

발 간 등 록 번 호

11-1543000-000838-01

안토시아닌 함유 국내산 작물을 이용한
천연색소의 국산화 기술 개발

(Development of natural colors with localization
technology by use of indigenous crops containing
Anthocyanin and its derivatives)

서도비엔아이 주식회사

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “안토시아닌 함유 국내산 작물을 이용한 천연색소의 국산화 기술 개발”
과제의 보고서로 제출합니다.

2015년 1월 25일

주관연구기관명 : 서도비엔아이 주식회사

주관연구책임자 : 김 원 석

연 구 원 : 장 해 진

연 구 원 : 최 우 영

연 구 원 : 조 현 오

연 구 원 : 김 동 민

협동연구기관명 : 단국대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 김 명 환

연 구 원 : 김 희 선

연 구 원 : 강 은 진

연 구 원 : 임 지 은

연 구 원 : 이 인 경

요 약 문

I. 제 목

안토시아닌 함유 국내산 작물을 이용한 천연색소의 국산화 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 최종목표는 21세기 LOHAS, 웰빙시대의 트렌드에 맞춰 컬러푸드와 천연색소의 수요가 급증하는 현실에서 수입의존도가 높은 천연색소의 국제경쟁력을 제고하기 위해 식물성 생리활성 물질 (phytonutrient)을 함유한 국내산 작물, 비상품성 식물, 가공 부산물 등에서 고순도의 Anthocyanin계 천연색소의 최적화된 대량생산 제조공정을 확립하여 국산화시킴으로서 경쟁력을 확보하고 다양한 가공식품에 적용하여 가공 및 저장 안정성을 향상시키는 기술을 연구하여 고부가가치 식품, 의약품, 화장품 등의 소재로 제품화 하는 한편, 국내산 작물의 농가소득을 증대시키기 위함이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

가. Anthocyanin계 천연색소의 추출, 정제 및 저장성향상 기술개발

- ⇒ Anthocyanin계 천연색소의 원료 선별 및 최적 추출공정개발
- ⇒ Anthocyanin계 천연색소의 분리정제기술개발
- ⇒ Anthocyanin계 천연색소의 저장안정성향상연구

나. Anthocyanin계 천연색소의 대량생산을 위한 공정 확립

- ⇒ 천연색소의 대량생산을 위한 추출 및 분리정제 제조공정 확립
- ⇒ 생산농가 및 관련가공업체와의 전략적 구매계약 체결
- ⇒ 안정성 확보를 위한 spray dryer를 이용한 부형제 처리기술개발 및 안전성검증

다. 고부가가치 식품, 의약품, 화장품 등의 소재에 적합한 식품첨가물 개발

- ⇒ 부형제 첨가와 미처리 간에 다양한 제품에 적용실험을 통해 안정성확인
- ⇒ 용도에 적합한 다양한 형태 (분말 및 액상)의 제품개발 및 산업화

IV. 연구개발결과

1. Anthocyanin계 천연색소의 원료선별

Anthocyanin계 천연색소의 원료선별을 위하여 복분자, 오디, 자영 및 홍영의 Anthocyanin 함량, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, 생리활성 등을 분석하였다. 베리류에서는 복분자가 오디에 비하여 총 Anthocyanin 함량, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량이 더 높게 나타났으며 생리활성 측면에서도 SOD-like activity, hydroxyl radical 소거능, hydrogen peroxide 소거능, elastase 저해 활성능이 더 높게 나타났다. 켈러감자에서는 홍영이 자영에 비하여 총 Anthocyanin 함량, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량이 더 높게 나타났으며 DPPH radical 소거능, SOD-like activity, hydroxyl radical 소거능, hydrogen peroxide 소거능 등의 항산화 실험에서도 더 높은 활성을 보였다.

2. Anthocyanin계 천연색소의 ethanol 추출조건 설정

Anthocyanin계 천연색소의 ethanol 추출공정 개발을 위하여 중심합성계획법 (central composite design)을 사용하였다. 15개의 실험 점 가운데 복분자의 ethanol 추출 시 Anthocyanin 함량이 가장 큰 조건은 시료 대 용매비율 15% (w/v), 추출온도 30°C, 추출시간 1시간으로 나타났고, 반응표면분석법(RSM, response surface methodology)으로 분석한 결과 복분자의 최적 추출조건으로서 시료 대 용매비율 11.71% (w/v), 추출온도 30°C, 추출시간 1시간이었으며 그 때의 Anthocyanin 함량은 0.52 mg/100 g으로 나타났다. 홍영의 경우는 15개의 실험 점 가운데 시료 대 용매비율 20% (w/v), 추출온도 50°C, 추출시간 5시간 일 때 Anthocyanin 함량이 가장 높게 나타났고, RSM으로 분석한 결과 홍영의 최적 추출조건은 시료 대 용매비율 20% (w/v), 추출온도 58.26°C, 추출시간 5시간이었으며, 최적조건에서 추출물의 Anthocyanin 함량은 0.22 mg/100 g으로 분석되었다.

3. Anthocyanin계 천연색소의 최적화 추출조건 설정

추출에 가장 적합한 산도조절제 선정을 위한 후보군으로 구연산 (CA, citric acid)와 산성메타인산나트륨 (ASM, Acidic Sodium Metaphosphate)을 설정하였다. 다른 추출조건은 참고문헌 및 예비실험을 통해 추출온도(40°C), 추출시간(3시간), 산도조절제 농도(1.0%), ethanol 함량(30%, w/v), 시료 대 용매 비율(1:10, w/v)을 설정해서 추출물을 제조하였으며, 각 추출액의 Anthocyanin을 분석한 결과 ASM이 CA보다 추출효율이 높은 것으로 확인되어 ASM이 바람직하다는 결과를 얻었다.

각 시료에서 추출온도와 시료 대 용매 비율을 고정하고 추출시간을 3시간 이상으로 하였을 때, Anthocyanin 함량이 감소하는 경향을 보였기 때문에 3시간 추출이 가장 효과적임을 알 수 있었다. 시료 대 용매 비율, ASM 함량, 추출온도, 추출시간을 고정하고 ethanol 함량 (20 ~ 80%)에 따른 Anthocyanin 함량은 30% ethanol에서 대조군 대비 18% 증가하였고, 시료 대 용매 비율, ethanol 함량, 추출온도, 추출시간을 고정하고 ASM 함량 (0.5 ~ 1.0%)에 따른 Anthocyanin의 함량은 0.7% ASM에서 대조군 대비 24% 증가하는 경향을 보였다. 대량생산을 위한 경제성 및 효율성과 최적화된 추출 조건 확립을 위해 다양한 요인들에 대한 추출 조건을

확인하였으며 식품첨가물로서의 사용을 위한 추출 조건 중 추출용매는 30% (w/v) ethanol과 0.7%의 산도조절제가 혼합된 용매를 원료 대비 10배, 추출온도 50℃, 추출시간 3시간 및 추출 횟수 2회로 설정하였다.

4. Anthocyanin계 천연색소의 최적 효소처리 공정 개발

Anthocyanin계 추출물의 수율, phytochemical 함량 및 항산화활성 향상을 위해 Pectinex Ultra SP-L과 Novozym 33095로 최적 효소처리 공정을 개발하였다. Pectinex Ultra SP-L에 대한 요인은 세 가지로서 시료에 대한 효소농도 (0.5-1.5 mL/100 L), 반응온도 (20-60℃), 반응시간 (2-8 시간)이었고, Novozym 33095에 대한 요인도 세 가지로서 시료에 대한 효소농도 (0.05-0.25 mL/L), 반응온도 (20-60℃), 반응시간 (60-120 분)이었으며, 그에 따른 수율, 총 폴리페놀 함량, Total Flavonoid 함량, 총 Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능을 반응표면분석법에 의하여 최적화하였다. 효소 처리를 한 결과, 복분자, 오디, 자영 및 홍영 모두에 대해 Novozyme 33095 처리 보다 Pectinex Ultra SP-L 처리를 하였을 때 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, 총 Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능이 더 높게 나타났다.

5. Anthocyanin계 천연색소의 안정화 기술 개발

HPLC를 통해 분석한 Anthocyanin 표준물질 (Cyanidin-3-glucoside)의 RT와 복분자박 농축액의 RT가 매우 유사하게 측정되었으며, 복분자 박 추출물 역시 표준물질과 매우 유사하게 측정되었다. 따라서 복분자박 유래 Anthocyanin계 천연색소 역시 Cyanidin-3-glucoside가 주요 Anthocyanin 물질임을 확인할 수 있었다. 색소의 안정성 평가에서 Anthocyanin계 천연색소는 낮은 pH에서의 적색 발현성이 좋은 것으로 확인되었고 pH가 낮을수록 고온에서 장시간 가열처리를 하여도 색소의 감소율은 크지 않음을 확인하였으며, 빛에 대한 안정성 역시 낮은 pH에서 효과적으로 나타났다. 또한 다양한 당류 (fructose, maltose, sucrose, glucose, galactose)의 첨가 비율에 따라 안정성이 다르게 나타났으며 그 중 sucrose에 의한 안정화 효과가 다른 당류에 비해 효과적이었다. Anthocyanin의 구조적 안정화를 위한 copigment로 널리 알려진 방향족 페놀산류인 tannic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, hydrobenzoic acid를 선택하여 처리한 결과, 모든 방향족 페놀산류에서 안정화 효과를 나타내었다.

6. 복분자박 천연색소로부터 Anthocyanin의 최적 분리정제 기술 개발

복분자박으로부터 최적의 ethanol 추출 조건과 효소 처리 조건에 의해 제조한 추출물을 이용하여 Anthocyanin의 분리정제 기술을 개발하기 위해 sorbent로 MCX SPE cartridge, HP-20 및 Amberlite XAD-7을 사용하였고, pH 조절제로 HCl 또는 TFA의 농도 (0.1-1.0%)와 용출제로 ethanol의 농도 (60-90%)에 따른 수율, 색가 및 총 Anthocyanin 함량을 반응표면분석법에 의하여 최적화하였다. 예측된 최적 조건을 종합적으로 볼 때, 모든 흡착제에서 pH 조절제로서 TFA 보다 HCl 사용 시 수율, 색가 및 총 Anthocyanin 함량이 높게 나타났기 때문에 HCl을 사용하였을 때의 최적 정제 조건에 의해 분리정제를 하는 것이 바람직하다고 사료된다.

7. Citric acid의 농도에 따라 분리정제 한 Anthocyanin의 기능성 비교

식품첨가물공전에 의하면 Anthocyanin계 천연색소 제조 시 HCl이나 TFA과 같은 강산을 사용할 수 없기 때문에 Anthocyanin계 천연색소를 식품첨가물로서 이용하기 위해 식용 가능한 유기산인 citric acid를 pH 조절제로 사용하여 Anthocyanin을 분리정제 하였다. 최적의 ethanol 추출 공정 및 효소 처리 공정에 따라 제조된 추출물을 HP-20 sorbent로 분리정제 하였고, 흡착된 Anthocyanin을 용출하기 위해 용출제로 60% ethanol과 pH 조절제로 citric acid (0-1.0%, w/v)를 사용하여 비교 분석하였다. Citric acid 0.7% 조건에서 항산화활성이 높게 나타났으며, Total Anthocyanin 함량은 9.6 mg/100 g으로 HCl이나 TFA를 사용하였을 때에 비해 59.0-86.2% 정도로 다소 낮게 나타났지만 식품첨가물로서 Anthocyanin계 천연색소를 사용하기 위해서는 citric acid의 사용이 바람직할 것이다.

8. 추출용매 재사용에 따라 제조된 시제품들에 대한 분석

복분자박 유래 천연색소의 생산원가 절감 및 경제성을 고려하여 추출용매를 재사용하였으며 그에 따른 시제품들의 생리활성 측정 결과와 색가, Total Anthocyanin 함량 측정 결과를 종합해보면 전반적으로 추출용매를 재사용하여도 시제품들의 품질 (색가, Total Anthocyanin 함량, 생리활성)에는 큰 변화가 없음을 확인할 수 있었다. 또한, 추출용매를 재사용하여 제조한 시제품들의 휘발성 성분을 분석하기 위해 SPME로 추출하고 GC-MS를 이용하여 분석하였을 때, 시료에 따라 46-68개의 휘발성 성분이 동정되었으나 동정된 향기성분에서는 이취 성분이 나타나지 않았다.

9. 효소 처리에 따라 제조된 시제품들에 대한 분석

용매추출 단계에서 사용되는 효소의 종류에 따라 제조된 시제품들의 생리활성 측정 결과와 색가, Total Anthocyanin 함량 측정 결과를 종합해보면 전반적으로 Pectinex Ultra SP-L을 사용하여 제조된 시제품이 좋은 결과를 나타냈다. 따라서 복분자 박 유래 천연색소 추출 시 용매 추출 단계에서 다른 효소보다는 Pectinex Ultra SP-L을 사용하는 것이 바람직하다고 사료된다. 또한, 효소 처리를 달리하여 제조한 시제품들의 휘발성 성분을 분석하기 위해 SPME로 추출하고 GC-MS를 이용하여 분석하였을 때, 시료에 따라 39-50개의 휘발성 성분이 동정되었으나 동정된 향기성분에서는 이취 성분이 나타나지 않았다.

10. Anthocyanin계 천연색소의 다양한 적용실험

Anthocyanin계 천연색소를 생강초절임(Ginger pickling)에 적용하였을 때, 코치닐 추출색소와 유사한 염착력을 나타내었다. 제빵에 대한 응용실험에서 머핀을 제조하였을 때, 조리 후에도 적색이 발현되고 유지되는 것을 확인하였다. 오징어 진미체에 대한 실험에서는 시중에 유통 중인 천연색소 혼합제제(치자황색소, 홍국색소, 고량색소 등 혼합제제)와 비교하였을 때 유사한 염착력을 나타내는 것을 확인하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

가. 연구결과의 기대성과

1) 기술적 측면

- 21세기 LOHAS시대 트렌드에 부합하는 컬러 푸드의 기능성을 함유하는 고순도의 Anthocyanin계 천연색소를 자체 개발함으로써 원천기술을 보유하는 한편, 대부분 수입에 의존하는 천연색소 원료의 국산화를 통해 국제경쟁력을 제고할 수 있음.
- 기존의 유기용매추출법의 추출 전 pectinolytic 계열의 효소처리를 이용하여 추출 시 수율의 극대화를 시키는 기술을 개발함.
- ethanol 유기용매를 이용하여 추출된 Anthocyanin은 당류와 유기산 등이 같이 추출됨으로서 순도의 문제점을 지니고 있음. 이를 해결하기 위해 양이온 교환수지(cation exchange resin)를 이용한 solid-phase extraction(SPE)기술을 이용하여 Anthocyanin계 천연색소의 분리정제기술을 개발함으로써 순도를 극대화시킴.
- 미세캡슐화의 대표적인 특성은 이들이 물과 지방에 모두 친한 용해성(duo-solubility)을 갖는 것이며, 용해도(solubility)와 분산성(dispersibility)을 향상시킬 수 있고, 생체 내 세포에 이용 시 투과하기 어려운 세포의 지질이층 막(lipid bilayer)을 통과할 수 있으므로 기능성 물질의 효율적 이용에 대한 기대가 큼. 또한, 작은 입도는 넓은 표면적을 가짐을 의미하며 이로 인하여 수분흡수, 생체적합성, 촉매활성, 소화흡수활성 등을 효과적으로 증가시킬 수 있음.
- Anthocyanin은 pH, 수분, 금속이온, 산소, 열, 빛 등 식품내부와 외부환경의 조건에 따라서 민감하게 반응함으로서 저장성이 불안정성 때문에 저장안정성을 높이는 최적의 저장조건을 설정함.

2) 경제·산업적 측면

- 현재 우리나라의 경우 경제성장과 국민소득의 증대와 더불어 각종 성인병이 증가추세에 있어 예방의학기능을 가진 건강기능식품에 대한 관심이 급증하고 있음. 국내의 식품시장은 최근 포화상태로 연 1%의 성장대를 이루고 있으나 2007년 건강기능식품의 시장규모는 3조 원으로 2001년도 1조1천억 원에 비하면 약 2.7배의 비약적인 성장을 하고 있음. Anthocyanin계 천연색소의 추출, 정제 및 저장성향상 기술개발은 천연색소로서의 식품산업 뿐만 아니라 건강기능식품소재산업의 활성화에 일조를 할 것임.
- 약 1조 5000 억원 정도의 시장규모를 갖는 기능성 식품의 원재료는 70%를 수입에 의존하고 있어 20% 수입대체 시 연간 2,000 억원의 비용절감효과를 기대할 수 있음.
- 국내 화장품 시장규모는 2003년 4조 1100억원, 2004년 4조 8200억원, 2005년 약 5조원으로 매년 10% 이상 성장하고 있으며, 2008년에는 6조원을 돌파하였음. 특히, 천연 색조화장품 시장 규모는 2004년 기준으로 전체 화장품 시장의 14.3%를 점유하여 생산액 기준으로 5900억 원 정도이며, 수입은 1억 달러에 이룸. 따라서 세계적으로나 국내에서나 천연 및 기능성 화장품의 매출이 급격히 증가하는 상황에서 Anthocyanin의 기능성을 함유한 색소 화장품은 새로운 trend로 자리를 굳힐 것으로 예상됨.

- 세계의 천연색소 시장규모는 2010년 기준으로 약 17억 달러에 이르며 국내연간수요량은 150톤으로 약 600억원 규모이고 전량수입에 의존하고 있는 실정임. Anthocyanin계 천연색소 국산화기술개발은 상품성이 없는 작물이나 가공부산물 등 저부가가치 상품을 고부가가치 제품으로 전환함으로써 부가가치 향상으로 Anthocyanin계 천연색소를 함유한 국내산 작물재배농가 및 가공업체의 수입증대, 품질향상을 통한 경쟁력 향상으로 수출증대, 수입대체효과 및 가공식품, 의약품, 화장품 산업의 활성화를 이루며 신 성장 동력산업 창출에 일조를 할 것으로 판단됨.

나. 연구결과의 활용방안

- Anthocyanin계 천연색소의 추출, 정제 및 저장성향상 기술개발은 천연색소로서의 기능뿐만 아니라 항산화작용, 유리 라디칼 소거작용, 발암성물질의 활성감소, 항바이러스, 항균효과, 변이 암세포의 생육저해, 혈압강하, 모세혈관 강화작용, 간장보호효과, 중금속해독작용 등을 위한 건강 기능성식품소재로서 의약, 화장품 등의 분야에도 기능성소재로 활용할 수 있음.
- 특히 육가공제품에 있어 대표적인 발색제로서 첨가되는 아질산염은 육색의 발색화와 안정화를 개선하는데 중요한 작용을 하나 식품 및 생체내의 잔존 아질산염은 발암물질인 nitrosamine을 생성하는 것으로 알려져 있음. Anthocyanin계 천연색소의 추출, 정제 및 저장성향상 기술개발을 통하여 아질산염대체 적색계 천연색소로 활용할 수 있음.
- 우리나라의 천연색소에 대한 연구는 선진국에 비하여 미흡한 실정이므로 개발된 분리정제 방법을 여타 식물체인 유색미, 검정콩, 검정찰옥수수, 블루베리, 포도껍질 등에서 고순도의 Anthocyanin 천연색소 제품화를 위한 기초자료를 제공하고 여타 식물체로부터의 천연색소 및 생리활성물질 분리정제공정에 응용하여 활용이 가능함.
- 개발된 Anthocyanin계 천연색소의 추출, 정제 및 저장성향상 기술개발에 대하여 기술이전, 특허출원/등록, 학술발표 및 논문을 발표할 것임.
- Anthocyanin의 부형제를 이용한 미세캡슐화 기술개발은 항산화작용, 유리 라디칼 소거작용, 발암성물질의 활성감소, 항바이러스, 항균효과, 변이 암세포의 생육저해, 혈압강하, 모세혈관 강화작용, 간장보호효과, 중금속해독작용 등을 위한 건강 기능성식품소재뿐만 아니라 의약, 화장품 등의 분야에도 기능성소재로 활용함.
- 현재 자사는 인산염 전문기업으로 1976년에 회사를 설립하여 식품업계에서도 인지도가 매우 높으며 인산염뿐 아니라 천연색소를 제품화하여 판매한 경험도 많기 때문에 본 연구개발을 통해 생산되는 신제품의 시장진입도 매우 쉬울 것으로 예상됨.
- 또한 식품, 의약, 화장품 산업체 등의 기존 거래처를 많이 확보하고 있기 때문에 전략적인 제휴를 통한 시장 진입이 용이할 것으로 판단됨.
- 본 연구개발의 목적은 Anthocyanin계 천연색소를 제품화하는 것이지만, 궁극적으로 천연색소 생산과 관련된 국산화 기술개발이 목적이므로 다른 원료들에 대한 연구개발도 지속적으로 수행하여 제품화 할 계획임.

SUMMARY

1. Screening of raw material for natural pigment Anthocyanins extraction

Total Anthocyanin contents, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents and bioactivities of Bokbunja, mulberry, purple-fleshed potato and red-fleshed potato were analyzed for screening of raw material. Bokbunja had higher values of Total Anthocyanin contents, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, SOD-like activity, hydroxyl radical scavenging activity, hydrogen peroxide scavenging activity and elastase inhibitory activity than mulberry in berries. Red-fleshed potato had higher values of Total Anthocyanin contents, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, DPPH radical scavenging activity, SOD-like activity, hydroxyl radical scavenging activity and hydrogen peroxide scavenging activity than purple-fleshed potato in color potatoes.

2. Development of optimal ethanol extraction conditions of natural pigment Anthocyanins

RSM(Response Surface Methodology) was carried out for the process optimization of Anthocyanin ethanol extraction from Bokbunja and red-fleshed potato. The ranges of independent variables selected from the preliminary experiments results. Interesting ranges of independent variables were sample to ethanol ratio 10–20%, extraction temperature 30–70°C, and extraction time 1–5 hr, respectively. As a result, proposed optimal extraction conditions from Bokbunja were 11.71% of sample to ethanol ratio, 30°C of extraction temperature, and 1 hr of extraction time, respectively. In above optimal extraction conditions, Total Anthocyanin contents from Bokbunja was 0.52 mg/100 g. The proposed optimal extraction conditions from red-fleshed potato were 20% of sample to ethanol ratio, 50°C of extraction temperature, and 5 hr of extraction time, respectively. In above optimal extraction conditions, Total Anthocyanin contents from red-fleshed potato was 0.22 mg/100 g.

3. Optimal extraction conditions for set up experiment

Mulberry extract conditions were extraction temperature 40°C, extraction time 3 hr, concentration of CA or ASM 1.0%, ethanol 30% and the sample to solvent ratio 1:10 (w/v), respectively, in order to make comparison of extraction efficiency between citric acid(CA) and acidic sodium metaphosphate(ASM) as pH adjusters. Absorption rate value of Anthocyanins in ASM had higher than that in CA, and pH increased slightly increased during extraction. Optimal extraction time was 3 hr for maximizing Anthocyanin absorbance with fixing the extraction temperature, sample to solvent ratio in the sample

conditions. Anthocyanin absorbance rate of mulberry was 117.80% at 30% ethanol concentration with fixing the sample to solvent ratio, concentration of ASM, extraction temperature and extraction time. Mulberry Anthocyanin absorbance rate was the highest value 123.73% in 0.7% of ASM with fixing the sample to solvent ratio, concentration of ethanol, extraction temperature and extraction time.

4. Optimal enzyme treatment condition

The pectinase enzyme, Pectinex Ultra SP-L(PEC) or Novozym 33095(NOV) was treated to Bokbunja, mulberry, purple-fleshed potato and red-fleshed potato extracts in order to raise yield, phytochemical concentrations and bioactive properties. RSM was employed to obtain the optimal enzyme treatment conditions from Bokbunja, mulberry, purple-fleshed potato and red-fleshed potato extracts. Ranges of independent variables selected from the preliminary experiments were enzyme concentration 0.5-1.5 mL/100 L(PEC) or 0.05-0.25 mL/L(NOV) and enzyme reaction temperature and time 20-60°C(both PEC and NOV) and 2-8 hr(PEC) or 60-120 min(NOV), respectively. Pectinex Ultra SP-L treatment had higher values of yield, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, Total Anthocyanin contents, DPPH radical scavenging activity and SOD-like activity than Novozym 33095 treatment in all samples.

5. Stabilization technologies of natural pigment Anthocyanins

RT of Bokbunja byproduct Anthocyanin was very similar to that of standard material(Cyanidin-3-glucoside, C3G) based on HPLC analysis. Therefore, it was confirmed that C3G is the major component of Bokbunja byproduct Anthocyanin. For the stability of Anthocyanin during long term heat treatment, it was found to stabilize at the low pH (pH 3 or less) condition. Also, added sugars(fructose, maltose, sucrose, glucose, galactose) in Bokbunja byproduct Anthocyanin showed different stability depending on the added ratio.

6. Optimal isolation condition from Bokbunja byproducts

For the optimal isolation process of Anthocyanin from Bokbunja byproduct extracts, MCX SPE cartridge, HP-20 and Amberlite XAD-7 as sorbents were used with pH adjuster of ethanol(60-90%), HCl or TFA(0.1-1.0%). The yield, color value and Total Anthocyanin contents evaluated as response variables. Regardless of sorbents, HCl worked better than TFA as a pH adjuster for all response variables, which was worthwhile to be used for the recovery of Anthocyanin under optimal isolation conditions.

7. Comparison of the isolated Anthocyanin functionality according to the concentration of citric acid

The Anthocyanin, as a food additive, isolated from Bokbunja byproducts extracts using citric acid as a pH adjuster. In the range of citric acid from 0 to 1.0%(w/v) into a 60% ethanol, optimum concentration of citric acid was 0.7%(w/v) which had the highest Total Anthocyanin contents as well as bio-activities. Total Anthocyanin content(9.59 mg/100 g) with 0.7% citric acid was about 58.98-86.16% compared to that with HCl or TFA. However, citric acid is preferred to use for Anthocyanin pigment isolation owing to safety.

8. Analysis of the prototype according to the reuse of the extractant

Antho-Red KR(140416) extracted with a third recovery solvent was the highest values than the Antho-Red KR(140305) extracted with new solvent, and Antho-Red KR(140418) extracted with quaternary recovery solvent was lowest value based on bioactivities, color value and Total Anthocyanin contents. Thus, the reuse of the extractant up to third recovery was effective to extract Anthocyanin. To analyze the volatile components of extraction in SPME using GC-MS, 46-68 kinds of volatile components were identified based on the sample. The off-flavor components were not identified in volatile components.

9. Analysis of the prototype produced in accordance with the type of enzyme used during the extraction

Based on bioactivities, color value and Total Anthocyanin contents of the manufactured prototype, Antho-Red(140430) with Pectinex SP-L were higher values than that with Novozym 33095. To analyze the volatile components of the prototype extracted with enzyme, the extraction of volatile components in SPME and analyzed using GC-MS. 39-50 kinds of volatile components were identified according to the sample, The off-flavor components were not identified in volatile components.

10. Various application tests of natural pigment Anthocyanins

The Anthocyanin from Bokbunja byproduct applied to the pickled ginger, it was showed that color and salt adhesion similar to the extracted pigment from cochineal. Preparing a muffin for baking application test, it was confirmed that the red color expressed and maintained after cooking. In experiments on squid jinmichae, Anthocyanin from Bokbunja byproduct showed the similar color and salt adhesion to the other natural pigment mixture formulation(mixture formulation like gardenia yellow pigment, red yeast rice pigment, kaoliang pigment etc.).

CONTENTS

Chapter 1. Introduction of the Project

Chapter 2. Technology Development of Korea and Foreign Countries

Chapter 3. Results and Discussion

Section 1. Analysis of Market Conditions for Natural Pigments

1. Market Conditions for Natural Pigments in 2012
2. Market Conditions for Natural Pigments in 2013

Section 2. Material and Methods for Analysis of Natural Pigment Anthocyanins

1. Preparation of Extract
2. Design of Optimal Extraction Conditions (Ethanol, Temperature, Time)
3. Design of Optimal Extraction Conditions (Ethanol, Acidity Regulator)
4. Design of Optimal Extraction Conditions (Enzyme Treatment Condition)
5. Natural Pigment Extraction Conditions of Bokbunja Byproducts Anthocyanins
6. Stabilization Technologies of Bokbunja Byproducts Anthocyanins
7. Optimal Isolation Condition from Bokbunja Byproducts Anthocyanins
8. Comparison of the Isolated Anthocyanin Functionality according to the Concentration of Citric acid
9. Comparison of Bioactivities based on juice extraction season of Bokbunja
10. Analysis of the Prototype according to the reuse of the Extractant
11. Analysis of the Prototype produced in accordance with the type of Enzyme used during the Extraction
12. Solid Phase Microextraction (SPME)
13. Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS)
14. Antioxidant Activities
15. Statistics

Section 3. Results

1. Screening of Raw Material for Natural Pigment Anthocyanins Extraction
2. Development of Optimal Extraction Conditions of Natural Pigment Anthocyanins
3. Development of Optimal Ezyme Treatment Condition
4. Natural Pigment Extraction Conditions of Bokbunja Byproducts Anthocyanins
5. Stabilization Technologies of Bokbunja Byproducts Anthocyanins
6. Optimal Isolation Condition from Bokbunja Byproducts Anthocyanins
7. Comparison of the Isolated Anthocyanin Functionality according to the Concentration of Citric acid

8. Comparison of Bioactivities based on juice extraction season of Bokbunja
9. Analysis of the Prototype according to the reuse of the Extractant
10. Analysis of the Prototype produced in accordance with the type of Enzyme used during the Extraction

Section 4. Various Application Tests of Natural Pigment Anthocyanins

1. Application tests of Ginger pickling
2. Application tests of Baking(Muffin)
3. Application tests of Squid Jinnichae

Chapter 4. Achievement of Objectives and Performances of Research

Chapter 5. Practical Plan of Research Results

Chapter 6. Acquired Information on Foreign Technology

Chapter 7. Status of Research Facilities and equipments

Chapter 8. References

목 차

제 1 장. 연구개발과제의 개요	15
제 2 장. 국내외 기술개발 현황	18
제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과	22
제 1 절. 천연색소 시장현황 분석	22
1. 2012년 천연색소 시장현황	22
2. 2013년 천연색소 시장현황	24
제 2 절. Anthocyanin계 천연색소 분석을 위한 재료 및 방법	26
1. 조추출물의 제조	26
2. 최적 추출 공정의 실험설계 (추출용매, 온도, 시간)	26
3. 최적 추출 공정의 실험설계 (추출용매, 산도조절제)	27
4. 최적 추출 공정의 실험설계 (효소처리)	28
5. 복분자박 천연색소의 추출조건 설정	31
6. 복분자박 천연색소의 안정화 기술 개발	32
7. 복분자박으로부터 Anthocyanin의 최적 분리정제 실험설계	33
8. Citric acid를 이용한 분리정제 공정	36
9. 복분자의 착즙 시기에 따른 생리활성 차이 비교	36
10. 추출용매의 재사용에 따른 시제품들의 생리활성 비교	37
11. 효소의 종류에 따른 시제품들의 생리활성 비교	37
12. Solid phase microextraction (SPME)	38
13. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)	38
14. 항산화활성	38
15. 통계처리	41
제 3 절. 실험 결과	42
1. Anthocyanin계 천연색소의 원료선별	42
2. Anthocyanin계 천연색소의 최적 추출 공정 개발	46
3. Anthocyanin계 천연색소의 최적 효소처리 공정 개발	66
4. 복분자박 천연색소의 추출조건 설정	182
5. 복분자박 천연색소의 안정화 기술 개발	199
6. 복분자박으로부터 Anthocyanin의 분리정제 기술 개발	209
7. Citric acid의 농도에 따라 분리정제 한 Anthocyanin의 기능성 비교	239
8. 복분자의 착즙 시기에 따른 복분자박 천연색소의 생리활성 비교	242
9. 추출용매의 재사용에 따른 시제품들의 생리활성 비교	244
10. 효소의 종류에 따른 시제품들의 생리활성 비교	253

제 4 절. Anthocyanin계 천연색소의 다양한 적용실험	259
1. 생강초절임(Ginger pickling)에 대한 응용실험	259
2. 제빵(Muffin)에 대한 응용실험	260
3. 오징어 진미채(홍진미채)에 대한 응용실험	261
제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	262
제 5 장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획	263
제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	275
제 7 장. 연구시설·장비 현황	276
제 8 장. 참고문헌	277

제 1 장. 연구개발과제의 개요

가. 천연색소의 장점

- 천연색소는 인공색소와 달리 생체 내 안전성이 높아 신뢰도가 높음.
- 자연스러운 천연의 색조로 다양하게 조합할 수 있는 장점을 보유하고 있으며 가식(可食)할 수 있는 식품의 성분이기 때문에 여러 분야에서 다양하게 적용이 가능함.
- 착색효과가 좋고 생산 및 정제 기술이 인공색소에 비해 간단하고 제조원가도 절감할 수 있음.
- 원료 및 색상에 따라 다양한 생리활성 기능(phytonutrient)을 보유하고 있어 기능적·영양학적 가치도 매우 높음. (Table 1)

Table 1. 천연색소의 생리활성 기능

색상	대표적인 작물	색소명	기능성 정보
황색 ~ 적색	녹황색 야채, 당근, 토마토, 호박, 수박, 붉은 피망, 고추 등	Carotenoid 계 β-carotin, lycopen, astaxanthin 등	- 암의 원인인 활성산소 발생 억제 - 비타민A의 전구(前驅)체 프로비타민A 로서의 작용
적색 ~ 자색	적양배추, 딸기, 블루베리, 자주색고구마, 포도, 복분자, 오디 등	Anthocyanin 계	- 비타민A의 보호작용에 의한 시력 개선 효과, 모세혈관 저항성 개선 작용 - 무라사키이모 주스에 간기능 장애 억제효과 - 피부암 예방 - 적포도주의 항산화성 물질(폴리페놀류)의 콜레스테롤 산화 억제 등
녹색	녹황색 야채 (시금치, 파슬리 등)	chlorophyll 류	- 소취(消臭)효과(들연변이의 억제)
황색	심황 (울금)	Curcumin	- 항산화 및 항암작용 - 내분비계 항진작용 - 혈소판 응집 방해 작용
갈색	코코아, 초콜릿 등	Polyphenol (tannin, Quercetin 등)	- 암의 원인인 활성산소 발생 억제 (심근경색과 뇌경색 예방에 효과) - 항 알레르기성 작용
흑색	오징어 먹물 등	Melanin	- 멜라닌 색소와 뮤코 다당 펩티드 복합체, 면역 기능의 활성화 효과

(출처 : 천연색소분야 국내 기술동향, 김석진, 한국식품연구원 식품기술 20(1) 38-68, 2007년)

나. 천연색소의 단점

- 작물의 제한성과 종류에 따라서 가격이 높음.
- 원료의 변질 등이 우려되어 해외에서 원료 수급이 원활하지 않음.
- 국산 원료들은 인건비, 생산비 등이 해외와 비교하여 높기 때문에 생산량이 많지 않음.
- 인공색소에 비해 열, 빛, pH 등 다양한 조건하에서 안정성이 떨어짐.
- 인공색소에 비해 사용량이 많으며 균일한 색조를 발현하기에 제한성이 있음.

다. 천연색소의 제품화 조건

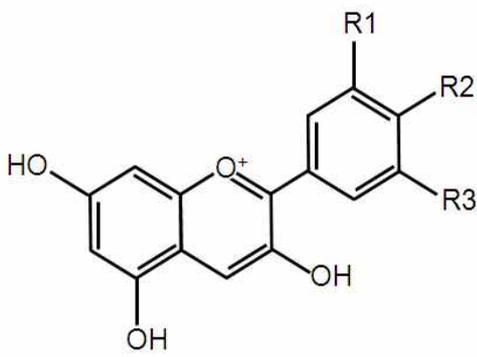
- 천연색소는 보통 식품으로 사용하는 원료이거나 보통 식품으로 이용되지는 않지만 안전성에 관한 자료가 있어 그 안전성이 확보된 것이어야 함.
- 만약 안전성에 관한 자료 중 색소와 유사한 성분의 자료가 있거나, 자료가 없지만 관습적으로 사용되어 온 것이어야 함.
- 인체에 무해하고 살균이나 가열공정에서 퇴색, 변색되지 않는 것이어야 함.
- 내열성이 좋으며 빛에 대한 내광성, 내약품성 등이 좋고 이미, 이취 등이 없어야 함.
- 식품 속의 기타 성분과 상호 반응하여 부산물을 형성하여 식품자체의 품질을 손상하지 않아야함.
- 주로 식품으로 사용하는 원료에서 추출한 것이지만 그렇지 않은 것도 있음.

라. 천연색소의 일반적인 제조방법

- 천연색소는 천연원료인 식품이나 동식물에서 추출하여 정제하여 제조.
- 추출, 정제하는 방법은 색소와 원료에 따라 다르지만 주로 용매를 사용한 추출방법을 많이 이용.
- 형태는 분말 또는 액상으로 가공식품에 사용되고 있는데 천연색소의 형태에 따라 안정성이 다소 다르고 특히 환경요인에 의해서 크게 달라짐.

마. Anthocyanin

- Anthocyanin은 각종 식물의 잎, 꽃, 과실 등에서 적색에서 청색에 이르는 다양한 색을 발현하는 색소로 ‘화청소(花靑素)’라고도 불림.
- 식물에서 600종 이상이 발견되고 있는 Anthocyanin은 모두 anthocyanidin 배당체로서 flavilium(2-phenylbenzopyrilim)의 기본구조에 hydroxyl group또는 methoxy group이 치환되어 있는 구조를 가지고 있음. (Fig. 1)



Anthocyanidin	R1	R2	R3	MW
Pelargonidin	H	OH	H	271
Cyanidin	OH	OH	H	287
Delphinidin	OH	OH	OH	303
Peonidin	OCH ₃	OH	H	304
Petunidin	OCH ₃	OH	OH	307
Malvidin	OCH ₃	OH	OCH ₃	331

Fig. 1. Anthocyanidin의 기본구조 및 배당체

바. Anthocyanin의 주요 특징

- 비교적 물에 잘 용해되지만 non-hydroxyl solvent에는 용해가 되지 않는 특징이 있음.
- pH 변화에 매우 민감한 전위차적 성질을 가지고 있는데, 산성 pH 영역에서는 flavylium salt로 존재하며, pH가 증가하면 색조가 점점 옅어지다가 pH 4~5에 이르면 무색으로 변화 됨.
- Anthocyanin은 자연계에서는 금속이온, 단백질, 다당류 및 다른 flavonoid 색소 등과 결합된 상태로 존재하면서 보라색으로 안정하게 존재할 수 있지만, 제품의 경우 알칼리성에서는 quinoidal anhydrobase 형태로 존재하여 보라색을 띠지만 매우 불안정함.
- 항산화 효능 및 미백효과가 있어 화장품 산업에 원료로서 이용됨.
- 심질환 등의 만성질환이나 암과 같은 악성질환에 대해 예방효과가 있음.
- 강한 항산화 활성을 가지고 있어서 식품의 건강 기능성을 향상시킴.

제 2 장. 국내외 기술개발 현황

가. 연구개발의 기술적 측면

- 최근 LOHAS (Life Style of health and Sustainability) 시대를 맞이하여 소비자들은 천연유래 제품에 대한 욕구가 증가하고 있는 실정임.
- 식품 및 의약품 산업에서 여전히 사용되고 있는 인공색소(타르색소)에 대한 유해성 논란이 가중되면서 천연색소로의 전환이 가속화되고 있으며, 최근에는 여러 정부부처가 지원하여 산학연을 중심으로 기초연구, 산업화 활동이 추진되고 있음.
- 천연색소의 국산화를 위하여 대형 프로젝트 및 여러 지원사업 등으로 국내에서 생산하는 작물들을 소재로 하여 연구개발 사업이 진행되고 있음에도 불구하고 실제 산업화까지 이뤄진 경우는 극소수이며, 이 또한 수입 작물과의 가격경쟁력 때문에 시장에서 호응을 얻고 있지 못하고 있는 실정임.
- 국내에서 천연색소를 제조 및 공급하고 있는 대부분의 업체들은 추출, 생산과 관련된 원천기술을 보유하고 있지 않은 상태이며, 가격적인 측면만을 고려하여 원료를 수입한 후 혼합 및 희석한 제품을 제조·공급하고 있음.
- Anthocyanin계 천연색소의 대표적인 원료로는 베리류, 자주색고구마, 컬러감자, 오디, 복분자 등이 있는데, 대부분 기후의 영향을 받는 작물로서 국내에서 생산량이 많지 않음.
- Anthocyanin은 생체유용성이 낮고, 식물체내 존재하는 종류 및 함량이 다양하고 수확 후 압축, 살균, 건조 등의 가공처리과정에서 함량 및 생리활성능이 달라짐. 컬러감자, 오디 등은 베리류(딸기, 블루베리, 블랙베리 등), 포도에 비해 Anthocyanin 함량이 높아 그 활용 가치가 매우 높고 구성하고 있는 Anthocyanin 종류에 따라 생체에 미치는 영향이 달라 생리적 기능성에 대한 체계적인 연구가 필요함. 특히 우리나라에서 성인에게 발병률이 높은 고혈압 및 혈액순환기계 질환과 같은 혈관질환 관련 기능성 규명과 관련된 연구는 매우 부족한 실정임.
- 최근 Anthocyanin 이용에 대한 연구개발이 활발히 수행되면서 관련 연구기관과 농가가 연계되어 기능성이 향상된 신품종(컬러감자-자영, 홍영/기능성 옥수수-색소 1호 등)이 생산되고 있으며, 이 중 몇몇의 소재들은 대량으로 재배가 시도되고 있는 상황임.
- 이러한 작물들은 천연색소 및 기능성 소재로서 가치를 인정받고 있지만 실제 제품화가 된 것은 극히 미비한 실정임.
- 자사는 기능성 식량작물로부터 천연색소의 제조 기술을 토대로 한 원천기술 보유에 대한 의지가 매우 높으며 사업화를 위해 필요한 인력 및 생산 설비는 80% 이상 갖춰진 상태이므로, 본 연구개발에서 국가지원을 통해 부족한 부분을 충족시켜 새로운 아이템으로 선정이 된다면 생산, 유통 및 판매가 가능하여 빠른 시간에 산업화가 가능할 것으로 사료됨.
- Anthocyanin계 천연색소 추출은 기존의 기술을 참고하여 다양한 연구개발을 통해 추출 및 생산효율의 최적화를 이뤄 고품질 원료의 생산·공급이 가능할 것으로 사료됨.
- 기존의 국내 천연색소 관련 기술이 수입 원료의 응용기술이었다면, 본 연구개발을 통해 Anthocyanin 뿐 아니라 다양한 작물로부터 천연색소의 추출 및 정제 기술에 대한 원천기술을 확보할 수 있을 것임.

나. 연구개발의 경제·산업적 측면

- 2013년 현재 식품첨가물로서의 천연색소 생산액은 약 296.5억원 정도 (수출액은 약 56만불 정도)이며 매년 약 10% 정도 성장하는 추세임. (Fig. 2)

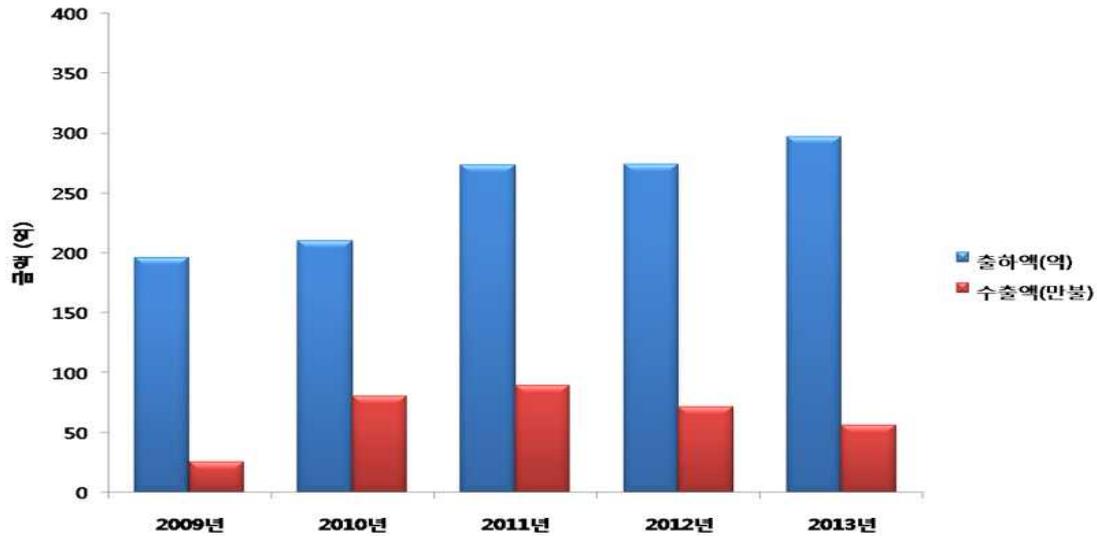


Fig. 2. 국내 천연색소 생산실적 현황

(출처 : 식품의약품안전청, 식품첨가물 생산실적 보고)

- 천연색소는 식품산업을 비롯하여 여러 분야에서 사용되고 있는 주요원료인데, 인공색소의 위해성이 확산되면서 천연색소의 필요성이 높아지고 관련 시장이 커지고 있는 실정임.
- 또한 식품산업 선진국인 일본의 경우 이미 오래전부터 인공색소에서 천연색소로 전환이 많이 이루어지고 있음. (Fig. 3)

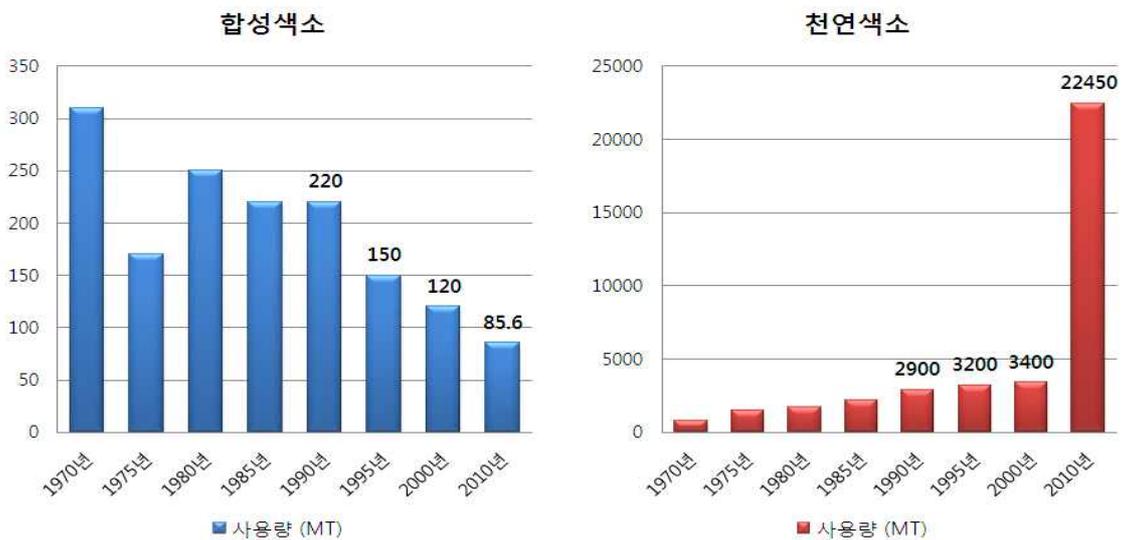


Fig. 3. 일본 합성색소와 천연색소 사용규모 (1970-2010)

(출처 : 일본 통계청, 식품첨가물 마케팅리서치 2010)

- Anthocyanin이 다량 함유되어 있는 기능성 작물들의 개발이 활발히 이뤄지고 있는데, 예를 들면 컬러감자의 경우에는 강원도 및 제주도 지역에서 특수작물로 재배가 되고 있음.
- 그러나 작물의 희소성에 의해 가격이 비교적 높다는 단점이 있는데, 작물의 수확량을 늘리기 위해서는 천연색소와 같은 고부가가치 기능성 소재로 개발하여 많은 농가에서 특수작물로 재배를 할 수 있도록 경제적인 여건이 마련되어야 할 것임.
- 국내에서 사용되고 있는 Anthocyanin계 천연색소는 대부분 수입에 의존하고 있는데, 본 연구개발을 통해 국산화하게 되면 수입대체 효과가 매우 높을 것으로 기대됨.
- 천연색소 원료는 특화 작물로서 부가가치가 매우 높아 관련 농가들의 수익도 증가할 것이며 농가 소득 증대 및 관련 산업들의 발전을 기대할 수 있을 것임.
- 국내산 기능성 작물의 경우 세계적으로도 품질이 우수하여 국제경쟁력이 있을 것으로 예상되어 지는바, 특히 'made in Korea'의 경우 경쟁력이 매우 높기 때문에 세계시장으로의 진출이 기대됨.
- 현재 대부분이 수입에 의존하고 있는 천연색소 원료들의 수입대체 효과를 비롯하여 경쟁력 있는 고순도의 천연색소 제품화를 통해 역수출이 가능할 것으로 사료됨.

다. 오디

- 오디는 뽕나무과 (Moraceae)에 속하는 낙엽교목인 뽕나무(*Morus alba* L.)의 열매로서 5월부터 6월에 걸쳐 과실의 색이 검은색 또는 자홍색을 나타낼 때 채취함.
- 2008년 오디재배면적은 1029.7ha, 오디 생산량은 3,244톤으로 2007년 재배면적 744.1ha 대비 38.2%, 생산량 2,050톤 대비 58.3% 증가하였음. 또한, 2009년도 오디 생산량은 5,613톤, 오디 생산액은 281억 원으로 전년도 대비 생산량이 73.0% 증가함으로써 급진적인 증가 추세임. 오디는 10 ha 단위면적당 추정소득이 5,000원으로 고추(2,850원), 마늘(2,200원) 등에 비하여 고소득 작물이며, 오디재배농가도 2008년도 3,248호에서 2009년은 5,198호로 증가하였음.
- 2009년 현재 전국 시도별 오디 생산량추이는 **Table 2**와 같음.

Table 2. 전국 시도별 오디 생산량

시도별	2007		2008		2009	
	면적(ha)	생산량(kg)	면적(ha)	생산량(kg)	면적(ha)	생산량(kg)
계	744.1	2,050,007	1,029.7	3,244,469	1,544.4	5,613,529
대구	0.23	200	0.3	-	0.5	2,000
인천	-	-	0.8	25	-	-
광주	-	-	18.0	-	25.0	6,000
경기	30.7	20,010	37.3	45,000	59.7	64,060
강원	3.2	1,000	3.8	3,400	14.8	1,152
충북	1	975	1.7	2,600	7.5	12,100
충남	10.37	6,600	19.1	2,230	25.8	21,510
전북	511	1,869,660	674.4	2,911,360	962.5	4,206,435
전남	143.9	115,092	165.6	195,754	282.2	1,132,838
경북	28.9	32,000	91.8	53,350	132.5	115,604
경남	14.8	4,470	16.8	30,750	27.9	45,830
제주	-	-	-	-	6.0	6,000

(출처 : 2009년도 잠업통계조사 결과, 농림수산식품부)

- 오디는 flavonoids, stilbenes, prenylflavonoids, coumarin, deoxynojirimycin, rutin 등 다양한 생리활성물질들을 함유하고 있어서 항산화, 항암, 항간독성, 항당뇨성, 항피부노화 등의 기능성이 있으며 오디 종자는 불포화 지방산인 linoleic acid가 다량 함유되어있어 고지혈증 예방 등의 기능성을 지닌 식품 소재로 최근 들어(2007년도 이후부터) 크게 각광받기 시작하였음.
- 특히, 오디는 포도껍질에 비하여 무게(dry weight basis) 비로 3배 이상의 Anthocyanin 색소를 함유하고 있으며, 일반과실의 경우는 주로 과피에만 존재하여 천연색소자원으로 이용 시 한계점을 지니고 있으나 오디는 과피 뿐만 아니라 과육에도 색소를 함유하고 있음. 또한, Anthocyanin 함유량이 높은 유색미, 검정콩, 검정찰옥수수 등의 Anthocyanin 색소는 cyanidin, delphinidin, pelargonidin 계열의 성분이 혼합되어 존재하지만, 오디 Anthocyanin의 주성분으로는 cyanidin-3-glucoside(C3G)와 cyanidin-3-rutinoside(C3R)의 비율이 3:1로 구성되어 상대적으로 추출이 수월함. 따라서 오디는 Anthocyanin 색소의 존재형태, 이용부위 및 함량 측면에 있어서 천연색소자원으로 유망 시 되며 색소자원으로 이용 시 여타 작물보다 유리한 경제수종으로 판단됨.
- 비상품성 또는 가공처리 후 발생하는 오디박을 활용한 고부가가치 소재개발이 필요한 실정임.

라. 복분자

- 복분자(覆盆子)는 장미과에 속하는 야생 나무딸기의 생약명으로, 복분자딸기는 주로 계곡과 산기슭의 햇빛이 잘 들고 토양이 좋은 곳에서 자라는 낙엽성의 작은키나무임. 5 ~ 6월에 흰색 꽃이 피며 7 ~ 8월에 검은색 열매가 익음.
- 복분자라는 이름은 이 열매를 먹으면 요강이 뒤집힐 만큼 소변줄기가 세어진다는 민담에서 유래되어 '엎어질 복(覆), 요강 분(盆), 아이 자(子)'라는 이름을 얻게 되었음.
- 복분자는 동의보감, 당본초, 본초종신록 등 여러 고문헌에 그 효능이 언급돼 있으며, 현대의학의 약리작용 분석에서도 열매안에 polyphenol을 다량 함유, 함암효과, 노화억제, 동맥경화예방, 혈전예방, 살균 효과 등이 있다는 것이 밝혀졌음.
- 맛이 좋을 뿐 아니라 영양도 풍부한 건강식품이기 때문에 최근 들어 복분자를 재배하는 농가가 많아지면서 2008년 10,903t에서 2010년 15,759t으로 생산량이 증가하는 상황이고, 복분자주와 음료 등 다양한 관련제품들이 출시되고 있는 상황임.
- 그 성질이 따뜻하기 때문에 몸이 차가운 체질인 사람에게 좋으며 혈액순환에도 효과가 있다고 알려져 있으며, 또한 붉은 열매들의 특징인 폴리페놀이라는 성분이 다량 들어있기 때문에 항암기능도 널리 알려져 있음.
- 복분자는 전북 고창과 순창, 전남 장성과 보성 등이 주산지로 특히, 고창군의 2009년 복분자 생산량은 약 6,000t으로 생과시장 450억, 주류 450억, 음료 100억, 기타가공품 100억, 농가간이판매 500억원의 소득이 발생하였으며 시장확대, 고용창출 등 직간접 파급효과를 고려할 때 약 3천억의 시장창출이 기대되고 있음.
- 앞서의 주류, 음료 등 가공 후 발생하는 복분자박은 전량 폐기되고 있으며 이를 이용한 고부가가치 소재개발이 필요한 실정임.

제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 천연색소 시장현황 분석

1. 2012년 천연색소 시장현황

국제적인 천연색소의 시장 규모 및 현황을 분석하기 위하여 전반기에는 2012 상해 식품 원료 및 첨가물 박람회[FIC 2012 Shanghai(3/27~3/30)] 및 후반기에는 아시아 식품첨가물 박람회[FIA 2012 자카르타(10/2~10/5)]에 참가하였다(Fig. 4). 천연색소의 식품 및 음료 업계에서의 이용은 과거 10년간 지속적으로 증가해 왔으며, 컬러푸드에 대한 수요 확대 등이 이 시장의 성장을 이끌고 있는 것으로 확인하였다. 인공색소 및 향료에 의한 어린이의 주의력결핍 과잉행동장애(ADHD)와 행동상 문제도 이 시장의 성장을 촉진하는 요인이 되고 있다. 세계의 천연색소 시장은 앞으로도 큰 성장 가능성을 내포하고 있으며, 천연색소는 유럽과 북미가 최대 규모의 시장이다. 다만, 유럽, 미국, 일본, 중국 및 우리나라는 천연색소의 수요가 점차 증가하고 있는 반면에 동남아시아는 아직 경제적, 문화적으로 개발도상국 수준에 머물러 있는 경우가 많아서, 천연색소에 대한 수요가 크지 않은 것으로 파악되었다. 그러나, 건강에 대한 인식이 점차 높아짐에 따라, 가까운 시일에 천연색소 수요도 증가할 것으로 예상되어진다.

천연 식용색소의 세계 시장규모는 2010년 현재, 6억 5천만 달러로 연간 4~5%씩 지속적인 성장 추세를 보이고 있으며 전체 식용색소 시장의 38%를 점유할 만큼 큰 규모를 차지하고 있다. 우리나라의 천연색소 시장규모도 2010년 현재, 약 1조 5천억 원 정도로 추산되고 있으며 이 중 식용색소는 약 200억 원(2010년 기준)의 시장을 형성하고 있으며 매년 약 3% 정도 성장하는 추세인 것으로 파악되고 있다. 또한 식품산업 선진국인 일본의 경우 이미 오래전부터 인공색소에서 천연색소로 전환이 많이 이루어지고 있다(Fig. 5).



Fig. 4. FIC 2012 Shanghai 참가

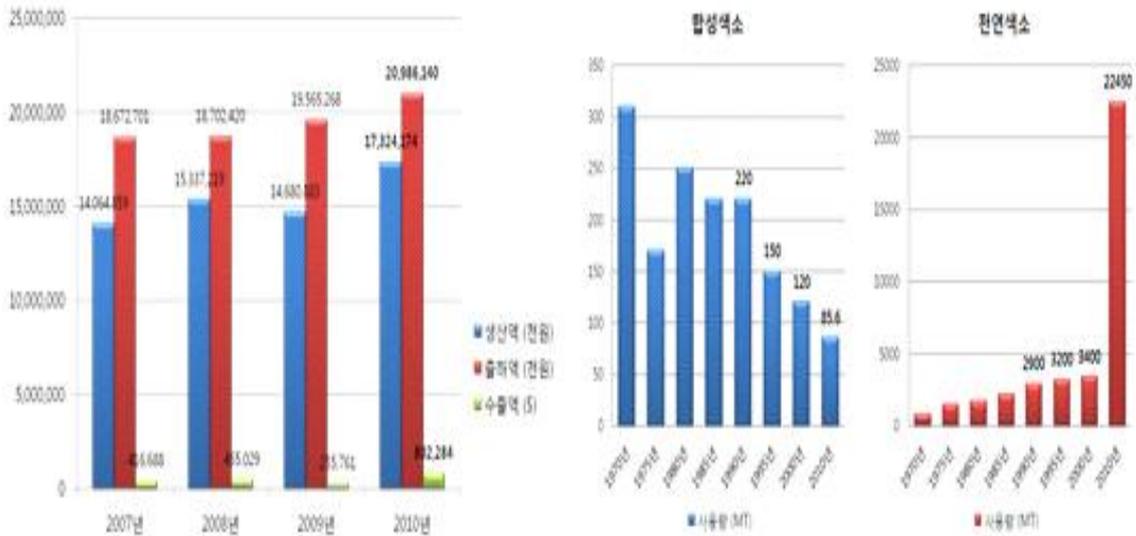


Fig. 5. 국내 천연색소 생산실적 현황과 일본 합성색소와 천연색소 사용규모

또한, 본 실험의 재료로 선정된 오디와 복분자의 국내 생산현황과 작물가격, 가공기술 등을 파악하기 위하여 오디와 복분자의 국내 최대 생산지인 경북 상주, 경북 문경, 전북 고창, 전북 정읍 등을 방문하였다(Fig. 6). 오디는 전체적으로 수확량에 큰 문제없는 것으로 파악되었으며(경북, 전북) 복분자는 작년 장마/냉해, 올해 가뭄 등의 자연적 원인과 블루베리 재배의 증가 등의 이유로 작년 대비 4~50%의 수확량을 나타내고 있었다. 대부분의 농가는 더 큰 부가가치를 위해 소비자와의 직거래를 선호하며 가공업체와의 거래는 부정적인 생각을 가지고 있는 것으로 확인되었다. 오디의 수매가격은 4,000~7,000원/kg 정도로 지역별, 수확량별, 계약단위별 편차를 보이고 있으며 소비자가격은 10,000원/kg 선에서 거래되고 있었으며, 복분자의 수매가격은 8,000~10,000원/kg 정도이며, 소비자가격은 14,000원/kg을 넘어서고 있는 상황으로 정부 및 지자체 차원에서 안정적인 농작물 수매가격 정책이 필요한 것으로 판단되었다.



Fig. 6. 국내 오디, 복분자 농가 및 가공업체 방문

2. 2013년 천연색소 시장현황

국제적인 천연색소의 시장 규모 및 현황을 파악하기 위하여 2013 상해 식품 원료 및 첨가물 박람회 [FIC 2013 Shanghai (3/26~29)] 및 IFT 2013 (7/13~16, McCormick Place South, Chicago, IL)에 참가하였다(Fig. 7).

2013 상해 식품 원료 및 첨가물 박람회 [FIC 2013 Shanghai (3/26~3/29)] : 전 세계 20여개국에서 1,000여 업체 이상이 참가하였으며 2012년 대비 참가업체 수가 소폭 줄었다고 함. 방문객 수가 예년대비 많이 줄어든 것을 느낄 수 있었으며, 내방 바이어는 주로 중국, 중동, 동유럽, 남미에서 온 바이어가 많았다. 전체적으로 bakery 및 beverage 등의 가공식품용 소재가 많았으며 천연색소를 직접 생산 / 판매중인 업체들도 많이 참가하였다. 하지만, 아직도 동남아시아 권역에서는 천연색소 보다 인공합성색소의 사용량이 여전히 높은 편으로 추정되며 자사의 천연색소 제품에 대한 문의와 상담이 많이 이루어졌다.

천연색소의 식품 및 음료 업계에서의 이용은 과거 10년간 지속적으로 증가해 왔으며, 컬러푸드에 대한 수요 확대 등이 이 시장의 성장을 이끌고 있는 것으로 확인하였다. 인공색소 및 향료에 의한 어린이의 주의력결핍 과잉행동장애(ADHD)와 행동상 문제도 이 시장의 성장을 촉진하는 요인이 되고 있다. 세계의 천연색소 시장은 앞으로도 큰 성장 가능성을 내포하고 있으며, 천연색소는 유럽과 북미가 최대 규모의 시장이다. 다만, 유럽, 미국, 일본, 중국 및 우리나라는 천연색소의 수요가 점차 증가하고 있는 반면에 동남아시아는 아직 경제적, 문화적으로 개발도상국 수준에 머물러 있는 경우가 많아서, 천연색소에 대한 수요가 크지 않은 것으로 파악되었다. 그러나, 건강에 대한 인식이 점차 높아짐에 따라, 가까운 시일에 천연색소 수요도 증가할 것으로 예상되어진다. 또한 미국과 유럽을 중심으로 청색의 천연색소 소재를 개발하고자 하는 trend를 확인할 수 있었으며, 최근 문제시 되고 있는 코치닐추출색소의 대체품에 대한 수요도 급증하고 있는 현실이었다.



Fig. 7. FIC 2013 Shanghai 참가

또한, 국내의 천연색소 시장규모 및 현황 등을 확인하기 위하여 서울국제식품산업대전 (5/16, KINTEX)에 참관하였다(Fig. 8). 서울국제식품산업대전은 농축수산물&가공식품관 / 첨가물전시관 / 제과·제빵관 / 커피·차·주류·음료관 / 건강기능식품관 등 38개국, 1200여 개 사, 2300여 부스 규모의 국제식품산업대전으로 Smart Food, Delicious Life라는 슬로건으로 식품산업의 지속적인 변화와 발전, 건강한 식재료의 기본을 지키고 식품관련 신기술 개발의 최선을 향하는 다양한 프로그램 및 세미나 등을 진행하였으며 올해 유난히 특이할 만한 업체 및 전시품목으로는 건강(웰빙)을 강조하는 다양한 음료 및 주스류 등의 제품이 많았다. 고창군에서도 부스를 통해 지역 특산물인 풍천장어, 해풍고추, 복분자 등을 홍보하였으며 특히, 고창일반산업단지·복분자농공단지에 투자 및 지원하는 제도에 대해서도 홍보하였다. 이는 향후에 좀 더 편리한 조건 (원료 공급, 물류, 저장, 원가절감 등)의 산업화를 위한 검토 대상이 될 것으로 판단되었다. 경북 영덕과 경기 양평에서도 오디와 관련된 제품 (막걸리, 오디주, 가공식품)을 홍보하였으며 차후 본 연구개발의 원료확보를 위한 주요 공급처로서의 검토가 필요할 것이다. 천연색소와 관련된 식품첨가물 업체는 해외 원료의 수입 및 판매하는 유통업체 몇 업체를 제외하고 많이 참가하지 않았다. 이는 현재 국내에서 제조/판매되는 천연색소는 대부분 중국, 일본, 유럽 등의 글로벌 업체로부터 원료를 수입/판매하는 형태의 업체들이 주를 이루고 있기 때문이며 본 연구개발의 최종 목표인 천연색소의 국산화 기술 개발이 시급한 이유이기도 하다.



Fig. 8. 2013 서울국제식품산업대전 참가

제 2 절. Anthocyanin계 천연색소 분석을 위한 재료 및 방법

1. 조추출물의 제조

본 실험에 사용한 복분자는 (주)우리농(Wanju-gun, Jeollabuk-do, Korea)에서 구입하였고, 컬러감자(자영, 홍영)는 옥션에서 구입하였으며, 오디는 전남 영광에서 수확한 것을 제공받아 사용하였다. 건조 시료 1 g을 60% ethanol 200 mL와 함께 sonicator(VC 601, Sonics & Materials Inc., Newtown, CT., USA)를 이용하여 40°C에서 1 시간 추출하여 시료로 사용하였다.

2. 최적 추출 공정의 실험설계 (추출용매, 온도, 시간)

최적 ethanol 추출 조건에 의해 복분자와 홍영에 60% ethanol을 시료 대 용매 비율(%)에 따라 혼합하고, 추출온도(°C) 및 추출시간(hr)에 따라 추출하여 그 추출물을 시료로 사용하였다.

최적 ethanol 추출 공정에 대한 실험설계는 중심합성계획을 사용하였다. ethanol 추출공정에 대한 요인은 세 가지로서 시료 대 용매 비율(X_1) 10-20%, 추출온도(X_2) 30-70°C, 추출시간(X_3) 1-5 hr을 흥미구역으로 정하였으며, 각 요인에 대한 수준은 **Table 5**와 같다. 각 독립변수는 수준을 3가지로 하여 -1 ~ 1 범위의 각 code value를 갖도록 부호화하여 중심합성계획에 따라 15 구간으로 설정하였다(**Table 6**).

본 실험에서 반응표면분석을 위한 이차다항회귀곡선식은 아래와 같다.

$$A + A_1X_1 + A_2X_2 + A_3X_3 + A_4X_1X_2 + A_5X_1X_3 + A_6X_2X_3 + A_7X_1^2 + A_8X_2^2 + A_9X_3^2$$

여기서, X는 독립변수로서 X_1 (시료 대 용매 비율), X_2 (추출온도), X_3 (추출시간)이며, Y는 종속변수(Y_n)로 Total Anthocyanin 함량에 대한 값이고, A_i 는 회귀계수이다. ethanol 추출공정의 최적화를 위해 반응표면분석법을 사용하였으며 각 인자의 수준 변화에 따른 ethanol 추출공정의 최적화를 위하여 분산분석, 이차다항회귀곡선식 및 반응표면분석법 등의 통계방법을 이용하였고 통계분석은 SAS 9.3(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하였다.

Table 5. Factors and levels of experiment for ethanol extraction of *Bokbunja*.

Factors	Symbol	Levels		
		-1	0	1
Ratio of sample to solvent (%)	X_1	10	15	20
Extraction temperature (°C)	X_2	30	50	70
Extraction time (hr)	X_3	1	3	5

Table 6. Central composite design for ethanol extraction of *Bokbunja* and its dependent variables.

Experiment number	X1	X2	X3	Ratio of sample to solvent (%)	Extraction temperature (°C)	Extraction time (hr)
1	0	-1	1	15	30	5
2	0	1	-1	15	70	1
3	0	0	0	15	50	3
4	0	-1	-1	15	30	1
5	-1	0	1	10	50	5
6	-1	-1	0	10	30	3
7	-1	0	-1	10	50	1
8	0	0	0	15	50	3
9	1	1	0	20	70	3
10	0	0	0	15	50	3
11	1	0	-1	20	50	1
12	1	0	1	20	50	5
13	1	-1	0	20	30	3
14	0	1	1	15	70	5
15	-1	1	0	10	70	3

3. 최적 추출 공정의 실험설계 (추출용매, 산도조절제)

본 실험에서 Anthocyanin계 천연색소 추출 시 수율향상을 위한 추출공정의 처리조건에 대한 실험계획은 중심합성계획(central composite design)을 사용하였으며, 반응표면분석을 위해 MINITAB statistical software를 사용하였다. 이때 ethanol 함량 조건은 용매에 대한 농도(X_1)로는 16-44%, ASM(X_2)은 0.56-0.84%로 정하였다. 이들 독립변수들은 5수준(-1.4, -1, 0, 1, 1.4)으로 부호화하여 중심합성계획법에 따라 설정하였다. 또한 이들 독립변수에 의해 영향을 받는 종속변수는 천연색소로의 활용이 목표이므로 Anthocyanin 흡광도(520nm)와 Total Anthocyanin 함량으로 정하였다. 나머지 추출조건(시료 대 용매 비율, 추출시간, 추출온도)은 고정하였다.

Table 7. Anthocyanin계 천연색소 추출조건 설정

Independent variables	Symbol	Levels				
		-1.4	-1	0	1	1.4
Ethanol concentration(%)	X ₁	16	20	30	40	44
ASM concentration(%)	X ₂	0.56	0.6	0.7	0.8	0.84

Table 8. Anthocyanin계 천연색소 추출실험 설계

Experiment number	X ₁	X ₂	Ethanol concentration (%)	ASM concentration (%)
1	-1	-1	20	0.6
2	1	-1	40	0.6
3	-1	1	20	0.8
4	1	1	40	0.8
5	-1.4	0	16	0.7
6	1.4	0	44	0.7
7	0	-1.4	30	0.56
8	0	1.4	30	0.84
9	0	0	30	0.7
10	0	0	30	0.7
11	0	0	30	0.7
12	0	0	30	0.7
13	0	0	30	0.7

총 13가지 실험을 설계하였으며, 이 중 8가지는 factorial experiments이며 5가지 실험은 오류를 추정하기 위한 zero-point tests이다(**Table 8**).

4. 최적 추출 공정의 실험설계 (효소처리)

본 실험에서는 최적 ethanol 추출 공정에 의해 추출된 추출물을 시료로 하여 수율 및 항산화 활성 향상을 위해 Novozyme 사(Bagsvaerd, Denmark)의 Pectinex Ultra SP-L(9,500 pectinase unit/mL)과 Novozym 33095(10,000 pectin transeliminase unit/mL)로 효소 처리를 하였고, 그 다음 4000 rpm으로 15 분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. Pectinex Ultra SP-L과 Novozym 33095 상등액의 지방성분을 제거하기 위해 ethyl ether : *n*-hexane (1:6, v/v)용액으로 세척한

다음 진공회전농축기(BUCHI rotavapor R-124 and BUCHI water bath B-480, Flawil, Switzerland)로 40°C에서 20 Brix까지 농축한 후 동결 건조하여 시료로 사용하였다.

복분자, 오디, 자영 및 홍영을 이용한 최적 효소 처리 공정에 대한 실험설계는 중심합성계획(central composite design)을 사용하였으며, Pectinex Ultra SP-L과 Novozym 33095의 manual에서 최적 activity 범위를 흥미구역으로 정하였다. Pectinex Ultra SP-L에 대한 요인은 세 가지로서 시료에 대한 효소농도(X_1) 0.5-1.5 mL/100 L, 반응온도(X_2) 20-60°C, 반응시간(X_3) 2-8 시간을 흥미구역으로 정하였으며 각 요인에 대한 수준은 **Table 9**와 같다. Novozym 33095에 대한 요인도 세 가지로서 시료에 대한 효소농도(X_1) 0.05-0.25 mL/L, 반응온도(X_2) 20-60°C, 반응시간(X_3) 60-120 분을 흥미구역으로 정하였으며 각 요인에 대한 수준은 **Table 11**과 같다. 각 독립변수는 수준을 3가지로 하여 -1 ~ 1 범위의 각 code value를 갖도록 부호화하여 중심합성계획에 따라 15 구간으로 설정하였다(**Table 10**, **Table 12**).

본 연구에서 반응표면분석을 위한 이차다항회귀곡선식은 아래와 같다.

$$A + A_1X_1 + A_2X_2 + A_3X_3 + A_4X_1X_2 + A_5X_1X_3 + A_6X_2X_3 + A_7X_1^2 + A_8X_2^2 + A_9X_3^2$$

여기서, X는 독립변수로서 X_1 (효소농도), X_2 (반응온도), X_3 (반응시간)이며, Y는 종속변수(Y_n)로 수율(Y_1), Total Polyphenol 함량(Y_2), Total Flavonoid 함량(Y_3), Total Anthocyanin 함량(Y_4), DPPH radical 소거능(Y_5), SOD-like 활성능(Y_6)에 대한 값이고, A_i 는 회귀계수이다. 효소 처리 공정의 최적화를 위해 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 사용하였으며 각 인자의 수준 변화에 따른 효소 처리 공정의 최적화를 위하여 분산분석, 이차다항회귀곡선식 및 반응표면분석법 등의 통계방법을 이용하였고 통계분석은 SAS 9.3(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하였다.

Table 9. Factors and levels of experiment for Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment of *Bokbunja* extracts.

Factors	Symbol	Code value		
		-1	0	1
Concentration of Pectinex Ultra SP-L (mL/100 L)	X_1	0.5	1.0	1.5
Reaction temperature (°C)	X_2	20	40	60
Reaction time (hr)	X_3	2	5	8

Table 10. Central composite design for Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment of *Bokbunja* extracts and its dependent variables.

Experiment number	X ₁	X ₂	X ₃	Concentration of enzymatic activity (mL/100 L)	Reaction temperature (°C)	Reaction time (hr)
1	0	-1	1	1.0	20	8
2	0	1	-1	1.0	60	2
3	0	0	0	1.0	40	5
4	0	-1	-1	1.0	20	2
5	-1	0	1	0.5	40	8
6	-1	-1	0	0.5	20	5
7	-1	0	-1	0.5	40	2
8	0	0	0	1.0	40	5
9	1	1	0	1.5	60	5
10	0	0	0	1.0	40	5
11	1	0	-1	1.5	40	2
12	1	0	1	1.5	40	8
13	1	-1	0	1.5	20	5
14	0	1	1	1.0	60	8
15	-1	1	0	0.5	60	5

Table 11. Factors and levels of experiment for Novozym 33095 enzyme treatment of *Bokbunja* extracts.

Factors	Symbol	Code value		
		-1	0	1
Concentration of Novozym 33095 (mL/L)	X ₁	0.05	0.15	0.25
Reaction temperature (°C)	X ₂	20	40	60
Reaction time (min)	X ₃	60	90	120

Table 12. Central composite design for Novozym 33095 enzyme treatment of *Bokbunja* extracts and its dependent variables.

Experiment number	X ₁	X ₂	X ₃	Concentration of enzymatic activity (mL/L)	Reaction temperature (°C)	Reaction time (min)
1	0	-1	1	0.15	20	120
2	0	1	-1	0.15	60	60
3	0	0	0	0.15	40	90
4	0	-1	-1	0.15	20	60
5	-1	0	1	0.05	40	120
6	-1	-1	0	0.05	20	90
7	-1	0	-1	0.05	40	60
8	0	0	0	0.15	40	90
9	1	1	0	0.25	60	90
10	0	0	0	0.15	40	90
11	1	0	-1	0.25	40	60
12	1	0	1	0.25	40	120
13	1	-1	0	0.25	20	90
14	0	1	1	0.15	60	120
15	-1	1	0	0.05	60	90

5. 복분자막 천연색소의 추출조건 설정

가. 추출용매

복분자막으로부터 식용 천연색소를 추출하기 위하여 추출용매는 정제수와 식음용 곡물주정(95%, 대한주정라이프, 한국)을 사용하였으며 추출용매의 농도는 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 95%이었다. 추출조건은 복분자막 대비 10배의 추출용매를 첨가하였고, 50°C에서 3시간 동안 shaking한 후 Whatman No.1 여과지로 흡인 여과하여 추출액을 분석하였다.

나. 산도조절제

Anthocyanin계 천연색소는 pH가 낮은 조건에서 적색을 발현하는 색소이므로 pH를 산성으로 조절해주는 다양한 유기산(citric acid, acetic acid, lactic acid, butyric acid, palmitic acid, oxalic acid, tartaric acid 등)을 첨가하여 추출하는 공정이 주를 이루고 있다. 식품첨가물로서의 천연색소를 제조하는 것이 본 연구개발의 목표이므로 다양한 유기산 중에서도 가장 추출 효율이 우수한 것으로 널리 알려진 Citric Acid(Food Grade)를 사용하였다. 또한 일반적으로

식품제조가공분야에 널리 사용되고 있는 산도조절제인 축합인산염 중에서도 metal ion chelation, 분산성, 해교성이 매우 크며 완충작용, 이온강도 증가, 세정작용 등 다양한 능력을 보유하고 있는 고중합 산성메타인산나트륨(Acidic Sodium Metaphosphate, 서도비엔아이(주), 한국)은 1.0% 수용액에서의 pH가 2.0으로 유기산보다 적은 함량으로도 pH를 조절할 수 있는 buffer 능력이 있으며 항균활성력도 뛰어난 무기인산염이다. 유기산인 citric Acid와의 추출 효율을 비교하기 위하여 추출실험에 사용하였다.

다. 추출시간 및 추출횟수

복분자박 대비 10배의 추출용매를 첨가하여 50℃에서 shaking하면서 1~9시간 동안 추출하고 Whatman No.1 여과지로 흡인 여과한 후 남은 잔사를 다시 새로운 추출용매를 사용하여 2회 반복 추출·여과하여 추출액을 분석하였다.

라. 추출온도 및 추출횟수

복분자박 대비 10배의 추출용매를 첨가하여 30, 50, 70, 90℃에서 3시간 동안 shaking한 후 Whatman No.1 여과지로 흡인 여과한 후 남은 잔사를 다시 새로운 추출용매를 사용하여 2회 반복 추출·여과하여 추출액을 분석하였다.

6. 복분자박 천연색소의 안정화 기술 개발

가. 복분자박 천연색소의 추출과 농축

식용 천연색소로서 활용하기 위하여 추출용매는 복분자박 대비 10배의 0.7% 함량의 Citric acid(Food grade, 중국)가 첨가된 30%(w/w) 농도의 식음용 곡물주정(95%, 대한주정라이프, 한국)을 사용하였으며 추출조건은 40L 용량의 스테인레스 추출기(자체제작)에 복분자박을 추출용 보자기를 이용하여 투입하고 50℃에서 3시간 동안 교반 추출한 후 pore size 5 μ m의 카트리지 필터 2개를 이용하여 흡인 여과한 뒤 잔여 부산물은 다시 동일한 용매를 사용하여 2회 반복 추출하였다. 40L 용량의 진공저온농축기(MM-0750A, 미광메디컬, 한국)를 이용하여 최종 20Brix가 되도록 농축한 뒤 Whatman No.1 여과지를 이용하여 흡인 여과한 농축액을 제조하였다.

나. pH 및 가열처리에 따른 색소의 안정성 평가

복분자박 농축액의 pH 및 가열처리에 대한 안정성을 확인하기 위하여 MacIlvaine 완충액을 사용하여 pH를 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0으로 조절하였다. 각 pH별로 복분자박 농축액을 첨가하여 최종농도 1% 수용액을 제조하였고 각 수용액을 10mL씩 cap test tube에 넣어 50, 70, 100℃의 항온수조(BW-20G, 한국)에서 0~30분까지 가열처리를 시킨 후 색상의 변화를 측정하였다.

다. 당류 첨가 및 저장온도, 저장기간에 따른 색소의 안정성 평가

당류 첨가가 복분자박 농축액의 저장온도와 저장기간에 미치는 영향을 확인하기 위하여 pH 3.0의 구연산·제2인산나트륨 완충액을 사용하여 1% 농도의 색소 수용액을 제조하였고 각 수용액에 fructose, maltose, sucrose, glucose, galactose를 각 0.1%, 0.5%, 1.0% 첨가하였다. 각각의 시료를 복분자 Anthocyanin의 최대흡수파장인 513nm에서 흡광도를 측정된 뒤 25°C의 상온과 4°C의 냉장고에 2주 동안 보관하면서 흡광도의 변화를 측정하여 저장기간 중 색소의 안정성을 평가하였다.

라. Co-pigmentation에 의한 Anthocyanin계 천연색소의 안정성 평가

Anthocyanin의 구조적 안정성을 높일 수 있는 co-pigment로서 tannic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, hydrobenzoic acid를 선택하고 색소 농도의 1, 5, 10, 20, 40배가 되도록 첨가하여 pH 3.0의 구연산·제2인산나트륨 완충액에서 co-pigment의 농도에 대한 영향을 조사한 뒤, 각각의 시료를 25°C의 상온과 4°C의 냉장고에 2주 동안 보관하면서 흡광도의 변화를 측정하여 저장기간 중 색소의 안정성을 평가하였다.

7. 복분자박으로부터 Anthocyanin의 최적 분리정제 실험설계

본 실험에 사용한 복분자박 A는 코레아누스(Gochang-gun, Jeollabuk-do, Korea)에서 제공받은 것으로 착즙 후 압착한 시료였으며, 복분자박 B는 (주)연수당(Gwangju, Korea)에서 제공받은 것으로 복분자 생과를 원심분리에 의해 착즙하고 남은 부산물을 시료로 사용하였다.

복분자박으로부터 최적 ethanol 추출 공정과 최적 효소 처리 공정에 의해 추출물을 제조하였다. MCX(Mixed Cation Exchange) SPE cartridge(6 mL, Waters Corp., Milford, MA)를 이용한 정제는 cartridge에 3차 증류수를 용출시켜 수지의 불순물을 제거하고 시료 12 mL을 흘려내린 뒤, 다시 3차 증류수를 투입하여 시료의 당류와 유기산, 비흡착 색소, 아미노산 등을 제거하였다. 색소를 얻기 위해 pH 조절제를 포함한 ethanol 24 mL로써 용출시킨 후 시료로 사용하였다. HP-20(Iontec Corp., Seongnam, Korea)과 Amberlite XAD-7(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)은 Yoon 등(Yoon and Lee, 1979)과 Kim 등(Kim and Kim, 2003)의 방법을 변형시켜 사용하였다. Glass open column(2.5 cm i.d. x 25 cm)을 sorbent로 충전하고 sea sand를 위아래로 충분히 넣어 수지를 손상시키지 않도록 하였다. 그리고 3차 증류수로써 용출시켜 수지의 불순물을 제거한 다음 시료 30 mL를 loading 하였다. 시료의 당류와 유기산, 비흡착 색소, 아미노산 등의 제거를 위해 3차 증류수를 흘려준 뒤 pH 조절제를 포함한 ethanol 250 mL로써 용출시킨 후 농축하여 시료로 사용하였다.

복분자박을 이용한 Anthocyanin의 최적 분리정제 실험설계는 요인실험법(full factorial design)을 사용하였으며, MCX SPE cartridge, HP-20 및 Amberlite XAD-7을 sorbent로 사용하였다(Fig. 9). 이때 요인은 두 가지로서 HCl 또는 TFA(Trifluoroacetic acid)의 농도(X_1) 0.1-1.0%와 ethanol의 농도(X_2) 60-90%를 흥미구역으로 정하였으며, 각 요인에 대한 수준은 Table 13, 15와 같다. 각 독립변수는 수준을 3가지로하여 -1, 0, 1범위의 각 code value를 갖도록 부호화하여 요인실험법에 따라 9 구간으로 설정하였다(Table 14, 16).

본 실험에서 반응표면분석을 위한 이차다항회귀곡선식은 아래와 같다.

$$Y = A_0 + A_1X_1 + A_2X_2 + A_3X_1X_2 + A_4X_1^2 + A_5X_2^2$$

여기서, X는 독립변수로서 X₁(HCl 또는 TFA 농도), X₂(ethanol 농도)이며, Y는 종속변수로 복분자박에서 분리정제한 Anthocyanin의 수율(Y₁), 색가(Y₂) 및 Total Anthocyanin 함량(Y₃)에 대한 값이고, A_i는 회귀계수이다. 분리정제 공정의 최적화를 위해 반응표면분석법을 사용하였으며 각 인자의 수준 변화에 따른 분리정제 공정의 최적화를 위하여 분산분석, 이차다항회귀곡선식 및 반응표면분석법 등의 통계방법을 이용하였고 통계분석은 SAS 9.3(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하였다.

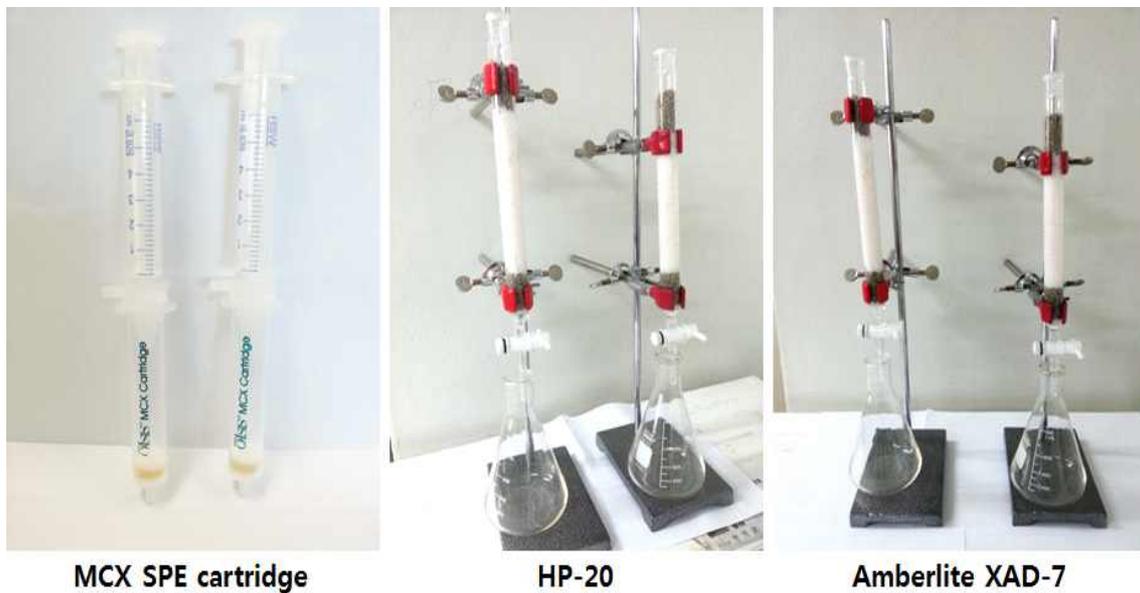


Fig. 9. Appearances of the sorbent for Anthocyanin isolation from *Bokbunja* byproduct extracts.

Table 13. Factors and levels of experiment for Anthocyanin isolation from *Bokbunja* byproduct extracts.

Factors	Symbol	Code value		
		-1	0	1
Concentration of HCl (%)	X ₁	0.1	0.55	1.0
Concentration of ethanol (%)	X ₂	60	75	90

Table 14. Full factorial design for Anthocyanin isolation from *Bokbunja* byproduct extracts by sorbent according to HCl and ethanol concentrations.

Experiment number	X ₁	X ₂	Concentration of HCl (%)	Concentration of ethanol (%)
1	-1	-1	0.1	60
2	-1	0	0.1	75
3	-1	1	0.1	90
4	0	-1	0.55	60
5	0	0	0.55	75
6	0	1	0.55	90
7	1	-1	1.0	60
8	1	0	1.0	75
9	1	1	1.0	90

Table 15. Factors and levels of experiment for Anthocyanin isolation from *Bokbunja* byproduct extracts.

Factors	Symbol	Code value		
		-1	0	1
Concentration of TFA (%)	X ₁	0.1	0.55	1.0
Concentration of ethanol (%)	X ₂	60	75	90

Table 16. Full factorial design for Anthocyanin isolation from *Bokbunja* byproduct extracts by sorbent according to TFA and ethanol concentrations.

Experiment number	X ₁	X ₂	Concentration of TFA (%)	Concentration of ethanol (%)
1	-1	-1	0.1	60
2	-1	0	0.1	75
3	-1	1	0.1	90
4	0	-1	0.55	60
5	0	0	0.55	75
6	0	1	0.55	90
7	1	-1	1.0	60
8	1	0	1.0	75
9	1	1	1.0	90

8. Citric acid를 이용한 분리정제 공정

복분자박으로부터 Anthocyanin 분리정제 시 pH 조절제로 사용된 HCl과 TFA를 대체하기 위해 식용 가능한 유기산인 citric acid를 이용하여 분리정제 하였다. 최적 ethanol 추출 공정 및 최적 효소 처리 공정에 따라 제조된 추출물을 HP-20 sorbent에 흡착 시킨 후 흡착된 Anthocyanin을 용출하기 위해 용출제로서 60% ethanol을 사용하였고, pH 조절제로 citric acid를 0, 0.4, 0.7 및 1.0%(w/v)으로 농도를 달리하여 정제물을 얻었다.

9. 복분자의 착즙 시기에 따른 생리활성 차이 비교

복분자박 천연색소는 주관기관인 서도비엔아이(주)에서 제공받은 것으로 두 시료 모두 50℃에서 3 hr 교반 추출하고 여과하여 60℃에서 농축한 후 분말건조한 시료로서, SD04는 2013년 1월에 수확 및 착즙된 복분자박이었고, SD07은 2013년 10월에 수확 및 착즙된 복분자박이었다.

10. 추출용매의 재사용에 따른 시제품들의 생리활성 비교

본 실험에 사용한 복분자박 천연색소는 주관기관인 서도비엔아이(주)에서 제공받은 것으로 Fig. 10과 같은 제조 과정에 의해 생산된 시제품이었다. 추출 시 사용한 용매를 회수하여 재사용하였고 이에 따라 신규 용매를 사용한 Antho-Red KR(140305), 1차 회수용매를 사용한 Antho-Red KR(140403), 2차 회수용매를 사용한 Antho-Red KR(140409), 3차 회수용매를 사용한 Antho-Red KR(140416) 그리고 4차 회수용매를 사용한 Antho-Red KR(140418)까지 총 5개의 시제품을 시료로 사용하였다.

11. 효소의 종류에 따른 시제품들의 생리활성 비교

본 실험에 사용한 복분자박 천연색소는 주관기관인 서도비엔아이(주)에서 제공받은 것으로 Fig. 11과 같은 제조 과정에 의해 생산된 시제품이다. 추출 시 효소를 복분자박 대비 0.5%로 투입하였고 Pectinex SP-L 효소를 사용한 Antho-Red KR(140430), Plantase PLC를 사용한 Antho-Red KR(140512), Plantase MAX를 사용한 Antho-Red KR(140515) 그리고 AMG 300L를 사용한 Antho-Red KR(140521)까지 총 4개의 시제품을 시료로 사용하였다.

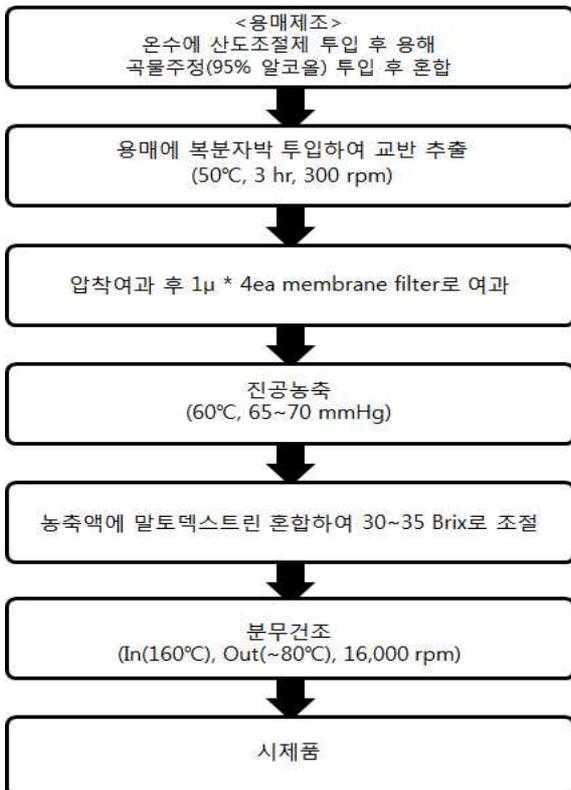


Fig. 10. Manufacturing process of Anthocyanin-based pigment prototypes produced by extraction solvent reusing from *Bokbunja* byproduct.

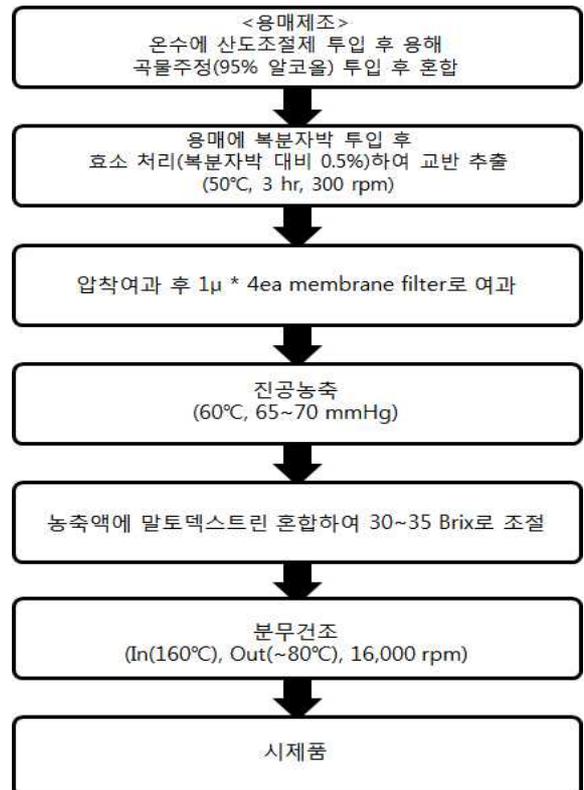


Fig. 11. Manufacturing process of Anthocyanin-based pigment prototypes produced according to the type of enzyme from *Bokbunja* byproduct.

12. Solid phase microextraction (SPME)

시료의 휘발성 향기성분을 추출하기 위해서 solid phase microextraion(SPME)을 이용하였다. SPME fiber는 50/30 μm divinylbenzene/carboxen/polydimethyl siloxane을 사용하였다. 시료 7 g을 20 mL headspace vial에 넣고 teflon cap으로 밀봉하였다. 40°C에서 30 분간 방치하여 평형상태에 도달시킨 후, SPME fiber를 1 cm 노출시켜 30 분 동안 시료의 휘발성 향기성분을 흡착시켰다. fiber를 GC의 injector port(200°C)에 노출시키고, 1 분 동안 탈착시켰다. 추출은 duplicate로 실시하였다.

13. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

시료의 휘발성 향기성분은 Agilent 6890N GC/Agilent 5973 mass selective detector(MSD)(Agilent Co., Palo Alto, CA, USA)를 사용하여 동정하였다. Column은 DB-5ms(60 m length x 0.25 mm i.d. x 0.25 μm film thickness : J& W Scientific, Folsom, CA, USA)와 DB-wax(60 m length x 0.25 mm i.d x 0.25 μm film thickness : J & W Scientific, Folsom, CA, USA)를 사용하였고, oven 온도는 40°C에서 5 분간 유지한 후 200°C까지 5°C/min의 속도로 승온시켜 20 분간 유지하였다. Injector온도는 200°C, detector온도는 250°C이었으며 carrier gas로는 helium을 사용하였고 유속은 1 mL/min이었다. Ionization voltage는 70 eV 그리고 분석할 분자량의 범위(m/z)는 33~350으로 하여 분석하였다. 분석은 duplicate로 실시하였다.

14. 항산화활성

가. Total polyphenol 함량 측정

Total polyphenol 함량은 Folin-Denis법(Cho et al, 2005)을 약간 변형하여 측정하였다. 즉, 추출물 2 mL에 2% Na_2CO_3 용액 2 mL을 가한 후 실온에서 3 분간 반응시킨 다음 50% Folin-ciocalteu용액 0.4 mL을 가하여 실온에서 30 분간 방치한 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. Total polyphenol 함량을 구하기 위해 표준물질로 tannic acid를 이용하여 표준검량곡선으로부터 함량을 구하였다.

나. Total flavonoid 함량 측정

Total flavonoid 함량은 Cha 등(Cha et al, 2007)의 방법에 의해 추출액 0.5 mL에 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 용액 1 mL와 1M potassium acetate 용액 0.1 mL를 첨가하고, 증류수 4.3 mL를 더 첨가하였다. 시료액을 실온에서 40 분간 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 Total Flavonoid함량을 구하기 위한 표준물질로는 quercetin을 이용하여 작성한 표준검량곡선으로부터 함량을 구하였다.

