

도토리 Polyphenol 및 Gallic Acid 성분의 열수 추출조건 최적화

김성호 · 이진만^{1†}

경북과학대학 바이오 식품과, ¹호서대학교 식품생물공학과

Optimization of Hot-Water Extraction Conditions for Preparation of Polyphenol and Gallic Acid from Acorn

Seong-Ho Kim and Jin-Man Lee^{1†}

Department of Bio-Food Science, Kyongbuk College of Science, Chilgok 718-851, Korea

¹Department of Food and Biotechnology, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

Abstract

The Acorn (*Quercus acutissima* CARRUTHERS), which contains a large quantity of tannin, should be developed as a processed food as the acorn is rich in natural antioxidants and other valuable components. Accordingly, acorn extraction conditions for polyphenol and gallic acid (both antioxidants) were investigated by response surface methodology. The content of polyphenols were determined under 16 different extraction conditions based upon a central composite design. The parameters varied over 30-70 °C of extraction temperature, 1-5 h of extraction time, and 5-25 mL/g of solvent ratio, Gallic acid extraction was optimal at 60-100 °C extraction temperature, 1-5 h of extraction time, and 5-25 mL/g of solvent ratio. Epicatechin content was highest at 56.77 °C, 4.16 h and 22.38 mL/g. Catechin content was highest at 52.37 °C, 2 h and 23.59 mL/g. The maximum catechin content was 91.30 µg/mL. Epigallocatechin content was influenced by extraction temperature and time. The maximum epigallocatechin content was 1,066.56 µg/mL at 61.42 °C, 4.17 h, and 9.25 mL/g. The maximum value of epicatechingallate content was 125.39 µg/mL at 47.72 °C, 3.04 h, and 24.93 mL/g. Epigallocatechingallate content was influenced principally by solvent ratio and the maximum content was 61.38 µg/mL at 48.11 °C, 2.96 h, and 24.95 mL/g. The total polyphenol content was maximal at 1,332.75 µg/mL, after extraction at 61.50 °C, 4.24 h, at 9.71 mL/g. The higher the extraction temperature and the longer the extraction time, the greater the polyphenol content. Gallic acid content was highest, the maximal level was 30.51 µg/mL after 65.84 °C, 1.65 h at 17.17 mL/g, and this was influenced principally by extraction time and solvent ratio.

Key words : Acorn, polyphenol, gallic acid, extraction condition, response surface methodology

서 론

천연의 항산화제에 대한 기능을 지닌 것으로 알려진 대표적인 화합물이 polyphenol 물질이다(1). 특히 식물에 널리 분포되어 있는 polyphenol 물질은 phenolic acid, coumarin, flavonoid류 그리고 tannin류 등으로 분류된다. 이중 flavonoid 물질은 식물계에 주로 분포되어 있으며 종류는 약 5,000여 종이 알려져 있다. 그 화학구조에 따라 flavones, flavonones,

flavanols, catechins, anthocyanidines, isoflavones, dihydroflavonols 및 chalcone 등으로 구분된다(2). 이들의 작용으로 hydroxyl radical, superoxide anion radical, peroxy radical 등의 free radical의 소거작용과 항산화 효소 활성을 증가시켜 지질과산화와 LDL의 산화 억제 등의 항산화 효과가 있으며(3) 혈소판응집 저해작용으로 동맥경화증, 고혈압, 관상심장질환의 예방효과 뿐만 아니라 항암, 항염증, 항바이러스, 항알레르기 등의 특성을 가지는 것으로 알려져 있다(4). 방향족 화합물인 녹차의 polyphenol 화합물이 아질산염을 효과적으로 분해하여 발암성 nitrosamine의 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다(5).

[†]Corresponding author. E-mail : jmlee@hoseo.ac.kr,
Phone : 82-41-540-5645, Fax : 82-41-544-4151

Tannin류는 식물 중 과실과 견과류에 널리 분포되어 있으며 단백질과 결합하는 특성을 지닌 폴리페놀의 총칭이다(6). Perkin의 분류(7)에서 tannin은 축합형과 가수분해형으로 분류되며 축합형 tannin이 총페놀 함량과 높은 상관성을 지니는 것으로 알려져 있다(8). Tannin화합물의 약리활성으로 항 virus 작용, 효소활성 저해, 혈압강하작용, 혈중요소질소 저하작용, 항 allergy작용, 항 고혈압 작용, 항 HIV작용 등이 있으며 최근에는 항균, 항산화 항종양 및 중금속 제거능 등의 생리활성 관련 연구가 활발하다(9,10).

도토리(*Quercus acutissima*)는 우리나라 전역의 산림에서 분포되어 있는 참나무과(Fagaceae)(11) 나무의 열매로서 그 종류는 약 28종이나 되며 우리나라에서는 주로 도토리묵의 재료로 이용되어 왔다(12). 도토리의 떫은맛과 갈변 현상은 주로 탄닌 성분의 일종인 gallic acid, digallic acid 및 gallotannin 등을 다량 함유하고 있으며(13), 다른 천연 항산화 성분들처럼 각종 유지에 대해 항산화 작용을 나타내고 있다(14).

우리나라에서의 도토리에 대한 연구는 묵으로의 이용성과, 도토리의 성분(15) 도토리 전분의 연구(16), 도토리의 떫은 맛 성분인 tannin의 제거방법(17), 도토리 gallic acid의 항산화에 대한 연구보고(13)와 최근에는 지방대사와 항산화능에 관한 연구(18-21) 등이 있다.

