

초음파에너지를 이용한 칩으로부터 이소플라보노이드의 추출공정 최적화

이승범 · 김수인 · 홍인권[†]

단국대학교 화학공학과
(2018년 4월 4일 접수, 2018년 4월 27일 심사, 2018년 5월 11일 채택)

Optimization of Iso-flavonoids Extraction Process from Kudze Using Ultrasonic Irradiation Energy

Seung Bum Lee, Su In Kim, and In Kwon Hong[†]

Department of Chemical Engineering, Dankook University, Gyeonggi 16890, Korea
(Received April 4, 2018; Revised April 27, 2018; Accepted May 11, 2018)

초 록

본 연구에서는 칩으로부터 항산화 물질을 추출하는 방법으로 초음파 추출공정을 이용하였으며, 칩에 포함된 iso-flavonoids인 puerarin, daidzein, daidzin의 함량을 측정하였다. 본 연구에서는 칩으로부터 iso-flavonoids 추출수율의 최대화를 위한 공정조건의 최적화를 위해 통계학적 분석방법인 반응표면분석법을 적용하였다. 이는 최소한의 실험횟수로 원하는 반응치에 부합하는 공정조건을 효과적으로 도출하고 각 공정조건이 반응치에 미치는 효과도를 분석하는 방법이다. 반응표면분석법 중 중심합성계획모형을 적용하여 최적조건을 분석하였으며, 3개의 독립변수는 초음파 조사시간, 주정/초순수 부피비, 초음파 조사세기로 설정하였다. 반응표면분석법을 이용하여 두 개의 반응치인 추출수율과 iso-flavonoids 함량의 최대값을 갖는 최적조건을 평가한 결과 초음파 조사시간(24.75 min), 주정/초순수 부피비(39.75 vol%), 초음파 조사세기(592.36 W)로 나타났다. 종합 만족도 D 는 0.8938로 높게 나타났으며 5% 이내의 유의성 수준에 인정된다. 또한 최적화 과정을 분석한 결과 초음파 조사시간이 반응치에 가장 영향을 많이 미치는 인자임을 확인할 수 있었다.

Abstract

In this study, we used the ultrasonic extraction process as a method to extract antioxidant substances from kudzu, and measured the content of iso-flavonoids puerarin, daidzein, daidzin contained in kudzu. The response surface methodology which is a statistical analysis method for optimizing the extraction amount of iso-flavonoids from the kudzu and the process condition for maximizing the yield was applied. It is the final objective of this study to effectively derive the condition of the process that matches the target response with a minimum number of experiments and analyze the effect of each process condition on the response. In the response surface methodology, the central composite design was applied and the optimum condition was analyzed, and the three independent variables were set to ultrasonic irradiation time, volume ratio of ethanol/ultrapure water, ultrasonic irradiation power. Using the response surface methodology, the optimum conditions with the maximum extraction yield and the content of iso-flavonoids were evaluated as ultrasonic irradiation time (24.75 min), ethanol / ultrapure water volume ratio (39.75 vol%), ultrasonic irradiation power (592.36 W). The overall satisfaction level appears as high as 0.8938, which is recognized at a significance level within 5%. As a result of analyzing the optimization process, it was confirmed that the ultrasonic irradiation time is the factor that most affects the responses.

Keywords: kudzu, iso-flavonoids, ultrasonic irradiation energy, response surface methodology

1. 서 론

칩(kudze)은 다년생 식물로서 굵은 줄기로 이루어져 나무로 분류된다. 이는 오래전부터 자양강장제 등 건강식품으로 이용되었으며 특히 뿌리부분은 항산화 물질이 다량 함유되어 있어 최근 많은 연구가 이뤄

지고 있다[1-2]. 칩에는 flavonoid 계통 화합물의 한 종류인 iso-flavone 이 다량 함유되어있으며 이는 여성호르몬인 에스트로젠과 비슷한 식물성 에스트로젠(phytoestrogen)이다. Iso-flavone은 일반 세포 내에서 estrogen receptor와 결합할 수 있는 능력이 있으며 체내에서 심장병, 골다공증의 발생 빈도를 낮추주며 여러 갱년기 증상을 완화시켜 주는 것으로 알려졌다[3-4]. 칩에는 다량의 전분 외에 iso-flavone계 성분인 puerarin, daidzein, daidzin, genistein, genistin, formonetin, coumesterol, 4'-7-dihydroxyisoflavone, 7-xyloside puerarin, 3'-hydroxypuerarin, 3'-methoxypuerin, β -sistrol, lupeol, lupenone, allantoin 등이 함유되

[†] Corresponding Author: Dankook University,
Department of Chemical Engineering, Gyeonggi 16890, Korea
Tel: +82-31-8005-3544 e-mail: khong@dankook.ac.kr

어 있다[5-6].