다. DPPH radical 소거능 측정

DPPH radical 소거능은 Blois(Blois, 1958)의 방법에 의해 시료 1 mL를 시험관에 넣고 95%(v/v) ethyl alcohol 4 mL을 가하여 실험용액을 제조하였다. 이 용액에 0.2 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)용액 1.0 mL을 넣고 상온에서 30분간 반응시킨 후 U.V. visible spectrophotometer(OPTIZEN POP, Mecasys Co., Ltd. Daejeon, Korea)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 대신 증류수를 이용하여 동일한 방법으로 수행하였고 각 시료에 대한 자유라디칼인 DPPH radical 소거능(%)은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

$$DPPH \text{ radical 소거능 } (\%) = (1 - \frac{A}{B}) \times 100$$

여기서, A : Absorbance of sample

B : Absorbance of blank

라. SOD-like 활성능

SOD-like 활성능은 Marklund와 Gudrun의 방법(Marklund and Gudrun, 1974)을 변형하여 사용하였다. 일정농도의 시료 0.2 mL, Tris-HCl buffer(50 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane + 10 mM EDTA, pH 8.5로 보정) 3 mL, 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL을 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시키고 1 N HCl, 1 mL를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양은 420 nm에서 흡광도를 측정하였으면 SOD-like 활성능은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다. SOD-like 활성능은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

$$SOD - like \text{ 활성능 } (\%) = (1 - \frac{A}{B}) \times 100$$

여기서, A : Absorbance of sample

B : Absorbance of blank

마. Hydroxyl radical 소거능

Hydroxyl radical 소거능은 Halliwell 등(Halliwell et al, 1987)의 방법에 따라 Fenton 반응에 의한 2-deoxyribose가 hydroxyl radical에 의해 산화되어 malonaldehyde로 변환된 후 chromagen을 형성하는 정도를 측정하는 방법을 이용하였다. 2.8 mM 2-deoxy-D-ribose와 1.4 mM H₂O₂를 함유하는 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4) 일정량에 증류수에 녹인 각각의 시료와 premix 된 EDTA/FeCl₂(100 uM EDTA pH 7.0, 20 uM FeCl₂)를 첨가하여 최종반응액이 2.0 mL가 되게 한 후 37°C에서 4 시간동안 반응시켰다. 10% trichloroacetic

acid(TCA)로 반응을 중지시키고 1% thiobarbituronic acid (TBA)와 잘 혼합하여 95℃에서 20 분간 반응시킨 후 실온에서 냉각하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 같은 시료로 반응 시간 없이 동일한 과정을 반복하였고 대조구는 시료 대신 증류수를 이용하여 동일한 방법으로 수행하였다. 각 시료에 대한 hydroxyl radical 소거능(%)은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Hydroxyl radical 소거능 (\%)} = \left(1 - \frac{A - B}{C - D}\right) \times 100$$

여기서, A : Absorbance of sample (4 hr)
 B : Absorbance of sample (0 time)
 C : Absorbance of blank (4 hr)
 D : Absorbance of blank (0 time)

바. Hydrogen peroxide 소거능

Choi 등(Choi et al, 2002)의 방법을 변형하여 hydrogen peroxide 소거능을 측정하였다. 96 well micro plate에 PBS 100 μL, 증류수에 녹인 시료 20 uL을 넣고 1 mM H₂O₂를 가하여 5 분간 방치한 다음 1.25 nM ABTS 30 μL와 PBS에 녹인 1 u/mL peroxidase, 30 uL를 첨가하여 37℃에서 10 분간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Hydrogen peroxide 소거능 (\%)} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

여기서, A : Absorbance of sample
 B : Absorbance of blank

사. Elastase 저해 활성능

Park(Park, 1997)의 방법을 약간 변형하여 elastase 저해 활성능을 측정하였다. 시료를 0.2 M Tris-Cl buffer(pH 8.0)로 희석배수에 따라 희석하고(10~1000 μg/mL), 희석된 시료 20 μL에 0.2 M Tris-Cl buffer(pH 8.0) 200 μL를 가한 다음, 0.8 mM N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide 20 μL씩 첨가하였다. 반응혼합물은 다시 25℃에서 10 분간 배양한 다음, 1.0 μg/mL의 porcine pancreatic elastase(PPE)를 20 μL씩 첨가하였다. 반응혼합물은 다시 25℃에서 20 분간 배양한 후, 냉침으로 반응을 정지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 시료대신 증류수를 가해 효소의 활성을 측정하였다.

$$\text{Elastase 저해 활성능 (\%)} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

여기서, A : Absorbance of sample
 B : Absorbance of blank

아. Total Anthocyanin 함량

Total Anthocyanin 함량은 Hosseinian 등(Hosseinian et al, 2008)의 pH differential method에 따라 측정하였다. 각 추출물 0.5 mL에 0.025 M potassium chloride buffer(pH 1.0)와 0.4 M sodium acetate buffer(pH 4.5)를 가하여 최종부피를 5 mL로 한 다음 510 nm 및 700 nm에서 반응액의 흡광도를 각각 측정하였다. Total Anthocyanin의 함량은 cyanidin-3-glucoside의 몰흡광계수($\epsilon=26,900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 이용하여 다음의 식에 따라 산출하였다.

$$\text{총 안토시아닌 함량 } (mg/100g) = \frac{A \times MW \times D \times 100}{\epsilon \times V}$$

여기서, A(absorbance value) = $(A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 1.0} - (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 4.5}$

MW(molecular weight of cyanidin-3-glucoside) : 449.2

D : Dilution ratio of sample

ϵ (cyanidin-3-glucoside molar absorbance) : $26,900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

V : Final volume of sample (mL)

자. 색가

식품첨가물공전 베리류색소의 색가 정량법에 따라 시료의 흡광도가 0.3~0.7의 범위가 되도록 pH 3.0의 구연산 인산이나트륨 완충액을 가하여 100 mL로 한 것을 시험용액으로 하였으며 원심 분리하여 그 상등액을 사용하였다. pH 3.0의 구연산 인산이나트륨 완충액을 대조 액으로 하여 액 층 1 cm, 파장 500~540 nm 부근의 극대흡수파장에서 시험용액의 흡광도를 측정하여 다음 식에 따라 색가를 구하였다.

$$\text{Color value } (E 10\%, 1 \text{ cm}) = \frac{A \times 10}{B}$$

여기서, A : Absorbance of sample

B : Weight of sample (g)

15. 통계처리

통계분석은 SAS 9.3(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) program을 이용하였으며 분산분석(ANOVA)한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 하여 처리군 간의 유의성 검정을 하였다.

제 3 절. 실험 결과

1. Anthocyanin계 천연색소의 원료선별

복분자, 오디, 컬러감자(자영, 홍영)의 외형을 보면 오디가 복분자보다 색상이 짙으며 컬러감자는 육질보다는 껍질에 색소가 진하게 나타났고, 자영은 보라색 계통을 띠었고 홍영은 붉은색 계통을 띠었다(Fig. 12). 60% ethanol을 이용하여 조추출물을 제조하였을 때, 외관상 오디가 가장 짙은 색상을 나타내었으며 복분자, 홍영, 자영 순으로 나타났다(Fig. 13). 조추출물을 분석한 결과 total 안토시아닌 함량은 복분자가 0.12 mg/100 g으로 가장 높게 나타났고, 오디(0.09 mg/100 g), 홍영(0.06 mg/100 g) 및 자영(0.06 mg/100 g) 순으로 나타났다.

Hunter's color의 L값은 명도를 나타내며, a값은 녹색도(-a)에서 적색도(+a)의 차원을 의미하고, b값은 청색도(-b)에서 황색도(+b)의 차원을 의미한다(Lee and Shin, 2006). Hunter value의 붉은색(redness, a)값에서도 복분자(72.53), 오디(68.03), 홍영(65.47), 자영(50.73) 순으로 높게 나타났으며 5% 수준에서 유의성차이가 나타났다(Table 17).

페놀화합물은 구조상 phenolic hydroxyl기를 가지고 있는 공명 안정화된 물질로(Giacosa and Filiberti, 1996) 발암 억제와 항산화작용을 하는 중요한 성분으로 알려져 있다(Mang, 2007). Total polyphenol 함량은 복분자가 8.25 mg/g으로 다른 시료들에 비해 5% 수준에서 유의적으로 높게 나타났으며, 오디(5.64 mg/g), 자영(3.74 mg/g), 홍영(3.83 mg/g) 간에 차이는 보이지 않았다.

페놀류의 일종인 플라보노이드류(flavonoids)는 채소나 과일, 향신료 등에 널리 존재하는 성분으로 발암 억제 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 플라보노이드 중에는 항산화효과와 활성산소 소거능을 가진 것이 많기 때문에 플라보노이드는 효과적인 항촉진제(antipromoter)로 작용한다고 볼 수 있다(Mang, 2007). Total flavonoid 함량에서는 복분자(4.42 mg/ml), 오디(3.08 mg/ml), 홍영(2.47 mg/ml), 자영(2.26 mg/ml) 순으로 시료들 간에 5% 수준에서 유의성차이가 나타났다(Table 18).

DPPH radical 소거능은 측정 방법이 간단하고 그 감도가 좋아 최근 가장 많이 사용되고 있는 항산화력 측정 방법 중 하나이다. DPPH free radical은 안정하지 않은 상태에서 보라색을 띠는데, 항산화제에 의해 수소 이온을 제공받으면 상대적으로 안정된 노란색의 DPPH radical로 전환된다. 이러한 원리를 이용하여 색상 변화에 의한 항산화력을 측정하였다(Hong et al, 2010). Total polyphenol 함량과 Total Flavonoid 함량에서 복분자와 오디가 컬러감자인 자영과 홍영에 비해 더 높게 나타났지만, DPPH radical 소거능에서는 홍영이 57.90%로 가장 높게 나타났으며 자영도 50.55%로 높게 나타나 복분자(11.76%)와 오디(34.17%)와 5% 수준에서 유의성차이를 보였다.

SOD(superoxide dismutase)는 superoxide(O_2^-)를 정상 상태의 산소로 환원시켜 주는 효소로, superoxide에 의해 유발되는 각종 질병이나 노화를 억제시켜 산화적 장애를 방어하는 효과를 기대할 수 있을 것으로 보고되고 있다(Kuramoto, 1992). SOD-like 활성능에서는 복분자가 1.10%로 가장 높게 나타났으나 오디(0.88%), 자영(0.66%), 홍영(0.88%)과 5% 수준에서 유의성차이를 보이지 않았다(Table 19).

Hydroxyl radical 소거능과 hydrogen peroxide 소거능은 복분자(80.52%, 88.40%)와 오디(73.45%, 76.65%)가 자영(14.09%, 35.65%)과 홍영(21.78%, 40.47%)보다 월등히 높게 나타났으며, elastase 저해 활성능은 자영(5.97%)과 홍영(4.69%)이 복분자(4.26%)나 오디(2.88%)에 비하여 높게 나타났다(Table 20).

Hydroxyl radical($\cdot\text{OH}$)과 같은 활성 산소와 free radical은 세포의 구성성분인 DNA나 단백질, 지방질에 산화적 장애를 일으켜 돌연변이와 염색체 이상을 유발하고 더욱 암화를 촉진하는 등 발암과정에 깊이 관여한다고 보고되고 있다(Jeong, 2005). Hydrogen peroxide(H_2O_2)는 표백제 또는 살균제로 사용되지만 식품 중에 천연으로 존재하기도 한다. Hydrogen peroxide 자체의 독성은 낮지만 세포막을 통과할 수 있고, 금속이온과 반응하여 독성이 강한 hydroxyl radical을 생성하기 때문에 생체에서 제거가 필요하다. Hydrogen peroxide 소거활성은 hydrogen peroxide를 peroxidase에 의해 물과 산소분자로 환원시키는 정도를 측정한다(Kim et al, 2011). Elastase는 알라닌, 글리신, 이소류신, 발린 등의 카르복실기를 함유한 펩티드 결합의 가수분해를 촉매하는 단백질분해효소이다. 또한, 동물 결합 조직의 불용성 탄성 섬유 단백질인 elastin을 분해하여 피부 진피조직의 그물망 구조 결합을 끊기 때문에 주름생성의 주원인이 되는 효소로 알려져 있다(Lee et al, 1999).

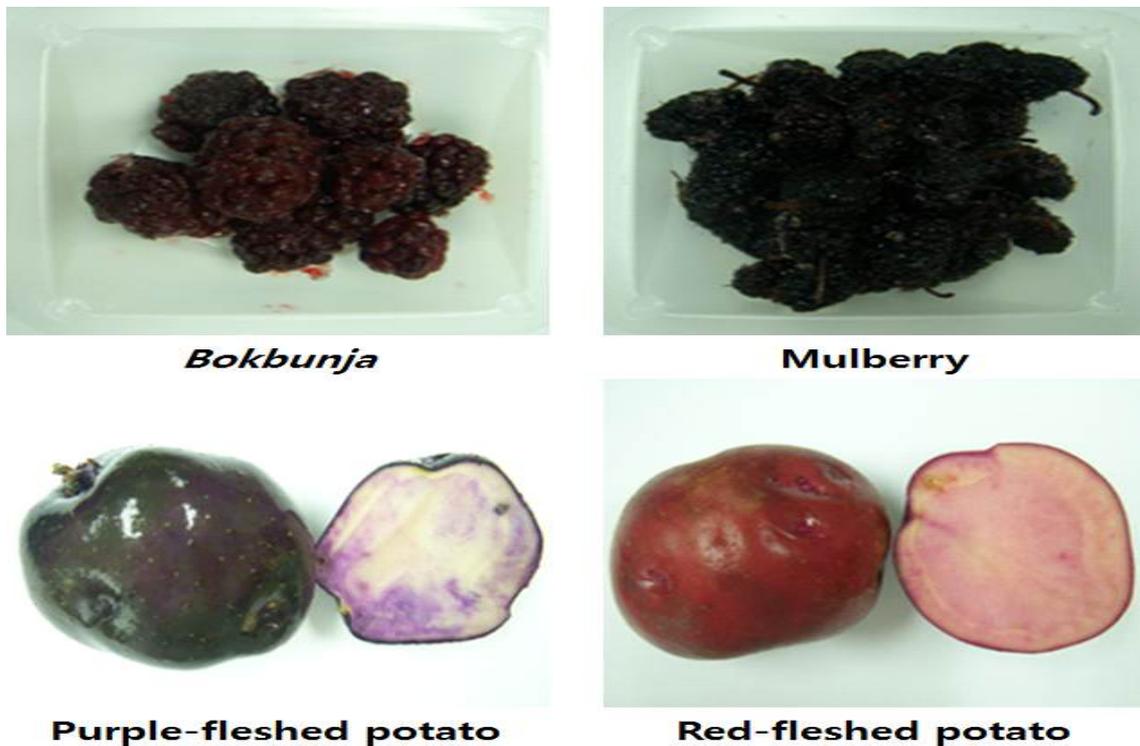


Fig. 12. Appearance of *Bokbunja*, mulberry, purple-fleshed potato and red-fleshed potato.

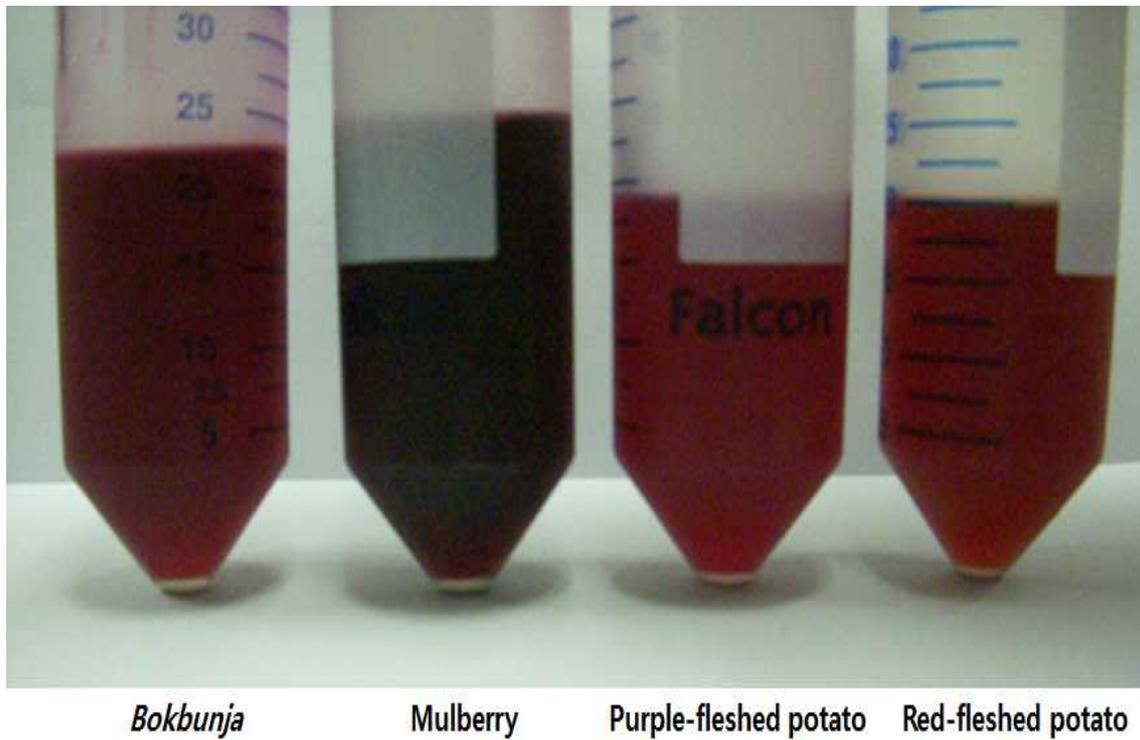


Fig. 13. Appearance of 60% ethanol extract appearance from *Bokbunja*, mulberry, purple-fleshed potato and red-fleshed potato.

Table 17. Total Anthocyanin contents and Hunter value of 60% ethanol extract from *Bokbunja*, mulberry, purple-fleshed potato and red-fleshed potato.

	Total Anthocyanin contents (mg/100 g)	Hunter value		
		L	a	b
<i>Bokbunja</i>	0.12±0.001 ^a	45.49±0.01 ^c	72.53±0.01 ^a	39.81±0.09 ^a
Mulberry	0.09±0.000 ^b	42.40±0.08 ^d	68.03±0.02 ^b	23.04±0.10 ^c
Purple-fleshed potato	0.06±0.004 ^c	56.55±0.21 ^b	65.47±0.21 ^c	-14.70±0.17 ^d
Red-fleshed potato	0.06±0.002 ^c	67.03±0.09 ^a	50.73±0.32 ^d	31.78±0.53 ^b

Table 18. Total polyphenol contents and Total Flavonoid contents of 60% ethanol extract from *Bokbunja*, mulberry, purple-fleshed potato and red-fleshed potato.

	Total polyphenol contents (mg/g)	Total flavonoid contents (mg/ml)
<i>Bokbunja</i>	8.25±0.04 ^a	4.42±0.01 ^a
Mulberry	5.64±1.40 ^b	3.08±0.11 ^b
Purple-fleshed potato	3.74±0.05 ^b	2.26±0.00 ^d
Red-fleshed potato	3.83±0.05 ^b	2.47±0.04 ^c

Table 19. DPPH radical scavenging activity and SOD-like activity of 60% ethanol extract from *Bokbunja*, mulberry, purple-fleshed potato and red-fleshed potato.

	DPPH radical scavenging activity (%)	SOD-like activity (%)
<i>Bokbunja</i>	11.76±0.34 ^d	1.10±0.93 ^{NS}
Mulberry	34.17±2.59 ^c	0.88±0.00 ^{NS}
Purple-fleshed potato	50.55±0.01 ^b	0.66±0.31 ^{NS}
Red-fleshed potato	57.90±0.40 ^a	0.88±0.62 ^{NS}

Table 20. Antioxidative activities of 60% ethanol extract from *Bokbunja*, mulberry, purple-fleshed potato and red-fleshed potato.

	Hydroxyl radical scavenging activity (%)	Hydrogen peroxide scavenging activity (%)	Elastase inhibitory activity (%)
<i>Bokbunja</i>	80.52±0.73 ^a	88.40±0.09 ^a	4.26±0.01 ^c
Mulberry	73.45±0.59 ^b	76.65±0.78 ^a	2.88±0.14 ^d
Purple-fleshed potato	14.09±1.56 ^d	35.65±1.25 ^b	5.97±0.02 ^a
Red-fleshed potato	21.78±1.42 ^c	40.47±8.63 ^b	4.69±0.01 ^b

2. Anthocyanin계 천연색소의 최적 추출 공정 개발

가. 복분자의 최적 ethanol 추출 공정 개발

세 가지 요인으로서 시료 대 용매비율(10-20%), 추출온도(30-70°C), 추출시간(1-5 hr)에 따른 복분자 추출물의 Total Anthocyanin 함량을 분석한 결과는 **Table 21**과 같다. 본 실험의 흥미영역 구간 실험 점에서 Total Anthocyanin 함량의 범위는 0.29-0.57 mg/100 g으로 나타났고, 시료 대 용매비율 15%(w/v), 추출온도 30°C, 추출시간 1 hr에서 0.57 mg/100 g으로 가장 높았다.

흥미구역 안에서 시료 대 용매비율, 추출온도, 추출시간에 따른 복분자 추출물이 Total Anthocyanin 함량에 미치는 정도를 분산 분석한 결과는 **Table 22**와 같다. Total Anthocyanin 함량에 미치는 요인으로는 추출온도, 시료 대 용매비율, 추출시간 순으로 영향을 미치는 것을 알 수 있었으며, 모든 요인이 5% 내에서 유의성 차이를 보였다.

처리 요인의 수준에 대하여 종속변수인 Total Anthocyanin 함량을 예측하기 위한 이차다항 회귀곡선식의 회귀계수를 계산한 결과는 **Table 23**과 같다. Total Anthocyanin 함량에 대하여 이차다항회귀곡선식에서의 일차다항회귀(linear), 이차다항회귀(quadratic) 및 교차회귀(cross product)의 기여도를 검정한 결과(**Table 24**) Total Anthocyanin 함량의 기여도는 일차다항회귀, 이차다항회귀 및 교차회귀 순으로 나타났으며 이차다항회귀곡선식 적합성 검정에서의 total regression은 5% 내에서 유의성 차이를 보였다.

시료 대 용매비율, 추출온도와 추출시간에 따른 복분자 추출물의 Total Anthocyanin 함량에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 **Fig. 14**와 같다. ethanol 추출공정에서 추출 시간보다는 추출온도(**Fig. 14-A, B, C**)나 시료 대 용매비율(**Fig. 14-D, E, F**)에 영향을 크게 받는 것을 알 수 있으며, 추출온도는 시료 대 용매 비율보다 영향력이 더 크게 나타났다(**Fig.**

14-G, H, I). ethanol 추출공정의 흥미영역에서의 반응평균(response mean) 값은 0.41 mg/100 g이었다. 시료 대 용매비율, 추출온도, 추출시간에 따른 복분자의 Total Anthocyanin 함량을 반응표면분석한 결과 일반적으로 추출온도가 낮고 추출시간이 짧을수록 증가하는 경향을 나타내었다. 또한, Total Anthocyanin 함량을 다중반응표면의 최적화방법으로써 만족함수(desirability function)를 이용하여 종속변수들의 가중치를 1로 놓고 종합적으로 판단한 결과 (Fig. 15) 최적 ethanol추출 조건은 시료 대 용매비율 11.71%, 추출온도 30℃, 추출시간 1 hr일 때가 최적 ethanol추출 조건으로 그 때의 Total Anthocyanin 함량은 0.52 mg/100 g으로 예측되었다.

Table 21. Central composite design for ethanol extracts from *Bokbunja* and its total anthocaynin contents.

Experiment number	X ₁	X ₂	X ₃	Total Anthocyanin contents (mg/100 g)
1	0	-1	1	0.56±0.002
2	0	1	-1	0.29±0.002
3	0	0	0	0.45±0.001
4	0	-1	-1	0.57±0.005
5	-1	0	1	0.36±0.004
6	-1	-1	0	0.44±0.002
7	-1	0	-1	0.35±0.006
8	0	0	0	0.41±0.002
9	1	1	0	0.34±0.000
10	0	0	0	0.45±0.004
11	1	0	-1	0.38±0.000
12	1	0	1	0.46±0.005
13	1	-1	0	0.31±0.001
14	0	1	1	0.39±0.006
15	-1	1	0	0.36±0.001

X₁: Ratio of sample to solvent (%), X₂: Extraction temperature (°C), X₃: Extraction time (hr)

Table 22. Analysis of variance for the effects of three variables on Total Anthocyanin contents of ethanol extracts from *Bokbunja*.

Factors	F value	Pr > F
Ratio of sample to solvent (%)	3.81	0.0184
Extraction temperature (°C)	6.28	0.0019
Extraction time (hr)	1.62	0.2079

Table 23. Regression coefficients of second degree polynomials for Total Anthocyanin contents of ethanol extracts from *Bokbunja*.

Parameters	Estimate
Intercept	0.341
$X_1^{1)}$	0.064
$X_2^{2)}$	-0.008
$X_3^{3)}$	-0.078
$X_1 * X_1$	-0.003
$X_2 * X_1$	0.000
$X_2 * X_2$	0.000
$X_3 * X_1$	0.002
$X_3 * X_2$	0.001
$X_3 * X_3$	0.005

¹⁾ X_1 : Ratio of sample to solvent (%), ²⁾ X_2 : Extraction temperature (°C), ³⁾ X_3 : Extraction time (hr)

Table 24. Determination coefficients and probability of second degree polynomials for Total Anthocyanin contents of ethanol extracts from *Bokbunja*.

Regressions	R^2	F value	Pr > F
Linear	0.38	8.04	0.0010
Quadratic	0.22	4.68	0.0123
Cross product	0.07	1.55	0.2330
Total regress	0.68	4.76	0.0018

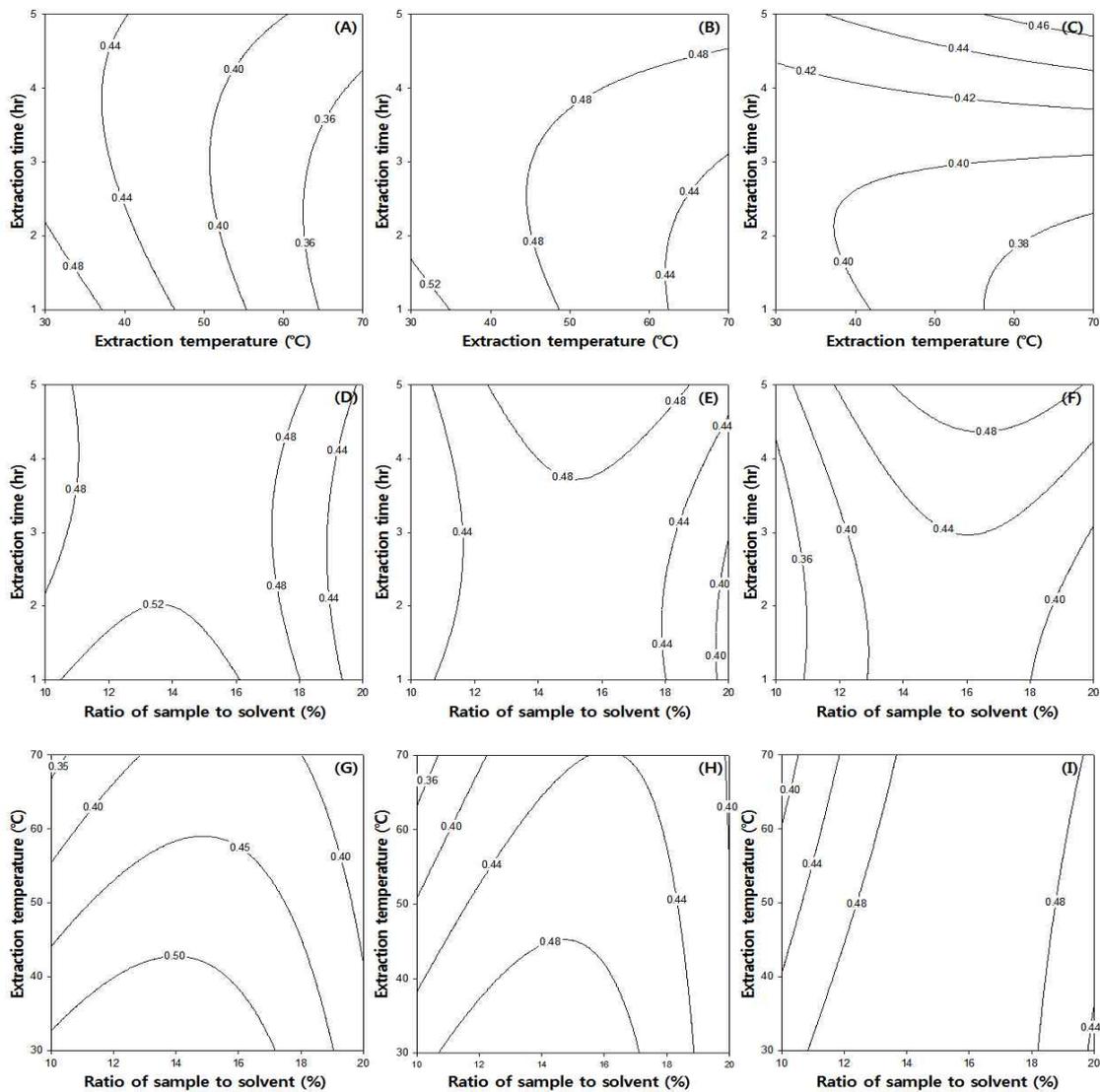


Fig. 14. Contour plot for Total Anthocyanin contents (mg/100 g) of ethanol extracts from *Bokbunja*.

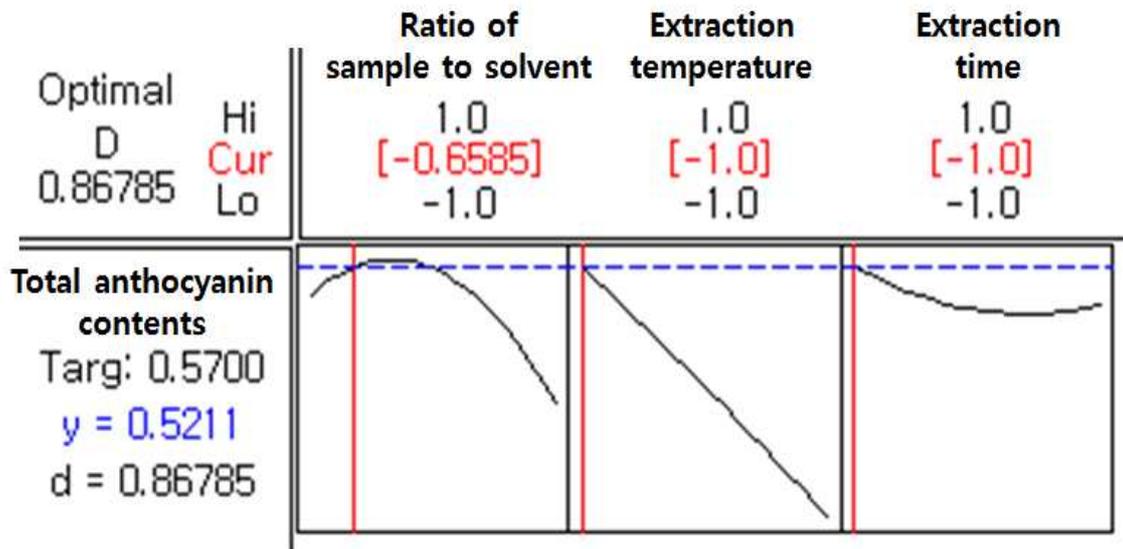


Fig. 15. Response optimization for multi-response surface of ethanol extracts from *Bokbunja*.

나. 홍영의 최적 ethanol 추출 공정 개발

세 가지 요인으로서 시료 대 용매비율, 추출온도, 추출시간에 따른 홍영 추출물의 Total Anthocyanin 함량을 분석한 결과는 **Table 25**와 같다. 본 실험의 홍미영역 구간 실험 점에서 Total Anthocyanin 함량의 범위는 0.15-0.24 mg/100 g으로 나타났고, 시료 대 용매비율 20%(w/v), 추출온도 50°C, 추출시간 5 hr에서 0.24 mg/100 g으로 가장 높았다.

홍미구역 안에서 시료 대 용매비율, 추출온도, 추출시간에 따른 홍영 추출물이 Total Anthocyanin 함량에 미치는 정도를 분산 분석한 결과는 **Table 26**과 같다. Total Anthocyanin 함량에 미치는 요인으로는 추출온도, 시료 대 용매비율, 추출시간 순으로 영향을 미치는 것을 알 수 있었으며, 세 가지 요인 모두 5% 내에서 유의성 차이를 보이지 않았다.

처리 요인의 수준에 대하여 종속변수인 Total Anthocyanin 함량을 예측하기 위한 이차다항 회귀곡선식의 회귀계수를 계산한 결과는 **Table 27**과 같다. Total Anthocyanin 함량에 대하여 이차다항회귀곡선식에서의 일차다항회귀(linear), 이차다항회귀(quadratic) 및 교차회귀(cross product)의 기여도를 검정한 결과(**Table 28**) Total Anthocyanin 함량의 기여도는 교차회귀, 일차다항회귀 및 이차다항회귀 순으로 나타났으며 이차다항회귀곡선식 적합성 검정에서의 total regression은 5% 내에서 유의성 차이를 보이지 않았다.

시료 대 용매비율, 추출온도와 추출시간에 따른 홍영 추출물의 Total Anthocyanin 함량에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 **Fig. 16**과 같다. ethanol 추출공정에서 추출 시간보다는 추출온도(**Fig. 16-A, B, C**)나 시료 대 용매비율(**Fig. 16-D, E, F**)에 영향을 크게 받는 것을 알 수 있으며, 추출온도는 시료 대 용매비율과 비슷한 영향을 보였다(**Fig. 16-G, H, I**). ethanol추출공정의 홍미영역에서의 반응평균(response mean) 값은 0.19 mg/100 g이었다. 시료 대 용매비율, 추출온도, 추출시간에 따른 홍영의 Total Anthocyanin 함량을 반응표면 분석한 결과 일반적으로 시료 대 용매비율이 높고, 추출시간이 길수록 증가하는 경향을 나타내

었다. 또한, Total Anthocyanin 함량을 다중반응표면의 최적화방법으로써 만족함수(desirability function)를 이용하여 종속변수들의 가중치를 1로 놓고 종합적으로 판단한 결과(**Fig. 17**) 최적 ethanol추출 조건은 시료 대 용매비율 20%, 추출온도 58.26℃, 추출시간 5 hr일 때가 최적 ethanol추출 조건으로 0.22 mg/100 g으로 예측되었다.

Table 25. Central composite design for ethanol extract of Anthocyanin from red-fleshed potato and its total anthocaynin contents.

Experiment number	X ₁	X ₂	X ₃	Total Anthocyanin contents (mg/100 g)
1	0	-1	1	0.20±0.005
2	0	1	-1	0.16±0.005
3	0	0	0	0.20±0.000
4	0	-1	-1	0.19±0.001
5	-1	0	1	0.15±0.007
6	-1	-1	0	0.22±0.002
7	-1	0	-1	0.17±0.001
8	0	0	0	0.20±0.002
9	1	1	0	0.17±0.001
10	0	0	0	0.16±0.002
11	1	0	-1	0.22±0.000
12	1	0	1	0.24±0.005
13	1	-1	0	0.15±0.000
14	0	1	1	0.18±0.001
15	-1	1	0	0.18±0.001

X₁: Ratio of sample to solvent (%), X₂: Temperature (°C), X₃: Time (hr)

Table 26. Analysis of variance for the effects of three variables on Total Anthocyanin contents of ethanol extracted Anthocyanin from red-fleshed potato.

Factors	F value	Pr > F
Ratio of sample to solvent (%)	1.98	0.1195
Extraction temperature (°C)	2.44	0.0651
Extraction time (hr)	0.64	0.6379

Table 27. Analysis of variance for the effects of three variables on Total Anthocyanin contents of ethanol extracted Anthocyanin from red-fleshed potato.

Parameters	Estimate
Intercept	0.312
$X_1^{1)}$	-0.012
$X_2^{2)}$	0.000
$X_3^{3)}$	-0.021
$X_1 * X_1$	0.000
$X_2 * X_1$	0.000
$X_2 * X_2$	0.000
$X_3 * X_1$	0.001
$X_3 * X_2$	0.000
$X_3 * X_3$	0.001

¹⁾ X_1 : Ratio of sample to solvent (%), ²⁾ X_2 : Temperature (°C), ³⁾ X_3 : Time (hr)

Table 28. Determination coefficients and probability of second degree polynomials for Total Anthocyanin contents of ethanol extracted Anthocyanin from red-fleshed potato.

Regressions	R^2	F value	Pr > F
Linear	0.11	1.83	0.1591
Quadratic	0.05	0.89	0.4549
Cross product	0.12	2.04	0.1261
Total regress	0.29	1.59	0.1571

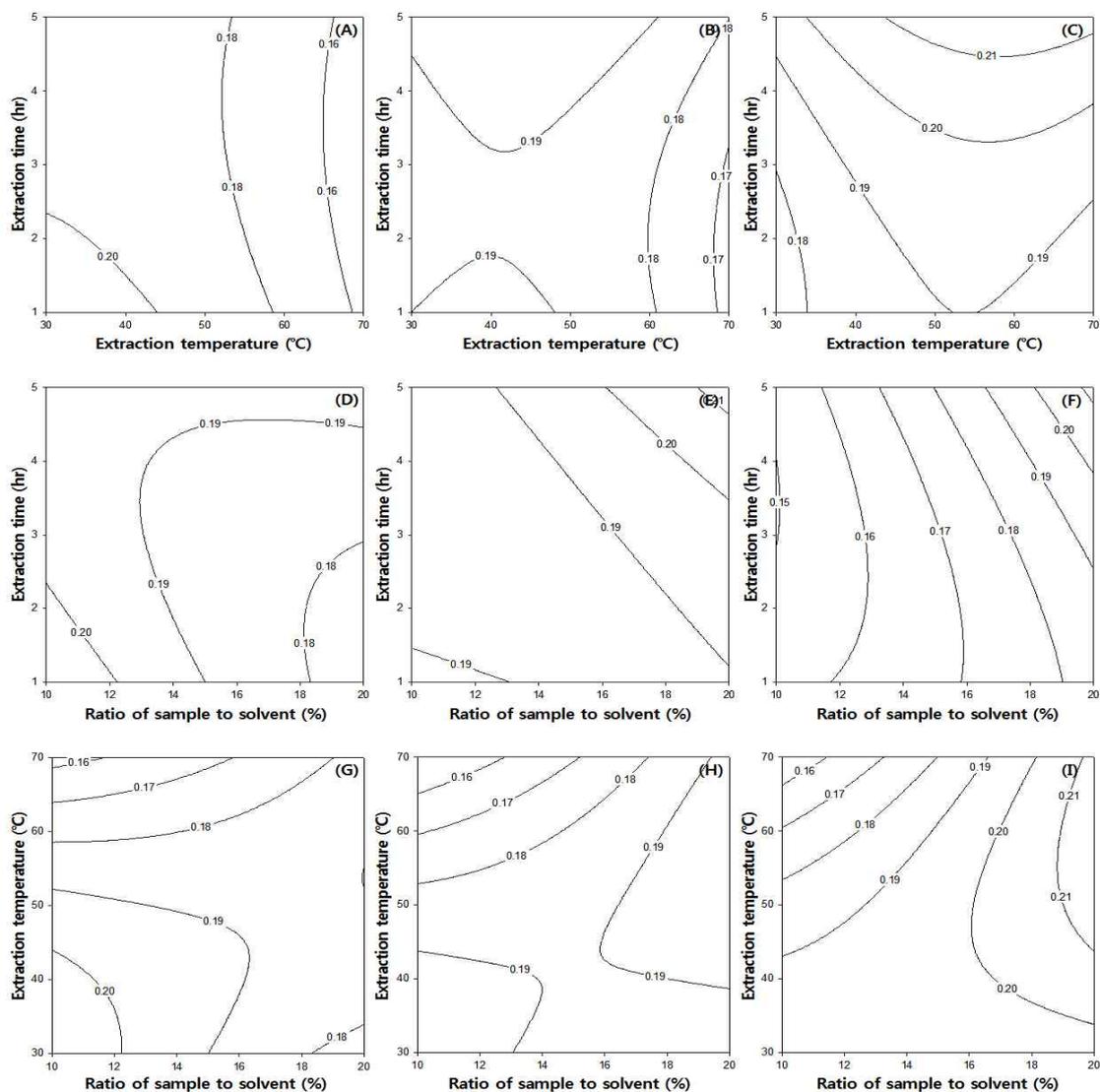


Fig. 16. Contour plot for Total Anthocyanin contents (mg/100 g) of ethanol extracted Anthocyanin from red-fleshed potato.

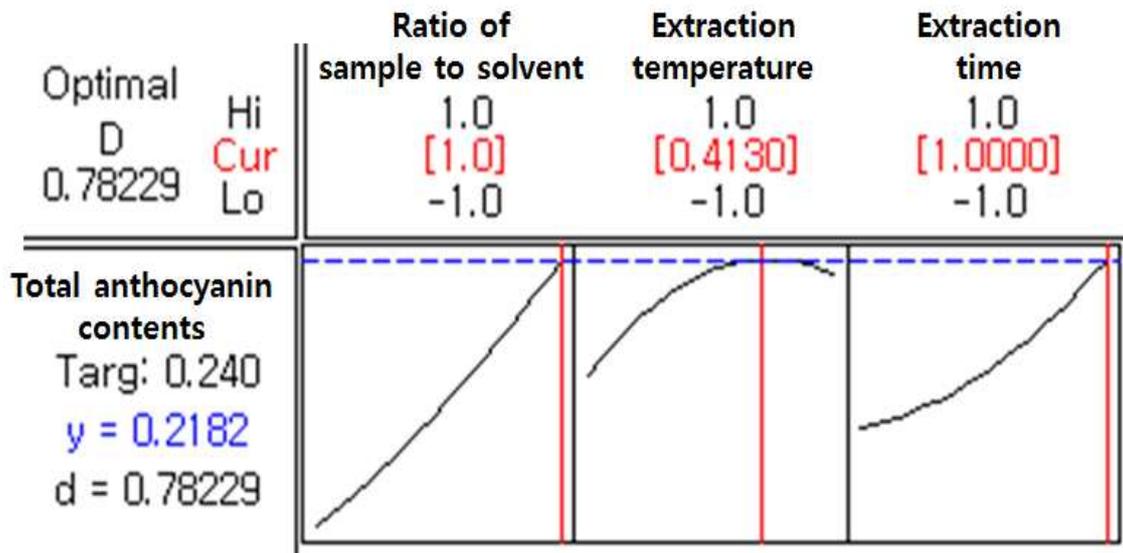


Fig. 17. Response optimization for multi-response surface of ethanol extracted Anthocyanin from red-fleshed potato.

다. 오디의 최적 추출 공정 개발

Citric acid(CA)와 Acidic Sodium Metaphosphate(ASM)을 이용한 오디 추출 시 효율을 비교하기 위하여 흡광도를 측정하였다. 추출조건은 추출온도 40°C, 추출시간 3시간, CA와 ASM의 농도는 1.0%, ethanol은 30%, 시료:용매 비율은 1:10 (w/v)으로 고정하였다.

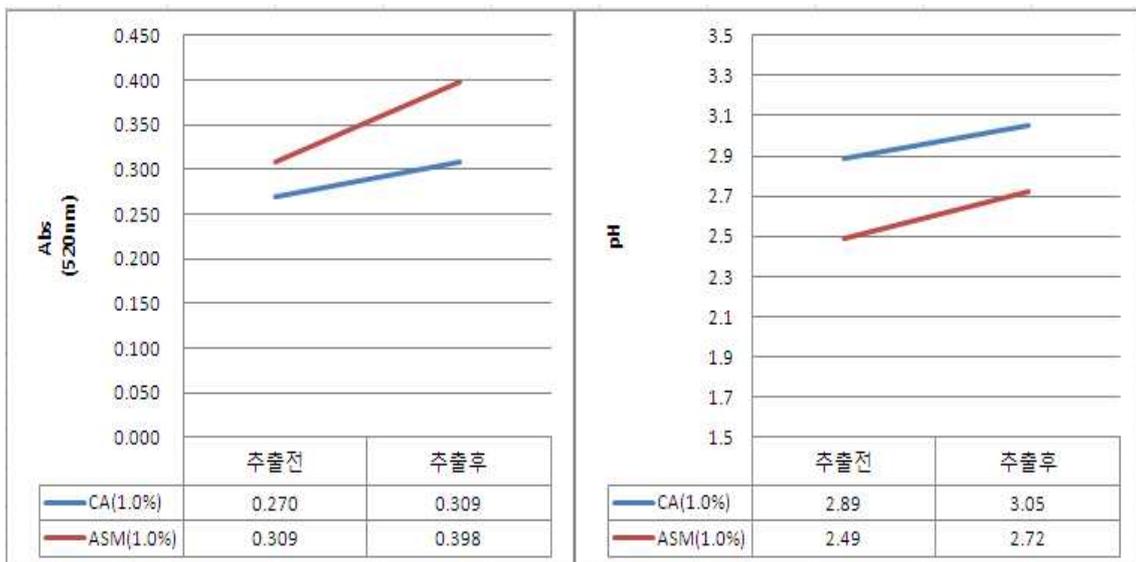


Fig. 18. Citric acid와 Acidic Sodium Metaphosphate를 이용한 오디 추출액의 흡광도 및 pH 변화 그래프

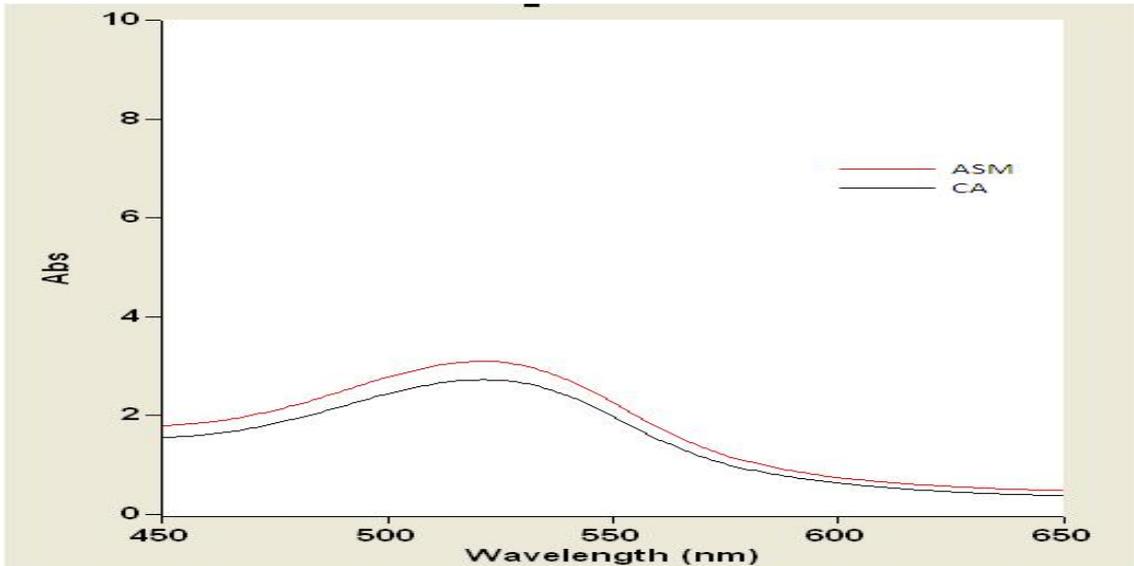


Fig. 19. CA와 ASM을 이용한 오디 추출액의 흡광도 chromatogram.

추출조건들을 모두 동일 시 하였을 때, Anthocyanin의 흡광도 증가율(Anthocyanin 함량 및 천연색소의 색가와 상관관계)을 비교한 결과, CA(1.0%) 사용 시 117.78%이지만 ASM(1.0%) 사용시 128.80%로 추출 수율의 증가를 확인할 수 있었다(Fig. 18).

pH는 CA(1.0%) 적용 시나 ASM(1.0%) 적용시 모두 소폭 증가하는 경향을 보이고 있으나 Anthocyanin의 구조적인 특징에 의하면 pH 3.0 이하의 산성조건하에서 가장 안정적인 천연색소가 추출됨을 감안하면 CA보다 pH buffer 능력이 우수한 ASM을 사용 시 Anthocyanin 추출에 효과적임을 유추할 수 있었다.

예비 실험을 통해 CA와 ASM에 의한 오디 Anthocyanin 추출효과를 비교해 본 결과를 바탕으로 보다 다양한 시료 조건을 적용하여 실험을 진행하였다(Table 29).

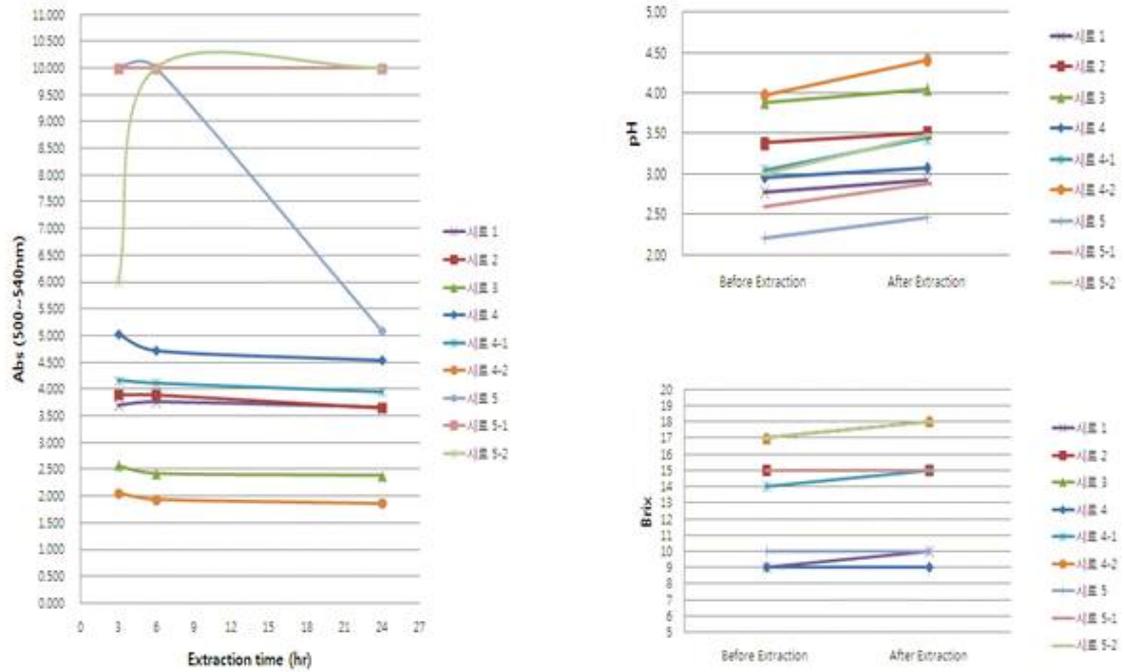


Fig. 20. CA와 ASM 처리구의 오디 Anthocyanin 흡광도, pH, Brix 변화

Table 29. CA와 ASM의 혼합비율에 따른 다양한 추출용매

시료 No.	추출용매
시료 1	1% CA+30% Ethanol
시료 2	1% CA+50% Ethanol
시료 3	1% CA+70% Ethanol
시료 4	0.5% ASM+30% Ethanol
시료 4-1	0.5% ASM+50% Ethanol
시료 4-2	0.5% ASM+70% Ethanol
시료 5	1% ASM+30% Ethanol
시료 5-1	1% ASM+50% Ethanol
시료 5-2	1% ASM+70% Ethanol

각 시료에서 다른 추출조건(온도, 시료/용매 비율)은 고정하였고, 추출시간은 3시간 이후 오히려 Anthocyanin 흡광도는 약간 감소하는 경향을 보이고 있다. 이는 pH와 Brix의 변화(증가)에 따른 Anthocyanin 색소의 구조적인 흡광도 변화에서 기인한 것으로 판단되며 경제적 측면을 고려하였을 때, 3시간 추출이 효과적임을 나타내었다. 전체적으로 CA 처리구 대비 ASM 처리구의 Anthocyanin 흡광도가 증가함을 확인하였다(Fig. 20).

예비실험을 통해 추출온도, 추출시간, 시료/용매 비율을 고정하였고, Anthocyanin 천연색소의 대량생산을 위한 산업적, 경제적 변수로 가장 중요하다고 판단하는 ASM의 함량, ethanol 함량 2가지 변수에 의한 최적화 조건을 설정하기 위한 추가 실험을 진행하였다.

ethanol(95% 식음용 곡물주정, 대한주정라이프, KOREA) 함량에 따른 오디 Anthocyanin 흡광도를 측정한 결과는 다음과 같다.

Mulberry 10g, Liquid 100ml (Ethanol+0.5% ASM), 40°C, 3hour

Test set	Ethanol conc.(%)	0 hr	3 hr	variation (%)	0 hr	3 hr	0 hr	3 hr
		520nm			Brix		pH	
A	20	3.721	3.908	105.03	6	6	2.78	2.74
B	30	4.798	5.652	117.80	9	9	2.78	2.83
C	40	5.073	5.410	106.64	12	12	3.00	3.00
D	50	4.890	4.460	91.21	15	15	3.24	3.26
E	60	4.554	4.081	89.61	16	16	3.28	3.48
F	70	3.416	2.882	84.37	18	18	3.92	4.10
G	80	2.178	1.575	72.31	19	19	4.48	4.76

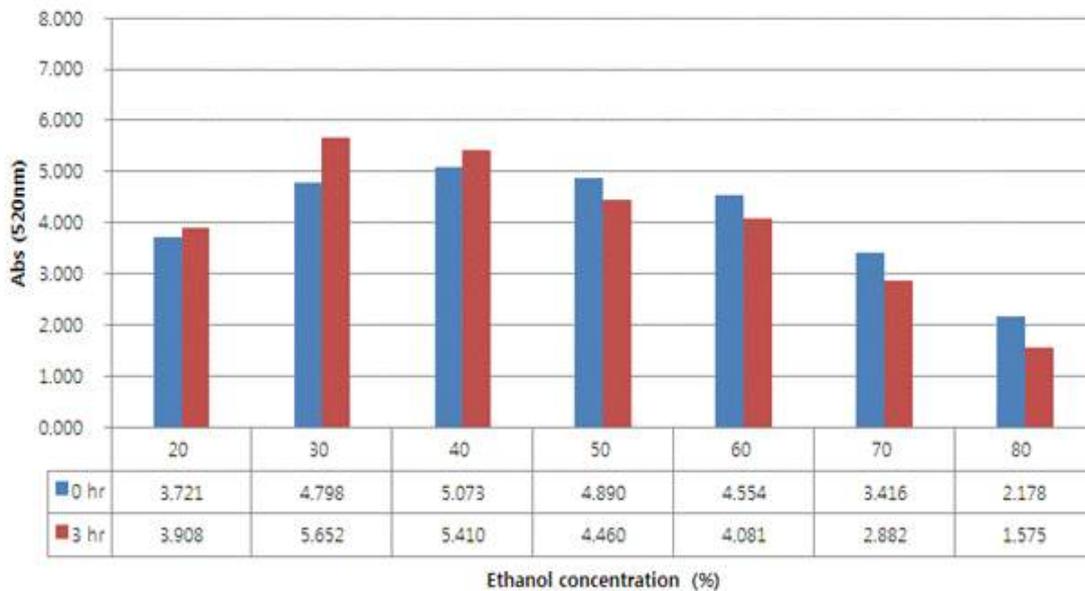


Fig. 21. ethanol 함량에 따른 오디 Anthocyanin 흡광도, pH, Brix 변화 그래프

다른 추출조건(시료/용매 비율, ASM 함량, 추출온도, 추출시간)을 고정한 채 ethanol 함량 (20-80%)에 따른 오디 Anthocyanin의 흡광도 변화율은 20-40%까지는 증가하는 경향을 보였으나, 50% 이상에서는 오히려 감소하는 경향을 확인하였다. 그 중, B시료(ethanol 30% 함량)에서 117.80%로 가장 높게 측정되었음을 확인하여서 ethanol의 함량은 30%로 결정하였다(Fig. 21).

ASM(Acidic Sodium Metaphosphate, SDBNI Co., LTD., KOREA) 함량에 따른 오디 Anthocyanin 흡광도를 측정한 결과는 다음과 같다.

Mulberry 10g, Liquid 100ml (30% Ethanol+ASM), 40°C, 3hour

Test set	ASM conc.(%)	0 hr	3 hr	variation (%)	0 hr	3 hr	0 hr	3 hr
		520nm			Brix		pH	
A	0.5	3.741	4.237	113.26	9	9	2.78	2.86
B	0.6	3.677	4.192	114.01	9	9	2.64	2.74
C	0.7	3.274	4.051	123.73	9	9	2.50	2.56
D	0.8	3.636	4.374	120.30	9	9	2.40	2.48
E	0.9	4.307	4.813	111.75	9	9	2.34	2.38
F	1.0	3.825	4.413	115.37	9	9	2.28	2.32

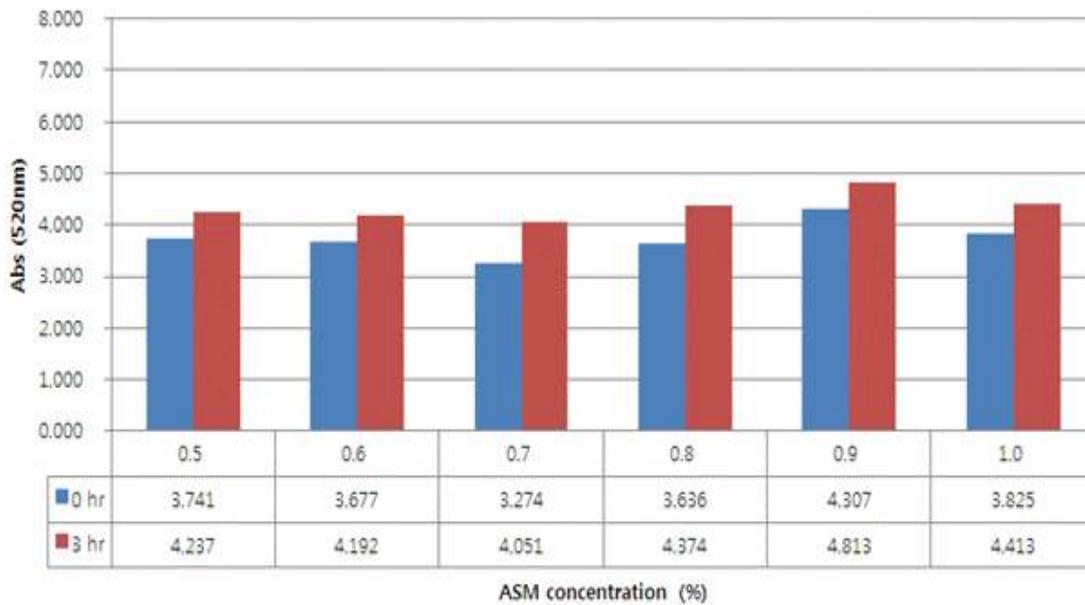


Fig. 22. ASM 함량에 따른 오디 Anthocyanin 흡광도, pH, Brix 변화 그래프

다른 추출조건(시료/용매 비율, ethanol 함량, 추출온도, 추출시간)을 고정한 채 ASM 함량 (0.5-1.0%)에 따른 오디 Anthocyanin의 흡광도 변화율은 전체적으로 증가하는 경향을 보이고 있으나, ASM 함량이 0.9% 이상에서는 pH가 2.34 이하의 산성영역을 보이며 이는 ethanol과 무기염의 일종인 ASM과의 혼합 용해시 일부 혼탁함을 나타내어서 적합하지 않은 함량으로 판단되었다. 따라서, C시료(ASM 0.7% 함량)에서 123.73%로 가장 높게 측정되었음을 확인하여서 ASM의 함량은 0.7%로 결정하였다(Fig. 22).

Coded levels 처리에 따른 오디 추출물의 흡광도(520nm)와 Total Anthocyanin 함량 결과를 나타내었고, Total Anthocyanin 함량은 건고물 기준으로 환산시 7.69%에서 8.67% 범위였다 (Table 30).

Table 30. 오디 Anthocyanin 추출물의 흡광도와 Total Anthocyanin 함량

Experiment number	X ₁	X ₂	Abs of Mulberry extract (520nm)	Total Anthocyanin (% , dry weight)
1	-1	-1	0.497	7.96
2	1	-1	0.511	8.19
3	-1	1	0.502	8.04
4	1	1	0.522	8.37
5	-1.4	0	0.480	7.69
6	1.4	0	0.535	8.57
7	0	-1.4	0.510	8.17
8	0	1.4	0.525	8.41
9	0	0	0.536	8.59
10	0	0	0.533	8.54
11	0	0	0.540	8.65
12	0	0	0.539	8.64
13	0	0	0.541	8.67

Table 31. 오디 Anthocyanin 추출물의 pH와 Hunter value

Experiment number	X ₁	X ₂	pH	Hunter value		
				L	a	b
1	-1	-1	2.50	44.59	65.92	46.66
2	1	-1	2.91	41.52	66.84	35.61
3	-1	1	2.31	44.81	66.55	48.10
4	1	1	2.72	40.03	66.57	40.45
5	-1.4	0	2.42	46.44	65.24	45.28
6	1.4	0	2.91	37.63	65.69	40.93
7	0	-1.4	2.74	42.43	66.66	42.22
8	0	1.4	2.43	42.97	67.39	44.30
9	0	0	2.55	44.34	67.34	42.05
10	0	0	2.60	43.81	67.28	42.08
11	0	0	2.58	43.68	67.25	42.05
12	0	0	2.58	43.78	67.28	42.05
13	0	0	2.60	43.77	67.23	42.10

13가지 실험에 대한 흡광도 chromatogram과 추출물 사진은 Fig. 23과 Fig. 24에 나타내었다.

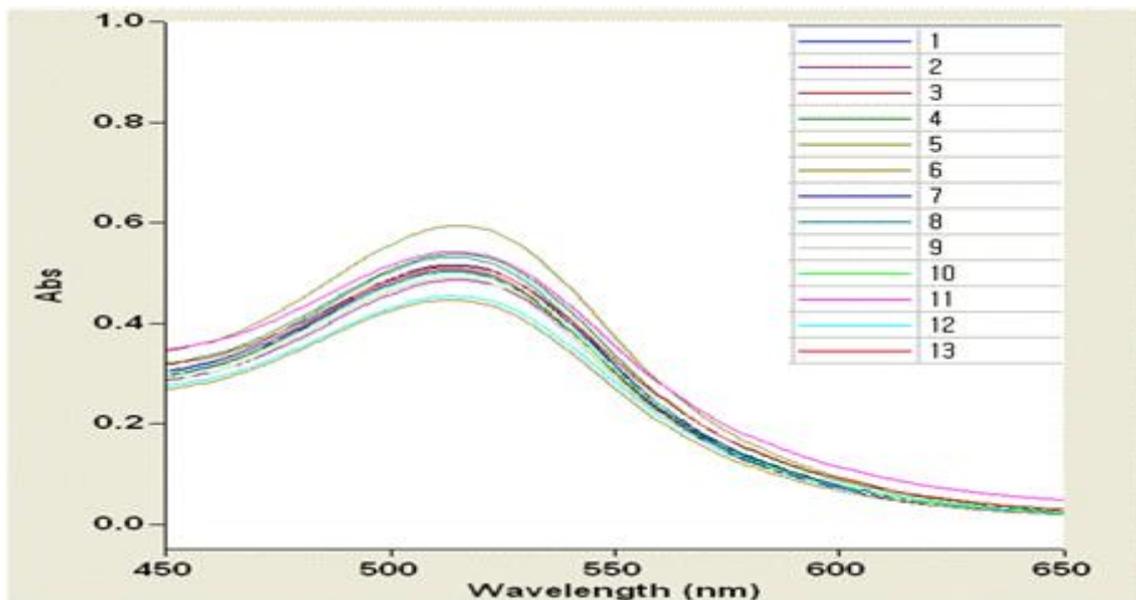


Fig. 23. 오디 Anthocyanin 추출물의 흡광도 chromatogram



Fig. 24. 오디 Anthocyanin 추출물 사진

Table 32. Estimated Regression Coefficients for Anthocyanin (%)

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	8.61849	0.04766	180.828	0.000
$X_1^{1)}$	0.22626	0.03787	5.974	0.001
$X_2^{2)}$	0.07525	0.03787	1.987	0.087
X_1*X_1	-0.26496	0.04100	-6.463	0.000
X_2*X_2	-0.18333	0.04100	-4.472	0.003
X_1*X_2	0.02500	0.05329	0.469	0.653

¹⁾ Ethanol Concentration (%)

²⁾ ASM Concentration (%)

RSM에 따른 실험을 수행한 결과를 MINITAB으로 통계 처리한 결과는 **Table 32**와 같이 확인되었으며, 이를 바탕으로 2차회귀방정식은 아래와 같이 설정되었다.

$$tocyanin\ content\ (\%) = 8.61849 + 0.22626X_1 + 0.07525X_2 - 0.26496X_1^2 - 0.18333X_2^2 + 0.02500X_1X_2$$

상기 RSM 결과를 바탕으로 삼차원 그래프(Surface Plot)를 그린 결과는 **Fig. 25**와 같다.

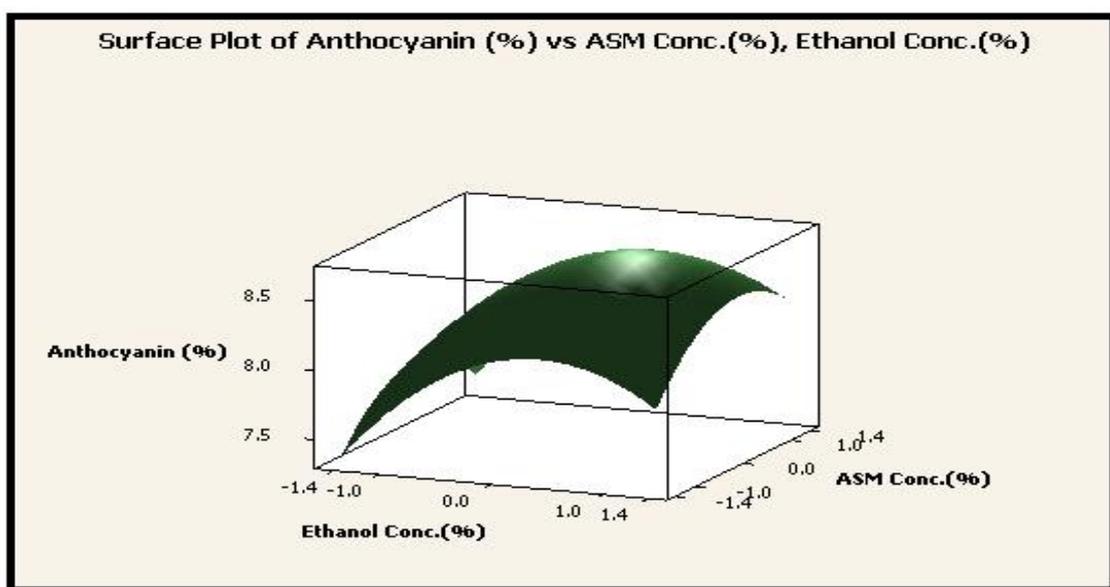
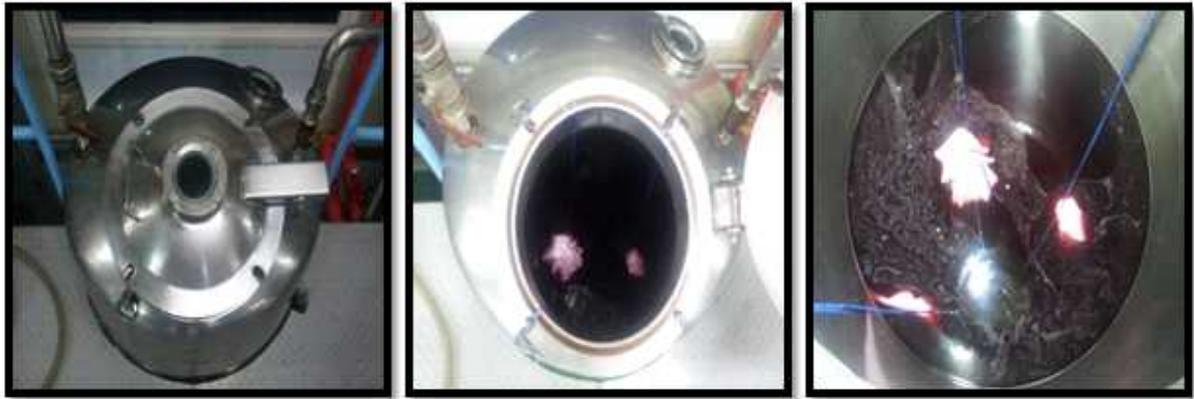


Fig. 25. Surface Plot of Anthocyanin (%) vs ASM Conc.(%), Ethanol Conc.(%)

MINITAB을 이용한 통계처리 결과, 최적조건(optimum condition)은 ethanol 농도는 34.578%, ASM의 함량은 0.7368%로 설정되었으며, 최적 조건에서 확인실험 결과, Anthocyanin 함량은 8.6736(% dry weight)로 확인 되었으며, 실험설계에서 예측되어지는 수치와 유사한 결과를 얻을 수 있었다.

본 추출공정의 최적화 확립을 위한 시험생산은 주)대호양행(화성시 팔탄면 소재)에 의뢰하였으며 실험 과정 및 결과는 Fig. 26과 같다.

추출 (3시간 정치 추출)



여과 (1 μ m Membrane filter)



농축 (40 $^{\circ}$ C)



Fig. 26. 오디 추출 및 농축 시험생산 과정

오디 50.0 kg, ASM 2.4 kg(0.7%), 95% 곡물주정 158.0 kg(30%), 정제수 339.6 kg 이 시험생산에 적용되었으며 추출액에 대한 분석 결과는 다음과 같다.

Table 33. 시험생산 오디 추출액의 분석결과

Brix	pH	Abs (520nm)	Hunter value		
			L	a	b
12	2.61	0.422	45.72	65.21	31.30

실험실에서의 분석과 대량 시험생산시의 분석 결과(Brix, pH, Hunter value)는 유사하게 측정되었으나, Anthocyanin 추출물의 흡광도(0.422)는 실험실에서의 흡광도 결과(0.533)의 79.17% 정도로 측정되었다(**Table 33**). 이는 실험실에서의 오디 착즙 후 부산물은 직접 투입하여서 흡인여과를 거친 반면, 시험생산시 오디 부산물은 여과 시 필터의 손실을 막기 위하여 추출망과 함께 투입되었기 때문으로 사료되며 Anthocyanin계 천연색소의 대량생산과 산업화를 위해서는 생산조건에 적합한 추가연구가 필요할 것으로 사료된다.

Anthocyanin과 당 성분의 분리 및 정제를 목표로 시료의 일부를 KeyChem-Flash(MPLC) System을 이용하여 재현성이 있는 분취 조건을 찾고 Fraction을 분획하여 원하는 Anthocyanin Target이 어디에 위치하고 있는지 알아보는 실험을 진행하였다. 물에 잘 녹는 당 성분이 포함된 Sample 임을 감안하여, 역상 Column 으로 진행하고, 처음 물의 비중을 높게 잡아 당 성분을 먼저 분취하기 위한 조건을 잡았으며, 0.5 g 의 시료에 2 mL의 증류수를 넣어 희석하여 실험을 진행하였다. 분석 조건 및 결과는 **Table 34**와 같다.

Table 34. 오디 Anthocyanin 추출물 당 성분 분취 조건

Column	YMC - DispoPack AT ODS-25 : 12 g
Eluent	MeOH, Water (Gradient)
Flow rate	10ml/min
Temperature	실온
Detection	UV (254nm), Monitor (380nm)
Injection	2 mL

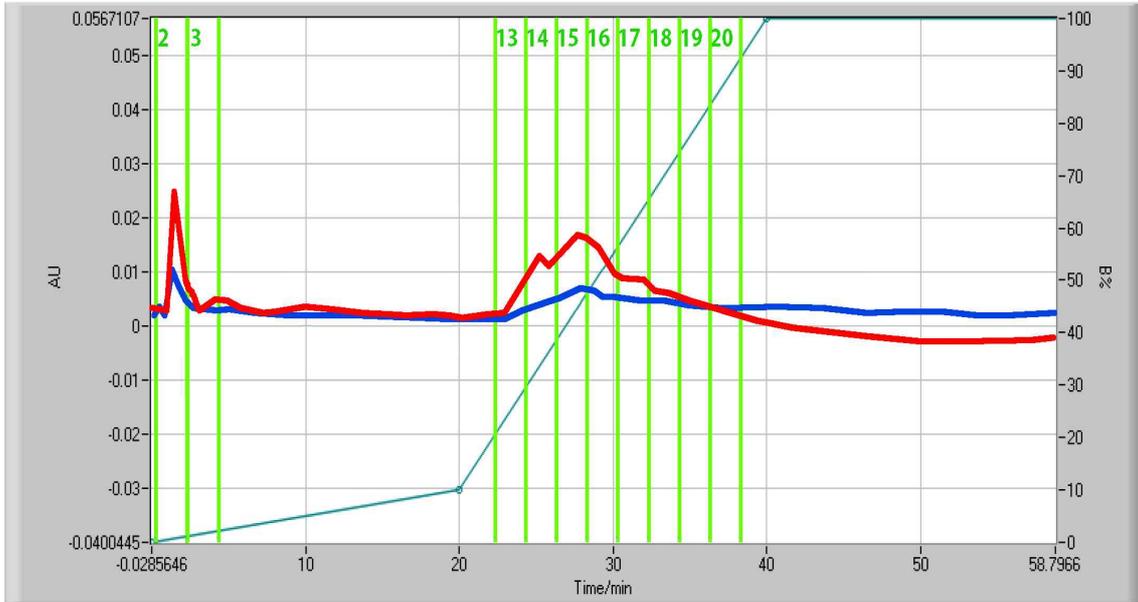


Fig. 27. 오디 추출물 chromatogram

당 성분으로 생각되는 물질은 아래의 **Table 35**와 같이 2-3번 tube에서 분취되었으며, Anthocyanin과 몇 가지 물질이 분취되는 구간은 아래의 **Table 36**과 같이 13-20 tube에서 분취되는 것을 확인할 수 있었다(**Fig. 27**).

Table 35. 당 성분 분취 구간

Tube	Start	End
2	0.3	2.3
3	2.3	4.3

Table 36. Anthocyanin 분취 구간

Tube	Start	End
13	22.31	24.31
14	24.31	26.31
15	26.31	28.31
16	28.31	30.32
17	30.32	32.32
18	32.32	34.32
19	34.32	36.32
20	36.32	38.32

상기 결과를 보면 전체적인 구간은 앞의 당 성분과 Anthocyanin 부분 두 구간임을 알 수 있었다. 당 성분은 한 가지 정도의 물질일 가능성이 높으므로 당을 분취하는 것에는 큰 어려움이 없는 것으로 판단되며, 두 번째 구간의 겹치는 부분의 확실한 분취를 위해서는 Prep-LC에 Particle size가 작은 고분리능 Column을 이용하여 분리능을 높이는 방법을 검토해 볼 필요성이 있는 것으로 확인되었다.

3. Anthocyanin계 천연색소의 최적 효소처리 공정 개발

본 실험에서는 최적 ethanol 추출 공정에 따라 60% ethanol을 사용하여 시료 대 용매비율 13.16%(w/v), 추출온도 30℃ 및 추출시간 1 hr에 의해 ethanol 추출물을 제조하였다. 추출물의 수율 및 항산화활성의 증가를 위해 Pectinex Ultra SP-L과 Novozym 33095를 첨가하여 효소처리 최적 공정을 개발하였다.

가. Pectinex Ultra SP-L을 이용한 복분자의 최적 효소처리 공정

(1) 수율 및 항산화활성

Novozymes사에 의하면 Pectinex Ultra SP-L은 *Aspergillus aculeatus*의 선택된 균주에 의해 생성된 고효능 펙틴가수분해 효소 제제로, 펙틴을 가수분해함과 동시에 셀룰로오스를 가수분해 한다. 식물 세포벽을 분해하기 때문에 과실주 제조 시 주로 사용하는 효소이다.

Pectinex Ultra SP-L의 농도(0.5-1.5 mL/100 L), 반응온도(20-60℃) 및 반응시간(2-8 hr)에 따른 복분자 추출물의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능을 분석한 결과는 **Table 37**과 같았다.

Pectinex Ultra SP-L을 이용한 복분자 추출물의 효소처리 시 수율은 4.04-6.36% 범위로 나타났다. Total polyphenol 함량의 경우 무처리 시에는 8.25 mg/g이었는데, 본 실험에서 효소처리의 흥미영역 구간 실험점에서의 범위는 6.30-12.34 mg/g로 나타났다. 효소처리 조건에 따라 무처리에 비해 Total Polyphenol 함량이 낮게 나타나기도 했지만, 대체로 무처리에 비해 높게 나타났다. Total flavonoid 함량의 경우 무처리 시에 4.42 mg/mL이었고, 효소처리의 흥미영역 구간 실험점에서의 범위는 3.19-4.97 mg/mL로 나타났는데, 무처리에 비해 Total Flavonoid 함량이 거의 증가하지 않아 Pectinex Ultra SP-L 처리가 효과적이지 않은 것으로 보였다. Total Anthocyanin 함량의 경우 무처리 시에는 0.12 mg/100 g 이었는데 본 실험의 효소처리의 흥미영역 구간 실험 점에서 Total Anthocyanin 함량의 범위는 0.32-0.95 mg/100 g로 나타나 앞선 결과들에 비해 Pectinex Ultra SP-L 처리가 효과적으로 나타났다. DPPH radical 소거능은 무처리 시에는 11.76% 이었으나 효소처리 시 33.10-65.17%로 나타났다. SOD-like 활성능의 경우 무처리 시 1.10% 이었으나, 효소처리 시 8.25-38.32%로 활성이 크게 증가하여 Pectinex Ultra SP-L 처리가 매우 효과적인 것을 알 수 있었다.

Table 37. Central composite design for Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment from *Bokbunja* extracts and its dependent variables.

Coded levels of variable			Responses					
X ₁	X ₂	X ₃	Yield (%)	Total polyphenol contents (mg/g)	Total flavonoid contents (mg/mL)	Total Anthocyanin contents (mg/100 g)	DPPH radical scavenging activity (%)	SOD-like activity (%)
0	-1	1	6.36	8.81±0.01 ^e	4.97±0.21 ^a	0.57±0.009 ^f	33.10±4.49 ^g	9.03±0.65 ^{ef}
0	1	-1	4.93	9.96±0.04 ^b	4.17±0.22 ^{bcd}	0.63±0.019 ^d	51.52±4.09 ^d	8.77±0.65 ^{ef}
0	0	0	5.77	8.51±0.02 ^f	4.27±0.61 ^{bcd}	0.37±0.009 ^k	48.88±1.06 ^{de}	8.25±1.75 ^f
0	-1	-1	5.26	8.49±0.03 ^f	3.79±0.24 ^e	0.43±0.010 ⁱ	51.39±2.85 ^d	9.16±0.46 ^{ef}
-1	0	1	5.95	9.49±0.02 ^c	4.26±0.52 ^{bcd}	0.32±0.005 ^l	49.50±0.18 ^{de}	10.32±0.09 ^d
-1	-1	0	5.09	7.89±0.03 ^k	3.92±0.16 ^{de}	0.72±0.018 ^b	55.27±2.70 ^c	12.90±0.61 ^b
-1	0	-1	6.05	8.44±0.03 ^g	4.09±0.21 ^{bcd}	0.49±0.022 ^h	51.14±2.49 ^d	38.32±0.56 ^a
0	0	0	6.18	12.34±0.02 ^a	4.45±0.47 ^b	0.48±0.002 ^h	42.74±1.54 ^f	9.03±0.65 ^{ef}
1	1	0	4.55	8.08±0.01 ⁱ	3.90±0.14 ^{de}	0.66±0.001 ^c	56.52±2.00 ^c	10.19±0.82 ^d
0	0	0	6.32	8.36±0.01 ^h	4.38±0.42 ^{bc}	0.36±0.001 ^k	46.23±1.62 ^e	8.51±0.65 ^f
1	0	-1	4.66	7.47±0.00 ^h	4.17±0.10 ^{bcd}	0.95±0.030 ^a	61.16±2.91 ^b	8.90±1.20 ^{ef}
1	0	1	5.32	6.33±0.00 ^m	3.19±0.17 ^f	0.41±0.004 ^j	60.27±1.52 ^b	9.68±0.46 ^{de}
1	-1	0	5.85	7.94±0.00 ^j	4.02±0.31 ^{cde}	0.55±0.013 ^g	52.14±3.91 ^d	8.26±0.29 ^f
0	1	1	4.04	6.30±0.00 ^m	3.34±0.11 ^f	0.49±0.015 ^h	65.17±2.23 ^a	12.00±0.80 ^c
-1	1	0	4.34	9.38±0.14 ^d	4.48±0.04 ^b	0.60±0.013 ^e	49.50±1.59 ^{de}	10.32±0.27 ^d

X₁: Concentration of Pectinex Ultra SP-L (mL/100 L), X₂: Reaction temperature (°C), X₃: Reaction time (hr)

(2) 이차다항회귀곡선식

홍미구역 안에서 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 복분자 추출물의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능에 미치는 정도를 분산 분석한 결과는 **Table 38**과 같다.

수율에 영향을 미치는 요인으로 반응온도가 가장 크고 반응시간, 효소농도 순으로 나타났으며, 세 가지 요인 모두 5% 내에서 유의성차이를 나타내었다. Total polyphenol 함량은 반응시간의 영향이 가장 컸으며, 효소농도, 반응온도 순으로 나타났고 반응온도를 제외한 두 요인에 대해서 5% 내에서 유의성차이를 나타내었다. Total flavonoid 함량에서는 반응시간이 효소농도와 반응온도보다 영향이 큰 것으로 나타났으며 세 가지 요인 모두 5% 내에서 유의성차이를 보였다. Total Anthocyanin 함량에 영향을 미치는 요인으로 효소농도가 가장 컸으며 반응시간, 반응온도 순으로 나타났고 세 가지 요인 모두 5% 내에서 유의성차이를 나타내었다. DPPH radical 소거능에서는 효소농도가 가장 컸으며 반응온도, 반응시간 순이었고, 세 가지 요인 모두 5% 내에서 유의성 차이가 나타났다. SOD-like 활성능은 효소농도가 반응시간과 반응온도보다 큰 것으로 나타났으며 반응온도를 제외한 두 가지 요인에서 5% 내에서 유의성차이를 보였다.

처리 요인의 수준에 대하여 종속변수인 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능을 예측하기 위한 이차다항회귀곡선식의 회귀계수를 계산한 결과는 **Table 39**와 같다. 또한, 종속변수에 대한 이차다항회귀곡선식의 일차다항회귀, 이차다항회귀 및 교차회귀의 기여도를 검정하였다.(**Table 40**) 수율의 기여도는 일차다항회귀, 이차다항회귀 및 교차회귀 순으로 나타났으며, Total Polyphenol 함량의 기여도는 이차다항회귀, 교차회귀 및 일차다항회귀 순으로 나타났다. Total flavonoid 함량의 경우 교차회귀, 일차다항회귀, 이차다항회귀 순으로, Total Anthocyanin 함량은 이차다항회귀, 일차다항회귀 및 교차회귀 순으로 나타났다. DPPH radical 소거능의 경우 교차회귀, 일차다항회귀 및 이차다항회귀 순으로 기여도가 나타났으며, SOD-like 활성능의 기여도는 일차다항회귀, 교차회귀 및 이차다항회귀 순으로 나타났다. 이차다항회귀곡선식 적합성 검정에서의 total regression은 모두 5% 이내에서 유의성 차이를 보였다.

Table 38. Analysis of variance for the effects of three variables on yield, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, Total Anthocyanin contents and antioxidative activities of Pectinex Ultra SP-L enzyme treatments from *Bokbunja* extracts.

Factors	Yield	Total polyphenol contents	Total flavonoid contents	Total Anthocyanin contents	DPPH radical scavenging activity	SOD-like activity	
X ₁	F value	3.45	3.16	3.42	8.48	5.92	10.87
	Prob>F	0.0266	0.0363	0.0277	<.0001	0.0026	<.0001
X ₂	F value	21.8	1.97	4.72	5.20	3.49	0.84
	Prob>F	<.0001	0.1383	0.0076	0.0022	0.0261	0.5156
X ₃	F value	5.07	3.49	5.97	7.83	3.24	8.34
	Prob>F	0.0055	0.0256	0.0025	0.0001	0.0333	0.0004

X₁: Concentration of Pectinex Ultra SP-L (mL/100 L), X₂: Reaction temperature (°C), X₃: Reaction time (hr)

Table 39. Regression coefficients of second degree polynomials for yield, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, Total Anthocyanin contents and antioxidative activities of Pectinex Ultra SP-L enzyme treatments from *Bokbunja* extracts.

Parameters	Estimate					
	Yield	Total polyphenol contents	Total flavonoid contents	Total Anthocyanin contents	DPPH radical scavenging activity	SOD-like activity
Intercept	0.700	-2.892	-0.065	1.067	109.635	70.878
X ₁ ¹⁾	2.794	9.301	3.000	-0.769	-55.136	-72.745
X ₂ ²⁾	0.174	0.216	0.069	-0.021	-0.945	0.354
X ₃ ³⁾	0.462	1.847	0.757	0.058	-9.359	-10.543
X ₁ *X ₁	-1.570	-3.733	-0.862	0.479	25.268	17.769
X ₂ *X ₁	-0.014	-0.034	-0.017	0.006	0.254	0.113
X ₂ *X ₂	-0.002	-0.001	0.000	0.000	0.003	-0.007
X ₃ *X ₁	0.127	-0.364	0.192	-0.062	0.125	4.796
X ₃ *X ₂	-0.008	-0.017	-0.008	-0.001	0.133	0.014
X ₃ *X ₃	-0.023	-0.096	-0.025	0.002	0.361	0.418

¹⁾X₁: Concentration of Pectinex Ultra SP-L (mL/100 L), ²⁾X₂: Reaction temperature (°C), ³⁾X₃: Reaction time (hr)

Table 40. Determination coefficients and probability of second degree polynomials for yield, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, Total Anthocyanin contents and antioxidative activities of Pectinex Ultra SP-L enzyme treatments from *Bokbunja* extracts.

	Regressions	Linear	Quadratic	Cross product	Total regress
	R ²	0.37	0.31	0.15	0.83
Yield	F value	14.78	12.40	6.01	11.07
	Prob>F	<.0001	<.0001	0.0043	<.0001
Total polyphenol contents	R ²	0.17	0.20	0.19	0.56
	F value	2.55	2.98	2.78	2.77
	Prob>F	0.0847	0.0557	0.0676	0.0276
Total flavonoid contents	R ²	0.11	0.10	0.42	0.63
	F value	1.94	1.75	7.46	3.71
	Prob>F	0.1561	0.1899	0.0015	0.0070
Total Anthocyanin contents	R ²	0.23	0.24	0.18	0.65
	F value	7.89	8.07	6.01	7.32
	Prob>F	0.0004	0.0003	0.0021	<.0001
DPPH radical scavenging activity	R ²	0.22	0.19	0.31	0.73
	F value	5.42	4.75	7.57	5.92
	Prob>F	0.0068	0.0116	0.0014	0.0005
SOD-like activity	R ²	0.28	0.19	0.27	0.75
	F value	7.47	5.14	7.13	6.58
	Prob>F	0.0015	0.0085	0.0019	0.0002

(3) 효소처리공정 최적화

효소농도, 반응온도와 반응시간이 복분자 추출물의 수율에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 **Fig. 28**과 같다. 효소처리공정에서 반응시간 보다는 반응온도에 영향을 크게 받고(**Fig. 28-A, B, C**), 효소농도는 반응시간과 영향력이 비슷하게 나타났지만(**Fig. 28-D, E, F**), 반응온도 보다는 영향력이 더 작았다(**Fig. 28-G, H, I**). 효소처리 흥미영역에서의 반응평균(response mean) 값은 5.38%이었고, 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 복분자의 수율을 반응표면분석한 결과 일반적으로 반응시간이 길수록 수율이 증가하는 경향을 나타내었다. 복분자 추출물의 수율은 효소농도 1.00 mL/100 L, 반응온도 28.74°C 및 반응시간 8.00 hr 일 때가 최적 효소처리 조건으로 6.36%로 예측되었다.

Total polyphenol 함량에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 **Fig. 29**와 같다. 효소처리공정에서 반응온도는 반응시간(**Fig. 29-A, B, C**)과 효소농도(**Fig. 29-G, H, I**) 보다 영향을 작게 받고, 반응시간은 효소농도(**Fig. 29-D, E, F**)와 비슷한 영향력을 보였다. 효소처리 흥미영역에서의 반응평균 값은 8.52 mg/g이었고 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 복분자의 Total Polyphenol 함량을 반응표면분석한 결과 일반적으로 반응온도가 높을수록 증가하는 경향을 나타내었다. 효소농도 0.72 mL/100 L, 반응온도 60.00°C 및 반응시간 2.80 hr 일 때가 최적 효소처리 조건으로 그 때의 Total Polyphenol 함량은 9.96 mg/g으로 예측되었으며, 이는 무처리 시의 1.21배 수준이었다.

Total flavonoid 함량에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 **Fig. 30**과 같다. 효소처리공정에서 반응시간은 반응온도(**Fig. 30-A, B, C**)와 효소농도(**Fig. 30-D, E, F**)보다 영향을 크게 받고, 효소농도가 반응온도보다 영향력이 더 크게 나타났다(**Fig. 30-G, H, I**). 효소처리 흥미영역에서의 반응평균 값은 4.09 mg/mL이었고, Total Flavonoid 함량은 일반적으로 반응온도가 낮고 반응시간이 길 때 증가하는 경향을 나타내었다. 효소농도 0.54 mL/100 L, 반응온도 20.00°C, 반응시간 8.00 hr일 때가 최적 효소처리 조건으로 4.71 mg/mL로 예측되었으며, 이는 무처리 시의 1.07배 수준이었다.

효소농도, 반응온도와 반응시간이 복분자 추출물의 Total Anthocyanin 함량에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 **Fig. 31**과 같다. 효소처리공정에서 반응시간은 반응온도보다 영향력이 더 작게 나타났으나 (**Fig. 31-A, B, C**) 효소농도와는 비슷하였고(**Fig. 31-D, E, F**), 반응온도는 효소농도보다 더 큰 영향력을 보였다(**Fig. 31-G, H, I**). 효소처리 흥미영역에서의 반응평균 값은 0.54 mg/100 g이었고, 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 복분자의 Total Anthocyanin 함량을 반응 표면 분석한 결과 일반적으로 반응온도가 높고 반응시간이 짧을수록 Total Anthocyanin 함량이 증가하는 경향을 나타내었다. 효소농도 1.48 mL/100 L, 반응온도 59.42°C 및 반응시간 2.56 hr 일 때가 최적 효소처리조건으로 0.95 mg/100 g으로 예측되었고, 이는 무처리 시의 7.92배 수준이었다.

DPPH radical 소거능에 미치는 영향을 분석한 결과는 **Fig. 32**와 같다. 효소처리공정에서 반응시간과 반응온도(**Fig. 32-A, B, C**), 반응시간과 효소농도(**Fig. 32-D, E, F**) 그리고 반응온도와 효소농도(**Fig. 32-G, H, I**) 사이의 영향력은 서로 비슷하게 나타났다. 효소처리 흥미영역에서의 반응평균 값은 51.64%이었고, 일반적으로 반응온도가 높고 반응시간이 길 때 DPPH radical 소거능이 증가하는 경향을 보였다. 효소농도 1.40 mL/100 L, 반응온도 56.34°C, 반응시간 7.54 hr 일 때 최적 효소처리조건으로 DPPH radical 소거능이 65.17%로 예측되었고, 이는

무처리 시의 5.54배 수준이었다.

SOD-like 활성능에 미치는 영향을 분석한 결과는 **Fig. 33**과 같다. 효소처리과정에서 반응시간이 반응온도보다 더 큰 영향을 미치지만(**Fig. 33-A, B, C**), 반응시간과 효소농도의 영향력은 비슷하고(**Fig. 33-D, E, F**), 효소농도가 반응온도보다 더 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있었다(**Fig. 33-G, H, I**). 흥미영역에서의 반응평균 값은 11.58%이었고, 효소농도, 반응온도가 낮고 반응시간이 짧을수록 SOD-like 활성능이 증가하는 것으로 나타났다. 최적 효소처리 조건으로 효소농도 0.50 mL/100 L, 반응온도 20.67°C 및 반응시간 2.00 hr 일 때 복분자 추출물의 SOD-like 활성능은 30.59 %로 예측되었고, 이는 무처리 시의 27.8배 수준이었다.

효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 복분자 추출물의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능을 다중반응표면의 최적화방법으로써 만족 함수(desirability function)를 이용하여 종속변수들의 가중치를 1로 놓고 종합적으로 판단한 결과 (**Fig. 34**) 최적 효소처리 조건은 효소농도 0.50 mL/100 L, 반응온도 54.66°C 및 반응시간 2.00 hr의 조건이었으며 이때의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능은 각각 5.36%, 9.26 mg/g, 4.26 mg/mL, 0.56 mg/100 g, 49.21% 및 28.76% 이었고 전반적인 만족도(overall desirability)는 0.54로 나타났다.

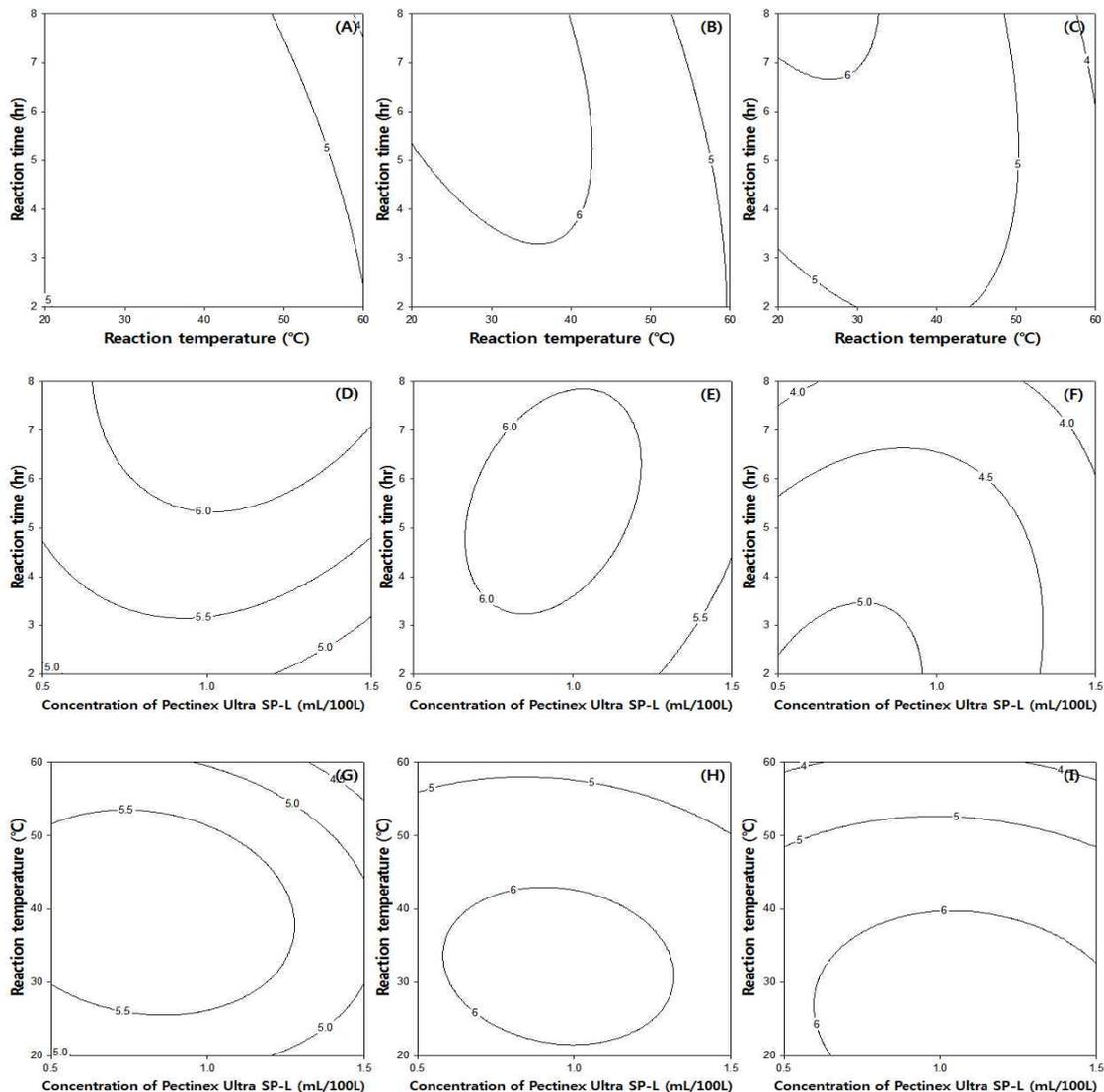


Fig. 28. Contour plot for yield (%) of *Bokbunja* Anthocyanin by Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment.

(Concentration of Pectinex Ultra SP-L, A: 0.5 mL/100 L, B: 1.0 mL/100 L, C: 1.5 mL/100 L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 2 hr, H: 5 hr, I: 8 hr)

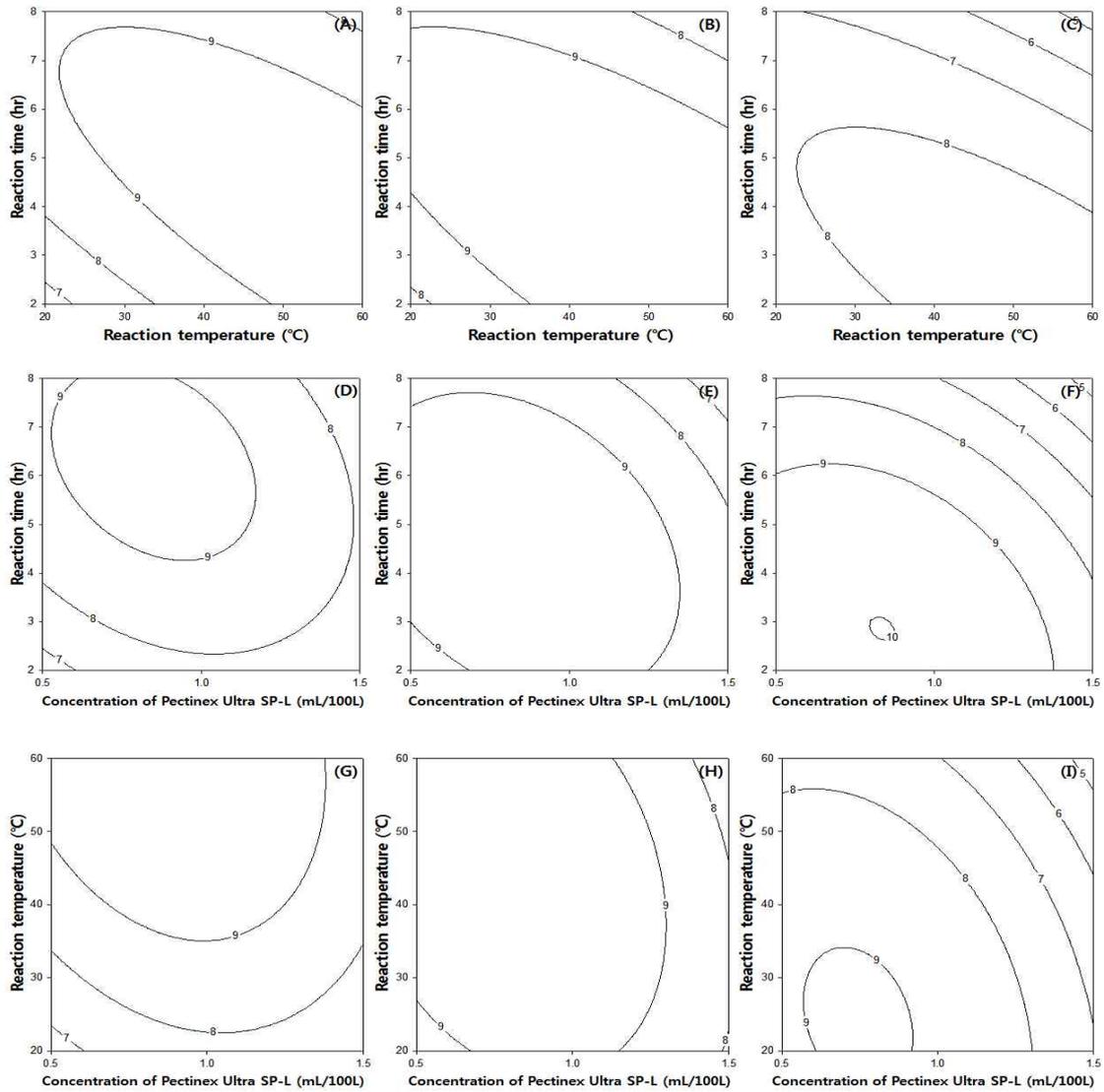


Fig. 29. Contour plot for Total Polyphenol contents (mg/g) of *Bokbunja* extracts by Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment.

