

Microwave-Assisted Process에 의한 섬백리향의 항산화 관련 성분의 최적 추출조건 예측

권영주 · 노정은 · 이정은 · 이성호¹ · 최용희 · 권중호[†]
경북대학교 식품공학과, ¹계명문화대학 식품영양조리과

Prediction of Optimal Extraction Conditions in Microwave-Assisted Process for Antioxidant-Related Components from *Thymus quinquecostatus*

Young-ju Kwon, Jung-eun Noh, Jung-eun Lee, Sung-Ho Lee¹, Yong-Hee Choi
and Joong-Ho Kwon

Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 701-702, Korea

¹Department of Food Nutrition and Culinary, Keimyung College, Daegu 704-703, Korea

Abstract

Microwave-assisted process(MAP) was applied to extract antioxidant-related components from *Thymus quinquecostatus* var. *japonica* Hara. Microwave power(2,450 MHz, 0~160 W) and extraction time(1~5 min) were used as independent variables(X_i) for central composite design to yield 10 different extraction conditions. Response surface methodology was applied to predict optimum extraction conditions for dependent variables of extracts, such as total yield, total phenolics, flavonoid, and electron donation ability depending on different powers and extraction times of MAP. Determination coefficients(R²) of regression equations for dependent variables were higher than 0.93 excluding that of total phenolics, and microwave power was predicted more influential than extraction time in MAP (p<0.05). The optimal extraction time for each dependent variable was ranged from 3.36 to 4.97 min, but microwave power showed wide ranges depending on variables. The superimposed contour maps for maximized dependent variables illustrated extraction conditions of 64 to 100 W in microwave power and 2.9 to 4.0 min in extraction time.

Key words : *Thymus quinquecostatus*, microwave-assisted extraction, antioxidative components

서 론

최근 식생활 패턴의 변화와 생활환경의 악화로 생활습관병의 발병률이 크게 증가하고 있다. 따라서 자연지향 및 건강지향에 관심이 높아지면서 건강기능식품의 제도적 발전과 수요 확대가 전망되고 있다(1). 섬백리향(*Thymus quinquecostatus*)은 남부유럽이 원산지이며 꿀풀(Labiatae)과에 속하는 다년생 초본으로서 아열대로부터 온대에 걸쳐 자생하고 있다. 우리나라에는 울릉도 일원과 남부지역에

산재하여 분포하며, 특히 양지나 음지를 가리지 않고 강한 번식력이 있어 재배도 용이한 것으로 알려져 있다(2). 특히 독특한 향기를 지니고 있어서 식품 및 향료자원으로서도 활용이 가능하며 육류, 어류 등의 불쾌취를 없애고 향장품(비누, lotion 등), 치약 등으로도 널리 이용되고 있다(3,4). 섬백리향에 존재하는 약리성분으로는 배당체의 일종인 scutellareinheteroside, 플라보노이드류인 apigenin 및 페놀성분의 일종인 carvacrol 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(4). 현재 백리향 식물에 대한 국내 연구로는 백리향 및 섬백리향의 정유성분 분석(5,6), 한국산 허브를 이용한 침출차에 대한 가공특성(7)이 있으며, 국외는 백리향과 식물의 정유성분의 화학적 분석에 관한 연구 및 잎의 향기성

[†]Corresponding author. E-mail : jhkwon@knu.ac.kr,
Phone : 82-53-950-5775, Fax : 82-53-950-6772

본 분석과 항산화성 물질의 검출 등에 관한 연구가 수행되었다(8,9).

따라서 본 연구에서는 천연 향료자원으로서 섬백리향의 활용도를 높이고자 국내에서 자생하고 있는 섬백리향의 기능성분 추출법을 연구하면서 마이크로웨이브 공정을 이용하여 시료의 항산화 관련 성분의 추출특성과 최적 추출조건을 반응표면분석에 의해 예측하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용한 섬백리향(*Thymus quinquecostatus* var. *japonica* Hara) 시료는 향료식물 재배지에서 채취하여 지상부를 자연 건조한 다음, 실험실용 blender로 마쇄하여 40 mesh로 분리하였다(수분함량 8.13%).

