

Optimization of Extraction Conditions for Mate (*Ilex paraguarensis*) Ethanolic Extracts

Su-Jin Yang, Kwang-Sup Youn, Hong-Kyoon No, Shin-Ho Lee
and Joo-Heon Hong[†]

Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyeongsan 712-702, Korea

Mate (*Ilex paraguarensis*) 에탄올 추출물의 추출조건 최적화

양수진 · 윤광섭 · 노홍균 · 이신호 · 홍주현[†]
대구가톨릭대학교 식품가공학전공

Abstract

This study was conducted to monitor the quality characteristics of mate (*Ilex paraguarensis*) ethanolic extracts via the response surface methodology. In the extraction conditions that were based on the central composite design with variations in the ethanol concentration (0-100%), extraction temperature(35-95°C), and the ratio of the solvent to the sample (10~30 mL/g). The extraction yield and total polyphenol content improved with the increase in the ethanol concentration than in the extraction temperature. The caffeic acid content increased with the decrease in the solvent ratio. The coefficients of determinations (R^2) were 0.8842 ($p<0.05$), 0.8729 ($p<0.05$), and 0.9205 ($p<0.05$) in terms of the electron donating ability, nitrite scavenging effect (pH 3.0), and SOD-like ability, respectively. The estimated conditions for the maximized extraction, including in terms of the yield, total polyphenol content, caffeic acid content, and electron donating ability, were a 21-48% ethanol concentration, a 76.4°C extraction temperature, and 10-14mL/g solvent-to-sample ratio.

Key words : Mate (*Ilex paraguarensis*), extraction condition, optimization, caffeic acid

서 론

최근 경제 성장에 따른 소득의 증가로 국민들의 식생활 패턴이 건강과 직결된 자연 식품을 선호하는 추세로 변화되고 있다. 인체는 산화촉진물질(prooxidant)과 산화억제물질(antioxidant)이 균형을 이루고 있으나 여러 가지 요인들에 의하여 이런 균형상태가 불균형을 이루게 되고 산화촉진 쪽으로 기울게 되면, 산화적 스트레스(oxidative stress)가 유발되어 잠재적인 세포손상 및 병리적 질환을 일으키게 된다(1,2). 이러한 산화적 스트레스의 직접적인 원인이 되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 불안정하고 반응성이 높아 여러 생체 물질과 쉽게 반응하고, 체내 고분자들을 공격하여 세포와 조직에 비가역적인 손상을 일으키거나 돌연변이, 세포독성 및 발암 등을 초래하게 된다. 이런 관점으로 활성산소를 소거하기 위한 항산화성 물질은 식품이

나 천연물에서 찾고자 하는 노력이 많이 시도되고 있다 (3,4).

Mate는 아르헨티나, 우르과이, 파라과이와 브라질 남부에서 주로 소비되는 차로 다년생 나무인 *Ilex paraguarensis* (예르바 마테)의 잎을 채취하여 말린 후 세절하여 제조된다 (5). Mate는 항산화능이 높을 뿐만 아니라 콜레스테롤 함량을 낮출 수 있어 항비만 효과가 있는 것으로 알려져 있다 (6,7). 또한 mate차에는 다양한 폴리페놀과 quercetin, kampferol, rutin과 같은 플라보노이드, 아미노산, P, Fe, Ca 등의 미네랄, 비타민 C, B₁, B₂, 사포닌 등 다량의 phytochemical을 함유하고 있을 뿐만 아니라 미국 식품의약국(FDA)에 의해 독성검사나 안정성 검사가 필요하지 않은 GRAS (Generally recognized As Safe)에 등재한 안전식품이기도 하다(8-10). Mate에 관한 연구로는 Hong(11)은 mate를 원료로 한 발효차를 제조하고 발효 공정조건에 따른 항산화 특성을 연구하였고, Rosana 등(12)은 아르헨티나에서 자생하는 mate 품종별 항산화 특성에 대해 연구하였으며, Euclides 등(13)은 브라질에서 재배된 mate의 폴리페놀 성

[†]Corresponding author. E-mail : jhhong@cu.ac.kr
Phone : 82-53-850-3218, Fax : 82-53-850-3218

분에 대해 조사하였고 Claudia 등(14)은 mate 열수 및 에탄올 추출물의 산화효소 억제 효과에 대해 연구하였다.

반응표면분석은 복수개의 독립변수들이 복합적인 작용을 하여 한 개 또는 여러 개의 종속변수들에 영향을 줄때 그 작용의 관계를 통계적으로 분석하는 방법으로 최근에는 제품개발, 공정개발, 품질관리 등의 분야에서 널리 활용되고 있다. Kim 등(15)은 반응표면분석을 이용하여 용매비, 에탄올농도, 추출온도에 따른 홍월적 양배추의 추출조건을 최적화 하였고, Kim 등(16)은 시료에 대한 용매비, 추출온도와 추출시간에 따른 무화과의 추출조건 최적화를 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 최근 국내에서 기능성 소재로서 시판되고 있는 mate의 유용성분의 최적 추출조건을 설정하고자 하였으며, 이를 위해서 에탄올 농도, 추출온도, 시료에 대한 용매비에 따른 유용성분의 추출특성을 반응표면분석으로 모니터링 하였다.