(Concentration of Pectinex Ultra SP-L, A: 0.5 mL/100 L, B: 1.0 mL/100 L, C: 1.5 mL/100 L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 2 hr, H: 5 hr, I: 8 hr)

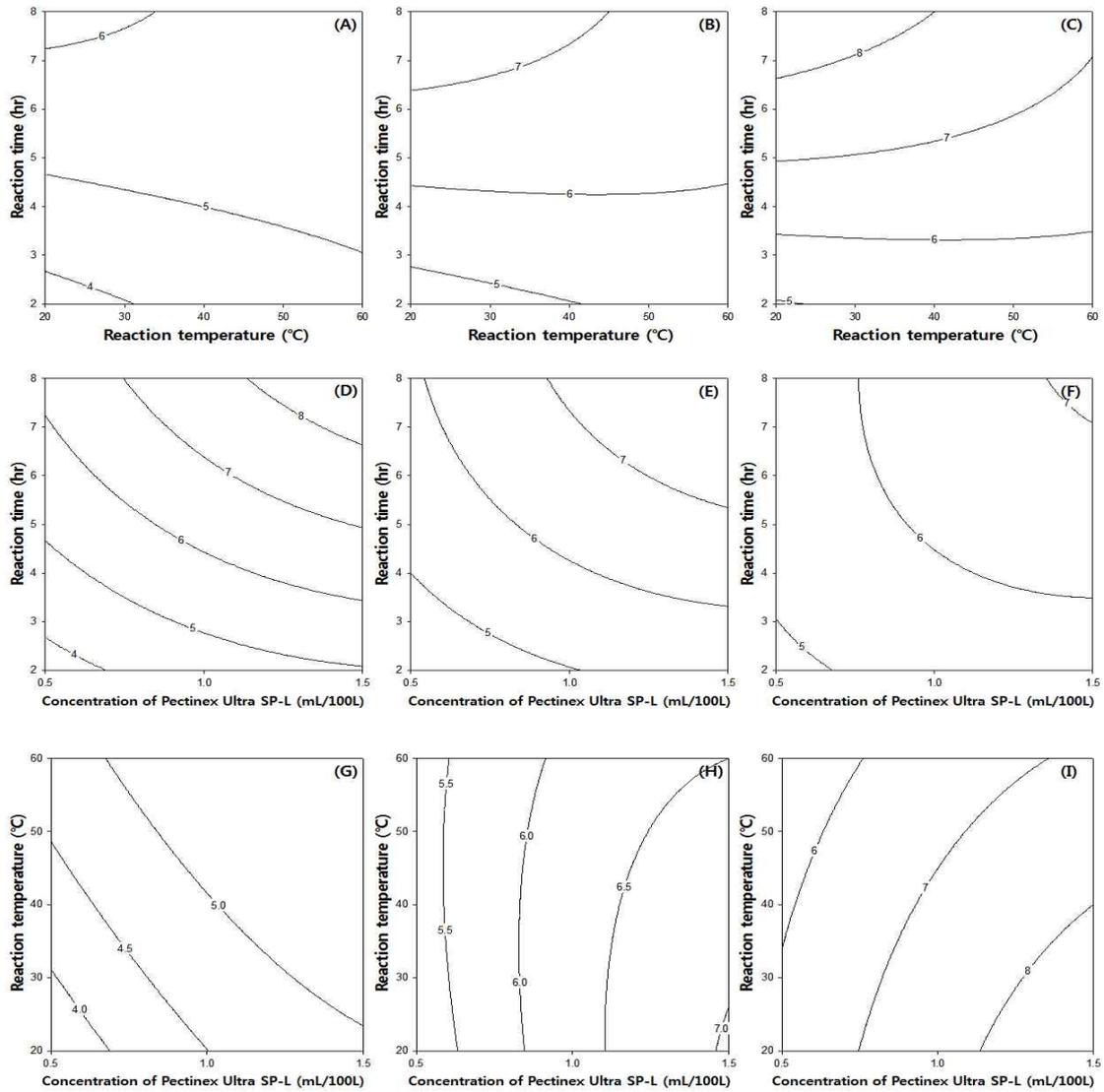


Fig. 30. Contour plot for Total Flavonoid contents (mg/mL) of *Bokbunja* extracts by Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment.

(Concentration of Pectinex Ultra SP-L, A: 0.5 mL/100 L, B: 1.0 mL/100 L, C: 1.5 mL/100 L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 2 hr, H: 5 hr, I: 8 hr)

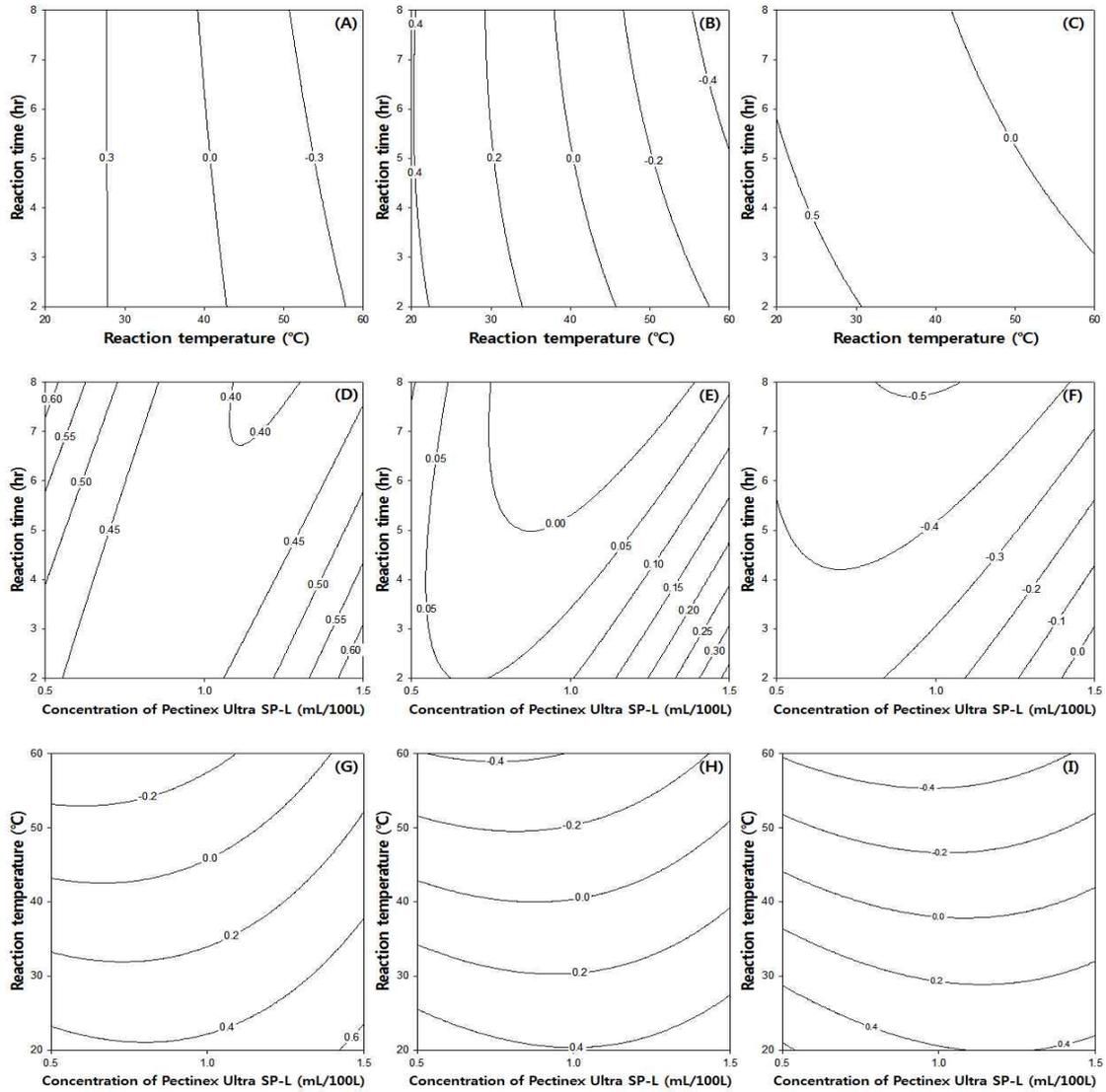


Fig. 31. Contour plot for Total Anthocyanin contents (mg/100 g) of *Bokbunja* extracts by Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment.

(Concentration of Pectinex Ultra SP-L, A: 0.5 mL/100 L, B: 1.0 mL/100 L, C: 1.5 mL/100 L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 2 hr, H: 5 hr, I: 8 hr)

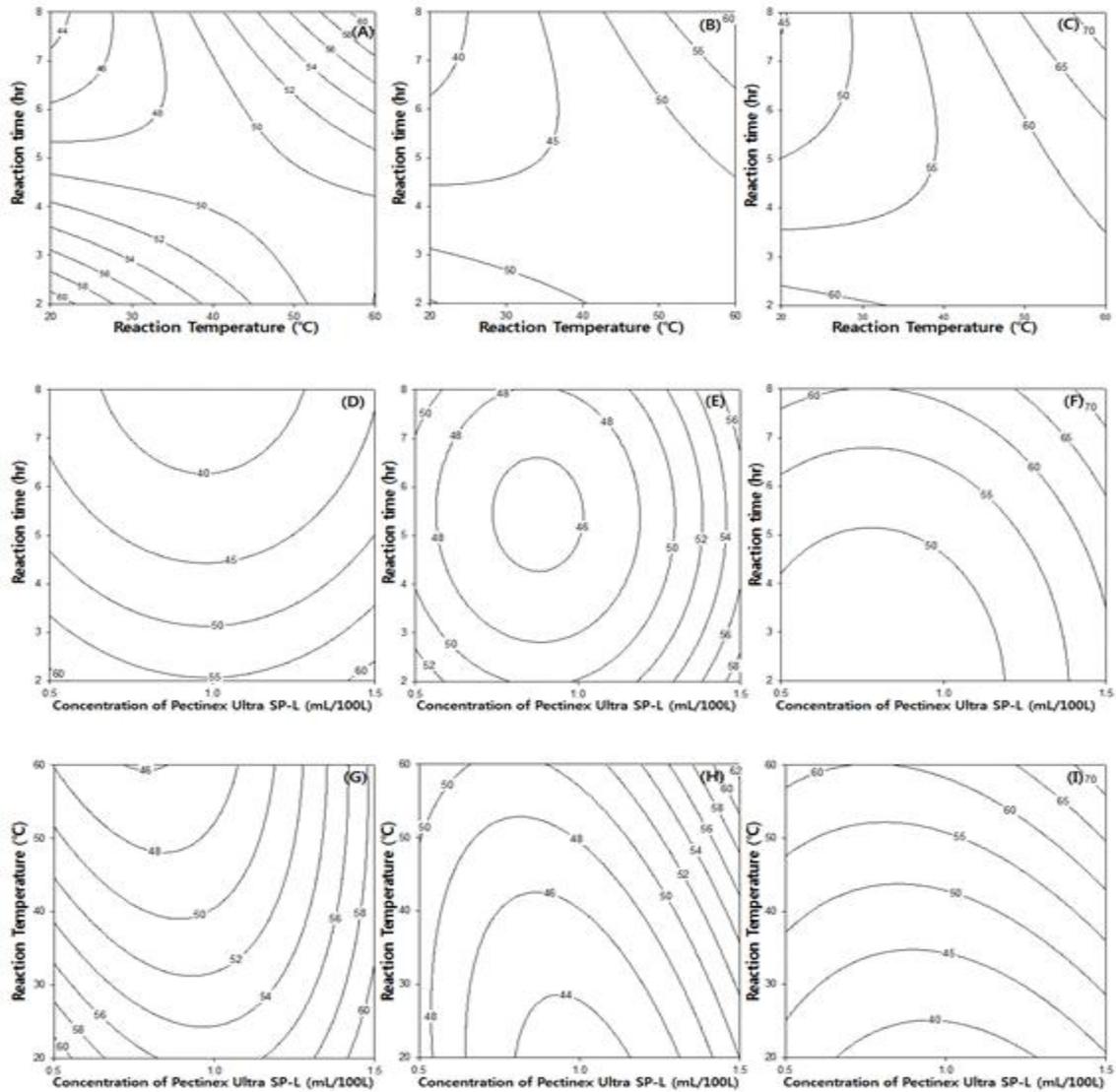


Fig. 32. Contour plot for DPPH radical scavenging activity (%) of *Bokbunja* extracts by Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment.

(Concentration of Pectinex Ultra SP-L, A: 0.5 mL/100 L, B: 1.0 mL/100 L, C: 1.5 mL/100 L, Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C, Reaction time, G: 2 hr, H: 5 hr, I: 8 hr)

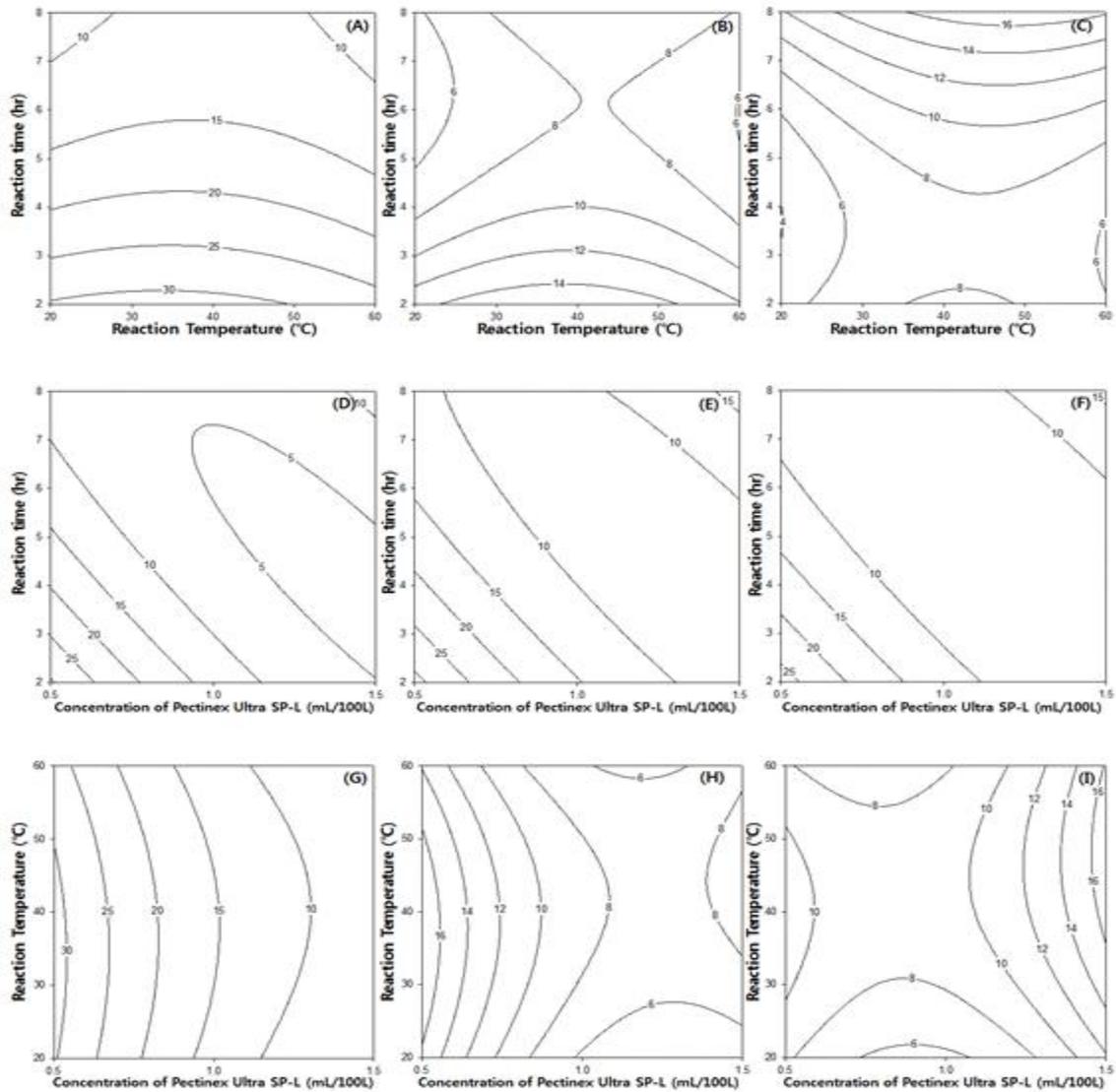


Fig. 33. Contour plot for SOD-like activity (%) of *Bokbunja* extracts by Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment.

(Concentration of Pectinex Ultra SP-L, A: 0.5 mL/100 L, B: 1.0 mL/100 L, C: 1.5 mL/100 L, Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C, Reaction time, G: 2 hr, H: 5 hr, I: 8 hr)

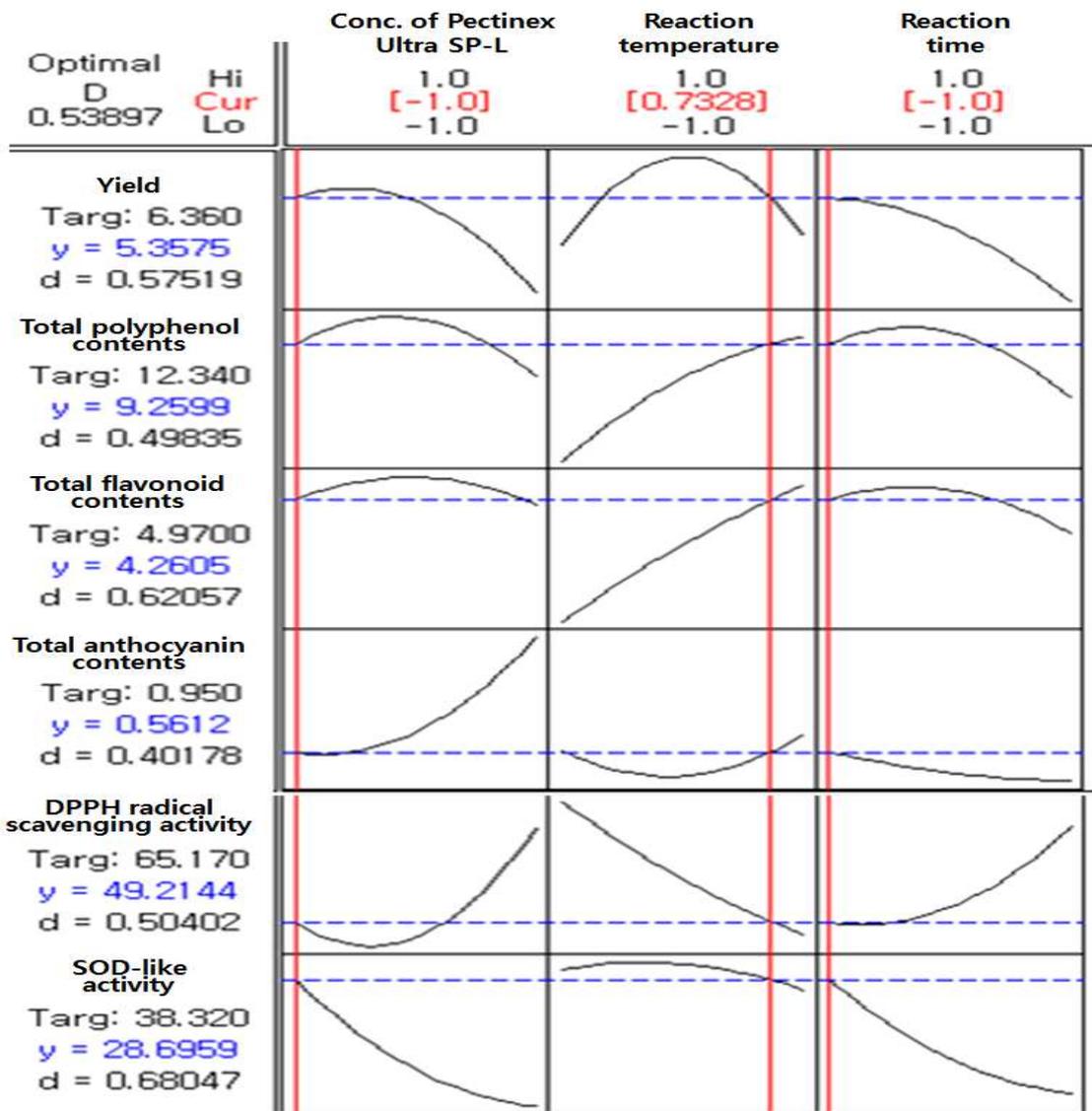


Fig. 34. Response optimization for multi-response surface of *Bokbunja* extracts by Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment.

나. Pectinex Ultra SP-L을 이용한 오디의 최적 효소 처리 공정

(1) 수율 및 항산화활성

여섯 가지 요인으로서 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 오디 추출물의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능을 분석한 결과는 **Table 41**과 같았다.

오디를 Pectinex Ultra SP-L 처리 하였을 때의 수율은 5.74-11.59% 범위로 나타났으며, 효소농도 0.54 mL/100 L, 반응온도 20°C 및 반응시간 2 hr의 조건에서 10.73%로 최적값을 보였다.

Total polyphenol 함량의 경우 무처리 시에는 5.64 mg/g이었는데, 본 실험에서 효소처리의 흥미영역 구간 실험점에서의 범위는 4.26-5.92 mg/g로 나타났다. 효소농도 0.50 mL/100 L, 반응온도 28.81°C, 반응시간 4.22 hr일 때 5.90 mg/g으로 최적값을 보였으며, 이는 무처리 시의 105% 수준이었다.

Total flavonoid 함량의 경우 무처리 시에 3.08 mg/ml이었고, 효소처리의 흥미영역 구간 실험점에서의 범위는 2.97-3.64 mg/ml로 나타났다. 효소농도 1.03 mL/100 L, 반응온도 60°C, 반응시간 5.64 hr일 때 3.58 mg/ml로 최적값을 보였으며, 이는 무처리 시의 116% 수준이었다.

Total Anthocyanin 함량의 경우 무처리 시에는 0.09 mg/100 g에 불과하였으나 본 실험의 효소처리의 흥미영역 구간 실험 점에서 Total Anthocyanin 함량의 범위는 0.28-0.71 mg/100 g로 나타났다. 효소농도 0.50 mL/100 L, 반응온도 23.39°C 및 반응시간 2.65 hr의 조건에서 0.71 mg/100 g으로 최적값을 보였으며 무처리 시의 Total Anthocyanin 함량의 789% 수준이었다.

DPPH radical 소거능은 무처리 시에는 34.17% 였으나 효소처리 시 38.83-52.62%로 나타났다. 효소농도 0.55 mL/100 L, 반응온도 34.02°C 및 반응시간 2 hr의 조건에서 52.62%로 최적값을 보였으며 무처리 시의 154% 수준이었다.

SOD-like 활성능의 경우 무처리 시 0.88%였으나, 효소처리 시 14.45-22.32%로 나타났다. 효소농도 1.00 mL/100 L, 반응온도 32.82°C 및 반응시간 8 hr의 조건에서 21.20%로 최적값이 나타났으며 무처리 시의 2410% 수준이었다.

Table 41. Central composite design for Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment from mulberry extracts and its dependent variables.

Coded levels of variable			Responses					
X ₁	X ₂	X ₃	Yield (%)	Total polyphenol contents (mg/g)	Total flavonoid contents (mg/ml)	Total Anthocyanin contents (mg/100 g)	DPPH radical scavenging activity (%)	SOD-like activity (%)
0	-1	1	9.89	4.67±0.13 ^{gh}	3.05±0.10 ^{fg}	0.63±0.035 ^{bc}	52.50±2.29 ^a	21.54±1.08 ^a
0	1	-1	5.74	4.74±0.13 ^g	3.43±0.05 ^{abcd}	0.37±0.015 ^{ef}	45.99±1.27 ^d	16.26±0.58 ^g
0	0	0	8.97	5.92±0.32 ^a	3.50±0.16 ^{abc}	0.68±0.042 ^{ab}	52.00±0.52 ^{ab}	18.45±1.11 ^{ef}
0	-1	-1	9.52	5.15±0.47 ^{ef}	3.17±0.25 ^{efg}	0.71±0.066 ^a	52.25±0.52 ^a	18.71±0.74 ^{cdef}
-1	0	1	7.16	5.13±0.17 ^f	3.21±0.15 ^{def}	0.48±0.060 ^d	47.86±3.56 ^{cd}	19.48±0.37 ^{bcd}
-1	-1	0	9.40	5.51±0.41 ^{bcde}	3.39±0.24 ^{bcde}	0.65±0.093 ^b	51.00±1.23 ^{abc}	19.35±0.55 ^{bcd}
-1	0	-1	9.30	5.79±0.63 ^{ab}	3.23±0.31 ^{def}	0.59±0.038 ^c	52.13±0.34 ^{ab}	20.25±0.73 ^b
0	0	0	8.98	4.26±0.03 ⁱ	3.22±0.02 ^{def}	0.33±0.046 ^{fgh}	48.23±3.38 ^{cd}	19.61±0.55 ^{bc}
1	1	0	7.55	5.71±0.32 ^{abcd}	3.44±0.01 ^{abcd}	0.28±0.021 ^h	46.97±5.16 ^d	14.45±0.50 ^h
0	0	0	8.78	5.74±0.14 ^{abc}	3.64±0.21 ^a	0.58±0.044 ^c	49.25±0.88 ^{abcd}	22.32±0.71 ^a
1	0	-1	8.86	5.38±0.04 ^{cdef}	3.28±0.30 ^{cdef}	0.38±0.031 ^{ef}	48.74±2.31 ^{bcd}	19.61±0.55 ^{bc}
1	0	1	8.61	5.35±0.20 ^{def}	3.22±0.16 ^{def}	0.35±0.017 ^{fg}	51.87±1.76 ^{ab}	18.19±0.75 ^f
1	-1	0	8.72	4.38±0.03 ^{hi}	2.97±0.26 ^{fg}	0.41±0.002 ^e	52.62±3.17 ^a	18.58±0.20 ^{def}
0	1	1	11.59	4.26±0.04 ⁱ	3.44±0.04 ^{abcd}	0.31±0.019 ^{gh}	40.09±3.26 ^e	20.00±0.36 ^b
-1	1	0	7.42	5.48±0.32 ^{bcdef}	3.59±0.02 ^{ab}	0.30±0.004 ^h	38.83±3.62 ^e	18.19±1.11 ^f

X₁: Concentration of Pectinex Ultra SP-L (mL/100 L), X₂: Reaction temperature (°C), X₃: Reaction time (hr)

(2) 이차다항회귀곡선식

홍미구역 안에서 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 오디 추출물의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능에 미치는 정도를 분산 분석한 결과 **Table 42**와 같다.

수율에 영향을 미치는 요인으로 반응온도가 가장 컸으며, 반응시간, 효소농도 순으로 나타났다. 효소농도를 제외한 두 가지 요인이 5% 내에서 유의성차이를 나타내었다. Total polyphenol 함량은 효소농도의 영향이 가장 컸으며, 반응온도, 반응시간 순으로 나타났고 효소농도와 반응온도에서만 5% 내에서 유의성차이를 나타내었다. Total flavonoid 함량에서는 반응온도의 영향이 크고 반응시간, 효소농도 순으로 나타났으며 반응온도에 대해서만 5% 내에서 유의성차이를 보였다. Total Anthocyanin 함량에 영향을 미치는 요인으로 반응온도가 가장 컸으며 효소농도, 반응시간 순으로 나타났고 반응시간을 제외한 두 가지 요인에서 5% 내에서 유의성차이를 나타내었다. DPPH radical 소거능에서는 반응온도가 가장 컸으며 효소농도, 반응시간 순이었고, 그 중 반응온도만 5% 내에서 유의성 차이가 있었다. SOD-like 활성능도 반응온도, 효소농도, 반응시간 순으로 나타났고, 반응온도에 대해서만 5% 내에서 유의성차이를 보였다.

처리 요인의 수준에 대하여 종속변수인 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능을 예측하기 위한 이차다항회귀곡선식의 회귀계수를 계산한 결과는 **Table 43**과 같다. 또한, 종속변수에 대한 이차다항회귀곡선식의 일차다항회귀(linear), 이차다항회귀(quadratic) 및 교차회귀(cross product)의 기여도를 검정하였다.(**Table 44**) 수율의 기여도는 교차회귀, 일차다항회귀 및 이차다항회귀 순으로 나타났으며, Total Polyphenol 함량의 기여도는 이차다항회귀, 교차회귀 및 일차다항회귀 순으로 나타났다. Total flavonoid 함량과 Total Anthocyanin 함량의 기여도는 일차다항회귀, 이차다항회귀 및 교차회귀 순으로 나타났다. DPPH radical 소거능의 경우 일차다항회귀, 교차회귀 및 이차다항회귀 순으로 기여도가 나타났으며, SOD-like 활성능의 기여도는 일차다항회귀, 이차다항회귀 및 교차회귀 순으로 나타났다. 이차다항회귀곡선식 적합성 검정에서의 total regression은 모두 5% 이내에서 유의성 차이를 보였다.

Table 42. Analysis of variance for the effects of three variables on yield, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, Total Anthocyanin contents and antioxidative activities of Pectinex Ultra SP-L enzyme treatments from mulberry extracts.

	Factors	Yield	Total polyphenol contents	Total flavonoid contents	Total Anthocyanin contents	DPPH radical scavenging activity	SOD-like activity
X ₁	F value	1.41	3.62	2.02	9.35	2.62	2.69
	Prob>F	0.2677	0.0143	0.1133	<.0001	0.0654	0.0607
X ₂	F value	5.7	3.26	6.99	19.36	14.49	4.49
	Prob>F	0.0032	0.0226	0.0003	<.0001	<.0001	0.0094
X ₃	F value	5.37	2.05	2.54	1.27	2.04	0.72
	Prob>F	0.0042	0.1089	0.0572	0.3006	0.1278	0.5876

X₁: Concentration of Pectinex Ultra SP-L (mL/100 L), X₂: Reaction temperature (°C), X₃: Reaction time (hr)

Table 43. Regression coefficients of second degree polynomials for yield, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, Total Anthocyanin contents and antioxidative activities of Pectinex Ultra SP-L enzyme treatments from mulberry extracts.

Parameters	Estimate					
	Yield	Total polyphenol contents	Total flavonoid contents	Total Anthocyanin contents	DPPH radical scavenging activity	SOD-like activity
Intercept	14.380	6.894	2.809	0.855	56.391	11.498
X ₁ ¹⁾	3.090	-4.816	0.225	0.262	-9.986	10.789
X ₂ ²⁾	-0.174	0.043	0.005	-0.006	0.229	0.271
X ₃ ³⁾	-1.338	0.081	0.139	-0.037	-0.867	-0.273
X ₁ *X ₁	-2.680	1.331	-0.293	-0.350	-0.057	-4.450
X ₂ *X ₁	0.020	0.034	0.007	0.005	0.163	-0.074
X ₂ *X ₂	0.000	-0.001	0.000	0.000	-0.006	-0.003
X ₃ *X ₁	0.315	0.104	-0.007	0.014	1.236	-0.108
X ₃ *X ₂	0.023	0.000	0.001	0.000	-0.026	0.004
X ₃ *X ₃	0.027	-0.025	-0.063	0.001	0.037	0.041

¹⁾X₁: Concentration of Pectinex Ultra SP-L (mL/100 L), ²⁾X₂: Reaction temperature (°C), ³⁾X₃: Reaction time (hr)

Table 44. Determination coefficients and probability of second degree polynomials for yield, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, Total Anthocyanin contents and antioxidative activities of Pectinex Ultra SP-L enzyme treatments from mulberry extracts.

	Regressions	Linear	Quadratic	Cross product	Total regress
Yield	R ²	0.21	0.08	0.33	0.62
	F value	3.61	1.36	5.86	3.61
	Prob>F	0.3110	0.2823	0.0048	0.0080
Total polyphenol contents	R ²	0.10	0.24	0.11	0.46
	F value	2.24	5.13	2.43	3.26
	Prob>F	0.1008	0.0048	0.0820	0.0055
Total flavonoid contents	R ²	0.38	0.14	0.03	0.55
	F value	9.78	3.59	0.86	4.74
	Prob>F	<.0001	0.0231	0.4721	0.0004
Total Anthocyanin contents	R ²	0.63	0.09	0.04	0.76
	F value	31.26	4.65	1.98	12.63
	Prob>F	<.0001	0.0077	0.1356	<.0001
DPPH radical scavenging activity	R ²	0.59	0.07	0.11	0.77
	F value	17.18	2.16	3.13	7.49
	Prob>F	<.0001	0.1240	0.0488	<.0001
SOD-like activity	R ²	0.33	0.21	0.05	0.59
	F value	5.47	3.52	0.74	3.25
	Prob>F	0.0065	0.0338	0.5380	0.0136

(3) 효소처리공정 최적화

효소농도, 반응온도와 반응시간이 오디 추출물의 수율에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 **Fig. 35**와 같다. 효소처리공정에서 반응시간은 반응온도와 비슷한 영향력을 보이나(**Fig. 35-A, B, C**) 효소농도보다는 영향이 더 크고(**Fig. 35-D, E, F**), 반응온도는 효소농도보다 영향을 크게 받는 것을 알 수 있었다(**Fig. 35-G, H, I**). 효소처리 흥미영역에서의 반응평균(response mean) 값은 8.70%이었다. 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 오디의 수율을 반응표면분석한 결과 일반적으로 효소농도와 반응온도가 낮고, 반응시간이 짧을수록 수율이 증가하는 경향을 나타내었으며 효소농도 0.54 mL/100 L, 반응온도 20°C 및 반응시간 2 hr 일 때가 최적 효소처리 조건으로 10.73%로 예측되었다.

Total polyphenol 함량에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 **Fig. 36**과 같다. 효소처리공정에서 반응시간과 반응온도(**Fig. 36-A, B, C**), 반응시간과 효소농도(**Fig. 36-D, E, F**), 그리고 반응온도와 효소농도(**Fig. 36-G, H, I**) 사이의 영향력은 비슷하게 나타났다. 효소처리 흥미영역에서의 반응평균 값은 5.17 mg/g이었다. 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 오디의 Total Polyphenol 함량을 반응표면분석한 결과 일반적으로 효소농도가 낮을수록 증가하는 경향을 보였으며 효소농도 0.50 mL/100 L, 반응온도 28.81°C 및 반응시간 4.22 hr 일 때가 최적 효소처리 조건으로 그 때의 Total Polyphenol 함량은 5.90 mg/g으로 예측되었다.

Total flavonoid 함량에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 **Fig. 37**과 같다. 효소처리공정에서 반응시간은 반응온도(**Fig. 37-A, B, C**)와 효소농도(**Fig. 37-D, E, F**)보다 영향을 크게 받고, 반응온도는 효소농도보다 영향을 크게 받는 것을 알 수 있다(**Fig. 37-G, H, I**). 효소처리 흥미영역에서의 반응평균 값은 3.32 mg/ml이었다. Total flavonoid 함량은 일반적으로 반응온도가 높을 때 증가하는 경향을 나타내었으며 효소농도 1.03 mL/100 L, 반응온도 60°C, 반응시간 5.64 hr 일 때가 최적 효소처리 조건으로 3.58 mg/ml로 예측되었다.

효소농도, 반응온도와 반응시간이 오디 추출물의 Total Anthocyanin 함량에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 **Fig. 38**과 같다. 효소처리공정에서 반응시간 보다는 반응온도(**Fig. 38-A, B, C**)와 효소농도(**Fig. 38-D, E, F**)에 영향을 크게 받는 것을 알 수 있으며 반응온도와 효소농도는 비슷한 영향력을 보였다(**Fig. 38-G, H, I**). 효소처리 흥미영역에서의 반응평균(response mean) 값은 4.32 mg/100 g이었다. 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 오디의 Total Anthocyanin 함량을 반응 표면 분석한 결과 일반적으로 효소농도와 반응온도가 낮고, 반응시간이 짧을수록 Total Anthocyanin 함량이 증가하는 경향을 나타내었으며 효소농도 0.50 mL/100 L, 반응온도 23.39°C 및 반응시간 2.65 hr 일 때가 최적 효소처리조건으로 0.71 mg/100 g으로 예측되었다.

DPPH radical 소거능에 미치는 영향을 분석한 결과는 **Fig. 39**와 같다. 효소처리공정에서 반응온도는 반응시간(**Fig. 39-A, B, C**)과 효소농도(**Fig. 39-G, H, I**)보다 영향이 크고, 반응시간과 효소농도(**Fig. 39-D, E, F**)는 비슷한 영향력을 나타냈다. 효소처리 흥미영역에서의 반응평균 값은 48.69%이었다. 일반적으로 효소농도가 낮고, 반응시간이 짧을 때 DPPH radical 소거능이 증가하는 경향을 보였으며 효소농도 0.55 mL/100 L, 반응온도 34.02°C, 반응시간 2 hr 일 때 최적 효소처리조건으로 DPPH radical 소거능이 52.62%로 예측되었다.

SOD-like 활성능에 미치는 영향을 분석한 결과는 **Fig. 40**과 같다. 효소처리공정에서 반응시간은 반응온도(**Fig. 40-A, B, C**)와 효소농도(**Fig. 40-D, E, F**)보다 영향력이 더 낮았고, 반

응온도와 효소농도는 비슷한 영향력을 보였다(**Fig. 40-G, H, I**). 흥미영역에서의 반응평균 값은 19.00%이었다. 반응시간이 길수록 SOD-like 활성능은 증가하는 것으로 나타났으며 최적 효소처리조건으로 효소농도 1.00 mL/100 L, 반응온도 32.82°C 및 반응시간 8 hr 일 때 오디 추출물의 SOD-like 활성능은 21.20%로 예측되었다.

효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 오디 추출물의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능을 다중반응표면의 최적화방법으로써 만족 함수(desirability function)를 이용하여 종속변수들의 가중치를 1로 놓고 종합적으로 판단한 결과 (**Fig. 41**) 최적 효소처리 조건은 효소농도 0.52 mL/100 L, 반응온도 25.66°C 및 반응시간 3.53 hr의 조건이었으며 이때의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능은 각각 9.39%, 5.87 mg/g, 3.34 mg/ml, 0.67 mg/100 g, 52.53% 및 19.31%이었고 전반적인 만족도(overall desirability)는 0.78이었다.

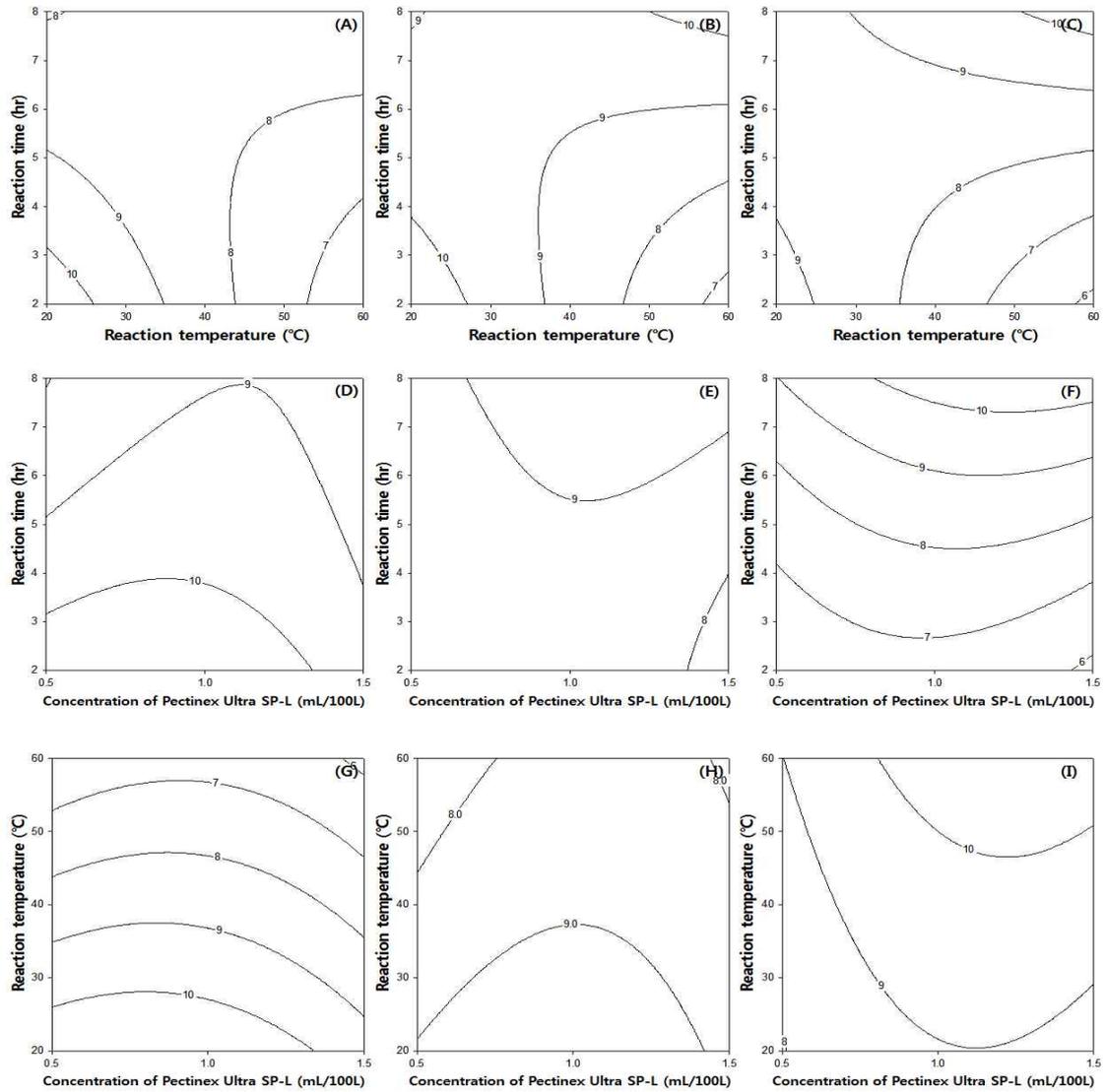


Fig. 35. Contour plot for yield (%) of mulberry Anthocyanin by Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment.

(Concentration of Pectinex Ultra SP-L, A: 0.5 mL/100 L, B: 1.0 mL/100 L, C: 1.5 mL/100 L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 2 hr, H: 5 hr, I: 8 hr)

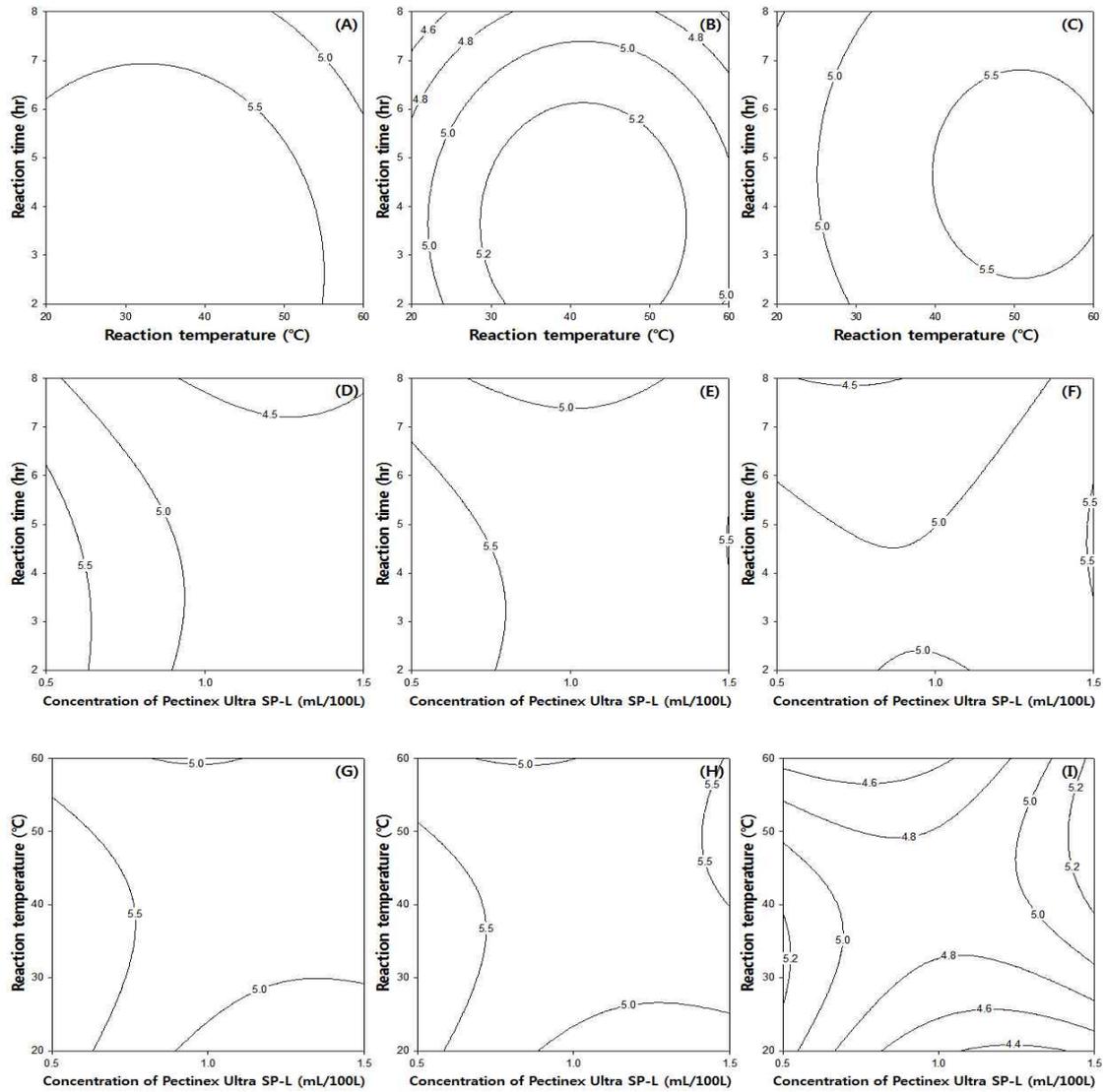


Fig. 36. Contour plot for Total Polyphenol contents (mg/g) of mulberry Anthocyanin by Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment.

(Concentration of Pectinex Ultra SP-L, A: 0.5 mL/100 L, B: 1.0 mL/100 L, C: 1.5 mL/100 L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 2 hr, H: 5 hr, I: 8 hr)

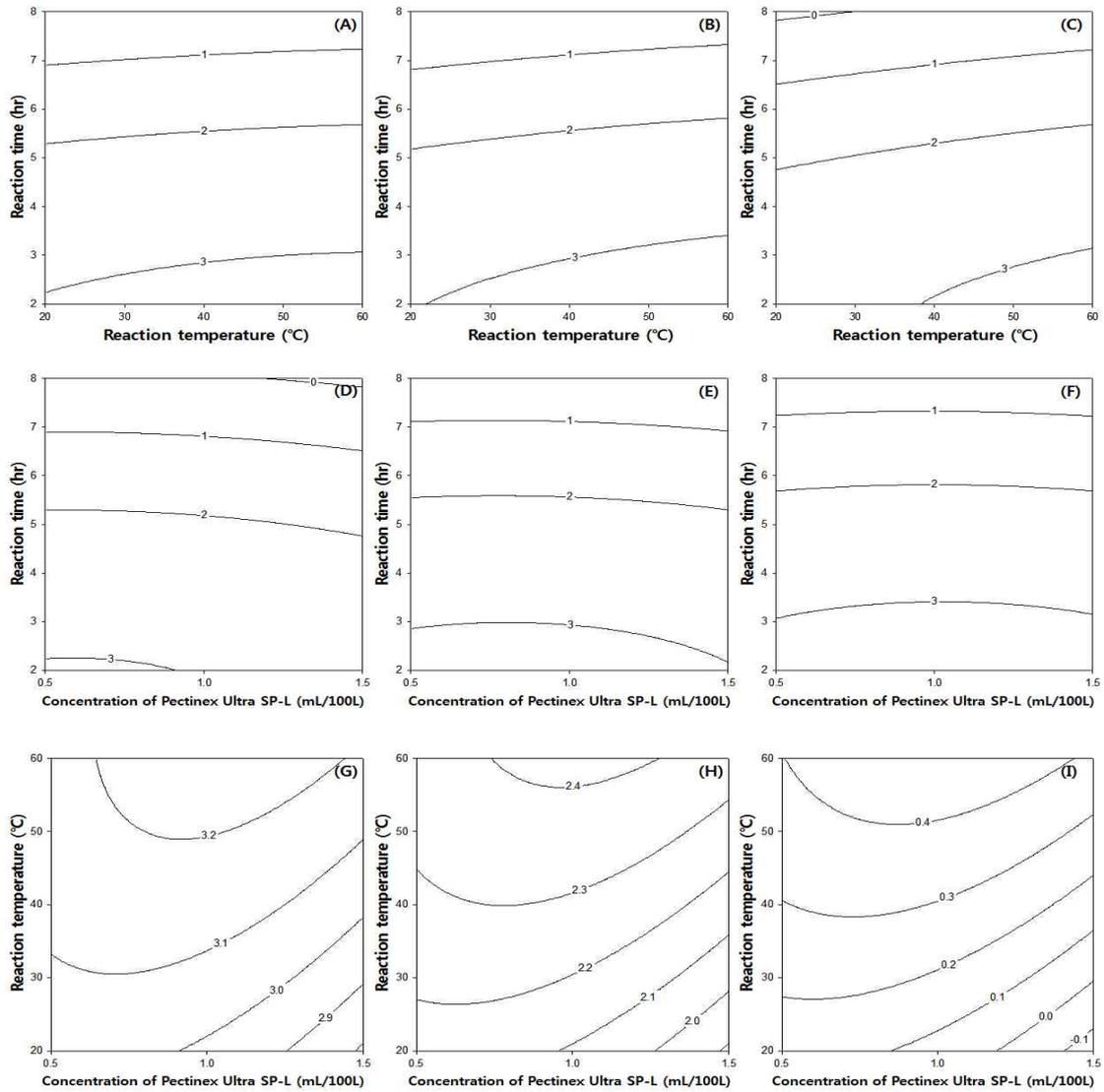


Fig. 37. Contour plot for Total Flavonoid contents (mg/ml) of mulberry Anthocyanin by Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment.

(Concentration of Pectinex Ultra SP-L, A: 0.5 mL/100 L, B: 1.0 mL/100 L, C: 1.5 mL/100 L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 2 hr, H: 5 hr, I: 8 hr)

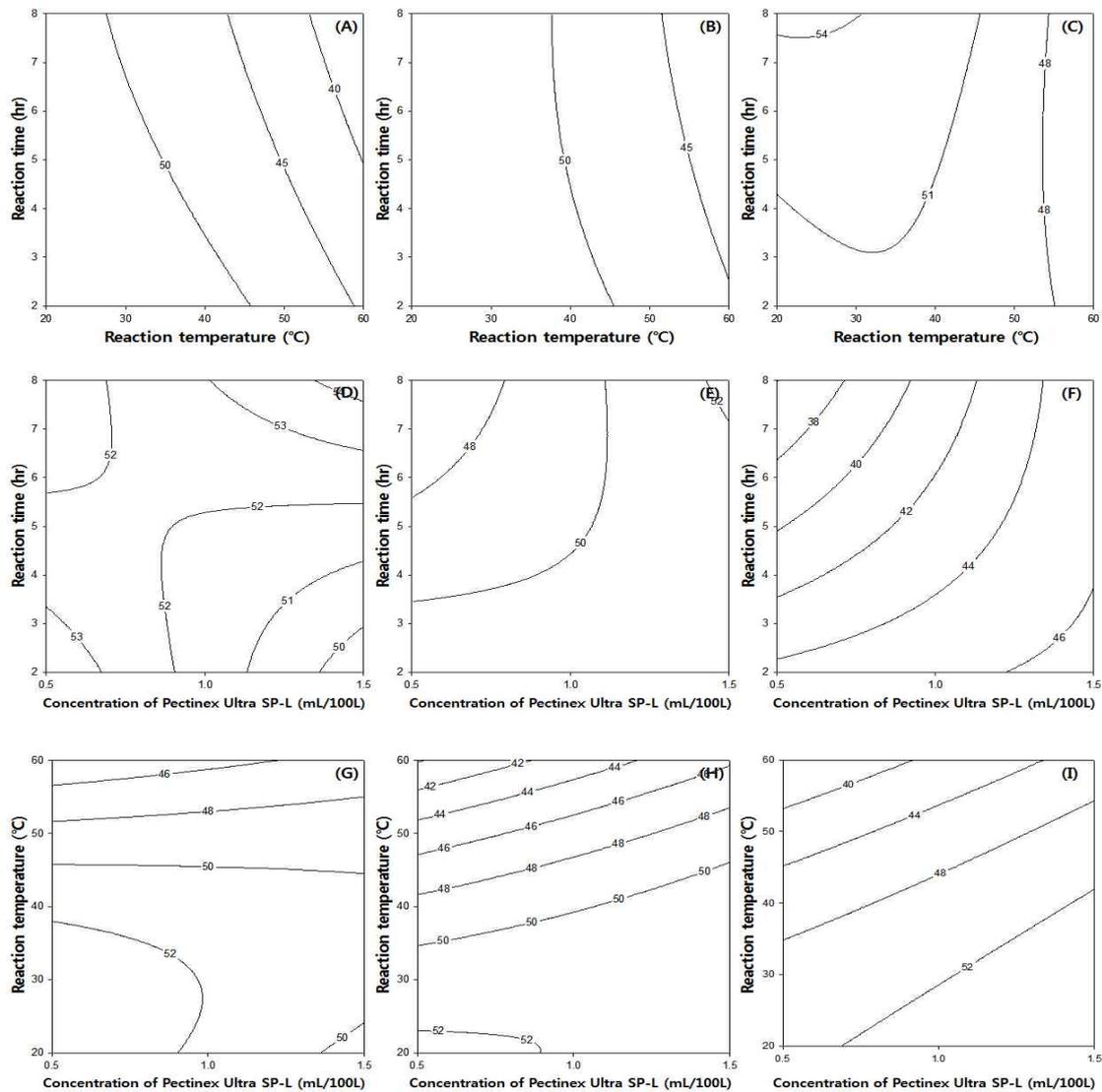


Fig. 39. Contour plot for DPPH radical scavenging activity (%) of mulberry Anthocyanin by Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment.

(Concentration of Pectinex Ultra SP-L, A: 0.5 mL/100 L, B: 1.0 mL/100 L, C: 1.5 mL/100 L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 2 hr, H: 5 hr, I: 8 hr)

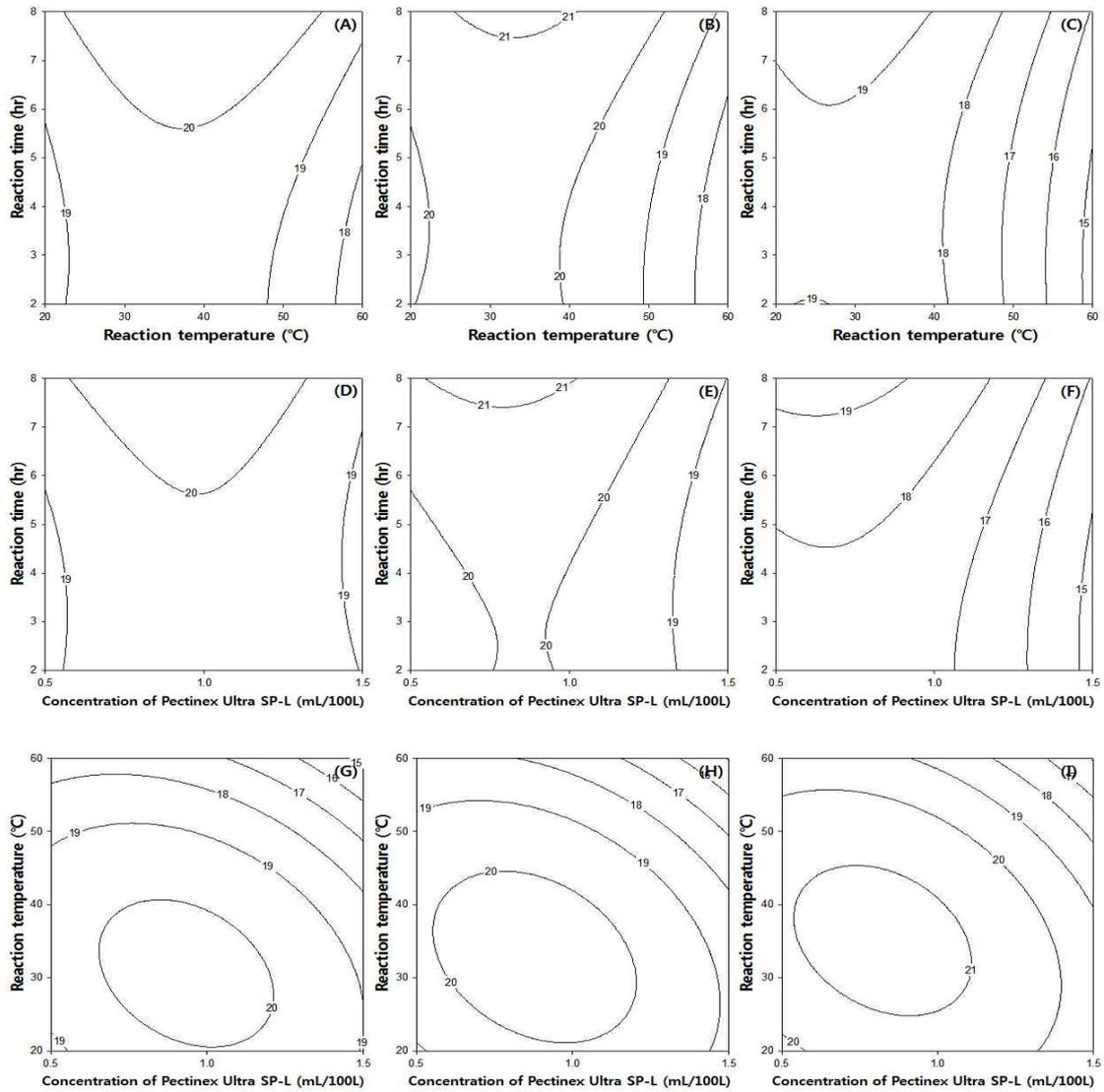


Fig. 40. Contour plot for SOD-like activity (%) of mulberry Anthocyanin by Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment.

(Concentration of Pectinex Ultra SP-L, A: 0.5 mL/100 L, B: 1.0 mL/100 L, C: 1.5 mL/100 L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 2 hr, H: 5 hr, I: 8 hr)

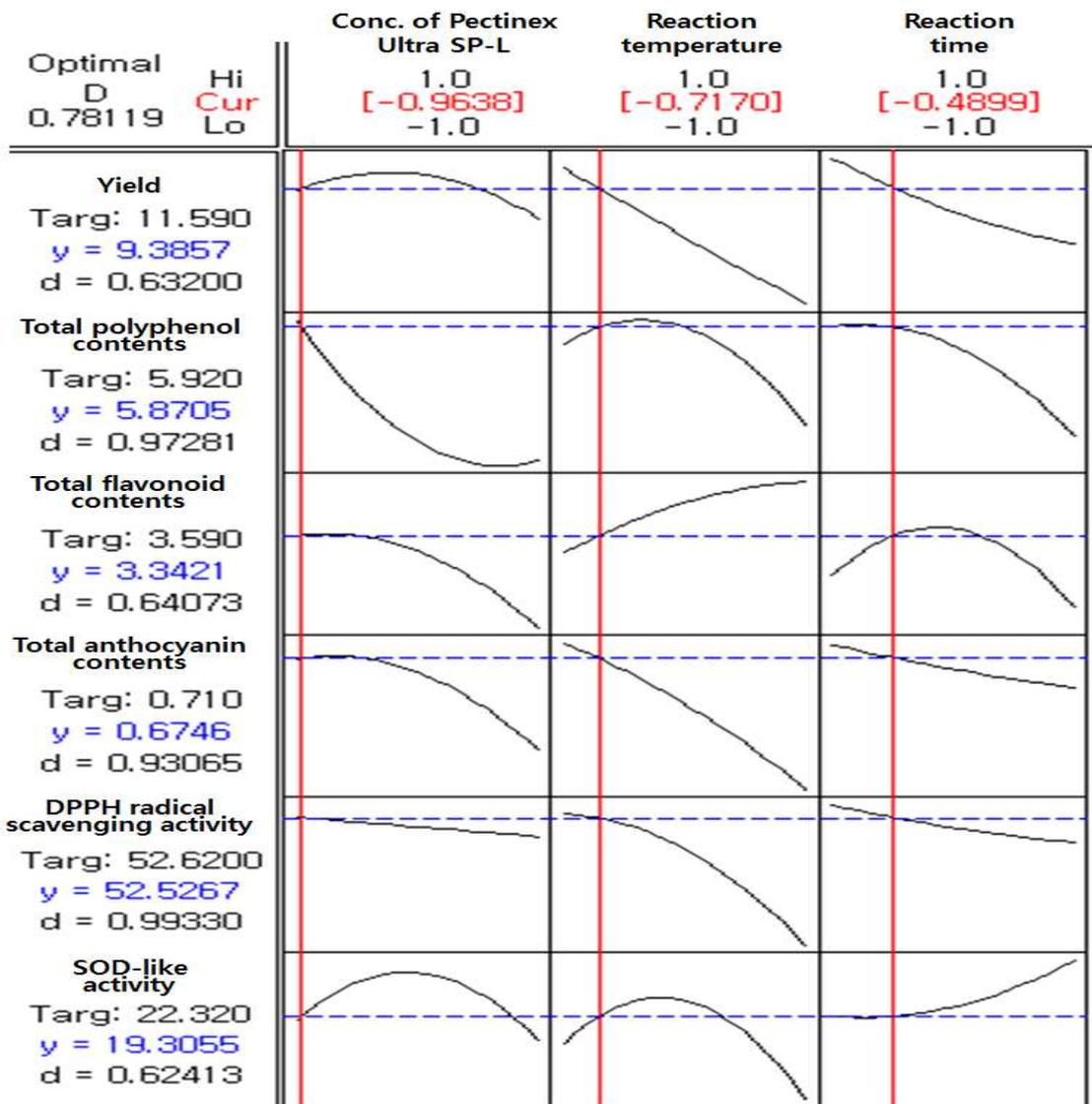


Fig. 41. Response optimization for multi-response surface of mulberry extracts by Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment.

다. Pectinex Ultra SP-L을 이용한 자영의 최적 효소 처리 공정

(1) 수율 및 항산화활성

여섯 가지 요인으로서 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 자영 추출물의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능을 분석한 결과는 **Table 45**와 같았다.

자영을 Pectinex Ultra SP-L 처리 하였을 때의 수율은 0.26-2.67% 범위로 나타났으며, 효소 농도 1.47 mL/100 L, 반응온도 20.03°C 및 반응시간 7.63 hr의 조건에서 2.67%로 최적값을 보였다.

Total polyphenol 함량의 경우 무처리 시에는 3.74 mg/g이었는데, 본 실험에서 효소처리의 흥미영역 구간 실험점에서의 범위는 2.37-4.08 mg/g로 나타났다. 효소농도 1.50 mL/100 L, 반응온도 60°C, 반응시간 2 hr일 때 4.05 mg/g으로 최적값을 보였으며, 이는 무처리 시의 108% 수준이었다.

Total flavonoid 함량의 경우 무처리 시에 2.26 mg/ml이었고, 효소처리의 흥미영역 구간 실험점에서의 범위는 2.44-9.59 mg/ml로 나타났다. 효소농도 0.73 mL/100 L, 반응온도 20°C, 반응시간 8 hr일 때 9.59 mg/ml로 최적값을 보였으며, 이는 무처리 시의 424% 수준이었다.

Total Anthocyanin 함량의 경우 무처리 시에는 0.06 mg/100 g이었으나 본 실험의 효소처리의 흥미영역 구간 실험 점에서 Total Anthocyanin 함량의 범위는 0.08-0.19 mg/100 g으로 나타났다. 효소농도 0.61 mL/100 L, 반응온도 20.00°C 및 반응시간 2 hr의 조건에서 0.18 mg/100 g으로 최적값을 보였으며 무처리 시의 Total Anthocyanin 함량의 300% 수준이었다.

DPPH radical 소거능은 무처리 시에는 50.55% 였으나 효소처리 시 24.67-36.97%로 나타났다. 효소농도 1.34 mL/100 L, 반응온도 56.02°C 및 반응시간 2.91 hr의 조건에서 36.97%로 최적값을 보였으며 무처리 시의 73% 수준이었다.

SOD-like 활성능의 경우 무처리 시 0.66%였으나, 효소처리 시 6.93-12.47%로 나타났다. 효소농도 0.56 mL/100 L, 반응온도 56.56°C 및 반응시간 8 hr의 조건에서 12.47%로 최적값이 나타났으며 무처리 시의 1889% 수준이었다.

Table 45. Central composite design for Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment from purple-fleshed potato extracts and its dependent variables.

Coded levels of variable			Responses						
X ₁	X ₂	X ₃	Yield (%)	Total polyphenol contents (mg/g)	Total flavonoid contents (mg/ml)	Total Anthocyanin contents (mg/100 g)	DPPH radical scavenging activity (%)	SOD-like activity (%)	
0	-1	1	1.71	3.50±0.23 ^b	9.59±9.85 ^a	0.15±0.028 ^c	31.06±4.74 ^{bc}	7.93±0.53 ^{ij}	
0	1	-1	2.10	3.41±0.01 ^{bc}	2.66±0.02 ^b	0.14±0.007 ^{de}	36.70±4.88 ^a	8.69±0.53 ^{fgh}	
0	0	0	2.37	3.12±0.01 ^{ef}	2.65±0.04 ^b	0.15±0.010 ^{cd}	28.44±2.46 ^{cde}	9.57±0.36 ^{cde}	
0	-1	-1	1.47	3.14±0.00 ^{ef}	2.82±0.07 ^b	0.16±0.009 ^b	30.43±4.92 ^{cd}	8.56±0.71 ^{ghi}	
-1	0	1	1.53	3.24±0.02 ^{de}	7.95±7.45 ^a	0.10±0.006 ⁱ	28.67±8.13 ^{cde}	10.20±0.18 ^{bc}	
-1	-1	0	2.10	3.49±0.02 ^b	3.08±0.10 ^b	0.19±0.006 ^a	28.31±1.93 ^{cde}	7.93±0.18 ^{ij}	
-1	0	-1	2.04	4.08±0.06 ^a	3.16±0.14 ^b	0.13±0.005 ^{ef}	28.93±5.29 ^{cde}	8.19±0.53 ^{hij}	
0	0	0	1.81	3.09±0.20 ^f	2.80±0.20 ^b	0.11±0.001 ^{gh}	26.56±3.00 ^{cde}	10.71±0.18 ^b	
1	1	0	0.26	4.07±0.18 ^a	3.17±0.15 ^b	0.08±0.001 ^j	36.71±2.40 ^a	6.93±0.53 ^k	
0	0	0	2.21	3.06±0.05 ^f	2.82±0.10 ^b	0.13±0.008 ^{fg}	24.93±2.13 ^e	7.56±0.36 ^{ik}	
1	0	-1	1.92	3.16±0.06 ^{ef}	2.86±0.07 ^b	0.10±0.005 ^{hi}	36.97±1.15 ^a	9.32±0.71 ^{def}	
1	0	1	2.67	3.34±0.18 ^{cd}	2.75±0.05 ^b	0.08±0.000 ^j	35.59±0.61 ^{ab}	9.07±0.71 ^{efg}	
1	-1	0	2.33	3.07±0.12 ^f	2.81±0.16 ^b	0.10±0.007 ^{hi}	31.85±4.48 ^{abc}	9.95±0.89 ^{cd}	
0	1	1	1.45	2.37±0.01 ^h	2.44±0.01 ^b	0.12±0.004 ^{fg}	24.67±4.96 ^e	10.20±0.89 ^{bc}	
-1	1	0	1.70	2.69±0.01 ^g	2.65±0.21 ^b	0.15±0.004 ^c	25.43±1.06 ^{de}	12.47±0.18 ^a	

X₁: Concentration of Pectinex Ultra SP-L (mL/100 L), X₂: Reaction temperature (°C), X₃: Reaction time (hr)

(2) 이차다항회귀곡선식

홍미구역 안에서 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 자영 추출물의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능에 미치는 정도를 분산 분석한 결과 **Table 46**과 같다.

수율에 영향을 미치는 요인으로 반응온도가 가장 컸으며, 효소농도, 반응시간 순으로 나타났다. 반응시간을 제외한 두 가지 요인이 5% 내에서 유의성차이를 나타내었다. Total polyphenol 함량은 효소농도의 영향이 가장 컸으며, 반응온도, 반응시간 순으로 나타났고 세 요인에 대해 모두 5% 내에서 유의성차이를 나타내었다. Total flavonoid 함량에서는 반응시간의 영향이 크고 반응온도, 효소농도 순으로 나타났으며 효소농도를 제외한 두 가지 요인이 5% 내에서 유의성차이를 보였다. Total Anthocyanin 함량에 영향을 미치는 요인으로 효소농도가 가장 컸으며 반응온도, 반응시간 순으로 나타났고 세 가지 요인 모두 5% 내에서 유의성차이를 나타내었다. DPPH radical 소거능에서는 효소농도가 가장 컸으며 반응시간, 반응온도 순이었고, 그 중 반응온도만 5% 내에서 유의성 차이가 없었다. SOD-like 활성능은 반응온도, 효소농도, 반응시간 순으로 나타났고, 반응시간을 제외한 두 가지 요인에 대해 5% 내에서 유의성차이를 보였다.

처리 요인의 수준에 대하여 종속변수인 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능을 예측하기 위한 이차다항회귀곡선식의 회귀계수를 계산한 결과는 **Table 47**과 같다. 또한, 종속변수에 대한 이차다항회귀곡선식의 일차다항회귀(linear), 이차다항회귀(quadratic) 및 교차회귀(cross product)의 기여도를 검정하였다.(**Table 48**) 수율의 기여도는 교차회귀, 이차다항회귀 및 일차다항회귀 순으로 나타났으며, Total Polyphenol 함량의 기여도는 교차회귀, 이차다항회귀 및 일차다항회귀 순으로 나타났다. Total flavonoid 함량의 기여도는 일차다항회귀, 교차회귀 및 이차다항회귀 순으로, Total Anthocyanin 함량의 기여도는 일차다항회귀, 이차다항회귀 및 교차회귀 순으로 나타났다. DPPH radical 소거능의 경우 일차다항회귀, 이차다항회귀 및 교차회귀 순으로 기여도가 나타났으며, SOD-like 활성능의 기여도는 교차회귀, 일차다항회귀 및 이차다항회귀 순으로 나타났다. 이차다항회귀곡선식 적합성 검정에서의 total regression은 모두 5% 이내에서 유의성 차이를 보였다.

Table 46. Analysis of variance for the effects of three variables on yield, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, Total Anthocyanin contents and antioxidative activities of Pectinex Ultra SP-L enzyme treatments from purple-fleshed potato extracts.

	Factors	Yield	Total polyphenol contents	Total flavonoid contents	Total Anthocyanin contents	DPPH radical scavenging activity	SOD-like activity
X ₁	F value	3.05	10.95	1.35	20.44	5.63	9.44
	Prob>F	0.0410	<.0001	0.2702	<.0001	0.0033	0.0002
X ₂	F value	5.89	10.78	2.72	9.73	2.14	9.51
	Prob>F	0.0027	<.0001	0.0450	<.0001	0.1133	0.0002
X ₃	F value	1.62	7.78	5.86	3.57	3.43	1.97
	Prob>F	0.2086	0.0006	0.0010	0.0152	0.0274	0.1387

X₁: Concentration of Pectinex Ultra SP-L (mL/100 L), X₂: Reaction temperature (°C), X₃: Reaction time (hr)

Table 47. Regression coefficients of second degree polynomials for yield, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, Total Anthocyanin contents and antioxidative activities of Pectinex Ultra SP-L enzyme treatments from purple-fleshed potato extracts.

Parameters	Estimate					
	Yield	Total polyphenol contents	Total flavonoid contents	Total Anthocyanin contents	DPPH radical scavenging activity	SOD-like activity
Intercept	-0.761	6.134	-0.865	0.232	41.848	0.366
X ₁ ¹⁾	1.273	-4.961	2.080	0.086	-22.400	7.015
X ₂ ²⁾	0.136	-0.009	0.043	-0.005	-0.130	0.199
X ₃ ³⁾	-0.066	-0.067	0.854	0.002	-1.604	0.441
X ₁ *X ₁	-0.350	1.176	-0.052	-0.080	11.515	0.777
X ₂ *X ₁	-0.042	0.045	0.020	0.000	0.194	-0.189
X ₂ *X ₂	-0.001	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000
X ₃ *X ₁	0.210	0.168	-0.816	0.002	-0.186	-0.379
X ₃ *X ₂	-0.004	-0.006	-0.029	0.000	-0.053	0.009
X ₃ *X ₃	0.000	0.008	0.159	-0.001	0.336	-0.031

¹⁾X₁: Concentration of Pectinex Ultra SP-L (mL/100 L), ²⁾X₂: Reaction temperature (°C), ³⁾X₃: Reaction time (hr)

Table 48. Determination coefficients and probability of second degree polynomials for yield, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, Total Anthocyanin contents and antioxidative activities of Pectinex Ultra SP-L enzyme treatments from purple-fleshed potato extracts.

	Regressions	Linear	Quadratic	Cross product	Total regress
Yield	R ²	0.13	0.17	0.29	0.58
	F value	2.02	2.69	4.66	3.12
	Prob>F	0.1440	0.0737	0.0126	0.0163
Total polyphenol contents	R ²	0.10	0.12	0.55	0.78
	F value	3.00	3.70	16.34	7.68
	Prob>F	0.0546	0.0289	<.0001	<.0001
Total flavonoid contents	R ²	0.23	0.07	0.16	0.46
	F value	4.89	1.45	3.45	3.26
	Prob>F	0.0061	0.2460	0.0268	0.0056
Total Anthocyanin contents	R ²	0.55	0.24	0.01	0.80
	F value	31.31	13.97	0.37	15.22
	Prob>F	<.0001	<.0001	0.7759	<.0001
DPPH radical scavenging activity	R ²	0.34	0.16	0.14	0.64
	F value	6.35	2.93	2.65	3.98
	Prob>F	0.0034	0.0585	0.0767	0.0049
SOD-like activity	R ²	0.14	0.02	0.54	0.70
	F value	3.16	0.39	12.18	5.24
	Prob>F	0.0474	0.7611	<.0001	0.001

(3) 효소처리공정 최적화

효소농도, 반응온도와 반응시간이 자영 추출물의 수율에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 Fig. 42와 같다. 효소처리공정에서 반응시간은 반응온도(Fig. 42-A, B, C)나 효소농도(Fig. 42-D, E, F)보다 영향이 적고, 반응온도는 효소농도보다 영향이 크게 나타났다(Fig. 42-G, H, I). 효소처리 흥미영역에서의 반응평균(response mean) 값은 1.84%이었다. 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 자영의 수율을 반응표면분석한 결과 일반적으로 효소농도가 높고, 반응온도가 낮으며, 반응시간이 길수록 수율이 증가하는 경향을 나타내었으며 효소농도 1.47 mL/100 L, 반응온도 20.03°C 및 반응시간 7.63 hr 일 때가 최적 효소처리조건으로 2.67%로 예측되었다.

Total polyphenol 함량에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 Fig. 43과 같다. 효소처리공정에서 반응시간과 반응온도(Fig. 43-A, B, C), 반응시간과 효소농도(Fig. 43-D, E, F) 및 반응온도와 효소농도(Fig. 43-G, H, I) 사이의 영향력은 비슷하게 나타났다. 효소처리 흥미영역에서의 반응평균 값은 3.26 mg/g이었다. 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 자영의 Total Polyphenol 함량을 반응표면분석한 결과 일반적으로 효소농도와 반응온도가 높고, 반응시간이 짧을수록 증가하는 경향을 보였으며 효소농도 1.50 mL/100 L, 반응온도 60°C 및 반응시간 2 hr 일 때가 최적 효소처리 조건으로 그 때의 Total Polyphenol 함량은 4.05 mg/g으로 예측되었다.

Total flavonoid 함량에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 Fig. 44와 같다. 효소처리공정에서 반응시간은 반응온도(Fig. 44-A, B, C)와 효소농도(Fig. 44-D, E, F)보다 영향이 크고, 반응온도는 효소농도와 비슷한 영향력을 보였다(Fig. 44-G, H, I). 효소처리 흥미영역에서의 반응평균 값은 3.61 mg/ml이었다. Total flavonoid 함량은 일반적으로 반응온도가 낮고 반응시간이 길 때 증가하는 경향을 나타내었으며 효소농도 0.73 mL/100 L, 반응온도 20°C, 반응시간 8 hr일 때가 최적 효소처리 조건으로 9.59 mg/ml로 예측되었다.

효소농도, 반응온도와 반응시간이 자영 추출물의 Total Anthocyanin 함량에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 Fig. 45와 같다. 효소처리공정에서 반응시간과 반응온도(Fig. 45-A, B, C), 반응시간과 효소농도(Fig. 45-D, E, F) 및 반응온도와 효소농도(Fig. 45-G, H, I) 사이의 영향력은 비슷하게 나타났다. 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 자영의 Total Anthocyanin 함량을 반응 표면 분석한 결과 일반적으로 반응온도가 낮고, 반응시간이 짧을수록 Total Anthocyanin 함량이 증가하는 경향을 나타내었으며 효소농도 0.61 mL/100 L, 반응온도 20°C 및 반응시간 2 hr 일 때가 최적 효소처리조건으로 0.18 mg/100 g으로 예측되었다.

DPPH radical 소거능에 미치는 영향을 분석한 결과는 Fig. 46과 같다. 효소처리공정에서 반응시간은 반응온도보다 영향이 크지만(Fig. 46-A, B, C) 효소농도와는 비슷한 영향력을 보였고(Fig. 46-D, E, F), 효소농도는 반응온도보다 더 큰 영향을 나타냈다(Fig. 46-G, H, I). 효소처리 흥미영역에서의 반응평균 값은 30.35%이었다. 일반적으로 효소농도와 반응온도가 비교적 높을 때 DPPH radical 소거능이 증가하는 경향을 보였으며 효소농도 1.34 mL/100 L, 반응온도 56.02°C, 반응시간 2.91 hr 일 때가 최적 효소처리조건으로 DPPH radical 소거능이 36.97%로 예측되었다.

SOD-like 활성능에 미치는 영향을 분석한 결과는 Fig. 47과 같다. 효소처리공정에서 반응시

간은 반응온도(Fig. 47-A, B, C)나 효소농도(Fig. 47-D, E, F)보다 영향력이 적으며, 반응온도는 효소농도와 비슷한 영향력을 나타냈다(Fig. 47-G, H, I). 흥미영역에서의 반응평균 값은 9.15%이었다. 효소농도가 낮고, 반응온도가 높으며, 반응시간이 길수록 SOD-like 활성능은 증가하는 것으로 나타났으며 최적 효소처리조건으로 효소농도 0.56 mL/100 L, 반응온도 56.56°C 및 반응시간 8 hr 일 때 자영 추출물의 SOD-like 활성능은 12.47%로 예측되었다.

효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 자영 추출물의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능을 다중반응표면의 최적화방법으로써 만족 함수(desirability function)를 이용하여 종속변수들의 가중치를 1로 놓고 종합적으로 판단한 결과 (Fig. 48) 최적 효소처리 조건은 효소농도 1.38 mL/100 L, 반응온도 20°C 및 반응시간 8 hr의 조건이었으며 이때의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능은 각각 2.63%, 3.41 mg/g, 6.86 mg/ml, 0.12 mg/100 g, 34.83% 및 8.94%이었고 전반적인 만족도 (overall desirability)는 0.60이었다.

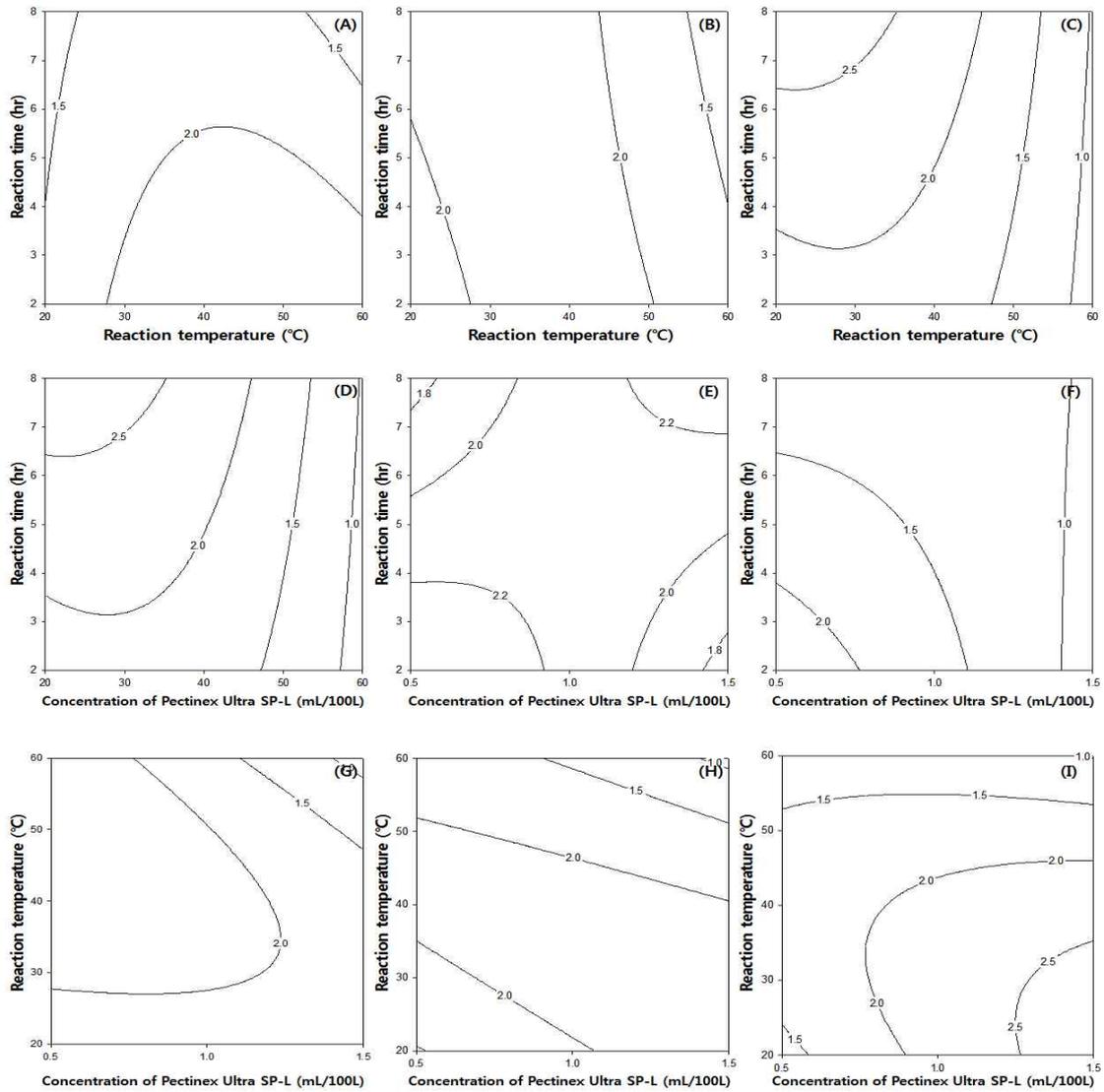


Fig. 42. Contour plot for yield (%) of purple-fleshed potato Anthocyanin by Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment.

(Concentration of Pectinex Ultra SP-L, A: 0.5 mL/100 L, B: 1.0 mL/100 L, C: 1.5 mL/100 L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 2 hr, H: 5 hr, I: 8 hr)

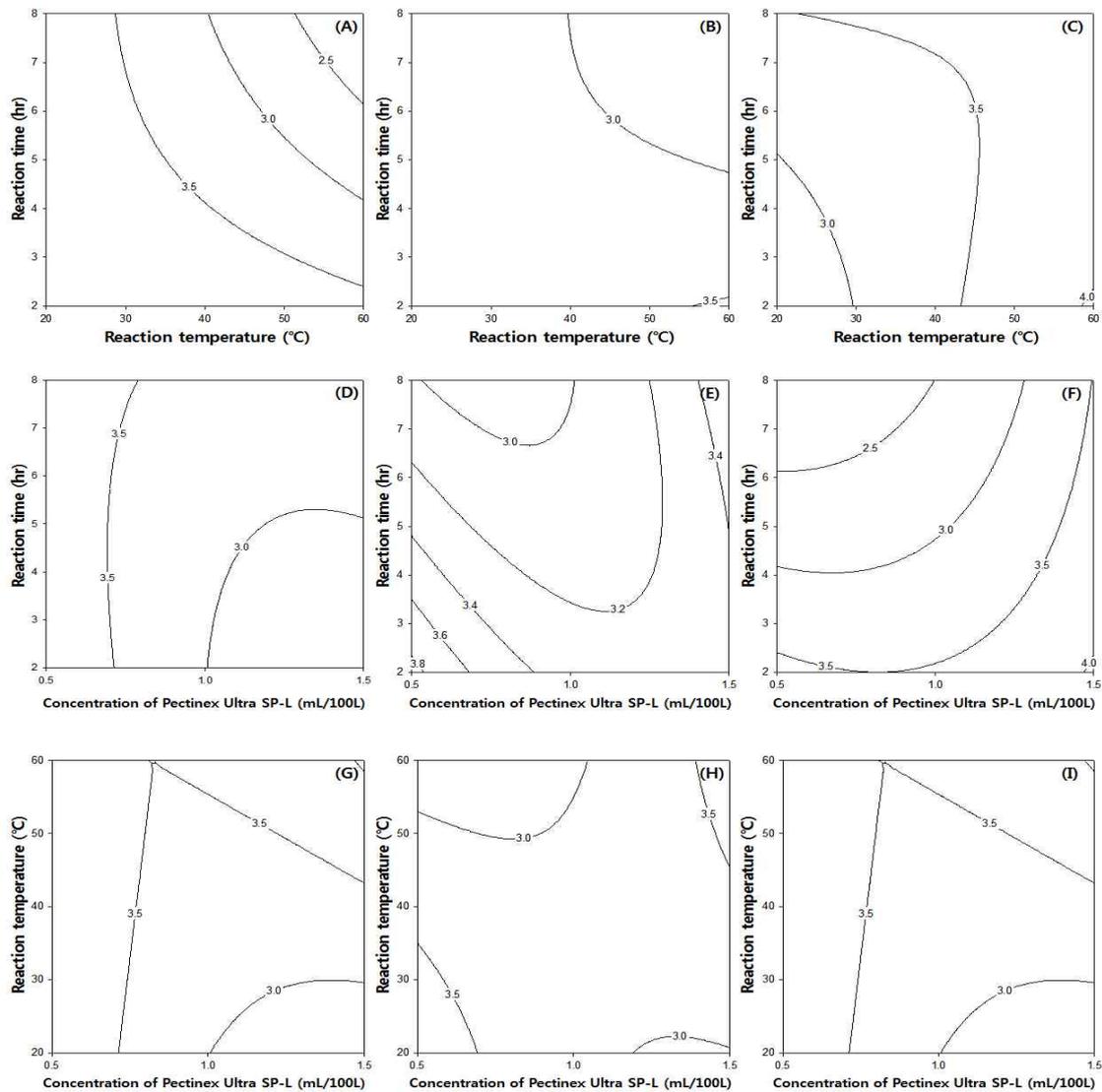


Fig. 43. Contour plot for Total Polyphenol contents (mg/g) of purple-fleshed potato Anthocyanin by Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment.

(Concentration of Pectinex Ultra SP-L, A: 0.5 mL/100 L, B: 1.0 mL/100 L, C: 1.5 mL/100 L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 2 hr, H: 5 hr, I: 8 hr)

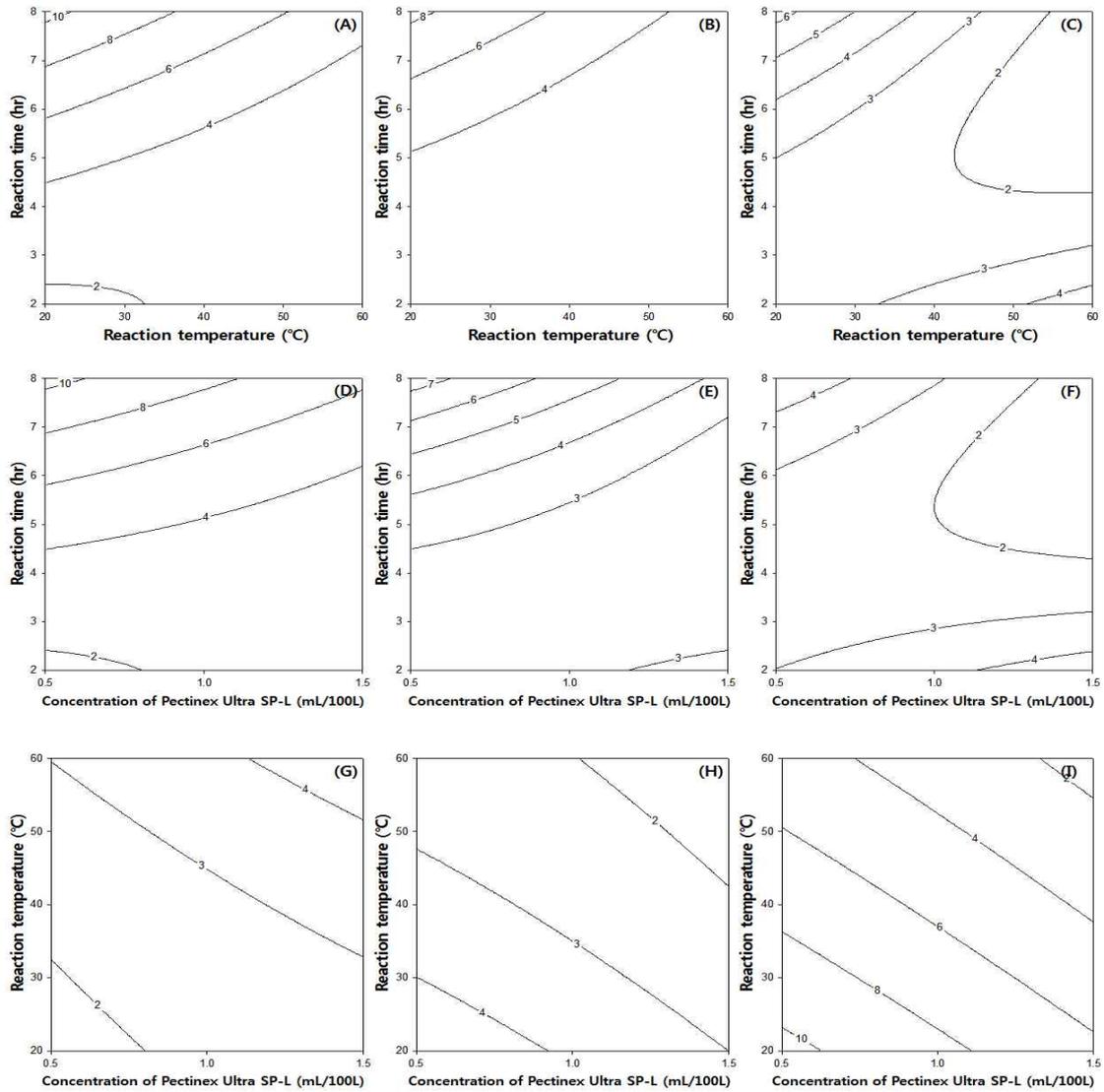


Fig. 44. Contour plot for Total Flavonoid contents (mg/ml) of purple-fleshed potato Anthocyanin by Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment.

(Concentration of Pectinex Ultra SP-L, A: 0.5 mL/100 L, B: 1.0 mL/100 L, C: 1.5 mL/100 L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 2 hr, H: 5 hr, I: 8 hr)

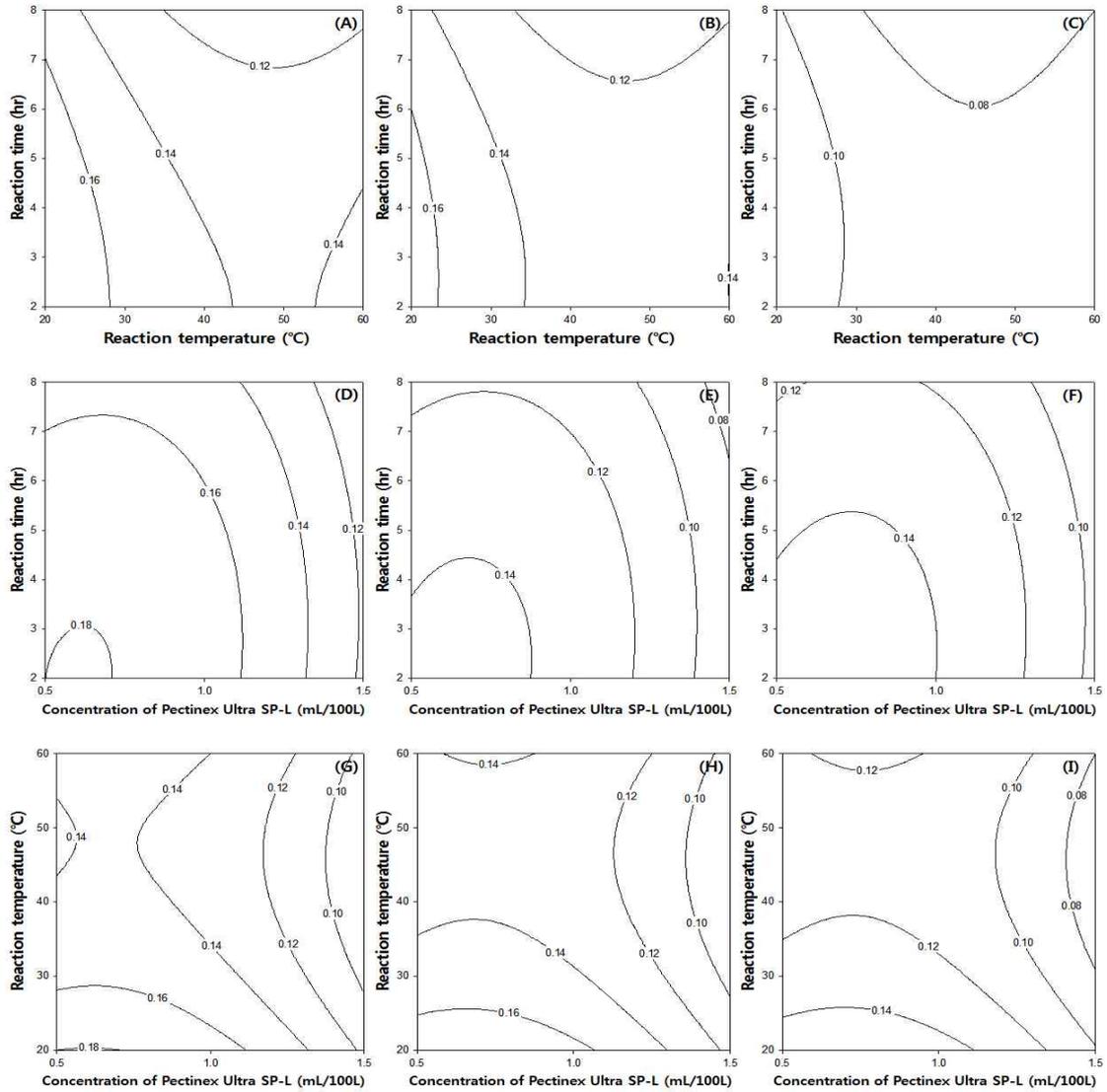


Fig. 45. Contour plot for Total Anthocyanin contents (mg/100 g) of purple-fleshed potato Anthocyanin by Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment. (Concentration of Pectinex Ultra SP-L, A: 0.5 mL/100 L, B: 1.0 mL/100 L, C: 1.5 mL/100 L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 2 hr, H: 5 hr, I: 8 hr)

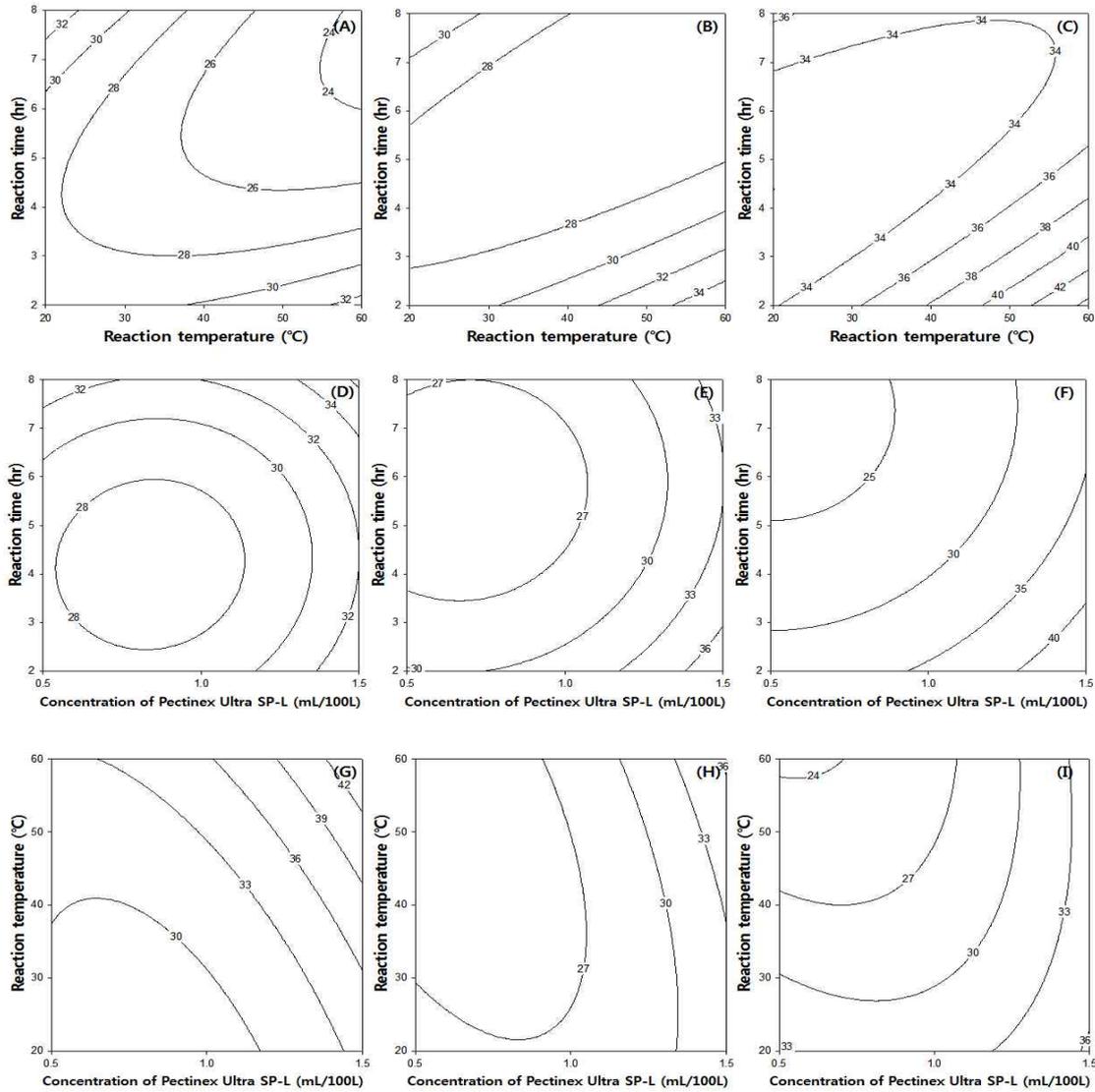


Fig. 46. Contour plot for DPPH radical scavenging activity (%) of purple-fleshed potato Anthocyanin by Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment.

