

Taguchi 법에 의한 흑목이버섯의 항산화활성 증진을 위한 열수추출 최적화

김현민 · 허 원 · 이신영*
강원대학교생물공학과

Optimization of Hot Water Extraction for Enhancing Antioxidative Activity from *Auricularia auricula* Using Taguchi Approach

Hyeon-Min Kim, Won Hur, and Shin-Young Lee*

Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University

Abstract

Optimization study of the hot water extraction for enhancing antioxidative activity from *Auricularia auricula* was performed by Taguchi approach using orthogonal matrix $L_9(3^3)$ method. The correlation between DPPH radical scavenging activity and the components of samples extracted from different extraction conditions were also analyzed. The correlation coefficient between DPPH radical scavenging activity and melanin content of *A. auricula* was 0.93, indicating 'good correlation'. The optimum extraction conditions were obtained at the extraction time of 1 hr, temperature of 85°C, solid: water ratio of 1: 40(w/v) and frequency of 2 times. Under these conditions, values of maximum DPPH free radical scavenging activity and melanin contents of *A. auricula* were 67.21 ± 2.17 and 52.94 ± 2.10 mg/g, respectively. Melanin content of 1.6 times and DPPH free radical scavenging effect of 130% were enhanced by optimization.

Key words: *A. auricula*, antioxidative activity, melanin, optimization, Taguchi method

서 론

흑목이버섯 열수추출물의 주성분은 다당이지만 이 조다당의 분획에는 흑갈색의 멜라닌 색소가 잔존하며, 항산화작용의 유효성분이었다(Kim et al., 2009a). 이는 열수추출물이 보습제 역할로서의 다당과, 항산화제로서의 색소가 적정 함유된 추출물로서, 다기능 소재로서의 가능성이 있음을 의미한다. 그러므로 다당, 색소 등 추출물로부터 얻어지는 각 성분들의 수율에 대한 추출최적화 및 추출성분과 항산화활성과의 상관관계분석을 통한 효율적 추출조건을 검토할 필요성이 있다고 판단되었다.

그동안 최적 추출조건에 대한 검토는 주로 하나의 변수를 고정시켜 놓고, 다른 여러 변수들을 차례로 변화시키는 방법(one-factor-at-a-time method)에 의해 이루어졌다(Montgomery, 2001). 하지만 이 방법은 변수들의 상호작용 및 중요변수에 대한 해석이 불가능하고 실험횟수가 매우

많아지는 단점이 있다.

최근에는 이들 단점을 극복하기 위해 반응표면분석법, 혼합물분석법, Taguchi 법등의 통계적 실험법이 널리 이용되고 있다. 혼합물실험법은 버섯 배지의 최적화에 일부 이용되었고, 버섯 배양공정이나 추출공정의 최적화에는 주로 반응표면분석법이 널리 이용되었다(Hou & Chen, 2008; Lee et al., 2008; Li et al., 2010; Liu et al., 2011; Rispoli & Shah, 2007; Youn et al., 2006).

반면, 직교배열법의 원리를 이용한 Taguchi(1986)법은 버섯 액체배양의 배지조성이나 배양조건 최적화에 응용되었다(Changa et al., 2006; Kim et al., 2005; Prasad et al., 2005). 이 Taguchi 법은 실험적 오차를 줄여주며, 적은 실험횟수로 추출요인의 기여도 및 상호관계, 그리고 최적 추출조건을 확립할 수 있어, 각종 재료의 추출공정에 널리 사용되었다(Esakandari Nasab et al., 2011; Houg et al., 2006; Prasad et al., 2005; Wang et al., 2011). 따라서 버섯 자실체나 균사체의 경우도 검토의 필요성이 높지만 버섯 자실체의 추출공정 최적화에 시도된 바는 없다

이상의 사실들을 토대로 본 연구에서는 Taguchi 법을 이용한 흑목이 버섯 자실체로부터 항산화활성을 극대화할 수 있는 추출최적화를 실시함으로써 궁극적으로 흑목이 버섯 추출물의 기능성 소재화 자료를 마련하고자 하였다.

*Corresponding author: Shin-Young Lee, Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea

Tel: +82-33-250-6273 ; Fax: +82-33-243-6350

E-mail: sylee@kangwon.ac.kr

Received May 24, 2011; revised July 9, 2011; accepted July 11, 2011

Table 1. Variables and their levels employed in the Taguchi's robust design method for optimal extraction from fruit body of *Auricularia auricula*.

Factors	Level 1	Level 2	Level 3
Temperature (°C)	75	85	95
Time (hr)	1	3	5
Solid: Water ratio (v/v)	1:20	1:30	1:40
Frequency	1	2	3

재료 및 방법

재료

본 연구의 재료는 중국 길림성 산의 건조된 흑목이 버섯이며, 중국에서 직접 구입한 것을 (주)화인코로부터 제공받아 사용하였다. 건조 시료는 분쇄기(Hanil Co., HMF-390, Incheon, Korea)로 분쇄하여 분말(100 mesh)화하였고, desiccator에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

실험 설계

흑목이 버섯 자실체의 열수추출 최적화를 위해 증류수를 사용하여 Table 1에서와 같이, 3 수준(low, mediu and high level), 4 요인(온도, 시간, 용매비, 횟수)의 Orthogonal matrix $L_9(3^4)$ 법에 따라 추출하고, 각종 반응변수를 측정하였다. 이 때, 추출물의 반응변수(Y_n)로서는 추출수율(Y_0), 유효다당의 함량(Y_1), 총 페놀함량(Y_2), 조 단백 함량(Y_3), 멜라닌 함량(Y_4) 및 DPPH 라디칼 소거 활성(Y_5)으로 하였다.

