

## 반응표면분석법을 이용한 프로폴리스의 에탄올 추출조건 최적화

김성호 · 김인호 · 강복희<sup>1</sup> · 이경희<sup>2</sup> · 이상환<sup>3</sup> · 이동선<sup>4</sup> · 김소미<sup>4</sup> · 허상선<sup>5</sup> · 권택규<sup>6</sup> · 이진만<sup>1,2\*</sup>

경북과학대학 바이오식품과, <sup>1</sup>호서대학교 식품기능안전연구센터 및 기초과학연구소,  
<sup>2</sup>호서대학교 식품생물공학과, <sup>3</sup>경북대학교 식품공학과, <sup>4</sup>제주대학교 생명공학부,  
<sup>5</sup>중부대학교 식품생명과학과, <sup>6</sup>계명대학교 의과대학 면역학교실

## Optimization of Ethanol Extraction Conditions from Propolis (a Bee Product) Using Response Surface Methodology

Seong-Ho Kim, In-Ho Kim, Bok-Hee Kang<sup>1</sup>, Kyung-Hee Lee<sup>2</sup>, Sang-Han Lee<sup>3</sup>,  
Dong-Sun Lee<sup>4</sup>, Somi K. Cho<sup>4</sup>, Sang-Sun Hur<sup>5</sup>, Taeg-Kyu Kwon<sup>6</sup>  
and Jin-Man Lee<sup>1,2\*</sup>

*Department of Bio and Food Science, Kyungbuk College of Science, Chilgok 718-851, Korea*

<sup>1</sup>*Center for Food Function and Safety and Basic Science Institute, Hoseo University, Asan 336-795, Korea*

<sup>2</sup>*Department of Food & Biotechnology, Hoseo University, Asan 336-795, Korea*

<sup>3</sup>*Department of Food Science & Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea*

<sup>4</sup>*Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea*

<sup>5</sup>*Dept. of Food Science & Biotechnology, Joongbu University, Kumsan 312-702, Korea*

<sup>6</sup>*Department of Immunology, School of Medicine, Keimyung University, Taegu 700-712, Korea*

### Abstract

A central composite design was used to optimize extraction of propolis materials using ethanol. The independent variables in extraction experiments were ethanol concentration (50, 60, 70, 80, 90%, v/v) and extraction time (1, 2, 3, 4, and 5 h). Higher ethanol concentration and shorter extraction time increased total polyphenol content, but total polyphenol concentration began to decrease when ethanol concentration was higher than 80% (v/v). Ethanol concentration was more important than extraction time in optimization of total polyphenol content in propolis extracts. Electron-donating ability increased with ethanol concentration and shorter extraction time, with ethanol concentration being of greater significance. Antioxidant ability in extracts was optimal at an ethanol concentration of 65 - 75% and with an extraction time of 2.2 - 3.6 h. Nitrite-scavenging ability was increased with use of higher ethanol concentration and shorter extraction time. Total flavonoid content was maximized with an ethanol concentration of 68 - 82% and an extraction time of 2.4 - 3.7 h. Total flavonoid content was affected by both ethanol concentration and extraction time. By superimposition of contour plots, an ethanol concentration of 72 - 82% and an extraction time of 2.2 - 3.3 h were optimal for preparation of propolis extracts.

**Key words** : propolis, ethanol, response surface methodology, flavonoid, extract

### 서 론

프로폴리스는 꿀벌이 유해 세균이나 바이러스로부터

보금자리를 보호하고 청결한 환경을 유지하기 위해 수목에서 얻은 수액에 봉납이나 타액을 혼합시켜 만든 점착성 있는 수액상의 천연 물질로서 황갈색의 천연 화합물이다 (1). 프로폴리스의 성분은 약 150종 이상의 화합물을 포함하고 있는 것으로 알려져 있으며, 주성분은 polyphenol이다. Flavonoid, phenolic acid 및 ester, phenolic aldehyde, ketone,

\*Corresponding author. E-mail : jmlee@hoseo.edu,  
Phone : 82-41-540-5645, Fax : 82-41-544-4151

다량의 왁스수지, 발삼, 정유, 화분 등이 있으며 이 외에 각종 비타민 및 미네랄도 함유하고 있다. 이러한 성분은 프로폴리스의 채집 산지나 시기, 주위의 식물 등에 따라 종류, 함량에 차이가 있으며 효능에도 차이가 있다(2). 프로폴리스는 항균효과(2), 항바이러스 작용(2), 항염증(3), 항암 작용(4), 항산화능(5,6) 등의 여러 생리활성이 보고된 바 있으며 관련 연구가 활발히 진행되고 있다.

