

반응표면분석을 이용한 진피의 항산화 활성 최적화를 위한 로스팅 조건 확립

황현정¹ · 박정아¹ · 최정인¹ · 김희수² · 조미숙¹

¹이화여자대학교 식품영양학과

²(주)커피지아

Roasting Conditions for Optimization of Citri Unshii Pericarpium Antioxidant Activity Using Response Surface Methodology

Hyun Jung Hwang¹, Jeong Ah Park¹, Jeong In Choi¹, Hee Soo Kim², and Mi Sook Cho¹

¹Department of Nutritional Science & Food Management, Ewha Womans University

²CoffeeJia Co., Ltd.

ABSTRACT This study was conducted to establish roasting conditions for optimization of Citri Unshii Pericarpium antioxidant activity using response surface methodology (RSM). A central composite design was applied to investigate the effects of two independent variables, namely roasting temperature (40~100°C; X₁) and roasting time (5~15 min; X₂), on responses such as electron donating ability (Y₁), total phenolic content (Y₂), total flavonoid content (Y₃), and hydroxyl radical scavenging activity (Y₄). The maximum electron donating ability was 72.38% at a roasting temperature of 71.12°C and roasting time of 9.39 min. The maximum total phenolic content was 10.76 mg tannic acid equivalents/g at a roasting temperature of 69.71°C and roasting time of 8.39 min. The maximum total flavonoid content was 105.99 mg quercetin equivalents/100 g at 72.54°C and 8.64 min. The maximum hydroxyl radical scavenging activity was 60.33% at 68.97°C and 9.84 min. Based on the superimposition of three dimensional RSM with respect to electron donating ability, total phenolic content, total flavonoid content, and hydroxyl radical scavenging activity under various conditions, optimum conditions were established as follows: roasting temperature of 70.90°C and roasting time of 9.03 min.

Key words: Citri Unshii Pericarpium, roasting conditions, antioxidant activity, response surface methodology, optimization

서 론

최근 건강정보에 대한 관심이 고조되면서 건강식품 및 기능성식품 등의 웰빙 식품에 대한 관심이 증대되고 있으며 (1), 각종 약용작물의 2차 대사산물에 의한 항산화, 항균 및 항알레르기 활성 등에 관한 연구(2)가 활발히 진행되고 있다. 인간의 생체 내에서는 생화학 반응 및 환경적 인자에 의해 superoxide radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide 등과 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성되는데, 이들이 증가된 상태가 지속되면 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유발시킨다(3). 산화적 스트레스는 노화를 촉진시킬 뿐만 아니라 만성질환을 유발하는 주요 원인으로 알려져 있기 때문에 이를 저감하는 항산화 소재 개발 연구(4)가 꾸준히 진행되고 있다. 일반적

으로 페놀계 합성 항산화제로 널리 사용되고 있는 BHA(butylated hydroxy anisole)와 BHT(butylated hydroxy toluene)는 그 효능과 경제성으로 널리 이용되어 왔지만 과량 섭취 시 간, 위장 점막, 폐, 신장 등에 치명적인 독성 작용을 일으키는 것으로 알려져 보다 안전한 천연 항산화 소재의 개발이 요구되고 있다(5).

국내에서 재배되는 감귤류는 전체 과수 생산량 중 약 27.7%를 차지하고 있으며, 생산 증가에 비하여 소비는 그에 미치지 못할 뿐만 아니라 대체적으로 생과 소비에 그치고 있어 감귤류의 부가가치를 높일 수 있는 연구가 지속적으로 이루어지고 있다(6). 진피(陳皮, Citri Unshii Pericarpium)는 성숙한 감귤 과실의 껍질로 예로부터 한약재로 사용되어 왔으며, 대한약전에는 '귤나무(Citri Unshiu Markovich) 또는 기타 동속 근연식물(운향과, Rutaceae)의 성숙한 과피'로 규정되어 있다(7). 진피에는 carotenoid, pectin, bio-flavonoid 및 terpene 류가 풍부하게 함유되어 있으며, 고혈압 예방 등의 다양한 생리활성 작용(8,9)이 알려지고 있으나 생산량 중 일부만 한약재로 이용되고 있고 이외에는 대부분 폐기되고 있는 실정이다.

Received 9 September 2015; Accepted 15 January 2016

Corresponding author: Mi Sook Cho, Department of Nutritional Science & Food Management, Ewha Womans University, Seoul 03760, Korea