이 때, 직교배열, 자료분석 및 분산분석(ANOVA)은 Taguchi 법에 기초하여 MINITAB® 15 software(Minitab Inc.)를 사용하였다.

열수 추출 및 추출물 수율의 측정

흑목이 버섯의 건조 자실체(100 mesh) 적당량(4 g)을 취하고 여기에 적정 용매비(1:20~1:40)의 용매(증류수)를 넣고 서로 다른 온도(75~95°C)에서 적정시간(1~5 시간) 동안 항온수조에서 환류추출하였다. 추출액은 12,000×g에서 20 분 간 원심분리 하였으며, 상등액의 3 배량 ethanol을 가한 다음 생성된 침전물을 건조하고 무게를 칭량하여 추출물의 추출수율로 하였다.

추출물의 성분 분석

추출물의 다당 함량은 Ebarandu 등(2005)의 비색법에 따라 glucomannan의 함량으로 측정하였으며, 총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 방법(Slinkard & Singleton, 1977)에 따라 측정하였고, 단백질 함량은 Lowry 법(1951)에 따라 측정하였다.

또, 멜라닌 함량은 시료를 0.5 mg/mL 농도로 제조하여 분광광도계(UV-Vis spectrophotometer, Varian Cary1E, Sydney, Australia)를 이용하여 230 nm에서의 흡광도를 측정하였으며,

미리 합성 멜라닌(synthetic dopa melanin, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 농도별로 제조하여 얻은 표준곡선으로부터 함량을 산출하였다.

DPPH 라디칼 소거 활성 측정

시료의 DPPH 라디칼 소거활성은 Blois의 방법(1958)을 일부 변형하여 측정하였다. 1 mg/mL 농도의 시료 0.2 mL에 4×10^{-4} M 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma Co., St. Louis, MO, USA) 용액 0.8 mL를 가하여 10 초 동안 진탕하고 상온에서 10 분간 방치한 후 517 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이때, 라디칼 소거활성은 무첨가구(A)와 시료첨가구(B)의 흡광도 차이를 다음 식에서와 같이 전자공여능(electron donating ability; EDA)을 계산하여 백분율로 표시하였다.

$$EDA (\%) = \frac{A-B}{A} \times 100$$

결과 및 고찰

추출물 수율 및 DPPH 라디칼 소거능에 미치는 추출조건의 영향

버섯의 자실체를 이용한 추출물의 생산은 주로 용매추출 공정에 의해 이루어지며, 사용 용매로는 증류수, 에탄올, 메탄올 등이 쓰인다. 하지만 공정의 경제성, 환경 및 안전성을 고려할 때, 증류수가 보편적으로 사용되고 있으며, 이 때, 버섯으로부터 최대 수율의 추출물과 함께 최대의 생물활성을 지니기 위한 공정은 경제성 있는 생산에서 매우 중요하다.

이들 고체-액체 추출에서 고려되는 주요 영향인자는 용매의 종류와 비율, 추출시간, 추출 온도 및 추출횟수 등이며, 최대의 생물학적 활성이나 추출 수율을 얻기 위해서는 이들의 적정조건을 조사하여야 한다.

따라서 흑목이 버섯의 건조 자실체를 시료로 물을 용매로 사용해 추출 용매비, 시간, 온도 및 횟수의 영향을 Taguchi 법(Taguchi, 1986)을 이용하여 다음과 같이 비교, 검토하였다.

즉, 흑목이버섯 자실체로부터 최적추출에 유용한 용매로 증류수를 이용하여 열수추출하고자 하였고, 열수추출에 의한 최적화는 추출온도, 추출시간, 용매비 및 횟수의 4 인자에 대해 3 수준의 $L_9(3^4)$ orthogonal matrix 법을 사용하였다.

이상을 고려하여 Table 1과 같이 9 개 처리조합에 따른 각각의 조건에서 추출물의 수율과 DPPH 라디칼 소거 활성을 조사하였으며, 그 결과는 Table 2와 같다.

추출물 수율은 각 인자의 수준에 따라 7.6 ± 0.08 ~ $17.95 \pm 0.54\%$ 범위로 각 조건에서의 수율변화가 매우 컸으며, 평균 수율은 $12.99 \pm 0.98\%$ 이었다. 1 mg/mL 농도의 각 추출물 DPPH 라디칼 소거활성도 30.12 ± 0.05 ~ $59.00 \pm 0.33\%$ 범위로

Table 2. $L_9(3^4)$ orthogonal array of Taguchi design of experiments and corresponding extraction from fruit body of *Auricularia auricula*.

Trial No.	A	B	C	D	Extraction yield (%)	Electron donating ability (%)
1	1	1	1	1	7.9±0.08	39.20±0.54
2	1	2	2	2	11.1±0.35	41.00±0.12
3	1	3	3	3	13.8±0.28	45.32±0.15
4	2	1	2	3	12.45±1.03	59.00±0.33
5	2	2	3	2	11.55±0.48	58.00±1.25
6	2	3	1	1	14.1±0.54	42.21±0.65
7	3	1	3	2	14.5±0.18	56.00±0.18
8	3	2	1	3	17.95±0.84	30.12±0.05
9	3	3	2	1	13.55±0.10	32.35±2.13

처리조건에 따라 약 2 배 활성의 차이를 보였으며, 평균 44.8%의 활성을 나타내었다. 즉 No. 8 처리구에서는 최소의 DPPH 라디칼 소거활성(30.12±0.05%) 및 최대의 추출물 수율(17.95±0.84%)을 보인 반면, No. 4 처리구에서는 최대의 DPPH 라디칼 소거활성(59.00±0.33%)을 보였고, 이 때의 추출물 수율은 12.45±1.03%로 평균값의 함량 수준이었다.

