

반응표면분석법을 이용한 인삼우유 중 사포닌 추출조건의 최적화

이승수 · 박종면 · 오훈일 · 곽해수
세종대학교 자연과학대학 식품공학과
(1994년 3월 2일 접수)

Optimization of Saponin Extraction Conditions in Ginseng Milk using Response Surface Methodology

Seung-Soo Lee, Jong-Myon Park, Hoon-Il Oh and Hae-Soo Kwak
Department of Food Science and Technology, Sejong University, Seoul 133-747, Korea
(Received March 2, 1994)

Abstract □ To develop the methodology of the quantitative analysis of saponin in ginseng milk, conditions of the saponin extraction were optimized using the fractional factorial design with 3 variables and 3 levels by a RSM computer program. The extraction of saponin increased with an increase in extraction temperature up to 90°C and then decreased significantly at 100°C. Extraction time affected the saponin yield in a similar trend. On the other hand, decreasing cooling temperature increased the amount of the saponin extracted. Recovery yield of the saponin from ginseng milk varied from 70.0% to 92.9%. The optimum extraction temperature, time and cooling temperature determined by partial differentiation of the model equation were 86°C, 2.83 hrs and 4°C, respectively.

Key words □ Ginseng milk, saponin, response surface methodology.

서 론

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 옛부터 우리나라 고유의 생약으로서 민간 또는 한방에서 영약으로 애용되어 왔으며¹⁾ 최근 약리적 효능이 과학적으로 입증됨에 따라 의약품은 물론 건강식품으로서도 그 진가를 국내외에서 인정받게 되었다.

건강식품으로서 인삼은 그 기호에 따라 인삼차, 인삼엑기스, 인삼타부렐, 인삼캡슐, 인삼드링크, 인삼주, 인삼과자 등 다양하게 제품이 개발되고 있다. 현재 인삼제품은 일반 건강식품과 국내시장에서 과다경쟁을 하고 있으며 또한 중국에서 값싼 인삼이 대량으로 수입됨에 따라 인삼제품의 수출과 제품업계의 경영에 많은 어려움을 주고 있는 실정이다. 따라서 최근 국민소득의 향상과 건강에 대한 소비자의 관심이 증대

됨에 따라 우리의 식생활에서 점차 중요한 위치를 차지하고 있는 우유에 인삼을 첨가하므로써 영양공급과 질병예방이 가능한 기능식품으로 인삼우유를 제조하여 인삼의 소비를 증대시킬 수 있는 제품을 개발하게 되었다. 이러한 인삼우유 개발에 있어서 인삼의 유효성분으로 알려진 사포닌 함량을 품질의 지표로 하여, 인삼우유 중 사포닌의 추출 조건을 최적화하여 사포닌 함량을 정량해야 할 것이다. 사포닌은 분자내에 물과 친한부분(親水性)과 기름과 친한부분(親脂性 또는 疎水性)을 함께 갖고 있으므로 중성지질(triglyceride)이나 cholesterol과 같은 지질을 물에 분산시키는 능력을 갖고 있는 것이 특색이다.²⁾ 한편 우유는 주요 일반성분으로 lactose 4.8%, 단백질 3.4%, 지방 4.0%를 평균적으로 함유하고 있으므로³⁾ 사포닌이 우유의 단백질 및 지방과 결합할 가능성이

이다.²⁾ 실제 예비 사포닌 정량실험에서 인삼우유를 수포화 n-butanol 방법으로 사포닌을 추출할 경우 n-butanol층의 분리가 일어나지 않아 사포닌을 추출할 수 없었으므로 인삼우유의 단백질을 제거하는 과정을 사포닌성분을 추출하는 가장 일반적인 방법인 수포화 n-butanol 방법에 추가하게 되었다.

본 연구의 목적은 인삼우유에서 품질관리상 가장 중요한 유효성분인 사포닌을 다양한 조건으로 추출하여 인삼엑기스에 대한 각각의 회수수율을 구한 후, 다중회귀분석을 실행하고 model식을 설정하여 반응표면분석법(Response Surface Methodology : RSM)⁴⁻¹⁰⁾을 이용한 등고분석과 3-D plot 분석을 수행하여 인삼우유 중 사포닌의 최적 추출조건을 확립하는데 있다.

재료 및 방법

1. 재 료

우유 : 우유는 서울우유협동조합의 서울우유를 시중에서 구입하여 사용하였다.