외국에서는 현재 프로폴리스를 이용한 제품으로 캡슐, 탱크제, 타블렛, 화장품, 치약, 구강청정제 및 일광차단제 등의 재료와 첨가제로 다양하게 이용되고 있다(7). 프로폴리스가 광범위하게 이용되고 있는 동구 유럽이나 호주, 브라질 등에서는 이미 오래 전부터 프로폴리스에 대한 심도 있는 수많은 연구가 진행되고 있으나 국내의 프로폴리스 관련 연구는 아직 체계적인 연구가 부족한 실정이다.

프로폴리스를 이용한 응용제품 관련 국내 연구로는 프로폴리스를 이용한 육류양념소스 개발(8), propolis 수용성분 말 제조 및 이를 첨가한 빵의 저장 중 품질변화(9), 프로폴리스 첨가 양미리 연육 튀김, 어묵의 품질특성(10), 프로폴리스를 이용한 숙취 해소 음료(11) 등이 있으며, 프로폴리스 추출과 관련된 연구로는 용매별 추출물의 생리활성(12), 에틸 알코올로 추출한 프로폴리스의 이화학적 특성(13) 등이 있다.

프로폴리스는 다양한 생리활성을 지닌 소재로서 건강기능성 제품으로 각광받고 있으며, 대중에게 효능과 우수성이 널리 확대되고 있는 추세이다. 따라서, 본 연구에서는 영덕군 일대에서 수집된 프로폴리스를 이용하여 다양한 응용제품 개발에 앞서 프로폴리스의 에탄올 추출조건에 따른 플라보노이드, 항산화능 등의 품질특성을 살펴보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용한 프로폴리스는 경북 영덕군 일대에서 2003년에 채취한 시료를 구입하여 사용하였다.

### 에탄올 추출조건 설정을 위한 실험계획

본 실험에서는 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)(14)을 이용하여 추출조건에 따른 추출물의 이화학적 특성을 모니터링하고 최적 추출조건을 예측하였다. 추출조건의 최적화를 위한 실험계획은 중심합성계획법(15)에 의하여 설계하였고, 반응표면분석법을 위해서는 SAS (statistical analysis system) 프로그램(16)을 사용하였다. 중심합성계획에서 독립변수( $X_n$ )는 예비실험 결과 유효성분의 함량이 높을 것으로 예측되는 범위로서 에탄올 농도(50~90%,  $X_1$ ) 및 추출시간(1~5 hr,  $X_2$ )으로 설정하여 실험계

획은 -2, -1, 0, 1, 2로 5단계로 부호화하였다(Table 1). 프로폴리스 추출물의 이화학적 특성에 관련된 종속변수( $Y_n$ )로는 총 페놀성 화합물 함량( $Y_1$ ), 전자공여능( $Y_2$ ), 아질산염소거능( $Y_3$ ), 항산화능( $Y_4$ ), quercetin( $Y_5$ ), t-cinamic acid( $Y_6$ ), kaempferol( $Y_7$ ), isorhamnetin( $Y_8$ ), chrysin( $Y_9$ ), acacatin( $Y_{10}$ ), total flavonoid( $Y_{11}$ ) 함량을 설정하였으며, 추출조건별로 프로폴리스에 대한 용매비는 10 mL/g으로 하여 추출을 실시하였다.

**Table 1. Experimental design of ethanol extraction conditions for propolis**

Extraction condition	-2	-1	0	1	2
$X_1$ Ethanol concentration (%)	50	60	70	80	90
$X_2$ Time (hrs)	1	2	3	4	5

### 총페놀성 화합물의 함량 측정

총 페놀성 화합물 함량은 Folin-Denis법(17)에 따라 비색 정량하였다. 각 시험용액을 일정하게 희석한 검액 2 mL에 Folin-Ciocalteu 시약 2 mL를 가하여 혼합하고, 3분 후 10%  $Na_2CO_3$  2 mL를 넣어 진탕하고 1시간 실온에서 방치하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준물질로는 tannic acid를 5~50  $\mu$ g/mL의 농도로 조제하여 검량곡선의 작성에 사용하였다.

