

반응표면분석법을 이용한 김으로부터 생리활성물질 생산증대를 위한 초음파 추출 조건 최적화

염서희¹, 박제훈¹, 박하영¹, 김소희¹, 김진우^{123*}

¹선문대학교 식품과학과, ²선문대학교 차세대 반도체기술연구소, ³프렉스프로FlexPro Biotechnology Co. Ltd.

Optimization of Ultrasound-assisted Extraction Conditions for Enhancement of Bioactive Compounds from *Porphyra tenera* using Response Surface Methodology

Suh Hee Yeom¹, Jae Hoon Park¹, Ha Young Park¹, So Hee Kim¹, Jin Woo Kim^{123*}

¹Department of Food Science, Sunmoon University

²Center for Next-Generation Semiconductor Technology

³FlexPro Biotechnology Co. Ltd.

요약 본 연구에서는 김으로부터 총 폴리페놀 함량(total polyphenol content, TPC), 총 플라보노이드 함량(total flavonoid content, TFC) 및 항산화 활성(radical scavenging activity, RSA)과 같은 생리활성물질의 최적 추출 조건을 확립하는 것이 목적이며 추출 시간, 추출 온도 및 에탄올 농도를 주요 독립변수로 설정하였다. 주요 독립변수의 추출 조건은 반응 표면 분석법의 일종인 중심합성설계를 이용하였으며 초음파 추출을 위한 17개의 독립변수 조건을 설정하였다. 이때 추출 시간 31.0 분, 60.3°C 및 에탄올 60.0%가 최적 추출 조건으로 설정되었으며 예측값은 TPC 4.44 mg GAE/g DM, TFC 1.25 mg QE/g DM과 RSA 43.5%로 예측되었고, 검증 실험을 진행하였을 때 실험 값이 유의적으로 차이가 나지 않는 것으로 확인되었다. 따라서 최적 추출 조건을 통해 김으로부터 생리활성물질 추출이 증대될 수 있음이 사료되며 향후 식품 및 의약품 산업에 생리활성 물질로서 활용 가능하고 상업화에 효과적인 추출 조건이 확립되었다고 예상된다.

Abstract In this study, the extraction conditions of bioactive compounds, such as total polyphenol content (TPC), total flavonoid content (TFC), and radical scavenging activity (RSA), from *Porphyra tenera* were optimized using response surface methodology. A central composite design was employed to establish 17 distinct conditions for ultrasound-assisted extraction (UAE), with the extraction time, extraction temperature, and ethanol concentration as the key independent variables. Under the optimal UAE parameters of 31.0 min, 60.3°C, and 60.0% ethanol, the study achieved consistent predicted and experimental values of 4.44 mg GAE/g DM for TPC, 1.25 mg QE/g DM for TFC, and 43.5% for RSA. Overall, this study showed that ultrasound-assisted extraction under optimized conditions could effectively extract bioactive compounds from *Porphyra tenera*, which may have potential applications in the food and pharmaceutical industries. Overall, this study showed that ultrasound-assisted extraction under optimized conditions could effectively extract bioactive compounds from *Porphyra tenera*, which may have potential applications in the food and pharmaceutical industries.

Keywords : *Porphyra tenera*, Optimization, Polyphenol, Flavonoid, Antioxidant

*Corresponding Author : Jin Woo Kim(Sunmoon Univ.)

email: Kimjw1028@sunmoon.ac.kr

Received May 12, 2023

Revised June 19, 2023

Accepted August 10, 2023

Published August 31, 2023

1. 서론

활성산소(reactive oxygen species)는 세포 내에서 생성되어 생체 활동에 필수적인 역할을 수행하지만, 과도하게 생성될 경우 세포 손상과 질병 발생의 원인이 된다고 보고되고 있다[1]. 특히, 산화적 스트레스로 인해 생성된 활성산소는 반응성이 크고 불안정하여 과도하게 생성되면 단백질, 핵산과 DNA를 산화적 손상시켜 노화, 고지혈증, 동맥경화, 백내장, 당뇨병과 암 등의 발생을 가속화시킨다[2,3]. 이를 예방하기 위해 체내에 존재하는 항산화 효소인 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) 등이 활성산소를 소거하여 항상성을 유지하는 중요한 역할을 수행한다[4]. 하지만 비정상 대사과정, 미토콘드리아 기능 이상, 염증반응 등의 내부요인과 환경오염, 음주, 흡연, 고지방 식습관 등의 외부적인 요인으로 활성산소가 과도하게 증가할 경우 체내 항상성 유지 작용이 약화되고, 이로 인해 노화, 암과 혈관 질환 등 질병 발생 위험이 증가하게 된다[5,6]. 따라서, 이와 같은 질병 발생을 예방하기 위해서는 적절한 운동과 스트레스 관리 등으로 산화적 스트레스를 완화하는 것과 함께 폴리페놀, 플라보노이드, 비타민 C, 비타민 E과 베타카로틴 등 항산화 물질이 풍부한 식품섭취를 통해 체내 항산화 균형을 유지하는 것이 중요하다[7].

해조류는 폴리페놀, 루테인, 카로티노이드, 플라보노이드와 다당류 등의 생리활성물질을 함유하여 항산화, 항염, 항암, 면역강화, 혈압조절과 자외선 방어 등의 다양한 생리학적 효과를 보유하고 있어 건강 기능성 식품 및 의약품 원료로 활용도가 증가하고 있다[8]. 특히 폴리페놀은 해조류에서 가장 흔하게 발견되는 생리활성물질 중의 하나로 강한 항산화 작용을 보유하고 있어 세포 손상을 예방하고 면역력을 강화하는 데 도움을 준다고 알려져 있다[9]. 최근 김을 비롯한 다양한 해조류로부터 다양한 생리활성물질을 추출하는 연구가 활발히 이루어지고 있는데 이러한 연구를 통해 해조류의 다양성을 활용하여 새로운 건강 기능성 소재를 개발할 수 있을 것으로 사료된다. 보라털과 해조류인 김(*Porphyra tenera*)은 해조류 중 가장 많이 섭취되는 식품 중 하나로 한국, 미국, 일본과 중국이 주 생산국으로 한국과 일본은 2019년에 약 34만 톤과 20만 톤의 김을 생산하는 최대 생산국이다[10]. 영양학적 측면에서 김은 isofloridoside, floridoside와 hemicellulose, porphyran 등을 함유

하고 있어 항산화 및 항염증 효과와 함께 면역력 강화와 혈액순환 촉진하는 효과가 있다고 보고되고 있다[11]. 또한, 2차 대사산물인 폴리페놀 중 isorhamnetin과 kaempferol 등 유용물질을 다량 함유하고 있어 활성산소를 소거하는 능력이 뛰어나고 콜레스테롤 저하, 면역조절, 항산화와 항바이러스 등 효과가 있다고 보고되어 있다[12].