인삼 엑기스 : 인삼엑기스는 한국담배인삼공사에서 시판되는 고려홍삼정(Korean red ginseng extract)을 구입하여 사용하였다.

Total saponin : Total saponin은 한국인삼연초연구원에서 제공받아 사용하였다.

Saponin 발색시약 : Saponin 발색시약인 vanillin은 acetone에 침전시켜 재결정하여 사용하였다.

2. 실험방법

인삼우유의 제조 : 우유에 인삼엑기스를 0.3%(w/v) 되게 첨가하여 제조하였다.

인삼우유에서의 총사포닌 추출 : 총사포닌의 추출은 Ando 등¹¹⁾의 수포화 n-butanol 방법으로 추출하였으며 추출 및 냉각 후 우유의 단백질을 제거하기 위해 원심분리기(Hanil Industrial Co., Model HA-50)로 4,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 여과(Whatman filter paper No. 4) 하였다(Fig. 1).

인삼우유 중의 총사포닌 정량 : 인삼우유에서 추출한 총사포닌 추출액을 vanillin-H₂SO₄ 비색법¹¹⁻¹⁴⁾으로 발색시켜 분광광도법으로 총사포닌(total saponin)을 정량하였다. 사포닌 추출액 1 ml를 시험관에 넣고 얼음물 속에서 0.8% vanillin-EtOH 용액 0.4 ml와 72%

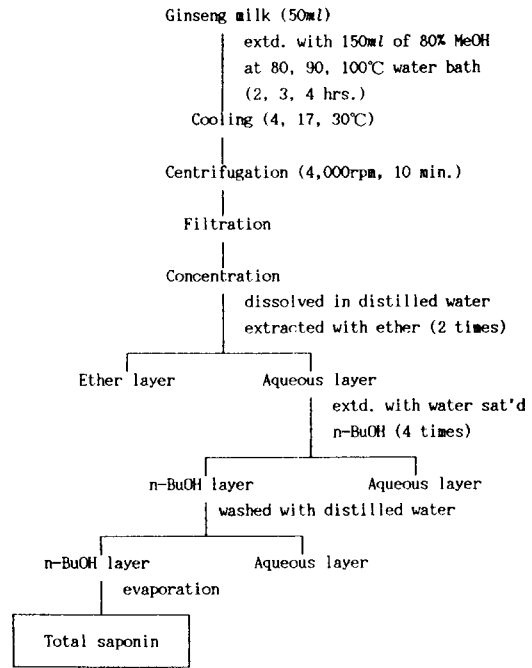


Fig. 1. Schematic diagram for extraction of total saponin from ginseng milk.

H₂SO₄ 용액 5 ml를 가하여 60°C의 물중탕에서 10분간 발색시킨 후 얼음물에서 냉각시켜 spectrophotometer (Milton Roy Co., Model Spectronic 21D)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이를 total saponin stock(0.5 g/l)으로 구한 standard curve를 이용하여 총사포닌으로 환산하였다.

사포닌 최적 추출조건 결정 : 인삼우유 중의 사포닌 최적 추출조건을 결정하기 위하여 총사포닌의 회수 수율을 종속변수로 하고 추출조건인 추출온도, 추출시간, 냉각온도의 3변수를 독립변수로 하여 3수준의 fractional factorial design에 의하여 Table 1과 같은 조건으로 처리하고 vanillin-H₂SO₄ 비색법으로 측정된 인삼우유 중의 총사포닌 양을 인삼엑기스에 대한 회수수율로 환산한 후 이 값을 종속변수 Y로 설정하여 response surface methodology(RSM) computer program인 Stat-graphics(STSC Inc., Rockville, MD, USA) program을 사용하여 다중회귀분석 후 model식을 만들어 RSM에 의하여 등고분석(contour plot)과 3차원 분석(3-D plot)을 통하여 최적화를 수행하였다.

Table 1. The fractional factorial design for optimization of extraction condition of saponin in ginseng milk

Treatment no.	Coded var ^a			Process var.		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	-1	80	2	4
2	-1	+1	+1	80	4	30
3	+1	-1	+1	100	2	30
4	+1	+1	-1	100	4	4
5	0	0	0	90	3	17
6	0	0	0	90	3	17
7	-1	-1	+1	80	2	30
8	-1	+1	-1	80	4	4
9	+1	-1	-1	100	2	4
10	+1	+1	+1	100	4	30
11	0	0	0	90	3	17
12	0	0	0	90	3	17
13	+1	0	0	100	3	17
14	-1	0	0	80	3	17
15	0	+1	0	90	4	17
16	0	-1	0	90	2	17
17	0	0	+1	90	3	30
18	0	0	-1	90	3	4

^aX₁ is extraction temp. (°C), X₂ is extraction time (hour), X₃ is cooling temp. (°C).