E-mail: misocho@ewha.ac.kr, Phone: +82-2-3277-4427

한편 열처리 가공은 식품에 있어 일반적으로 저장성을 연장하고 품질을 향상시키기 위해 이용되고 있는데 향, 물질적인 특성, 화학적 구성 등에 많은 영향을 주기도 하지만 일부 영양소는 가공 중 파괴되는 문제가 있다고 알려졌다(10). 최근 다양한 식품 가공에 대한 연구가 지속하여 오면서 특정 과채류의 생리활성이 열처리 과정에 의해 증가하는 것으로 보고(11)되고 있으며, Cho와 Joo(10)의 연구로 볶음치리로 인한 자색고구마의 항산화 증진 효과 등이 검증되었다. 이와 같은 결과는 식물체의 질소화합물과 환원당이 열처리 가공 중 갈색화 반응을 일으키면서 갈색 색소와 휘발성 향미 물질을 생성하고, 이 과정에서 생성된 Maillard 반응 생성물에 의해 항산화성, 항돌연변이원성 등 여러 가지 생리활성이 나타나는 현상에 따른 것으로 밝혀지고 있다(12). 따라서 본 연구에서는 진피를 다양한 기능성 식품소재로 활용하기 위한 기초자료로서 로스팅 온도 및 시간에 따른 항산화 활성 및 유효성분의 최적 조건을 설정하고자 하였으며, 이를 위해 반응표면분석법을 이용하여 특성을 모니터링하고 최적 로스팅 조건을 설정하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구의 실험재료인 진피는 제주 서귀포 지방에서 2015년 1월에 생산, 음건된 것을 (주)두손애약초(Jeonbuk, Korea)에서 구입하였으며, 실험 전 이물질 제거 후 선별하여 사용하였다. 모든 시약은 특급을 사용하였다.

시료의 제조

진피는 Roaster(Roaster THCR-005, Taewhan Automation Industry Co., Gyeonggi, Korea)를 이용하여 150 g씩 로스팅 하였다. 이때 로스팅 온도 및 시간은 수차례 예비 실험을 통한 결과를 바탕으로 반응표면분석 실험 범위 설정에 따른 13가지 조건으로 로스팅 하였다. 로스팅 과정을 거친 진피는 실온에서 충분히 식힌 후 분쇄기(EKM 200, Rommelsbacher, Dinkelsbühl, Germany)로 분말화하여 시료로 사용하였고 추출 전까지 지퍼백(zipperbag)에 담고 밀봉하여 포장한 후, 서늘하고 어두운 곳에 보관하면서 사용하였다.

추출방법

추출물의 추출방법은 시료 25 g에 2 L의 증류수를 가수하여 충분히 혼합한 후 환류냉각 장치가 부착된 추출장치(DH, WHM12038, Heating Mantel, Wise Therm, Wertheim, Germany)로 80°C에서 4시간 추출하였으며, 이를 감압여과(Filter Papers No.2, WhatmanTM, Buckinghamshire, UK) 하고 회전증발 농축기(Rotavapor R-3, BUCHI, Flawil, Switzerland)로 완전히 농축한 후 분말화하여 실험에 사용하였다.

로스팅 조건 최적화를 위한 실험계획

본 실험에서는 로스팅 특성의 모니터링과 로스팅 조건의 최적화를 위하여 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 이용하였으며(13), 로스팅 조건에 대한 실험계획은 중심합성계획(central composite design, CCD)을 실시하여(14) Design-expert® version 8.0 software for windows program으로 분석하였다(15). 로스팅 공정에서 중요한 독립변수(X_i)로 로스팅 온도(40~100°C, X_1), 로스팅 시간(5~15 min, X_2)에 대한 실험 범위를 설정하여 각각을 -2, -1, 0, 1, 2의 5단계로 부호화하였으며(Table 1), 중심합성계획에 따라 13구간으로 설정하여 실험하였다. 또한 이들 독립변수에 의해 영향을 받는 종속변수(Y_n)로는 전자공여능(Y_1), 총페놀 함량(Y_2), 총플라보노이드 함량(Y_3) 및 hydroxyl radical 소거능(Y_4)으로 하였으며, 모든 실험은 3반복 측정하여 그 평균값을 회귀분석에 사용하였다. 이를 통해 로스팅 조건이 진피 열수 추출물의 항산화적 특성에 미치는 영향을 예측 모델식으로 제시하였으며, 3차원 반응표면분석으로 나타내었다.

전자공여능 측정

시료의 전자공여능(electron donating ability, EDA)은 Brand-Williams 등(16)의 방법에 따라 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)을 이용하여 측정하였다(17). Methanol에 용해시킨 0.2 mM DPPH 100 μ L에 시료 100 μ L를 혼합하여 20분 암소 방치한 후 spectrophotometer(SPECTRAMax 340 Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하고 시료 첨가구와 무 첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 표시하여 전자공여능으로 나타내었다.

$$\text{EDA} (\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

A_0 : Control의 흡광도

A_1 : Sample의 흡광도

A_2 : Blank(without sample)의 흡광도

총페놀 함량 측정

총페놀 함량은 산화-환원 반응에 의한 색의 변화로 총페놀의 양을 측정하는 방법인 Folin-Denis법(18)을 변형하여 실시하였다. Folin-Denis reagent 80 μ L에 시료 40 μ L를 혼합하여 실온에서 3분간 반응시키고 10% sodium carbonate 80 μ L를 첨가한 후 실온에서 1시간 반응시킨 다음 spectrophotometer(SPECTRAMax 340 Microplate Read-

Table 1. Experimental design of roasting conditions for Citri Unshii Pericarpium

Roasting conditions	-2	-1	0	1	2
X_1 , temperature (°C)	40	55	70	85	100
X_2 , time (min)	5	7.5	10	12.5	15

er, Molecular Devices)를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총페놀의 함량은 tannic acid(Sigma-Aldrich Co., St, Louis, MO, USA)를 사용하여 작성된 검량 곡선으로부터 페놀 화합물을 정량하였으며, 시료 1 g 중의 mg TA/g(tannic acid equivalents)으로 나타내었다.

