

## Establishment of hot water extraction conditions for optimization of fermented *Smilax china* L. using response surface methodology

Jae-Won Kim<sup>1</sup>, Sang-Il Lee<sup>2</sup>, Ye-Kyung Lee<sup>3</sup>, Seung Hwan Yang<sup>3</sup>, Soon-Dong Kim<sup>3</sup>,  
Joo-Won Suh<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyeongsan 712-702, Korea

<sup>2</sup>Department of Food, Nutrition and Cookery, Keimyung College, Daegu 704-703, Korea

<sup>3</sup>Division of Bioscience and Bioinformatics, College of Natural Science, Myongji University, Yongin 449-728, Korea

### 반응표면분석에 의한 발효 청미래덩굴(*Smilax china* L.) 잎 열수 추출조건의 최적화

김재원<sup>1</sup> · 이상일<sup>2</sup> · 이예경<sup>3</sup> · 양승환<sup>3</sup> · 김순동<sup>3</sup> · 서주원<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>대구가톨릭대학교 식품공학전공, <sup>2</sup>계명문화대학 식품영양조리학부

<sup>3</sup>명지대학교 생명과학정보학부

#### Abstract

In this study, we investigated the contents of total polyphenol (TP), total flavonoid, and absorbance at 475 nm (OD<sub>475</sub>) which may produced in solid-fermented leaf of *Smilax china* L. by *Aspergillus oryzae* as a new functional components with reddish brown color; contents of water soluble substance (WSS), electron donating ability (EDA), Hunter L\*, a\*, b\* values, sensory overall acceptability (OA) and also, the inhibitory activities (XOI and AOI) against partial purified xanthine oxidase (XO) and aldehyde oxidase (AO) from rabbit liver which were well known to relate the gout, and alcoholic liver disease, respectively in order to optimize water extraction using response surface methodology (RSM). All the R<sup>2</sup> values of the second-order polynomials ranged from 0.85 to 0.98, except for the EDA (0.69) and the XOI (0.78). However, the activities of the EDA and XOI were relatively high in the lower concentration of the fermented *Smilax china* L. leaf. The effects on the water extraction were highest in the concentration, among the dependent variables, and showed significant differences at the 1% level in the TP, TF and WSS contents and the a\*, b\* and OD<sub>475</sub> values, but the OA showed significant differences at the 5% level. The optimal values of AOI, which was the most important functionality in the *Smilax china* L. that was predicted via RSM, were 59.48% at the 2.19% concentration, a 90.02°C extraction temperature and a 4.03 minute extraction time (R<sup>2</sup>: 0.93, p<0.007). The ranges of all the dependent variables of the optimal water extraction were 1.6~1.8% for the concentration, 83~93°C for the temperature and 3.4~4.4 minutes for the extraction time; and the optimal water extraction conditions were a 1.7% concentration, an 88°C extraction temperature and a 3.9-min extraction time.

**Key words :** *Smilax china* L., *Aspergillus oryzae*, response surface methodology, water extraction conditions, xanthine and aldehyde oxidase.

#### 서 론

청미래덩굴(*Smilax china* L.)은 우리나라를 비롯한 중국, 일본 등의 산야에 널리 분포하는 백합과 (*Liliaceae*)의 활엽 덩굴성 관목으로 망개나무, 산귀래, 명감나무 등 다양한

별명이 있으며 한의학에서 토복령으로 불리는 청미래덩굴의 뿌리는 위암, 식도암, 직장암, 식욕부진, 구토증 등 소화기 질환에 민간요법으로 사용해 왔으며 이노, 체력증강, 통풍, 류머티즘에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다(1). 청미래덩굴의 어린잎은 나물로 이용되며, 노잎은 떡을 찌 때 포장해서 만드는 망개떡제조에 사용한다(1,2). 최근 청미래덩굴의 잎에서 α-tocopherol 수준의 높은 항산화활성을 지니는 kaempferol-7-O-α-L-rhamnopyrano side와 kaempferol-3,

\*Corresponding author. E-mail : jwsuh@mju.ac.kr  
Phone : 82-31-330-6190, Fax : 82-31-336-0870

7-O- $\alpha$ -L-dirhamno-pyranoside가 분리된 바 있다(3). 주성분은 triterpenoid saponins, flavones, stilbenes 및 organic acids 등(4)으로 한의에서는 주로 뿌리를 통풍치료(1,5)에 사용되며 해독(4), 항염, 항암 및 항산화효과(5,6)가 알려져 있다. 통풍은 관절염의 원인이 되는 대사성질환의 일종으로 노산(uric acid)의 과잉생성 또는 배설저하로 유발된 고 노산혈증으로 인하여 노산의 결정체가 관절부위에 축적되어 발생하는 염증으로 반복적으로 통증을 일으키는 질환이다(7). 노산은 purine 염기의 최종 대사산물로 xanthine oxidoreductase (XOR)에 의하여 xanthine으로부터 생성된다. XOR은 xanthine dehydrogenase(XD)와 xanthine oxidase(XO)로 구분되며 정상적인 생리상태에서는 XD로 작용하나 병리적인 상태에서는 XO로 되어 그 활성이 증가함으로써 과잉의 노산을 생성함으로써 활성산소 생성계 효소인 동시에 통풍과도 관련이 있다(8). Aldehyde oxidoreductase(AOR)는 XOR과 아주 유사한 효소로 aldehyde dehydrogenase(AD)와 aldehyde oxidase(AO)로 작용하며 간, 폐 및 신장 등의 세포질에 다량으로 존재하며 활성산소 생성계 효소(9,10)의 하나로 항암제(methotrexate)와 항바이러스제(famciclovir)와 같은 약물을 포함하는 aldehyde 및 질소함유 heterocyclic 화합물의 산화에 관여한다(11,12). 또, electron donors가 존재할 경우에는 nitrosamines, azo 염료, 방향족 nitro화합물과 같은 독성물질의 환원에 관여함으로써 해독(13,14)과 다중 약물에 대한 저항성 극복에도 관여 한다(15). 그러나 한편으로는 알코올성 간 손상을 유도하며(16), 고지방식이에 의한 지방간 생성을 촉진 한다(17). 최근, AO의 mRNA가 피하지방조직에 비하여 복부비만조직(visceral adipose tissue)에서 더욱 높게 발현된다는 사실이 보고되고 있어(18) 비만조절, 간 손상예방 및 항암제 개발에 대한 표적효소(19,20)로 관심이 커지고 있으며 특히 병리적 상태에서 XO와 함께 간 손상에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 발효 청미래덩굴잎 물 추출물에서 주요 기능성 성분으로서 사료되는 flavonoid의 함량이 증가하는 결과(21)를 근거로 하여 우리나라의 전통발효식품 제조에 널리 사용되고 있는 안전성이 검증된 미생물인 *Aspergillus oryzae*(22,23)로 발효시킨 발효 청미래덩굴잎을 제조하였으며, 기능성 차 또는 음료로 사용하기 위한 물 추출조건(농도, 추출온도 및 시간)을 최적화하기 위하여 total polyphenol (TP) 및 total flavonoid(TF) 함량, 색상, 수용성 고형물의 양, 발효에 의하여 생성되는 색상물질의 함량(OD<sub>475</sub>), 전자공여능(EDA), xanthine oxidase(XOI) 및 aldehyde oxidase 저해활성(AOI)과 차로서의 종합적인 기호도를 반응표면분석을 통하여 최적화 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 균주

실험에 사용한 청미래덩굴(*Smilax china* L.)잎은 2012년

7월10일에 경기도 용인시의 야산에서 채취한 후 40℃의 열풍건조기에서 충분히 건조시킨 후 food mixer(HNF-1710, Hanil Electric Co., Ltd., Seoul, Korea)를 사용하여 40 mesh 입도로 분쇄하였으며, polyethylene film으로 밀봉하여 4℃에서 보관하면서 시료로 사용하였다. 효용 균주는 *Aspergillus oryzae* KFRI 995로서 한국종균협회에서 분양받아 malt extract 배지(Bacto™, Becton, Dickinson and Co., Sparks, MD, USA)를 사용하여 25℃에서 7일간 진탕배양한 후 균수를 10<sup>8</sup> CFU/mL로 조정하여 종균으로 사용하였다.

### 발효차 제조방법

청미래덩굴잎의 고상발효는 Fig. 1과 같이 행하였다. 즉, 수돗물로 깨끗이 세척한 후 다시 무균수로 2~3회 세척한 후 습기를 제거하였으며, 5 mm 내외크기로 잘라 40℃에서 건조시킨 후 40 mesh 입도로 분쇄하여 4℃에서 보존하면서 재료로 사용하였다. 발효는 보존중인 분말시료 1.5 kg에 종균배양액과 살균수를 혼합하여 3 L가 되게 조정된 액을 첨가하여 첨가한 총 수분함량이 67%가 되게 조정하였다. 종균 배양액은 재료 중량에 대하여 5%(v/w)를 첨가하였다. 이렇게 청미래덩굴잎 분말과 종균 및 물을 혼합한 후 플라 스틱 발효상자(가로 50×세로 70×높이 18 cm)에 두께

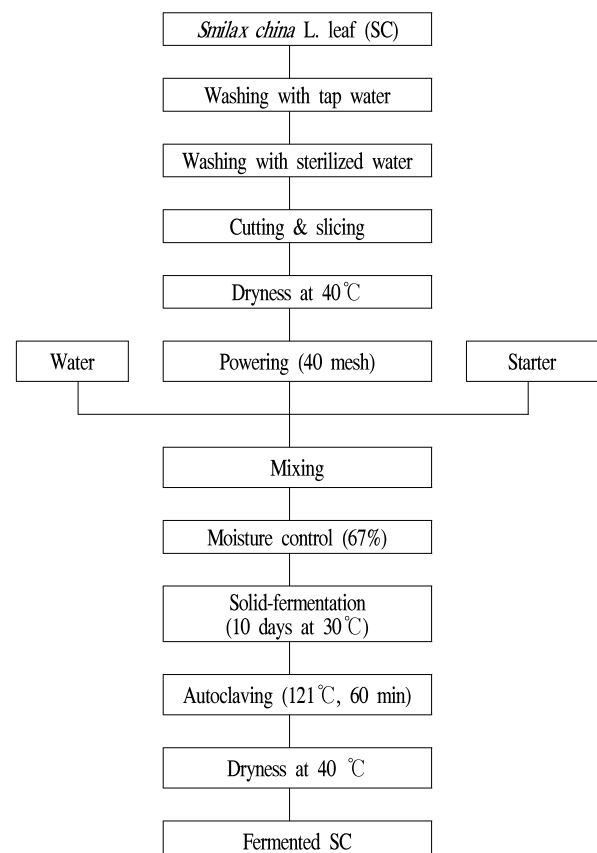


Fig. 1. Solid-fermentation procedures of *Smilax china* L. leaf by *Aspergillus oryzae*.

5 cm 내외로 담고 폴리에틸렌 필름으로 상부를 덮은 후 30°C에서 10일간 발효시켰다. 발효가 완료된 후는 polypropylene-bag에 담아 121°C에서 60분간 살균하였으며, 40°C에서 건조시켜 발효 청미래덩굴잎을 제조하였다.

