

반응표면분석법을 이용한 감잎 (*Diospyros kaki* L. folium) 에탄올 추출물의 최적화

배두경 · 최희진 · 손준호 · 박무희 · 배종호¹ · 안봉진² · 배만중² · 최 청*

영남대학교 식품가공학과, ¹대구미래대학, ²경산대학교 생명자원공학과

초 록 : 한국산 감잎(*Diospyros kaki* L. folium)을 이용하여 추출시간(1.5~2.5 hrs), 추출온도(70~90°C) 및 에탄올농도(0~40%) 등 세가지 조건을 요인변수로 하고 감잎의 몇가지 기능적 특성을 반응변수로 하여 중심합성계획에 의한 반응표면분석법(Response Surface Methodology)으로 감잎의 추출조건을 최적화하였다. 감잎의 추출조건 최적화 실험에서 요인변수 중 가장 영향력이 낮은 추출시간을 2시간으로 고정하고 반응표면을 실시한 결과, 수용성 고형분 함량과 수용성 탄닌의 함량은 에탄올의 농도가 높고 추출온도가 낮을수록 증가하였고, 탁도는 에탄올의 농도가 낮고 추출온도가 높을수록 높은 투과도를 나타내었다. 전자공여능은 추출온도에는 거의 영향을 받지 않았고, 에탄올의 농도가 높을수록 증가하는 경향을 나타내었다. 그리고 XOase 저해율의 경우 에탄올의 농도와 추출온도가 모두 높아질수록 증가하는 경향이 나타났고, ACE 저해율의 경우에 유의성은 인정되지 않았으나 에탄올의 농도 27%에서 최고값을 나타내었다. 추출물의 가용성 고형분 함량, 탁도, 수용성 탄닌 함량, 전자공여능, XOase 저해율, ACE 저해율 등을 모두 만족시키는 추출조건을 예측하여 보았을 때 추출시간 2시간, 추출온도 78~81°C, 에탄올 농도 33~35%로 나타났다. 회귀식의 신뢰성을 확인하기 위하여 예측된 추출조건의 임의 최적점 (추출시간 2시간, 추출온도 80°C, 에탄올 농도 34%)에서 3회 반복으로 실제 추출실험을 실시해 본 결과, 각 반응변수들의 예측값과 유사하게 나타났다. (2000년 4월 26일 접수, 2000년 7월 20일 수리)

서 론

감잎(*Diospyros kaki* L. folium)은 예로부터 널리 알려진 민간약재로써 비타민 A, C, D 및 엽록소가 풍부해서 고혈압, 호흡기 질환, 심장병 등의 성인병 예방에 좋으며 지혈, 기관지염 치료에도 약효가 있다고 하였으며, 그 외 비타민 B₁, 판토텐산, 엽산의 함유량도 녹차엽보다 많아 감잎차의 경우 성인에게 권장할만한 차라고 한다. 100 g중에 함유된 비타민 C의 함량을 보면 어린 감잎에는 500~1,000 mg이나 들어있고 성엽에도 200 mg이나 함유되어 있어 다른 과실류나 녹차에 비해 5~10배 정도의 많은 함량이 들어있다. 감잎의 기능성에 관한 연구를 살펴보면 감잎의 sister chromatid exchange(SCE) 방법에 따른 항돌연변이 효과,¹⁾ 비타민 C와 superoxide dismutase 유사활성의 변화,²⁾ 돌연변이 및 염색체이상 유발 억제 효과,^{3,5)} 생리활성 물질의 효소저해효과,^{6,8)} 감잎과 감잎차의 중금속 제거효과,^{9,11)} 항산화효과 및 항암효과 등¹²⁻¹⁵⁾ 감잎의 생리활성 기능에 대한 많은 보고가 있다.

따라서 감잎추출물의 활용가능성을 고려할 때 추출시간, 추출온도, 에탄올의 함량 등의 추출조건은 추출물의 품질을 결정하는데 중요한 요소가 될 것으로 판단되므로 이에 대한 최적화 연구가 요구되며, 특히 최근에 와서는 실험 설계와 computer program을 이용한 반응표면 분석방법의 응용 연구가 활발히 진행되고 있다.¹⁶⁻²²⁾

이에 본 연구에서는 반응표면분석법(Response Surface Methodology)을 이용하여 감잎추출물의 품질을 최대한 높이고자 최적 추출조건을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 감잎은 경북 창녕군에서 재배하는 감나무로서 창녕부유 1품종을 6월 초순에 채집하여 이물질을 제거하고 세척한 후 음지에서 건조시켜 polyethylene film에 넣어 냉동고에 보관하면서 본 실험에 사용하였다.

추출조건 최적화를 위한 실험계획

추출 공정은 추출시간, 추출온도, 에탄올농도 등의 여러 변수에 따라 추출효율이 좌우될 수 있으므로, 본 실험에서는 추출물의 기능적 특성을 최대한 하는 최적조건을 설정하기 위해 반응 표면 분석(RSM)²³⁾ program을 활용하였다. 본 computer program은 중심합성계획에 의해 설계된 실험 조건에 따라 모델 실험을 실시하고 여기에서 얻어지는 결과, 즉 추출물의 기능적 특성을 수치화하여 statistical analysis system(SAS) program에 대입함으로써 통계적으로 유의성이 있는 최적의 결과를 예측하였다. 추출조건의 실험변수로는 추출시간(X₁), 추출온도(X₂), 에탄올 농도(X₃)이었으며, 1차 예비실험을 통한 각 조건들은 -1, 0, 1로서 3수준으로 부호화하여 실험값을 Table 1에 나타내었다. 또 혼합조건의 품질특성에 관련된 반응(종속) 변수(Y_n)로써는 추출수율(Y₁), 탁도(Y₂), 수용성 탄닌함량(Y₃), 전자공여능(Y₄), xanthine oxidase(Y₅) 및 angiotensin

