creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000265000

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

2015년 08월

석사학위논문

다양한 식물 유래 식용 폴리페놀의 분리 및 분석

조선대학교 대학원

화 학 공 학 과

이 용 조

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

다양한 식물 유래 식용 폴리페놀의 분리 및 분석

Isolation and analysis of dietary polyphenols from various plant sources

2015년 8월 25일

조선대학교 대학원

화 학 공 학 과

이 용 조

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

다양한 식물 유래 식용 폴리페놀의 분리 및 분석

Isolation and analysis of dietary polyphenols from various plant sources

지도교수 신 현 재

이 논문을 석사학위신청 논문으로 제출함

2015년 4월

조선대학교 대학원

화 학 공 학 과

이 용 조

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

이용조의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교 수 이 중 헌 (인)

위 원 조선대학교 교 수 이 재 욱 (인)

위 원 조선대학교 교 수 신 현 재 (인)

2015년 5월

조선대학교 대학원

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

목 차

List of Tables ····· VI

List of Figures ····· IX

Abstract ····· 1

제 1장 서론 ····· 4

제 1절 연구 배경 ····· 4

1. 식물성 폴리페놀의 정의 ····· 4

2. 식물성 폴리페놀의 종류와 구조 ····· 5

가. Flavonoids ····· 5
나. Phenolic acids ····· 5
다. Stilbenes ····· 5
라. Lignans ····· 6

제 2절 본 연구와 관련한 식물 소재 연구 현황 ····· 8

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

1. 밀싹 ····· 8

2. 블루베리 열매 ····· 10

3. 아로니아 열매 ····· 10

제 3절 반응표면분석 ····· 12

제 4절 연구의 목적 ····· 16

제 2장 재료 및 방법 ····· 18

제 1절 실험재료 및 시약 ····· 18

1. 실험 재료 ····· 18

2. 실험 시약 ····· 19

제 2절 추출 및 분리 ····· 20

1. 밀싹의 추출 및 분리 ····· 20

2. 블루베리 및 아로니아 열매의 anthocyanin 추출 ····· 23

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 3절 각 원물의 성분 분석 ····· 26

1. 밀싹 분획물의 HPLC 분석 ····· 26

2. 블루베리 및 아로니아 열매 anthocyanin 추출물 HPLC 분석 ····· 28

제 4절 반응표면분석 및 통계처리 ····· 30

1. 실험 계획 ····· 30

제 5절 RSM 중심합성법에 의한 각종 실험 ····· 32

1. 총 폴리페놀 함량 측정 ····· 32

2. 항산화 활성 측정 ····· 32

가. DPPH radical scavenging activity ····· 32
나. ABTS radical scavenging activity ····· 33

제 3장 결과 및 고찰 ····· 34

제 1절 각 원물로부터 분리된 폴리페놀 화합물의 분석 ····· 34

1. 밀싹 분획물 HPLC 분석 결과 ····· 34

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 블루베리 및 아로니아 열매 HPLC 분석 결과 ····· 48

가. Anthocyanin 표준 물질 HPLC 분석 결과 ····· 48
나. 블루베리 열매 HPLC 분석 결과 ····· 48
다. 아로니아 열매 HPLC 분석 결과 ····· 51

제 2절 RSM을 이용한 각 원물의 추출 조건 최적화 ····· 54

1. 추출 수율 ····· 54

가. 밀싹 ····· 54
나. 블루베리 열매 ····· 59
다. 아로니아 열매 ····· 63

2. 총 폴리페놀 함량 ····· 67

가. Gallic acid ····· 67
(1) 밀싹 ····· 67
(2) 블루베리 열매 ····· 68
(3) 아로니아 열매 ····· 69
나. Quercetin ····· 70
(1) 밀싹 ····· 70
(2) 블루베리 열매 ····· 71
(3) 아로니아 열매 ····· 71

3. 항산화능 ····· 93

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

가. DPPH radical scavenging activity ····· 93
(1) 밀싹 ····· 93
(2) 블루베리 열매 ····· 98
(3) 아로니아 열매 ····· 102
나. ABTS radical scavenging activity ····· 106
(1) 밀싹 ····· 106
(2) 블루베리 열매 ····· 110
(3) 아로니아 열매 ····· 114
제 4장 결론 ····· 118
참고문헌 ····· 122

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

List of Tables

Table 1. HPLC analysis conditions of wheat sprout ····· 27

Table 2. HPLC analysis conditions of blueberry and black chokeberry ····· 29

Table 3. Central composite design by RSM computer program ····· 31

Table 4. Contents of anthocyanins in *A. melanocapa* ····· 53

Table 5. Yield of wheat sprout extracts for response surface methodology analysis. X_1: Concentration of ethano(%)l; X_2: Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃) ····· 56

Table 6. Yield of wheat blueberry extracts for response surface methodology analysis X_1: Concentration of ethanol(%); X_2: Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃) ····· 60

Table 7. Yield of black chokeberry extracts for response surface methodology analysis X_1: Concentration of ethanol(%); X_2: Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃) ····· 64

Table 8. Total Polyphenol(gallic acid) of wheat sprout extracts for response surface methodology analysis X_1: Concentration of ethanol(%); X_2: Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃) ····· 74

Table 9. Total Polyphenol(gallic acid) of blueberry extracts for response surface methodology analysis X_1: Concentration of ethanol(%); X_2: Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃) ····· 77

Table 10. Total Polyphenol(gallic acid) of black chokeberry extracts for response surface methodology analysis X_1: Concentration of ethanol(%); X_2:

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃) ····· 80

Table 11. Total Polyphenol(quercetin) of wheat sprout extracts for response surface methodology analysis X_1: Concentration of ethanol(%); X_2: Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃) ····· 84

Table 12. Total Polyphenol(quercetin) of blueberry extracts for response surface methodology analysis X_1: Concentration of ethanol(%); X_2: Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃) ····· 87

Table 13. Total Polyphenol(quercetin) of black chokeberry extracts for response surface methodology analysis X_1: Concentration of ethanol(%); X_2: Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃) ····· 90

Table 14. DPPH radical scavenging activity of wheat sprout extracts for response surface methodology analysis X_1: Concentration of ethanol(%); X_2: Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃) ····· 95

Table 15. DPPH radical scavenging activity of blueberry extracts for response surface methodology analysis X_1: Concentration of ethanol(%); X_2: Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃) ····· 99

Table 16. DPPH radical scavenging activity of black chokeberry extracts for response surface methodology analysis X_1: Concentration of ethanol(%); X_2: Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃) ····· 103

Table 17. ABTS radical scavenging activity of wheat sprout extracts for response surface methodology analysis X_1: Concentration of ethanol(%); X_2: Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃) ····· 107

Table 18. radical scavenging activity of blueberry extracts for response surface

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

methodology analysis X_1: Concentration of ethanol(%); X_2: Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃) ····· 111

Table 19. ABTS radical scavenging activity of black chokeberry extracts for response surface methodology analysis X_1: Concentration of ethanol(%); X_2: Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃) ····· 115

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

List of Figures

Figure 1. Variation of Polyphenols. 7
Figure 2. The experimental points of central composite design 14
Figure 3. Procedure of response surface methodology. 15
Figure 4. wheat sprout(left), blueberry(center), black chokeberry(right). 18
Figure 5. Isolation of wheat sprout. 22
Figure 6. Isolation of anthocyanins from blueberry. 24
Figure 7. Isolation of anthocyanins from black chokeberry. 25
Figure 8. HPLC result of wheat sprout fr. 2(230 nm). 36
Figure 9. HPLC result of wheat sprout fr. 2(254 nm). 37
Figure 10. HPLC result of wheat sprout fr. 7(230 nm). 38
Figure 11. HPLC result of wheat sprout fr. 7(254 nm). 39
Figure 12. HPLC result of wheat sprout fr. 12(230 nm). 40
Figure 13. HPLC result of wheat sprout fr. 12(254 nm). 41
Figure 14. HPLC result of wheat sprout fr. 14(230 nm). 42
Figure 15. HPLC result of wheat sprout fr. 14(254 nm). 43
Figure 16. HPLC result of wheat sprout fr. 17(230 nm). 44
Figure 17. HPLC result of wheat sprout fr. 17(254 nm). 45
Figure 18. HPLC result of wheat sprout fr. 23(230 nm). 46
Figure 19. HPLC result of wheat sprout fr. 23(254 nm). 47
Figure 20. HPLC result of anthocyanin standard mixture. 49
Figure 21. HPLC chromatogram of blueberry anthocyanin extract. 50

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Figure 22. HPLC chromatogram of black chokeberry anthocyanin extract. 52
Figure 23. Response surface for the effects of yield on wheat sprout extract. 57
Figure 24. Response surface for the effects of yield on blueberry extract. 61
Figure 25. Response surface for the effects of yield on black chokeberry extract. 65
Figure 26. Gallic acid standard curve for total Polyphenol contents. 73
Figure 27. Response surface for the effects of total Polyphenol contents(gallic acid) on wheat sprout extract. 75
Figure 28. Response surface for the effects of total Polyphenol contents(gallic acid) on blueberry extract. 78
Figure 29. Response surface for the effects of total Polyphenol contents(gallic acid) on black chokeberry extract. 81
Figure 30. Quercetin standard curve for total Polyphenol contents. 83
Figure 31. Response surface for the effects of total Polyphenol contents(quercetin) on wheat sprout extract. 85
Figure 32. Response surface for the effects of total Polyphenol contents(quercetin) on blueberry extract. 88
Figure 33. Response surface for the effects of total Polyphenol contents(quercetin) on black chokeberry extract. 91
Figure 34. Response surface for the effects of DPPH radical scanvenging activity on wheat sprout extract. 96
Figure 35. Response surface for the effects of DPPH radical scanvenging activity on blueberry extract. 100

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Figure 36. Response surface for the effects of DPPH radical scanvenging activity on black chokeberry extract. ····· 104
Figure 37. Response surface for the effects of ABTS radical scanvenging activity on wheat sprout extract. ····· 108
Figure 38. Response surface for the effects of ABTS radical scanvenging activity on blueberry extract. ····· 110
Figure 39. Response surface for the effects of ABTS radical scanvenging activity on black chokeberry extract. ····· 116

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Abstract

Isolation and analysis of dietary polyphenols from various plant sources

By Yong-Jo Lee
Advisor : Prof. Hyun-Jae Shin, Ph.D.
Department of Chemical Engineering,
Graduate School of Chosun University

The major objective of this study was to evaluate the dietary Polyphenols from various plant sources including wheat sprout (*Triticum aestivum* L.), blueberry (*Vaccinium spp.*), and black chokeberry (*Aronia melanocarpa*). Response surface methodology (RSM) was introduced for the optimized extraction conditions and DPPH, ABTS radical scavenging activity, and total Polyphenol contents were employed for the determination of the antioxidant activity.

The results of high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

revealed that there were 3 major peaks at 230 nm from wheat sprout fr. 2, fr. 7, and fr. 14 , 4 major peaks from wheat sprout fr. 12, and 6 major peaks from fr. 17, while no separated peaks were obtained from fr. 23. All together the 6 wheat sprout fractions were detected as chlorophyll compounds instead of polyphenols which was similar with other reports that over 70% of wheat sprout extraction were chlorophyll compounds. A series of anthocyanin derivatives were successfully extracted blueberry and black chokeberry. There were 8 peaks determined from blueberry identified as Cyanidin-3,5-di-O-glucoside, Cyanidin-3-O-galactoside, Cyanidin-3-O-glucoside, Cyanidin-3-O-rutinoside, Delphinidin, Cyanidin, Pelargonidin, Malvidin. For black chokeberry there were 4 peaks identified as Cyanidin-3-O-galactoside, Cyanidin-3-glucoside, Cyanidin-3-arabinosied, Cyanidin-3-xyloside.

Response surface methodology was utilized to optimize the extraction conditions of wheat sprout, blueberry, and black chokeberry. For wheat sprout the maximum extraction yield was 28.53% under the following conditions: ethanol concentration of 63.56%, extraction time of 8.07 h, temperature of 29.26℃. Maximum total polyphenol content (gallic acid) was 120.14 μg/ml obtained with 49.43% ethanol treated for 8.63 h at 27.86℃. Maximum total Polyphenol content (Quercetin) was 109.29 μg/ml obtained with 49.51% ethanol treated for 8.64 h at 27.89℃. Maximum DPPH radical scavenging activity was 87.21% obtained with 49.51% ethanol treated for 8.64 h at 27.89℃. Maximum ABTS radical scavenging activity was 99.40% obtained with 49.96% ethanol treated for 8.05 h at 28.39℃. For blueberry the maximum extraction yield was 99.13%

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

under the following conditions: ethanol concentration of 53.49%, extraction time of 10.18 h, temperature of 33.53℃. Maximum extraction total polyphenol content (gallic acid) was 100.24 μg/ml obtained with 54.70% ethanol treated for 9.37 h at 29.77℃. Maximum total polyphenol content (Quercetin) was 106.81 μg/ml obtained with 55.91% ethanol treated for 10.76 h at 24.11℃. Maximum DPPH radical scavenging activity was 35.67% obtained with 53.08% ethanol treated for 8.57 h at 32.02℃. Maximum ABTS radical scavenging activity was 99.02% obtained with 54.18% ethanol treated for 8.96 h at 29.70℃. For black chokeberry the maximum extraction yield was 75.19% under the following conditions: ethanol concentration of 58.67%, extraction time of 9.56 h, temperature of 29.61℃. Maximum extraction total polyphenol content (gallic acid) was 100.34 μg/ml obtained with 62.38% ethanol treated for 8.33 h at 30.95℃. Maximum total polyphenol content (Quercetin) was 110.67 μg/ml obtained with 61.29% ethanol treated for 8.72 h at 29.05℃. Maximum DPPH radical scavenging activity was 67.20% obtained with 47.63% ethanol treated for 8.88 h at 30.45℃. Maximum ABTS radical scavenging activity was 98.63% obtained with 53.57% ethanol treated for 7.37 h at 31.43℃.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 1장 서론

제 1절 연구 배경

1. 식물성 폴리페놀의 정의

최근 과일이나 채소에 함유 되어있는 폴리페놀 화합물이 사람이나 동물에게 건강을 증진(health promoting functions)시키는 효과가 있음이 밝혀지고 있다. 폴리페놀은 활성산소를 제거하고 지질과산화에 의한 생체의 순환기능 장애와 노화 등을 억제하는 항산화 기능을 가지고 있으므로 각종 질환의 예방과 치료에 이용되고 있으며, 최근 역학 조사의 결과에서는 과일이나 야채를 많이 섭취하는 사람일수록 심질환이나 암의 발생율 및 순환기계의 질환이 감소한다는 것이 알려졌다[6, 21, 43]. 폴리페놀은 산화적 DNA 손상, 비정상적 세포증식, 세포의 돌연변이, 세포간 정보전달 등을 억제하고 발암과 관련된 과정에서 항암효과를 가지며 단백질과 결합하여 신체 대사에 관여하는 효소활성을 변화 시키거나 화학물질의 독성 제거를 위한 유전자 발현을 촉진 시키는 작용을 한다 [11, 45, 38]. 폴리페놀은 화학적으로 benzene ring에 hydroxyl group을 한개 또는 그 이상 가진 화합물로써, 페놀성 고리 및 다른 구조적 요소의 개수에 따라 여러 가지로 나눌 수 있는데 탄소 골격에 따라 flavonoid, phenolic acid, stilbene, 그리고 lignan으로 나누어진다 [10, 30]. 폴리페놀 은 현재까지 8000개 이상의 구조가 알려져 있으며, 중합체 및 올리고머 등으로 중합이 되는데 이 때 Flavonoid의 올리고머 형태는 'tannin' 이라고 부르고 중합된 tannin(proanthocyanidins 또는 procyanidins)과 가수분해 가능한 tannin으로 분류된다 [11].

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 식물성 폴리페놀 종류 및 구조

가. Flavonoids

Flavonoid는 15개의 탄소골격을 가진 두개의 벤젠 고리를 가지고 있고 3개의 선형 탄소사슬이 결합되어있는 형태이다. 식물이 함유하고 있는 노란색을 띤 천연 물질을 총칭하며 원래 flavonoid는 식물 자신이 태양의 자외선으로부터 자기 자신을 방어하기 위해 만들어낸 천연물질이다. 또한 flavonoid는 phenolic compound로 이들은 당과 결합하여 배당체로 존재하는 경우가 많으므로 보통은 수용성을 띠고 있다. 일반적으로 이들은 화학구조 중 산화 정도에 따라 6개의 종류로 나뉘는데 flavonol, flavone, flavanone, isoflavones, anthocyanidin, 그리고 flavanol 이렇게 6가지로 분류된다 [4].

나. Phenolic acids

Phenolic acid는 모든 식물 및 식품들 중에 존재하고, 주로 caffeic acid나 ferulic acid로 존재한다. 식물의 세포벽을 형성하는 lignin의 전구체로서 주로 hemicellulose에 결합된 형태로 식물의 여러 기관에 분포되어 식이섬유와 관계가 깊다. 대표적으로 맥아에는 5 mg/g 정도의 phenolic acid가 함유되어있고, 커피에는 약 50~150 mg의 caffeic acid의 기본 구조를 가진 chlorogenic acid가 포함되어 있다 [4].

다. Stilbenes

Stilbene은 식품에 많이 존재하지는 않지만 포도, 땅콩, 적포도주 등에서 주목을 받고 있는 resveratrol이 주로 함유되어 있다. Resveratrol은 coumaroyl-Co A와

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

malony-Co A로부터 stilbene synthase라는 효소에 의해 합성되는 물질로서 trans-form, cis-form, piceid의 3가지 형태로 알려져 있다 [4].

라. Lignans

Lignan 전구체는 종실류, 곡류, 두류, 과일 및 채소류 등 식물 유래 식품들에 폭넓게 존재한다. 특히 아마씨에 풍부하게 존재하며 이들을 섭취하게되면 장내에서 미생물에 의해 lignan, enterodiol, enterolactone으로 전환된다. 참깨의 경우 sesamin, sesamolin, sesaminol glucose 등 리그난 성분이 다량 함유되어 있으며 그 중에서도 sesamin이 가장

많이 들어있다 [4].

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

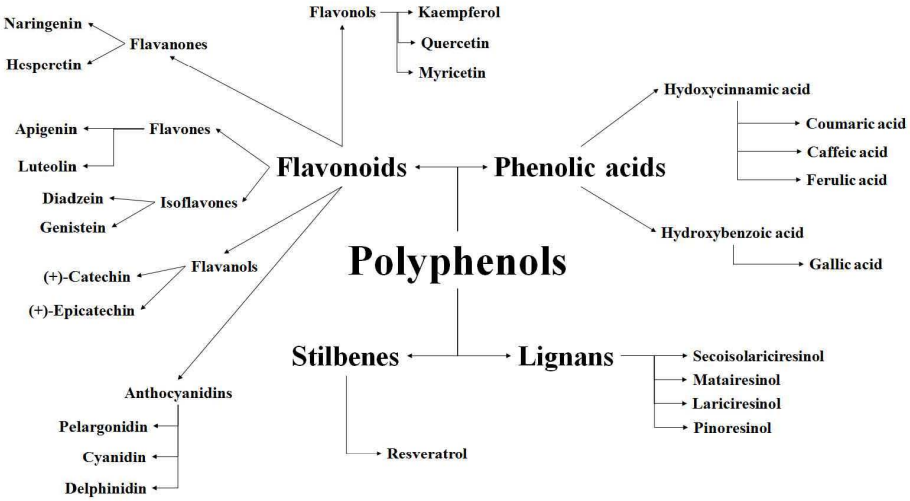


Figure 1. Variation of Polyphenols.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 2절 본 연구와 관련한 식물 소재 연구 현황

1. 밀싹 (*Triticum aestivum* L.)

새싹채소는 발아한지 일주일 정도 되어 본 잎이 나오기 전의 새싹을 말하는데, 식품의약품안전처(KFDA)에서 제공하는 데이터베이스에서의 밀은 식물계, 벼목, 벼과, 포아풀아과 밀속으로 나누어지고, 학명은 *Triticum aestivum* L. 이다. 밀은 씨와 싹 부분만 식품원료로 사용이 가능하고, 씨는 밀가루, 맥주 등으로 사용되어지고, 싹은 주로 주스로 만들어서 섭취한다 [19]. 밀싹은 밀에서 1-2주 마디단계 직전의 어린 싹을 부르는 말이고, 밀싹의 약효는 이미 오래 전부터 알려져 있다. 밀, 보리, 알팔파 같은 곡식의 싹에는 사람과 동물의 건강을 증진 시키는 탁월한 효과를 발휘하여 미국의 앤 위그모어(1909~1994)와 미국의 의사인 버지니아 리빙스턴(1906~1990) 등 각종 난치병을 치료한 사례가 종종 보고되고 있다. 밀싹의 약 70%가 chlorophyll이 포함되어있는데 산소가 풍부하고, 또한 이 chlorophyll은 유독한 이산화탄소를 분해해서 산소를 방출시키는 녹색식품으로 각광을 받고 있다. 또한 밀싹 에는 유력한 산화를 억제하는 성분인 항산화 성분들이 있다 [47]. 10가지가 넘는 비타민과 20가지가 되는 아미노산(필수아미노산 8가지 함유)과 시금치의 18배의 미네랄(칼슘, 칼륨, 마그네슘, 인, 무기물 아연, 셀레늄)과 효소를 함유하고 있고, 손상된 세포와 심장과 동맥의 조직을 수리해주는 뮤코 다당류를 함유하고 있으며 항암 물질인 SOD, P4D1, 셀렌, 레트릴이 함유되어 있어 암 환자에게 큰 도움을 주는 건강식품 중 최고로

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

꼽히는 알칼리 식품이다. 미국과 유럽에서는 밀 싹이 각종 성인병 예방에 효과가 있다는 것이 알려져 인기가 높은 완전식품으로 생즙의 형태로 많이 음용되고 있다 [5]. 현재 국내 국민들이 건강에 관한 관심이 높아지면서 밀싹의 효능이 알려져 아울러 밀싹에 대한 소비자들의 관심도 크게 증가하여 밀싹 재배 농가가 늘어나고 있다. 2009년 농촌 진흥청 조사에 의하면 밀싹에는 단백질이 100 g당 30 g 들어 있으나 통밀 가루에는 13 g 밖에 들어 있지 않았고, 또한 비타민C가 감귤의 6 배, 미네랄은 시금치의 18 배가 함유되어 있고, 밀 싹에는 비타민 A가 20,000 IU 정도 들어 있으나 통밀가루에는 전혀 들어있지 않았다고 한다.

그 외 단백질, 식이섬유 엽록소, 철, 칼슘, 엽산, 나이아신, 리보플라본 등이 통밀가루에 비해 월등히 많은 것으로 보고되고 있어 건강기능식품으로서 상품성이 높다. 그러나 현재 밀싹 제품은 즙 형태나 원물로 생산 판매가 주로 이뤄지는 형태로 품질관리와 보존기간이 짧은 단점을 가지고 있었으나 최근에는 분말형태의 밀싹 제품이 생산되고 있고, 다양한 상품화 연구가 필요하다. 밀싹에 관한 국내의 연구로 밀싹 물 추출물이 당뇨병을 유발시킨 마우스의 혈당을 강하시키는 역할을 하였다고 보고하였으며 [26], 농림수산식품부에서는 밀싹 추출물을 이용한 당뇨병 개선 바이오 기능성소재 산업화를 연구하며 제2형 당뇨모델 ob/ob 마우스에서 밀싹 물 추출물의 항당뇨 효과를 보고하기도 하였다 [27]. 그 외 밀싹 추출물이 고지방식이 섭취 마우스의 간 조직의 지질 축적을 억제하는데 긍정적인 역할을 하는 것으로 보고되었다 [29].

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 블루베리 (*Vaccinium* spp.)

블루베리는 식물계, 진달래목 진달래과 산앵두나무속에 속하는 식물이며 학명으로 *Vaccinium* spp. 이고, 열매와 잎 부분만 식용으로 사용이 가능하다고 식품의약품안전처 식품원재료 데이터 베이스에 보고되어 있다 [3]. 망막의 로돕신 합성 촉진, 항 궤양 및 항염 작용, 정장작용, 혈소판 응고억제작용 및 항산화작용이 있는 것으로 알려져 있으며, 또한 세계 10대 장수 식품의 하나로 선정되어질 정도로, 주요 채소 및 과일 중에 최고의 항산화 활성물질을 함유하고 있다고 알려져 왔다 [22].

이러한 Vaccinium속 berry류는 anthocyanin 성분들이 많이 함유되어 있다고 알려져 있다. Anthocyanin은 과일에도 많이 들어 있는 수용성 천연 색소이며 [14, 32, 43], 기능성 생리활성 물질로 건강 증진 효과가 높다 [23]. Anthocyanin 성분은 항산화 활동과 밀접한 관련이 있는데 [23,39], 이러한 항산화제는 퇴행성 질병 및 질환의 많은 발달 조건에 관련된 자유라디칼을 억제하는데 도움이 된다. 또한 관상 동맥 심장 질환의 위험을 감소시키고 혈소판 응집을 억제하며 동맥 내피세포를 보호하고 항암 및 항염 작용, 면역 반응을 조절할 수 있다고 보고되었다 [16, 20, 24, 30, 31, 38, 48-50].

3. 아로니아 (*Aronia melanocarpa*)

블랙 초크베리 (black chokeberry)라고 불리는 아로니아(*Aronia melanocarpa*)는 식물계(Plantae), 피자식물문(Magnoliophyta), 쌍떡잎식물강

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(Magnoliopsida), 장미목(Rosares), 장미과(Rosaceae), 배나무아과(Maloideae), 아로니아속(*Aronia*)에 속하는 베리류의 식물열매로 원래는 북부 아메리카지역에서 자생한다 [46]. 아로니아에는 phenolic acids, flavonoids등의 생리활성 물질이 함유되어 있으며 [44], 특유의 신맛과 떫은 맛 때문에 생과로 이용하기 보다는 가공용으로 개발할 필요성이 대두되고 있다. 18세기에 유럽에 소개되어 재배된 아로니아는 맛, 색 그리고 향이 좋아 잼, 와인, 쥬스, 차로 사용하는 등 다양한 식자재로서의 이용가치가 높다 [44]. 최근까지 국내에서 연구된 아로니아의 기능성에 관한 보고로는 항산화효과, 항당뇨효과 [17], 항염증효과 [35], 면역조절기능활성 [12], 위보호효과 [34] 등이 있는 것을 알려져 있다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 3절 반응표면분석(Response surface methodology)

실험 계획(experimental design)은 어떤 원인이 반응에 유의한 영향을 주고 있는가를 파악하고 그 영향의 양적 정도 변화를 파악하고자 실시하는 것으로, 작은 요인들이 전체적으로 어느 정도 영향을 주고 있으며, 측정오차의 범위와 유의한 영향을 미치는 원인들이 어떠한 조건을 가질 때 가장 바람직한 반응을 얻을 수 있는가를 알아내기 위한 최적화 조건을 찾아내기 위해서 실시하는 것으로 알려져 있다 [27].

반응표면분석법은 1950년대, Box와 그의 공동연구자들에 의해 개발되었다 [7]. 반응표면분석법은 수학적 모델링의 적합성이 입증된 후에 시각적인 관점에서 유래되었고, 계량분석화학분야에서 널리 적용되었다 [7]. 반응표면분석법은 실험계획과 관련하여 얻은 실험 데이터에 대한 경험적 모델의 적합성에 기반을 두고 있고, 수학 및 통계적 기술의 한 그룹으로 구성되어있다 [7]. 반응표면분석법의 목적은 선형 또는 평면상의 다항식 함수가 참조되어 연구되는 계를 묘사하기 위함이고, 모델링과 변수들의 최적화된 실험조건을 찾는 것을 이용하기 위함이다 [7].