또한 관련 연구로 문 등(22)은 상수리나무(*Quercus acutissima*, 3년생)의 잎, 줄기, 뿌리, 껍질 및 열매에 각각 존재하고 있는 polyphenol 성분을 조사하여 총 25종류의 polyphenol 성분을 분리와 분포를 조사, 보고하였다.

도토리에 대한 선행 연구들은 도토리묵과 도토리 고유의 떫은맛을 내게 하는 tannin의 제거와 관련된 가공 방법과 이화학적 특성 연구가 대부분으로 여러 가지 기능식품의 개발에 필요한 기능성분의 추출에 대한 연구가 미진하다. 따라서 본 연구에서는 도토리의 이용과 가공을 위한 전단계로서 항산화 물질과 비만조절인자로 알려진 polyphenol 물질 중 catechin류와 tannin류의 gallic acid에 대한 최적 추출조건을 반응표면분석법으로 설정하였다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에 사용된 도토리는 충남 서천군 판교면에 위치한 농민식품에서 2005년 가을에 수집된 것을 2006년 2월경에 공급받아 수세 후 건조하여 사용하였다.

추출물 제조

도토리를 일정한 크기로 분쇄(50 mesh)한 후, 항온수조에서 진탕(100 rpm)하면서 각각의 추출조건에 따라 추출하였다.

Polyphenol 성분의 추출조건 최적화를 위한 실험계획

Polyphenol 성분의 추출조건을 최적화를 위한 실험계획은 중심합성계획법(23)에 의하여 설계하였고, 반응표면 회귀분석을 위하여 statistical analysis system (SAS) program (24)을 사용하였다. 중심합성계획에서 독립변수(X_n)는 추출온도(30~70°C, X_1), 추출시간(1~5 hr, X_2) 및 시료에 대한 열수 용매비(5~25 mL/g, X_3)이며 실험계획은 -2, -1, 0, 1, 2 다섯 단계로 부호화하여, 중심합성계획에 따라 Table 1과 같이 16구로 설정하여 추출실험을 하였다. 도토리 추출물의 polyphenol 성분에 관련된 종속변수(Y_n)로는 epicatechin (EC) 함량(Y_1), catechin (C) 함량(Y_2), epigallocatechin (EGC) 함량(Y_3), epicatechingallate (ECG) 함량(Y_4), epigallocatechingallate (EGCG)함량(Y_5) 및 total polyphenol 함량(Y_6)로 각각 나타내었다. 이때 세 가지의 추출조건에 따른 3차 회귀모형식은 아래와 같다.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3$$

이때 Y는 추출한 polyphenol 화합물 함량이고, X_1 , X_2 및 X_3 는 추출조건, b_0 은 회귀계수이다.

Table 1. Level in polyphenol extraction condition for acorn based in fractional factorial design

Extraction conditions		-2	-1	0	1	2
X_1	Extraction temp. (°C)	30	40	50	60	70
X_2	Extraction time (hr)	1	2	3	4	5
X_3	Solvent ratio (mL/g)	5	10	15	20	25

Polyphenol 함량 분석

각 추출물의 polyphenol 함량은 HPLC를 사용하여 분석하였다. 즉 각 추출물을 0.45 µm membran filter로 여과 후 이것을 시험용액으로 사용하였다. Polyphenol의 동정은 각 polyphenol 표준품으로 epicatechin (EC), catechin (C), epigallocatechin (EGC), epicatechingallate (ECG) 및 epigallocatechingallate (EGCG)을 구입(Sigma Co., USA)하여 사용하였고 각 성분의 retention time과 비교하여 동정하였으며, 함량은 자동분석기에 의해서 계산된 함량으로 나타내었다. 이때 사용한 HPLC는 Shimadzu LC-10AT system (Shimadzu Co., Japan)이었고 column은 Spherisorb® ODS (4.6 mm × 250 mm, 10µm Waters Co., USA)를 사용하였고 컬럼 온도는 35°C이었다. 분석에 사용된 이동상 용매는 A용액(acetonitrile : ethylacetate : 0.1% phosphoric acid = 8.5 : 2 : 89.5 v/v%)과 B용액(50% Acetonitrile)을 사용하여 gradient 조건(To 10 min → B Conc. = 0%, From 10 min to 20 min → B Conc. = reach 20%, From 20 min to 50

min → B Conc. = 20%, From 50 min to 60 min → B Con. = 0%)으로 수행하였고 이때 흐름속도 1.0 mL/min이고 검출기는 UV 280 nm 이고 주입량은 20 μ L이었다.

Gallic acid의 추출조건 최적화를 위한 실험계획

Gallic acid성분의 추출조건을 최적화를 위한 실험계획은 중심합성계획법에 의하여 설계하였고, 반응표면 회귀분석을 위하여 SAS program을 사용하였다. 중심합성계획에서 독립변수(X_n)는 추출온도(60~100°C, X_1)와 추출시간(1~5 hr, X_2) 및 용매비(5~25 mL/g, X_3)이며, 실험계획은 -2, -1, 0, 1, 2 다섯 단계로 부호화하여 실험값을 Table 2에 나타내었다. 종속변수(Y_n)로는 gallic acid(Y_1)로 나타내었다.