찾는말 : 감잎, 최적화, RSM, 수용성 탄닌, 탁도, 전자공여능, XOase, ACE

*연락처 : Tel : 82-53-810-2952; Fax : 82-53-815-1891

E-mail : cchoi@yuncc.yeungnam.ac.kr

converting enzyme 저해율(Y_6)이었으며, 이들은 3회 반복 측정하여 그 평균값을 회귀분석에 사용하였다. 이때 세 개의 독립변수와 종속변수에 대한 2차 회귀모형식은 식(1)과 같다.

$$Y_n = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 \quad (1)$$

여기서 Y 는 종속변수, X_1, X_2, X_3 는 독립(조건)변수, β_0 는 절편, β_n 는 회귀계수이다.

가용성 성분의 수율 측정

각 조건에서 얻어진 추출물의 가용성 성분 수율은 추출액 일정량을 취하여 105°C 건조법으로 수분을 측정하여 고형분 함량을 계산하고 추출액 조제에 사용된 원료량(건물량)에 대한 백분율로서 고형분 수율을 나타내었다.

탁도 (turbidity) 측정

탁도는 각 조건에서 얻어진 추출물을 일정량씩 취하여 650 nm에서 투과도를 측정하여 증류수를 100% 기준으로 하여 비교치로 나타내었다.

수용성 탄닌함량 측정

수용성 탄닌의 정량은 AOAC에 준하여 정량하였다. 즉, 100배 희석한 시료용액 1 ml에 Folin-Denis시약 5 ml를 가하고 포화 Na_2CO_3 용액 10 ml를 가하여 혼합한 후 증류수로 최종 volume을 100 ml로 맞춘 후 30분간 실온에서 방치하고 760 nm에서 흡광도를 측정한 것을 미리 작성한 표준곡선의 흡광도 값과 비교하여 함량을 산출하였다.

전자공여능 (DPPH) 측정

각 추출물의 전자공여작용은 Blois²⁴⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 시료 1 ml에 $2 \times 10^{-4} M$ α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl(DPPH) 1.0 ml를 넣고 vortex한 후 30분 동안 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{전자 공여능} = \frac{(100 - \text{시료첨가구의 흡광도})}{\text{무첨가구의 흡광도}} \times 100$$

Xanthine oxidase(XOase) 저해율 측정

XOase 저해활성 측정은 Stürpe와 Corte²⁵⁾의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 반응구는 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)에 xanthine oxidase 2 mM을 녹인 기질액 1 ml에 효소액 0.1 ml와 탄닌용액 0.1 ml를 가하고 대조구에는 탄닌 대신 증류수를 0.1 ml 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시키고 20% trichloroacetic acid 1 ml를 가하여 반응을 종료시키고 원심분리하여 단백질을 제거한 후 반응액 중에 생성된 uric acid를 흡광도 292 nm에서 측정하여 다음 식으로 저해율(%)을 구하였다.

$$\text{저해율}(\%) = 1 - \left(\frac{\text{반응구의 uric acid 생성량}}{\text{대조구의 uric acid 생성량}} \right) \times 100$$

Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해율 측정

ACE저해 효과 측정은 Cushman 등²⁶⁾의 방법을 변형하여 행하였다. 즉, 반응구는 0.3 M NaCl을 함유하는 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 8.3)에 기질(Hippury-L-histidyl-L-leucine; HHL) 2.5 mM을 녹인 액 0.15 ml, ACE 0.1 ml와 각 추출시료 용액 0.1 ml를 혼합하였으며, 대조구는 추출시료 대신 증류수 0.1 ml를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시키고 1 N HCl 0.35 ml를 첨가하여 반응을 중지시킨 뒤 3 ml의 ethyl-acetate(EtOAc)를 첨가하였다. EtOAc층으로부터 용매를 증류시킨 잔류물에 1

Table 1. Experimental data for soluble solid, turbidity, tannin contents, DPPH¹⁾, XOase inhibition and ACE inhibition of extracts prepared with persimmon leaf for optimization of extraction condition by RSM program

Treatment number	Ext. time (hr)	Ext. temp. (°C)	Alcohol conc. (%)	Soluble solid (%)	Turbidity ¹⁾ (%)	Soluble Tannin (%)	DPPH ¹⁾ (%)	XOase inhibition (%)	ACE inhibition (%)
1	1.5(-1)	70(-1)	0(-1)	14.8	20.9	2.59	50.3	13.09	26.7
2	2.5(1)	70(-1)	0(-1)	14.7	17.4	1.41	32.9	13.42	38.3
3	1.5(-1)	90(1)	0(-1)	14.9	21.4	1.93	38.1	9.31	37.1
4	2.5(1)	90(1)	0(-1)	15.3	19.2	1.88	48.0	10.47	40.1
5	1.5(-1)	70(-1)	40(1)	17.8	8.6	4.78	79.8	44.52	43.5
6	2.5(1)	70(-1)	40(1)	18.0	8.3	3.82	85.8	55.48	51.6
7	1.5(-1)	90(1)	40(1)	16.4	7.5	4.11	89.0	59.41	59.7
8	2.5(1)	90(1)	40(1)	17.0	7.1	4.97	88.7	64.11	54.2
9	1.5(-1)	80(0)	20(0)	17.4	10.2	5.16	84.4	67.59	72.4
10	2.5(1)	80(0)	20(0)	17.9	10.2	5.18	89.2	61.37	51.4
11	2.0(0)	70(-1)	20(0)	16.5	15.4	4.54	84.0	61.86	56.1
12	2.0(0)	90(1)	20(0)	15.3	17.4	3.45	86.1	60.72	45.0
13	2.0(0)	80(0)	0(-1)	16.1	20.1	2.39	66.9	23.57	30.7
14	2.0(0)	80(0)	40(1)	17.6	6.5	5.10	90.1	77.58	64.7
15	2.0(0)	80(0)	20(0)	17.7	11.7	4.54	88.4	68.92	62.9
16	2.0(0)	80(0)	20(0)	18.1	11.6	3.52	89.5	66.25	68.6

¹⁾Electron donating ability to α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl at 528 nm.