재료 및 방법

실험재료

Mate (*Ilex paraguayensis*)는 대구소재 (주)대자연 B&T에서 제공받아 본 실험에 사용하였으며, 시료는 분쇄기 (J-NCM, Jisico, Korea)로 분쇄한 후 표준체 No. 60을 통과한 것을 -20℃ 이하의 암소에 보관하면서 추출용 시료로 사용하였다.

추출조건 최적화를 위한 실험계획

본 실험에서는 추출물의 기능적 특성을 최대로 하는 최적 추출조건을 설정하기 위해 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)(17)을 사용하였다. 추출조건에 대한 실험계획은 중심합성계획(central composite design)(18)을 사용하였으며, 반응표면분석을 위해 SAS (statistical analysis system)(19)를 사용하였다. 실험계획은 Table 1과 같이 추출공정에서 중요한 변수로 고려되는 인자 즉, 시료에 대한 에탄올 농도(0~100%, X_1), 추출온도(35~95℃, X_2), 용매비(10~30 mL/g, X_3)를 -2, -1, 0, 1, 2의 5단계로 부호화하여 중심합성계획에 따라 Table 2와 같이 16구간으

Table 1. Level in extraction condition for mate based on central composite design

Extraction condition	Level				
	-2	-1	0	1	2
Ethanol concentration (%)	0	25	50	75	100
Extraction temperature (°C)	35	50	65	80	95
Ratio of solvent to sample content (mL/g)	10	15	20	25	30

로 설정하여 추출실험을 실시하였다. 또한 이들 요인변수에 의해 영향을 받는 종속변수(Y_n) 즉, 수율(Y_1), 총 폴리페놀함량(Y_2), Caffeic acid함량(Y_3), 전자공여능(Y_4), 아질산염소거능(Y_5), SOD 유사활성(Y_6)으로 하였으며, 이들은 3회 반복 측정하여 그 평균값을 회귀분석에 사용하였다.

수율 측정

수율(yield)은 추출액을 회전 감압 증발기(Rotavapor R-123, Buchi, Switzerland)로 감압 농축한 후 건조오븐(forced convection oven, Jeico Tech, Korea)을 이용하여 105℃ 상압가열건조법(20)으로 항량이 될 때까지 건조한 후 추출액 조제에 사용한 원료 건물량에 대한 고형분 수율(%, d.b.)로 나타내었다.

총 폴리페놀함량 분석

총 폴리페놀함량은 Folin-Denis (21)법에 따라 추출조건에 따른 추출액 0.5 mL에 2N Folin-ciocalteau reagent 0.1 mL를 첨가하고 충분히 혼합한 다음 8.4 mL의 멸균 증류수를 가하여 실온에서 3분간 반응시킨 후 20% Na_2CO_3 1 mL를 첨가하고 실온에서 1시간 반응시킨 후 spectrophotometer (Ultraspec 2100pro, Amersham Co, Sweden)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 폴리페놀의 함량은 tannic acid (Sigma, St, Louis, MO, USA)를 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

Caffeic acid 함량 측정

추출조건별 추출물의 caffeic acid함량 분석은 Waters 515 HPLC pump, 486 Tunable Absorbance Detector를 연결한 HPLC System을 사용하였다. 분석용 column은 sunfire C18 (4.5×150 mm, Waters)를 사용하였으며, 이동상은 2% 아세트산과 아세트나이트릴을 99:1의 비율로 조제하여 1.0 mL/min의 속도로 흘러 caffeic acid 표준품(Sigma, St Louis, MO, USA) 및 추출액을 10 μ L 주입하였고 검출과장은 280 nm였다.

전자공여능 측정

항산화능을 측정하기 위한 전자공여능은 1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)의 환원력을 이용하여 측정하였다(22). 즉, 추출물 1 mL에 4×10^{-4} M DPPH용액(99.9% ethyl alcohol에 용해) 1 mL를 가하여 총액의 부피가 2 mL가 되도록 하였다. 이 반응액을 약 10초간 혼합하고 실온에 30분 방치한 후 분광광도계(Ultraspec 2100pro, Amersham Co, Sweden)를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여효과는 추출물의 첨가 전·후의 차이를 백분율로 나타내었다.

$$EDA(\%) = (1 - \frac{A}{B}) \times 100$$

- A : 추출물 첨가구의 흡광도
- B : 추출물 무첨가구의 흡광도

Table 2. Central composite design for optimization of extraction condition for mate

Experimental number ¹⁾	Ethanol concentration (%)	Extraction Temperature (°C)	Ratio of solvent to sample content (mL/g)
1	25(-1)	50(-1)	15(-1)
2	25(-1)	80(1)	15(-1)
3	75(1)	50(-1)	15(-1)
4	75(1)	80(1)	15(-1)
5	25(-1)	50(-1)	25(1)
6	25(-1)	80(1)	25(1)
7	75(1)	50(-1)	25(1)
8	75(1)	80(1)	25(1)
9	50(0)	65(0)	20(0)
10	50(0)	65(0)	20(0)
11	50(0)	65(0)	10(-2)
12	50(0)	65(0)	30(2)
13	0(-2)	65(0)	20(0)
14	100(2)	65(0)	20(0)
15	50(0)	35(-2)	20(0)
16	50(0)	95(2)	20(0)

¹⁾The number of experimental condition by central composite design.