(Concentration of Pectinex Ultra SP-L, A: 0.5 mL/100 L, B: 1.0 mL/100 L, C: 1.5 mL/100 L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 2 hr, H: 5 hr, I: 8 hr)

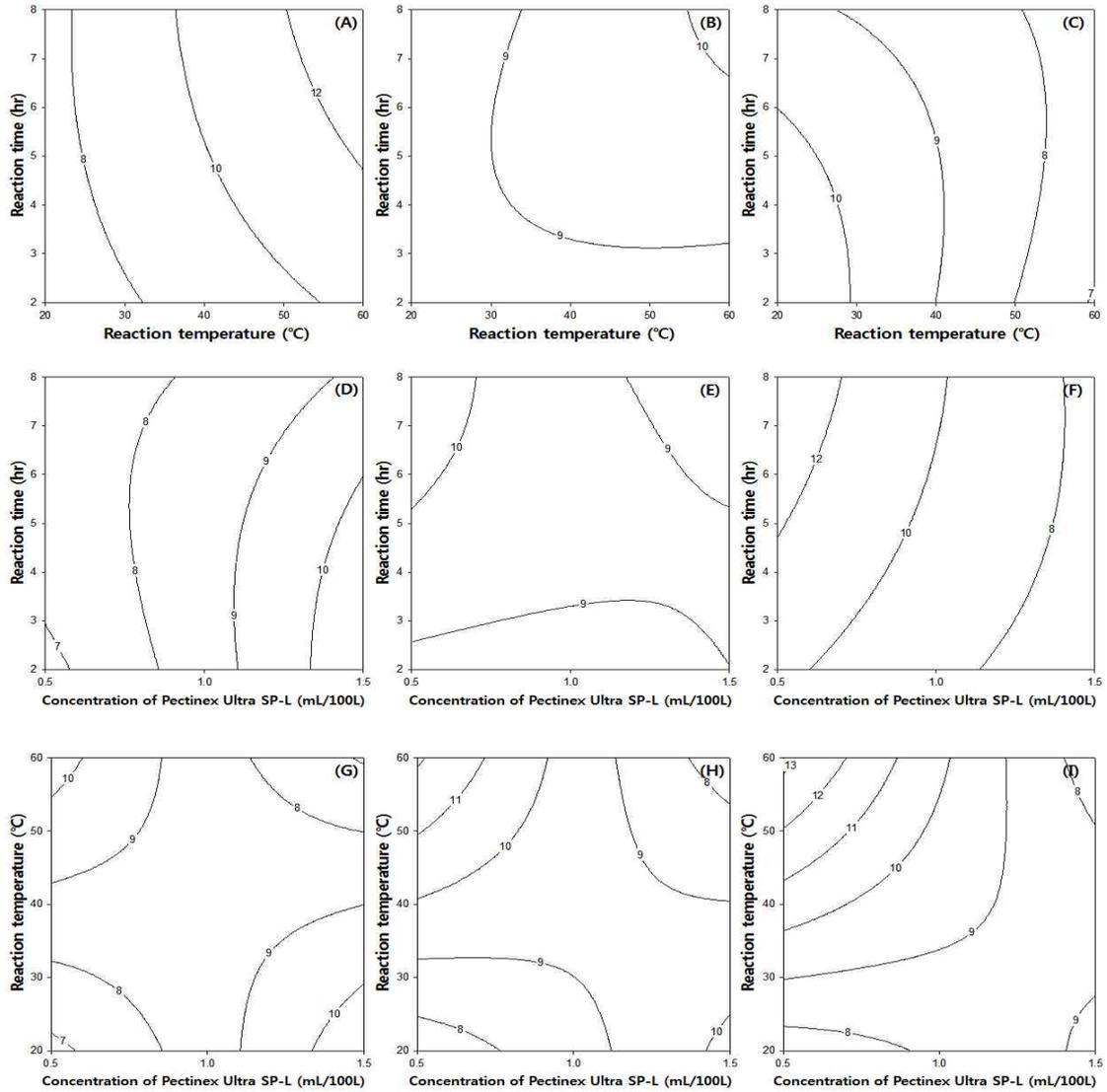


Fig. 47. Contour plot for SOD-like activity (%) of purple-fleshed potato Anthocyanin by Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment.

(Concentration of Pectinex Ultra SP-L, A: 0.5 mL/100 L, B: 1.0 mL/100 L, C: 1.5 mL/100 L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 2 hr, H: 5 hr, I: 8 hr)

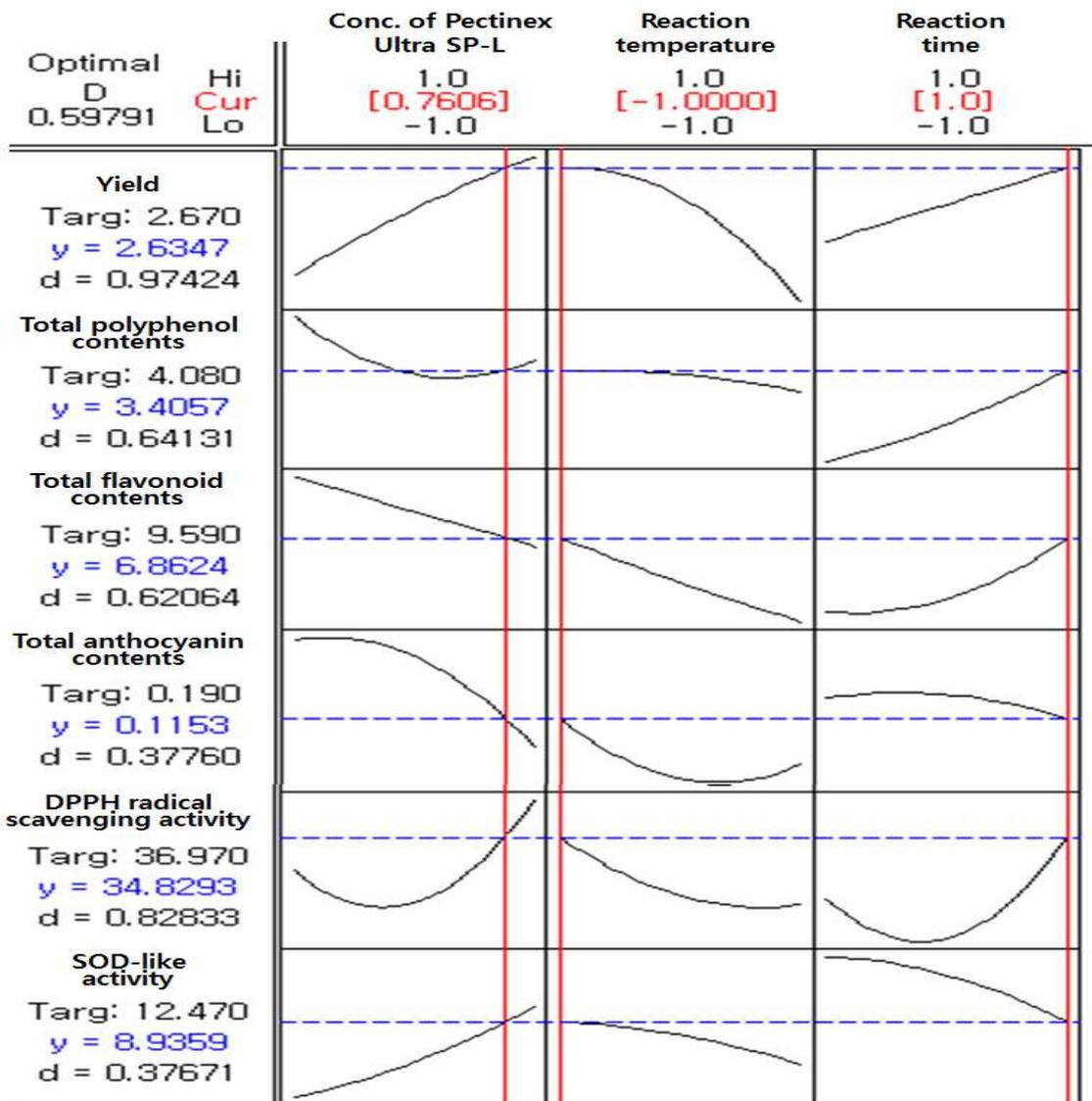


Fig. 48. Response optimization for multi-response surface of purple-fleshed potato extracts by Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment.

라. Pectinex Ultra SP-L을 이용한 홍영의 최적 효소 처리 공정

(1) 수율 및 항산화활성

여섯 가지 요인으로서 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 홍영 추출물의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능을 분석한 결과는 **Table 49**와 같았다.

홍영을 Pectinex Ultra SP-L 처리 하였을 때의 수율은 1.98-3.17% 범위로 나타났으며, 효소 농도 1.50 mL/100 L, 반응온도 60°C 및 반응시간 5.69 hr의 조건에서 3.09%로 최적값을 보였다.

Total polyphenol 함량의 경우 무처리 시에는 3.83 mg/g이었는데, 본 실험에서 효소처리의 홍미영역 구간 실험점에서의 범위는 3.15-4.33 mg/g로 나타났다. 효소농도 1.50 mL/100 L, 반응온도 60°C, 반응시간 8 hr일 때 4.33 mg/g으로 최적값을 보였으며, 이는 무처리 시의 113% 수준이었다.

Total flavonoid 함량의 경우 무처리 시에 2.47 mg/ml이었고, 효소처리의 홍미영역 구간 실험점에서의 범위는 2.63-3.22 mg/ml로 나타났다. 효소농도 0.50 mL/100 L, 반응온도 20°C, 반응시간 2 hr일 때 3.11 mg/ml로 최적값을 보였으며, 이는 무처리 시의 126% 수준이었다.

Total Anthocyanin 함량의 경우 무처리 시에는 0.06 mg/100 g 이었으나 본 실험의 효소처리의 홍미영역 구간 실험 점에서 Total Anthocyanin 함량의 범위는 0.15-0.25 mg/100g로 나타났다. 효소농도 0.50 mL/100 L, 반응온도 37.65°C 및 반응시간 8 hr의 조건에서 0.25 mg/100 g 으로 최적값을 보였으며 무처리 시의 Total Anthocyanin 함량의 417% 수준이었다.

DPPH radical 소거능은 무처리 시에는 57.90% 였으나 효소처리 시 28.06-51.49%로 나타났다. 효소농도 1.50 mL/100 L, 반응온도 60°C 및 반응시간 8 hr의 조건에서 48.44%로 최적값을 보였으며 무처리 시의 84% 수준이었다.

SOD-like 활성능의 경우 무처리 시 0.88%였으나, 효소처리 시 5.67-15.99%로 나타났다. 효소농도 0.50 mL/100 L, 반응온도 21.80°C 및 반응시간 2.25 hr의 조건에서 15.99%로 최적값이 나타났으며 무처리 시의 1817% 수준이었다.

Table 49. Central composite design for Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment from red-fleshed potato extracts and its dependent variables.

Coded levels of variable			Responses					
X ₁	X ₂	X ₃	Yield (%)	Total polyphenol contents (mg/g)	Total flavonoid contents (mg/ml)	Total Anthocyanin contents (mg/100 g)	DPPH radical scavenging activity (%)	SOD-like activity (%)
0	-1	1	2.18	3.48±0.06 ^d	2.88±0.09 ^{cde}	0.19±0.004 ^{cd}	44.61±0.75 ^b	13.48±0.53 ^{ef}
0	1	-1	2.55	3.52±0.21 ^d	2.84±0.12 ^{def}	0.21±0.013 ^{bc}	42.47±2.71 ^{bc}	13.10±0.00 ^f
0	0	0	2.74	3.34±0.07 ^{ef}	2.63±0.05 ^h	0.15±0.018 ^f	40.47±2.37 ^{bcd}	14.74±0.18 ^{bc}
0	-1	-1	2.70	3.48±0.12 ^d	3.00±0.16 ^{bc}	0.18±0.039 ^{de}	38.58±4.33 ^{cde}	14.99±0.18 ^b
-1	0	1	2.39	3.46±0.01 ^{de}	2.76±0.06 ^{efgh}	0.25±0.005 ^a	38.70±4.87 ^{cde}	12.47±0.18 ^g
-1	-1	0	2.64	3.87±0.10 ^c	3.00±0.07 ^{bcd}	0.17±0.016 ^{ef}	42.47±4.48 ^{bc}	13.98±0.53 ^{de}
-1	0	-1	2.06	3.31±0.01 ^f	2.88±0.06 ^{cde}	0.21±0.004 ^{bc}	40.59±3.26 ^{bcd}	12.47±0.18 ^g
0	0	0	2.75	3.57±0.09 ^d	3.22±0.19 ^a	0.23±0.012 ^{ab}	29.68±4.57 ^f	13.48±0.53 ^{ef}
1	1	0	3.17	3.29±0.14 ^f	2.97±0.24 ^{bcd}	0.15±0.010 ^f	38.60±0.08 ^{cde}	15.11±0.36 ^b
0	0	0	3.17	3.44±0.17 ^{de}	2.81±0.09 ^{efg}	0.23±0.007 ^{ab}	35.84±0.10 ^e	9.19±0.18 ⁱ
1	0	-1	1.98	3.15±0.02 ^g	2.71±0.09 ^{fgh}	0.23±0.030 ^{ab}	37.08±4.70 ^{de}	12.47±0.18 ^g
1	0	1	2.74	4.33±0.09 ^a	3.06±0.14 ^b	0.23±0.011 ^{ab}	37.58±3.99 ^{de}	14.36±0.36 ^{cd}
1	-1	0	2.74	3.90±0.13 ^c	2.91±0.12 ^{bcde}	0.16±0.017 ^f	40.23±0.11 ^{cd}	11.21±1.25 ^h
0	1	1	2.31	4.09±0.03 ^b	2.77±0.05 ^{efgh}	0.18±0.009 ^{de}	51.49±3.00 ^a	15.99±0.18 ^a
-1	1	0	2.56	3.28±0.03 ^f	2.67±0.06 ^{gh}	0.16±0.005 ^f	28.06±1.57 ^f	5.67±0.18 ^j

X₁: Concentration of Pectinex Ultra SP-L (mL/100 L), X₂: Reaction temperature (°C), X₃: Reaction time (hr)

(2) 이차다항회귀곡선식

홍미구역 안에서 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 홍명 추출물의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능에 미치는 정도를 분산 분석한 결과 **Table 50**과 같다.

수율에 영향을 미치는 요인으로 반응시간이 가장 컸으며, 효소농도, 반응온도 순으로 나타났고 반응시간만 5% 내에서 유의성차이를 나타내었다. Total polyphenol 함량도 반응시간이 가장 컸으며, 효소농도, 반응온도 순으로 나타났고 반응시간만 5% 내에서 유의성차이를 나타내었다. Total flavonoid 함량에서는 효소농도, 반응온도, 반응시간 순으로 나타났으며 효소농도만 5% 내에서 유의성차이를 보였다. Total Anthocyanin 함량에 영향을 미치는 요인으로 반응온도가 가장 컸으며 반응시간, 효소농도 순으로 나타났고 효소농도를 제외한 두 가지 요인에 대해 5% 내에서 유의성차이를 나타내었다. DPPH radical 소거능에서는 반응시간이 가장 컸으며 반응온도, 효소농도 순이었고, 그 중 효소농도만 5% 내에서 유의성 차이가 없었다. SOD-like 활성능은 효소농도, 반응온도, 반응시간 순으로 나타났고, 세 가지 요인에 대해 모두 5% 내에서 유의성차이를 보였다.

처리 요인의 수준에 대하여 종속변수인 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능을 예측하기 위한 이차다항회귀곡선식의 회귀계수를 계산한 결과는 **Table 51**과 같다. 또한, 종속변수에 대한 이차다항회귀곡선식의 일차다항회귀(linear), 이차다항회귀(quadratic) 및 교차회귀(cross product)의 기여도를 검정하였다. (**Table 52**) 수율의 기여도는 이차다항회귀, 일차다항회귀, 교차회귀 순으로 나타났으며, Total polyphenol 함량의 기여도는 일차다항회귀, 교차회귀 및 이차다항회귀 순으로 나타났다. Total flavonoid 함량의 기여도는 교차회귀, 일차다항회귀 및 이차다항회귀 순으로, Total Anthocyanin 함량의 기여도는 이차다항회귀, 교차회귀 및 일차다항회귀 순으로 나타났다. DPPH radical 소거능의 경우 이차다항회귀, 교차회귀 및 일차다항회귀 순으로 기여도가 나타났으며, SOD-like 활성능의 기여도는 교차회귀, 이차다항회귀 및 일차다항회귀 순으로 나타났다. 이차다항회귀곡선식 적합성 검정에서의 total regression은 Total Flavonoid 함량을 제외하고 모두 5% 이내에서 유의성 차이를 보였다.

Table 50. Analysis of variance for the effects of three variables on yield, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, Total Anthocyanin contents and antioxidative activities of Pectinex Ultra SP-L enzyme treatments from red-fleshed potato extracts.

	Factors	Yield	Total polyphenol contents	Total flavonoid contents	Total Anthocyanin contents	DPPH radical scavenging activity	SOD-like activity
X ₁	F value	2.46	2.54	3.43	0.45	1.96	10.83
	Prob>F	0.0789	0.0721	0.0182	0.7704	0.1224	<.0001
X ₂	F value	0.84	1.18	2.38	10.19	3.52	9.05
	Prob>F	0.5150	0.3504	0.0706	<.0001	0.0162	0.0002
X ₃	F value	7.54	6.17	1.88	5.86	4.16	3.60
	Prob>F	0.0007	0.0021	0.1359	0.001	0.0074	0.0229

X₁: Concentration of Pectinex Ultra SP-L (mL/100 L), X₂: Reaction temperature (°C), X₃: Reaction time (hr)

Table 51. Regression coefficients of second degree polynomials for yield, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, Total Anthocyanin contents and antioxidative activities of Pectinex Ultra SP-L enzyme treatments from red-fleshed potato extracts.

Para meters	Estimate					
	Yield	Total polyphenol contents	Total flavonoid contents	Total Anthocyanin contents	DPPH radical scavenging activity	SOD-like activity
Intercept	1.854	5.084	3.699	0.043	72.221	28.828
X ₁ ¹⁾	0.383	-0.882	-0.622	0.044	1.324	-1.952
X ₂ ²⁾	-0.020	-0.036	-0.016	0.009	-1.196	-0.468
X ₃ ³⁾	0.416	-0.280	-0.060	-0.019	-5.944	-2.784
X ₁ *X ₁	-0.503	0.113	-0.039	-0.010	-7.588	-4.852
X ₂ *X ₁	0.013	0.000	0.010	0.000	0.319	0.306
X ₂ *X ₂	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.001
X ₃ *X ₁	0.072	0.172	0.079	-0.006	0.399	0.316
X ₃ *X ₂	0.001	0.002	0.000	0.000	0.012	0.018
X ₃ *X ₃	-0.050	0.009	-0.003	0.003	0.562	0.187

¹⁾X₁: Concentration of Pectinex Ultra SP-L (mL/100 L), ²⁾X₂: Reaction temperature (°C), ³⁾X₃: Reaction time (hr)

Table 52. Determination coefficients and probability of second degree polynomials for yield, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, Total Anthocyanin contents and antioxidative activities of Pectinex Ultra SP-L enzyme treatments from red-fleshed potato extracts.

	Regressions	Linear	Quadratic	Cross product	Total regress
	R ²	0.09	0.50	0.08	0.66
Yield	F value	1.67	9.64	1.48	4.26
	Prob>F	0.2064	0.0004	0.2503	0.0033
Total polyphenol contents	R ²	0.34	0.04	0.21	0.59
	F value	5.59	0.64	3.44	3.22
	Prob>F	0.0060	0.5999	0.0363	0.0140
Total flavonoid contents	R ²	0.12	0.01	0.22	0.35
	F value	2.15	0.13	3.98	2.09
	Prob>F	0.1115	0.9413	0.0153	0.0579
Total Anthocyanin contents	R ²	0.00	0.61	0.04	0.65
	F value	0.14	20.36	1.48	7.33
	Prob>F	0.9372	<.0001	0.2366	<.0001
DPPH radical scavenging activity	R ²	0.06	0.33	0.09	0.48
	F value	1.30	7.50	2.03	3.61
	Prob>F	0.2896	0.0005	0.1274	0.0029
SOD-like activity	R ²	0.13	0.18	0.44	0.75
	F value	3.37	4.73	11.77	6.62
	Prob>F	0.0390	0.0119	0.0001	0.0002

(3) 효소처리공정 최적화

효소농도, 반응온도와 반응시간이 홍영 추출물의 수율에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 Fig. 49와 같다. 효소처리공정에서 반응시간은 반응온도보다(Fig. 49-A, B, C) 그리고 효소농도도 반응온도보다(Fig. 49-G, H, I) 영향이 크지만 반응시간과 효소농도는 비슷한 영향력을 보였다(Fig. 49-D, E, F). 효소처리 홍미영역에서의 반응평균(response mean) 값은 2.58%이었다. 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 홍영의 수율을 반응표면분석한 결과 일반적으로 효소농도와 반응온도가 높을수록 수율이 증가하는 경향을 나타내었으며 효소농도 1.50 mL/100 L, 반응온도 60°C 및 반응시간 5.69 hr 일 때가 최적 효소처리조건으로 3.09%로 예측되었다.

Total polyphenol 함량에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 Fig. 50과 같다. 효소처리공정에서 반응시간과 반응온도의 영향력은 비슷하지만(Fig. 50-A, B, C), 효소농도보다 반응시간(Fig. 50-D, E, F)과 반응온도(Fig. 50-G, H, I)의 영향력이 더 크게 나타났다. 효소처리 홍미영역에서의 반응평균 값은 3.57 mg/g이었다. 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 홍영의 Total Polyphenol 함량을 반응표면분석한 결과 효소농도와 반응온도가 높고, 반응시간이 길수록 증가하는 경향을 보였으며 효소농도 1.50 mL/100 L, 반응온도 60°C 및 반응시간 8 hr 일 때가 최적 효소처리 조건으로 그 때의 Total Polyphenol 함량은 4.33 mg/g으로 예측되었다.

Total flavonoid 함량에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 Fig. 51과 같다. 효소처리공정에서 반응시간과 반응온도(Fig. 51-A, B, C), 반응시간과 효소농도(Fig. 51-D, E, F) 및 반응온도와 효소농도(Fig. 51-G, H, I) 사이에서 모두 비슷한 영향력을 보였다. 효소처리 홍미영역에서의 반응평균 값은 2.87 mg/ml이었다. Total flavonoid 함량은 효소농도와 반응온도가 낮고 반응시간이 짧을 때 증가하는 경향을 나타내었으며 효소농도 0.50 mL/100 L, 반응온도 20°C, 반응시간 2 hr일 때가 최적 효소처리 조건으로 3.11 mg/ml로 예측되었다.

효소농도, 반응온도와 반응시간이 홍영 추출물의 Total Anthocyanin 함량에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 Fig. 52와 같다. 효소처리공정에서 반응시간은 반응온도(Fig. 52-A, B, C)와 효소농도(Fig. 52-D, E, F)보다 영향력이 크며, 반응온도는 효소농도보다 영향력이 크게 나타났다(Fig. 52-G, H, I). 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 홍영의 Total Anthocyanin 함량을 반응 표면 분석한 결과 일반적으로 효소농도가 낮고, 반응시간이 길수록 Total Anthocyanin 함량이 증가하는 경향을 나타내었으며 효소농도 0.50 mL/100 L, 반응온도 37.65°C 및 반응시간 8 hr 일 때가 최적 효소처리조건으로 0.25 mg/100 g으로 예측되었다.

DPPH radical 소거능에 미치는 영향을 분석한 결과는 Fig. 53과 같다. 효소처리공정에서 반응시간과 반응온도(Fig. 53-A, B, C), 반응시간과 효소농도(Fig. 53-D, E, F) 및 반응온도와 효소농도(Fig. 53-G, H, I)의 영향력은 비슷하게 나타났다. 효소처리 홍미영역에서의 반응평균 값은 39.10%이었다. 효소농도와 반응온도가 높고, 반응시간이 길 때 DPPH radical 소거능이 증가하는 경향을 보였으며 효소농도 1.50 mL/100 L, 반응온도 60°C, 반응시간 8 hr 일 때가 최적 효소처리조건으로 DPPH radical 소거능이 48.44%로 예측되었다.

SOD-like 활성능에 미치는 영향을 분석한 결과는 Fig. 54와 같다. 효소처리공정에서 반응시간의 영향력은 반응온도(Fig. 54-A, B, C)나 효소농도(Fig. 54-D, E, F)보다 작지만, 반응온

도와 효소농도의 영향력은 비슷하게 나타났다(**Fig. 54-G, H, I**). 흥미영역에서의 반응평균 값은 12.85%이었다. 효소농도와 반응온도가 낮으며, 반응시간이 길수록 SOD-like 활성능이 일반적으로 증가하는 것으로 나타났으며 최적 효소처리조건으로 효소농도 0.50 mL/100L, 반응온도 21.80°C 및 반응시간 2.25 hr 일 때 홍영 추출물의 SOD-like 활성능은 15.99%로 예측되었다.

효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 홍영 추출물의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능을 다중반응표면의 최적화방법으로써 만족 함수(desirability function)를 이용하여 종속변수들의 가중치를 1로 놓고 종합적으로 판단한 결과 (**Fig. 55**) 최적 효소처리 조건은 효소농도 1.50 mL/100 L, 반응온도 50.44°C 및 반응시간 6.98 hr의 조건이었으며 이때의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능은 각각 2.89%, 3.98 mg/g, 3.01 mg/ml, 0.19 mg/100g, 40.27% 및 15.43%이었고 전반적인 만족도 (overall desirability)는 0.67였다.

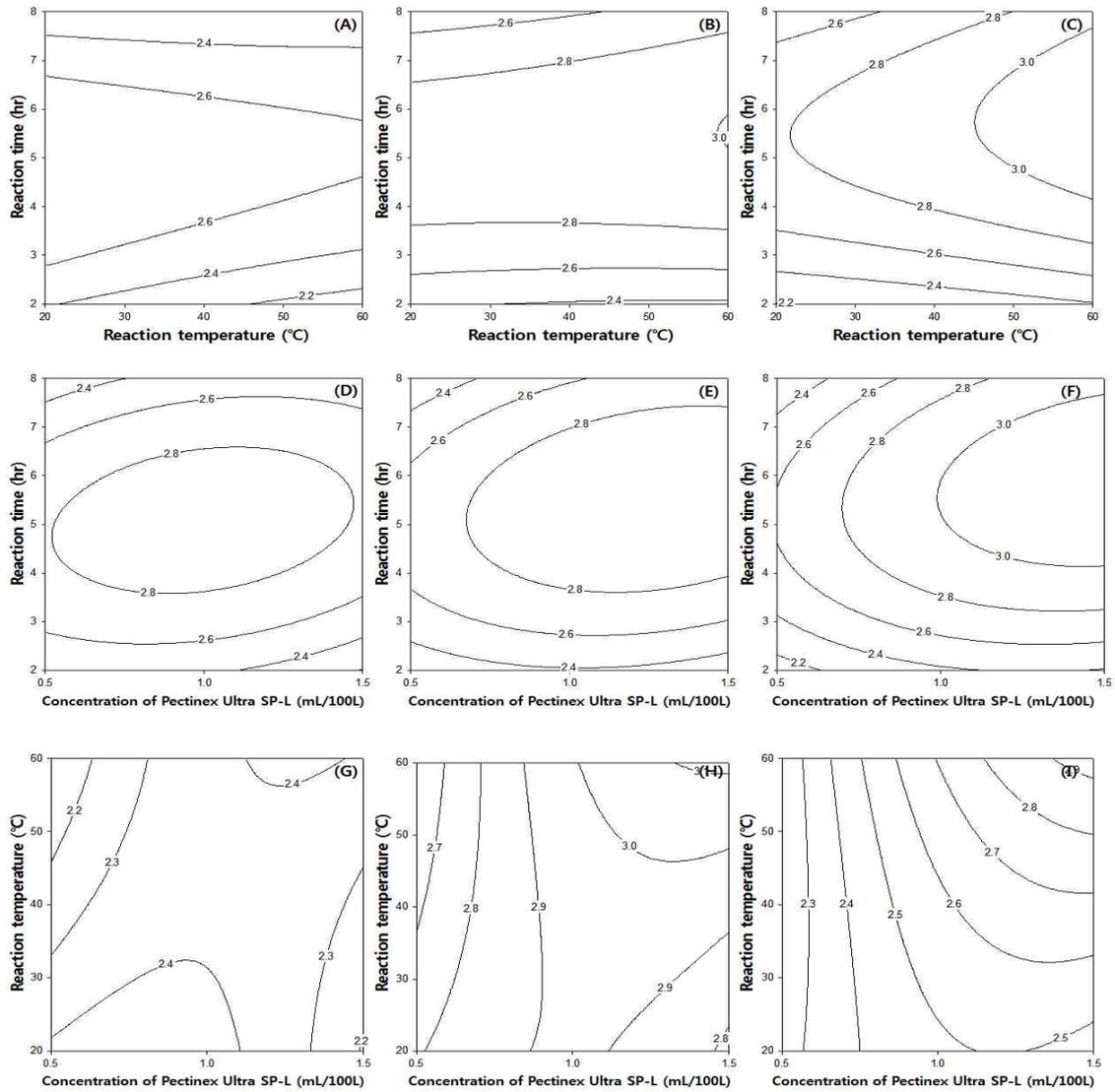


Fig. 49. Contour plot for yield (%) of red-fleshed potato Anthocyanin by Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment.

(Concentration of Pectinex Ultra SP-L, A: 0.5 mL/100 L, B: 1.0 mL/100 L, C: 1.5 mL/100 L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 2 hr, H: 5 hr, I: 8 hr)

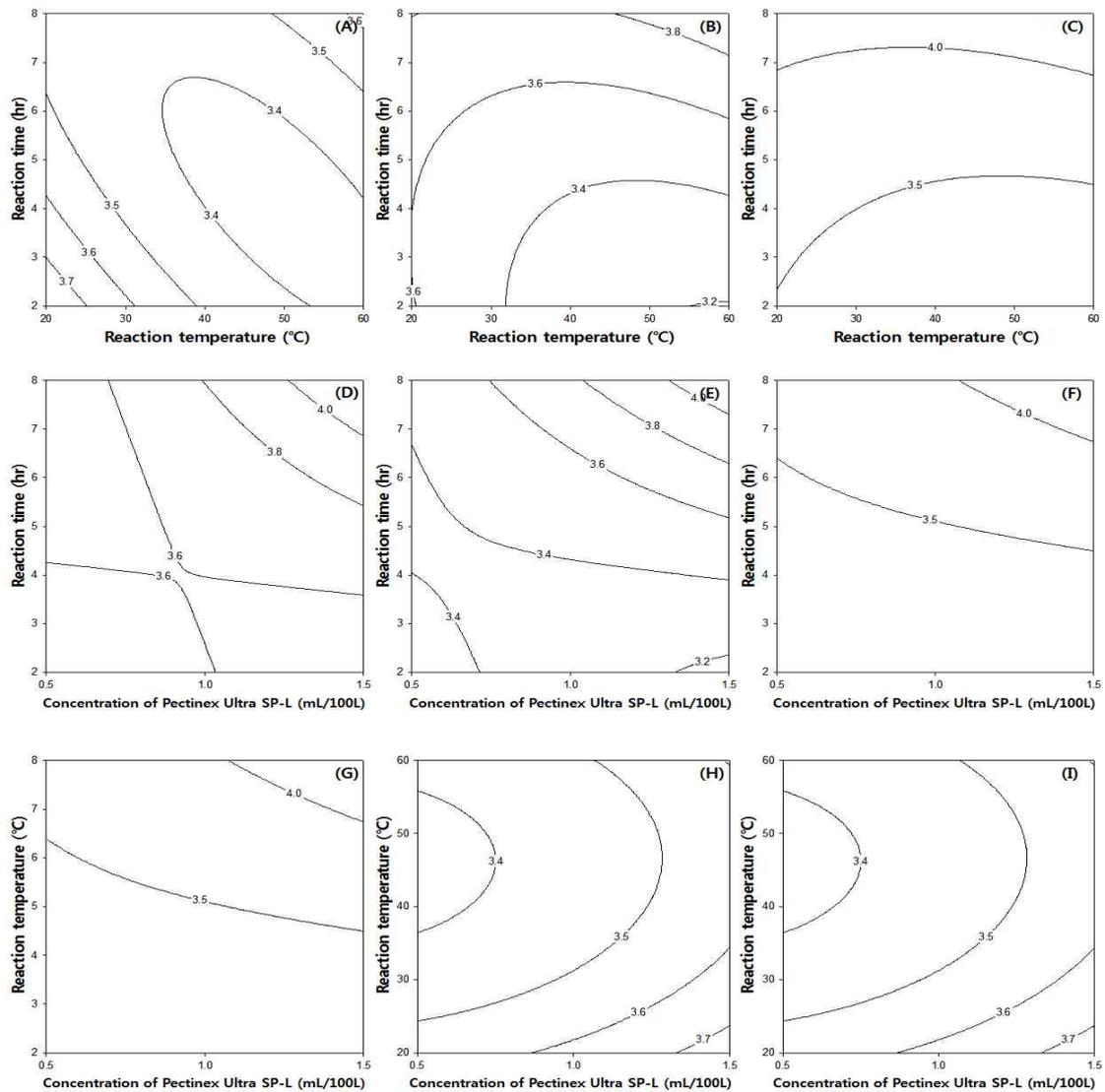


Fig. 50. Contour plot for Total Polyphenol contents (mg/g) of red-fleshed potato Anthocyanin by Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment.

(Concentration of Pectinex Ultra SP-L, A: 0.5 mL/100 L, B: 1.0 mL/100 L, C: 1.5 mL/100 L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 2 hr, H: 5 hr, I: 8 hr)

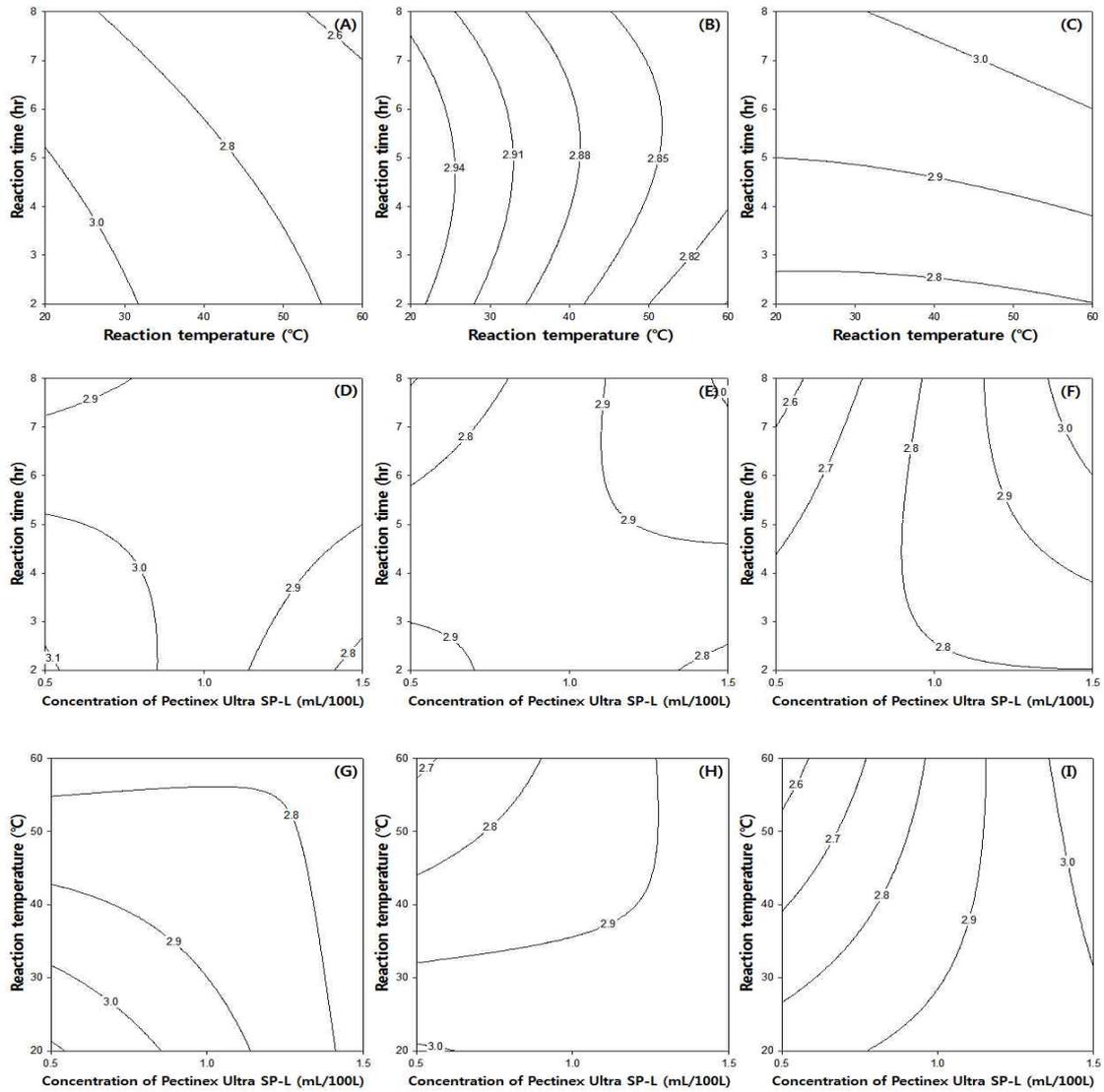


Fig. 51. Contour plot for Total Flavonoid contents (mg/ml) of red-fleshed potato Anthocyanin by Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment.

(Concentration of Pectinex Ultra SP-L, A: 0.5 mL/100 L, B: 1.0 mL/100 L, C: 1.5 mL/100 L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 2 hr, H: 5 hr, I: 8 hr)

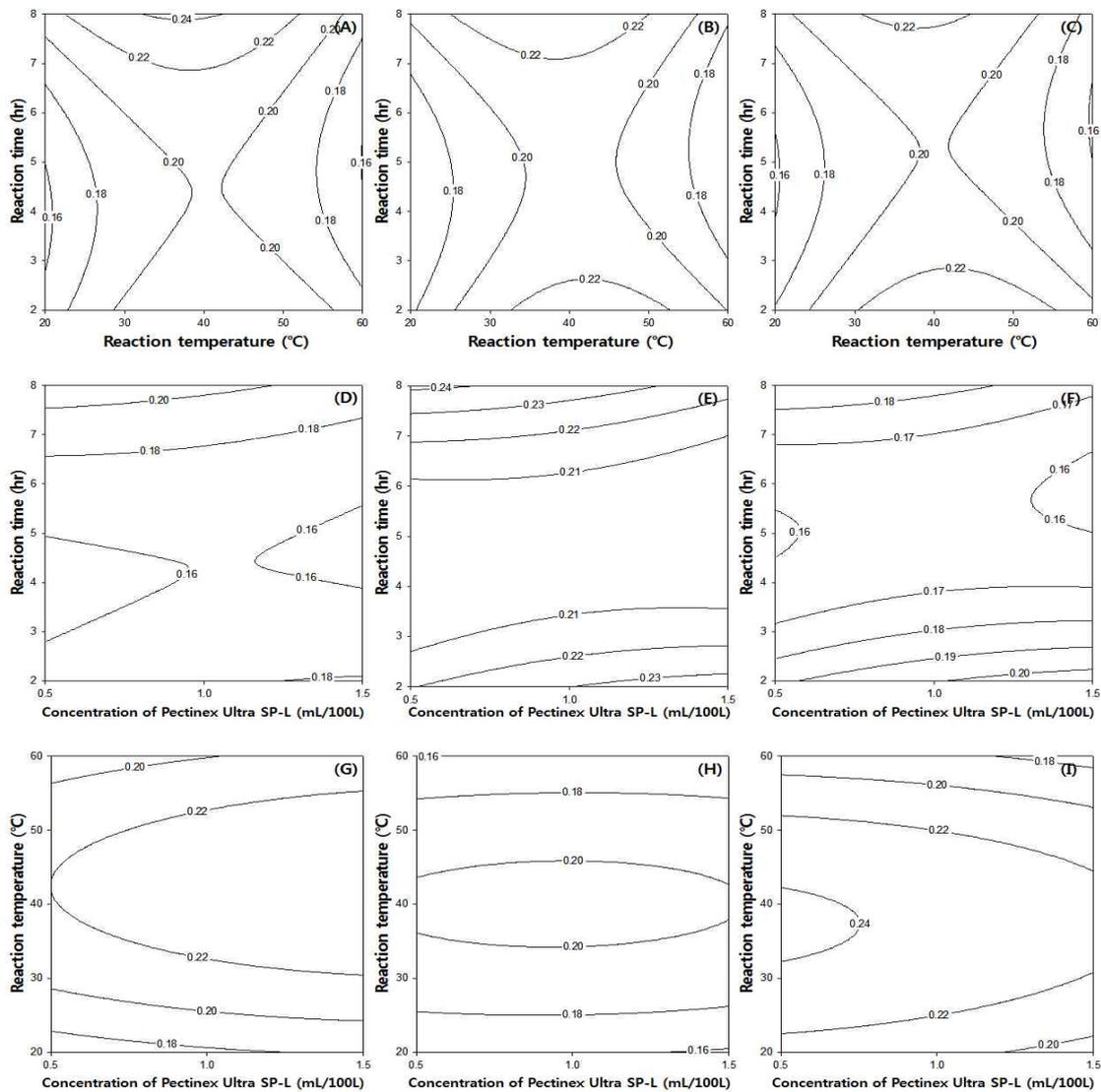


Fig. 52. Contour plot for Total Anthocyanin contents (mg/100 g) of red-fleshed potato Anthocyanin by Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment.

(Concentration of Pectinex Ultra SP-L, A: 0.5 mL/100 L, B: 1.0 mL/100 L, C: 1.5 mL/100 L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 2 hr, H: 5 hr, I: 8 hr)

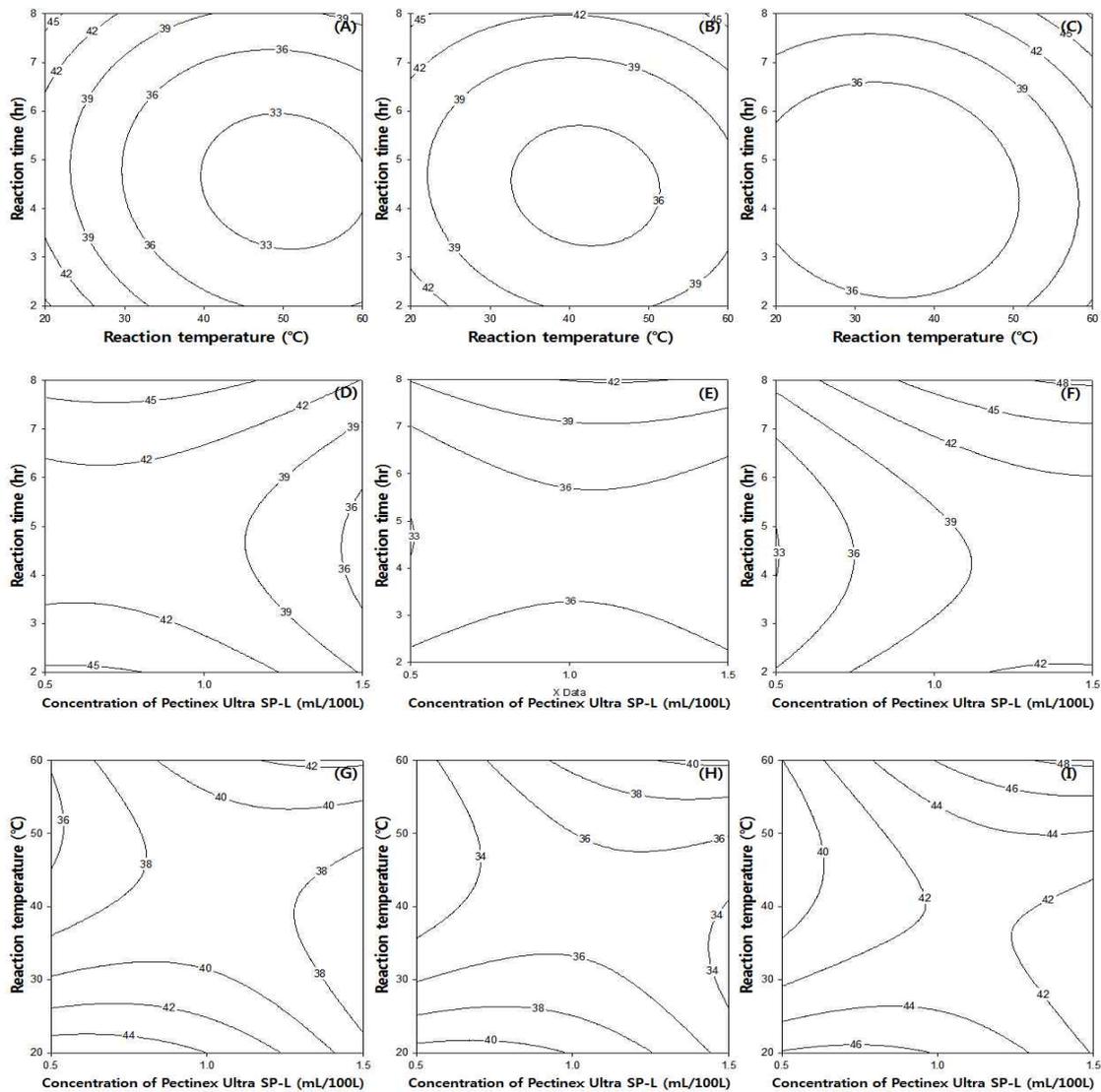


Fig. 53. Contour plot for DPPH radical scavenging activity (%) of red-fleshed potato Anthocyanin by Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment.

(Concentration of Pectinex Ultra SP-L, A: 0.5 mL/100 L, B: 1.0 mL/100 L, C: 1.5 mL/100 L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 2 hr, H: 5 hr, I: 8 hr)

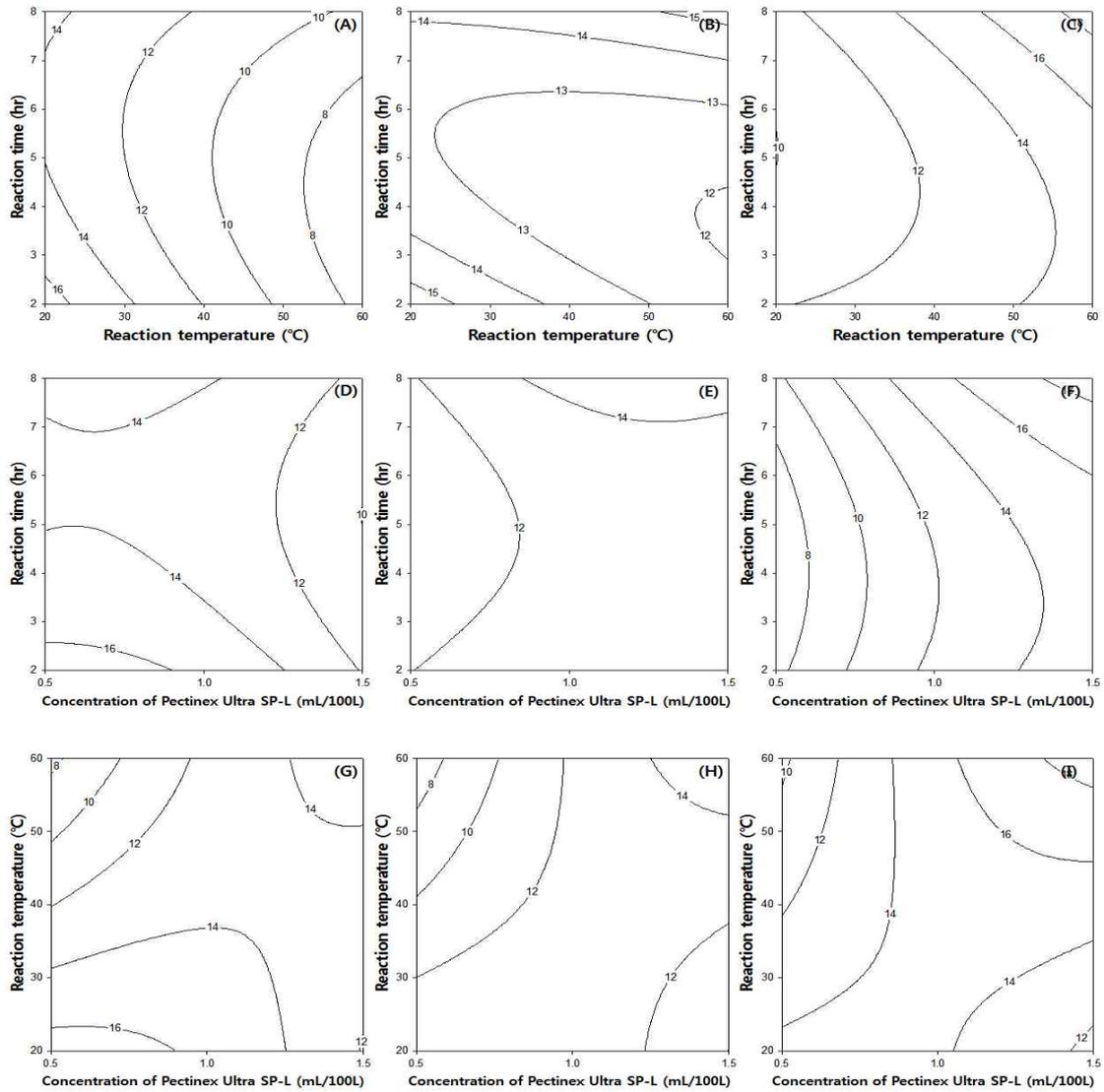


Fig. 54. Contour plot for SOD-like activity (%) of red-fleshed potato Anthocyanin by Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment.

(Concentration of Pectinex Ultra SP-L, A: 0.5 mL/100 L, B: 1.0 mL/100 L, C: 1.5 mL/100 L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 2 hr, H: 5 hr, I: 8 hr)

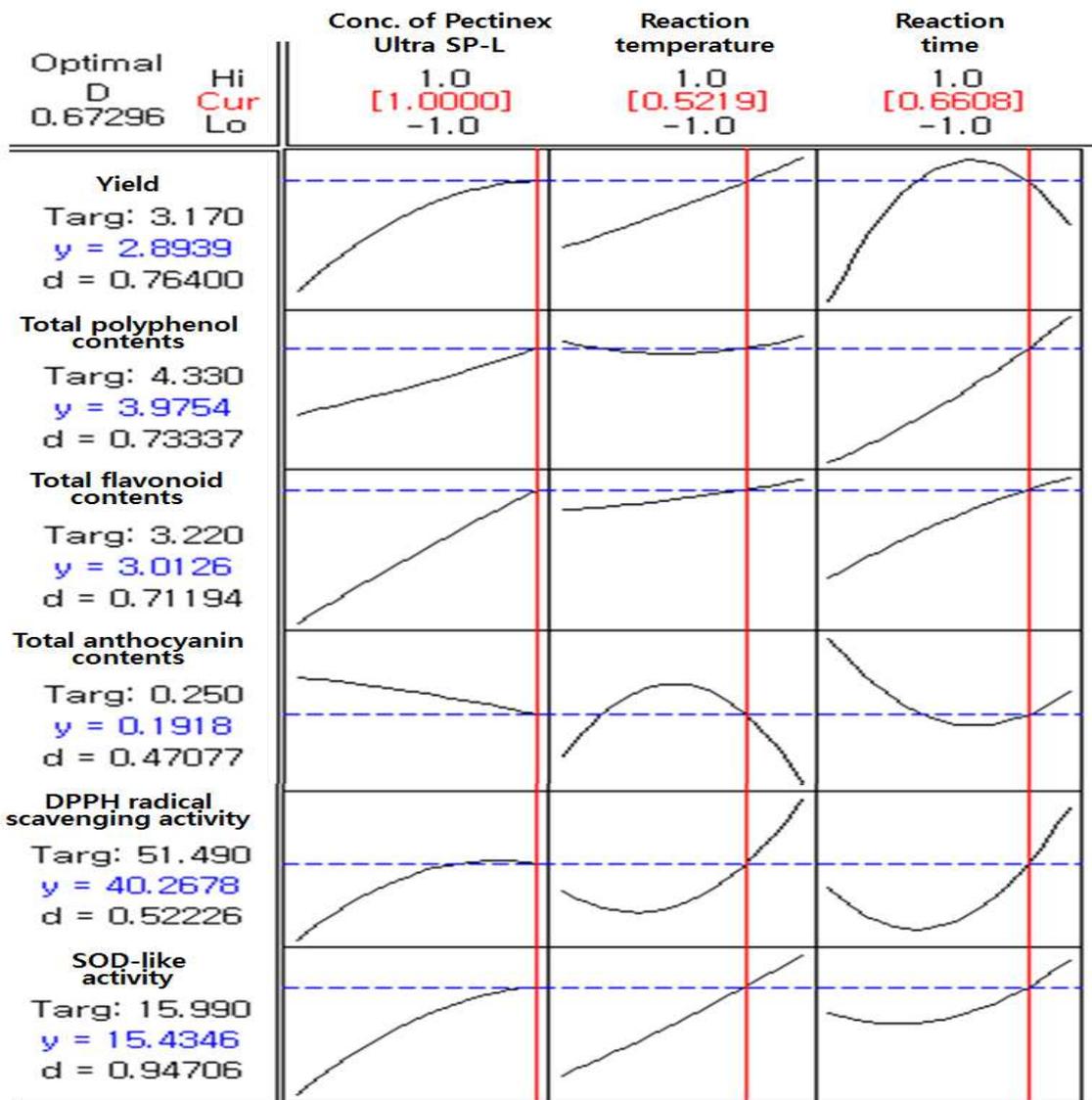


Fig. 55. Response optimization for multi-response surface of red-fleshed potato extracts by Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment.

마. Novozym 33095를 이용한 복분자의 최적 효소 처리 공정

(1) 수율 및 항산화활성

Novozymes사에 의하면 Novozym 33095는 *Aspergillus aculeatus*와 *Aspergillus niger*에서 얻어지는 황색의 액상 효소로 pectin lyase로 작용한다.

Novozym 33095의 농도(0.05-0.25 mL/L), 반응온도(20-60°C)와 반응시간(60-120 min)에 따른 복분자 추출물의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능을 분석한 결과는 **Table 53**과 같았다.

Novozym 33095를 이용한 복분자 추출물의 효소 처리 시 수율은 3.85-6.01% 범위로 나타났다. Total polyphenol 함량의 경우 무처리 시에는 8.25 mg/g이었는데, 본 실험에서 효소처리의 흥미영역 구간 실험점에서의 범위는 7.24-11.79 mg/g로 나타나 복분자 추출물에 Novozym 33095의 처리가 다소 효과적인 것을 알 수 있었다. Total flavonoid 함량의 경우 무처리 시에 4.42 mg/mL이었고, 효소처리의 흥미영역 구간 실험점에서의 범위는 3.36-4.98 mg/mL로 나타난 것으로 보아 Novozym 33095 처리가 Total Flavonoid 함량을 다소 증가시키지만 효과가 없거나 오히려 함량이 감소된 것을 알 수 있었다. Total Anthocyanin 함량의 경우 무처리 시에는 0.12 mg/100 g이었으나 본 실험의 효소처리의 흥미영역 구간 실험 점에서 총 Anthocyanin 함량의 범위는 0.41-0.82 mg/100 g으로 나타나 총 Anthocyanin 함량에 있어서 복분자 추출 시 Novozym 33095 처리 효과가 높은 것을 알 수 있었다. DPPH radical 소거능은 무처리 시 11.76%에서 효소처리 후 39.74-59.38%로 나타났으며, SOD-like 활성능의 경우 무처리 시 1.10%에서 효소처리 후 8.11-17.16%로 나타나 Novozym 33095 효소 처리에 의해 활성이 크게 증가하는 것을 알 수 있었다.

Table 53. Central composite design for Novozym 33095 enzyme treatment from *Bokbunja* extracts and its dependent variables.

Coded levels of variable			Responses					
X ₁	X ₂	X ₃	Yield (%)	Total polyphenol contents (mg/g)	Total flavonoid contents (mg/mL)	Total Anthocyanin contents (mg/100 g)	DPPH radical scavenging activity (%)	SOD-like activity (%)
0	-1	1	4.45	8.91±0.01 ^g	3.82±0.32 ^{defg}	0.62±0.010 ^f	56.53±3.06 ^{ab}	12.64±0.98 ^{de}
0	1	-1	5.08	9.59±0.01 ^f	4.26±0.40 ^{bcd}	0.75±0.029 ^b	46.25±3.34 ^{def}	10.06±0.64 ^{fg}
0	0	0	5.23	9.93±0.01 ^e	3.86±0.42 ^{cdef}	0.41±0.013 ^h	47.26±5.83 ^{def}	10.06±0.64 ^{fg}
0	-1	-1	5.38	9.67±0.00 ^f	4.01±0.47 ^{bcde}	0.57±0.020 ^g	50.26±2.66 ^{cd}	17.16±0.34 ^a
-1	0	1	5.02	11.05±0.02 ^c	4.33±0.50 ^{bc}	0.67±0.035 ^d	45.50±2.98 ^{def}	13.16±0.24 ^{cd}
-1	-1	0	6.01	8.08±0.01 ⁱ	3.47±0.40 ^{fg}	0.71±0.028 ^c	55.65±3.23 ^{ab}	14.71±0.23 ^{bc}
-1	0	-1	5.82	10.08±0.00 ^{de}	3.99±0.38 ^{bcde}	0.63±0.011 ^{ef}	53.64±1.80 ^{bc}	11.09±0.63 ^{ef}
0	0	0	4.78	10.28±0.00 ^d	4.46±0.14 ^b	0.65±0.009 ^{de}	45.24±1.92 ^{ef}	9.03±0.65 ^g
1	1	0	3.96	9.17±0.01 ^g	4.10±0.22 ^{bcd}	0.64±0.015 ^{def}	47.48±4.45 ^{def}	14.58±0.32 ^{cd}
0	0	0	5.21	9.12±0.01 ^g	3.95±0.43 ^{cde}	0.56±0.020 ^g	48.61±3.91 ^{de}	14.19±0.13 ^{cd}
1	0	-1	4.38	11.79±0.00 ^a	4.98±0.20 ^a	0.74±0.042 ^{bc}	39.74±3.65 ^g	8.11±5.22 ^g
1	0	1	5.15	7.24±0.00 ^j	3.36±0.42 ^g	0.57±0.031 ^g	59.38±4.19 ^a	9.67±1.55 ^{fg}
1	-1	0	4.21	8.62±0.35 ^h	3.58±0.21 ^{efg}	0.82±0.014 ^a	55.75±4.04 ^{ab}	14.96±0.96 ^{bc}
0	1	1	3.85	11.34±0.22 ^b	4.90±0.34 ^a	0.80±0.032 ^a	42.86±1.01 ^{fg}	16.51±0.58 ^{ab}
-1	1	0	4.82	8.65±0.71 ^h	3.36±0.30 ^g	0.63±0.027 ^{ef}	58.29±5.20 ^{ab}	14.06±0.42 ^{cd}

X₁: Concentration of Novozym (mL/L), X₂: Reaction Temperature (°C), X₃: Reaction Time (min)

(2) 이차다항회귀곡선식

홍미구역 안에서 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 복분자 추출물의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, 총 Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능에 미치는 정도를 분산 분석한 결과는 **Table 54**와 같다.

수율에 영향을 미치는 요인으로 효소농도가 가장 컸으며, 반응온도, 반응시간 순으로 나타났으며, 세 가지 요인 모두 5% 내에서 유의성차이를 나타내었다. Total polyphenol 함량은 반응시간의 영향이 가장 컸으며, 효소농도, 반응온도 순으로 나타났고 세 가지 요인에 대해서 5% 내에서 유의성차이를 나타내었다. Total flavonoid 함량에서는 반응시간이 효소농도와 반응온도보다 영향이 큰 것으로 나타났으며 반응온도를 제외한 두 가지 요인에서 5% 내에서 유의성차이를 보였다. 총 Anthocyanin 함량에 영향을 미치는 요인으로 반응온도가 가장 컸으며 효소농도, 반응시간 순으로 나타났고 반응시간을 제외한 두 가지 요인에서 5% 내에서 유의성차이를 나타내었다. DPPH radical 소거능에서는 효소농도가 가장 컸으며 반응시간, 반응온도 순이었으며, 세 가지 요인 모두 5% 내에서 유의성 차이를 보였다. SOD-like 활성능은 반응온도가 반응시간과 효소농도보다 큰 것으로 나타났으며 효소농도에 대해서만 5% 내에서 유의성차이가 나타나지 않았다.

처리 요인의 수준에 대하여 종속변수인 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능을 예측하기 위한 이차다항회귀곡선식의 회귀계수를 계산한 결과는 **Table 55**와 같다. 또한, 종속변수에 대한 이차다항회귀곡선식의 일차다항회귀, 이차다항회귀 및 교차회귀의 기여도를 검정하였다.(**Table 56**) 수율의 기여도는 일차다항회귀, 교차회귀 및 이차다항회귀 순으로 나타났으며, Total Polyphenol 함량과 Total Flavonoid 함량의 기여도는 교차회귀, 이차다항회귀 및 일차다항회귀 순으로 나타났다. Total Anthocyanin 함량의 기여도는 이차다항회귀, 교차회귀 및 일차다항회귀 순으로, DPPH radical 소거능의 경우 교차회귀, 일차다항회귀 및 이차다항회귀 순으로 기여도가 나타났으며, SOD-like 활성능의 기여도는 이차다항회귀, 교차회귀 및 일차다항회귀 순으로 나타났다. 이차다항회귀곡선식 적합성 검정에서의 total regression은 모두 5% 이내에서 유의성 차이를 보였다.

Table 54. Analysis of variance for the effects of three variables on yield, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, Total Anthocyanin contents and antioxidative activities of Novozym 33095 enzyme treatment from *Bokbunja* extracts.

	Factors	Yield	Total polyphenol contents	Total flavonoid contents	Total Anthocyanin contents	DPPH radical scavenging activity	SOD-like activity
X ₁	F value	14.64	8.47	4.10	2.92	10.04	0.53
	Prob>F	<.0001	0.0004	0.0139	0.0350	0.0001	0.7173
X ₂	F value	7.36	4.57	2.26	3.72	5.53	9.95
	Prob>F	0.0008	0.0087	0.0990	0.0126	0.0036	0.0001
X ₃	F value	6.45	11.90	4.78	1.89	8.51	4.45
	Prob>F	0.0017	<.0001	0.0072	0.1348	0.0004	0.0099

X₁: Concentration of Novozym (mL/L), X₂: Reaction Temperature (°C), X₃: Reaction Time (min)

Table 55. Regression coefficients of second degree polynomials for yield, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, Total Anthocyanin contents and antioxidative activities of Novozym 33095 enzyme treatment from *Bokbunja* extracts.

Parameters	Estimate					
	Yield	Total polyphenol contents	Total flavonoid contents	Total Anthocyanin contents	DPPH radical scavenging activity	SOD-like activity
Intercept	7.699	10.695	5.078	1.177	67.667	36.423
X ₁ ¹⁾	-22.625	54.956	20.806	0.313	-284.856	-3.225
X ₂ ²⁾	0.052	0.059	0.006	-0.017	-0.245	-1.150
X ₃ ³⁾	-0.020	-0.135	-0.062	-0.007	0.153	-0.046
X ₁ *X ₁	3.958	-49.229	-27.271	6.278	392.146	-4.938
X ₂ *X ₁	0.118	-0.003	0.078	-0.013	-1.364	0.033
X ₂ *X ₂	-0.001	-0.002	0.000	0.000	0.008	0.009
X ₃ *X ₁	0.131	-0.460	-0.163	-0.017	2.315	-0.042
X ₃ *X ₂	0.000	0.001	0.000	0.000	-0.004	0.005
X ₃ *X ₃	0.000	0.001	0.000	0.000	-0.002	-0.001

¹⁾X₁: Concentration of Novozym (mL/L), ²⁾X₂: Reaction Temperature (°C), ³⁾X₃: Reaction Time (min)

Table 56. Determination coefficients and probability of second degree polynomials for yield, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, Total Anthocyanin contents and antioxidative activities of Novozym 33095 enzyme treatment from *Bokbunja* extracts.

	Regressions	Linear	Quadratic	Cross product	Total regress
Yield	R ²	0.58	0.09	0.15	0.83
	F value	22.58	3.49	5.97	10.68
	Prob>F	<.0001	0.0347	0.0045	<.0001
Total polyphenol contents	R ²	0.11	0.23	0.42	0.76
	F value	3.22	6.45	12.02	7.23
	Prob>F	0.0444	0.0031	0.0001	0.0001
Total flavonoid contents	R ²	0.13	0.21	0.28	0.61
	F value	2.15	3.54	4.71	3.47
	Prob>F	0.1262	0.0334	0.0120	0.0099
Total Anthocyanin contents	R ²	0.02	0.32	0.08	0.43
	F value	0.50	6.63	1.68	2.94
	Prob>F	0.6860	0.0012	0.1886	0.0105
DPPH radical scavenging activity	R ²	0.18	0.17	0.41	0.76
	F value	4.93	4.76	11.20	6.96
	Prob>F	0.0101	0.0116	0.0002	0.0002
SOD-like activity	R ²	0.08	0.38	0.23	0.69
	F value	1.72	8.25	5.10	5.02
	Prob>F	0.1945	0.0009	0.0088	0.0013

(3) 효소처리공정 최적화

효소농도, 반응온도와 반응시간이 복분자 추출물의 수율에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 Fig. 56과 같다. 효소처리공정에서 반응시간은 반응온도(Fig. 56-A, B, C)와 효소농도(Fig. 56-D, E, F)보다 영향이 더 작게 나타나고, 효소농도는 반응온도보다 영향이 더 크게 나타났다(Fig. 56-G, H, I). 효소처리 홍미영역에서의 반응평균 값은 4.89%이었다. 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 복분자의 수율을 반응표면분석한 결과 일반적으로 반응온도가 낮을수록 수율이 증가하는 경향을 나타내었으며 효소농도 0.07 mL/L, 반응온도 20.00°C 및 반응시간 67.49 min 일 때가 최적 효소처리조건으로 6.01%로 예측되었다.

Total polyphenol 함량에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 Fig. 57과 같다. 효소처리공정에서 반응시간은 반응온도(Fig. 57-A, B, C)와 효소농도(Fig. 57-D, E, F)보다 영향이 더 크게 나타났지만, 반응온도와 효소농도는 비슷한 영향력을 나타냈다(Fig. 57-G, H, I). 효소처리 홍미영역에서의 반응평균 값은 9.57 mg/g이었고 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 복분자의 Total Polyphenol 함량을 반응표면분석한 결과 일반적으로 효소농도가 낮고 반응온도가 높으며, 반응시간이 길수록 증가하는 경향을 나타내었다. 효소농도 0.05 mL/L, 반응온도 59.93°C 및 반응시간 120.00 min 일 때가 최적 효소처리 조건으로 그 때의 Total Polyphenol 함량은 11.64 mg/g으로 예측되었으며, 이는 무처리 시의 1.41배 수준이었다.

Total flavonoid 함량에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 Fig. 58과 같다. 효소처리공정에서 반응온도는 반응시간(Fig. 58-A, B, C)과 효소농도(Fig. 58-G, H, I)보다 영향력이 더 작고, 반응시간과 효소농도는 비슷한 영향력을 나타냈다(Fig. 58-D, E, F). 효소처리 홍미영역에서의 반응평균 값은 4.03 mg/mL이었고 효소농도가 높고, 반응시간이 짧을 때 증가하는 경향을 나타내었다. 효소농도 0.25 mL/L, 반응온도 48.94°C, 반응시간 60.00 min 일 때가 최적 효소처리 조건으로 4.90 mg/mL로 예측되었으며, 이는 무처리 시의 1.11배 수준이었다.

효소농도, 반응온도와 반응시간이 복분자 추출물의 Total Anthocyanin 함량에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 Fig. 59와 같다. 효소처리공정에서 반응시간은 반응온도와 비슷한 영향력이 나타났지만(Fig. 59-A, B, C) 효소농도보다는 영향이 더 크게 나타났고(Fig. 59-D, E, F), 반응온도는 효소농도보다 더 큰 영향을 보였다(Fig. 59-G, H, I). 효소처리 홍미영역에서의 반응평균(response mean) 값은 0.65 mg/100 g이었고 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 복분자의 Total Anthocyanin 함량을 반응 표면 분석한 결과 효소농도가 높을수록 Total Anthocyanin 함량이 증가하는 경향을 나타내었다. 효소농도 0.25 mL/L, 반응온도 20.49°C 및 반응시간 60.55 min 일 때가 최적 효소처리조건으로 0.82 mg/100 g으로 예측되었고, 이는 무처리 시의 6.83배 수준이었다.

DPPH radical 소거능에 미치는 영향을 분석한 결과는 Fig. 60과 같다. 효소처리공정에서 반응시간은 반응온도보다 영향력이 더 크지만(Fig. 60-A, B, C), 효소농도보다는 영향력이 더 작고(Fig. 60-D, E, F), 반응온도보다 효소농도가 더 큰 영향력을 나타냈다(Fig. 60-G, H, I). 효소처리 홍미영역에서의 반응평균 값은 50.16%이었고 일반적으로 반응온도가 낮고 반응시간이 길 때 DPPH radical 소거능이 증가하는 경향을 보였다. 효소농도 0.18 mL/L, 반응온도 20.00°C, 반응시간 120.00 min 일 때가 최적 효소처리조건으로 59.38%로 예측되었으며, 이는 무처리 시의 5.05배 수준이었다.

SOD-like 활성능에 미치는 영향을 분석한 결과는 Fig. 61과 같다. 효소처리공정에서 반응온

도는 반응시간(**Fig. 61-A, B, C**)과 효소농도(**Fig. 61-G, H, I**)보다 영향력이 크고, 반응시간은 효소농도보다 영향력이 크게 나타났다(**Fig. 61-D, E, F**). 흥미영역에서의 반응평균 값은 12.67%이었고 효소농도가 낮고, 반응온도가 높으며 반응시간이 길수록 SOD-like 활성능은 증가하는 것으로 나타났다. 최적 효소처리조건으로 효소농도 0.05 mL/L, 반응온도 58.92°C 및 반응시간 119.11 min 일 때 복분자 추출물의 SOD-like 활성능은 17.16 %로 예측되었으며, 이는 무처리 시의 15.6배 수준이었다.

효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 복분자 추출물의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능을 다중반응표면의 최적화방법으로써 만족 함수를 이용하여 종속변수들의 가중치를 1로 놓고 종합적으로 판단한 결과 (**Fig. 62**) 최적 효소 처리 조건은 효소농도 0.11 mL/L, 반응온도 20.00°C 및 반응시간 60.00 min의 조건이었으며 이때의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능은 각각 5.61%, 9.85 mg/g, 4.14 mg/mL, 0.65 mg/100 g, 50.34% 및 16.91%이었고 전반적인 만족도는 0.66이었다.

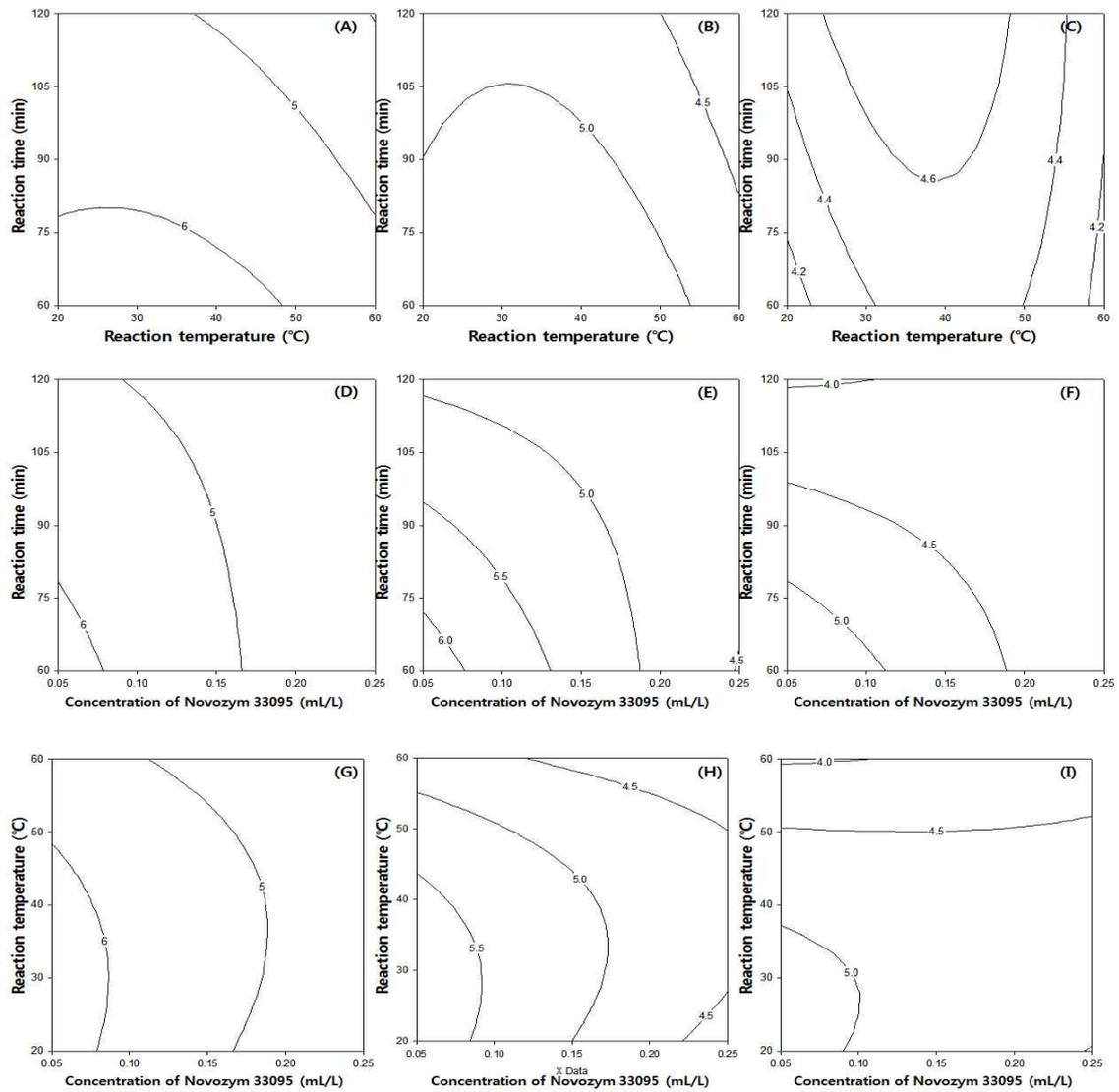


Fig. 56. Contour plot for yield (%) of *Bokbunja* Anthocyanin by Novozym 33095 enzyme treatment.

(Conc. of Novozym 33095, A: 0.05 mL/L, B: 0.15 mL/L, C: 0.25 mL/L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 60 min, H: 90 min., I: 120 min)

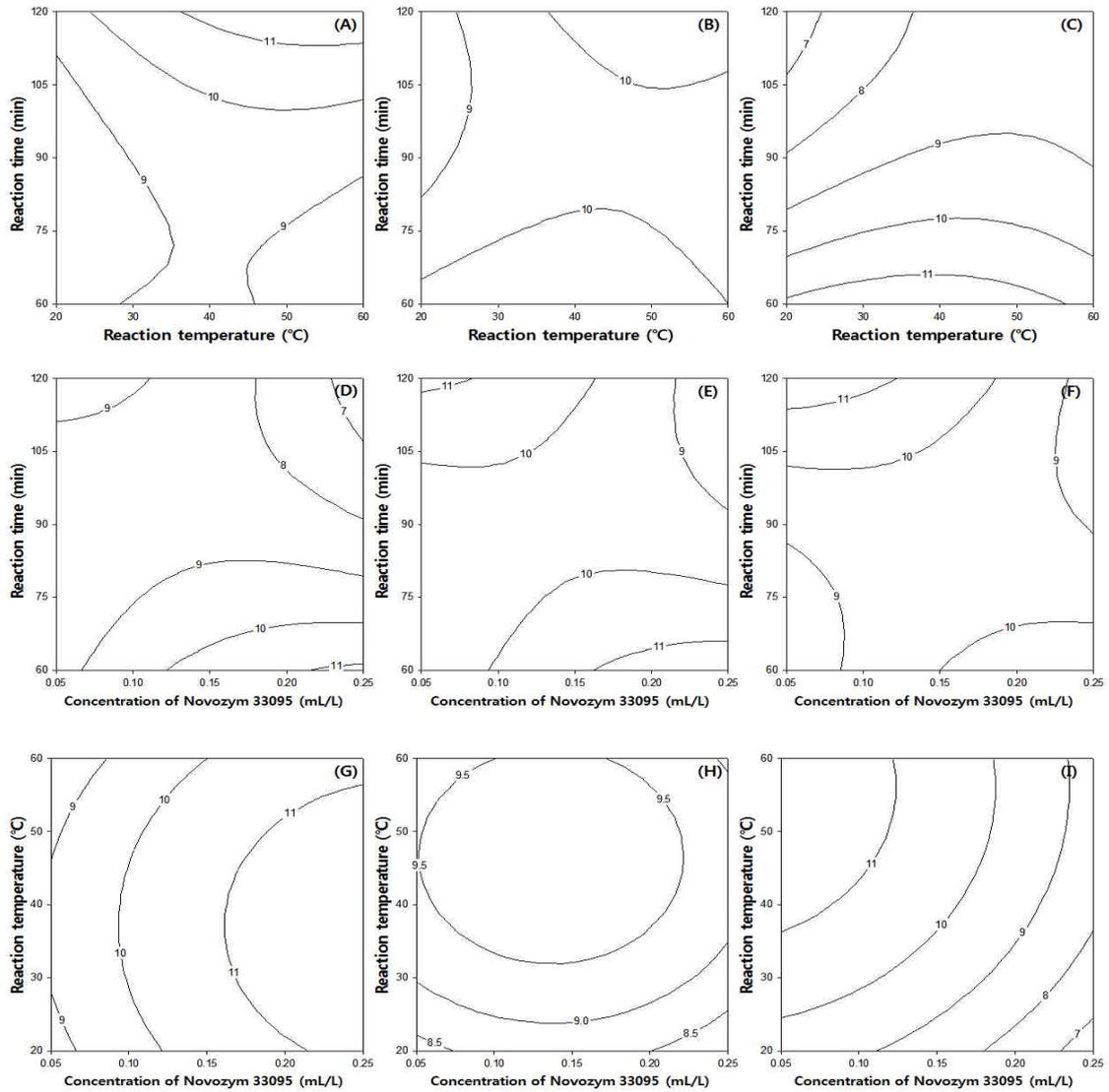


Fig. 57. Contour plot for Total Polyphenol contents (mg/g) of Novozym 33095 enzyme treatment from *Bokbunja* extracts.

(Conc. of Novozym 33095, A: 0.05 mL/L, B: 0.15 mL/L, C: 0.25 mL/L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 60 min, H: 90 min., I: 120 min)

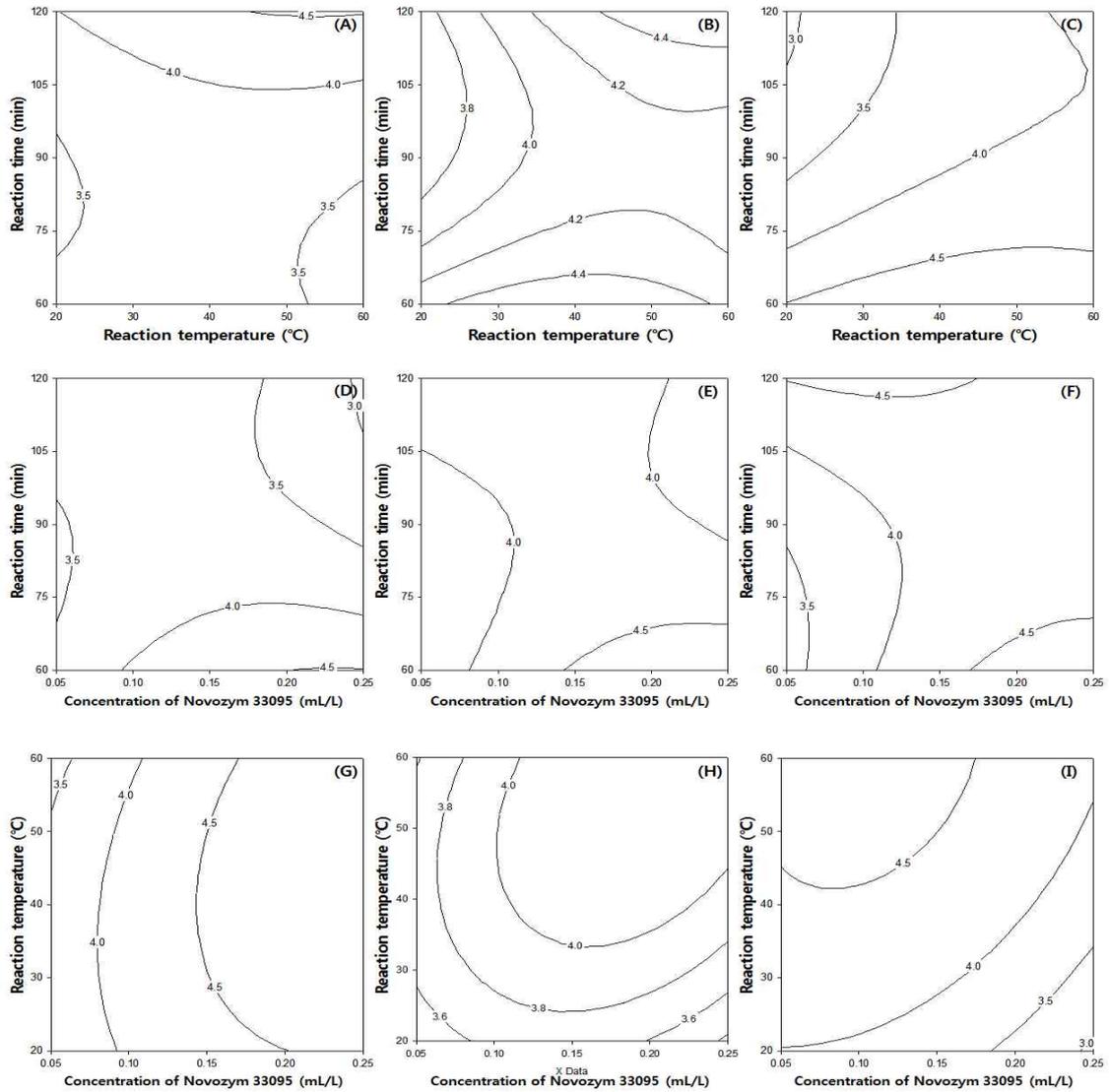


Fig. 58. Contour plot for Total Flavonoid contents (mg/mL) of Novozym 33095 enzyme treatment from *Bokbunja* extracts.

(Conc. of Novozym 33095, A: 0.05 mL/L, B: 0.15 mL/L, C: 0.25 mL/L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 60 min, H: 90 min., I: 120 min)

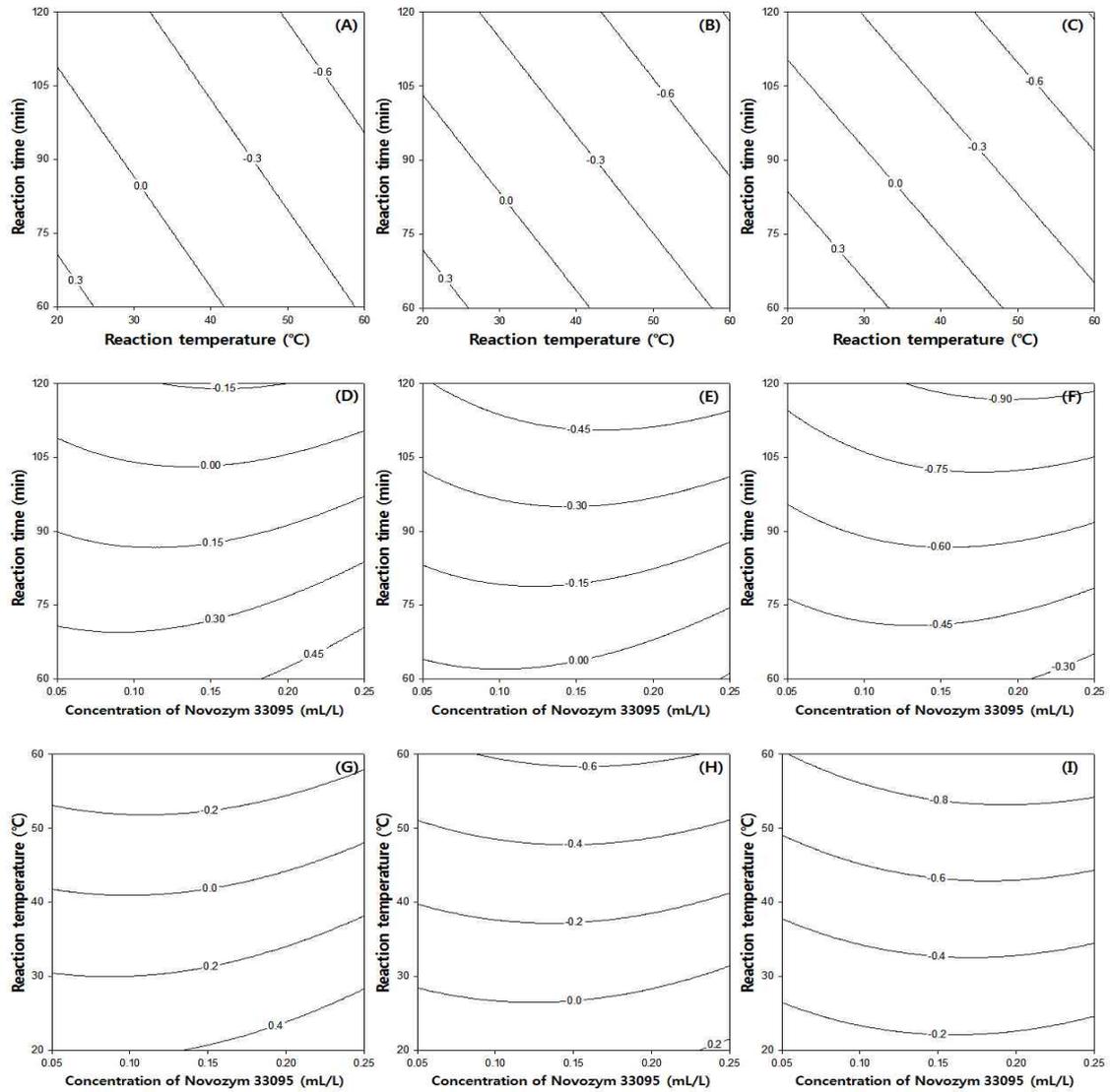


Fig. 59. Contour plot for Total Anthocyanin contents (mg/100 g) of Novozym 33095 enzyme treatment from *Bokbunja* extracts.

(Conc. of Novozym 33095, A: 0.05 mL/L, B: 0.15 mL/L, C: 0.25 mL/L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 60 min, H: 90 min., I: 120 min)

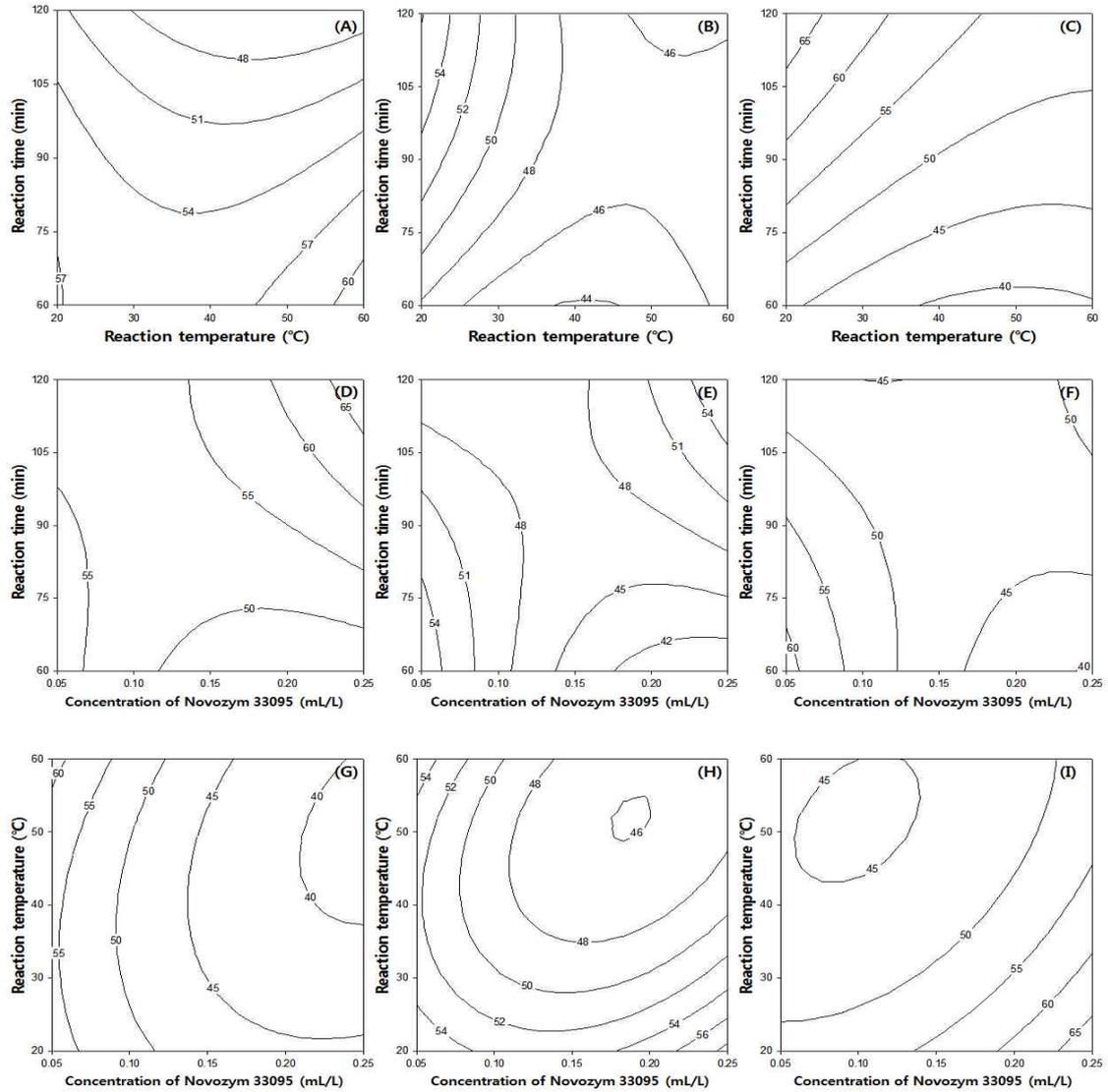


Fig. 60. Contour plot for DPPH radical scavenging activity (%) of Novozym 33095 enzyme treatment from *Bokbunja* extracts.

(Conc. of Novozym 33095, A: 0.05 mL/L, B: 0.15 mL/L, C: 0.25 mL/L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 60 min, H: 90 min., I: 120 min)

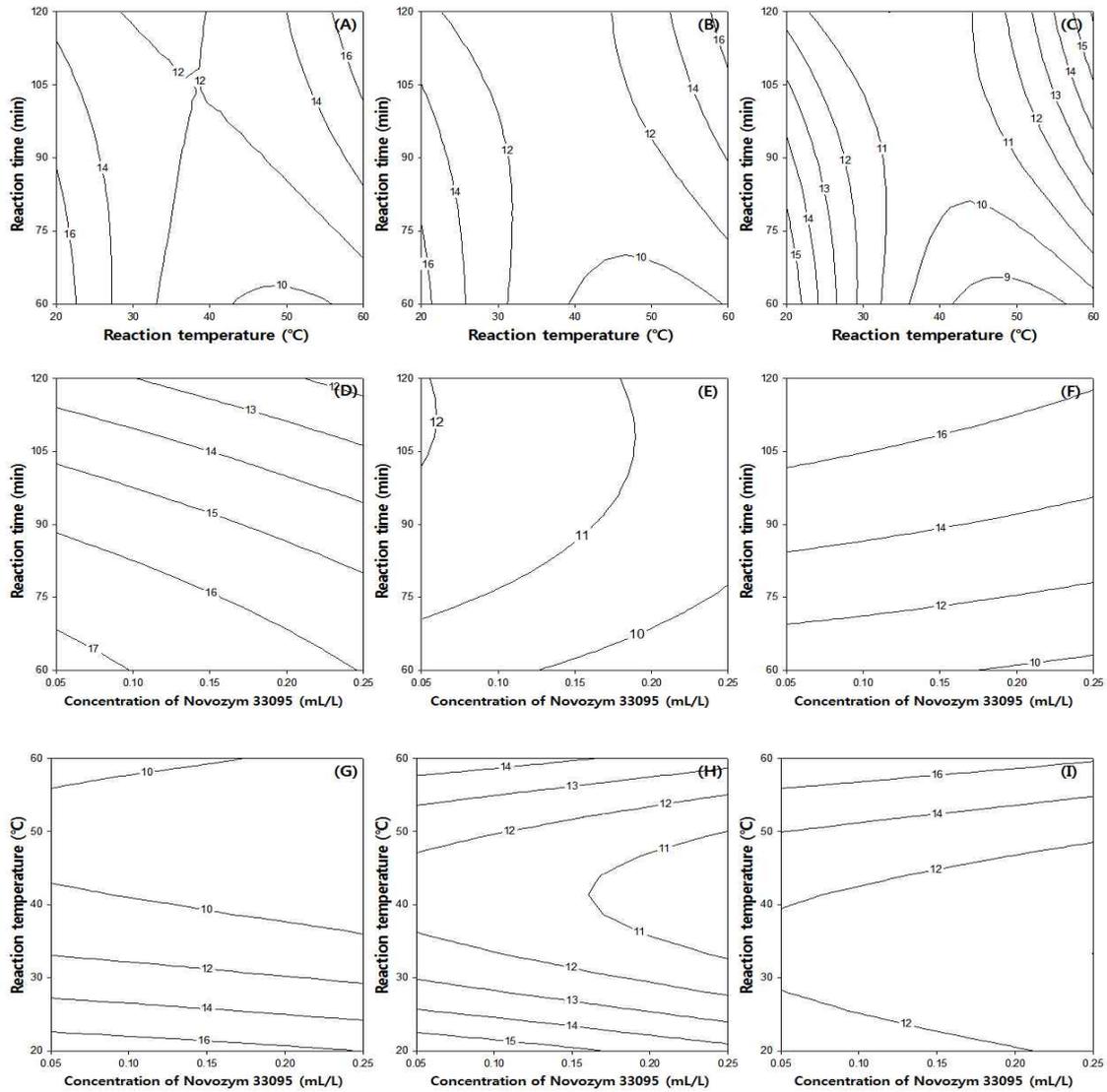


Fig. 61. Contour plot for SOD-like activity (%) of Novozym 33095 enzyme treatment from *Bokbunja* extracts.

(Conc. of Novozym 33095, A: 0.05 mL/L, B: 0.15 mL/L, C: 0.25 mL/L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 60 min, H: 90 min., I: 120 min)

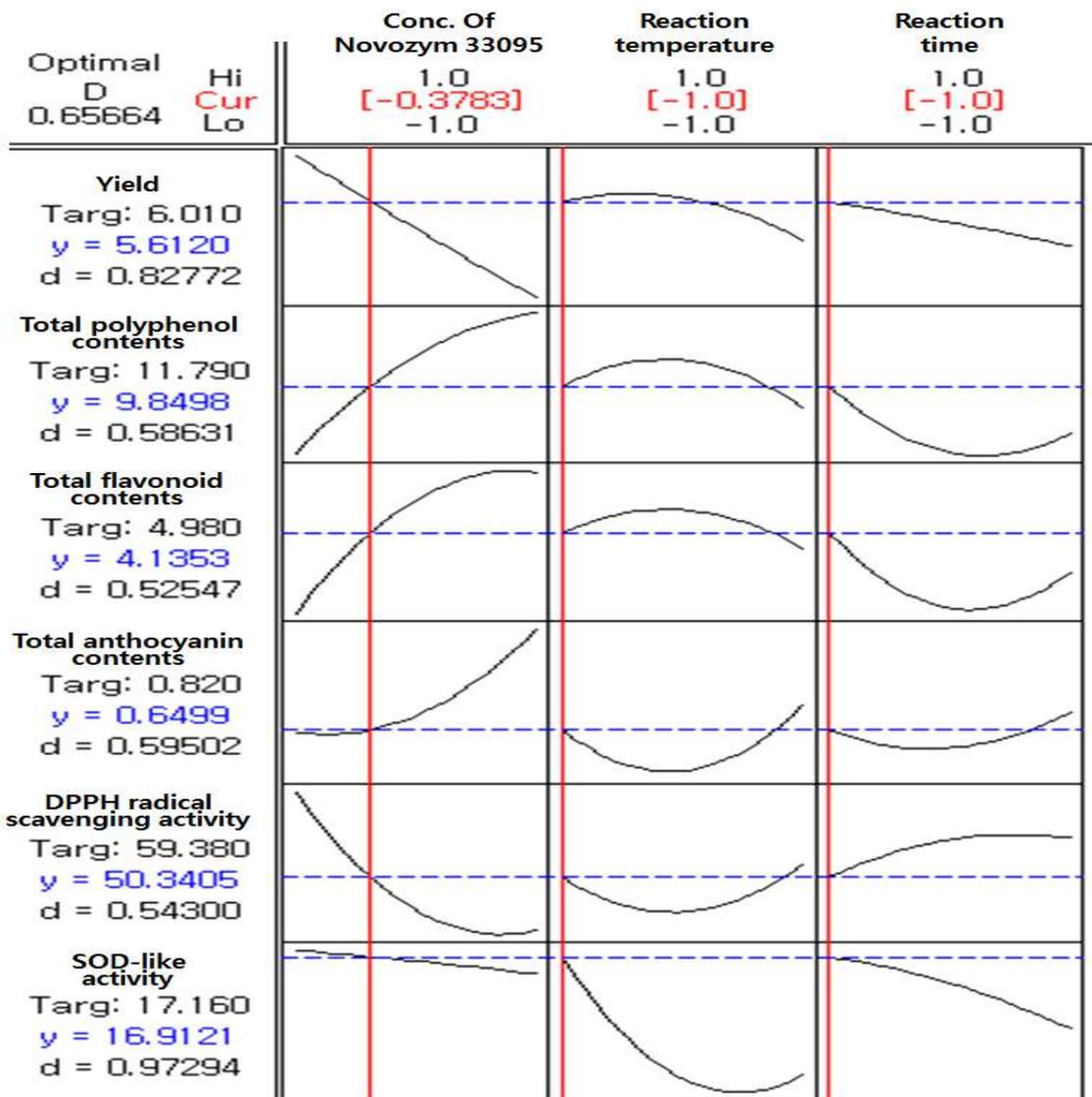


Fig. 62. Response optimization for multi-response surface of Novozym 33095 enzyme treatment from *Bokbunja* extracts.

바. Novozym 33095를 이용한 오디의 최적 효소 처리 공정

(1) 수율 및 항산화활성

여섯 가지 요인으로서 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 오디 추출물의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능을 분석한 결과는 **Table 57**과 같았다.

오디를 Novozym 33095 처리 하였을 때의 수율은 3.64-8.48% 범위로 나타났으며, 효소농도 0.05 mL/L, 반응온도 20°C 및 반응시간 120 min의 조건에서 7.84%로 최적값을 보였다.