Table 2. The fractional factorial design for total saponin extraction performance test and recovery yield

Treatment no.	Coded var ^a			TS ^b mg/0.15 g GE ^c	Recovery yield (%)
	X ₁	X ₂	X ₃		
1	-1	-1	-1	4.92	89.9
2	-1	+1	+1	4.32	78.8
3	+1	-1	+1	4.09	74.7
4	+1	+1	-1	4.50	82.1
5	0	0	0	4.85	88.5
6	0	0	0	4.85	88.5
7	-1	-1	+1	4.26	77.8
8	-1	+1	-1	4.95	90.3
9	+1	-1	-1	4.90	89.5
10	+1	+1	+1	3.83	70.0
11	0	0	0	4.85	88.5
12	0	0	0	4.85	88.5
13	+1	0	0	4.68	85.4
14	-1	0	0	4.49	89.2
15	0	+1	0	4.69	85.6
16	0	-1	0	4.75	87.3
17	0	0	+1	4.41	80.5
18	0	0	-1	5.09	92.9

^aX₁ is extraction temp. (°C), X₂ is extraction time (hour), X₃ is cooling temp. (°C), ^bTotal saponin, ^cGinseng extract.

결과 및 고찰

1. Fraction factorial design에 의한 인삼우유 중 총사포닌의 회수수율

우유에 홍삼 extract를 0.3% 첨가하여 균질화 시킨 후 Ando 등¹¹⁾의 수포화 n-butanol 방법으로 사포닌 추출을 시도하였으나 n-butanol 층이 분리되지 않았다. 이것은 우유중에 단백질등 고형분이 많이 함유되어 있기 때문인 것으로 사료되었다. 따라서 인삼 우유의 사포닌 추출과정 중 우유에 함유되어 있는 단백질을 제거하기 위해서 Fig. 1과 같이 냉각과정을 추가하였다. 독립변수에 추출온도, 추출시간 외에 냉각온도를 추가하여 인삼우유 중의 사포닌 추출에 대한 fractional factorial design을 Table 1과 같이 설정하고 종속변수인 사포닌의 추출량을 vanillin-H₂SO₄ 비색법으로 측정한 결과와 우유에 첨가한 인삼엑기스로 환산한 회수 수율의 결과를 Table 2에 나타내었다. 추출 가열온도 90°C, 추출시간 3시간, 냉각온도 4°C 일 때 총사포닌이 첨가된 0.15 g 인삼엑기스당 5.09 mg이 추출되어 가장 높은 반응값을 보였으며 추출온도 100

°C, 추출시간 4시간, 냉각온도 30°C 일 때 총사포닌이 첨가된 0.15 g 인삼엑기스당 3.83 mg이 추출되어 가장 낮은 반응값을 보였다.

본 실험에서 사포닌의 회수수율이 전반적으로 다소 낮은 것은(Table 2) 최 등¹⁵⁾이 홍삼의 물추출 회수별에 따른 사포닌의 추출수율을 조사한 결과 3회 추출하였을 경우 전량대비 86%가 추출되었다고 보고한 바와 같이 인삼우유에서 사포닌을 추출할 때 원심분리한 후 침전물을 회수하여 반복 추출을 하지 않은점과 일부 사포닌이 우유단백질과 결합된 상태로 침전되었기 때문인 것으로 사료된다.

2. 최적 추출조건의 결정

인삼우유로부터 총사포닌을 추출하기 위하여 X₁~X₃의 3가지 factor를 독립변수로 설정하고 vanillin-H₂SO₄ 비색법으로 측정한 총사포닌 양을 인삼엑기스에 대한 회수수율로 환산한 후 이 값을 종속변수 Y로 설정하여 다중 회귀분석을 수행한 결과(Table 3)에서 유의수준이 0.01 미만인것, 즉 99% 수준에서 유의성이 있는 것을 채택하여 독립변수 중 X₃항인 냉각온도와

Table 3. Values of regression coefficient calculated by RSM program for the recovery yield of saponin