### 추출방법

추출조건 설정을 위한 발효 청미래덩굴 잎의 추출은 다음과 같이 행하였다. 먼저 60~100°C 범위로 조정된 water bath상에 16개의 환류추출냉각장치를 설치하고 실험설계와 동일하게 추출용 증류수를 미리 60~100°C로 각각 조정하고, 시료는 0.5~2.5 g씩을 각각 준비하였다. 다음에 시료와 추출용의 증류수를 순차적으로 첨가하여 100 mL로 채운 후 온도와 시간을 체크하면서 시료농도와 추출온도 및 추출 시간을 달리한 추출액을 얻었다. 여과는 추출이 끝난 즉시 Whatman No. 2 여과지(Whatman International Ltd., Maidstone, England)를 사용하여 여액을 얻었으며 4°C에서 보관하면서 분석용 시료로 사용하였다.

### 추출조건 설정을 위한 실험계획

추출조건의 최적화를 위한 실험계획은 중심합성계획법(24)에 의하여 설계하였으며(Table 1), 반응표면분석은 SAS(Statistical Analytical System, Cary, NC, USA) program을 사용, 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)으로 최적 추출조건의 예측과 추출조건에 따른 추출물의 이화학적 특성을 조사하였다. 중심합성계획은 Table 1에서와 같이 독립변수(Xi)로 농도(X1), 추출온도(X2) 및 추출시간(X3)을 -2, -1, 0, 1, 2의 5단계로 부호화하였으며 Table 2에서와 같이 16개 구간으로 설정하여 실험하였다. 종속변수(Yn)로는 발효청미래덩굴잎 추출물의 특성과 주요 기능성을 고려하여 total polyphenol(TP) 함량(Y1), total flavonoid(TF) 함량(Y2), 색상(L\*, a\*, b\*, a/b(%)) (Y3-6), OD475(Y7), 수용성 고형물(WSS)의 함량(Y8), 전자공여능(EDA)(Y9), AO 및 XO 저해활성(AOI 및 XOI)(Y10,11), 종합적인 관능적 품질(OA)(Y12)로 정하여 측정하였다. 실험은 3회 반복으로 측정하여 평균값으로 나타내었으며 회귀분석에 사용하였다.

Table 1. Levels of extraction conditions

Xi	Extraction conditions	Levels				
		-2	-1	0	1	2
X1	Concentration (g/100 mL)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
X2	Extraction temperature (°C)	60	70	80	90	100
X3	Extraction time (min)	1	2	3	4	5

### 물 추출액의 색상과 OD475의 측정

발효청미래덩굴잎 물 추출액의 색상은 Chromameter (CR-200, Minolta Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 밝기를

나타내는 L\*(lightness), 적색도를 나타내는 a\*(redness) 및 황색도를 나타내는 b\*(yellowness) 값을 측정하였다. 이때 사용한 표준백판의 L\*, a\* 및 b\*값은 각각 94.50, 0.3132, 0.3203이었다. 열수추출액의 갈색도는 Recording Spectrophotometer (Cary Winuv, Varian, Seoul, Korea)를 사용하여 400~700 nm에서의 흡광도를 recording하여 얻어진 최대파장인 475 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

Table 2. Central composite design for response surface analysis

No <sup>1)</sup>	Independent variables					
	Concentration (g/100 mL)		Extraction temperature (°C)		Extraction time (min)	
1	2.0	(1)	90	(1)	4	(1)
2	2.0	(1)	90	(1)	2	(-1)
3	2.0	(1)	70	(-1)	4	(1)
4	2.0	(1)	70	(-1)	2	(-1)
5	1.0	(-1)	90	(1)	4	(1)
6	1.0	(-1)	90	(1)	2	(-1)
7	1.0	(-1)	70	(-1)	4	(1)
8	1.0	(-1)	70	(-1)	2	(-1)
9	2.5	(2)	80	(0)	3	(0)
10	0.5	(-2)	80	(0)	3	(0)
11	1.5	(0)	100	(2)	3	(0)
12	1.5	(0)	60	(-2)	3	(0)
13	1.5	(0)	80	(0)	5	(2)
14	1.5	(0)	80	(0)	1	(-2)
15	1.5	(0)	80	(0)	3	(0)
16	1.5	(0)	80	(0)	3	(0)

<sup>1)</sup>The number of experimental conditions by central composite design.

### 가용성 총고형물

60~100°C의 물 가용성 고형물(WSS)의 양은 추출액 100 mL을 50~60°C의 Rotary Evaporator(N-1200 Series, Sunilab Com., Busan, Korea)를 사용하여 증발, 건조시킨 후 무게를 측정하였다.

### Total polyphenol 및 total flavonoid 함량

Total polyphenol(TP) 함량은 Minussi 등(25)의 방법에 따라 물 추출액 100 µL에 2% sodium carbonate 2 mL와 50% Folin-Ciocalteu reagent 100 µL를 가한 후 720 nm에서 흡광도를 측정하였으며, gallic acid(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)의 표준검량선에 의하여 함량을 산출하였다. Total flavonoid(TF) 함량은 Meda 등(26)의 방법에 따라 물 추출액 1 mL에 2% aluminum chloride 1 mL와 50% 에탄올 1 mL를 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 다음 415 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준품 quercetin(Sigma-

Aldrich Co.)의 표준검량선에 의하여 함량을 산출하였다.

### 전자공여능

전자공여능 (electron donating ability: EDA)은 Blois(27)의 방법에 따라 물 추출액 0.2 mL에 0.4 mM DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) 용액 0.8 mL를 가하여 10분간 방치한 다음 520 nm에서 흡광도를 측정하였으며 계산식, 전자공여능(%)=[1-(시료흡광도/대조구 흡광도)]×100에 의하여 활성도를 산출하였다.

### Aldehyde oxidase 및 xanthine oxidase 저해활성

발효 청미래덩굴잎 열수추출액이 토끼 간 조직으로부터 부분 정제한 aldehyde oxidase(AO) 및 xanthine oxidase(XO)에 저해활성은 다음과 같이 측정하였다. 효소원으로 사용한 AO와 XO는 Rajagopalan 등(28)의 방법에 따라 토끼의 간 조직에 4 배량의 0.1 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)를 가하여 마쇄, 균질화 시킨 후 60°C에서 2분간 열처리하여 생성되는 침전물을 10,000g에서 원심분리하여 제거하였다. 얻어진 상등액은 30%이상 50%이하의 ammonium sulfate 포화용액에서의 침전물을 원심분리하여 얻은 후 동일 buffer에 현탁시키고 50% acetone용액에서의 침전물을 얻었으며, 투석막 (분자량 2,000이하를 제거)을 이용하여 12시간동안 투석한 후 원심분리하여 얻어진 상등액을 -70°C에서 보관하면서 효소원으로 사용하였다. XO 활성도는 Stirpe와 Della Corte(29)의 방법에 따라 기질 xanthine을 uric acid로의 전환을 정도를 %로 나타내었으며, AO 활성도는 Rajagopalan 등(28)의 방법에 따라 기질 NMN(N1-methyl nicotinamide)으로부터 산화된 pyridone의 흡광도를 300 nm에서 측정하는 다음 시료대신에 증류수를 첨가한 대조구에 대한 %로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

*A. oryzae*는 amylase, protease, cellulase 및 tannase와 같은 다양한 효소류를 생성하며 미국의 식품의약국안정청과 world health organization(WHO)에서 generally regarded as safe(GRAS)로 인정되고 있는 미생물(23)로 우리나라의 전통 발효식품의 제조에 널리 사용되고 있다. 또, *A. oryzae*는 조류나 소와 같은 동물의 장내에서 *Lactobacillus*속 미생물의 기질로 사용됨으로서 유해 세균류에 대한 항균작용을 높이고 소화를 증진하며 체내 콜레스테롤을 감소시키는 것으로 보고되고 있다(30). 본 연구자들은 선행연구에서 *A. oryzae*로 10일간 발효시킨 청미래덩굴잎에서 체내에서 활성산소종 생성계 효소로 작용하며 통풍 및 알코올성 비만과 관련이 있는 것으로 알려져 있는 XO와 AO에 대한 저해활성이 증진된다는 결과를 보고한 바 있다(31). 본 연구에서는 *A. oryzae*

로 발효시킨 청미래덩굴잎을 이용한 기능성 차 또는 음료 제조를 위하여 반응표면분석에 의한 물 추출조건을 확립하고자 하였다. 추출은 중심합성계획에 의한 16개 구간의 추출 조건에 따라 실험을 실시하였으며 얻어진 각 추출물에 대하여 TP 및 TF함량과 색상을 측정하였다. 또, 발효에 의하여 생성되는 새로운 색상 물질의 생성정도는 recording spectrophotometer를 이용하여 400~700 nm의 가시부 파장을 recording하여 얻은 최대흡광파장인 OD<sub>475</sub>(Fig. 2)를 측정하였으며 WSS 함량, 전자공여능, AO와 XO에 대한 저해활성 및 종합적인 기호도를 분석, 평가하여 Table 3에 나타내었다.

반응표면 회귀분석을 행하여 얻은 각 종속변수에 대한 regression coefficients는 Table 4에, 각 변수들에 대한 회귀 방정식과 그 결정계수(R<sup>2</sup>)는 Table 5에 나타내었으며, 유의성이 있는 추출조건에 대한 변수별 squares의 합은 Table 6에, 그리고 반응표면으로부터 예측되는 최적조건과 반응표면의 형태 및 유의성 정도는 Table 7에 나타내었다. 또한, 각 변수들에 대한 반응표면은 농도(%), 추출온도 및 추출시간을 독립변수로 하여 Fig. 3~7에, 각 변수들을 종합한 contour maps를 통하여 최적 추출조건에 대한 영역을 plot한 결과는 Fig. 8에 나타내었으며 이들 결과들을 종합한 최적 추출범위와 조건은 Table 8에 나타내었다.

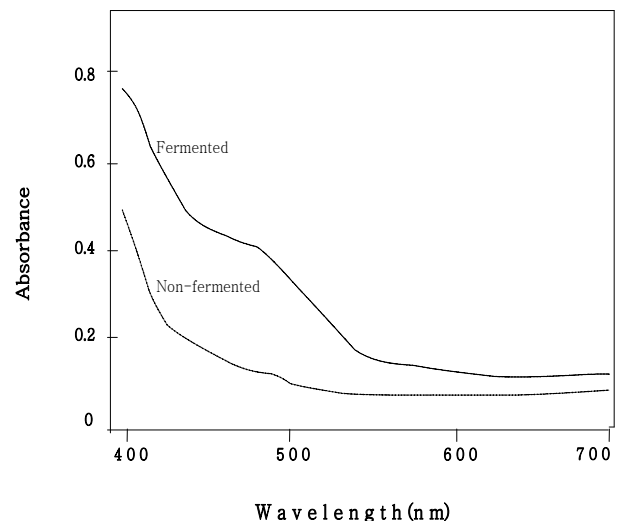


Fig. 2. Spectrophotograms of solid-fermented *Smilax china* L. leaf by *Aspergillus oryzae* water extracts.