아질산염 소거작용 측정

아질산염 소거효과(nitrite-scavenging effect)는 Gray 등의 방법(23)으로 측정하였다. 즉, 1 mM 아질산나트륨 용액 1 mL에 각각의 추출물을 2 mL 가하고 여기에 0.1 N 염산(pH 1.2) 및 0.2 N 구연산 완충용액(pH 3.0, 4.2)을 7 mL 가하여 반응용액의 pH를 각각 1.2, 3.0 및 4.2로 달리하여 반응용액의 부피를 10 mL로 하였다. 이를 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 반응액을 1 mL씩 취하고 여기에 2% 초산 5 mL, Griess 시약(acetic acid에 1% sulfanylic acid와 1% naphthylamine을 1:1 비율로 혼합 것으로 사용 직전에 제조) 0.4 mL를 가하여 잘 혼합시켜 15분간 실온에서 방치시킨 후 분광 광도계(Ultaspec 2100pro, Amersham Co, Sweden)를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염량을 구하였다. 그리고 대조구는 Griess 시약 대신 증류수 0.4 mL를 가하여 상기와 동일하게 행하였다. 아질산염 소거능은 pH 1.2에서 추출액 첨가전후의 아질산염 백분율(%)로 표기하였다.

$$N(\%) = \left(1 - \frac{A - C}{B}\right) \times 100$$

- N : 아질산염 소거율
- A : 1 mM NaNO₂ 용액에 시료를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도
- B : 1 mM NaNO₂ 용액에 시료대신 증류수를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도
- C : 시료 추출물 자체의 흡광도

Superoxide dismutase (SOD) 유사활성

SOD 유사활성의 측정은 Marklund와 Marklund의 방법을 변형한 Kim 등(24)의 방법을 이용하여 실시하였다. 즉, 각 추출물을 감압 농축한 후 tris-HCl buffer (50 mM tris [hydroxymethyl]amino-methane+10 mM EDTA, pH 8.5)를 이용하여 pH 8.5로 조절된 시료액을 만들었다. 각 시료 0.2 mL에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer (50 mM tris [hydroxymethyl]amino-methane+10 mM EDTA) 3 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 가하고 25°C에서 10분간 방치 후 1 N HCl 1 mL로 반응을 정지시킨 후 분광광도계(Ultaspec 2100pro, Amersham Co, Sweden)를 이용하여 420 nm에서의 흡광도를 측정하여 시료 첨가 및 무 첨가구간의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

$$SOD \text{ 유사활성}(\%) = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

- A : 추출물 첨가구의 흡광도
 - B : 추출물 무첨가구의 흡광도
- 단, A, B는 대조구의 흡광도를 제외한 수치임.

최적 추출조건 예측

조건별 추출물의 최적 추출조건 예측은 품질특성에 대한 contour map superimposing 했을 때 중복되는 부분의 범위에서 최적 추출조건 범위를 설정하였다. 또한 예측된 범위에서 임의의 중심점을 최적조건으로 예측하고, 각 회귀식에 대입하여 예측 값을 설정하였다.

결과 및 고찰

수율의 변화

중심합성계획에 의해 각 요인변수에 따른 반응변수들 즉, 수율(Y₁), 총폴리페놀 함량(Y₂), caffeic acid함량(Y₃), 전자공여능(Y₄), 아질산염소거능(Y₅) 및 SOD유사활성(Y₆)에 대한 회귀식과 반응표면분석에 의해 최적추출조건을 예측하였다. 이들 회귀식에서 요인변수들 중 영향이 가장 적은 것으로 나타난 추출온도를 76.4°C로 고정하여 반응표면을 나타내었다.

수율의 결과는 Table 3에 나타내었으며, 각각의 결과를 이용한 반응표면 회귀식은 Table 4에 나타내었다. 수율에 대한 회귀식의 R²는 0.8676이고 5%이내의 유의수준에서

Table 3. Experimental data on yield, total polyphenol, caffeic acid content, electron donating ability, nitrite-scavenging ability and superoxide dismutase (SOD)-like activity of mate by central composite design for response surface analysis

Exp. number ¹⁾	Yield (%)	Total Polyphenol (mg/mL)	Caffeic acid (µm/mL)	Electron donating ability (%)	Nitrite-scavenging ability (%)			SOD-like activity (%)
					pH 1.0	pH 3.0	pH 4.2	
1	2.82	14.347	52.12	83.529	94.528	86.028	50.712	30.351
2	2.99	15.519	58.055	85.661	95.694	87.923	51.856	32.380
3	3.18	8.194	46.13	78.870	87.639	79.176	42.709	18.635
4	3.03	8.820	52.51	81.159	86.944	70.834	30.044	33.764
5	1.98	9.129	34.4	80.035	88.694	78.709	44.468	11.070
6	2.40	11.059	38.95	83.210	89.417	79.503	48.318	12.823
7	1.60	10.625	25.76	84.894	93.056	74.310	35.585	16.513
8	1.61	11.185	32.7	85.235	94.444	76.594	32.419	13.007
9	1.80	11.742	40.91	87.494	95.139	78.878	44.732	20.203
10	2.61	11.527	39.64	86.002	95.694	83.347	48.690	23.524
11	4.82	21.534	68.15	84.830	97.139	76.892	50.800	40.683
12	1.80	8.141	34.47	81.184	89.167	75.402	36.376	9.410
13	1.80	11.883	36.31	80.361	83.611	83.843	31.715	8.856
14	0.40	3.807	20.28	72.913	84.694	55.045	24.063	0.613
15	1.79	11.969	31.25	81.770	92.583	83.049	41.653	12.269
16	4.75	18.059	66.17	84.126	95.722	76.792	51.530	40.775

¹⁾The number of experimental condition by central composite design.