²⁾Absorbance at 650 nm.

Table 2. Taylor second equations calculated by RSM program for various response

Response	Taylor second equation	R ²	Significance
Soluble solid(%)	$Y_1 = -63.542414 - 7.618793X_1 + 2.163371X_2 + 0.239914X_3 + 0.022500X_1X_2 + 0.006250X_1X_3 - 0.001938X_2X_3 + 1.503448X_1^2 - 0.013741X_2^2 - 0.001060X_3^2$	0.9462	0.0036
Turbidity(%)	$Y_2 = 210.784138 + 36.807931X_1 - 5.728707X_2 - 0.249138X_3 + 0.030000X_1X_2 + 0.062500X_1X_3 - 0.002875X_2X_3 - 10.434483X_1^2 + 0.035914X_2^2 + 0.001228X_3^2$	0.9855	0.0001
Soluble tannin(mg%)	$Y_3 = -22.619345 - 13.669328X_1 + 0.993642X_2 + 0.098495X_3 + 0.073750X_1X_2 + 0.014125X_1X_3 + 0.000419X_2X_3 + 1.806207X_1^2 - 0.007234X_2^2 - 0.002434X_3^2$	0.9229	0.0100
Electron donating ability(%)	$Y_4 = -418.696552 + 45.148276X_1 + 10.790828X_2 + 1.587552X_3 + 0.525000X_1X_2 + 0.165000X_1X_3 + 0.005750X_2X_3 - 22.462069X_1^2 - 0.073655X_2^2 - 0.034789X_3^2$	0.9452	0.0038
XOase inhibition(%)	$Y_5 = -673.992724 + 108.499362X_1 + 15.053461X_2 + 1.298674X_3 - 0.135750X_1X_2 + 0.177125X_1X_3 + 0.018906X_2X_3 - 24.748966X_1^2 - 0.093772X_2^2 - 0.050231X_3^2$	0.9867	0.0001
ACE inhibition(%)	$Y_6 = -592.448966 + 7.274483X_1 + 15.449948X_2 + 1.647966X_3 - 0.555000X_1X_2 - 0.150000X_1X_3 + 0.004125X_2X_3 + 9.841379X_1^2 - 0.088897X_2^2 - 0.029349X_3^2$	0.7827	0.1493

X₁: Extract time(hr), X₂: Extract temperature(°C), X₃: Ethanol concentration.

mL의 증류수를 첨가하여 추출된 hippuric acid를 흡광도 228 nm에서 측정된 후 다음 식에 따라 저해율을 구하였다.

$$\text{저해율}(\%) = 1 - \left(\frac{\text{반응구의 hippuric acid 생성량}}{\text{대조구의 hippuric acid 생성량}} \right) \times 100$$

결과 및 고찰

추출물의 특성에 대한 추출조건의 영향

감잎에 대한 최적 추출조건을 알아보기 위해 각각의 조건으로 추출한 추출물의 특성을 측정한 결과는 Table 1에 나타내었다. 이상의 실험결과를 이용하여 추출시간, 추출온도, 에탄올농도 등 세가지 조건(X₁~X₃)의 요인변수와 추출물의 특성인 가용성 고형분 함량, 탁도, 수용성 탄닌 함량, 전자공여능, XOase 저해, ACE 저해의 반응변수(Y₁~Y₆)에 대한 SAS program의 Taylor 2차 방정식을 나타낸 결과는 Table 2와 같다.

이같은 반응변수들의 2차 방정식과 반응표면 분석을 실행 검토한 결과 전자공여능과 XOase 저해(%)에서는 정상점이 최대값을 나타냈으나, 이를 제외한 다른 반응변수는 안장점을 나타내어 최대값과 최소값을 알 수가 없었다. 그러므로 능선분석을 실행한 결과 감잎은 추출시간(X₁)이 거의 일정하게 2시간 내외에서 반응변수들이 최대값을 나타내었다. 따라서 3차원 반응표면에서는 X₁ 즉, 추출시간을 고정시켜 최적조건을 구하기 위한 반응표면을 작성하였다.

가용성 고형분 함량의 변화

추출조건에 따른 추출물의 가용성 고형분 함량에 대한 contour map과 3차원 반응표면은 Fig. 1과 같다. 가용성 고형분 함량에 대한 추출물의 회귀식에서 R²는 0.9462이고, 유의성은 0.0036으로서 1%이내의 유의수준에서 인정되었다(Table 2). 이때 예측된 정상점은 안장점이므로 능선분석을 실시하여 본 결과, 가용성 고형분의 최대값은 18.42%로 예측이 되었다. 이때 추출조건별 가용성 고형분 함량 변화에 대한 contour map과 반응표면을 보면 에탄올의 농도가 높을수록, 추출온도가 낮을수록 가용성 고형분의 함량이 증가하는 경향이 나타났으며,

에탄올 농도 20% 이상, 추출온도 80°C이하에서 높은 함량을 나타낸 것으로 나타났다. Sung²⁷⁾과 Oh 등²⁸⁾은 인삼이나 구기자, 당귀, 오미자, 오갈피 등과 같은 생약재는 에탄올 농도가 높아질수록 추출액의 고형분 수율이 낮아졌다고 하여 감잎의 경우와는 다소 상이하게 나타났다.