### Total polyphenol 및 total flavonoid 함량

청미래덩굴의 잎에는 α-tocopherol 수준의 높은 항산화활성을 지니는 kaempferol-7-O-α-L-rhamnopyranoside와 kaempferol-3,7-O-α-L-dirhamno-pyranoside과 같은 glycoside 형태의 flavonoids 성분을 함유하며(3), 발효에 의하여 이들 결합이 분해되어 aglycone으로 분해됨과 동시에 산화, 중합되어 적갈색의 아름다운 색상을 생성 한다(31). Aglycone 형

**Table 3. Experimental data on physicochemical properties of hot water extracts in solid-fermented *Smilax china* L. leaf by *Aspergillus oryzae* under different conditions based on central composite design for response surface analysis**

No <sup>1)</sup>	TP <sup>2)</sup>	TF <sup>3)</sup>	L*	a*	b*	a/b(%)	OD <sub>475</sub>	WSS <sup>4)</sup>	EDA <sup>5)</sup>	AOI <sup>6)</sup>	XOI <sup>7)</sup>	OA <sup>8)</sup>
1	7.85 <sup>9)</sup>	3.26	52.89	3.24	43.11	7.51	0.67	54.21	76.36	51.72	31.25	3.0
2	7.75	3.01	53.02	3.17	38.87	8.15	0.61	49.35	77.14	38.73	17.79	3.3
3	7.28	2.93	55.76	2.97	33.49	8.86	0.53	30.44	75.89	32.31	25.48	4.1
4	6.89	2.13	55.67	2.79	30.09	9.27	0.48	38.83	79.00	30.07	16.35	3.7
5	4.99	2.68	55.86	2.56	24.97	10.25	0.41	33.17	74.65	28.44	14.90	3.3
6	4.39	2.56	57.64	2.45	20.77	11.79	0.33	26.70	72.01	6.37	7.21	2.6
7	4.17	2.71	57.66	2.37	20.70	10.19	0.32	25.89	72.32	0.05	6.25	2.4
8	3.72	1.78	57.23	2.60	23.60	11.01	0.37	29.93	72.56	10.45	23.56	2.7
9	8.69	3.93	52.83	3.25	45.42	7.15	0.71	57.44	75.74	54.28	26.92	2.6
10	3.71	1.94	57.99	2.24	11.49	19.49	0.22	17.80	53.65	0.03	15.38	2.0
11	5.69	3.77	55.84	2.90	33.47	8.66	0.53	42.88	74.34	30.05	22.12	3.6
12	5.06	1.79	56.05	2.50	23.68	10.55	0.39	31.55	71.23	25.71	17.31	3.0
13	6.24	3.44	54.86	3.11	36.15	8.60	0.57	46.11	71.38	38.57	14.90	3.9
14	5.27	2.56	56.99	2.88	23.63	12.18	0.38	30.74	71.07	17.14	21.63	2.8
15	5.98	2.33	54.88	3.02	34.14	8.84	0.54	43.69	72.78	34.28	24.04	4.3
16	6.05	2.67	55.05	2.85	32.83	8.68	0.52	42.07	70.30	30.22	23.71	4.1

<sup>1)</sup>The number of experimental conditions by central composite design.

<sup>2)</sup>TP: total polyphenol (mg/100 mL).

<sup>3)</sup>TF: total flavonoid (mg/100 mL).

<sup>4)</sup>WSS: water soluble substance (mg/100 mL).

<sup>5)</sup>EDA: electron donating ability (%/mL).

<sup>6)</sup>AOI: aldehyde oxidase inhibitory activity % (Reaction mixture: 0.1 mL of sample/3.30 mL).

<sup>7)</sup>XOI: xanthine oxidase inhibitory activity % (Reaction mixture: 0.2 mL of sample/3.55 mL).

<sup>8)</sup>OA: overall acceptability (scores).

<sup>9)</sup>Values are mean of triplicate determinations.

태의 polyphenol은 glycoside 형태의 것에 비하여 체내 주요 반응에서 쉽게 작용함으로서 더욱 높은 기능성을 가지는 것으로 알려져 있다(32). 청미래덩굴잎은 강한 항균력으로 떡의 보존을 증진시키기 위하여 예로부터 떡을 제조하는데 사용되어 왔으나 차나 음료로 이용할 경우 떫은맛이 강하여 이를 완화시킬 수 있는 필요성이 요구되었다. 이에 따라 본 연구자들은 청미래덩굴잎을 *A. oryzae*로 발효시킬 경우 total polyphenol(TP)의 함량은 감소하나 total flavonoid (TF)의 상대적 비율이 높아진다는 사실을 보고한 바 있다(31). *A. oryzae*를 포함하는 *Aspergillus*속 미생물은 amylase, protease와 같은 효소를 강력하게 분비할 뿐만 아니라 pectinase와 같은 식물체 세포벽성분의 분해에 관여하는 효소를 분비함으로서 발효를 통하여 세포벽과 강하게 결합하여 용출되기 어려운 기능성 성분들을 쉽게 가용화시킬 수 있으며(33), 떫은맛의 원인이 되는 gallotannins를 비롯한 gallic acid esters의 depside결합과 ester결합을 분해시키는 tannase를 분비함으로서 떫은맛을 감소시킬 수 있다(34). Polyphenol 성분의 함량이 높을수록 활성산소를 생성하는 과산화수소의 함량이 높다는 보고(35)가 있으나 다른 한편으로 polyphenol 성분은 높은 항산화 활성과 다양한 생리 활성을 나타내나(36), 발효에 의하여 생성되는 theaflavin

및 thearubigin과 같은 성분들도 새로운 기능성을 나타냄(31)으로써 세계적으로도 비 발효차에 비하여 발효차의 선호도가 높은 것으로 알려져 있다(37).

Table 3과 Fig. 3에서는 *A. oryzae*로 발효시킨 청미래덩굴잎의 차로서의 물 추출조건을 최적화하기 위하여 농도(0.5~2.5%), 추출온도(60~100°C) 및 추출시간(1~5 min)에 따른 물 추출물의 TP 및 TF 함량을 조사하였다. 그 결과 TP 및 TF 함량은 각각 3.71~8.69 mg% 및 1.94~3.93 mg%를 나타내었고, TP의 추출량이 높아질수록 TF의 추출량도 높아지는 경향을 보였으며, TP에 대한 TF의 함유율은 31~66% 범위를 나타내었다(Table 3). 최소오차방법에 의하여 이차다항회귀식의 계수와 회귀방정식 및 결정계수를 조사한 결과(Table 4, 5), TP와 TF의 결정계수는 0.920~0.972를 나타내었으며, 0.01~3%의 높은 유의성을 나타내었다. 추출수율에 미치는 영향은 TP는 농도 > 추출온도 > 추출시간 순으로 농도에 의한 영향이 컸으나 TF에서는 추출온도 > 농도 > 추출시간 순으로 온도에 의한 영향이 컸다(Table 6). 즉, TP와 TF의 추출수율은 발효청미래덩굴잎의 농도와 온도가 높을수록 높은 수율을 나타내었으며, 추출시간이 길어질수록 수율은 증가하는 경향을 보였다(Table 3, Fig.

**Table 4. Regression coefficients of second order polynomials<sup>1)</sup> representing relationships between indicated response variables (Y<sub>n</sub>) and independent variables of concentration, temperature and extraction time from solid-fermented *Smilax china* L. leaf by *Aspergillus oryzae***

Coefficients	TP <sup>2)</sup>	TF <sup>3)</sup>	L*	a*	b*	a/b(%)	OD <sub>475</sub>	WSS <sup>4)</sup>	EDA <sup>5)</sup>	AOI <sup>6)</sup>	XOI <sup>7)</sup>	OA <sup>8)</sup>
β <sub>k0</sub>	-12.56	1.568	64.41	0.14	-32.19	35.54	-0.44	22.56	62.27	-0.20	89.96	-24.36
β <sub>k1</sub>	2.79	-1.528	3.27	-0.40	-8.16	-12.31	-0.08	-23.18	39.22	32.10	-38.05	11.06
β <sub>k2</sub>	0.29	-0.04	-0.19	0.07	1.28	-0.21	0.02	0.62	-0.53	0.37	0.06	0.44
β <sub>k3</sub>	0.96	0.85	0.15	-0.42	-2.80	-2.65	-0.06	-12.99	-2.43	-33.60	-33.02	1.26
β <sub>k11</sub>	0.19	0.44	0.45	-0.19	-5.03	4.56	-0.07	-5.26	-6.85	-5.10	-2.73	-1.90
β <sub>k12</sub>	-0.002	0.01	-0.10	0.02	0.42	-0.08	0.01	0.76	-0.088	0.09	0.37	-0.06
β <sub>k13</sub>	-0.14	0	0.33	0.09	1.59	0.002	0.02	-1.49	-1.57	0.89	8.05	-0.08
β <sub>k22</sub>	-0.002	0.001	0.002	-0.001	-0.01	-0.01	-0.000	-0.01	0.003	-0.01	-0.01	-0.002
β <sub>k23</sub>	-0.002	-0.02	-0.03	0.003	0.10	0.33	0.002	0.30	0.07	0.54	0.37	0.004
β <sub>k33</sub>	-0.07	0.13	0.24	0.02	-0.90	0.41	-0.014	-1.11	-0.08	-1.10	-1.40	-0.21

$$1) Y_n = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

2-8) Abbreviation and units: See Table 3.

**Table 5. Polynomial equations calculated by RSM program for extraction conditions of solid-fermented *Smilax china* L. leaf by *Aspergillus oryzae***