추출방법

섬백리향의 항산화 기능성분을 효과적으로 추출하고자 신속한 추출특성이 보고된 마이크로파 공정(10,11)을 이용하였으며, 본 실험에 사용된 마이크로파 추출장치는 2450 MHz의 주파수에 programmable power (max. 2450 W), time control 등이 가능하고 환류냉각관이 장치된 상압형 추출장치(Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France)였다. 추출방법은 예비실험을 통하여 입자크기(40 mesh), 시료대 용매비(1:5), 용매농도(75% EtOH)를 고정한 다음 마이크로파 power와 추출시간에 따른 추출특성 실험을 실시하였다.

추출조건에 대한 실험계획 및 회귀분석

마이크로파 공정을 이용한 섬백리향 기능성분의 최적 추출조건 예측을 위하여 중심합성계획(12)에 따라 microwave power(0~160 W)와 extraction time(1~5 min)을 독립변수(X_i)로 하여 -2, -1, 0, 1, 2의 5단계로 부호화 하였다. 이와 같이 설계된 10군의 추출조건에서 얻어진 추출물의 기능성분 특성(종속변수, Y_n)은 3회 반복 측정하여 SAS(statistical analysis system) program(13)에 의해 회귀분석을 실시하였다. 또한 추출조건에 따른 추출물의 품질특성, 즉 총 추출수율, 총 페놀 함량, 총 플라보노이드 함량, 전자공여능 등은 반응표면분석(response surface methodology, RSM)(12, 14,15)에 의해 모니터링하고 회귀분석 결과, 임계점이 안장점일 경우에는 능선분석을 실시하여 최적점을 구하였으며, 각 기능성분에 대한 최적 추출조건을 예측하였다.

총 추출수율 측정

각 조건에서 얻어진 추출물의 총 수율은 추출물 일정량을 항량을 구한 수기에 취하여 회전증발농축기(Heidolph VV2011, Schwabach, Germany)로 농축하고 105℃에서 항

량이 될 때까지 건조하여 추출액 조제에 사용된 원료량(건물량)에 대한 백분율로써 총 추출수율(total extract yield, %)로 나타내었다(16).

총 페놀함량 측정

항료성분 추출물의 총 페놀성 화합물 함량은 Folin-Denis 법(17)에 따라 비색정량 하였다. 즉, 추출액을 일정하게 희석한 검액 2 mL에 Folin-Ciocalteu 시약 2 mL를 가하여 혼합하고 3 분 후 10% Na₂CO₃ 2 mL를 넣어 진탕하고 1시간 실온에서 방치하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준물질로는 gallic acid를 5~50 µg/mL의 농도로 조제하여 검량곡선의 작성에 사용하였다.

총 플라보노이드 함량 측정

각 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Davis변법(18)을 이용하여 측정하였다. 시료 용액 1 mL에 diethylene glycol 10 mL를 가하고 1 N NaOH 용액 1 mL를 넣고 30℃에서 1 시간 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 검량곡선은 naringin을 사용하여 작성하였다.

전자공여능 측정

섬백리향 추출액의 전자공여능(electron donating ability, EDA) 시험은 α, α-diphenyl-β-picrylhydrazyl(DPPH)를 사용한 방법(19)으로 측정하였다. 즉, DPPH 시약 12 mg을 absolute ethanol 100 mL에 용해한 후 증류수 100 mL를 가하고 50% ethanol 용액을 blank로 하여 517 nm에서 DPPH 용액의 흡광도를 약 1.0으로 조정된 후 이 용액 5 mL를 취하여 시료용액 0.5 mL와 혼합한 후 상온에서 30초간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 표시하여 전자공여능으로 하였다.