Table 4. Polynomial equations calculated by RSM program for extraction conditions of mate

Response	Second order Polynomials	R ²	Significance
Yield	$Y_Y = 10.375625 + 0.082492X_1 - 0.128792X_2 - 0.538792X_3 - 0.000442X_1^2 - 0.000243X_1X_2 + 0.001183X_2^2 - 0.001570X_1X_3 + 0.000683X_2X_3 + 0.011050X_3^2$	0.8676	0.0433
Total polyphenol	$Y_{TP} = 56.687708 - 0.164842X_1 - 0.410667X_2 - 2.475717X_3 - 0.001516X_1^2 - 0.000639X_1X_2 + 0.003755X_2^2 + 0.014474X_1X_3 + 0.001153X_2X_3 + 0.032030X_3^2$	0.8422	0.0682
Caffeic acid content	$Y_{CA} = 128.216389 + 0.338663X_1 - 0.847951X_2 - 5.961438X_3 - 0.004792X_1^2 + 0.000945X_1X_2 + 0.009372X_2^2 - 0.003355X_1X_3 - 0.0013750753X_2X_3 + 0.110350X_3^2$	0.9502	0.0029
Electron donating ability	$Y_{EDA} = 54.767861 + 0.098609X_1 + 0.676376X_2 + 0.752979X_3 - 0.004044X_1^2 - 0.000892X_1X_2 - 0.004222X_2^2 + 0.016045X_1X_3 - 0.001508X_2X_3 - 0.037410X_3^2$	0.8842	0.0304
Nitrite-scavenging ability	pH 1.2 $Y_{pH1.2} = 98.007368 - 0.023887X_1 + 0.184761X_2 - 0.712892X_3 - 0.004644X_1^2 - 0.000399X_1X_2 - 0.001404X_2^2 + 0.025028X_1X_3 + 0.002733X_2X_3 - 0.022635X_3^2$	0.9215	0.0105
	pH 3.0 $Y_{pH3.0} = 92.883639 + 0.101486X_1 - 0.065718X_2 - 0.100137X_3 - 0.004667X_1^2 - 0.002916X_1X_2 - 0.001324X_2^2 + 0.016633X_1X_3 + 0.015875X_2X_3 - 0.049655X_3^2$	0.8729	0.0389
	pH 4.2 $Y_{pH4.2} = 41.329618 + 0.928676X_1 - 0.005335X_2 - 0.866896X_3 - 0.007529X_1^2 - 0.006942X_1X_2 - 0.000133X_2^2 + 0.005033X_1X_3 + 0.020342X_2X_3 - 0.031230X_3^2$	0.8430	0.0673
SOD-like activity	$Y_{SOD} = 37.679965 + 0.143114X_1 + 0.128526X_2 - 1.575746X_3 - 0.006852X_1^2 + 0.002614X_1X_2 + 0.005176X_2^2 + 0.015959X_1X_3 - 0.031518X_2X_3 + 0.031830X_3^2$	0.9205	0.0109

*X₁: ethanol concentration (%), X₂: extraction temperature (°C), X₃: ratio of solvent to sample content (mL/g)

유의성이 인정되었다. 16개 구간에서의 추출조건에 따른, 수율의 최대값은 4.82%이었고, 각각의 추출조건에 따른 수율에 대한 반응표면 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 즉 시료에 대한 용매비보다는 에탄올 농도에 많은 영향을 받는

것으로 나타났다. 이러한 결과는 Park 등(25)의 산국 에탄올 추출물의 가용성 고형분 함량이 시료에 대한 용매비와 추출 시간의 영향보다는 에탄올 농도에 의해 영향을 많이 받고 있다는 보고와 같은 경향을 나타내었다.

총 폴리페놀함량 및 caffeic acid 함량의 변화

항산화작용을 가지는 폴리페놀류에는 caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid, p-coumaric acid, syringic acid 및 vanilic acid 등이 있으며, phenolic hydroxyl 그룹 때문에 단백질 또는 효소단백질, 기타 거대분자들과 결합하는 성질이 있다. 중심합성계획에 의한 mate 에탄올 추출조건별 총 폴리페놀함량은 Table 3에서와 같이 3.807~21.534 mg/mL의 범위였으며, 결과에 대한 반응표면 회귀식의 R^2 는 0.8422로 10%이내의 유의수준에서 인정되었다(Table 4). 각각의 추출조건에 따른 총 폴리페놀함량에 대한 반응표면 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 즉 추출온도보다는 시료에 대한 용매비와 에탄올 농도에 많은 영향을 받을 수 있었다. Park 등(26)의 메틸 새싹 에탄올 추출조건 연구에서 총 폴리페놀함량은 추출온도에 비하여 에탄올 농도가 더 큰 영향을 준다는 보고와 유사한 경향을 나타내었다. Mate는 다양한 폴리페놀과 quercetin, kampferol, rutin과 같은 플라보노이드 등 다량의 phytochemical을 함유하고 있으며, 주요 생리활성 성분중 하나인 caffeic acid는 항산화, 항염증, 항돌연변이 및 항암활성 등이 우수하다고 보고되고 있다(13,27). Mate 에탄올 추출조건별 caffeic acid함량은 Table 3에서와 같이 20.28~68.15 $\mu\text{g/mL}$ 의 범위였으며, 결과에 대한 반응표면 회귀식의 R^2 는 0.9502로 1%이내의 유의수준에서 인정되었다(Table 4). 시료에 대한 용매비가 낮을수록 에탄올농도 40~50%에서 가장 높음을 확인하였다(Fig. 1). Lee 등(28)은 품종별 들깨잎 열수추출물의 caffeic acid함량 비교에서 생물 100 g 기준으로 0.11~0.87 mg이 함유되어 있다고 보고하였다. Mate 에탄올 추출물의 추출조건에 대한 영향은 에탄올 농도와 추출온도 보다는 용매비에 크게 영향을 받고 있는 것으로 나타났다(Table 5).