Responses	Second order polynomials <sup>1)</sup>	R <sup>2</sup>
TP <sup>2)</sup>	R = -12.555625+2.792500X <sub>1</sub> +0.289625X <sub>2</sub> +0.957500X <sub>3</sub> +0.185000X <sub>1</sub> <sup>2</sup> -0.001500X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> -0.140000X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> -0.001600X <sub>2</sub> <sup>2</sup> -0.001750X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> -0.065000X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.972
TF <sup>3)</sup>	R = 1.568125-1.527500X <sub>1</sub> -0.041250X <sub>2</sub> +0.851250X <sub>3</sub> +0.435000X <sub>1</sub> <sup>2</sup> +0.011500X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> -0.000700X <sub>2</sub> <sup>2</sup> -0.017000X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> -0.125000X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.920
L*	R = 64.408750+3.271250X <sub>1</sub> -0.191813X <sub>2</sub> +0.145625X <sub>3</sub> +0.445000X <sub>1</sub> <sup>2</sup> -0.103250X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> -0.327500X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> +0.002450X <sub>2</sub> <sup>2</sup> -0.030375X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> +0.240000X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.982
a*	R = 0.136250-0.401250X <sub>1</sub> +0.071812X <sub>2</sub> -0.421875X <sub>3</sub> -0.190000X <sub>1</sub> <sup>2</sup> +0.015250X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> +0.092500X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> -0.000587X <sub>2</sub> <sup>2</sup> +0.002875X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> +0.015000X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.953
b*	R = -32.189375-8.162500X <sub>1</sub> +1.276625X <sub>2</sub> -2.801250X <sub>3</sub> -5.030000X <sub>1</sub> <sup>2</sup> +0.424000X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> +1.585000X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> -0.012275X <sub>2</sub> <sup>2</sup> +0.099250X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> -0.898750X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.973
a/b(%)	R = 35.542500-12.308750X <sub>1</sub> -0.212063X <sub>2</sub> -2.646875X <sub>3</sub> +4.560000X <sub>1</sub> <sup>2</sup> -0.082750X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> +0.327500X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> -0.002113X <sub>2</sub> <sup>2</sup> -0.011875X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> +0.407500X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.953
OD <sub>475</sub>	R = -0.441250-0.075000X <sub>1</sub> +0.018250X <sub>2</sub> -0.055000X <sub>3</sub> -0.065000X <sub>1</sub> <sup>2</sup> +0.005500X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> +0.020000X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> -0.000175X <sub>2</sub> <sup>2</sup> +0.001750X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> -0.013750X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.972
WSS <sup>4)</sup>	R = 22.555000-23.177500X <sub>1</sub> +0.622250X <sub>2</sub> -12.990000X <sub>3</sub> -5.260000X <sub>1</sub> <sup>2</sup> +0.756000X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> -1.490000X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> -0.014162X <sub>2</sub> <sup>2</sup> +0.297000X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> -1.113750X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.920
EDA <sup>5)</sup>	R = 62.273750+39.221250X <sub>1</sub> -0.533188X <sub>2</sub> -2.433125X <sub>3</sub> -6.845000X <sub>1</sub> <sup>2</sup> -0.079250X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> -1.572500X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> +0.003113X <sub>2</sub> <sup>2</sup> +0.065125X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> -0.078750X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.685
AOI <sup>6)</sup>	R = -0.200000+32.097500X <sub>1</sub> +0.367875X <sub>2</sub> -33.602500X <sub>3</sub> -5.095000X <sub>1</sub> <sup>2</sup> +0.094000X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> +0.890000X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> -0.010925X <sub>2</sub> <sup>2</sup> +0.540250X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> -1.098750X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.933
XOI <sup>7)</sup>	R = 89.962500-38.048750X <sub>1</sub> +0.062063X <sub>2</sub> -33.024375X <sub>3</sub> -2.725000X <sub>1</sub> <sup>2</sup> +0.372750X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> -0.010400X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> +0.366625X <sub>2</sub> <sup>2</sup> +8.052500X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> -1.402500X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.781
OA <sup>8)</sup>	R = -24.362500+11.062500X <sub>1</sub> +0.438125X <sub>2</sub> +1.256250X <sub>3</sub> -1.900000X <sub>1</sub> <sup>2</sup> -0.057500X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> -0.075000X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> -0.002250X <sub>2</sub> <sup>2</sup> +0.003750X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> -0.212500X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.843

1)X<sub>1</sub>: concentration (g/100 mL), X<sub>2</sub>: extraction temperature (°C), X<sub>3</sub>: extraction time (min).

2-8) Abbreviations and units: See Table 3.

**Table 6. Analysis of variance showing significance of effects of processing variables on TP, a\* and b\* value, OD<sub>475</sub>, WSS, AOI and OA from solid-fermented *Smilax china* L. leaf by *Aspergillus oryzae***

Process variables	DF	Sum of squares							
		TP <sup>1)</sup>	TF <sup>2)</sup>	a*	b*	OD <sub>475</sub>	WSS <sup>3)</sup>	AOI <sup>4)</sup>	OA <sup>5)</sup>
Concentration (%)	4	31.60**	2.16	1.21**	1017.69**	0.22**	1309.57**	2945.85**	5.44*
Temperature (°C)	4	1.50	2.53*	0.25*	165.06*	0.04*	449.53*	487.38	1.50
Extraction time (min)	4	0.87	1.41	0.05	97.99	0.02	149.76	558.55	1.20

1-5) Abbreviation and units: See Table 3.

\*Significant at 5%.

\*\*Significant at 1%.

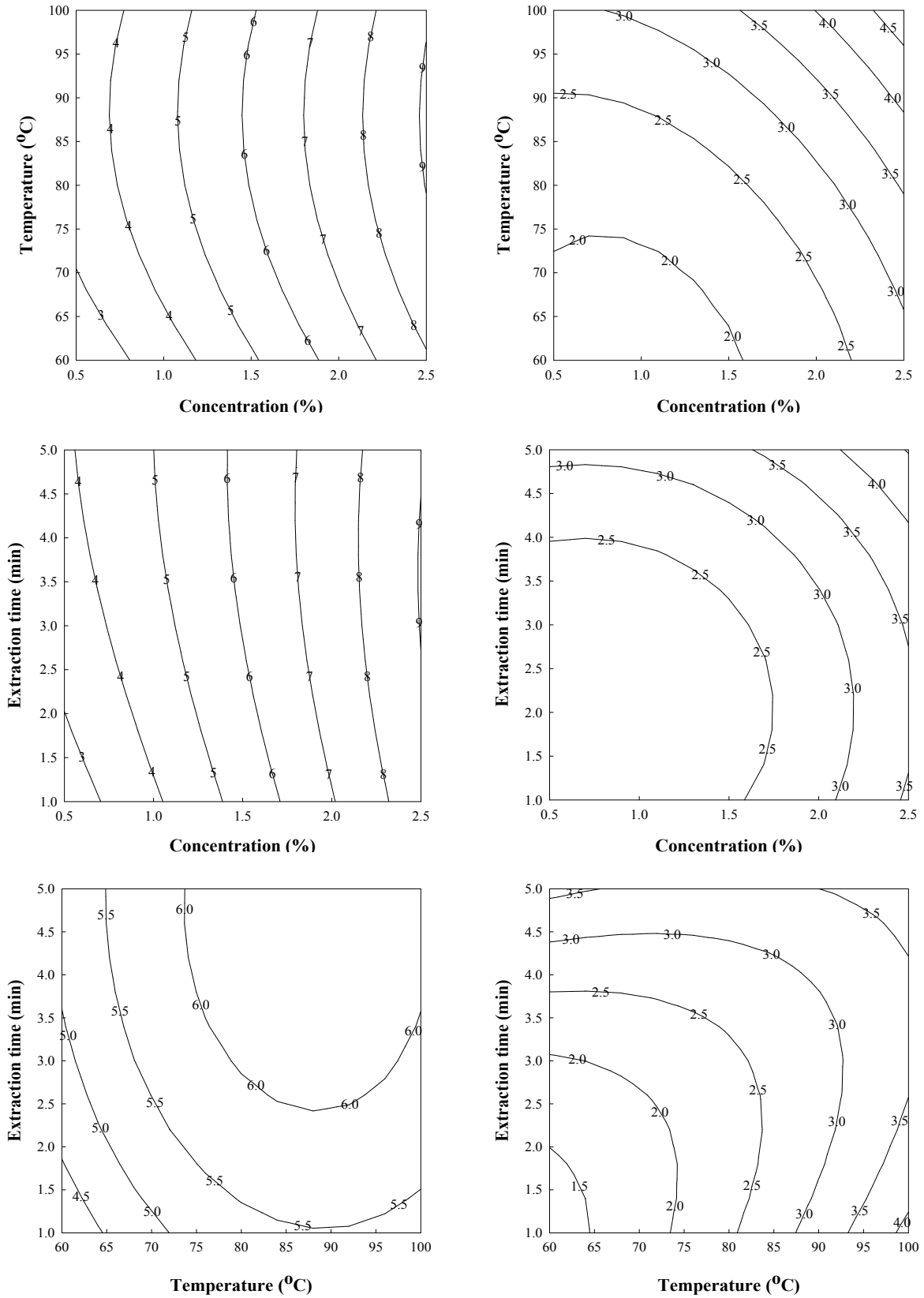


Fig. 3. Response surface plot for contents of total polyphenol (TP) (left figures) and total flavonoid (TF) (right figures) from water extraction of *Smilax china* L. leaf fermented by *Aspergillus oryzae*.

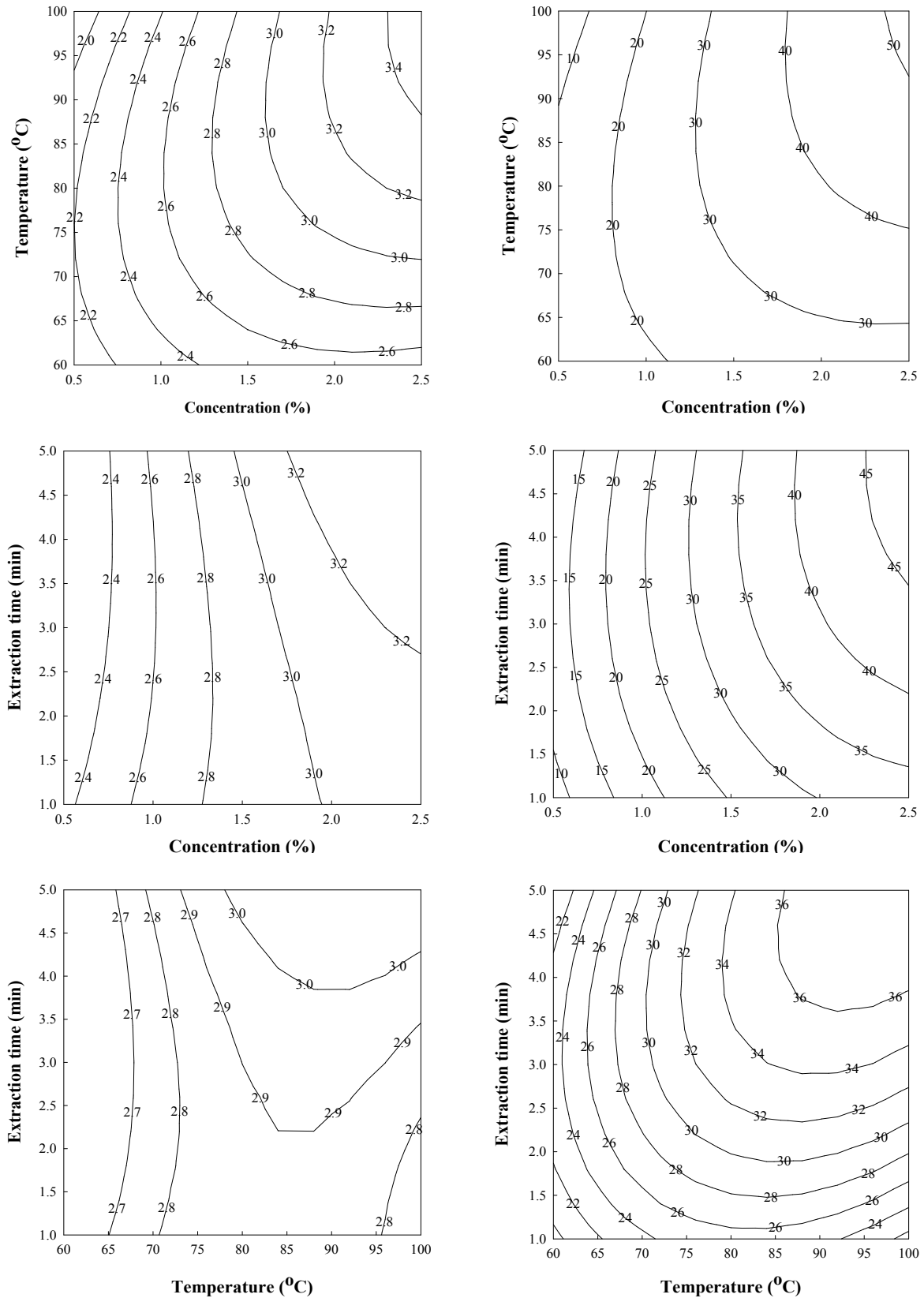


Fig. 4. Response surface plot for Hunter color  $a^*$  (left figures) and  $b^*$  values (right figures) from water extraction of *Smilax china* L. leaf fermented by *Aspergillus oryzae*.