### 전자공여능 측정

시험용액의 전자공여능은 DPPH를 사용한 방법으로 측정하였다(18). DPPH 시약 12 mg을 에탄올 100 mL에 용해한 후 증류수 100 mL를 가하고 50% 에탄올 용액을 공시험으로 하여 517 nm에서 DPPH 용액의 흡광도를 약 1.0으로 조정하였다. 이 용액 4 mL를 취하여 시험용액 1 mL와 혼합한 후 상온에서 10분간 방치시킨 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하여 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 표시하여 전자공여능으로 하였다.

$$EDA(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{공시험의 흡광도}}\right) \times 100$$

### 아질산염 소거능 측정

프로폴리스 추출물에 대한 아질산염소거능은 Gray와 Dugan의 방법(19)에 준하여 측정하였다. 1 mM  $Na_2NO$  1 mL에 각각의 추출시료를 첨가하고, 여기에 0.1 N HCl을 사용하여 pH 1.2로 조정된 반응용액을 10 mL로 하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후, 반응액 1 mL를 취하여 2% 초산 용액 5 mL를 첨가한 다음 Griess 시약 0.4 mL를 가하여 혼합하고 15분간 정치 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

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

N : 아질산염 소거율

A : 1 mM 아질산나트륨(NaNO<sub>2</sub>) 용액에 시료를 첨가하여 1시간 방치시킨 후의 흡광도

B : 아질산나트륨(NaNO<sub>2</sub>) 용액의 흡광도

C : 시료자체의 흡광도

**항산화능 측정**

프로폴리스 추출물들의 항산화능은 Rancitometer를 이용하여 측정하였으며, 전도도(conductivity)가 급격하게 증가되는 시점까지를 유도기간으로 계산하여 항산화 정도를 측정하였다. 또 항산화지수(antioxidant index, AI)는 각 추출물을 첨가한 실험구의 유도기간을 무첨가구의 유도기간으로 나눈 값으로 구하였다. 측정 조건은 시료 2.5 g을 반응조(reaction vessel)에 취하고, 증류수를 측정조(measuring vessel)에 넣은 후 반응온도 110℃, 공기유입속도(air flow rate) 20 L/hr로 하여 산화 안정성을 비교하였다.

$$AI = \frac{\text{각 추출물을 첨가한 실험구의 유도기간}}{\text{무첨가구의 유도기간}}$$

**플라보노이드 성분 분석**

프로폴리스 추출물에 함유된 플라보노이드 성분분석은 고속액체크로마토그래피(High-Performance Liquid Chromatography, HPLC)를 이용하여 실시하였다. 표준물질인 퀘세르틴(querctin), t-시나믹산(t-cinnamic acid), 캄프페롤(kaempferol), 이소람네티딘(isorhamnetin), 아카세틴(acacetin) 및 크리신(chrysin)은 시그마사(Sigma Co., U.S.A)에서 구입하여 사용하였으며 이 때 사용된 HPLC의 분석 조건은 Table 2와 같다.

**Table 2. Operating condition of HPLC for analysis of flavonoids**

Specification	Condition
Instrument	Shimadzu LC-10AT, Co.
Column	Shim-pack ODS (4.6 mm * 250 mm, pore size 5 μm, Shimadzu Co.)
Column temperature	35℃
Mobile phase	Acetic acid : Methanol : Water = 5 : 75 : 65 (v/v)
Flow rate	1 mL/min
Detector	UV 254 nm

**결과 및 고찰**

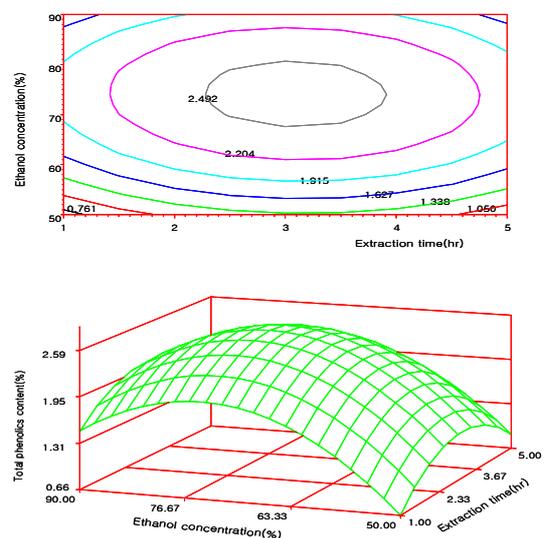
**총 페놀성 화합물 함량에 대한 추출조건의 영향**

추출물에 대한 총 페놀성 화합물의 함량은 Table 3에

나타내었으며, 반응표면은 Fig. 1에 나타내었다. 총 페놀성 화합물 함량에 대한 추출물의 회귀식의 R<sup>2</sup>는 0.8838으로 10% 유의수준에서 유의성이 인정되었다. 예측된 정상점은 최대점으로 최대값은 2.58%로 예측되었으며, 이 때의 추출 조건은 에탄올 농도 73.91% 및 추출시간 3.08시간이었다 (Table 6). 총 페놀성 화합물 함량은 에탄올 농도가 높을수록 증가하다가 80% 이상에서는 감소하는 것으로 나타났으며 (Fig. 1), Table 7과 같이 추출시간보다는 에탄올 농도에 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. Jeong 등(20)의 연구에서는 프로폴리스의 각 용매별(에탄올 농도 0, 50, 75, 95%)