Ind. variable	Coefficient	Stand. error	Sig. level
Constant	-108.190135	29.088842	0.0059**
X ₁	3.720049	0.662942	0.0005***
X ₂	29.850934	2.933537	0.0000***
X ₃	0.207581	0.172674	0.2637
X ₁ X ₂	-0.16875	0.021307	0.0000***
X ₁ X ₃	-0.003173	0.001639	0.0889
X ₂ X ₃	0.031731	0.01639	0.0889
X ₁ ²	-0.018905	0.003661	0.0009***
X ₂ ²	-2.740476	0.366105	0.0001***
X ₃ ²	-0.014737	0.002166	0.0001***

X₁: extraction temp., X₂: extraction time, X₃: cooling temp.

p<0.01, *p<0.001.

interaction term 중에서 X₁X₃항과 X₂X₃항이 기각되어 model식 $Y = -108.190135 + 3.720049X_1 + 29.850934X_2 - 0.018905X_1^2 - 2.740476X_2^2 - 0.014737X_3^2 - 0.16875X_1X_2$ ($r=0.9906$)를 얻었다. 다중회귀분석 전체에 대한 분산분석의 결과(Table 4), 다중 상관계수의 제곱합은 654.112이고 잔차의 제곱합은 2.90549이었다. 또한

Table 4. Analysis of variance for full regression of the recovery yield of saponin

Source	Sum of squares	DF	Mean squares	F value
Model	645.112	9	72.6791	200.115***
Error	2.90549	8	0.36319	
Total	657.018	17		

R sq.=0.995578, R adj.=0.990603, ***p<0.001.

유의수준을 검정하는 자유도인 F-value도 99.9% 수준에서($p<0.001$) 유의성을 나타내어 다중회귀분석에 의하여 각 변수가 선별되어 설정된 model식이 99.9% 수준에서 유의성이 있었음을 알 수 있었다. 다중 회귀분석에 의하여 설정된 model식을 Stat-graphics program을 이용하여 반응표면분석을 하여 Fig. 2~4와 같은 결과를 얻었다. Fig. 2는 독립변수중 추출온도를 고정시킨 후 추출시간과 냉각온도를 독립변수로 하여 도식한 결과로 추출온도를 80°C로 고정시킨 경우 추출시간 3시간, 냉각온도 4°C에서 가장 높은 회수수율인 91.0%를 보였으며 추출온도를 90°C로 고정시킨 경우는 추출시간 2.7시간, 냉각온도 4°C에서

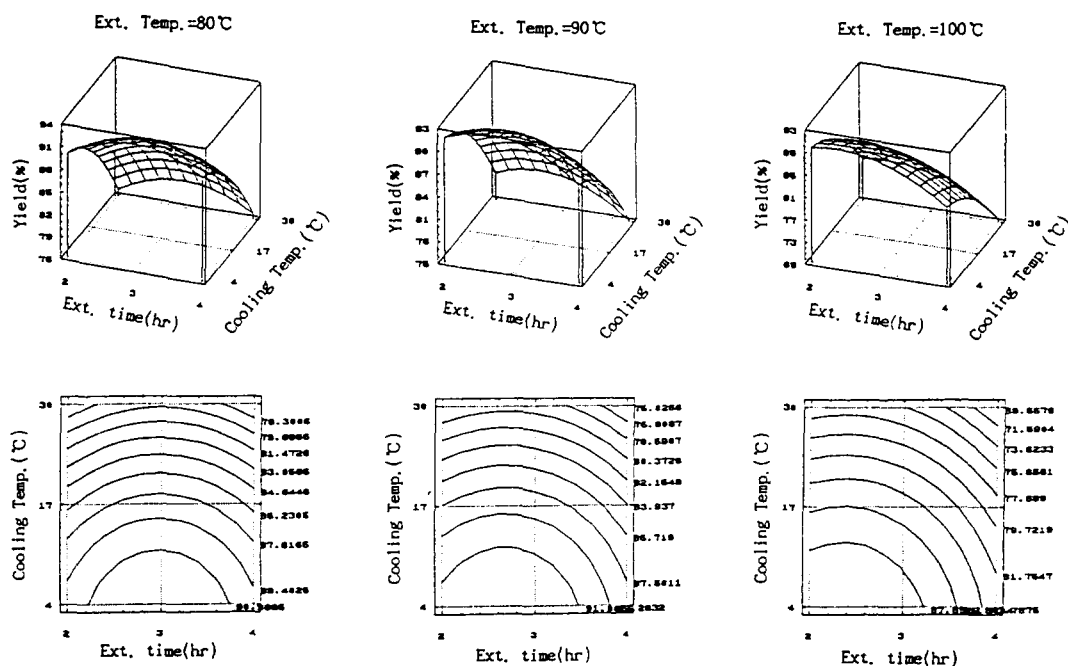


Fig. 2. Response surfaces and contour plots of the yield of saponin recovery at constant extraction temperature of 80, 90 and 100°C, respectively.