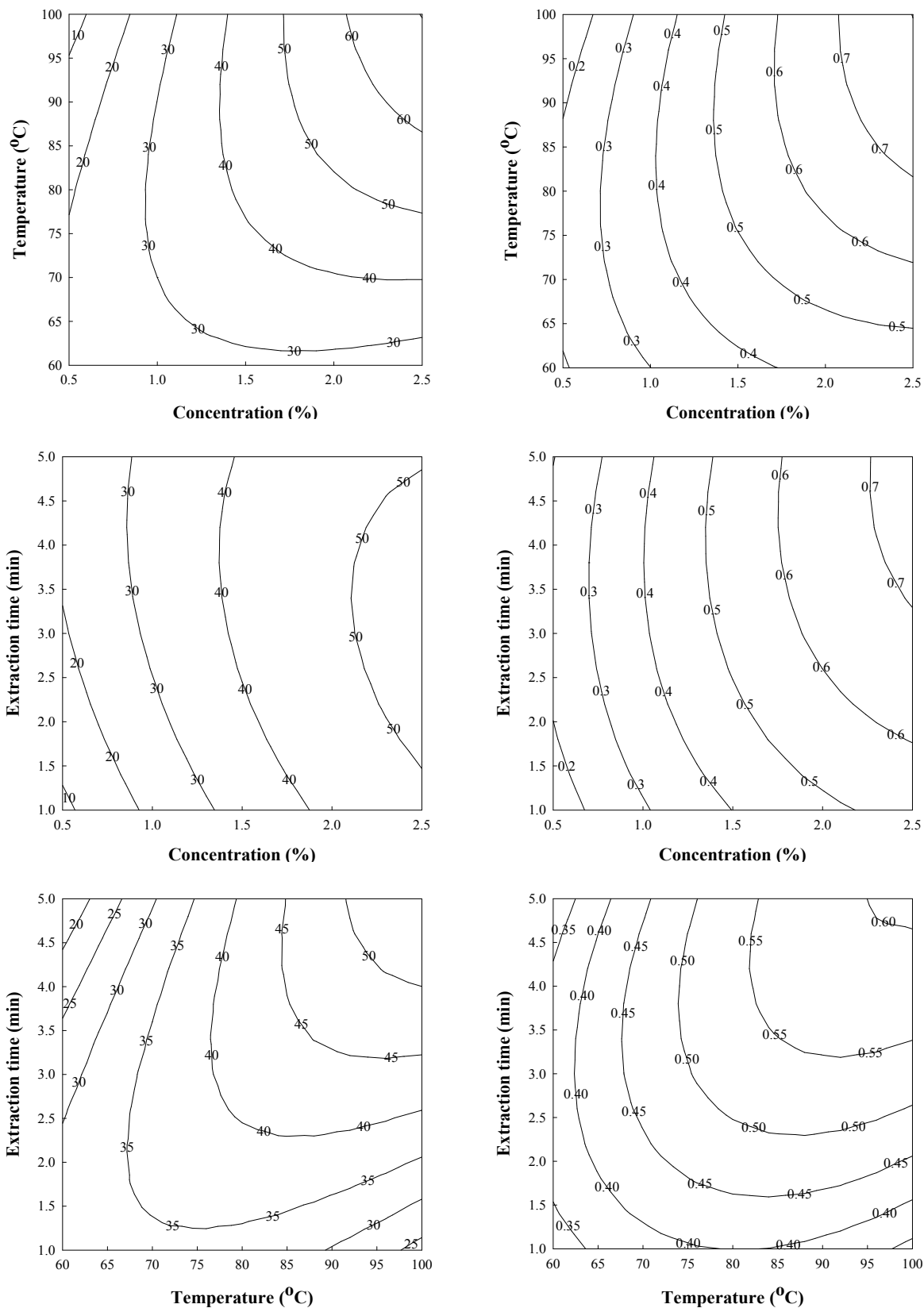


Fig. 5. Response surface plot for WSS content (left figures) and OD<sub>475</sub> (right figures) from water extraction of *Smilax china* L. leaf fermented by *Aspergillus oryzae*.

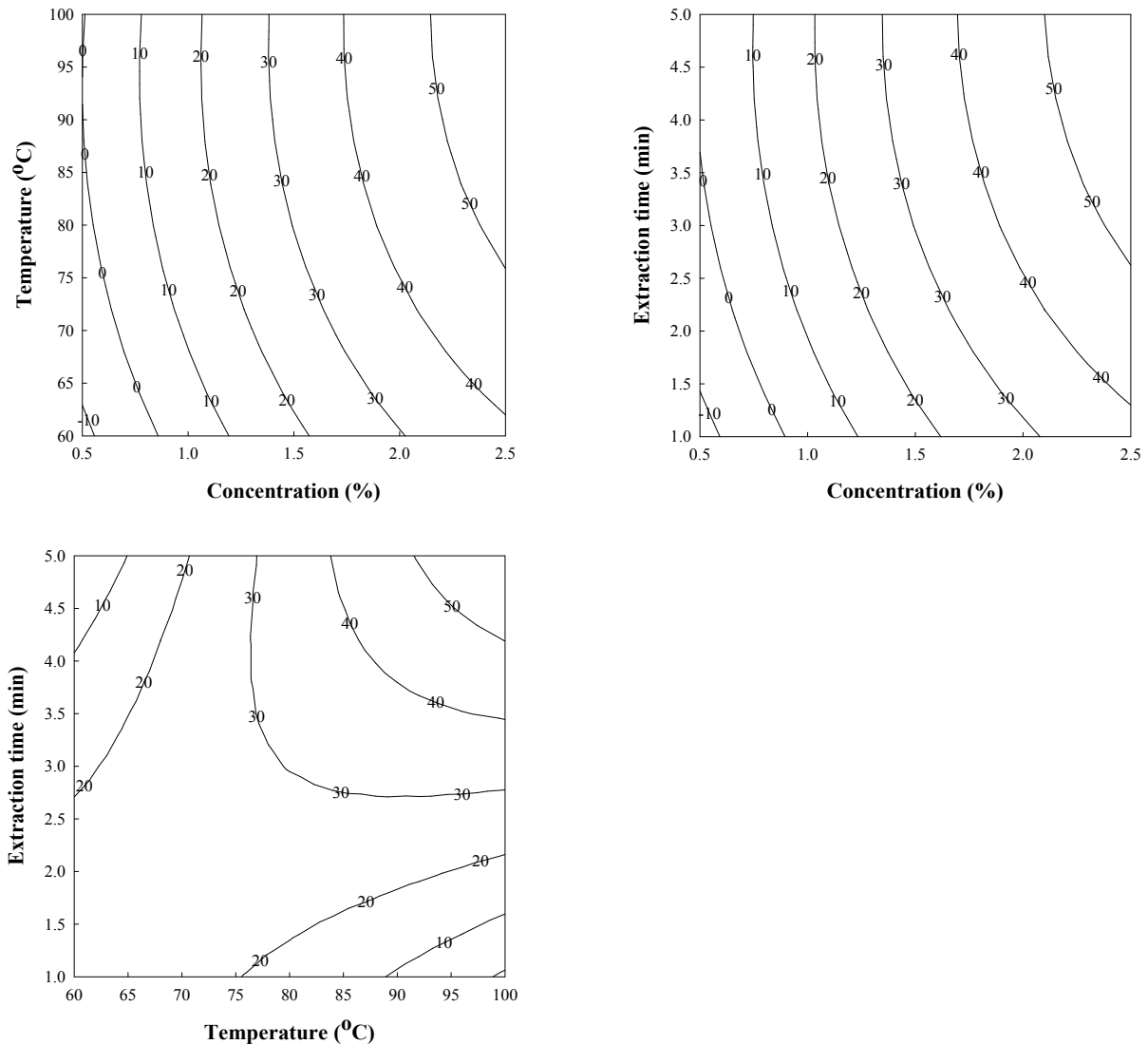


Fig. 6. Response surface plot for inhibitory activity of rabbit hepatic aldehyde oxidase (AOI) from water extraction of *Smilax china* L. leaf fermented by *Aspergillus oryzae*.

3). 최적 추출조건에서의 예측되는 TP와 TF의 추출수율은 농도는 각각 2.49%와 2.27%, 추출온도는 각각 82.2°C 및 92.59°C, 추출시간은 각각 3.08 min 및 3.11 min이었으며 이때의 추출량은 각각 9.06 mg% 및 3.91 mg%이었다(Table 7). 일반적으로 결정계수가 높을수록 반응표면 모델식의 적합도가 높아지며(38), 결정계수가 0.8이상에서 더욱 높아질수록 이상적인 적합도를 나타내는 것으로 알려져 있다(39). 따라서 발효청미래덩굴잎의 경우는 TP와 TF 모두에서 이상적인 적합도를 나타냄으로서 반응표면분석에 의한 추출조건 최적화 예측이 가능한 것으로 판단된다.

#### 색상

*A. oryzae*로 발효시킨 청미래덩굴잎 물 추출액의 색상을 조사한 결과, 밝기를 나타내는  $L^*$  값은 52.83~57.99, 적색

도를 나타내는  $a^*$  값은 2.24~3.25, 황색도를 나타내는  $b^*$  값은 11.49~45.42,  $a^*/b^*$  값은 7.15~19.49의 범위를 나타내었으며(Table 3), 이차다항회귀식의 계수와 회귀방정식 및 결정계수(Table 4, 5)는  $L^*$ ,  $a^*$  및  $b^*$  값이 각각 0.982, 0.953 및 0.973으로 0.05~0.2%의 수준에서 유의성을 나타내었다(Table 7). 비발효 청미래덩굴잎 물 추출액의 경우는 연한 녹색을 띠는 발효청미래덩굴잎 물 추출액은 적황색으로 색상의 정도는 농도 > 추출온도 > 추출시간 순으로 농도에 의한 영향이 큰 것으로 관찰되었다(Table 6, Fig. 4). 최적 추출조건에서의 예측되는  $a^*$ ,  $b^*$ 값은 농도 2.24~2.29%, 추출온도 88.58~89.94°C, 추출시간 3.74~4.02 min에서 각각 3.47 및 49.44로 보이차 스타일의 아름다운 적황색 색상을 나타내었다(Table 7). 이러한 현상은 차의 발효에서 무색의 catechins이 적황색계의 새로운 기능성 성분인 theaflavins