천연물의 생리활성물질을 추출하는 방법은 속실판 추출법, 기계적 압착법과 고온 용매 추출법 등이 있지만 수율이 낮고 설비 및 생산 비용이 높아 가격 경쟁력이 낮은 단점이 보고되고 있다. 반면에 초음파 추출법은 용매 내에서 초음파의 공동(cavitation) 효과에 의해 화학적 반응성을 향상시켜 추출 효율을 증진시키는 효과에 따라 식품 산업의 추출 공정에 도입되고 있다고 알려져 있다[13,14]. 따라서 본 연구에서는 김으로부터 2차 생리활성 물질인 폴리페놀과 플라보노이드의 효과적인 추출을 위해 초음파 추출법을 이용하여 추출을 진행하였다. 또한 추출 최적화를 위해 다양한 요인 변수들이 종속변수에 복합적인 영향을 미치는 경우 사용되는 최적화 실험 계획법인 반응표면분석법을 이용하여 추출 최적화를 수행하였다[15]. 반응표면분석법은 주요한 영향을 미치는 독립변수의 주효과와 두 개 이상의 요인 변수가 조합되며 발생하는 교호 효과를 분석하여 수행된다[16]. 반응표면분석법을 효율적으로 적용하기 위해 실험계획법 설정이 우선적으로 고려되어야 하며, 중심 합성 계획법(central composite design, CCD)은 다수 요인 실험에 적합하고 회귀 함수의 1차 항에 추가로 축점(axial point)과 중심점(center point)을 포함시켜 2차 곡면에 의한 반응을 분석하여 정확한 예측을 할 수 있다[17]. 따라서 중심 합성 계획법을 이용하여 김의 폴리페놀, 플라보노이드와 항산화 활성 최대화 조건을 확립하고 공정 표준화에 대한 기초자료를 제공하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험 재료 및 초음파 추출

본 연구에서 사용된 김은 서천해초김(주)에서 구매하여 열풍건조기(VS-1202D4N, Vision Bionex, Buchoen, Korea)로 60℃에서 건조한 후 40 mesh (0.381 mm) 이하 크기의 건조물을 사용하였다. 추출을 위해 탁상형 초음파기(SD-250H, Mujigae Co., Seoul, Korea)를 사용하였으며 추출 용매로 증류수와 에탄올(Samchun,

Korea, 99% 이상)을 사용하였다. 항산화 활성 측정에는 2 N folin-ciocalteu, aluminum chloride, gallic acid, ascorbic acid, potassium acetate, quercetin, 2-2diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH)와 sodium carbonate 등의 시약을 Sigma-Aldrich와 (주) 덕산약품공업(Ansan, Korea)에서 구매하여 사용하였다. 생리활성 물질을 추출하기 위해 건조된 김 1 g과 용매 10 mL를 혼합하여 40 kHz와 200 W의 탁상용 초음파기(SD-250H, Mujigae Co., Seoul, Korea)에서 추출을 진행하였다. 추출 용매로는 1차 증류수와 99.5% 에탄올을 혼합하여 추출 시간, 온도와 에탄올 농도를 변화시키면서 추출을 진행하였다. 추출물은 2,878 × g에서 10분 원심분리를 한 후 상등액을 냉장 보관하여 분석 실험에 사용하였다.

2.2 총 폴리페놀 함량(Total polyphenol content, TPC) 측정

총 폴리페놀 함량은 folin-ciocalteu 시약이 폴리페놀에 의해 환원되는 원리에 기반한 Gam의 실험법 변형하여 사용하였다[18]. 김 추출물 0.14 mL에 0.2 N folin-ciocalteu 0.7 mL를 첨가하여 8분 반응시켰고 이후 7.5% Na₂CO₃ 0.56 mL를 첨가하여 상온에서 60분간 반응시켰다. 반응에 의한 발색도를 분광광도계(Optizen 2120 UV, Mecasys Co., Daejeon, Korea)로 765 nm에서 측정하고 표준물질로 gallic acid를 사용하여 검량 곡선을 통해 상대적 농도를 mg gallic acid equivalent (GAE)/g dry matter (DM)로 TPC를 나타내었다.

2.3 총 플라보노이드 함량(Total flavonoid content, TFC) 측정

총 플라보노이드 함량은 플라보노이드와 aluminium chloride가 상호작용하여 복합체를 형성하는 원리에 기반한 Jung 등의 측정법 방법을 변형하여 측정하였다[19]. 김 추출물 0.1 mL, 1차 증류수 0.56 mL와 99.5% 에탄올 0.3 mL를 가하고 1 M potassium acetate와 10% aluminum chloride를 0.02 mL씩 순차적으로 혼합하였다. 혼합액을 상온에서 30분 반응시켜 분광광도계로 415 nm에서 측정하였으며 정량을 위해 quercetin을 이용한 검량 곡선을 통해 상대적 농도를 mg quercetin equivalent (QE)/g DM로 TFC를 나타내었다.