이들 추출물 수율과 DPPH 라디칼 소거 활성으로 나타낸 항산화 활성의 추출조건에 따른 영향 정도를 살펴보기 위해 Orthogonal matrix 법에 의거하여 각 인자들의 효과를 계산하였으며, 그 결과는 Table 3과 같다.

각 인자수준(Ai)에서의 수율(K_i^A) 및 단위수준 당 k_i^A 값, 즉 $k_i^A (=K_i^A/3)$ 으로부터 최대 k_i^A 와 최소 k_i^A 의 차이값(R_i^A)을 구하여 인자효과의 크기를 검정하였다.

그 결과, 추출물수율은 temperature (45±1.41%) > frequency (40±2.09%) > time (11±1.59%) > solid : water ratio (3±1.91%)의 순서로 영향을 받았다. 반면, DPPH 라디칼 소거능은 solid:water ratio (31±1.73%) > frequency (27±0.41%) > temperature (26±1.11%) > time (16±0.28%)의 순서로 영향을 받았다.

또, 각 인자의 최적 수준을 k_i^A 값에 의해 검정한 결과, 역시 Table 3에서 보는 바와 같이, 추출물의 수율에서의 optimal level은 추출온도 3 수준(95°C), 추출횟수는 3 수준(3 회), 추출시간 3 수준(5 시간)이었으며, 용매비는 추출 수율에 거의 영향을 주지 않았다. 반면, DPPH 라디칼 소거능은 추출온도 2 수준(85°C), 용매비는 3 수준(1:40), 추출 횟수는 2 수준(2 회)에서 최적수준을 나타내었다.

한편, Fig. 1은 각 인자별로 k_i^A 값을 도시한 결과이다. 수율은 온도 및 추출횟수의 증가에 따라 증가하는 경향을 보인 반면, 추출시간 및 용매비는 각 인자수준에 거의 영향을 받지 않았다. 따라서 실험범위에서 용매비에 무관하며, 추출시간의 경우는 1, 3 및 5 시간에서 큰 차이를 보이지 않아 생산 공정 시 최적 추출 조건으로 1 또는 3 시간이 더 경제적임을 보였다. 반면, DPPH 라디칼 소거활성은

Table 3. Analysis of electron donating activity and extraction yield from the fruit body of *Auricularia auricula* with the Taguchi's robust design.

Extraction yield	Temperature	Time	Solid : water ratio	Frequency
K1	32.75±0.55	37.30±0.95	40.20±0.38	35.00±0.91
K2	39.55±1.56	40.85±0.45	39.60±1.28	36.60±1.20
K3	46.80±0.94	40.95±0.71	39.30±0.28	47.50±0.89
k1	10.92±0.18	12.43±0.32	13.40±0.13	11.67±0.30
k2	13.18±0.52	13.62±0.16	13.23±0.43	12.20±0.40
k3	15.60±0.31	13.65±0.24	13.16±0.09	15.83±0.30
R	4.68±0.50	1.20±0.08	0.37±0.22	4.17±0.60
Optimal level	3	3	1	3
Percentage contribution (%)	45±1.41	11±1.59	3±1.91	40±2.09

Electron donating activity	Temperature	Time	Solid : water ratio	Frequency
K1	125.52±0.45	154.20±1.57	111.53±0.25	113.76±0.17
K2	159.21±0.91	129.12±0.35	132.35±1.08	155.00±1.23
K3	118.47±0.53	119.88±0.03	159.32±1.05	134.44±0.84
k1	41.84±0.15	51.40±0.52	37.18±0.08	37.92±0.05
k2	53.07±0.30	43.04±0.12	44.12±0.36	51.67±0.41
k3	39.49±0.18	39.96±0.01	53.11±0.35	44.81±0.28
R	13.58±0.02	8.36±0.08	15.93±0.18	13.75±0.16
Optimal level	2	1	3	2
Percentage contribution (%)	26±1.11	16±0.28	31±1.73	27±0.41

$K_i^A = \sum \text{extraction yield or electron donating activity at } A_i$

$k_i^A = K_i^A / 3$

$R_i^A = \max\{k_i^A\} - \min\{k_i^A\}$

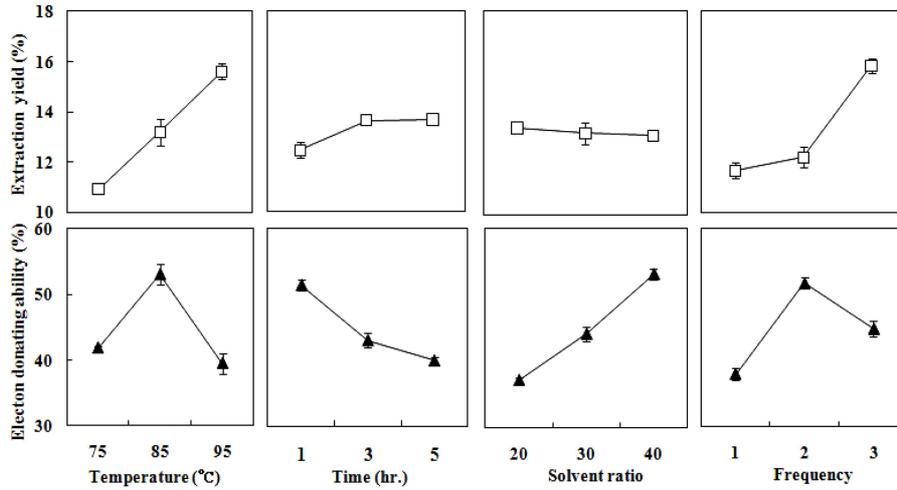


Fig. 1. Intuitive analysis of relationship between levels and extraction yield, electron donating yields.