Table 2. Level in gallic acid extraction condition for acorn based in fractional factorial design

Extraction conditions		-2	-1	0	1	2
X_1	Extraction temp. (°C)	60	70	80	90	100
X_2	Extraction time (hr)	1	2	3	4	5
X_3	Solvent ratio (mL/g)	5	10	15	20	25

Gallic acid 성분의 추출 및 함량 분석

각각의 추출물 10 mL에 동량의 acetone를 가하여 40°C에서 4시간 추출하고 전액을 40°C에서 감압 농축하였다. 농축액에 3배량의 ethyl acetate를 첨가하여 진탕하여 ethyl acetate 층으로 이행시키는 조작을 3회 반복하고 40°C에서 감압농축하여 분말상의 도토리 추출물을 얻었다. 또한 이것을 methanol에 녹여 HPLC의 분석시료로 하였고, 이때 사용한 HPLC는 Shimadzu LC-10AT system (Shimadzu Co., Japan)이었고 column은 μ BondapakTM C₁₈ (3.9 mm * 300 mm, Waters Co., USA)을 사용하였고 컬럼 온도는 35°C이었다. 분석에 사용된 이동상 용매는 A용액(0.5% phosphoric acid)와 B용액(0.5% phosphoric acid in methanol)을 사용하여 gradient 조건(A 펌프 100% → 0% 및 B pump는 0% → 100%)으로 수행하였고 이때 흐름속도 1.5 mL/min이고 검출기는 UV 280 nm 이고 주입량은 20 μ L이었다. Gallic acid의 동정은 표준품인 gallic acid (Sigma Co., USA)의 retention time과 비교하여 동정하였고, 함량은 자동분석기에 의해서 계산된 함량으로 나타내었다.

결과 및 고찰

Epicatechin (EC)의 함량 변화

추출온도, 추출시간 및 시료에 대한 용매비에 따른 도토리의 EC 함량은 47.7~102.1 μ g/mL 범위이었고(Table 3), EC 함량에 대한 추출물의 회귀식의 R^2 는 0.9414이고 1% 이내에서 유의성이 인정되었다(Table 5). EC 함량은 추출시간에 대해 1%수준에서 유의성이 인정되어 가장 큰 영향을

받았고 추출온도와 용매비는 5% 이내의 유의성이 인정되어 영향을 받는 것으로 나타났으며(Table 6), 예측된 정상점은 안장점으로 능선분석을 한 결과, 최대값은 112.35 μ g/mL 이었고, 이때의 조건은 추출온도 56.77°C, 추출시간 4.16시간 및 용매비 22.38 mL/g으로 나타났다(Table 7). 4차원 반응표면에 의한 EC 함량의 변화는 Fig. 1과 같으며, 추출시간이 길어지면서 온도가 높고, 용매비가 증가할수록 EC 함량이 증가하였다.

Catechin (C)의 함량 변화

도토리 추출물의 C 함량은 55.4~93.1 μ g/mL 범위이었으며(Table 3), C 함량에 대한 추출물의 회귀식의 R^2 는 0.8380 이고 유의성은 인정되지 않았다(Table 5). C 함량은 주어진 추출조건에서는 유의성이 인정되지 않는 것으로 나타났으며(Table 6). 예측된 정상점은 안장점으로 능선분석을 한 결과, 최대값은 91.30 μ g/mL이었고, 이때의 조건은 추출온도 52.37°C, 추출시간 2시간 및 용매비 23.59 mL/g으로 나타났다(Table 7). 4차원 반응표면에 의한 C 함량의 변화는 Fig. 2에 나타내었으며, 추출온도가 높고, 용매비가 증가할수록 C 함량이 증가하는 경향을 나타냈다.

천연물내에 함유되어 있는 epicatechin과 catechin은 항암, 항간독, 항돌연변이, 항고혈압 및 항염증반응 등 여러 가지 생리적 기능을 갖으며(25) 아울러 활성산소 포착제 및 금속착염제로서 지질과산화 반응을 효과적으로 억제하는 천연항산화 물질로 잘 알려져 있다(26). 따라서 도토리의 catechin류가 항산화 기능을 하는 물질로 추정된다.

Epigallocatechin (EGC)의 함량 변화

추출조건에 따른 도토리의 EGC 함량은 411.6~988.0 μ g/mL의 범위이었으며(Table 3), EGC 함량에 대한 추출물의 회귀식의 R^2 는 0.8913이고 5% 이내에서 유의성이 인정되었다(Table 5). EGC 함량은 추출온도와 추출시간에 대해 5% 이내에서 유의성이 인정되어 영향을 받는 것으로 나타났다(Table 6). 예측된 정상점은 안장점으로 능선분석을 한 결과, 최대값은 1,066.56 μ g/mL이었고, 이때의 조건은 추출온도 61.42°C, 추출시간 4.17시간 및 용매비 9.25 mL/g으로 나타났다(Table 7). 4차원 반응표면에 의한 EGC 함량의 변화는 Fig. 3과 같으며, 추출온도가 높고, 추출시간이 증가할수록 EGC 함량이 증가하는 경향이였다.

Epicatechingallate (ECG)의 함량 변화

도토리의 ECG함량은 33.3~128.1 μ g/mL 범위로 상대적으로 함량차이가 크게 나타났다 (Table 3). ECG 함량에 대한 추출물의 회귀식의 R^2 는 0.9598이고 1% 이내의 유의수준에서 유의성이 인정되었다(Table 5). ECG 함량은 시료에 대한 용매비가 1% 이내의 유의성이 인정되어 가장 큰 영향을 받으며, 추출시간에서 유의성이 없는 것으로 나타

났다(Table 6). 예측된 정상점은 안장점으로 능선분석을 한 결과, 최대값은 125.39 $\mu\text{g/mL}$ 이었고, 이때 조건은 추출온도 47.72 $^{\circ}\text{C}$, 추출시간 3.04시간 및 용매비 24.93 mL/g으로 나타났다(Table 7). 4차원 반응표면에 의한 ECG 함량의 변화는 Fig. 4와 같으며, 용매비가 증가하면서 추출시간이 길때 ECG 함량은 증가하는 경향이 있었다.

