



Research Article

Effects of extraction conditions on color quality and antioxidant properties of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) leaf tea

침출 조건이 감잎차의 색 및 항산화 특성에 미치는 영향

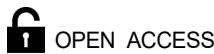
Jonghwa An^{1†}, Juhae Kim^{2†}, Choon Young Kim^{1,2*}
 안종화^{1†} · 김주혜^{2†} · 김춘영^{1,2*}

¹Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, Gyeongsan 38541, Korea
²Research Institute of Human Ecology, Yeungnam University, Gyeongsan 38541, Korea

¹영남대학교 식품영양학과, ²영남대학교 생활과학연구소

Abstract This study was carried out to investigate the effect of the extraction conditions for persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) leaf tea (PLT) on its color quality and antioxidant properties. The amount of persimmon leaf (PL) powder and pH influenced the PLT's color and antioxidant capacity. As the amount of PL powder in tea increased, lightness decreased while yellowness increased. The PLT with the highest amount of PL (10 mg/mL) exhibited the highest 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical scavenging activity and ferric reducing antioxidant power (FRAP). In addition, the PLT with the highest PL showed the highest total polyphenol and flavonoid contents. Subsequently, PLT was prepared using 10 mg/mL PL powder under varying pH conditions. As pH increased from 4 to 7, lightness decreased while redness and yellowness increased. Antioxidant capacity was determined using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging activity and FRAP assay showed that lower pH exhibited higher antioxidant capacity. The PLT extracted under the lowest pH of 4 showed higher polyphenol and flavonoid contents than that extracted under higher pH conditions. Overall, PLT extraction using a solvent with pH 4.0 showed better antioxidant activities and higher amounts of polyphenolic compounds. Simultaneously, lesser lightness, redness, and yellowness were detected in PLT extracted under pH 4 conditions. In conclusion, to acquire a better functional health benefit in terms of antioxidant capacity, preparing PLT under pH 4 conditions is suggested.

Keywords persimmon leaf tea, extraction condition, pH, color, antioxidant capacity



OPEN ACCESS

Citation: An J, Kim J, Kim CY. Effects of extraction conditions on color quality and antioxidant properties of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) leaf tea. Korean J Food Preserv, 30(2), 300-310 (2023)

Received: February 03, 2023
Revised: March 24, 2023
Accepted: March 27, 2023

[†]These authors contributed equally to this study.

***Corresponding author**
 Choon Young Kim
 Tel: +82-53-810-2871
 E-mail: cykim@yu.ac.kr

Copyright © 2023 The Korean Society of Food Preservation. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서론

차(tea)는 2021년 기준으로 전 세계의 60여 개 국가에서 약 650만 톤이 생산되고 있고 일인당 소비량이 10년 사이 2.5% 증가하여 보편적으로 음용되고 있는 대표적인 기호식품 중 하나이다(FAO, 2022). 최근의 차 음료에 대한 국내 판매액은 2020년 대비 2021년에 11.6% 증가한 것으로 나타나, 높은 소비수준을 나타내고 있으며(KOSIS, 2021), 차 음용의 주된 목적은

맛과 건강인 것으로 보고되었다(KAF and FTC, 2019). 건강차에 대한 관심과 소비가 증가하면서 기능성을 갖춘 천연 재료를 활용한 차의 개발이 확대되고 있다. 차는 크게 침출차, 액상차, 고형차로 유형을 나눌 수 있다. 이 중 침출차는 식물의 어린 싹이나 잎, 꽃, 줄기, 뿌리, 열매 또는 곡류 등을 주원료로 가공한 것으로 물에 침출하여 그 여액을 음용하는 식품이다(MFDS, 2022). 오래 전부터 차를 마셔온 다른 아시아 국가들과 달리 국내에서의 차 음용 문화는 많이 발달하지 않아 국내 소비자들은 일반적으로 티백이나 잎차 형태의 침출차를 차로 인식하는 것으로 알려져 있다(Lee, 2019). 가장 대표적으로 소비되는 침출차는 녹차이지만, 녹차 외의 감잎차 등과 같은 대용차에 대한 소비도 지속되고 있다.

감잎차의 주원료는 감나무(*Diospyros kaki* Thunb.)의 잎인 감잎이며, 감잎(차)은 녹차 이상의 다양한 생리활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 녹차에 비해 sucrose를 포함한 총 유리당 함량이 2배 이상 높으며, 비타민C는 8배, gallic acid는 4-5배 정도 높은 것으로 보고되었다(Jung 등, 2004). 특히 비타민C는 다른 기능성 성분과 함께 항산화 작용에 기여한다. 또 다른 선행연구에 따르면 감잎차 내 총 클로로필(0.74 mg/L)과 총폴리페놀(0.34 mg/mL) 함량은 녹차보다 약간 적은 정도이며, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 라디칼 소거능은 거의 유사한 수준을 나타내어 두 종류의 차는 비슷한 수준의 높은 항산화 활성을 나타내었다(Lim 등, 2008). 이외에도 감잎차 내 플라보노이드, 카테킨, 카페인, 유리당 등의 생리활성물질이 보고된 바 있다(Chung 등, 1994; Son과 Kim, 2011). 이러한 항산화 효과 외에도 감잎차는 항균효과, 항암효과, 돌연변이 억제효과, 활성산소를 생성하는 효소의 일종인 xanthine oxidase 효소를 저해하는 효과 등 다양한 기능성을 가진 것으로 알려져 있다(Lim 등, 2008; Moon, 2002; Moon과 Lee, 1998).

침출차의 기능성을 최대화하기 위해서는 유효성분이 많이 우리나라도록 제조하는 것이 중요하다. 이를 위한 침출차의 제조 조건으로서 온도, 시간, 시료의 양 및 pH 등의 변수 인자가 고려되어야 한다. 예를 들어 쌍화차 제조 중 90℃에서 8시간 동안 원료량의 10배의 50% ethanol 용매를 사용하였을 때 쌍화차 회수율과 주된 기능성 성분인 decursinol 이 함량이 가장 높았다(Cho, 1989). 황률, 대추, 굴피, 모과, 생강을 원료로 한 오과차의 경우 30분과 50분 추출 시간

대비 70분 동안 원료량의 9.5배의 증류수로 침출시킨 경우에 총 당량, 유리 당량 및 아미노산의 함량이 가장 높았다(You, 1994). 또한, pH를 4와 7 범위에서 침출한 녹차에서 용출된 유효성분을 비교하였을 때, pH 4에서 카테킨이 가장 많이 용출되었고 녹차 고유의 색도 유지되는 것으로 보고된 바 있다(Kim 등, 1999).