Total polyphenol 함량의 경우 무처리 시에는 5.64 mg/g이었는데, 본 실험에서 효소처리의 흥미영역 구간 실험점에서의 범위는 4.12-6.57 mg/g로 나타났다. 효소농도 0.05 mL/L, 반응온도 59.79°C, 반응시간 61.18 min일 때 6.57 mg/g으로 최적값을 보였으며, 이는 무처리 시의 116% 수준이었다.

Total flavonoid 함량의 경우 무처리 시에 3.08 mg/ml이었고, 효소처리의 흥미영역 구간 실험점에서의 범위는 2.92-3.69 mg/ml로 나타났다. 효소농도 0.25 mL/L, 반응온도 20°C, 반응시간 120 min일 때 3.64 mg/ml로 최적값을 보였으며, 이는 무처리 시의 118% 수준이었다.

Total Anthocyanin 함량의 경우 무처리 시에는 0.09 mg/100 g이었으나 본 실험의 효소처리의 흥미영역 구간 실험 점에서 Total Anthocyanin 함량의 범위는 0.36-0.61 mg/100 g으로 나타났다. 효소농도 0.25 mL/L, 반응온도 57.42°C 및 반응시간 60 min의 조건에서 0.61 mg/100 g으로 최적값을 보였으며 무처리 시의 Total Anthocyanin 함량의 678% 수준이었다.

DPPH radical 소거능은 무처리 시에는 34.17% 였으나 효소처리 시 41.46-59.00%로 나타났다. 효소농도 0.24 mL/L, 반응온도 58.43°C 및 반응시간 66.45 hr의 조건에서 59.0%로 최적값을 보였으며 무처리 시의 173% 수준이었다.

SOD-like 활성능의 경우 무처리 시 0.88%였으나, 효소처리 시 15.60-23.36%로 나타났다. 효소농도 0.05 mL/L, 반응온도 48.60°C 및 반응시간 116.57 min의 조건에서 22.29%로 최적값이 나타났으며 무처리 시의 2533% 수준이었다.

Table 57. Central composite design for Novozym 33095 enzyme treatment from mulberry extracts and its dependent variables.

Coded levels of variable			Responses					
X ₁	X ₂	X ₃	Yield (%)	Total polyphenol contents (mg/g)	Total flavonoid contents (mg/ml)	Total Anthocyanin contents (mg/100g)	DPPH radical scavenging activity (%)	SOD-like activity (%)
0	-1	1	7.35	5.98±0.36 ^{bcde}	3.48±0.11 ^{abc}	0.47±0.072 ^{cd}	56.52±1.64 ^{ab}	18.32±0.17 ^e
0	1	-1	7.41	6.44±0.61 ^{ab}	3.32±0.31 ^{cde}	0.52±0.084 ^{bc}	54.77±3.40 ^{abc}	18.83±1.65 ^{de}
0	0	0	7.32	5.67±0.25 ^{def}	3.66±0.10 ^{ab}	0.40±0.012 ^e	43.22±4.83 ^f	18.45±0.38 ^e
0	-1	-1	8.48	5.56±0.56 ^{ef}	3.15±0.37 ^{def}	0.43±0.023 ^{de}	52.27±2.67 ^{bcde}	15.60±2.59 ^f
-1	0	1	7.68	5.77±0.36 ^{cdef}	3.22±0.38 ^{cde}	0.36±0.022 ^e	52.52±3.39 ^{bcde}	23.36±0.76 ^a
-1	-1	0	6.46	5.48±0.15 ^f	3.27±0.14 ^{cde}	0.56±0.047 ^{ab}	53.13±1.04 ^{bcd}	18.32±0.20 ^e
-1	0	-1	6.81	6.22±0.18 ^{abc}	3.69±0.09 ^a	0.58±0.039 ^a	54.64±0.32 ^{abc}	19.61±0.92 ^{cde}
0	0	0	6.89	4.70±0.09 ^g	2.92±0.04 ^f	0.52±0.006 ^{bc}	59.00±5.43 ^a	19.10±0.19 ^{de}
1	1	0	6.23	6.57±0.91 ^a	3.44±0.04 ^{abcd}	0.58±0.058 ^a	54.87±4.57 ^{abc}	18.96±1.83 ^{de}
0	0	0	7.19	5.43±0.18 ^f	3.45±0.10 ^{abcd}	0.56±0.048 ^{ab}	48.48±5.15 ^b	20.77±1.09 ^{bc}
1	0	-1	7.17	6.11±0.07 ^{abcd}	3.45±0.42 ^{abcd}	0.61±0.071 ^a	58.40±0.41 ^a	20.00±0.36 ^{cd}
1	0	1	4.38	5.35±0.21 ^f	3.39±0.09 ^{bcd}	0.41±0.032 ^e	49.37±1.78 ^{de}	19.74±0.37 ^{cde}
1	-1	0	6.38	6.09±0.38 ^{abcd}	3.51±0.25 ^{abc}	0.52±0.048 ^{bc}	51.75±0.87 ^{cde}	21.54±1.08 ^b
0	1	1	3.64	4.12±0.03 ^h	3.07±0.00 ^{ef}	0.43±0.027 ^{de}	52.87±2.82 ^{bcd}	20.13±0.55 ^{bcd}
-1	1	0	7.28	5.40±0.15 ^f	3.22±0.10 ^{cde}	0.59±0.039 ^a	41.46±4.14 ^f	18.19±1.48 ^e

X₁: Concentration of Novozym (mL/L), X₂: Reaction Temperature (°C), X₃: Reaction Time (min)

(2) 이차다항회귀곡선식

홍미구역 안에서 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 오디 추출물의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능에 미치는 정도를 분산 분석한 결과 **Table 58**과 같다.

수율에 영향을 미치는 요인으로 반응시간이 가장 컸으며, 효소농도, 반응온도 순으로 나타났다. 세 가지 요인 모두 5% 내에서 유의성차이를 나타내었다. Total polyphenol 함량은 반응시간, 반응온도, 효소농도 순으로 나타났고 효소농도를 제외한 두 가지 요인에 대해 5% 내에서 유의성차이를 나타내었다. Total flavonoid 함량에서도 반응시간의 영향이 가장 크고 반응온도, 효소농도 순으로 나타났으나 세 가지 요인 모두 5% 내에서 유의성차이가 나타나지 않았다. Total Anthocyanin 함량에 영향을 미치는 요인으로 반응시간이 가장 컸으며 효소농도, 반응온도 순으로 나타났고 반응시간에 대해서만 5% 내에서 유의성차이를 나타내었다. DPPH radical 소거능에서는 효소농도가 가장 컸으며 반응시간, 반응온도 순이었고, 세 가지 요인에서 모두 5% 내에서 유의성 차이가 나타났다. SOD-like 활성능은 반응시간, 효소농도, 반응온도 순으로 나타났고, 세 가지 요인에서 모두 5% 내에서 유의성차이를 보였다.

처리 요인의 수준에 대하여 종속변수인 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능을 예측하기 위한 이차다항회귀곡선식의 회귀계수를 계산한 결과는 **Table 59**와 같다. 또한, 종속변수에 대한 이차다항회귀곡선식의 일차다항회귀(linear), 이차다항회귀(quadratic) 및 교차회귀(cross product)의 기여도를 검정하였다.(**Table 60**)

수율의 기여도는 일차다항회귀, 교차회귀 및 이차다항회귀 순으로 나타났으며, Total Polyphenol 함량의 기여도는 교차회귀, 일차다항회귀 및 이차다항회귀 순으로 나타났다. Total flavonoid 함량의 기여도는 교차회귀, 이차다항회귀 및 일차다항회귀 순으로, Total Anthocyanin 함량의 기여도는 일차다항회귀, 이차다항회귀 및 교차회귀 순으로 나타났다. DPPH radical 소거능의 경우 교차회귀, 이차다항회귀 및 일차다항회귀 순으로 기여도가 나타났으며, SOD-like 활성능의 기여도는 이차다항회귀, 일차다항회귀 및 교차회귀 순으로 나타났다. 이차다항회귀곡선식 적합성 검정에서의 total regression은 Total Flavonoid 함량을 제외하고 모두 5% 이내에서 유의성 차이를 보였다.

Table 58. Analysis of variance for the effects of three variables on yield, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, Total Anthocyanin contents and antioxidative activities of Novozym 33095 enzyme treatment from mulberry extracts.

	Factors	Yield	Total polyphenol contents	Total flavonoid contents	Total Anthocyanin contents	DPPH radical scavenging activity	SOD-like activity
X ₁	F value	5.80	2.21	1.41	1.84	3.30	3.86
	Prob>F	0.0029	0.1046	0.2522	0.1434	0.0213	0.0106
X ₂	F value	3.93	4.04	1.76	1.74	2.90	3.40
	Prob>F	0.0163	0.0147	0.1583	0.1631	0.0358	0.0188
X ₃	F value	10.44	6.19	2.17	8.22	3.06	4.33
	Prob>F	<.0001	0.0021	0.0929	<.0001	0.0291	0.0060

X₁: Concentration of Novozym (mL/L), X₂: Reaction Temperature (°C), X₃: Reaction Time (min)

Table 59. Regression coefficients of second degree polynomials for yield, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, Total Anthocyanin contents and antioxidative activities of Novozym 33095 enzyme treatment from mulberry extracts.

Parameters	Estimate					
	Yield	Total polyphenol contents	Total flavonoid contents	Total Anthocyanin contents	DPPH radical scavenging activity	SOD-like activity
Intercept	-1.054	4.989	2.970	0.212	81.075	5.617
X ₁ ¹⁾	38.550	-13.069	-5.488	-1.750	-1.704	9.229
X ₂ ²⁾	0.125	0.061	0.036	0.001	-0.152	0.378
X ₃ ³⁾	0.110	0.013	0.003	0.010	-0.578	0.084
X ₁ *X ₁	-37.792	47.458	9.889	4.889	-15.361	113.514
X ₂ *X ₁	-0.121	0.068	-0.002	0.005	1.848	-0.306
X ₂ *X ₂	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	-0.003
X ₃ *X ₁	-0.305	-0.026	0.034	0.001	-0.576	-0.334
X ₃ *X ₂	-0.001	-0.001	0.000	0.000	-0.003	-0.001
X ₃ *X ₃	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000

¹⁾X₁: Concentration of Novozym (mL/L), ²⁾X₂: Reaction Temperature (°C), ³⁾X₃: Reaction Time (min)

Table 60. Determination coefficients and probability of second degree polynomials for yield, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, Total Anthocyanin contents and antioxidative activities of Novozym 33095 enzyme treatment from mulberry extracts.

	Regressions	Linear	Quadratic	Cross product	Total regress
Yield	R ²	0.47	0.04	0.25	0.75
	F value	12.50	0.95	6.66	6.70
	Prob>F	<.0001	0.1935	<.0001	<.0001
Total polyphenol contents	R ²	0.21	0.13	0.29	0.63
	F value	3.80	2.33	5.15	3.76
	Prob>F	0.0264	0.1048	0.0084	0.0065
Total flavonoid contents	R ²	0.07	0.08	0.15	0.29
	F value	1.17	1.26	2.40	1.61
	Prob>F	0.3362	0.3045	0.0848	0.1517
Total Anthocyanin contents	R ²	0.30	0.21	0.05	0.56
	F value	7.99	5.59	1.28	4.95
	Prob>F	0.0003	0.0031	0.2959	0.0003
DPPH radical scavenging activity	R ²	0.1042	0.1257	0.1917	0.4216
	F value	2.1	2.54	3.87	2.84
	Prob>F	0.1175	0.0725	0.0173	0.0129
SOD-like activity	R ²	0.16	0.25	0.12	0.53
	F value	3.87	6.05	3.00	4.31
	Prob>F	0.0172	0.0020	0.0438	0.0008

(3) 효소처리공정 최적화

효소농도, 반응온도와 반응시간이 오디 추출물의 수율에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 Fig. 63과 같다. 효소처리공정에서 반응시간은 반응온도(Fig. 63-A, B, C)와 효소농도(Fig. 63-D, E, F)보다 영향이 크고, 효소농도는 반응온도보다 영향이 크게 나타났다(Fig. 63-G, H, I). 효소처리 홍미영역에서의 반응평균(response mean) 값은 6.71%이었다. 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 오디의 수율을 반응표면분석한 결과 일반적으로 효소농도와 반응온도가 낮고, 반응시간이 길수록 수율이 증가하는 경향을 나타내었으며 효소농도 0.05 mL/L, 반응온도 20°C 및 반응시간 120 min 일 때가 최적 효소처리조건으로 7.84%로 예측되었다.

Total polyphenol 함량에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 Fig. 64와 같다. 효소처리공정에서 반응시간은 반응온도와 비슷한 영향력을 나타냈지만(Fig. 64-A, B, C), 효소농도보다는 영향력이 더 작고(Fig. 64-D, E, F), 반응온도보다 효소농도가 더 큰 영향을 나타냈다(Fig. 64-G, H, I). 효소처리 홍미영역에서의 반응평균 값은 5.66 mg/g이었다. 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 오디의 Total Polyphenol 함량을 반응표면분석한 결과 일반적으로 효소농도가 낮고 반응온도가 높을수록 증가하는 경향을 보였으며 효소농도 0.05 mL/L, 반응온도 59.79°C 및 반응시간 61.18 min 일 때가 최적 효소처리 조건으로 그 때의 Total Polyphenol 함량은 6.57 mg/g으로 예측되었다.

Total flavonoid 함량에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 Fig. 65와 같다. 효소처리공정에서 반응시간과 반응온도(Fig. 65-A, B, C), 반응시간과 효소농도(Fig. 65-D, E, F), 반응온도와 효소농도(Fig. 65-G, H, I)는 서로 비슷한 영향력을 보였다. 효소처리 홍미영역에서의 반응평균 값은 3.35 mg/ml이었다. Total flavonoid 함량은 일반적으로 효소농도가 높고 반응온도가 낮으며 반응시간이 길 때 증가하는 경향을 나타내었으며 효소농도 0.25 mL/L, 반응온도 20°C, 반응시간 120 min 일 때가 최적 효소처리 조건으로 3.64 mg/ml로 예측되었다.

효소농도, 반응온도와 반응시간이 오디 추출물의 Total Anthocyanin 함량에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 Fig. 66과 같다. 효소처리공정에서 반응시간은 반응온도(Fig. 66-A, B, C)와 효소농도(Fig. 66-D, E, F)보다 영향력이 크고 반응온도보다 효소농도가 더 큰 영향을 나타냈다(Fig. 66-G, H, I). 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 오디의 Total Anthocyanin 함량을 반응 표면 분석한 결과 일반적으로 효소농도가 높고, 반응시간이 짧을수록 Total Anthocyanin 함량이 증가하는 경향을 나타내었으며 효소농도 0.25 mL/L, 반응온도 57.42°C 및 반응시간 60 min 일 때가 최적 효소처리조건으로 0.61 mg/100 g으로 예측되었다.

DPPH radical 소거능에 미치는 영향을 분석한 결과는 Fig. 67과 같다. 효소처리공정에서 반응시간은 반응온도(Fig. 67-A, B, C)와 효소농도(Fig. 67-D, E, F)보다 영향력이 크고 반응온도와 효소농도는 비슷한 영향력을 보였다(Fig. 67-G, H, I). 효소처리 홍미영역에서의 반응평균 값은 52.22%이었다. 일반적으로 효소농도와 반응온도가 높을 때 DPPH radical 소거능이 증가하는 경향을 보였으며 효소농도 0.24 mL/L, 반응온도 58.43°C, 반응시간 66.45 min 일 때 최적 효소처리조건으로 DPPH radical 소거능이 59.0%로 예측되었다.

SOD-like 활성능에 미치는 영향을 분석한 결과는 Fig. 68과 같다. 효소처리공정에서 반응시

간은 반응온도(**Fig. 68-A, B, C**)와 효소농도(**Fig. 68-D, E, F**)보다 영향이 더 작고, 반응온도와 효소농도 사이의 영향력은 비슷하게 나타났다(**Fig. 68-G, H, I**). 흥미영역에서의 반응평균 값은 19.39%이었다. 반응시간이 길수록 SOD-like 활성능은 증가하는 것으로 나타났으며 최적 효소처리조건으로 효소농도 0.05 mL/L, 반응온도 48.60°C 및 반응시간 116.57 min 일 때 오디 추출물의 SOD-like 활성능은 22.29%로 예측되었다.

효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 오디 추출물의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능을 다중반응표면의 최적화방법으로써 만족 함수(desirability function)를 이용하여 종속변수들의 가중치를 1로 놓고 종합적으로 판단한 결과 (**Fig. 69**) 최적 효소처리 조건은 효소농도 0.25 mL/L, 반응온도 43.35°C 및 반응시간 61.67 min의 조건이었으며 이때의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능은 각각 7.67%, 6.57 mg/g, 3.46 mg/ml, 5.15 mg/100 g, 58.25% 및 20.79%이었고 전반적인 만족도(overall desirability)는 0.82이었다.

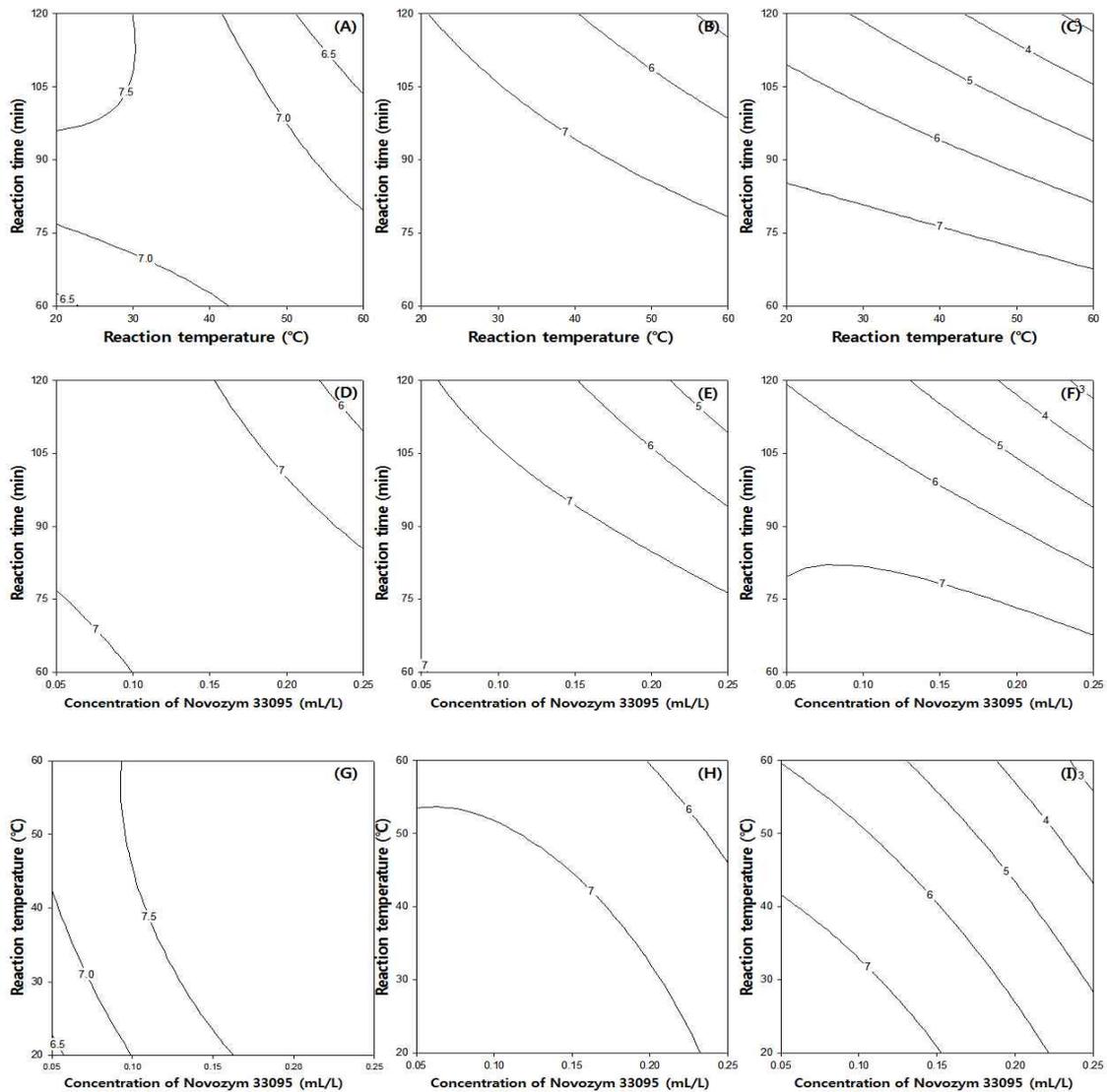


Fig. 63. Contour plot for yield (%) of mulberry Anthocyanin by Novozym 33095 enzyme treatment.

(Conc. of Novozym 33095, A: 0.05 mL/L, B: 0.15 mL/L, C: 0.25 mL/L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 60 min, H: 90 min., I: 120 min)

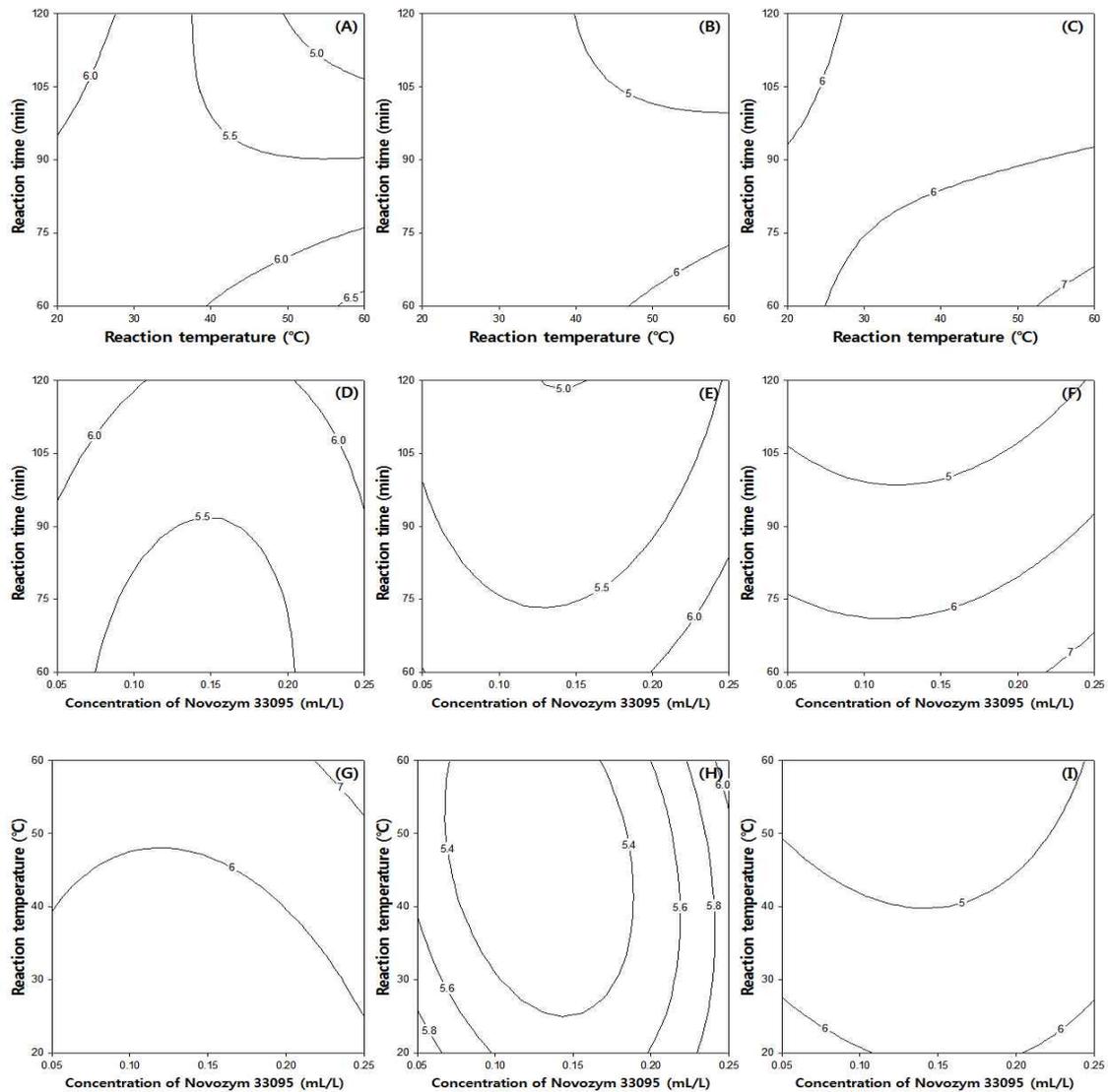


Fig. 64. Contour plot for Total Polyphenol contents (mg/g) of Novozym 33095 enzyme treatment from mulberry extracts.

(Conc. of Novozym 33095, A: 0.05 mL/L, B: 0.15 mL/L, C: 0.25 mL/L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 60 min, H: 90 min., I: 120 min)

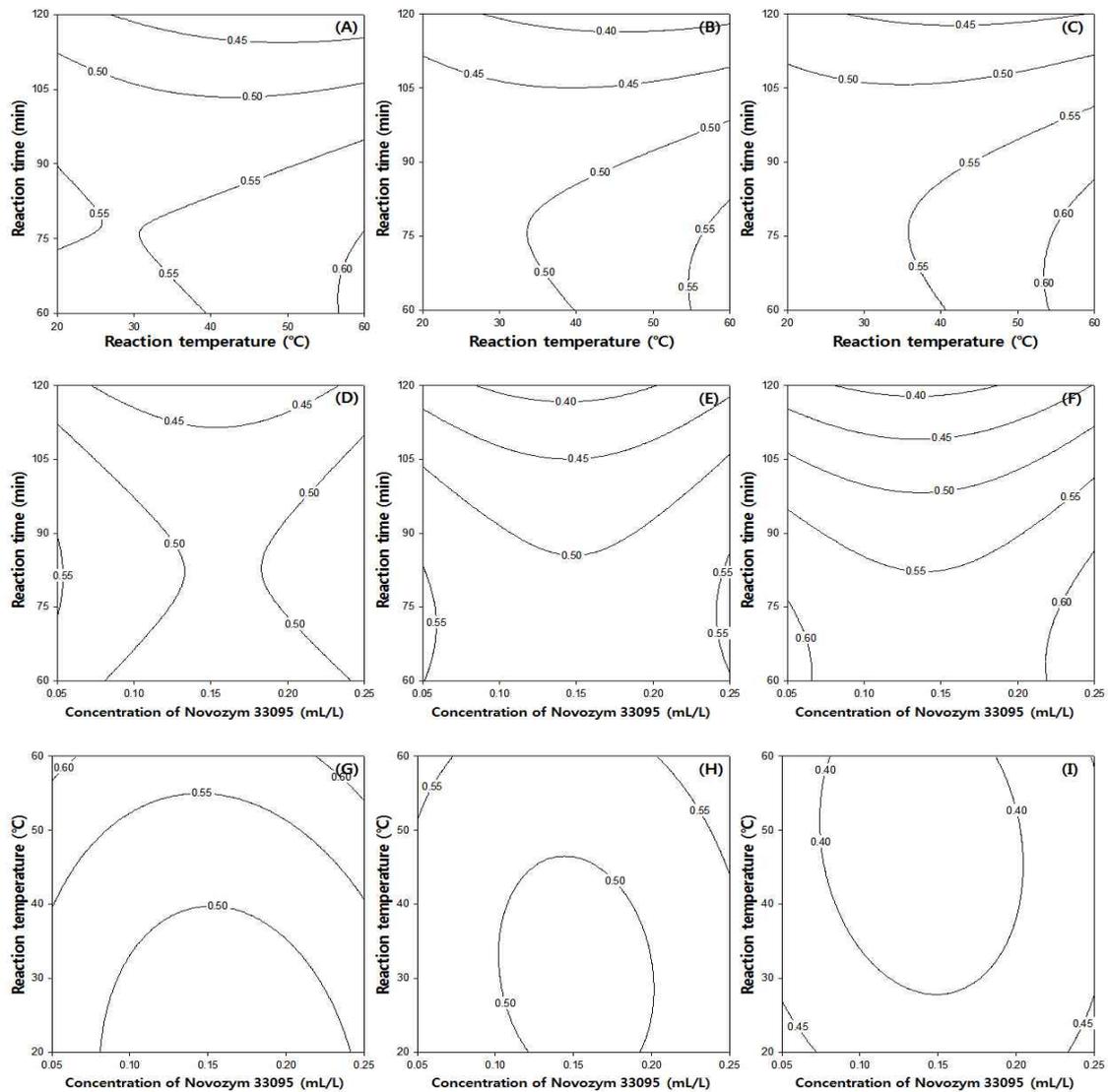


Fig. 66. Contour plot for Total Anthocyanin contents (mg/100 g) of Novozym 33095 enzyme treatment from mulberry extracts.

(Conc. of Novozym 33095, A: 0.05 mL/L, B: 0.15 mL/L, C: 0.25 mL/L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 60 min, H: 90 min., I: 120 min)

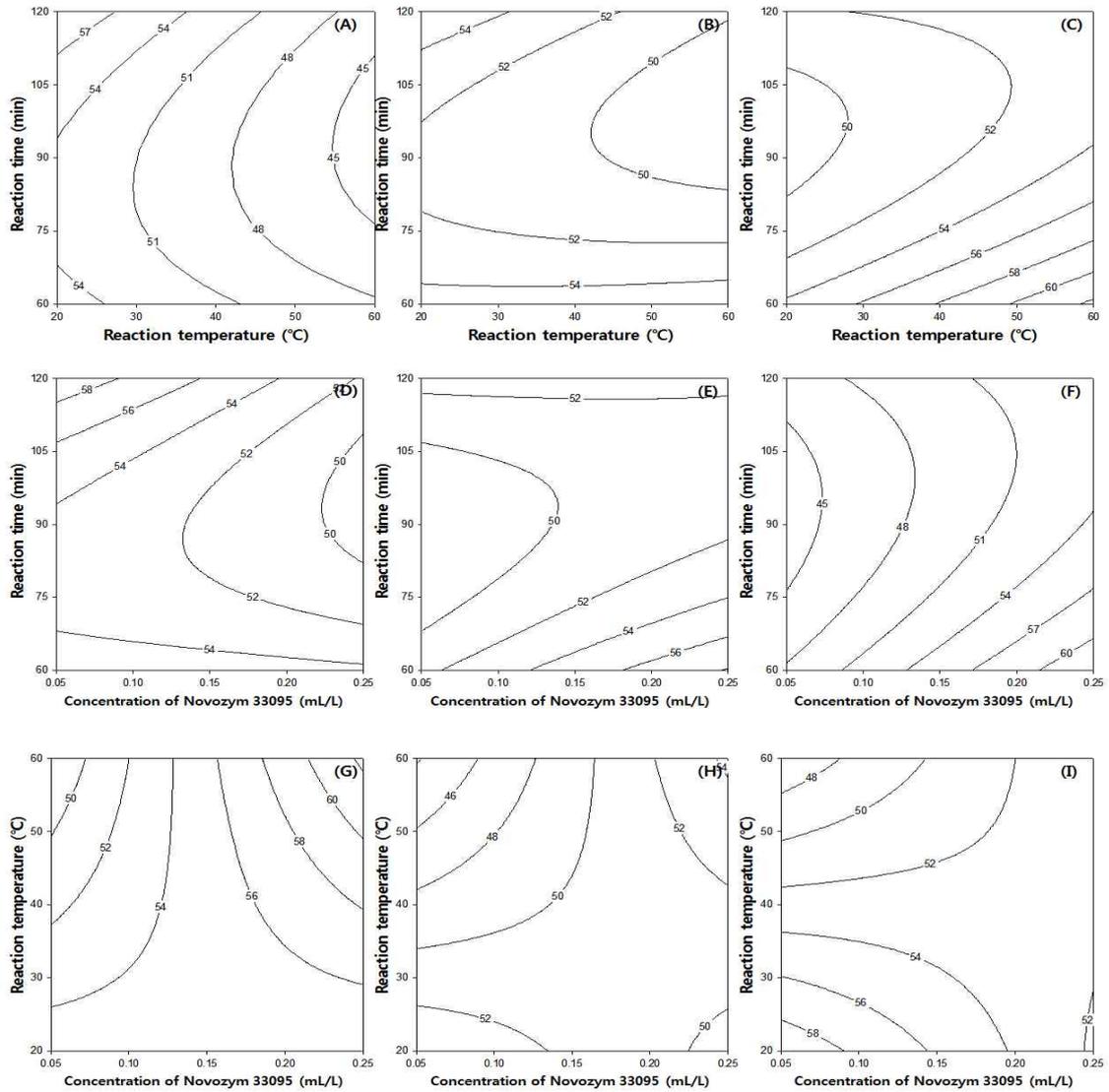


Fig. 67. Contour plot for DPPH radical scavenging activity (%) of Novozym 33095 enzyme treatment from mulberry extracts.

(Conc. of Novozym 33095, A: 0.05 mL/L, B: 0.15 mL/L, C: 0.25 mL/L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 60 min, H: 90 min, I: 120 min)

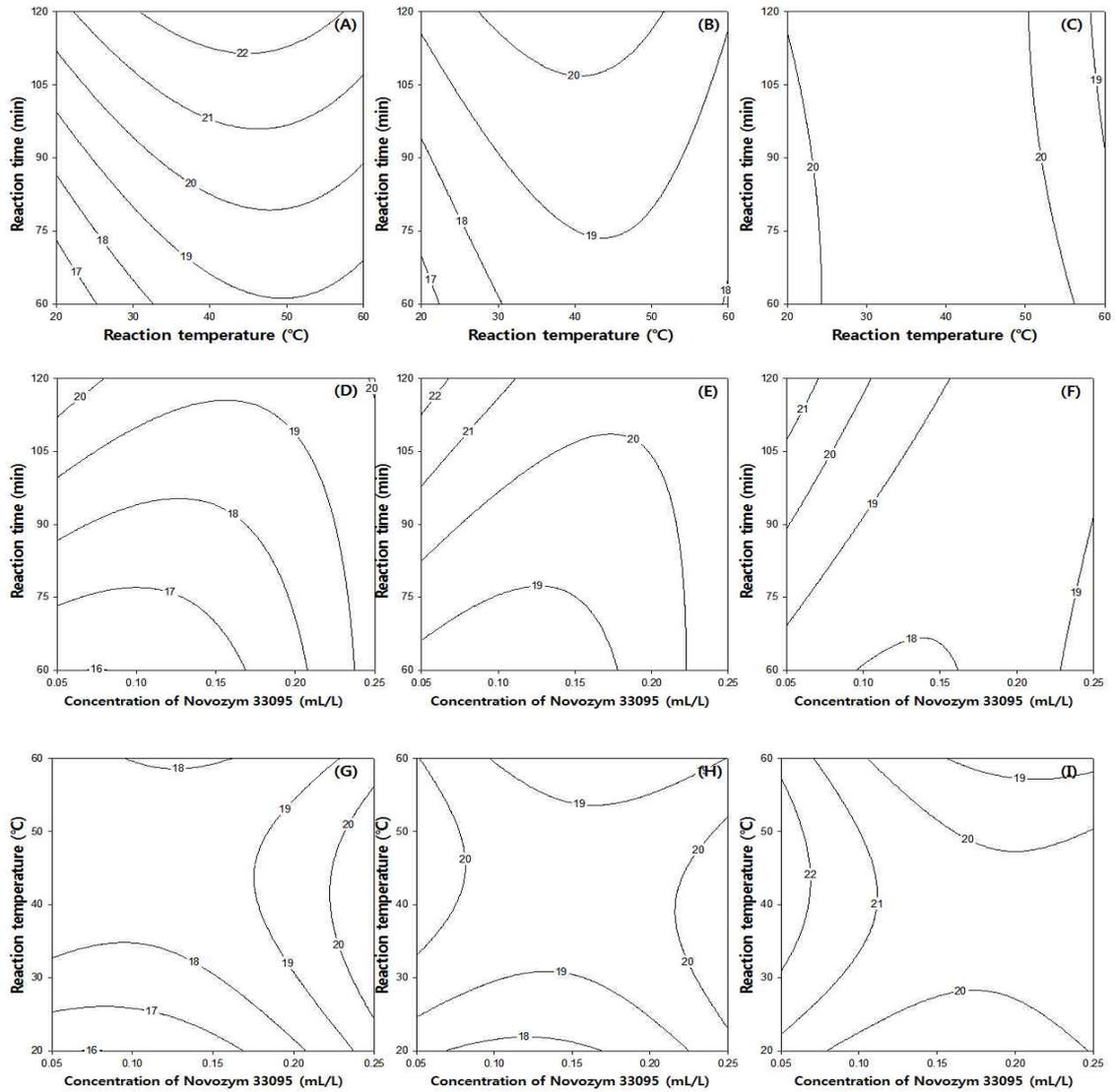


Fig. 68. Contour plot for SOD-like activity (%) of Novozym 33095 enzyme treatment from mulberry extracts.

(Conc. of Novozym 33095, A: 0.05 mL/L, B: 0.15 mL/L, C: 0.25 mL/L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 60 min, H: 90 min., I: 120 min)

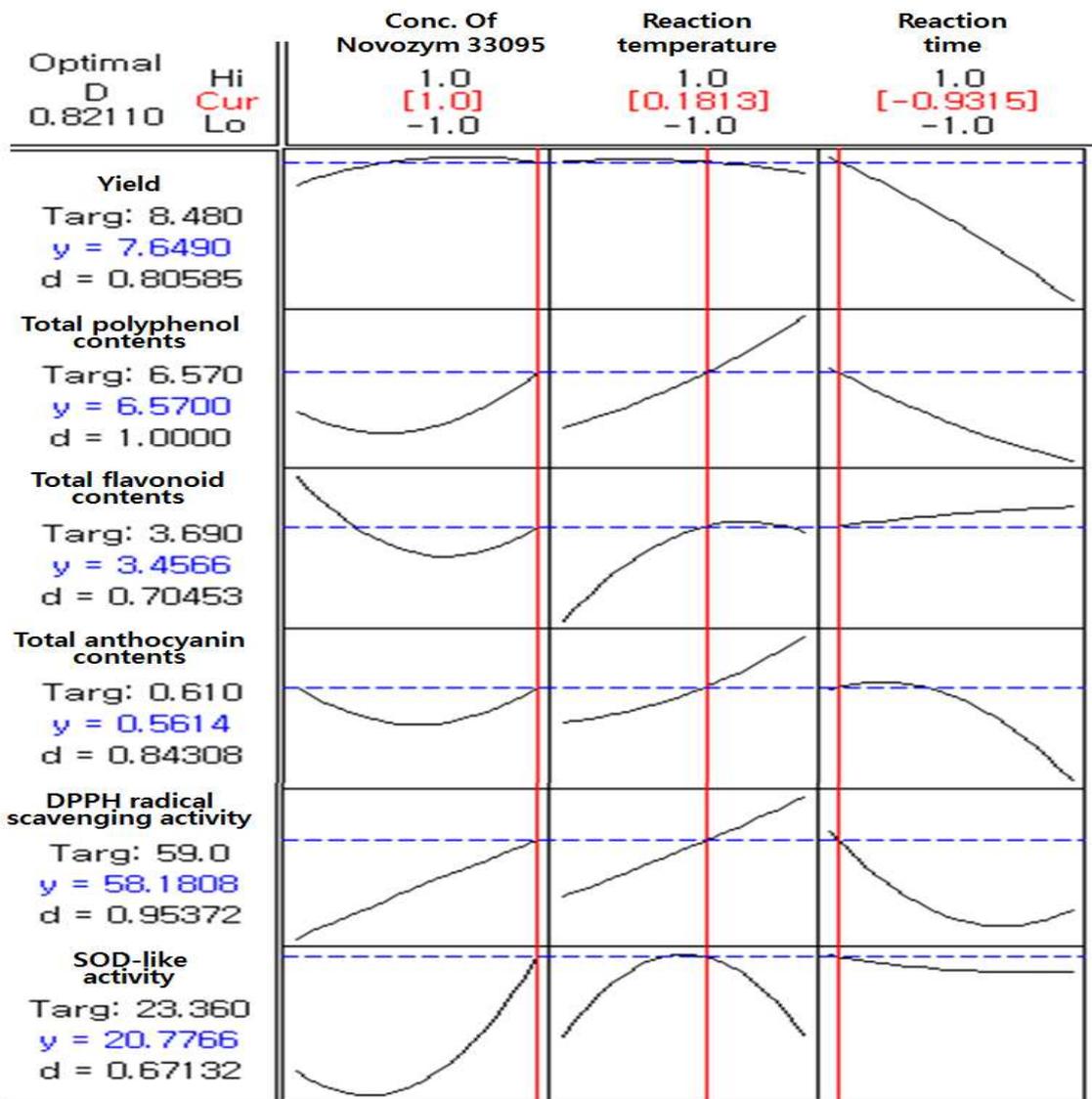


Fig. 69. Response optimization for multi-response surface of Novozym 33095 enzyme treatment from mulberry extracts.

사. Novozym 33095를 이용한 자영의 최적 효소 처리 공정

(1) 수율 및 항산화활성

여섯 가지 요인으로서 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 자영 추출물의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능을 분석한 결과는 **Table 61**과 같았다.

자영을 Novozym 33095 처리 하였을 때의 수율은 1.31-4.92% 범위로 나타났으며, 효소농도 0.11 mL/L, 반응온도 20°C 및 반응시간 60 min의 조건에서 4.92%로 최적값을 보였다.

Total polyphenol 함량의 경우 무처리 시에는 3.74 mg/g이었는데, 본 실험에서 효소처리의 흥미영역 구간 실험점에서의 범위는 1.15-3.45 mg/g로 나타났다. 효소농도 0.25 mL/L, 반응온도 60°C, 반응시간 63.85 min일 때 3.45 mg/g으로 최적값을 보였으며, 이는 무처리 시의 92% 수준이었다.

Total flavonoid 함량의 경우 무처리 시에 2.26 mg/ml이었고, 효소처리의 흥미영역 구간 실험점에서의 범위는 2.35-8.88 mg/ml로 나타났다. 효소농도 0.25 mL/L, 반응온도 38.04°C, 반응시간 120 min일 때 7.20 mg/ml로 최적값을 보였으며, 이는 무처리 시의 319% 수준이었다.

Total Anthocyanin 함량의 경우 무처리 시에는 0.06 mg/100 g 이었으나 본 실험의 효소처리의 흥미영역 구간 실험 점에서 Total Anthocyanin 함량의 범위는 0.08-0.17 mg/100 g로 나타났다. 효소농도 0.05 mL/L, 반응온도 57.80°C 및 반응시간 102.73 min의 조건에서 0.15 mg/100 g으로 최적값을 보였으며 무처리 시의 Total Anthocyanin 함량의 250% 수준이었다.

DPPH radical 소거능은 무처리 시에는 50.55% 였으나 효소처리 시 20.43-48.49%로 나타났다. 효소농도 0.25 mL/L, 반응온도 42.13°C 및 반응시간 70.70 min의 조건에서 48.49%로 최적값을 보였으며 무처리 시의 96% 수준이었다.

SOD-like 활성능의 경우 무처리 시 0.66%였으나, 효소처리 시 4.79-14.48%로 나타났다. 효소농도 0.05 mL/L, 반응온도 60°C 및 반응시간 62.42 min의 조건에서 12.83%로 최적값이 나타났으며 무처리 시의 1944% 수준이었다.

Table 61. Central composite design for Novozym 33095 enzyme treatment from purple-fleshed potato extracts and its dependent variables.

Coded levels of variable				Responses				
X ₁	X ₂	X ₃	Yield (%)	Total polyphenol contents (mg/g)	Total flavonoid contents (mg/ml)	Total Anthocyanin contents (mg/100g)	DPPH radical scavenging activity (%)	SOD-like activity (%)
0	-1	1	2.11	2.67±0.15 ^{cd}	2.61±0.12 ^b	0.14±0.004 ^d	28.44±2.81 ^f	7.68±0.53 ^{bc}
0	1	-1	2.63	3.45±0.36 ^a	2.85±0.06 ^b	0.15±0.006 ^c	32.33±0.83 ^e	6.93±0.53 ^{cd}
0	0	0	2.17	2.67±0.14 ^{cd}	2.62±0.14 ^b	0.11±0.001 ^f	31.57±2.61 ^e	8.94±0.18 ^b
0	-1	-1	4.07	3.19±0.50 ^{ab}	2.95±0.14 ^b	0.08±0.005 ^h	40.34±2.90 ^c	5.04±1.42 ^e
-1	0	1	2.45	2.57±0.03 ^{cd}	2.57±0.01 ^b	0.17±0.008 ^a	39.34±1.49 ^c	8.94±0.18 ^b
-1	-1	0	4.92	2.17±0.59 ^{ef}	2.70±0.10 ^b	0.08±0.010 ^h	25.56±1.24 ^g	5.54±0.36 ^{de}
-1	0	-1	3.55	1.99±0.13 ^f	2.50±0.05 ^b	0.09±0.002 ^g	31.20±2.08 ^e	8.82±0.36 ^b
0	0	0	3.71	2.53±0.32 ^{de}	2.52±0.02 ^b	0.11±0.001 ^f	36.59±0.61 ^d	6.93±0.18 ^{cd}
1	1	0	2.45	2.69±0.04 ^{cd}	2.58±0.01 ^b	0.13±0.004 ^e	38.84±0.79 ^c	8.06±0.36 ^{bc}
0	0	0	1.37	2.99±0.03 ^{bc}	2.69±0.06 ^b	0.16±0.006 ^b	42.98±1.64 ^b	6.80±0.71 ^{de}
1	0	-1	2.09	3.45±0.34 ^a	2.92±0.11 ^b	0.11±0.002 ^f	48.49±0.90 ^a	6.05±0.71 ^{de}
1	0	1	2.72	3.11±0.38 ^{ab}	8.88±8.37 ^a	0.08±0.000 ^h	39.10±0.08 ^c	4.79±1.07 ^e
1	-1	0	1.42	3.08±0.47 ^{abc}	2.81±0.21 ^b	0.13±0.015 ^e	33.34±0.59 ^e	8.06±0.71 ^{bc}
0	1	1	2.33	1.15±0.21 ^g	2.35±0.10 ^b	0.09±0.003 ^g	20.43±0.32 ^h	6.80±1.42 ^{cd}
-1	1	0	1.31	3.36±0.30 ^{ab}	2.63±0.12 ^b	0.15±0.007 ^{cd}	24.93±2.48 ^g	14.48±0.53 ^a

X₁: Concentration of Novozym (mL/L), X₂: Reaction Temperature (°C), X₃: Reaction Time (min)

(2) 이차다항회귀곡선식

홍미구역 안에서 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 자영 추출물의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능에 미치는 정도를 분산 분석한 결과 **Table 62**와 같다.

수율에 영향을 미치는 요인으로 반응온도가 가장 컸으며, 효소농도, 반응시간 순으로 나타났다. 세 가지 요인에서 모두 5% 내에서 유의성차이를 나타내었다. Total polyphenol 함량은 반응시간의 영향이 가장 컸으며, 효소농도, 반응온도 순으로 나타났고 반응시간에 대해서만 5% 내에서 유의성차이를 나타내었다. Total flavonoid 함량에서는 효소농도의 영향이 크고 반응시간, 반응온도 순으로 나타났으며 반응온도를 제외한 두 가지 요인이 5% 내에서 유의성차이를 보였다. Total Anthocyanin 함량에 영향을 미치는 요인으로 반응시간이 가장 컸으며 반응온도, 효소농도 순으로 나타났고 세 가지 요인 모두 5% 내에서 유의성차이를 나타내었다. DPPH radical 소거능에서는 효소농도가 가장 컸으며 반응온도, 반응시간 순이었고, 세 가지 요인에서 모두 5% 내에서 유의성 차이를 나타내었다. SOD-like 활성능도 효소농도, 반응온도, 반응시간 순으로 나타났고, 반응시간을 제외한 두 가지 요인에 대해 5% 내에서 유의성차이를 보였다.

처리 요인의 수준에 대하여 종속변수인 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능을 예측하기 위한 이차다항회귀곡선식의 회귀계수를 계산한 결과는 **Table 63**과 같다. 또한, 종속변수에 대한 이차다항회귀곡선식의 일차다항회귀(linear), 이차다항회귀(quadratic) 및 교차회귀(cross product)의 기여도를 검정하였다.(**Table 64**)

수율과 Total Polyphenol 함량의 기여도는 교차회귀, 일차다항회귀 및 이차다항회귀 순으로 나타났으며, Total Flavonoid 함량의 기여도는 일차다항회귀, 교차회귀 및 이차다항회귀 순으로 나타났다. Total Anthocyanin 함량의 기여도는 교차회귀, 일차다항회귀 및 이차다항회귀 순으로, DPPH radical 소거능의 경우 일차다항회귀, 이차다항회귀 및 교차회귀 순으로 기여도가 나타났으며, SOD-like 활성능의 기여도는 일차다항회귀, 교차회귀 및 이차다항회귀 순으로 나타났다. 이차다항회귀곡선식 적합성 검정에서의 total regression은 모두 5% 이내에서 유의성 차이를 보였다.

Table 62. Analysis of variance for the effects of three variables on yield, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, Total Anthocyanin contents and antioxidative activities of Novozym 33095 enzyme treatment from purple-fleshed potato extracts.

	Factors	Yield	Total polyphenol contents	Total flavonoid contents	Total Anthocyanin contents	DPPH radical scavenging activity	SOD-like activity
X ₁	F value	10.61	2.59	4.22	9.71	6.77	11.05
	Prob>F	<.0001	0.0682	0.0068	<.0001	0.0013	<.0001
X ₂	F value	10.89	2.46	0.51	12.07	5.96	9.97
	Prob>F	<.0001	0.0782	0.7300	<.0001	0.0025	0.0001
X ₃	F value	3.64	3.17	3.63	16.21	3.85	2.85
	Prob>F	0.0220	0.0359	0.0141	<.0001	0.0177	0.0507

X₁: Concentration of Novozym (mL/L), X₂: Reaction Temperature (°C), X₃: Reaction Time (min)

Table 63. Regression coefficients of second degree polynomials for yield, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, Total Anthocyanin contents and antioxidative activities of Novozym 33095 enzyme treatment from purple-fleshed potato extracts.

Parameters	Estimate					
	Yield	Total polyphenol contents	Total flavonoid contents	Total Anthocyanin contents	DPPH radical scavenging activity	SOD-like activity
Intercept	15.839	-2.069	12.023	-0.362	8.795	-14.438
X ₁ ¹⁾	-41.000	13.631	-58.933	1.221	107.788	11.369
X ₂ ²⁾	-0.192	0.100	0.150	0.006	1.368	0.239
X ₃ ³⁾	-0.115	0.047	-0.212	0.006	-0.105	0.353
X ₁ *X ₁	1.292	13.292	79.944	-0.333	138.479	100.792
X ₂ *X ₁	0.580	-0.198	-0.020	-0.008	0.768	-1.118
X ₂ *X ₂	0.000	0.000	-0.002	0.000	-0.019	0.001
X ₃ *X ₁	0.144	-0.077	0.491	-0.009	-1.463	-0.116
X ₃ *X ₂	0.001	-0.001	0.000	0.000	0.000	-0.001
X ₃ *X ₃	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001	-0.002

¹⁾X₁: Concentration of Novozym (mL/L), ²⁾X₂: Reaction Temperature (°C), ³⁾X₃: Reaction Time (min)

Table 64. Determination coefficients and probability of second degree polynomials for yield, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, Total Anthocyanin contents and antioxidative activities of Novozym 33095 enzyme treatment from purple-fleshed potato extracts.

	Regressions	Linear	Quadratic	Cross product	Total regress
	R ²	0.29	0.02	0.45	0.76
Yield	F value	7.91	0.54	12.52	6.99
	Prob>F	0.0011	0.6579	<.0001	0.0002
Total polyphenol contents	R ²	0.24	0.02	0.27	0.52
	F value	3.35	0.23	3.70	2.43
	Prob>F	0.0397	0.8755	0.0287	0.0474
Total flavonoid contents	R ²	0.15	0.12	0.15	0.42
	F value	3.07	2.37	2.91	2.79
	Prob>F	0.0403	0.0869	0.0480	0.0142
Total Anthocyanin contents	R ²	0.12	0.03	0.56	0.71
	F value	4.85	1.15	22.29	9.43
	Prob>F	0.0063	0.3417	<.0001	<.0001
DPPH radical scavenging activity	R ²	0.34	0.30	0.11	0.75
	F value	9.04	7.90	2.77	6.57
	Prob>F	0.0006	0.0011	0.0681	0.0002
SOD-like activity	R ²	0.34	0.16	0.28	0.78
	F value	10.33	4.92	8.48	7.91
	Prob>F	0.0003	0.0102	0.0008	<.0001

(3) 효소처리공정 최적화

효소농도, 반응온도와 반응시간이 자영 추출물의 수율에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 **Fig. 70**과 같다. 효소처리공정에서 반응시간은 반응온도(**Fig. 70-A, B, C**)나 효소농도(**Fig. 70-D, E, F**)보다 영향이 적고, 반응온도와 효소농도는 영향이 비슷하게 나타났다(**Fig. 70-G, H, I**). 효소처리 흥미영역에서의 반응평균(response mean) 값은 2.62%이었다. 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 자영의 수율을 반응표면분석한 결과 일반적으로 반응온도가 낮고 반응시간이 짧을수록 수율이 증가하는 경향을 나타내었으며 효소농도 0.11 mL/L, 반응온도 20°C 및 반응시간 60 min 일 때가 최적 효소처리조건으로 4.92%로 예측되었다.

Total polyphenol 함량에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 **Fig. 71**과 같다. 효소처리공정에서 반응시간과 반응온도(**Fig. 71-A, B, C**), 반응시간과 효소농도(**Fig. 71-D, E, F**), 반응온도와 효소농도(**Fig. 71-G, H, I**) 사이에서 모두 비슷한 영향력을 보였다. 효소처리 흥미영역에서의 반응평균 값은 2.74 mg/g이었다. 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 자영의 Total Polyphenol 함량을 반응표면분석한 결과 일반적으로 효소농도와 반응온도가 높을수록 증가하는 경향을 보였으며 효소농도 0.25 mL/L, 반응온도 60°C 및 반응시간 63.85 min 일 때가 최적 효소처리 조건으로 그 때의 Total Polyphenol 함량은 3.45 mg/g으로 예측되었다.

Total flavonoid 함량에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 **Fig. 72**와 같다. 효소처리공정에서 반응시간은 반응온도보다 영향이 크지만(**Fig. 72-A, B, C**), 효소농도보다는 더 작고(**Fig. 72-D, E, F**), 반응온도는 효소농도보다 영향이 더 작게 나타났다(**Fig. 72-G, H, I**). 효소처리 흥미영역에서의 반응평균 값은 3.08 mg/ml이었다. Total flavonoid 함량은 일반적으로 효소농도가 높고 반응시간이 길 때 증가하는 경향을 나타내었으며 효소농도 0.25 mL/L, 반응온도 38.04°C, 반응시간 120 min 일 때가 최적 효소처리 조건으로 7.20 mg/ml로 예측되었다.

효소농도, 반응온도와 반응시간이 자영 추출물의 Total Anthocyanin 함량에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 **Fig. 73**과 같다. 효소처리공정에서 반응시간과 반응온도(**Fig. 73-A, B, C**), 반응시간과 효소농도(**Fig. 73-D, E, F**), 반응온도와 효소농도(**Fig. 73-G, H, I**) 사이에서 모두 비슷한 영향력을 보였다. 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 자영의 Total Anthocyanin 함량을 반응 표면 분석한 결과 일반적으로 효소농도와 반응온도가 낮고, 반응시간이 길수록 Total Anthocyanin 함량이 증가하는 경향을 나타내었으며 효소농도 0.05 mL/L, 반응온도 57.80°C 및 반응시간 102.73 min 일 때가 최적 효소처리조건으로 10.15 mg/100 g으로 예측되었다.

DPPH radical 소거능에 미치는 영향을 분석한 결과는 **Fig. 74**와 같다. 효소처리공정에서 반응시간은 반응온도보다 영향이 작으나(**Fig. 74-A, B, C**) 효소농도보다는 영향이 크고(**Fig. 74-D, E, F**), 반응온도는 효소농도보다 더 큰 영향을 나타냈다(**Fig. 74-G, H, I**). 효소처리 흥미영역에서의 반응평균 값은 34.23%이었다. 일반적으로 효소농도와 반응온도가 비교적 높을 때 DPPH radical 소거능이 증가하는 경향을 보였으며 효소농도 0.25 mL/L, 반응온도 42.13°C, 반응시간 70.70 hr 일 때 최적 효소처리조건으로 DPPH radical 소거능이 48.49%로 예측되었다.

SOD-like 활성능에 미치는 영향을 분석한 결과는 **Fig. 75**와 같다. 효소처리공정에서 반응시간은 반응온도(**Fig. 75-A, B, C**)나 효소농도(**Fig. 75-D, E, F**)보다 영향력이 적으며, 반응온

도는 효소농도와 비슷한 영향력을 나타냈다(**Fig. 75-G, H, I**). 흥미영역에서의 반응평균 값은 7.59%이었다. 효소농도가 낮고, 반응온도가 높을수록 SOD-like 활성능은 증가하는 것으로 나타났다으며 최적 효소처리조건으로 효소농도 0.05 mL/L, 반응온도 60°C 및 반응시간 62.42 min 일 때 자영 추출물의 SOD-like 활성능은 12.83%로 예측되었다.

효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 자영 추출물의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능을 다중반응표면의 최적화방법으로써 만족 함수(desirability function)를 이용하여 종속변수들의 가중치를 1로 놓고 종합적으로 판단한 결과 (**Fig. 76**) 최적 효소처리 조건은 효소농도 0.05 mL/L, 반응온도 49.87°C 및 반응시간 60 min의 조건이었으며 이때의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능은 각각 2.92%, 2.97 mg/g, 3.92 mg/ml, 0.11 mg/100 g, 30.41% 및 9.98%이었고 전반적인 만족도 (overall desirability)는 0.44였다.

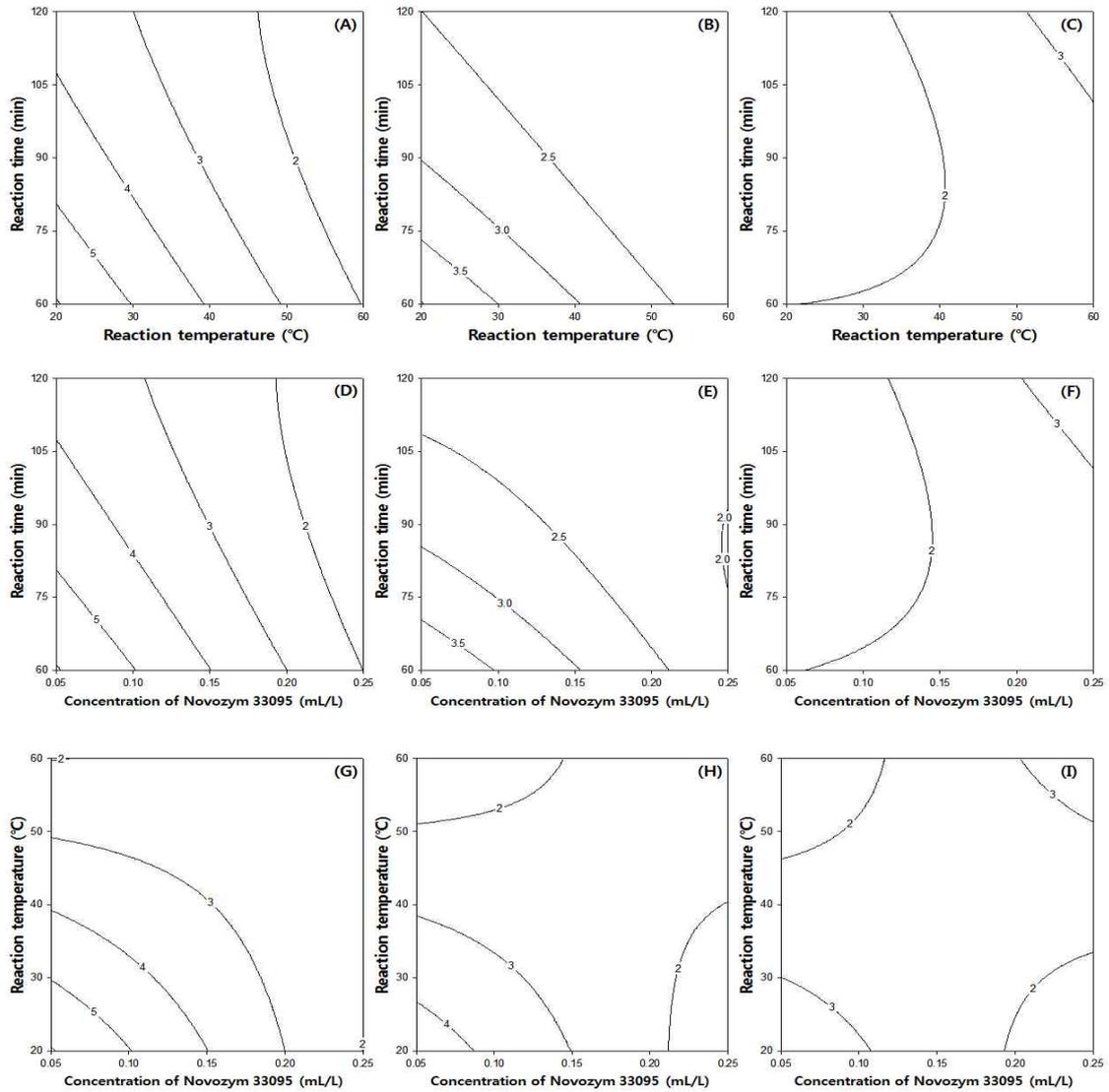


Fig. 70. Contour plot for yield (%) of purple-fleshed potato Anthocyanin by Novozym 33095 enzyme treatment.

(Conc. of Novozym 33095, A: 0.05 mL/L, B: 0.15 mL/L, C: 0.25 mL/L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 60 min, H: 90 min., I: 120 min)

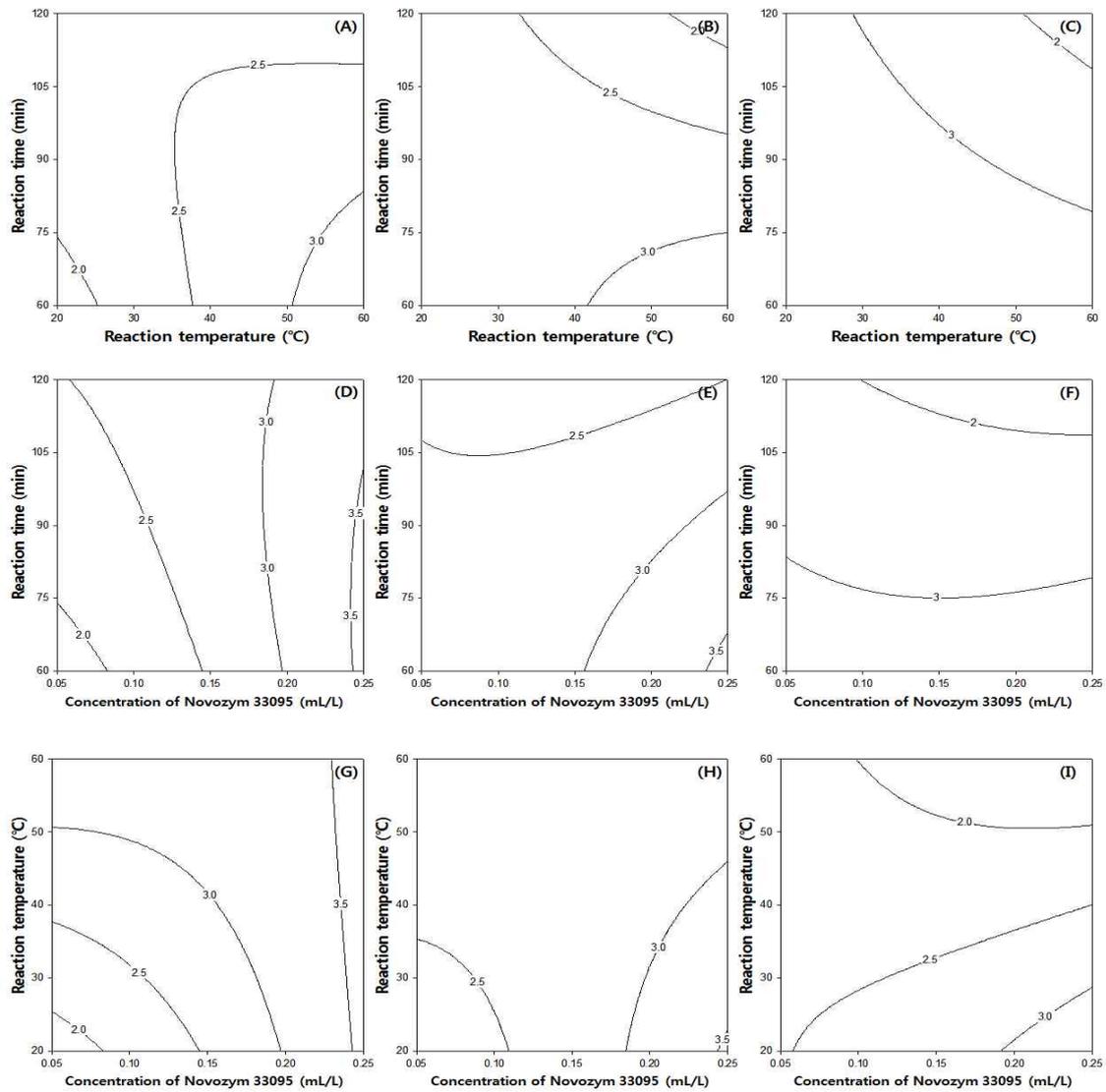


Fig. 71. Contour plot for Total Polyphenol contents (mg/g) of Novozym 33095 enzyme treatment from purple-fleshed potato extracts.

(Conc. of Novozym 33095, A: 0.05 mL/L, B: 0.15 mL/L, C: 0.25 mL/L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 60 min, H: 90 min., I: 120 min)

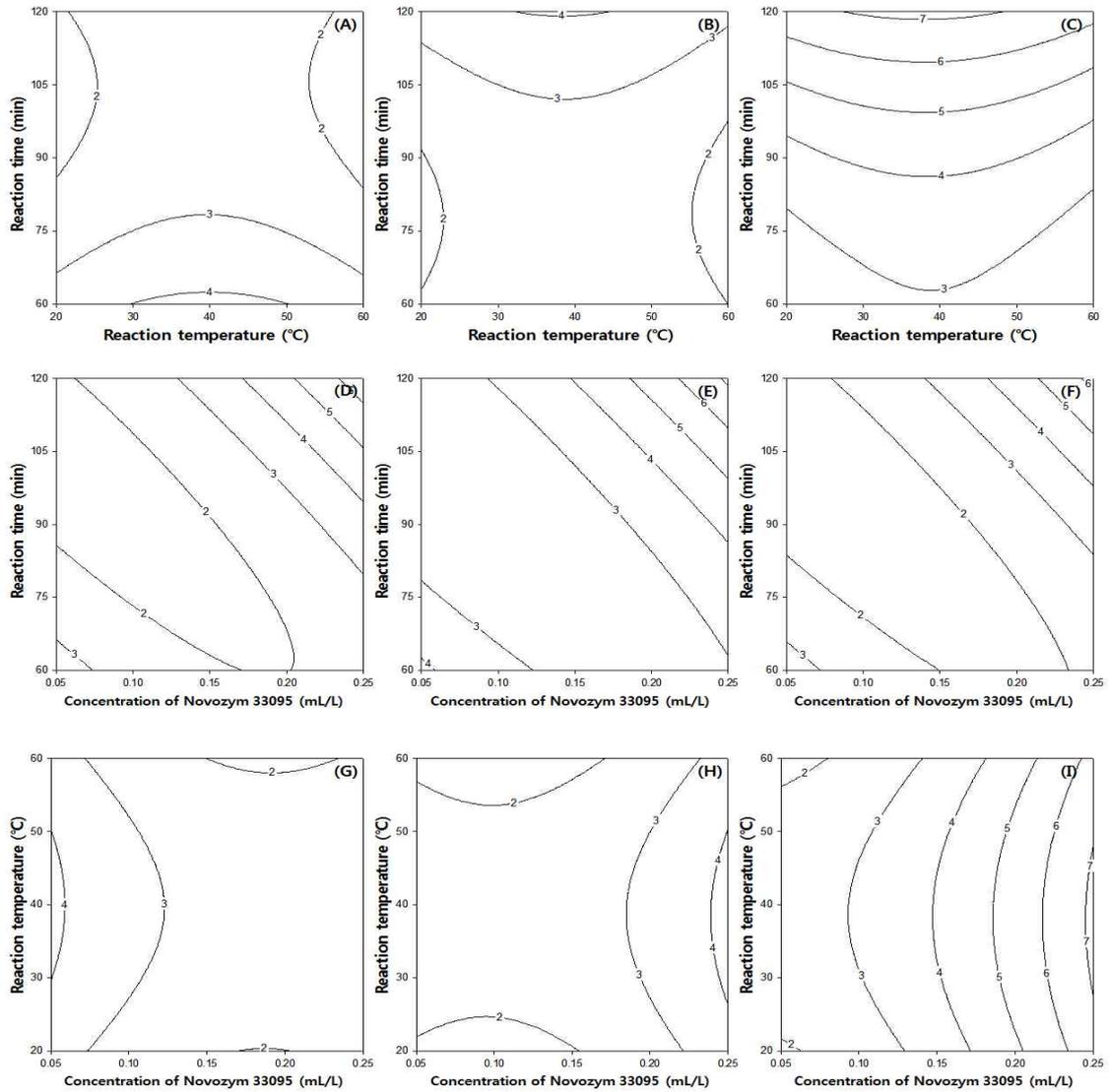


Fig. 72. Contour plot for Total Flavonoid contents (mg/mL) of Novozym 33095 enzyme treatment from purple-fleshed potato extracts.

(Conc. of Novozym 33095, A: 0.05 mL/L, B: 0.15 mL/L, C: 0.25 mL/L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 60 min, H: 90 min., I: 120 min)

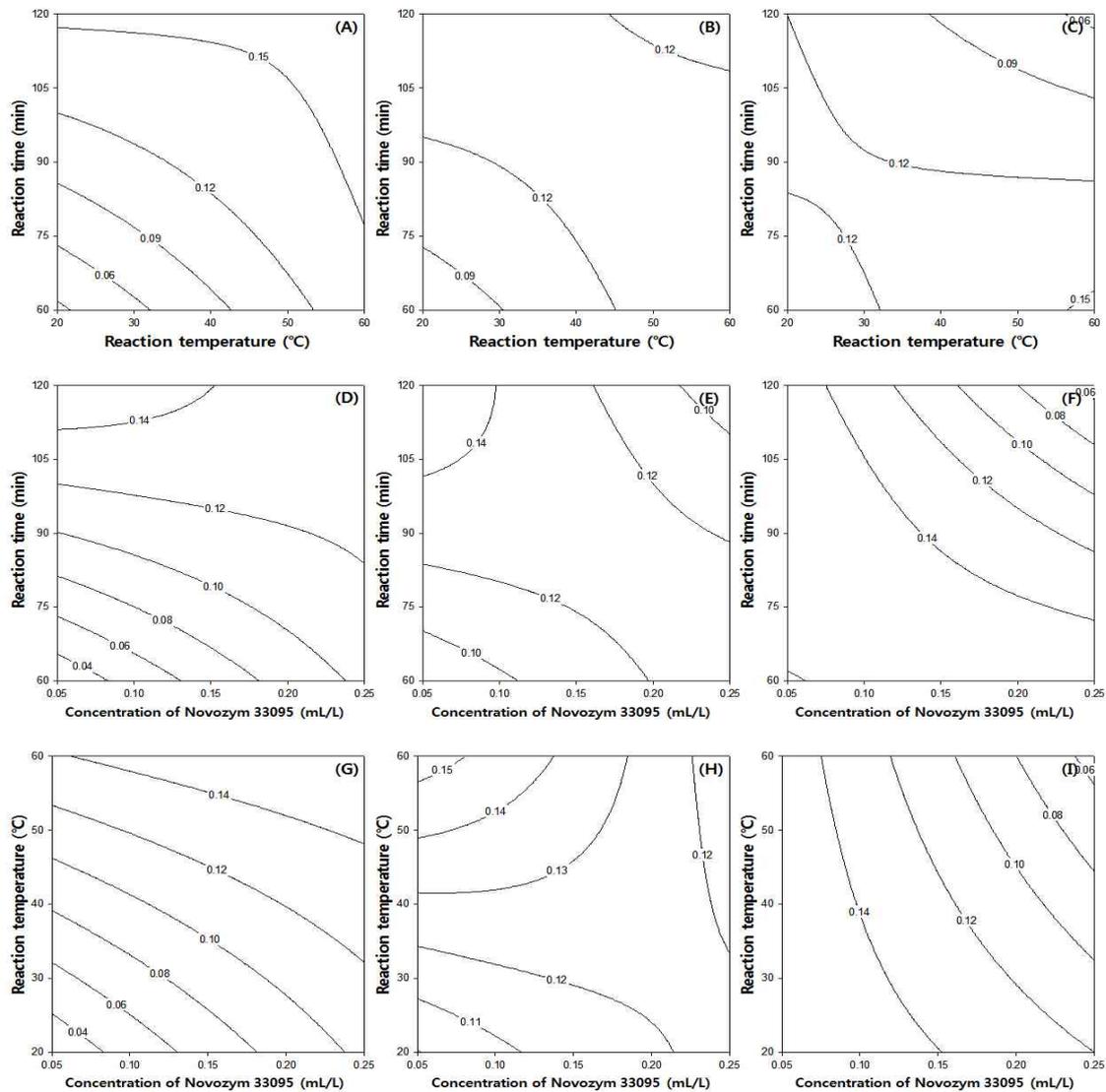


Fig. 73. Contour plot for Total Anthocyanin contents (mg/100 g) of Novozym 33095 enzyme treatment from purple-fleshed potato extracts.

(Conc. of Novozym 33095, A: 0.05 mL/L, B: 0.15 mL/L, C: 0.25 mL/L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 60 min, H: 90 min., I: 120 min)

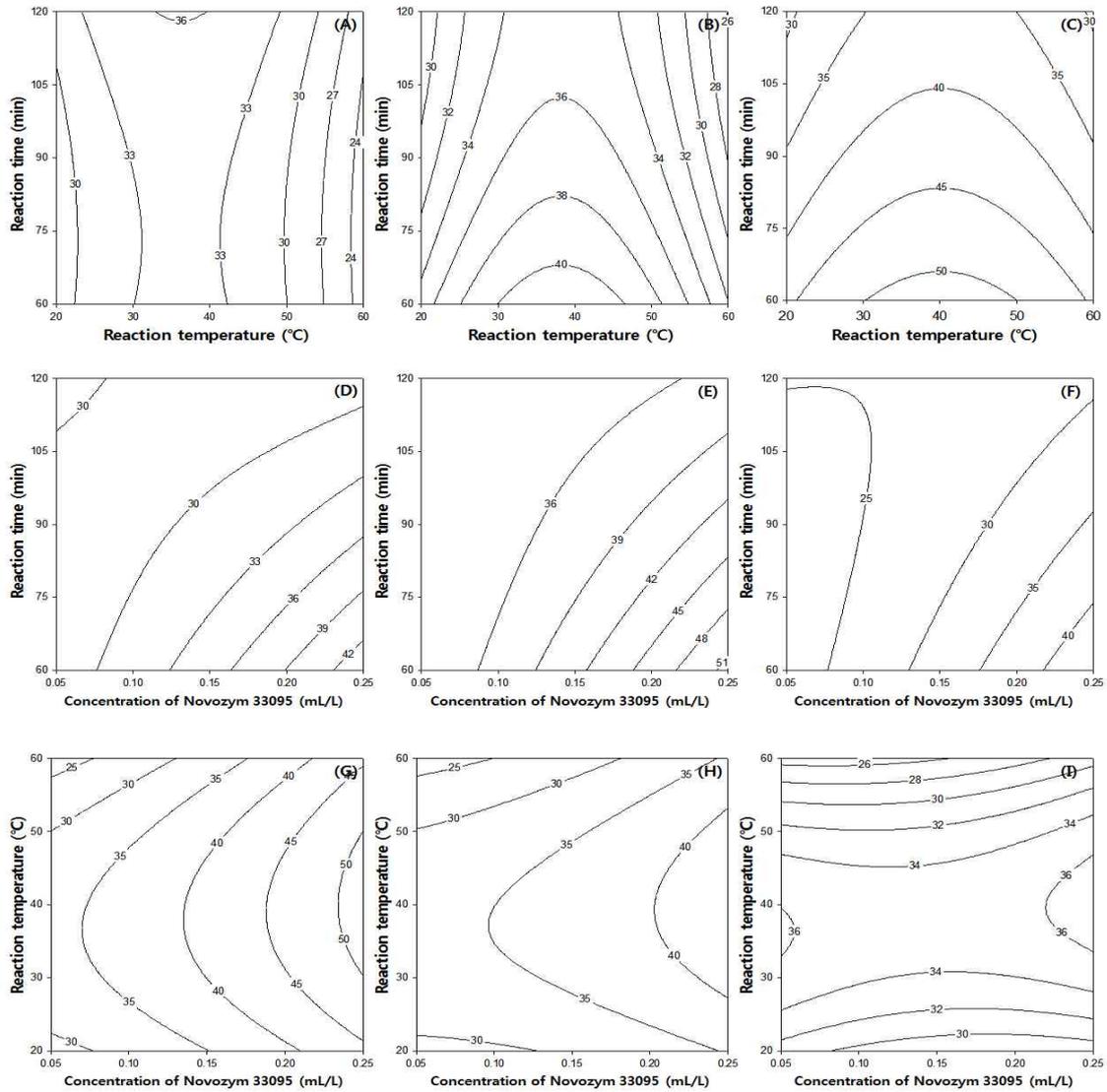


Fig. 74. Contour plot for DPPH radical scavenging activity (%) of Novozym 33095 enzyme treatment from purple-fleshed potato extracts.

(Conc. of Novozym 33095, A: 0.05 mL/L, B: 0.15 mL/L, C: 0.25 mL/L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 60 min, H: 90 min., I: 120 min)

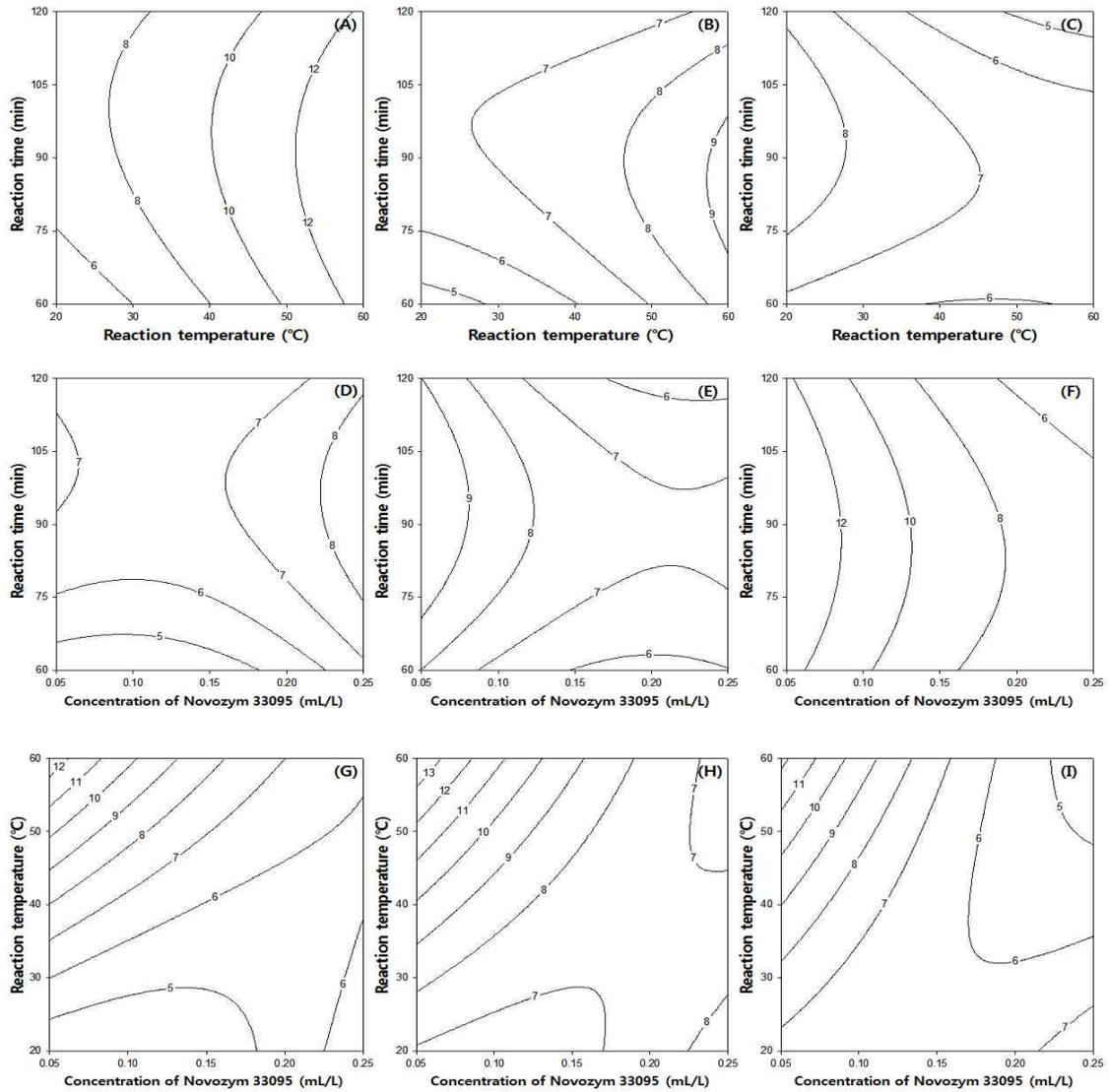


Fig. 75. Contour plot for SOD-like activity (%) of Novozym 33095 enzyme treatment from purple-fleshed potato extracts.

(Conc. of Novozym 33095, A: 0.05 mL/L, B: 0.15 mL/L, C: 0.25 mL/L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 60 min, H: 90 min., I: 120 min)

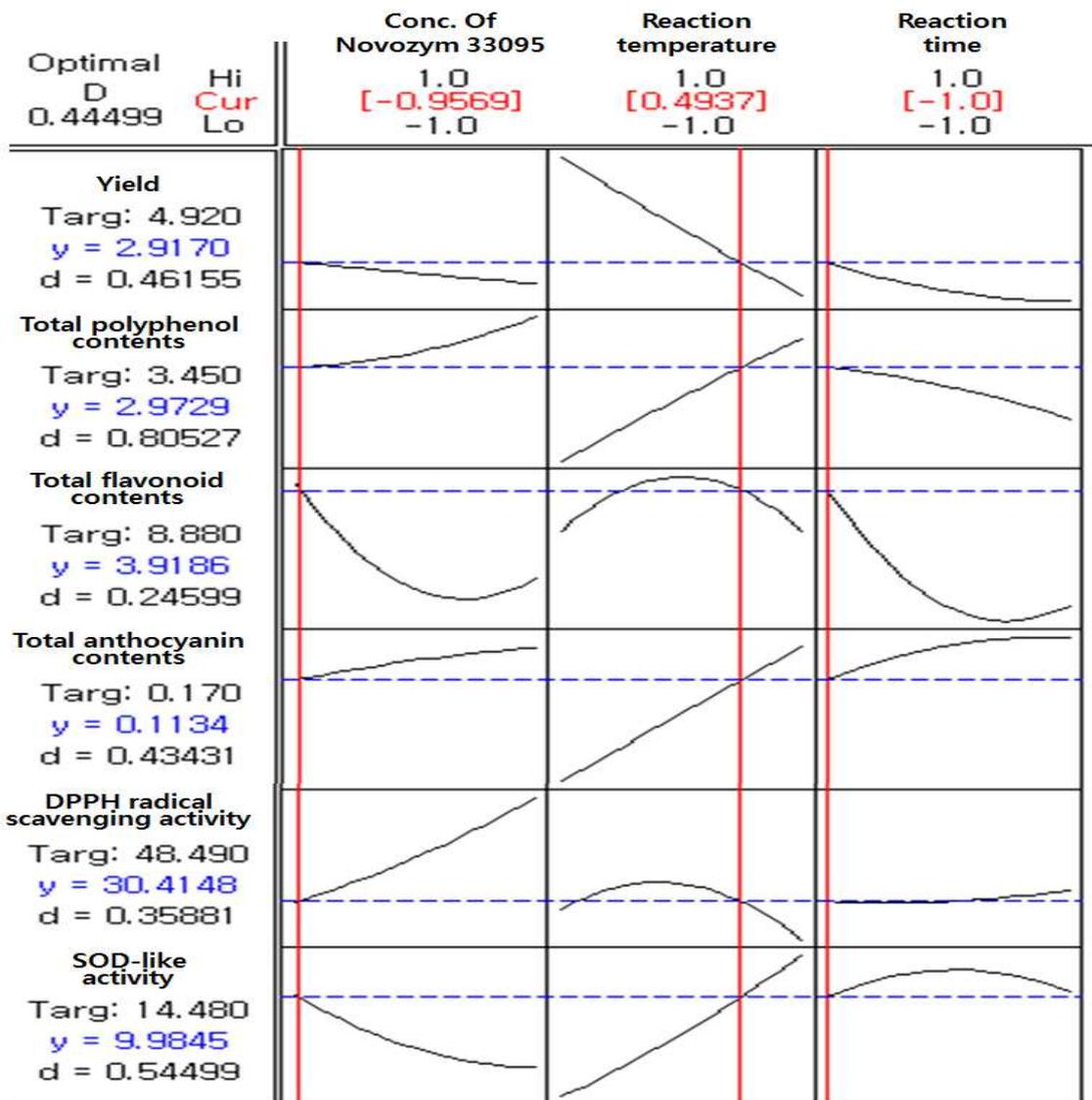


Fig. 76. Response optimization for multi-response surface of Novozym 33095 enzyme treatment from purple-fleshed potato extracts.

아. Novozym 33095을 이용한 홍영의 최적 효소 처리 공정

(1) 수율 및 항산화활성

여섯 가지 요인으로서 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 홍영 추출물의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능을 분석한 결과는 **Table 65**와 같았다.

홍영을 Novozym 33095 처리 하였을 때의 수율은 1.58-2.72% 범위로 나타났으며, 효소농도 0.25 mL/L, 반응온도 50.39°C 및 반응시간 120 min의 조건에서 2.55%로 최적값을 보였다.

Total polyphenol 함량의 경우 무처리 시에는 3.83 mg/g이었는데, 본 실험에서 효소처리의 홍미영역 구간 실험점에서의 범위는 4.36-8.04 mg/g로 나타났다. 효소농도 0.15 mL/L, 반응온도 40°C, 반응시간 61.91 min일 때 8.04 mg/g으로 최적값을 보였으며, 이는 무처리 시의 210% 수준이었다.

Total flavonoid 함량의 경우 무처리 시에 2.47 mg/ml이었고, 효소처리의 홍미영역 구간 실험점에서의 범위는 3.26-5.66 mg/ml로 나타났다. 효소농도 0.15 mL/L, 반응온도 44.32°C, 반응시간 60 min일 때 5.66 mg/ml로 최적값을 보였으며, 이는 무처리 시의 229% 수준이었다.

Total Anthocyanin 함량의 경우 무처리 시에는 0.06 mg/100 g이었으나 본 실험의 효소처리의 홍미영역 구간 실험 점에서 Total Anthocyanin 함량의 범위는 0.08-0.20 mg/100 g로 나타났다. 효소농도 0.25 mL/L, 반응온도 20.35°C 및 반응시간 60.32 min의 조건에서 0.20 mg/100 g으로 최적값을 보였으며 무처리 시의 Total Anthocyanin 함량의 333% 수준이었다.

DPPH radical 소거능은 무처리 시에는 57.90% 였으나 효소처리 시 33.96-62.28%로 나타났다. 효소농도 0.25 mL/L, 반응온도 60°C 및 반응시간 118.53 min의 조건에서 62.28%로 최적값을 보였으며 무처리 시의 108% 수준이었다.

SOD-like 활성능의 경우 무처리 시 0.88%였으나, 효소처리 시 17.16-22.06%로 나타났다. 효소농도 0.07 mL/L, 반응온도 44.86°C 및 반응시간 120 min의 조건에서 22.06%로 최적값이 나타났으며 무처리 시의 2507% 수준이었다.

Table 65. Central composite design for Novozym 33095 enzyme treatment from red-fleshed potato extracts and its dependent variables.

Coded levels of variable				Responses					
X ₁	X ₂	X ₃	Yield (%)	Total polyphenol contents (mg/g)	Total flavonoid contents (mg/ml)	Total Anthocyanin contents (mg/100g)	DPPH radical scavenging activity (%)	SOD-like activity (%)	
0	-1	1	1.69	6.52±0.16 ^f	4.62±0.14 ^{cd}	0.14±0.050 ^{de}	45.61±1.80 ^b	19.48±0.73 ^{cde}	
0	1	-1	1.79	6.99±0.09 ^{bcd}	5.66±0.10 ^a	0.11±0.001 ^{fg}	33.96±1.13 ^b	17.93±0.75 ^{ef}	
0	0	0	2.26	7.82±0.14 ^a	5.24±0.15 ^b	0.11±0.002 ^{fg}	51.63±0.37 ^b	19.35±0.55 ^{de}	
0	-1	-1	1.83	6.91±0.15 ^{cde}	4.74±0.01 ^c	0.13±0.000 ^{ef}	44.87±1.03 ^b	18.31±2.39 ^{efg}	
-1	0	1	2.03	5.25±0.53 ⁱ	3.26±0.15 ⁱ	0.11±0.002 ^g	60.40±0.28 ^b	22.06±0.02 ^a	
-1	-1	0	2.15	5.08±0.30 ⁱ	3.37±0.14 ⁱ	0.09±0.001 ^{hi}	57.13±3.49 ^b	18.19±1.11 ^{efg}	
-1	0	-1	2.07	8.04±0.13 ^a	5.35±0.17 ^b	0.11±0.001 ^{fg}	38.48±1.16 ^b	17.16±0.39 ^g	
0	0	0	1.90	6.59±0.27 ^{ef}	4.39±0.16 ^e	0.16±0.001 ^{bc}	51.25±0.88 ^b	20.39±0.19 ^{cd}	
1	1	0	1.95	6.11±0.18 ^g	4.16±0.06 ^f	0.11±0.010 ^{fg}	57.15±1.11 ^b	17.42±0.75 ^g	
0	0	0	2.28	6.74±0.49 ^{def}	4.44±0.26 ^{de}	0.10±0.004 ^{gh}	57.90±1.83 ^b	20.77±1.82 ^{bc}	
1	0	-1	1.58	7.13±0.24 ^{bc}	4.44±0.20 ^{de}	0.16±0.003 ^b	52.76±1.61 ^b	19.22±0.37 ^{def}	
1	0	1	2.72	5.89±0.41 ^{gh}	3.57±0.14 ^h	0.08±0.004 ⁱ	62.28±0.97 ^a	18.44±1.47 ^{efg}	
1	-1	0	1.59	4.36±0.11 ^j	3.41±0.14 ^{hi}	0.17±0.002 ^b	54.38±1.03 ^b	20.13±0.55 ^{cd}	
0	1	1	1.77	7.28±0.39 ^b	4.22±0.14 ^f	0.20±0.006 ^a	51.89±2.49 ^b	20.13±0.18 ^{cd}	
-1	1	0	1.61	5.64±0.12 ^h	3.79±0.06 ^g	0.14±0.005 ^{cd}	36.33±3.29 ^b	21.68±0.17 ^{ab}	

X₁: Concentration of Novozym (mL/L), X₂: Reaction Temperature (°C), X₃: Reaction Time (min)

(2) 이차다항회귀곡선식

홍미구역 안에서 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 홍명 추출물의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능에 미치는 정도를 분산 분석한 결과 **Table 66**과 같다.

수율에 영향을 미치는 요인으로 반응온도가 가장 컸으며, 효소농도, 반응시간 순으로 나타났고 세 가지 요인에서 모두 5% 내에서 유의성차이를 나타내었다. Total polyphenol 함량은 효소농도가 가장 컸으며, 반응시간, 반응온도 순으로 나타났고 세 요인 모두 5% 내에서 유의성 차이를 나타내었다. Total flavonoid 함량에서는 반응시간, 효소농도, 반응온도 순으로 나타났으며 세 가지 요인에서 모두 5% 내에서 유의성차이를 보였다. Total Anthocyanin 함량에 영향을 미치는 요인으로 효소농도가 가장 컸으며 반응온도, 반응시간 순으로 나타났고 세 가지 요인 모두 5% 내에서 유의성차이를 나타내었다. DPPH radical 소거능에서는 반응시간이 가장 컸으며 반응온도, 효소농도 순이었고, 세 가지 요인에서 모두 5% 내에서 유의성 차이를 보였다. SOD-like 활성능은 효소농도, 반응시간, 반응온도 순으로 나타났고, 세 가지 요인에 대해 모두 5% 내에서 유의성차이를 보였다.

처리 요인의 수준에 대하여 종속변수인 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능을 예측하기 위한 이차다항회귀곡선식의 회귀계수를 계산한 결과는 **Table 67**과 같다. 또한, 종속변수에 대한 이차다항회귀곡선식의 일차다항회귀(linear), 이차다항회귀(quadratic) 및 교차회귀(cross product)의 기여도를 검정하였다.(**Table 68**)

수율의 기여도는 교차회귀, 이차다항회귀, 일차다항회귀 순으로 나타났으며, Total Polyphenol 함량의 기여도는 이차다항회귀, 일차다항회귀 및 교차회귀 순으로 나타났다. Total flavonoid 함량의 기여도는 이차다항회귀, 일차다항회귀 및 교차회귀 순으로, Total Anthocyanin 함량의 기여도는 교차회귀, 이차다항회귀 및 일차다항회귀 순으로 나타났다. DPPH radical 소거능의 경우 일차다항회귀, 교차회귀 및 이차다항회귀 순으로 기여도가 나타났으며, SOD-like 활성능의 기여도는 교차회귀, 일차다항회귀 및 이차다항회귀 순으로 나타났다. 이차다항회귀곡선식 적합성 검정에서의 total regression은 모두 5% 이내에서 유의성 차이를 보였다.

Table 66. Analysis of variance for the effects of three variables on yield, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, Total Anthocyanin contents and antioxidative activities of Novozym 33095 enzyme treatment from red-fleshed potato extracts.

	Factors	Yield	Total polyphenol contents	Total flavonoid contents	Total Anthocyanin contents	DPPH radical scavenging activity	SOD-like activity
X ₁	F value	8.66	6.84	14.26	7.04	19.58	11.28
	Prob>F	0.0003	0.0012	<.0001	0.0003	<.0001	<.0001
X ₂	F value	9.44	4.78	4.53	6.92	21.41	6.30
	Prob>F	0.0002	0.0072	0.0091	0.0003	<.0001	0.0019
X ₃	F value	7.42	5.52	17.80	4.13	25.16	9.66
	Prob>F	0.0008	0.0037	<.0001	0.0076	<.0001	0.0002

X₁: Concentration of Novozym (mL/L), X₂: Reaction Temperature (°C), X₃: Reaction Time (min)

Table 67. Regression coefficients of second degree polynomials for yield, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, Total Anthocyanin contents and antioxidative activities of Novozym 33095 enzyme treatment from red-fleshed potato extracts.

Parameters	Estimate					
	Yield	Total polyphenol contents	Total flavonoid contents	Total Anthocyanin contents	DPPH radical scavenging activity	SOD-like activity
Intercept	2.264	11.589	5.678	0.116	15.223	0.459
X ₁ ¹⁾	-13.500	13.250	13.925	1.608	-87.825	77.150
X ₂ ²⁾	0.043	0.113	0.089	-0.004	-0.053	0.192
X ₃ ³⁾	-0.003	-0.164	-0.070	-0.001	0.805	0.218
X ₁ *X ₁	0.417	-104.979	-83.313	-1.167	352.646	-27.854
X ₂ *X ₁	0.113	0.149	0.042	-0.014	2.946	-0.775
X ₂ *X ₂	-0.001	-0.002	0.000	0.000	-0.015	-0.001
X ₃ *X ₁	0.098	0.129	0.102	-0.007	-1.033	-0.474
X ₃ *X ₂	0.000	0.000	-0.001	0.000	0.007	0.000
X ₃ *X ₃	0.000	0.001	0.000	0.000	-0.004	-0.001

¹⁾X₁: Concentration of Novozym (mL/L), ²⁾X₂: Reaction Temperature (°C), ³⁾X₃: Reaction Time (min)

Table 68. Determination coefficients and probability of second degree polynomials for yield, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, Total Anthocyanin contents and antioxidative activities of Novozym 33095 enzyme treatment from red-fleshed potato extracts.

	Regressions	Linear	Quadratic	Cross product	Total regress
Yield	R ²	0.08	0.29	0.40	0.77
	F value	2.37	8.34	11.62	7.44
	Prob>F	0.1012	0.0009	0.0001	<.0001
Total polyphenol contents	R ²	0.22	0.47	0.07	0.76
	F value	6.15	13.27	1.93	7.11
	Prob>F	0.0039	<.0001	0.1573	0.0001
Total flavonoid contents	R ²	0.37	0.39	0.11	0.87
	F value	18.84	19.87	5.40	14.70
	Prob>F	<.0001	<.0001	0.0069	<.0001
Total Anthocyanin contents	R ²	0.05	0.10	0.40	0.55
	F value	1.19	2.58	10.26	4.68
	Prob>F	0.3285	0.0692	<.0001	0.0004
DPPH radical scavenging activity	R ²	0.48	0.21	0.23	0.91
	F value	37.04	16.32	17.73	23.70
	Prob>F	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
SOD-like activity	R ²	0.24	0.07	0.47	0.77
	F value	6.85	2.02	13.60	7.49
	Prob>F	0.0023	0.1439	<.0001	<.0001

(3) 효소처리공정 최적화

효소농도, 반응온도와 반응시간이 홍영 추출물의 수율에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 Fig. 77과 같다. 효소처리공정에서 반응시간은 반응온도보다 영향이 작으나 (Fig. 77-A, B, C) 효소농도와는 비슷한 영향력을 나타냈고(Fig. 77-D, E, F), 반응온도는 효소농도보다 더 큰 영향을 나타냈다(Fig. 77-G, H, I). 효소처리 홍미영역에서의 반응평균(response mean) 값은 1.95%이었다. 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 홍영의 수율을 반응표면분석한 결과 일반적으로 효소농도가 높고 반응시간이 길수록 수율이 증가하는 경향을 나타내었으며 효소농도 0.25 mL/L, 반응온도 50.39°C 및 반응시간 120 min 일 때가 최적 효소처리조건으로 2.55%로 예측되었다.

Total polyphenol 함량에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 Fig. 78과 같다. 효소처리공정에서 수율과 마찬가지로 반응시간과 반응온도(Fig. 78-A, B, C), 반응시간과 효소농도(Fig. 78-D, E, F), 반응온도와 효소농도(Fig. 78-G, H, I)의 영향력은 비슷하게 나타났다. 효소처리 홍미영역에서의 반응평균 값은 6.42 mg/g이었다. 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 홍영의 Total Polyphenol 함량을 반응표면분석한 결과 일반적으로 반응시간이 짧을수록 증가하는 경향을 보였으며 효소농도 0.15 mL/L, 반응온도 40°C 및 반응시간 61.91 min 일 때가 최적 효소처리 조건으로 그 때의 Total Polyphenol 함량은 8.04 mg/g으로 예측되었다.