Epigallocatechingallate의 (EGCG)함량 변화

추출온도, 추출시간 및 시료에 대한 용매비에 따른 도토리의 EGCG 함량은 39.2~65.8 $\mu\text{g/mL}$ 의 범위이었으며 (Table 3), EGCG 함량에 대한 추출물의 회귀식의 R^2 는 0.8237이고 유의수준이 인정되지 않았다(Table 5). EGCG 함량은 용매비에 대해 5% 이내의 유의성이 인정되어 영향을 받는 것으로 나타났으나, 추출온도와 추출시간에서는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다(Table 6). 예측된 정상점은 안장점으로 능선분석을 한 결과, 최대값은 61.38 $\mu\text{g/mL}$ 이었고, 이때의 추출조건은 추출온도 48.11 $^{\circ}\text{C}$, 추출시간 2.96시간 및 용매비 24.95 mL/g으로 나타났다(Table 7). 4차원 반응표면에 의한 EGCG 함량의 변화는 Fig. 5와 같으며, 용매비가 일정정도 증가할수록 EGCG 함량도 증가하는 경향이 있었다.

녹차에 polyphenol 물질중 다량 함유되어 있는 ECG와 EGCG는 콜레스테롤 저하효과를 가지는 주요물질이라고 보고되어 있다(27).

Total polyphenol 함량의 변화

도토리의 total polyphenol 함량은 634.2~1,261.3 $\mu\text{g/mL}$ 의 범위로 나타났으며(Table 3), total polyphenol 함량에 대한 추출물의 회귀식의 R^2 는 0.9134이고 5% 이내의 유의수준에서 유의성이 인정되어 영향을 받는 것으로 나타났다 (Table 5). Total polyphenol 함량은 추출시간은 1%이내에서, 추출온도는 5%이내에서 유의성이 각각 인정되어 영향을 받는 것으로 나타났다.(Table 6). 예측된 정상점은 안장점으로 최대값은 1,332.75 $\mu\text{g/mL}$ 이었고, 이때의 조건은 추출온도 61.50 $^{\circ}\text{C}$, 추출시간 4.24시간 및 용매비 9.71 mL/g으로 나타났다(Table 7). 4차원 반응표면에 의한 total polyphenol 함량의 변화는 Fig. 6과 같으며, 추출온도가 높고, 추출시간이 증가할수록 total polyphenol 함량이 증가하는 경향을 나타내었다.

식물계에 널리 분포되어 있는 페놀성 물질은 다양한 구조와 분자량을 가지며 이들의 phenolic hydroxyl이 단백질과 같은 거대분자와 결합하여 항산화, 항암, 항균 등의 생리 기능을 갖는 것으로 알려져 있다(28).

Gallic acid 함량의 변화

각 실험구에서 얻어진 도토리의 gallic acid 함량은 7.66~

24.71 $\mu\text{g/mL}$ 의 범위로 나타났으며(Table 4), gallic acid 에 대한 회귀식 R^2 는 0.8875로 5%이내의 유의성이 인정되었다(Table 5). 도토리 추출물의 gallic acid함량에 대한 추출조건에의 영향은 추출시간과 용매비에 대해 5%이내에서 유의성이 인정되어 영향을 받는 것으로 나타났으며, 설정된 범위내의 온도에 대한 영향은 거의 나타나지 않았다(Table 6). 예측된 정상점은 안장점(saddle point)이므로 능선분석을 한 결과, 최대값은 30.51 $\mu\text{g/mL}$ 이었고, 이때의 추출조건은 추출온도 65.84 $^{\circ}\text{C}$, 추출시간 1.65시간 및 용매비 17.17 mL/g으로 나타났다(Table 7). Mathematica 프로그램을 이용하여 나타낸 4차원 반응표면 결과는 Fig. 7과 같으며 도토리의 gallic acid 함량은 추출온도가 낮을수록 증가하였다.

정 등(29)은 백작약 열수추출물의 산화적 스트레스 억제 효과를 갖는 유효물질로 gallic acid와 caechin을 분리 동정하였다.

Table 3. Experimental data on polyphenol of acorn under different conditions based on central composite design for response surface analysis