현재까지 감잎차에 대한 연구는 주로 생리활성 물질 동정, 녹차와 비교한 항산화 항균 활성 및 성분 측정, 건조, 증자, 발효 또는 볶음, 찜 등의 감잎의 제조방법에 따른 항산화능이나 관능적 품질 특성 조사가 주를 이루었다(Choi 등, 1998; Chung 등, 1994; Jung 등, 2004; Kim과 Oh, 1999; Lim 등, 2008; Park 등, 1995; Shin, 1997). 이에 반해 쉽게 구할 수 있는 시판용 감잎 분말에 대하여 기능성을 최대화한 침출법에 대한 연구는 미비하다. 따라서 본 연구에서는 예비실험에서 확인된 감잎차 특성에 큰 변수로 작용하지 않은 온도와 시간 조건은 고정변수로 두고, 항산화 기능성을 최대화할 수 있는 시료의 양과 pH의 적절 수준을 알아보려고 하였다. 항산화 활성은 일반적으로 차의 대표적인 기능성 및 품질 지표로 여겨지므로, 항산화력 및 항산화 성분 분석을 기능성 지표로 설정하였다. 또한, 소비자의 차 선택에 있어 중요한 결정 요인으로 여겨지는 관능적 특성 중 색도의 변화도 종속지표로서 함께 설정하였다. 본 연구는 항산화 기능성을 최대화할 수 있는 감잎 시료의 적절 사용량과 침출액 pH 조건을 조사함으로써, 쉽게 활용할 수 있는 감잎차 침출 방법에 대한 기초자료를 제공하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 감잎차의 제조

본 실험에 사용된 감잎 분말은 2021년 9월에 경북 영천에서 생산된 것으로서 한약재시장/삼흥건재약업사에서 구입하여 사용하였다. 첫째로, 용매당 사용되는 시료 양의 영향을 확인하기 위하여, 감잎 분말과 증류수의 비율을 달리하여 증류수 100 mL당 10, 50, 100, 200, 500 또는 1,000 mg 감잎 분말을 각각 가하여 최종 농도가 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 또는 10 mg/mL가 되도록 하였다. 각 침출액을 100℃에서 60분 동안 가열 후 filter paper(Chmlab Group, Barcelona, Spain)로 여과하여 얻은 여액을 감잎차

(persimmon leaf tea, PLT)로 명명하고 실험에 사용하였다. 다음으로, pH의 영향을 확인하기 위하여, 10 mg/mL로 용매당 시료 양은 고정하되, McIlvaine 완충용액(0.1 M citric acid and 0.2 M dibasic sodium phosphate)을 사용하여 침출액의 pH가 4, 5, 6, 또는 7이 되도록 제조하였다. pH는 SevenCompact™ pH meter(Mettler Toledo, Columbus, OH, USA)를 이용하여 측정하였으며, 각 침출액을 100°C에서 60분 동안 가열 후 filter paper로 여과하여 얻은 여액을 실험에 사용하였다.

2.2. 색 측정

침출액 내 시료의 양 또는 용매 pH 조건에 따라 제조한 각 PLT 1 mL를 직경 1.55 cm의 24-well plate의 각 well에 담아 흰 종이 위에서 색도를 측정하였다. 색차계(Minolta, CR-300, Konica Minolta Co., Tokyo, Japan)를 사용하여, $L=93.7$ $a=0.3130$ $b=0.3194$ 의 색도를 나타내는 표준판(calibration plate)으로 보정한 후, 각 PLT에 대해 명도(L, lightness), 적색도(a, redness) 및 황색도(b, yellowness)를 5회 반복 측정하였다. 각 PLT 간의 색차(color difference, ΔE)는 가장 낮은 농도인 0.1 mg/mL PLT를 대조군으로 선정 후 분석하였으며 계산식은 하단 식과 같다. 또한 폰카메라(Galaxy S20 plus SM-G986N, Samsung Electronics Inc., Suwon, Korea)를 이용하여 처리 조건에 따른 샘플들을 함께 촬영하여 색상을 비교 관찰하였다.

$$\Delta E = \sqrt{(L-L')^2 + (a-a')^2 + (b-b')^2}$$

2.3. DPPH 라디칼 소거능 측정

각 PLT의 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거능은 Brand-Williams의 방법을 변형하여 측정하였다(Brand-Williams 등, 1995). 즉, 각 조건별 PLT 25 μ L와 0.02% DPPH 125 μ L를 혼합하여 SpectraMax® ID3(Molecular Devices, San Jose, CA, USA)을 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 기존의 알려진 항산화제인 ascorbic acid(Kanto Chemical, Tokyo, Japan)를 표준물질로 사용하여 얻은 표준곡선으로부터 시료 용액의 DPPH 라디칼 소거능을 구하였으며, 측정단위는 mg ascorbic acid equivalent(mg AAE)/mL를 사용하였다.

2.4. ABTS 라디칼 소거능 측정

각 PLT의 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) 라디칼 소거능은 Biglari의 방법으로 분석하였다(Biglari 등, 2008). 즉, 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 1:1로 혼합한 후 차광 상태로 16시간 동안 반응시킨 후 증류수로 희석하여 734 nm에서의 흡광도값이 0.70 ± 0.02 가 되도록 ABTS 용액을 제조하였다. 이후, 각 조건별 PLT 10 μ L와 ABTS 용액 190 μ L를 혼합하여 6분간 상온에서 반응시킨 후 SpectraMax® ID3(Molecular Devices)을 이용하여 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. Trolox를 표준물질로 사용하여 얻은 표준곡선으로부터 시료 용액의 ABTS 라디칼 소거능을 구하였으며, 측정단위는 μ mol trolox equivalent(μ mol TE)/mL를 사용하였다.

2.5. Ferric reducing antioxidant power(FRAP) 측정

각 PLT의 환원력은 Benzie의 방법을 변형하여 측정하였다(Benzie와 Strain, 1996). 즉, 300 mM sodium acetate buffer(pH 3.6), 40 mM HCl에 녹인 10 mM 2,4,6-tripyridyl-s-triazine, 그리고 20 mM ferric chloride를 10:1:1(v/v/v)의 비율로 혼합하여 37°C에서 20분간 반응시켜 FRAP 반응액을 준비하였다. 이후, 각 조건별 PLT 10 μ L에 10 μ L의 증류수와 100 μ L의 FRAP 반응액을 첨가하여 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. Ascorbic acid를 표준물질로 사용하여 얻은 표준곡선으로부터 시료 용액의 환원력을 구하였으며, 측정단위는 mg AAE/mL를 사용하였다.