총플라보노이드 함량 측정

총플라보노이드 함량은 Davis법(19)을 변형하여 사용하였으며, 시료 20 μ L에 80% ethanol 160 μ L, 10% $AlCl_3$ 10 μ L 및 1 M potassium acetate 10 μ L를 혼합하여 40분간 암소에서 반응시킨 후 spectrophotometer(SPECTRAMax 340 Microplate Reader, Molecular Devices)를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 quercetin(Sigma-Aldrich Co.)을 사용하여 작성된 검량 곡선으로부터 플라보노이드 함량을 정량하였으며, 시료 100 g 중의 mg QE/100 g(quercetin equivalents)으로 나타내었다.

Hydroxyl radical 소거능 측정

Hydroxyl radical 소거능 측정은 Park 등(20)의 방법을 변형하여 측정하였다. 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4) 100 μ L와 시료 20 μ L, 10 mM iron(II) sulfate heptahydrate($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) 20 μ L를 혼합한 후 500 mM EDTA 20 μ L, 10 mM 2-deoxy-D-ribose 20 μ L 및 10 mM H_2O_2 20 μ L를 첨가하여 37°C에서 4시간 반응시켰다. 그다음 2.8% TCA 100 μ L와 1% TBA 100 μ L를 차례로 첨가하고 100°C에서 10분간 반응시킨 후 실온에서 5분간 방치한 뒤 spectrophotometer(SPECTRAMax 340 Microplate Reader, Molecular Devices)를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Hydroxyl radical scavenging activity (\%)} = \left(\frac{A_1 - A_2}{A_0} \right) \times 100$$

A_0 : Control의 흡광도

A_1 : Sample의 흡광도

A_2 : Blank(without sample)의 흡광도

최적 로스팅 조건 예측

로스팅 조건별 진피 열수 추출물의 최적 조건 예측은 Design-expert® version 8.0 software for windows program을 이용하였으며, 항산화 활성에 대한 contour map superimposing 했을 때 중복되는 부분의 범위에서 최적 로스팅 조건을 설정하였고, 또한 예측된 범위에서 임의의 중심점을 최적 조건으로 예측한 뒤 각 회귀식에 대입하여 예측값을 설정하였다. 각각의 로스팅 조건을 각각 독립변수로 하고 실험 결과인 종속변수와의 관계를 2차 다항 회귀식으로 구하였으며, 각 종속변수(Y_n)에 대한 다항 회귀식은 다음과 같다. 이때 Y 는 종속변수, X_1 과 X_2 는 독립변수, β_0 는 절편, β_n 는 회귀계수를 나타낸다.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2$$

이를 통해 1차 선형 효과, 2차 곡선 효과 및 인자 간 교호작용을 보았으며, 독립변수에 대한 종속변수의 반응표면 상태를 3차원 그래프와 perturbation plot으로 나타내어 분석을 실시하였고, canonical 모형의 수치 최적화(numerical optimization)와 모형의 최적화(graphical optimization)를 통해 최적화를 위한 조건을 설정하였다. 회귀분석 결과 임계점이 최대점이거나 최소점이 아닌 안장점일 경우에는 능선 분석을 하여 최적점을 구하였다(21).

결과 및 고찰

전자공여능

전자공여능은 활성 라디칼에 전자를 공여하고 식품 중의 지방질 산화를 억제하는 목적으로 사용되며, 인체 내에서는 활성 라디칼에 의한 노화를 억제시키는 것으로 알려져 있다(22). 로스팅 조건에 따른 진피 열수 추출물의 전자공여능은 59.92~78.67%의 범위로 나타났으며(Table 2), 이를 바탕으로 한 전자공여능의 회귀식은 Table 3과 같고 R^2 값은 0.7540으로 확인되었다. ANOVA 분석을 통한 모형에 대한 적합성을 검증하기 위해서는 Lack of fit의 P -value가 0.05 이상으로 확인되어야 하는데(15), 전자공여능의 P -value가 0.4317로 나타나 모형의 적합성이 인정되었다(Table 4). 로스팅 조건에 따라 반응표면모델로 예측된 회귀분석 결과 임계점이 최대점이 아닌 안장점으로 나타났으며, 능선 분석을 하여 최적점을 산출한 결과 전자공여능의 최댓값은 72.38%이며, 이때의 로스팅 조건은 71.12°C, 9.39분으로 나타났다(Table 5). 3차원 반응표면을 통한 로스팅 조건에 따른 진피 열수 추출물의 전자공여능 변화는 Fig. 1(A)와 같으며, 로스팅 조건에 대한 영향은 로스팅 온도(X_1)가 로스팅 시간(X_2)보다 큰 영향을 미치고 있는 것으로 분석된다(Table 6). Jeong 등(23)의 연구 결과 추출물의 에탄올 농도가 추출 시간보다 더 큰 영향을 미치는 것으로 확인되었으며, 이와 같은 결과를 응용하여 천연물 유래 기능성 식품 소재로 이용이 가능할 것으로 사료된다.