반응표면분석법을 사용하기 위한 과정은 Figure 2와 같이 진행되는데 [51], 입력과 출력의 파라미터를 설계하고 실험적 설계(experimental design)에 의해 만들어진 인자들을 특정 수준의 조합으로 구성된 실험 행렬을 만든다 [51]. 구성된 행렬을 가지고 회귀분석(Regression analysis)을 통해 예측변인의 변화에 따라 결과변인이 얼마나 변화하는지를 예측하고 ANOVA와 같은 통계검정(statistical test)를 통해 실험적 설계의 결과를 검정한다. 만약 모델링한 값에 따라 유의한 값이 나

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

온다면 최적 설계(optimal design)가 달성되고, 다시 최적 설계를 확인한다. 만약, 유의한 값이 나오지 않는다면 가변성 선별(screening variables)을 통해 다시 실험적 설계(experimental design)을 해야 한다 [51]. 반응표면분석법중 가장 일반적으로 사용되는 방법이 중심합성법(central composite design, CCD)이며, 조건에 따른 실험 후에 추가 실험하여 곡률 반응변수를 모델화 할 때 많이 사용되며, 2차 반응표면을 적합 시키기 위한 중심합성법의 실험점은 2^k개의 2^k 요인실험의 실험점과 2 k개의 축점 그리고 $n(\geq 1)$개의 중심점으로 이루어져 총 실험점의 수는 2^k+2k+n개인데, 반응표면이 곡면일 때 중심점의 영향이 크므로 중심점에서의 실험을 다른 실험점보다 많이 하는 것이 바람직한 특성을 가지고 있다. 회귀계수를 효율적으로 추정할 수 있게 하면서 훨씬 적은 실험횟수를 필요로 하는 실험설계의 개발이 절실하다. 이 목적으로 개발되어 현재까지 가장 많이 사용되고 있는 실험설계가 중심합성법 이다. 중심합성법은 Figure 2와 같이 2^3 요인점(2^3 factorial points), 중심점(center points)과 축점(axial points)의 세부분으로 구성되어 있다.

반응표면분석법은 독립변수와 종속변수 간의 관계를 실험값으로부터 추정하여 독립변수의 변화에 따른 종속변수의 값과 이에 따른 최적값을 최소한의 비용과 시간으로 예측할 수 있는 장점이 있어 적절한 실험계획법을 찾기 위한 방법으로 이용되고 있다 [27].

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

$$
\begin{array}{ccccc}
x_1 & x_2 & x_3 & \cdots & x_k \\
\end{array}
$$

$$
\begin{bmatrix}
-1 & -1 & -1 & \cdots & -1 \\
 & & \cdots & & \\
1 & 1 & 1 & \cdots & 1 \\
0 & 0 & 0 & \cdots & 0 \\
 & & \cdots & & \\
0 & 0 & 0 & \cdots & 0 \\
-\alpha & 0 & 0 & \cdots & 0 \\
\alpha & 0 & 0 & \cdots & 0 \\
 & & \cdots & & \\
0 & 0 & 0 & \cdots & -\alpha \\
0 & 0 & 0 & \cdots & \alpha
\end{bmatrix}
$$

2^kfactorial points

central points

axial points

Figure 2. The experimental points of central composite design.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

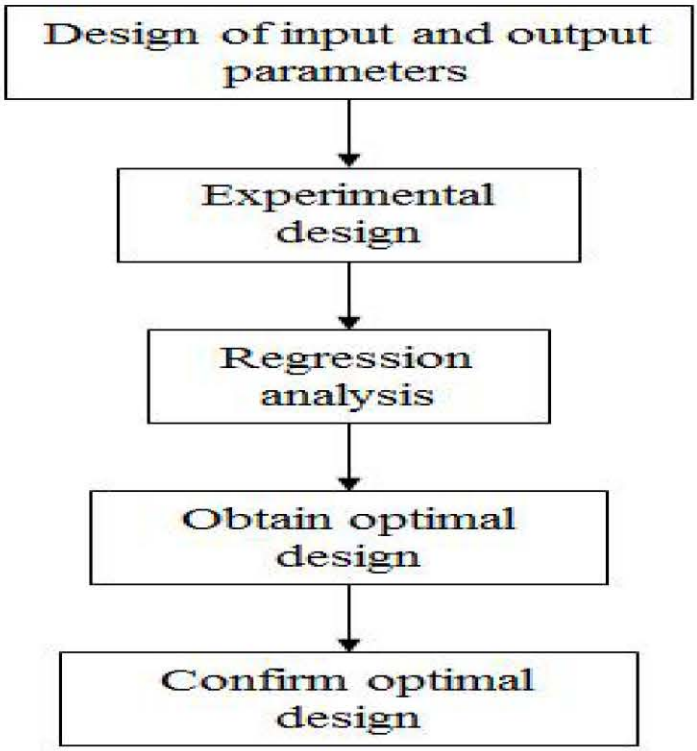


Figure 3. Procedure of response surface methodology.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 4절 연구의 목적

많은 식물성 소재들은 *in vitro* 상에서의 자유라디칼 소거와 *in vivo* 내에서 새로운 자유라디칼 종의 증식을 방해하는데 중요한 항산화 역할을 하는 페놀류 화합물, 안토시아닌 및 플라보노이드 화합물 등을 함유하고 있는데, 그 중에서도 베리류 및 어린 새싹류는 천연 산화 방지제로 잘 알려져 있다 [44]. 특히 블루베리와 아로니아는 다른 식물과 비교하였을 때, 상대적으로 높은 항산화력을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며, 안토시아닌과 페놀류 화합물 또한 상대적으로 높은 함량을 보이고 있는 것으로 알려져 있다 [34, 46]. 이와 같이 항산화력과 관련 있는 식물 소재로부터의 유용 성분 추출은 일반적으로 용매 추출이 보편화되어 있으며, 이에 본 연구에서는 우수한 생리활성 물질을 다량 함유한 3종의 식물 소재(밀싹, 아로니아 및 블루베리)로부터 이들의 유용 성분의 함량을 분석하고 폴리페놀류 화합물을 통한 항산화능 평가를 실시하고자 하였다. 또한, 본 연구에 사용된 식물 소재의 활용성 제고를 위하여 폴리페놀을 비롯한 유용 성분의 추출 최적화 방안 연구를 위하여 실험계획법인 반응표면분석(RSM)을 도입하고자 하였다. 반응표면분석은 식물 소재의 유용성분 추출 공정에서 추출 조건의 최적화를 수행하는데 있어 추출 용매의 종류, 시간 및 농도 등과 같은 독립변수가 최종 추출 수율에 미치는 영향과 독립변수들 간의 상호 관계를 파악하고자 하였다.

따라서, 본 연구는 항산화능이 높은 식물 소재로 알려진 밀싹, 블루베리 및 아로니아 등 3종의 식물로부터 폴리페놀을 추출, 분리 및 분석하고 이들의 항산화력을 측정하고자 하였으며, 식물성 폴리페놀 화합물의

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

다양한 산업적 활용을 위하여 실험계획법 반응표면분석을 통한 3종의 식물 소재가 함유하고 있는 폴리페놀류에 대한 최적 추출 조건을 확립하고자 하였다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 2장 재료 및 방법

제 1절 실험재료 및 시약

1. 실험 재료

밀싹(*Triticum aestivum* L. (keumkang))은 금강밀 품종을 사용하였고, 식물 배양기를 통해 자란 싹 부분을 건조하여 사용하였다 [40]. 블루베리(*Vaccinium* spp.)는 시중에서 판매하는 원물을 구입하였고 액화질소로 처리하여 분말 형태로 제조하여 냉동보관 하였다 [36]. 아로니아(*Aronia melanocarpa*)는 전남 옥과의 농장에서 여름철에 수확된 열매를 기부 받아 액화질소 처리하여 분말 형태로 제조하여 냉동보관 하였다 [36].

Figure 4. wheat sprout(left), blueberry(center), black chokeberry(right).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 실험 시약

추출에 사용한 시약은 대정화금(Korea)社의 ethanol, methanol, ethyl acetate을 사용하였고, Junsei(Japan)社의 petroleum ether를 사용하였다. open column chromatography와 추출물 흡착을 위해 Oci(Korea) 社의 silica gel(200~300 mesh)를 사용하였고, 각종 활성실험을 위해 Sigma-aldrich(USA)社의 Folin-ciocalteu phenol, sodium carbonate, gallic acid, quercetin, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), potassium persulfate를 사용하였고, Gibco(USA)社의 PBS buffer를 사용하였다. HPLC분석을 위해 Junsei(Japan)社의 formic acid, J.T.Baker(USA)社의 acetonitrile을 사용하였다. 항산화 활성실험과 총 폴리페놀 함량 측정을 위해 Sinco(Korea)社의 S-3100 UV-Vis spectrophotometer를 사용하였고, 분획물 및 추출물의 분석을 위해 HPLC 분석을 실시하였고, 사용된 분석 기기는 Simadzu(Japan)社의 LC-20A Series를 사용하였다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 2절 추출 및 분리

1. 밀싹의 추출 및 분리

밀싹은 수용성 추출물에서 항산화능이 높다고 한다. 그래서 본 실험에서는 소수성 물질에서 항산화능을 갖는 물질을 찾기 위해 Figure 5와 같이 실험을 진행하였다 [15]. 분말형태로 곱게 처리한 밀싹 200 g을 80% ethanol에 25℃ 조건에서 72 hr 동안 shaking incubator을 이용하여 170 rpm, 실온에서 추출하였다. 추출물을 aspirator를 사용하여 여과하여 여과액을 얻고 이를 evaporator rotary를 사용하여 감압 농축하였다. 농축물을 소수성 물질만을 분리하기 위해 ethyl acetate 와 증류수 1:1 비율로 농축물을 충분히 녹여 상분리를 진행하였고, ethyl acetate 층만 회수하여 evaporator rotary를 사용하여 감압 농축하였다. Ethyl acetate 농축물을 buthanol 과 증류수 1:1 용액으로 충분히 녹여내고 상분리를 진행하여 소수성 물질을 분리하였고, buthanol 층만 회수하여 다시 농축하였다. open column chromatography를 하기 위해 butanol 농축물에 silica gel(200~300 mesh)을 첨가하여 evaporator rotary를 사용하여 silica gel에 흡착하였고, 흡착된 silica gel을 open column chromatography를 진행하여 총 28개의 분획물을 얻었다. 이때 사용한 용출액은 hydrophobic한 hexane/ethyl acetate 용출액을 8:2 비율부터 시작하여 7:3, 5:5, 3:7, 0:1 비율 순서대로 용출하였고, hydrophilic 한 methanol/water 1:0, 1:1, 0:1 비율 순서대로 용출하여 28개의 분획물을 얻었다. TLC를 이용하여 *p*-anisaldehyde H_2SO_4, ethanol 혼합액을 발

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

색시약으로 이용하여 발색을 진행하였고, 드라이기를 사용하여 고온으로 가열하여 발색 결과를 확인하였다. 발색이 확인된 fr. 2, 7, 12, 14, 17, 23을 선택하여 HPLC 분석을 진행하였다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

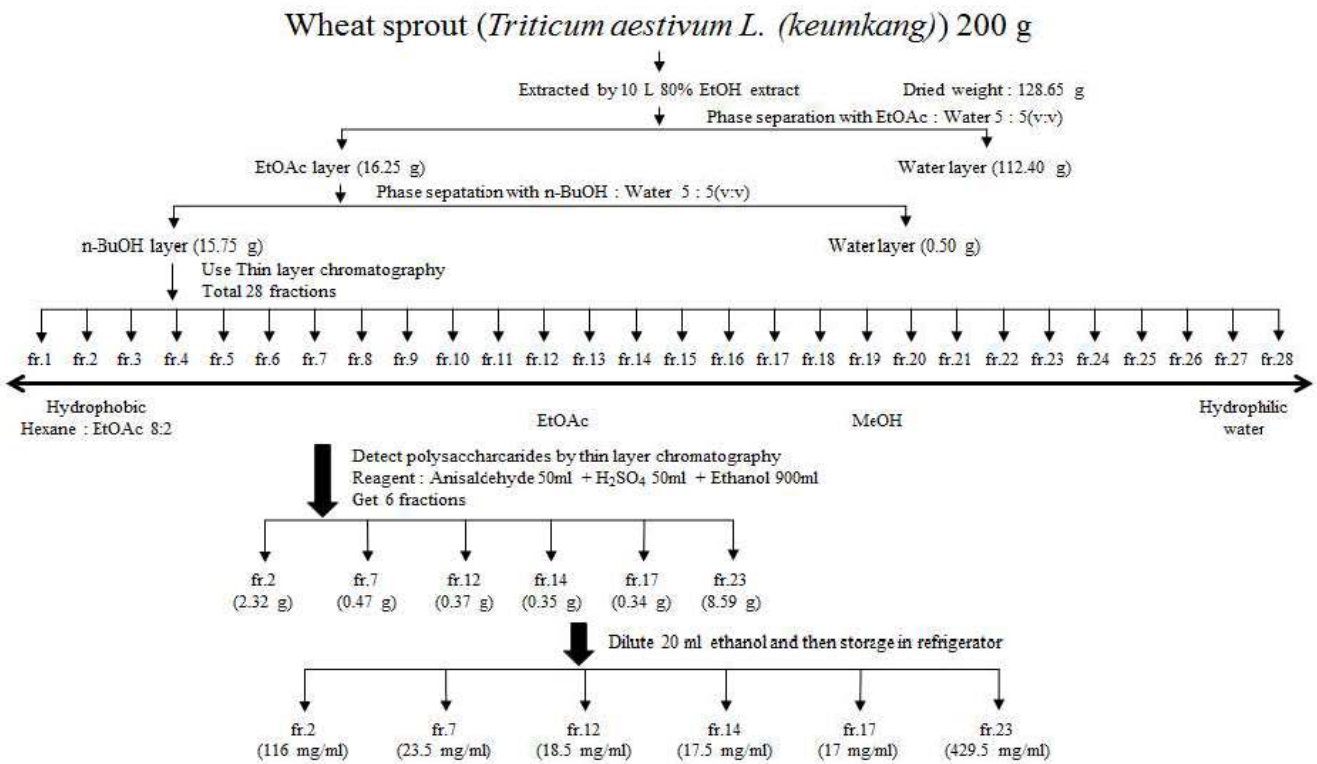


Figure 5. Isolation of wheat sprout.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 블루베리 및 아로니아 열매의 anthocyanin 추출

블루베리와 아로니아 열매의 대표적인 폴리페놀 성분은 플라보노이드 계열의 안토시아닌 화합물이다. 안토시아닌 화합물을 분리하기 위하여 Figure 6과 Figure 7과 같은 방법으로 실험을 진행하였다 [36]. 블루베리, 아로니아 열매를 각각 액화질소 처리 하여 분말 형태로 만든 후 0.1% HCl을 첨가한 80% ethanol을 시간차로 2 번 가하여 담금 추출을 한다. 80% methanol을 한 번 더 첨가하여 지속적으로 추출한다. 추출물을 syringe filter를 사용하여 여과한 후 감압농축을 하여 alcohol류인 ethanol과 methanol만 제거한다. 제거된 농축물을 petroleum ether를 가하여 상분리를 하여 폴리페놀과 관련 없는 비극성화합물을 제거한다. 분리된 물층에 ethyl acetate를 가하여 상분리를 한다. 분리된 물층을 감압 농축을 하여 물을 완전히 제거한 후 formic acid로 pH를 2로 맞춘 증류수를 가하여 완전히 녹인 후 syringe filter를 사용하여 여과를 하고, 분석 실험 및 각종 항산화 실험을 위해 암실에서 냉장보관을 한다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Blueberry (*Vaccinium spp.*)

Treated liquid nitrogen Blueberry(*Vaccinium spp.*), Domestic 5 g
↓
50 ml 80% Ethanol containg 0.1% HCl × 2
↓
50 ml 80 % methanol × 1
↓
Filtration by Milipore 45 μm → Residue : 600 mg, Extract : 4400 mg
↓
Vacuum concentration at 35 ℃
↓
Add 25 ml petroleum ether
↓
[25 ml ethyl acetate] × 3
↓
Evaporation by Rotavapor → Residue : 1040 mg, Extract : 3360 mg
↓
Diluted 33.6 ml D.W adjusted at pH 2 by addition of HCOOH
↓
Filtration → Concentration : 100 mg/ml

Figure 6. Isolation of anthocyanins from blueberry.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

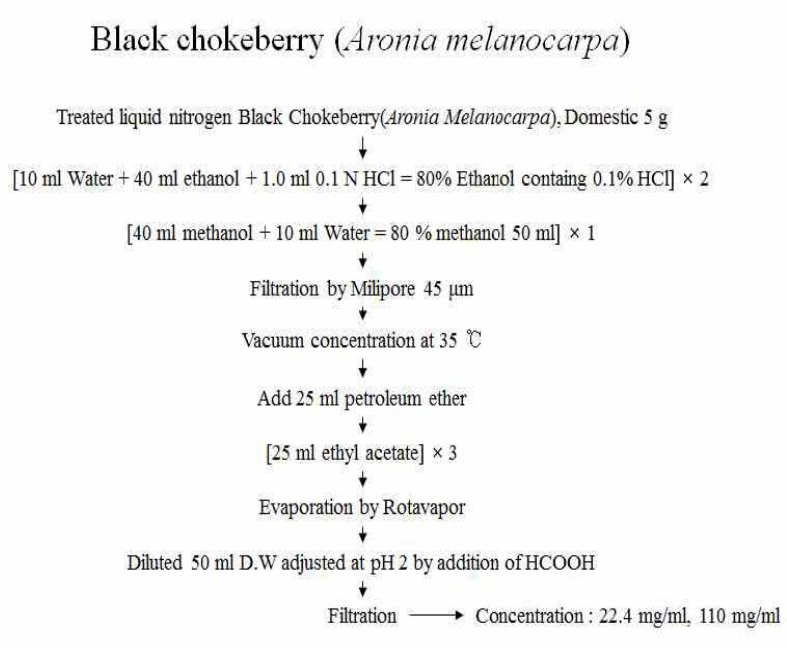


Figure 7. Isolation of anthocyanins from black chokeberry.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 3절 각 원물의 성분 분석

1. 밀싹 분획물의 HPLC 분석

밀싹 분획물은 hydrophobic한 용매인 hexane과 ethyl acetate의 조합과 hydrophilic한 용매인 methanol과 water의 조합으로 용출 되었기 때문에 6개의 분획물(fr.2, fr. 7, fr. 12, fr. 14, fr. 17, fr. 23)의 상태에 따라 Table 1과 같이 HPLC 분석을 하였다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 1. HPLC analysis conditions of wheat sprout

Analysis condition	Explanation
Mobile phase	0.1%EtOH/Hxn
	25% ACN/Hxn
	20% ACN/water
	30% ACN/Hxn
Flow rate	1 ml/min
Column oven temperature	40℃
Column	silica column (300mm X 4mm I.D.)
	CapcellpakC18 column (250mm X 4.6mmI.D.)
UV detector wavelength monitoring	230, 254 nm
Total run time	60 min, 90 min, 30 min
Injection volume	5μl

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 블루베리 및 아로니아 열매 anthocyanin 추출물의 HPLC 분석

블루베리와 아로니아 열매 anthocyanin 추출물은 HPLC를 통해 분석을 하였고, Table 2와 같은 조건으로 분석을 하였다 [36].

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 2. HPLC analysis conditions of blueberry and black chokeberry

Analysis condition	Explanation
Mobile phase	(A) 10 % Formic acid in water(v/v) (B) Formic acid, water, acetonitrile(10:60:30, v/v/v)
Flow rate	1 ml/min
Column oven temperature	40℃
Column	PRONTOSIL 120-5-C18 SH (250 ×4.6 mm, 5.0 μm particle size)
UV detector wavelength monitoring	546 nm
Gradient program	0-10 min 40%, 10-25 min 50%, 25-26 min 100%, 26-30 min 0%
Total run time	40 min
Injection volume	20 μl

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 4절 Response surface methodology(RSM) 및 통계처리

1. 실험 계획

표면반응분석법을 이용하여 최적 추출 조건을 도출하였다. 중심합성계획을 통해 독립변수를 3개로 하였으며, Ethanol의 농도(0~100%, X_1), 추출 시간(3~15 hr, X_2), 추출 온도(10~50℃, X_3)로 정하였다. Table 3와 같이 3 단계로 부호화 하였고 이때 나온 ±α=±2다. 실험 횟수는 20개였고, 종속변수를 각 원물들의 총 폴리페놀함량, DPPH, ABTS radical scavenging activity로 하였다. 실험을 통해 얻어진 결과를 회귀분석에 사용하여 식을 도출하였고 기본적인 회귀식은 다음과 같다 [33].

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X^2$$

RSM 분석을 위해 Design-Expert(8.0.7.1 ver. Wiley) 프로그램을 이용하여 중심합성계획법에 의한 실험설계 및 회귀분석, 3D-mesh 그래프를 표현하였고, 최적조건을 계산하기 위해 각 독립변수들에 대한 편미분을 사용하여 연립방정식 형태로 계산하였고, Matlab(2014a version)을 사용하여 최적조건을 계산하였다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 3. Central composite design by RSM computer program

Experimentral number	X_1	X_2	X_3
1	25(-1)	6(-1)	20(-1)
2	75(1)	6(-1)	20(-1)
3	25(-1)	12(1)	20(-1)
4	75(1)	12(1)	20(-1)
5	25(-1)	6(-1)	40(1)
6	75(1)	6(-1)	40(1)
7	25(-1)	12(1)	40(1)
8	75(1)	12(1)	40(1)
9	0(-2)	9(0)	30(0)
10	100(2)	9(0)	30(0)
11	50(0)	3(-2)	30(0)
12	50(0)	15(2)	30(0)
13	50(0)	9(0)	10(-2)
14	50(0)	9(0)	50(2)
15	50(0)	9(0)	30(0)
16	50(0)	9(0)	30(0)
17	50(0)	9(0)	30(0)
18	50(0)	9(0)	30(0)
19	50(0)	9(0)	30(0)
20	50(0)	9(0)	30(0)

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 5절. RSM 중심합성법에 의한 각종 활성 실험

1. 총폴리페놀 함량측정

총 폴리페놀 함량을 측정하기 위해 0.2 M Folin-ciocalteu phenol 시약(Sigma-aldrich, USA)과 각 RSM에 의해 실험한 원물별 추출물과 2% Na_2CO_3 수용액(2:98, w/v)을 각각 1:1:1 비율로 섞어서 암실에서 50분 동안 반응을 시켰다. UV-Vis spectrophotometer를 이용하여 750 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 기준 물질로 gallic acid, quercetin을 사용하였고, 함량 계산은 기준 물질의 standard curve에 따라 계산하였다 [9].

2. 항산화 활성측정

가. DPPH radical scavenging activity

DPPH radical 시약 0.08 g에 methanol 200 ml을 가하여 DPPH radical 용액을 제조하였고, 제조된 DPPH radical 용액과 측정하기 위한 sample을 1:1(v/v)비율로 암실에서 25분간 반응시키고, 원심분리한 후 상등액만 취하여 UV-spectrometer로 517 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. radical 소거능에 대한 식은 다음과 같다 [18].

$$Antioxidant\,activity\,(\%) = \frac{Absorbance\,of\,control - Absorbance\,of\,sample}{Absorbance\,of\,control} \times 100$$

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. ABTS radical scavenging activity

ABTS (2,2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) scavenging activity는 증류수에 용해한 ABTS 7.0 mM에 증류수에 용해한 potassium persulfate 2.45 mM을 1:1로 넣고 12~16시간 동안 암소에 방치하고 radical stock solution은 730 nm에서 흡광도 값이 0.70(±0.02)이 되도록 흡광계수를 조절하여 PBS 완충용액(pH 7.4)으로 희석하였다. 희석된 용액 3 mL에 농도별로 제조된 sample 20 μl씩 가하여 15분 동안 암실에서 방치 후 흡광도를 측정하였다. 소거능에 관한 계산식은 다음과 같다 [18].

$$Antioxidant\,activity\,(\%) = \frac{Absorbance\,of\,control - Absorbance\,of\,sample}{Absorbance\,of\,control} \times 100$$

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 3장 결과 및 고찰

제 1절 각 원물로부터 분리된 폴리페놀 화합물의 분석

1. 밀싹 분획물 HPLC 분석 결과

밀싹 분획물을 선정하는데에는 TLC와 발색시약인 *p*-anisaldehyde H_2SO_4, ethanol 혼합액을 사용하여 발색이 된 분획물을 선택하는 방법으로 진행하였다. *p*-anisaldehyde H_2SO_4, ethanol 혼합액은 당성분과 벤젠고리를 선택적으로 발색을 한다. 폴리페놀 특성상 flavonoid류에 당성분이 결합되어있는 배당체 화합물을 발색하여 28개의 밀싹 분획물들중 폴리페놀을 선택하기 위함이다.

이렇게 선택된 밀싹 각 분획물들을 분석하기 위해 이동상의 농도를 달리하며 분석을 진행하였다. fr, 2와 fr. 7은 0.2, 0.15, 0.1%의 ethanol/hexane 용매로 분석을 시작하여 peak 분리가 잘 되는 농도를 찾는데 주력하였다. 분석 결과 Figure 8, Figure 9, Figure 10, Figure 11과 같이 0.1% ethanol/hexane 용매에서 분리가 잘 되고, 230 nm 파장에서 3개의 주요 peak가 나타남을 확인할 수 있었다.

밀싹 fr. 12는 hydrophilic한 물질이 있는 것으로 판단하였고 55% methanol/water와 25% acetonitrile/water로 HPLC 분석을 시작하였다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

분석 결과 Figure 12.와 Figure 13.과 같은 결과를 얻을 수 있었고, 230 nm 파장에서 25% acetonitrile/water를 사용하였을 때 주요 peak 4개 외에 여러 개의 peak가 나타남을 확인할 수 있었다.

밀싹 fr. 14는 45% methanol/water와 20% acetonitrile/water로 분석을 시작하였다. 분석 결과 Figure 14와 Figure 15와 같은 결과를 얻을 수 있었고, 230 nm 파장에서 20% acetonitrile/water로 분석하였을 때 peak 분리가 잘 되었고, 3개의 주요 peak가 검출됨을 확인할 수 있었다.

밀싹 fr. 17은 55% methanol/water, 30% acetonitrile/water, 25% acetonitrile/water를 이동상으로 이용하여 HPLC 분석을 시작하였다. 분석 결과 Figure 16과 Figure 17과 같은 결과를 얻을 수 있었고, 230 nm 파장에서 30% acetonitrile/water를 이동상으로 하였을 때 peak 분리가 잘 되었고, 6개의 주요 peak가 검출됨을 확인할 수 있었다.

fr. 23은 이동상을 50% methanol/water, 20% acetonitrile/water를 시용하여 230 nm, 254 nm파장에서 HPLC 분석을 하였다. 분석 결과 Figure 18.과 Figure 19.와 같은 결과를 얻을 수 있었고, peak 분리가 잘 되지 않음을 확인 할 수 있었다.