본 연구에서는 씬에 함유된 iso-flavonoids인 puerarin, daidzein, daidzin의 추출수율의 최대화를 위한 공정조건의 최적화를 진행하였다. 최근 천연물로부터 유효성분을 추출하는 공정방법은 열역학적 특성을 고려한 열수추출, cavitation을 이용한 초음파추출, 마이크로웨이브 추출, 다양한 용매 추출 등 매우 다양하다[7-9]. 본 연구는 씬으로부터 항산화 물질을 추출하는 방법으로 초음파 용매추출공정(ultrasonic-assisted solvent extraction process)을 이용하였다. 이 공정은 기존의 열수추출방법에 비해 추출시간이 빠르고 효율이 높다고 알려져 있다[10-12]. 씬으로부터 이소플라보노이드를 추출하는 용매 중 주정(ethanol)을 선정할 경우 산화스트레스를 줄일 수 있다는 연구결과가 존재하며[13-14], 꾀뿌리로부터 puerarin, daidzein, daidzin을 추출하기 위해 에탄올을 용매로 사용한 연구가 진행되고 있다[15]. 또한 추출물에 함유된 iso-flavonoids (puerarin, daidzein, daidzin)의 분석은 고성능 액체크로마토그래피를 이용하여 수행하였다[16-17].

추출공정의 최적화를 위해 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 이용하였다. 반응표면분석법은 통계학적 분석방법으로 기초실험을 통해 변수에 따른 반응결과 값을 예측하여 원하는 반응치에 따른 최적조건을 도출해주는 방법이다. 따라서 이는 복잡한 process들을 최적화하는데 매우 효과적이고 체계적인 기술이며 실험에서의 각 independent variables에 따른 효과와 최적조건들을 빠른 시간에 효율적으로 찾는데 많이 활용된다[18-19]. 본 연구에서는 기초실험을 바탕으로 반응표면분석법을 활용하여 실험횟수를 줄이고 원하는 결과 값을 도출하는 최적공정조건을 분석했다. 또한 각 공정조건이 반응치에 미치는 주효과도와 교호효과도를 관찰하고 결정계수(R^2)와 P-value 및 F-value를 해석하여 본 실험에서 사용한 분석방법의 적합성을 판단했다[20-21]. 독립변수로 초음파 조사시간, 주정/초순수 부피비, 초음파 조사세기를 설정하였고, 기초 실험 data를 바탕으로 추출효율과 iso-flavonoids 함량을 반응치로 설정하여 최적화과정을 수행하였다.

2. 실험방법

2.1. 초음파 용매추출

건조된 씬 12.5 g을 추출용매 250 mL에 넣고 초음파 용매추출과정을 진행하였다. 이때 추출용매는 주정(Daehan Ethanol life, 95%)과 초순수(Vivagenen EXL-III)를 부피비로 혼합하여 사용하였다. 초음파 용매추출을 위해 초음파 발생장치는 Sonics & Material Inc.사의 ultrasonic generator (VCX-600, U.S.A)와 probe type (diameter: 0.5 in, threaded end, amplitude: 124 nm)의 horn을 사용하였다. 또한 반응표면분석법을 이용한 최적화 과정은 기초실험을 통해 독립변수를 초음파 조사시간(20.0~30.0 min), 주정/초순수 부피비(35.0~45.0 vol%), 초음파 조사세기(550.0~650.0 W)로 설정하였다. 추출이 완료된 추출물은 여과 후 진공회전증발기(EYELA N-N type, Aspirator A-3S)를 이용하여 농축하고, -10 °C로 6 h 동안 동결한 후 냉동건조장치를 이용하여 -40 °C, 0.1 mbar의 조건에서 24 h 동안 건조하였다.

2.2. Iso-flavonoids 함량 분석

건조된 추출물 10 mg을 증류수에 녹여 10 mg/mL로 만든 후 10,000 rpm에서 5 min간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 이를 syringe filter (Nylon 66, 0.45 m, Whatman, Kent, UK)로 여과한 후 100 µL를 분취하여 내부표준물질인 geniposide (Sigma-Aldrich)를 20 µL와 혼합

하고 증류수를 넣어 총부피 1 mL로 제조하였다. 제조된 시료를 고성능 액체크로마토그래피(YL 9100 HPLC System, Young Lin Instrument, Korea)를 이용하여 iso-flavonoids 함량 분석을 수행하였다. 표준물질로는 puerarin, daidzein, daidzin (Sigma-Aldrich Co.)을 이용하였으며, 농도범위는 2.5~50 µg/mL이다. 분석에 사용한 컬럼은 SunFire® C₁₈ (4.6 × 150 mm, Waters, USA)이고, 이동상으로는 acetonitrile과 acetic acid, 초순수를 사용하였다. 검출기의 자외선 파장은 250 nm로 설정하였으며, 시료주입량은 10 µL이다.