2.4 활성산소 소거능(Radical scavenging activity, RSA) 측정

활성산소 소거능은 김의 2차 대사산물이 활성산소에 전자를 공여하여 환원되어 항산화 활성을 띠는 원리에 기반한 Kim 등의 방법을 변형하여 측정하였다[20]. 제조한 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)를 메탄올로 희석하여 흡광도가 1.0 (± 0.05)이 되도록 한 후 김 추출물 0.25 mL와 0.1 mM DPPH 1.25 mL를 혼합하였다. 혼합액은 암실에서 20분 상온에서 반응시킨 후 분광광도계로 517 nm에서 측정하고 ascorbic acid를 양성대조군으로 사용하여 아래 식을 이용하여 나타내었다.

$$RSA (\%) = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100 \quad (1)$$

A: 추출물 첨가군의 흡광도,

B: 대조군 첨가군의 흡광도

2.5 실험계획법

본 실험에서는 김으로부터 생리활성물질 추출 조건 최적화를 위하여 반응표면분석법 중 다수 요인 실험에 적합한 CCD를 이용하여 최적화를 수행하였으며 통계 소프트웨어인 Design-expert® 9.0(State-Ease, Minneapolis, USA)를 사용하였다. 중심점 3개를 포함한 17개 추출 조건으로 구성된 CCD에 기반한 실험 설계를 수행하였다. 추출 조건인 독립변수(X_i)는 추출 효율을 증진시킬 수 있는 주요 변수로 알려진 독립변수(X_i)는 추출 시간(X₁, 5 ~ 55분), 추출 온도(X₂, 26.0 ~ 94.0°C)와 에탄올 농도(X₃, 0 ~ 100%)로 설정하였으며 5단계(-1.68, -1, 0, +1, +1.68)로 부호화 하여 각 조건에 따라 실험을 진행하였다(Table 1)[21]. 독립변수와 종속변수에 대한 2차 회귀방정식은 아래와 같이 도출하였고 분산분석 및 회귀분석을 실시하여 유의성이 인정되는 변수만을 채택하였다. 또한 초음파 추출 조건 최적화를 위해 일변수 최적화 곡선, 3차원 반응표면곡선과 변수 간의 교호작용을 확인하였으며, 독립변수의 변화에 따른 종속변수의 반응표면을 분석하였다.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_1^2X_1X_2 + b_1^3X_1X_3 + b_2^3X_2X_3 + b_1^2X_1^2 + b_2^2X_2^2 + b_3^2X_3^2 \quad (2)$$

b₀ = y절편; b_n = 회귀계수; b₁, b₂, b₃ = 변수계수; b₁², b₂², b₃² = 이차항계수; b₁³, b₂³, b₃³ = 교호계수

Table 1. Main independent variables and levels for the extraction of bioactive compounds from *Porphyra tenera* extract with 17 conditions coded in a central composite design.

X _i	Independent variables	Coded levels				
		-1.68	-1	0	1	1.68
X ₁	Extraction time (min)	5	15	30	45	55
X ₂	Extraction temperature (°C)	26	40	60	80	94
X ₃	Ethanol concentration (%)	0	20	50	80	100

2.6 통계처리

김의 기능성 평가를 위해 실시한 모든 실험 데이터는 3회 반복 진행하였으며 평균 ± 표준편차로 나타내었고 통계 프로그램은 GraphPad Prism (Ver. 5.0, GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA)을 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 통계적 유의성을 평가하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 TPC 최적 추출 조건 탐색

플리페놀은 식물체에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물로 다 개의 하이드록실기(OH-)를 가진 방향족 화합물로 활성산소에 전자를 공여하여 활성산소를 소거하여 항산화 활성을 나타낸다고 보고되어 있다[22]. 본 실험에서 김의 TPC 최적 추출 조건을 탐색하기 위해 추출 시간(X₁), 추출 온도(X₂)와 에탄올 농도(X₃)를 독립변수로 설정하여 CCD에 따라 실험 조건을 17 조건으로 설계하였다(Fig. 1). 김 추출물 TPC 최댓값은 RUN #11 (X₁: 30 분, X₂: 26°C, X₃: 50%)에서 7.39 mg GAE/g DM으로 나타난 반면, 최솟값은 RUN #13 (X₁: 30 분, X₂: 60°C, X₃: 0%)에서 1.16 mg GAE/g DM으로 동일한 추출 시간에서 추출 온도와 에탄올 농도 차이에 따른 TPC 차이를 확인하였다(Table 2). 각 실험 조건에 따른 실험값의 응답성을 확인하기 위해 2차 회귀 방정식을 도출하였으며 R²값은 0.8298로 실험값과 예측값 사이의 신뢰성이 82% 이상으로 모델이 TPC의 변동을 82.3% 이상 설명할 수 있었다(Table 3). 2차 회귀 방정식에서 독립변수에 따른 TPC의 유의성 p 값은 0.0463로 추출 시간, 추출 온도 및 에탄올 농도로 구성된 회귀 모델이 TPC 추출에 유의한 영향 ($p < 0.05$)을 미치며 이 변수들은 TPC 최적 추출 조건 예측을 위한 조절 요인으로 사용될 수 있음이

Table 2. Experimental data of the dependent variables TP-C, TFC and RSA for 17 experiments based on a central composite design.

Run No.	Extraction condition			TPC1) (mg GAE/g DM)	TFC2) (mg QE/g DM)	RSA3) (%)
	X1	X2	X3			
1	15	40	20	4.17	1.30	26.40
2	45	40	20	2.53	1.19	25.12
3	15	80	20	4.91	0.93	17.64
4	45	80	20	2.69	1.55	59.81
5	15	40	80	5.65	2.51	37.27
6	45	40	80	5.87	1.58	24.53
7	15	80	80	6.06	1.24	26.99
8	45	80	80	5.71	1.83	45.68
9	5	60	50	5.99	1.47	32.48
10	55	60	50	5.81	1.55	36.22
11	30	26	50	7.39	1.55	42.29
12	30	94	50	4.91	1.58	42.64
13	30	60	0	1.16	1.47	24.53
14	30	60	100	7.23	1.97	22.55
15	30	60	50	5.81	1.44	50.35
16	30	60	50	4.97	1.86	47.60
17	30	60	50	6.67	1.52	44.63

¹)TPC (total polyphenol content), ²)TFC (total flavonoid content),

³)RSA (radical scavenging activity), X₁: Extraction time (min); X₂: Extraction temperature (°C); X₃: Ethanol concentration (%)

Table 3. Second-order polynomial equations calculated by central composite design for the optimization of extraction conditions of *Porphyra tenera* extract.