밀싹 분획물 6종을 통틀어 보았을 때, 밀싹이 가지고 있는 성분들 중 대부분은 70 % 정도가 chlorophyll 종류인 것으로 보고되어있다. 그러므로 밀싹 분획물 6종의 sample 또한 폴리페놀류가 아닌 chlorophyll 종류 인 것으로 추측된다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

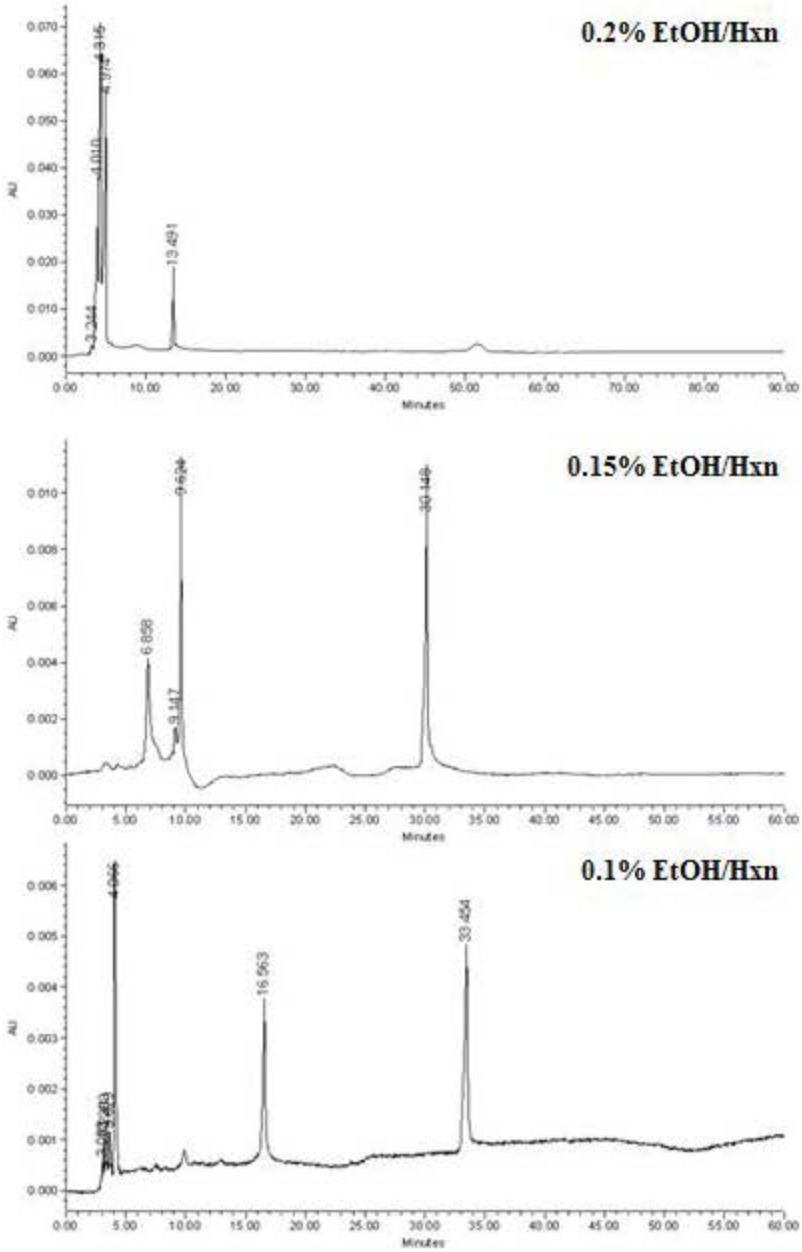


Figure 8. HPLC result of wheat sprout fr. 2(230 nm).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

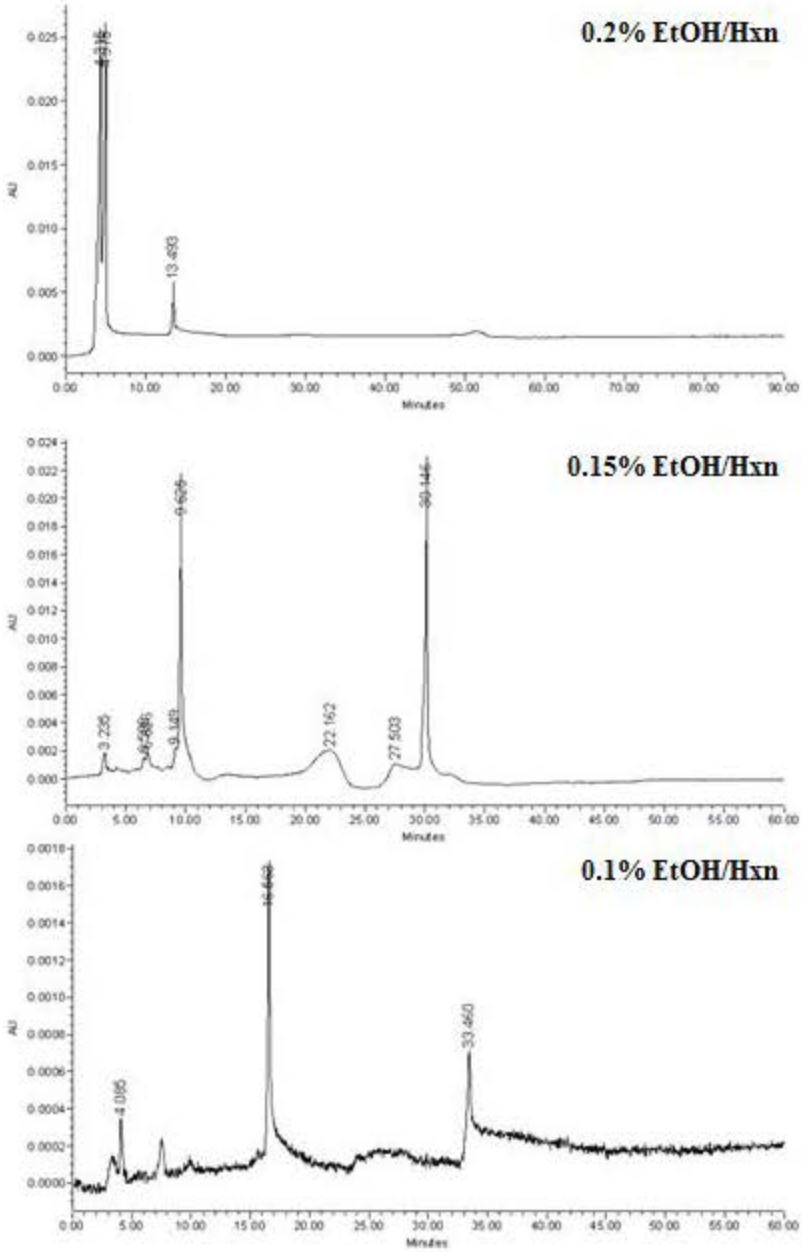


Figure 9. HPLC result of wheat sprout fr. 2(254 nm).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

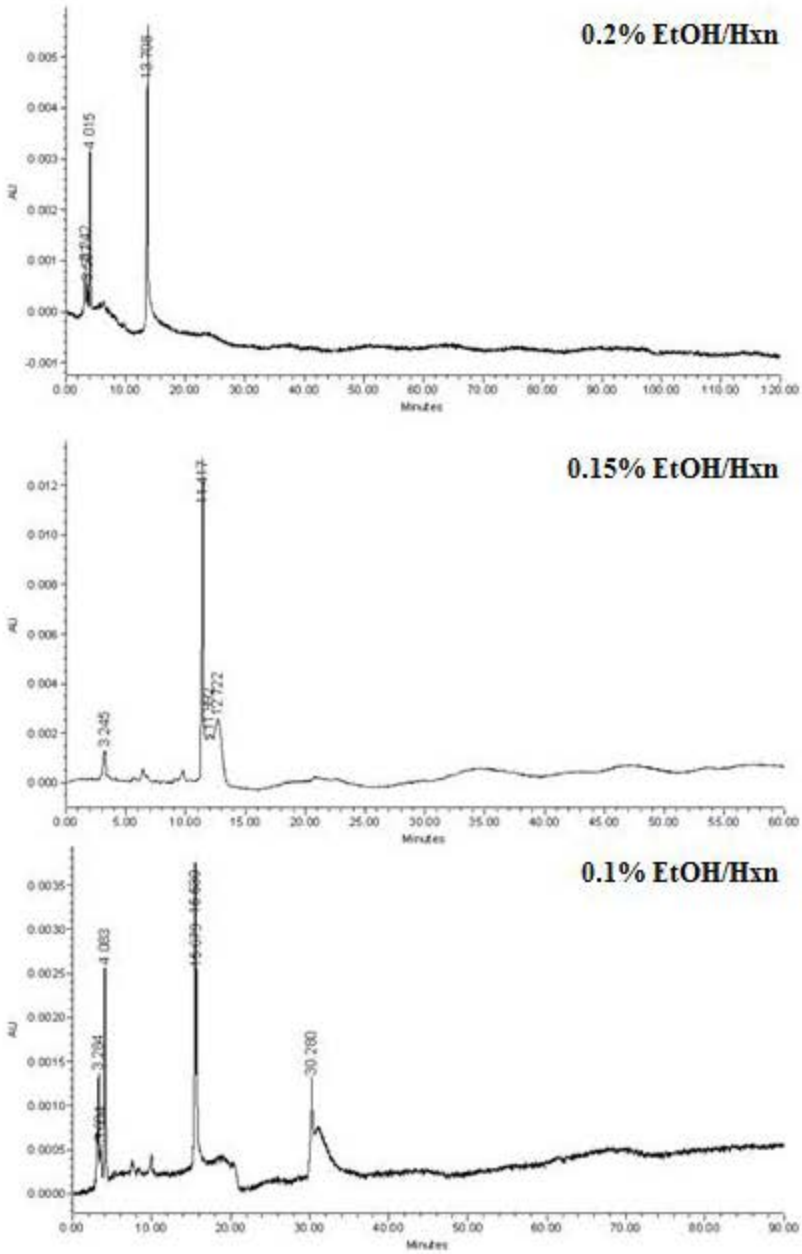


Figure 10. HPLC result of wheat sprout fr. 7(230 nm).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

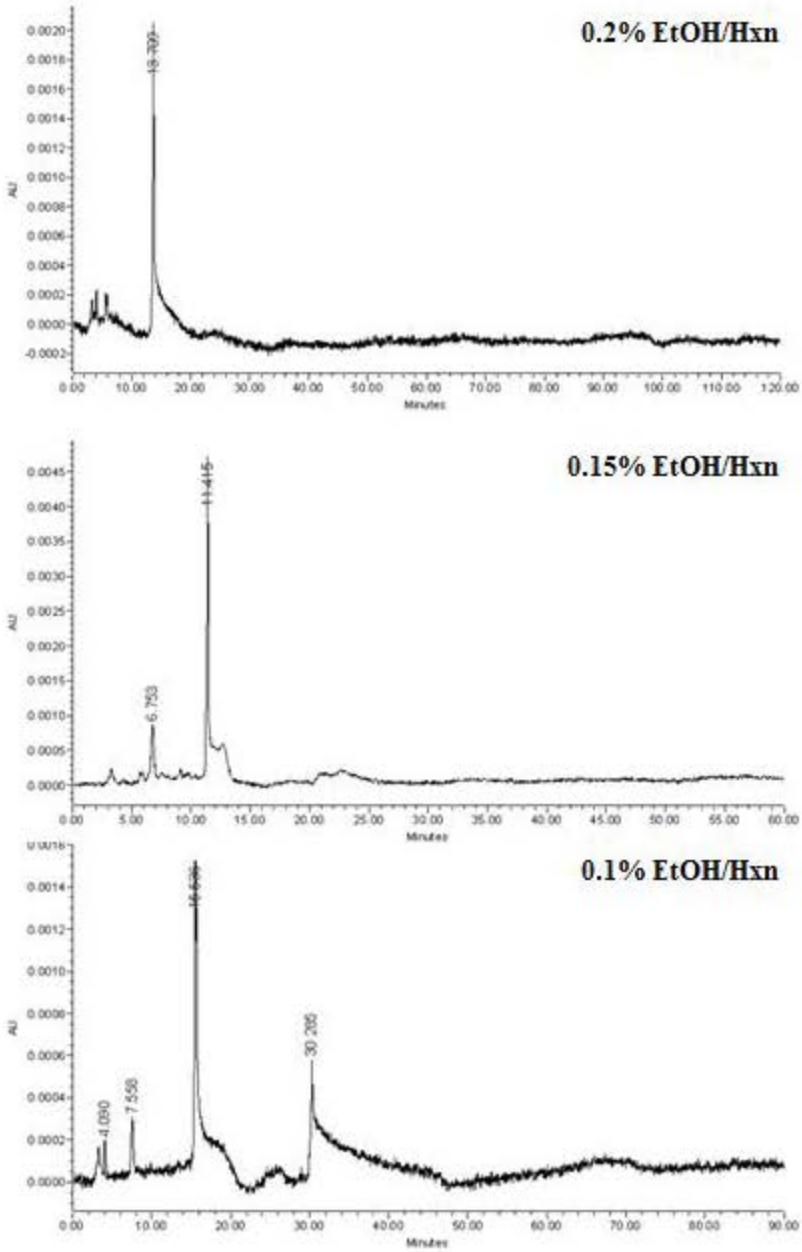


Figure 11. HPLC result of wheat sprout fr. 7(254 nm).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

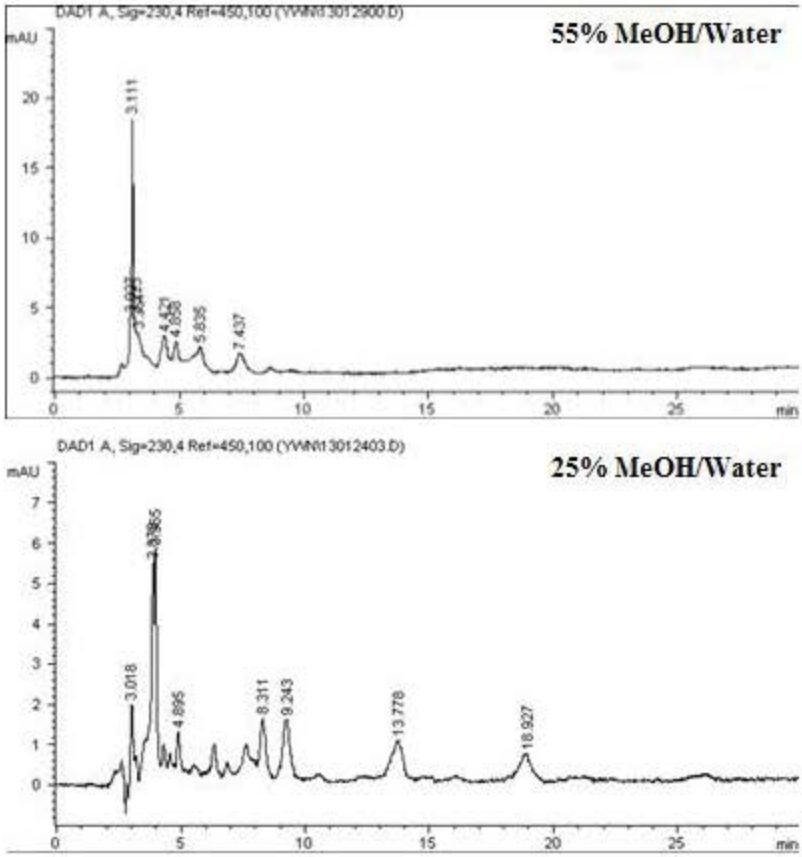


Figure 12. HPLC result of wheat sprout fr. 12(230 nm).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

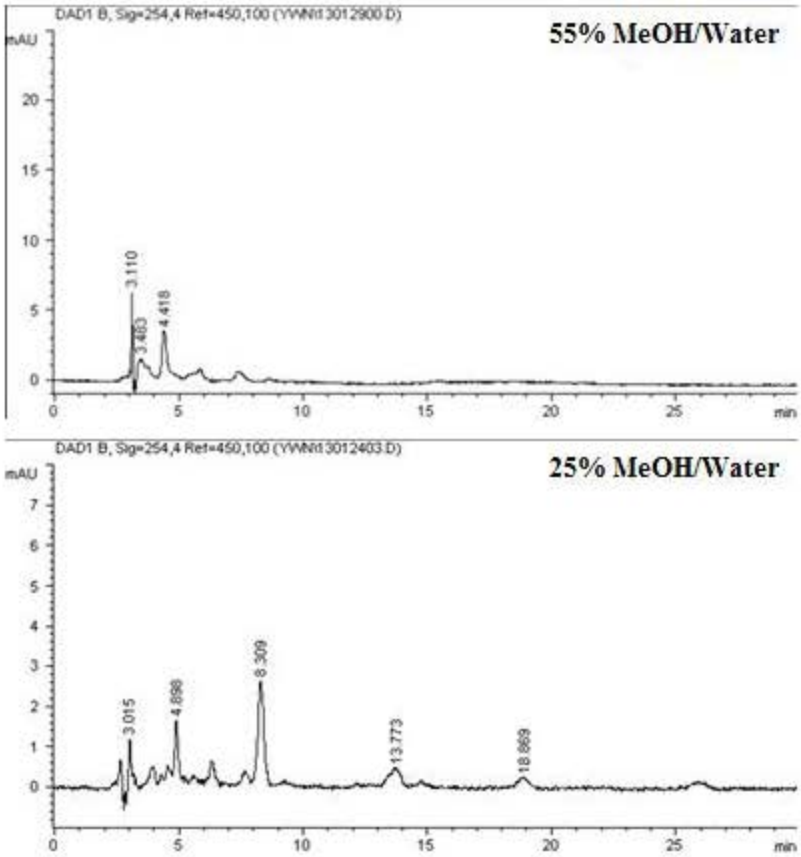


Figure 13. HPLC result of wheat sprout fr. 12(254 nm).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

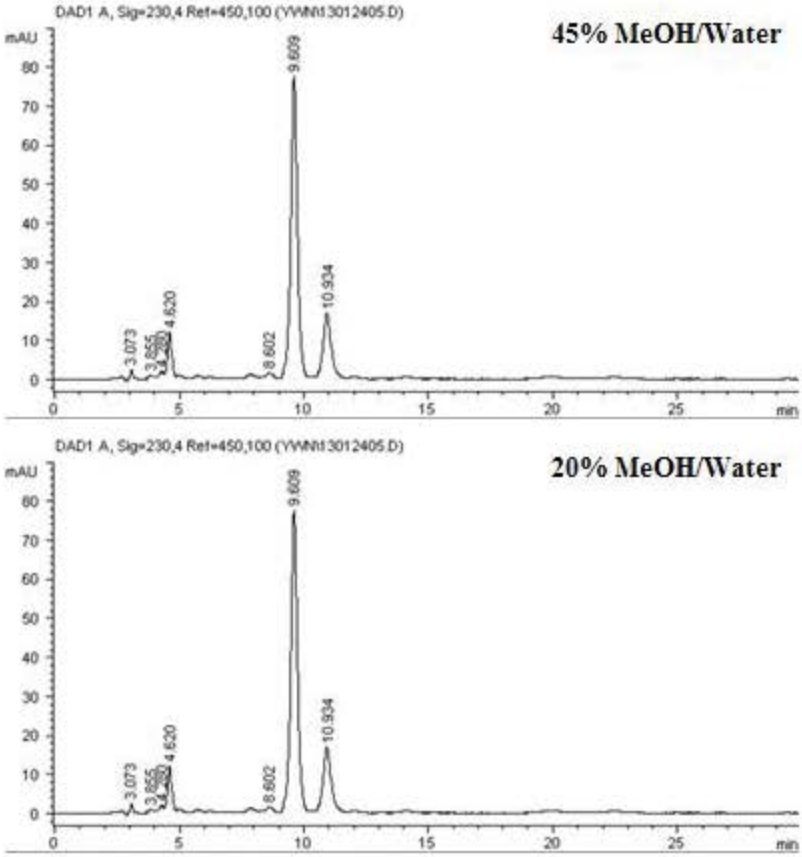


Figure 14. HPLC result of wheat sprout fr. 14(230 nm).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

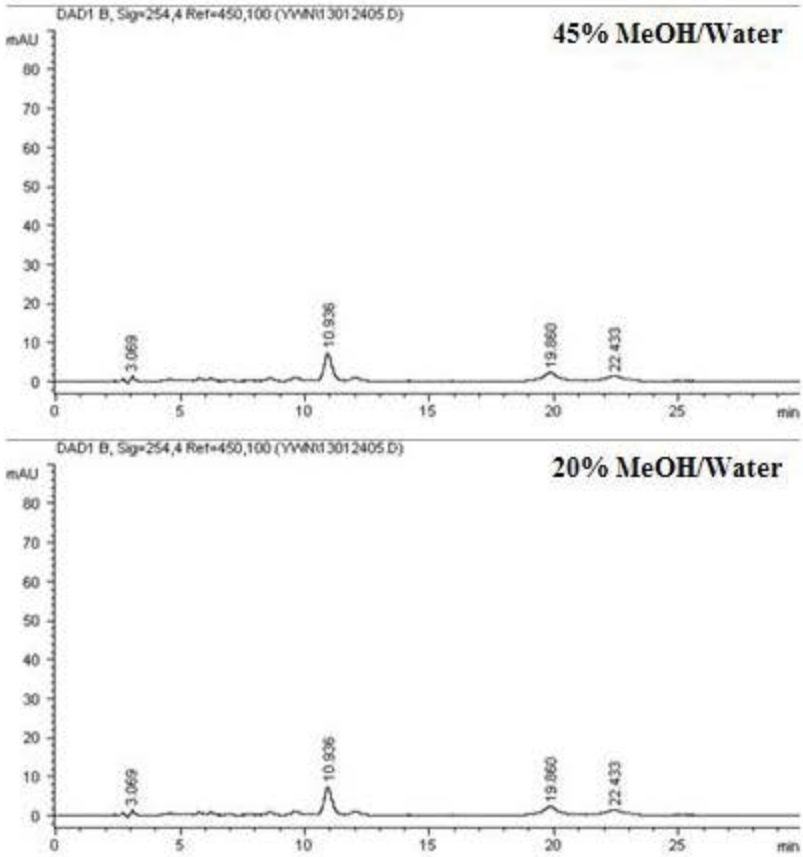


Figure 15. HPLC result of wheat sprout fr. 14(254 nm).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

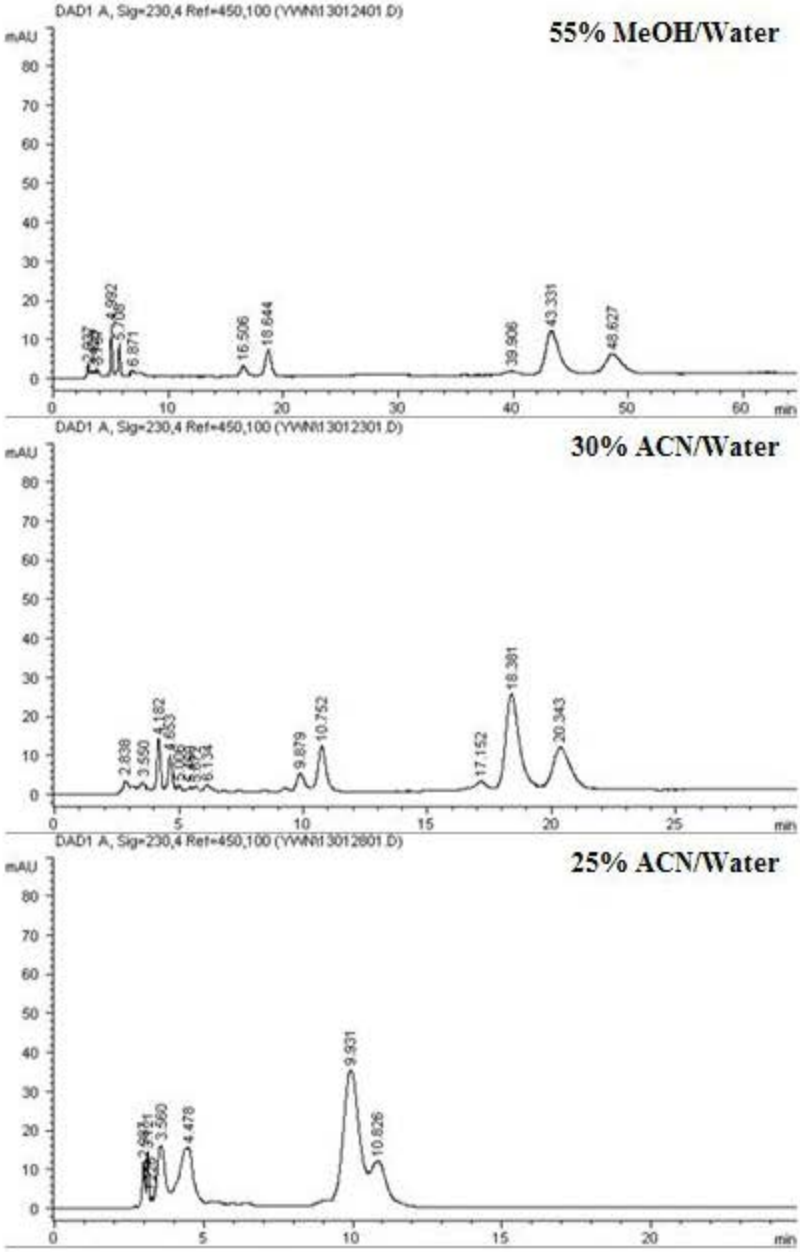


Figure 16. HPLC result of wheat sprout fr. 17(230 nm)

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

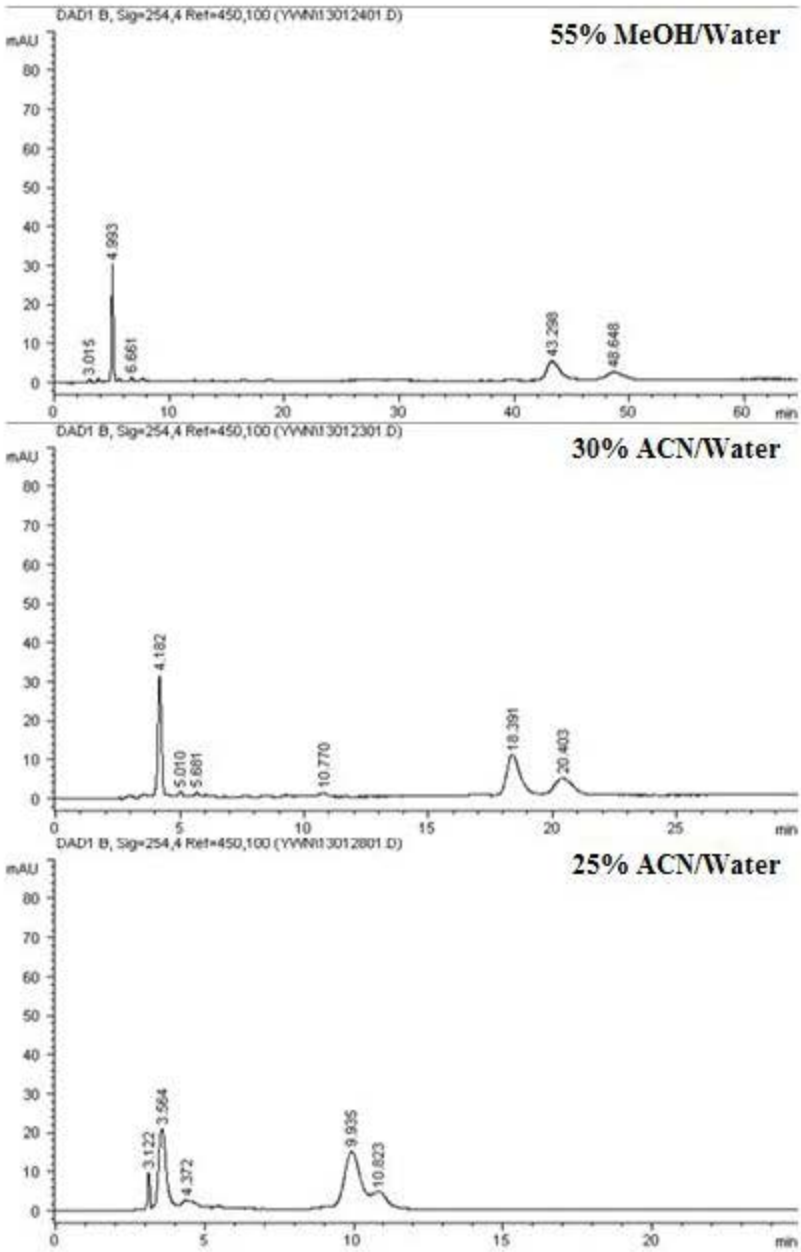


Figure 17. HPLC result of wheat sprout fr. 17(254 nm).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