총페놀 함량

식물의 2차 대사산물로 수산기를 가지는 방향성 화합물을 총칭하는 페놀 화합물은 다양한 과일, 채소, 약용식물 등의 천연물에 다량 분포된 것으로 보고되고 있으며, 특히 분자 내 phenolic hydroxyl기가 효소 단백질과 같은 거대분자들과 결합하는 성질을 가지고 있어 항염, 항종양, 항암, 동맥경화 방지, 항당뇨, 항균 활성 등 건강에 유익한 생리활성 효과를 나타내는 것으로 연구되고 있다(24-27). 로스팅 조건에 따른 진피 열수 추출물의 총페놀 함량을 측정된 결과는 Table 2와 같으며, 4.15~12.26 mg TA/g의 범위로 측정되었다. 조건에 따른 값을 이용한 총 페놀 함량의 회귀식은

Table 2. Experimental data on electron donating ability, total phenolics content, total flavonoid content, and hydroxyl radical scavenging of Citri Unshii Pericarpium extract under different roasting conditions based on central composite design by response surface analysis

Exp. No. ¹⁾	Roasting conditions		Antioxidant activity			
	Temp (°C)	Time (min)	Electron donating ability (%)	Total phenolics content (mg TA/g)	Total flavonoid content (mg QE/100 g)	Hydroxyl radical scavenging activity (%)
1	40	10	65.68	4.15	42.92	38.69
2	85	12.5	78.67	8.44	46.69	42.86
3	70	10	77.56	9.90	118.27	65.48
4	70	10	71.96	12.26	95.29	63.69
5	70	10	72.18	10.33	116.96	61.31
6	70	10	69.77	9.67	100.47	58.93
7	85	7.5	68.50	9.12	82.57	50.00
8	100	10	67.16	5.41	34.41	36.61
9	55	7.5	71.82	9.59	55.55	47.02
10	70	10	68.08	11.02	117.31	60.71
11	55	12.5	59.92	6.43	77.39	54.17
12	70	15	60.52	7.73	64.50	56.58
13	70	5	67.66	9.59	94.32	58.93

¹⁾The number of experimental conditions by central composite design.

Table 3. Polynomial equation calculated by RSM program for roasting conditions of Citri Unshii Pericarpium extract

Response	Second order polynomials	R ²	F-value	Pro>F
Electron donating ability	$Y_{EDA} = +113.96046 - 0.54311X_1^{1)} - 4.73959X_2^{2)} + 0.14783X_1X_2 - 0.005946X_1^2 - 0.30728X_2^2$	0.7540	4.29	0.0417**
Total phenolics content	$Y_{TPC} = -16.87817 + 0.77057X_1 + 0.18590X_2 + 0.016537X_1X_2 - 0.01956873X_1^2 - 0.079786X_2^2$	0.8564	15.32	0.0012***
Total flavonoid content	$Y_{TFC} = -652.00476X_1 + 14.97767X_2 - 0.38480X_1X_2 - 0.080319X_1^2 - 1.26168X_2^2$	0.8573	8.41	0.0071***
Hydroxyl radical scavenging activity	$Y_{HRS} = -154.47455 + 4.76213X_1 + 10.28462X_2 - 0.095238X_1X_2 - 0.027732X_1^2 - 0.18883X_2^2$	0.8712	9.47	0.0051***

¹⁾Temperature (°C). ²⁾Time (min).

Significant at 5% level; *Significant at 1% level.

Table 4. Analysis of variance (ANOVA) results for electron donating ability, total phenolics content, total flavonoid content, and hydroxyl radical scavenging activity for roasting conditions

	Model	R ²	Lack of fit	Temp	Time	Temp × Temp	Temp × Time	Time × Time
Electron donating ability	273.23**	0.7540	0.4317	28.54	21.61	41.01	122.93**	84.51**
Total phenolics content	52.23***	0.8564	0.8427	1.40	4.77**	49.36***	1.54	5.70**
Total flavonoid content	1,798.69**	0.8573	0.1687	35.71**	452.45	7,483.41***	832.88	1,424.78**
Hydroxyl radical scavenging activity	968.05***	0.8712	0.0601	14.29	1.89	892.12***	51.02	31.92

Significant at 5% level; *Significant at 1% level.