정은 DPPH 라디칼 소거법으로 측정하며, DPPH법은 tocopherol, ascorbate, flavonoid 화합물, 방향족 아민류, Maillard형 갈변 생성물질, peptide 등의 항산화 활성을 나타내는 생리활성 물질에 의해 환원됨으로서 짙은 자색이 발색되는 정도에 따라 항산화 효과를 수소공여능으로 측정하는 방법으로 알려져 있다(29).

Mate 에탄올 추출조건에 따른 전자공여능은 Table 3에 나타내었으며, 전자공여능 변화에 대한 반응표면은 Fig. 1에 나타내었다. 추출조건에 있어 시료에 대한 용매비, 에탄올 농도, 추출온도에 따른 전자공여능의 변화에 대한 반응표면 회귀식은 Table 4와 같으며, 전자공여능에 대한 회귀식의 R^2 는 0.8842로 5%이내의 유의수준에서 유의성이 인정되었다. Mate 추출물의 추출조건에 대한 영향은 에탄올 농도에 크게 영향을 받고 있는 것으로 나타났다(Table 5). 이러한 결과는 Yoon 등(30)의 복분자 추출조건에서 전자공여능이 에탄올 농도에 의해 크게 영향을 받고 있다는 보고와 같은 경향을 나타내었으며, 최대값을 나타내는 에탄올 농도가 30~40%로 유사한 경향이였다.

아질산염 소거능의 변화

아질산염은 니트로사민의 전구체인 nitrous anhydride (N_2O_3)와 같은 활성 니트로소화 물질을 생성하고, 이 nitrous anhydride가 2차 아민과 결합하여 발암물질인 N-nitrosamine을 생성하는 것으로 알려져 있다(31,32). Kang 등(33)은 방향족 화합물인 polyphenol 화합물이 아질산염을 효과적으로 분해하여 발암성 nitrosamine의 생성을 억제한다고 보고하였다. 이들은 니트로사민 생성의 기질인 아민과 경쟁적으로 작용하며, 생성억제 정도는 상호간의 농도 및 pH에 의해 영향을 받는다. 최근에는 니트로사민 생성억제 인자의 함량이 높은 천연추출물에서 아질산염 소거능에 대한

Table 5. Regression analysis for regression model of physiochemical properties in extraction condition of mate

Extract condition	F-Ratio							
	Yield	Total polyphenol	Caffeic acid	Electron donating ability	Nitrite-scavenging ability			SOD-like activity
					pH 1.2	pH 3.0	pH 4.2	
Ethanol concentration	1.37	3.18	3.79*	10.49**	14.12***	9.26**	5.84**	3.11
Extraction temperature	2.15	1.04	6.54**	1.74	0.46	0.52	0.63	3.47*
Ratio of solvent to sample content	4.81**	3.59*	15.03***	3.20*	6.44**	1.24	1.22	9.07**

*Significant at 10% level ; ** significant at 5% level ; *** significant at 1% level

전자공여능의 변화

전자공여능은 활성 라디칼에 전자를 공여하고 식품 중의 지방질 산화를 억제하는 목적으로 사용되며, 인체 내에서는 활성 라디칼에 의한 노화를 억제시키는 작용으로 이용되고 있다(13). 라디칼 소거작용은 인체의 질병과 노화를 방지하는데 대단히 중요한 역할을 한다. 따라서 전자공여능 측

연구가 이루어지고 있다.

추출조건에 따른 아질산염 소거능은 Table 3에 나타내었다. pH가 낮을수록 아질산염 소거능이 증가하였으며, 시료에 대한 용매비와 추출온도의 영향은 뚜렷하게 나타나지 않았으나 에탄올 농도가 증가할수록 아질산염 소거능은 낮아짐을 알 수 있었다. pH에 따른 아질산염 소거능에 대한

추출물의 회귀식을 Table 4에 나타내었다. 아질산염 소거능에 대한 회귀식의 R²는 pH 1.2, 3.0 및 4.2가 각각 0.9215, 0.8729 및 0.8430이고, 10%이내의 유의수준에서 유의성이 인정되었다. pH 조건에 따른 mate의 아질산염 소거능에서 최대점을 보인 pH 3.0 (Fig. 1)에서는 시료에 대한 용매비가 낮고, 에탄올 농도가 감소할수록 아질산염 소거능이 증가하였다. Table 5에서 보는 바와 같이 아질산염 소거능에 대한 추출조건의 영향은 pH 조건별 에탄올 농도가 가장 영향이 큰 것으로 나타났다. Noh 등(31)은 미나리과 산채 추출물의 아질산염 소거능이 pH가 낮을수록 높다고 보고

하였고, Lee 등(34)은 차류, 약용 식물류, 해조류, 채소류 및 과실류의 아질산염 분해작용이 pH 1.2에서 가장 크다고 보고한 바 있으며 그 외 많은 연구에서도 낮은 pH에서의 아질산염 소거능이 우수함을 알 수 있었다. 아질산염과 아민류가 반응하여 결합된 발암성 니트로사민은 강산성 조건 특히 인체나 동물 위내의 pH 조건에서 용이하게 생성되므로 마메 에탄올 추출물이 강산성 조건하에서 아질산염 분해능이 크다는 사실은 위내에서 니트로사민의 생성억제에 기여하리라 생각된다.