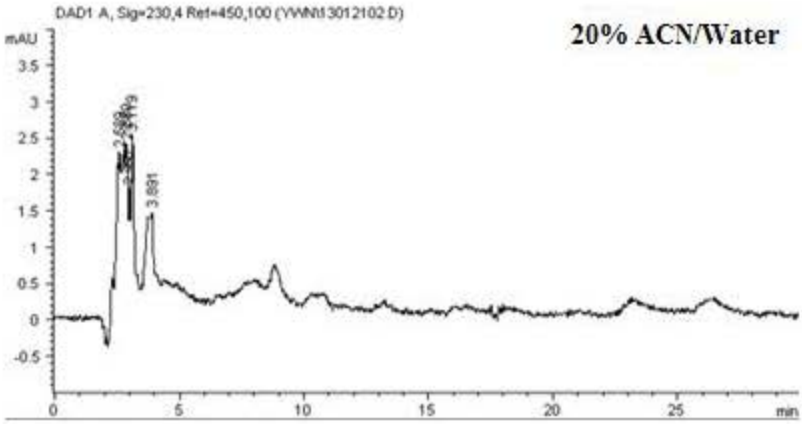


Figure 18. HPLC result of wheat sprout fr. 23(230 nm).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

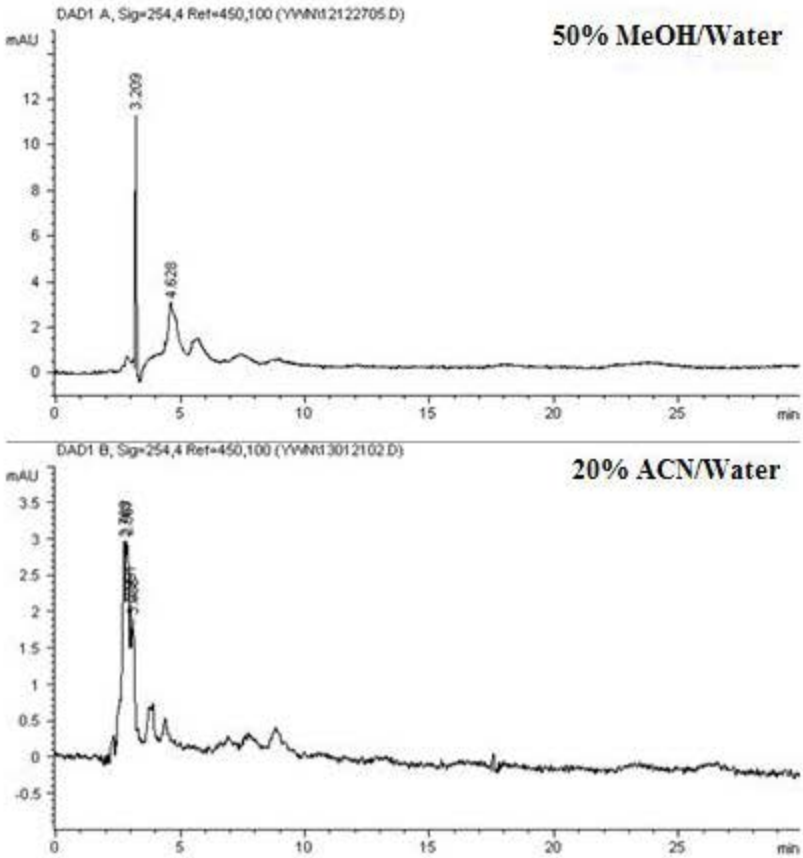


Figure 19. HPLC result of wheat sprout fr. 23(254 nm).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 블루베리 및 아로니아 열매 HPLC 분석 결과

가. Anthocyanin 표준 물질 HPLC 분석 결과

블루베리 및 아로니아 열매 anthocyanin 추출물을 HPLC 분석을 하기 전에 anthocyanin 표준물질 8종을 먼저 분석하여 Figure 20.과 같은 chromatogram을 얻었고, 이를 농도별로 각각 분석하여 농도와 면적 대비 검량식을 만들었다. cyanidin-3,5-di-o-glucoside, cyanidin-3-o-galactoside, cyanidin-3-o-glucoside, cyanidin-3-o-rutinoside, delphinidin, cyanidin, pelargonidin, malvidin을 분석하였으며 각각의 검량식은 각각 y=45839916x-3530684, y=47181376x-5776397, y=42425078x-3845567, y=45839916x-3530684, y=97621784x-2787021, y=110721223x-15591528, y=36397029x-5508022, y=94087548x-24907804와 같이 계산되었고, 신뢰도(R^2)는 각각 0.9842, 0.9936, 0.9885, 0.9983, 0.9995, 0.9836, 0.9930, 0.9530 이다.

나. 블루베리 열매 HPLC 분석 결과

블루베리 HPLC 분석 결과 Figure 21.과 같이 분석이 되었고, yanidin-3,5-di-o-glucoside, cyanidin-3-o-galactoside, cyanidin-3-o-glucoside, cyanidin-3-o-rutinoside, delphinidin, cyanidin, pelargonidin, malvidin 8종이 검출됨을 확인할 수 있었다. HPLC에 주입한 부피를 기준으로 한 정량분석 결과 8종의 anthocyanin 화합물 각각 0.135, 0.133, 0.092, 0.079, 0.029, 0.141, 0.152, 0.269 mg이 함유되어있음을 확인할 수 있었다. 즉 블루베리 5 g 속에는 33.75, 33.25, 23, 19.75, 7.25, 35.25, 38, 67.25 mg이 함유되어있음을 확인할 수 있었다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

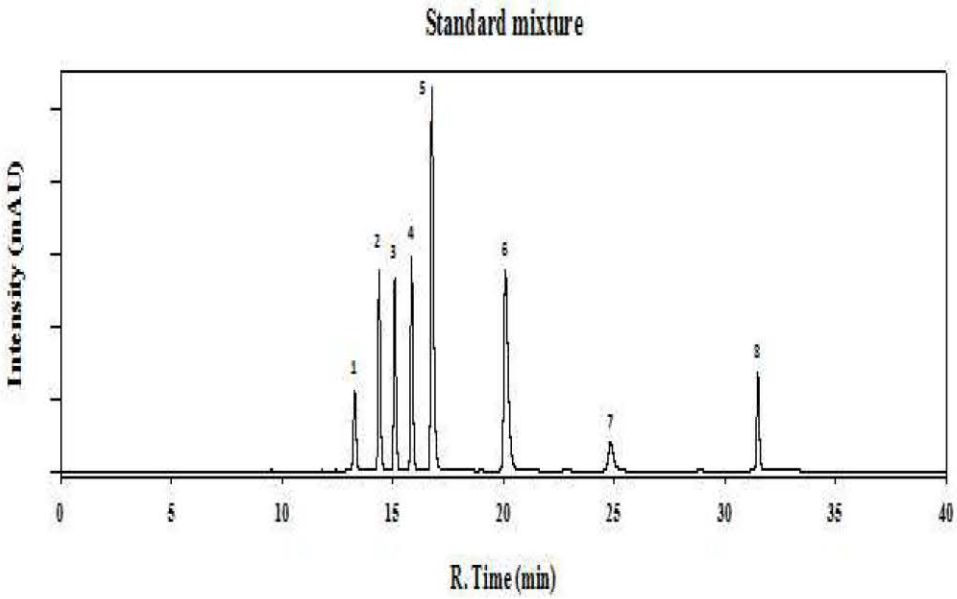


Figure 20. HPLC result of anthocyanin standard mixture.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

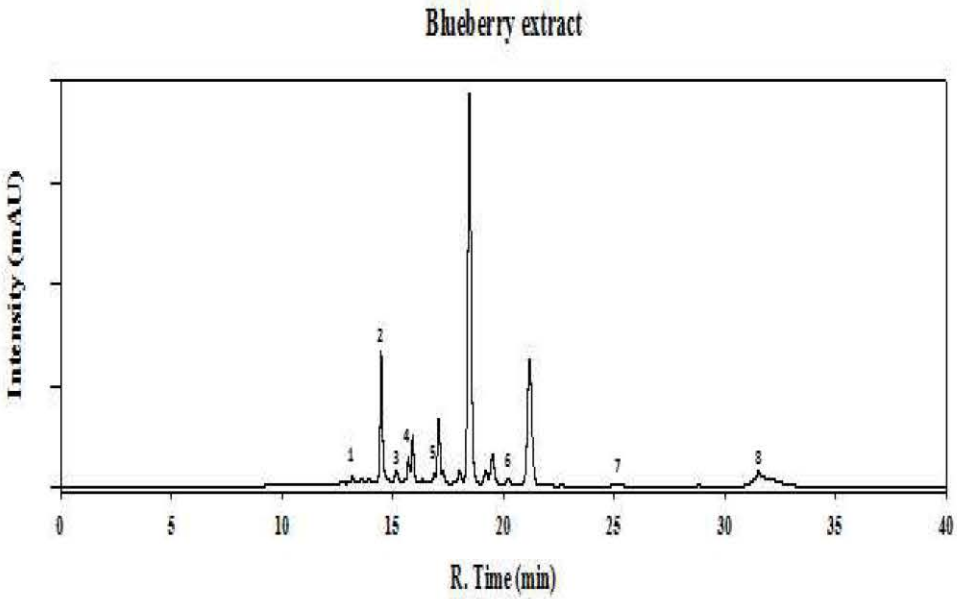


Figure 21. HPLC chromatogram of blueberry anthocyanin extract.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

다. 아로니아 열매 HPLC 분석 결과

아로니아 열매로부터 분리한 anthocyanin 추출물을 HPLC를 사용하여 분석을 실시하였다. Figure 22와 같은 chromatogram을 얻을 수 있었고, peak 위치별 검출된 화합물 과 함량은 Table 4에 언급하였다. 주요 peak는 10.399 min에서 검출 되었고 이는 cyanidin-3-galactoside임을 확인 할 수 있었다. 아로니아 열매 기준에서 약 0.003%정도의 수율을 확인 할 수 있었다. 아로니아 열매 자체 수분을 제외하고 수율을 계산한 결과 약 0.013%정도의 수율을 확인할 수 있었다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

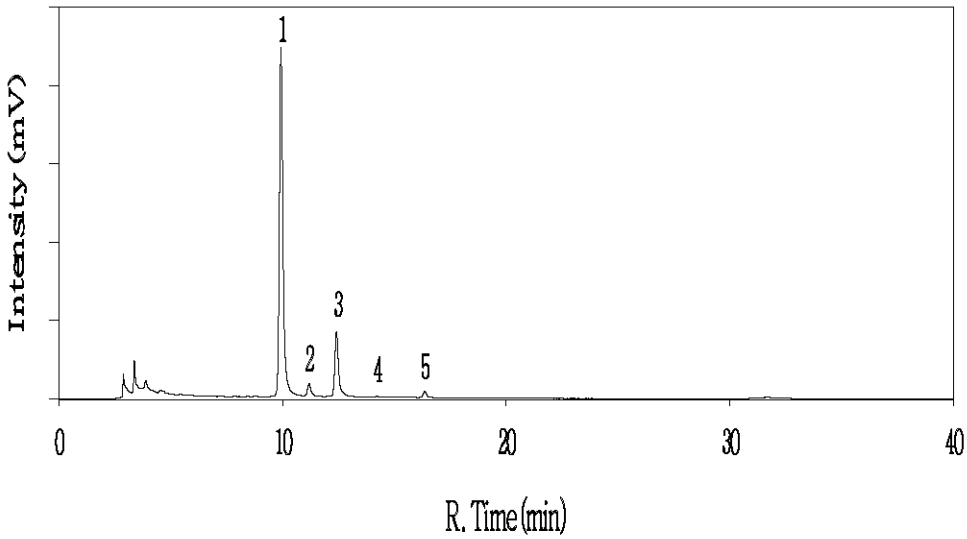


Figure 22. HPLC chromatogram of black chokeberry anthocyanin extract.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 4. Contents of anthocyanins in *A. melanocapa*

Peak No.	Compound name	R. Time (min)	Area	Content (mg/g)
1	Cyanidin-3-O-galactoside	10.399	157227	0.126
2	Cyanidin-3-O-glucoside	11.647	5652	0.091
3	Cyanidin-3-arabinoside	12.876	27616	-
4	-	16.077	957	-
5	Cyanidin-3-xyloside	16.826	2751	-

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 2절 RSM을 이용한 각 원물의 추출 조건 최적화

RSM을 이용한 각 원물의 최적 추출 조건 최적화를 위해 중심합성법을 이용하여 실험 조건을 세웠고, 그 조건에 따라서 실험을 통해 얻은 결과들로부터 회귀분석을 실시하여 2차식형태의 회귀식을 얻었다. 이를 통해서 통계학적인 최적 조건을 구하였고, 최적 조건을 회귀식에 대입하여 최대값을 예상하였다. ANOVA 분석을 통해 통계학적인 유의한 변수와 추출 조건들에 대한 영향을 살펴보았다.

1. 추출 수율

원물의 추출 수율은 주요한 반응 조건 중 하나이므로 본 실험에서는 최대의 추출 수율을 가질 수 있는 반응조건을 최적화하고자 하였다.

가. 밀싹

중심합성법을 이용하여 계획된 실험 조건에 따른 반응 값은 Table 5에 나타냈다. 실험 값중 14(X_1: 50% X_2: 9 hr X_3: 50℃)번에서 가장 낮은 추출 수율(9.80%)를 보였으며, 19(X_1: 50% X_2: 9 hr X_3: 30℃)번에서 최대 수율(32.10%)을 보였다.

$$Y = -58.849 + 0.592X_1 + 7.941X_2 + 2.497X_3 - 0.021X_1X_2 - 0.001X_1X_3 - 0.003X_2X_3 - 0.003X_1^2 - 0.405X_2^2 + 0.041X_3^2$$

실험 결과를 토대로 회귀분석한 회귀식을 이용하여 3차원 반응표변분석을 Figure 23과 같이 실시하였고, 통계적인 최적 조건을 구한 결과

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

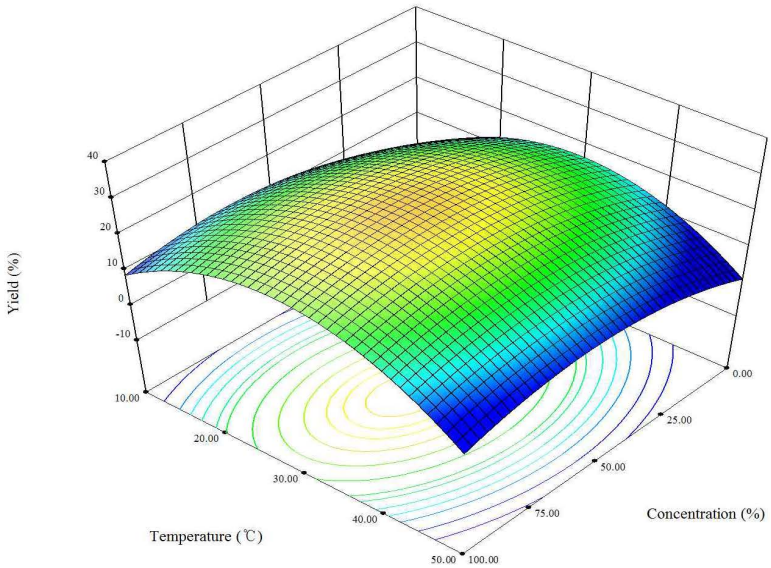
63.56%, 8.07 hr, 29.26℃에서 최대값이 28.53%로 예측되었다. 각각의 변수가 추출 수율에 미치는 영향을 분석한 결과 추출 용매의 농도(sum of square: 39.06)가 추출 시간(sum of square: 33.06), 추출 온도(sum of square: 3.42)보다 큰 것으로 나타났으며, 추출 용매의 농도에 대한 F-value는 3.66(p=0.02)으로 통계적으로 유의한 값을 표현한 $p<0.05$의 조건을 만족하므로 유의적인 영향을 미치고 있지만 추출 시간 및 추출 온도의 F-value는 각각 1.77(p=0.21), 1.50(p=0.25 이므로 유의성이 없는 것으로 나타났다.

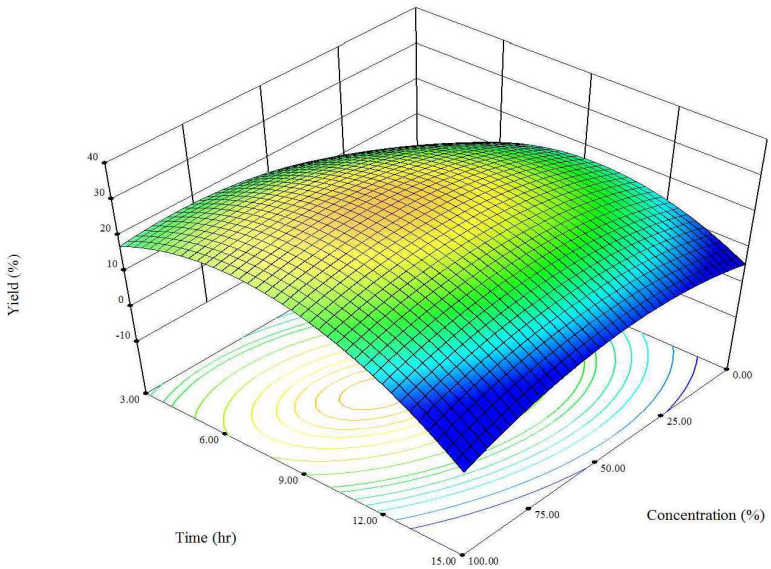
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 5. Yield of wheat sprout extracts for response surface methodology analysis. X_1: Concentration of ethanol; X_2: Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃)

	Conditions			
	X_1	X_2	X_3	Yield (%)
1	25(-1)	6(-1)	20(-1)	16.00
2	75(1)	6(-1)	20(-1)	21.00
3	25(-1)	12(1)	20(-1)	15.30
4	75(1)	12(1)	20(-1)	13.90
5	25(-1)	6(-1)	40(1)	18.00
6	75(1)	6(-1)	40(1)	21.50
7	25(-1)	12(1)	40(1)	16.70
8	75(1)	12(1)	40(1)	14.20
9	0(-2)	9(0)	30(0)	16.30
10	100(2)	9(0)	30(0)	26.50
11	50(0)	3(-2)	30(0)	16.10
12	50(0)	15(2)	30(0)	12.80
13	50(0)	9(0)	10(-2)	15.60
14	50(0)	9(0)	50(2)	9.80
15	50(0)	9(0)	30(0)	16.80
16	50(0)	9(0)	30(0)	29.20
17	50(0)	9(0)	30(0)	31.50
18	50(0)	9(0)	30(0)	30.00
19	50(0)	9(0)	30(0)	32.10
20	50(0)	9(0)	30(0)	29.90

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY





조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

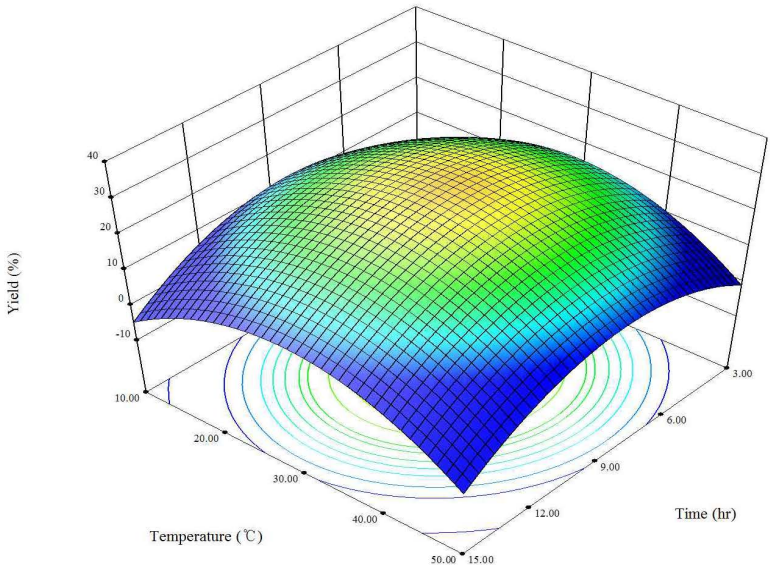


Figure 23. Response surface for the effects of yield on wheat sprout extract.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. 블루베리 열매

중심합성법을 이용하여 계획된 실험 조건에 따른 반응 값은 Table 6에 나타냈다. 실험 값중 10(X_1: 100% X_2: 9 hr X_3: 30℃)번에서 가장 낮은 추출 수율(80.45%)를 보였으며, 15(X_1: 50% X_2: 9 hr X_3: 30℃)번에서 최대 수율(98.45%)을 보였다. 실험결과는 회귀분석을 통하여 다음과 같은 2차 다항방정식 형태의 회귀식을 유도하였다.

$$Y = 43.786 + 0.796X_1 + 2.867X_2 + 1.161X_3 - 0.007X_1X_2 - 0.002X_1X_3 - 0.003X_2X_3 - 0.006X_1^2 - 0.119X_2^2 - 0.016X_3^2$$

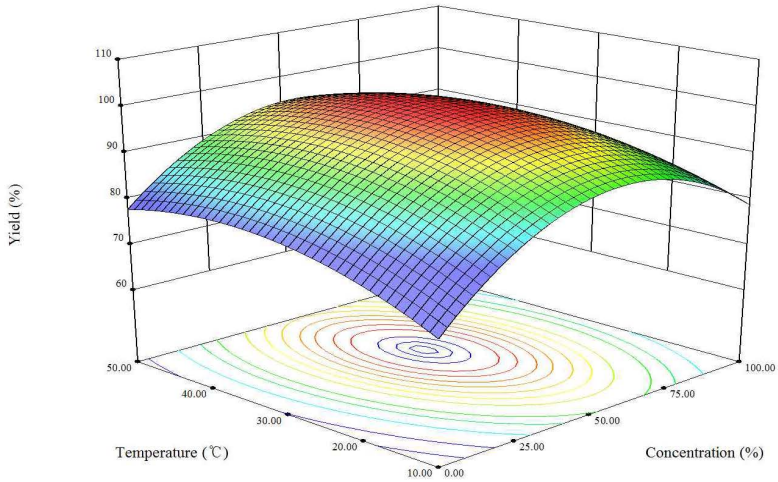
위의 식을 이용하여 3차원 반응 표면 분석을 실시하였고 Figure 24와 같은 결과를 얻을 수 있었다. 통계적 최적 조건을 구한 결과 53.49%, 10.18 hr, 33.53℃에서 99.13%의 최대 추출 수율이 되는 것으로 예상할 수 있었다. 본 실험에 대한 각 변수들의 영향을 확인한 결과 추출 용매 농도(sum of square: 33.25, F-value: 3.43, p=0.094), 추출 시간(sum of square: 14.25, F-value: 1.47, p=0.253), 추출 온도(sum of square: 22.56, F-value: 2.53, p=0.158)임을 알 수 있었고 각 변수들의 통계적인 유의성은 확인되지 않았으나, sum of square값과 F-value값이 추출 용매 농도가 제일 높았음을 감안하여 본 실험에 대한 영향을 끼치는 것을 확인할 수 있었다.

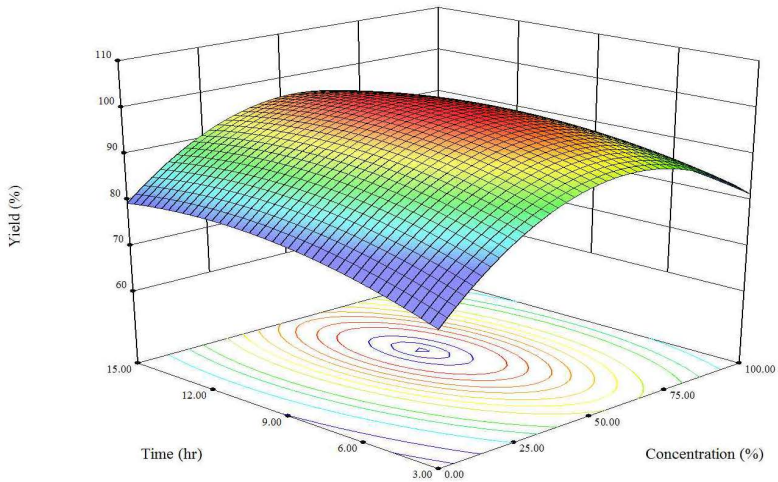
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 6. Yield of wheat blueberry extracts for response surface me thodology analysis X_1: Concentration of ethanol; X_2: Extraction time (hr); X_3: Extraction temperature(℃)

	Conditions			
	X_1	X_2	X_3	Yield (%)
1	25(-1)	6(-1)	20(-1)	86.12
2	75(1)	6(-1)	20(-1)	95.54
3	25(-1)	12(1)	20(-1)	90.35
4	75(1)	12(1)	20(-1)	97.15
5	25(-1)	6(-1)	40(1)	89.13
6	75(1)	6(-1)	40(1)	96.15
7	25(-1)	12(1)	40(1)	92.38
8	75(1)	12(1)	40(1)	98.10
9	0(-2)	9(0)	30(0)	83.40
10	100(2)	9(0)	30(0)	80.45
11	50(0)	3(-2)	30(0)	92.30
12	50(0)	15(2)	30(0)	94.33
13	50(0)	9(0)	10(-2)	88.30
14	50(0)	9(0)	50(2)	94.50
15	50(0)	9(0)	30(0)	98.45
16	50(0)	9(0)	30(0)	98.31
17	50(0)	9(0)	30(0)	98.18
18	50(0)	9(0)	30(0)	98.19
19	50(0)	9(0)	30(0)	98.43
20	50(0)	9(0)	30(0)	98.19

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY





조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

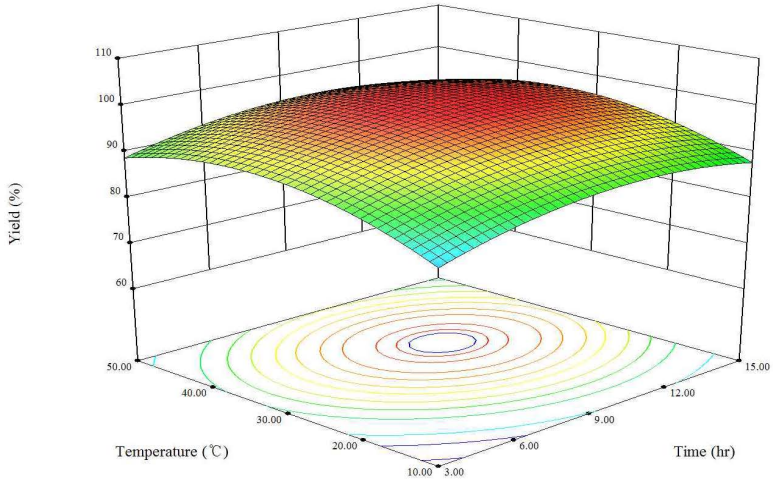


Figure 24. Response surface for the effects of yield on blueberry extract.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

다. 아로니아 열매

중심합성법을 이용하여 계획된 실험 조건에 따른 반응 값은 Table 7에 나타냈다. 실험 값중 10(X_1: 100% X_2: 9 hr X_3: 30℃)번에서 가장 낮은 추출 수율(44.80%)를 보였으며, 3(X_1: 25% X_2: 12 hr X_3: 20℃)번에서 최대 수율(75.83%)을 보였다. 실험결과는 회귀분석을 통하여 다음과 같은 2차 다항방정식 형태의 회귀식을 유도하였다.

$$Y = -38.898 + 0.323X_1 + 10.886X_2 + 3.551X_3 + 0.015X_1X_2 + 0.010X_1X_3 + 0.048X_2X_3 - 0.006X_1^2 - 0.688X_2^2 - 0.077X_3^2$$

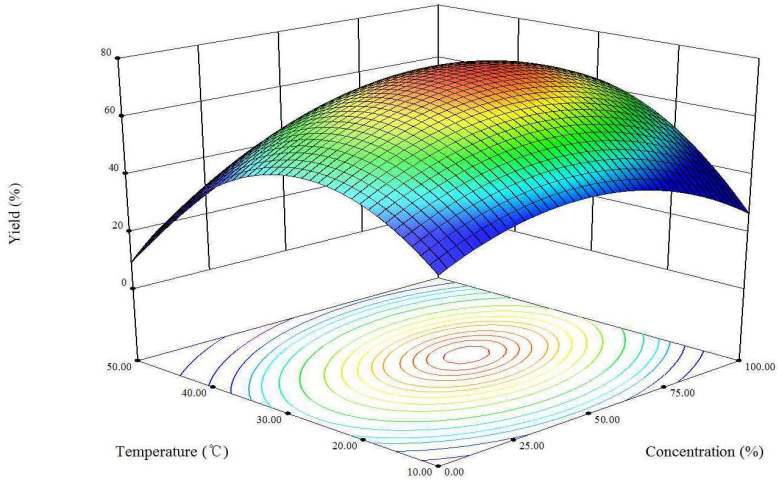
위 회귀식을 이용하여 3차원 반응 표면 분석을 실시하였고, Figure 25와 같은 결과를 얻을 수 있었다. 통계학적 최적 조건을 구한 결과 58.67%, 9.56 hr, 29.61℃에서 최대값이 75.19%로 예상되었다. 각각의 변수들의 본 실험에 대한 영향을 살펴본 결과 추출 용매 농도(sum of square: 111.83, F-value: 5.15, p=0.047), 추출 시간(sum of square: 63.60, F-value: 2.93, p=0.118), 추출 온도(sum of square: 46.58, F-value: 2.15, p=0.174)이고, 추출 용매 농도에서만 통계적 유의하였고, 본 실험에 대한 영향이 큰 것으로 알 수 있었다.

