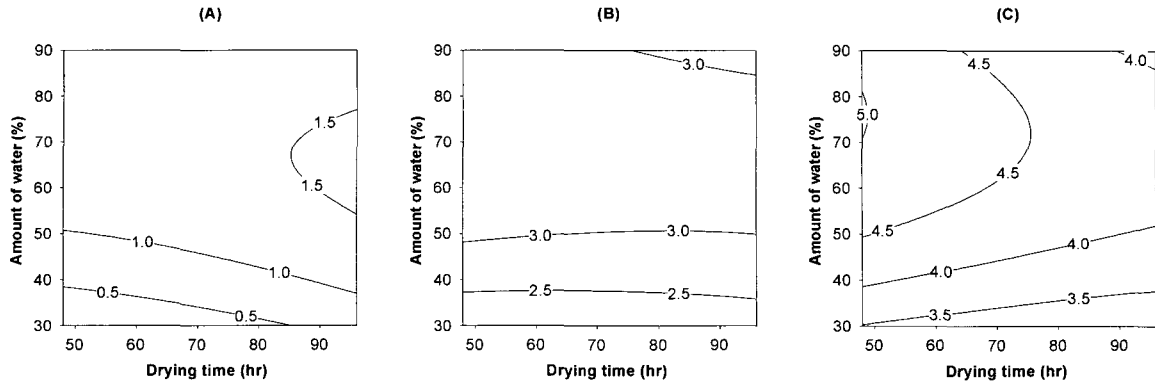


Fig. 2. Response surface plots of *trans*-resveratrol showing effects of drying time and amount of water under constant soaking time. The numbers inside plots represent µg *trans*-resveratrol in 1 g sample: Soaking time (A) 10 hr, (B) 15 hr, (C) 20 hr.

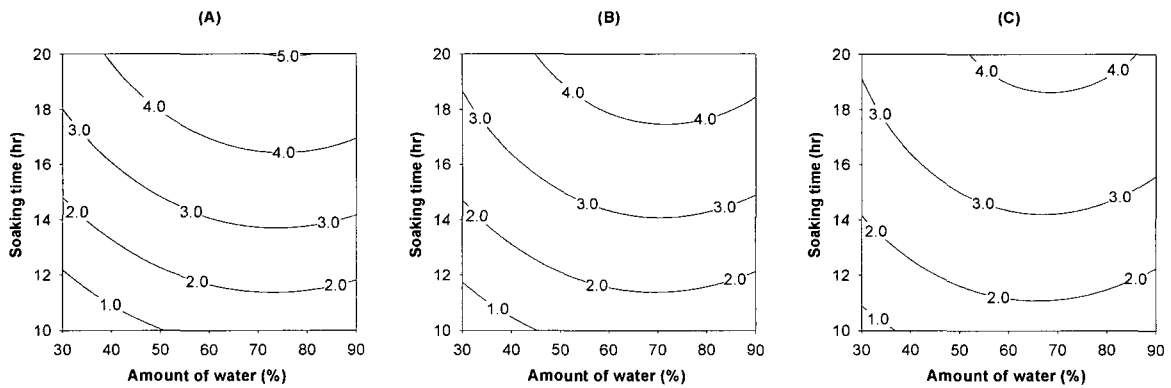


Fig. 3. Response surface plots of *trans*-resveratrol showing effects of amount of water and soaking time under constant drying time. The numbers inside plots represent µg *trans*-resveratrol in 1 g sample: Drying time (A) 48 hr, (B) 72 hr, (C) 96 hr.

Table 4. Precision and accuracy assay for raw peanuts

Precision	Parameter	Peanut	
		µg/g	Recovery ¹⁾
Repeatability ²⁾	Mean ⁴⁾	0.10	99.98
	SD ⁵⁾	0.00875	0.47
	CV (%) ⁶⁾	8.75	0.47
Reproducibility ³⁾	Mean	0.13	96.10
	SD	0.00999	4.11
	CV (%)	18.23	4.28

¹⁾A measure of the closeness of the analytical result to the true value evaluated by analyzing a spike sample.

²⁾The results of independent determinations carried out on a sample by analyzing 5 replicates of the sample at same time.

³⁾The result of independent determinations carried out on a sample by analyzing 5 replicates of the sample at different periods of time.

⁴⁾n=5

⁵⁾Standard deviation.

⁶⁾Coefficient of variation which is calculated by the standard deviation divided by the mean.

낮은데 그 원인을 찾을 수 있다(16). 반면, 회수율은 97% (n=10)이었으며 그 CV(%)도 5% 미만으로 상당히 우수하였다. 레스베라트롤 표준물질의 회귀성은 그 상관관계(r^2)가

Table 5. Evaluation of peak purity by fluorescence ratio

Ratio ¹⁾	Standard	Raw peanut	Treated peanut
330/320 nm	0.676	0.651	0.651
330/325 nm	0.805	0.772	0.813
320/325 nm	1.191	1.187	1.174

¹⁾Fluorescence ratios were calculated by dividing the values for the two peak heights for *trans*-resveratrol obtained from separate chromatographic runs at three different excitation wavelengths, with the emission wavelength constant at 374 nm.