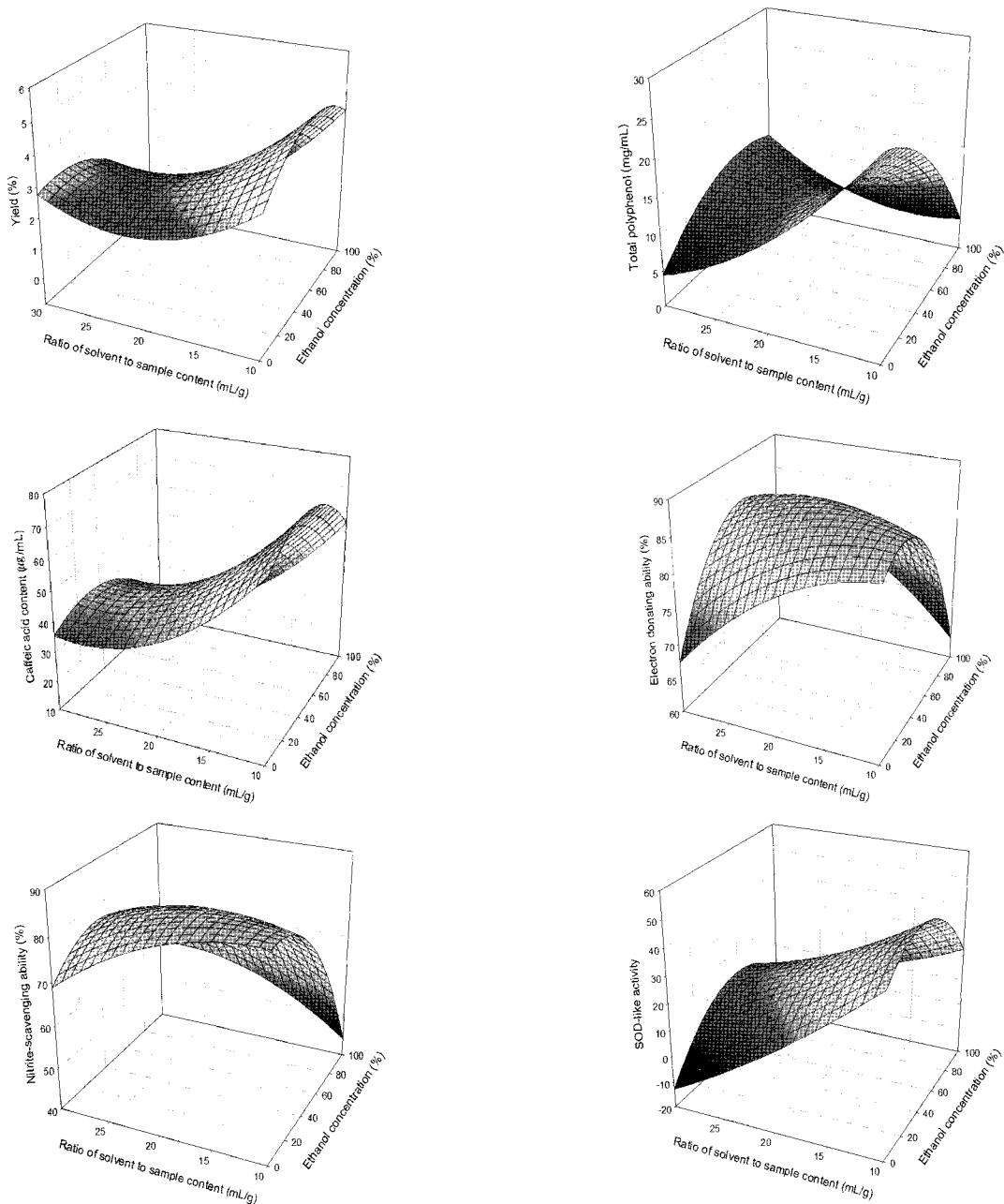


Fig. 1. Response surface for the effects of extraction conditions on yield, total polyphenol, caffeic acid content, electron donating ability, nitrite scavenging activity, and SOD-like ability of mate (*Ilex paraguarensis*) by ethanolic extraction.

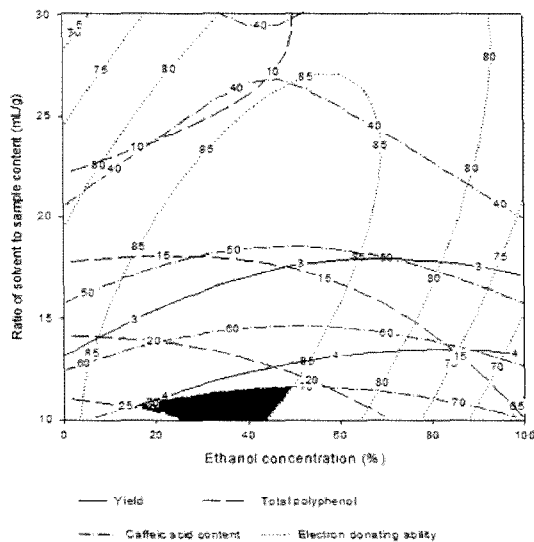


Fig. 2. Superimposing contour map of optimized conditions for the yield, total polyphenol, caffeic acid content, and electron donating ability of mate (*Ilex paraguarensis*) as functions of extraction concentration, solvent ratio and extraction temperature (76°C) by ethanolic extraction.