탁도의 변화

추출조건에 따른 추출물의 탁도 변화를 650 nm의 파장에서 투과도로 측정한 결과에 대한 contour map과 3차원 반응표면은 Fig. 2와 같다. 탁도에 대한 추출물의 회귀식의 R²는 0.9855이고, 유의성은 0.0001으로서 1%이내의 유의수준에서 인

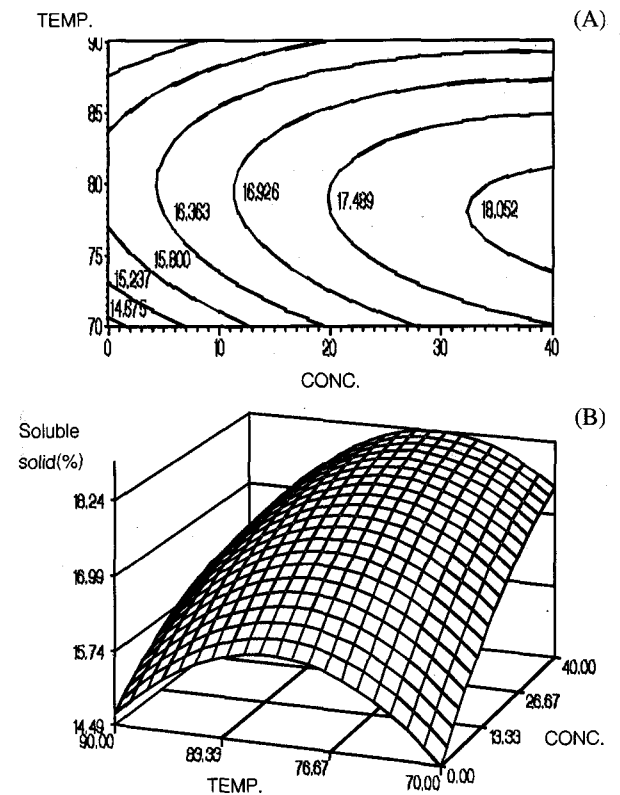


Fig. 1. Contour map(A) and response surface(B) for the effects of ethanol concentration and temperature on soluble solid contents of persimmon leaf extracts.

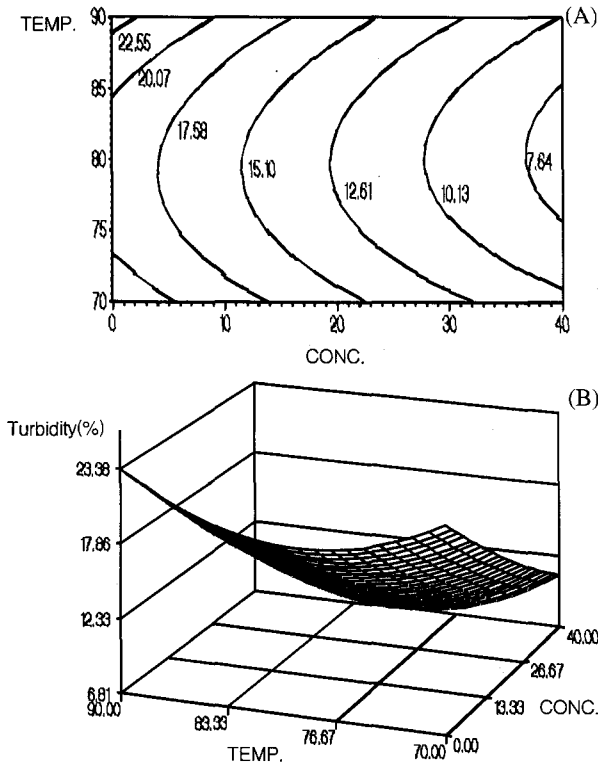


Fig. 2. Contour map(A) and response surface(B) for the effects of ethanol concentration and temperature on turbidity of persimmon leaf extracts.

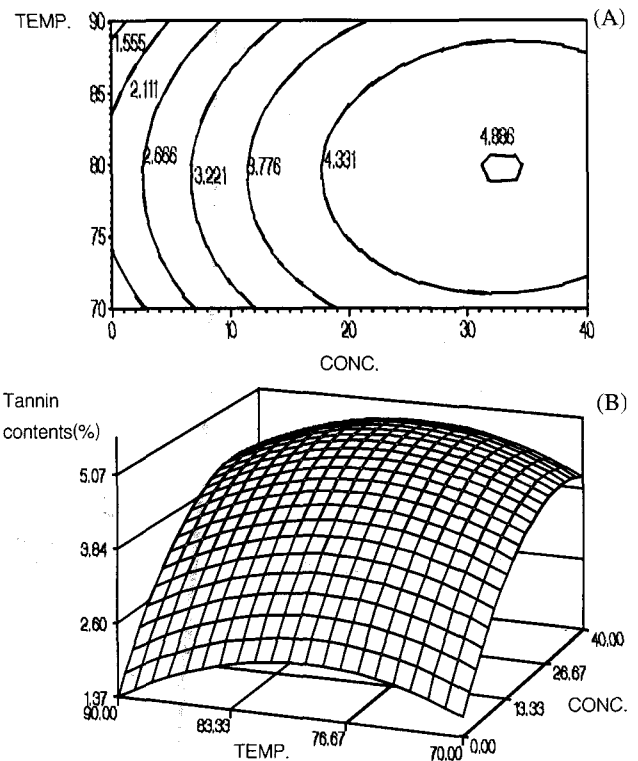


Fig. 3. Contour map(A) and response surface(B) for the effects of ethanol concentration and temperature on soluble tannin contents of persimmon leaf extracts.