결과분석

섬백리향 추출물의 품질 및 항산화 특성은 3회 반복 측정하여 건물량 기준으로 나타내었으며, 실험결과는 SAS program(13)을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

추출물의 총 수율

마이크로웨이브의 선택적 추출원리(10,20)를 이용하여 75% 에탄올을 용매로 하여 추출조건에 따른 섬백리향 추출물의 총 수율은 Table 1과 같다. 그리고 microwave power 및 추출시간에 따른 추출수율의 회귀식의 R²는 0.9821로써 1% 이내의 수준에서 유의성이 인정되었다(Table 2). 반응표면분석을 통하여 예측된 정상점(stationary point)은 최대점

Table 1. Experimental data on total yield, total phenolics, flavonoid, and electron donating ability(EDA) of *Thymus quinque-costatus* extracted by microwave-assisted process(MAP) based on central composite design for response surface analysis

Experiment number	Microwave power (W)	Extraction time (min)	Total yield (% db)	Total phenolics (g%, db)	Flavonoid (mg%, db)	EDA (%)
1	120	4	25.20	1.68	13.65	82.69
2	120	2	20.94	1.84	7.97	85.90
3	40	4	19.83	1.96	6.73	87.76
4	40	2	15.82	2.04	3.02	90.62
5	80	3	22.63	2.28	10.42	85.12
6	80	3	21.01	2.55	10.06	86.79
7	160	3	25.17	1.38	12.94	80.97
8	0	3	14.53	1.46	4.16	86.01
9	80	5	25.93	2.04	11.39	82.82
10	80	1	16.09	1.88	5.21	88.08

¹⁾The number of experimental conditions by central composite design

을 보이면서 27.43%로 나타났으며, 이 때 추출조건은 microwave power 131.19 W, 추출시간 4.53분이었다(Table 3). 총 추출수율에 대한 조건별 영향을 보면 Table 4와 같이 microwave power와 추출시간은 1% 수준에서 유의적으로 영향을 미치는 것으로 나타났으며, microwave power의 영향이 조금 더 큰 것으로 나타났다. 섬백리향 추출물의 총

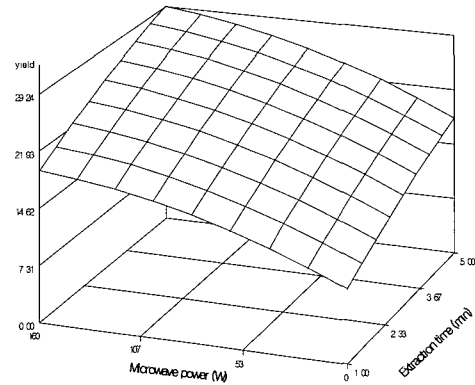
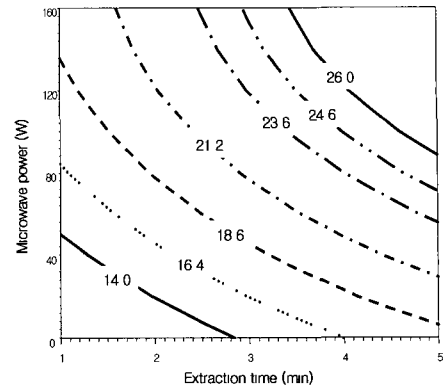


Fig. 1. Contour map (top) and response surface (bottom) for the effect of extraction conditions on total extract yields from *Thymus quinquecostatus* by MAP.

Table 2. The second order equation for total yield, total phenolics, flavonoid, and electron donation ability(EDA) of *Thymus quinquecostatus* extracted by MAP under different powers and extraction times

Responses	Second order equations	R ²	Significance
Total yield (% db)	$Y_1 = 6.361964 + 0.105911X_1 + 3.128810X_2 - 0.000278X_1X_1 + 0.001563X_2X_1 - 0.154107X_2X_2$	0.9821	0.0014
Total phenolics (g%, db)	$Y_2 = 0.424524 + 0.023810X_1 + 0.655238X_2 - 0.000148X_1X_1 - 0.000500X_2X_1 - 0.101429X_2X_2$	0.8597	0.0743
Flavonoids (mg%, db)	$Y_3 = -2.670357 + 0.055982X_1 + 3.098929X_2 - 0.000198X_1X_1 + 0.012313X_2X_1 - 0.378571X_2X_2$	0.9318	0.0190
EDA (%)	$Y_4 = 88.741488 + 0.037720X_1 + 0.205714X_2 - 0.000453X_1X_1 - 0.002188X_1X_2 - 0.235536X_2X_2$	0.8594	0.0747

수율은 microwave power가 증가할수록 증가하였으며, 추출시간은 5분에서는 40 W 이상의 처리로 20% 이상의 총 추출수율을 보였다(Fig. 1). 이러한 결과는 인삼(16) 및 곰취(21)의 가용성 고형물에 대한 마이크로웨이브 추출특성과 유사한 경향을 나타내었다.