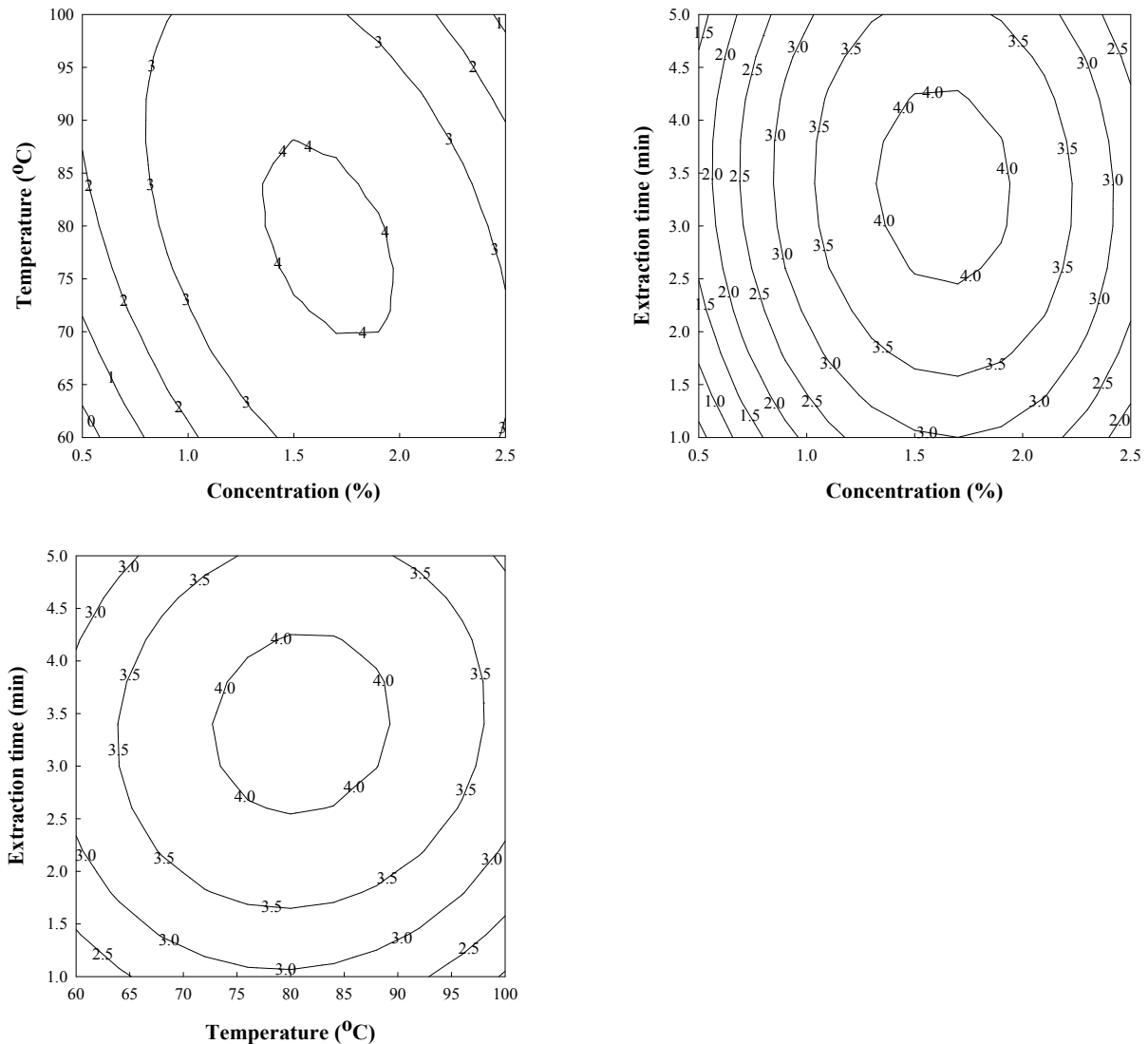


Fig. 7. Response surface plot for overall acceptability (OA) from water extraction of *Smilax china* L. leaf fermented by *Aspergillus oryzae*.

또는 thearubigin이 생성되는 것처럼 발효 청미래덩굴잎에서도 존재하는 polyphenol성 성분이 수용성의 flavonoid로 전환되거나 산화 중합됨으로서 새로운 물질이 생성되는 것으로 보인다(31).

#### WSS, OD<sub>475</sub> 및 EDA

16개 실험군의 추출조건에 따른 발효청미래덩굴잎의 WSS 함량과 OD<sub>475</sub> 및 EDA를 조사한 결과, WSS의 함량은 최저는 17.80 mg%, 최대는 57.44 mg%를 나타내었으며, OD<sub>475</sub> 및 EDA는 각각 최저는 0.22 및 53.65%, 최대는 각각 0.71 및 79.00%를 나타내었으며, TP와 TF의 함량이 높아질수록 OD<sub>475</sub>값과 EDA가 높아지는 경향을 나타내었다(Table 3). 회귀방정식의 결정계수는 WSS는 0.920, OD<sub>475</sub>는 0.972로 높았다. 그러나 EDA는 실험에 사용한 최저농도인 0.5%에서

53.65%로 비교적 높은 활성을 나타내었으나 결정계수가 0.685로 적합도가 낮았다(Table 5). WSS의 함량과 OD<sub>475</sub>에 미치는 영향은 농도 > 추출온도 > 추출시간 순으로 농도의 영향이 가장 컸다(Table 6, Fig. 5). WSS 함량에 대한 최적조건으로 예측되는 농도 2.24%, 추출온도 92.38°C, 추출시간 3.54 min에서의 WSS 수율은 62.63 mg%를 나타내었으며, OD<sub>475</sub>의 경우는 농도 2.29%, 추출온도 89.73°C, 추출시간 3.73 min에서 0.77를 나타내었다(Table 7). 일반적으로 동일 농도일 경우에는 추출온도가 높고 추출시간이 길수록 수율이 높아지는 것으로 알려져 있으며(40), 청미래덩굴의 뿌리인 토복령은 10배량의 물을 가하여 약한 불로 약 2시간 정도 끓여 추출(Kapdang Herb Co.)하는 것으로 알려져 있다.

**Table 7. Predicted levels of process variables yielding optimum response of TP, a\* and b\* value, OD, WSS, AOI and OA from solid-fermented *Smilax china* L. leaf by *Aspergillus oryzae***

Process variables	Levels for optimum response							
	TP <sup>1)</sup>	TF <sup>2)</sup>	a*	b*	OD <sub>475</sub>	WSS <sup>3)</sup>	AOI <sup>4)</sup>	OA <sup>5)</sup>
Concentration (%)	-3.45 (2.49)	7.05 (2.27)	2.19 (2.24)	-3.85 (2.29)	-3.96 (2.29)	1.09 (2.24)	3.80 (2.19)	1.65 (2.04)
Temperature (°C)	86.70 (82.20)	-400.33 (92.59)	87.01 (88.58)	-44.37 (89.94)	-50.45 (89.73)	44.60 (92.38)	60.41 (90.02)	79.11 (63.90)
Extraction time (min)	9.91 (3.08)	-30.63 (3.11)	-1.02 (4.02)	-7.40 (3.74)	-8.09 (3.73)	-0.61 (3.54)	1.10 (4.03)	3.36 (3.50)
R-square	0.9722	0.9203	0.9533	0.9732	0.9715	0.9196	0.9331	0.8433
Significance	0.0001	0.0363	0.0024	0.0005	0.0006	0.0112	0.0067	0.0670
Predicted value	-0.07 (9.06)	-8.59 (3.91)	3.04 (3.47)	-34.43 (49.44)	-0.53 (0.77)	27.80 (62.63)	53.46 (59.48)	4.19 (3.71)
Morphology	SP <sup>6)</sup> (max)	SP(max)	SP(max)	SP(max)	SP(max)	SP(max)	SP(max)	SP(max)

<sup>1-5)</sup> Abbreviation and units: See Table 3.

<sup>6)</sup> SP: saddle point.

**Table 8. Optimal conditions of water extraction for maximum responses of *Smilax china* L. leaf fermented by *Aspergillus oryzae* by superimposing their contour maps**

Conditions	Range of optimum condition	Optimum condition
Concentration (%)	1.6~1.8	1.7
Temperature (°C)	83~93	88
Extraction time (min)	3.4~4.4	3.9

비 발효 청미래덩굴잎에 연한 녹황색을 띠는데 비하여 발효청미래덩굴잎 물 추출액에서는 적황색을 나타내는 현상은 발효에 의한 polyphenol성분의 산화나 새로운 수용성 물질의 생성에 기인하는 현상(31)으로 400~700 nm의 가시부 영역을 recording spectrophotometer를 이용하여 recording해 본 결과, Fig. 2에서와 같이 발효시킨 경우가 비 발효 경우에 비하여 400~550 nm 범위에서 높은 흡광도를 나타내었으며 비 발효 청미래덩굴잎에서는 보이지 않던 475 nm에서 peak이 나타나 발효에 의하여 새로운 색성분이 생성됨을 짐작케 하였다. 한편, 전자공여능은 체내에서 생성되는 활성산소에 의한 산화를 막는 항산화 활성에 대한 지표(41)로 주로 flavonoids를 포함한 polyphenol 성분(42)과 saponins(31) 성분들이 나타내며, 그 함량이 높을수록 항산화력이 높아지고(43), 전자공여능이 높을수록 환원력도 높아지는 것으로 알려져 있다(44). 청미래덩굴잎에는 flavonoid와 saponin이 풍부하게 함유되어 있으며(4), 높은 항산화활성을 가지는 kaempferol glycoside가 함유되어 있다(3). 또, 발효에 의하여 total polyphenol의 함량은 감소하나 flavonoid의 함량은 오히려 증가하며 아름다운 색상을 나타내는 동시에 항산화 활성 등 다양한 기능성을 나타내는 것으로 알려져 있으나(31), 본 실험의 EDA에서 낮은 적합

도를 나타낸 것은 시료에 대한 대조구를 두어 실험을 행하였으나 EDA의 측정 파장이 520 nm로 발효청미래덩굴잎에서 새로이 나타나는 색성물질의 파장과 중첩되어 나타난 오차로 인한 결과라 생각되어 진다.

#### AO 및 XO 저해활성

AO와 XO는 생화학적으로 매우 유사한 효소(45)로 항암제(46)와 항고혈압제(47)의 환원에 관여하며, XOD가 결핍된 경우에는 allopurinol과 pyrazinamide 등의 대사에도 관여한다(48). AO와 XO는 분자상태의 산소를 전자수용체로 이용하여 superoxide와 hydrogen peroxide 등과 같은 활성산소종(ROS)을 생성함으로써 ROS 관련 질병을 유발할 수 있으며(10), 에탄올 및 chloroform과 같은 독성물질의 간손상을 촉진하는데 관여하는 것으로 알려져 있다(49). 특히, AO는 adipocyte의 분화와 지질의 저장 및 adiponectin의 분비를 촉진하고(18), 항비만 adipokine인 adiponectin에 의해 AO의 활성이 저하됨으로서 비만유도와 관련이 있으며(50), 지방식이 및 에탄올성 지방간의 생성에도 관여한다(16). Polyphenol 성분 중 flavonoids는 항산화작용과 함께 체내에서 AO와 XO의 활성을 억제하며(46), 그 효과는 glycoside 형태에 비하여 aglycone 형태가 높은 것으로 보고되고 있다(32).