2.3. 반응표면분석법을 이용한 최적화

반응표면분석법을 이용한 최적화를 위해 Minitab 프로그램(Minitab Inc., USA)을 사용하였으며 실험계획, 수학적 모델링, 최적화 등을 수행하였다. 반응표면분석법 중 중심합성계획모델(central composite design, CCD)은 3개의 독립변수와 3개의 수준(level), 20번의 실험과정과 중심점(central point)에서의 6번 반복실험으로 구성된다. 3개의 실험인자는 초음파 조사시간(x_1), 주정/초순수 부피비(x_2), 초음파 조사세기(x_3)이고, 이 인자들은 반응표면분석법에 의해 최적화된다. 반응치는 추출수율(Y_1)과 iso-flavonoids 함량(Y_2)이며, 이는 아래의 식과 같이 2차 회귀방정식으로 표현된다.

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^3 (a_i x_i) + \sum_{i=1}^3 (a_{ii} x_i^2) + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 (a_{ij} x_i x_j) + \epsilon \quad (1)$$

여기서 a_0 는 상수이며 a_i , a_{ii} , a_{ij} 는 각각 1차, 2차, 상호작용에 따른 계수이다. x_i 와 x_j 는 독립변수인 초음파 조사시간, 주정/초순수 부피비, 초음파 조사세기이고, 반응치인 Y_1 과 Y_2 를 동시에 만족하는 최적조건을 도출하였다. 또한 다변량 해석(multivariate analysis)은 MATLAB 프로그램(The MathWorks, MA, USA)을 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 기초실험 및 반응표면분석법 적용

초음파에너지를 이용하여 씬으로부터 유효성분 추출과정의 최적화를 위해 독립변수에 따른 추출효율과 iso-flavonoids 함량을 분석하였다. 실제로 반응표면분석법은 실험횟수를 줄이고 원하는 반응치에 따른 조건을 최적화하기 위해 여러 연구에서 활용된다[22-24]. 본 연구에서는 반응표면분석법을 사용하기 위하여 초음파 조사시간(10.00~40.00 min), 주정/초순수 부피비(30.00~50.00 vol%), 초음파 조사세기(500.00~700.00 W)의 범위에서 기초실험을 진행하였다. 기초실험 결과 높은 반응치를 갖는 각 변수의 적정범위를 초음파 조사시간(20.00~30.00 min), 주정/초순수 부피비(35.00~45.00 vol%), 초음파 조사세기(550.00~650.00 W)로 좁게 설정한 후 Minitab 프로그램을 활용하여 반응표면분석을 진행하였다. 3개의 독립변수는 초음파 조사시간(x_1), 주정/초순수 부피비(x_2), 초음파 조사세기(x_3)로 설정하고 20번의 표면설계를 생성했고 반응치인 추출수율(Y_1)과 iso-flavonoids 함량(Y_2)을 반응표면분석법에 의해 최적화했다. 중심합성계획모델에 의해 설정된 계량인자인 초음파 조사시간, 주정/초순수 부피비, 초음파 조사세기에 따른 반응치인 추출수율과 iso-flavonoids 함량을 Table 1에 나타내었다.

Table 1의 실험결과를 바탕으로 각 독립변수에 따른 추출수율을 최적화할 때 결정계수(coefficient of determination, R^2), P-value, F-value 등을 Table 2에 나타내었다. 여기서 결정계수는 예측값과 실제값 사이

Table 1. Response Surface Methodology of Three Variables and Corresponding Response Values

No.	Experimental factors levels			Response values	
	Time (min)	EtOH (vol%)	Power (W)	Yield (wt%)	iso-Flavonoids ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
1	16.59104	40	600	17.00	10.898
2	20	35	550	22.90	20.952
3	20	35	650	21.25	18.596
4	20	45	550	21.45	20.875
5	20	45	650	20.80	18.573
6	25	31.59104	600	23.95	23.561
7	25	40	515.9104	25.55	23.868
8	25	40	600	29.15	40.752
9	25	40	600	29.15	34.459
10	25	40	600	28.60	31.696
11	25	40	600	28.60	28.856
12	25	40	600	28.60	24.559
13	25	40	600	25.55	24.252
14	25	40	684.0896	23.85	23.024
15	25	48.40896	600	23.85	21.566
16	30	35	550	20.15	18.419
17	30	35	650	19.65	17.268
18	30	45	550	20.00	18.189
19	30	45	650	19.10	16.600
20	33.40896	40	600	17.30	16.347