Exp. No.	Extraction conditions				Polyphenol content				
	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Time (hr)	Solventratio (mL/g)	EC ¹⁾ ($\mu\text{g/mL}$)	C ($\mu\text{g/mL}$)	EGC ($\mu\text{g/mL}$)	ECG ($\mu\text{g/mL}$)	EGCG ($\mu\text{g/mL}$)	Total polyphenol ($\mu\text{g/mL}$)
1	60(1)	4(1)	20(1)	102.1	89.9	589.6	71.0	44.1	852.6
2	60(1)	4(1)	10(-1)	83.5	87.0	988.0	61.9	40.9	1,220.4
3	60(1)	2(-1)	20(1)	65.9	93.1	595.7	46.7	48.3	801.4
4	60(1)	2(-1)	10(-1)	71.1	78.3	598.0	33.3	42.8	780.7
5	40(-1)	4(1)	20(1)	69.1	73.6	411.6	74.3	48.7	628.6
6	40(-1)	4(1)	10(-1)	72.6	64.6	425.8	51.2	39.9	614.2
7	40(-1)	2(-1)	10(-1)	79.1	70.0	447.0	42.5	50.9	638.6
8	40(-1)	2(-1)	10(-1)	79.1	70.0	447.0	42.5	50.9	638.6
9	50(0)	3(0)	15(0)	67.4	80.1	589.1	47.5	44.4	784.1
10	50(0)	3(0)	15(0)	67.4	80.1	589.1	47.5	44.4	784.1
11	70(2)	3(0)	15(0)	57.6	74.2	577.8	48.9	42.1	758.5
12	30(-2)	3(0)	15(0)	47.7	59.2	446.9	35.7	44.7	589.5
13	50(0)	5(2)	15(0)	87.2	78.4	691.9	62.1	41.6	919.6
14	50(0)	1(-2)	15(0)	59.7	74.6	471.1	42.1	45.4	647.5
15	50(0)	3(0)	25(2)	96.9	88.9	724.4	128.1	65.8	1,038.3
16	50(0)	3(0)	5(-2)	85.2	55.4	589.2	83.1	39.2	812.9

¹⁾EC : Epicatechin content, C : catechin content, EGC : Epigallocatechin content, ECG : Epicatechingallate content, EGCG : Epigallocatechin gallate content.

Table 4. Experimental data on gallic acid of acorn under different conditions based on central composite design for response surface analysis

Exp. No.	Extraction conditions			Gallic acid content (µg/mL)
	Temp. (°C)	Time (hr)	Solvent ratio (mL/g)	
1	90(1)	4(1)	20(1)	18.05
2	90(1)	4(1)	10(-1)	15.60
3	90(1)	2(-1)	20(1)	16.93
4	90(1)	2(-1)	10(-1)	14.39
5	70(-1)	4(1)	20(1)	10.72
6	70(-1)	4(1)	10(-1)	9.11
7	70(-1)	2(-1)	10(-1)	17.85
8	70(-1)	2(-1)	10(-1)	17.85
9	80(0)	3(0)	15(0)	19.06
10	80(0)	3(0)	15(0)	19.06
11	100(2)	3(0)	15(0)	15.46
12	60(-2)	3(0)	15(0)	24.71
13	80(0)	5(2)	15(0)	10.97
14	80(0)	1(-2)	15(0)	22.36
15	80(0)	3(0)	25(2)	10.87
16	80(0)	3(0)	5(-2)	7.66

Table 6. Regression analysis for regression model of polyphenol and gallic acid content in extraction conditions of acorn

Steaming conditions	F-Ratio						Gallic acid (µg/mL)
	EC ¹⁾ (µg/mL)	C (µg/mL)	EGC (µg/mL)	ECG (µg/mL)	EGCG (µg/mL)	Total polyphenol (µg/mL)	
X ₁ Extraction temp.(°C)	7.63*	3.65	8.16*	1.27	0.43	9.51**	2.71
X ₂ Extraction time(hr)	9.73**	0.40	5.46*	4.21	0.79	6.47*	5.88 [†]
X ₃ Solvent ratio(mL/g)	7.00*	3.61	4.32	22.38**	5.28*	3.86	5.02*

*Significant at 5% level ; **Significant at 1% level ; ***Significant at 0.1% level
¹⁾EC : epicatechin content, C : catechin content, EGC : epigallocatechin content, ECG : epicatechingallate content, EGCG : epigallocatechin gallate content.

Table 7. Predicted level of extraction conditions for the maximum responses of polyphenols and gallic acid by the ridge analysis

Responses(µg/mL)	R ²	Pro>F	X ₁	X ₂	X ₃	Maximum	Morphology
EC ¹⁾	0.9414	0.0046	56.77	4.16	22.38	112.35	Saddle point
C	0.8380	0.0729	52.37	2.00	23.59	91.30	Saddle point
EGC	0.8913	0.0256	61.42	4.17	9.25	1066.56	Saddle point
ECG	0.9598	0.0016	47.72	3.04	24.93	125.39	Saddle point
EGCG	0.8237	0.0901	48.11	2.96	24.95	61.38	Saddle point
Total polyphenol	0.9134	0.0138	61.50	4.24	9.71	1332.75	Saddle point
Gallic acid content	0.8875	0.0546	65.84	1.65	17.17	30.51	Saddle point

*X₁ : extraction temperature (°C), X₂ : extraction time (hr), X₃ : solvent ratio (mL/g)
¹⁾EC : epicatechin content, C : catechin content, EGC : epigallocatechin content, ECG : epicatechingallate content, EGCG : epigallocatechin gallate content.