Responses	Regression models (Y)	R ²	p value
TPC (mg GAE/g DM)	$2.22136 - 0.011508X_1 + 0.020707X_2 + 0.10707X_3 - 4.76667 \times 10^4 X_1 X_2 + 1.03944 \times 10^3 X_1 X_3 - 1.35417 \times 10^4 X_2 X_3 - 5.47818 \times 10^4 X_1^2 - 8.89445 \times 10^2 X_2^2 - 8.32273 \times 10^4 X_3^2$	0.8298	0.0463
TFC (mg QE/g DM)	$1.65945 - 0.028825X_1 - 0.011118X_2 + 0.024662X_3 + 937333 \times 10^4 X_1 X_2 - 2.34333 \times 10^4 X_1 X_3 - 2.10900 \times 10^4 X_2 X_3 - 2.36373 \times 10^4 X_1^2 - 8.32503 \times 10^5 X_2^2 + 2.51363 \times 10^4 X_3^2$	0.8491	0.0356
RSA (%)	$6.61722 + 0.080240X_1 - 0.14455X_2 + 1.43615X_3 + 0.031201X_1 X_2 - 9.70275 \times 10^3 X_1 X_3 - 3.13960 \times 10^3 X_2 X_3 - 0.020130X_1^2 - 4.14684 \times 10^3 X_2^2 - 9.53199 \times 10^3 X_3^2$	0.9181	0.0048

X₁: extraction time (min), X₂: extraction temperature (°C), X₃: ethanol concentration (%), R²: coefficient of determination, Y_n: predicted response

확인되었다. 분산분석을 통해 TPC에 따른 독립변수의 유의성을 비교한 결과 에탄올 농도($p = 0.0017$)가 추출 시간($p = 0.3030$)과 추출 온도($p = 0.4616$)에 비해 에탄올 농도의 의존성이 높다는 것이 확인되어 일변수 그래프에서 에탄올 농도 변화에 따른 TPC 변량이 크다는 결과와 유사하였으며 초음파 추출에 있어 에탄올 농도의 최적화가 우선적으로 고려되어야 한다고 사료되었다 (Table 4, Fig. 1).

Table 4. ANOVA analysis of TPC, TFC, and RSA by in-dependent variables.

	TPC (mg GAE/g DM)		TFC (mg QE/g DM)		RSA (%)	
	Sum of squares	<i>p</i> -value	Sum of squares	<i>p</i> -value	Sum of squares	<i>p</i> -value
Model	37.45	0.0463	1.66	0.0356	200.76	0.0046
X_1	1.36	0.3030	7.064 × 10 ³	0.7002	206.72	0.0063
X_2	0.67	0.4616	0.068	0.2526	102.36	0.0888
X_3	26.73	0.0017	0.68	0.0056	0.15	0.9421
X_1X_2	0.16	0.7108	0.63	0.0067	700.94	0.0013
X_2X_3	1.75	0.2470	0.089	0.1975	152.51	0.0467
X_1X_3	0.053	0.8326	0.13	0.1313	28.39	0.3329
X_1^2	0.17	0.7040	0.032	0.4213	232.13	0.0007
X_2^2	0.014	0.9122	0.013	0.6094	31.13	0.3122
X_3^2	6.06	0.0511	5.525 × 10 ³	0.7332	794.54	0.0009

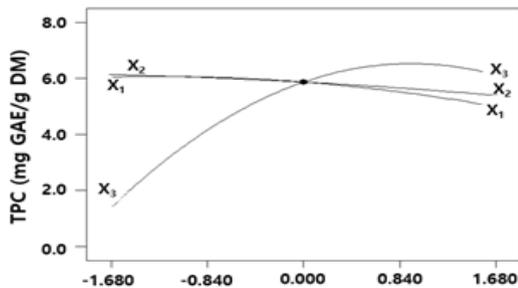


Fig. 1. Perturbation plot of TPC affected by each independent variable on extraction yield.

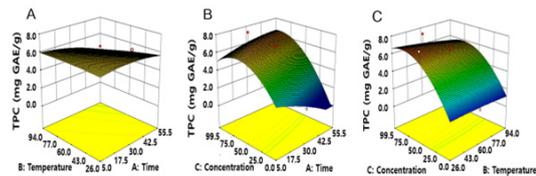


Fig. 2. The 3D response surface plots for the effect of 2 independent variables of TPC from *Porphyra tenera* extr-act. (A) Response surface for the effects of X_1 and X_2 , (B) Response surface for the effects of X_1 and X_3 , (C) Response surface for the effects of X_2 and X_3 .

또한 분산분석에서 확인된 독립변수의 영향과 변수들의 상호작용을 비교하기 위해 하나의 독립변수를 고정시켜 다른 두 개의 변수에 따른 종속변수의 변화를 3D 반응표면 그래프로 나타내었다(Fig. 2). 에탄올을 50%로 고정하고, 추출 온도와 추출 시간을 변화시켰을 때(Fig. 2A) TPC 변량은 크지 않은 반면 에탄올 농도와 추출 온도 또는 추출 시간과의 상호작용에 있어 에탄올 농도가 증가함에 따라 TPC가 유의하게 증가함이 확인되었다 (Fig. 2B, Fig. 2C). 이는 새싹보리 추출 최적화에서 에탄올 농도가 TPC 추출 효율이 유의하게 영향을 미쳤으며 에탄올 58.9%가 최적 추출 농도라는 Lee 등의 결과와 유사한 경향이다[23]. TPC 추출 시 폴리페놀의 분자량, 탄화수소 길이, 그리고 -OH기의 분포에 따라 추출 특성에 차이가 발생한다. 폴리페놀은 방향성 결합을 가진 탄화수소 고분자 화합물인 페닐 프로판이나 페닐 에테인 등으로 구성되어 높은 극성을 가지지만, 탄소와 수소로 이루어진 소수성 부분으로도 구성되어 극성과 비극성 물질 모두에 용해될 수 있는 특성을 가지고 있다[24]. 물과 에탄올은 모두 극성 용매로 물은 폴리페놀에서 전하를 가진 이온이나 극성분자와 상호작용하여 추출 효율을 증가시키며 에탄올은 물에 비해 극성이 낮아 폴리페놀의 비극성 분자와 상호작용하여 추출 효율을 높임이 가능할 것으로 예상할 수 있다[25]. 따라서, 에탄올 농도가 증가함에 따라 극성 폴리페놀 뿐만 아니라 비극성 폴리페놀 추출이 함께 증가하여 TPC 추출 효율이 증가했다고 판단되었다. 이에 따라 김으로부터 폴리페놀 추출에 있어 극성과 비극성 물질 추출을 모두 고려해야 하며 이를 위해 에탄올 농도 최적화가 우선적으로 진행되어야 할 것으로 사료된다[26].