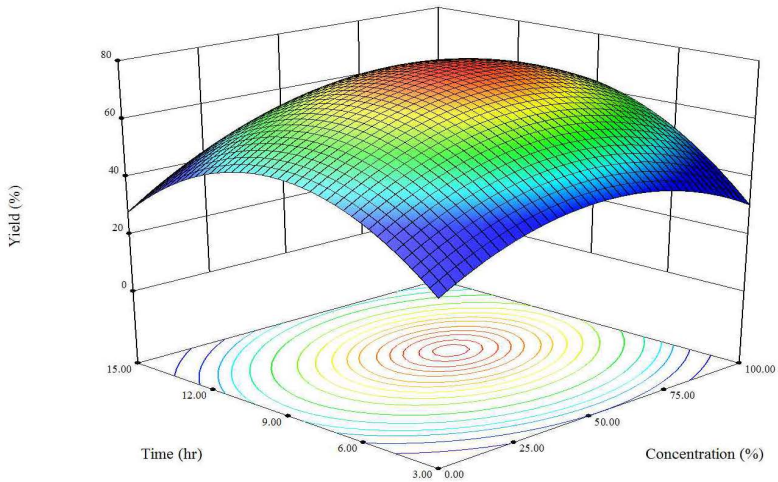
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 7. Yield of black chokeberry extracts for response surface methodology analysis X_1: Concentration of ethanol; X_2: Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃)

	Conditions			
	X_1	X_2	X_3	Yield (%)
1	25(-1)	6(-1)	20(-1)	48.90
2	75(1)	6(-1)	20(-1)	53.50
3	25(-1)	12(1)	20(-1)	75.83
4	75(1)	12(1)	20(-1)	70.00
5	25(-1)	6(-1)	40(1)	61.60
6	75(1)	6(-1)	40(1)	75.76
7	25(-1)	12(1)	40(1)	75.15
8	75(1)	12(1)	40(1)	48.70
9	0(-2)	9(0)	30(0)	47.70
10	100(2)	9(0)	30(0)	44.80
11	50(0)	3(-2)	30(0)	59.10
12	50(0)	15(2)	30(0)	54.10
13	50(0)	9(0)	10(-2)	75.13
14	50(0)	9(0)	50(2)	46.20
15	50(0)	9(0)	30(0)	55.40
16	50(0)	9(0)	30(0)	50.30
17	50(0)	9(0)	30(0)	55.30
18	50(0)	9(0)	30(0)	75.81
19	50(0)	9(0)	30(0)	55.40
20	50(0)	9(0)	30(0)	75.62

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY





조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

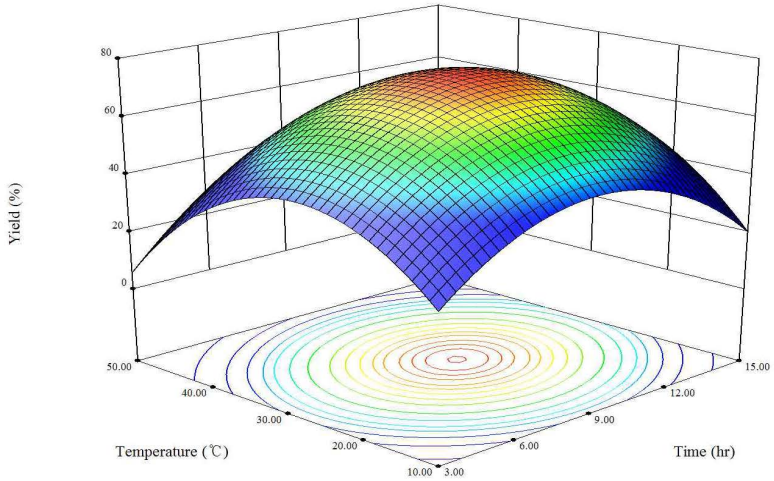


Figure 25. Response surface for the effects of yield on black chokeberry extract.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 총 폴리페놀 함량

Phenolic compounds는 식물의 대표적인 2차 대사산물로 hydroxyl기를 가지는 방향족 화합물이다. 이는 다양한 생리활성에 관여하며, 항산화 활성은 phenolic compounds의 종류나 함량이 미치는 영향이 큰 것으로 알려져 있다. 대부분의 phenolic compounds는 세포벽, 다당류, 리그닌 등과 에스테르 결합을 이루고 있거나 중합체로 존재하며, hydroxyl기를 통한 수소공여와 페놀 고리구조의 공명 안정화에 의하여 항산화능을 나타낸다.

가. Gallic acid

총 폴리페놀 함량을 측정하기 위해 표준 물질인 gallic acid를 사용하여 농도 vs 흡광도를 이용하여 검량선을 작성하였고, 검량식을 사용하여 Figure 26에 표현하였고, 이를 이용하여 gallic acid 함량을 구하였다. 검량식은 y=10.022x-0.0335 이고, 신뢰도(R^2)값은 0.9935 이다.

(1) 밀싹

중심합성법을 이용하여 계획된 실험 조건에 따른 반응 값은 Table 8에 나타냈다. 실험 값중 13(X_1: 50% X_2: 9 hr X_3: 10℃)번에서 가장 낮은 함량(90.15 mg/mL)를 보였으며, 19(X_1: 50% X_2: 9 hr X_3: 30℃)번에서 최대 함량(100.13 mg/mL)을 보였다. 실험결과는 회귀분석을 통하여 다음과 같은 2차 다항방정식 형태의 회귀식을 유도하였다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

$$Y = 60.348 + 0.068X_1 + 1.541X_2 + 2.193X_3 + 0.008X_1X_2 + 0.0003X_1X_3 + 0.018X_2X_3 - 0.001X_1^2 - 0.140X_2^2 - 0.042X_3^2$$

3차원 반응 표면 분석 결과 Figure 27과 같은 결과를 얻었고, 통계적 최적 조건을 구한 결과 49.43%, 8.63 hr, 27.86℃에서 최대값이 120.14 mg/mL임을 예측하였다. 각각의 변수들이 총 폴리페놀(gallic acid)의 함량에 대한 영향을 통계적으로 분석한 결과 추출 용매 농도(sum of square: 0.03), 추출 시간(sum of square: 0.56), 추출 온도(sum of square: 48.75)이므로 추출 온도에 영향을 받는 것으로 나타났으며, 추출 온도에 대한 F-value는 5.09(p=0.04)이므로 통계적으로 유의한 영향을 미치고 있었다. 추출 용매 농도와 추출 시간에 대한 F-value는 각각 0.0004(p=0.95), 0.059(p=0.81)이므로 통계적으로 유의하지 않음을 확인하였으며, 총 폴리페놀 함량(gallic acid)에 대한 영향을 미치지 않았다.

(2) 블루베리 열매

중심합성법을 이용하여 계획된 실험 조건에 따른 반응 값은 Table 9에 나타냈다. 실험 값중 1(X_1: 25% X_2: 6 hr X_3: 20℃)번에서 가장 낮은 함량(73.50 mg/mL)을 보였으며, 20(X_1: 50% X_2: 9 hr X_3: 30℃)번에서 최대 함량(102.34 mg/mL)을 보였다. 실험결과는 회귀분석을 통하여 다음과 같은 2차 다항방정식 형태의 회귀식을 유도하였다.

$$Y = -23.632 + 0.976X_1 + 11.604X_2 + 2.876X_3 - 0.030X_1X_2 - 0.007X_1X_3 - 0.120X_2X_3 - 0.005X_1^2 - 0.342X_2^2 - 0.024X_3^2$$

위의 회귀식을 이용하여 3차원 반응 표면 분석을 진행하였고, Figure

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

28과 같은 결과를 얻었다. 통계적인 최적 조건을 구한 결과 54.70%, 9.37 hr, 29.77℃에서 100.24 mg/mL의 최대 함량이 되는 것을 예측할 수 있었고, 각각의 변수들의 영향을 분석한 결과 추출 용매 농도(sum of square: 27.74, F-value: 1.46, p=0.255), 추출 시간(sum of square: 19.44, F-value: 1.02, p=0.336), 추출 온도(sum of square 6.56, F-value: 0.35, p=0.569)의 결과를 얻을 수 있었고, 통계적인 유의성은 없었지만 sum of suqare와 F-value가 추출 용매 농도에서 높은 것을 감안할 때 추출 용매의 농도가 본 실험에 영향을 미치는 것으로 확인하였다.

(3) 아로니아 열매

중심합성법을 이용하여 계획된 실험 조건에 따른 반응 값은 Table 10에 나타냈다. 실험 값중 17(X_1: 50% X_2: 9 hr X_3: 30℃)번에서 가장 낮은 함량(70.87 mg/mL)을 보였으며, 7(X_1: 25% X_2: 12 hr X_3: 40℃)번에서 최대 함량(100.52 mg/mL)을 보였다. 실험결과는 회귀분석을 통하여 다음과 같은 2차 다항방정식 형태의 회귀식을 유도하였다.

$$Y = -37.354 + 1.347X_1 + 9.656X_2 + 3.585X_3 - 0.043X_1X_2 - 0.013X_1X_3 - 0.101X_2X_3 - 0.005X_1^2 - 0.231X_2^2 + 0.031X_3^2$$

본 회귀식을 이용하여 3차원 표면 반응 분석을 실시하였고, Figure 29와 같은 결과를 얻었고, 통계학적 최적 조건을 구한 결과 62.38%, 8.33 hr, 30.95℃에서 최대값이 100.34 mg/mL으로 예측된다. 각각의 변수에 대한 본 실험의 영향을 분석한 결과 추출 용매 농도(sum of square: 100.16, F-value: 7.50, p=0.021), 추출 시간(sum of square: 14.47, F-value: 1.08, p=0.323), 추출 온도(sum of square: 37.14,

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

F-value: 2.78, p=0.126)중 추출 용매 농도가 본 실험에 영향을 받았고, 통계적으로 유의함을 보였지만, 추출 시간, 추출 온도는 통계적으로 유의함을 보이지 않았다.

나. Quercetin

총 폴리페놀 함량을 측정하기 위해 표준 물질인 gallic acid를 사용하여 농도 vs 흡광도를 이용하여 검량선을 작성하였고, 검량식을 사용하여 gallic acid 함량을 구하였다. 검량식은 Figure 30에 언급하였고, y=10.022x-0.0335 이고, 신뢰도(R^2)값은 0.9935 였다.

(1) 밀싹

중심합성법을 이용하여 계획된 실험 조건에 따른 반응 값은 Table 11에 나타냈다. 실험 값중 14(X_1: 50% X_2: 9 hr X_3: 50℃)번에서 가장 낮은 함량(75.23 mg/mL)을 보였으며, 20(X_1: 50% X_2: 9 hr X_3: 30℃)번에서 최대 함량(110.40 mg/mL)을 보였다. 실험결과는 회귀분석을 통하여 다음과 같은 2차 다항방정식 형태의 회귀식을 유도하였다.

$$Y = 55.095 + 0.103X_1 + 2.224X_2 + 3.014X_3 + 0.011X_1X_2 + 0.0004X_1X_3 + 0.024X_2X_3 - 0.002X_1^2 - 0.198X_2^2 - 0.058X_3^2$$

위와 같은 회귀식을 이용하여 3차원 반응 표면 분석을 한 결과 Figure 31과 같은 결과를 얻을 수 있었고, 통계적인 최적 조건을 구한 결과 49.51%, 8.64 hr, 27.89℃에서의 최대값이 109.29 mg/mL으로 예측되었다. 본 실험에서는 추출 온도(sum of square: 89.57, F-value: 5.03, p=0.048)가 추출 용매의 농도(sum of suqare: 0.062, F-value: 0.0035,

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

p=0.954), 추출 시간(sum of square: 1.04, F-value: 0.058, p=0.814)보다 본 실험 조건에서 영향을 미치는 것으로 확인하였다.

(2) 블루베리 열매

중심합성법을 이용하여 계획된 실험 조건에 따른 반응 값은 Table 12에 나타냈다. 실험 값중 1(X_1: 25% X_2: 6 hr X_3: 20℃)번에서 가장 낮은 함량(74.18 mg/mL)을 보였으며, 18(X_1: 50% X_2: 9 hr X_3: 30℃)번에서 최대 함량(108.35 mg/mL)을 보였다. 실험결과는 회귀분석을 통하여 다음과 같은 2차 다항방정식 형태의 회귀식을 유도하였다.

$$Y = -32.162 + 1.167X_1 + 12.738X_2 + 3.137X_3 - 0.036X_1X_2 - 0.010X_1X_3 - 0.141X_2X_3 - 0.005X_1^2 - 0.341X_2^2 + 0.022X_3^2$$

본 회귀식을 이용하여 3차원 반응 표면 분석을 실시하였고, Figure 32와 같은 결과를 얻을 수 있었다. 통계적인 최적 조건을 구한 결과 55.91%, 10.76 hr, 24.11℃에서 106.81 mg/mL의 최대 함량이 예측할 수 있었다. 각각의 변수들에 대한 본 실험의 영향을 확인한 결과 추출 용매 농도(sum of square: 34.06, F-value: 0.98, p=0.345), 추출 시간(sum of square: 48.32, F-value: 1.39, p=0.265), 추출 온도(sum of square: 4.96, F-value: 0.14, p=0.713)이었고, 통계적인 유의성을 확인되지 않았으나, 추출 시간의 sum of square와 F-value가 다른 변수보다 높은 것을 감안 하였을 때 본 실험에 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었다.

(3) 아로니아 열매

중심합성법을 이용하여 계획된 실험 조건에 따른 반응 값은 Table

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

13에 나타냈다. 실험 값중 17(X_1: 50% X_2: 9 hr X_3: 30℃)번에서 가장 낮은 함량(80.62 mg/mL)을 보였으며, 20(X_1: 50 X_2: 9 hr X_3: 30℃)번에서 최대 함량(110.70 mg/mL)을 보였다. 실험결과는 회귀분석을 통하여 다음과 같은 2차 다항방정식 형태의 회귀식을 유도하였다.

$$Y = -46.132 + 1.457X_1 + 10.250X_2 + 4.642X_3 - 0.041X_1X_2 - 0.013X_1X_3 - 0.096X_2X_3 - 0.006X_1^2 - 0.283X_2^2 - 0.052X_3^2$$

본 회귀식을 이용하여 3차원 표면 반응 분석을 실시하였고, Figure 33과 같은 결과를 얻었다. 통계학적 최적 조건을 구한 결과 61.29%, 8.72 hr, 29.05℃이었고, 최대값은 110.67 mg/mL임이 예상된다. 각각의 변수들에 대한 영향은 추출 용매 농도(sum of square: 112.45, F-value: 6.13, p=0.033), 추출 시간(sum of square: 7.05, F-value: 0.35, p=0.566), 추출 온도(sum of square: 0.47, F-value: 0.02, p=0.881)중에서 추출 용매 농도가 통계적으로 유의함을 알 수 있었고, 본 실험에 대한 영향이 높은 것으로 확인되었다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

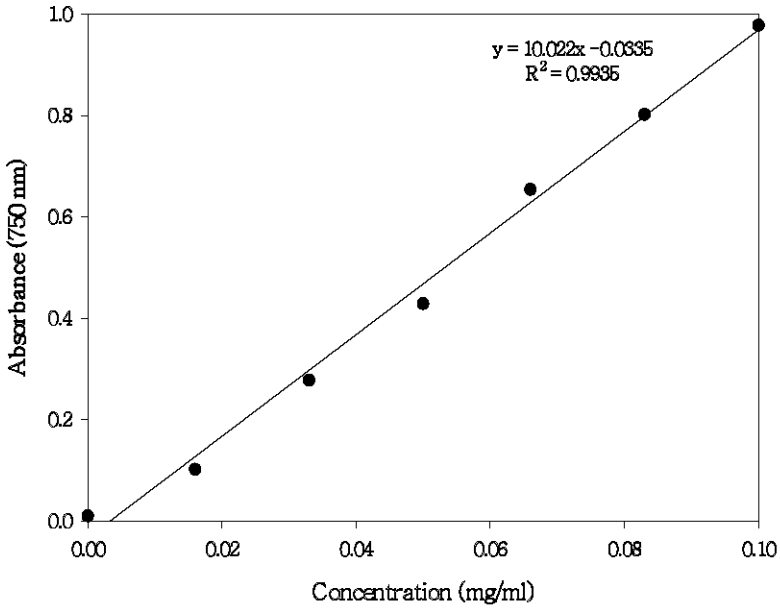


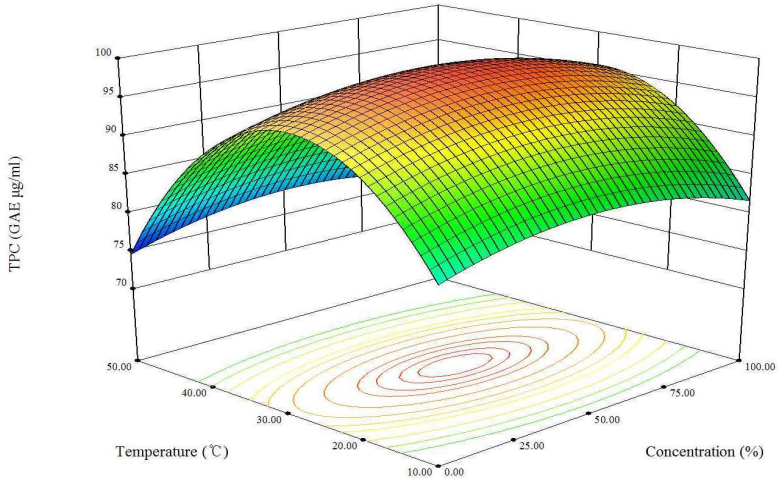
Figure 26. Gallic acid standard curve for total polyphenol contents.

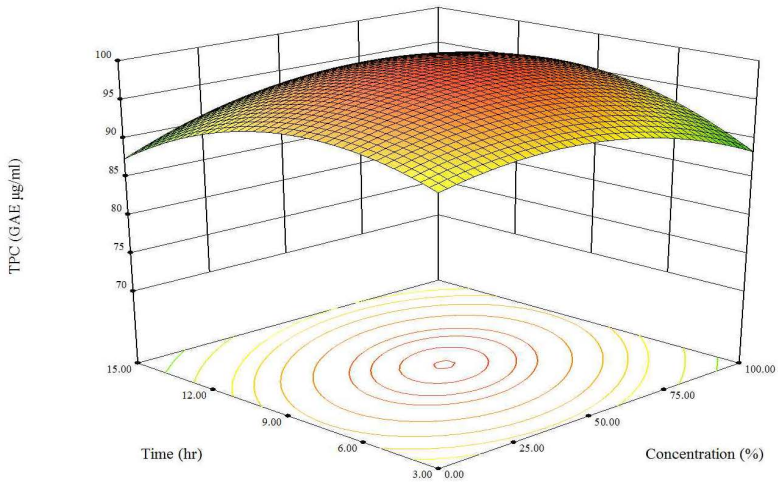
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 8. Total polyphenol(gallic acid) of wheat sprout extracts for res ponse surface methodology analysis X_1: Concentration of ethanol; X_2: Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃)

	Conditions			
	X_1	X_2	X_3	GAE (μg/mL)
1	25(-1)	6(-1)	20(-1)	93.18
2	75(1)	6(-1)	20(-1)	91.42
3	25(-1)	12(1)	20(-1)	91.91
4	75(1)	12(1)	20(-1)	91.64
5	25(-1)	6(-1)	40(1)	93.36
6	75(1)	6(-1)	40(1)	91.01
7	25(-1)	12(1)	40(1)	93.37
8	75(1)	12(1)	40(1)	94.22
9	0(-2)	9(0)	30(0)	94.48
10	100(2)	9(0)	30(0)	96.60
11	50(0)	3(-2)	30(0)	95.40
12	50(0)	15(2)	30(0)	92.81
13	50(0)	9(0)	10(-2)	90.15
14	50(0)	9(0)	50(2)	74.28
15	50(0)	9(0)	30(0)	96.44
16	50(0)	9(0)	30(0)	99.50
17	50(0)	9(0)	30(0)	100.00
18	50(0)	9(0)	30(0)	99.13
19	50(0)	9(0)	30(0)	100.13
20	50(0)	9(0)	30(0)	99.24

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY





조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

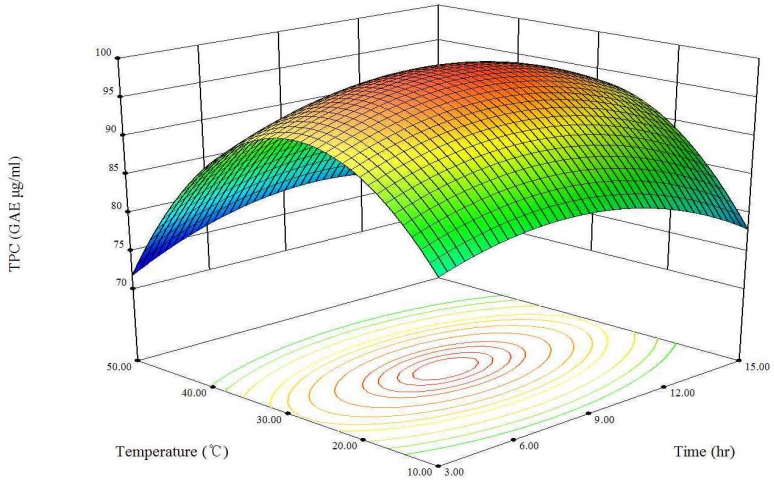


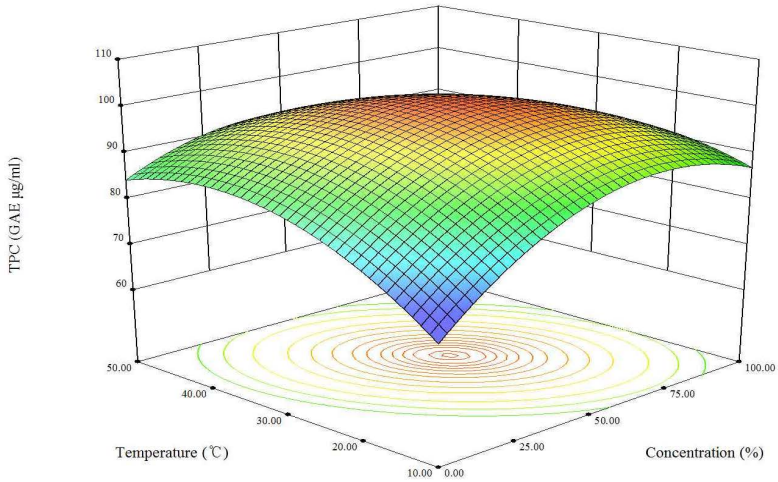
Figure 27. Response surface for the effects of total polyphenol contents(gallic acid) on wheat sprout extract.