Total flavonoid 함량에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 Fig. 79와 같다. 효소처리공정에서 반응시간은 반응온도 보다 영향력이 더 크고(Fig. 79-A, B, C), 효소농도와는 비슷한 영향력을 보이며(Fig. 79-D, E, F), 반응온도보다는 효소농도가 더 큰 영향을 나타냈다(Fig. 79-G, H, I). 효소처리 홍미영역에서의 반응평균 값은 4.31 mg/ml이었다. Total flavonoid 함량은 반응시간이 짧을 때 증가하는 경향을 나타내었으며 효소농도 0.15 mL/L, 반응온도 44.32°C, 반응시간 60 min 일 때가 최적 효소처리 조건으로 5.66 mg/ml로 예측되었다.

효소농도, 반응온도와 반응시간이 홍영 추출물의 Total Anthocyanin 함량에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 Fig. 80과 같다. 효소처리공정에서 반응시간은 반응온도 (Fig. 80-A, B, C)와 효소농도보다 영향이 더 작고(Fig. 80-D, E, F), 반응온도와 효소농도는 비슷한 영향력을 나타냈다(Fig. 80-G, H, I). 효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 홍영의 Total Anthocyanin 함량을 반응 표면 분석한 결과 일반적으로 효소농도가 높고, 반응시간이 낮으며 반응시간이 짧을수록 Total Anthocyanin 함량이 증가하는 경향을 나타내었으며 효소농도 0.25 mL/L, 반응온도 20.35°C 및 반응시간 60.32 min 일 때가 최적 효소처리조건으로 0.20 mg/100 g으로 예측되었다.

DPPH radical 소거능에 미치는 영향을 분석한 결과는 Fig. 81과 같다. 효소처리공정에서 반응시간은 반응온도보다 영향이 더 작으나(Fig. 81-A, B, C) 효소농도보다는 영향이 더 크고 (Fig. 81-D, E, F), 반응온도는 효소농도보다 더 큰 영향을 나타냈다(Fig. 81-G, H, I). 효소처리 홍미영역에서의 반응평균 값은 50.40%이었다. 효소농도와 반응온도가 높을수록 DPPH radical 소거능이 증가하는 경향을 보였으며 효소농도 0.25 mL/L, 반응온도 60°C, 반응시간 118.53 min 일 때 최적 효소처리조건으로 DPPH radical 소거능이 62.28%로 예측되었다.

SOD-like 활성능에 미치는 영향을 분석한 결과는 Fig. 82와 같다. 효소처리공정에서 반응시간과 반응온도(Fig. 82-A, B, C), 반응시간과 효소농도(Fig. 82-D, E, F), 반응온도와 효소농도(Fig. 82-G, H, I) 사이의 영향력은 비슷하게 나타났다. 홍미영역에서의 반응평균 값은

19.38%이었다. 반응시간이 길수록 SOD-like 활성능이 증가하는 것으로 나타났으며 최적 효소 처리조건으로 효소농도 0.07 mL/L, 반응온도 44.86°C 및 반응시간 120 min 일 때 홍영 추출물의 SOD-like 활성능은 22.06%로 예측되었다.

효소농도, 반응온도와 반응시간에 따른 홍영 추출물의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능을 다중반응표면의 최적화방법으로써 만족 함수(desirability function)를 이용하여 종속변수들의 가중치를 1로 놓고 종합적으로 판단한 결과 (**Fig. 83**) 최적 효소처리 조건은 효소농도 0.15 mL/L, 반응온도 44.39°C 및 반응시간 120 min의 조건이었으며 이때의 수율, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능 및 SOD-like 활성능은 각각 2.19%, 7.19 mg/g, 4.37 mg/ml, 0.14 mg/100g, 56.17% 및 20.57%이었고 전반적인 만족도 (overall desirability)는 0.64였다.

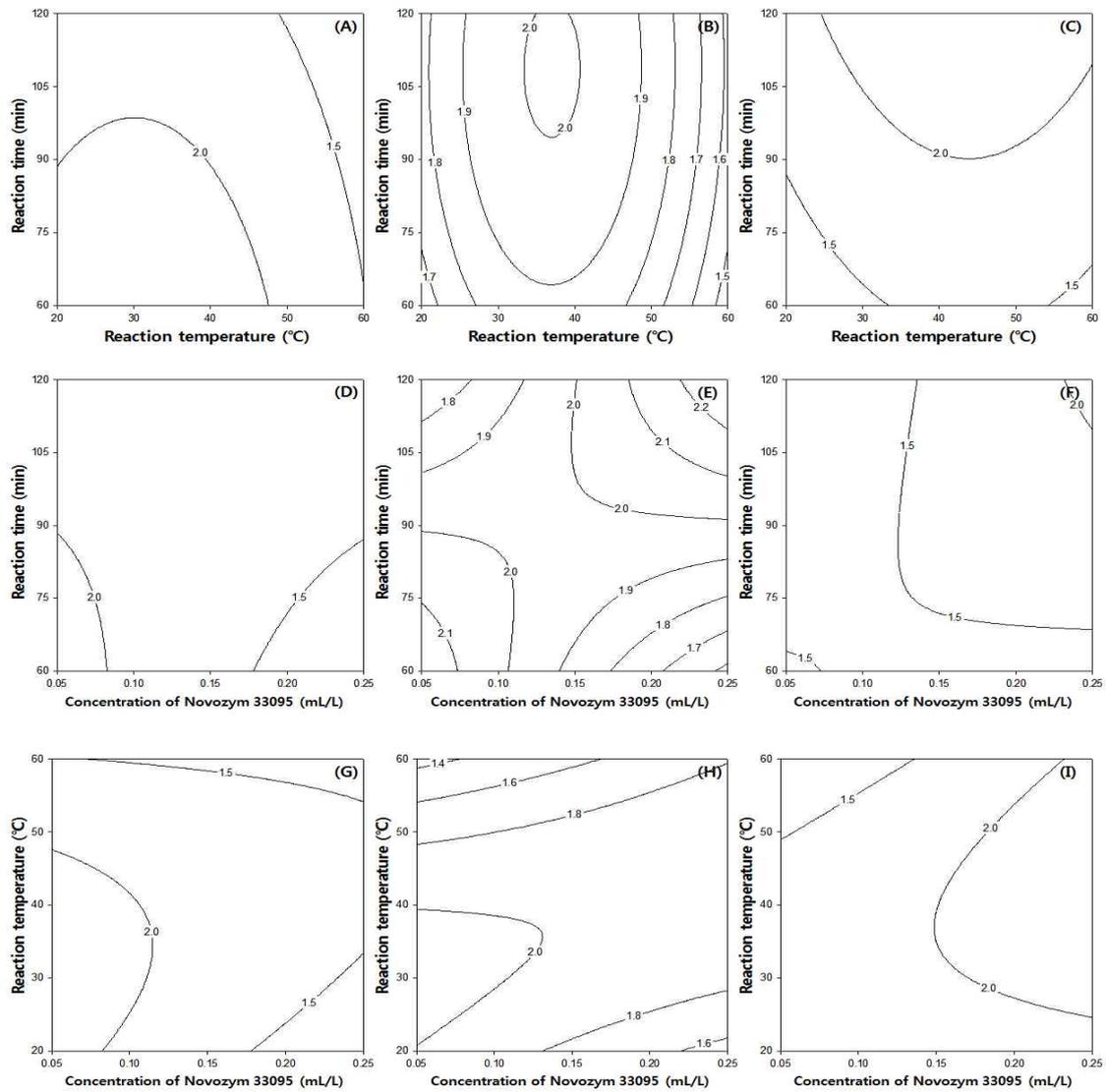


Fig. 77. Contour plot for yield (%) of red-fleshed potato Anthocyanin by Novozym 33095 enzyme treatment.

(Conc. of Novozym 33095, A: 0.05 mL/L, B: 0.15 mL/L, C: 0.25 mL/L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 60 min, H: 90 min., I: 120 min)

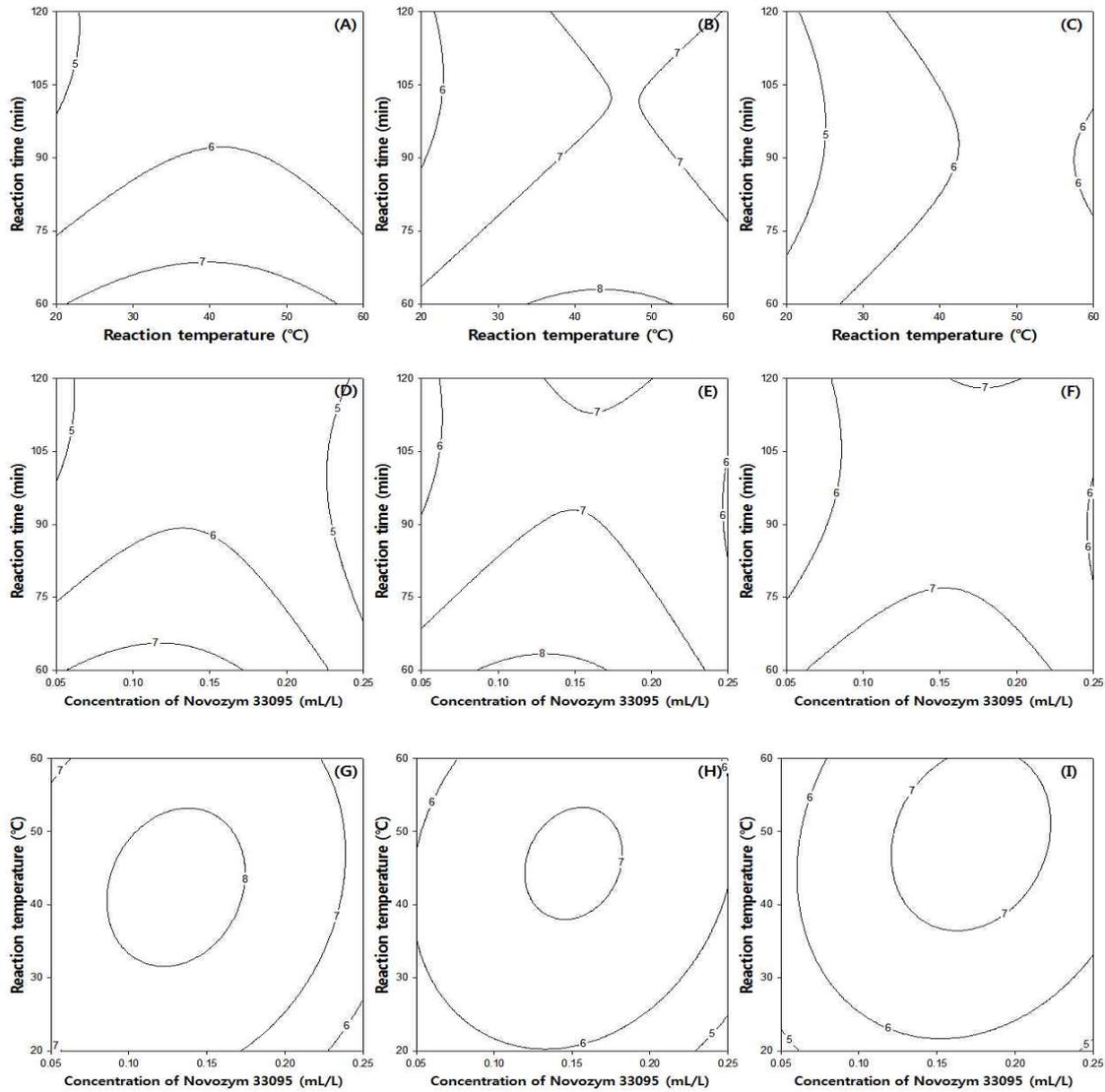


Fig. 78. Contour plot for Total Polyphenol contents (mg/g) of Novozym 33095 enzyme treatment from red-fleshed potato extracts.

(Conc. of Novozym 33095, A: 0.05 mL/L, B: 0.15 mL/L, C: 0.25 mL/L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 60 min, H: 90 min., I: 120 min)

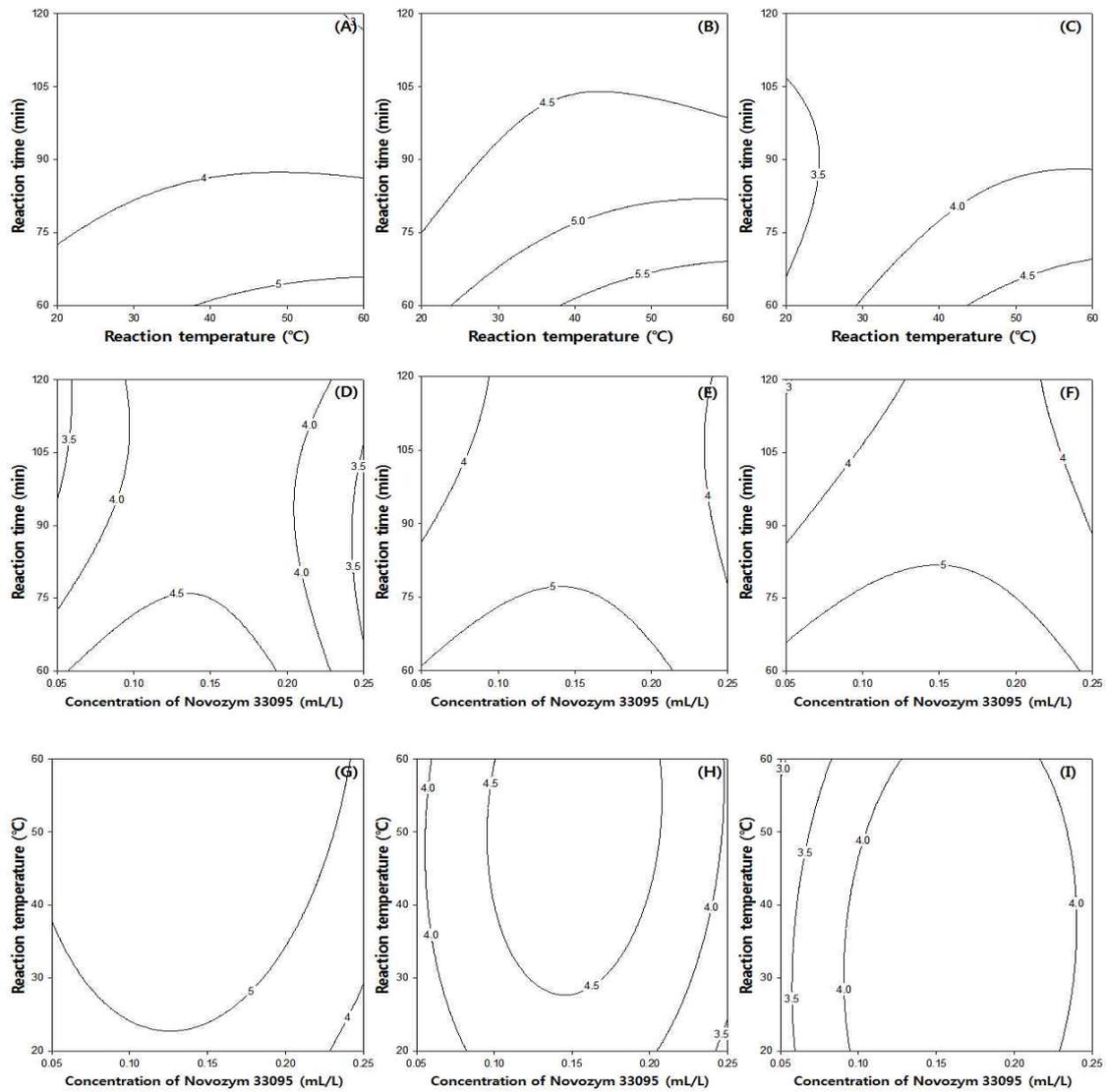


Fig. 79. Contour plot for Total Flavonoid contents (mg/mL) of Novozym 33095 enzyme treatment from red-fleshed potato extracts.

(Conc. of Novozym 33095, A: 0.05 mL/L, B: 0.15 mL/L, C: 0.25 mL/L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 60 min, H: 90 min., I: 120 min)

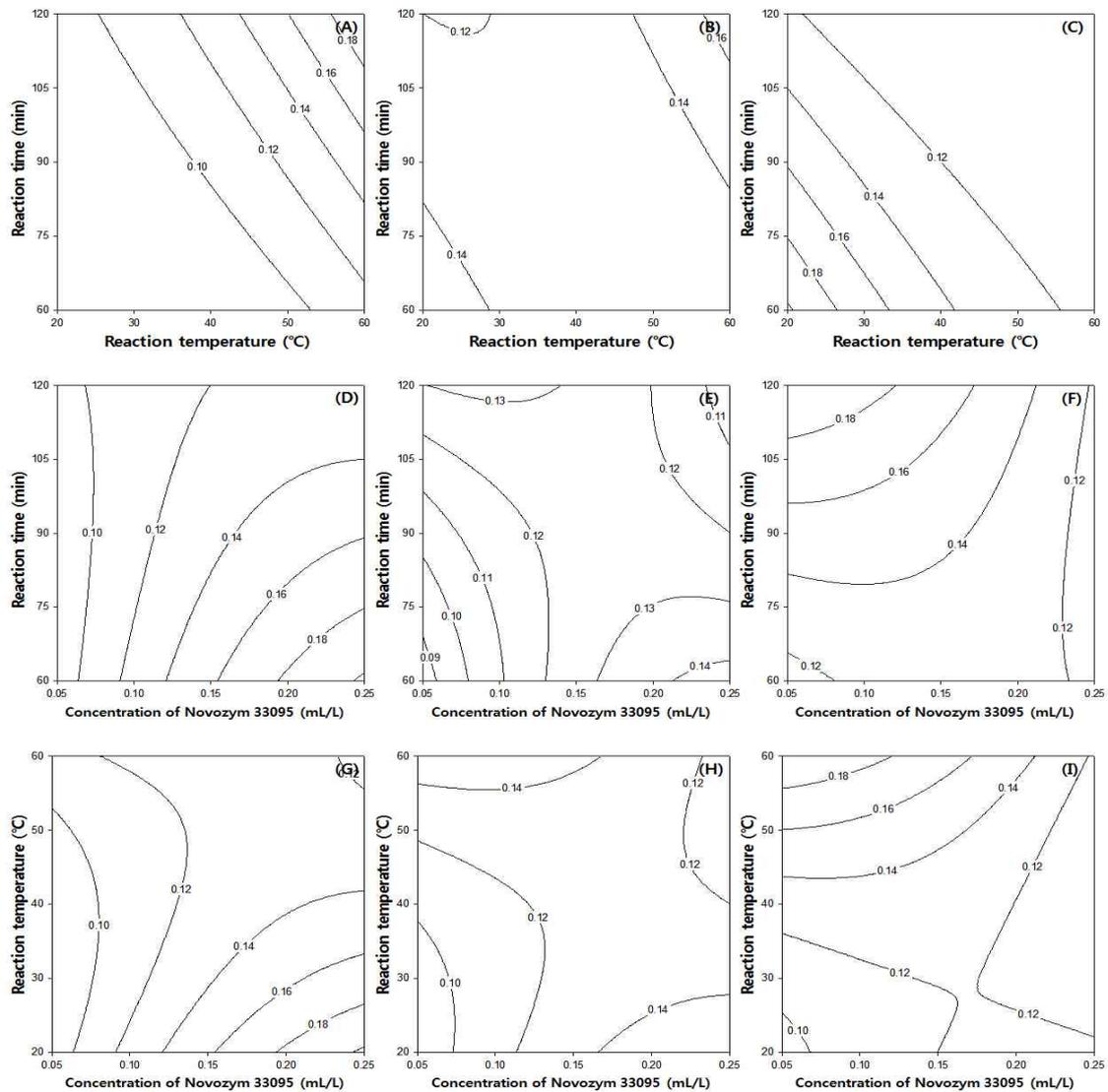


Fig. 80. Contour plot for Total Anthocyanin contents (mg/100 g) of Novozym 33095 enzyme treatment from red-fleshed potato extracts.

(Conc. of Novozym 33095, A: 0.05 mL/L, B: 0.15 mL/L, C: 0.25 mL/L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 60 min, H: 90 min., I: 120 min)

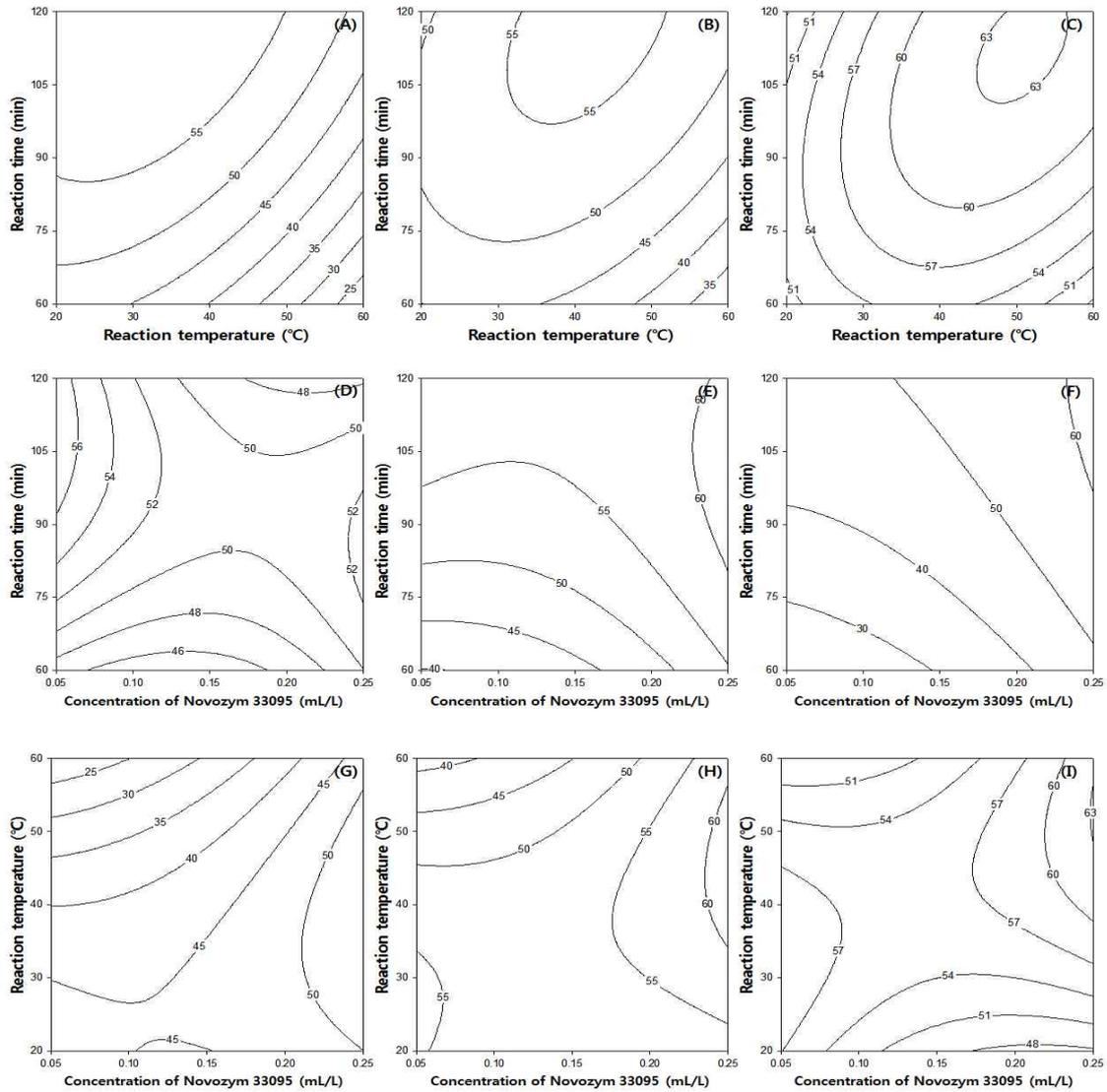


Fig. 81. Contour plot for DPPH radical scavenging activity (%) of Novozym 33095 enzyme treatment from red-fleshed potato extracts.

(Conc. of Novozym 33095, A: 0.05 mL/L, B: 0.15 mL/L, C: 0.25 mL/L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 60 min, H: 90 min, I: 120 min)

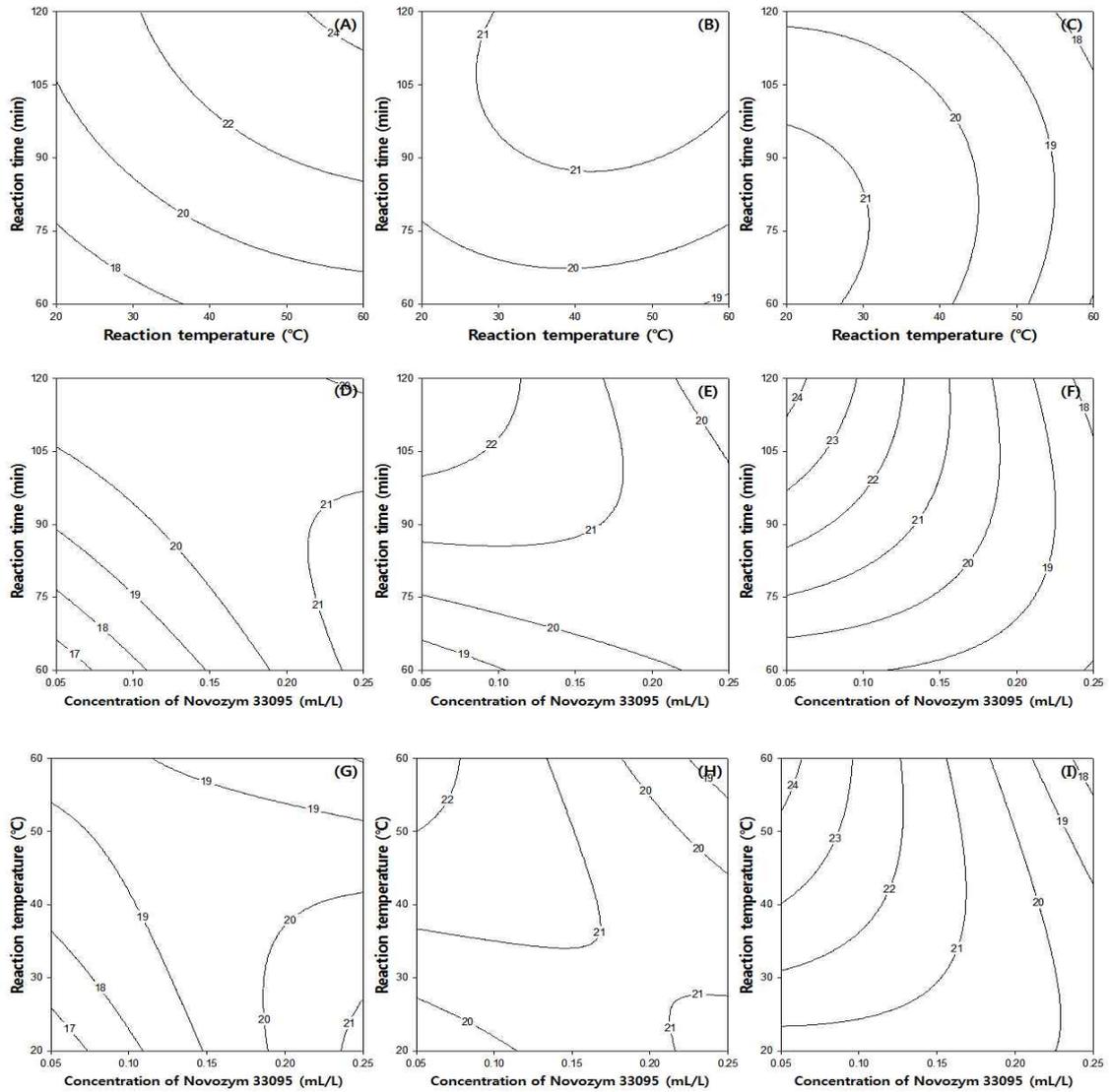


Fig. 82. Contour plot for SOD-like activity (%) of Novozym 33095 enzyme treatment from red-fleshed potato extracts.

(Conc. of Novozym 33095, A: 0.05 mL/L, B: 0.15 mL/L, C: 0.25 mL/L; Reaction temperature, D: 20°C, E: 40°C, F: 60°C; Reaction time, G: 60 min, H: 90 min., I: 120 min)

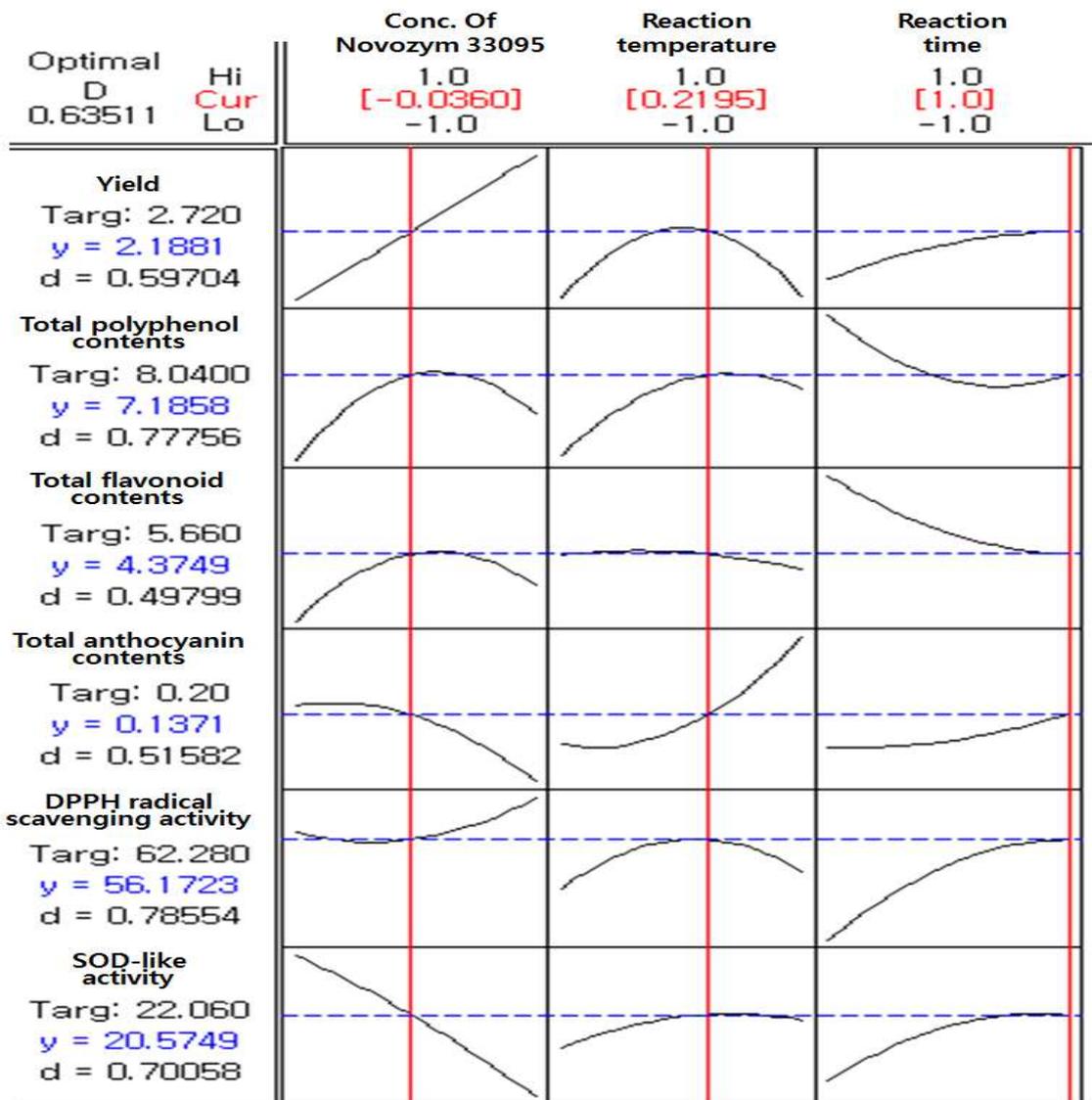


Fig. 83. Response optimization for multi-response surface of Novozym 33095 enzyme treatment from red-fleshed potato extracts.

4. 복분자박 천연색소의 추출조건 설정

가. 복분자박 시료의 분석과 선별

복분자박 유래 Anthocyanin 천연색소의 추출효율을 비교하기 위하여 복분자박 A와 B 두 시료 모두 동일한 조건으로 추출실험을 진행하였다. 즉, 복분자박 대비 10배의 추출용매 (0.1% 산도조절제가 함유된 30% 곡물주정)로 50℃에서 3시간 동안 shaking한 후 Whatman No.1 여과지로 흡인 여과하여 추출액에 대한 분석 결과를 **Table 69**에 나타내었다.

Table 69. 복분자박 시료에 따른 추출물 비교

Extract	Absorbance	pH	Brix	Anthocyanin content (mg/kg)
A	1.299	3.66	10	21.54
B	0.680	3.33	9	12.28

두 시료를 사용한 추출물은 최대흡광파장인 513nm에서 흡광도 및 Anthocyanin 함량의 차이가 거의 2배 가까운 차이를 보였다. 이는 수분함량의 차이에 따른 부산물의 품질 (착즙도)차이에 기인한 것으로 사료되어지며 상대적으로 수분함량이 적어 가용성 고형분 함량이 높은 복분자박 시료 A가 Anthocyanin 천연색소의 추출에 효율적이면서 경제적인 수 있음을 확인할 수 있었다. 흡광도의 차이는 곧 색농도와 비례하므로 추출물의 외형으로도 색농도 차이를 확인할 수 있었다(**Fig. 84**).

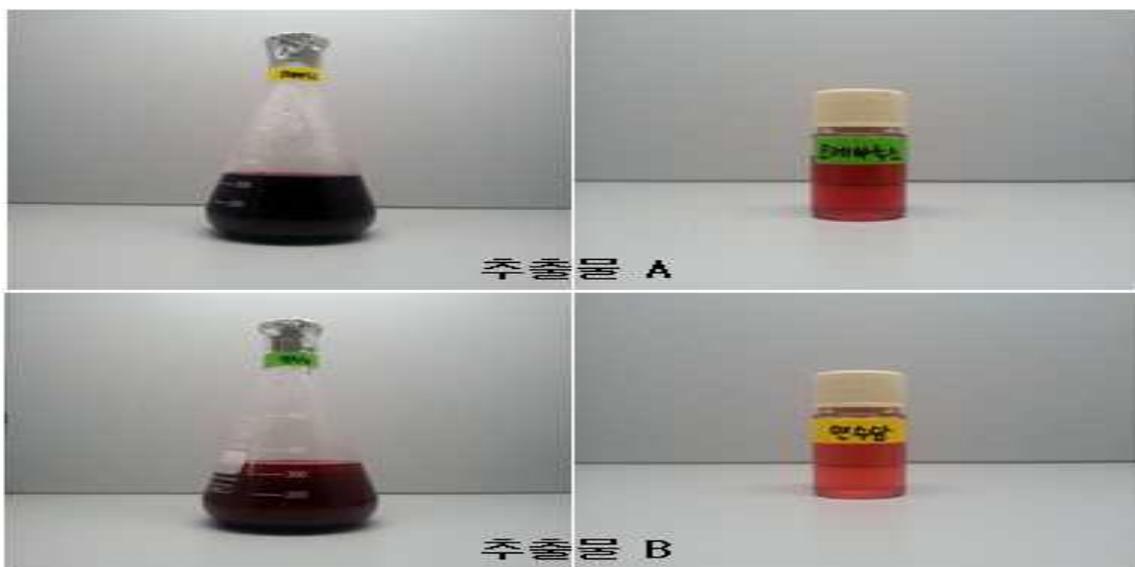


Fig. 84. 복분자 추출물의 색농도 비교

위와 같이 복분자박 시료 2종에 대한 분석결과, Anthocyanin계 천연색소원으로서의 효율성과 경제성을 고려하여 복분자 생과를 filter press를 이용하여 완전히 착즙 및 압착한 부산물(시료 A, 코리아누스 영농조합법인 제공)을 최종 원료로 선정하였다.

나. 용매에 의한 색소 추출특성

상기 실험에 의해 선정된 복분자박(시료 A)를 사용하여 식음용 곡물주정 함량에 따른 색소의 추출특성을 **Table 70**에 나타내었다. 식음용 곡물주정 함량을 제외한 추출조건은 부산물 대비 10배 용매량, 추출온도 50°C, 추출시간 3시간으로 동일시 하였다.

Anthocyanin 함량은 식음용 곡물주정 함량 30%에서 8.11 mg/100g으로 가장 높았으며 40% 이후 비례적으로 감소하는 경향을 보였고(**Fig. 85**), 최대흡광파장인 513nm에서의 흡광도 역시 식음용 곡물주정 함량 30%에서 1.531로 가장 높게 측정되어(**Fig. 86**) Anthocyanin 함량과 흡광도 사이 상호의존적인 경향을 보였다. 이는 Anthocyanin을 함유한 많은 작물들 중 일반적으로 ethanol에서의 추출효과가 물에서의 추출효과보다 우수하다는 보고와 유사한 결과였으나 작물의 종류 및 품종에 따라 추출효율이 좋은 ethanol의 함량과는 약간 다른 결과를 보였다.

가용성 고형분의 함량은 식음용 곡물주정 함량 60%까지는 약 0.6%로 유사하였으나, 이후 감소하는 경향을 보였다(**Fig. 87**). 이는 식음용 곡물주정 함량이 높을수록 ethanol에 의한 유효 성분들의 용출 및 용해에 좋지 않은 결과를 보인 것으로 사료된다.

최종 제품에 대한 식품 및 식품첨가물로서의 생산 및 공급을 위하여 인체 안정성, 경제성, 산업성, 효율성 등을 고려하여 복분자 부산물의 추출용매는 30%(w/w)의 식음용 곡물주정이 가장 적합한 것으로 판단하였다.

Table 70. 식음용 곡물주정 함량에 의한 복분자 부산물 추출물 비교

No.	Ethanol conc. (%)	Abs (513nm)	Anthocyanin content (mg/100g)	Soluble solid (%)
1	0	1.215	3.31±0.11	0.627
2	10	1.260	6.35±0.08	0.612
3	20	1.380	7.05±0.07	0.589
4	30	1.531	8.11±0.10	0.595
5	40	1.458	7.65±0.17	0.598
6	50	1.459	7.46±0.06	0.605
7	60	1.434	7.35±0.13	0.558
8	70	1.405	7.36±0.07	0.513
9	80	1.326	6.82±0.09	0.507
10	95	1.128	4.22±0.14	0.397

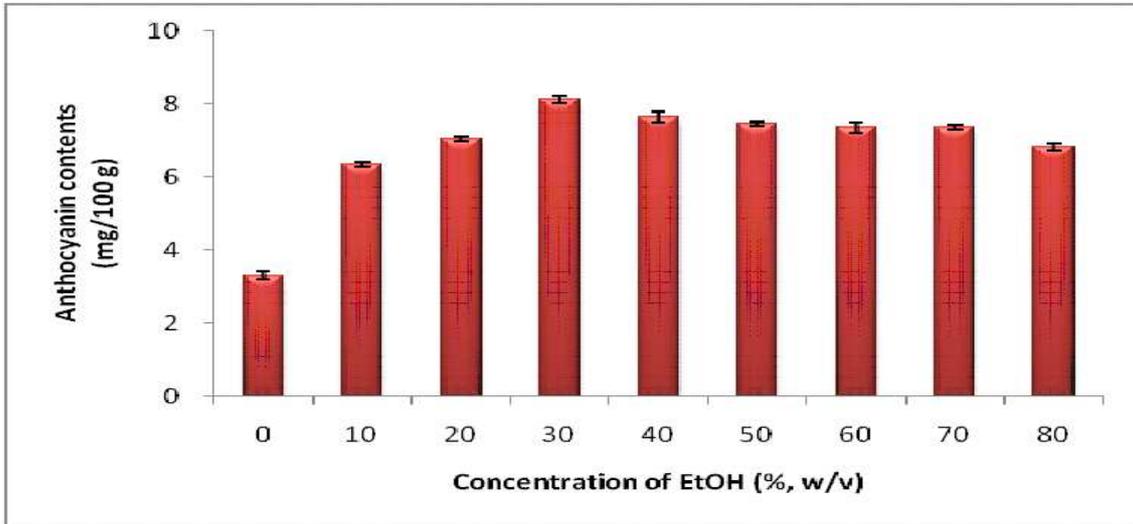


Fig. 85. 식음용 곡물주정 함량에 따른 Anthocyanin 함량 비교

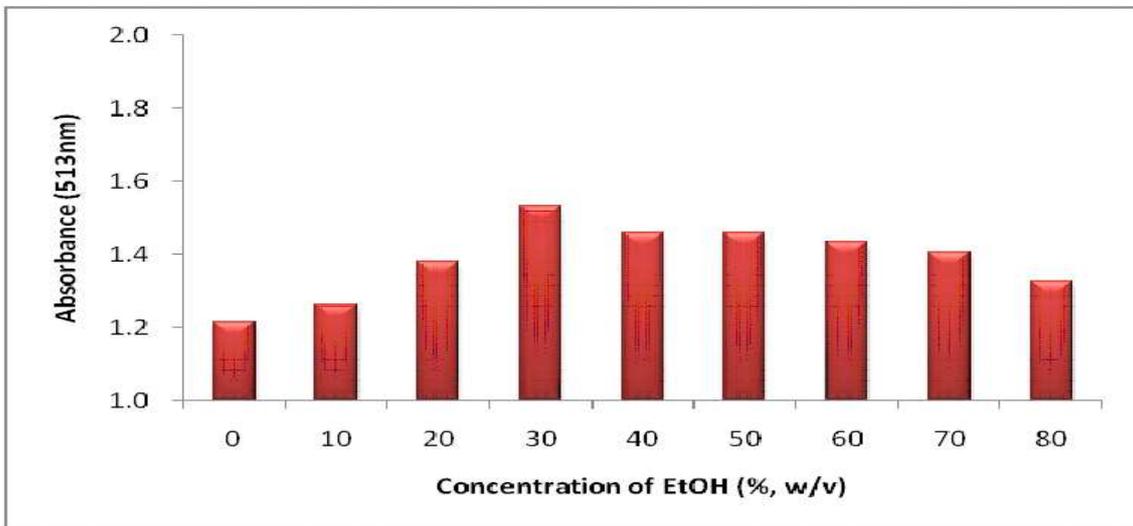


Fig. 86. 식음용 곡물주정 함량에 따른 흡광도 비교

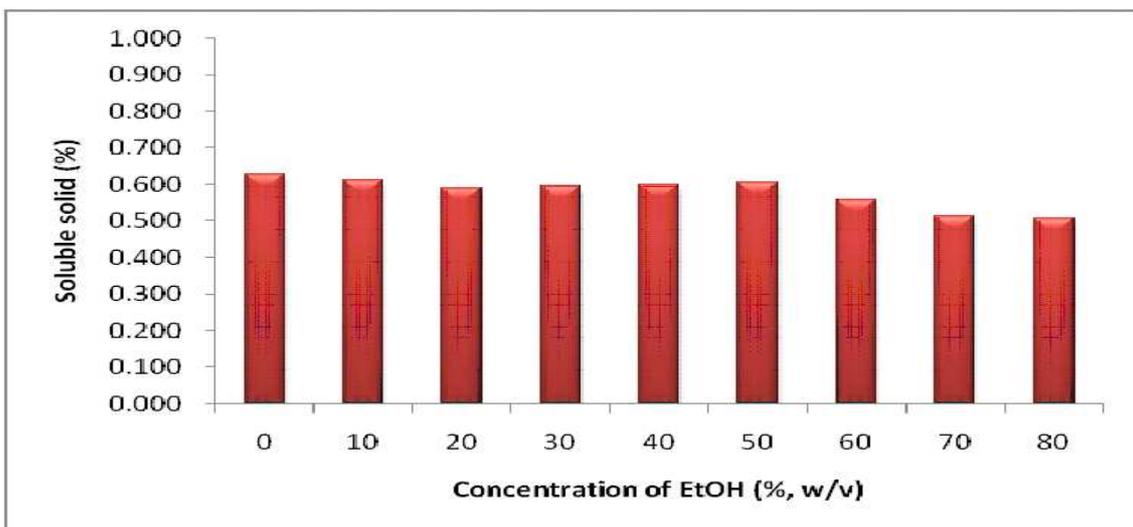


Fig. 87. 식음용 곡물주정 함량에 따른 흡광도 비교

다. 산도조절제에 의한 색소 추출특성

Anthocyanin계 천연색소의 추출에 가장 널리 사용되고 있는 산도조절제는 다양한 유기산 (citric acid, acetic acid, lactic acid, butyric acid, palmitic acid, oxalic acid, tartaric acid 등) 중에서도 식품첨가물로서 사용이 용이하고 특별한 취급상 주의가 필요없으면서 가격이 저렴한 유기산이 Citric acid이다. 이와 비교하기 위하여 식품제조가공분야에 널리 사용되고 있는 산도 조절제로서 축합인산염 중에서도 이온봉쇄력, 분산성, 해교성이 매우 크며 완충작용, 이온강도 증대력, 세척작용 등 다양한 능력을 보유하고 있는 고중합 산성메타인산나트륨(Acidic sodium metaphosphate, 서도비엔아이(주), 한국)은 1% 수용액에서의 pH가 1.8~2.0으로 유기산보다 적은 함량으로도 pH를 조절할 수 있는 buffer 능력이 뛰어나며 항균활성력에서도 뛰어난 무기인산염이므로 유기산인 Citric acid와의 일반성분을 비교한 결과는 **Table 71**에 나타내었다.

Table 71. Citric Acid(CA)와 Acidic Sodium Metaphosphate(ASM)의 비교

Items	Citric Acid	Acidic Sodium Metaphosphate
Appearance	Citric Acid occurs as colorless, transparent crystals, granules, or lumps, or as a white powder	White crystals, granules, or granule powder
Formula	$C_6H_8O_7$	$(NaPO_3)_n$
pH(1% sol.)	2.1-2.3	1.8-2.2
Arsenic(ppm)	≥ 4	≥ 4
Lead(ppm)	≥ 4	≥ 4
$P_2O_5(\%)$	-	68-76
Chelating value	-	380-420

Citric acid(CA)와 Acidic sodium metaphosphate(ASM)을 사용하여 각 함량별 복분자박의 추출 특성은 **Table 72**에 나타내었다. 각 산도조절제의 함량을 제외한 추출조건은 복분자박 대비 10배 용매량, 식음용 곡물주정 30%(w/w), 추출온도 50℃, 추출시간 3시간으로 동일시하였다.

산도조절제의 함량이 높을수록 추출물의 pH는 비례적으로 낮아지는 경향은 유사하였으며, 최대흡광파장인 513nm에서의 흡광도는 함량이 높을수록 비례적으로 높아지는 경향이였다(**Fig. 88**). 이는 pH가 낮을수록 적색의 Anthocyanin계 천연색소의 추출효율이 높아진다는 보고와 일치함을 확인할 수 있었다.

Anthocyanin 함량은 산도조절제의 함량이 높을수록 비례적으로 증가하지는 않았으나 두 시료 모두 0.7% 함량에서 CA를 첨가한 추출물에서 10.10 mg/100g, ASM을 첨가한 추출물에서 10.56 mg/100g으로 가장 효율이 좋았다(**Fig. 89**).

가용성 고형분 함량은 CA보다 ASM을 사용하였을 때 함량에 따라 비례적으로 증가율이 높음을 확인하였다. 이는 ASM의 이온봉쇄력, 분산성, 해교성, 완충력 등이 유기산인 CA보다 효과적이기 때문으로 사료된다(**Fig. 90**).

이상의 결과를 바탕으로 최종 제품에 대한 경제성 및 산업성, 효율성을 고려하여 복분자박 안토시아닌 천연색소 추출시 산도조절제는 0.7% 함량으로 첨가할 시 가장 적합한 것으로 판단하였다.

Table 72. 산도조절제 함량에 의한 복분자 부산물 추출물 비교

No.	Acidity regulator		pH	Abs (513nm)	Anthocyanin content (mg/100g)	Soluble solid (%)
	ASM (%)	CA (%)				
1	0.0	-	4.17	1.547	3.13±0.12	0.587
2	0.1	-	4.01	1.624	5.93±0.15	0.716
3	0.2	-	3.73	1.656	8.02±0.13	0.807
4	0.3	-	3.44	1.675	8.24±0.05	0.888
5	0.4	-	3.14	1.864	8.47±0.09	1.078
6	0.5	-	2.94	1.917	9.85±0.09	1.202
7	0.6	-	2.85	1.916	10.06±0.09	1.437
8	0.7	-	2.70	2.017	10.56±0.19	1.504
9	0.8	-	2.61	2.168	9.83±0.04	1.711
10	0.9	-	2.55	2.289	9.78±0.07	1.919
11	1.0	-	2.44	2.287	9.16±0.06	1.938
12	-	0.0	4.23	1.464	3.13±0.12	0.562
13	-	0.1	3.86	1.576	5.25±0.09	0.692
14	-	0.2	3.59	1.605	6.89±0.11	0.724
15	-	0.3	3.48	1.708	7.86±0.15	0.879
16	-	0.4	3.37	1.727	8.17±0.09	0.776
17	-	0.5	3.26	1.878	8.47±0.11	1.081
18	-	0.6	3.22	1.832	9.63±0.08	1.216
19	-	0.7	3.20	1.927	10.10±0.06	1.362
20	-	0.8	3.16	1.859	9.12±0.12	1.442
21	-	0.9	3.13	1.978	9.05±0.06	1.559
22	-	1.0	3.12	1.960	8.15±0.07	1.576

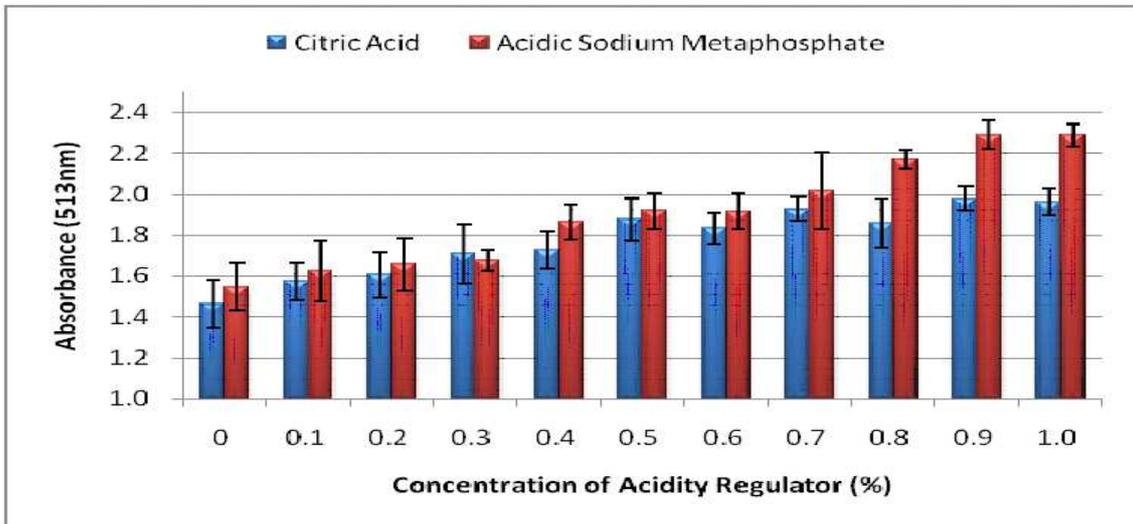


Fig. 88. 산도조절제의 종류와 함량에 따른 흡광도 비교

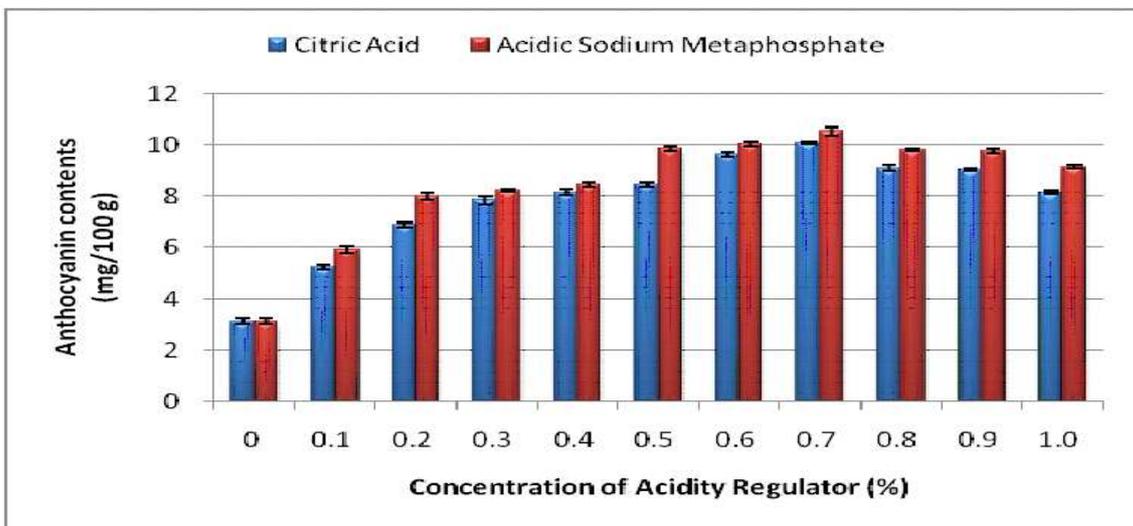


Fig. 89. 산도조절제의 종류와 함량에 따른 Anthocyanin 함량 비교

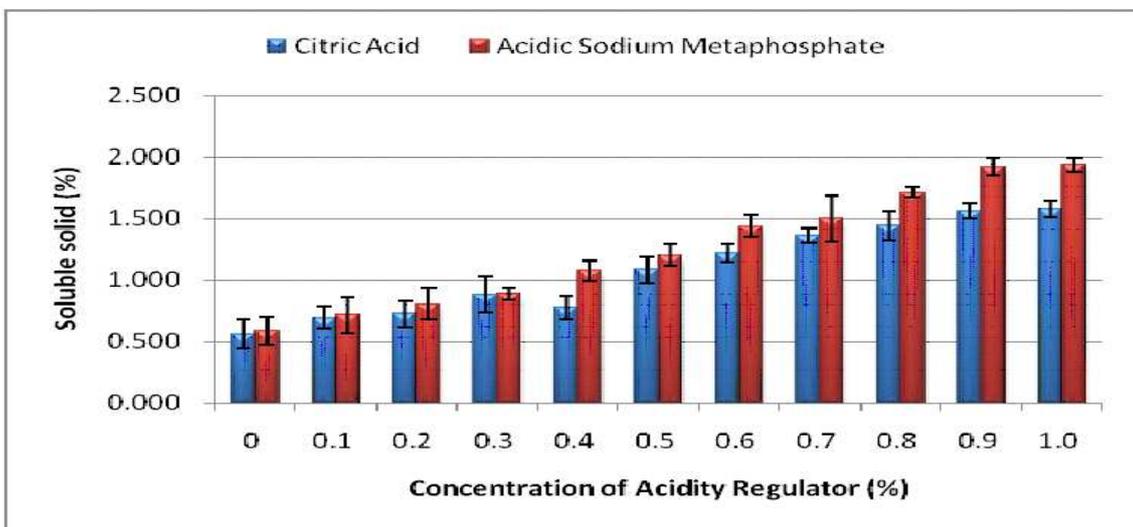


Fig. 90. 산도조절제의 종류와 함량에 따른 가용성 고형분 함량 비교

라. 추출시간 및 추출횟수에 의한 색소 추출특성

일반적으로 유효성분을 추출시 시간이 길어질수록, 횟수가 많을수록 추출되어지는 유효성분은 증가한다고 알려져 있다. 하지만, 사용된 재료 및 품종에 따라 그 효과는 차이가 있으므로 본 실험에서는 추출시간과 추출횟수에 따른 복분자박 Anthocyanin계 천연색소의 추출특성을 Table 73에 나타내었다.

추출시간과 추출횟수를 제외하고 추출조건은 복분자박 대비 10배의 추출용매, 30%(w/w) 곡물주정 함량, 0.7% 함량의 산도조절제, 50℃로 동일시하여 실험을 진행하였다.

1회 추출시 추출시간이 증가할수록 최대흡수파장인 513nm에서의 흡광도와 Anthocyanin 함량은 증가하였으나 비례적이지는 않았으며 3~5시간 사이에서는 유사한 추출효율을 나타내었다 (Fig. 91). 이는 복분자 생과를 압착 및 착즙된 재료를 사용하였으므로 이미 압착 및 착즙시에 최대한의 유효성분이 빠져나가 더 이상 추출시간을 늘려도 유효성분의 추출에는 큰 효과가 없음을 의미한다.

또한 2회 추출시에도 유사한 추출효율을 나타내었으며 추출시간 3시간 이후에는 최종 Anthocyanin의 total 함량은 유효범위 내에서 큰 효율을 보이지 않았음을 확인하였다(Fig. 92).

이상의 결과를 바탕으로 최종 제품에 대한 경제성 및 산업성, 효율성을 고려하여 복분자 부산물 추출시 추출시간과 횟수는 3시간, 2회 추출이 가장 적합한 것으로 판단하였다.

Table 73. 추출시간과 추출횟수에 의한 복분자 부산물 추출물 비교

No.	Time (hr)	Abs (513nm)			Anthocyanin content (mg/kg)		
		1st ext.	2nd ext.	Total	1st ext.	2nd ext.	Total
1	1	1.406	0.431	1.837	56.910	16.532	73.442
2	2	1.748	0.370	2.118	60.784	11.956	72.740
3	3	1.707	0.315	2.022	65.627	10.620	76.247
4	4	1.680	0.301	1.981	65.560	10.053	75.613
5	5	1.847	0.291	2.138	65.359	10.086	75.446
6	6	1.801	0.284	2.085	68.198	10.754	78.952
7	7	1.794	0.266	2.060	65.159	9.431	74.590
8	8	1.841	0.271	2.112	71.772	8.884	80.656
9	9	1.891	0.273	2.164	73.442	6.947	80.388

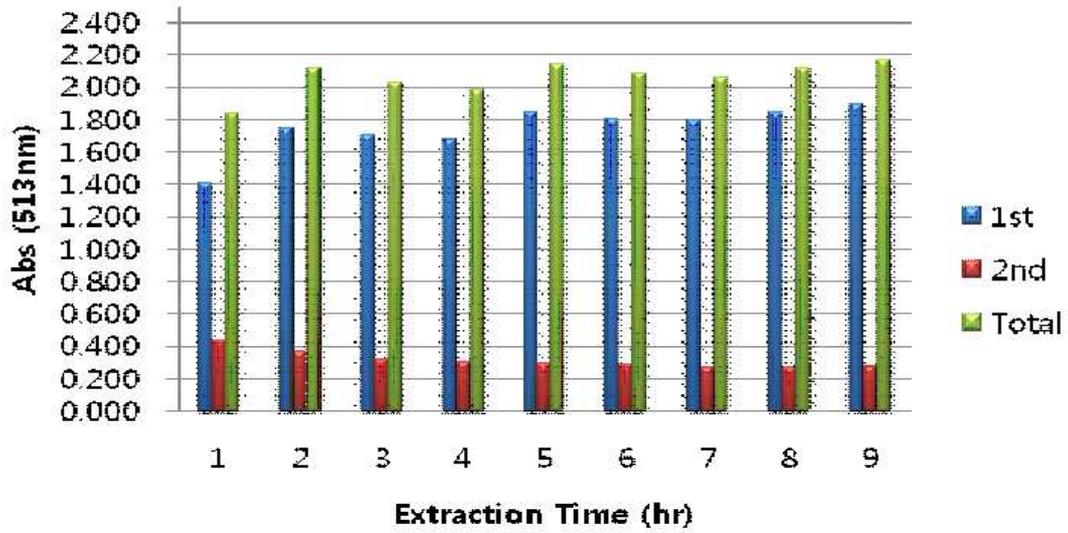


Fig. 91. 추출시간과 추출횟수에 따른 흡광도 비교

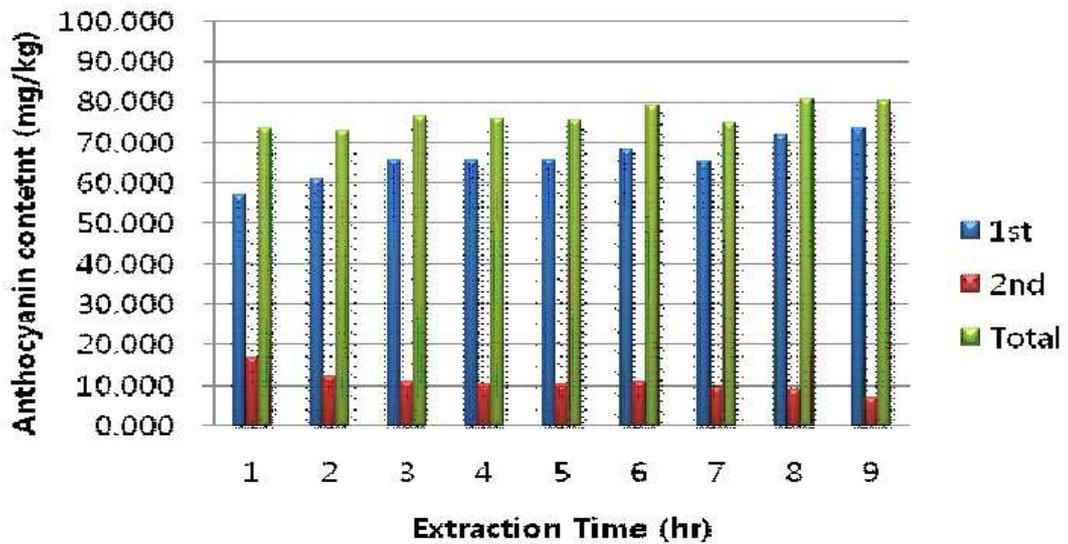


Fig. 92. 추출시간과 추출횟수에 따른 Anthocyanin 함량 비교

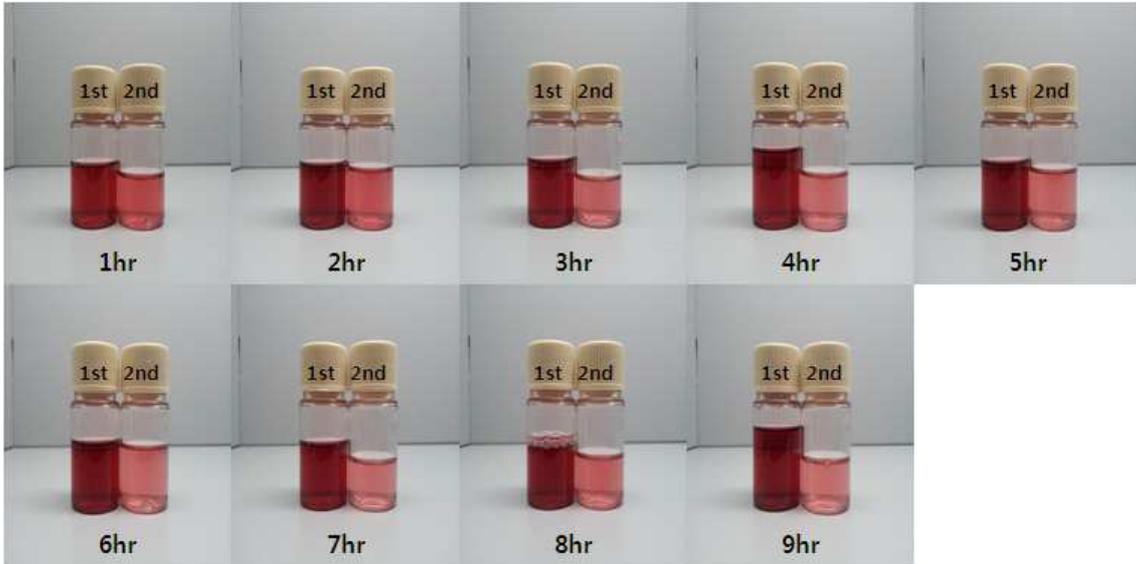


Fig. 93. 추출시간과 추출횟수에 따른 복분자 부산물 추출물의 색농도 비교

마. 추출온도 및 추출횟수에 의한 색소 추출특성

용매에 의한 추출시 상온에서보다 열처리를 통한 추출조건하에서 유효성분의 추출은 용이한 것으로 널리 알려져 있다. 하지만 역시 재료의 종류와 품종 등에 따라 최적화된 추출온도는 상이하므로 본 실험에서는 복분자박 추출시 온도와 추출횟수에 따른 색소의 추출특성을 **Table 74**에 나타내었다.

추출온도와 추출횟수를 제외하고 추출조건은 복분자박 대비 10배의 추출용매, 30%(w/w) 곡물주정 함량, 0.7% 함량의 산도조절제, 3시간으로 동일시하여 실험을 진행하였다.

추출시 온도에 따른 흡광도는 1.628에서 2.535까지 비례적으로 증가하는 경향을 보였으며 (**Fig. 94**), Anthocyanin 함량 역시 42.449 mg/kg에서 57.678 mg/kg으로 상호의존적인 경향을 보였다(**Fig. 95**). 하지만, 온도가 상승할수록 추출용매인 곡물주정이 휘발되어 추출액의 회수량은 감소하였다. 이는 농축시 농축시간을 단축할 수 있는 장점이 있긴 하지만 최종적으로 농축시 증발되는 용매를 재활용할 수 있는 방안이 산업적으로 대량생산시 경제적이며 효율적임을 감안하였을 때, 추출 온도는 50℃가 가장 적합한 것으로 판단하였다.

Table 74. 추출온도와 추출횟수에 의한 복분자 부산물 추출물 비교

No.	Temp. (°C)	Abs (513nm)			Anthocyanin content (mg/kg)		
		1st ext.	2nd ext.	Total	1st ext.	2nd ext.	Total
1	30	1.374	0.254	1.628	37.506	4.943	42.449
2	50	1.358	0.342	1.700	40.845	8.917	49.763
3	70	1.528	0.251	1.779	40.372	7.076	47.448
4	90	2.000	0.535	2.535	50.364	7.314	57.678

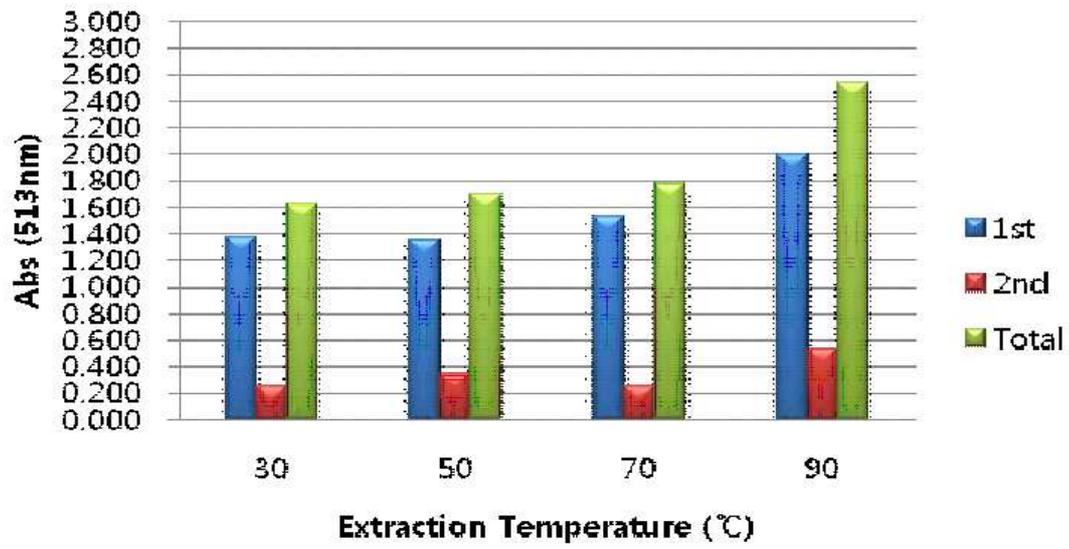


Fig. 94. 추출온도와 추출횟수에 따른 흡광도 비교

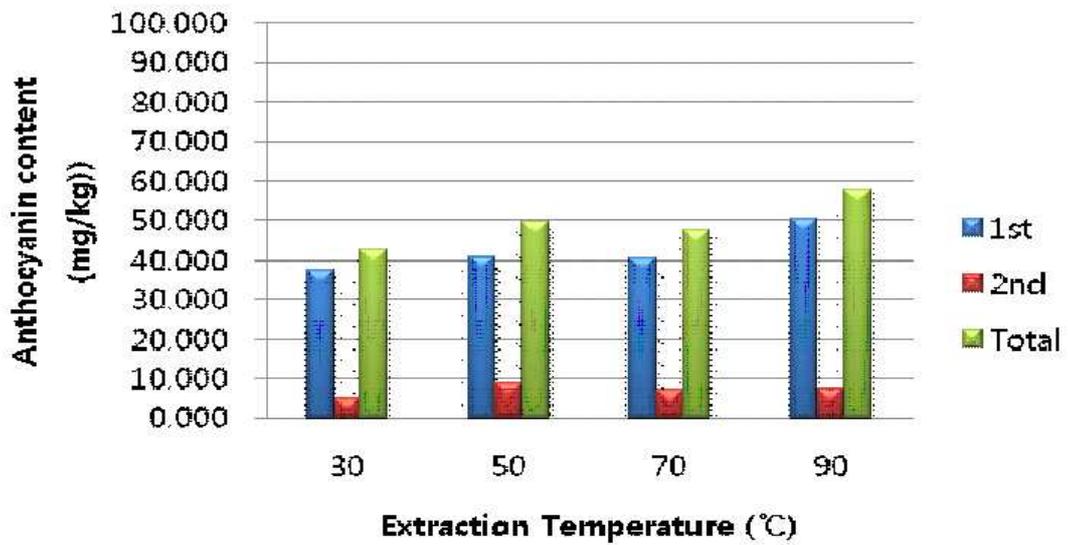


Fig. 95. 추출온도와 추출횟수에 따른 Anthocyanin 함량 비교

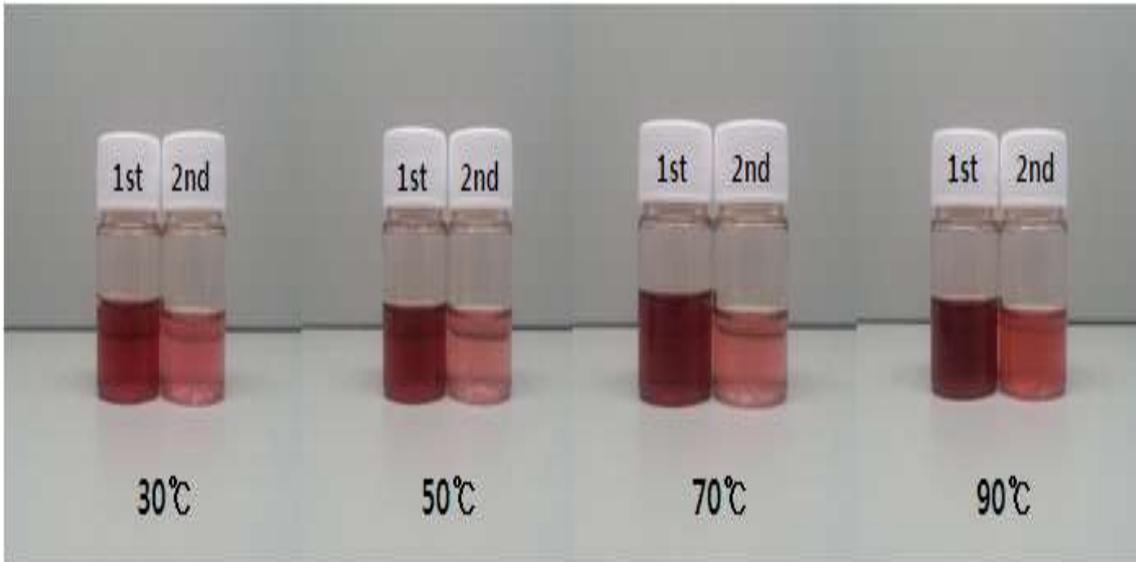


Fig. 96. 추출온도와 추출횟수에 따른 복분자 부산물 추출물의 색농도 비교

바. Pilot scale에 의한 추출·농축 실험

대량생산을 위한 경제성 및 효율성을 확인하고 최적화된 추출조건 확립을 위해 다양한 요인들에 대한 추출특성을 확인한 결과, 식품첨가물용 천연색소원을 고려하여 추출용매는 복분자박 대비 10배의 30%(w/w) 곡물주정, 0.7%의 산도조절제(유기산인 Citric acid, 무기산인 Acidic sodium metaphosphate), 추출온도 50°C, 추출시간 3시간, 추출횟수 2회로 최종 설정(Fig. 97) 하였으며 상기의 추출조건을 바탕으로 pilot scale의 설비를 이용하여 lab scale에서의 효율과 비교하였다.

40L 용량의 스테인레스 추출기(자체제작)에 복분자 부산물을 추출용 보자기를 이용하여 2회 반복 교반 추출한 후 pore size 5 μ m의 카트리지필터 2개를 이용하여 흡인 여과한 뒤 동일 규모의 진공저온농축기(MM-0750A, 미광메디컬, 한국)를 이용하여 최종 60Brix가 되도록 농축한 뒤 lab scale에서의 효율과 비교한 결과를 Table 75와 Table 76에 나타내었다.

lab scale에서의 추출물에 대한 총 흡광도는 1.700이었으며 pilot scale에서의 총 흡광도는 1.873으로 약간 높게 측정되었다. 이는 용량이 커진 추출기를 이용하여 보다 효율적으로 Anthocyanin계 천연색소가 추출된 것으로 사료된다.

또한, Total Anthocyanin 함량 역시 lab scale에서는 49.763 mg/kg이었고 pilot scale에서는 49.495 mg/kg으로 유사한 결과를 나타내었다.

Hunter's color value에 의하면 pilot에서 제조된 추출물은 lab에서 제조된 추출물에 비하여 a(redness)와 b(yellowness) 모두 증가하였으며 이는 전체적인 색농도의 증가를 의미한다. 흡광도가 다소 높게 측정된 pilot에서 제조된 추출물이 육안상으로도 짙은 색상임을 확인할 수 있었다(Fig. 98).

Table 75. lab scale과 pilot scale 시 복분자 부산물 추출물의 pH, Brix, Abs, Anthocyanin content 비교

Test scale	pH	Brix	Abs (513nm)			Anthocyanin content (mg/kg)		
			1st ext.	2nd ext.	Total	1st ext.	2nd ext.	Total
Lab	2.77	10	1.358	0.342	1.700	40.845	8.917	49.763
Pilot	2.84	10	1.534	0.339	1.873	41.881	7.615	49.495

Table 76. lab scale과 pilot scale 시 복분자 부산물 추출물의 Hunter's color value 비교

	Hunter's color value		
	L	a	b
Lab	53.98	52.50	20.40
Pilot	50.25	56.27	23.75

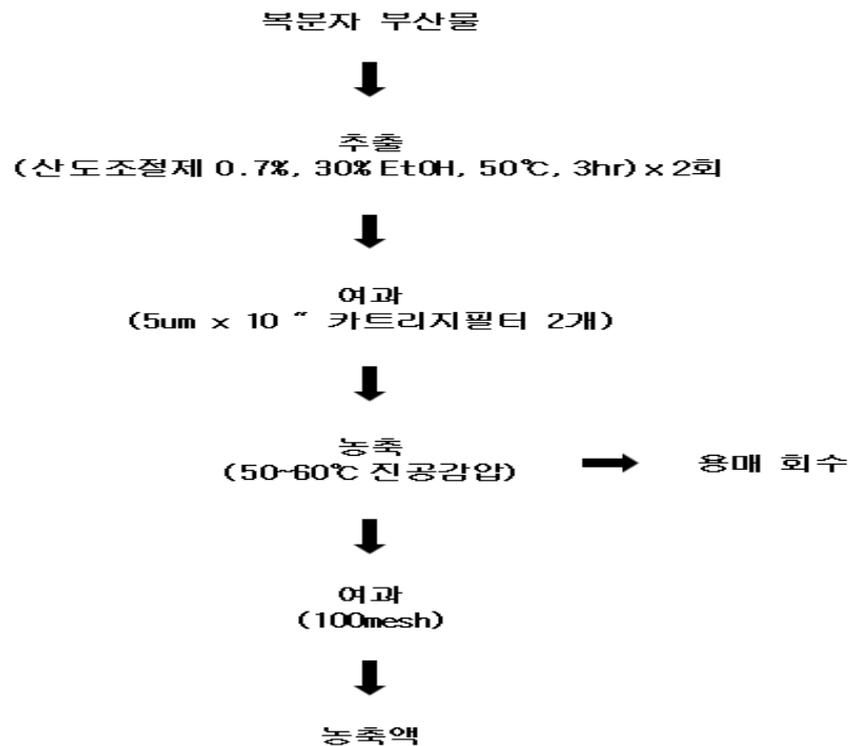


Fig. 97. 복분자 부산물의 추출 · 농축 공정도 (pilot scale)



Fig. 98. 복분자박 추출물의 색농도 비교

Pilot scale에서의 충분한 반복실험을 통해 상기의 실험결과를 얻을 수 있었으며 전체적으로 큰 오차없이 유사한 추출효율을 확인할 수 있었다. 하지만 보다 큰 규모, 즉 실제 제품화를 위해서는 대량생산 규모에서의 추출효율을 확인해야 한다. 이는 곧 제품의 생산에 따른 직·간접 경비가 포함된 제품의 원가는 물론 균일한 고품질의 고부가가치 신제품을 개발하는 최종목표이기 때문이다.

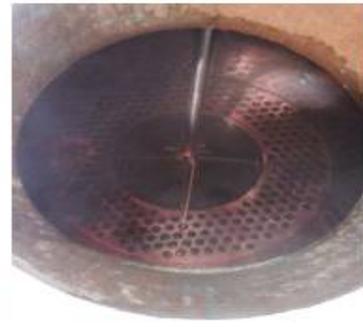
따라서 현재 자사 설비인 5ton 용량의 추출탱크 2기와 3톤 용량의 농축 및 진공탱크 1기를 이용하여 시험가동을 진행중이며 보다 정확한 추출효율 및 품질에 대한 비교결과를 확인하는 추가연구를 진행하였다(Fig. 99).



복분자 부산물



추출 (50°C, 3hr)



농축 (60°C)

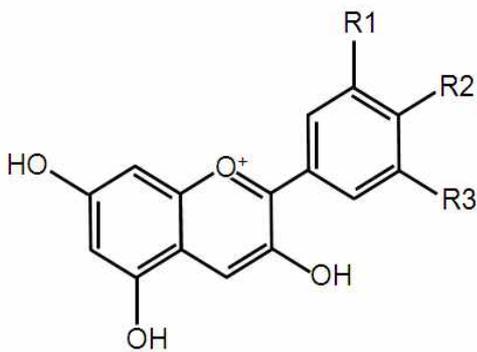
Fig. 99. 대용량 추출기 및 농축기를 이용한 대량생산 실험

자사에서 보유중인 상기 설비를 이용하여 현재 pilot scale에서 확인된 추출 및 농축 조건들에 대한 검증 실험을 진행하였으며, 다수의 반복 실험을 통해 최종 완제품에 대한 수율 및 제조원가 등에 대한 검증을 거쳐 제품화를 준비 중이다.

5. 복분자박 천연색소의 안정화 기술 개발

가. 복분자박 Anthocyanin 천연색소의 분석

Anthocyanin은 각종 식물의 잎, 꽃, 과실 등에서 적색에서 청색에 이르는 다양한 색을 발현하는 색소로 ‘화청소(花靑素)’라고도 불리고 있다. 자연계의 다양한 식물체에서 600종 이상이 발견되고 있는 Anthocyanin은 모두 안토시아니딘 배당체로서 flavilium(2-phenylbenzopyrilim)의 기본구조에 hydroxyl group 또는 methoxy group이 치환되어 있는 구조를 가지고 있다(**Fig. 100**).



Anthocyanidin	R1	R2	R3	MW
Pelargonidin	H	OH	H	271
Cyanidin	OH	OH	H	287
Delphinidin	OH	OH	OH	303
Peonidin	OCH ₃	OH	H	304
Petunidin	OCH ₃	OH	OH	307
Malvidin	OCH ₃	OH	OCH ₃	331

Fig. 100. 안토시아니딘의 기본구조 및 배당체

복분자 Anthocyanin의 경우 주성분인 Cyanidin-3-glucoside(C3G)와 Cyanidin-3-rutinoside(C3R)의 비율이 3:1 정도로 구성되어 상대적으로 추출이 수월하다고 알려져 있다. 이를 확인하기 위하여 Anthocyanin 표준물질(Cyanidin-3-glucoside, Sigma Aldrich, USA)과 복분자박 추출물 및 농축액을 동시에 분석하여 일치하는지를 확인하였다.

Anthocyanin의 분석은 HPLC를 이용하여 solvent gradient 방법으로 분석하였다. Column은 YMC-Pack ODS-A(4.6*250mm)를 사용하였으며, HPLC 분석조건은 **Table 78**과 같다.

Table 78. 복분자박 Anthocyanin HPLC 분석조건

HPLC	Waters e2695
Column	YMC-Pack ODS-A (4.6*250mm, s-5 μ m, 12mm)
Flow rate	1ml/min
UV Wavelength	520nm
Temperature	30 $^{\circ}$ C
Injection	2 μ l

표준품(Cyanidin-3-glucoside)은 10ug/ml의 농도로 MeOH 용해하여 0.45 μ m syringe filter로 여과하였고 복분자박 농축액은 50mg/ml의 농도로 MeOH 용해하여 0.45 μ m syringe filter로 여과, 복분자박 추출물 A, B, C은 0.45 μ m syringe filter로 여과한 후 HPLC로 분석하였다.

Anthocyanin 표준물질(C3G)의 RT는 10.476분으로 복분자박 농축액의 RT는 10.673분으로 매우 유사하게 측정되었으며(**Fig. 101**), 복분자박 추출물 A, B, C의 RT 역시 각각 10.682분, 10.668분, 10.680분으로 표준물질과 매우 유사하게 측정되었다(**Fig. 102**). 이상의 결과로 복분자박 Anthocyanin 역시 Cyanidin-3-glucoside가 주요 Anthocyanin 물질임을 확인할 수 있었다.

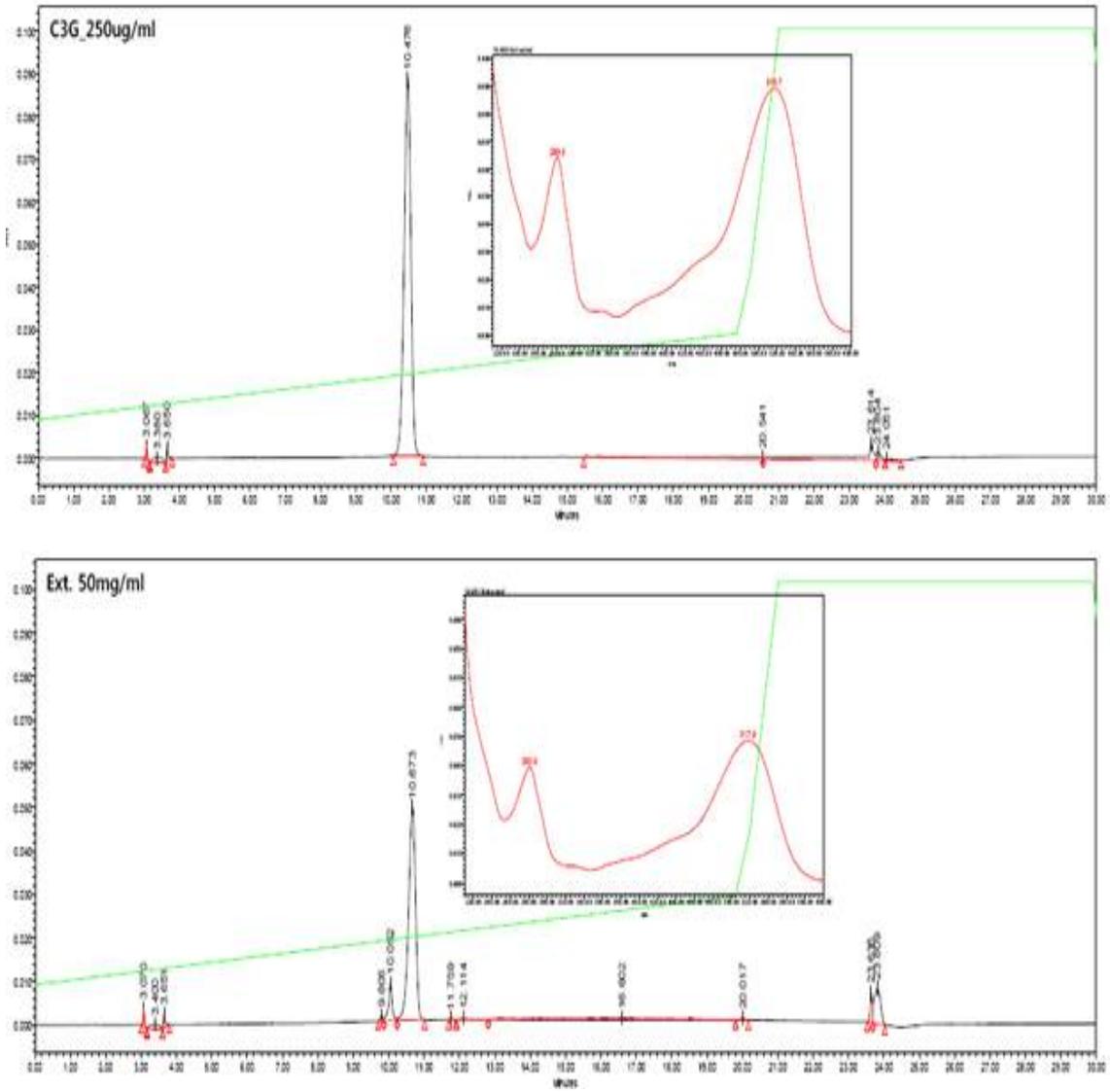


Fig. 101. Anthocyanin 표준물질(C3G)과 복분자박 농축액의 HPLC chromatogram

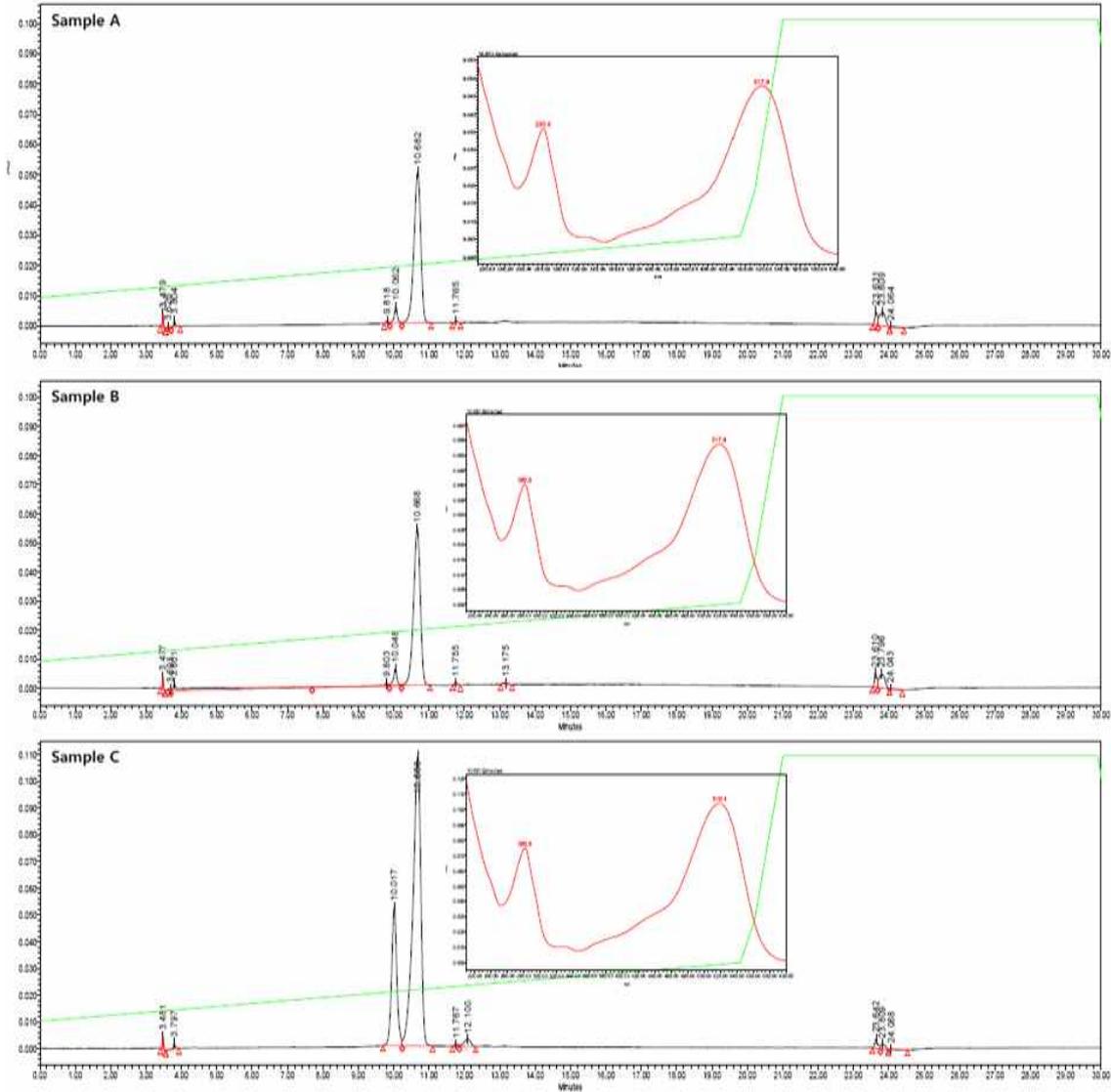


Fig. 102. 복분자박 추출액 A, B, C의 HPLC chromatogram

나. pH 및 가열처리에 따른 색소의 안정성 평가

복분자박 Anthocyanin 천연색소의 pH 및 가열처리에 대한 안정성을 확인하기 위하여 pH를 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0으로 조절하였다. 각 pH별로 복분자박 Anthocyanin 천연색소를 첨가하여 최종농도 1% 수용액을 제조하였고 각 수용액을 10mL씩 cap test tube에 넣어 50, 70, 100°C의 항온수조(BW-20G, 한국)에서 0~30분까지 가열처리를 시킨 후 전체적인 색상의 변화를 알아보기 쉽게 고안한 color map의 형태로 정리하였다(Fig. 103).

Anthocyanin계 천연색소의 가장 큰 특징인 낮은 pH 영역에서의 적색 발현성이 좋은 것으로 확인되었으며 pH가 낮을수록 고온에서 장시간 가열처리를 하여도 색상의 변화는 크지 않음을 확인하였다. 이는 복분자박에서 추출한 Anthocyanin 천연색소의 열에 대한 안정성은 낮은 pH에서 효과적임을 나타낸다. 따라서 최근 문제시 되고 있는 음료 및 시럽, 병과류 등 pH가 낮은 산성영역의 가공식품에 알레르기 및 ADHD 유발 가능성이 높다고 알려진 동물성 천연색소인 코치닐추출색소를 대체할 수 있는 좋은 색소원으로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

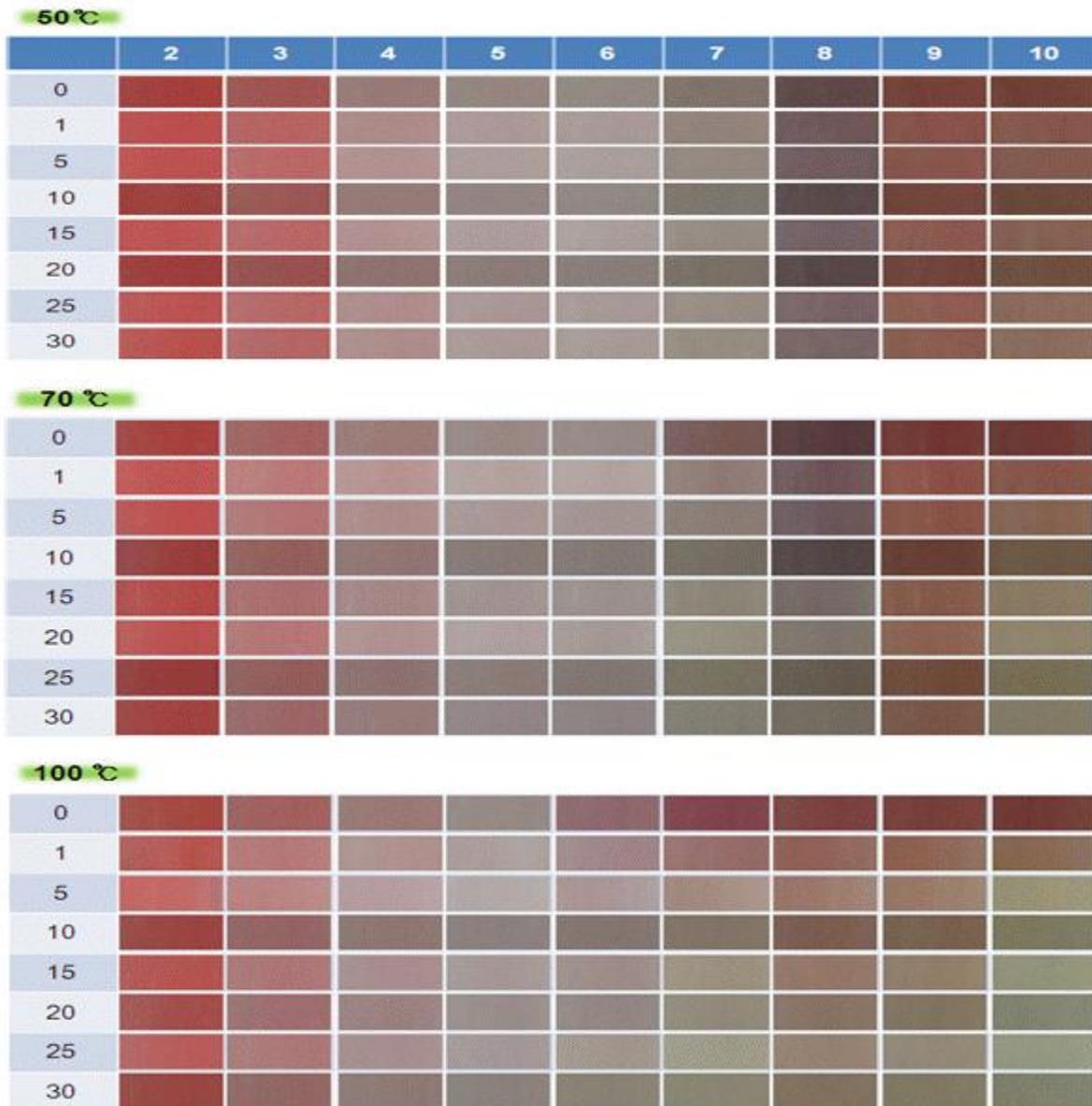


Fig. 103. 복분자박 Anthocyanin 천연색소의 color map

다. 당류 첨가 및 저장온도, 저장기간에 따른 색소의 안정성 평가

당류 첨가가 복분자박 Anthocyanin 천연색소의 저장온도와 저장기간에 미치는 영향을 확인하기 위하여 pH 3.0의 구연산·인산이나트륨 완충액을 사용하여 1% 농도의 색소 수용액을 제조하였고 각 수용액에 fructose, maltose, sucrose, glucose, galactose를 각 0.1%, 0.5%, 1.0% 첨가하였다. 각각의 시료를 Anthocyanin의 최대흡수파장인 513nm에서 흡광도를 측정 후 25°C의 상온과 4°C의 냉장고에 2주동안 보관하면서 흡광도의 변화를 측정하여 저장기간 중 색소의 안정성을 평가하였다.

25°C의 상온에서 2주간의 저장기간 중, 복분자박 Anthocyanin 천연색소에 각 당류가 0.1% 첨가시에는 Maltose가 첨가된 시료가 안정성이 좋은 것으로 확인되었고 0.5% 첨가시에는

Glucose가 첨가된 시료가 비교적 우수하였으며 1.0% 첨가시에는 Sucrose가 첨가된 시료가 안정성이 우수한 것으로 확인되었다(Fig. 104).

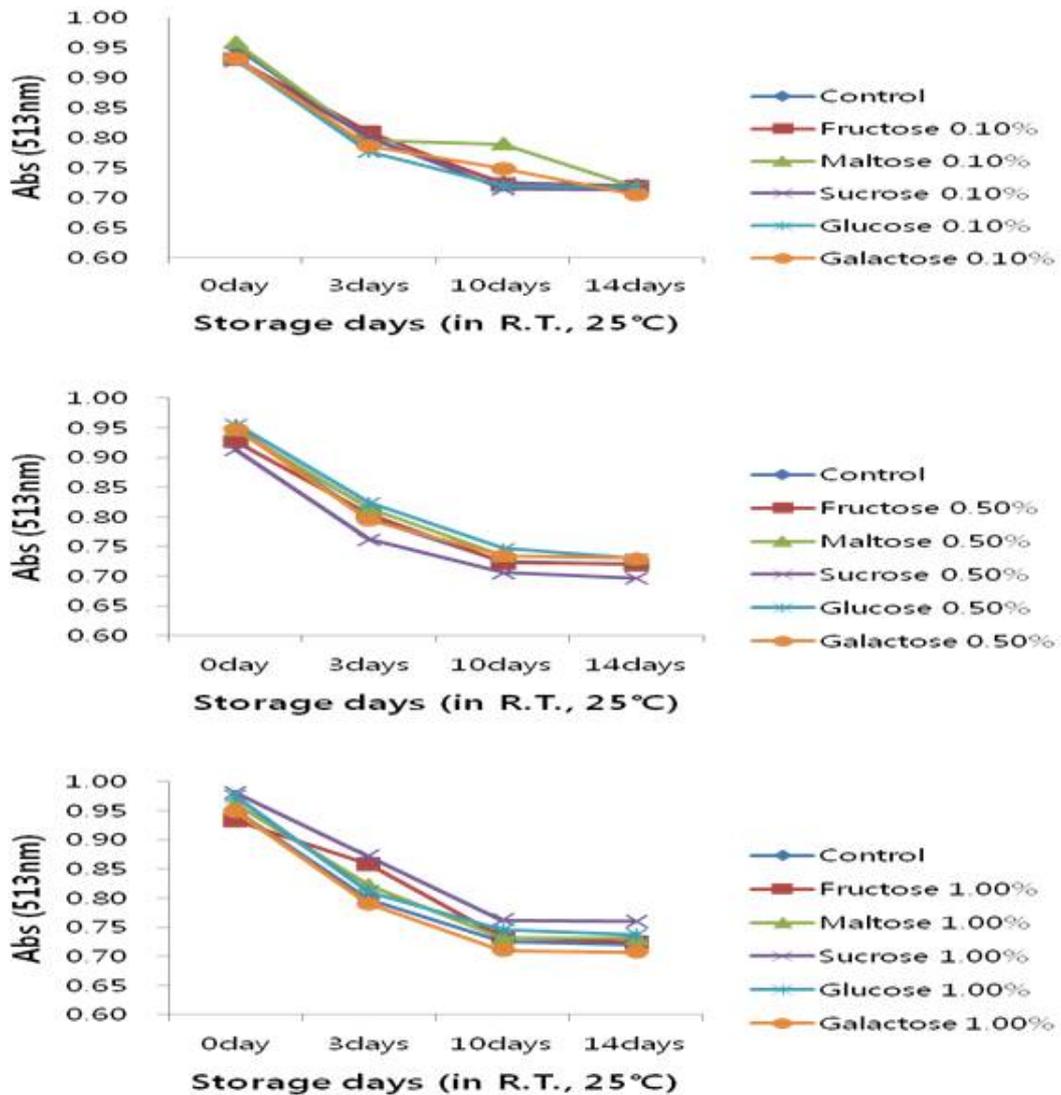


Fig. 104. 당류가 첨가된 복분자박 Anthocyanin 천연색소의 안정성 비교 (25°C)

이러한 효과는 4°C의 냉장고에서 2주간의 저장기간 중, 복분자박 Anthocyanin 천연색소의 안정화 효과와 동일한 결과를 나타내었다. 즉, 각 당류가 0.1% 첨가시에는 Maltose가 첨가된 시료가 안정성이 좋은 것으로 확인되었고 0.5% 첨가시에는 Glucose가 첨가된 시료가 비교적 우수하였으며 1.0% 첨가시에는 Sucrose가 첨가된 시료가 안정성이 우수한 것으로 확인되었다 (Fig. 105).