3.2 TFC 최적 추출 조건 탐색

플라보노이드는 두 개의 방향족 고리와 헤테로 사이클릭 (heterocyclic)로 구성된 배당체로 지질 과산화물 생성 억제제를 통한 활성산소 소거함에 따라 항암, 항돌연변이, 항염증 등 생리 활성 기능이 있다고 알려져 있다[27]. 본 실험은 김으로부터 항산화 활성을 갖는 TFC 생산을 최대화하기 위해 독립변수 조건을 CCD에 따라 설계하고 각 조건에 따른 실험값을 비교하였다(Fig. 3). 김의 TFC가 0.93 ~ 2.51 mg QE/g DM 범위로 독립변수 조건에 따른 차이가 확인되었으며 80% 에탄올, 15 분과 40°C 추출 조건(Run #5)에서 최대 추출되었으며 추출량은 2.51 mg QE/g DM으로 나타났다(Fig. 3). 이를 기반으로 2차 회귀 방정식을 도출하였고 ANOVA를 통해 적합성(R^2)과 유의성(p)이 0.8441과

0.0356로 독립변수에 따른 높은 정확성과 상관관계를 갖는 것으로 예측되었다. 또한 독립변수에 대한 일차 항의 유의성은 에탄올 농도가 $p = 0.0056$ 로 추출 온도($p = 0.2526$)와 추출 시간($p = 0.7002$)보다 가장 큰 영향을 주는 독립변수로 확인되었다($p < 0.05$, Table 3, Table 4). 이는 앞선 TPC 결과와 유사하며 TFC 추출 시 에탄올 농도 최적화가 우선적으로 고려되어야 함이 일변수 그래프를 통해 재확인하였다(Fig. 3).

두 개 독립변수의 상호작용을 확인하고자 2차 회귀 방정식에 기반한 3D 반응 표면 그래프를 분석하였다. 에탄올을 50%로 고정시키고 추출 온도와 추출 시간 변화에 따른 TFC 증감은 크지 않은 것으로 확인되었다(Fig. 4A). 그러나 에탄올 농도와 추출 시간 또는 추출 온도의 상호작용은 에탄올 농도 증가에 따라 TFC가 증가하여 에탄올 농도가 TFC 추출에 주요한 인자로 예측되었다(Fig. 4B, Fig. 4C). 이는 대추 잎에서 TFC 추출에 있어 에탄올 농도가 추출 효율에 유의한 영향인자 확인되었으며 에탄올을 47.9%에서 최대 TFC가 얻어진다는 연구결과와 유사하여 김으로부터 플라보노이드 추출을 최대화하기 위해서는 추출 용매의 극성도 범위 확대를 고려해야 하며 이를 위해 에탄올 농도 최적화가 선행되어야 할 것으로 사료된다[28].

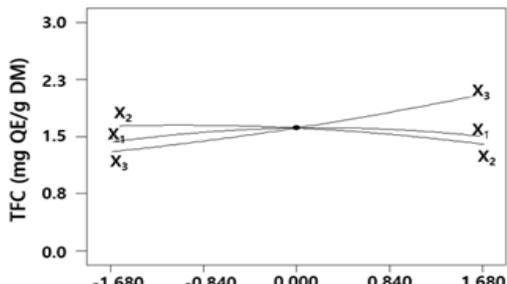


Fig. 3. Perturbation plot of TFC affected by each independent variable on extraction yield.

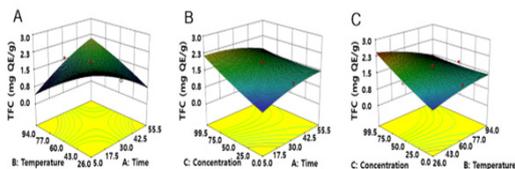


Fig. 4. The 3D response surface plots for the effect of 2 independent variables of TFC from *Porphyra tenera* extr-act. (A) Response surface for the effects of X_1 and X_2 , (B) Response surface for the effects of X_2 and X_3 , (C) Response surface for the effects of X_1 and X_3 .

3.3 RSA 최적 추출 조건 탐색

식물계에서 풍부하게 존재하는 2차 대사산물인 폴리페놀과 플라보노이드는 활성산소에 전자를 공여하여 활성산소를 소거하는 항산화제 역할을 하며 신체의 항산화 체계를 반응하거나 금속 킬레이트화를 통한 항산화 활성을 나타낸다고 알려져 있다[29]. 본 연구는 RSA를 높이기 위해 독립변수 조건을 CCD로 도출한 결과 RSA는 17.64 ~ 59.81%로 최대 3 배 이상 증가가 가능한 것으로 예측되었고 최솟값(Run #3)과 최댓값(Run #4) 비교 시 추출 시간이 가장 큰 영향을 미친 것으로 확인되었다(Table 2). 각 실험 조건에 따른 실험값의 상관관계를 2차 회귀방정식으로 도출한 결과 R^2 값은 0.9181로 높은 상관성을 나타냈고 유의성은 추출 시간($p = 0.0263$) > 추출 온도($p = 0.0888$) > 에탄올 농도($p = 0.9421$) 순으로 추출 시간이 종속 함수에 가장 큰 영향을 미친 것으로 확인되었다(Table 3). 이는 앞선 TPC와 TFC 추출 최적화에서 에탄올 농도가 종속변수에 가장 유의한 영향을 나타냈다는 것과 다른 경향성으로 RSA 최적화에서는 에탄올 농도보다는 추출 시간이 우선적으로 고려되어야 함이 일변수 그래프로 재확인하였다(Fig. 5).