2.6. 총폴리페놀 함량 측정

각 PLT 내 총폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu법을 이용하여 분석하였다(Singleton 등, 1999). 각 조건별 PLT 10 μ L에 20 μ L의 10% Folin-Ciocalteu 반응액을 혼합하고 80 μ L의 700 mM sodium carbonate를 첨가하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 95% methanol에 녹인 gallic acid(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 표준물질로 사용하여 얻은 표준곡선으로부터 시료 용액의 총폴리페놀 함량을 구하였으며, 측정단위는 mg gallic acid equivalent(mg GAE)/mL를 사용하였다.

2.7. 총플라보노이드 함량 측정

각 PLT 내 총플라보노이드 함량은 aluminum chloride 법으로 측정하였다(Zhishen 등, 1999). 각 조건별 PLT 25 μ L에 125 μ L의 증류수와 10 μ L의 5% sodium nitrite solution을 혼합하여 6분간 방치 후, 15 μ L의 10% aluminum chloride hexahydrate를 첨가하여 5분간 상온에서 반응시켰다. 여기에 50 μ L의 1 M sodium hydroxide와 125 μ L의 증류수를 첨가한 후 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총플라보노이드 함량은 catechin (Sigma-Aldrich)의 표준곡선으로부터 구하였으며 측정단위는 mg catechin(mg CE)/mL를 사용하였다.

2.8. 통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복 실시하였고 결과치를 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 실험결과는 SPSS 통계프로그램 (version 27.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였다. 각 실험군 간 차이는 유의확률 $p < 0.05$ 에서 one-way ANOVA 및 Duncan's multiple range test로 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 시료와 용매 비율에 따른 PLT의 색 변화

차의 색은 음용 이전에 시각적으로 호소하여 차로써 입맛을 돋우는 역할을 할 수 있어, 차의 품질 평가 시 중요한 요소가 될 수 있다. 따라서 시료와 용매의 비율(w/v)에 따른

품질 특성의 지표로서 색도를 측정한 결과를 Table 1에 나타내었다. 용매 물 대비 시료 감잎분말의 양이 많아질수록 밝기를 의미하는 L값은 낮아지는 경향을, 황색을 나타내는 b값은 높아지는 경향을 나타냈다. 이러한 색의 변화는 Fig. 1에서도 확인되었다. 적색을 의미하는 a값은 0.1 mg/mL에서 5 mg/mL 범위 내에서는 시료의 양이 증가할수록 낮아지는 경향을 보였다. 반면, 10 mg/mL의 a값은 0.1 mg/mL와 유사한 수준을 나타내었다. 색의 차이를 나타내는 ΔE 값은 용매 대비 시료의 양이 많아질수록 높아지는 경향을 보였으며, 용매 대비 시료의 양이 가장 높은 10 mg/mL에서 17.52 ± 0.03 으로 색의 차이 값이 가장 큰 것으로 나타났다. 추출 조건에 따른 감잎차의 색 변화는 찌차(steamed tea)와 볶음차(roasted tea)의 전처리 조건에 따라 분석된 바 있다 (Kim과 Oh, 1999). 이는 감잎 시료 2 g에 물 200 mL를 가해 추출처리를 한 것으로, 본 실험에서의 가장 높은 농도인 10 mg/mL 조건에 해당된다. 해당 연구 결과에 따르면 찌는 시간이 증가할수록, 또는 볶음 시간이 증가할수록, 각각 L값은 감소하고 a값, b값 및 ΔE 값은 증가하는 것으로 보고되어, 본 연구에서 침출시킨 시료의 양이 증가하는 것과 전처리 시간이 증가하는 것이 유사한 색도 변화 양상을 나타내는 것으로 사료된다. 이때, 차의 색, 향, 맛의 3가지 관능 평가도 수행되었으며, 전처리 시간이 증가할수록 색, 향, 맛의 전체적 기호성이 우수한 것으로 평가되었다.

3.2. 시료와 용매 비율에 따른 PLT의 항산화력

시료와 용매의 비율(w/v)에 따른 기능성 지표로서 항산화

Table 1. Hunter's color values of persimmon leaf tea prepared by different amounts of persimmon leaf powder

Samples ¹⁾ (mg/mL)	Parameters ²⁾			
	L	a	b	ΔE
0.1	49.81 \pm 0.09 ^{3),f}	-1.57 \pm 0.07 ^e	0.27 \pm 0.05 ^a	0.09 \pm 0.04 ^a
0.5	49.28 \pm 0.01 ^e	-1.74 \pm 0.02 ^d	1.17 \pm 0.00 ^b	1.06 \pm 0.02 ^b
1	48.47 \pm 0.04 ^d	-1.85 \pm 0.02 ^c	2.51 \pm 0.01 ^c	2.62 \pm 0.01 ^c
2	47.87 \pm 0.05 ^c	-1.93 \pm 0.03 ^b	3.73 \pm 0.02 ^d	3.99 \pm 0.01 ^d
5	45.40 \pm 0.02 ^b	-2.08 \pm 0.03 ^a	10.11 \pm 0.01 ^e	10.79 \pm 0.01 ^e
10	42.92 \pm 0.02 ^a	-1.63 \pm 0.03 ^e	16.38 \pm 0.02 ^f	17.52 \pm 0.03 ^f

¹⁾Persimmon leaf powder (mg)/ water (1 mL).

²⁾L, lightness; a, redness; b, yellowness.

³⁾Each value represents mean \pm SD (n=5).

Different superscripts within a column indicate significant differences (one-way ANOVA followed by the Duncan's multiple range test, $p < 0.05$).