**Table 3. Experimental data on polyphenol content, electron donating ability, antioxidant, nitrite-scavenging ability(pH 1.2) of propolis ethanol extract by central composite design for response surface methodology**

Exp. No.	Extraction condition		Total polyphenol content (mg %)	Electron donating ability (%)	Antioxidant ability (AI)	Nitrite-scavenging ability (in pH 1.2) (%)
	Ethanol concentration (%)	Extraction time (hr)				
1	80 (1)	4 (2)	2.13	74.28	2.39	97.59
2	80 (1)	2 (-1)	2.22	79.84	2.57	98.61
3	60 (-1)	4 (2)	2.05	70.73	2.23	96.07
4	60 (-1)	2 (-1)	2.10	72.58	2.46	96.62
5	70 (0)	3 (0)	2.62	74.51	2.88	97.61
6	70 (0)	3 (0)	2.62	74.51	2.88	97.61
7	90 (2)	3 (0)	2.20	76.29	2.09	99.00
8	50 (-2)	3 (0)	1.21	66.45	2.14	95.83
9	70 (0)	5 (2)	2.16	69.19	2.29	97.12
10	70 (0)	1 (-2)	1.92	70.30	2.34	96.84



**Fig. 1. Response surface plot for total polyphenol content in ethanol extraction condition of propolis.**

추출물 100 g에 함유되어 있는 총 polyphenol 화합물의 함량을 조사한 결과 70% 에탄올 추출물이 3.59%로 가장 많이 함유되어 있었으며, 50% 에탄올 추출물 3.52%, 95% 에탄올 추출물 3.41% 및 물 추출물이 1.17% 순으로 나타난 것으로 보고한 바 있다.

**전자공여능에 대한 추출조건의 영향**

DPPH는 자유기(free radical)의 안정된 모델로서 반응 중 DPPH의 감소는 radical의 소거 반응이 진행됨을 예측할 수 있어 radical에 의한 지질과산화의 초기 반응의 억제 정도를 판단할 수 있다. 프로폴리스의 각 추출물에 대한 전자공여능을 측정 한 결과는 Table 3과 같다. 추출물의 전자공여능에 대한 R<sup>2</sup>는 0.8925로 5% 이내의 유의성이 인정되었다. 예측된 정상점은 최대점으로 전자공여능의 최대값에 대한 추출조건은 에탄올 농도 87.82% 및 추출시간 2.09시간이었으며 이 때의 최대값은 78.31%이었다(Table 6). 추출물의 전자공여능은 에탄올 농도가 높을수록, 추출시간이 짧을수록 전자공여능이 증가하는 경향을 나타내었으며, 추출시간 보다는 에탄올농도에 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다(Fig. 2, Table 7). 프로폴리스 에탄올 추출물의 농도별 DPPH radical 소거활성 실험(12)에서 프로폴리스 추출물 12 µg을 첨가했을 때 30%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내었으며, 100 µg 첨가구는 약 60~90%로 시료에 따라 다르게 나타났다. 추출물 중에서 낮은 농도에서는 70% 에탄올 추출물에서 높은 활성을 나타내었으며, 농도가 증가하면서 95% 에탄올 추출물이 가장 높은 활성을 나타내었다.

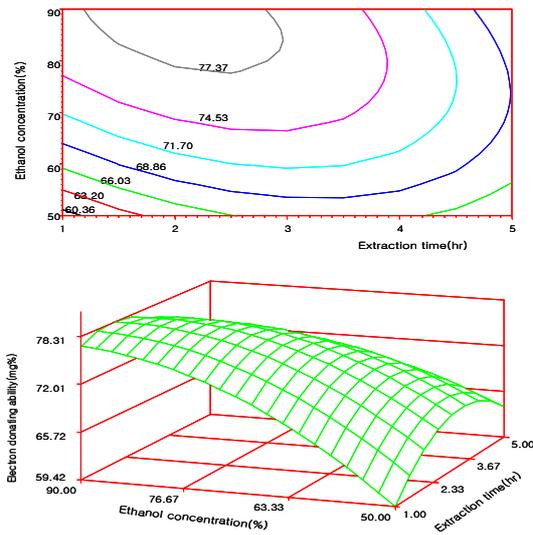


Fig. 2. Response surface plot for electron donating ability in ethanol extraction condition of propolis.