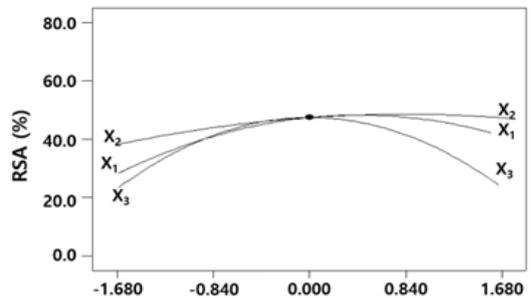


Fig. 5. Perturbation plot of RSA affected by each independent variable on extraction yield.

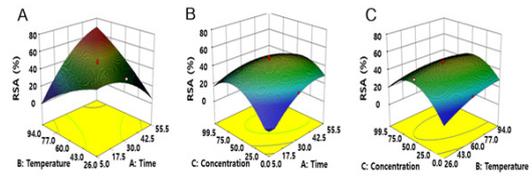


Fig. 6. The 3D response surface plots for the effect of 2 independent variables of RSA from *Porphyra tenera* extr-act. (A) Response surface for the effects of X_1 and X_2 , (B) Response surface for the effects of X_1 and X_3 , (C) Response surface for the effects of X_2 and X_3 .

또한 2차 회귀 방정식을 기반으로 다른 두 개의 독립변수의 상호작용을 확인하고자 3D 반응 표면 그래프로 나타내었다(Fig. 6). 추출 시간을 30 분 고정시키고 추출 온도와 에탄올 농도 변화에 따른 RSA 변량에 유의적인 상호작용이 확인되지 않은 반면 추출 온도 또는 에탄올 농도를 고정시키고 추출 시간에 따른 RSA 증감에 유의적인 차이가 확인되었다. 또한 천연물 추출 연구인 Lohvina 등의 호로파 종자 추출물의 TPC와 TFC 결과가 에탄올 농도의 영향을 많이 받았으며, RSA는 추출 시간에 큰 영향을 받았다는 연구결과와 김 원초 추출물의 연구 결과가 유사하였다[30,31]. 따라서, 위의 결과들을 기반으로 김의 초음파 추출 공정에 있어 RSA 최대화를 위해 추출 시간을 중심으로 최적 조건을 확립할 필요가 있다고 판단되었다.

3.4 최적 추출 조건 확립

최적 추출 조건을 확립하기 위해 2차 회귀 방정식을 이용한 TPC, TFC와 RSA의 반응 표면 곡선을 중첩해 공통 최대화 조건을 예측하였다(Fig. 7). 최적 조건 범위를 위한 공정 조건의 범위는 추출 시간 5 ~ 55 분, 추출 온도 26 ~ 94°C와 에탄올 농도 0 ~ 100%로 설정하였다. 산업화에 유용하게 적용하기 위해 에탄올 농도를 70% 이하로 선정하고, 추출 최적 조건 확립 시 제한 조건으로 경제적인 추출을 위해 추출 시간과 추출 온도를 최소화되는 지점을 최적화 목표값으로 도출하였다. 이를 통해 도출된 최적 추출 조건은 31.0 분, 60.3°C와 60.0%로 TPC 4.44 mg GAE/g DM, TFC 1.25 mg QE/g DM과 RSA 43.5%가 예측되었다. 이를 검증하기 위해 시행된 검증 실험에서 TPC 4.20 ± 0.26 mg GAE/g DM, TFC 1.32 ± 0.12 mg QE/g DM과 RSA 43.7 ± 0.40%로 확인되어 예측값과 실험값이 유사하게 나타나 도출된 2차 회귀 방정식의 신뢰성을 검증할 수 있었다($p > 0.05$).

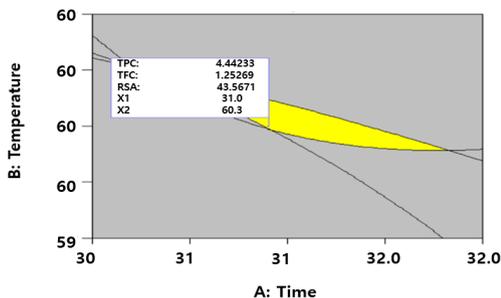


Fig. 7. Superimposed contour plots showing the optimized condition of input variables and responses (TPC, T-FC and RSA) by independent variables (extract time, extract temperature, and ethanol concentration).

4. 결론

활성산소는 세포 내 생체 활동을 위해서 필요한 인자이지만 내부 및 외부인자에 의해 과도하게 생성되면 생체 내 방어 체계를 손상시킴으로써 암, 노화, 고지혈증과 동맥경화 등의 질병을 유발할 수 있어 활성산소를 효과적으로 소거하고 부작용이 적은 천연소재에 관심을 기울이고 있는 상황이다. 따라서 본 연구는 반응 표면 분석법을 이용하여 김으로부터 생리활성물질인 TPC와 TFC 추출을 극대화함과 동시에 RSA를 최대화할 수 있는 추출 조건을 확립하고 김의 천연 항산화제로써 활용 가능성을 높이고자 하였다. 초음파 추출을 이용한 김으로부터 유용물질 추출에 있어 종속변수인 TPC와 TFC 변량이 추출 시간과 추출 온도에 비해 에탄올 농도가 유의한 영향을 미침에 따라 폴리페놀과 플라보노이드의 추출에 있어 증류수와 에탄올 혼합 비율 최적화를 통해 극성과 비극성 물질의 동시 추출이 필요하다는 것임을 확인하였다. 반면 김으로부터 RSA 추출에 있어 추출 시간이 가장 유의적인 독립변수인 것으로 확인되었으며 적정 시간 이상의 추출에 있어 항산화 활성을 가진 폴리페놀과 플라보노이드 페놀 성분의 열분해에 따른 손상 가능성이 있어 추출공정 개발에 있어 추출 시간을 최소화하는 제한조건의 도입이 필요하다 사료되었다. 본 연구에서는 중심합성계획법을 사용하여 초음파 추출을 적용한 김 추출 공정 최적화를 수행하였다, 2차 회귀함수를 사용하여 예측한 결과와 실험값이 유사함을 확인함에 따라 예측 모델이 신뢰도가 높다는 것을 확인하였다. 따라서 초음파 추출법은 김 추출 공정에서 생리활성물질 생산 증가에 유용하게 적용될 수 있으며 김으로부터 천연 항산화제를 효율적으로 생산함으로써 건강기능식품, 화장품 및 의약품 생산에 기여할 수 있는 경제적으로 효율적인 추출 공정임을 제안하였다.