Table 2. Various Analysis of Regression Coefficients and Equation of the Extraction Yield and iso-Flavonoids Content

Source	Extraction Yield		iso-Flavonoids Content	
	F-Value	P-Value	F-Value	P-Value
Model	16.81	< 0.0001	3.40	0.035
x_1	2.01	0.187	0.00	0.971
x_2	0.31	0.587	0.06	0.809
x_3	1.76	0.214	0.25	0.627
x_1x_2	0.10	0.757	0.00	0.954
x_1x_3	0.06	0.817	0.02	0.889
x_2x_3	0.03	0.877	0.00	0.978
x_1^2	129.28	0.000	24.31	0.001
x_2^2	21.08	0.001	5.78	0.037
x_3^2	14.35	0.004	4.65	0.056
Lack of Fit	0.58	0.718	0.14	0.976
R^2	0.94		0.75	

의 관계를 나타내는 지표로써 추출수율을 해석할 경우 $R^2 = 0.94$ 로 높게 나타나 실험값과 예측값의 상호관계가 높은 것으로 해석된다. P-value란 실험값의 검정 통계량이 귀무가설을 지지하는 정도를 확률로 표현한 것이다. 따라서 P-value가 작을수록 귀무가설을 지지하는 정도가 약하므로 귀무가설을 기각하게 된다. P-value (유의확률 값)가 유의수준보다 작으면 귀무가설 하에 일반적인 형상이 아니므로 귀무가설을 기각하고 대립가설을 채택하게 되며 일반적인 유의수준으로 5%를 설정한다. 또한 F-value란 분산 분석의 모형에 대한 적합성

을 나타내며 값이 클수록 적합하다고 볼 수 있다[25-26].

3.2. 추출수율의 최적화과정

추출수율에 대한 F-value는 16.81로 뛰어난 적합성을 나타내었으며, P-value 또한 매우 작게 나타났다. P-value는 각각의 독립변수의 중요도를 확인할 수 있는 하나의 도구로써 그 값이 작을수록 더 중요한 독립변수로 판단할 수 있다. Table 2로부터 추출수율에 따른 각 변수의 P-value는 $x_1 = 0.187$, $x_2 = 0.587$, $x_3 = 1.76$ 으로 x_1 의 P-value가 가

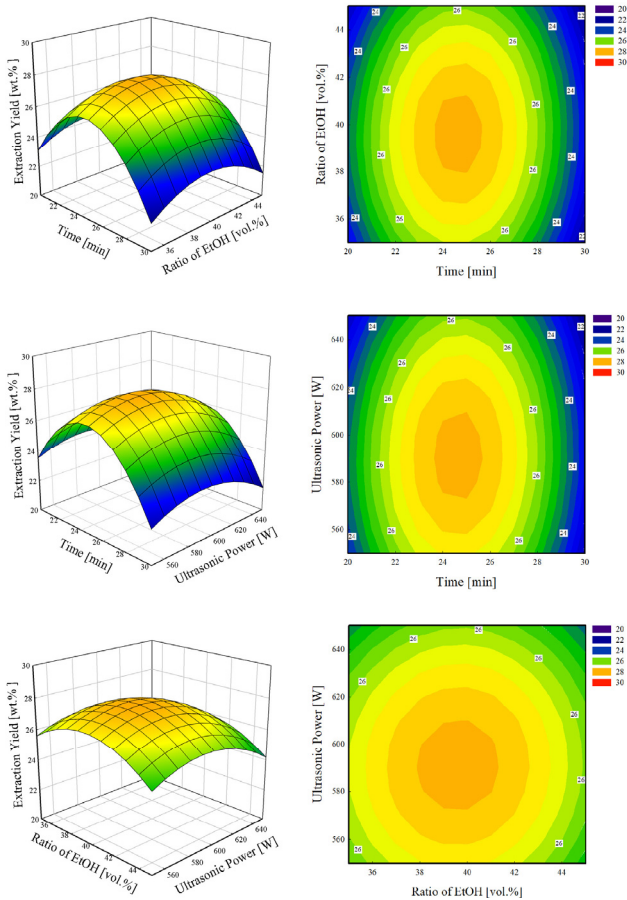


Figure 1. 3D surface and contour graph of extraction yield according to various variables.