다만, 상온에서 보관중인 시료는 당류에 의한 색상의 갈변도가 증가하였으며 시간이 경과할수록 변질의 우려가 높으므로 상온에서는 특별한 주의가 필요할 것으로 사료된다.

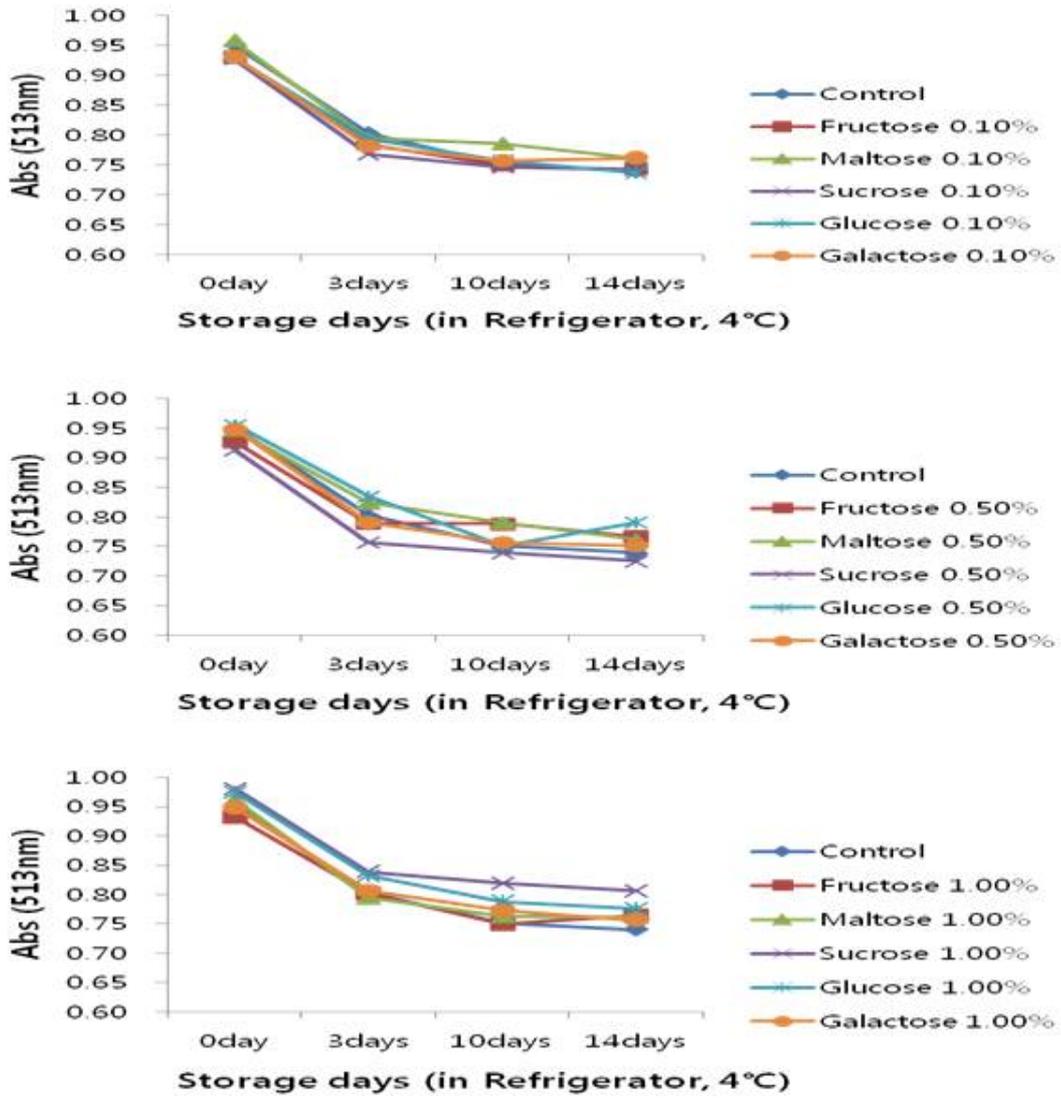


Fig. 105. 당류가 첨가된 복분자박 Anthocyanin 천연색소의 안정성 비교 (4°C)

라. Copigmentation에 의한 Anthocyanin계 천연색소의 안정성 평가

Anthocyanin계 천연색소의 불안정성은 flavilium 양이온 구조에 기인하며 pH, 온도, 당류, 금속이온과 copigment 등에 의해 영향을 받는다. Anthocyanin의 copigmentation은 크게 Anthocyanin의 농도가 높을 때 일어나는 자체결합, acylation된 Anthocyanin에서 일어나는 분자내결합, 그리고 서로 다른 분자 사이에서 일어나는 분자간결합으로 나눌 수 있다(Fig. 106).

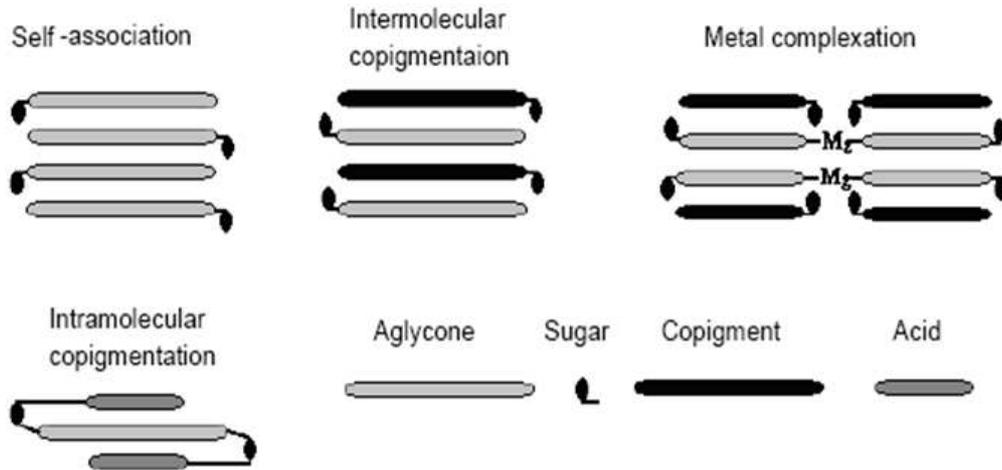


Fig. 106. Anthocyanin의 copigmentation 결합과정

Anthocyanin의 구조적 안정성을 높일 수 있는 copigment로서 방향족 페놀산류인 tannic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, hydrobenzoic acid를 선택하고 색소 농도의 1, 5, 10배가 되도록 첨가하여 pH 3.0의 구연산·인산이나트륨 완충액에서 copigment의 농도에 대한 영향을 조사한 뒤, 각각의 시료를 25℃의 상온과 4℃의 냉장고에 2주동안 보관하면서 흡광도의 변화를 측정하여 저장기간 중 색소의 안정성을 평가하였다.

25℃의 상온에서 2주간의 저장기간 중, 복분자박 Anthocyanin 천연색소에 각 방향족 페놀산류의 함량이 높을수록 Anthocyanin의 저장 안정성을 높이는 효과를 보여주고 있으며 그 중 chlorogenic acid의 효과가 가장 좋았으며 caffeic acid, tannic acid, hydrobenzoic acid의 순으로 효과가 있음이 확인되었다.(Fig. 107).

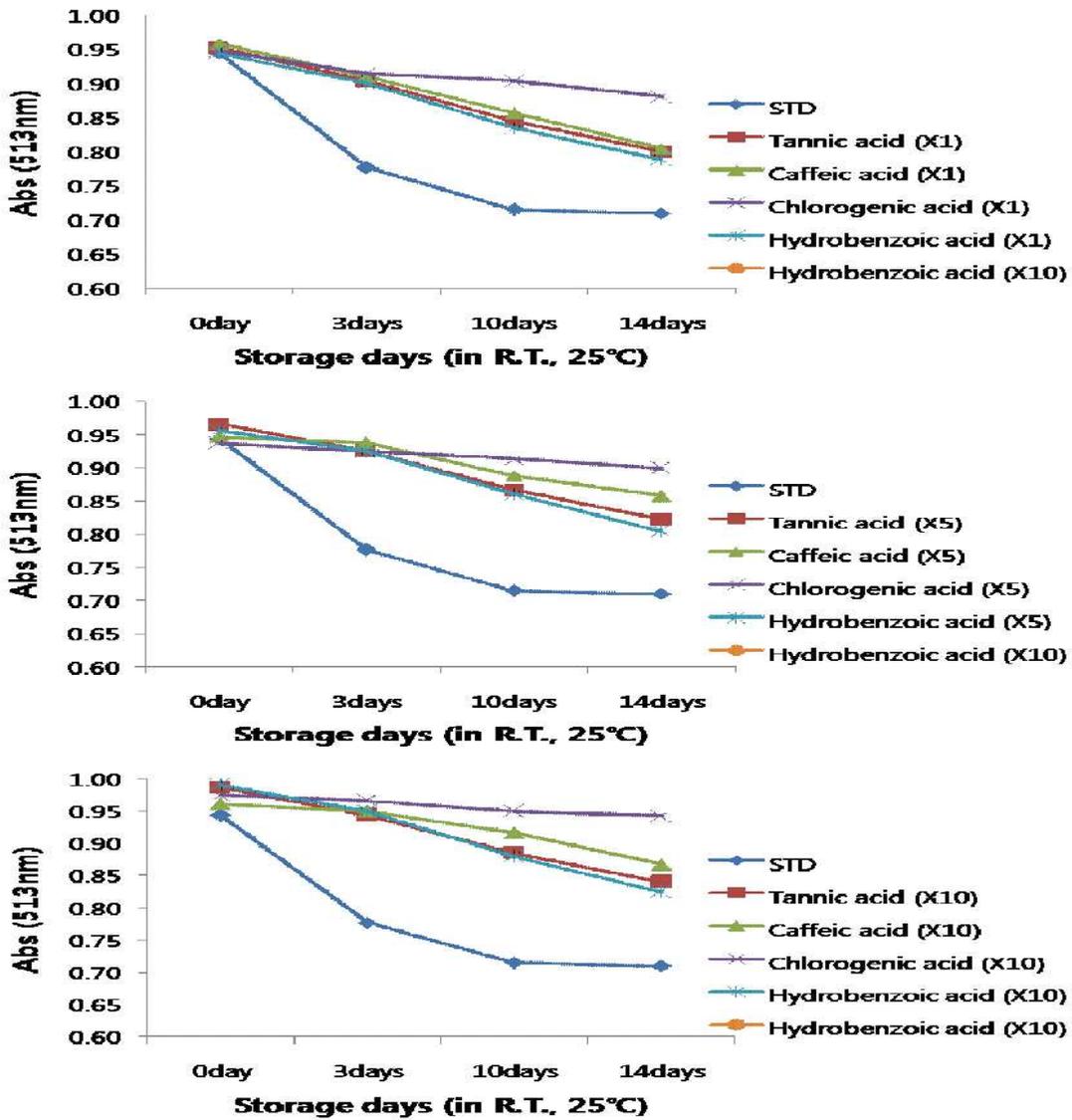


Fig. 107. 방향족 페놀산류가 첨가된 복분자박 Anthocyanin 천연색소의 안정성 비교 (25°C)

이러한 효과는 당류 첨가에 따른 4°C의 냉장고에서 2주간의 저장기간 중, 복분자박 Anthocyanin 천연색소의 안정화 효과와 유사한 결과를 나타내었다. 즉, 각 방향족 페놀산류의 첨가량이 높을수록 다소 좋은 효과를 보였으나 그 차이는 미미하였으며 chlorogenic acid의 효과가 다소 좋았으나 전반적으로 4°C의 냉장보관시 모든 방향족 페놀산류 첨가 시료에서 좋은 효과를 나타내었다(Fig. 108).

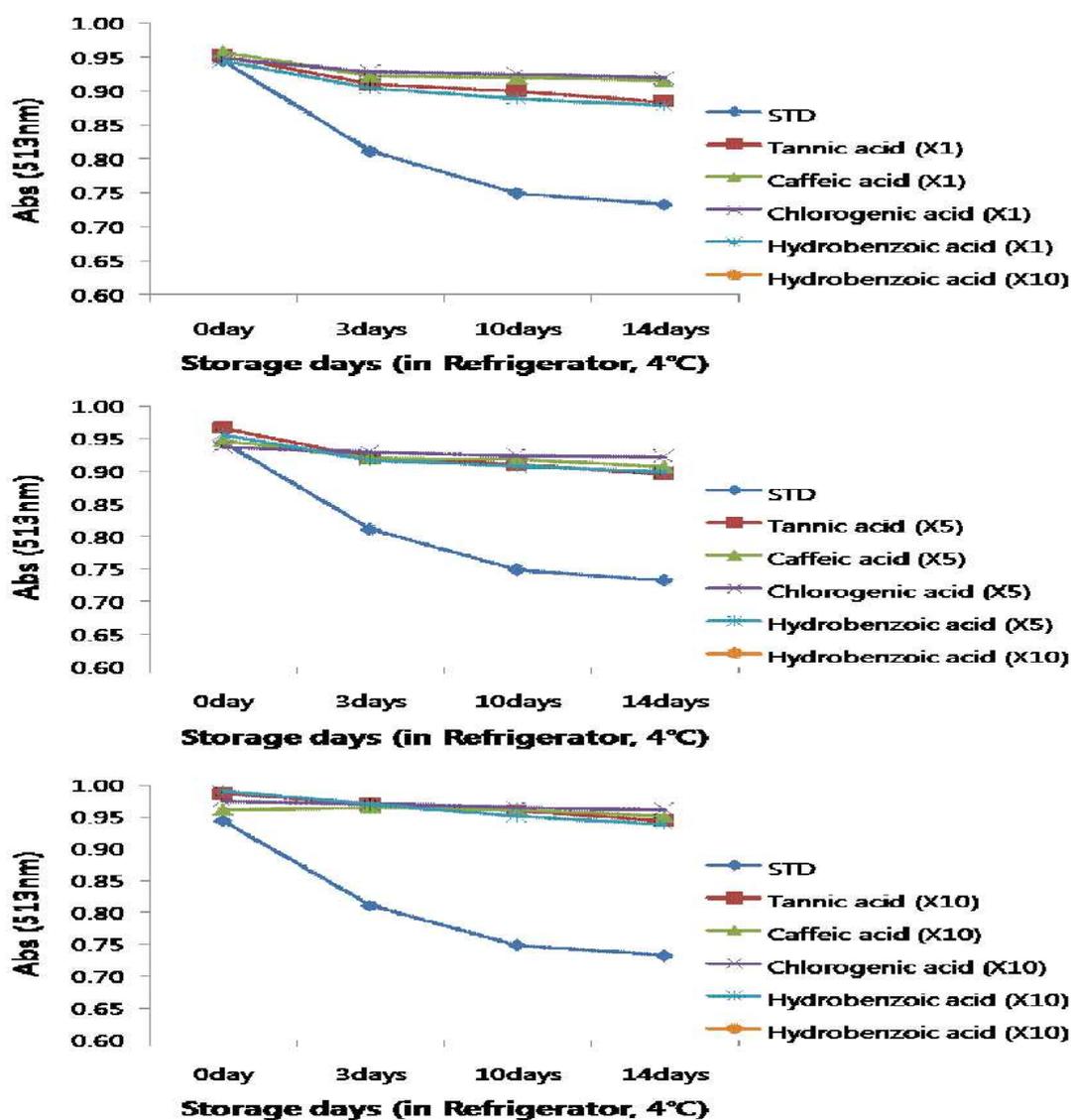


Fig. 108. 방향족 페놀산류가 첨가된 복분자박 Anthocyanin 천연색소의 안정성 비교 (4°C)

6. 복분자박으로부터 Anthocyanin의 분리정제 기술 개발

가. 시료선정을 위한 복분자박의 외관 비교

본 실험에 사용한 복분자박 A는 코리아누스(Gochang-gun, Jeollabuk-do, Korea)에서 제공받은 것으로 착즙 후 압착한 시료였으며, 복분자박 B는 (주)연수당(Gwangju, Korea)에서 제공받은 것으로 복분자 생과를 원심분리에 의해 착즙하고 남은 부산물을 시료로 사용하였다. 복분자박 A와 B를 최적 ethanol 추출 조건(시료 대 용매 비율 13.16%(w/v), 추출온도 30°C, 추출시간 1 hr)과 최적 효소 처리 조건(Pectinex Ultra SP-L의 농도 0.5 mL/100 L, 반응온도 54.49°C, 반응시간 2hr)에 의해 추출물을 제조한 후 정제에 사용하였다. 정제 시 흡착제로 Amberlite XAD-7을 사용하였으며 흡착된 Anthocyanin은 1% HCl을 포함한 95% ethanol로 용출하여 정제물을 얻었다.

복분자 부산물의 원물 그대로를 비교해보면, 복분자 부산물A는 복분자 부산물B에 비해 수분이 적고 색이 더 짙은 것을 알 수 있었다(Fig. 109). 이러한 복분자 부산물을 Pectinex Ultra SP-L의 최적 효소처리조건인 효소농도 0.50 ml/100 L, 반응온도 54.49°C, 반응시간 2 hr으로 효소처리한 후 동결건조 하였을 때의 외관은 Fig. 110와 같다. 복분자 부산물A의 경우 동결건조에 의해 건조되어 고형분만 남았지만, 복분자 부산물B의 경우 gel 상태로 나타났다.

효소처리 후 시료를 ethanol 추출하였으며 ethanol 추출 시 최적추출조건인 시료 대 용매비율 13.16%(w/v), 추출온도 30°C, 추출시간 1 hr으로 행하였고, 추출 후 추출물의 외관은 Fig. 111과 같다. ethanol 추출물을 sorbent인 Amberlite XAD-7로 1%의 HCl에 95% EtOH 조건에서 분리정제 하였다(Fig. 112). 분리정제 후 동결건조하였고 복분자 부산물 A에서 분리정제한 Anthocyanin계 천연색소보다 복분자 부산물 B에서 분리정제 하였을 때 색상이 전반적으로 더 진하게 나타났다(Fig. 113).

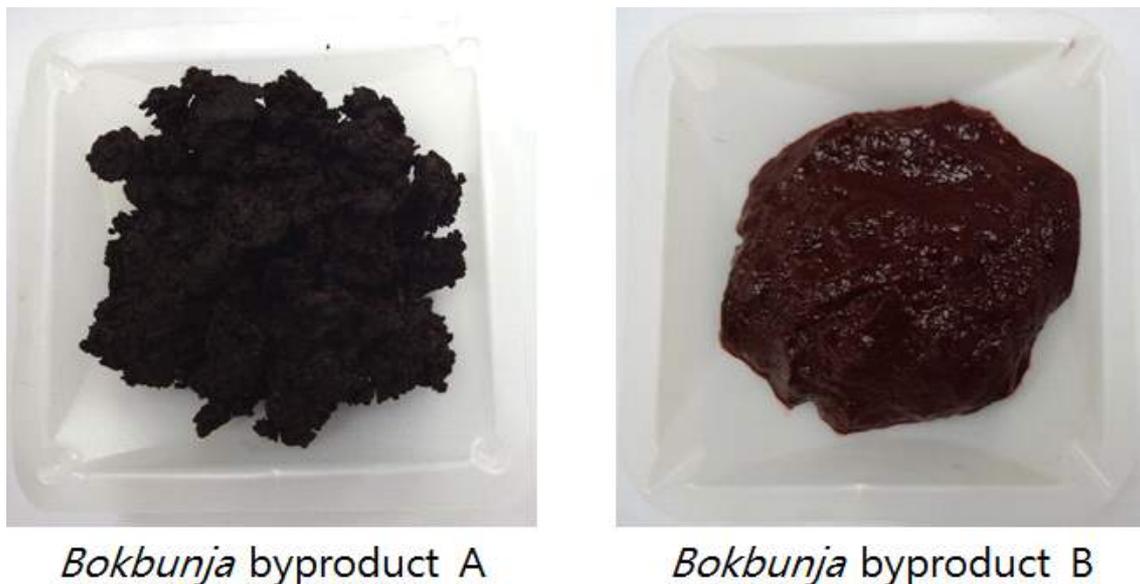


Fig. 109. Appearance of *Bokbunja* byproduct A and B.



Bokbunja byproduct A



Bokbunja byproduct B

Fig. 110. Appearance of *Bokbunja* byproduct A and B after treated Pectinex Ultra SP-L.

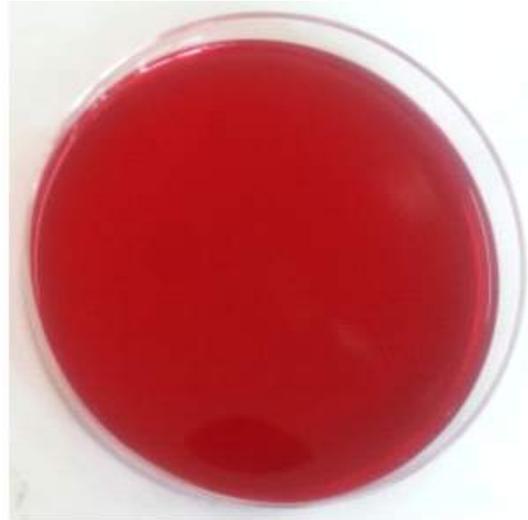


Bokbunja byproduct A *Bokbunja* byproduct B

Fig. 111. Appearance of *Bokbunja* byproduct A and B before purification by Amberlite XAD-7



Bokbunja byproduct A



Bokbunja byproduct B

Fig. 112. Appearance of *Bokbunja* byproduct A and B after purification by Amberlite XAD-7.



Bokbunja byproduct A



Bokbunja byproduct B

Fig. 113. Appearance of *Bokbunja* byproduct A and B after freeze drying.

나. 시료선정을 위한 복분자박의 항산화활성 비교

복분자박 A와 B를 정제 하는 과정에서 각 단계의 정제 수율을 측정 한 결과는 **Table 79**와 같다. ethanol 추출 과정까지는 복분자박 B의 수율이 높았으나 최종 정제 후의 정제 수율을 측정 한 결과 각각 0.11%와 0.07%로 복분자박 A가 상대적으로 높은 수율을 보였다.

복분자박 A와 B를 처음 원물 상태의 복분자박(raw sample)과 최적 추출 공정에 의해 ethanol 추출한 시료(extracted with EtOH) 및 Amberlite XAD-7 sorbent를 이용하여 정제한 시료(purified sample)의 세 단계로 시료를 얻어 분석에 사용하였다.

복분자박 A의 경우 복분자박을 정제함에 따라 Total Anthocyanin 함량, DPPH radical 소거능, SOD-like 활성능, hydrogen peroxide 소거능이 증가하는 경향을 보였으나 Total Flavonoid 함량은 있어서 정제에 의해 그 함량이 감소하는 것으로 나타났다(**Table 80**). 복분자박 B의 경우 Total Anthocyanin 함량, Total Flavonoid 함량 및 Total Flavonoid 함량에 있어서만 정제에 의해 증가하는 것을 보였으며, DPPH radical 소거능, hydroxyl radical 소거능 및 hydrogen peroxide 소거능의 경우 ethanol 추출 한 시료를 정제했을 때, 활성이 다소 감소하는 것으로 나타났다(**Table 81**).

복분자박 A와 B를 비교해보면, 원물 상태일 때 SOD-like 활성능을 제외한 모든 분석 항목에서 복분자박 A의 항산화활성이 우수하게 나타났고, 정제 후에도 DPPH radical 소거능, SOD-like 활성능, hydroxyl radical 소거능, hydrogen peroxide 소거능 및 elastase 저해 활성능의 5가지 분석 항목에 있어서 더 높게 나타났다. 따라서, 복분자박 A의 정제 수율 및 항산화활성이 복분자박 B 보다 높게 나타났기 때문에 Anthocyanin의 분리 정제를 위한 시료로서 복분자박 A를 사용하는 것이 바람직하다고 사료되었다.

Table 79. Yield of *Bokbunja* byproduct A¹⁾ and B²⁾ by isolation step.

	(%)	
	<i>Bokbunja</i> byproduct A ¹⁾	<i>Bokbunja</i> byproduct B ²⁾
Raw sample	100.00	100.00
Extracted with EtOH	25.19	73.14
Pectinex Ultra SP-L enzyme treatment	19.04	30.79
Purified sample	0.11	0.07

¹⁾ A : Compressed byproduct.

²⁾ B : Centrifuged byproduct.

Table 80. Total Anthocyanin contents, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, antioxidative activities and elastase inhibitory activity of *Bokbunja* byproduct A¹⁾ by isolation step.

	Total Anthocyanin contents (mg/100 g)	Total polyphenol contents (µg/g)	Total flavonoid contents (µg/mL)	DPPH radical scavenging activity (%)	SOD-like activity (%)	Hydroxyl radical scavenging activity (%)	Hydrogen peroxide scavenging activity (%)	Elastase inhibitory activity (%)
Raw sample	0.39±0.001	6.94±0.23	2.23±0.10	73.51±1.81	46.62±0.66	65.46±0.54	78.85±0.64	8.81±2.11
Extracted with EtOH sample	0.35±0.003	8.02±0.01	2.01±0.02	74.78±0.13	51.10±1.19	76.29±0.15	84.28±0.21	5.79±6.47
Purified sample	6.75±0.001	7.97±3.53	1.19±0.14	84.55±0.08	61.82±1.13	73.37±0.99	92.73±0.05	9.72±2.54

¹⁾ A : Compressed byproduct.

Table 80. Total Anthocyanin contents, Total Polyphenol contents, Total Flavonoid contents, antioxidative activities and elastase inhibitory activity of *Bokbunja* byproduct B¹⁾ by isolation step.

	Total Anthocyanin contents (mg/100 g)	Total polyphenol contents (µg/g)	Total flavonoid contents (µg/mL)	DPPH radical scavenging activity (%)	SOD-like activity (%)	Hydroxyl radical scavenging activity (%)	Hydrogen peroxide scavenging activity (%)	Elastase inhibitory activity (%)
Raw sample	0.23±0.007	1.85±0.78	1.50±0.19	1.85±0.78	57.64±1.88	50.55±0.34	40.65±2.52	5.16±5.57
Extracted with EtOH sample	0.64±0.001	7.49±0.10	2.13±0.00	57.33±0.02	48.62±0.58	68.02±0.42	83.90±0.75	0.91±1.29
Purified sample	6.67±0.001	14.83±0.77	2.35±0.03	44.59±1.90	42.65±0.60	61.61±1.92	77.58±0.40	7.90±0.89

¹⁾ B : Compressed byproduct.

다. MCX SPE cartridge를 이용한 Anthocyanin의 최적 분리정제 공정

(1) 외형

복분자박으로부터 Anthocyanin을 분리정제하기 위해 sorbent로서 MCX SPE cartridge를 사용하였고, pH 조절제로는 HCl 또는 TFA의 농도(0.1-1.0%)와 용출제로는 ethanol의 농도(60-90%)를 독립변수로 하여 최적 분리정제공정을 위한 실험설계를 하였다. MCX(Mixed cation exchange)는 양이온 교환과 역상 흡착(reversed phase adsorption)의 두 가지 메커니즘을 이용하여 고체상 추출(solid phase extraction, SPE) 방법으로 원하는 물질을 분리할 수 있도록 한다. MCX SPE cartridge의 양이온 교환기에는 양이온 상태의 물질이 흡착되고, 비극성 구조에는 산성 물질이 흡착되어 중성화되는데, 유기용매에 의해 비극성 구조에 흡착된 중성형태 산성 물질과의 결합이 끊어지므로 산성물질만을 용출시킬 수 있다(Sim et al, 2008). 용출제로서는 ethanol과 메탄올 등의 사용이 보고되어 있다(Noela et al, 2015; Noelia et al, 2009; Hanzhi et al, 2015; He and Giusti, 2011a).

pH 조절제로 사용된 HCl과 TFA는 Anthocyanin 색소의 안정성을 위해 사용되었다. Anthocyanin은 pH에 의해 구조가 변하기 때문에 색 변화가 발생하는데, 일반적으로 산성일 때 적색이고 염기성일 때 청색을 나타낸다(Choi, 2004). 낮은 pH에서 적색을 띠는 것은 red flavylium ion에 의한 것으로 보고되고 있다(Cooper-Diver, 2001). 분리정제 시 용출제로 사용되는 용매로는 ethanol, 메탄올, 증류수 등이 있으며, 그 중 독성과 수율 측면에서 고려했을 때 식품산업에서는 주로 ethanol이 많이 이용되고 있다(Kim et al, 2014).

분리정제된 Anthocyanin의 색상을 보았을 때(Fig. 114), pH 조절제로 HCl을 사용하였을 경우 ethanol 75% 조건에서 색이 가장 진하게 나타났다. Ethanol 60% 조건에서 HCl 0.1%를 사용하였을 때 붉은색이 가장 연했으며, HCl 0.55%와 1%는 비슷하게 나타났다. Ethanol 90% 조건에서는 HCl의 농도 증가에 따라 색이 진해지는 경향을 보였다. pH 조절제로 TFA를 사용하였을 경우 ethanol 60% 보다 ethanol 90% 조건에서 색이 더 연하게 나타났다. HCl과 TFA를 비교해보면, HCl을 사용하여 분리정제 하였을 때 붉은색이 더 강하였으며, HCl의 농도가 1%, ethanol의 농도가 75%일 때 붉은색이 가장 진하게 나타났다.

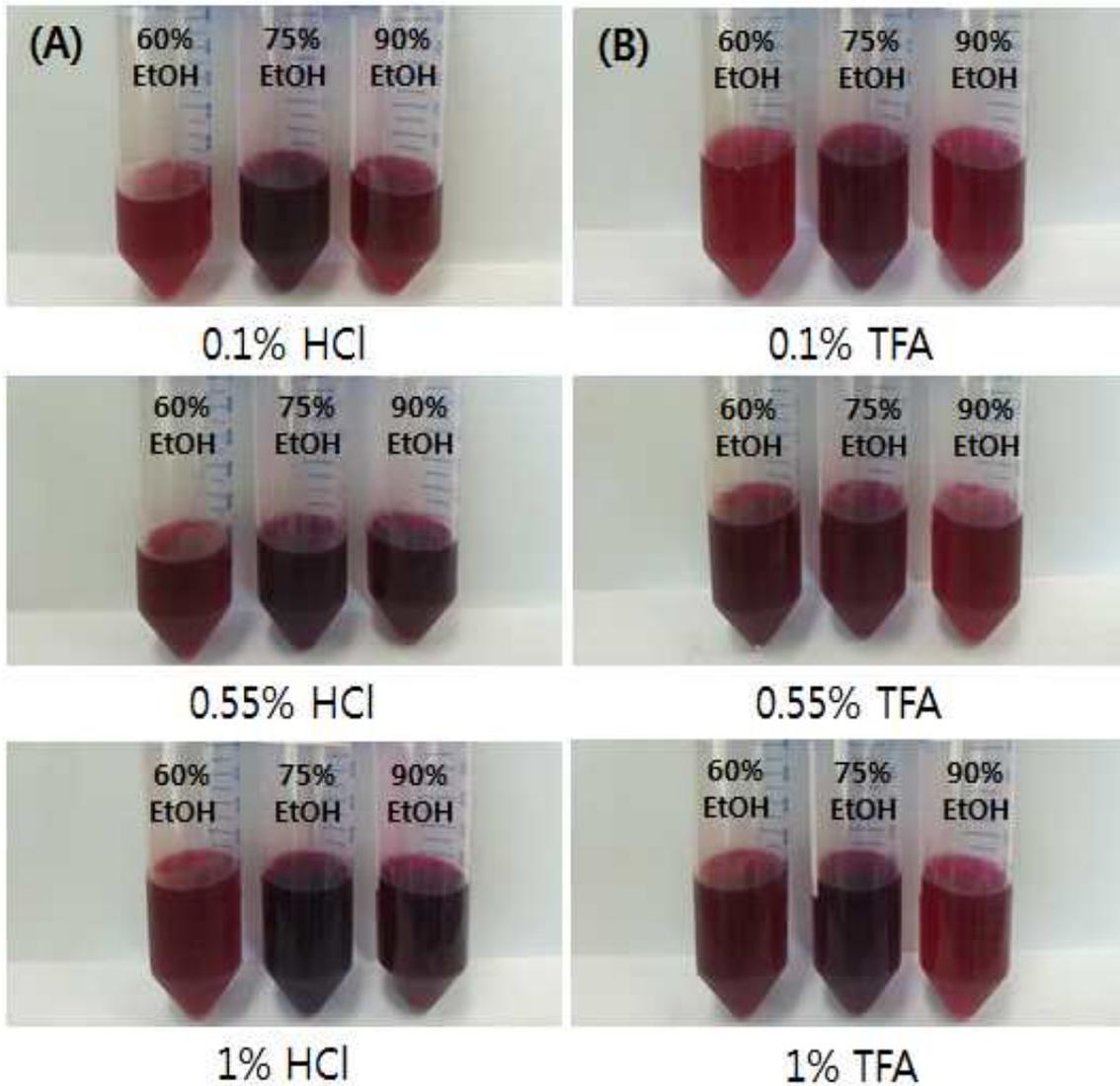


Fig. 114. Appearances of purified Anthocyanin from *Bokbunja* byproduct extracts by MCX SPE cartridge depending on acidulant, HCl (A) or TFA (B), and ethanol concentrations.

(2) 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량

두 가지 요인으로서 HCl 또는 TFA의 농도와 ethanol의 농도에 따른 정제된 Anthocyanin의 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량을 조사한 결과는 **Table 82**와 같다.

pH 조절제로서 HCl을 사용하였을 경우 본 실험의 흥미영역 구간 실험점에서의 수율은 54.50-63.47%로, HCl 1%, ethanol 60%의 조건에서 가장 높았다. 색가는 0.274-0.996(E 10%, 1 cm) 범위로 HCl 1%, ethanol 75% 조건에서 가장 높았으며, Total Anthocyanin 함량은 5.00-19.77 mg/100 g으로 HCl 1%, ethanol 75% 조건에서 가장 높게 나타났다. 반면에 TFA를 사용하였을 경우 수율은 54.24-63.39%로 TFA 1%, ethanol 60% 조건에서 가장 높았고, 색가는 0.295-0.813(E 10%, 1 cm)로 TFA 1%, ethanol 75%에서, Total Anthocyanin 함량은

5.62-16.01 mg/100 g 범위로 TFA 1%, ethanol 75%에서 가장 높은 함량을 나타내었다.

분리정제된 Anthocyanin의 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량을 분석한 결과 pH 조절제로서 HCl이 TFA 보다 우수하게 나타났으며 농도가 1% 일 때 효과적이었고, 용출제로서 ethanol의 농도는 60-75% 수준에서 가장 좋은 결과를 얻었다.

Table 82. Full factorial design for purified Anthocyanin from *Bokbunja* byproduct extracts by MCX SPE cartridge and its dependent variables.

Coded levels of variable		Responses					
		HCl			TFA		
X ₁	X ₂	Yield (%)	Color value (E 10%, 1 cm)	Total Anthocyanin contents (mg/100 g)	Yield (%)	Color value (E 10%, 1 cm)	Total Anthocyanin contents (mg/100 g)
-1	-1	63.40	0.274±0.001	5.00±0.06	63.24	0.295±0.003	5.62±0.33
-1	0	57.64	0.557±0.001	15.35±0.19	57.50	0.566±0.001	11.39±0.81
-1	1	54.50	0.593±0.003	10.95±0.03	54.24	0.439±0.001	8.74±0.71
0	-1	63.36	0.612±0.001	10.45±0.06	62.91	0.758±0.003	13.63±0.16
0	0	57.83	0.824±0.003	17.43±0.22	57.15	0.575±0.001	11.21±0.55
0	1	54.87	0.712±0.001	17.53±0.14	54.43	0.585±0.001	10.86±0.58
1	-1	63.47	0.574±0.001	10.03±0.66	63.39	0.698±0.005	12.32±0.32
1	0	57.68	0.996±0.003	19.77±0.81	57.73	0.813±0.003	16.01±0.52
1	1	55.03	0.705±0.001	17.33±0.07	54.59	0.594±0.001	11.06±0.73

X₁: Concentration of HCl or TFA (%), X₂: Concentration of ethanol (%)

(3) 이차다항회귀곡선식

흥미구역 안에서 HCl 또는 TFA의 농도와 ethanol의 농도에 따른 정제된 Anthocyanin의 수율, 색가 및 Anthocyanin 함량에 미치는 정도를 분산 분석한 결과는 **Table 83**과 같다. pH 조절제로서 HCl을 사용한 경우 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량에 미치는 영향은 HCl의 농도 변화보다 ethanol의 농도 변화가 더 큰 것으로 나타났다. HCl의 농도와 ethanol 농도 모두 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량에서 5% 이내에서 유의성 차이를 보였다. pH 조절

제로서 TFA를 사용한 경우 수율에 있어서 TFA 농도보다 ethanol 농도 변화가 더 큰 영향을 미쳤고, 색가와 Total Anthocyanin 함량에서는 ethanol 농도보다 TFA 농도 변화가 더 큰 영향을 미쳤으며, 모든 요인이 5% 이내에서 유의성 차이가 나타났다. Anthocyanin 색소의 정제 시 가공 및 저장 안정성을 위해 pH 조절제로 HCl이나 유기산을 첨가하는데, 일반적으로 Anthocyanin 색소는 pH가 낮을 때 추출 수율이 우수하다고 알려져 있다(Fuleki and Francis, 1968; Jackman et al, 1987).

처리 요인의 수준에 대하여 종속변수인 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량을 예측하기 위한 이차다항회귀곡선식의 회귀계수를 계산한 결과는 **Table 84**와 같다. 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량에 대하여 이차다항회귀곡선식에의 일차다항회귀, 이차다항회귀 및 교차회귀의 기여도를 검정한 결과(**Table 85**) pH 조절제로서 HCl를 사용하였을 경우 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량의 기여도는 모두 일차다항회귀, 이차다항회귀 및 교차회귀 순으로 나타났으며 이차다항회귀곡선식 적합성 검정에서의 total regression도 모두 5% 이내에서 유의성 차이를 보였다. TFA를 사용하였을 경우 수율과 Total Anthocyanin 함량의 기여도는 일차다항회귀, 이차다항회귀 및 교차회귀 순으로, 색가의 기여도는 일차다항회귀, 교차회귀 및 이차다항회귀 순으로 나타났으며, 이차다항회귀곡선식 적합성 검정에서의 total regression은 모두 5% 이내에서 유의성 차이를 보였다.

Table 83. Analysis of variance for the effects of three variables on yield, color value and Total Anthocyanin contents of purified Anthocyanin from *Bokbunja* byproduct extracts by MCX SPE cartridge.

Factors	HCl		TFA		
	X ₁	X ₂	X ₁	X ₂	
Yield	F value	11.82	10461.50	11.44	5198.87
	Pr>F	0.0007	<.0001	0.0008	<.0001
Color value	F value	34.86	38.74	19.76	5.1
	Pr>F	<.0001	<.0001	<.0001	0.0083
Total Anthocyanin contents	F value	59.17	154.76	14.78	6.79
	Pr>F	<.0001	<.0001	<.0001	0.0022

X₁: Concentration of HCl or TFA (%), X₂: Concentration of ethanol (%)

Table 84. Regression coefficients of second degree polynomials for yield, color value and Total Anthocyanin contents of purified Anthocyanin from *Bokbunja* byproduct extracts by MCX SPE cartridge.

Parameters	Estimate					
	HCl			TFA		
	Yield	Color value	Total Anthocyanin contents	Yield	Color value	Total Anthocyanin contents
Intercept	114.467	-5.937	-143.064	113.253	-2.079	-59.198
X ₁	-0.679	1.338	13.350	-1.833	1.373	22.889
X ₂	-1.222	0.163	3.952	-1.189	0.063	1.746
X ₁ *X ₁	-0.329	-0.452	-10.206	1.407	-0.353	-5.150
X ₁ *X ₂	0.017	-0.007	0.050	0.007	-0.009	-0.162
X ₂ *X ₂	0.006	-0.001	-0.025	0.006	0.000	-0.011

X₁: Concentration of HCl or TFA (%), X₂: Concentration of ethanol (%)

Table 85. Determination coefficients and probability of second degree polynomials for yield, color value and Total Anthocyanin contents of purified Anthocyanin from *Bokbunja* byproduct extracts by MCX SPE cartridge.

	Regressions	HCl				TFA			
		Linear	Quadratic	Cross product	Total regress	Linear	Quadratic	Cross product	Total regress
	R ²	0.9656	0.0335	0.0005	0.9996	0.9676	0.0315	0.0001	0.9992
Yield	F value	15168.90	526.75	14.42	6281.13	7567.57	246.59	1.31	3125.93
	Pr>F	<.0001	<.0001	0.0025	<.0001	<.0001	<.0001	0.274	<.0001
	R ²	0.5181	0.3663	0.0265	0.9108	0.5551	0.1320	0.0764	0.7635
Color value	F value	61.02	43.14	6.25	42.91	24.65	5.86	6.79	13.56
	Pr>F	<.0001	<.0001	0.0208	<.0001	<.0001	0.0095	0.0165	<.0001
Total Anthocyanin contents	R ²	0.5855	0.3803	0.0024	0.9682	0.4537	0.2140	0.0701	0.7378
	F value	193.57	125.75	1.59	128.04	18.17	8.57	5.61	11.82
	Pr>F	<.0001	<.0001	0.2219	<.0001	<.0001	0.0019	0.0275	<.0001

X₁: Concentration of HCl or TFA (%), X₂: Concentration of ethanol (%)

(4) 정제과정 최적화

HCl 또는 TFA의 농도와 ethanol의 농도에 따른 정제된 Anthocyanin의 수율에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 **Fig. 115-A, B**와 같다. 복분자에는 glucose, fructose 등의 당류와 citric acid, malic acid, succinic acid 등의 유기산이 다량 함유되어 있는데, 복분자 주를 생산하고 남은 복분자박의 추출 시 추출물에도 Anthocyanin 외에 다른 성분들이 많이 존재하게 된다. 그 중 uronic acid의 경우 Anthocyanin 보다 높은 함량으로 존재한다고 보고되기도 하였다(He and Giusti, 2011b). 따라서, 추출물 중 Anthocyanin의 순도를 높이기 위하여 정제공정이 필요하다(Kim et al, 2014). Anthocyanin 정제과정에서 수율은 HCl 또는 TFA의 농도보다는 ethanol의 농도에 영향을 받으며 ethanol 농도가 낮아짐에 따라 수율이 증가하는 것으로 나타났다. 정제된 Anthocyanin의 수율을 반응표면분석한 결과 HCl 0.52%, ethanol 60.00% 일 때 63.45%로 예측되었고, 반면 TFA의 경우에는 TFA 1.00%, ethanol 60.00%일 때 63.35%로 예측되었다.

색가에 미치는 영향을 분석한 결과 HCl과 ethanol의 농도에 따른 변화(**Fig. 115-C**)에서는 두 요인이 유사하게 영향을 미치는 것을 알 수 있었으며 TFA와 ethanol의 농도에 따른 변화(**Fig. 115-D**)에서는 TFA의 농도 변화에 대한 영향력이 더 큰 것으로 나타났다. HCl과 ethanol 농도 변화에 따른 색가의 최적 조건은 HCl 0.87%, ethanol 77.58% 일 때 0.91(E 10%, 1 cm)로 예측되었고, TFA의 경우 TFA 1.00%, ethanol 68.16% 일 때 0.78(E 10%, 1 cm)로 예측되었다.

정제된 Anthocyanin의 Total Anthocyanin 함량에 미치는 영향을 분석한 결과, HCl과 ethanol의 농도에 따른 변화(**Fig. 115-E**)와 TFA와 ethanol의 농도의 변화(**Fig. 115-F**)에서 모두 두 요인이 유사하게 영향을 미치는 것으로 나타났다. HCl의 경우 최적 조건으로 HCl 0.80%, ethanol 84.34%일 때 정제된 Anthocyanin의 Total Anthocyanin 함량은 19.77 mg/100 g 으로 예측되었고, TFA의 경우는 TFA 1.00%, ethanol 66.58% 일 때 16.01 mg/100 g 으로 예측되었다.

HCl 또는 TFA의 농도와 ethanol의 농도에 따른 정제된 Anthocyanin의 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량을 다중반응표면의 최적화방법으로써 만족 함수를 이용하여 종속변수들의 가중치를 1로 놓고 종합적으로 판단한 결과 pH 조절제가 HCl인 경우(**Fig. 116-A**) 최적 정제 조건은 HCl 0.97%, ethanol 69.53%의 조건이었으며 이때의 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량은 각각 59.52%, 0.86(E 10%, 1 cm) 및 17.47 mg/100 g이었고 전반적인 만족도는 0.74 이었다. TFA에서의(**Fig. 116-B**) 최적 정제 조건은 TFA 1.00% ethanol 60.00%의 조건이었으며 이때의 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량은 각각 63.35%, 0.76(E 10%, 1 cm) 및 13.54 mg/100 g이었고 전반적인 만족도는 0.89 이었다.

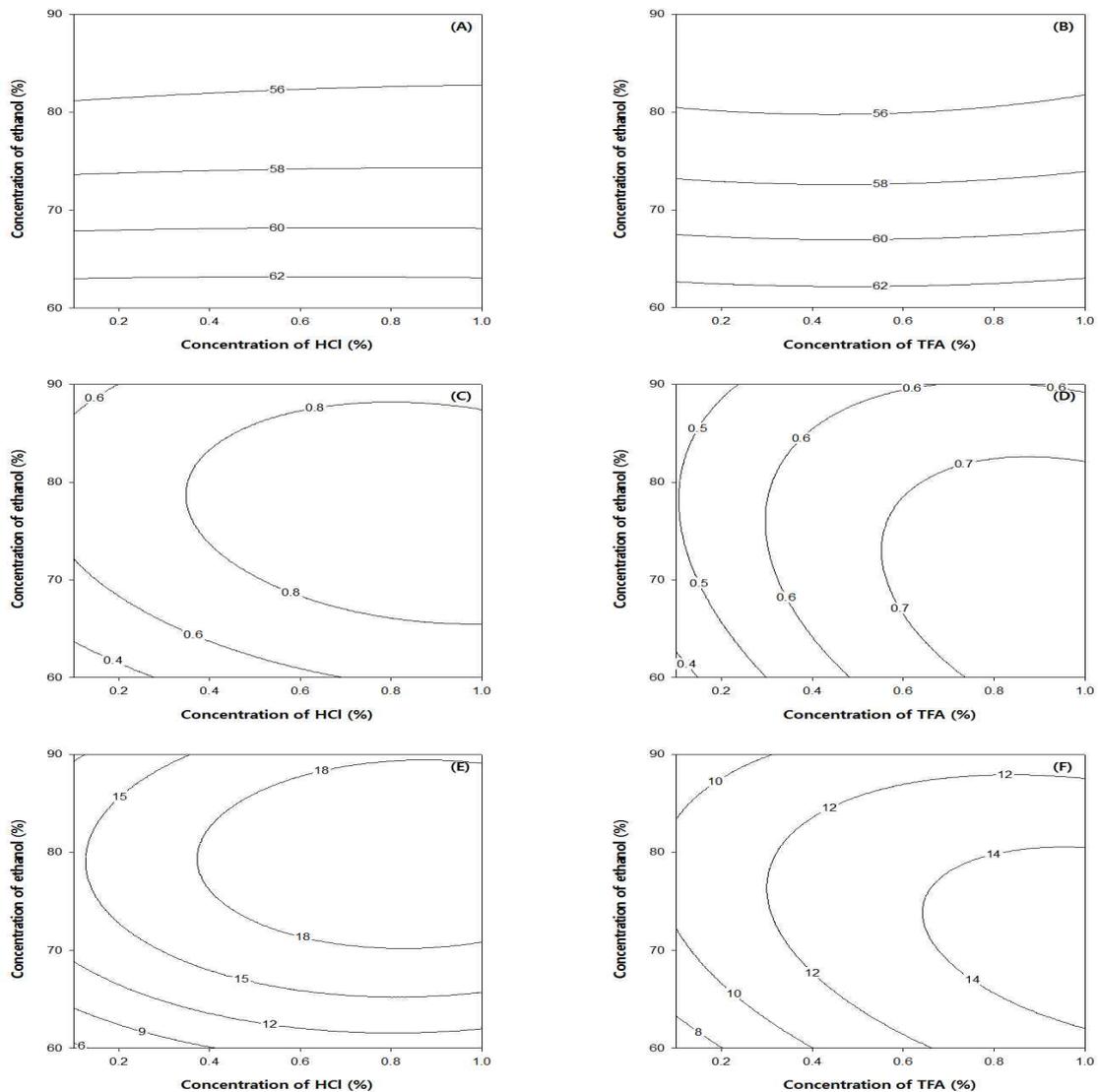


Fig. 115. Contour plot for yield (%), color value (E 10%, 1 cm) and Total Anthocyanin contents (mg/100 g) of purified Anthocyanin from *Bokbunja* byproduct extracts by MCX SPE cartridge. (A, B : yield, C, D : color value, E, F : Total Anthocyanin contents)

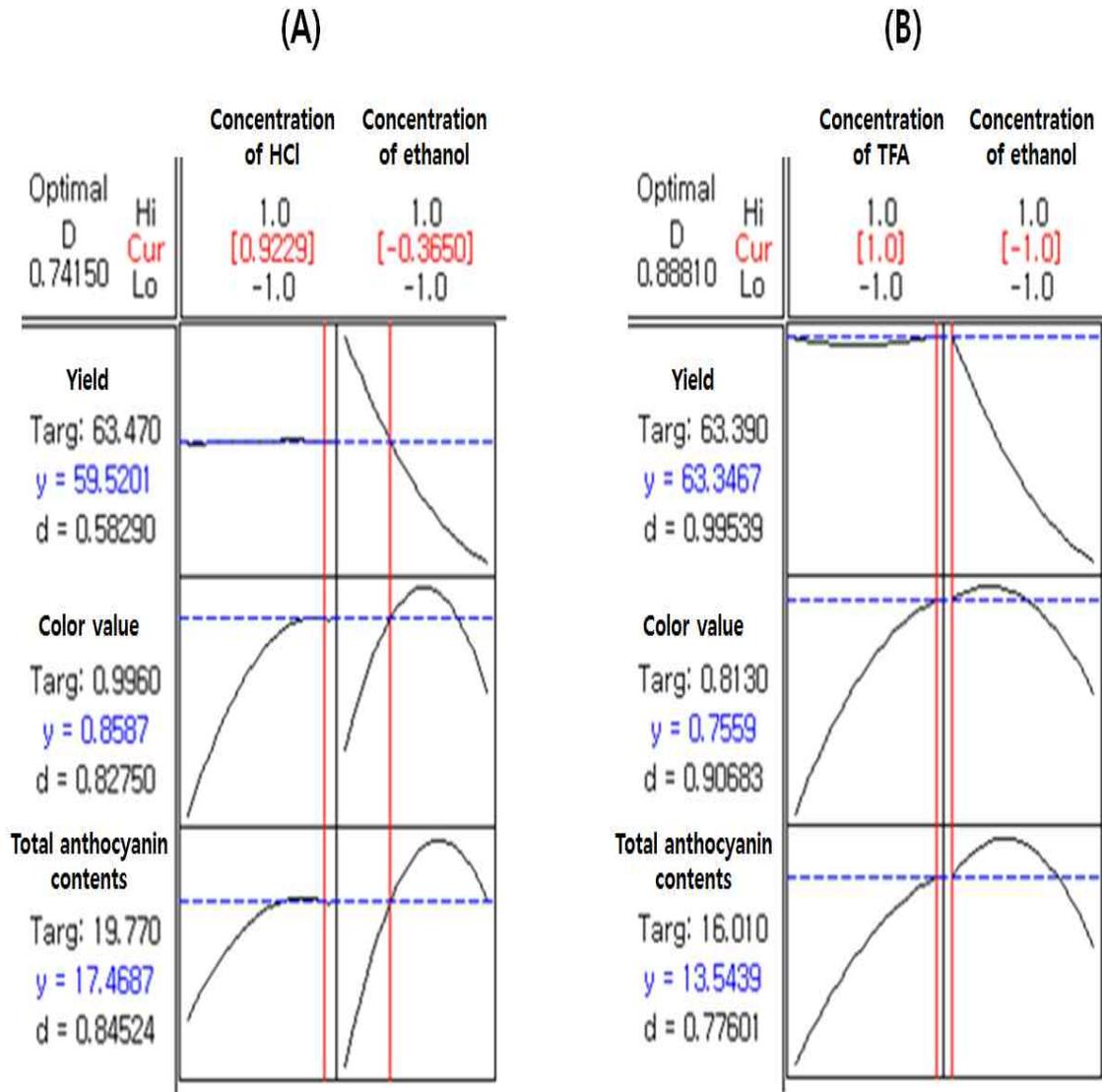


Fig. 116. Response optimization for multi-response surface of purified Anthocyanin from *Bokbunja* byproduct extracts by MCX SPE cartridge. (A : HCl, B : TFA)

라. HP-20 cartridge를 이용한 Anthocyanin의 분리정제

(1) 외형

Anthocyanin 정제공정에서 HP-20 cartridge를 sorbent로 사용하였고 두 가지 요인으로 pH 조절제로서 HCl 또는 TFA 의 농도(0.1-1.0%)와 용출제로서 ethanol의 농도(60-90%)에 따라 정제된 Anthocyanin의 외형 사진은 **Fig. 117**과 같다. Iontec 사에 의하면 HP-20은 high porous type 합성흡착체로서 vitamin류, 항생물질, steroid계, enzyme 등 각종 항산화활성물질의 흡착, 분리, 정제에 주로 사용되고 있다. HP-20은 오디와인으로부터의 효소저해제 분리 공정에서 ODS-A gel 및 Sephadex LH-20 보다 높은 수율 및 저해 활성을 보였다는 연구결과가 있고(Son and Choi, 2013), 복분자 딸기 농축액의 당 및 고분자성 다당체 제거를 위한 분리정제 과정에서 SP-207, SP-700 및 SP-850보다 높은 수율을 얻었다는 연구결과가 있다(Son and Choi, 2013). 또한 흡착제로 HP-20 사용 시에는 주로 ethanol 및 메탄올이 용출제로 사용된다고 보고되어 있다(Stephen, 1998; Ikuo et al, 2002; Chen et al, 2006; Chang et al, 2005).

분리된 Anthocyanin의 색상을 보았을 때, HCl을 사용하였을 경우 ethanol 60%에서 붉은색이 가장 연하게 나타났으며, ethanol 75% 조건에서 90% 보다 조금 더 강한 붉은색을 나타냈다. Ethanol 60% 일 때는 HCl의 농도가 낮아짐에 따라 붉은색이 강해지는 것을 알 수 있었다. TFA를 사용하였을 경우에는 ethanol 75%와 90% 조건에서 강한 붉은색을 나타내었는데, TFA 0.1% 조건에서는 ethanol 농도에 관계없이 세 시료가 비슷한 수준으로 나타났고, ethanol 60% 조건에서는 TFA의 농도가 높아짐에 따라 붉은색이 연해지는 것을 알 수 있었다. HCl과 TFA를 비교해볼 때, 전반적으로 HCl이 TFA 보다 붉은색이 강하였지만, ethanol 60% 조건에서는 TFA의 붉은색이 강하였고, HP-20 cartridge의 경우 HCl의 농도가 0.1%, ethanol의 농도가 75% 일 때 붉은색이 가장 진하게 나타났다.

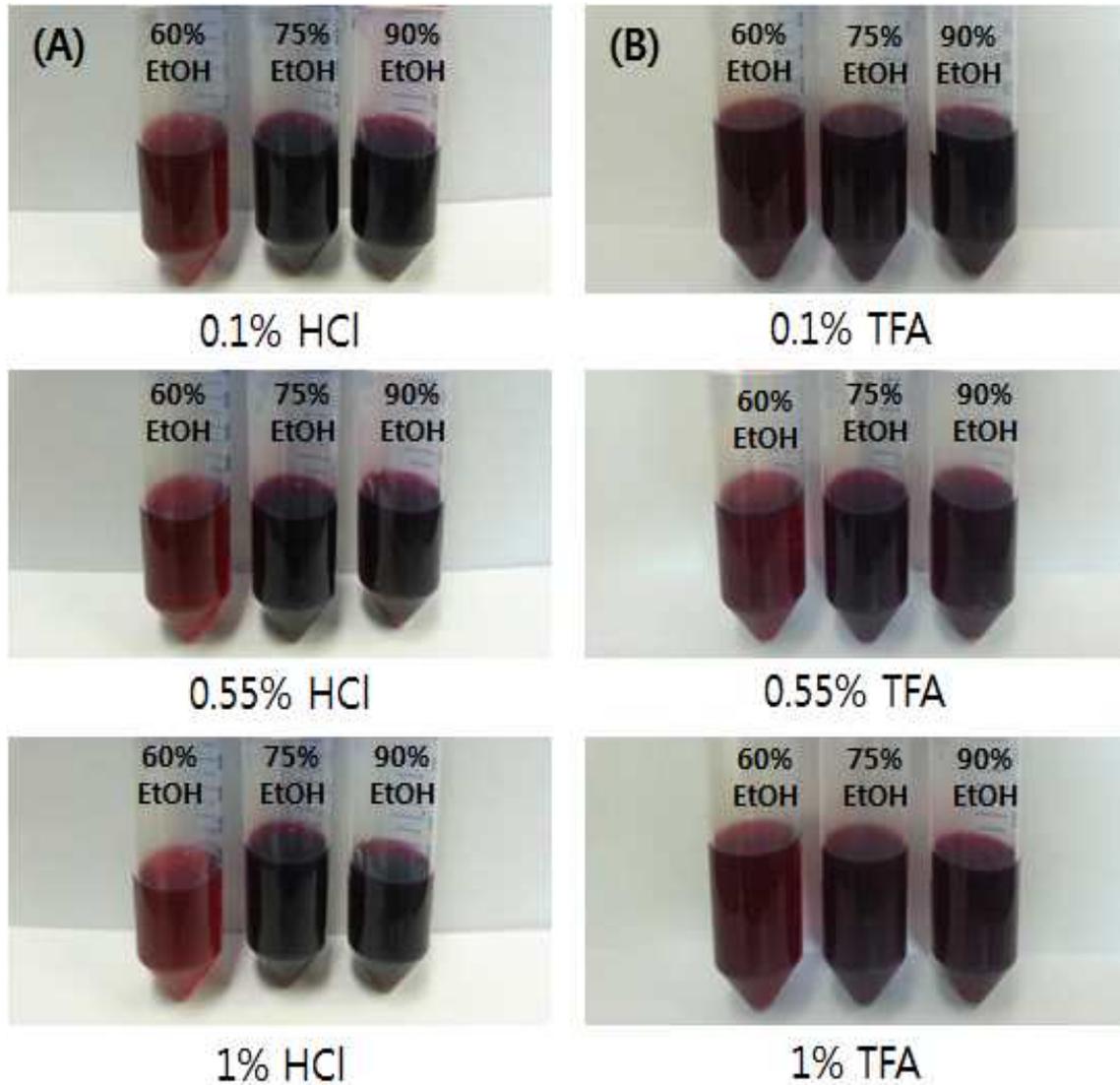


Fig. 117. Appearances of purified Anthocyanin from *Bokbunja* byproduct extracts by HP-20 cartridge depending on acidulant, HCl (A) or TFA (B), and ethanol concentrations.

(2) 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량

두 가지 요인으로서 HCl 또는 TFA의 농도와 ethanol의 농도에 따른 정제된 Anthocyanin의 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량을 조사한 결과는 **Table 86**과 같다. HCl의 경우에는 본 실험의 흥미영역 구간 실험점에서의 수율은 25.08-70.93%의 범위로 HCl 0.55%, ethanol 60%의 조건에서 가장 높았으며 색가는 0.438-2.155(E 10%, 1 cm)로 HCl 0.55%, ethanol 75%의 조건에서 가장 높은 값을 보였다. Total Anthocyanin 함량은 5.13-16.54 mg/100 g 범위로 HCl 1.00%, ethanol 90%의 조건에서 가장 높았다. 반면에 TFA의 경우에는 수율은 26.61-59.36%로 TFA 1%, ethanol 60%에서 가장 높았으며, 색가는 0.402-0.885(E 10%, 1 cm)로 TFA 0.1%, ethanol 90%에서, Total Anthocyanin 함량은 4.87-16.96 mg/100 g의 범위로

TFA 0.1%, ethanol 90%에서 가장 높은 함량을 나타내었다. 이러한 결과는 복분자 딸기 농축액과 오디 와인에서 HP-20으로 Anthocyanin 분리정제 수율인 5.54% 및 0.001% 보다 크게 나타나(Son and Choi, 2013a; Son and Choi, 2013b) 본 실험의 추출과정에 의해 추출된 추출물에서 HP-20을 이용한 Anthocyanin을 분리정제하는 것이 효과적이라고 생각된다.

정제된 Anthocyanin의 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량을 분석한 결과 pH 조절제로서 HCl이 TFA보다 우수하게 나타났으며 용출제로서의 ethanol의 농도로는 75-90% 수준이 가장 좋은 결과를 얻었다.

Table 86. Full factorial design for purified Anthocyanin from *Bokbunja* byproduct extracts by HP-20 cartridge and its dependent variables.

Coded levels of variable		Responses					
		HCl			TFA		
X ₁	X ₂	Yield (%)	Color value (E 10%, 1 cm)	Total Anthocyanin contents (mg/100 g)	Yield (%)	Color value (E 10%, 1 cm)	Total Anthocyanin contents (mg/100 g)
-1	-1	66.45	0.449±0.003	5.61±0.24	44.17	0.547±0.003	10.81±0.22
-1	0	29.96	0.584±0.003	14.09±0.23	37.31	0.659±0.001	12.40±0.14
-1	1	28.02	1.591±0.003	14.93±1.07	26.61	0.885±0.005	16.96±0.06
0	-1	70.93	0.576±0.003	5.13±0.13	56.82	0.402±0.003	7.18±0.31
0	0	25.90	2.155±0.003	15.60±0.60	31.90	0.836±0.003	4.87±0.39
0	1	36.24	1.278±0.003	11.43±0.23	36.81	0.585±0.006	11.18±0.06
1	-1	66.70	0.438±0.003	5.42±0.00	59.36	0.419±0.001	7.33±0.05
1	0	31.38	1.853±0.008	13.68±0.59	37.84	0.625±0.001	11.63±0.04
1	1	25.08	1.884±0.005	16.54±0.74	42.05	0.516±0.003	9.67±0.52

X₁: Concentration of HCl or TFA (%), X₂: Concentration of ethanol (%)

(3) 이차다항회귀곡선식

홍미구역 안에서 HCl 또는 TFA의 농도와 ethanol의 농도에 따른 정제된 Anthocyanin의 수율, 색가 및 Anthocyanin 함량에 미치는 정도를 분산 분석한 결과는 **Table 87**과 같다. pH 조절제로 HCl을 사용했을 때 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량에 미치는 영향은 HCl 농도 변화보다 ethanol 농도 변화가 더 큰 것으로 나타났으며, 수율과 Total Anthocyanin 함량은 ethanol 농도만 5% 이내에서 유의성 차이가 나타났고, 색가는 HCl 농도와 ethanol 농도 모두 5% 이내에서 유의성 차이가 나타났다. pH 조절제로 TFA를 사용하였을 때, 수율과 색가는 ethanol 농도 변화에 대한 영향이 크게 나타났지만 Total Anthocyanin 함량은 TFA 농도 변화에 대한 영향이 더 크게 나타났고, 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량에서 TFA 농도와 ethanol 농도 모두 5% 이내에서 유의성 차이가 나타났다.

처리 요인의 수준에 대하여 종속변수인 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량을 예측하기 위한 이차다항회귀곡선식의 회귀계수를 계산한 결과는 **Table 88**과 같다. 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량에 대하여 이차다항회귀곡선식의 일차다항회귀, 이차다항회귀 및 교차회귀의 기여도를 검정한 결과(**Table 89**) pH 조절제로서 HCl 및 TFA를 사용하였을 때 모두 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량의 기여도가 일차다항회귀, 이차다항회귀 및 교차회귀 순으로 나타났으며, 이차다항회귀곡선식 적합성 검정에서의 total regression은 모두 5% 이내에서 유의성 차이를 보였다.

Table 87. Analysis of variance for the effects of three variables on yield, color value and Total Anthocyanin contents of purified Anthocyanin from *Bokbunja* byproduct extracts by HP-20 cartridge.

Factors	HCl		TFA		
	X ₁	X ₂	X ₁	X ₂	
Yield	F value	1.19	161.57	5.67	22.69
	Pr>F	0.3556	<.0001	0.0118	<.0001
Color value	F value	3.29	15.02	8.00	15.82
	Pr>F	0.0408	<.0001	0.001	<.0001
Total Anthocyanin contents	F value	1.50	85.65	14.78	6.79
	Pr>F	0.2435	<.0001	<.0001	0.0022

X₁: Concentration of HCl or TFA (%), X₂: Concentration of ethanol (%)

Table 88. Regression coefficients of second degree polynomials for yield, color value and Total Anthocyanin contents of purified Anthocyanin from *Bokbunja* byproduct extracts by HP-20 cartridge.

Parameters	Estimate					
	HCl			TFA		
	Yield	Color value	Total Anthocyanin contents	Yield	Color value	Total Anthocyanin contents
Intercept	613.108	-13.589	-119.741	290.438	-3.758	-59.198
X ₁	25.185	0.835	-10.015	14.214	0.468	22.889
X ₂	-14.425	0.360	3.335	-6.362	0.110	1.746
X ₁ *X ₁	-15.267	-1.004	4.900	-3.062	0.004	-5.150
X ₁ *X ₂	-0.118	0.011	0.067	0.009	-0.009	-0.162
X ₂ *X ₂	0.088	-0.002	-0.020	0.038	-0.001	-0.011

X₁: Concentration of HCl or TFA (%), X₂: Concentration of ethanol (%)

Table 89. Determination coefficients and probability of second degree polynomials for yield, color value and Total Anthocyanin contents of purified Anthocyanin from *Bokbunja* byproduct extracts by HP-20 cartridge.

Regressions		HCl				TFA			
		Linear	Quadratic	Cross product	Total regress	Linear	Quadratic	Cross product	Total regress
	R ²	0.7134	0.2617	0.0008	0.9760	0.7154	0.1610	0.0000	0.8764
Yield	F value	178.31	65.41	0.41	97.57	34.72	7.81	0.00	17.01
	Pr>F	<.0001	<.0001	0.5323	<.0001	<.0001	0.0067	0.9684	<.0001
	R ²	0.5685	0.1474	0.0059	0.7218	0.4972	0.1956	0.0652	0.7580
Color value	F value	21.45	5.56	0.45	10.90	21.58	8.49	5.66	13.16
	Pr>F	<.0001	0.0115	0.5102	<.0001	<.0001	0.0020	0.0270	<.0001
Total Anthocyanin contents	R ²	0.6689	0.2494	0.0045	0.9229	0.4537	0.2140	0.0701	0.7378
	F value	91.05	33.95	1.24	50.25	18.17	8.57	5.61	11.82
	Pr>F	<.0001	<.0001	0.2788	<.0001	<.0001	0.0019	0.0275	<.0001

X₁: Concentration of HCl or TFA (%), X₂: Concentration of ethanol (%)

(4) 정제공정 최적화

HCl 또는 TFA의 농도와 ethanol의 농도에 따른 정제된 Anthocyanin의 수율에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과, Anthocyanin 정제공정에서 HCl과 ethanol의 농도에 따른 변화(**Fig. 118-A**)에서는 HCl의 농도 보다는 ethanol의 농도에 영향을 많이 받고, ethanol의 농도가 낮을수록 수율이 낮은 경향을 보였다. TFA와 ethanol 농도의 변화(**Fig. 118-B**)에서는 TFA의 농도와 ethanol의 농도가 유사하게 영향을 미치며, TFA의 농도가 낮고, ethanol의 농도가 높을 때 수율이 증가하는 경향을 보였다. 정제된 Anthocyanin의 수율을 반응 표면 분석한 결과 HCl 0.59%, ethanol 60% 일 때가 최적 조건으로 70.12%로 예측되었다. 반면 TFA의 경우에는 TFA 1.0%, ethanol 60%일 때 58.37%로 예측되었다.

정제된 Anthocyanin의 색가에 미치는 영향을 분석한 결과, HCl과 ethanol의 농도에 따른 변화(**Fig. 118-C**)에서는 두 요인이 색가에 유사하게 영향을 미치는 것을 알 수 있었고 HCl과 ethanol의 농도가 높을 때 색가가 높아지는 경향을 보였다. TFA와 ethanol의 농도에 따른 변화(**Fig. 118-D**)에서도 두 요인이 유사하게 영향을 미치며, TFA의 농도가 낮고 ethanol 농도가 높을 때 색가가 증가하였다. 최적 조건은 HCl 0.88%, ethanol 84.03% 일 때 1.93(E 10%, 1 cm)로 예측되었고, TFA의 경우에는 TFA 0.10%, ethanol 83.32%일 때 0.84로 예측되었다.

정제된 Anthocyanin의 Total Anthocyanin 함량에 미치는 영향을 분석한 결과, HCl과 ethanol의 농도에 따른 변화(**Fig. 118-E**)에서는 ethanol의 농도가 영향력이 컸고, HCl의 농도와 상관없이 ethanol 농도가 낮을 때 Total Anthocyanin 함량이 높았다. TFA와 ethanol의 농도의 변화(**Fig. 118-F**)에서는 영향력이 유사한 것으로 나타났는데, TFA의 농도가 낮고 ethanol 농도가 75% 이상일 때 Total Anthocyanin 함량이 높게 나타났다. 최적 조건은 HCl 1.00%, ethanol 83.12%일 때 16.26 mg/100 g으로, TFA 1.00%, ethanol 66.99% 일 때 14.75 mg/100 g으로 예측되었다.

HCl 또는 TFA의 농도와 ethanol의 농도에 따른 정제된 Anthocyanin의 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량을 다중반응표면의 최적화방법으로써 만족 함수를 이용하여 종속변수들의 가중치를 1로 놓고 종합적으로 판단한 결과 pH 조절제가 HCl인 경우(Fig. 119-A) 최적 정제 조건은 HCl 1.00%, ethanol 67.18%의 조건이었으며 이때의 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량은 각각 43.65%, 1.26(E 10%, 1 cm) 및 11.13 mg/100 g이었고 전반적인 만족도는 0.47이었다. TFA에서의(Fig. 119-B) 최적 정제 조건은 TFA 0.95% ethanol 70.10%의 조건이었으며 이때의 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량은 각각 44.12%, 0.60(E 10%, 1 cm) 및 14.86 mg/100 g이었고 전반적인 만족도는 0.58이었다.

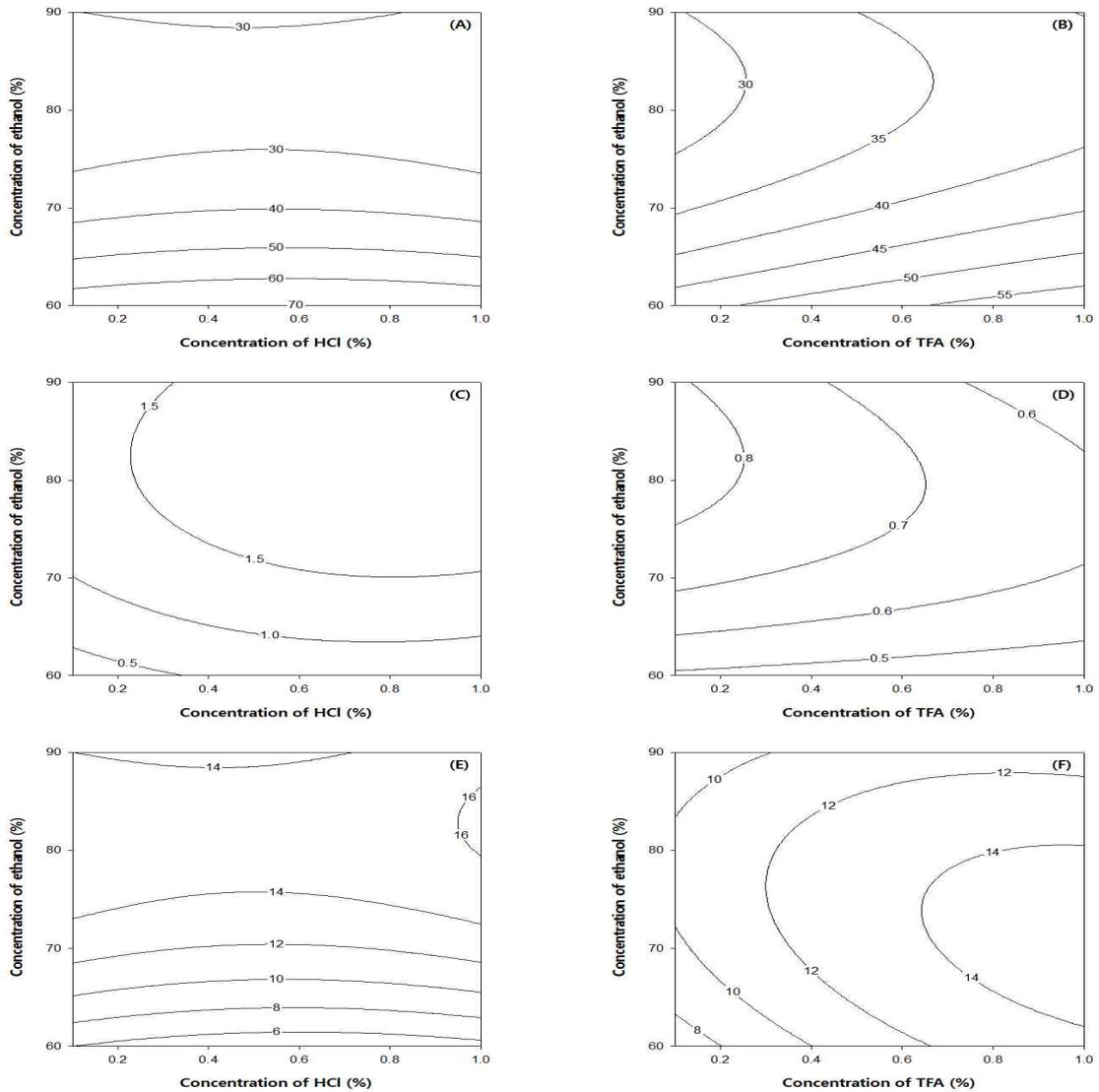


Fig. 118. Contour plot for yield (%), color value(E 10%, 1 cm) and Total Anthocyanin contents (mg/100 g) of purified Anthocyanin from *Bokbunja* byproducts extracts by HP-20. (A, B : yield, C, D : color value, E, F : Total Anthocyanin contents)

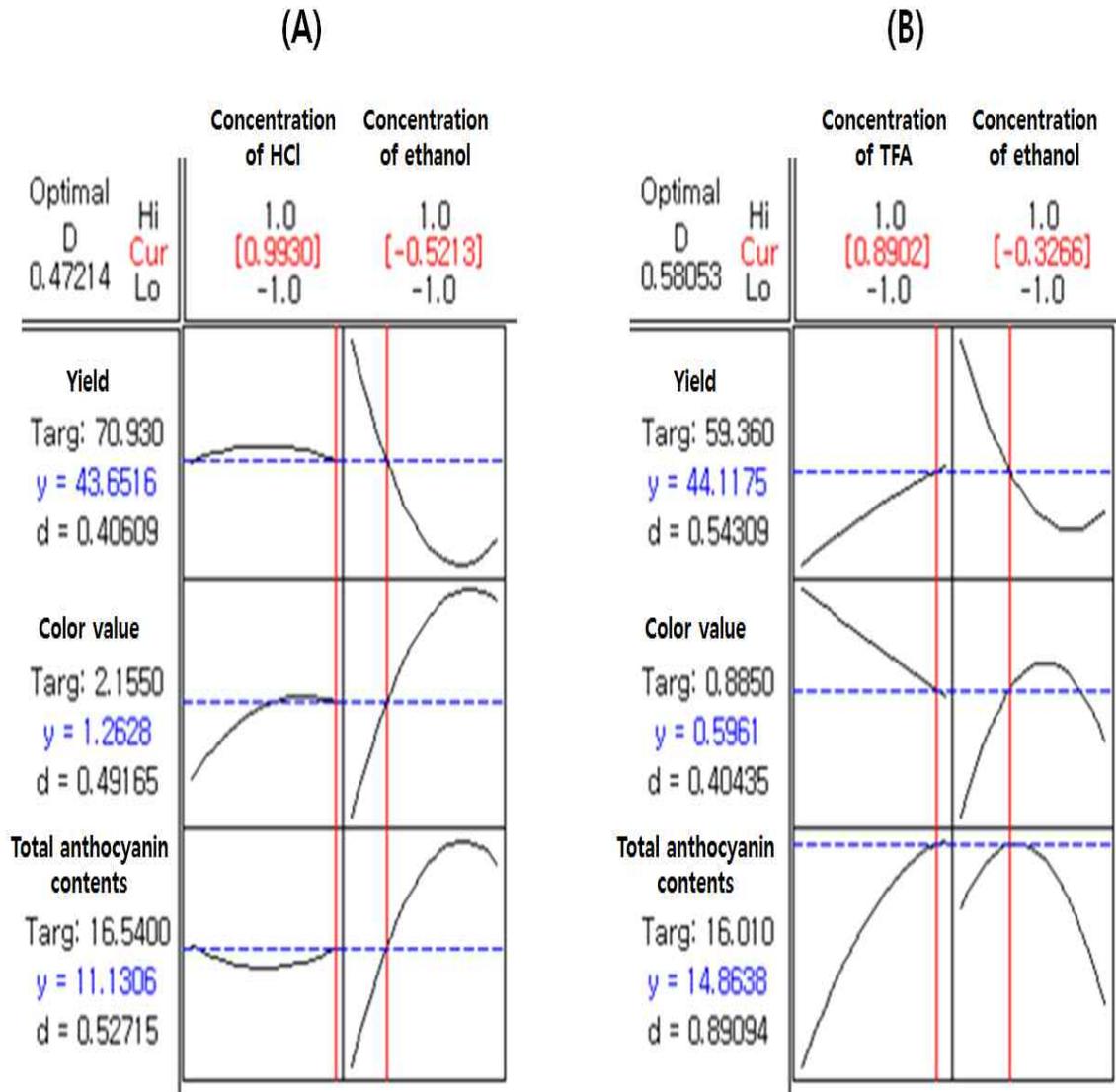


Fig. 119. Response optimization for multi-response surface of purified Anthocyanin from *Bokbunja* byproduct extracts by HP-20 cartridge. (A : HCl, B : TFA)

마. Amberlite XAD-7을 이용한 Anthocyanin의 분리정제 공정

(1) 외형

Anthocyanin 정제공정에서 Amberlite XAD-7을 sorbent로 사용하였고 두 가지 요인으로 pH 조절제로서 HCl 또는 TFA 의 농도(0.1-1.0%)와 용출제로서 ethanol의 농도(60-90%)에 따라 정제된 Anthocyanin의 외형 사진은 **Fig. 120**과 같다. Sigma 사에 의하면 Amberlite XAD-7은 높은 수율과 높은 해상도가 특징이며 선택적 성분 추출이 가능하고 수용액으로부터 펩타이드, 단백질 및 저분자 화합물의 제거, 고정, 회수를 위해 사용되는 고분자 흡착제이다. 주로 식품가공이나 생물공정 및 제약 분야에 이용되며, 용출제로는 ethanol 및 메탄올 등이 사용된다 (Francois et al, 1992; Yuko et al, 2000; Michael et al, 2003; Andreas et al, 2000).

분리된 Anthocyanin의 색상을 보면 다른 시료들이 강한 붉은색을 나타낸 것에 비해 HCl을 사용하고 ethanol 농도가 60% 일 때 붉은색이 선명하게 나타났으며, HCl의 농도가 높아짐에 따라 붉은색이 더 연하게 나타났다. 전체적으로 HCl 보다는 TFA가 붉은색이 강하였으며 TFA 0.55%, ethanol 75% 일 때 붉은색이 가장 진하게 나타났다.

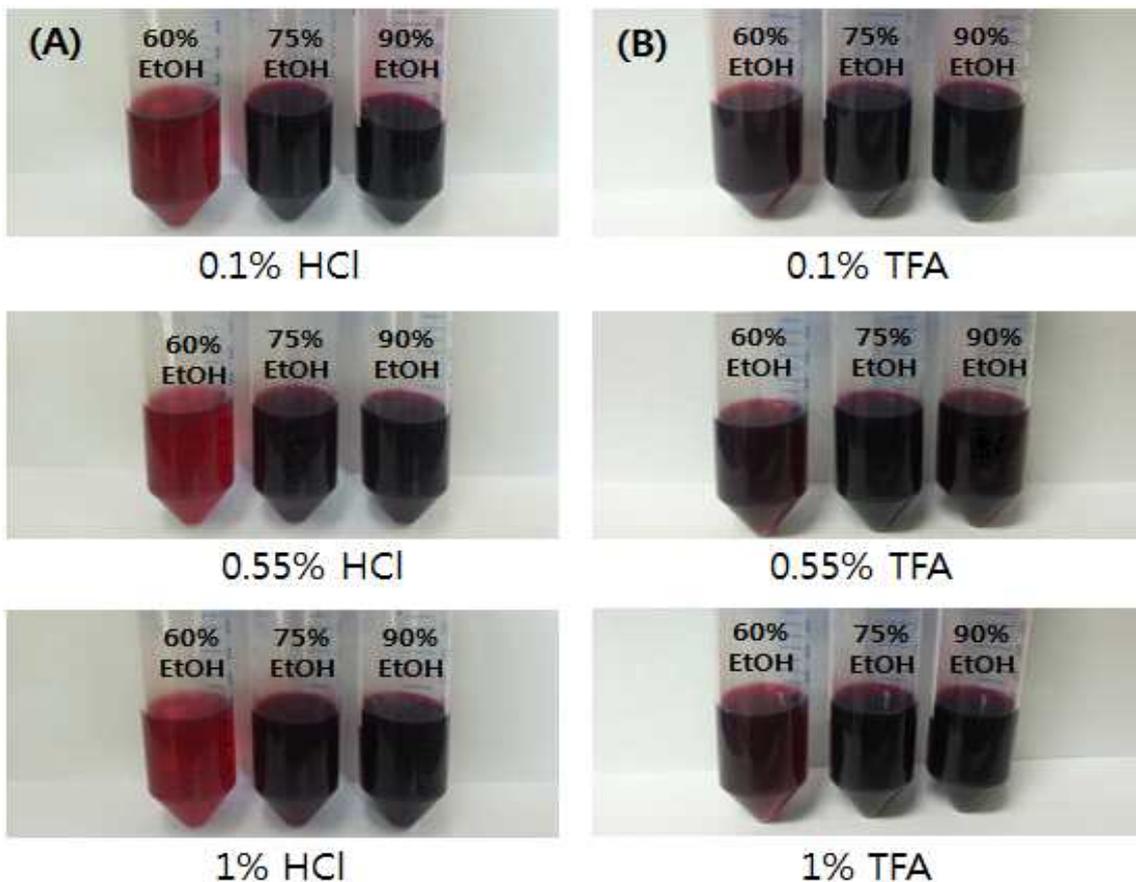


Fig. 120. Appearances of purified Anthocyanin from *Bokbunja* byproduct extracts by Amberlite XAD-7 cartridge depending on acidulant, HCl (A) or TFA (B), and ethanol concentrations.

(2) 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량

두 가지 요인으로서 HCl 또는 TFA의 농도와 ethanol의 농도에 따른 정제된 Anthocyanin의 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량을 조사한 결과는 **Table 90**과 같다.

HCl의 경우에는 본 실험의 흥미영역 구간 실험점에서의 수율은 16.96-63.09%로 HCl 0.1%, ethanol 60%의 조건에서 가장 높았으며 색가는 0.453-4.305(E 10% 1 cm) 범위로 HCl 0.55%, ethanol 60%의 조건에서 가장 높은 값을 보였다. Total Anthocyanin 함량은 4.32-31.67 mg/100 g으로 HCl 0.1%, ethanol 90%의 조건에서 가장 높았다. 반면에 TFA의 경우에는 수율은 23.92-50.86%로 TFA 0.1%, ethanol 60%에서 가장 높았으며 색가는 1.020-2.187(E 10%, 1 cm) 범위로 TFA 0.55%, ethanol 75%에서, Total Anthocyanin 함량은 10.08-21.52 mg/100 g 범위로 TFA 0.55%, ethanol 75%에서 가장 높은 값을 나타내었다.

정제된 Anthocyanin의 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량을 분석한 결과 pH 조절제로서 HCl이 TFA보다 우수하게 나타났으며 용출제로서의 ethanol의 농도로는 75% 수준이 가장 좋은 결과를 얻었다.

Table 90. Full factorial design for purified Anthocyanin from *Bokbunja* byproduct extracts by Amberlite XAD-7 cartridge and its dependent variables.

Coded levels of variable		Responses					
		HCl			TFA		
X ₁	X ₂	Yield (%)	Color value (E 10%, 1 cm)	Total Anthocyanin contents (mg/100 g)	Yield (%)	Color value (E 10%, 1 cm)	Total Anthocyanin contents (mg/100 g)
-1	-1	63.09	0.758±0.003	6.78±0.27	50.86	1.042±0.003	10.34±0.24
-1	0	25.36	2.180±0.008	20.14±0.13	27.38	1.482±0.003	14.62±0.68
-1	1	17.12	3.224±0.008	31.67±0.06	23.92	1.965±0.039	20.04±1.12
0	-1	52.26	4.305±0.005	5.65±0.17	41.70	1.260±0.003	12.37±0.22
0	0	25.25	3.162±0.003	28.52±0.09	24.78	2.187±0.003	21.52±0.26
0	1	16.96	2.469±0.005	22.90±0.65	34.87	1.020±0.003	10.08±0.09
1	-1	62.04	0.453±0.003	4.32±0.06	36.34	1.240±0.026	11.43±0.21
1	0	25.16	2.969±0.003	26.36±0.72	30.75	1.562±0.028	15.15±0.47
1	1	17.30	3.445±0.003	30.13±0.37	31.37	1.776±0.023	16.78±0.46

X₁: Concentration of HCl or TFA (%), X₂: Concentration of ethanol (%)

(3) 이차다항회귀곡선식

홍미구역 안에서 HCl 또는 TFA의 농도와 ethanol의 농도에 따른 정제된 Anthocyanin의 수율, 색가 및 Anthocyanin 함량에 미치는 정도를 분산 분석한 결과는 **Table 91**과 같다. pH 조절제로서 HCl을 사용한 경우 수율 및 Total Anthocyanin 함량에 미치는 영향은 ethanol의 농도 변화가 HCl의 농도 변화보다 큰 것으로 나타났고, 색가의 경우 TFA의 농도 변화가 영향이 더 크게 나타났다. Ethanol의 농도는 수율 및 Total Anthocyanin 함량에서 5% 이내에서 유의성 차이를 보였다. pH 조절제로서 TFA를 사용한 경우는 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량 모두 ethanol의 농도 변화가 TFA의 농도 변화보다 큰 것으로 나타났고, ethanol 농도는 5% 이내에서 유의성 차이를 보였다.

처리 요인의 수준에 대하여 종속변수인 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량을 예측하기 위한 이차다항회귀곡선식의 회귀계수를 계산한 결과는 **Table 92**와 같다. 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량에 대하여 이차다항회귀곡선식의 일차다항회귀, 이차다항회귀 및 교차회귀의 기여도를 검정한 결과(**Table 93**), pH 조절제로서 HCl를 사용하였을 때 수율과 Total Anthocyanin 함량의 기여도는 일차다항회귀, 이차다항회귀 및 교차회귀 순으로 나타났으며, 색가의 기여도는 이차다항회귀, 일차다항회귀 및 교차회귀 순으로 나타났다. 이차다항회귀곡선식 적합성 검정에서의 total regression은 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량 모두 5% 이내에서 유의성 차이를 보였다. TFA를 사용하였을 때는 수율의 기여도가 일차다항회귀, 교차회귀 및 이차다항회귀 순으로 나타났으며, 색가의 기여도는 이차다항회귀, 일차다항회귀 및 교차회귀 순으로 나타났고, Total Anthocyanin 함량의 기여도는 일차다항회귀, 이차다항회귀 및 교차회귀 순으로 나타났다. 이차다항회귀곡선식 적합성 검정에서의 total regression은 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량 모두 5% 이내에서 유의성 차이를 보였다.

Table 91. Analysis of variance for the effects of three variables on yield, color value and Total Anthocyanin contents of purified Anthocyanin from *Bokbunja* byproduct extracts by Amberlite XAD-7 cartridge.

Factors	HCl		TFA		
	X ₁	X ₂	X ₁	X ₂	
Yield	F value	2.20	258.68	7.57	32.46
	Pr>F	0.1404	<.0001	0.0042	<.0001
Color value	F value	2.58	2.31	0.35	4.83
	Pr>F	0.0810	0.1056	0.7876	0.0104
Total Anthocyanin contents	F value	0.22	76.37	0.46	5.12
	Pr>F	0.8831	<.0001	0.7111	0.0081

X₁: Concentration of HCl or TFA (%), X₂: Concentration of ethanol (%)

Table 92. Regression coefficients of second degree polynomials for yield, color value and Total Anthocyanin contents of purified Anthocyanin from *Bokbunja* byproduct extracts by Amberlite XAD-7 cartridge.

Parameters	Estimate					
	HCl			TFA		
	Yield	Color value	Total Anthocyanin contents	Yield	Color value	Total Anthocyanin contents
Intercept	457.067	-8.729	-232.418	315.786	-8.857	-89.522
X ₁	-22.943	4.994	-6.495	-60.515	0.987	11.114
X ₂	-10.006	0.248	6.136	-6.794	0.261	2.623
X ₁ *X ₁	17.391	-5.633	4.335	-1.712	0.110	0.343
X ₁ *X ₂	0.046	0.020	0.034	0.814	-0.014	-0.161
X ₂ *X ₂	0.057	-0.001	-0.036	0.039	-0.002	-0.016

X₁: Concentration of HCl or TFA (%), X₂: Concentration of ethanol (%)

Table 93. Determination coefficients and probability of second degree polynomials for yield, color value and Total Anthocyanin contents of purified Anthocyanin from *Bokbunja* byproduct extracts by Amberlite XAD-7 cartridge.

Regressions		HCl				TFA			
		Linear	Quadrat ic	Cross product	Total regress	Linear	Quadrat ic	Cross product	Total regress
	R ²	0.8680	0.1168	0.0001	0.9849	0.4236	0.2647	0.2025	0.8908
Yield	F value	344.83	46.40	0.10	156.51	23.26	14.54	22.24	19.57
	Pr>F	<.0001	<.0001	0.7590	<.0001	<.0001	0.0006	0.0005	<.0001
	R ²	0.1795	0.2229	0.0055	0.4079	0.1866	0.1945	0.0280	0.4092
Color value	F value	3.18	3.95	0.19	2.89	3.32	3.46	1.00	2.91
	Pr>F	0.0620	0.0349	0.6636	0.0386	0.0560	0.0504	0.3295	0.0378
Total Anthocy anin contents	R ²	0.7814	0.1346	0.0002	0.9162	0.2016	0.1883	0.0347	0.4246
	F value	97.95	16.88	0.05	45.94	3.68	3.44	1.27	3.10
	Pr>F	<.0001	<.0001	0.8195	<.0001	0.0427	0.0512	0.2733	0.0300

X₁: Concentration of HCl or TFA (%), X₂: Concentration of ethanol (%)

(4) 정제공정 최적화

HCl 또는 TFA의 농도와 ethanol의 농도에 따른 정제된 Anthocyanin의 수율에 미치는 영향을 반응표면분석법으로 분석한 결과는 **Fig. 121-A, B**와 같다. Anthocyanin 정제공정에서 HCl 또는 TFA의 농도보다는 ethanol의 농도에 영향을 받는 것으로 나타났다. pH 조절제로서 HCl의 농도 변화와 용출제로 ethanol 농도 변화에 따른 정제된 Anthocyanin의 수율을 반응 표면 분석한 결과 HCl 0.10%, ethanol 60% 일 때가 최적 조건으로 60.79%로 예측되었다. 반면 TFA의 경우에는 TFA 0.10%, ethanol 60%일 때 48.96%로 예측되었다.

정제된 Anthocyanin의 색가에 미치는 영향을 분석한 결과, HCl과 ethanol의 농도에 따른 변화(**Fig. 121-C**)에서는 HCl의 농도 변화에 대한 영향력이 더 큰 것을 알 수 있었으며, TFA와 ethanol의 농도에 따른 변화(**Fig. 121-D**)에서는 ethanol의 농도 변화에 대한 영향력이 더 큰 것으로 나타났다. HCl과 ethanol 농도 변화에 따른 정제된 Anthocyanin의 색가의 최적 조건은 HCl 0.55%, ethanol 88.59% 일 때 3.81로 예측되었다. 반면 TFA의 경우에는 TFA 0.10%, ethanol 80.69%일 때 1.80으로 예측되었다.

정제된 Anthocyanin의 Total Anthocyanin 함량에 미치는 영향을 분석한 결과 **Fig. 121-E, F**와 같으며 HCl 또는 TFA의 농도보다는 ethanol의 농도에 영향을 받는 것으로 나타났다. 최적 조건으로 HCl 1.00%, ethanol 87.23%일 때 정제된 Anthocyanin의 Total Anthocyanin 함량은 29.71 mg/100 g으로 예측되었다. 반면 TFA의 경우는 TFA 0.10%, ethanol 81.52% 일 때 18.11 mg/100 g으로 예측되었다.

HCl 또는 TFA의 농도와 ethanol의 농도에 따른 정제된 Anthocyanin의 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량을 다중반응표면의 최적화방법으로써 만족 함수를 이용하여 종속변수들의 가중치를 1로 놓고 종합적으로 판단한 결과 pH 조절제가 HCl인 경우(**Fig. 122-A**) 최적 정제 조건은 HCl 0.56%, ethanol 68.17%의 조건이었으며 이때의 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량은 각각 35.14%, 3.19(E 10%, 1 cm) 및 17.59 mg/100 g이었고 전반적인 만족도는 0.52 이었다. TFA에서의(**Fig. 122-B**) 최적 정제 조건은 TFA 0.10% ethanol 69.28%의 조건이었으며 이때의 수율, 색가 및 Total Anthocyanin 함량은 각각 33.99%, 1.57(E 10%, 1 cm) 및 15.64 mg/100 g 이었고 전반적인 만족도는 0.45 이었다.