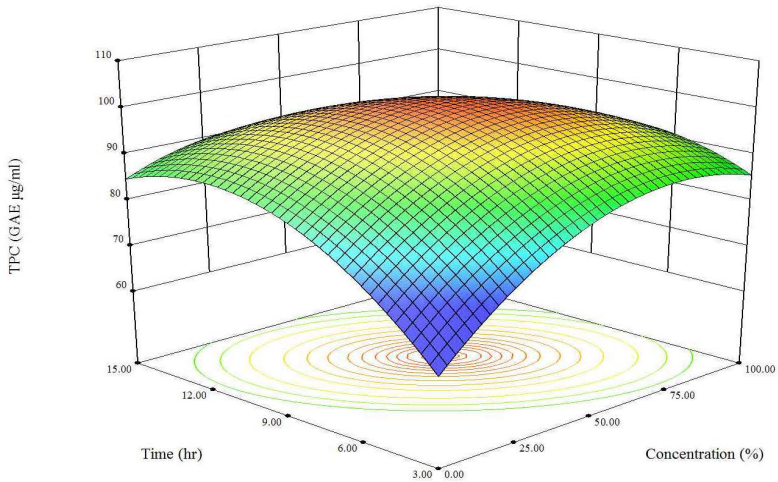
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 9. Total polyphenol(gallic acid) of blueberry extracts for response surface methodology analysis X_1: Concentration of ethanol; X_2: Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃)

	Conditions			
	X_1	X_2	X_3	GAE (μg/mL)
1	25(-1)	6(-1)	20(-1)	73.50
2	75(1)	6(-1)	20(-1)	89.61
3	25(-1)	12(1)	20(-1)	94.41
4	75(1)	12(1)	20(-1)	91.72
5	25(-1)	6(-1)	40(1)	92.88
6	75(1)	6(-1)	40(1)	92.68
7	25(-1)	12(1)	40(1)	89.64
8	75(1)	12(1)	40(1)	90.23
9	0(-2)	9(0)	30(0)	89.24
10	100(2)	9(0)	30(0)	92.87
11	50(0)	3(-2)	30(0)	90.12
12	50(0)	15(2)	30(0)	90.27
13	50(0)	9(0)	10(-2)	94.57
14	50(0)	9(0)	50(2)	91.61
15	50(0)	9(0)	30(0)	100.31
16	50(0)	9(0)	30(0)	100.35
17	50(0)	9(0)	30(0)	100.32
18	50(0)	9(0)	30(0)	100.54
19	50(0)	9(0)	30(0)	101.35
20	50(0)	9(0)	30(0)	102.34

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY





조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

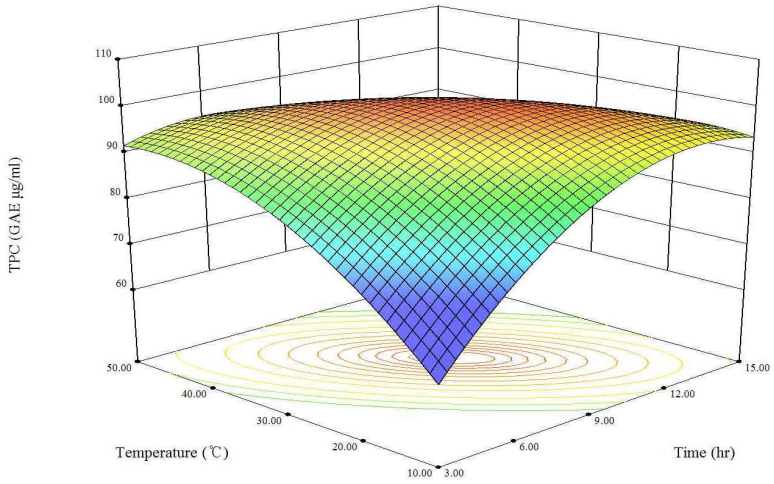


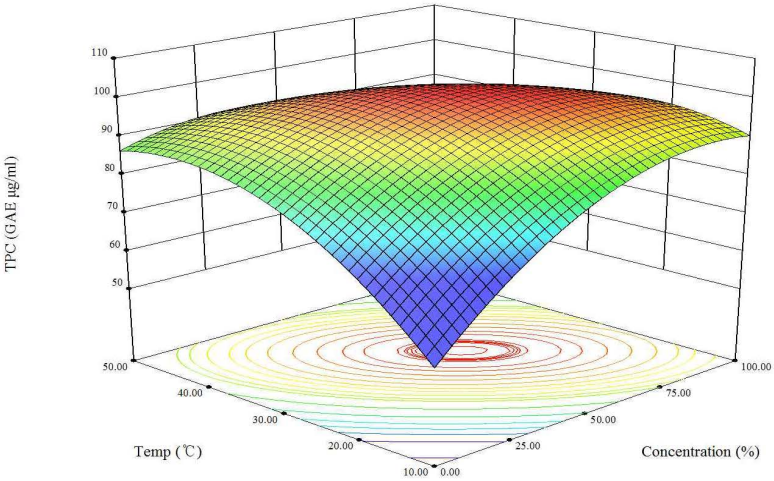
Figure 28. Response surface for the effects of total polyphenol contents(gallic acid) on blueberry extract.

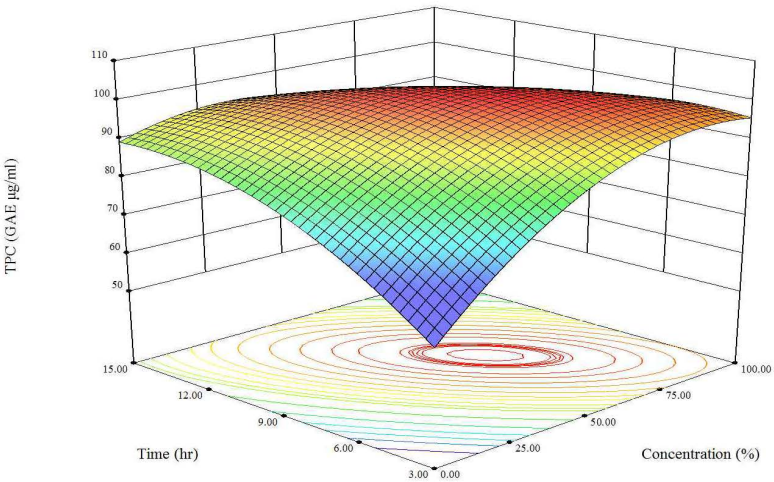
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 10. Total polyphenol(gallic acid) of black chokeberry extracts fo r response surface methodology analysis X_1: Concentration of ethanol; X_2: Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃)

	Conditions			
	X_1	X_2	X_3	GAE (μg/mL)
1	25(-1)	6(-1)	20(-1)	94.17
2	75(1)	6(-1)	20(-1)	85.59
3	25(-1)	12(1)	20(-1)	100.13
4	75(1)	12(1)	20(-1)	93.76
5	25(-1)	6(-1)	40(1)	90.01
6	75(1)	6(-1)	40(1)	100.31
7	25(-1)	12(1)	40(1)	100.52
8	75(1)	12(1)	40(1)	89.96
9	0(-2)	9(0)	30(0)	96.39
10	100(2)	9(0)	30(0)	87.97
11	50(0)	3(-2)	30(0)	89.50
12	50(0)	15(2)	30(0)	92.59
13	50(0)	9(0)	10(-2)	100.31
14	50(0)	9(0)	50(2)	93.40
15	50(0)	9(0)	30(0)	93.65
16	50(0)	9(0)	30(0)	92.58
17	50(0)	9(0)	30(0)	70.87
18	50(0)	9(0)	30(0)	100.30
19	50(0)	9(0)	30(0)	92.65
20	50(0)	9(0)	30(0)	100.31

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY





조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

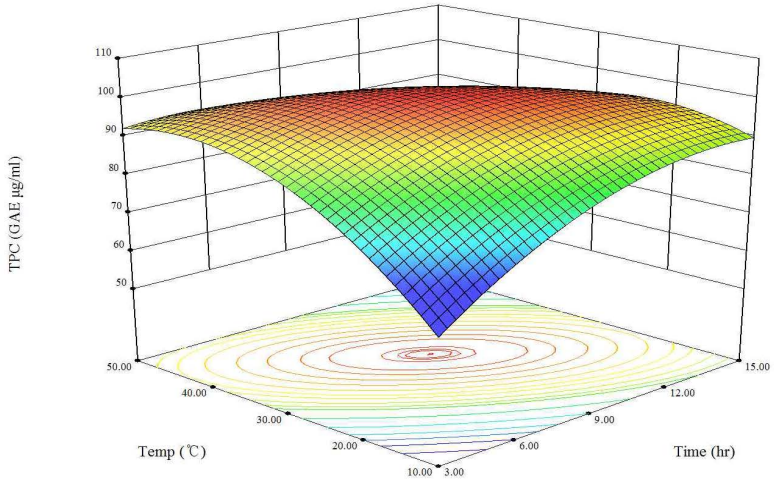


Figure 29. Response surface for the effects of total polyphenol contents(gallic acid) on black chokeberry extract.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

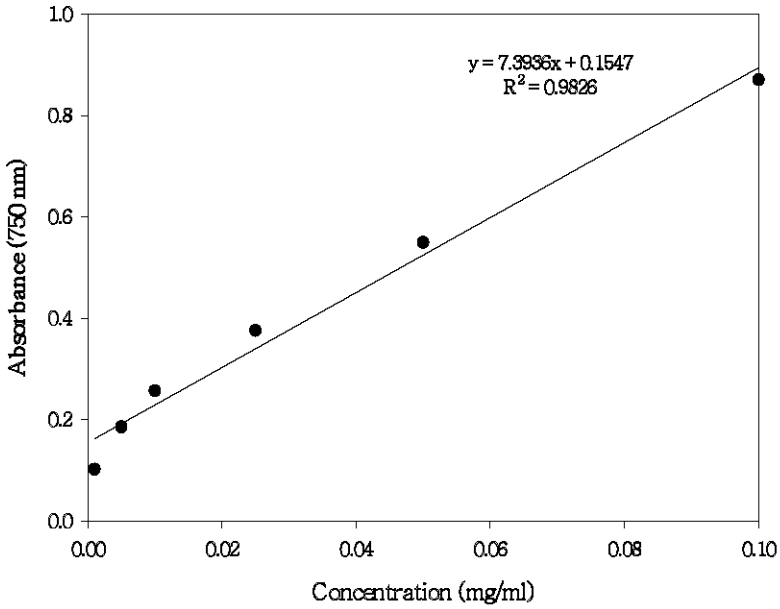


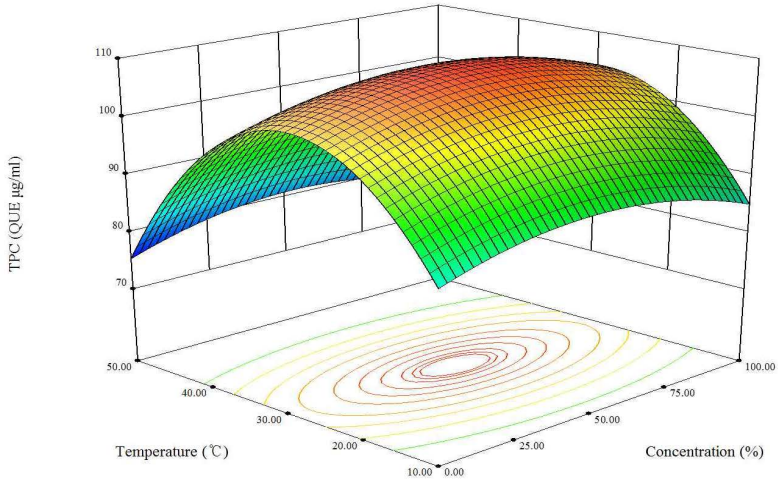
Figure 30. Quercetin standard curve for total polyphenol contents.

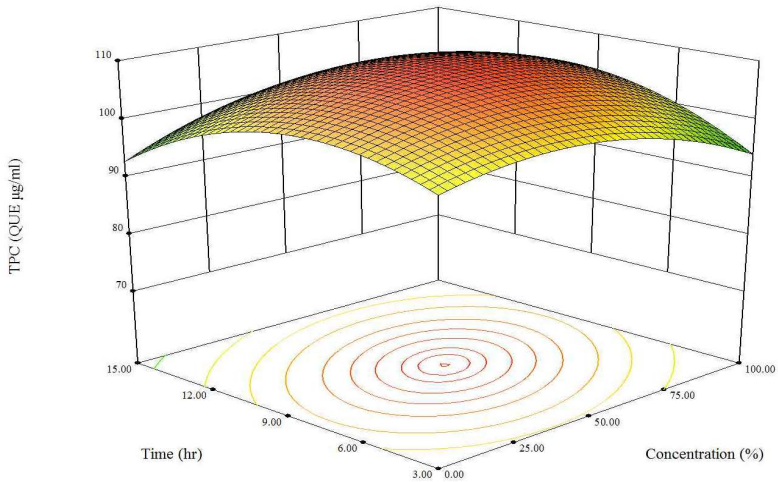
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 11. Total polyphenol(quercetin) of wheat sprout extracts for response surface methodology analysis X_1: Concentration of ethanol; X_2: Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃)

	Conditions			
	X_1	X_2	X_3	QUE (μg/mL)
1	25(-1)	6(-1)	20(-1)	100.84
2	75(1)	6(-1)	20(-1)	98.46
3	25(-1)	12(1)	20(-1)	99.13
4	75(1)	12(1)	20(-1)	98.77
5	25(-1)	6(-1)	40(1)	101.09
6	75(1)	6(-1)	40(1)	97.91
7	25(-1)	12(1)	40(1)	101.11
8	75(1)	12(1)	40(1)	102.26
9	0(-2)	9(0)	30(0)	102.61
10	100(2)	9(0)	30(0)	105.49
11	50(0)	3(-2)	30(0)	103.86
12	50(0)	15(2)	30(0)	100.34
13	50(0)	9(0)	10(-2)	96.74
14	50(0)	9(0)	50(2)	75.23
15	50(0)	9(0)	30(0)	105.27
16	50(0)	9(0)	30(0)	110.15
17	50(0)	9(0)	30(0)	109.25
18	50(0)	9(0)	30(0)	110.00
19	50(0)	9(0)	30(0)	109.46
20	50(0)	9(0)	30(0)	110.40

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY





조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

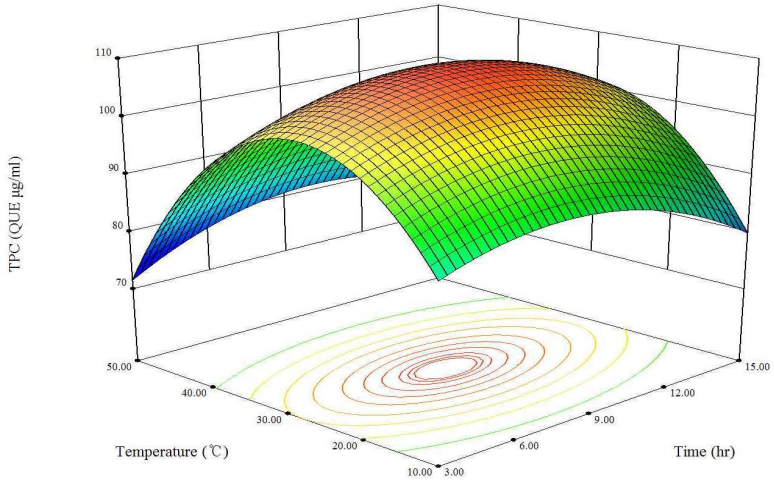


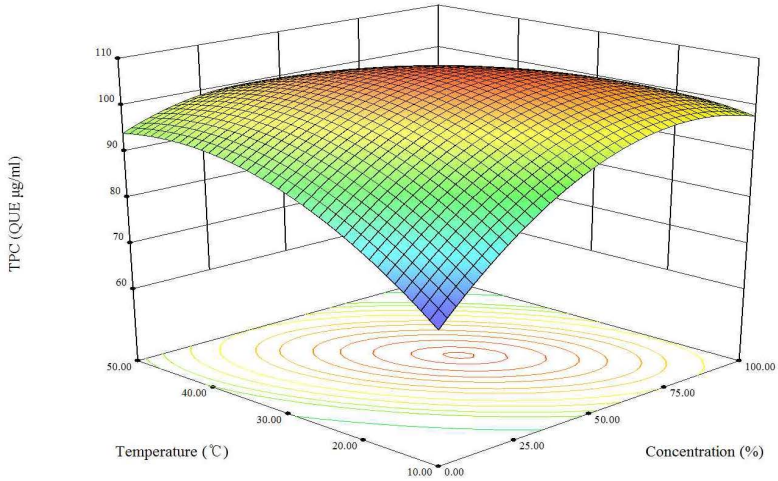
Figure 31. Response surface for the effects of total polyphenol contents(quercetin) on wheat sprout extract.

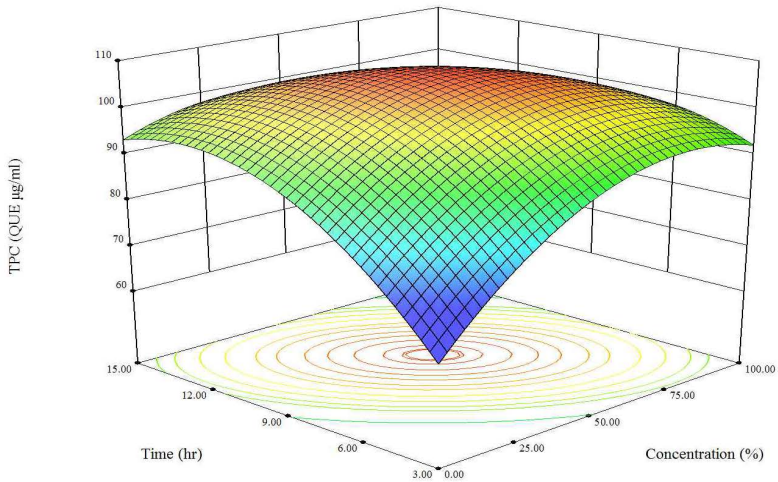
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 12. Total polyphenol(quercetin) of blueberry extracts for response surface methodology analysis X_1: Concentration of ethanol; X_2: Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃)

	Conditions			
	X_1	X_2	X_3	QUE (μg/mL)
1	25(-1)	6(-1)	20(-1)	74.18
2	75(1)	6(-1)	20(-1)	96.02
3	25(-1)	12(1)	20(-1)	102.52
4	75(1)	12(1)	20(-1)	98.88
5	25(-1)	6(-1)	40(1)	99.44
6	75(1)	6(-1)	40(1)	96.17
7	25(-1)	12(1)	40(1)	96.05
8	75(1)	12(1)	40(1)	96.86
9	0(-2)	9(0)	30(0)	95.52
10	100(2)	9(0)	30(0)	99.32
11	50(0)	3(-2)	30(0)	97.25
12	50(0)	15(2)	30(0)	96.90
13	50(0)	9(0)	10(-2)	102.74
14	50(0)	9(0)	50(2)	98.73
15	50(0)	9(0)	30(0)	107.65
16	50(0)	9(0)	30(0)	106.35
17	50(0)	9(0)	30(0)	107.81
18	50(0)	9(0)	30(0)	108.35
19	50(0)	9(0)	30(0)	107.35
20	50(0)	9(0)	30(0)	106.34

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY





조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

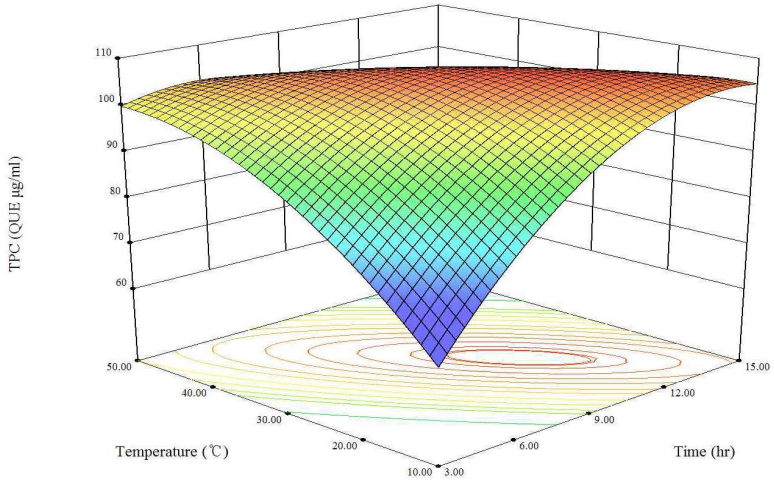


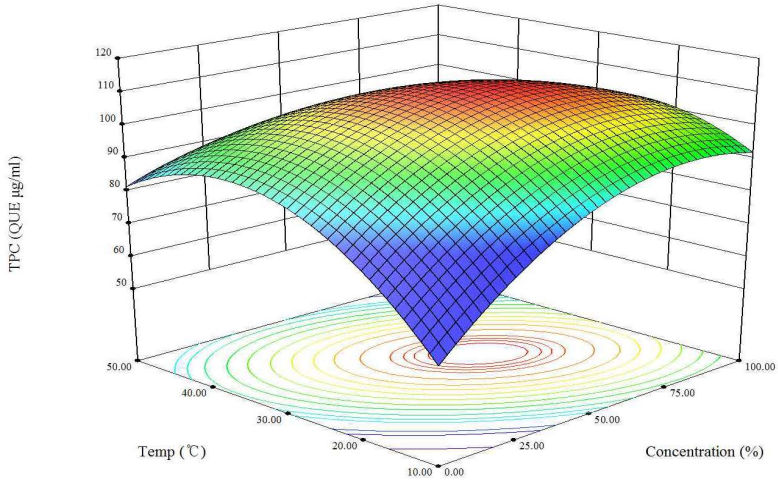
Figure 32. Response surface for the effects of total polyphenol contents(quercetin) on blueberry extract.

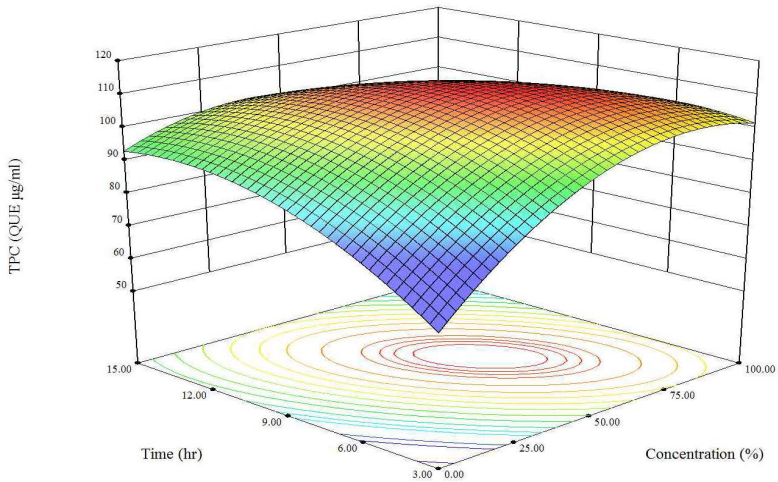
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 13. Total polyphenol(quercetin) of black chokeberry extracts for response surface methodology analysis X_1: Concentration of ethanol; X_2: Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃)

	Conditions			
	X_1	X_2	X_3	QUE (μg/mL)
1	25(-1)	6(-1)	20(-1)	102.19
2	75(1)	6(-1)	20(-1)	90.56
3	25(-1)	12(1)	20(-1)	110.35
4	75(1)	12(1)	20(-1)	101.63
5	25(-1)	6(-1)	40(1)	96.55
6	75(1)	6(-1)	40(1)	110.31
7	25(-1)	12(1)	40(1)	110.31
8	75(1)	12(1)	40(1)	96.48
9	0(-2)	9(0)	30(0)	105.20
10	100(2)	9(0)	30(0)	83.63
11	50(0)	3(-2)	30(0)	95.86
12	50(0)	15(2)	30(0)	100.05
13	50(0)	9(0)	10(-2)	110.32
14	50(0)	9(0)	50(2)	101.15
15	50(0)	9(0)	30(0)	101.48
16	50(0)	9(0)	30(0)	100.03
17	50(0)	9(0)	30(0)	80.62
18	50(0)	9(0)	30(0)	110.17
19	50(0)	9(0)	30(0)	100.13
20	50(0)	9(0)	30(0)	110.70

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY





조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

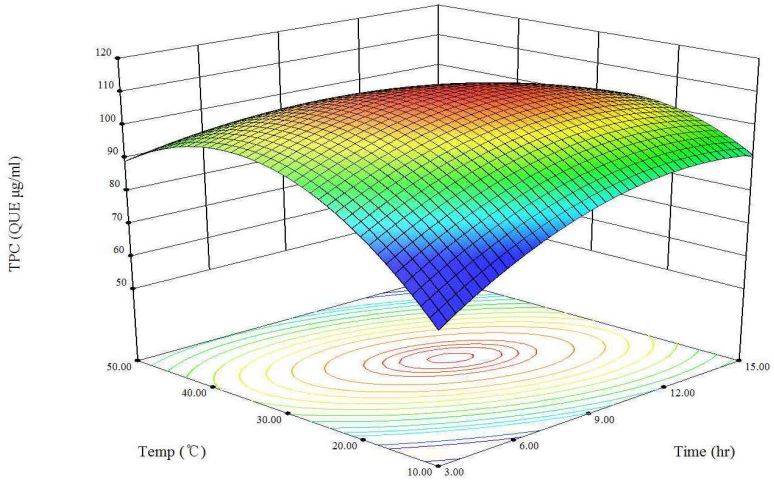


Figure 33. Response surface for the effects of total polyphenol contents(quercetin) on black chokeberry extract.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. 항산화능

가. DPPH radical scavenging activity

DPPH는 페놀성 화합물의 free radical 소거활성을 간단하게 측정할 수 있어 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 탐색하기 위하여 많이 이용되고 있는 방법으로 짙은 보라색을 띄는 비교적 안정화된 free radical이 항산화제, 방향족 아민류와 반응 시 radical이 소거되어 색이 노란색으로 탈색되는 원리를 이용하여 항산화 활성을 측정하는데 사용된다.