총 페놀 함량

섬백리향 추출물에서 총 페놀함량을 측정하여 추출조건별 특성을 비교하였다. 추출조건별 총 페놀 함량은 Table 1과 같으며, 반응표면분석에 의한 예측회귀식과 R²(0.8597)

는 Table 2에 나타내었고 유의성은 10% 이내에서 인정되었다. 반응표면분석을 통해 예측된 최대 페놀 함량은 1.93 g%이었고, 이 때 microwave power는 66.59 W, 추출시간은 4.97분이었다(Table 3). 각 독립변수(추출조건)에 대한 의존도를 살펴보면 Table 4와 같이 추출시간에 비해 microwave power에 따른 영향이 크게 나타났다(p<0.05). 추출조건에 따른 총 페놀의 추출특성을 살펴보면 Fig. 2에서와 같이 상기 예측된 조건이 정상점을 보이면서 최적 추출조건을 확인할 수 있었다. 이는 김 등(22)의 팽이버섯 추출물에서, 이 등(23)은 당귀추출물에서 총 페놀 함량은 90 W 이하의

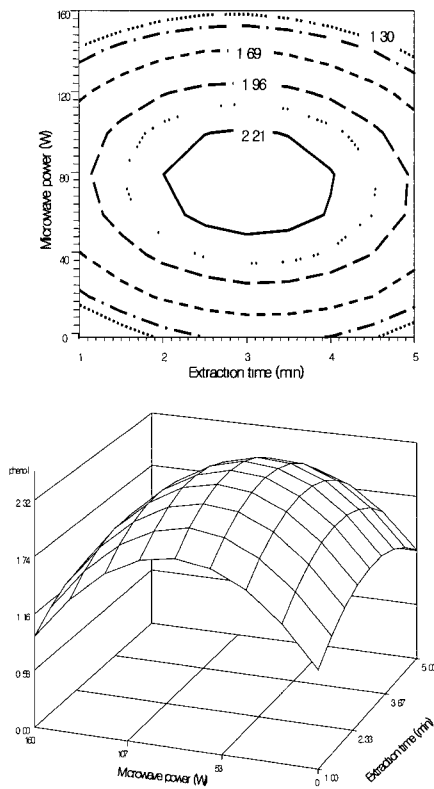


Fig. 2. Contour map (top) and response surface (bottom) for the effect of extraction conditions on total phenolics from *Thymus quinquecostatus* by MAP.

microwave power에서 높은 추출효율을 보였다고 보고하여 본 연구의 결과인 70 W 부근과 유사한 경향을 보여주었다.

총 플라보노이드 함량

식물성 식품의 기능성 페놀성분인 총 플라보노이드 함량에 대한 추출조건을 확인하였다. 섬백리향 시료에 대한 10구간의 조건에서 얻은 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Table 1에 나타내었다. 이에 대한 최적 추출조건과

Table 3. Predicted levels of extraction conditions for the maximum responses of total yield, total phenolics, flavonoid, and electron donating ability(EDA) of *Thymus quinquecostatus* by the ridge analysis

Y _n	R ²	Prob > F	X ₁ (power/W)	X ₂ (time/min)	Max	Morphology
Total yield (%, db)	0.9821	0.0014	131.13	4.53	27.43	max
Total phenolics (g%, db)	0.8597	0.0743	66.59	4.97	1.93	max
Flavonoids (mg%, db)	0.9318	0.0190	142.69	4.24	15.08	max
EDA (%)	0.8594	0.0747	44.88	1.20	89.30	max