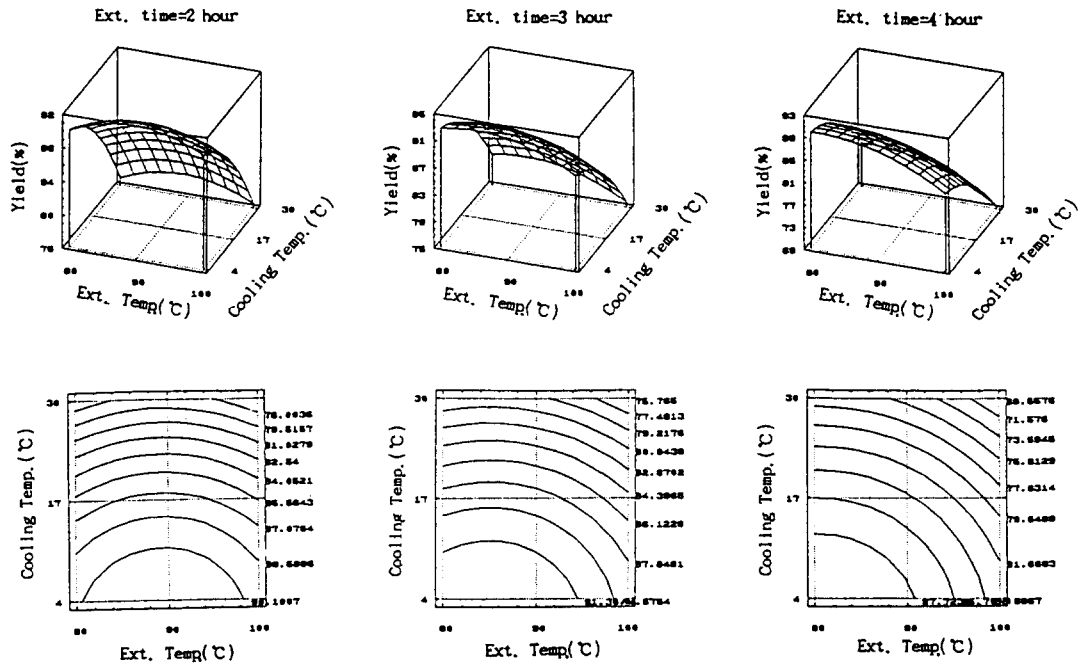


Fig. 3. Response surfaces and contour plots of the yield of saponin recovery at constant extraction time of 2, 3 and 4 hours, respectively.

가장 높은 91.1%의 수율을 보였다. 또한 추출온도를 100°C로 고정시킨 경우 추출시간 2.4시간, 냉각온도 4°C에서 가장 높은 87.6%의 회수수율을 보였다. 이상의 결과는 추출온도가 높아질 수록 추출시간을 줄여야 높은 회수수율을 얻을 수 있고 추출온도가 높을 수록 사포닌 추출수율이 감소한다는 것을 나타내므로 추출온도와 추출시간은 서로 밀접한 관계가 있음을 보여주고 있다. 추출온도 90°C에서 가장 높은 수율(91.1%)을 보였는 바 인삼우유에서 사포닌 추출에 가장 적합한 온도는 90°C라 하겠다. 이는 성 등¹⁶⁾이 홍삼에서 인삼엑기스 제조시 추출온도가 증가함에 따라 사포닌의 용출량이 감소하였으며 특히 100°C에서 panaxatriol(PT) 및 pure saponin(PS)의 용출량과 모든 ginsenoside 수준에서 감소되었다는 보고와 우 등¹⁷⁾이 수삼을 100°C로 추출하였을 때 70°C로 추출했을 때 보다 사포닌이 현저하게 감소했다는 보고와 비교할 때 매우 유사하였는데 이는 높은 온도에서 장시간 가열 추출시 배당체인 인삼사포닌의 당결합이 일부 가수분해되어 사포닌의 안정성에 영향을 미치는 것으로 볼 수 있다. Fig.3은 추출시간을 고정시킨 결과로 추출시간을 2시간으로 고정시킨 경우 추출온도 90°C,