References

- [1] E. J. Kim, J. Y. Choi, M. R. Yu, M. Y. Kim, S. Lee, and B. H. Lee, "Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants", *Korean Journal of Food Science and Technology*, vol.44, no.3, pp.337-342, Jun. 2012. DOI: <https://doi.org/10.9721/KJFST.2012.44.3.337>
- [2] E. J. Han, E.-J. Shin, K.-W. Kim, G. Ahn, and T. J. Bae, "Cytoprotective effect of a neutrase enzymatic hydrolysate derived from Korea pen shell atrina

- pectinata against hydrogen peroxide-induced oxidative damages in hepatocytes", *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol.53, no.1, pp.123-131, Feb. 2020.
DOI: <https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0123>
- [3] K. A. Hwang, H. J. Hwang, and Y. J. Hwang, "Antioxidant effect of raphanus sativus L. through the suppression of reactive oxygen species production", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, vol.50, no.11, pp.1145-1151, Oct. 2021.
DOI: <https://doi.org/10.3746/ikfn.2021.50.11.1145>
- [4] M. J. Seong, J. E. Kim, and N. H. Lee, "Whitening and anti-oxidative constituents from the extracts of hydrangea petiolaris leaves", *Journal of Society of Cosmetic Scientists of Korea*, vol. 48, no. 2, pp. 123-134, Jun. 2022.
DOI: <https://doi.org/10.15230/SCSK.2022.48.2.123>
- [5] J. H. Moon et al., "Metabolic analysis and neuroprotective effect of domestic and imported walnuts (*Juglans regia* L.)", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, vol.49, no. 9, pp.907-918, Sep. 2020.
DOI: <https://doi.org/10.3746/ikfn.2020.49.9.907>
- [6] W. Y. Song and J. H. Choi, "Effect of spirodela polyrhiza on antioxidant activity in diet-induced obese rats", *Korean Journal of Life Science*, vol. 31, no.5, pp.488-495, May. 2021.
DOI: <https://doi.org/10.5352/ILS.2021.31.5.488>
- [7] D. O. Kim and C. Y. Lee, "Considerations for the effects of antioxidant phytochemicals on human health", *Korean Journal of Food Science and Technology*, vol. 53, no.2, pp.111-114, Apr. 2021.
DOI: <https://doi.org/10.9721/KJFST.2021.53.2.111>
- [8] Q. Wang, J. Yan, J. W. Bak, Y. G. Go, Y. R. Go, and H. M. Kim, "In vitro screening of seaweed ethanol extracts for anti-inflammatory and anti-obesity properties". *Korean Journal of Food Science and Technology*, vol.55, no.1, pp.50-56, Feb. 2023.
DOI: <https://doi.org/10.9721/KJFST.2023.55.1.50>
- [9] C. H. Lee, Y. N. Park, and S. G. Lee, "Analysis and comparison of bioactive compounds and total antioxidant capabilities of korean brown algae", *Korean Journal of Food Science and Technology*, vol. 52, no. 1, pp. 54-59, Feb. 2020.
DOI: <https://doi.org/10.9721/KJFST.2020.52.1.54>
- [10] Y. J. Lee, W. S. Kim, Y. J. Jeon, and Y. T. Kim, "Physicochemical properties and antioxidant activity of yanggaeng containing *Pyropia yezoensis*", *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol.53, no. 5, pp.672-680, Oct. 2020.
DOI: <https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0672>
- [11] C. L. Ho, "Comparative genomics reveals differences in algal galactan biosynthesis and related pathways in early and late diverging red algae", *Genomics*, vol.112, no.2, pp.1536-1544, Mar. 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.YGENO.2019.09.002>
- [12] M. R. Kim, J. H. Lim, and J. S. Song, "Acid treatment effects on the contents of quercetin glycosides and aglycone in red onion powder", *Korean Journal of Food Science and Technology*, vol.54, no.2, pp.115-125, Apr. 2022.
DOI: <https://doi.org/10.9721/KJFST.2022.54.2.115>
- [13] T. H. Kim, S. Jang, A. R. Lee, A. Y. Lee, G. Y. Choi, and H.K. Kim, "Optimization of extraction conditions for swertiamarin in *Swertia japonica* Makino", *The Korea Association Of Herbology*, vol.29, no.1, pp.13-18, Jan. 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2014.29.1.13>
- [14] D. I. Kim and J. H. Hong, "Optimization of ethanol extraction conditions for functional components from *Lespedeza cuneata* using response surface methodology", *Korean Journal of Food and Cookery Science*, vol. 28, no.3, pp.702-712 Jun. 2012.
DOI: <http://doi.org/10.9724/kfcs.2012.28.3.275>
- [15] H. I. Kim and S. H. Song, "Development and optimization of an immediate-release lafutidine tablet formulation using combinatorial response surface methodology", *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, Vol.23, No.1 pp.660-669, Jan. 2022.
DOI: <https://doi.org/10.5762/KAIS.2022.23.1.660>
- [16] M. Y. Wang, Y. Gang, H. Qing, "Response surface methodological analysis on biohydrogen production by enriched anaerobic cultures", *Enzyme and Microbial Technology*, vol.38, no.7, pp.905-913, May. 2006.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.08.016>
- [17] M. Dutka, M. Ditaranto, T. Løvås, Application of a central composite design for the study of NOx emission performance of a low NOx burner. *Energies*, vol.8, no.5, pp.3606-3627, Apr. 2015.
DOI: <https://doi.org/10.3390/en8053606>
- [18] D. H. Gam, J. W. Hong, S. H. Yeom, and J. W. Kim, "Polyphenols in peanut shells and their antioxidant activity: Optimal extraction conditions and the evaluation of anti-obesity effects", *Journal of Nutrition and Health*, vol.54, no.1, pp.116-128, Apr. 2021.
DOI: <https://doi.org/10.4163/JNH.2021.54.1.116>
- [19] H. J. Jung, Y. J. Han, D. K. Lee, D. H. Gam, and J. W. Kim, "Optimization of alkaline hot-water extraction conditions for production of polyphenolic compounds and flavonoids from korean thistle (*Cirsium japonicum*)", *Journal of Advanced Engineering and Technology*, vol.11, pp.95-99, Jun. 2018.
DOI: <https://doi.org/10.35272/jaet.2018.11.2.95>
- [20] H. L. Kim, J. W. Hong, S. J. Jeon, H. Y. Kim, and J. W. Kim, "Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant from *Cirsium setidens* using response surface methodology", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, vol.50, no.3, pp.285-293, Feb. 2021.
DOI: <https://doi.org/10.3746/JKFN.2021.50.3.285>