**항산화능에 대한 추출조건의 영향**

추출조건에 따른 항산화능의 측정결과는 Table 3에 나타

내었고, 항산화능 측정에 대한 추출물의 회귀식 R<sup>2</sup>는 0.8843이며, 10% 이내에서 유의수준이 인정되었다. 예측된 정상점은 최대점으로 최대값 2.80으로 예측되었고, 이 때 추출조건은 에탄올 농도 70.37% 및 추출시간 2.80시간이었다(Table 6). 항산화능이 가장 높게 나타난 범위는 에탄올 농도 65~75%, 추출시간 2.2~3.6시간이었으며(Fig. 3), 에탄올 농도와 추출시간 모두 영향을 받는 것으로 나타났으나 특히 에탄올농도에 영향을 많이 받는 것으로 나타났다(Table 7). Park 등(21)의 연구에서 propolis의 항산화능이 90% ethanol 추출물보다 70%, 80% ethanol 추출물에서 보다 높게 나타난 결과와 유사한 경향을 보였다.

**아질산염소거능에 대한 추출조건의 영향**

프로폴리스 에탄올 추출물의 아질산염소거능은 Table 3과 같이 나타났으며, R<sup>2</sup>는 0.9155로 5% 이내의 유의성이 인정되었다. 예측된 정상점은 안장점으로 능선분석을 한 결과 최대값은 99.12%이었고, 이때 추출조건은 에탄올 농도 89.44% 및 추출시간 2.53시간이었다(Table 6). 추출물의 아질산염소거능은 에탄올농도가 높을수록 증가하였고, 추출시간이 짧을수록 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 4). Table 7과 같이 프로폴리스의 아질산염소거능의 추출영향은 추출시간보다는 에탄올농도가 더 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이 등(12)은 에탄올 농도별 프로폴리스 추출물의 아질산염 소거능을 측정 한 결과 50%, 70%의 에탄올 추출물을 농도별로 첨가하였을 때 약 80%의 아질산염 소거 활성을 나타내었다고 보고하였다. Seo 등(22)은 4종의 프로폴리스 에탄올 추출물의 아질산염 소거능을 조사한 결과 42.93~83.24%를 나타내었다고 보고하였으며 이러한 활성은 flavonoid에 기인한 것으로 보고하였다.

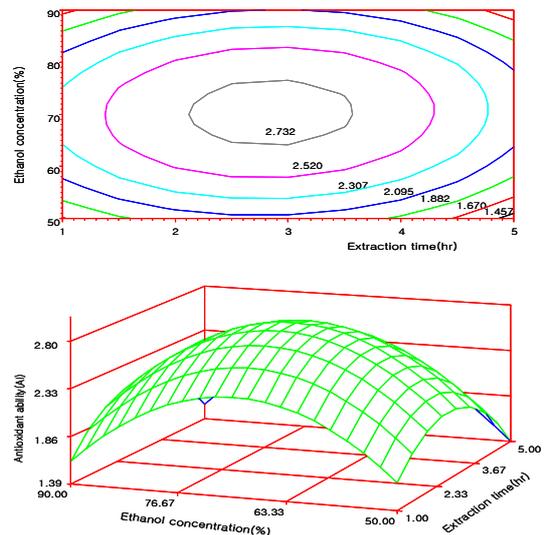


Fig. 3. Response surface plot for antioxidant ability in ethanol extraction condition of propolis.

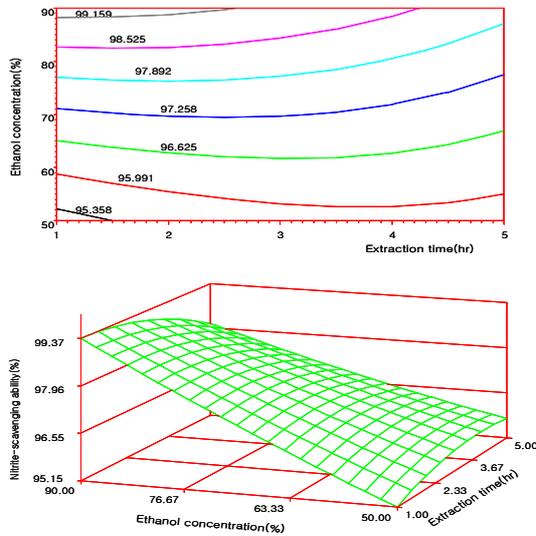


Fig. 4. Response surface plot for nitrite scavenging ability in ethanol extraction condition of propolis.