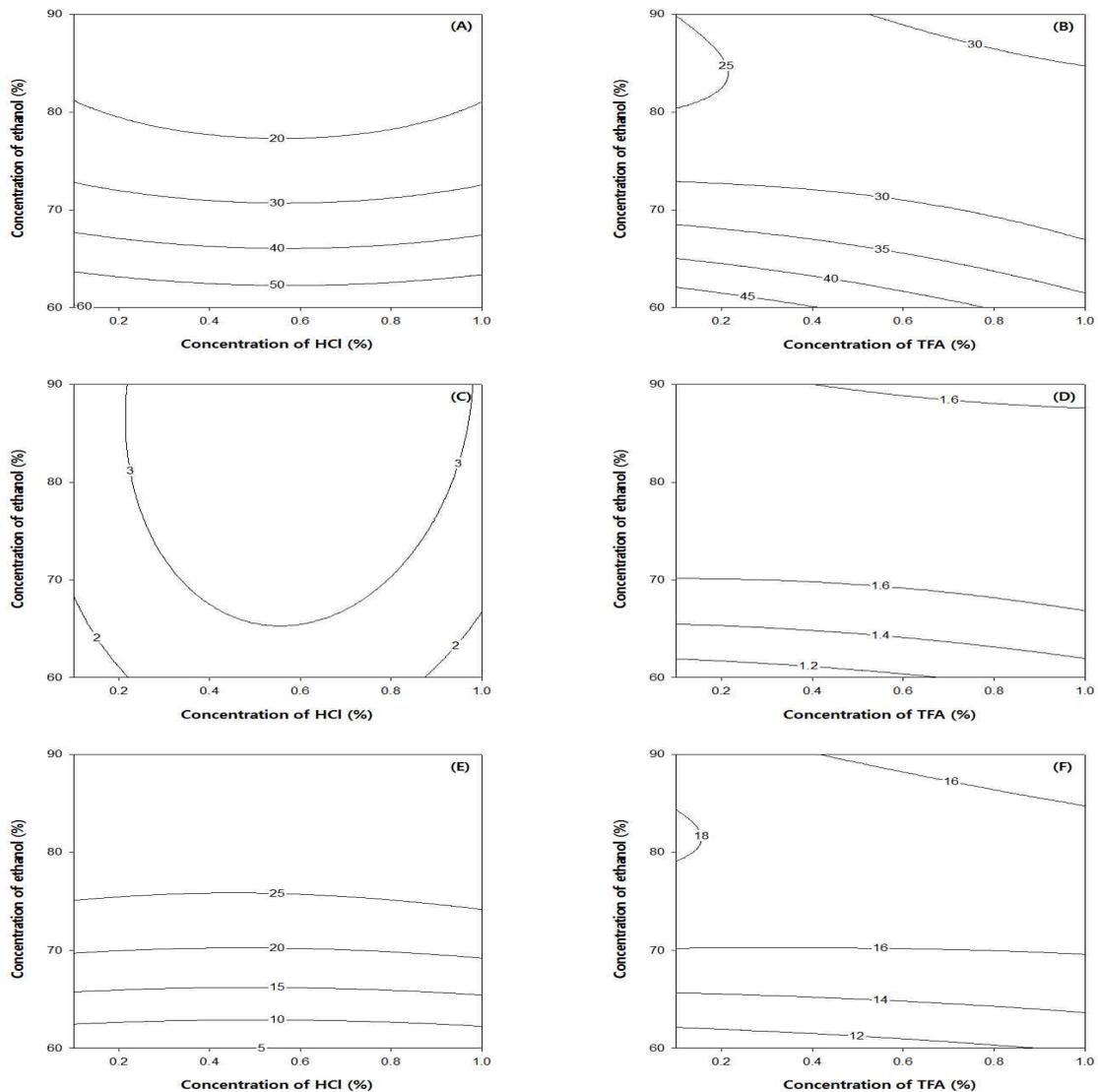


Fig. 121. Contour plot for yield (%), color value (E 10%, 1 cm) and Total Anthocyanin contents (mg/100 g) of purified Anthocyanin from *Bokbunja* byproduct extracts by Amberlite XAD-7. (A, B : yield, C, D : color value, E, F : Total Anthocyanin contents)

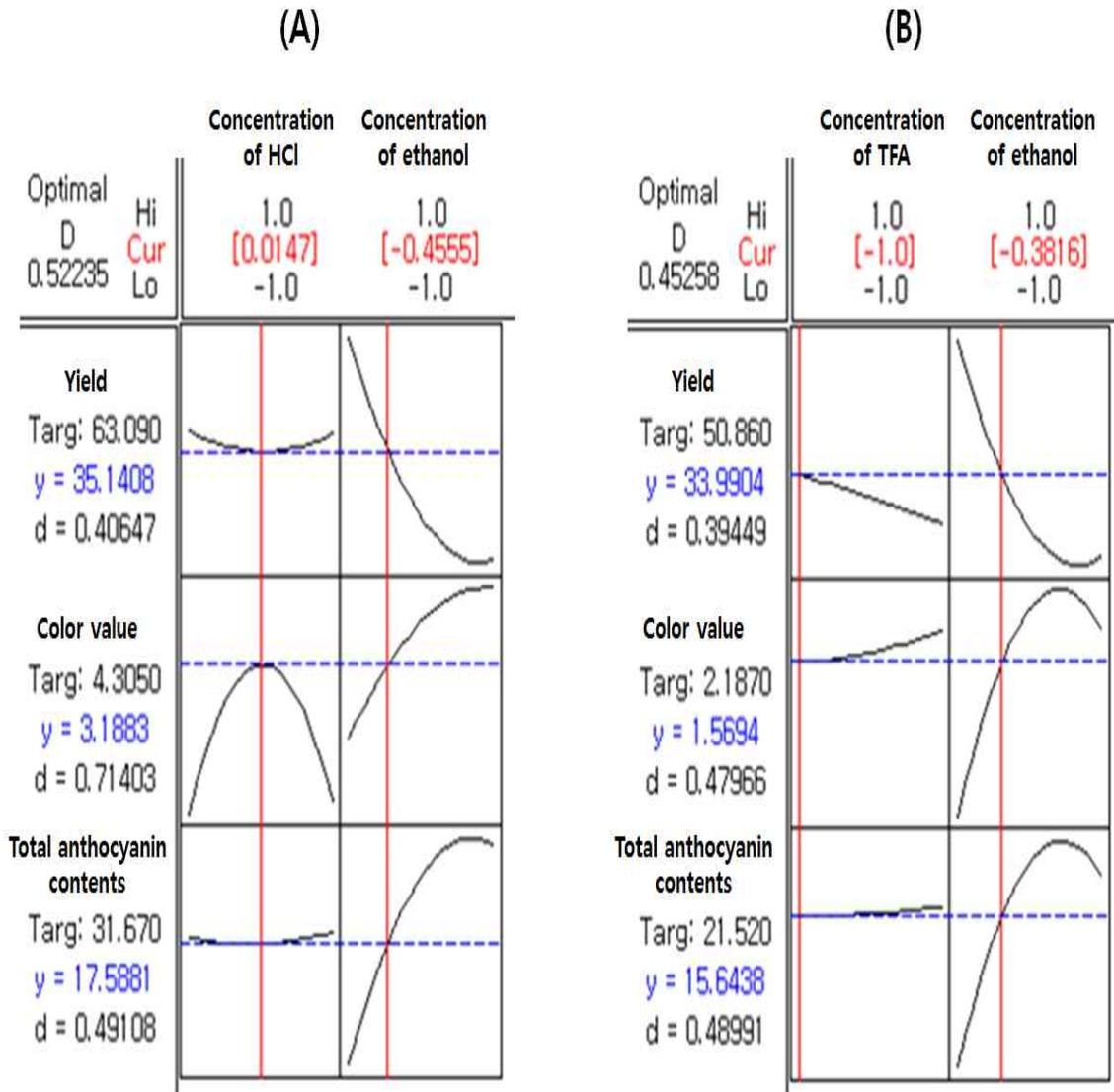


Fig. 122. Response optimization for multi-response surface of purified Anthocyanin from *Bokbunja* byproduct extracts by Amberlite XAD-7 cartridge. (A : HCl, B : TFA)

7. Citric acid의 농도에 따라 분리정제 한 Anthocyanin의 기능성 비교

식품첨가물공전 상 베리류 천연색소는 베리류 과실을 착즙 또는 물, 약산성이나 산성 수용액, ethanol 또는 메탄올로 추출하여 얻어진 색소라고 정의되어 있기 때문에, 앞선 실험에서 HCl 또는 TFA를 사용하여 분리정제된 Anthocyanin 색소를 식품첨가물로서 이용하는 경우 안전성을 고려하여야한다. 따라서 HCl 또는 TFA의 대체제로서 식용가능 한 유기산인 citric acid를 pH 조절제로 사용하여 Anthocyanin을 분리정제 하였다.

복분자박을 시료로 하여 최적 ethanol 추출 조건(시료 대 용매 비율 13.16%(w/v), 추출온도 30℃, 추출시간 1 hr)과 최적 효소 처리 조건(Pectinex Ultra SP-L의 농도 0.5 mL/100 L, 반응 온도 54.49℃, 반응시간 2hr)에 의해 제조된 추출물을 HP-20 sorbent를 이용하여 Anthocyanin

을 분리정제 하였다. 정제물의 용출 시 용출제로서 60% ethanol을 사용하였고, citric acid(CA)의 농도를 0, 0.4%, 0.7%, 1.0%(w/v)로 조절하여 citric acid의 농도에 따라 phytochemical 함량, 색도 및 항산화활성 등의 기능성을 비교 분석하였다. Citric acid는 냄새가 없고 순도가 높으며 산미도 순해서 청량음료나 채소통조림 등의 생산에 폭넓게 이용되고 있으며, Anthocyanin 색소를 안정화하여 색소 강도를 증가시킨다고 보고되기도 하였다(Park et al, 2004; Lee et al, 1996; Hong et al, 2002). 또한 ascorbic acid, acetic acid 및 lactic acid 보다 citric acid를 사용하였을 때 수율이 높고 폴리페놀 함량이 높게 나타났다고 보고(Jeong and Seo, 2009)된 바 있어 HCl 및 TFA 대체제로서 citric acid의 사용은 적합하다고 본다.

시료들의 고형분 함량 측정 결과(Table 94), citric acid 첨가량이 많을수록 고형분 함량이 높아지는 경향을 보였다. 또한, 고형분 함량이 대체로 낮게 나타났는데 이는 시료들의 고형분 함량 측정 시 정제물을 건조시키지 않고 추출물 상태로 측정하였기 때문에 나타난 결과로 생각된다. pH에 있어서는 citric acid를 첨가하지 않은 CA 0%는 6.85로 중성에 가까웠으며 citric acid를 0.4% 이상 첨가하였을 때 pH 3.5로 크게 감소하여 정제물이 산성을 나타내었다.

Citric acid의 농도에 따라 분리정제 한 Anthocyanin의 Total Polyphenol 함량과 Total Flavonoid 함량은 Table 95와 같다. Total polyphenol 함량의 경우 CA 0.7%가 2.71 mg/mL로 가장 높았고 CA 1.0%, CA 0% 및 CA 0.4% 순으로 나타났다. Total flavonoid 함량도 CA 0.7%가 0.38 mg/mL로 가장 높았으며, CA 1.0%, CA 0.4%와 CA 0% 순으로 나타나 Total Polyphenol 함량과 같은 경향을 보였다.

시료들의 항산화활성을 비교해보면(Table 96), Total Polyphenol 함량 및 Total Flavonoid 함량과 같이 CA 0.7%가 높은 활성을 나타내었는데, 특히 hydroxyl radical 소거능에 있어서 다른 시료들과의 차이가 크게 나타났다. DPPH radical 소거능에서는 CA 1.0%가 77.90%로 74.41%로 나타난 CA 0.7% 보다 더 높게 나타났다.

Citric acid의 농도에 따라 분리정제 한 Anthocyanin의 색가와 Total Anthocyanin 함량은 Table 97과 같다. 색가는 CA 0%가 가장 낮았고, CA 0.4%, 0.7% 및 1.0%는 비슷하게 나타났다. Total Anthocyanin 함량은 CA 0.7%가 9.59 mg/100 g, CA 1.0%가 9.29 mg/100 g으로 다른 시료들에 비해 높은 함량을 나타내었다.

Table 94. Analysis of dry matter and pH of purified Anthocyanin from *Bokbunja* byproduct extracts depending on citric acid concentration.

	Dry matter (%)	pH
CA 0%	0.12±0.03	6.85±0.001
CA 0.4%	0.83±0.01	3.56±0.002
CA 0.7%	1.27±0.02	3.55±0.001
CA 1.0%	1.78±0.07	3.50±0.002

Table 95. Analysis of Total Polyphenol contents and Total Flavonoid contents of purified Anthocyanin from *Bokbunja* byproduct extracts depending on citric acid concentration.

	Total polyphenol contents (mg/mL)	Total flavonoid contents (mg/mL)
CA 0%	2.55±0.005	0.32±0.004
CA 0.4%	2.51±0.003	0.32±0.002
CA 0.7%	2.71±0.003	0.38±0.004
CA 1.0%	2.58±0.004	0.35±0.005

Table 96. Analysis of antioxidative and elastase inhibitory activities of purified Anthocyanin from *Bokbunja* byproduct extracts depending on citric acid concentration.

	DPPH radical scavenging activity (%)	SOD-like activity (%)	Hydroxyl radical scavenging activity (%)	Elastase inhibitory activity (%)
CA 0%	71.41±0.09	36.23±0.07	24.83±0.15	9.49±0.08
CA 0.4%	69.07±0.1	37.03±0.13	26.09±0.17	10.76±0.12
CA 0.7%	74.41±0.11	42.54±0.20	66.78±0.27	17.41±0.02
CA 1.0%	77.90±0.12	41.76±0.15	49.55±0.26	16.41±0.02

Table 97. Analysis of color value and Total Anthocyanin contents of purified Anthocyanin from *Bokbunja* byproduct extracts depending on citric acid concentration.

	Color value (E 10%, 1 cm)	Total Anthocyanin contents (mg/100 g)
CA 0%	1.134±0.013	8.41±0.09
CA 0.4%	1.221±0.004	8.76±0.03
CA 0.7%	1.237±0.002	9.59±0.01
CA 1.0%	1.239±0.002	9.29±0.01

8. 복분자의 착즙 시기에 따른 복분자박 천연색소의 생리활성 비교

1월과 10월에 착즙한 복분자박으로 제조한 복분자박 천연색소인 SD04와 SD07을 비교분석하였다. 외관상으로는 두 시료 모두 진한 검붉은 색을 띠었고, 두 시료 간에 차이가 보이지 않았다(**Fig. 123**). 수분 함량에 있어서도 두 시료가 비슷하게 나타났다(**Table 98**).

SD04와 SD07의 생리활성을 종합적으로 분석한 결과, Total Polyphenol 함량, Total Flavonoid 함량, DPPH radical 소거능, SOD-like 활성능, hydroxyl radical 소거능, hydrogen peroxide 소거능, elastase 저해 활성능의 7가지 항목 중에서 SD04가 SD07보다 DPPH radical 소거능(62.24%, 56.31%), hydroxyl radical 소거능(63.25%, 48.99%), elastase 저해 활성능(12.03%, 8.04%)의 3가지 항목에서 더 높은 활성을 나타냈고, SD07은 Total Polyphenol 함량(7.44 mg/g, 11.22 mg/g), Total Flavonoid 함량(1.29 mg/g, 1.85 mg/g), SOD-like 활성능(20.11%, 24.28%), hydrogen peroxide 소거능(28.78%, 53.74%)의 4가지 항목에서 더 높은 활성을 나타내었다(**Table 99, 100**).

두 시료의 색가를 분석한 결과, SD04가 0.017(E 10%, 1cm)로 0.024(E 10%, 1cm)인 SD07보다 약간 낮게 나타났으며, Total Anthocyanin 함량에 있어서도 SD04(0.235 mg/g)가 SD07(1.270 mg/g)보다 낮게 나타났다(**Table 101**).

SD07이 전반적으로 생리활성과 색가 및 Total Anthocyanin 함량에서 높게 나타났으며, 특히 Total Anthocyanin 함량에서는 SD04와 약 6배 정도 크게 나타난 것으로 볼 때, 1월에 착즙한 복분자박보다 10월에 착즙한 복분자박을 이용하여 Anthocyanin계 천연색소를 추출하는 것이 더 바람직한 것으로 사료된다.



SD04



SD07

Fig. 123. Appearance of extracted powders(SD04, SD07) from *Bokbunja* byproduct.

Table 98. Moisture contents of extracted powders(SD04, SD07) from *Bokbunja* byproduct.

	Moisture contents (% wet basis)
SD04	0.94
SD07	0.95

Table 99. Total polyphenol contents, Total Flavonoid contents and DPPH radical scavenging activity of extracted powders(SD04, SD07) from *Bokbunja* byproduct.

	Total polyphenol contents (mg/ml)	Total flavonoid contents (mg/ml)	DPPH radical scavenging activity (%)
SD04	7.44±0.01	1.29±0.01	62.24±0.12
SD07	11.22±0.01	1.85±0.05	56.31±0.18

Table 100. SOD-like activity, hydroxyl radical scavenging activity, hydrogen peroxide scavenging activity and elastase inhibitory activity of extracted powders(SD04, SD07) from *Bokbunja* byproduct.

	SOD-like activity (%)	Hydroxyl radical scavenging activity (%)	Hydrogen peroxide scavenging activity (%)	Elastase inhibitory activity (%)
SD04	20.11±0.18	63.25±0.18	28.78±0.06	12.03±0.10
SD07	24.28±0.15	48.89±0.24	53.74±0.03	8.04±0.09

Table 101. Color value and Total Anthocyanin contents of extracted powders(SD04, SD07) from *Bokbunja* byproduct.

	Color value (E 10%, 1cm)	Total Anthocyanin contents (mg/g)
SD04	0.017	0.235±0.008
SD07	0.024	1.270±0.004

9. 추출용매의 재사용에 따른 시제품들의 생리활성 비교

가. 생리활성

복분자박에서 Anthocyanin계 천연색소 추출 시 사용되는 ethanol을 신규용매에서부터 4차까지 회수하여 5개의 시제품을 제조하였다. 외관상으로 시료 모두 진한 검붉은 색을 띠었고, 시료들 간에 차이가 없었다(Fig. 124).

시제품들의 수분 함량을 보면, Antho-Red KR(140305)가 7.17%로 가장 높고, Antho-Red KR(140418)가 4.59%로 가장 낮게 나타났으며 나머지 3개의 시료는 6.5% 정도로 비슷하게 나타났다(Table 102). Total polyphenol 함량에서는 Antho-Red KR(140416)가 163.48 mg/g으로 가장 높게 나타났고, Antho-Red KR(140305)가 130.12 mg/g, Antho-Red KR(140403)이 129.34 mg/g, Antho-Red KR(140409)가 113.98 mg/g 그리고 Antho-Red KR(140418)이 109.23 mg/g로 나타났다. Total flavonoid 함량도 Antho-Red KR(140416)이 32.09 mg/g으로 가장 높게

나타났으며 Antho-Red KR(140418)이 23.27 mg/g으로 가장 낮게 나타났다. DPPH radical 소거능의 경우 Antho-Red KR(140416)이 66.43%로 가장 높게 나타났으며, 다른 시료들은 비슷하게 나타났다. Elastase 저해 활성능도 Antho-Red KR(140416)이 9.85%로 0.66%인 Antho-Red KR(140418)과 큰 차이를 보였다(**Table 103**). 색가와 Total Anthocyanin 함량 측정 결과도 마찬가지로 다른 시료들에 비해 Antho-Red KR(140416)이 가장 높게 나타났고, Antho-Red KR(140418)이 가장 낮게 나타났다(**Table 104**).

추출 용매의 재사용에 따른 시제품들의 생리활성 측정 결과와 색가, Total Anthocyanin 함량 측정 결과를 종합해보면 신규용매로 추출한 Antho-Red KR(140305)보다 3차 회수용매로 추출한 Antho-Red KR(140416)이 가장 높게 나타났고, 4차 회수용매로 추출한 Antho-Red KR(140418)이 가장 낮게 나타났다. 따라서, 추출 용매 재사용 시 3차 회수용매까지는 시제품의 생리활성, 색가 및 Total Anthocyanin 함량에 영향을 미치지 않거나 더욱 증가시키는 것을 알 수 있지만, 4차 회수용매 사용 시 측정 결과가 현저히 낮아지는 것을 보아 3차 회수용매를 사용한 후에는 더 이상 회수하여 사용하지 않거나 추출 용매 재사용에 조금 더 깊은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

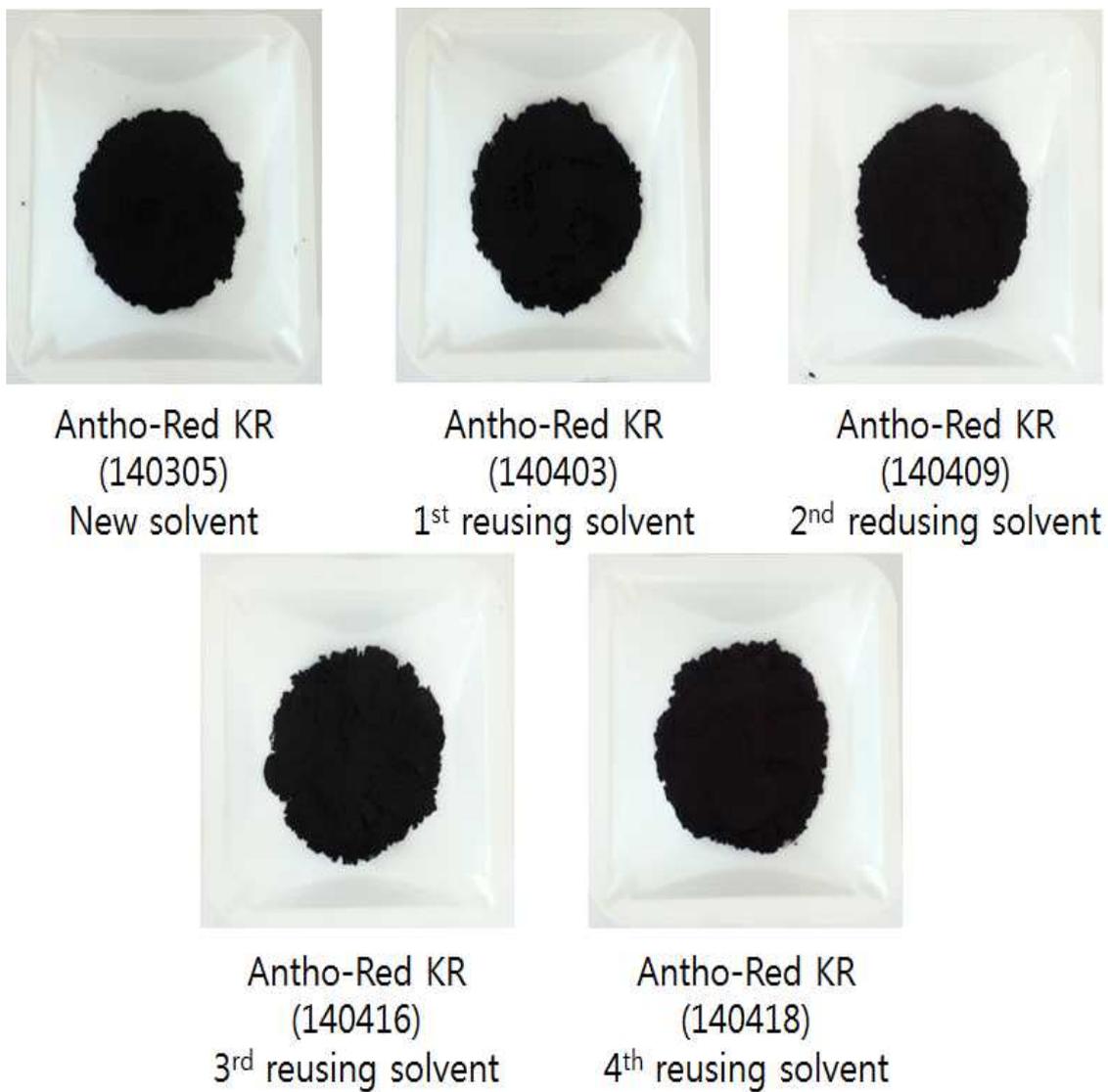


Fig. 124. Appearance of Anthocyanin-based pigment prototypes produced by extraction solvent reusing from *Bokbunja* byproduct.

Table 102. Moisture contents of Anthocyanin-based pigment prototypes produced by extraction solvent reusing from *Bokbunja* byproduct.

Sample name (Lot No.)	Moisture contents (% , wet basis)
Antho-Red KR (140305)	7.17
Antho-Red KR (140403)	6.41
Antho-Red KR (140409)	6.48
Antho-Red KR (140416)	6.55
Antho-Red KR (140418)	4.59

Table 103. Total polyphenol contents, Total Flavonoid contents, DPPH radical scavenging activity and elastase inhibitory activity of Anthocyanin-based pigment prototypes produced by extraction solvent reusing from *Bokbunja* byproduct.

Sample name (Lot No.)	Total polyphenol contents (mg/g, dry matter)	Total flavonoid contents (mg/g, dry matter)	DPPH radical scavenging activity (%)	Elastase inhibitory activity (%)
Antho-Red KR (140305)	130.12	26.54	63.21	4.57
Antho-Red KR (140403)	129.34	25.21	62.80	1.20
Antho-Red KR (140409)	113.98	24.67	62.82	2.11
Antho-Red KR (140416)	163.48	32.09	66.43	9.85
Antho-Red KR (140418)	109.23	23.27	60.45	0.66

Table 104. Color value and Total Anthocyanin contents of Anthocyanin-based pigment prototypes produced by extraction solvent reusing from *Bokbunja* byproduct.

Sample name (Lot No.)	Color value (E 10%, 1cm)	Total Anthocyanin contents (mg/kg, dry matter)
Antho-Red KR (140305)	155.92	16.86
Antho-Red KR (140403)	141.30	15.00
Antho-Red KR (140409)	132.08	14.98
Antho-Red KR (140416)	184.01	20.53
Antho-Red KR (140418)	127.39	12.53

나. 휘발성 성분 profile

추출용매를 재사용하여 제조한 시제품들의 휘발성 성분을 분석하기 위해 SPME로 추출하고 GC-MS를 이용하였다(Table 105~107).

Antho-Red KR(140305)은 총 69개의 휘발성 성분이 동정되었는데 alcohol류 16종, ester류 9종, aldehyde류 9종, ketone류 8종, acid류 6종, hydrocarbon 5종, phenol류 1종, 질소 함유 화합물 1종 및 황 함유 화합물 1종 등으로 나타났다. 가장 큰 피크 면적을 나타낸 화합물은 acetic acid 이며 그 다음으로는 2,3-butanediol, 1,3-butanediol, dihydro-2(3H)-furanone, furfuranol, 3,5-octadien-2-one 및 5-methyl-2-furaldehyde 등의 순으로 동정되었다.

Antho-Red KR(140403)은 총 62개의 휘발성 성분이 동정되었다. 그 중 alcohol류 14종, aldehyde류 10종, ester류 9종, ketone류 9종, hydrocarbon 8종 및 acid류 6종 등으로 나타났다. 가장 큰 피크 면적을 나타낸 화합물은 acetic acid 이며 그 다음으로는 2-cyclohexen-1-one, 2,3-butanediol, 1,3-butanediol, butyrolactone, 2,5-octadien-2-one 및 phenylethyl alcohol 등의 순으로 동정되었다.

Antho-Red KR(140409)은 총 61개의 휘발성 성분이 동정되었다. alcohol류가 11종으로 가장 많았으며, aldehyde류 10종, ester류 9종, ketone류 7종, hydrocarbon 6종 및 acid류 6종 순으로 나타났다. Antho-Red KR(140409)도 마찬가지로 acetic acid의 피크 면적이 가장 크게 나타났으며, 2,3-butanediol, 1,3-butanediol, butyrolactone, benzeneethanol, 3,5-octadien-2-one 및 5-methyl-2-furaldehyde 순으로 동정되었다.

Antho-Red KR(140416)의 경우 총 68개의 휘발성 성분이 동정되었는데 alcohol류 16종, aldehyde류 13종, ester류 9종, ketone류 8종, hydrocarbon 6종, acid류 6종 및 질소 함유 화합물 1종 등으로 나타났다. 그 중 acetic acid의 피크 면적이 가장 크고, 2,3-butanediol,

1,3-butanediol, 5-methyl-2-furaldehyde, butyrolactone, phenylethyl alcohol 및 3,5-octadien-2-one 순으로 동정되었다.

Antho-Red KR(140418)은 총 46개의 휘발성 성분이 동정되어 다른 시료들과 크게 차이가 나타났다. alcohol류가 14종 동정되었고, aldehyde류 9종, ester류 5종, ketone류 5종, acid류 5종 및 hydrocarbon 3종 등으로 나타났다. 피크 면적은 다른 시료들과 마찬가지로 acetic acid가 가장 컸으며, 2,3-butanediol, 1,3-butanediol, butyrolactone, phenylethyl alcohol, formic acid 및 2-acetylfruan 순으로 동정되었다.

동정된 향기성분 중에서 특별히 이취를 발생하는 성분이 나타나지 않았고, 직접적으로 향을 맡았을 때 이취가 느껴지지 않아 이취 성분을 동정할 수 없기 때문에 이취에 대한 추가 분석은 진행하지 않는 것이 바람직한 것으로 판단하였다.

Table 105. Volatile compounds identified from Anthocyanin-based pigment prototypes produced by extraction solvent reusing from *Bokbunja* byproduct by SPME.

No	RI ¹⁾	Compound name	Peak area ²⁾				
			New solvent	1 st reusing solvent	2 nd reusing solvent	3 rd reusing solvent	4 th reusing solvent
1	<1000	Ethyl acetate	175.47±49.25	133.1±2.76	198.5±24.47	223.42±18.73	-
2	<1000	2-Methyl-butanal	206.18±7.57	149.5±22.25	155.04±47.23	219.88±16.83	-
3	<1000	3-Methyl butanal	211.65±20.84	156.19±4.75	582.35±306.94	164.47±11.07	-
4	<1000	Ethanol	1196.09±180.5	857±217.34	-	1136.83±196.81	593.44±151.19
5	1040	Chloroform	-	55.12±1.94	-	199.05±78.11	175.3±96.55
6	1049	Toluene	354.93±36.99	100.11±18.1	130.05±46.73	94.94±5.59	-
7	1055	Unknown	136.75±27.74	137.52±14.42	99.95±40.18	141.06±39.95	80.18±26.6
8	1087	Hexanal	-	25.83±3.35	-	114.65±1.31	267.01±41.58
9	1107	Unknown	139.32±5.63	-	-	-	-
10	1136	3-Penten-2-one	193.96±14.99	191.64±41.61	177.65±65.64	251.5±89.58	-
11	1158	1-Penten-3-ol	1748.19±464.84	2715.92±201.15	1901.37±93	1643.31±80.8	913.81±21.3
12	1166	Cyclohexene oxide	829.89±84.34	308.26±15.37	389.87±61.33	299.55±3.7	-
13	1197	Heptanal	-	-	-	-	144.16±55.48
14	1204	Dodecane	305.9±264.9	536.49±339.08	583.95±291.57	852.94±15.02	886.72±89.16
15	1211	Isoamyl alcohol	278.85±20.45	71.56±9.66	115.2±38.35	92.74±28.02	-
16	1217	Unknown	332.15±6.81	-	198.19±8.89	-	-
17	1248	1-Pentanol	464.13±301.69	533.91±221.46	556.92±168.03	562.1±35.36	587.62±83.88
18	1303	Octanal	389.72±105.71	-	429.1±316.89	277.22±70.23	-
19	1304	Acetoin	365.92±14.74	311.3±26.45	409.95±217.54	257.19±15.28	250.27±20.19
20	1312	Unknown	105.52±38.75	-	-	-	-
21	1317	Unknown	67.6±27.2	-	-	-	-
22	1321	(Z)-2-Penten-1-ol	461.54±120.36	899.23±115.91	-	-	640.23±80.05
23	1351	1-Hexanol	711.92±338.68	-	-	983.2±69.74	-
24	1355	6-Methyl-5-hepten-2-one	121.33±3.92	115.31±5.66	155.7±14.33	158.66±9.79	126.95±3.29
25	1360	Ethyl lactate	286.8±2.17	656.8±13.96	529.1±23.91	854.69±10.53	552.43±17.68
26	1375	2,4,6-Trimethyl pyridine	-	-	97.77±34.8	97.26±1.35	-
27	1392	3-Ethoxy-1-propanol	353.54±34.55	603.65±62.1	707.91±10.54	743.41±63.97	335.47±0.13
28	1402	Dimethyl trisulfide	1386.6±339.27	-	-	-	-

Table 106. Continued.

No	RI ¹⁾	Compound name	Peak area ²⁾				
			New solvent	1 st reusing solvent	2 nd reusing solvent	3 rd reusing solvent	4 th reusing solvent
29	1407	Tetradecane	326.57±59.47	422.89±24.45	463.41±65.42	621.57±12.75	-
30	1413	Nonanal	-	74.14±0.57	236.4±16.62	348.79±16.03	-
31	1421	2-Butoxy ethanol	81.17±10.05	101.14±8.95	-	147.87±2.18	-
32	1447	Unknown	265.09±30.57	283.53±44.34	211.37±23.04	233.13±9.02	136.6±11.17
33	1451	1-Octen-3-ol	96.21±7.14	-	-	-	193.54±33.9
34	1455	2-Cyclohexen-1-one	-	96107.51±71517.26	-	-	-
35	1457	Acetic acid	107781.74±33810.14	127386.16±27672.31	147091.85±928.16	104953.86±8865.99	106416.5±116.62
36	1485	2-Cyclohexen-1-ol	-	-	-	171.15±0.32	-
37	1479	(E,E)-2,4-Heptadienal	560.6±164.02	-	-	-	436.73±79.75
38	1490	Furfural	1512.21±14.22	1031.57±20.59	1004.29±21.23	1281.49±45.4	723.37±6.14
39	1499	Unknown	173.16±15.9	123.44±13.87	-	128.97±20.23	317.66±349.65
40	1502	2-Ethyl-1-hexanol	316.52±117.25	227.31±15.7	236.19±34.16	206.42±8.1	397.38±29.13
41	1511	2,4-Heptadienal	1055.07±403.87	791.48±195.99	1129.61±154.96	802.91±65.14	645.04±28.21
42	1520	2-Acetylfuran	887.01±262.98	742.71±138.08	1118.25±184.3	1008.72±225.08	981.05±89.61
43	1528	Formic acid	1222.99±46.73	1442.18±161.69	1563.36±51.38	1230.43±160.26	1200.93±59.01
44	1533	Pyrrole	137.23±49.39	-	-	-	-
45	1539	Ethyl 3-hydroxybutanoate	194.95±29.31	290.19±34.93	334.28±27.89	282.68±25.52	-
46	1562	2,3-Butanediol	70159.07±81.36	65510.94±1201.44	56574.77±1897.76	53087.85±1872.3	30287.32±419.86
47	1572	1-Octanol	314.94±57.71	477.63±5.49	414.57±19.32	891.9±17.86	588.42±4.17
48	1580	3,5-Octadien-2-one	5432.66±69.99	6074.97±92.05	5757.35±11.45	5145.63±8.55	891.71±24.19
49	1595	1,3-Butanediol	26415.53±113.12	24721.69±478.31	21271.04±822.16	19998.88±623.66	10696.9±121.79
50	1598	5-Methyl-2-furaldehyde	2850.73±11.79	2329.39±119.17	2160.84±162.24	11821.36±13992.18	712.04±81.03
51	1603	5-Methyl furfural	2180.76±110.8	2164.37±265.13	1600.28±80.15	1565.44±212.17	763.27±29.86
52	1612	4-Cyclopentene-1,3-dione	534.64±699.93	158.13±7.75	-	-	-
53	1621	(E)-2-Octen-1-ol	-	-	-	167.08±111.12	-
54	1634	Unknown	147.67±31.66	98.74±11.92	247.01±48.08	90.57±1.19	-
55	1637	Unknown	127.04±1.33	202.08±75.2	203.64±27.07	437.24±230.07	101.28±13.55
56	1648	Butanoic acid	772.55±622.24	198.94±28.66	129.08±11.4	109.92±1.15	-
57	1673	Butyrolactone	15937.8±214.58	13853.17±200.29	12378.16±274.6	10124.12±161.03	4728.11±19.47

Table 107. Continued.

No	RI ¹⁾	Compound name	Peak area ²⁾				
			New solvent	1 st reusing solvent	2 nd reusing solvent	3 rd reusing solvent	4 th reusing solvent
58	1679	Acetophenone	-	-	-	128.87±23.04	-
59	1682	Furfuranol	10079.06±107.58	927.2±4.21	793.2±26.97	677.19±32.12	284.56±5.31
60	1697	Diethyl succinate	141.74±49.07	422.7±21.91	355.25±72.03	789.86±88.79	85.53±1.48
61	1705	Unknown	398.85±10.42	450.27±4.94	395.82±8.06	346.62±19.44	-
62	1739	4-Ethylbenzaldehyde	64.15±17.85	341.89±401.53	-	73.83±21.09	-
63	1745	Unknown	354.74±51.34	361.84±19.13	309.53±32.17	286±61.12	-
64	1758	2-Ethylhexyl-2-ethylhexanoate	956.92±857.01	135.93±12.18	51.71±2.8	61.85±5.06	-
65	1760	Undecenal	-	138.82±46.17	71.47±13.02	84.69±7.73	-
66	1786	(E,Z)-2,4-Decadienal	-	-	148.86±66.38	75.4±8.26	84.84±12.17
67	1821	2-Phenylethyl formate	230.22±50.46	227.94±28.21	405.51±37.2	401.32±3.93	97.93±15.58
68	1825	Ethyl-4-hydroxybutanoate	2258.19±78.2	2478.98±165.61	1675.09±10.03	1575.01±44.1	436.66±1.84
69	1848	Unknown	-	-	46.29±0.15	65.41±6.45	-
70	1867	Hexanoic acid	273.28±108.19	115.98±10.98	130.46±3.82	114.66±2.00	117.91±20.4
71	1873	Phenol	161.68±41.27	-	-	-	-
72	1893	Unknown	53.24±11.33	-	-	-	-
73	1902	1-(1-Butenyl)-cyclohexene	-	-	133.52±8.69	-	-
74	1908	Benzyl alcohol	99.38±21.65	168.29±21.49	162.02±25.15	170.76±18.82	86.61±2.2
75	1931	Unknown	-	-	132.28±21.64	-	-
76	1938	Butylated hydroxy toluene	852.77±188.14	932.01±72.12	564.51±101.2	559.45±20.9	345.67±6.35
77	1944	Phenylethyl alcohol	2623.89±13.2	5253.4±102.97	6604.95±43.01	7422.14±272.78	2380.41±83.32
78	1961	Unknown	229.06±40.5	199.5±18.24	293.01±47.71	187.47±2.43	322.26±13.28
79	1970	2-Ethyl-hexanoic acid	265.76±196.97	902.72±16.49	535.72±131.81	192.92±153.76	82.56±22
80	2064	2-Formyl-1H-pyrrrole	-	-	-	86.25±6.47	-
81	2070	DL-Pantolactone	97.34±0.53	99.13±2.84	127.5±23.86	117.91±7.15	-
82	2074	Unknown	-	-	149.48±24.14	-	-
83	2200<	Ethyl-2-hydroxy-3-phenylpropanoate	192.87±7.05	256.2±13.48	262.17±21.14	309.48±27.25	-
84	2200<	Monoethyl succinate	217.94±136.23	601.09±127.37	402.79±187.72	741.64±258.51	444.14±88.02
85	2200<	Benzoic acid	248.23±19.55	534.35±188.33	393.2±126.45	1240.25±261.18	833.97±32.89

10. 효소의 종류에 따른 시제품들의 생리활성 비교

가. 생리활성

복분자박에서 Anthocyanin계 천연색소 추출 시 용매 추출 단계에서 효소 처리를 할 때 사용되는 효소의 종류를 달리하여 4개의 시제품을 제조하였다. 외관상 시료 모두 진한 검붉은 색을 띠었고, 시료들 간에 차이가 보이지 않았다(**Fig. 125**).

시제품들의 수분 함량 측정 결과 Antho-Red KR(140430)이 4.52%로 가장 높게 나타났고, Antho-Red KR(140512), Antho-Red KR(140521), Antho-Red KR(140515) 순으로 나타났다(**Table 108**). Total polyphenol 함량과 Total Flavonoid 함량 측정 결과, Antho-Red KR(140515)가 162.04 mg/g과 31.84 mg/g으로 장 높게 나타났고, Antho-Red KR(140521)이 125.37 mg/g과 29.96 mg/g으로 가장 낮게 나타났다. DPPH radical 소거능에서는, Antho-Red KR(140530)이 66.14%로 가장 높게 나타났고 Antho-Red KR(140512)과 Antho-Red KR(140521)이 61.22%와 63.37%로 비슷한 값을 보였으며, Antho-Red KR(140515)는 56.86%로 가장 낮게 나타났다. Elastase 저해 활성능도 Antho-Red KR(140430)이 8.84%로 가장 높게 나타났고, Antho-Red KR(140515)이 0.66%로 가장 낮게 나타났다(**Table 109**). 색가와 Total Anthocyanin 함량에서도 Antho-Red KR(140430)이 가장 높게 나타났지만, 색가에서는 Antho-Red KR(140512)이, Total Anthocyanin 함량은 Antho-Red KR(140521)이 가장 낮게 나타났다(**Table 110**).

용매 추출 단계에서 사용되는 효소의 종류에 따라 제조된 시제품들의 생리활성 측정 결과와 색가, Total Anthocyanin 함량 측정 결과를 종합해보면, 전반적으로 pectinex SP-L을 사용한 Antho-Red KR(140430)이 높게 나타났다. 따라서, 복분자박에서 Anthocyanin계 천연색소 추출 시 용매 추출 단계에서 다른 효소보다는 pectinex SP-L을 사용하는 것이 바람직하다고 사료된다.



**Antho-Red KR
(140430)
Pectinex SP-L**



**Antho-Red KR
(140512)
Plantase PLC**



**Antho-Red KR
(140515)
Plantase MAX**



**Antho-Red KR
(140521)
AMG 300L**

Fig. 125. Appearance of Anthocyanin-based pigment prototypes produced according to the type of enzyme from *Bokbunja* byproduct.

Table 108. Moisture contents of Anthocyanin-based pigment prototypes produced according to the type of enzyme from *Bokbunja* byproduct.

Sample name (Lot No.)	Moisture contents (% , wet basis)
Antho-Red KR (140430)	4.52
Antho-Red KR (140512)	4.46
Antho-Red KR (140515)	3.22
Antho-Red KR (140521)	3.48

Table 109. Total polyphenol contents, Total Flavonoid contents, DPPH radical scavenging activity and elastase inhibitory activity of Anthocyanin-based pigment prototypes produced according to the type of enzyme from *Bokbunja* byproduct.

Sample name (Lot No.)	Total polyphenol contents (mg/g, dry matter)	Total flavonoid contents (mg/g, dry matter)	DPPH radical scavenging activity(%)	Elastase inhibitory activity(%)
Antho-Red KR (140430)	142.17	27.93	66.14	8.84
Antho-Red KR (140512)	122.19	25.94	61.22	3.57
Antho-Red KR (140515)	162.04	31.84	56.86	0.66
Antho-Red KR (140521)	125.37	26.96	63.37	5.99

Table 110. Color value and Total Anthocyanin contents of Anthocyanin-based pigment prototypes produced according to the type of enzyme from *Bokbunja* byproduct.

Sample name (Lot No.)	Color value (E 10%, 1cm)	Total Anthocyanin contents (mg/kg, dry matter)
Antho-Red KR (140430)	211.23	44.83
Antho-Red KR (140512)	184.21	39.44
Antho-Red KR (140515)	189.13	29.22
Antho-Red KR (140521)	224.37	28.16

나. 휘발성 성분 profile

복분자박에서 Anthocyanin계 천연색소 추출 시 용매 추출 단계에서 효소 처리를 할 때 사용되는 효소의 종류를 달리하여 제조한 시제품들의 휘발성 성분을 분석하기 위해 SPME로 추출하고 GC-MS를 이용하였다(Table 111~112).

Antho-Red KR(140430)은 총 50개의 휘발성 성분이 동정되었는데 alcohol류 15종, aldehyde류 9종, ketone류 6종, hydrocarbon 5종, acid류 5종 및 ester류 4종 등으로 나타났다. 가장 큰 피크 면적을 나타낸 화합물은 acetic acid 이며 그 다음으로는 2,3-butanediol, 1,3-butanediol, butyrolactone, phenylethyl alcohol, 3,5-octadien-2-one 및 1-penten-3-ol 등의 순으로 동정되었다.

Antho-Red KR(140512)의 경우 총 46개의 휘발성 성분이 동정되었고, alcohol류 13종, aldehyde류 9종, ketone류 6종, hydrocarbon 5종, ester류 4종 및 acid류 4종 등으로 나타났다. Antho-Red KR(140512)도 마찬가지로 acetic acid의 피크 면적이 가장 크게 나타났으며, 2,3-butanediol, 1,3-butanediol, butyrolactone, 3,5-octadien-2-one, 1-penten-3-ol 및 (E,E)-2,4-heptadienal 등의 순으로 동정되었다.

Antho-Red KR(140515)는 총 46개의 휘발성 성분이 동정되었는데 alcohol류 12종, aldehyde류 9종, ketone류 6종, acid류 5종, hydrocarbon 4종 및 ester류 4종 등으로 나타났다. Antho-Red KR(140430) 및 Antho-Red KR(140512)과 동일하게 acetic acid, 2,3-butanediol, 1,3-butanediol, butyrolactone의 피크 면적이 크게 나타났으며, 1-penten-3-ol, 2,4-heptadienal 및 (Z)-2-penten-1-ol 등의 순으로 동정되었다.

Antho-Red KR(140521)은 총 39개의 휘발성 성분이 동정되었는데 alcohol류 12종, aldehyde류 8종, ketone류 5종, hydrocarbon 4종, acid류 4종 및 ester류 3종 등으로 나타났다. 가장 큰 피크 면적을 나타낸 화합물은 acetic acid 이며 그 다음으로는 2,3-butanediol, 1,3-butanediol, butyrolactone, formic acid, (Z)-2-penten-1-ol 및 1-penten-3-ol 등의 순으로 동정되었다.

동정된 향기성분 중에서 특별히 이취를 발생하는 성분이 나타나지 않았고, 직접적으로 향을 맡았을 때 이취가 느껴지지 않아 이취 성분을 동정할 수 없기 때문에 이취에 대한 추가 분석은 진행하지 않는 것이 바람직한 것으로 판단하였다.

Table 111. Volatile compounds identified from Anthocyanin-based pigment prototypes produced according to the type of enzyme from *Bokbunja* byproduct by SPME.

No	RI ¹⁾	Compound name	Peak area ²⁾			
			Pectinex SP-L	Plantase PLC	Plantase MAX	AMG 300L
1	<1000	Ethanol	262.53±24.6	490.2±118.84	223.3±5.75	312.69±3.6
2	1032	Chloroform	511.74±133.79	216.9±194.22	100.51±1.53	279.19±86.65
3	1041	Cyclohexene oxide	-	233.8±82.97	-	-
4	1056	Unknown	377.81±439.89	93.62±1.64	-	81.62±13.89
5	1089	Hexanal	231.83±103.95	272.12±60.73	280.35±45.38	240.84±45.08
6	1158	1-Penten-3-ol	1115.89±45.82	1197.46±62.02	1046.65±94.01	864.57±8.79
7	1197	Heptanal	-	98.77±5.86	81.01±26.58	-
8	1204	Dodecane	435.65±137.79	541.2±224.68	538.06±53.29	620.74±121.09
9	1209	Isoamyl alcohol	171.92±26.37	-	-	-
10	1249	1-Pentanol	562.88±150.47	565.01±87.58	578.23±43.87	471±9.55
11	1304	Acetoin	571.59±50.98	391.52±67.7	527.46±77.38	419.81±34.92
12	1317	Unknown	65.09±2.73	-	-	-
13	1321	(Z)-2-Penten-1-ol	870.44±248.57	988.54±246.79	908.45±98.63	956.62±278.79
14	1355	6-Methyl-5-hepten-2-one	214.7±27.81	295.99±4.81	179.6±0.13	194.19±12.68
15	1360	Ethyl lactate	259.63±0.85	118.37±3.28	-	-
16	1392	3-Ethoxy-1-propanol	297.93±7.66	258.01±1.96	135.52±4.07	101.69±5.57
17	1407	Tetradecane	344.33±55.3	321.11±35.47	322.11±16.74	338.35±13.88
18	1413	Nonanal	429.51±26.59	560.77±47.97	897.49±17.53	350.72±8.21
19	1420	2-Butoxy ethanol	260.31±35.47	105.19±12.06	107.65±15.95	117.92±14.64
20	1447	Unknown	190.17±59.71	164.8±64.79	131.44±0.37	125.81±26.21
21	1455	Acetic acid	95766.31±4453.08	109220.67±373	87803.68±284.44	90958.5±393.4
22	1479	(E,E)-2,4-Heptadienal	758.26±575.27	1193.68±725.19	823.54±210.59	743.81±288.71
23	1485	2-Cyclohexen-1-ol	622.16±767.75	-	-	-
24	1490	Furfural	1059.09±28.75	276.9±32.35	261.09±8.58	120.84±10.35
25	1500	Pentadecane	117.05±28.16	-	-	-
26	1502	2-Ethyl-1-hexanol	282.16±48.2	335.13±29.4	326.32±36.44	359.13±23.75
27	1510	2,4-Heptadienal	532.18±8.24	534.58±54.26	934.69±634.04	485.58±6.52
28	1520	2-Acetylfuran	790.85±31.48	1058.29±77.68	745.79±848.84	711.21±7.58
29	1528	Formic acid	953.84±133.92	1070.56±30.23	714.44±6.7	1190.77±19.74
30	1561	2,3-Butanediol	46456.96±3287.81	47998.95±83.51	34549.86±483.75	31775.78±144.16

Table 112. Continued.

No	RI ¹⁾	Compound name	Peak area ²⁾			
			Pectinex SP-L	Plantase PLC	Plantase MAX	AMG 300L
31	1572	1-Octanol	439.16±84.34	421.68±1.04	308.68±15.47	247.57±64.05
32	1579	3,5-Octadien-2-one	1204.91±203.01	1489.05±38.93	620.65±21.58	511.71±68.19
33	1595	1,3-Butanediol	17008.83±1303.66	18495.36±19.41	13513.36±238.66	12448.85±280.53
34	1597	5-Methyl-2-furaldehyde	907.08±71.1	-	597.24±54.84	-
35	1603	5-Methyl furfural	808.61±89.81	607.46±7.8	631.12±75.78	366.82±33.95
36	1613	4-Cyclopentene-1,3-dione	-	88.23±25.82	196.56±36.27	-
37	1637	Unknown	259.39±101.58	462.14±54.91	248.04±32.25	171.6±0.63
38	1641	Unknown	-	-	108.18±15.29	-
39	1672	Butyrolactone	6970.58±241.21	7500.99±44.1	4794.86±23.62	3593.84±133.01
40	1682	Furfuranol	491.91±23.52	317.79±8.31	262.5±13.6	107.36±8.23
41	1699	Diethyl succinate	156.06±27.24	128.7±17.47	215.49±46.23	-
42	1739	4-Ethylbenzaldehyde	114.75±22.09	94.61±11.61	105.54±6.65	89.16±1.25
43	1743	Unknown	121.27±7.52	-	89.29±3.55	-
44	1758	2-Ethylhexyl-2-ethylhexanoate	-	-	57.76±9.04	73.11±4.13
45	1783	(E,Z)-2,4-Decadienal	74.74±17.19	139.46±47.29	-	-
46	1825	Ethyl-4-hydroxybutanoate	780.78±101.54	1052.57±22.71	360.52±33.27	316.13±22.65
47	1867	Hexanoic acid	154.57±6.26	183.46±23.27	148.01±17.51	86.96±27.22
48	1892	Unknown	-	-	56.58±21.83	-
49	1907	Benzyl alcohol	131.24±6.33	112.56±4.15	-	-
50	1931	Unknown	-	51.57±25.84	-	-
51	1938	Butylatedhydroxytoluene	813.85±79.49	409.85±28.88	502.06±29.07	466.42±19.5
52	1944	Phenylethyl alcohol	1236.58±116.36	786.9±6.09	327.32±62.37	329.8±3.27
53	1961	Unknown	261.19±29.37	256.31±21.73	221.4±10.14	185.61±6.51
54	1970	2-Ethyl-hexanoic acid	251±158.19	-	61.1±17.6	-
55	2070	DL-Pantolactone	81.55±4.43	-	-	-
56	2200 <	Monoethyl succinate	402.87±7.31	295.39±1.29	291.21±64.39	199.25±30.75
57	2200 <	Benzoic acid	733.82±128.26	467.77±15.03	337.14±168.97	175.59±105.27

¹⁾ : Retention indices were determined on DB-wax using C10-C22 as external reference.

²⁾ : Peak area = area x 10⁴ ± standard deviation x 10⁴

제 4 절. Anthocyanin계 천연색소의 다양한 적용실험

1. 생강초절임(Ginger pickling)에 대한 응용실험

재료 및 방법 : slice ginger(150g), vinegar(100ml), water(70ml), salt(3g), sugar(50g), natural color(3 type)

2.1. boiling (vinegar, water, salt, sugar)



2.2. wash & slice (ginger)



2.3. dyeing – 2hours

SA #1 : Cochineal Ext.

SA #2 : Cochineal Ext.+
Gardenia Yellow

SA #3 : Anthocyanins
(Bokbunja byproduct Ext.)

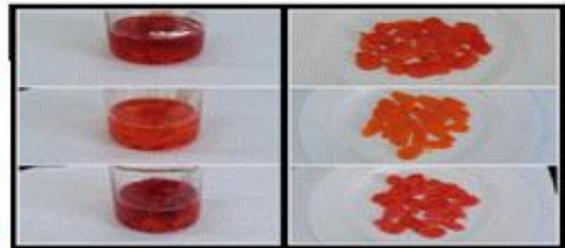


Fig. 126. 생강초절임(Ginger pickling)의 제조방법 및 천연색소의 적용 결과

결과 및 고찰 : 염착력이 우수한 적색계 천연색소인 코치닐추출색소는 최근 알레르기 및 ADHD 유발 가능성이 높다고 알려진 동물성 천연색소로서 사용이 기피되고 있으며, 본 응용실험에서는 생강초절임에 복분자 부산물에서 추출한 Anthocyanin계 천연색소를 사용하여 유사한 염착력을 나타내는 대체품으로 충분히 적용이 가능할 것으로 확인하였다(Fig. 126).

2. 제빵(Muffin)에 대한 응용실험

성분명	배합량(g)
밀가루 (강력분)	30.0
베이킹파우더 (RED524)	5.0
설탕	15.0
계란	45.0
버터	5.0
소금	0.5
우유	24.5
복분자 부산물 추출물	5.0
곡물주정	4.0
합계	134.0

1. 우유에 설탕과 소금을 용해시킨다.
2. Bowl에 계란을 풀고 1.을 투입하여 혼합한다.
3. 밀가루와 베이킹파우더를 투입하고 충분히 반죽한다.
4. 버터를 투입해서 반죽한 뒤, 곡물주정과 혼합된 복분자 부산물 추출물을 투입한다.
5. 180도 오븐에 20분간 조리한다.

Fig. 127. 복분자박 추출물이 첨가된 머핀의 제조방법

결과 및 고찰 : 일반적으로 제빵에 널리 사용되는 첨가물 중 베이킹파우더는 가스발생제(중탄산나트륨), 산성제(가스발생촉진제), 완화제(주로 건조전분)로 구성되어 있으며, 반응을 통하여 이산화탄소를 발생시킨다. 이때 동시에 생성된 주석산나트륨은 중성이므로 제품의 색을 황갈색으로 변하게 하지 않으며, 쓴맛과 비누냄새가 없다. 전분은 수분을 흡수하여 베이킹파우더가 덩어리지지 않도록 하고 수분에 의해 산과 알칼리가 반응하여 이산화탄소가 생성되는 것을 막아주며, 이산화탄소의 생성량을 12% 정도가 되도록 조절하는 역할을 한다. 또한 제빵에 사용되는 원재료들은 대부분이 중성 또는 알칼리성의 원재료들이므로 pH가 낮은 산성 영역에서 적색의 발현이 우수한 Anthocyanin계 천연색소는 적용하기가 쉽지 않은 것이 현실이다.

따라서 본 응용실험에서는 복분자박에서 추출된 Anthocyanin계 천연색소를 제빵에 적용시키 고자 Anthocyanin의 구조적인 안정성을 높여줄 수 있도록 개발된 베이킹파우더(Red524, Japan)을 사용하여 머핀을 제조해 본 결과, 조리 후에도 적색의 발현 및 유지가 가능할 수 있음을 확인하였다(Fig. 128).

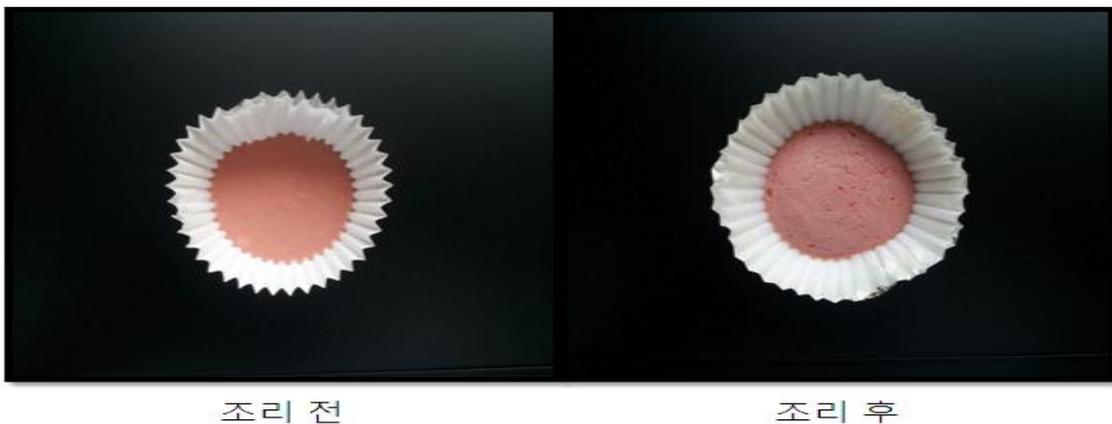


Fig. 128. 베이킹 파우더(Red524)를 사용하여 복분자박 천연색소가 적용된 머핀

3. 오징어 진미채(홍진미채)에 대한 응용실험

재료 및 방법 : 홍진미채용 천연색소 혼합제제(0.15g), 복분자박 농축액(0.15g), 건조오징어 (80g), 냉수(400g) -> 12시간 침지

결과 및 고찰 : 시중에 유통중인 천연색소 혼합제제(치자황색소, 홍국색소, 고량색소 등 혼합제제)의 대체가 가능한지를 검토하기 위하여 복분자박 농축액(60Brix)을 동일한 농도로 희석한 뒤 건조오징어를 12시간 침지시켜 염착력 및 색상의 변화를 관찰한 결과, 유사한 색상 및 염착력을 나타내었다(Fig. 129). 또한, 상기의 실험결과를 바탕으로 강원도 주문진에 위치한 현남 식품의 협조를 얻어 시험생산을 진행하였으며 양호한 결과를 나타내었다(Fig. 130).

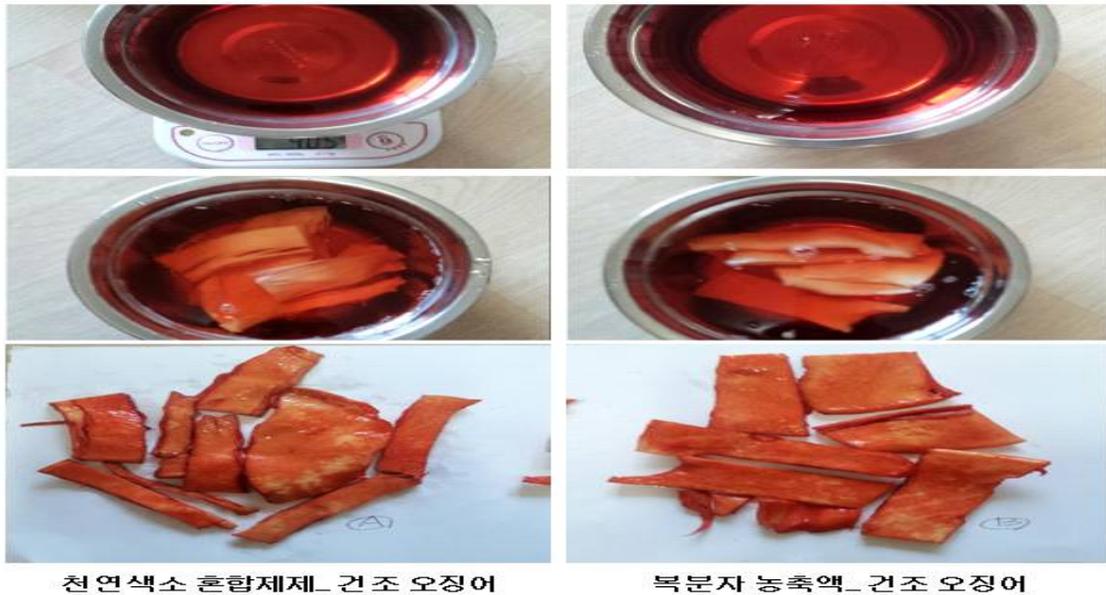


Fig. 129. 천연색소 혼합제제와 복분자박 농축액의 건조 오징어 염착 실험 결과



Fig. 130. 복분자박 농축액을 이용한 건조 오징어 시험생산 결과

제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	연구개발의 목표 및 내용	목표달성도	기여도
2012년 (1차년도)	[Anthocyanin계 천연색소의 원료선별 및 최적 추출공정개발] · 원료별 Anthocyanin 함량, 색도, 생리활성 분석 · 효소전처리공정을 포함한 유기용매법을 이용하여 추출용매, 추출온도, 추출시간, 용매/원료 비율, 용매농도 등에 따른 최적추출공정개발	100%	
	[Anthocyanin계 천연색소의 대량생산을 위한 공정 확립] · 개발되는 추출, 분리정제기술을 바탕으로 Anthocyanin계 천연색소의 대량생산을 위한 최적화된 제조공정을 자체적으로 확립하여 산업화를 위한 준비를 할 것임.	100%	
2013년 (2차년도)	[고부가가치 식품, 의약품, 화장품 등의 소재에 적합한 식품첨가물 개발] · 생산능가 및 관련가공업체와의 전략적 원료 구매계약 체결 · 제품의 안정성 확보를 위한 부형제 적용 실험 · 부형제처리 및 미처리 간의 pH, 열처리, 빛, 당류, 유기산 등의 요인에 따른 가공안정성 분석 · 부형제처리 및 미처리 간의 음료, 제과, 제빵, 시럽 등의 가공식품/기능성함유 의약품/미백효과에 탁월한 skin care 화장품 등에 적용실험	100%	
	[Anthocyanin계 천연색소의 분리정제기술개발] · 양이온 교환수지(cation exchange resin)를 이용하여 solid-phase extraction(SPE)기술의 최적화공정을 통한 공정개발 · Anthocyanin의 이미, 이취 등 관능적 문제점 해결기술개발	100%	
2014년 (3차년도)	[고부가가치 식품, 의약품, 화장품 등의 소재에 적합한 식품첨가물 개발] · 개발된 자체 추출분리기술의 대량생산화 적용확인실험 · 공인인증기관을 통한 안전성검증(잔류농약, 중금속(납, 수은, 카드뮴, 비소 등), 세균검사 등 종합 검증) · 식품첨가물등록 (제품화 및 사업화)	100%	
	[Anthocyanin계 천연색소의 저장안정성향상연구] · 식품내부와 외부환경의 조건에 따라서 민감하게 반응하는 Anthocyanin의 저장안정성을 높이는 조건설정에 대한 연구	100%	

제 5 장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획

가. 연구개발 성과

구분	특허		학술발표		유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	국내	국제		SCI	비SCI	
1차년도	2		5					
2차년도	1		4				1	
3차년도		2	1				1	
계	3	2	10				2	

나. 연구결과의 활용방안

- Anthocyanin계 천연색소의 추출, 정제 및 저장성향상 기술개발은 천연색소로서의 기능뿐만 아니라 항산화작용, 유리 라디칼 소거작용, 발암성물질의 활성감소, 항바이러스, 항균효과, 변이 암세포의 생육저해, 혈압강하, 모세혈관 강화작용, 간장보호효과, 중금속해독작용 등을 위한 건강 기능성식품소재로서 의약, 화장품 등의 분야에도 기능성소재로 활용할 수 있음.
- 특히 육가공제품에 있어 대표적인 발색제로서 첨가되는 아질산염은 육색의 발색화와 안정화를 개선하는데 중요한 작용을 하나 식품 및 생체내의 잔존 아질산염은 발암물질인 nitrosamine을 생성하는 것으로 알려져 있음. Anthocyanin계 천연색소의 추출, 정제 및 저장성향상 기술개발을 통하여 아질산염대체 적색계 천연색소로 활용할 수 있음.
- 우리나라의 천연색소에 대한 연구는 선진국에 비하여 미흡한 실정이므로 개발된 분리정제 방법을 여타 식물체인 유색미, 검정콩, 검정찰옥수수, 블루베리, 포도껍질 등에서 고순도의 Anthocyanin 천연색소 제품화를 위한 기초자료를 제공하고 여타 식물체로부터의 천연색소 및 생리활성물질 분리정제공정에 응용하여 활용이 가능함.
- 개발된 Anthocyanin계 천연색소의 추출, 정제 및 저장성향상 기술개발에 대하여 기술이전, 특허출원/등록, 학술발표 및 논문을 발표할 것임.

- Anthocyanin의 부형제를 이용한 미세캡슐화 (encapsulation) 기술개발은 항산화작용, 유리 라디칼 소거작용, 발암성물질의 활성감소, 항바이러스, 항균효과, 변이 암세포의 생육저해, 혈압강하, 모세혈관 강화작용, 간장보호효과, 중금속해독작용 등을 위한 건강 기능성식품소재뿐만 아니라 의약, 화장품 등의 분야에도 기능성소재로 활용함.
- 부형제를 이용한 미세캡슐화 (encapsulation) 기술개발을 위하여 캐나다에 본사를 두고 있는 Colalome사와 기술제휴를 맺어 Anthocyanin계 천연색소 뿐 아니라 다양한 천연색소에 rice protein을 적용하여 인공색소, 특히 황산알루미늄, 염화알루미늄 등으로 처리하여 다양한 가공식품과 의약품, 화장품 등에 착색도를 높인 알루미늄레이크 제제를 대체하기 위한 연구개발을 진행 중임.
- 현재 자사는 인산염 전문기업으로 1976년에 회사를 설립하여 식품업계에서도 인지도가 매우 높으며 인산염뿐 아니라 천연색소를 제품화하여 판매한 경험도 많기 때문에 본 연구개발을 통해 생산되는 신제품의 시장진입도 매우 쉬울 것으로 예상됨.
- 식품, 의약, 화장품 산업체 등의 기존 거래처를 많이 확보하고 있기 때문에 전략적인 제휴를 통한 시장 진입이 가능할 것으로 판단됨.
- 본 연구개발의 목적은 Anthocyanin계 천연색소를 제품화하는 것이지만, 궁극적으로 천연색소 생산과 관련된 국산화 기술개발이 목적이므로 다른 원료들, 특히 치자나무(*Gardenia augusta* Merrill 또는 *Gardenia jasminoides* Ellis)의 과실을 물 또는 에탄올로 추출 또는 가수분해를 거쳐 얻는 치자황색소, 치자나무의 과실추출액에 함유된 Iridoid 배당체와 단백질분해물의 혼합물에 β -Glucosidase를 첨가하여 얻어지는 치자청색소, 비트(*Beta vulgaris* Linné)의 뿌리를 물 또는 에탄올로 추출하여 얻어진 색소로서 이소베타닌(isobetanine) 및 베타닌(betanine)을 주성분으로 하는 비트레드색소 등 국내에서 활용가능한 다양한 천연색소원에 대한 연구개발도 지속적으로 수행하여 제품화 할 계획임.
- 본 연구개발을 진행하면서 국내 유일, 최대 규모의 추출, 농축, 분리정제 라인이 구축된 (사)경북청정약용작물클러스터사업단의 한국천연색소산업화센터와 국내의 천연색소산업의 활성화 및 상호 공동이익의 증진을 도모하기 위한 업무협약(MOU)을 맺게 되었음.
- 한국천연색소산업화센터와의 업무협약을 통하여 국내산 작물 (복분자, 자주색고구마, 적양배추)에서 Anthocyanin계 천연색소를 산업화하기 위한 시험생산과 본생산을 단계적으로 진행할 계획임.
- 또한, 본 연구개발을 통해 개발된 기술을 대량생산에 적용함에 있어 추출단계별 추출효율, Ultra-Filer를 이용한 막분리 농축공정, Prep LC를 이용한 고순도 분리정제 등을 활용하여 품질적으로 또는 형태적으로 다양한 제품을 개발하는 것을 목표로 하고 있음.
- 그에 따라 국민의 건강과 지역경제발전에 기여하고 특히 천연색소 산업 발전을 위하여 상호협력 관계를 유지발전 시키기 위한 추가업무를 진행중임.

다. 별첨



특 허 증

CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 10-1465842 호

(PATENT NUMBER)

출원번호
(APPLICATION NUMBER)

제 2012-0130496 호

출원일
(FILING DATE:YY/MM/DD)

2012년 11월 16일

등록일
(REGISTRATION DATE:YY/MM/DD)

2014년 11월 20일

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)

PECTINEX ULTRA SP-L을 이용한 안토시아닌계 색소를 포함하는 베리류 또는 컬리감자의 추출물의 제조 방법

특허권자 (PATENTEE)

단국대학교 산학협력단(274371-0*****)

경기 용인시 수지구 죽전로 152, 내 (죽전동, 단국대학교)

발명자 (INVENTOR)

등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록 되었음을 증명합니다.

(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2014년 11월 20일



특 허 청 장 김 영

COMMISSIONER, THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE



연차등록료는 2017년부터 매년 11월 20일까지 납부하여야 하며, 등록원부로 권리관계를 확인바랍니다.

특허증

CERTIFICATE OF PATENT



특허
Patent Number

제 10-1480209 호

출원번호
Application Number

제 10-2012-0130497 호

출원일
Filing Date

2012년 11월 16일

등록일
Registration Date

2014년 12월 31일

발명의 명칭 Title of the Invention

NOVOZYM 33095 를 이용한 안토시아닌계 색소를 포함하는 베리류 또는 컬러감자의 추출물의 제조 방법

특허권자 Patentee

단국대학교 산학협력단(274371-0*****)
경기 용인시 수지구 죽전로 152, 내 (죽전동, 단국대학교)

발명자 Inventor

등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.

This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.



2014년 12월 31일

특허청장
COMMISSIONER,
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

김영민

복분자박을 이용한 안토시아닌 최적정제공정 연구

김희선 · 강운진 · 김원석¹ · 김명환*
단국대학교 식품공학과, ¹서도비엔아이(주)

Study to find the Optimal Purification Processing Conditions of Anthocyanin from *Bokbunja* Byproducts

Hee-Sun Kim, Eun-Jin Kang, Won-Suk Kim¹, and Myung-Hwan Kim*

Department of Food engineering, Dankook University
¹SDBNI Co., LTD

Abstract

This study was performed to determine the purification yield, color value, and total anthocyanin content of purified anthocyanins from *Bokbunja* byproducts for analyzing the optimal conditions of purification processing by response surface methodology (RSM) based on HCl or trifluoroacetic acid (TFA) concentration as an acidulent and ethanol concentration as an eluent. From the results of purification yield, color value, and total anthocyanin content of the purified anthocyanins, it was shown that HCl was better than TFA for purification processing from *Bokbunja* byproducts and the optimal concentration range of ethanol was 60-75%. The optimal purification conditions for HCl or TFA, ethanol concentration, and overall desirability by analysis of multiple response surface methodology with the same weighed value for each dependent variable were 0.84%, 73.12% and 0.77 for HCl acidulent and 1.00%, 60.75% and 0.96 for TFA acidulent, respectively.

Key words: *Bokbunja* byproducts, purification, HCl, trifluoroacetic acid, ethanol, anthocyanin

서 론

복분자(*Rubus coreanus* Miq.)는 장미목(Rosales) 장미과(Rosaceae)의 낙엽관목으로 한반도 남부지방, 중국, 일본 등지에 분포하고 있으며 열매는 7-8월에 성숙되어 붉은색으로 익으며 점차 검 붉은색으로 된다(Chung & Lim, 2012). 복분자에 함유되어 있는 안토시아닌(anthocyanin)은 합성착색제를 대체할 수 있는 천연색소로서 주목을 받고 있으며 색소 기능성 이외의 강한 항산화작용이 혈관계 질환, 암, 당뇨, 신경계 질환 등의 치료에 효과가 있다는 연구결과가 있다(Koneczak & Zhang, 2004). 안토시아닌은 수용성 flavonoid 색소로서 각종 식물체의 꽃, 과일 등에 존재하며 직색에서 청색에 이르는 다양한 색을 발현하는 색소이다(Chong, 2004). 안토시아닌 천연색소원으로 복분자 이외로 주목 받고 있는 것들은 자색고구마, 꽃양배추, 포도껍질, 오디, 유색

미, 꽃 배고니아 등이다(Jeong & Seo, 2009). 식물계에서 600여 종 이상이 발견되고 있는 안토시아닌은 모두 안토시아닌idin(anthocyanidin) 배당체로서 안토시아닌idin은 flavylium(2-phenyl-1-benzopyrylium)의 기본구조에 수산기 또는 메톡실기가 치환되어있는 구조를 가진다(Choi, 2010; He & Giusti, 2011). 복분자는 씨앗과 과피가 전체 과실의 20-25%를 차지하며 착즙 후 가공 과정을 거쳐서 술, 음료, 전병, 환 등으로 제형화되고 있다. 복분자의 착즙 공정에서 발생하는 복분자 박의 일부는 사료로 이용되고 있으나 대부분 폐기되고 있는 실정이다(Chung & Lim, 2012).

안토시아닌 추출방법으로 주로 용매추출법을 이용하는데 메탄올 추출은 에탄올, 아세톤, 열수 추출에 비하여 각각 20, 50, 73%의 수율 증가 효과가 있으나 식품에서는 메탄올의 독성 때문에 일반적으로 에탄올 추출법을 이용한다(Metivier et al., 1980). 그 이외의 추출방법으로써 초임계 추출, 초음파추출, 유산균발효 추출, 마이크로웨이브추출 등이 연구 보고되었다(Ryu & Kwon, 2013). 안토시아닌 추출과정에서 당류, 유기산, 단백질 등이 동시에 추출됨으로서 정제(purification) 과정이 요구되어진다. 정교한 정제 방법으로는 counter-current chromatography(CCC), medium pressure liquid chromatography(MPLC), high performance

*Corresponding author: Myung-Hwan Kim, Department of Food Engineering, Dankook University, Cheonan, 330-714, Korea
Tel: +82-41-550-3563; Fax: +82-41-559-7868
E-mail: kmhl@dankook.ac.kr

Received November 28, 2013; revised January 14, 2014; accepted January 15, 2014

효소처리를 이용한 복분자 추출공정의 최적화 연구

김희선 · 최우영¹ · 김원석¹ · 김명환
단국대학교 식품공학과, ¹서도비엔아이(주)

Study for Optimal Extraction Processing Condition of Anthocyanin from *Bokbunja* by Enzymatic Treatment

Hee-Sun Kim, Wu-Yung Choi¹, Won-Suk Kim¹, and Myung-Hwan Kim*

Department of Food engineering, Dankook University
¹SDBNI Co., LTD

Abstract

This study was performed to determine the total anthocyanin contents, DPPH radical scavenging activity and SOD-like activity of extracted anthocyanins from *Bokbunja* for analyzing optimal conditions of enzyme treatment by response surface methodology(RSM) based on three factors, concentration of Pectinex Ultra SP-L, reaction temperature and reaction time. The optimal enzyme treatment conditions of Pectinex Ultra SP-L concentration, reaction temperature, reaction time and overall desirability by analysis of multiple response surface methodology with the same weighed value of each dependent variable were 0.5 mL/100 L, 20 °C, 2 hr and 0.63, respectively. Total anthocyanin content, DPPH radical scavenging activity and SOD-like activity of above conditions were 5.2 mg/100 g, 61.3% and 30.5%, respectively. While, those of control were 1.1 mg/100 g, 11.8% and 1.1%, respectively.

Key words: *Bokbunja*, extracted anthocyanin, enzyme, optimization, RSM

서 론

복분자(*Rubus coreanus* Miq.)는 장미목(Rosales) 장미과(Rosaceae)의 낙엽관목으로 한반도 남부지방, 중국, 일본 등지에 분포하고 있으며 열매는 7-8월에 성숙되어 붉은색으로 익으며 점차 검붉은색으로 된다(Choung & Lim, 2012). 복분자에 함유되어 있는 안토시아닌(anthocyanin)은 항산화작용을 대체할 수 있는 천연색소로서 주목을 받고 있으며 강한 항산화작용이 혈관계 질환, 암, 당뇨, 신경계 질환 등의 치료에 효과가 있다는 연구결과가 있다(Konczak & Ziang, 2004).

색분자의 malonyl CoA와 흰분자의 p-coumaroyl CoA에 의하여 생합성 되는 안토시아닌은 식물체에서 600 여 종 이상이 발견되었으며 적색, 자색 및 청색을 나타내는 수용성 flavonoid 색소로서 모두 안토시아닌idin(anthocyanidin) 배당체이며 안토시아닌idin은 flavylium(2-phenyl-1-benzopyrylium)의 기

본구조에 수산기 또는 메톡실기가 치환되어있는 구조를 가진다(He & Giusti, 2011; Choi, 2010). 복분자는 씨앗과 과피가 전체 과일의 20-25%를 차지하며 착즙 후 가공 과정을 거쳐서 술, 음료, 전병, 환 등으로 제품화되고 있다(Choung & Lim, 2012).

안토시아닌 추출방법으로 주로 용매추출법을 이용하는 데 메탄올 추출은 에탄올, 아세톤, 열수 추출에 비하여 각각 20, 50, 73%의 수율 증가 효과가 있으나 식품에서는 메탄올의 독성 때문에 일반적으로 에탄올 추출법을 이용한다(Metivier et al., 1980). 그 이외의 추출방법으로써 초임계 추출(Natal et al., 2009), 초음파추출(Ivanovic et al., 2014), 마이크로웨이브추출(Teng et al., 2013) 등이 연구 보고되었다. 효소처리를 이용한 추출공정은 주로 주스제조공정에서 이용되고 있으며 일반적으로 사용되는 효소는 펙틴효소로 세포벽 바탕질(cell wall matrix)을 분해함으로써 침도저하, 향, 추출 수율, 폴리페놀 함량 등을 증가시킨다(Krammer et al., 2005). 해리효소(Macerating enzyme)로서 pectolytic, cellulolytic, hemicellulolytic 효소들을 혼합하여 사용하는 경우도 있는데 이는 과일의 과피, 과육의 성분은 주로 pectin, cellulose, hemicellulose로 구성되어 있으며 과일의 종류에 따라서 그 함량이 다르고 사용되어지는 효소의 종류와 양, 반응온도, pH 등에 영향을 받기 때문이다(Ducasse et al.,

*Corresponding author: Myung-Hwan Kim, Department of Food Engineering, Dankook University, Cheonan, 330-714, Korea
Tel: +82-41-550-3563; Fax: +82-41-559-7868

E-mail: kmh1@dankook.ac.kr

Received October 00, 2013; revised November 00, 2013; accepted November 00, 2013

제 2012 - 07 호

우수논문발표상

소 속 : 단국대학교 식품공학과, ¹서도비엔아이㈜
성 명 : 김희선 · 김원석¹ · 최우영¹ · 김명환

귀하는 2012년도 (사)한국산업식품공학회 추계 정기총회 및 학술대회에서 'Pectinolytic 효소를 이용한 오디의 안토시아닌 수율증진기술'이라는 제 하로 우수한 연구결과를 발표하였기에 본 학회의 이름으로 상장을 드립니다.

2012년 11월 21일

(사)한국산업식품공학회장 이 신



제 14-120306-0017 호

검사성적서

검사자	정	노현균 (인)
	부	정광식 (인)

제 품 명	Antho-Red KR	제 조 일 자	2014년 03월 05일	
검 사 항 목	납 외	접 수 년월일	2014년 03월 06일	
의뢰인	업 체 명	서도비엔아이(주)	성 명	김일환
	소 재 지	경기도 화성시 팔탄면 제암고주로 134-18		
검 사 목 적	참고용	검사완료일	2014년 03월 19일	

귀하가 당사에 시험 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

결과 :

검 사 항 목	규 격 기 준	결 과	항 목 판 정
납(mg/kg)		불검출	-
카드뮴(mg/kg)		불검출	-
비소(mg/kg)		불검출	-
수은(mg/kg)		0.0	-
메틸알루미늄		불검출	-
이산화황(mg/kg)		불검출	-
세균수		0	-
대장균		음성	-
진균수		5	-
효모수		0	-
살모넬라		음성	-

2014년 3월 19일 (발급번호 : 제 R-14-120306-0017)

주식회사 에이앤드에프 대표이사

식품의약품안전처 식품위생검사기관지정 제16

식품의약품안전처 축산물위생검사기관 제9호



1. 상기 판정은 의뢰된 검사항목에 한함.
2. 이 검사결과는 제출된 검체에 한하며 의뢰목적 이외의 상업적인 광고 및 법적인 해결수단으로 사용할 수 없습니다.

(주)에이앤드에프 425-809 경기도 안산시 단원구 광덕4로 250, 5층(고신동, 세티프라자) 대표전화: 031)493-3547 Fax: 031)493-1959

A&F RESEARCH Co. Ltd 식품 · 식품첨가물 분야 · 건강기능식품 분야 · 기구 및 용기 · 포장분야 · 축산물 분야 · 농업 분야 · 프로젝트 사업 · 컨설팅 서비스



검 사 성 적 서

발급번호	제 R-41407-0034 호	접수번호	R-41407-0034
제 품 명	복분자딸기농축분말(Antho-Red-KR)	제조일자 (LOT번호)	2014-07-02
		유통기한	
의 외 인	업소명	시도비엔아이(주)	성 명
	소재지	경기도 화성시 팔탄면 제암고수로 134-18	김일환, 김원석
접수일자	2014-07-03	검사완료일	2014-07-11
검사목적	참고용		

시험항목 및 결과

시험항목	<p>나프로카이드, 노발루론, 누아리움, 다이아지논, 델타메스린, 디니코나올, 디디티, 디메칠린포스, 디메텐아미드, 디메토르포스, 디메토에이트, 디페리페레이트, 디셀로몬, 디에토렌카브, 디엘드린, 디우론, 디지오피르, 디코폴, 디크로보스, 디크로프루아린, 디글로란, 디글로포프-메틸, 디레노코나올, 디켈리아민, 디켈아미드, 디프루벤주론, 푸페누론, 마이클로부타린, 안디프로카이드, 말라치온, 메인포스, 메소일, 메치오카브, 메카밤, 메타락실, 메타민포프, 메타벤즈티아주론, 메탈라클로르, 메토브로루론, 메옥시칼로르, 메옥시페노자이드, 메올카브, 메트리부진, 메트로나올, 메티다지온, 메파니피린, 메페라질, 메프로닐, 몰라에이트, 메노일, 멘디오카브, 멘옥시메이트, 멘티아발리카브아이스프로필, 보스칼리드, 부타클로르, 부프로페진, 부프로부타이드, 부프로프로필레이트, 비에치사, 비리타놀, 비페복스, 비펜스린, 빈클로출린, 사이클로푸스나이드, 스프로디크로클, 스피로메시켈, 시아진, 시메코나올, 시아조과이드, 실라플루오렐, 싸이클사닐, 싸이피메스린, 싸이프로디닐, 싸이프로코나올, 싸이플루스린, 싸이할로포프-부틸, 케메트린, 아닐로포스, 아라클로르, 아미셀브롬, 아세타미프리트, 아옥시스트로빈, 아진포스메킬, 아크리나스린, 알드린, 알디카브, 에디렌포스, 에스프로카브, 에치오렌카브, 예치온, 예타복삼, 예탈플루라린, 예탈렌프록스, 예탈프로포스, 예독사올, 예트리디아올, 예트릴포스, 예노셀란, 예드린, 오푸레이스, 옥사디아존, 옥사일, 옥사지크로메폰, 옥시플루오렐, 이마저린, 이미다크로프리트, 이미벤코나올, 이스켈포스, 이스프로키오란, 이스프로카브, 이프로디온, 이프로발리카브, 이프로벤포스, 이피렌, 인다노란, 인독사카브, 옥사마이드, 치노메치오네이트, 지오피네이트, 카두사포스, 카바린, 카벤다질, 카보페노치온, 카보후란, 캄판, 퀴노클라마인, 퀴토젠, 크레속삼-메칠, 크로메노자이드, 크로치아니딘, 크로켈테진, 클로란트라닐리프올, 클로로벤질레이트, 클로로타리놀, 클로르단, 클로르펜빈포스, 클로르프로파, 클로르플루아주론, 클로르피리포스, 클로르피리포스-메틸, 클로르헥나피르, 티부코나올, 티부트린, 티부틸라진, 티부트스, 테부페노자이드, 테부펜피라드, 테부피린포스, 테트라디온, 테트라코나올, 테프루벤주론, 테플루스린, 톨릴플루아이드, 톨크로포스-메칠, 트라모메스린, 트리싸이클라올, 트리아디메놀, 트리아디메론, 트리아조포스, 트리플루라린, 트리플루루론, 트리플루시드르비드, 트리플루미올, 티아디닐, 티아메복삼, 티아벤다올, 티아조피르, 티아클로프리트, 티오디카브, 티오벤카브, 티부부자이드, 파라치온, 파라티온-메틸, 파클로부트라올, 피메스린, 페나리올, 페나미돈, 페나미포스, 페나자퀸, 페복사닐, 페니트로치온, 페림온, 펜디메타린, 펜발러레이트, 펜부코나올, 펜시루론, 펜치온, 펜코나올, 펜토에이트, 펜투사존, 펜트로파스린, 펜피복시메이트, 포레이트, 포사론, 포스치아제이트, 포스카미돈, 포플로르페누론, 플랫, 푸락치오카브, 푸루살라올, 푸르스트리네이트, 프메트린, 프모베나올, 프로서미돈, 프로치오포스, 프로클로라즈, 프로라핀, 프로레노포스, 프로루사, 프로피코나올, 프탈리드, 플로클코나올, 플루미옥사진, 플루벤디아미드, 플루아크리피릴, 플루오피롤라이드, 플루토라닐, 플루메복수론, 피라조포스, 피라크루스트로빈, 피라크로포스, 피로릴올, 피리다넌, 피리다렌치온, 피리달릴, 피리메타닐, 피리미노박-메틸, 피리미디켈, 피리미카브, 피리미포스-메틸, 피리미포스-에틸, 피리벤옥실, 피리부티카브, 피리프로시켈, 피페로포스, 피프루닐, 할렌프록스, 엑사코나올, 엑사프루루론, 엑시치아옥스, 헵타크로, 후투디옥소닐, 웨노부카브, 웨노지오카브, 1-싸이할로스린</p>	
시험결과	상기 잔류농약 245항목 불검출	
	검출된 항목 (단위 mg/kg)	없음

비고 : 1. 상기 내용은 의뢰인이 제출한 검체에 대한 결과이며, 검체의 명칭은 의뢰인이 제시한 것임.
2. 이 시험성적서는 승인 없이 복사 사용을 금지하며, 용도 이외의 사용을 금함.

2014년 07월 11일

(주)에스푸드가디언스 대표이사

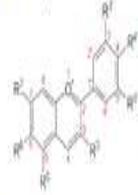


실험 결과보고서 요약

제목	“복분자추출분말”의 유통기한설정실험			
실험구분	자체실험()		의뢰실험(0)	
실험기간	2014 년 07 월 03 일 ~ 2014 년 11 월 02 일			
신청인	업소명	서도비엔아이(주)	대표자	김일환, 김원석
	주소	경기도 화성시 팔탄면 제암고주로 134-18	연락처	031-8047-0200
실험수행 기관	기관명	(주)에스푸드가디언스	대표자	박우현
	주소	서울시 성북구 안암동 5가 고려대학교 CJ식품안전관 413호	연락처	02-953-6568
실험 참여자	시험검사 책임자	강성란	연구원	조용원
	연구원	양지혜	연구원	김혜원
	연구원	이도훈	연구원	최태연
	연구원	성윤미	연구원	김지영
	연구원	문소영	연구원	한희정
실험 결과	요약			
	* 유통기한 실험 결과			
	품질지표	품질한계	근거	
	일반세균수(logCFU/g)	5.0 이하	미생물학적으로 초기부패시점의 기준값	
	대장균군	음성	위생학적 참고지표	
	수분(%)	-	관능, 미생물, 이화학 품질지표변화의 참고지표	
	이물	불검출	식품공전 기타가공품의 기준규격	
	타르색소	불검출	이화학적 참고지표	
	보존료(g/kg)	불검출	이화학적 참고지표	
	관능평가	5.0 이상	9 점 척도법 기호도	
<p>→ 설정한 품질지표 중 결정계수가 가장 높은 관능 0 차반응식으로 25 ℃에서 15.0 개월의 유통기한이 산출되었다. 하지만 유통과정 중의 외부적 요인을 고려하여 실제 유통기한은 단축될 수 있으므로 산출일 (15.0 개월) X 안전계수(0.8) = 12 개월로 추정되고, 실험기간에 따른 최대 유통기한은 12 개월 이내로 하는 것이 바람직하다.</p>				

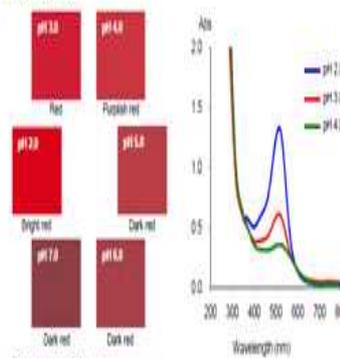
Antho-Red KR

Description



Antho-Red KR is a new natural colorant for food. The major principal constituents are natural red **anthocyanins** extracted from Korean Raspberry (*Rubus coreanus* Mi.) species of raspberries native to Korea, Japan and China.
Antho-Red KR can be approved for its use in foods as "Anthocyanins" (E163) in Europe and "Fruit Juice" (21 CFR 73.250) in U.S.A.

Color variation



Physical characteristic

Specification	Antho-Red KR	Grape skin	Elderberry	Black currant
pH (1% sol)	3.0-4.0	3.0-4.0	3.0-4.0	3.0-4.0
Color value (L*, a*, b*)	+100	+100	+100	+100
Stable pH range (recommend)	Lower than pH 4.0			

Usage & Storage

Before use, dissolve in water and close properly after use.
 Store in light-colored containers in a cool and dry area, away from heat and direct sunlight.

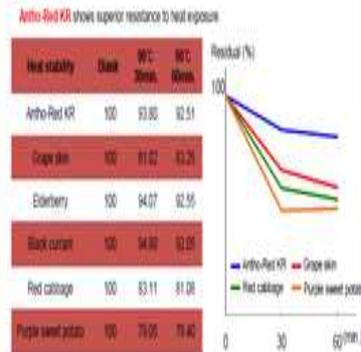
Antho-Red KR

Anthocyanin group of Natural colors



Color space	L*	a*	b*
Antho-Red KR	70.02	35.58	0.74
Grape skin	71.81	42.02	1.07
Elderberry	70.71	40.42	-0.88
Black currant	71.34	43.72	-2.00
Red cabbage	74.04	49.02	-14.54
Purple sweet potato	71.83	42.98	-15.18

Heat stability



Antho-Red KR

Color variation (Anthocyanin group of Natural colors)



천연색소 산업화 지원 협력사업

업 무 협 약 서

안동시, 서도비엔아이㈜, (사)경북청정약용작물클러스터사업단은 천연색소 산업화 지원 협력을 통하여 국민건강과 지역경제발전에 기여하고 특히 천연색소 산업 발전을 위하여 상호협력 관계를 유지발전 시키기 위한 업무제휴로 국내 천연색소 시장 활성화를 위하여 다음과 같이 산업화 지원 협약을 체결하고 시행한다.

제1조(목적) 본 협약은 국내의 6차 산업 환경의 변화에 적극 대응하기 위해 상호간의 유기적인 협력체계를 구축하고 국내 천연색소의 생산·연구개발 및 마케팅지원을 활성화하여 천연색소산업의 활성화 및 상호공동이익의 증진을 도모함에 그 목적이 있다.

제2조(신의성실의 원칙) 제1조의 목적을 달성하기 위하여 상호간 우호적이고 호혜적인 정신에 입각하여 신의와 성실의 자세로 임한다.

제3조(주요사업) 상호간 다음 각항의 업무에 대하여 적극 협력한다.
가. 천연색소 생산 및 연구개발 사업화 지원
나. 천연색소 공동개발 인프라 구축
다. 천연색소 소재 공동화 사업 추진
라. 천연색소 판매 활성화 마케팅 사업 추진
마. 천연색소 학술자료정보 및 출판물의 교환
바. 기타 천연색소 산업과 관련하여 필요하다고 인정되는 분야

제4조(역할과 책임) 천연색소 산업의 활성화 및 산업화를 위해 안동시, 서도비엔아이㈜, (사)경북청정약용작물클러스터사업단은 상호 필요한 제반비용을 지원할 수 있으며 각 기관은 천연색소 개발 및 기술협력에 관한 자료를 우호적으로 교류하여 본 협약서에서 목적하는 바를 상호 충족시키기 위하여 업무를 공유할 수 있도록 책임을 다한다.

제5조(분쟁해결)

본 업무협약서의 해석이나 적용에 관한 분쟁은 당사자간의 상호협력에 의하여 우호적으로 해결하며, 일체 제3자의 개입을 허용하지 않는다.

제6조(보안)

본 업무협약서에 의하여 교환되는 사업계획, 기술내역, 각종 문서 등 사업추진과 관련하여 취득한 정보는 상대방의 서면동의 없이 다른 목적에 사용하거나 외부로 누출하지 않도록 서로의 이익을 위하여 철저히 보안을 유지 한다.

제7조(협약의 해지)

본 협약을 계속 이행할 수 없는 사유가 발생한 것이 객관적으로 인정될 경우 각 기관은 협의 후 협약 해지를 통보할 수 있다.

제8조(유효기간)

본 협약의 유효기간은 체결일로부터 3년간으로 하고, 기간 만료 3개월 전까지 어느 일방의 서면 해지 통보가 없는 한 1년씩 자동적으로 연장되는 것으로 한다.

제9조(기타사항)

본 협약서 제3조(주요사업)의 세부 진행사항 및 본 협약서에 명시되지 않은 사항은 별도 협의 후에 처리한다.

본 협약서의 내용을 성실히 준수하기 위하여 적극 노력하며, 본 협약은 협약일로부터 효력이 발생하고 3부를 작성하여 서명 날인한 후 각 1부씩 보관한다.

2014년 8월 8일

SDBNI 서도비엔아이㈜ 안동시 (사)경북청정약용작물 클러스터사업단

대표이사 김일환·김원석 시장 권영세 단장 정우석

Handwritten signatures of Kim Ilhwan, Kim Wonseok, Kwon Youngse, and Jung Woo-seok.

제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 해당사항 없음.

제 7 장. 연구시설·장비 현황

구분	품 명	규 격	단 위	수 량	단 가(원)	금 액(원)	비 고
구입	Spray Dryer	MD-005R	ea	1	24,500,000	24,500,000	미세캡슐화 및 분무건조
구입	Ribbon Mixer	~100Kg/hr	ea	1	12,000,000	12,000,000	안정화 공정(부형 제 혼합)
구입	Homo Mixer	~100kg/hr	ea	1	9,000,000	9,000,000	
합 계						45,500,000	

제 8 장. 참고문헌

- Andreas D., Holger K. and Peter W. 2000. Separation and purification of Anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48: 338-343.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature*, 28: 1198-1199.
- Cha HS, Youn AR, Park PJ, Choi HR, Kim BS. 2007. Comparison of physiological activities of *Rubus coreanus* Miquel during maturation. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 36(6): 683-688.
- Chang YC, Huang HP, Hsu JD, Yang SF, Wang CJ. 2005. Hibiscus Anthocyanins rich extract-induced apoptotic cell death in human promyelocytic leukemia cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 205: 201-212.
- Chen PN, Chu SC, Chiou HL, Kuo WH, Chiang CL, Hsieh YS. 2006. Mulberry Anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. *Cancer Letters*, 235: 248-259.
- Cho YJ, Chun SS, Kwon HJ, Kim JH, Yoon SJ, Lee KH. 2005. Comparison of physiological activities between hot-water and ethanol extracts of Bokbunja (*Rubus coreanum* F.). *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 34(6): 790-796.
- Choi C, Kim S, Hwang S, Choi B, Ahn H, Lee M, Park S, Kim S. 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*, 163: 1161-1168.
- 최연배. 2004. 식품학총론. 동화기술교역, 파주시, 경기도, 대한민국. pp. 165-166.
- Cooper-Diver GA. 2001. Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of Anthocyanins. *Phytochemistry*, 56: 229-236.
- Francois C., Chi B. D. and Christine M. 1992. Anthocyanin release from grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. *Biotechnology Letters*, 14(11): 1029-1034.
- Fuleki T, Francis JF. 1968. Quantitative methods for Anthocyanins. 1. Extraction and determination of Total Anthocyanin in cranberries. *Journal of Food Science*, 33: 72-77.

- Giacosa A, Filiberti R. 1996. Free radicals, oxidative damage and degenerative disease. *European journal of cancer prevention*, 5: 307-312.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, Aruoma OI. 1987. The deoxyribose method: a simple "test tube" assay for determination of rate constants for reaction of hydroxyl radical. *Analytical Biochemistry*, 165: 215-219.
- Hanzhi W., Mitch C. J., Chi-Hua L., Kevin L. F., Andrew L. T., Yongquan L., Zongwei C. and Michael G. 2015. Peptidomics study of Anthocyanin-rich juice of elderberry. *Talanta*, 131: 640-644.
- He J, Giusti MM. 2011. High-purity isolation of Anthocyanins mixtures from fruits and vegetables - A novel solid-phase extraction method using mixed mode cation-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218: 7914-7922.
- He J. and Giusti M. M. 2011. High-purity isolation of Anthocyanins mixtures from fruits and vegetables - A novel solid-phase extraction method using mixed mode cation-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218: 7914-7922.
- Hong JH, Chung HS, U H, Youn KS, 2002. Storage stability of Anthocyanin pigment isolated from wasted grape peels. *Korean journal of food preservation*, 9(3): 327-311.
- Hong J, Wie M, Leem D, Park KS, Yoon TH, No KM, Jeong JY. 2010. Evaluation of antioxidants activity through the chemical assay. *Journal of biomedical research*, 11(1): 1-8.
- Hosseini FS, Li W, Beta T. 2008. Measurement of Anthocyanins other phytochemicals in purple wheat. *Food Chemistry*, 109: 916-924.
- Ikuo S, Tomoyuki O, Mami M, Yoichi N, Shu F, Kazusato M, Koichi S, Norihiko T. 2002. Direct absorption of acylated Anthocyanin in purple-fleshed sweet potato into rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50: 1672-1676.
- Jackman RL, Yada RY, Tung MA. 1987. Separation and chemical properties of Anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis. A review. *Journal of biochemistry*, 11: 279-308.
- Jeong YJ, Seo JH. 2009. Conditions for pigment extraction from Bokbunja (*Rubus coreanus* Miquel) byproducts. *Korean journal of food preservation*, 16(3): 400-404.

- 정동호. 2005. 암 예방식품. 유한문화사, 서울, 대한민국. pp. 181-182.
- Kim HB, Kim SL. 2003. Identification of C3G(cyanidin-3-glucoside)from mulberry fruits and quantification with different varieties. Korean journal of sericultural science, 45(2): 90-95.
- Kim HY, Yeo SI, Lee JT. 2011. Antioxidant effects of solvent fraction from *Sanguisorbae officinalis* L. with acetone. Journal of applied biological chemistry, 54(2): 89-93.
- Kim HS, Kang EJ, Kim WS, Kim MH. 2014. Study to find the optimal purification processing conditions of Anthocyanin from Bokbunja byproducts. Journal of food engineering, 18(1): 25-31.
- Kuramoto T. 1992. Development and application of food materials from extract such as SOD. Upto data food precess, 27: 22-23.
- 이서래, 신호선. (2006) 최신식품화학. 2판. 신광출판사, 서울, 대한민국. pp. 298-299.
- Lee LS, Rhim JW, Kim SH, Chun BC. 1996. Study on the stability of Anthocyanin pigment extracted from purple sweet potato. Korean journal of food science and technology, 28: 352-359.
- Lee KK, Kim JH, Cho JJ, Choi JD. 1999. Inhibitory effects of 150 plant extracts on elastase activity and their anti-inflammatory effects. International journal of cosmetic science, 21(2): 71-82.
- 맹영선. (2007) 암을 예방하는 식물성 식품. 유한문화사, 서울, 대한민국. pp. 207-212.
- Marklund S and Gudrun M. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutases. European journal of biochemistry, 47: 469-474.
- Michael S., Silke H., Saskia H., Andreas D. and Peter W. 2003. Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of Anthocyanins. Biochemical engineering journal, 14: 179-189.
- Noela B. C., Maria F. G., Raquel R. O., Beatriz C. G. and Jesus S. G. 2015. The measure and control of effects of botryticides on phenolic profile and color quality of red wines. Food control. 50: 942-948.
- Noelia C. M., Monica F. G., Sergio G. A., Esteban G. R. and Isidro H. G. 2009. Red-color

related phenolic composition of garnacha tintorera (*Vitis vinifera* L.) grapes and red wines. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57: 7883–7891.

Park HJ, Jeon TW, Lee SY, Cho YS, Cho SM, Chang KS. 2004. Studies on characteristics and stability of Anthocyanin pigment extracted from Korean purple-fleshed potatoes. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 33: 1544–1551.

Park SN. 1997. Skin aging and antioxidants. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, 23(1): 75–132.

Sim YE, Cho HW, Myung SW. 2008. Determination of acidic pharmaceuticals in aquatic environmental samples by LC/ESI-MS/MS. *ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY*, 21(3): 191–200.

Choi SJ, Lee YS, Kim JK, Chung Ck, Kang IJ, Lim SS. 2011. Antioxidant activity of ripe fruit components of *Rubus coreanus*: extraction using porous polymer resins. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 43(2): 149–155.

Son WR, Choi SW. 2013. Biological activity and analysis of α -glucosidase inhibitor from mulberry (*Morus alba* L.) wine. *Korean Journal of Food Preservation*, 20(6): 877–885.

Stephen J. B. 1998. A Macrocyclic Anthocyanin from red/mauve carnation flowers. *Phytochemistry*, 49(1): 225–228.

Yoon TH, Lee SW. 1979. Stability of Anthocyanins in foods. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 11(1): 63–73.

Yuko F., Akira K. and Masa-atsu Y. 2000. Cyclic malyl Anthocyanins in *Dianthus caryophyllus*. *Phytochemistry*, 55: 937–939.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.