추출시간의 증가에 따라 감소되고, 용매비의 증가에 따라 증가하는 것으로 나타났는데, 추출 온도 및 추출 횟수는 최적 값이 존재하여 중간 온도(85°C) 및 중간 횟수(2 회)에서 가장 높은 활성을 나타내었다.

이와 같이, 수율과 DPPH 라디칼 소거 활성의 인자 효과는 서로 차이를 보였으므로, 추출 목표에 따라 서로 다른 조건을 설정하는 것이 중요한 것으로 생각되었다. 그러나 두 가지를 동시에 만족시키는 적정 조건을 선정할 경우는 1) 추출물의 수율은 추출온도(45%)와 횟수(40%)가 85%이상의 영향을 준 반면, DPPH 라디칼 소거활성은 용매비(31%), 횟수(27%) 및 추출온도(26%)에 영향을 받았으며, 이들의 영향은 전체의 84%이었다는 점, 2) 추출수율의 경우는 용매비에 무관하고 추출시간은 low 혹은 intermediate 수준에서 더 높다는 점, 3) 추출수율에서는 용매비와 추출시간의 인

자효과 크기의 순위가 낮다는 점을 고려할 때 용매비 및 추출시간은 항산화 활성의 조건 즉, 1:40과 1 시간이 최적으로 생각되었다.

따라서 추출온도 85~95°C에서 용매비 1: 40으로 추출시간 1 시간 동안 2~3 회로 추출함으로써 최대의 항산화활성 및 수율을 갖는 추출물을 얻을 수 있다고 판단하였다.

이상의 추출 수율 및 DPPH 라디칼 소거능에 대한 ANOVA 분석 결과는 Table 4에서 보는 바와 같이 $p < 0.05$ 에서 유의성이 있었다.

추출물 조성에 미치는 추출조건의 영향

각 처리구에서 얻어진 추출물 분획으로부터 glucomannan, 총 폴리페놀, 조단백질 및 멜라닌함량을 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 2와 같다. Glucomannan은 $27.13 \pm 1.88 \sim 48.13 \pm$

Table 4. Variance analysis for crude polysaccharide yield and component contents.

Variance source	Sum of square (SS)	Degree of freedom (DF)	Mean square (MS)	Extraction yield	
				F	P
Temperature	32.912	2	16.456	235.08	0.004
Time	2.882	2	1.441	20.58	0.046
Frequency	38.127	2	19.063	272.33	0.004
Error	0.140	2	0.070		

$S = 0.264575, R^2 = 99.81\%, R^2(\text{adjustment}) = 99.24\%$

Variance source	Sum of square (SS)	Degree of freedom(DF)	Mean square (MS)	Electron donating ability	
				F	P
Temperature	316.05	2	158.03	20.32	0.047
Solid:water ratio	210.25	2	105.12	13.52	0.069
Frequency	382.75	2	191.37	24.61	0.039
Error	15.55	2	7.78		

$S = 2.78867, R^2 = 98.32\%, R^2(\text{adjustment}) = 93.27\%$

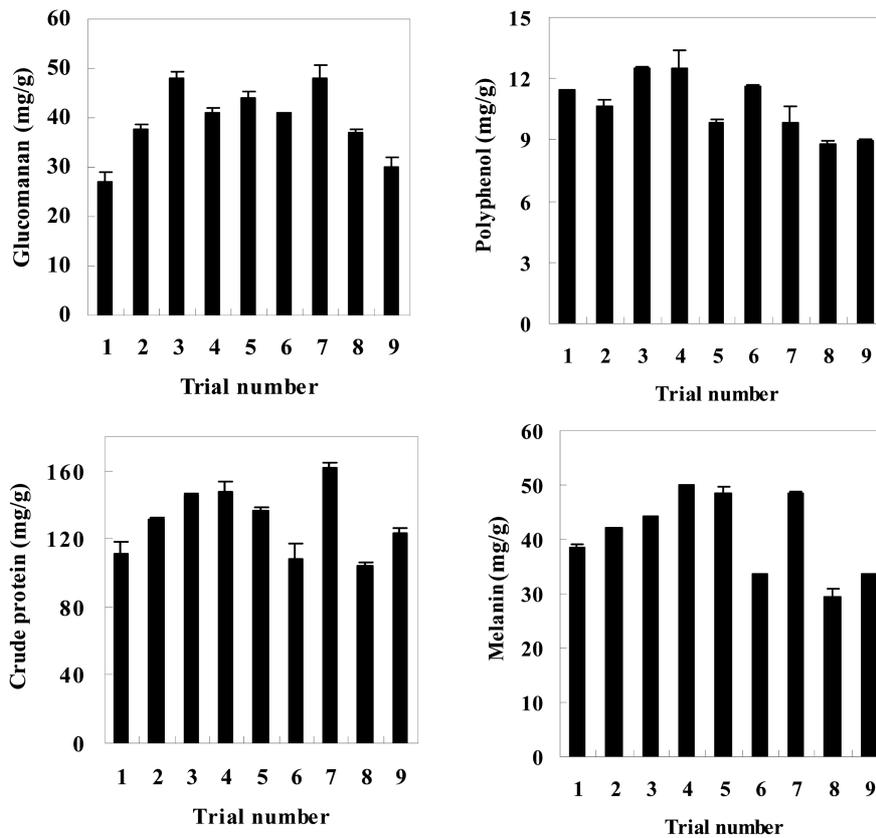


Fig. 2. Comparisons of components from the fruit body of *Auricularia auricula* by water extraction with different factors and their levels.