(1) 밀싹

중심합성법을 이용하여 계획된 실험 조건에 따른 반응 값은 Table 14에 나타냈다. 실험 값중 9(X_1: 0% X_2: 9 hr X_3: 30℃)번에서 가장 낮은 활성(61.52 %)를 보였으며, 20(X_1: 50% X_2: 9 hr X_3: 30℃)번에서 최대 활성(91.43 %)을 보였다. 실험결과는 회귀분석을 통하여 다음과 같은 2차 다항방정식 형태의 회귀식을 유도하였다.

$$Y = 24.813 + 0.780X_1 + 3.834X_2 + 2.192X_3 + 0.005X_1X_2 + 0.003X_1X_3 + 0.114X_2X_3 - 0.009X_1^2 - 0.447X_2^2 - 0.063X_3^2$$

위의 회귀식을 이용하여 3차원 반응 표면 분석을 한 결과 Figure 33과 같은 결과를 얻을 수 있었고, 통계적인 최적 조건을 구한 결과 48.35%, 7.85 hr, 26.00℃에서 87.21%의 최대 활성이 되는 것을 예측할 수 있었다. 각 변수들에 대한 본 실험의 영향을 통계적으로 처리한 결과 추출 용매 농도(sum of square: 1.46, F-value: 0.022, p=0.885), 추출 시간(sum of square: 45.54, F-value: 0.69, p-0.426), 추출 온도(sum of

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

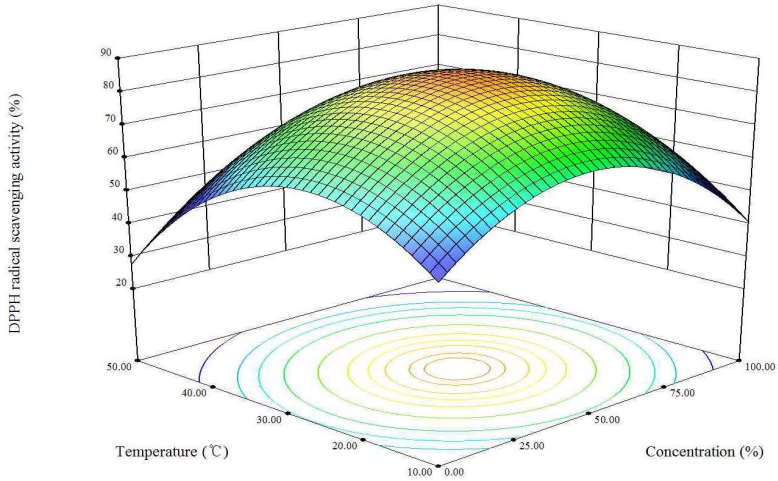
square: 211.40, F-value: 3.19, p=01.04)의 결과를 얻을 수 있었고, 각 변수들의 통계적인 유의성을 찾지 못하였지만 추출 온도에서 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

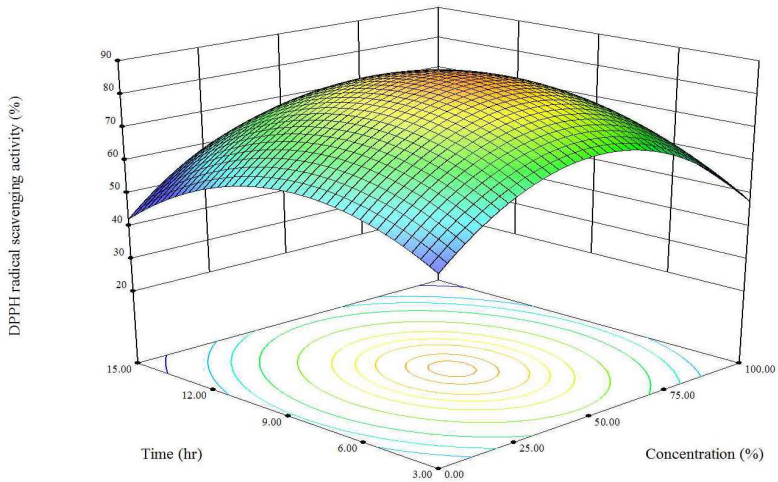
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 14. DPPH radical scavenging activity of wheat sprout extracts for response surface methodology analysis X_1: Concentration of ethanol; X_2: Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃)

	Conditions			
	X_1	X_2	X_3	DPPH (%)
1	25(-1)	6(-1)	20(-1)	85.30
2	75(1)	6(-1)	20(-1)	77.32
3	25(-1)	12(1)	20(-1)	67.06
4	75(1)	12(1)	20(-1)	68.70
5	25(-1)	6(-1)	40(1)	65.51
6	75(1)	6(-1)	40(1)	69.15
7	25(-1)	12(1)	40(1)	69.17
8	75(1)	12(1)	40(1)	65.97
9	0(-2)	9(0)	30(0)	61.52
10	100(2)	9(0)	30(0)	62.04
11	50(0)	3(-2)	30(0)	69.23
12	50(0)	15(2)	30(0)	68.93
13	50(0)	9(0)	10(-2)	67.56
14	50(0)	9(0)	50(2)	52.77
15	50(0)	9(0)	30(0)	64.11
16	50(0)	9(0)	30(0)	90.42
17	50(0)	9(0)	30(0)	90.31
18	50(0)	9(0)	30(0)	89.35
19	50(0)	9(0)	30(0)	89.34
20	50(0)	9(0)	30(0)	91.43

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY





조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

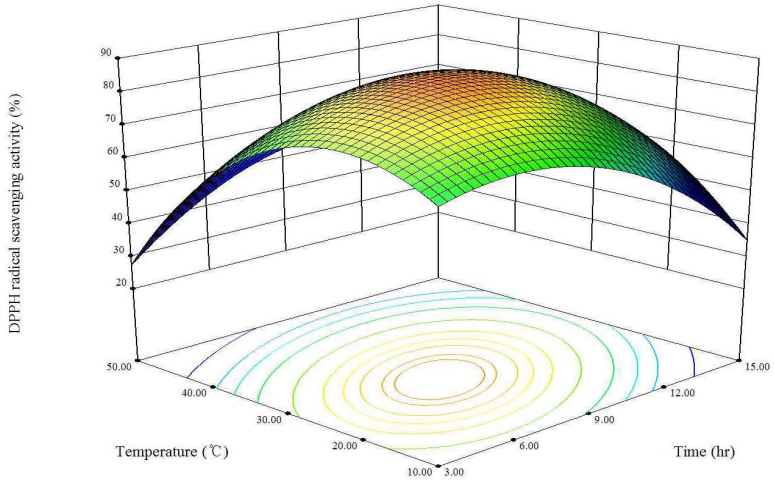


Figure 34. Response surface for the effects of DPPH radical scanvenging activity on wheat sprout extract.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(2) 블루베리 열매

중심합성법을 이용하여 계획된 실험 조건에 따른 반응 값은 Table 15에 나타냈다. 실험 값중 15(X_1: 50% X_2: 9 hr X_3: 30℃)번에서 가장 낮은 활성(53.81%)을 보였으며, 17(X_1: 50% X_2: 9 hr X_3: 30℃)번에서 최대 활성(70.35%)을 보였다. 실험결과는 회귀분석을 통하여 다음과 같은 2차 다항방정식 형태의 회귀식을 유도하였다.

$$Y = 4.270 + 0.608X_1 + 4.215X_2 + 1.765X_3 - 0.007X_1X_2 - 0.009X_1X_3 + 0.002X_2X_3 - 0.002X_1^2 - 0.229X_2^2 - 0.020X_3^2$$

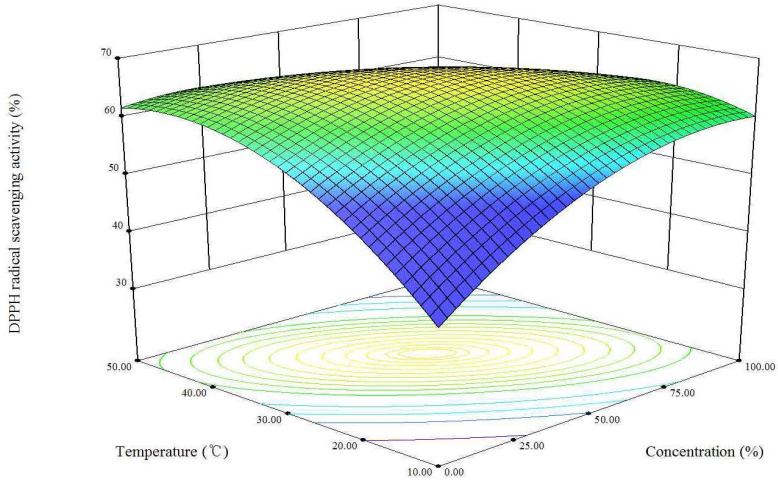
위 식을 이용하여 3차원 반응 표면 분석을 실시하였고, Figure 34와 같은 결과를 유도할 수 있었다. 통계적인 최적 조건을 구한 결과 53.08%, 8.57 hr, 32.02℃에서 최대값이 35.67%이 되는 것을 예측할 수 있었다. 본 실험에 대한 각 변수들의 영향을 분석한 결과 추출 용매 농도(sum of square: 9.27, F-value: 0.43, p=0.527), 추출 시간(sum of square: 4.64, F-value: 0.22, p=0.652), 추출 시간(sum of square: 19.81, F-value: 0.92, p=0.360)이었고, 통계적 유의성은 보이지 않았으나, 추출 시간에 대한 본 실험의 영향이 다른 변수들에 비해 크다는 것을 확인할 수 있었다.

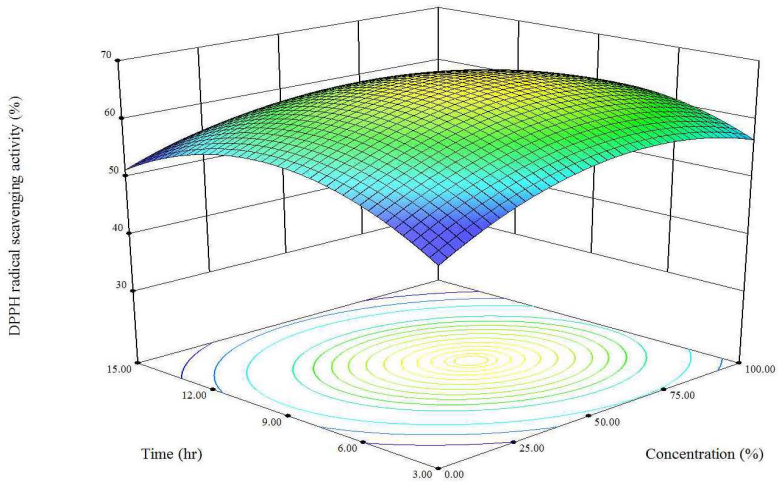
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 15. DPPH radical scavenging activity of blueberry extracts for response surface methodology analysis X_1: Concentration of ethanol; X_2: Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃)

	Conditions			
	X_1	X_2	X_3	DPPH (%)
1	25(-1)	6(-1)	20(-1)	57.35
2	75(1)	6(-1)	20(-1)	64.78
3	25(-1)	12(1)	20(-1)	54.91
4	75(1)	12(1)	20(-1)	61.36
5	25(-1)	6(-1)	40(1)	64.06
6	75(1)	6(-1)	40(1)	63.65
7	25(-1)	12(1)	40(1)	62.95
8	75(1)	12(1)	40(1)	59.44
9	0(-2)	9(0)	30(0)	59.55
10	100(2)	9(0)	30(0)	60.66
11	50(0)	3(-2)	30(0)	57.45
12	50(0)	15(2)	30(0)	58.73
13	50(0)	9(0)	10(-2)	56.61
14	50(0)	9(0)	50(2)	59.67
15	50(0)	9(0)	30(0)	53.81
16	50(0)	9(0)	30(0)	69.68
17	50(0)	9(0)	30(0)	70.35
18	50(0)	9(0)	30(0)	68.67
19	50(0)	9(0)	30(0)	67.61
20	50(0)	9(0)	30(0)	68.68

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY





조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

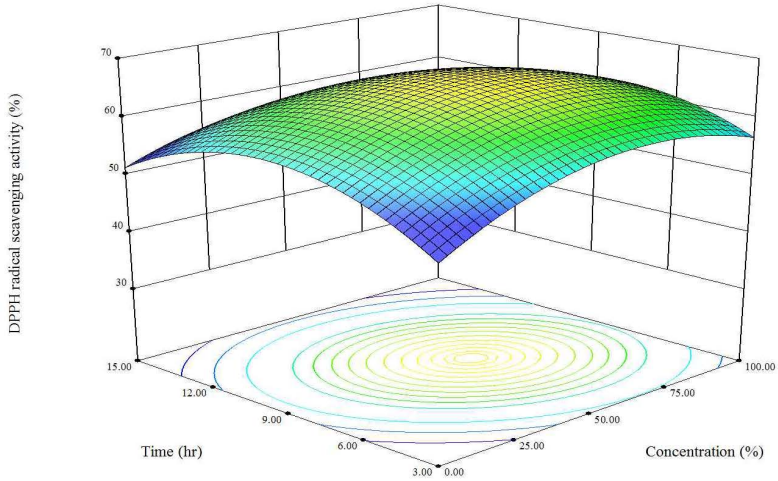


Figure 35. Response surface for the effects of DPPH radical scanvenging activity on blueberry extract.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(3) 아로니아 열매

중심합성법을 이용하여 계획된 실험 조건에 따른 반응 값은 Table 16에 나타냈다. 실험 값중 4(X_1: 75% X_2: 12 hr X_3: 20℃)번에서 가장 낮은 활성(42.90%)을 보였으며, 18(X_1: 50% X_2: 9 hr X_3: 30℃)번에서 최대 활성(67.54%)을 보였다. 실험결과는 회귀분석을 통하여 다음과 같은 2차 다항방정식 형태의 회귀식을 유도하였다.

$$Y = 28.713 + 0.630X_1 + 1.791X_2 + 1.021X_3 - 0.007X_1X_2 + 0.009X_1X_3 + 0.142X_2X_3 - 0.009X_1^2 - 0.325X_2^2 - 0.045X_3^2$$

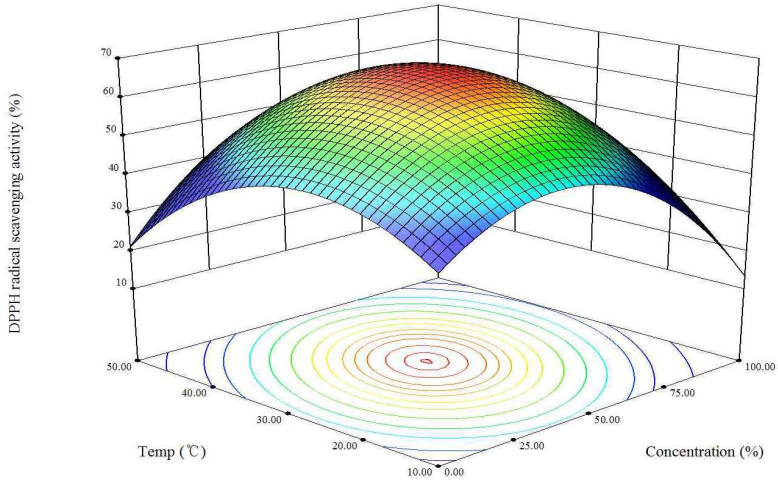
위 회귀식을 이용하여 3차원 반응 표면 분석을 실시하였고, Figure 35.와 같은 결과를 얻었다. 그에 따른 통계학적 최적 조건을 구한 결과 47.63%, 8.88 hr, 30.45℃임을 확인하였고, 이에 대한 최대값은 67.20%으로 예상된다. 각각의 변수들인 추출 용매 농도(sum of square: 22.53, F-value: 1.32, p=0.2769), 추출 시간(sum of square: 3.74, F-value: 0.22, p=0.649), 추출 온도(sum of square: 10.33, F-value: 0.61, p=0.454) 중에서 통계학적으로 유의한 변수는 없었지만, sum of square, F-value가 큰 추출 용매 농도가 본 실험에 영향을 주는 것으로 확인되었다.

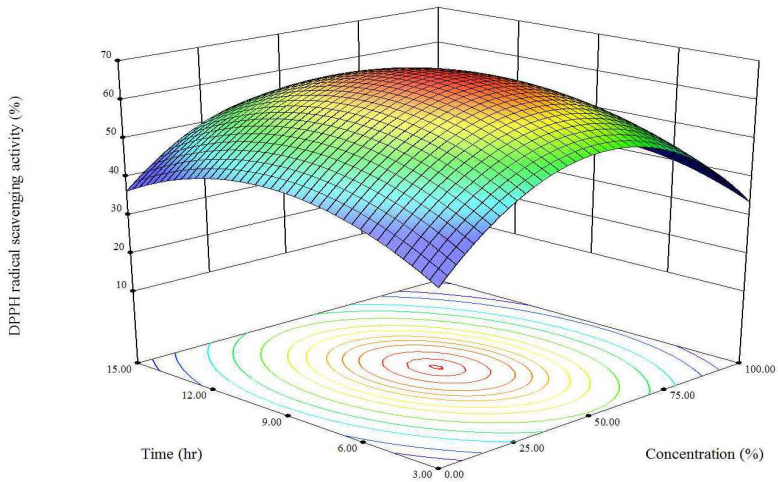
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 16. DPPH radical scavenging activity of black chokeberry extracts for response surface methodology analysis X_1: Concentration of ethanol; X_2: Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃)

	Conditions			
	X_1	X_2	X_3	DPPH (%)
1	25(-1)	6(-1)	20(-1)	63.14
2	75(1)	6(-1)	20(-1)	48.22
3	25(-1)	12(1)	20(-1)	67.32
4	75(1)	12(1)	20(-1)	42.90
5	25(-1)	6(-1)	40(1)	57.10
6	75(1)	6(-1)	40(1)	67.31
7	25(-1)	12(1)	40(1)	67.35
8	75(1)	12(1)	40(1)	51.49
9	0(-2)	9(0)	30(0)	56.91
10	100(2)	9(0)	30(0)	48.43
11	50(0)	3(-2)	30(0)	47.01
12	50(0)	15(2)	30(0)	48.41
13	50(0)	9(0)	10(-2)	67.44
14	50(0)	9(0)	50(2)	45.60
15	50(0)	9(0)	30(0)	53.94
16	50(0)	9(0)	30(0)	58.47
17	50(0)	9(0)	30(0)	61.68
18	50(0)	9(0)	30(0)	67.54
19	50(0)	9(0)	30(0)	46.68
20	50(0)	9(0)	30(0)	67.30

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY





조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

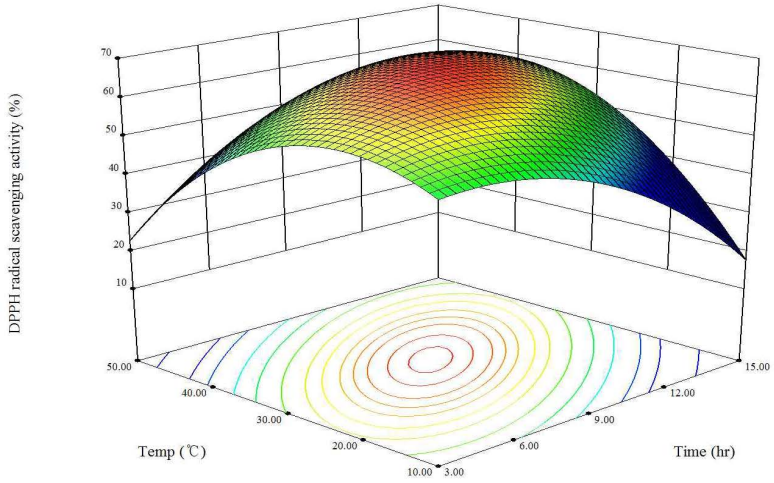


Figure 36. Response surface for the effects of DPPH radical scanvenging activity on black chokeberry extract.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. ABTS radical scavenging activity

DPPH 소거활성이 free radical이 소거되어지는 것을 이용하는 방법이라면 ABTS 소거활성은 양이온 radical이 소거되는 것을 이용한 방법이다. Potassium persulfate와 ABTS 가 반응하여 ABTS 양이온 radical이 생성되면 청록색을 띄게 되는데 항산화성 물질에 의해 ABTS 양이온 radical이 소거되어 청록색이 탈색되는 원리를 이용하여 항산화 활성을 측정하는데 사용된다.

(1) 밀싹

중심합성법을 이용하여 계획된 실험 조건에 따른 반응 값은 Table 17에 나타냈다. 실험 값중 10(X_1: 100% X_2: 9 hr X_3: 30℃)번에서 가장 낮은 활성(71.27%)를 보였으며, 20(X_1: 50% X_2: 9 hr X_3: 30℃)번에서 최대 활성(99.34%)을 보였다. 실험결과는 회귀분석을 통하여 다음과 같은 2차 다항방정식 형태의 회귀식을 유도하였다.

$$Y = 46.255 + 0.558X_1 + 3.089X_2 + 1.965X_3 + 0.008X_1X_2 + 0.003X_1X_3 + 0.014X_2X_3 - 0.008X_1^2 - 0.241X_2^2 - 0.039X_3^2$$

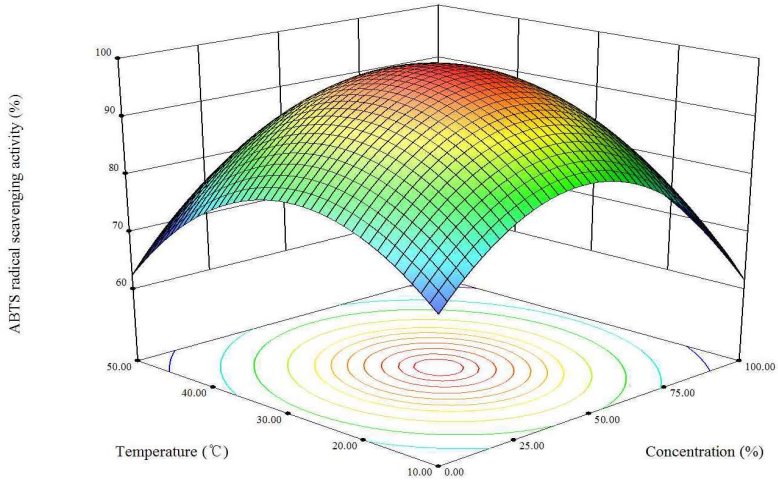
위 식을 이용하여 3차원 반응 표면 분석을 수행한 결과 Figure 36과 같은 결과를 얻을 수 있었고, 통계적인 최적 조건을 구한 결과 45.96%, 8.05 hr, 28.39℃에서 99.40%의 최대 활성이 되는 것으로 예측 하였다. 본 실험의 변수들의 영향을 분석한 결과 추출 용매의 농도(sum of square: 24.23, F-value:0.71, p=0.42), 추출 시간(sum of suqare: 23.45, F-value: 0.69, p=0.43), 추출 온도(sum of square: 16.09, F-value: 0.49, p=0.51)이므로 본 실험의 통계적 유의성은 없지만 추출 용매의 농도가 본 실험의 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.

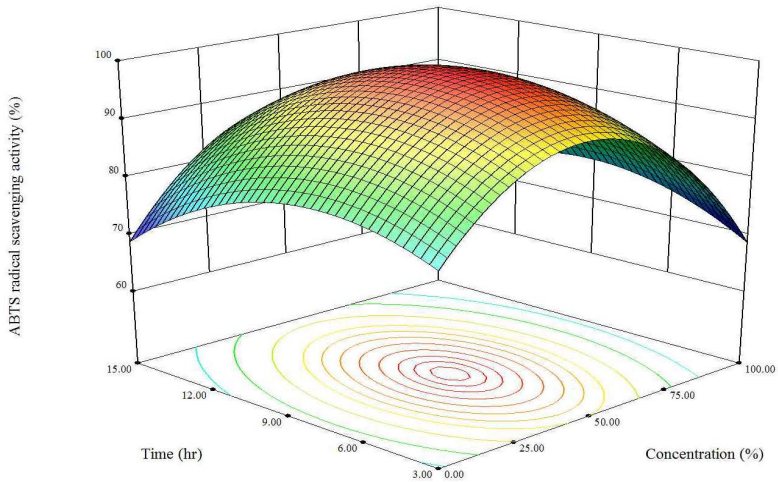
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 17. ABTS radical scavenging activity of wheat sprout extracts for response surface methodology analysis X_1: Concentration of ethanol; X_2: Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃)

	Conditions			
	X_1	X_2	X_3	ABTS (%)
1	25(-1)	6(-1)	20(-1)	97.38
2	75(1)	6(-1)	20(-1)	95.10
3	25(-1)	12(1)	20(-1)	92.78
4	75(1)	12(1)	20(-1)	92.46
5	25(-1)	6(-1)	40(1)	90.86
6	75(1)	6(-1)	40(1)	90.58
7	25(-1)	12(1)	40(1)	87.42
8	75(1)	12(1)	40(1)	90.22
9	0(-2)	9(0)	30(0)	81.07
10	100(2)	9(0)	30(0)	71.27
11	50(0)	3(-2)	30(0)	88.57
12	50(0)	15(2)	30(0)	84.41
13	50(0)	9(0)	10(-2)	79.04
14	50(0)	9(0)	50(2)	80.34
15	50(0)	9(0)	30(0)	90.23
16	50(0)	9(0)	30(0)	99.25
17	50(0)	9(0)	30(0)	99.15
18	50(0)	9(0)	30(0)	99.31
19	50(0)	9(0)	30(0)	99.18
20	50(0)	9(0)	30(0)	99.34

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY





조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

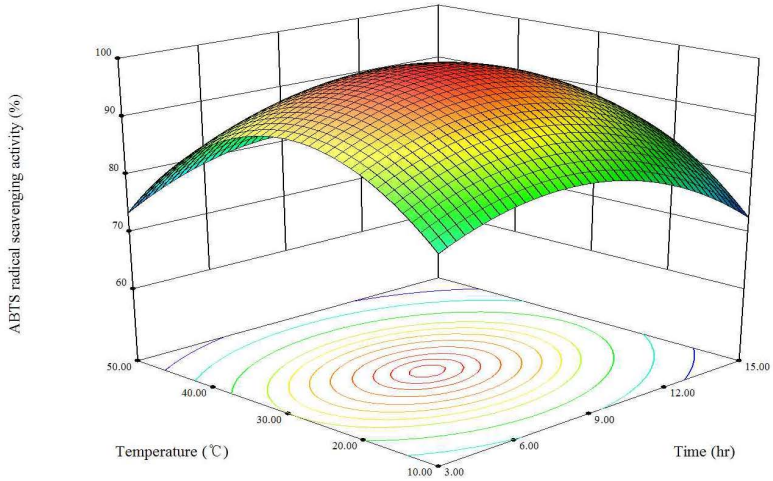


Figure 37. Response surface for the effects of ABTS radical scanvenging activity on wheat sprout extract.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(2) 블루베리 열매

중심합성법을 이용하여 계획된 실험 조건에 따른 반응 값은 Table 18에 나타냈다. 실험 값중 1(X_1: 25% X_2: 6 hr X_3: 20℃)번에서 가장 낮은 활성(85.53%)을 보였으며, 29(X_1: 50% X_2: 9 hr X_3: 30℃)번에서 최대 활성(99.74%)을 보였다. 실험결과는 회귀분석을 통하여 다음과 같은 2차 다항방정식 형태의 회귀식을 유도하였다.

$$Y = 33.799 + 0.723X_1 + 4.527X_2 + 1.708X_3 - 0.021X_1X_2 - 0.007X_1X_3 - 0.016X_2X_3 - 0.003X_1^2 - 0.162X_2^2 - 0.020X_3^2$$

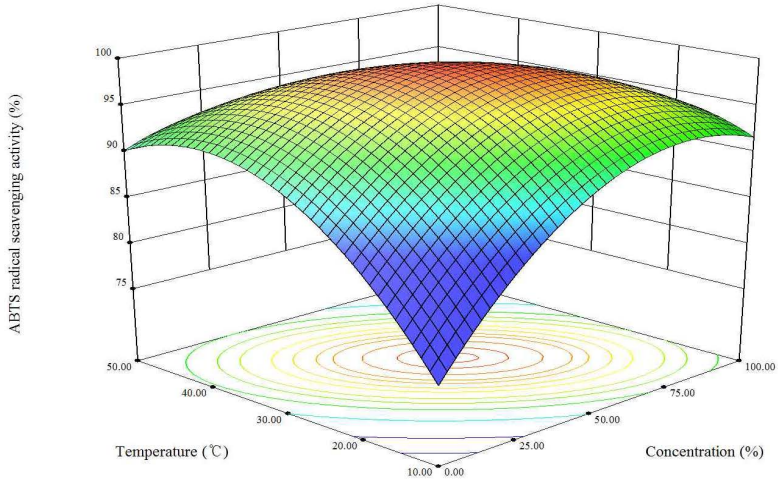
유도된 회귀식을 이용하여 3차원 반응 표면 분석을 하였고, Figure 37과 같은 결과를 얻을 수 있었다. 통계학적 최적 조건을 구한 결과 54.18%, 8.96 hr, 29.70℃에서 최대값이 99.02%임을 예측할 수 있었다. 각각의 변수들에 대한 본 실험의 영향을 살펴본 결과 추출 용매 농도(sum of square: 4.62, F-value: 1.19, p=0.302), 추출 시간(sum of square: 0.70, F-value: 0.18, p=0.681), 추출 온도(sum of square: 0.49, F-value: 0.13, p=0.730)이었고, 통계적으로 유의하지 않았지만, 추출 용매 농도가 본 실험에서 영향을 미치는 것으로 확인할 수 있었다.