발효청미래덩굴잎을 차로 이용하기 위한 물 추출조건 최적화를 위하여 16개 실험군으로 구분하여 추출한 액을 토끼 간 조직으로부터 추출하여 부분 정제한 AO와 XO의 저해활성(AOI 및 XOI)에 미치는 영향을 조사한 결과, AOI는 시료농도 0.5%일 경우 0.03%에서 시료농도 2.5%일 경우 54.28%를 나타내었으며, XOI는 AO측정시의 2배 농도에서 시료농도 0.5%일 때 15.38%, 시료농도 2.5%일 때는 26.92%를 나타내었다. 이차다항회귀식의 계수와 회귀방정식 및

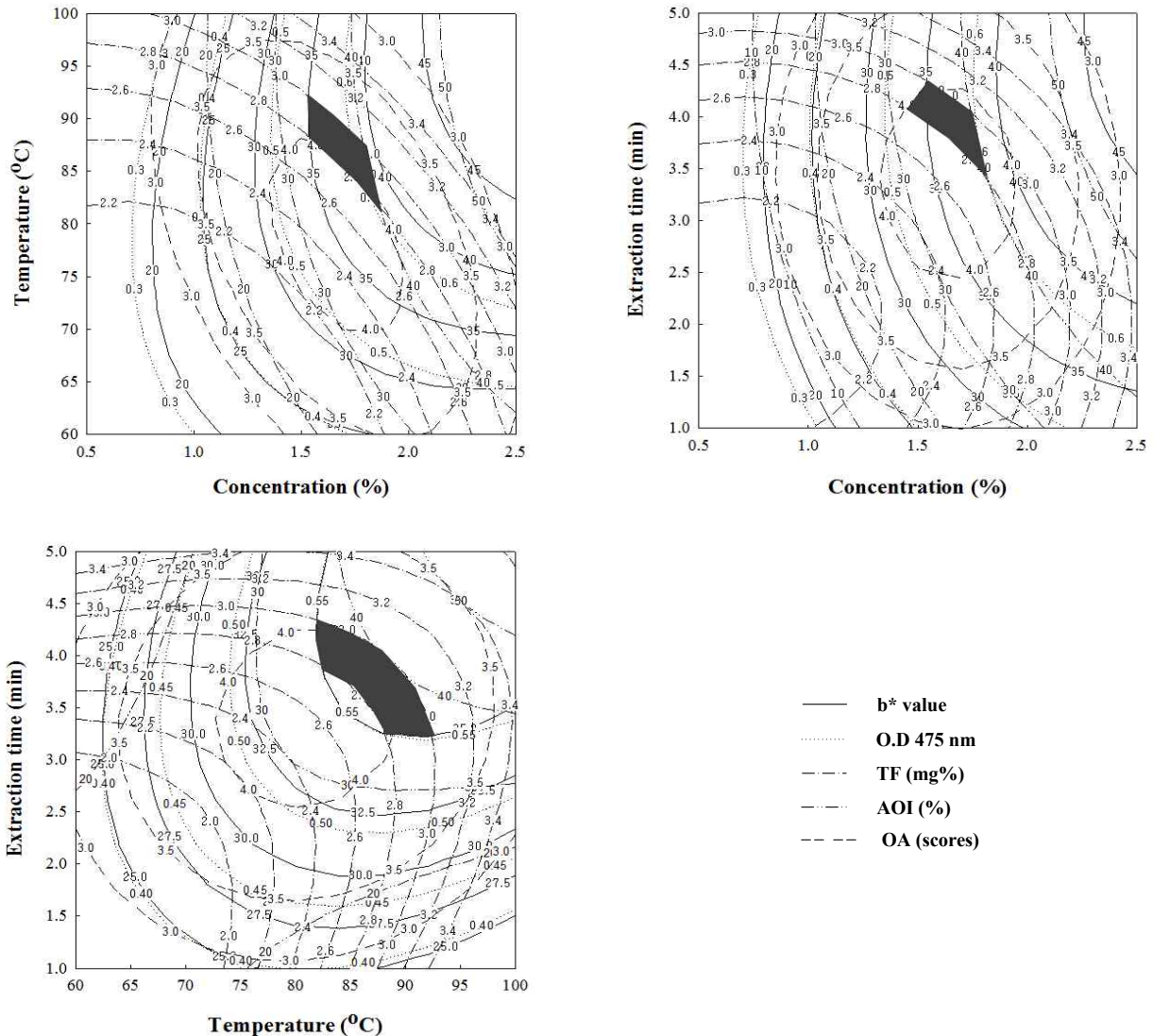


Fig. 8. Superimposing contour maps for optimizing water extraction conditions of *Smilax china* L. leaf fermented by *Aspergillus oryzae*.

결정계수는 Table 4, 5와 같으며, 결정계수  $R^2$ 는 AOI에서는 0.933으로 적합도가 매우 높았으나 XO1은 0.781로 다소 미흡하였다. AOI의 조건별에 따른 영향은 농도 > 추출시간 > 추출온도 순으로 0.7%수준에서 유의성이 있는 것으로 나타났으며(Table 6), 농도는 2%이상, 추출온도는 90°C이상, 추출시간은 2.5분 이상에서 AOI 50% 이상의 결과를 얻을 수 있으며(Fig. 6), 예측 최적조건은 농도 2.19%, 추출온도 90.02°C, 추출시간 4.03 min에서의 AOI는 59.48%이었다(Table 7).

이상의 결과, XO1에 대한 적합도가 낮아 이에 대한 최적 추출조건 도출은 어려우나 발효청미래당굴잎 물 추출물은 한방에서 통풍의 예방 및 치료약으로 쓰이는 토복령 물 추출물(농도 2.5%, 추출시간 80°C에 3 min일 때 24.45%)에 비하여 다소 높은 XO1 활성을 나타내며, 동일 조건에서

토복령 (농도 2.5%, 추출시간 80°C에 3 min일 때 51.92%)과 대등한 AOI 활성을 나타냄으로써 통풍의 예방과 치유 및 알코올성 북비비만을 예방할 수 있는 기능성 차 또는 음료로의 이용성을 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

#### 관능적 품질

추출조건에 따른 발효청미래당굴잎 물 추출액의 종합적 기호도를 조사한 결과 최하 2.0에서 최고 4.3점으로 평가되었다 (Table 3). 이차다항회귀식의 계수와 회귀방정식 및 결정계수는 Table 4, 5에 나타내었으며, 회귀방정식의 결정계수  $R^2$ 이 0.843으로 적합도가 0.80이상을 나타내었다. 추출조건에 따른 영향은 농도>추출시간>추출온도 순으로 0.07% 수준에서 유의성이 있는 것으로 나타났으며 (Table 6, 7), 최적조건으로 예측되는 은 농도 2.04%, 추출온도 63.90°C,

추출시간 3.50 min에서의 에서의 종합적인 기호도 (OA)는 3.71점이었다(Table 7, Fig. 7).

청미래덩굴잎은 떫은맛과 신맛이 있으나 발효시킨 경우는 이러한 맛들이 상당히 많이 감소하고 감미가 높아지며, 색상의 경우도 황색에서 적황색으로 변화됨으로서 관능적인 기호도가 높아진다(51). 일반적으로 발효차에서의 관능적인 품질평가가 항목으로는 향, 맛, 밝기 및 입맛(mouth feel)이 주요한 요소로 알려져 있다(52). 발효를 시키지 않은 경우에는 비수용성의 chlorophyll이 함유되어 녹색과 황색이 혼합된 어두운 색깔을 띠며, 차 제조과정 중 증자나 덩유시에 chlorophyll의 분해산물인 pheophytin과 pheophorbide가 남아 맑고 밝은 색상을 얻기 어렵다(53). 그러나 *A. oryzae*로 발효시킨 발효청미래덩굴잎 물 추출액은 chlorophyll과 그 분해물이 완전하게 소실되어 맑고 맑으며, 홍차나 보이차에서와 같이 polyphenol 성분이 teaflavins 또는 tearubigins과 같은 적색계의 아름다운 색상을 생성 하듯 새로운 색상 성분을 생성함(54)으로서 종합적 기호도가 높아지는 것으로 생각된다.

#### 최적 추출조건

발효청미래덩굴잎의 차로서의 최적 추출조건을 설정하기 위하여 추출조건별 물 추출물에 대하여 적합도가 0.8이상으로 나타난 항목 중에서 발효청미래덩굴잎에서의 품질과 기능성에 대한 지표항목으로 사료되는 b\*값, OD<sub>475</sub>, TF 함량, AOI 및 OA를 모두 만족하는 범위를 dark zone으로 최적 추출범위를 예측하였다(Fig. 8, Table 8). 각 반응변수들의 대응 값이 일치하지 않아 적절한 제한조건을 필요로 함으로 발효청미래덩굴잎의 추출조건에 있어서 종속변수의 제한조건으로 b\* 값 35~40, OD<sub>475</sub> 0.5~0.6, TF 함량 2.8~3.0 mg%, AOI 활성 30~40%, 종합적기호도 3.5~4.5점으로 범위를 정하고 이를 만족할 수 있는 contour map을 작성하였으며, 각 조건이 일치하는 지역을 contour map으로 중첩하여 최적화를 시도하였다. 발효청미래덩굴잎의 주요 기능성으로 생각되는 만성적인 음주에 의한 복부비만과 통풍의 예방 및 치유와 관련이 있는 AOI 및 XOI 활성을 뒷받침하는 TP 및 TF 함량, 색상, 관능적 품질 및 발효에 의하여 생성되는 새로운 물질의 생성정도를 알기 위한 OD<sub>475</sub>에 대하여 공통적으로 적용되는 최적 추출조건 범위는 농도 1.6~1.8%, 추출온도 83~93°C, 추출시간 3.4~4.4분이었으며 최적조건은 농도 1.7%, 추출온도 88°C, 추출시간 3.9 min 이었다.

#### 요 약

본 연구는 *A. oryzae* 발효시킨 청미래덩굴잎의 차로서의 최적 물 추출조건을 확립하기 위하여 농도, 추출온도 및 추출시간을 독립변수로 하고, 종속변수로는 향 통풍 및 향

알코올성 복부비만과 같은 청미래덩굴 본래의 기능성과 관련하여 total polyphenol(TP) 및 total flavonoid(TF) 함량, 발효에 의하여 생성되는 색상물질의 함량(OD<sub>475</sub>), xanthine oxidase 및 aldehyde oxidase 저해활성(XOI 및 AOI)을 측정함과 동시에 차로서의 품질과 관련이 있는 색상, 수용성 고형물의 양, 전자공여능(EDA) 및 종합적인 기호도(OA)를 반응표면분석법(response surface methodology)을 통하여 예측하였다. 반응표면에 대한 이차다중회귀방정식의 결정계수(R<sup>2</sup>)는 EDA(0.69), XOI(0.78)을 제외하고는 모든 종속변수들이 0.85~0.98범위로 높은 적합도를 나타내었다. 그러나 EDA와 XOI의 활성은 저 농도에서도 비교적 높은 활성을 나타내었다. 결정계수가 0.8이상으로 나타난 종속변수에 대하여 반응표면분석을 행한 결과 모든 변수들에서 다 같이 농도가 추출에 가장 큰 영향을 미쳤으며 TP, a\* 및 b\*값, OD<sub>475</sub>, WSS 및 AOI는 1%수준에서 유의성을 나타내었고, OA는 5%수준에서 유의성을 나타내었다. 추출온도의 경우는 a\* 및 b\*, OD<sub>475</sub>, WSS의 함량이 5%수준에서 유의성을 나타내었다. 청미래덩굴잎의 기능성과 관련하여 가장 중요한 요소의 하나인 AOI는 농도 2.19%, 추출온도 90.02°C, 추출시간 4.03 min이 최적 조건으로 나타났으며 이때의 AOI 값은 59.48% (R<sup>2</sup>: 0.93, p<0.007) 이었다. 통풍과 음주에 의한 복부비만과 관련이 있는 XO와 AO의 저해활성을 뒷받침하는 TP 및 TF 함량, OD<sub>475</sub> 그리고 차의 품질과 관련된 색상 및 종합적인 기호도 등 모든 종속변수를 만족시킬 수 있는 최적 물 추출조건 범위는 농도 1.6~1.8%, 추출온도 83~93°C, 추출시간 3.4~4.4 min이었으며 최적조건은 농도 1.7%, 추출온도 88°C, 추출시간 3.9 min 이었다.