1.25 mg/g 범위로 평균 35.21 mg/g 이었으며, 총 폴리페놀의 함량은 $8.83 \pm 0.14 \sim 12.53 \pm 0.84$ mg/g 범위로 평균 10.68 mg/g 이었고, 조단백질 함량은 $104.54 \pm 2.05 \sim 161.48 \pm 3.11$ mg/g 범위로 평균 130.20 mg/g이었다. 또, 멜라닌 함량은 $29.29 \pm 1.47 \sim 49.93 \pm 0.09$ mg/g으로 평균 40.91 mg/g이었다. 따라서 폴리페놀을 제외한 모든 성분의 함량은 각 처리구에 따라 값의 차이가 매우 컸는데, 각 성분에 대한 각 인자 효과의 크기 순서를 R 값으로 검정한 결과는 Table 5와 같고, R 값에 근거한 각 인자의 기여도 비율(%)는 Fig. 3과 같다.

Glucomannan 경우는 solid:water ratio ($44.14 \pm 1.33\%$) > temperature ($16.66 \pm 0.38\%$) > frequency ($15.56 \pm 0.60\%$) > time ($4.00 \pm 1.11\%$)의 순서로 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 폴리페놀의 경우에는 temperature ($47 \pm 0.43\%$) > time ($21 \pm 1.77\%$) = frequency ($21 \pm 0.45\%$) > solid:water ratio ($11 \pm 1.79\%$)의 순서로 영향을 주었다. 조단백질의 경우에는 solid : water ratio ($39 \pm 0.21\%$) > frequency ($30 \pm 0.52\%$) > time ($27 \pm 1.12\%$) > temperature ($4 \pm 0.44\%$)의 순서였으며, 멜라닌의 경우에는 solid : water ratio ($34 \pm 1.02\%$) > frequency ($28 \pm 1.32\%$) > time ($21 \pm 0.51\%$) > temperature ($17 \pm 1.12\%$)의 순서로 4가지 인자가 유사한 영향을 주는 것으로 나타났다.

각 성분들의 k_p^A 값에 의해 검정한 결과 얻어진 최적수준은 역시 Table 5와 같고, k_p^A 값을 각 인자별로 도시하여 Fig. 4로 나타내었다.

각 성분의 optimum level은 glucomannan의 경우, 추출온도 85°C, 용매비는 1:40, 추출횟수는 3 회이었으며, 시간은 함량에 크게 영향을 주지 않았고, 특히, 용매비가 1:20, 1:30인 경우, 거의 glucomannan의 함량에 변화가 없었으나 1:40일 때 함량이 크게 증가하는 것으로 나타났다.

총 폴리페놀은 추출온도 75°C, 추출시간 5 시간, 용매비는 1:20, 추출횟수는 3 회이었으며, 추출온도를 제외한 3 가지 인자가 수준에 따라 거의 큰 변화를 주지 않았다. 하지만 추출온도의 경우, 온도가 증가할수록 총페놀함량은 감소하는 것으로 나타났다.

조단백질과 멜라닌의 경우, 추출온도 85°C, 추출시간 1 시간, 용매비는 1:40, 추출횟수는 2 회에서 최대의 함량을 얻을 수 있는 것으로 나타났다. 조단백질의 함량은 온도에는 영향을 거의 받지 않았으며, 용매비가 증가할수록 증가하는 것으로 나타났다. 멜라닌 함량은 75-85°C일 때 일정하다가 95°C일 때 감소되었으며, 용매비가 증가할수록 증가하는 것으로 나타났다. 또한 추출시간이 길어질수록 오히려

Table 5. Analysis of components for extraction from the fruit body of *Auricularia auricula* with the Taguchi's robust design.

	Glucomannan				Polyphenol			
	A	B	C	D	A	B	C	D
K1	112.89±0.75	115.89±1.75	105.14±1.25	98.14±0.87	35.05±0.45	32.25±1.57	32.11±0.25	32.18±0.17
K2	125.64±0.37	118.64±0.87	108.64±0.13	129.39±1.63	33.06±0.91	29.90±0.35	32.04±1.08	30.08±1.23
K3	115.14±0.25	119.14±0.25	139.89±0.25	126.14±0.89	27.15±0.53	33.09±0.03	31.09±1.05	32.99±0.84
k1	37.63±0.18	38.63±0.32	35.05±0.42	32.71±0.41	11.68±0.15	10.75±0.52	10.70±0.08	10.72±0.05
k2	41.88±0.25	39.55±0.39	36.21±0.08	43.13±0.54	11.02±0.30	9.96±0.12	10.68±0.36	10.03±0.41
k3	39.71±0.12	39.71±0.63	46.63±0.09	42.05±0.29	9.05±0.18	11.03±0.01	10.36±0.35	10.99±0.28
R	4.25±0.37	1.08±0.48	11.58±0.37	9.33±0.04	2.64±0.02	1.19±0.08	0.60±0.18	1.00±0.16
Optimal level	2	3	3	2	1	3	1	3