Table 6. Optimum extraction condition for response variables yielding the optimum response by superimposing of the response surface

Extraction conditions	Optimum ranges	Optimum condition
Ethanol concentration (%)	21 ~ 48	35
Extraction temperature (°C)	76.4	76
Ratio of solvent to sample content (mL/g)	10 ~ 14	12

SOD 유사활성

SOD는 생체 내에서 O₂ (superoxide) 소거에 관여하는 효소(35)로서 생성된 활성 산소는 생체 내에서 산화적 장애를 초래하게 되므로 이런 현상을 억제하기 위해 SOD 유사활성을 지닌 천연물 소재를 개발하는데 연구가 이루어지고 있다. 추출조건에 따른 SOD 유사활성은 Table 3에 나타내었으며 에탄올 농도 및 추출온도에 따른 영향보다는 용매비에 많은 영향을 받음을 알 수 있었다. SOD 유사활성에 대한 추출물 회귀식은 Table 4와 같다. SOD 유사활성에 대한 회귀식의 R²는 0.9205으로 5%이내에서 유의수준이 인정되었다. SOD 유사활성에 대한 반응표면은 Fig 1과 같으며 30-50%의 에탄올 농도에서 용매비에 주로 영향을 받기 때문에 나타났다. 추출조건의 영향은 Table 5에서와 같이 시료에 대한 용매비와 추출온도에 영향을 받고 있는 것으로 나타났으며, 에탄올 농도에 대한 영향은 미비하였다.

최적 추출조건의 예측

Mate의 추출조건을 최적화하기 위하여 추출물의 특성인

조건별 추출물의 수율, 총 폴리페놀함량, caffeic acid함량, 전자공여능에 대해 contour map을 superimposing하여 최적 추출조건 범위를 예측하였다. Fig. 2에서와 같이 반응표면이 중복된 부분의 범위는 추출물의 품질특성(반응변수, Y₁~Y₄)을 대상으로 하였을 경우 에탄올 농도 21~48%, 추출온도 76.4°C, 시료에 대한 용매비가 10~14 mL/g이었으며, 최적조건은 에탄올 농도 35%, 추출온도 76°C, 용매비는 12 mL/g이었다.

요 약

본 실험은 반응표면분석법을 이용하여 mate 에탄올 추출물의 이화학적 특성을 모니터링 하였다. 추출조건에 따른 수율 및 총 폴리페놀함량의 최대값은 예측된 정상점에서 능선분석을 실시하여 본 결과, 4.74%와 21.10 mg/mL이었다. 추출조건별 caffeic acid함량은 20.28~68.15 µg/mL의 범위였으며, 결과에 대한 반응표면 회귀식의 R²는 0.9502로 1%이내의 유의수준에서 인정되었는데, 시료에 대한 용매비가 낮을수록 에탄올 농도 40~50%에서 가장 높음을 확인하였다. 전자공여능에 대한 회귀식의 R²는 0.8842로 5%이내의 유의수준에서 유의성이 인정되었으며, 에탄올 농도에 크게 영향을 받고 있는 것으로 나타났다. 추출조건에 따른 아질산염 소거능은 pH가 낮을수록 아질산염 소거능이 증가하였으며, 시료에 대한 용매비와 추출온도의 영향은 뚜렷하게 나타나지 않았으나 에탄올 농도가 증가할수록 아질산염 소거능은 낮아짐을 알 수 있었다. SOD 유사활성은 에탄올 농도 및 추출온도에 따른 영향보다는 용매비에 많은 영향을 받음을 알 수 있었다. 추출물의 특성인 조건별 추출물의 수율, 총 폴리페놀함량, caffeic acid함량, 전자공여능에 대해 contour map을 superimposing하여 얻은 최적 추출조건의 범위는 에탄올 농도 21~48%, 추출온도 76.4°C, 시료에 대한 용매비가 10~14 mL/g으로 예측되었다.

감사의 글

본 연구는 2010년도 대구가톨릭대학교 특성화사업 지원에 의한 것으로 감사드립니다.

참고문헌

1. Koh YJ, Cha DS, Choi HD, Park YK, Choi IW (2008) Hot water extraction optimization of Dandelion leaves to increase antioxidant activity. Korean J Food Sci Technol, 40, 283-289
2. Halliwell B, Aruoma OJ (1991) DNA damage by