0.999로 나타났다. 레스베라트롤의 peak 순도 측정은 Haroon 등이 제안한 간편법을 사용하였다(17). 즉, 형광 검출기의 emission wavelength를 374 nm로 고정시키고 excitation wavelength를 320, 325 그리고 330으로 변화시키면서 peak ratio를 구하여 시료 중의 peak ratio와 표준물질의 peak ratio를 비교함으로써 그 순도를 확인하였다(Table 5). 표준물질의 ratio와 시료의 ratio가 서로 유사함으로 보아 시료 중의 레스베라트롤은 다른 물질이 포함되어 있지 않음을 알 수 있었다.

요 약

레스베라트롤은 항암작용, 항혈전작용, 항산화작용 및 심혈관계질환의 발병을 낮추는 작용이 있다고 보고되어 있다. 본 실험에서는 땅콩에 함유되어 있는 레스베라트롤의 함량을 증가시키기 위한 침지조건을 반응표면분석법을 이용하여 최적화하였다. 레스베라트롤의 함량에 영향을 미치는 요인으로는 침지 시 물의 양(농도), 침지시간 그리고 침지 후 건조시간을 검토하였으며, 실험결과 침지 시 물의 양(농도)은 67.15%, 침지시간은 19.57 hr, 침지 후 건조시간은 65.56 hr으로 나타났다. 이 조건하에서 레스베라트롤은 0.1 µg/g에서 4.55 µg/g으로 약 45배 정도 증가함을 확인할 수 있었다. 레스베라트롤의 증가에 가장 큰 영향을 주는 요인으로는 침지시간이었으며 그 다음으로 침지 시 물의 양(농도)이 영향을 주었으며, 침지 후 건조시간은 별 영향을 주지 않았다. 본 실험의 이차 다항 회귀 곡선식에 대한 적합도를 결정계수로 조사한 결과 높은 적합도를 나타내었으며, 분석 방법에 대한 검증에서도 그 결과가 우수하였다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Chun J, Ye L, Lee J, Eitenmiller RR. 2003. Effect of peanut butter manufacture on vitamin E. *J Food Sci* 68: 2211-2214.
2. Sobolev VS, Cole RJ. 1999. *trans*-Resveratrol content in commercial peanuts and peanut products. *J Agric Food Chem* 47: 1435-1439.
3. Sanders TH, McMichael RW, Hendrix KW. 2000. Occurrence of resveratrol in edible peanuts. *J Agric Food Chem* 48: 1243-1246.
4. Lee SS, Lee SM, Kim M, Chun J, Cheong YK, Lee J. 2004. Analysis of *trans*-resveratrol in peanuts and peanut butters. *Food Res Int* 37: 247-251.
5. Ingham JL. 1976. 3,5,4'-Trihydroxystilbene as a phytoalexin

- from ground nuts (*A. hypogaea*). *Phytochemistry* 15: 1791-1793.
6. Arce L, Tena MT, Rios A, Valcarcel M. 1998. Determination of *trans*-resveratrol and other polyphenols in wine by a continuous flow sample clean-up system followed by capillary electrophoresis separation. *Anal Chim Acta* 359: 27-38.
7. Frémont L. 2000. Biological effects of resveratrol. *Life Sci* 66: 663-673.
8. Jang MS, Cai EN, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, Fong HHS, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275: 218-220.
9. Frémont L, Belguendou L, Delpal S. 1999. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Sci* 64: 2511-2521.
10. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425: 191-196.
11. Box GEP, Behnken DW. 1960. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics* 2: 455-475.
12. Rudolf JL, Phillips RD, Chinnan MS, Resurreccion AVA. 2002. Postharvest induction of resveratrol in peanut kernels by grinding. Abstract No 15C-9 presented at Annual Meeting of the Institute of Food Technologists. Anaheim, CA, USA.
13. Fritzeimer KH, Rolfs CH, Pfau J, Kindl H. 1983. Action of ultraviolet-C on stilbene formation in callus of *Arachis hypogaea*. *Planta* 159: 25-29.
14. Chung IM, Park MR, Chun JC, Yun SJ. 2003. Resveratrol accumulation and resveratrol synthase gene expression in response to abiotic stress and hormones in peanut plants. *Plant Science* 164: 103-109.
15. Arora MK, Strange RN. 1991. Phytoalexin accumulation in groundnuts in response to wounding. *Plant Science* 78: 157-163.
16. Lee J, Landen WO Jr, Phillips RD, Eitenmiller RR. 1998. Application of direct solvent extraction to the LC quantification of vitamin E in peanuts, peanut butter and selected nuts. *Peanut Science* 25: 213-218.
17. Haroon Y, Bacon DS, Sadowski JA. 1986. Liquid-chromatographic determination of vitamin K1 in plasma, with fluorometric detection. *Clinical Chemistry* 32: 1925-1929.

(2005년 1월 12일 접수; 2005년 3월 28일 채택)