	Crude protein				Melanin			
	A	B	C	D	A	B	C	D
K1	387.97±1.58	419.79±1.34	323.99±2.25	342.60±0.83	124.61±0.45	136.85±1.57	101.35±0.25	105.63±0.17
K2	393.07±0.21	373.30±0.79	402.52±1.23	430.24±1.23	132.20±0.91	119.97±0.35	125.5±1.08	139.18±1.23
K3	389.16±1.73	377.11±1.29	443.69±0.81	397.35±0.84	111.37±0.53	111.38±0.03	141.27±1.05	123.37±0.84
k1	129.32±0.21	139.93±0.52	107.99±0.08	114.20±0.42	41.54±0.15	45.61±0.52	33.78±0.08	35.21±0.05
k2	131.02±0.07	124.43±0.12	134.17±0.36	143.41±0.62	44.07±0.30	39.99±0.12	41.85±0.36	46.39±0.41
k3	129.72±0.18	125.70±0.01	147.90±0.35	132.45±0.38	37.12±0.18	37.13±0.01	47.09±0.35	41.12±0.28
R	1.70±0.34	15.49±0.59	39.90±0.18	29.21±0.52	6.94±0.02	8.49±0.08	13.31±0.18	11.18±0.16
Optimal level	2	1	3	2	2	1	3	2

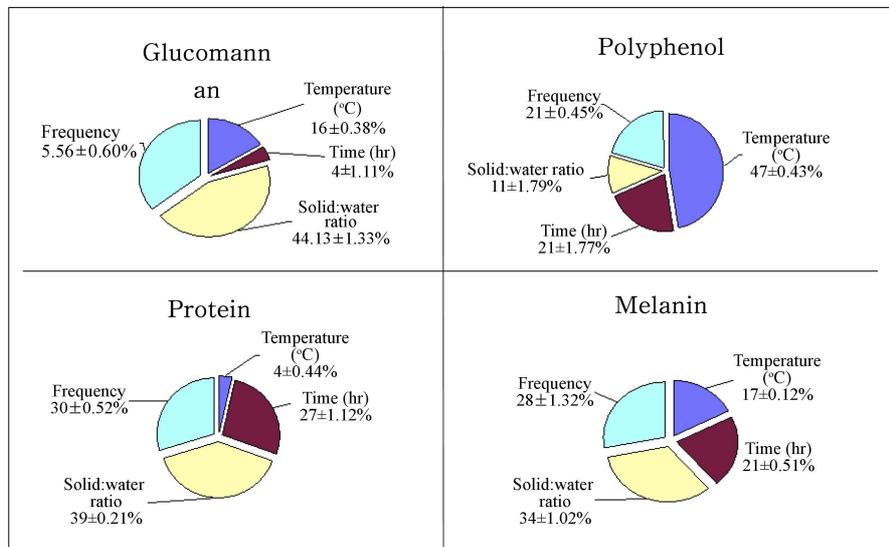


Fig. 3. Contribution of four factors on components of hot water extract and extraction yields from the fruit body of *Auricularia auricula*.

려 멜라닌 함량이 낮아지는 것으로 나타났다.

추출물 성분과 DPPH 라디칼 소거 활성에 대한 상관관계 분석

후목이 버섯 시료의 DPPH 라디칼 소거능과 glucomannan, 총 폴리페놀, 조 단백질, 멜라닌 등의 조성성분 함량들 사이의 관계를 알아보기 위하여 Taguchi 법에 의한 각 처리구의 DPPH 라디칼 소거능과 각 성분들의 함량 사이의 상관관계를 조사하였다. 그 결과는 Fig. 5와 같으며, 상관관계수 r 값으

로 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거 활성과 각 성분들의 변수 사이에는 양(positive)의 상관관계가 있음을 보였다. 변수들의 상관관계수는 폴리페놀의 경우, 0.163으로 매우 낮은 상관관계를 보였으며, glucomannan 및 조 단백질의 경우 각각 0.637 및 0.603으로 보통의 상관관계(average correlation)를 보였다. 반면, 멜라닌은 0.933으로 양호한 상관관계(good correlation)를 보였다. 이는 앞의 실험결과에서 멜라닌함량과 DPPH