Table 4. Experimental data on quercetin, t-cinamic acid, kaempferol, isorhamnetin, chrysin, acacetin and total flavonoid content of propolis ethanol extract by conral composite design for response surface methodology

Exp. No.	Extraction condition		Total flavonoid						
	Ethanol concentration (%)	Extract time (hr)	Quercetin content (mg%)	t-cinamic acid content (mg%)	Kaempferol content (mg%)	Isorhamnetin content (mg%)	Chrysin content (mg%)	Acacetin content (mg%)	Total flavonoid content (mg%)
1	80	4	24.73	25.98	24.77	32.45	254.14	39.97	402.04
2	80	2	31.37	32.49	32.21	56.78	254.52	42.89	429.67
3	60	4	29.54	28.05	29.76	40.86	236.78	40.95	405.94
4	60	2	26.15	26.34	25.40	38.01	243.16	43.29	402.35
5	70	3	31.68	27.72	30.19	45.18	276.08	47.10	457.95
6	70	3	61.68	27.72	30.19	45.18	276.08	47.10	457.95
7	90	3	24.75	28.62	14.44	22.88	257.84	43.12	391.65
8	50	3	21.87	18.91	17.92	19.52	117.06	25.00	220.28
9	70	5	28.75	22.54	27.69	21.49	200.59	32.95	334.01
10	70	1	24.67	29.85	19.65	32.07	149.51	36.04	291.79

Table 5. Polynominal equations calculated by RSM program for ethanol extraction conditions of propolis

Response	Second order polynomials	R <sup>2</sup>	Significance
Polyphenol content	$Y_{PC} = - 11.027381 + 0.329292X_1 + 0.916369X_2 - 0.002201X_1^2 - 0.001000X_1X_2 - 0.136339X_2^2$	0.8838	0.0524
Electron donating ability	$Y_{EDA} = - 16.045476 + 1.813708X_1 + 13.619107X_2 - 0.009153X_1^2 - 0.09275X_1X_2 - 1.32518X_2^2$	0.8925	0.0453
Antioxidant ability	$Y_{AA} = - 6.989524 + 0.251917X_1 + 0.659643X_2 - 0.001816X_1^2 + 0.001250X_1X_2 - 0.131607X_2^2$	0.8843	0.0519
Nitrite-scavenging ability (pH 1.2)	$Y_{NSA} = 90.063095 + 0.075958X_1 + 1.213512X_2 + 0.000296X_1^2 - 0.011750X_1X_2 - 0.079196X_2^2$	0.9155	0.0286
Total flavonoid content	$Y_{TF} = - 2216.75690 + 61.21845X_1 + 288.518512X_2 - 0.398754X_1^2 - 0.7805X_1X_2 - 38.14169X_2^2$	0.8849	0.0514

플라보노이드 성분 함량에 대한 추출조건의 영향

프로폴리스 추출물의 플라보노이드 성분 함량은 Table 4와 같으며, 회귀분석 결과 각각의 플라보노이드 성분의 반응표면이 유사하게 나타나 총 플라보노이드 성분에 대한 반응표면 회귀분석을 실시하여 나타내었다(Fig. 5). 프로폴리스의 각 플라보노이드 성분들의 값을 모두 더하여 조건별 추출물의 총 플라보노이드 함량을 계산하였다. 회귀식의 R<sup>2</sup>는 0.8849로 10% 이내에서 유의성이 인정되었으며(Table 5), 예측된 정상점은 최대점으로 최대값은 478.83 mg%이었으며 이 때의 추출조건은 에탄올농도 73.99% 및 추출시간 3.02시간으로 예측되었다. 총 플라보노이드 함량의 반응표면은 최대점의 형태를 나타내었으며, 에탄올농도 및 추출시간의 두 가지 변수 모두에서 영향을 받는 것으로 나타났다(Table 7). Jeong 등(20)의 연구에서 프로폴리스(경남 거창 수집)의 총 flavonoid 함량은 50% 에탄올 추출물이 6.60%로 가장 많이 함유되어 있었으며, 70% 에탄올 추출물 6.46%, 100% 에탄올 추출물 6.41% 및 물 추출물 0.74%로 보고하였다. 프로폴리스의 유효물질인 플라보노이드 성분들을 효과적으로 추출하기 위해서는 에탄올농도 및 추출시간 모두를 고려해야 할 것으로 사료된다.