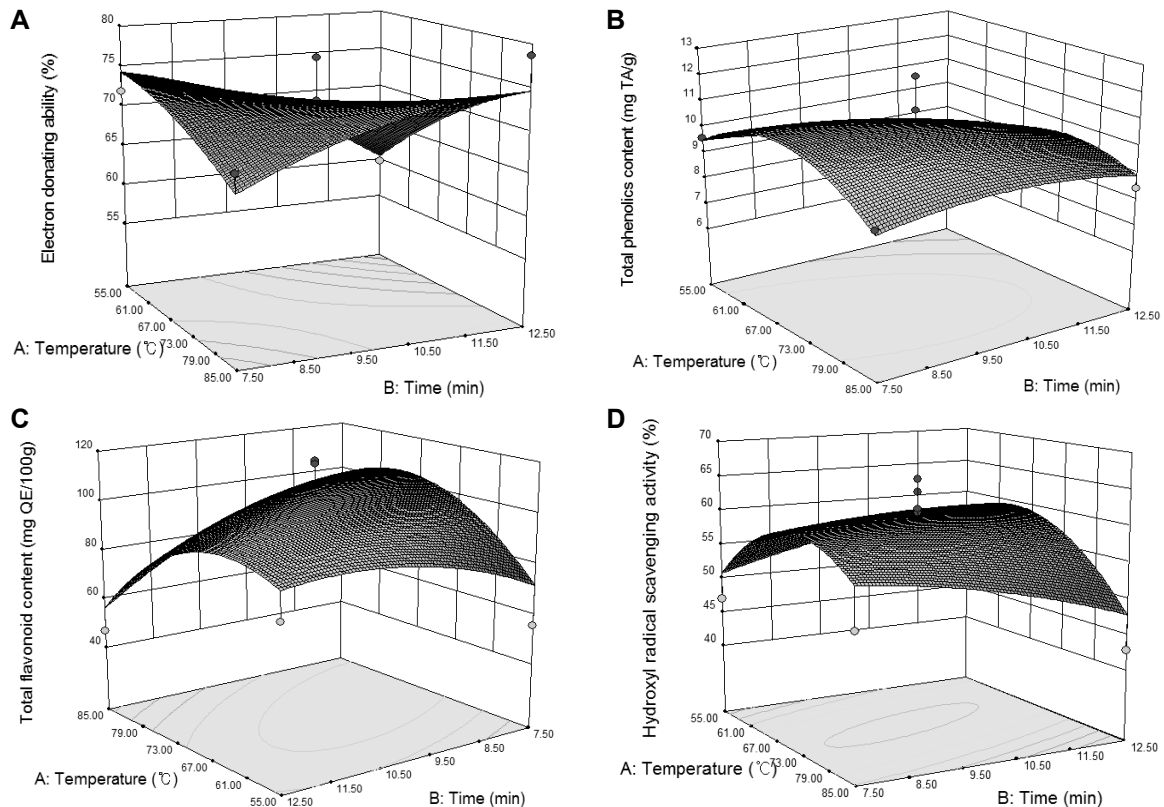
Table 3과 같으며, 이 모델에 대한 회귀식의 R² 값은 0.8564로 나타났다. ANOVA 분석을 통한 Lack of fit의 P-value는 0.8427로 분석되어 반응표면 모형에 대한 적합성이 확인되었다(Table 4). 로스팅 조건에 따라 반응표면모델로 예측된 정상점은 최대점으로 구하였고 총페놀의 최대 함량은 10.76 mg TA/g이었으며, 이때의 로스팅 조건은 69.71°C, 8.39분으로 나타났다(Table 5). 3차원 반응표면을 통한 진피 열수

추출물의 총페놀 함량 변화는 Fig. 1(B)와 같으며, 로스팅 조건에 대한 영향은 로스팅 시간(X₂)이 로스팅 온도(X₁)보다 큰 영향을 주는 것으로 생각된다(Table 6). 최근 과체류의 고압처리에 의한 폴리페놀 함량 증가에 대한 연구(28)가 지속적으로 진행되고 있으며, 이와 같이 로스팅 과정으로 증가된 진피의 페놀성분은 활성자유라디칼(reactive free radical)에 수소원자를 제공해 안정한 비라디칼(non-radical)을

Table 5. Predicted levels of roasting conditions of Citri Unshii Pericarpium extract for the maximum response of variables by the ridge analysis

Response	X ₁ ¹⁾	X ₂ ²⁾	Maximum	Morphology
Electron donating ability	71.12	9.39	72.38 (%)	Saddle point
Total phenolics content	69.71	8.39	10.76 (mg TA/g)	Maximum
Total flavonoid content	72.54	8.64	105.99 (mg QE/100 g)	Maximum
Hydroxyl radical scavenging activity	68.97	9.84	60.33 (%)	Maximum

¹⁾Temperature (°C). ²⁾Time (min).

**Fig. 1.** Response surface for electron donating ability (A), total phenolics content (B), total flavonoid content (C), and hydroxyl radical scavenging activity (D) of Citri Unshii Pericarpium extract by hot water extraction according to roasting conditions.

만들어 줌으로써 활성산소를 제거하는 항산화 효과(29)를 나타낼 것으로 기대된다.

총플라보노이드 함량

플라보노이드란 그리스어로 황색을 의미하는 flavus에서 유래된 자연계 페놀 화합물이며 anthocyanin과 anthoxanthin을 포함하는 비질소성 생물색소이다. Anthoxanthin은 꽃잎 등의 노란색, anthocyanin은 어린줄기의 붉은 색을 띠게 하는 주원인으로 보고되고 있으며, 플라보노이드는 1O_2 , O_2^- 와 결합하여 안정적인 complex를 형성하여 지질 과산화에 대한 천연 항산화제로 이용되고 있다(30). 감귤류에는 다양한 종류의 플라보노이드가 존재하는 것으로 알려졌으며, 현재까지 약 60여종의 플라보노이드가 분리되었고 생리 활성 물질이 지속해서 발견되고 있다(31). 로스팅 조건에 따른 진피 열수 추출물의 총플라보노이드 함량을 측정할 결