Table 5. Polynomial equations calculated by RSM program for extraction conditions of acorn polyphenol compounds and gallic acid

Response	Second order Polynomials	R ²	Significance
EC ¹⁾	$Y_{EC} = 207.406731 + 0.896458X_1 - 47.287660X_2 - 14.632949X_3 - 0.036875X_1^2 + 0.590737X_1X_2 + 1.512500X_2^2 + 0.093064X_1X_3 + 1.015641X_2X_3 + 0.236500X_3^2$	0.9414	0.0046**
C	$Y_C = -44.349038 + 3.034792X_1 - 5.006571X_2 + 4.949103X_3 - 0.033500X_1^2 + 0.302724X_1X_2 - 0.900000X_2^2 - 0.004872X_1X_3 - 0.338718X_2X_3 - 0.079500X_3^2$	0.8380	0.0729
EGC	$Y_{EGC} = -805.172115 + 21.011458X_1 - 206.115545X_2 + 133.088974X_3 - 0.191875X_1^2 + 10.569006X_1X_2 - 1.900000X_2^2 - 1.861782X_1X_3 - 19.212821X_2X_3 + 0.677000X_3^2$	0.8913	0.0256*
ECG	$Y_{ECG} = 110.023077 + 0.834583X_1 - 23.716026X_2 - 9.964872X_3 - 0.013000X_1^2 + 0.571218X_1X_2 + 1.150000X_2^2 - 0.085090X_1X_3 - 0.365897X_2X_3 + 0.581000X_3^2$	0.9598	0.0016**
EGCG	$Y_{EGCG} = 72.600000 - 0.134375X_1 - 7.206250X_2 - 2.021250X_3 - 0.002500X_1^2 + 0.088750X_1X_2 - 0.225000X_2^2 - 0.000250X_1X_3 + 0.162500X_2X_3 + 0.081000X_3^2$	0.8237	0.0901
Total polyphenol	$Y_{TOTAL} = -120.362500 + 20.485625X_1 - 354.781250X_2 + 91.830000X_3 - 0.277750X_1^2 + 12.816250X_1X_2 - 0.062500X_2^2 - 1.602000X_1X_3 - 16.170000X_2X_3 + 1.496000X_3^2$	0.9134	0.0138*
Gallic acid content (µg/ml)	$Y_{GA} = 64.562644 - 1.191729X_1 - 20.771266X_2 + 5.191705X_3 + 0.002563X_1^2 + 0.310804X_2X_1 - 0.598750X_2^2 - 0.016597X_3X_1 - 0.212474X_3X_2 - 0.097950X_3^2$	0.8875	0.0281*

*Significant at 5% level ; **Significant at 1% level ; ***Significant at 0.1% level.

¹⁾EC : Epicatechin content, C : catechin content, EGC : Epigallocatechin content, ECG : Epicatechingallate content, EGCG : Epigallocatechin gallate content.

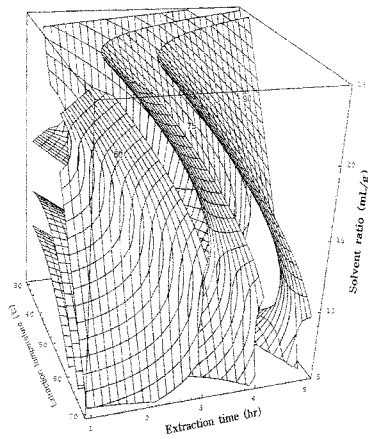


Fig. 1. Response surface for epicatechin content at constant values (epicatechin content : 60, 75, 90 $\mu\text{g/mL}$) as a function of extraction temperature, time and solvent ratio.

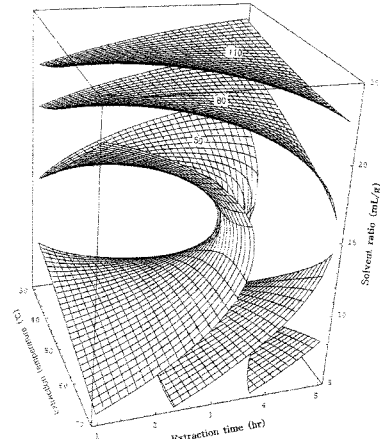


Fig. 4. Response surface for epicatechingallate content at constant values (epicatechingallate content : 50, 80, 110 $\mu\text{g/mL}$) as a function of extraction temperature, time and solvent ratio.

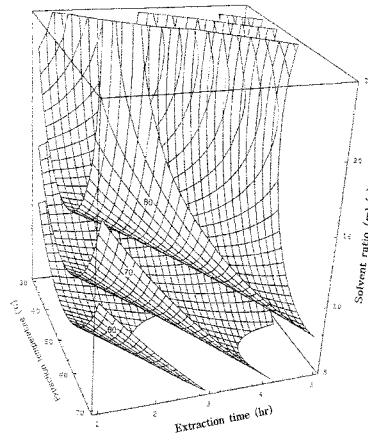


Fig. 2. Response surface for catechin content at constant values (catechin content : 60, 70, 80 $\mu\text{g/mL}$) as a function of extraction temperature, time and solvent ratio.

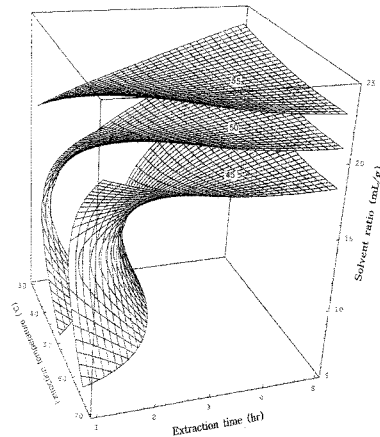


Fig. 5. Response surface for epigallocatechingallate content at constant values (epigallocatechingallate content : 45, 50, 55 $\mu\text{g/mL}$) as a function of extraction temperature, time and solvent ratio.