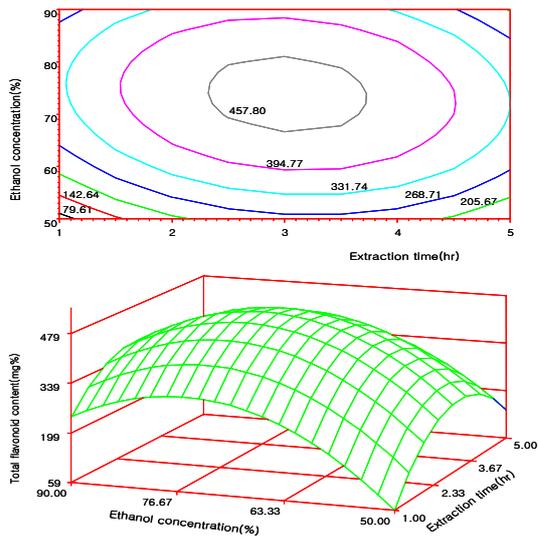
Table 6. Predicted levels of optimum conditions for experimental condition of ethanol extract of propolis

Responses	X <sub>1</sub> <sup>1)</sup>	X <sub>2</sub> <sup>2)</sup>	Maximum	Morphology
Polyphenol content (mg%)	73.91	3.08	2.58	Maximum
Electron donating ability (%)	87.82	2.09	78.31	Maximum
Antioxidant ability(AI)	70.37	2.80	2.80	Maximum
Nitrite-scavenging ability (pH 1.2, %)	89.44	2.53	99.12	Saddle point
Total flavonoid content (mg%)	73.99	3.02	478.83	Maximum

<sup>1)</sup>X<sub>1</sub> : Ethanol concentration (%), <sup>2)</sup>X<sub>2</sub> : Extraction time (hr).

**최적 에탄올 추출조건의 예측**

프로폴리스의 에탄올 최적 추출조건 설정을 위해 추출조건에 따른 항산화적 특성 및 총 플라보노이드 성분에 대한 반응표면을 superimposing하여 최적조건을 예측한 결과 프로폴리스의 에탄올 최적 추출조건의 범위는 72~82% 및 추출시간 2.2~3.2시간으로 예측되었다(Table 8).



**Fig. 5. Response surface plot for total flavonoid content in ethanol extraction condition of propolis.**

**Table 7. Regression analysis for regression model of total polyphenol content, electron donating ability, antioxidant activity, nitrite-scavenging ability(pH 1.2) and total flavonoid content in propolis ethanol extract**

Extraction conditions	F-Ratio				
	Total polyphenol content	Electron donating ability	Antioxidant activity	Nitrite-scavenging ability (pH 1.2)	Total flavonoid
X <sub>1</sub> Ethanol concentration(%)	9.90 <sup>**</sup>	8.79 <sup>**</sup>	9.13 <sup>**</sup>	13.98 <sup>**</sup>	8.45 <sup>**</sup>
X <sub>2</sub> Extraction time (hr)	2.63	3.72	5.14 <sup>*</sup>	0.42	5.52 <sup>*</sup>

<sup>\*</sup>Significant at 10% level; <sup>\*\*</sup>Significant at 5% level ; <sup>\*\*\*</sup>Significant at 1% level.

**Table 8. Optimization of ethanol extraction condition for response variables by superimposing contour maps**

Extraction conditions	Range of predicted condition
Ethanol concentration(%)	72~82
Extraction time (hrs)	2.2~3.2

**요 약**

본 연구에서는 프로폴리스의 다양한 효능을 이용한 식품 소재 개발을 위해 반응표면분석을 이용하여 프로폴리스의 에탄올 추출농도(50, 60, 70, 80, 90%)와 추출시간에 따른 항산화능, 플라보노이드 등의 품질특성을 조사하였다. 총 페놀성 화합물 함량은 에탄올 농도가 높을수록 증가하다가 80% 이상에서는 감소하는 것으로 나타났으며, 추출시간보다는 에탄올 농도에 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 추출물의 전자공여능은 에탄올 농도가 높을수록, 추출시간이 짧을수록 전자공여능이 증가하였으며, 추출시간보다는 에탄올농도에 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 항산화능이 가장 높은 범위는 에탄올 농도 65~75%, 추출시간 2.2~3.6시간이었다. 추출물의 아질산염소거능은 에탄올농도가 높을수록 증가하였고, 추출시간이 짧을수록 증가하는 경향을 나타내었다. 총 플라보노이드 함량은 에탄올 농도 68~82% 및 추출시간 2.4~3.7시간 범위에서 최대 함량을 나타내었으며, 에탄올 농도 및 추출시간 모두에 영향을 받는 것으로 나타났다. 에탄올 농도, 추출시간에 따른 반응표면을 superimposing하여 얻은 프로폴리스의 최적 추출조건의 범위는 에탄올 농도 72-82%, 추출시간 2.2-3.3시간 범위인 것으로 나타났다.