과는 Table 2와 같으며, 34.41~118.27 mg QE/100 g의 범위로 나타났고 이러한 결과를 이용한 총플라보노이드 함량의 회귀식은 Table 3과 같다. 반응표면모델에 대한 회귀식의 R^2 값은 0.8573으로 나타났으며, ANOVA 분석을 통한 Lack of fit의 P -value가 0.1687이므로 모형에 대한 적합성이 인정되었다(Table 4). 로스팅 조건에 따라 반응표면모델로 예측된 정상점은 최대점으로 구하였으며, 이때 총플라보노이드의 최대 함량은 105.99 mg QE/100 g, 로스팅 조건은 72.54°C, 8.64분으로 나타났다(Table 5). Hyon 등(32)의 연구에 따르면 진귤 생과피 메탄올 추출물의 총플라보노이드 함량이 $101.2 \pm 1.8 \sim 138.7 \pm 3.5$ mg/100 g으로 나타났으므로, 로스팅 과정으로 인해 총플라보노이드 함량이 다소 증가된 것을 확인할 수 있다. 3차원 반응표면을 통한 진피 열수 추출물의 총플라보노이드 함량 변화는 Fig. 1(C)와 같으며, 로스팅 조건에 대한 영향은 로스팅 시간(X_2)이 로스팅

Table 6. Regression analysis for regression model of variables in roasting condition

Roasting conditions	F-ratio	
	X ₁ ¹⁾	X ₂ ²⁾
Electron donating ability	2.24**	1.70
Total phenolics content	1.87*	6.38**
Total flavonoid content	0.17	2.12**
Hydroxyl radical scavenging activity	0.70	0.092

¹⁾Temperature (°C). ²⁾Time (min).

*Significant at 10% level; **Significant at 5% level.

온도(X₁)보다 큰 영향을 주는 것으로 나타났다(Table 6). 진피의 플라보노이드 함량을 증가시키기 위한 연구는 지속적으로 이루어지고 있으며, 열처리에 따른 진피 고체 발효물의 성분 분석 결과 감귤류 유래 플라보노이드인 hesperidin 함량이 비열처리 조건(64.46±0.10 mg/g)보다 열처리 조건(67.60±0.32 mg/g)에서 더 높게 나타났다(33). 또한 Park 등(34)에 의해 생물전환을 통한 플라보노이드 고함량 기능성 소재 개발 연구 등이 보고되고 있다.

Hydroxyl radical 소거능

Free radical 중에서도 가장 강력한 독성을 나타내는 것으로 알려진 hydroxyl radical(·OH)은 반응성이 매우 크고 반응속도가 빠르며, 지질의 산화 및 DNA 손상을 촉진하여 돌연변이를 유발함으로써 다양한 질환에 관여하는 것으로 알려졌다(35). 로스팅 조건에 따른 진피 열수 추출물의 hydroxyl radical 소거 활성을 측정된 결과는 36.61~65.48%의 범위로 나타났으며(Table 2), 이를 이용한 회귀식은 Table 3에 나타났다. 반응표면모델의 회귀식의 R² 값은 0.8712로 확인되었으며, ANOVA 분석을 통한 Lack of fit의 P-value가 0.0601이므로 반응표면 모델에 대한 적합성이 인정되었다(Table 4). 로스팅 조건에 따라 반응표면모델로 예측된 정상점은 최대점으로 구하였고 hydroxyl radical 소거능의 최댓값은 60.33%였으며, 이때의 로스팅 조건은 68.97°C, 9.84분으로 나타났다(Table 5). 3차원 반응표면을 통한 로스팅 조건에 따른 진피 열수 추출물의 hydroxyl radical 소거 활성 변화는 Fig. 1(D)와 같으며, 로스팅 온도(X₁)가 로스팅 시간(X₂)보다 큰 영향을 주는 것으로 나타났다(Table 6). 이와 같은 결과를 바탕으로 진피를 활용한 천연 항산화 식품 소재 및 향장품 소재 개발에 기초자료로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

Table 7. Comparison between predicted and observed values of response variables within the range of the optimum condition

	Optimum conditions	Predicted value	Experimental value
Electron donating ability		72.38 (%)	67.24±1.20 ¹⁾ (%)
Total phenolics content	70.90°C,	10.73 (mg TA/g)	10.01±0.54 (mg TA/g)
Total flavonoid content	9.03 min	105.74 (mg QE/100 g)	111.10±0.05 (mg QE/100 g)
Hydroxyl radical scavenging activity		60.26 (%)	58.54±1.55 (%)

¹⁾Data are the means±SD of three experiments.