냉각온도 4°C에서 가장 높은 수율(90.1%)을 보였고 추출시간을 3시간으로 고정시킨 경우는 추출온도 86°C, 냉각온도 4°C에서 가장 높은 수율(91.3%)을 보였다. 한편 추출시간을 4시간으로 고정시킨 경우는 추출온도 81°C, 냉각온도 4°C에서 가장 높은 수율(87.7%)을 보임으로서 Fig.2의 결과와 같이 추출온도와 추출시간이 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다. 사포닌 추출수율은 추출시간을 3시간으로 고정시켰을 때 가장 높은 91.3%를 보임으로 3시간 추출이 가장 적절한 추출시간으로 나타났다. Fig.4는 인삼우유를 메탄올로 사포닌을 추출한 후 우유속에 함유된 단백질을 제거하기 위하여 냉각온도를 달리하여 추출온도와 추출시간 변화에 따른 수율변화를 도시한 결과로서 4°C, 17°C, 30°C에서 냉각하였을 때 추출온도 88°C, 추출시간 2.8시간에서 각각 92.1, 88.1, 79.1%로 가장 높은 수율을 보였다. 냉각온도 변화에 따른 가장 높은 수율(92.1%)은 냉각온도 4°C, 추출시간 2.9시간, 추출온도 88°C였으므로 냉각온도는 4°C가 가장 적합한 것으로 사료된다. 위의 결과는 냉각온도가 회수수율에 영향을 주지만 고정되어진 모든 냉각온도에서 같은 추출시간, 같은 추출온도에서 가장 높은 수율을

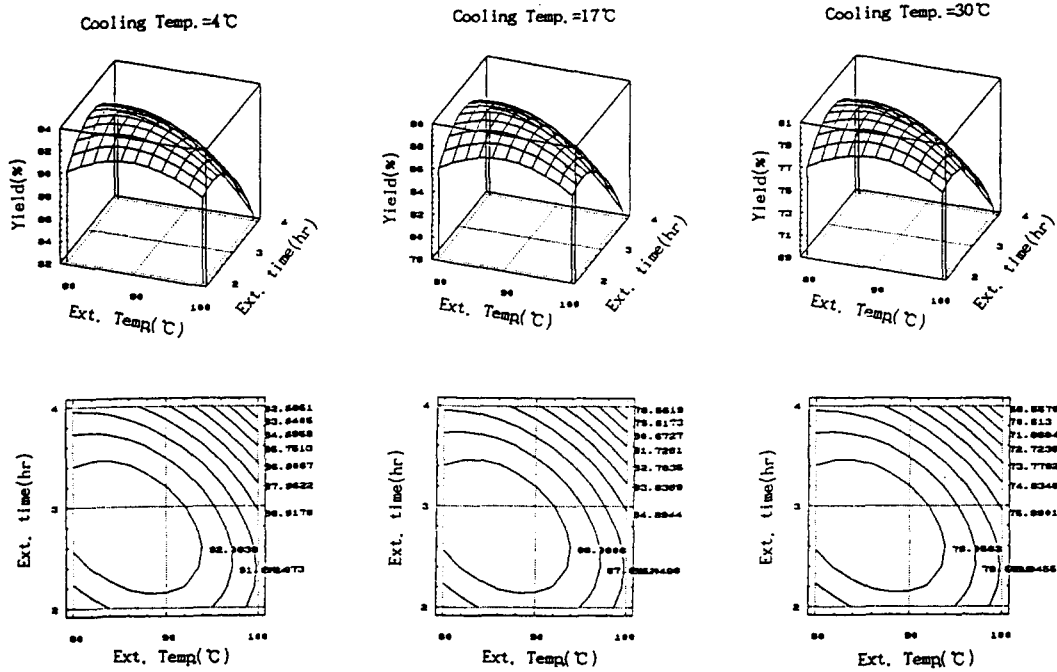


Fig. 4. Response surfaces and contour plots of the yield of saponin recovery at constant cooling temperature of 4, 17 and 30°C, respectively.