**감사의 글**

본 논문은 호서대학교 2007년 교내 연구비 지원에 의하여 수행된 결과이며 이에 감사드립니다.

**참고문헌**

- Havsteen, B. (1983) Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.*, 32, 1141-1148
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christove, R. and Popov, S. (1999) Antibacterial, antifungal and antiviral activity of different geographic origin. *J. Ethnopharmacol.*, 64, 235-240
- Park, E.H., Kim, S.H. and Park, S.S. (1996) Anti-inflammatory activity of propolis. *Arch. Pharm. Res.*, 19, 337-341
- Chiao, C., Carothers, A.M., Grunberger, D., Solomon, G., Preston, A. and Barrett, J.C. (1995) Apoptosis and altered redox state induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in transformed rat fibroblast cells. *Cancer Res.*, 55, 3576-3583

5. Shigenori, K., Tomoko, H., Tsutomu, N. and Grange, J.M. (1990) Antibacterial properties of propolis(bee glue). *J. Royal Soc. Med.*, 83, 159-160
6. Shigenori, K., Tomoko, H. and Tsutomu, N. (2004) Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84, 329-339
7. Bianchi, E.M. (1995) The preparation of the tincture, the soft extract, the ointment, the soap and other propolis-based products. *Apiacta*, 2, 121-127
8. Han, G.J., Shin, D.S., Kim, J.S., Cho, Y.S. and Jeong, K.S. (2005) Development of meat seasoning sauce using propolis. *Korean J. Food Cookery Sci.*, 21, 888-894
9. Song, H.N. (2006) Preparation of water soluble powder of propolis and the quality changes of its bread during storage. *Korean J. Food Cookery Sci.*, 22, 905-913
10. Kim, G.W., Kim, G.H., Kim, J.S., An, H.Y., Hu, G.W., Park, I.S., Kim, O.S. and Cho, S.Y. (2008) Quality of fried fish paste prepared with sand-lance, (*Hypoptychus dybowskii*) meat and propolis additive, *Kor. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41, 170-175
11. Han, S.K. and Kim, H.S. (2004) The Effect of hangover drink using propolis on ethanol oxidation. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 24, 198-201
12. Lee, H.J., Bae, Y.I., Jeong, C.H. and Shim, K.H. (2005) Biological activities of various solvent extracts from propolis. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 34, 1-7
13. Kim, C.T., Kim, C.J., Cho, Y.J., Choi, A.J. and Shin, W.S. (2002) Characteristics of propolis extracts from ethanol extraction. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 34, 941-946
14. Myers, R.H. (1971) *Response surface methodology*. Allyn and Bacon Inc. Boston, p.127-139
15. Wamasindara, P.K.J.P.D. and Shahi, F. (1996) Optimization of hexameta-phosphate-assited extraction of flaxseed proteins using response surface methodology. *Korean J. Food Sci.*, 61, 604-607
16. SAS Institute, Inc. (1990) *SAS user's guide*, Statistical analysis systems institute., Cary, N.C., U.S.A.
17. Amerine, M.A. and Ough, C.S. (1980) *Methods for analysis of musts and wine*. Wiley & Sons, New York, p.176-180
18. Blios, M.S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, 181, 1199-1200
19. Kato, H., Lee, I.E., Chuyen, N.V., Kim, S.B. and Hayase, F. (1987) Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 1333-1338
20. Jeong, C.H., Bae, Y.I., Lee, H.J. and Shim, K.H. (2003) Chemical components of propolis and its ethanolic extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 32, 501-505
21. Park, Y.K. and Ikegaki, M. (1998) Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparatoin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 2230-2232
22. Seo, K.I., Oh, I.S., Oh, D.H., Choi, S.H., Shon, M.Y. and Moon, J.S. (2000) Quality characteristic and functional properties of ethanol extract of propolis. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 29, 969-972

---

(접수 2009년 8월 17일, 채택 2009년 12월 4일)