정되었다(Table 2). 이때 예측된 정상점은 안장점이므로 능선분석을 실시하여 본 결과, 투과도의 최대값은 19.37%로 예측이 되었다. 이때 추출조건은 에탄올의 농도 2.89%, 추출온도 85.11°C이었다. 추출조건별 탁도 변화에 대한 contour map과 반응표면을 보면 에탄올의 농도가 감소할수록, 추출온도가 높을수록 투과도가 증가하는 경향이 나타났으며, 에탄올 농도 20% 이하, 추출온도 80°C이상에서 높은 투과도를 나타낸 것으로 나타났다.

수용성 탄닌 함량의 변화

추출조건에 따른 추출물의 수용성 탄닌 함량에 대한 contour map과 3차원 반응표면은 Fig. 3과 같다. 수용성 탄닌 함량에 대한 회귀식의 R²는 Table 2에 나타난 바와 같이 0.9229이고, 유의성은 0.0100으로서 1%이내의 유의수준에서 인정되었다. 이때 예측된 정상점은 안장점이므로 능선분석을 실시하여 본 결과, 수용성 탄닌의 최대값은 5.31%로 예측이 되었다. 이때 추출조건은 에탄올의 농도 27.44%, 추출온도 78.45°C이었다.

Contour map과 반응표면을 보면 에탄올의 농도가 높을수록, 추출온도가 낮을수록 수용성 탄닌의 함량이 증가하는 경향이 나타났으며, 에탄올의 농도 30~35%, 추출온도 78~80°C 범위에서 가장 높은 함량을 얻을 수 있을 것으로 예측되었다.

전자공여능의 변화

DPPH(α, α' -diphenyl- β -picryl-hydrazyl)를 이용한 감잎 추출물의 전자공여능에 대한 contour map과 3차원 반응표면은 Fig. 4

와 같다. 전자공여작용의 회귀식의 R²는 0.9452이고, 유의성은 0.0038으로서 1%이내의 유의수준에서 인정되었다(Table 2). 예측된 정상점은 최대점이고 이때 최대값은 98.17%로 예측되었으며, 이 예측치를 추출할 수 있는 조건(요인변수)들은 추출시간 2.18(hr), 추출온도 83.40°C, 에탄올 농도 37.36%이었다.

전자공여작용에 대한 contour map과 반응표면을 보면 에탄올의 농도가 높을수록 증가하는 경향을 보였다. 이때 전자공여작용은 에탄올 농도가 25~40%, 추출온도 76~88°C에서 높게 나타났다. Park¹⁷⁾은 감국 추출물의 전자공여능은 에탄올 농도에 거의 영향을 받지 않았고, 소국 추출물의 경우에는 에탄올 농도가 낮을수록 높아졌다고 하여 감잎의 경우에는 다소 상이한 경향을 보였다.

XOase 저해율의 변화

추출조건에 따른 추출물의 XOase의 저해율 변화는 Table 7에 나타내었고, 결과에 대한 contour map과 3차원 반응표면은 Fig. 5와 같다. XOase에 대한 회귀식의 R²는 0.9867이고, 유의성은 0.0001으로서 1%이내의 유의수준에서 인정되었다(Table 2). 이때 예측된 정상점은 최대점이고 이때 최대값은 75.39%이었고, 이때의 요인변수들의 값은 에탄올 농도 35.71%, 추출온도 83.84°C이었다. 추출조건별 탁도 변화에 대한 contour map과 반응표면을 보면 에탄올의 농도가 증가할수록, 추출온도가 높을수록 XOase 저해율은 증가하는 경향이 나타났으며, 에탄올 농도 20% 이상, 추출온도 80°C이상에서 높은 저해효과를 나타낸 것으로 나타났다.

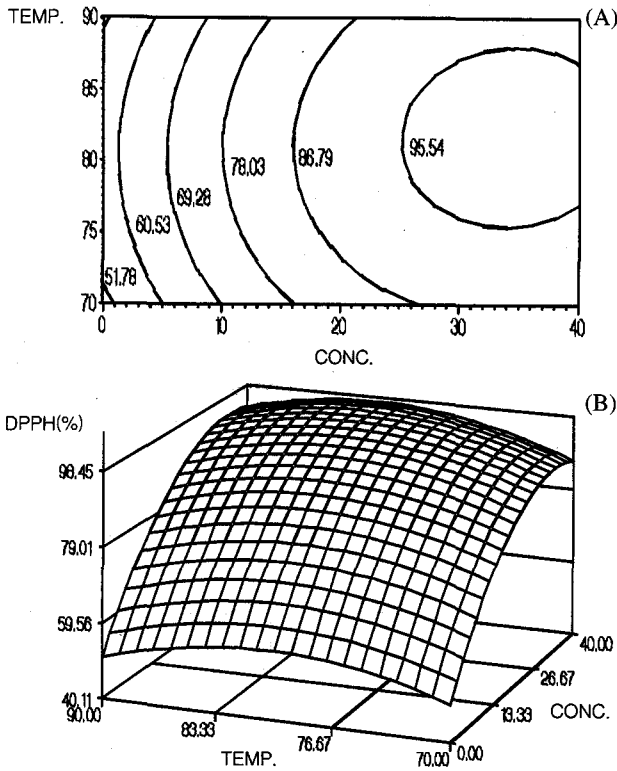


Fig. 4. Contour map(A) and response surface(B) for the effects of ethanol concentration and temperature on electron donation ability of persimmon leaf extracts.