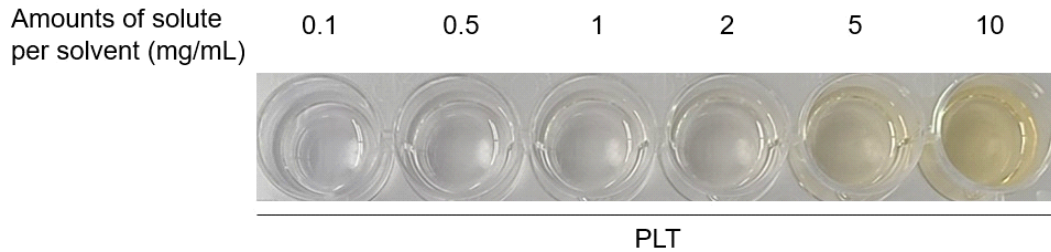


Fig. 1. Changes in colors of persimmon leaf tea (PLT) by different amounts of solute per solvent. PLT was prepared by boiling different amounts (0.1, 0.5, 1, 2, 5, or 10 mg) of persimmon leaf powder in 1 mL of water for 60 min. Color of PLT extracted from different amounts of persimmon leaf powder was visualized via camera.

력을 측정하여 Table 2에 나타내었다. 용매 대비 시료의 양이 많아질수록 DPPH 라디칼 소거능이 증가하는 경향을 보였으나 5 mg/mL와 10 mg/mL군 간의 소거능 값은 차이가 없었다. ABTS 라디칼 소거능은 모든 실험 조건에서 추출 용매 대비 시료의 양이 많아질수록 증가하는 것으로 나타나, 가장 높은 비율인 10 mg/mL 조건에서 $0.908 \pm 0.003 \mu\text{mol TE/mL}$ 값을 보였다. FRAP법에 의한 항산화 활성 또한 유사한 경향을 나타내어 시료의 양이 많을수록 높은 값을 보였다. 일반적으로 차 내 풍부한 성분으로 알려진 폴리페놀은 감잎차 찻물에서 열, 초음파, 또는 발효 처리 등과 같은 제조 방법의 차이에 따라 용출량이 달라지는 것으로 보고된 바 있다(Kim 등, 2012). 또한, 감류 내 건조 상태 및 부위에 따라 꽃감, 생감 및 감잎 추출물의 폴리페놀 함량 및 DPPH 라디칼 소거활성을 비교 분석한 선행연구는 항산화 활성의

원인 물질이 규명되지 않은 꽃감에 비해, 감잎의 항산화 활성은 폴리페놀 함량에 기인함을 보고하였다(Hong 등, 2008).

본 실험에서는 추출용매 대비 PLT 시료의 양이 많아질수록 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량이 높아지는 것으로 분석되어 가장 높은 비율인 10 mg/mL 조건에서 각각 $0.219 \pm 0.010 \text{ mg GAE/mL}$ 및 $0.107 \pm 0.003 \text{ mg CE/mL}$ 값을 보였다. 그러나 본 연구에서의 총폴리페놀 값은 10 mg/mL 동일 농도 조건이면서 본 실험 조건 대비 낮은 온도 및 짧은 시간 동안에 침출시킨 선행연구의 값, 즉 약 90°C 에서 1분간 침출한 본 실험 조건 대비 낮은 온도 및 짧은 시간 동안에 침출시킨 감잎차의 총폴리페놀 함량 0.394 mg GAE/mL 에 비해 절반 정도인 적은 양으로 사료된다(Lim 등, 2008). 다른 연구에서는 시료와 추출용매 비율 15 mg/mL(감잎 1.5 g을 100 mL의 증류수에 침출시킴) 조건

Table 2. Antioxidant activity and bioactive compounds of persimmon leaf tea prepared by different amounts of persimmon leaf powder

Samples ¹⁾ (mg/mL)	Parameters ²⁾				
	DPPH radical scavenging activity (mg AAE/mL)	ABTS radical scavenging activity ($\mu\text{mol TE/mL}$)	Ferric reducing activity (mg AAE/mL)	Total polyphenol contents (mg GAE/mL)	Total flavonoid contents (mg CE/mL)
0.1	$0.011 \pm 0.025^{3),a}$	0.000 ± 0.002^a	0.008 ± 0.001^a	0.003 ± 0.001^a	0.003 ± 0.000^a
0.5	0.025 ± 0.006^b	0.112 ± 0.003^b	0.014 ± 0.001^b	0.020 ± 0.001^b	0.007 ± 0.001^b
1	0.046 ± 0.006^c	0.296 ± 0.005^c	0.020 ± 0.001^c	0.044 ± 0.004^c	0.016 ± 0.001^c
2	0.066 ± 0.004^d	0.506 ± 0.005^d	0.032 ± 0.003^d	0.075 ± 0.005^d	0.027 ± 0.001^d
5	0.138 ± 0.001^e	0.877 ± 0.005^e	0.068 ± 0.003^e	0.149 ± 0.004^e	0.061 ± 0.001^e
10	0.138 ± 0.000^e	0.908 ± 0.003^f	0.111 ± 0.004^f	0.219 ± 0.010^f	0.107 ± 0.003^f

¹⁾Persimmon leaf powder (mg)/ water (1 mL).

²⁾AAE, ascorbic acid equivalent; TE, trolox equivalent; GAE, gallic acid equivalent; CE, catechin equivalent.

³⁾Each value represents mean \pm SD (n=5).

Different superscripts within a column indicate significant differences (one-way ANOVA followed by the Duncan's multiple range test, p<0.05).

이면서 약 90℃에서 3분간 침출하였을 때 0.023-0.042 mg GAE/mL의 총폴리페놀 함량을 보고한 바 있다(Son 등, 2020). 따라서 침출 시 시료의 농도와 침출 시간이 폴리페놀 용출에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 이와 같은 항산화력 관련 지표 분석 결과, 시료의 양이 가장 많은 10 mg/mL에서 항산화 가능성이 가장 우수한 것으로 파악되어, 이후 pH에 따른 추가 분석은 10 mg/mL 조건으로 수행하기로 하였다.