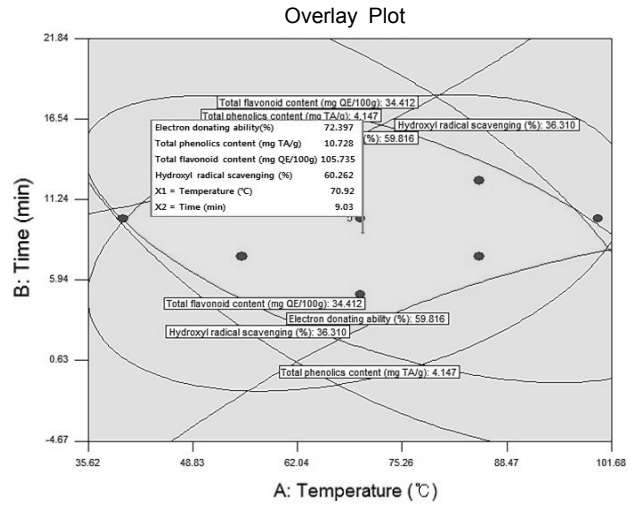


Fig. 2. Superimposing contour map for optimizing roasting conditions of Citri Unshii Pericarpium.

최적 로스팅 조건 예측

진피의 최적 로스팅 조건을 설정하기 위하여 로스팅 조건별 열수 추출물의 전자공여능, 총페놀 함량, 총플라보노이드 함량 및 hydroxyl radical 소거능에 대한 반응표면을 superimposing 하여 Fig. 2에 나타내었다. 각 분석 항목의 최적 로스팅 조건으로 도출된 최대 또는 최저값의 반응표면 한 도면에 일치시킨 결과 모든 항목에서 최댓값의 반응표면 그래프가 완전 또는 부분적으로 적합한 것으로 나타났으며, 일치하는 부분에 대해 각각의 독립변수의 범위를 고려하여 최적 로스팅 조건으로 설정하였다. 그 결과 진피 열수 추출물의 항산화 활성을 최대화할 수 있는 로스팅 조건으로 로스팅 온도는 70.90°C, 로스팅 시간은 9.03분으로 나타났고, 이와 같은 최적 조건에서 전자공여능은 72.38%, 총페놀 함량 10.73 mg TA/g, 총플라보노이드 함량 105.74 mg QE/100 g 및 hydroxyl radical 소거능 60.26%로 예측되었다(Table 7). 반응표면분석법에 의해 예측된 값과 동일조건에서 실제 실험하여 얻은 실험치를 비교한 결과 전자공여능(67.24±1.20%), 총페놀 함량(10.71±0.54 mg TA/g), 총플라보노이드 함량(111.20±0.05 mg QE/100 g) 및 hydroxyl radical 소거능(58.54±1.55%) 분석 값이 95% 신뢰구간(confidence interval, CI)에 속하여 재연성이 검증되었다(Table 7).