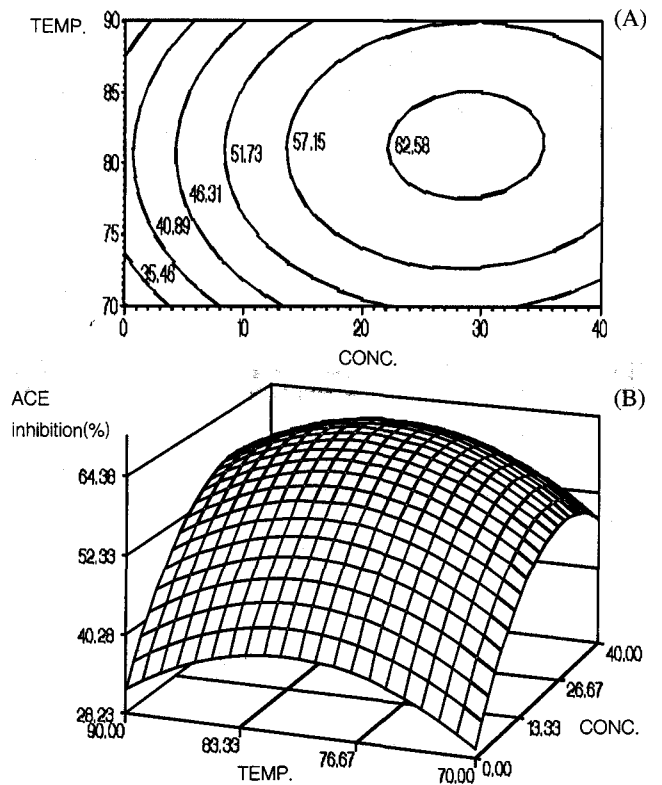


Fig. 6. Contour map(A) and response surface(B) for the effects of ethanol concentration and temperature on angiotensin converting enzyme inhibition rate of persimmon leaf extracts.

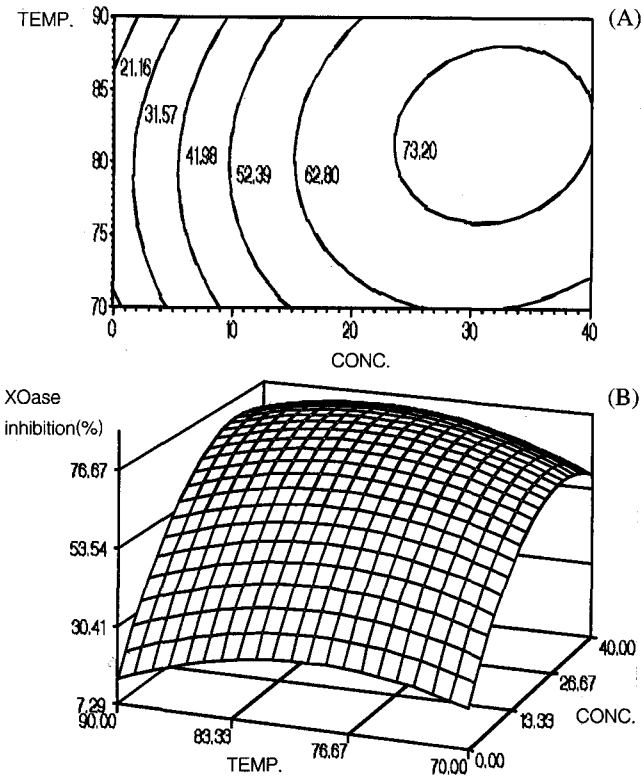


Fig. 5. Contour map(A) and response surface(B) for the effects of ethanol concentration and temperature on xanthine oxidase inhibition rate of persimmon leaf extracts.

ACE 저해율의 변화

추출조건에 따른 추출물의 ACE 저해율에 대한 변화는 Table 1에 나타내었고, 이들의 contour map과 3차원 반응표면은 Fig. 6과 같다. ACE 저해율에 대한 회귀식의 R²는 Table 2에서와 같이 0.7827이고, 유의성은 0.1493으로서 유의수준이 인정되지 않았다.

ACE 저해율의 contour map과 반응표면(Fig. 6)을 보면 ACE 저해율은 온도에는 거의 영향을 받지 않았고 에탄올의 농도에는 영향을 받았는데 용매농도 27%에서 최고치를 나타내었다.

추출조건의 최적화

감잎 음료 제조를 위한 추출공정을 최적화하기 위하여 조건 별 추출물의 가용성 고형분 함량, 추출물의 탁도, 수용성 탄닌의 함량, 전자공여작용, XOase 저해율 그리고 ACE 저해율에 대한 contour map을 superimposing하여 최적 추출조건 범위를 예측하였다. 추출에서 가장 영향이 작은 것으로 나타난 추출시간을 실험계획의 범위 즉, 2시간으로 고정하여 반응변수들의 추출특성을 반응표면 분석하였다. Fig. 7의 빗금친 부분에서 나타난 바와 같이 모든 반응변수를 공통으로 만족하는 전체적인 최적 추출조건 범위는 Table 3에서와 같이 추출온도 78~81°C, 에탄올 농도 33~35%로 나타났다. 따라서 감잎 음료 제조시 최적 추출조건으로 추출시간 2시간, 추출온도 80°C, 에탄올 농도 34%로 감나무 잎을 추출하는 것으로 결정하였다.