3.3. 용매 pH에 따른 PLT 색의 변화

추출 용매의 pH에 따른 차 품질 특성을 알아보기 위하여 pH가 다르도록 제조한 McIlvaine 완충용액으로 침출시킨 각 PLT의 색도를 측정하고, 그 결과를 Fig. 2와 Table 3에 나타냈다. pH 4와 7 사이에서 용매의 pH가 높아질수록 밝기를 의미하는 L값은 낮아지는 경향을, 황색을 나타내는 b 값과 색의 차이를 나타내는 ΔE값은 높아지는 경향을 나타냈다. 적색을 의미하는 a값은 pH 7에서 5.25 ± 0.03 으로 가장 높았고, pH 5에서 -2.68 ± 0.04 로 가장 낮았으며 pH에 따른 경향성은 나타나지 않았다. 색차계 분석에서 확인된 pH가 높아질수록 황색도가 높아지고, 특히 pH 7에서 적색도가 높아지는 차이는 육안으로도 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 현재까지 침출차의 pH 조건에 따른 색도 변화에 대한 연구들은 많지 않은 실정이다. 녹차 침출수 pH가 녹차 침출액의 색도 변화에 미치는 영향 연구에 따르면, pH 6과 pH 7 사이에 황색을 나타내는 b값이 급격히 증가하였다. 해당 연구에서는 이를 천연형 카테킨류의 이성체가 증가하여 녹차의 갈변이 급속히 진행되는 것으로 고찰하였다 (Kim 등, 1999). 본 연구에서는 카테킨을 포함하는 총폴리

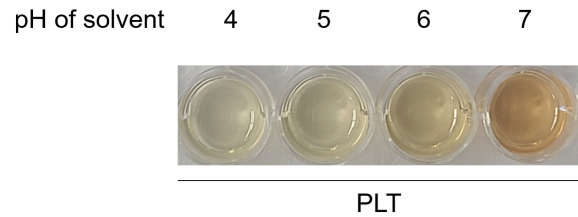


Fig. 2. Changes in colors of persimmon leaf tea (PLT) prepared by an aqueous solvent with different pH conditions. Persimmon leaf powder (10 mg) was extracted using 1 mL of aqueous solvent with different pH (pH 4, 5, 6 or 7) for 60 min. Color of PLT extracted under different pH conditions was visualized via camera.

페놀 함량이 pH 6에 비해 pH 7에서 유의적으로 감소하였다. 후속 연구에서는 감잎차의 pH에 따른 색도 변화가 녹차와 유사하게 카테킨 함량의 변화로 인한 것인지 추가 분석이 요구되는 바이다.

3.4. 추출 pH에 따른 PLT의 항산화력

추출 pH에 따른 PLT의 항산화력을 측정한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. DPPH 라디칼 소거능은 pH 5에서 0.137 ± 0.000 mg AAE/mL로 가장 높은 값을 나타냈으며, pH 4(0.131 ± 0.001 mg AAE/mL)와 pH 6(0.130 ± 0.000 mg AAE/mL)에서 유사한 수준으로 낮았다. 반면, pH 7에서는 0.084 ± 0.001 mg AAE/mL의 값을 나타내 DPPH 라디칼 소거능이 급격하게 낮아지는 것으로 분석되었다. FRAP법에 의한 항산화 활성은 pH가 증가될수록 낮아지는 경향을 보여 pH 4에서 0.137 ± 0.008 mg AAE/mL로 가장 높은 값을, pH 7에서는 0.060 ± 0.007 mg AAE/mL로 가장 낮은 값을 나타냈다. ABTS 라디칼 소거능은 군 간 차이

Table 3. Hunter's color values of persimmon leaf tea prepared under different pH conditions

Samples ¹⁾	Parameters ²⁾			
	L	a	b	ΔE
pH 4	44.33±0.02 ^{3),c}	-2.54±0.02 ^b	10.52±0.02 ^a	11.66±0.02 ^a
pH 5	44.82±0.02 ^b	-2.68±0.04 ^a	11.88±0.02 ^b	12.69±0.02 ^b
pH 6	43.24±0.03 ^b	-1.57±0.03 ^c	15.21±0.02 ^c	16.32±0.02 ^c
pH 7	39.05±0.02 ^a	5.25±0.03 ^d	19.47±0.02 ^d	23.04±0.02 ^d

¹⁾Different pH conditions were adjusted using McIlvaine buffer solution containing 10 mg/mL of persimmon leaf powder.

²⁾L, lightness; a, redness; b, yellowness.

³⁾Each value represents mean±SD (n=5).

Different superscripts within a column indicate significant differences (one-way ANOVA followed by the Duncan's multiple range test, p<0.05).