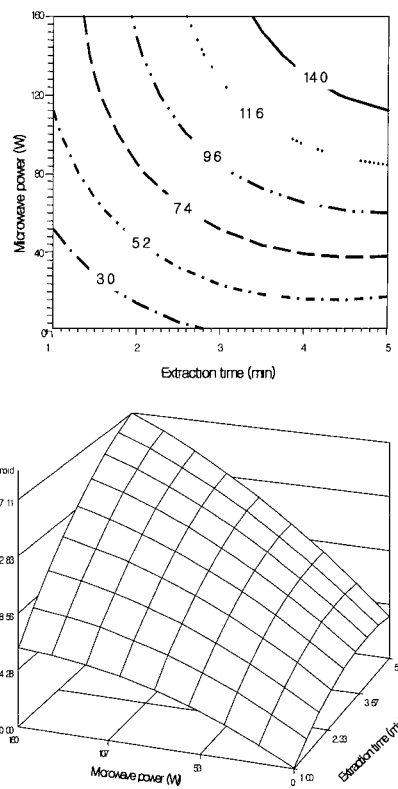


Fig. 3. Contour map (top) and response surface (bottom) for the effect of extraction conditions on flavonoid contents from *Thymus quinquecostatus* by MAP.

회귀식의 R²는 0.9318로써 5% 이내의 수준에서 유의성이 인정되었다(Table 2). 이 때 예측된 정상점은 최대점이었고 최대값은 15.08 mg%이었으며, 추출조건은 microwave power 142.69 W, 추출시간은 4.24분 이었다(Table 3). 섬백리향 추출물의 총 플라보노이드 함량은 추출시간에 비해 microwave power의 영향을 많이 받는 것으로 나타났으며 (p<0.05) (Table 4), power가 140이상으로 비교적 높고 추출 시간 4분까지는 함량이 증가하는 경향으로 나타났다 이

Table 4. Regression analysis for regression model of total yield, total phenolics, flavonoid, and electron donating ability(EDA) of *Thymus quinquecostatus*

Dependent variables	F-ratio	
	microwave power (W)	Extraction time (min)
Total yield	41.98***	31.47***
Total phenolics	8.14**	1.46
Flavonoids	11.81**	6.78**
EDA	5.23*	3.00

***Significant at 1% level, **Significant at 5% level, *Significant at 10% level

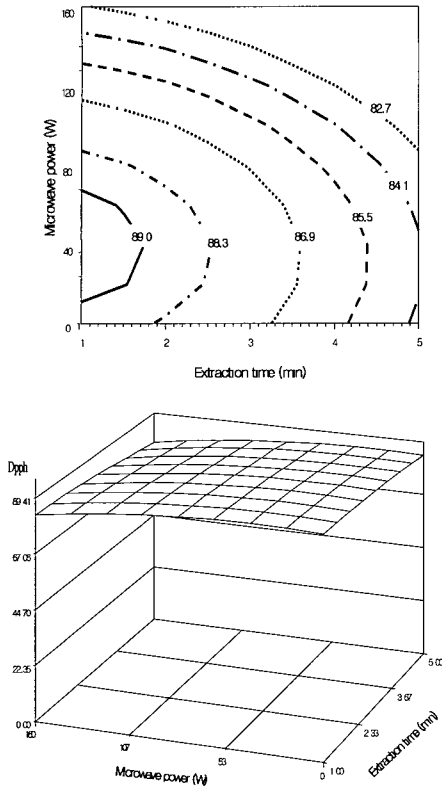


Fig. 4. Contour map (top) and response surface (bottom) for the effect of extraction conditions on electron donating ability from *Thymus quinquecostatus* by MAP.

같은 결과는 총 페놀성분의 추출특성과 다소 상이하게 microwave power가 높고 추출시간이 짧은 결과로써, 이는 식품 성분별 유전적 성질의 상이함과 마이크로파 에너지와의 상관관계에서 비롯될 수 있다고 사료된다(10,11).