[21] H. R. Kang, S. J. Lee, H. J. Kwon, M. H. Kwon, and N. J. Sung. "Establishment of extraction conditions for the optimization of the black garlic antioxidant activity using the response surface methodology", *Korean Journal of Food Preservation*, vol.19, no.4, pp.577-585, Agu. 2012.
DOI: <https://doi.org/10.11002/kjfp.2012.19.4.577>

[22] J. H. Kim, Y. S. Hwang, J. H. Park, M. H. Kang, Y. S. Oh, and J. W. Kim, "Determination of antioxidant activities and bioactive compounds from rosa rugosa extract", *Korean Journal of Life Science*, vol.32, no.11, pp.841-846, Nov. 2022.
DOI: <https://doi.org/10.5352/JLS.2022.32.11.841>

[23] J. J. Lee, D. H. Park, and W. Y. Lee, "Optimization of microwave-assisted extraction process of *Hordeum vulgare* L. by response surface methodology", *Korean Journal of Food Preservation*, vol.24, no.7, pp.949-956, Nov. 2017.
DOI: <https://doi.org/10.11002/KJFP.2017.24.7.949>

[24] S. Y. Kang, K. H. Kim, and H.-S. Yook, "Antioxidant activities of fermented sophorae fructus, and inhibitory actions on tyrosinase and elastase", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, vol.50, no.3, pp.254-263, Mar. 2021.
DOI: <https://doi.org/10.3746/JKFN.2021.50.3.254>

[25] C. H. Park, H. Kang, and S. G. Lee, "Antioxidant activity of ethanol extracts and fractions from *Castanea crenata* inner shell", *Journal of Plant Biotechnology*, vol.49, no.2, pp.150-154, Jun. 2022.
DOI: <https://doi.org/10.5010/IPB.2022.49.2.150>

[26] Y. Park, J. Lee, M. J. In, and H. J. Chae, "Optimization of extraction conditions of flavonoid compounds from thyme (*thymus vulgaris libiatae*)", *Journal of Applied Biological Chemistry*, vol.63, no.1, pp.111-116, Mar. 2020.
DOI: <https://doi.org/10.3839/JABC.2020.015>

[27] D. H. Gam, J. W. Hong, S. J. Jeon, D. H. Baek, and J. W. Kim, "Development of ultrasound-assisted extraction for production of bioactive compounds with whitening and anti-wrinkle effects from *Sargassum Horneri*", *The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering*, Bioeng, vol.35, pp.294-302, Dec. 2020.
DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27041296>

[28] D. L. Min, S. W. Lim, J. B. Ahn, and Y. J. Choi, "Optimization of ethanol extraction conditions for antioxidants from *zizyphus jujuba* Mill. leaves using response surface methodology", *Korean Journal of Food Science and Technology*, vol.42, no.6, pp.733-738, Jan. 2010.

[29] B. K. Kim, J. H. Kang, G. H. Oh, J.-Y. Hwang, S. O. Jang, and M. Kim, "Antibacterial and antioxidant activity of *chamaecyparis obtusa* extracts", *Korean Journal of Life Science*, vol.29, no.7, pp.785-791, Jul. 2019.
DOI: <https://doi.org/10.5352/JLS.2019.29.7.785>

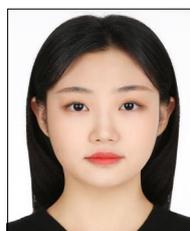
[30] Y. Liu, C. Cai, Y. Yao, and B. Xu, "Alteration of

phenolic profiles and antioxidant capacities of common buckwheat and tartary buckwheat produced in China upon thermal processing", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol.99, no.12, pp. 5565-5576, Jun. 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1002/JSA.9825>

[31] H. Lohvina, M. Sándor, M. Wink, "Effect of ethanol solvents on total phenolic content and antioxidant properties of seed extracts of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) varieties and determination of phenolic composition by HPLCESI-MS", *Diversity*, vol.14, no.1, pp.7, Dec. 2021.
DOI: <https://doi.org/10.3390/d14010007>

염 서 희(Suh Hee Yeom)

[준회원]



• 2021년 9월 ~ 현재 : 선문대학교 응용생물학과와 식품과학전공 석사과정

<관심분야>

바이오, 생물, 천연물

박 제 훈(Jae Hoon Park)

[준회원]



• 2023년 3월 ~ 현재 : 선문대학교 응용생물학과와 식품과학전공 석사과정

<관심분야>

바이오, 생물

박 하 영(Ha Young Park)

[준회원]



- 2022년 9월 ~ 현재 : 선문대학교 응용생물과학과 식품과학전공 석사과정

<관심분야>

바이오, 생물, 식품

김 소 희(So Hee Kim)

[준회원]



- 2022년 3월 ~ 현재 : 선문대학교 응용생물과학과 식품과학전공 석사과정

<관심분야>

바이오, 항암, 유전

김 진 우(Jin Woo Kim)

[정회원]



- 1997년 2월 : 인하대학교 생물공학과 (공학석사)
- 2000년 5월 : Colorado State Univ.(美) 화학공학과 (공학석사)
- 2004년 10 : McGill Univ. (캐) Biosystems Engineering (박사)
- 2015년 3월 ~ 현재 : 선문대학교 식품과학과 교수

<관심분야>

생물, 바이오