장 작다. 따라서 본 연구에서의 추출수율의 경우 초음파 조사시간(x_1)이 가장 큰 영향을 미치는 변수임을 알 수 있었다. 이를 바탕으로 반응표면분석법을 이용해 각 독립변수에 따른 추출수율의 2차 회귀방정식을 다음과 같이 산출하였다.

$$Y_1 = -337.7 + 7.39x_1 + 4.80x_2 + 0.607x_3 - 0.1601x_1^2 - 0.0647x_2^2 - 0.000533x_3^2 + 0.0060x_1x_2 + 0.00045x_1x_3 + 0.00030x_2x_3 \quad (2)$$

여기서 Y_1 은 추출수율이고, x_1, x_2, x_3 는 각각 독립변수인 초음파 조사시간, 주정/초순수 부피비, 초음파 조사세기이다.

반응표면분석법을 이용하여 얻은 2차 회귀방정식을 이용하여 3가지 독립변수 중 2가지 독립변수에 따른 추출수율의 관계를 Figure 1에 나타내었다. 계량인자인 독립변수가 2개 이상일 경우 인자수준의 조합에서 일어나는 효과를 나타내는 교호효과도를 해석할 수 있다. (초음파 조사시간 × 초음파 조사세기)와 (주정/초순수 부피비 × 초음파 조사세기)에 비해 (초음파 조사시간 × 주정/초순수 부피비)가 추출수율에 더 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 이는 Table 2에 x_1x_2 의 F-value (0.10)와 P-value (0.757)를 통해 x_1x_3 와 x_2x_3 에 비해 높은 F-value와 낮은 P-value 나타내었다.

Figure 2는 각 변수들의 주효과도를 나타낸 그래프이다. 주효과도란 각 변수들이 반응치에 영향을 미치는 정도를 뜻하며 이 그래프에서의 반응치는 추출수율이고 각각의 변수는 초음파 조사시간, 주정/초순수

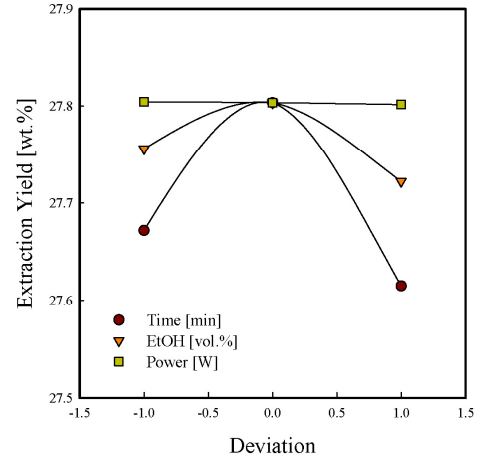


Figure 2. Perturbation plot for the effect of variables on extraction yield.

부피비, 초음파 조사세기이다. Figure 2에서 반응치인 추출수율에 초음파 조사시간이 상대적으로 가장 큰 주효과를 나타내고 있다. Figure 1에서 초음파 조사시간에 따른 추출수율은 일정구간 증가하다가 최고점을 지나 감소하는 경향을 보인다. 이는 초음파 조사시간이 증가할수록 용액의 온도가 증가하게 되고 이에 따라 추출효율이 증가하지만 일정 구간을 넘어가면 오히려 추출효율이 감소하는 것을 보여준다. 침에 존재하는 puerarin, daidzein, daidzin은 glycoside iso-flavonoids로 초음파 조사시간이 과도하게 증가할 경우 degradation과 hydrolysis를 초래한다는 연구결과가 존재한다[27-28]. 주정/초순수 부피비의 경우 최고점까지 증가하는 추세를 보이나 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 주정/초순수 부피비의 경우 고체와 용매 간 물질전달에 영향을 미치기 때문으로 사료된다[29]. 초음파 조사세기의 경우에도 추출수율이 증가하다가 감소하는 경향을 보이는데, 이는 일정 수준까지 추출 효율을 높이다가 한계점 이상에서 오히려 높은 에너지로 인해 acoustic cavitation을 유발시키고 cell 장벽의 붕괴를 초래하기 때문으로 사료된다.

3.3. Iso-flavonoids 함량의 최적화과정

Table 2의 iso-flavonoids 함량의 경우 $R^2 = 0.75$ 로 나타나 실험값과 예측값의 상호관계가 비교적 높았으며, F-value는 3.4, P-value가 0.035로 5%로 이내의 유의수준을 나타내었다. 따라서 본 연구에서는 각 독립변수에 따른 iso-flavonoids 함량의 관계를 다음과 같은 2차 회귀방정식으로 나타내었다.

$$Y_2 = -689.0 + 11.94x_1 + 9.79x_2 + 1.266x_3 - 0.2469x_1^2 - 0.1204x_2^2 - 0.001080x_3^2 - 0.0040x_1x_2 + 0.00096x_1x_3 - 0.00019x_2x_3 \quad (3)$$

여기서 Y_2 은 iso-flavonoids 함량이고, x_1, x_2, x_3 는 각각 독립변수인 초음파 조사시간, 주정/초순수 부피비, 초음파 조사세기이다.