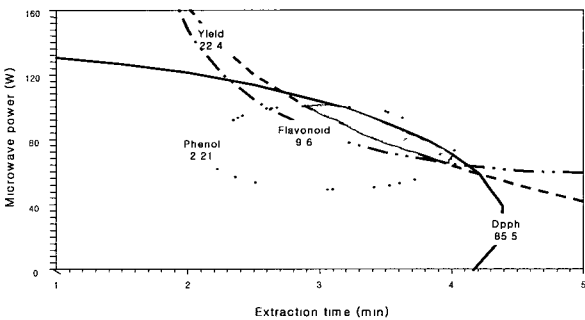


Fig. 5. Superimposed contour maps of optimized variables of total yield, total phenolics, flavonoid, and electron donating ability of *Thymus quinquecostatus* as functions of microwave power and extraction time in MAP.

전자공여능

추출조건에 따른 섬백리향 추출물의 전자공여능에 대한 측정 결과를 Table 1에 나타내었으며, 반응표면분석을 실시하여 회귀식을 도출하였을 때 회귀식의 R²는 0.9399이었고

5% 수준에서 유의성이 인정되었다. 예측된 정상점은 안장점(saddle point)으로 능선분석을 실시하여 본 결과, 최대값은 85.75%로 예측되었고, 이 때의 추출조건은 microwave power 1.33 W, 추출시간 3.36분으로 나타났다. 이것은 인삼 성분에 대한 마이크로파 추출조건에 대한 연구에서와 같이 비교적 낮은 microwave power에서 전자공여작용이 높게 나타났다는 권 등(21)의 연구결과와 유사한 경향을 보였다. 권 등(24)은 microwave power가 높을 경우 전자공여작용을 나타내는 성분이 추출되어 나오는 경우보다 오히려 분해되거나 다른 성분과 반응에 의해 활성이 감소하는 것으로 보고한 바 있다.

최적 추출조건 범위

섬백리향 유용성분의 마이크로웨이브 추출특성을 확인하고 최적조건을 설정하기 위하여 조건별 추출물의 총 수율, 총 페놀 함량, 총 플라보노이드 함량, 그리고 전자공여능에 대한 contour map을 superimposing하여 최적 추출조건 범위를 예측하였다. 이 때 모든 종속변수(추출수율, 총 페놀 함량, 총 플라보노이드 함량, 전자공여능)를 만족시키는 독립변수의 범위는 microwave power 64~100 W, 추출시간 2.9~4.0분이었다. 이상의 결과는 예측조건 범위 중 임의의 추출조건을 선택하여 실제 추출실험을 실시하고 실제값과 예측값을 비교함으로써 도출된 회귀식의 신뢰성을 검증할 수 있을 것이다.