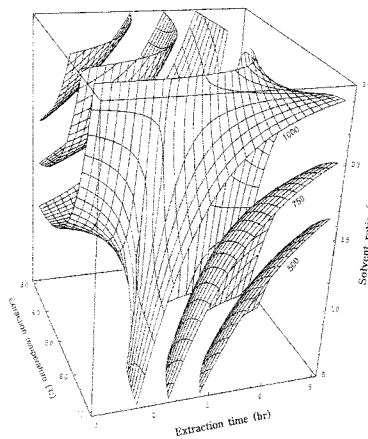


Fig. 3. Response surface for epigallocatechin content at constant values (epigallocatechin content : 500, 750, 1000 $\mu\text{g/mL}$) as a function of extraction temperature, time and solvent ratio.

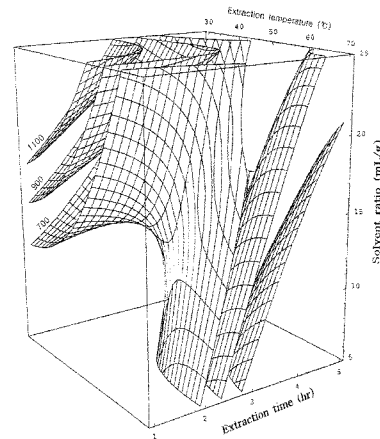


Fig. 6. Response surface for total polyphenol content at constant values (total polyphenol content : 700, 900, 1100 $\mu\text{g/mL}$) as a function of extraction temperature, time and solvent ratio.

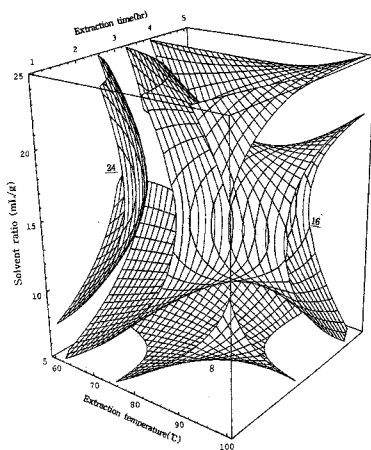


Fig. 7. Response surface for gallic acid content of acorn at constant values (gallic acid content : 8, 16, 24 $\mu\text{g/mL}$) as a function of extraction temperature, extraction time and solvent ratio.

요약

Tannin을 다량 함유하고 있는 도토리(*Quercus acutissima* CARRUTHERS)는 천연 항산화제 및 다양한 기능성을 가진 가공식품으로의 개발 가치가 있다고 생각된다. 이에 따라 도토리 항산화 기능물질의 일종인 polyphenol류와 gallic acid의 추출조건을 반응표면분석법을 이용하여 조사하였다. Polyphenol 화합물의 함량은 추출온도 30~70°C 및 추출시간 1~5 hr, 용매비 5~25 mL/g로 하여 중심합성계획법으로 16개의 구간에서 측정하였고, gallic acid 함량은 추출온도 60~100°C, 추출시간 1~5 시간 및 용매비 5~25 mL/g로 하여 최적추출조건을 설정하였다.

Epicatechin의 함량은 추출온도 56.77°C, 추출시간 4.16 시간 및 용매비 22.38 mL/g에서 최대값 112.35 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 도토리 추출물의 catechin 함량은 추출온도 52.37°C, 추출시간 2 시간 및 용매비 23.59 mL/g에서 최대치인 91.30 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 추출온도가 높고, 용매비가 증가할수록 catechin 함량이 증가하였다. Epigallocatechin 함량은 추출온도와 추출시간에 영향을 받는 것으로 나타났으며, 추출온도 61.42°C, 추출시간 4.17 시간 및 용매비 9.25 mL/g에서 최대값은 1,066.56 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. Epicatechingallate함량의 최대값은 125.39 $\mu\text{g/mL}$ 이었고, 이때의 추출조건은 추출온도 47.72°C, 추출시간 3.04 시간 및 용매비 24.93 mL/g이었다. Epigallocatechingallate 함량은 용매비에 대해 영향을 받았으며, 최대값은 61.38 $\mu\text{g/mL}$ 이었고, 이때의 추출조건은 추출온도 48.11°C, 추출시간 2.96시간 및 용매비 24.95 mL/g으로 나타났다. 총 polyphenol함량은 추출온도 61.50°C에서 1,332.75 $\mu\text{g/mL}$ 으로 최대값을 나타내었으며, 추출시간 4.24 시간 및 시료에 대한 용매비 9.71 mL/g에서 가장 높게 나타났다. 추출온도가 높고, 추출시간이 증가할수록

총 polyphenol 함량이 증가하는 경향을 나타내었다. Gallic acid 함량은 65.84°C에서 30.51 $\mu\text{g/mL}$ 으로 최대값을 나타내었으며, 추출시간 1.65 시간 및 시료에 대한 용매비 17.17 mL/g에서 가장 높은 추출율을 보였다. Gallic acid 함량에 대한 추출조건의 영향은 추출시간과 용매비에 영향을 받는 것으로 나타났으며, 설정된 범위 내에서 온도에 대한 영향은 거의 나타나지 않는 것으로 나타났다.