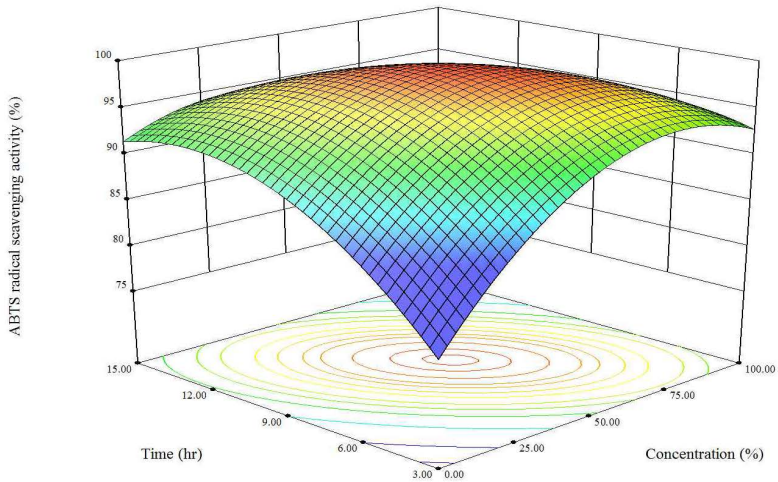
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 18. ABTS radical scavenging activity of blueberry extracts for response surface methodology analysis X_1: Concentration of ethanol; X_2: Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃)

	Conditions			
	X_1	X_2	X_3	ABTS (%)
1	25(-1)	6(-1)	20(-1)	85.53
2	75(1)	6(-1)	20(-1)	98.02
3	25(-1)	12(1)	20(-1)	93.33
4	75(1)	12(1)	20(-1)	93.11
5	25(-1)	6(-1)	40(1)	94.52
6	75(1)	6(-1)	40(1)	93.40
7	25(-1)	12(1)	40(1)	94.03
8	75(1)	12(1)	40(1)	92.93
9	0(-2)	9(0)	30(0)	92.59
10	100(2)	9(0)	30(0)	91.86
11	50(0)	3(-2)	30(0)	93.38
12	50(0)	15(2)	30(0)	94.09
13	50(0)	9(0)	10(-2)	92.20
14	50(0)	9(0)	50(2)	91.16
15	50(0)	9(0)	30(0)	99.31
16	50(0)	9(0)	30(0)	99.68
17	50(0)	9(0)	30(0)	98.35
18	50(0)	9(0)	30(0)	98.35
19	50(0)	9(0)	30(0)	99.74
20	50(0)	9(0)	30(0)	99.62

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY





조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

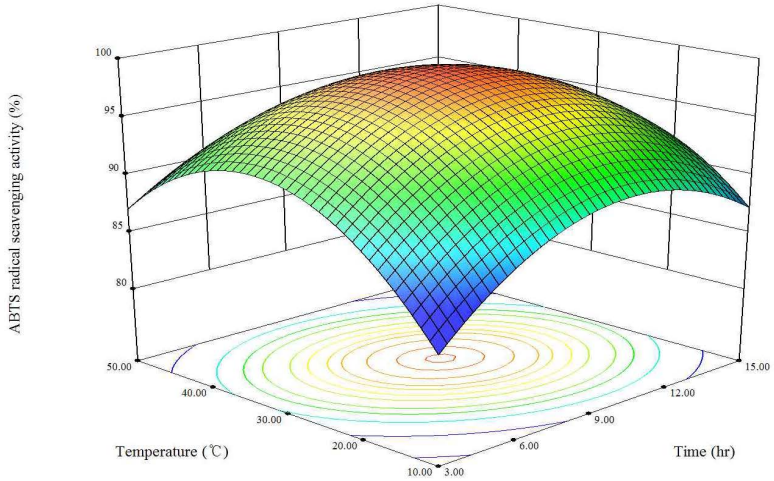


Figure 38. Response surface for the effects of ABTS radical scanvenging activity on blueberry extract.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(3) 아로니아 열매

중심합성법을 이용하여 계획된 실험 조건에 따른 반응 값은 Table 19에 나타냈다. 실험 값중 4(X_1: 75% X_2: 12 hr X_3: 20℃)번에서 가장 낮은 활성(57.26%)을 보였으며, 18(X_1: 50% X_2: 9 hr X_3: 30℃)번에서 최대 수율(98.53%)을 보였다. 실험결과는 회귀분석을 통하여 다음과 같은 2차 다항방정식 형태의 회귀식을 유도하였다.

$$Y = -130.460 + 2.561X_1 + 17.381X_2 + 6.184X_3 - 0.096X_1X_2 - 0.010X_1X_3 - 0.187X_2X_3 - 0.014X_1^2 - 0.431X_2^2 - 0.068X_3^2$$

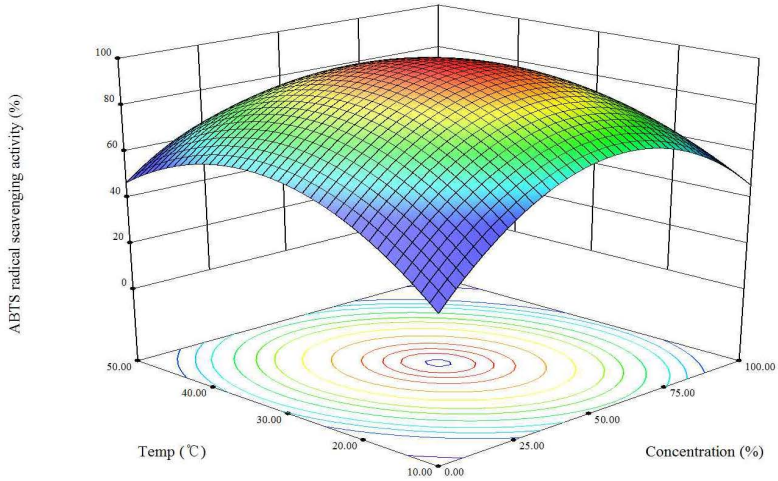
이를 토대로 3차원 반응 표면 분석을 실시하였고, Figure 38과 같은 결과를 얻었다. 통계학적 최적 조건을 구한 결과 53.57%, 7.37 hr, 31.43℃임을 예상할 수 있었고, 최대값은 98.63%임이 예상된다. 각각의 변수들인 추출 용매 농도(sum of square: 15.55, F-value: 1.27, p=0.287), 추출 시간(sum of square: 90.29, F-value: 7.36, p=0.022), 추출 온도(sum of square: 8.76, F-value: 0.71, p=0.418)중에서 추출 시간이 통계학적으로 유의함을 나타내었고, 본 실험에서 주요한 영향을 미치는 것으로 확인하였다.

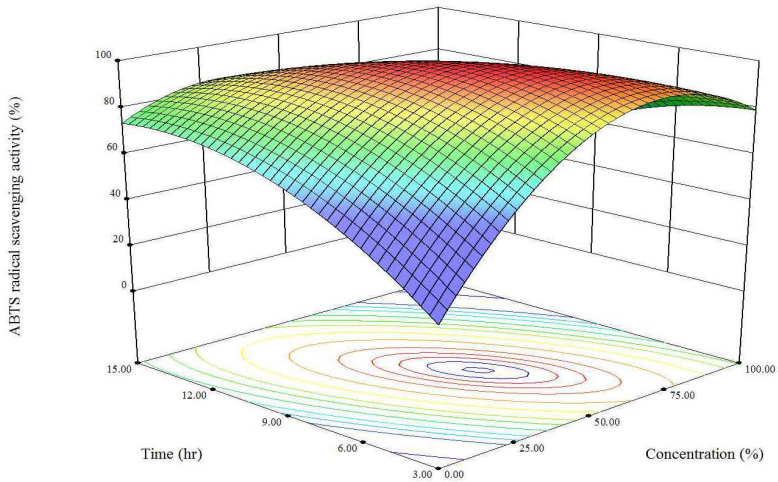
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 19. ABTS radical scavenging activity of black chokeberry extracts for response surface methodology analysis X_1: Concentration of ethanol; X_2: Extraction time(hr); X_3: Extraction temperature(℃)

	Conditions			
	X_1	X_2	X_3	ABTS (%)
1	25(-1)	6(-1)	20(-1)	84.75
2	75(1)	6(-1)	20(-1)	65.83
3	25(-1)	12(1)	20(-1)	98.31
4	75(1)	12(1)	20(-1)	57.26
5	25(-1)	6(-1)	40(1)	61.05
6	75(1)	6(-1)	40(1)	98.31
7	25(-1)	12(1)	40(1)	98.35
8	75(1)	12(1)	40(1)	70.79
9	0(-2)	9(0)	30(0)	93.92
10	100(2)	9(0)	30(0)	69.49
11	50(0)	3(-2)	30(0)	88.64
12	50(0)	15(2)	30(0)	85.77
13	50(0)	9(0)	10(-2)	98.15
14	50(0)	9(0)	50(2)	79.97
15	50(0)	9(0)	30(0)	74.94
16	50(0)	9(0)	30(0)	88.32
17	50(0)	9(0)	30(0)	70.26
18	50(0)	9(0)	30(0)	98.53
19	50(0)	9(0)	30(0)	84.24
20	50(0)	9(0)	30(0)	98.14

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY





조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

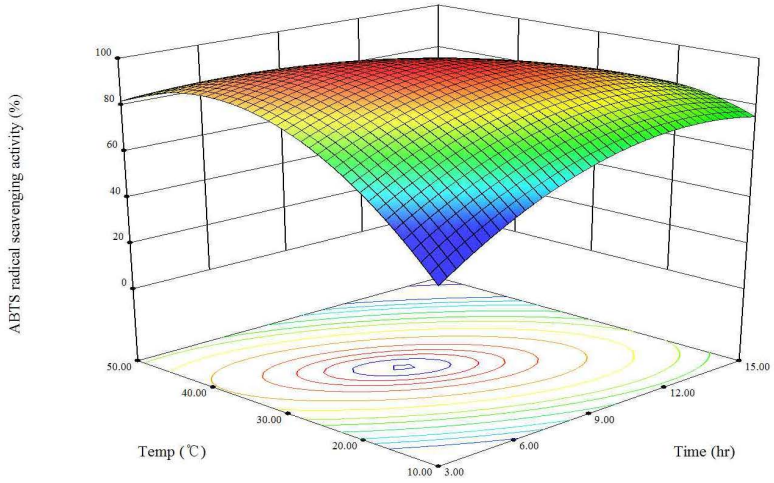


Figure 39. Response surface for the effects of ABTS radical scanvenging activity on black chokeberry extract

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 4장 결론

식물성 폴리페놀은 식물계에 널리 분포되어 있는 2 차 대사 산물로서 광합성에 의해 생성된 식물의 색소가 여기에 해당되며, 식물세포의 생성 및 활성화에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 폴리페놀의 다양한 생리활성 기능 중에서 인체의 산화를 방지하는 항산화능은 몸 안의 활성산소를 제거하고 지질과산화에 의한 인체의 순환기능 장애와 노화 등을 억제한다고 알려져 있다 [52]. 페놀계 합성 항산화제인 butylated hydroxtoluene(BHT) 및 butylated hydroxyanisole(BHA) 은 강력한 항산화능과 함께 경제성이 뛰어나 널리 사용되고 있지만, 인체에 여러 가지 유해성이 보고되고 있기 때문에 인체에 무해하고 항산화 효과가 높은 천연 항산화제를 찾는 것이 절실히 요구되고 있는 상황이다. 따라서 본 연구에서는 인체에 무해하고 항산화능이 높은 식물 유래의 폴리페놀을 찾고자 최근 강력한 천연 항산화능으로 사회적 이슈가 되고 있는 밀싹과 블루베리 열매, 아로니아 열매를 대상으로 각종 폴리페놀 화합물을 추출, 분리, 분석하였으며, 표면 반응 분석(RSM) 을 통해 3 가지 천연물의 폴리페놀의 최대 수율을 위한 최적 추출 조건과 최대 항산화능을 위한 최적 추출 조건을 확립하고자 하였다.

1. 밀싹, 블루베리 열매, 아로니아 열매의 HPLC 폴리페놀 성분 분석 결과, 밀싹 추출물 중 70% 가량이 chlorophyll 종류의 화합물로 확인되었

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

으며 폴리페놀 화합물보다 chlorophyll 종류의 화합물이 다량 함유 되어 있었다. 블루베리 열매는 anthocyanin 표준물질 yanidin-3,5-di-o-glucoside, cyanidin-3-o-galactoside, cyanidin-3-o-glucoside, cyanidin-3-o-rutinoside, delphinidin, cyanidin, pelargonidin, malvidin 이 검출되었고, 아로니아 열매는 cyanidin-3-o-galactoside, cyanidin-3-o-glucoside, cyanidin-3-arabinoside, cyanidin-3-xyloside 이 검출 되었다. 특히, 아로니아 열매는 cyanidin-3-o-galactoside 를 다량 함유하고 있는 것으로 확인되었다.

2. 밀싹, 블루베리 열매, 아로니아 열매의 추출물 대한 수율(% w/w)을 높이기 위해 RSM 을 사용하여 최적 Ethanol 농도 %, 추출시간 hr, 추출온도 ℃에 대한 추출물의 최대 수율을 확인하였다. 밀싹은 63.56%, 8.07 hr, 29.26℃에서 28.53%, 블루베리 열매는 53.49%, 10.18 hr, 33.53℃에서 99.13%, 그리고 아로니아 열매는 58.67%, 9.56 hr, 29.61℃에서 75.19%로 나타났다.

3. RSM을 사용하여 추출물에 포함된 2 가지 폴리페놀(gallic acid, quercetin)의 추출 최적 조건을 ethanol 농도 %, 추출시간 hr, 추출온도 ℃ 순으로 확인하였다. gallic acid 함량은 밀싹 49.43%, 8.63 hr, 27.86℃에서 120.14 mg/mL, 블루베리 열매 54.70%, 9.37 hr, 29.77℃에서 100.24 mg/mL, 아로니아 열매 62.38%, 8.33 hr, 30.95℃에서 100.34 mg/mL 이었다. quercetin 함량은 밀싹 49.51%, 8.64 hr, 27.89℃에서 109.29 mg/mL, 블루베리 열매는 55.91%, 10.76 hr, 24.11℃에서 106.81

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

mg/mL, 아로니아 열매는 61.29%, 8.72 hr, 29.05℃에서 110.67 mg/mL 이었다.

4. RSM을 사용하여 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능의 최대 활성을 위한 최적 폴리페놀 추출 조건을 확인하였다. DPPH 라디칼 소거능의 경우 밀싹은 48.35%, 7.85 hr, 26.00℃에서 87.21%, 블루베리 열매는 53.08%, 8.57 hr, 32.02℃에서 35.67%, 아로니아 열매는 47.63%, 8.88 hr, 30.45℃에서 67.20%이었다. ABTS 라디칼 소거능의 경우 밀싹은 45.96%, 8.05 hr, 28.39℃에서 99.40%로 나타났으며, 블루베리 열매는 54.18%, 8.96 hr, 29.70℃에서 99.40%, 아로니아 열매는 53.57%, 7.37 hr, 31.43℃에서 98.63%이었다.

본 연구에서는 천연물 분리 분석 시 폴리페놀 최대 수율 및 항산화능을 위한 최적 추출 조건을 RSM 을 통해 도출하였으며, 추후 여러 다양한 식물에 적용하여 폴리페놀의 수율을 증대시키고자 한다. RSM 실험결과 밀싹, 블루베리 열매, 아로니아 열매는 총 폴리페놀 함량이 매우 높은 것으로 확인되었으며, 매우 강력한 항산화 활성이 있음이 확인 되었다. 이와 같은 결과는 밀싹, 블루베리 열매, 아로니아 열매를 천연 항산화제 소재로 사용 및 개발할 수 있는 가능성을 시사하며, 추후 효소를 이용한 추출 방법이나 마이크로 웨이브(micro wave)를 이용한 추출 방법 또는 막(membrane) 분리를 통한 추출 방법 등을 이용하여 폴리페놀 추출의 최적 조건을 도출 할 필요가 있다고 생각되어 진다. 또한 RSM 의 독립변수를 변경하여 다른 조건에서의 폴리페놀의 수율 증대

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

와 항산화능을 높이기 위한 최적 조건을 예측하고 *In-vitro* 실험을 통해 검증할 필요가 있다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

참고문헌

[1] 농촌진흥청. (2011) 녹비작물 자원도감. 농촌진흥청 국립식량과학원.

[2] 농촌진흥청.광주 (2007).우리밀 싹을 이용한 가공식품의 개발

[3] 한국과학식품학회. (2012) 식품과학사전.(주)교문사.

[4] National Academy of Agricultural Science, RDA (2009) Tables of food functional composition first edition.

[5] http://cafe.naver.com/cancerproject/86 밀순즙 요법

[6] Art I. O. W. and Hollman P. C. H. (2005) Polyphenols and diseas e risk in epidemiologic studies. *Am. J. Cli. Nutri.* 81(suppl): 3178-32 58.

[7] Bezerra M. A., Santelli R. E., Oliveira E. P., Villar L. S., and Es caleiraL A. (2008) Response surface methodology as a tool for optimiza tion in analytical chemistry. *Talanta.* 76: 965-977.

[8] Cheynier V. (2005) Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am. J. Clin. Nutr.* 81(1 Suppl):223S-229S.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

[9] Choi M. H., M. J. Kim, Y. J. Jeon and H. J. Shin (2014) Quality Changes of Fresh Vegetable and Fruit Juice by Various Juicers *KSB B J.* 29(3): 145-154.

[10] D'Archivio M., Filesi C., Benedetto D. R., Gargiulo R., Giovannin i C., and Masella R. (2007) Polyphenols, dietary sources and bioavail ability. *Ann. Ist. Super Sanita'* 2007;43(4):348-361.

[11] Fraga C. G., Galleano M., Verstraeten S. V., and Oteiza P. I. (2 010) Basic biochemical mechanisms behind the gealth benefits of Pol yphenols. *Mol. Aspects Med.* 31(6):435-445.

[12] Gasiorowski K., Brokos B., and Tabaka H. (2000) Evaluation of the immunomodulatory activity of four compounds exerting antimuta genic effects on human lymphocytes *in vitro. Cell Mol. Biol. Lett.* 5: 469-481.

[13] Gulcin S. C., Reza R., and Francesco M. (2014) Chapter 43-Micr obial Metabolism of Polyphenols and Health. *Elsevier* Polyphenols in human health and disease 1, 577-589

[14] Henry B. S. (1992) Natural food colors. In Natural Food Coloran ts. Hendry G. A. F, Houghton J. D., eds. Blackie and Son Ltd., Glas

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

gow. 39

[15] Heo S. J., J. P. Kim, W. K. Jung, N. H. Lee, H. S. Kang, E. M. Jun, S. H. Park, S. M. Kang, Y. J. Lee, P. J. Park and Y. J. Jeon (2 008) Identification of Hemical Structure and Free Radical Scavenging Activity of Diphlorethohydroxycarmalol Isolated from a Brown Alga, *Ishige okamurae*, *J. Microbiol. Biotechnol.* 18 : 676-681

[16] Ichiyanagi T., Hatano Y., Matsuo S., and Konishi T. (2004) Sim ultaneous comparison of relative reactivities of twelve major anthocy anins in bilberry towards reactive nitrogen species. *Chem. Pharm. B ull.* 52(11):1312-1315

[17] Jankowski A., Niedworok J., and Jankowska B. (1999) The influ ence of *Aronia melanocarpa* elliot on experimental diabetes in the rat s. *Herb Polonica* 45:345-353.

[18] Jeon S. M., M. H. Choi, Y. J. Lee and H. J. Shin 2013. Anti-wri nkle effect of facial mask pack containing onion (Allium cepa) skin extr acts. *KSBB J.* 28: 387-393.

[19] Joseph J. A., Fisher D. R. and Bielinski D. (2006) Bluberry extr act alters oxidative stress-mediated signaling in GOS 7 cells transfe

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

cted with selectively vulnerable muscarinic receptor subtypes. *J. Alz heimers Dis.* 9:35-42

[20] Katsube N., Iwashita K., Tsushida T., Yamaki K., and Kobori M. (2003) Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry(*Vacciniu m myrtillus*) and the anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 51: 68-75

[21] Kaur C. and Kapoor H. C. (2001) Antioxidant in fruits and vege tables the milenium's health. *Int. J. Food Sci. and Technol.* 36: 703-725.

[22] Kim T. C., Bae K. S., Kim I. K., and Chun H. J. (2005) Antioxi dative activities of solvent extracts from blueberry. *Kor. J. Oriental Physiology & Pathology* 19(1): 179-183

[23] Kong J. M., Chia L. S., Goh N. K., Chia T. F., and Brouillard R. (2003) Review: Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64:923-933

[24] Lazzè M. C., Savio M., Pizzala R., Cazzalini O., Perucca P., Sco vassi A. I., Stivala L. A., and Bianchi L. (2004) Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines. *C arcinogenesis* 25(8): 1427-1433

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

[25] Lee S. H., Y. M. Lee, H. S. Lee, and D. K. Kim. (2009) Anti-oxidative and Anti-hyperglycemia Effects of Triticum aestivum Wheat Sprout Water Extracts on the Streptozotocin-induced Diabetic Mice. *Kor. J. Pharmacogn.* 40(4):408-414

[26] Lee H. S., (2011) Technical Develoment of the health biofunctional food for improving diabetes using the wheat sprout-derived materials. *농림수산식품* 194p

[27] Lee S. H. (2008) Data analysis of engineering statistics using minitab, revision, *Irentec Inc., Kunpo, ROK,* 647-778.

[28] Lee S. H., Lim S. W., Lee Y. M., Seo J. W., and Kim D. G. (2011) Inhibitory Effects of Triticum aestivum L. Extracts on Liver Lipid Accumulation in High Fat-Fed Mice *Kor. J. Pharmacogn.* 42(4): 309-316

[29] Manach C., Scalbert A., Morand C., Re´me´sy C., and Jime´nez L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79(5):727-747.

[30] Marozzoni P., and Magistretti M. J. (1990) Activity of Myrtocyan, an anthocyanoside complex from *Vaccinium myrtillus*(VMA), on pl

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

atelet aggregation and adhesiveness. *Fitoterapia* 61: 13-21

[31] Martin S., Giannone G., Andriantsitohaina R., and Martinez M. C. (2003) Delphinidin, an active compound of red wine, inhibits endot helial cell apoptosis via nitric oxide pathway and regulation of calciu m homeostasis. *Br. J. Pharmacol.* 139(6): 1095-1102

[32] Mazza G, and Minaiti E. Eds. (1993) Anthocyanins in fruits, veg etable, and grains. p. 362, *CRC Press, Boca Raton*

[33] M. Mune Mune, D. Saxena, and S. Minka (2014) Antioxidant ac tivity of cowpea protein isolate hydrolyzed by pepsin. *Acta Alimenta ria* 43(4): 614-622

[34] Niedworok J., Jankowska B., Kowalczyk E., Charyk K., and Kub at Z. (1997) Antiulcer activity of anthocyanin from *Aronia melanocar pa* Elliot. *Herba Polonica* 43:222-227.

[35] Ohgami K., Ilieva I., Shiratori K., Koyoma Y., Jin X., Yoshida K., Kase S., Kitaichi N., Suzuki Y., Tanaka T., and Ohno S. (2005) Anti-inflammatory effect of aronia extract on rat endotoxin-induced uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46:275-281.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

[36] Oszmianski J. and Sapis J. C. (1988) Anthocyanins in Fruits of *Aro nia melanocarpa* (Chokeberry), *J. Food Sci.* 53(4): 1241-1242.

[37] Rambach, G., Hagleitner, M., Mohsenipour I., Lass-Florl C., Mai er H., Wurzner R., Dierich M. P., and Speth C. (2005) Antifungal act ivity of the local complement system in cerebral aspergillosis. *Micro bes Infect.* 7, 1285 - 1295.

[38] Reed J. (2002) Cranberry flavonoids, atherosclerosis and cardiova scular health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42: 301-316

[39] Ronald L. P., Guohua C., Antonio M., Emin S., John M., Christi ne O. B., Neal L., Mark E., Willy K., Gerard K. C., and Mike M. (19 98) Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocy anin content, maturity, and variety of *Vaccinium species. J. Agric. F ood Chem.* 46: 2686-2693

[40] Ryu E. M., G. W. Seo, K. H. Kee and H. J. Shin (2013) Effect of ethanolic extraction from wheat sprout on hair growth of C57BL/ 6 mouse *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, 11(6):1051-1057

[41] Scalbert A, and Williamson G. (2000) Dietary intake and bioavai lability of Polyphenols. *J. Nutr.* 130(8S suppl):2073S-2085S.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

[42] Scalbert A, Johnson I. T. and Saltmarsh M. (2005) Polyphenols: antioxidant beyond. *Am. J. Cli. Nutri.* 81(suppl): 2158-2178.

[43] Skrede G., and Wrolstad R. (2002) Flavanoids from Beries and Grapes. In Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects, vo l. 2, Shi J., Mazza G., Le Maguer M., and Boca R. Eds., p. 71, *CRC Press, Boca Raton*

[44] Sueiro L., Yousef G. G., Seigler D., De Mejia E. G., Grace M. H., and Lila M. A. (2006) Chemopreventive potential of flavonoid ext racts from plantation-bred and wild *Aronia melanocarpa* (black chok eberry) fruits. *J Food Sci* 71:C480-C488.

[45] Tsao R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary Polypheno ls. *Nutrients* 2(12):1231-1246.

[46] Tsuneo T., and Akira T. (2001) Chemical components and chara cteristics of black chokeberry. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kai shi* 48:606-610.

[47] Vita J. A. (2005) Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothetial platelet function. *Am. J. Cli. Nutri.* 81(suppl): 2928-29

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

78.

[48] Wang J., and Mazza G. (2002) Effects of anthocyanins and othe r phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alp ha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *J. Agric. Food Chem.* 50(15): 4183-4189

[49] Yuodim K. A., McDonald J., Kalt W., and Joseph J. A. (2002) P otential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endotheli um vulnerability to oxidative and inflammatory insults. *J. Nutr. Bioc hem.* 13: 282-288

[50] Zheng W., and Wang S. Y. (2003) Oxygen Radical Absorbing C apacity of Phenolics in Blueberries, Cranberries, Chokeberries, and Li ngonberries. *J. Agric. Food Chem.* 51(2): 502-509

[51] Zhang X., Lu W., Yang P., and Cong W. (2008) Application of r esponse surface methodology to optimize the operation process for re generation of acid and base using bipolar membrane electrodialysis. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83: 12-19.

[52] Kim Y. J. (2009) Evaluation of antioxidant activity and thermal stability of plant Polyphenols. Bio. Res. 13(1): 30-36.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

감사의 글

어느덧 연구실에 들어 온지 3년이라는 시간이 지났습니다. 생활 하면서 마음가짐과 태도를 배우게 됩니다. 학부생 때부터 지금까지 연구실 생활을 같이 했던 오원정 박사님, 야구 좋아하는 김세원 박사님, 곧 품절남 대열에 합류할 최환석 박사님, 우리 연구실의 영원한 기둥인 최문희 박사님, 민명자 박사님, 학부생 동기인 김용운, 조우현, 학부생 후배였지만 지금은 같이 석사 졸업하는 김은지, 조하늘 동기들, 우리 연구실 유일한 공주님이었던 석사과정 조한교 후배, 품절남 대열에 합류한 김정훈 박사님, 지금도 열심히 공부하고 있는 연구실 학부생인 송용민, 김다송 등 여러 연구실 학부생들에게 고맙다고 전합니다. 지금은 은퇴하셨지만 일반화학실험 교수님으로 찾아오시는 김정규 교수님, '용조야! 이거 할 수 있지?' 라고 수업시간에 물어보셨던 이중헌 교수님, 깔끔한 ppt로 수업을 가르치셨던 이재욱 교수님, 그리고 저의 영원한 멘토이자 존경하는 지도교수님이신 신현재 교수님께 감사하다고 표현합니다. 부족한 부분을 채워주셔서 감사합니다. 새로운 인생이 시작 할 수 있게끔 도와주셔서 감사합니다. 빛이 보이지 않았던 터널이 이제 빛이 보이기 시작합니다. 빛을 볼 수 있게 도와주셔서 감사합니다. 대학교 입학 때부터 지금까지 제 공부 할 수 있도록 도와주신 우리 가족들에게 감사합니다.

2015년 8월

이 용 조