Figure 3은 반응표면분석법을 이용하여 얻은 2차 회귀방정식을 이용하여 독립변수에 따른 iso-flavonoids 함량을 나타낸 그림이다. iso-flavonoids 함량의 경우에는 (초음파 조사시간 × 주정/초순수 부피비)와 (주정/초순수 부피비 × 초음파 조사세기)가 (초음파 조사시간 × 초음파 조사세기)에 비해 더 많은 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. Table 2로부터 x_1x_2 와 x_2x_3 의 F-value와 P-value가 각각 0.00, 0.954와

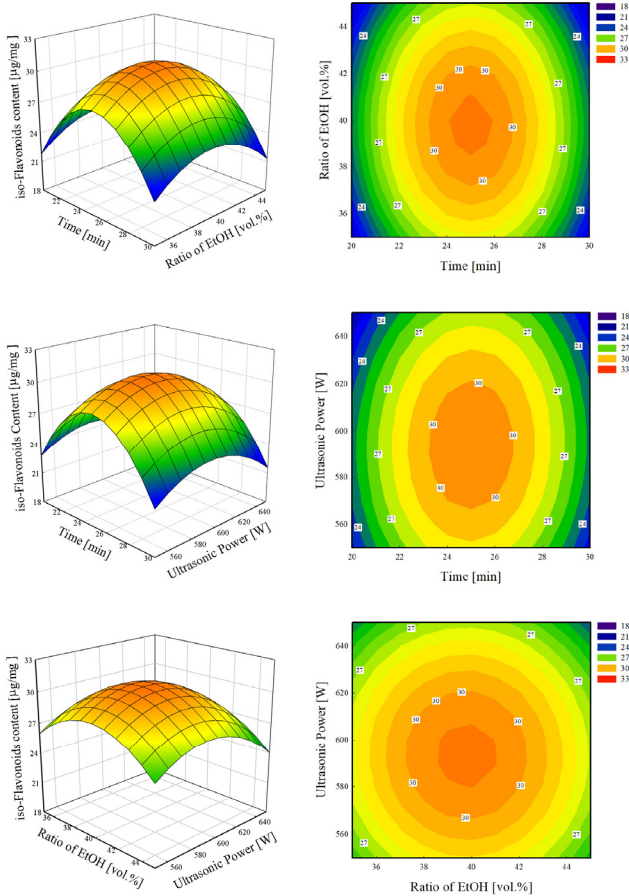


Figure 3. 3D surface and contour graph of iso-flavonoids content according to various variables.

0.00, 0.978로 x_1x_3 의 0.02와 0.889보다 더 높은 F-value와 더 낮은 P-value를 나타내었다. Table 2로부터 iso-flavonoids 함량에 따른 각 변수의 P-value는 $x_1 = 0.035$, $x_2 = 0.971$, $x_3 = 0.809$ 로 x_1 의 P-value가 가장 작다. 따라서 본 연구에서 iso-flavonoids 함량에 가장 큰 영향을 미치는 변수는 초음파 조사시간(x_1)임을 알 수 있었다. 또한 반응치인 iso-flavonoids 함량에 따른 주효과도를 나타낸 Figure 4을 통해 초음파 조사시간 > 주정/초순수 부피비 > 초음파 조사세기의 순서로 반응치에 가장 큰 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있다. 칩의 주요 iso-flavonoids인 puerarin, daidzein, daidzin의 추출함량을 이용해서 실험을 진행한 결과 초음파 조사시간이 증가함에 따라 iso-flavonoids 함량이 증가하다가 감소하는 경향을 보였다. 또한 초음파 조사시간이 증가할수록 용액의 온도가 증가하여 iso-flavonoids의 용해량이 증가하게 된다. 하지만 일정 시간 이상부에서는 iso-flavonoids의 변형이나 분해 등이 발생하여 오히려 iso-flavonoids 함량이 낮아지게 된다. 주정/초순수 부피비 또한 한계점 이하에서는 iso-flavonoids 함량이 증가하다가 감소하는 형태를 보이며 초음파 조사세기 또한 필요이상으로 증가할 경우 오히려 사용된 에너지에 비해 iso-flavonoids 함량이 감소하는 것으로 알 수 있었다.