참고문헌

- Pratt, D.E. (1992) Natural antioxidants from plant materials. In: Phenolic compounds in food and their effects on health(II), Huang, M.T., Ho, S.T. and Lee, C.Y.(eds), Am. Chem. Soc., Washington D.C., p.54-60
- Bravo, L. (1998) Polyphenols: In Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. Nutr. Rev., 56, 317-333
- Haenen, G.R., Paquay, J.B., Korthouwer, R.E. and Bast, A. (1997) Peroxynitrite scavenging by flavonoids. Biochem. Biophys. Res. Commun., 236, 591-593
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol., 37, 911-917
- Takahashi, T., Yamane, T., Hagiwara, N., Tateishi, M., Akachi, S., Kim, M., Okuzumi, J., Kitao, Y., Inagake, M. and Kuwata, K. (1991) Inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rat by green tea polyphenol fraction. Jpn. J. Cancer Res., 82, 1336-1339
- Lee, J.H. and Lee, S.R. (1994) Some physiological activity of phenolic substance in plant foods. Korean J. Food Sci. Technol., 26, 317-323
- Perkin, A.G. and Everest, A.E. (1918) The natural organic coloring matters, Longmans, Green and Co., London, pp.498-513
- Lee, J.H. and Lee, S.R. (1994) Analysis of phenolic substances content in Korean plant foods. Korean J. Food Sci. Technol., 26, 317-323
- Ahn, Y.J., Lee, S.H., Kang, S.J. and Hwang, B.Y. (1996) The phenolic components of *Sapium japonicum*. Yakhak Haeji, 40, 183-192
- Salunkhe, D.K., Chavan, J.K. and Kadam, S.S. (1990) Dietary tannins. Consequences and Remedies, CRC Press Inc, Boca Raton, Florida
- Ahn, H.K., Kil, H.B., Yoo, H.E. and Oh, D.H. (1990) Effect of lipid contents on the physicochemical characteristics of acorn starch, J. Korean Agric. Chem.

- Soc., 33, 293-300
12. Park, S.O. and Kim, K.O. (1988) Effects of added corn starches on sensory characteristics of acorn *mooks*(starch gel). Korean J. Food Sci. Technol., 20, 613-617
 13. Lee, M.H., Jeong J.H. and Oh, M.J. (1992) Antioxidative activity of gallic acid in acorn extract. J. Korean Soc. Food Nutr., 21, 693-700
 14. Cho, M.J., Kwon, T.B. and Oh, S.K. (1989) Antioxidant effect of some phenolics on soybean oil, J. Korean Agric. Chem., 32, 37-43.
 15. Kim, C.S. and Shin, E.T. (1975) Studies on the utilization of several varieties of acorn in Korea, Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng., 3, 17-22
 16. Kim, Y.A. and Rhee, H.S. (1987) Physicochemical properties of acorn crude starch and acorn refined starch. Korean J. Soc. Food. Sci., 3, 14-19
 17. Park, J.Y. and Koo, S.J. (1984) A study on the tannin components and physical properties of acorn starch. Korean J. Nutr., 17, 41-49
 18. Yook, G.J., Lee, H.J. and Kim, M.K. (2002) Effect of chestnut and acorn on lipid metabolism antioxidative capacity and antithrombotic capacity in rats. Korean J. Nutr., 35, 171-182
 19. Shim, T.H., Kim, Y.S., Sa, J.H., Shin, I.C., Heo, S.I. and Wang, M.H. (2004) Studies for component analysis and antioxidative evaluation in acorn powders, Korean J. Food Sci. Technol., 36, 800-803
 20. Kang, M.H., Lee, J.H., Lee, J.S., Kim, J.H. and Chung, H.K. (2004) Effect of acorn supplementation on lipid profiles and antioxidant enzyme activity in high fat diet-induced obese rats. Korean J. Nutr., 37, 169-175
 21. Lee, S.H., Kim, D.I., Cho, S.Y., Jung, H.J., Cho, S.M., Park, H.J. and Lillehoj, H.S. (2005) Effect of acorn (*Quercus acutissima* CARR.) supplementation on the level of acetylcholine and its related enzyme activities in the brain of dementia mouse model, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 34, 738-742
 22. Moon, J.Y. and Cho, S.H. (1998) Studies on the distribution of polyphenols in the parts of *Quercus acutissima*. J. Korean Soc. Anal. Sci., 11, 478-484
 23. Wanasundara, P.K.J.P.D. and Shahidi, F. (1996) Optimization of hexametaphosphate -assisted extraction of flaxseed proteins using response surface methodology, J. Food Sci., 6, 604-607
 24. S.A.S (1998) SAS User's Guide. Statistics, Version 6.03. SAS Institute Inc, Cary, N.C.
 25. Gali, H.U., Perchellet, E.M., Gao, X.M., Karchesy, J.J. and Perchellet, J.P. (1994) Comparison of the inhibitory effects of monomeric, dimeric and trimeric procyanidins on the biochemical markers of skin tumor promotion in mouse epidermis in vivo. Planta Med., 60, 235-239
 26. Ricardo, J.M., Darmon, N., Fernandez, Y. and Mitjavila, S. (1991) Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous model of different procyanidins from grape seeds. J. Agric. Food Chem., 39, 1549-1552
 27. Yang, T.T. and Koo, M.W. (1997) Hypocholesterolemic effects of Chinese tea. Pharmacol. Res., 35, 505-512
 28. Park, C.S. (2005) Component and quality characteristics of powdered green tea cultivated in Hwagae area. Kor. J. Food Preserv., 12, 36-42
 29. Jeong, I.Y., Lee, J.S., Oh, H., Jung, U.H., Park, H.R. and Jo, S.K.(2003) Inhibitory effect of hot-water extract of *Paeonia japonica* on oxidative stress and identification of its active components. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 32, 739-744

(접수 2007년 10월 30일, 채택 2007년 12월 28일)