요 약

본 연구는 진피의 항산화 성분 및 항산화 활성에 대한 최적 로스팅 조건을 설정하기 위하여 로스팅 온도(40~100°C, X₁)와 로스팅 시간(5~15 min, X₂)을 독립변수로 하고, 중심합성계획(CCD) 실험 범위 설정에 따른 13가지 조건으로 로스팅 된 진피의 열수 추출물에 대한 전자공여능, 총페놀 함량, 총플라보노이드 함량 및 hydroxyl radical 소거능을 측정하였다. 전자공여능은 71.12°C에서 9.39분 로스팅 하였을 때 최적점이 72.38%로 예측되었으며, 총페놀 함량은 69.71°C에서 8.39분 로스팅 하였을 때 최대 10.76 mg TA/g, 총플라보노이드 함량은 72.54°C에서 8.64분 로스팅 하였을 때 최대 105.99 mg QE/100 g, hydroxyl radical 소거능은 68.97°C에서 9.84분 로스팅 하였을 때 최대 60.33%로 예측되었다. 이상의 결과를 바탕으로 진피의 항산화 활성 및 유효성분 증가를 위한 최적 로스팅 조건은 70.90°C, 9.03분으로 분석되었으며, 이 조건에서 예측된 각각의 값과 실제 측정값을 비교하였을 때 95% 신뢰구간 내에서 재연성이 확인되었다. 이상의 결과로 로스팅 된 진피의 열수 추출물의 천연물 유래 기능성 식품소재 및 식품으로서 활용 가능성을 확인하였으며, 추후 연구를 통해 유효 물질의 분리·정제 및 구조분석이 필요하다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 서울지방중소기업청 산학연협력기술개발사업(과제번호: C0237129)에 의해 이루어진 결과이며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Bang BH, Kim KP, Kim MJ, Jeong EJ. 2011. Quality characteristics of cookies added with *Chungkukjang* powder. *Korean J Food & Nutr* 24: 210-216.
- Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. 2004. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 36: 333-338.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, New York, NY, USA. p 105-350.
- Yoon BR, Lee YJ, Hong HD, Lee YC, Kim YC, Rhee YK, Kim KT, Lee OK. 2012. Inhibitory effects of *Panax ginseng* C. A. Mayer treated with high temperature and high pressure on oxidative stress. *Korean J Food & Nutr* 25: 800-806.
- Moon YG, Hong JS, Song MH. 2012. DPPH radical scavenging activity and composition of essential oil from the herbs of Jeju *Agastache rugosa*. *J Life Sci* 22: 156-160.
- An HJ, Park KJ, Kim SS, Hyun JM, Park JH, Park SM, Yun SH. 2014. Antioxidative activities of new citrus hybrid 'Hamilgam' peel extracts. *Korean J Medicinal Crop Sci* 22: 442-448.
- Korea Food & Drug Administration. 2005. *The Korean pharmacopeia*. 8th ed. Shinil Books, Seoul, Korea. p 1455-1456.
- Moresi M, Clementi F, Rossi J, Medici R, Vinti L. 1987. Production of biomass untreated orange peel by *Fusarium avenaceum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 27: 37-45.
- Monforte MT, Trovato A, Kirjavainen S, Forestieri AM, Galati EM, Lo Curto RB. 1995. Biological effects of hesperidin, a Citrus flavonoid. (note II): hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. *Farmaco* 50: 595-599.
- Cho KM, Joo OS. 2012. Enhances antioxidant effect of purple sweet potato by roasting. *Korean J Food Preserv* 19: 735-743.
- Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50: 3010-3014.
- Jung HJ, Lee SR. 1991. Browning and mutagenicity of roasted barley and sesame seeds. *Korean J Food Sci Technol* 23: 280-285.
- Wanasundara PKJPD, Shahidi F. 1996. Optimization of hexametaphosphate-assisted extraction of flaxseed proteins using response surface methodology. *J Food Sci* 6: 606-607.
- Kim JW, Moon BS, Park YM, Yoo NH, Ryoo IJ, Chinh NT, Yoo ID, Kim JP. 2005. Structures and antioxidant activity of diketopiperazines isolated from the mushroom *Sarcodeodon aspratus*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 48: 93-97.
- Lim YB, Park SH, Ann BJ, Kim YI. 2008. *Practical design of experiments*. Free Academy, Seoul, Korea. p 41-42.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol* 28: 25-30.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Isabelle M, Lee BL, Ong CN, Liu X, Huang D. 2008. Peroxyl radical scavenging capacity, polyphenolics, and lipophilic antioxidant profiles of mulberry fruits cultivated in southern China. *J Agric Food Chem* 56: 9410-9416.
- Davis WB. 1947. Determination of flavanones in citrus fruits. *Anal Chem* 19: 476-478.
- Park SW, Chung SK, Park JC. 2000. Active oxygen scavenging activity of luteolin-7-O-β-D-glucoside isolated from *Humulus japonicus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 106-110.
- Lee DW, Lee SY, Chung HS, Choi YW, Im DS, Lee YG. 2013. Optimization of a process for extraction of petasin from *Petasites japonicus* leaves by response surface methodology. *J Life Sci* 23: 1360-1364.
- Lee BB, Park SR, Han CS, Han DY, Park EJ, Park HR, Lee SC. 2008. Antioxidant activity and inhibition activity against α-amylase and α-glucosidase of *Viola mandshurica* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 405-409.
- Jeong JE, Shim SP, Jeong YS, Jung HK, Kim YC, Hong JH. 2011. Optimization of extraction conditions for ethanol extracts from *Citrus unshiu* peel by response surface methodology. *Korean J Food Preserv* 18: 755-763.
- Huang MT, Ho CT, Lee C. 1992. *Phenolic compounds in food and their effects on health II*. ACS Symposium Series 507. American Chemical Society, Washington DC, USA. p 54-71.
- Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H. 2002. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177: 67-80.
- Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr* 81: 215S-217S.
- Kang MA, Kim MB, Kim JH, Ko YH, Lim SB. 2010.

- Integral antioxidative capacity and antimicrobial activity of pressurized liquid extracts from 40 selected plant species. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1249-1256.
28. Lee YR, Woo KS, Hwang IG, Kim HY, Lee SH, Lee J, Jeong HS. 2012. Physicochemical properties and antioxidant activities of garlic (*Allium sativum* L.) with different heat and pressure treatments. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 278-282.
 29. Lee SG, Lee EJ, Park WD, Kim JB, Choi SW. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from Korean traditional medicinal prescriptions. *Korean J Food Sci Technol* 43: 624-632.
 30. Choi SR, You DH, Kim JY, Park CB, Kim DY, Ryu J. 2009. Antioxidant activity of methanol extracts from *Cudrania tricuspidata* Bureau according to harvesting parts and time. *Korean J Medicinal Crop Sci* 17: 115-120.
 31. Kim YD, Ko WJ, Koh KS, Jeon YJ, Kim SH. 2009. Composition of flavonoids and antioxidative activity from juice of Jeju native citrus fruits during maturation. *Korean J Nutr* 42: 278-290.
 32. Hyon JS, Kang SM, Senevirathne M, Koh WJ, Yang TS, Oh MC, Oh CK, Jeon YJ, Kim SH. 2010. Antioxidative activities of dried and fresh citrus peels in Jeju. *Korean J Food Cookery Sci* 26: 88-94.
 33. Yun CS. 2007. Studies of *Citrus unshiu* peel by yeast fermentation. *MS Thesis*. Kyung Hee University, Seoul, Korea. p 18-21.
 34. Park CD, Jung HK, Park CH, Jung YS, Hong JH, Ko HS, Kang DH, Kim HS. 2012. Isolation of citrus peel flavonoid bioconversion microorganism and inhibitory effect on the oxidative damage in pancreatic beta cells. *Korean Soc Biotechnol Bioeng J* 27: 67-74.
 35. Halliwell B, Aruoma OI. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 281: 9-19.