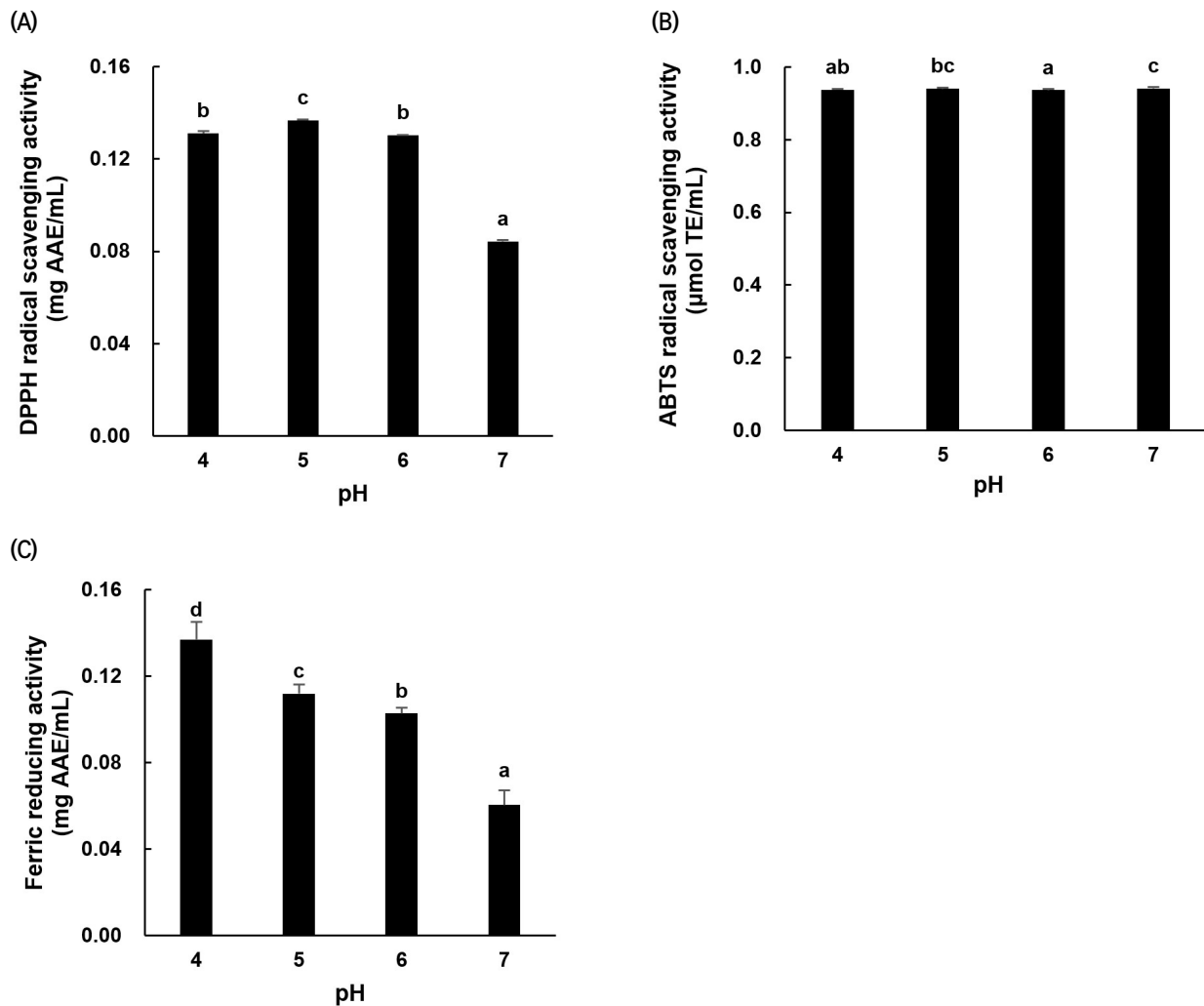


Fig. 3. Antioxidant activity of persimmon leaf tea (PLT) prepared by solvent with different pH conditions. Antioxidant capacity of PLT extracted under different pH condition (10 mg of persimmon leaf powder in 1 mL McIlvaine buffer solution with pH 4, 5, 6 or 7) was measured. (A) DPPH radical scavenging activity is expressed in mg ascorbic acid equivalent per mL of PLT (mg AAE/mL). (B) ABTS radical scavenging activity is expressed in μmol trolox equivalent per mL of PLT ($\mu\text{mol TE/mL}$). (C) Ferric reducing activity is expressed in mg ascorbic acid equivalent per mL of PLT (mg AAE/mL). Values represent mean \pm SD (n=5). Different letters indicate significant difference by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

가 있었으나 pH에 따른 값의 범위가 0.936-0.941 $\mu\text{mol TE/mL}$ 로 그 차이는 미비한 수준이었다. 따라서 ABTS 라디칼 소거능을 제외한 두 결과를 종합하면 pH가 낮을수록 항산화 활성이 높아지는 것으로 사료된다. DPPH 라디칼 소거능과 환원력은 pH 7에서 모두 가장 낮은 값을 나타냈는데, 이는 선행 녹차 침출 연구에서 pH를 4, 5, 6, 및 7로 조정하여 침출 시 pH가 높아질수록 총 카테킨 함량이 감소하는 경향을 나타내며, 특히 pH 7에서 급격하게 감소한 것과 유사한 결과였다(Kim 등, 1999). 해당 연구에서는 산성조건

에서 억제되었던 카테킨의 이성화(epimerization) 반응이 pH 7에서 빠르게 진행된 결과인 것으로 분석 결과를 고찰하였다. 감잎 내 카테킨 함량은 0.18-0.35 mg/100 g(dry weight)으로 품종별로 차이를 보이며 녹차의 0.07 mg/100 g(dry weight)에 비해 높은 것으로 분석된 바 있다(Jung 등, 2004). 따라서 녹차 침출수 연구결과와 유사하게 감잎차 내 카테킨의 이성화 반응에 따라 pH 7에서 카테킨에서 비롯된 항산화 활성이 저해되어, 산성 pH 범위에 비해 급격한 항산화력 감소가 나타난 것으로 사료된다. 또한, pH

에 따른 색도 변화에 따르면 pH 6에서 pH 7로 변화 시 a값에 해당하는 적색이 음의 값에서 양의 값으로 급격히 변화하는 것으로 측정되었다(Table 3).

항산화 활성은 시료의 총폴리페놀 함량과 총플라보노이드 함량과 연관성을 가진다고 보고되어 있으므로(Dai와 Mumper, 2010; Yun 등, 2018), 그 함량을 측정하여 Fig. 4에 나타내었다. 총폴리페놀과 총플라보노이드 함량은 pH 4에서 각각 0.232 ± 0.006 mg GAE/mL와 0.116 ± 0.004 mg CE/mL로 가장 높은 값을 나타내었다. pH 5와 7 사이에서 용매의 pH 증가에 따라 총폴리페놀 함량은 감소하는 경향을 나타내었으나, 총플라보노이드 함량은 pH에 따른 함량 차이를 보이지 않았다. 항산화성을 가지는 물질 중 하나인 녹차의 카테킨류의 pH에 대한 안정성 연구에 따르면 pH가 낮은 산성에서 카테킨이 안정적으로 유지되므로, 차류 기능성 성분을 효율적으로 이용하기 위해서 pH를 낮게 유지하는 것이 권장된 바 있다(Park 등, 2002). 더 앞선 연구는 침출수의 pH를 낮게 유지하는 것이 녹차 고유의 색을 유지하고 카테킨 침출량을 증가시킨다고 보고하였다(Kim 등, 1999). 감잎 내 카테킨은 최소 1.5에서 최대 33.4 mg/100 g, fresh weight) 함량으로 존재하는 것으로 보고

된 바 있다(Chung 등, 1994). 따라서 pH가 낮은 범위에서 높은 항산화력 경향이 나타낸 결과는 감잎 내 카테킨 양에 기인하였을 가능성이 고려될 수 있다.

본 실험은 감잎차 제조에 있어 침출 온도와 시간을 각 100°C와 60분으로 고정하여 수행하였다. 실험조건 설정을 위한 예비실험에서는 60, 80 또는 100°C 조건 및 10, 30, 또는 60분 등 총 9가지 조건에서 DPPH 라디칼 소거 활성과 총폴리페놀 함량을 비교 측정하였고, 추출 온도 및 시간에 따른 차이가 나타나지 않았다(data not shown). 침출 온도와 관련된 선행연구에 따르면 고온 조건에서 항산화 물질 섭취 증가가 유리하다. 즉, 제주산 진피 침출차의 기능성 연구에서 60, 80 또는 100°C에서 침출차 제조 시, 라디칼 소거능이 각각 33.3%, 60.1%, 또는 63.4%를 나타냈다. 다만, 함께 실시한 관능평가 결과에서는 100°C와 같은 고온에서 차를 침출하여 음용 시 여러 가지 향기와 떫은 맛 성분들이 함께 우려 나와 기호도가 80°C 침출차에 비해 낮았다(Yoo 등, 2005). 최근에 수행된 제주 타타리메밀침출차의 침출 조건 연구에서도 60°C 또는 80°C 조건에 비해 100°C에서 침출 시, 플라보노이드 함량, 주요 유효성분인 rutin 함량 그리고 DPPH 라디칼 소거 활성 및 tyrosinase 저해 활성이