#### 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청, 차세대바이오 그린 21사업의 연구비(No. PJ009521)로 수행된 과제로 연구비 지원당국에 깊은 감사를 드립니다.

#### References

1. Song HS, Park YH, Jung SH, Kim DP, Jung YH, Lee MK, Moon KY (2006) Antioxidant activity of extracts from *Smilax china* root. J Korean Soc Food Sci Nutr, 35, 1133-1138
2. Choi HY (2004) Antimicrobial effect of ethanol extract of *Smilax china* leaf. Korean J Sanitation, 19, 22-30
3. Cha BC, Lee EH (2007) Antioxidant activities of flavonoids from the leaves of *Smilax china* Linne. Korean J Pharmacogn, 38, 31-36

4. Cheng DS, Hua XL (2006) Today's research of *Smilax china*. J Chin Med Mater, 29, 90-93
5. Shu XS, Gao ZH, Yang XL (2006) Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Smilax china* L. aqueous extract. J Ethnopharmacol, 103, 327-332
6. Li YL, Gan GP, Zhang HZ, Wu HZ, Li CL, Huang YP, Liu YW, Liu JW (2007) A flavonoid glycoside isolated from *Smilax china* L. rhizome *in vitro* anticancer effects on human cancer cell lines. J Ethnopharmacol, 113, 115-1124
7. Chena L, Yina H, Lanb Z, Maa S, Zhanga C, Yanga Z, Li P, Linc B (2011) Anti-hyperuricemic and nephroprotective effects of *Smilax china* L. J Ethnopharmacology, 135, 399-405
8. Ham YK and Kim SW (2004) Protective effects of plant extract on the hepatocytes of rat treated with carbon tetrachloride. J Korean Soc Food Sci Nutr, 33, 1246-1251
9. Al-Salmy HS (2001) Individual variation in hepatic aldehyde oxidase activity. IUBMB Life, 51, 249-253
10. Kundu TK, Hille R, Velayutham M, Zweier JL (2007) Characterization of superoxide production from aldehyde oxidase: an important source of oxidants in biological tissues. Arch Biochem Biophys, 460, 113-121
11. Beedham C (1987) Molybdenum hydroxylases: biological distribution and substrate-inhibitor specificity. Prog Med Chem, 24, 85-121
12. Kitamura S, Sugihara K, Ohta S (2006) Drug-metabolizing ability of molybdenum hydroxylases. Drug Metab Pharmacokinet, 21, 83-98
13. Hirao Y, Kitamura S, Tatsumi, K (1994) Epoxide reductase activity of mammalian liver cytosols and aldehyde oxidase. Carcinogenesis, 15, 739-743
14. Sugihara K, Kitamura S, Tatsumi K (1996) Involvement of mammalian liver cytosols and aldehyde oxidase in reductive metabolism of zonisamide. Drug Metab Dispos, 24, 199-202
15. McCrystal MR, Evans BD, Harvey VJ, Thompson PI, Porter DJ, Baguley BC (1999) Phase I study of the cytotoxic agent N-[2-(dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide. Cancer Chemother Pharmacol, 44, 39-44
16. Shaw S, Jayatilleke E (1990) The role of aldehyde oxidase in ethanol-induced hepatic lipid peroxidation in the rat. Biochem J, 268, 579-583
17. Conklin, D, Prough R, Bhatnagar A (2007) Aldehyde metabolism in the cardiovascular system. Mol Biosyst, 3, 136-150
18. Weigert J, Neumeier M, Bauer S, Mages W, Schnitzbauer AA, Obed A, Gröschl B, Hartmann A, Schäffler A, Aslanidis C, Schöolmerich J, Buechler C (2008) Small-interference RNA-mediated knock-down of aldehyde oxidase 1 in 3T3-L1 cells impairs adipogenesis and adiponectin release. FEBS Lett, 582, 2965-2972
19. Pryde DC, Dalvie D, Hu Q, Jones P, Obach RS, Tran TD (2010). Aldehyde oxidase: an enzyme of emerging importance in drug discovery. J Med Chem, 53, 8441-8460
20. Garattini E, Terao M (2011) Increasing recognition of the importance of aldehyde oxidase in drug development and discovery. Drug Metab Rev, 43, 374-386
21. Lee GD, Kim JO, Son JH, Kim HY (2012) Monitoring on physicochemical properties of *Liriope platyphylla* by the use of four dimensional response surface. Korean J Food Preserv, 19, 560-568
22. Park MZ, Kim ID, Kim SD (2001) Effect of rice addition on enzyme activities of soybean *Meju* fermented by *Monascus spp.* Korean J Postharvest Sci Technol, 8, 405-411
23. Machida M (2002) Progress of *Aspergillus oryzae* genomics. Adv Appl Microbial, 51, 81-106
24. Myers RH (1971) Response Surface Methodology. Allyn and Bacon Inc, Boston, p 132
25. Minussi RC, Rossi M, Bologna L, Cordi L, Rotilio D, Pastore GM, Duran N (2003) Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. Food Chem, 82, 409-416
26. Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG (2005) Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food Chem, 91, 571-577
27. Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature, 181, 1199-1200
28. Rajagopalan KV, Fridovich I, Handler P (1962) Hepatic aldehyde oxidase I. Purification and properties. J Biol Chem, 237, 922-928
29. Stirpe F, Della Corte E (1969) The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). J Biol Chem, 244, 3855-3863
30. Lee KW, Lee SK, Lee BD (2006) *Aspergillus oryzae* as probiotic in poultry-A review. Int J Poultry Sci 5, 1-3.
31. Lee SI, Lee YK, Kim SD, Kang YH, Suh JW (2012) Antioxidative activity of *Smilax china* L. leaf teas fermented by different strains. Korean J Food Nutr, 25, 807-819
32. Hamzeh-Mivehroud M, Rahmani S, Rashidi MR, Hosseinpour Feizi MA, Dastmalchi S (2013) Structure-based investigation of rat aldehyde oxidase inhibition by flavonoids. Xenobiotica, 43, 661-670
33. Angayarkanni J, Palaniswamy M, Murugesan S, Swaminathan K (2002) Improvement of tea leaves

- fermentation with *Aspergillus* spp. pectinase. J Biosci Bioeng, 94, 299-303
34. Zhong X, Peng L, Zheng S, Sun Z, Ren Y, Dong M, Xu A (2004) Secretion, purification, and characterization of a recombinant *Aspergillus oryzae* tannase in *Pichia pastoris*. Protein Express Purif, 36, 165-169
  35. Arakawa H, Maeda M, Okubo S, Shimamura T (2004) Role of hydrogen peroxide in bactericidal action of catechin. Biol Pharm Bull, 27, 277-281
  36. Osawa T (1994) Novel natural antioxidant for utilization in food and biological system. In Postharvest Biochemistry of Plant Food Material in the Tropics. Uritani I, Garcia VV, Mendoza EM, eds. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan. p 241-251
  37. Bode AM, Dong Z (2003) Signal transduction pathway: Targets for green and black tea. J Biochem Mol Biol, 36, 66-77
  38. Sin HN, Yusof S, Hamid NSA, Rahman RA (2006) Optimization of hot water extraction for sapodilla juice using response surface methodology. J Foods Eng, 74, 352-358
  39. Joglekar AM, May AT (1987) Product excellence through design of experiments. Cereal Foods World, 32, 857-868
  40. Kang JR, Lee SJ, Kwon HJ, Kwon MH, Sung NJ (2012) Establishment of extraction conditions for the optimization of the black garlic antioxidant activity using the response surface methodology. Korean J Food Preserv, 19, 577-585
  41. Torel J, Cillard J, Cillard P (1986) Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. Phytochem, 25, 383-385
  42. Choi CH, Song ES, Kim SJ, Kang MH (2003) Antioxidative activities of *Castanea crenata* Flos. methanol extracts. Korean J Food Sci Technol, 35, 1216-1220
  43. Holasova M, Fiedlerova V, Smrcinova H, Orsak M, Lachman J, Vavreinova S (2002) Buckwheat the source of antioxidant activity in functional foods. Food Res Int, 35, 207-211
  44. Kang YH, Park YK, Oh SR, Moon KD (1995) Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. Korean J Food Sci Technol, 27, 978-984
  45. Yamaguchi Y, Matsumura T, Ichida K, Okamoto K, Nishino T (2007) Human xanthine oxidase changes its substrate specificity to aldehyde oxidase type upon mutation of amino acid residues in the active site: roles of active site residues in binding and activation of purine substrate. J Biochem, 141, 513-524
  46. Rashidi MR, Nazemiyeh H (2010) Inhibitory effects of flavonoids on molybdenum hydroxylases activity. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 6, 133-152
  47. Dambrova M, Uhle'n S, Welch CJ, Wikberg JES (1998) Identification of an N-hydroxyguanidine reducing activity of xanthine oxidase. Eur J Biochem, 257, 178-184
  48. Moriwaki Y, Yamamoto T, Nasako Y, Takahashi S, Suda M, Hiroishi K, Hada T, Higashino K (1993) *In vitro* oxidation of pyrazinamide and allopurinol by rat liver aldehyde oxidase. Biochem Pharmacol, 46, 975-981
  49. Ali S, Pawa S, Naime M, Prasad R, Ahmad T, Farooqui H, Zafar H (2008) Role of mammalian cytosolic molybdenum Fe-S flavin hydroxylases in hepatic injury. Life Sci, 82, 780-788
  50. Neumeier M, Weigert J, Schäffler A, Weiss TS, Schmidl C, Büttner R, Bollheimer C, Aslanidis C, Schölmerich J, Buechler C (2006) Aldehyde oxidase 1 is highly abundant in hepatic steatosis and is downregulated by adiponectin and fenofibric acid in hepatocytes in vitro. Biochem Biophys Res Commun, 350, 731-735
  51. Lee YK, Lee SI, Kim JS, Yang SH, Lee IA, Kim SD, Suh JW (2012) Antioxidant activity of green tea fermented with *Monascus pilosus*. J Appl Biol Chem, 55, 19-25
  52. Owuor PO, Obanda M, Nyirenda HE, Mphangwe NIK, Wright LP, Apostolides Z (2006) The relationship between some chemical parameters and sensory evaluations for plain black tea (*Camellia sinensis*) produced in Kenya and comparison with similar teas from Malawi and South Africa. Food Chem, 97, 644-653
  53. Chen CH, Chan HC, Chang YN, Liu BL, Chen YS (2000) Effects of bacterial strains on sensory quality of Puerh tea in an improved pile-fermentation process. J Sens Stud, 24, 534-553
  54. Halder B, Pramanick S, Mukhopadhyay S, Giri AK (2006) Anticlastogenic effects of black tea polyphenols theaflavins and thearubigins in human lymphocytes in vitro. Toxicol In Vitro, 20, 608-613