3.4. 종합만족도 평가

반응표면분석법을 통해 독립변수인 초음파 조사시간, 주정/초순수 부피비, 초음파 출력에 따른 2개의 반응치인 추출수율과 iso-fla-

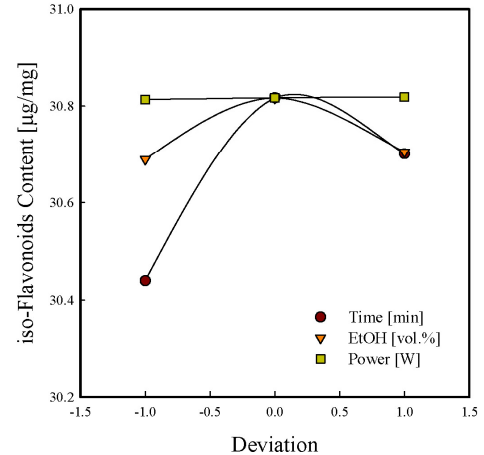


Figure 4. Perturbation plot for the effect of variables on iso-flavonoids content.

vonoids 함량의 최적 조건을 Figure 5에 나타냈다. 두 반응치의 최대 값을 모두 만족하는 최적조건은 초음파 조사시간(24.75 min), 주정/초순수 부피비(39.75 vol%), 초음파 조사세기(592.36 W)이다. 최적 반응치는 추출수율의 경우 27.8363 wt%이고 iso-flavonoids 함량은 30.8064 µg/mg이다. 최적화 그래프에서 또한 최적포인트 기준으로 증가, 감소 기울기 값이 초음파 조사시간에서 가장 크게 나타났으며 이는 반응치에 가장 영향력 있는 독립변수라는 것을 의미한다. 종합만족도를 나타내는 D는 0부터 1로 나타내며 반응치의 적합성을 뜻한다. 즉 D 값이 1에 가까울수록 높은 만족도를 나타내며 0에 가까울수록 낮은 만족도를 나타낸다. 본 그래프에 따른 종합 만족도 D는 0.8938로 높게 나타났다[30]. 또한 5% 이내의 유의성 수준에 인정된다. 반응표면분석법을 통한 최적조건이 기초실험을 통해 설정한 변수범위 안에 들었으므로 성공적인 실험이라고 볼 수 있으며 두 개의 반응치를 같이 분석해야 하는 다중분석 반응표면 분석임에도 불구하고 정확성이 높게 나타났다.

4. 결 론

본 연구에서는 칩에 포함된 향산화 물질인 iso-flavonoids 성분을 추출하기 위해 초음파에너지를 이용한 추출공정을 수행했다. 기초실험을 통해 높은 반응치를 갖는 각 변수의 적정범위로 초음파 조사시간(20.00~30.00 min), 주정/초순수 부피비(35.00~45.00 vol%), 초음파 조사세기(550.00~650.00 W) 범위를 설정하였다. 3개의 실험인자는 초음파 조사시간(x_1), 주정/초순수 부피비(x_2), 초음파 조사세기(x_3)로 설정하고 20번의 표면설계를 생성했고 반응치인 추출수율(Y_1)과 iso-flavonoids 함량(Y_2)을 반응표면분석법에 의해 최적화한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 칩의 추출수율에 따른 변수들의 교호효과도는 (초음파 조사시간 × 초음파 조사세기)와 (주정/초순수 부피비 × 초음파 조사세기)에 비해 (초음파 조사시간 × 주정/초순수 부피비)가 추출수율에 더 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 또한 추출수율에 따른 각 변수의 P-value 중 $x_1 = 0.187$ 로 가장 작은 값을 가지며 이는 가장 큰 주효과도를 나타낸다.