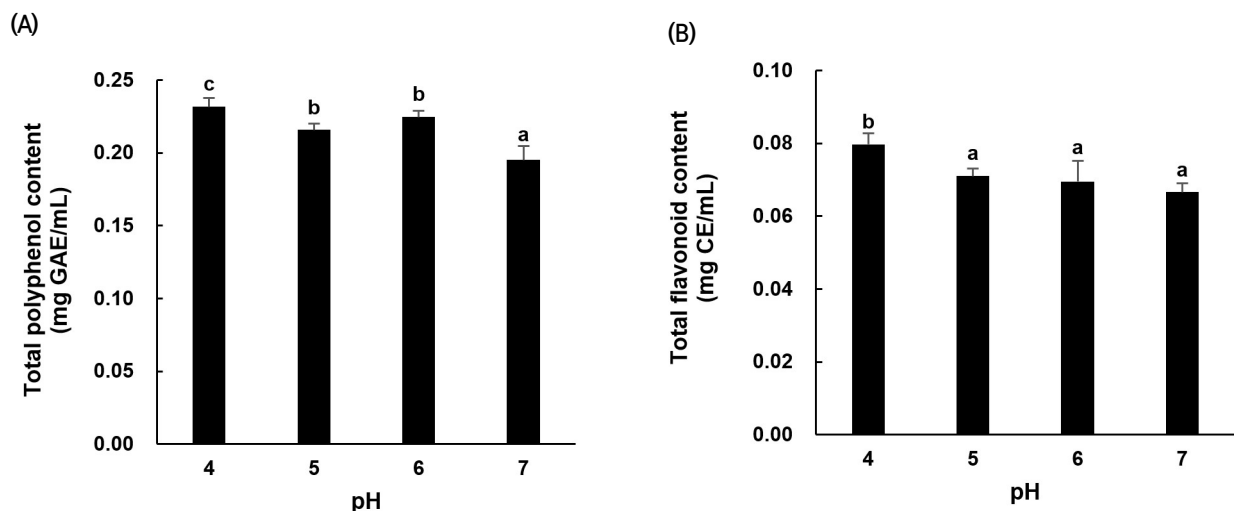


Fig. 4. Total polyphenol and flavonoid contents in persimmon leaf tea (PLT) prepared under different pH conditions. Antioxidant substances in PLT extracted under different pH conditions from 4–7 (10 mg of persimmon leaf powder in 1 mL McIlvaine buffer solution with different pH) was determined. (A) Total polyphenol content is expressed in mg gallic acid equivalent per mL of PLT (mg GAE/mL). (B) Total flavonoid content is expressed in mg catechin equivalent per mL of PLT (mg CE/mL). Values represent mean \pm SD (n=5). Different letters indicate significant difference by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

가장 높게 나타났다(Ko 등, 2022). 침출 시간과 관련하여 현재까지 이루어진 감잎차 연구에서는 20분간 가열 후 여액으로 카테킨을 동정하거나(Shin, 1997), 1, 3, 5 또는 10분간 침출하여 감잎차 내 폴리페놀 성분의 주기능지표인 SOD 유사활성을 비교하여 10분에서 가장 높은 활성을 확인하였다(Park 등, 1995). 또한, 30, 50 또는 70분 등의 침출 조건에 따른 오과차 연구에서는 침출시간이 길수록 유효성분인 유리당 및 유리아미노산의 함량이 증가하였다(You, 1994). 따라서 예비 실험 결과 및 앞서 언급한 선행연구들을 근거로 본 실험에서는 최대 항산화력을 기대할 수 있는 최대 시간 60분 및 최고 온도 100°C를 침출차 제조의 기본 조건으로 설정하고 실험을 수행하였다.

본 연구 결과에 따르면 낮은 pH에서 침출시킨 감잎차에서 가장 높은 항산화력을 기대할 수 있다. pH를 보정한 버퍼가 아닌 일반 증류수로 감잎차를 제조하였을 때 pH는 약 5.25로 측정되었고, 이는 찜 공정 또는 볶음 공정의 전처리 후 제조한 감잎 찐차 또는 볶음차에서 감잎 전처리 조건에 따라 측정된 산도값인 pH 5.2-5.8 범위와 유사한 범위이다(Kim와 Oh, 1999). 해당 연구에서는 색, 향 등의 기호성 및 가용성 고형분 함량, 추출수율 등의 품질평가만 실시되었고 본 연구와 같은 항산화 기능성은 검정되지 않았다. 따라서 본 실험조건과 같은 건조 분말로 바로 침출시키는 경우 또는 선행연구와 같은 찌기 또는 볶기 등의 전처리를 거친 분말로 만든 감잎 침출차의 기능성을 좋게 하기 위해서는 pH 2 범위의 레몬이나 라임 등을 약간 첨가하여 차를 음용하는 것이 권장될 수 있겠다.

4. 요약

본 연구는 시판용 감잎분말을 이용한 침출차 제조 시 시료의 양 및 pH 조건이 감잎차의 색 품질과 항산화능에 미치는 영향을 알아보기 위해 수행되었다. 차 내 감잎의 양이 많을수록 차의 명도는 감소하고 적색도와 황색도는 증가하였다. 항산화 특성 관련 지표 분석 결과, 감잎 함량이 가장 높았던 감잎차(10 mg/mL)에서 항산화력(DPPH 라디칼 소거 활성: 0.138 ± 0.000 mg AAE/mL, ABTS 라디칼 소거 활성: 0.908 ± 0.003 μ mol TE/mL, FRAP 환원력: 0.111 ± 0.004 mg AAE/mL)과 항산화 성분 함량(총폴리페놀 함량:

0.219 ± 0.010 mg/GAE mL, 총플라보노이드 함량: 0.107 ± 0.003 mg/CE mL)이 가장 높았다. 다음으로, 감잎차 내 시료의 양은 10 mg/mL로 고정하고, 침출 용매의 pH 조건을 pH 4에서 7 범위로 설정하여 색도와 항산화성을 분석하였다. 분석 결과, pH가 증가함에 따라 감잎차의 명도는 감소하고 적색도와 황색도는 증가하였다. 또한, DPPH 라디칼 소거 활성과 FRAP 항산화력은 pH가 낮을수록 높은 경향을 보였다. 일관되게, 가장 낮은 pH 4에서 다른 군에 비해 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량이 가장 높은 것을 확인하였다. 전반적으로, pH 4 조건에서 제조한 감잎차의 항산화 활성이 다른 pH 조건 대비 더 우수하였고 폴리페놀 화합물 함량도 더 많았다. 동시에 색도는 더 밝으면서 붉은 정도와 황색 정도가 적었다. 결론적으로, 시료의 양을 높이면서 낮은 pH 조건에서 감잎차를 준비하는 것이 항산화 기능성 측면에서 더 나은 건강 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

Acknowledgements

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (2021R1A6A1A03040177).