- oxygen-derived species. FEBS Lett, 281, 9-19
3. Jennings PE, Barnett AH (1988) New approaches to the pathogenesis and treatment of diabetic microangiopathy. Diabetic Med, 5, 111-117
 4. Fridovich I (1989) Superoxide dismutase an adaption to paramagnetic gas. J Biol Chem, 264, 7761-7762
 5. Jacques RA, Oliveira AP, Arruda EJ, Oliveira LC, Oliveira JV, Dariva C, Caramao EB (2007) Extraction of purine alkaloids from Maté (*Ilex Paraguariensis*) using supercritical CO₂. J Agric Food Chem, 55, 7510-7516
 6. Katia HK, Alexandre TC, Eloir PS, Grace G, Dominique G (1996) Mate saponin 5, a highly polar saponin from *ILEX Paraguariensis*. Phytochemistry, 42, 1119-1122
 7. Rosangela AJ, Claudio D, Jose, VO, Elina BC (2008) Pressurized liquid extraction of mate tea leaves. Anal Chim Acta, 625, 70-76
 8. Manuella L, Frank SB, Bruna RS, Aline CB, Vera Lucia GK, Luis CP, Samuel SV (2008) Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. Nutrition, 24, 375-381
 9. Heck CI, Mejia EG (2007) Yerba mate tea (*Ilex Paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological consideration. J Food Sci, 72, 138-151
 10. Jack LA, Li XC, Chowdhury FH, Dale GN, David MS, Paul M, Baskaran G, Josh D, Kristin RL, Ping Q (2005) Naturally occurring proteasome inhibitors from mate tea (*Ilex Paraguariensis*) serve as models for topical proteasome inhibitors. J Invest Dermatol, 125, 207 - 212
 11. Hong JH (2010) Quality characteristics of fermented Mate (*Ilex paraguarensis*) leaf tea. Korean J Food Preserv, 17, 500-506
 12. Rosana F, Silvina BL, Graciela F, Cesar GF (2000) Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. Nutrition Res, 20, 1437-1446
 13. Euclides LC, Osvaldo FF, Lucio CF, Maria LLF, Carmen MD, Jose AS (2007) Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St Hil) progenies grown in Brazil. J Food Composition & Analysis, 20, 553-558
 14. Claudia A, Graciela F, Rosana F (2006) Peroxidase-like activity of *Ilex Paraguariensis*. Food Chem, 97, 459-464
 15. Kim HK, Do JR, Hong JH, Lee GD (2005) Optimization of extraction conditions for cabbage. J. Korean Soc Food Sci Nutr, 34, 1625-1632
 16. Kim JO, Kwon ST, Lee GD, Hong JH, Moon DH, Kim TW, Kim DI (2008) Optimization of extraction condition on fig (*Ficus carica* L.) by response surface methodology. Korean J Food Preserv, 15, 66-73
 17. Gontard N, Guilbert S, Cuq JL (1992) Edible wheat gluten films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. J Food Sci, 57, 190-196
 18. Lee GD, Lee JE, Kwon JH (2000) Application of response surface methodology in food industry. Food and Industry, 33, 33-45
 19. SAS (1990) SAS User's Guide. Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC, USA
 20. Official methods of analysis of the AOAC (1990) Fifteenth edition. USA, p 1010-1011
 21. Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Viticult, 16, 144-158
 22. Lee EJ, Kim JS, Kwon JH (2008) Optimization of microwave-assisted extraction conditions for total catechin and electron donating ability of grape seed extracts. Korean J Food Preserv, 15, 840-846
 23. Gray JI, Dugan Jr LR (1975) Inhibition of N-nitrosamine formation in model food system. J Food Sci, 40, 981-984
 24. Kim SM, Cho YS, Sung SK (2001) The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts. Korean J Food Sci Technol, 33, 626-632
 25. Park NY, Lee GD, Jeong YJ, Kwon JH (1998) Optimization of extraction conditions for physicochemical properties of ethanol extracts from *Chrysanthemum boreale*. J Korean Soc Food Sc. Nutr, 27, 585-590
 26. Park KJ, Lim JH, Kim BK, Jeong JW, Kim JC, Lee MH, Cho YS, Jung HY (2009) Optimization of extraction conditions to obtain functional components from buckwheat (*Fagopyum esculentum* M.) sprouts, using response surface methodology. Korean J Food Preserv, 16, 734-741
 27. Chung MJ, Paul AW, Christer H (2006) Dietary phenolic antioxidants, caffeic acid and trolox, protect rainbow trout gill cells from nitric oxide-induced apoptosis. Aquatic Toxicology, 80, 321-328
 28. Lee HS, Lee HA, Hong CO, Yang SY, Hong SY, Park SY, Lee HJ, Lee KW (2009) Quantification of caffeic acid and rosmarinic acid and antioxidant activities of hot-water extracts from leaves of *Perilla frutescens*. Korean J Food Sci Technol, 41, 302-306
 29. Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature, 26, 1199-1204

30. Yoon SR, Jeong YJ, Lee GD, Kwon JH (2003) Changes in phenolic compounds properties of Rubi Fructus extract depending on extraction conditions. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 32, 338-345
31. Noh KS, Yang MO, Cho EJ (2002) Nitrite scavenging effect of *Umbelliferaeaceae*. *Korean J Soc Food Cookery Sci*, 18, 8-12
32. Davies R, Massey RC, McWeeny DJ (1980) The catalysis of the N-nitrosamine of secondary amines by nitrosophenols. *J Food Chem*, 6, 115-122
33. Kang YH, Park YK, Lee GD (1996) The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean J Food Sci Technol*, 28, 232-239
34. Lee SJ, Chung MJ, Shin JH, Sung NJ (2000) Effect of natural plant components on the nitrite-scavenging. *J Food Hyg Safety*, 15, 88-94
35. Kim SM, Kim EJ, Cho YS, Sung SK (1999) Antioxidant of pine extracts according to preparation method. *Korean J Food Sci Technol*, 31, 527-534

(접수 2010년 11월 26일 수정 2011년 4월 20일 채택 2011년 4월 29일)