Table 3. The optimum extraction conditions for response variables yielding optimum responses by superimposing of contour maps

Extraction conditions	Range optimum conditions
Extraction time(hr)	2
Extraction temperature(°C)	78~81
Ethanol concentration(%)	33~35

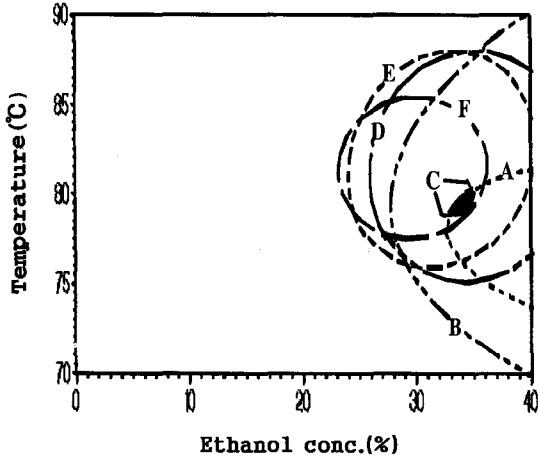


Fig. 7. Superimposed contour map for optimization of response variables in persimmon leaf extracts. (A) Soluble solid(%) (B) Turbidity(%) (C) Tannin contents(%) (D) Electron donation ability(%) (E) XOase inhibition(%) (F) ACE inhibition(%)

Table 4. Predicted and experimental values of response for 34% ethanol extracts from persimmon leaf at a given condition within the range of optimum-extraction conditions

Response variables	Predicted values	Experimental value
Soluble solid(%)	17.99~18.07	18.11
Turbidity(%)	8.14~8.84	8.35
Tannin contents(mg%)	4.87~4.88	4.81
Electron donation ability(%)	97.41~98.41	97.88
XOase inhibition(%)	75.00~76.03	74.09
ACE inhibition(%)	62.27~62.67	60.01

최적화 추출물의 품질특성 확인

반응표면을 겹쳐 그려서 얻은 최적 추출조건 범위에서 각각 나타난 여러반응변수 즉, 감잎 추출물의 품질인자들의 예측치를 실험치로써 확인하기 위하여 추출시간 2(hr), 추출온도 80°C 그리고 에탄올 농도 34%로 고정된 후 3번의 반복실험을 수행하여 예측치와 실제 실험치와의 추출특성을 확인하였으며, 그 결과를 Table 4에 나타내었다. 최적 추출조건 범위내에서 추출물의 가용성 고형분 함량에 대한 실측치는 반응표면분석으로부터 얻어진 예측치의 범위보다 약간 높았다. 탁도 및 전자공여능에 대한 실측치는 예측치의 범위에 속하였으나, 수용성 탄닌 함량, XOase 저해 및 ACE 저해율에 대한 실측치는 예측치보다 다소 낮은 값을 나타내었다.

감사의 글

이 연구는 1996년도 농림부 농특과제(No. 388, 1996)에 의

하여 연구비를 연구비를 지원받아 수행하였으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Song, H. S., Lee, H. K., Jang, H. D. Kim, J. I., Park, O. J., Lee, M. S. and Kang, M. H. (1996) Antimutagenic effects of persimmon leaf tea extracts in sister chromatid exchange(SCE) assay system(in Korean). *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **25**, 232-239.
2. Park, Y. J., Kang, M. H., Kim, J. I., Park, O. J., Lee, M. S. and Jang, H. D. (1995) Changes of vitamin C and superoxide dismutase(SOD)-like activity of persimmon leaf tea by processing method and extraction condition (in Korean). *Kor. J. Food Sci. Technol.* **27**, 281-285.
3. Moon, S. H. (1993) Antimutagenic and Anticarcinogenic Effect of Persimmon Leaves, M.D. Thesis, Pusan National Univ., Pusan, Korea.
4. Moon, S. H., Kim, J. O. and Rhee, S. H. (1993) Antimutagenic effects and compounds identified from hexane fraction of persimmon leaves. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **22**, 307-312.
5. Moon, S. H., Kim, J. O. and Park, K. Y. (1996) Antimutagenic compounds identified from chloroform fraction of persimmon leaves. *J. Food Sci. Nutr.* **1**, 203-207.
6. An, B. J. (1991) Structural Studying of Glucosyltransferase and Tyrosinase Inhibitors Isolated from *Diospyros kaki* folium, *Artocarpus heterophyllus* folium, M.D. Thesis, Yeungnam Univ., Kyungsan, Korea.
7. Sung, C. K. and Cho, S. H. (1992) Studies on the purification and characteristics of tyrosinase from *Diospyros kaki* Thumb(persimmon). *Kor. Biochem. J.* **25**, 79-87.
8. Park, M. H. (1998) Effect of Polyphenol Compounds from Persimmon Leaves (*Diospyros kaki* folium) on Immunofunctional and Biological Activity, Ph. D. Thesis, Yeungnam Univ., Kyungsan, Korea.
9. Kwon, E. Y., Kim, M. K. and Jeon, M. H. (1993) Adsorptivities of Cu(II) and Pb(II) ions in water by persimmon leaves. *Bulletin of Environmental Sciences, Research Institute for Environmental Sciences, Hanyang Univ. Seoul, Korea*, **14**, 3-8.
10. Lim, S. I. (1995) Investigation of Korean Green Tea, Oolong Tea, Persimmon Leaves Tea and Barley Tea on the Removal of Heavy Metal Ions. M.S. Thesis, Yeungnam Univ., Kyungsan, Korea.
11. Jo, G. Y. (1999) The effect of Removing a Heavy Metal and Antioxidative Enzyme Activity of Polyphenol Compound Extracted from Persimmon Leaves(*Diospyros kaki* folium). M.S. Thesis, Yeungnam Univ., Kyungsan, Korea.
12. Choi, S. W., Kang, W. W., Chung, S. K. and Cheon, S. H. (1993) Antioxidative activity of flavonoids in persimmon leaves. *Foods and Biotech.* **5**(2), 119-123.
13. Shin, D. H. (1997) Separation of antioxidant compounds from persimmon leaves. *J. Kor. Oil Chem. Soc.* **14**(1), 103-107.
14. Moon, S. H., Kim, K. H. and Park, K. Y. (1996) Antitumor effect of persimmon laves in vivo using Sarcoma-180 cels. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **25**(5), 865-870.
15. Kang, W. W., Kim, G. Y., Park, P. S., Park, M. R. and Choi,