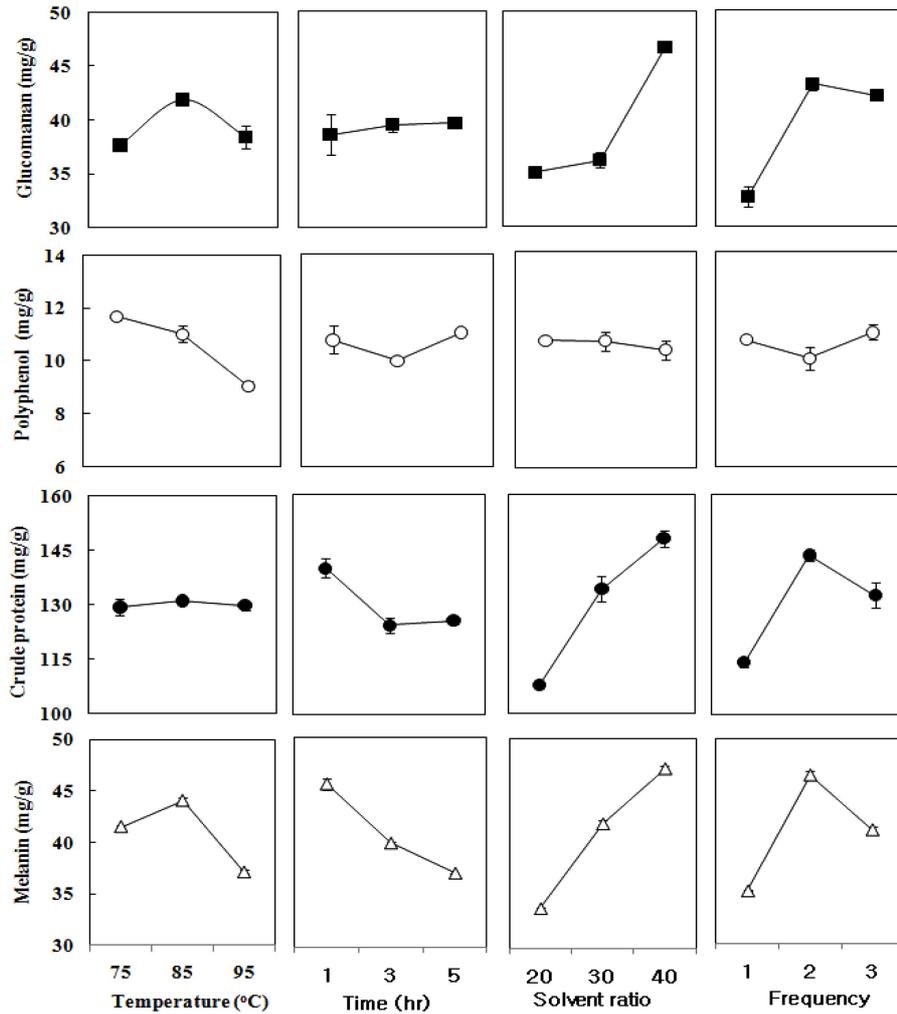


Fig. 4. Intuitive analysis of the relationship between levels and component contents (glucumaman, total polyphenol, crude protein and melanin).

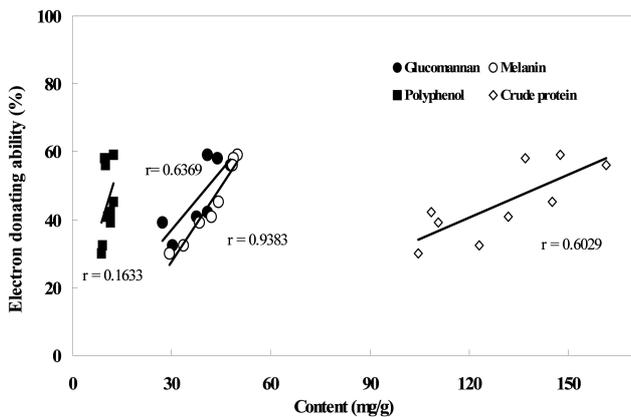


Fig. 5. Correlation analysis between component (glucumaman, melanin, polyphenol, crude protein) content and DPPH radical scavenging activity for water extracts of fruit body of *Auricularia auricula*. R (coefficient of correlation) < 0.6: weak correlation, 0.6 ≤ r ≤ 0.8: average correlation, r > 0.8: good correlation.

라디칼 소거능의 최적 추출조건이 같았던 결과와 일치하며, DPPH 라디칼 소거활성이 멜라닌에 의존함을 보여주는 결과이다. 또 다당이나 단백질에서의 보통의 상관관계는 멜라닌이 이들 과 복합체를 형성하는 것에 기인한다고 생각된다.

일반적으로 멜라닌은 유리 상태로 존재하는 것 이외에 단백질이나 다당과의 복합체를 형성하는 것으로 널리 알려져 있다(Kim et al., 2009b).

이상으로부터 DPPH 라디칼 소거능의 최대값은 멜라닌의 최대 함량의 추출조건으로부터 얻을 수 있음을 알 수 있었다. 이미 서술한 바와 같이, 멜라닌 함량과 DPPH 라디칼 소거능의 최적 추출조건은 둘 다 추출온도 85°C, 추출시간 1 시간, 용매비 1:40 및 추출횟수 2 회에서 최적이었다. 이때, 멜라닌의 함량은 55.4 mg/g 이었고, DPPH 라디칼 소거활성은 69.58% 이었으며, 추출물의 수율은 12.08% 이었다.

이들 계산값의 검정을 위해 상기의 최적 조건에서 실험한 결과, 추출물 수율의 실험값은 12.20±1.03%, 멜라닌 함량은 52.94±2.10 mg/g 및 DPPH 라디칼 소거활성은

Table 6. Comparison of extraction yield, component content and DPPH radical scavenging activity of extracts from *A. auricula* fruit body before and after optimization.

Extraction condition		Extraction yield (%)	Glucomannan content (mg/g)	Melanin content (mg/g)	DPPH radical scavenging activity (%) *
Before optimization	95°C, 5 hr. 1:20, 3 times	18.60	39.88	32.65	36.90
After optimization	85°C, 1 hr. 1:40, 2 times	12.20	43.86	52.94	67.21

* Concentration : 1 mg/mL sample

67.21±2.17%로 비교적 계산값과 잘 일치하였다. 이들의 $RMS(=100 \times \sqrt{\sum((\text{exp.-pred.}/\text{exp.})^2/N)}$ 값을 계산한 결과, 추출물 수율, 멜라닌 함량, DPPH 라디칼 소거활성의 RMS는 각각 0.98, 4.74 및 3.52%로, 모두 10%이내에서 적합하였다.

이와 같이 얻어진 최적 값들을 앞선 실험의 추출조건(95°C, 5 시간, 1:20 용매비, 3 회 추출)에서의 값들과 비교하여 Table 6에 나타내었다.