Conflict of interests

The authors declare no potential conflicts of interest.

Author contributions

Conceptualization: Kim CY. Methodology: An J. Formal analysis: An J. Validation: An J. Writing - original draft: An J, Kim J. Writing - review & editing: Kim J, Kim CY.

Ethics approval

This article does not require IRB/IACUC approval because there are no human and animal participants.

ORCID

Jonghwa An (First author)

<https://orcid.org/0000-0001-9488-3032>

Juhae Kim (First author)

<https://orcid.org/0000-0002-7576-0114>

Choon Young Kim (Corresponding author)

<https://orcid.org/0000-0002-5980-4578>

References

- Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal Biochem*, 239, 70-76 (1996)
- Biglari F, Alkarkhi AFM, Easa AM. Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix Dactylifera*) fruits from iran. *Food Chem*, 107, 1636-1641 (2008)
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol*, 28, 25-30 (1995)
- Cho KY. Studies on the extraction condition of Ssang Wha tea. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 18, 34-39 (1989)
- Choi HJ, Son JH, Woo HS, An BJ. Changes of composition in the species of persimmon leaves (*Diospyros kaki* folium) during growth. *Korean J Food Sci Technol*, 30, 529-534 (1998)
- Chung SH, Moon KD, Kim JK, Seong JH, Shon TH. Changes of chemical components in persimmon leaves during growth for processing persimmon leaves tea. *Korean J Food Sci Technol*, 26, 141-146 (1994)
- Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, 7313-7352 (2010)
- FAO. International Tea Market: Market Situation, Prospects and Emerging Issues. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy (2022)
- Hong JH, Kim HJ, Choi YH, Lee IS. Physiological activities of dried persimmon, fresh persimmon and persimmon leaves. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 37, 957-964 (2008)
- Jung KM, Kang GH, Kwon MK, Song IK, Cho DH, Chou YD. Chemical components and antioxidant activity of persimmon (*Diospyros kaki*, Thunb.) leaves. *Korean J Food Preserv*, 11, 175-181 (2004)
- KAF, FTC. Processed Food Segment Market Status Report: Beverage Market (Including Bottled Water) [printed in Korean]. Korea Agro-Fisheries & Food Trade Coporation, Naju, Korea (2019)
- Kim ID, Kim HR, Noh YJ, Shin DH. Antioxidant activity, ascorbic acid and amino acid content of persimmon (*Diospyros kaki*, Thunb.) leaf tea solution. *FoodServ Ind J*, 8, 7-19 (2012)
- Kim MJ, Oh SL. Effect of pre-treatment methods on the quality improvement of persimmon leaf tea. *Korean J Postharvest Sci Technol*, 6, 435-441 (1999)
- Kim SH, Park JD, Lee LS, Han DS. Effect of pH on the green tea extraction. *Korean J Food Sci Technol*, 31, 1024-1028 (1999)
- Ko HA, Park HJ, Kang I. Changes in chemical composition and physiological activity of Jeju-Tatary buckwheat tea according to leaching temperature. *J Appl Biol Chem*, 65, 421-427 (2022)
- KOSIS. Food and Food Additives Production Performance: Changes in Domestic Sales by Beverage Items [printed in Korean]. Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea (2021)
- Lee J. Selection attributes of leached teas according to food-related lifestyle and consumption behavior. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 48, 769-776 (2019)
- Lim JH, Kim BK, Park CE, Park KJ, Kim JC, Jeong JW, Jeong SW. Antioxidative and antimicrobial activities of persimmon leaf tea and green tea. *J East Asian Soc Diet Life*, 18, 797-804 (2008)
- MFDS. Korean Food Standards Codex. Ministry of Food and Drug Safety (2022)
- Moon SH. Inhibitory effect of persimmon leaves on the mutagenicity in spore rec assay and on the growth of human cancer cells. *Korean J Food & Nutr*, 15, 23-28 (2002)

- Moon SH, Lee MK. Inhibitory effects of xanthine oxidase by boiled water extract and tannin from persimmon leaves. *Korean J Food & Nutr*, 11, 354-357 (1998)
- Park YH, Won EK, Son DJ. Effect of pH on the stability of green tea catechins. *J Fd Hyg Saf*, 17, 117-123 (2002)
- Park YJ, Kang MH, Kim JI, Park OJ, Lee MS, Jang HD. Changes of vitamin C and superoxide dismutase (SOD)-like activity of persimmon leaf tea by processing method and extraction condition. *Korean J Food Sci Technol*, 27, 281-285 (1995)
- Shin DH. Separation of antioxidant compounds from persimmon leaves. *J of Korean Oil Chemists' Soc*, 14, 103-107 (1997)
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventios RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299, 152-178 (1999)
- Son JY, Ahn GH, Kim EG, Choi ST, Lee DU, Park HW, Lee SC. Physiological activities of water extracts from sweet persimmon leaves. *Korean J Food Sci Technol*, 52, 363-368 (2020)
- Son JY, Kim TO. Antioxidative and physiological activities of traditional Korean teas. *Korean J Food Cookery Sci*, 27, 567-575 (2011)
- Yoo KM, Kim CE, Kim DI, Huh D, Hwang I. Antioxidant activity and physicochemical characteristics of tangerine peel tea prepared with *Citrus unshiu* cultivated in Cheju. *Korean J Food Cookery Sci*, 21, 354-359 (2005)
- You MJ. Changes in component of five-fruit tea, with various extraction time. *Korean J Food & Nutr*, 7, 253-258 (1994)
- Yun H, Lim S, Park H, Shin Y. Correlation between antioxidant compounds and activities of '*Hibiscus sabdariffa*' teas from different origins. *J East Asian Soc Diet Life*, 28, 40-46 (2018)
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, 64, 555-559 (1999)