보이는 것으로 볼 때 냉각온도와 추출시간, 추출온도와는 상관관계가 없음을 나타내는 것이다. 이와 같은 결과로 볼 때 추출온도와 추출시간은 사포닌의 추출시 사포닌의 열변성에 많은 영향을 주는 것임을 알 수 있고 냉각온도는 인삼우유의 단백질 제거에 영향을 주는 것으로 생각된다. 본 실험의 결과 냉각온도의 경우에는 4°C에서 최고 반응값을 나타냈으나 추출온도(X_1)와 추출시간(X_2)에서는 설정한 3가지 수준(-, 0, +) 모두에서 최고 반응값을 나타내지 않았다. 따라서 최고 반응값을 나타내는 정확한 추출온도와 추출시간을 찾아내기 위하여 model식을 냉각온도(X_3) 4°C로 고정시킨 후 X_1 과 X_2 에 대해 편미분하여 종속변수 Y 가 최대값을 나타내는 추출온도와 추출시간을 구한 결과 추출온도는 86°C, 추출시간은 2시간 50분으로 나타났다.

이상과 같이 독립변수의 고정에 따른 종속변수의 반응값을 조사한 결과 인삼우유에서 사포닌을 가장 효과적으로 정량하는 추출조건은 추출온도 86°C, 추출시간 2시간 50분이며 냉각온도는 4°C로 예측되어졌으며 이 최적 추출조건하에서의 이론상 최고수율은

93.1%이었으며 실제 최적조건하에서 4회 반복실험을 통한 회수수율은 93.6%로 나타나 이론 예측치와 매우 유사한 값을 나타내었다.

요 약

우유에 인삼엑기스를 첨가한 인삼우유 중의 유효 지표성분의 정량법을 설정하기 위하여 인삼우유 중 사포닌의 최적 추출조건을 RSM을 이용하여 조사하였다. 최적 추출조건의 산출은 추출온도, 추출시간, 냉각온도의 3변수와 3수준의 fractional factorial design에 의하여 조사한 결과, 인삼우유중 총사포닌의 회수 수율은 최저 70.0%에서 최고 92.9%까지 나타났으며 다중회귀분석으로 구한 model식을 가지고 등고분석과 3차원 분석을 수행한 후 독립변수의 최저 또는 최고수준에서 종속변수가 최대치를 나타내지 않는 추출온도와 추출시간의 변수에 대하여 model식을 편미분한 결과 인삼우유 중 총사포닌의 최적 추출조건은 추출온도 86°C, 추출시간 2시간 50분, 냉각온도 4°C로 예측되어졌다.

인 용 문 헌

1. Bae, H.W. : *Korean Ginseng*, Korea Ginseng Research Institute, Seoul, p.1 (1978).
2. 주충노 : 고려인삼학회지, **17**(3), 250 (1993).
3. Alfa-Laval AB : *Dairy Handbook*, p.12 (1987).
4. Myers R.H. : *Response Surface Methodology*, Allyn and Bacon Inc., Boston (1971).
5. Box G.E.P. and Wilson K.B. : *J. Roy. Statist. Soc.* **B13:1** (1951).
6. Dziezak J.D. : *Food Technology*. June, p.110 (1990).
7. Mudahar G.S., Toledo R.T., Floros J.D. and Jen J.J. : *J. Food Sci.* **54**(3) (1989).
8. Floros J.D. and Chinnan M.S. : *J. Food Sci.* **53**(2) (1988).
9. 김지용, 김종태, 김철진 : 한국식품과학회지, **23**(1), 88 (1991).
10. 강규찬, 박재한, 백상봉, 진홍승, 이규순 : 한국식품과학회지, **24**(1), 74 (1992).
11. Ando, T., Tanaka, O. and Shibata, S. : *Syoyakugaku Zasshi*, **25**(1), 28 (1971).
12. Hiai, S., Ourak, H., Hamanaka, H. and Odaka, Y. : *Planta Medica*, **28**, 131 (1975).
13. Hiai, S., Ourak, H. and Nakajima, T. : *Planta Medica*, **29**, 166 (1976).
14. Woo, L.K., Han, B.H., Baik, D.W. and Park, D.S. : *J. Pharm. Soc. Korea*, **17**, 123 (1978).
15. 최강주, 김만옥, 성현순, 홍순근 : 고려인삼학회지, **4** (1), 88 (1980).
16. 성현순, 윤석권, 김우정, 양차범 : 고려인삼학회지, **9** (2), 170 (1985).
17. 우인희, 양차범, 성현순 : 고려인삼학회지, **10**(1), 36 (1986).