- S. W. (1996) Antioxidative properties of persimmon leaves. *Foods and Biotech.* 5(1), 48-53.
16. Ryu, K. C. (1995) Optimization of the Roasting Conditions for High-quality Polygonatum Odoratum Tea, M.D. Thesis, Kyungpook National Univ., Taegu, Korea.
17. Park, N. Y. (1995) Volatile Flavors of Wild and Cultivated Chrysanthemums and Optimization of Ethanol Extraction, M.D. Thesis, Kyungpook National Univ., Taegu, Korea.
18. Kang, K. C., Park, J. H., Baek, S. B., Jhin, H. S. and Rhee, K. S. (1992) Optimization of beverage preparation from Schizandra chinensis baillon by response surface methodology. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 24(1), 74-81.
19. Choi, U. K., Ji, W. D., Chung, H. C., Choi, D. W. and Chung, Y. G. (1997) Optimum condition for pigment production and antioxidative activity of the products by Bacillus subtilis DC-2 with response surface methodology. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 26(4), 620-624.
20. Kim, K. E. (1998) Prediction and Optimization of Extraction Conditions for Ginseng Components Using Response Surface Methodology in the Microwave-assisted Extraction under Atmospheric Pressure Conditions. M.D. Thesis, Kyungpook National Univ., Taegu, Korea.
21. Jeong, Y. J. (1996) Optimization for the Fermentation of Persimmon Vinegar Using Response Surface Methodology. Ph. D. Thesis, Yeungnam Univ., Kyungsan, Korea.
22. Kim, M. K. (1999) Studies on the Synthetic Additive and Packaging Materials for Enhancement of Shelf-life and Quality of Kimchi, Ph. D. Thesis, Catholic Univ. of Taegu-Hyosung, Kyungsan, Korea.
23. Myers, R. H. (1971) In 'Response Surface Methodology,' Allyn and Bacon Inc. Boston.
24. Blois, M. S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26, 1198.
25. Stirpe, F. and Corte, E. D. (1969) The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 244, 3855.
26. Cushman, D. W. and Ondetti, M. A. (1980) Inhibitors of angiotensin converting enzyme for treatment of hypertension. *Biochem. Pharmacology* 29, 1871-1877.
27. Sung, H. S. (1983) Studies on the Effect of Extracting Conditions on the Physicochemic at Properties of Korean Ginseng Extract. Ph.D. Thesis, Hanyang Univ., Seoul, Korea.
28. Oh, S. L., Kim, S. S., Min, B. Y. and Chung, D. H. (1990) Composition of free sugars, free amino acids, non-volatile organic acids and tannins in the extracts of *L. chinensis M.*, *A. acutiloba K.*, *S. chinensis B.* and *A. sessiliflorum S.*, *Kor. J. Food Sci. Technol.* 22(1), 76-81.

Optimization for the Process of Ethanol Extracts of Persimmon Leaf(*Diospyros kaki L. folium*) using Response Surface Methodology

Du-Kyung Bae, Hee-Jin Choi, Jun-Ho Son, Mu-Hee Park, Jong-Ho Bae¹, Bong-Jeon An², Man-Jong Bae² and Cheong Choi*(*Department of Food Science & Technology, Yeungnam University, Kyungsan, 712-749, ¹Department of Confectionery Decoration, Taegu Future College, Kyungsan, 712-716, ²Department of Faculty of Life Resource & Engineering, Kyungsan University, Kyungsan, 712-240, Korea*)

Abstract: The efforts were made to optimize ethanol extraction from persimmon leaf with the time of extraction(1.5~2.5 hrs), the temperature of extraction(70~90°C), and the concentration of ethanol(0~40%) as three primary variables together with several functional characteristics of persimmon leaf as reaction variables. The conditions of extraction was best fitted by using response surface methodology through the center synthesis plan, and the optimal conditions of extraction were established. The contents of soluble solid and soluble tannin went up as the concentration of ethanol went up and the temperature of extraction went down, and the turbidity went down as the concentration of ethanol went down. Electron donation ability was hardly affected by the extraction temperature and had the tendency to go up as the concentration of ethanol went up. The inhibitory activity of xanthine oxidase(XOase) had the tendency to go up as both the concentration of ethanol and the temperature of extraction went up. The inhibitory activity of angiotensin converting enzyme(ACE), the significance of which still was not recognized, showed the maximum when the concentration of ethanol was 27%. In result, the optimal conditions of extraction was the extraction time of two hours, the extraction temperature of 75~81°C, and the ethanol concentration of 33~35%.

Key words : Persimmon leaf, RSM, Electron donation ability, soluble solid, soluble tannin, XOase, ACE

*Corresponding author