추출물 수율의 경우 앞선 실험의 추출조건에서의 값(18.60%)에 비해 최적조건하에서는 12.99±0.98%로 수율이 감소되었으나 glucomannan 및 멜라닌 함량(39.88 mg/g 및 32.65 mg/g)은 43.86 및 52.94 mg/g으로 증가하였고, 특히 멜라닌함량은 1.6 배나 증가된 결과 이었다. 또한 DPPH 라디칼 소거활성은 약 30% 증가된 결과이었다.

결 론

흑목이 버섯의 색소와 항산화활성의 관계를 조사하고 항산화 색소의 최적추출조건을 검토하였다. 흑목이버섯으로부터 Taguchi 법에 의해 추출최적화 실험을 수행한 결과, 추출물성분 중 멜라닌 성분이 항산화활성과 매우 양호한 상관관계($r=0.93$)를 나타내었다. 이들의 최적추출조건은 추출온도 85°C, 추출시간 1 시간, 용매비 1:40 및 추출횟수 2 회이었다. 이들 조건하에서 계산된 멜라닌 함량은 55.45 mg/g, DPPH 라디칼 소거 활성은 69.58%이었다. 동일 조건하의 실험값은 추출물의 수율에서 12.20±1.03%, 멜라닌 함량에서 52.94±2.10 mg/g, 그리고 DPPH 라디칼 소거 활성에서 67.21±2.17%로 비교적 예측 값과 잘 일치하였다. 앞선 실험의 추출조건(추출온도 95°C, 추출시간 5 시간, 용매비 1:20 및 추출횟수 3 회)에서 추출물 수율값(18.60%)에 비해 최적조건하에서는 12.20%로 수율이 감소되었으나 glucomannan 및 멜라닌 함량(39.88 및 32.65 mg/g)은 43.86 및 52.94 mg/g으로 증가되었고, 특히 멜라닌 함량은 1.6 배 증가하였다. 또 DPPH 라디칼소거활성은 약 30% 증가하였다.

참고문헌

Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable

- free radical. *Nature* 26: 1199-1200.
- Changa MY, Tsaia GJ, Houg JY. 2006. Optimization of the medium composition for the submerged culture of *Ganoderma lucidum* by Taguchi array design and steepest ascent method. *Enzyme Microb. Tech.* 38(3-4): 407-414.
- Ebarandu AR, Luta G, Edwards JA, McAnalley BH, Davis B. 2005. Quantitative colorimetric analysis of aloe polysaccharides as a measure of *Aloe vera* quality in commercial products. *J. AOAC Inter.* 88(3): 684-691.
- Eskandari Nasab M, Sam A, Alamdar Milani S. 2011. Determination of optimum process conditions for solvent extraction of thorium using Taguchi method. *J. Radioanal Nucl. Chem.* 287: 239-245.
- Hou XJ, Chen W. 2008. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from wild edible BaChu mushroom by response surface methodology. *Carbohydr. Polym.* 72: 67-74.
- Kim HM, Hur W, Lee SY. 2009a. Isolation and characterization of dark brownish pigments from fruit body of *Auricularia auricula*. *Food Eng. Prog.* 13(4): 282-288.
- Kim HM, Hur W, Lee SY. 2009b. Composition and structural characteristics of polysaccharide from hot water extraction of *Auricularia auricula*. *KSBB J.* 24: 584-590.
- Kim OH, Lim JM, Joo JH, Kim SW, Hwang HJ, Choi JW, Yun JW. 2005. Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea* Bioresour. Technol. 96: 1175-1182.
- Lee SY, Bae HK, Kim NK, Hwang SH. 2008. Optimization of growth conditions of *Lentinus edodes* mycelium on corn processing waste using response surface analysis. *J. Biosci. Bioeng.* 105(2): 161-163.
- Li JR, Yin J, Zhu JL, Zhang Q. 2010. Optimization of conditions for ultrasonic-assisted extraction of γ -glutamyltranspeptidase from Shiitake mushroom by response surface methodology. *Food Sci.* 31(2): 20-23.
- Liu GQ, Zhao Y, Wang XL, Zhu CY. 2011. Response surface methodology for optimization of polysaccharides extraction by mild alkaline hydrolysis from fruiting body of medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum*. *J. Med. Plants Res.* 5(10): 2064-2070.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Montgomery DC. 2001. Design and Analysis of Experiments (5th ed.). John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
- Prasad, K.K., Mohan, S.V., Rao, R.S., Pati, B.R.,Sarma, P.N. (2005). Laccase production by *Pleurotus ostreatus* 1804: optimization of submerged culture conditions by Taguchi DOE meth-

- odology. *Biochem. Eng. J.* 24: 17-26.
- Rispoli FJ, Shah V. 2007. Mixture design as a first step for optimization of fermentation medium for cutinase production from *Colletotrichum lindemuthianum*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34: 349-355.
- Slinkard J, Singleton VL. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual method. *Am. J. Enol. Vitic.* 28: 49-55.
- Taguchi, G., 1986. *Introduction to Quality Engineering: Designing Quality into Product and Processes*. Asian Productivity Organization, Tokyo, Japan.
- Wang CC, Sheu SR, Chou YY, Jang MJ, Yang LC. 2011. Determination of optimum process conditions for solvent extraction of thorium using Taguchi method. *Thermal Sci.* 15(Suppl. 1): S53-S59.
- Youn SJ, Cho JG, Kwoen DJ, Choi UK, Kang SC. 2006. Determination of optimal conditions by response surface methodology and quality characteristics of water extracts of *Phellinus linteus*. *Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 49(3): 215-220.