요 약

섬백리향의 항산화 기능성 성분에 대한 마이크로웨이브 추출특성을 확인하고자 microwave power(0~160 W)와 추출시간(1~5분)을 독립변수(X_i)로 하여 중심합성계획에 의해 10개구간의 추출조건을 설계하였다. 또한 추출물의 기능성분인 총 추출수율, 총 페놀 함량, 총 플라보노이드 함량 및 전자공여능을 종속변수(Y_j)로 하여 반응표면분석을 실시하여 최적 추출조건을 예측하였다. 도출된 회귀식의 R²는 총 페놀성분을 제외하고는 모두 0.93 이상을 나타내었으며, microwave power는 추출시간보다 영향이 큰 것으로 나타났다(p<0.05). 종속변수들의 최적 추출시간은 3.36~4.97분이었으나 microwave power는 넓은 분포를 보였으며, 기능성 성분들 모두를 추출하기 위한 추출조건 범위는 microwave power 64~100 W, 추출시간 2.9~4.0분으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 농림기술개발사업의 일환으로 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. KFDA (2004) Standard Code for Health Functional Food. Korea Food and Drug Administration, Seoul, p.1-480
2. Korea Forest Service (2005) Korea Plants Database. Available from: <http://www.koreaplant.go.kr> koreaplants/index htm.
3. Lawrence, B.M (1984) A review of the world production of essential oils. *Perfumer & Flavorist*, 10, 1-16
4. Rangeiov, A., Koslev, P. and Malakov, P. (1989) Experimental study of essential oils from two varieties of cultivated thyme, sesquiterpene germacrone and diterpene sclareol for cholagogic and choleric activity *Folia Medica*, 31, 34-38
5. Chonbuk National University (2004) Korean Ethno-Economic Plants Database. Available from: <http://ruby.kisti.re.kr/~minsok>.
6. Kim, Y.H., Lee, J.C. and Choi, Y.H. (1994) Essential oils of *Thymus quinquecostatus* Celakov. and *Thymus magnus* Nakai. *Korean J Medicinal Crop Sci*, 2, 234-240
7. Joo, S.J., Chio, K.J., Kim, K.S., Park, S.G., Kim, T.S., Oh, M.H. Lee, S.S. and Ko, J.W (2002) Characteristics of mixed tea prepared with several herbs cultivated in Korea. *Korean J Food Preserv.*, 9, 400-405
8. Badi, H.N., Yazdani, D. Ali, S.M. and Nazari, F. (2004) Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products*, 19, 231-236
9. Kaloustian, J., El-Moselhy, T.F. and Portugal, H. (2003) Chemical and thermal analysis of the biopolymers in thyme (*Thymus vulgaris*), *Thermochimica Acta*, 401, 77-86
10. Pare, J.R.J., Blanger, J.M.R. and Stafford, M.R. (1994) Microwave-assisted process: a new tool for the analytical laboratory. *Trends Anal. Chem.*, 13, 176-184.
11. Kwon, J.H. (1998) High speed extraction of phytochemicals from food and natural products using microwave-assisted process. *Food Sci. Ind*, 31, 43-55
12. Myers, R.H. (1971) *Response Surface Methodology*, Allyn and Bacon Inc., Boston, USA
13. SAS (2001) *SAS User's Guide. Statistical Analysis Systems Institute, Version 8.0*, Cary, NC. USA
14. Gontard, N., Guilbert, S. and Cuq, J.L. (1992) Edible wheat gluten films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *J. Food Sci.*, 57, 190-196
15. Lee, G.D., Lee J.E. and Kwon, J.H. (2000) Application of response surface methodology in food chemistry. *Food Sci. Ind.*, 33, 33-45
16. Kwon JH, Belanger, J.M.R. and Pare, J.R.J. (2003) Optimization of microwave-assisted extraction (MAP) for ginseng components by response surface methodology. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1807-1810
17. Schanderl, S.H. (1970) *Methods in Food Analysis*. 2nd Ed., Academic Press, New York. p.701-725
18. Lee, J.M, Son, E.S., Oh, S.S and Han, D.S. (2001) Contents of total flavonoid and biological activities of edible plants. *Korean J. Dietary Culture*, 16, 504-515
19. Blois, M.S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 4617, 1198-1199
20. Kwon, J.H., Belanger, J.M.R., Pare, J.R.J. and Yaylayan, V.A. (2003) Application of microwave-assisted process (MAP) to the fast extraction of ginseng saponins. *Food Res. International*, 36, 491-498
21. Kwon, Y J., Kim, K.H. and Kim H.K. (2002) Changes of total polyphenol content antioxidant activity of *Ligularia fischeri* extracts with different microwave-assisted extraction conditions. *Korean J. Food Preserv.*, 9, 332-337
22. Kim, H.K., Choi, Y.J. and Kim K.H. (2002) Functional activities of microwave-assisted extracts from *Flammulina velutipes*. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 34, 1013-1017
23. Lee, S.Y., Shin, S.R, Kim, K.S. and Kwon, J.H. (2000) Isolation and characterization of polyphenol oxidase of clingstone peach. *Plant Physiol.*, 48, 19-23
24. Kwon, J.H., Kim, K.E. and Lee, K.D. (2000) Optimization of microwave-assisted extraction under atmospheric pressure condition for soluble ginseng components. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 32, 117-124

(접수 2005년 3월 28일, 채택 2005년 7월 8일)