2. Iso-flavonoids 함량의 경우에는 (초음파 조사시간 × 주정/초순수 부피비)와 (주정/초순수 부피비 × 초음파 조사세기)가 (초음파 조사시

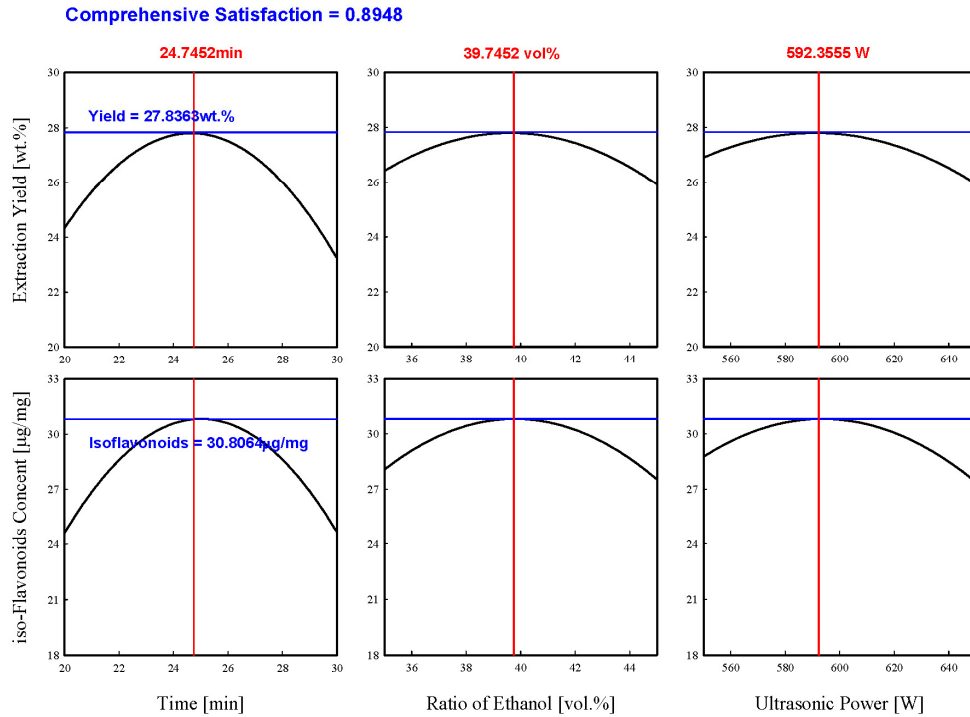


Figure 5. Multiple optimization graphs of extraction yield and iso-flavonoids content.

간 × 초음파 조사세기)에 비해 더 많은 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 또한 iso-flavonoids 함량에 따른 각 변수의 P-value는 $x_1 = 0.035$, $x_2 = 0.971$, $x_3 = 0.809$ 로 x_1 의 P-value가 가장 작게 나타났으며 이는 초음파 조사시간(x_1)이 가장 큰 영향을 미치는 것을 의미한다.

3. 반응표면분석법을 이용하여 두 개의 반응치인 추출수율과 iso-flavonoids 함량의 최대값을 갖는 최적조건을 평가한 결과 초음파 조사시간(24.75 min), 주정/조순수 부피비(39.75 vol%), 초음파 조사세기(592.36 W)에 따라 추출수율(27.8363 wt%)과 iso-flavonoids 함량(30.8064 µg/mg)의 결과를 얻을 수 있었다. 이때 종합 만족도 D 는 0.8938로 높게 나타났으며 5% 이내의 유의성 수준에 인정된다. 또한 최적화 과정과 주효과도를 분석한 결과 초음파 조사시간이 두 반응치 모두에 가장 많은 영향을 미치는 인자임을 확인하였다.

감 사

이 연구는 2017학년도 단국대학교 대학연구비 지원으로 연구되었음.

References

1. S. Kayano, Y. Matsumura, Y. Kitagawa, M. Kobayashi, A. Nagayama, N. Kawabata, K. Kikuzaki, and Y. Kitada, Isoflavone C-glycosides isolated from the root of kudzu (*Pueraria lobata*) and their estrogenic activities, *Food Chem.*, **134**, 282-287 (2012).
2. S.-W. Choi, K.-S. Kim, N.-Y. Hur, S.-C. Ahn, C.-S. Park, B.-Y. Kim, M.-Y. Baik, and D.-O. Kim, Effect of heat processing on thermal stability of kudzu (*Pueraria thumbergiana* Benth) root isoflavones, *J. Life Sci.*, **18**, 1447-1454 (2008).
3. Y. Zhang, J. Chen, C. Zhang, W. Wu, and X. Liang, Analysis of the estrogenic components in kudzu root by bioassay and high performance liquid chromatography, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **94**, 375-381 (2005).
4. W. Cherdshewassart, S. Subtang, and W. Dahlan, Major iso-flavonoid contents of the phytoestrogen rich-herb *Pueraria mirifica* in comparison with *Pueraria lobata*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **43**, 428-434 (2007).
5. P. Delmonte, J. Perry, and J. I. Rader, Determination of iso-flavones in dietary supplements containing soy, red clover and kudzu: Extraction followed by basic or acid hydrolysis, *J. Chromatogr. A*, **1107**, 59-69 (2006).
6. M.-Y. Lee and K.-H. Chang, Quality properties and isoflavone contents of Chungkukjang containing isoflavone extracted from arrowroot (*Pueraria lobata* Ohwi), *J. East Asian Soc. Diet. Life*, **20**, 543-550 (2010).
7. F.-Y. Ma, C.-B. Gu, C.-Y. Li, M. Luo, W. Wang, Y.-G. Zu, J. Li, and Y.-J. Fu, Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of isoflavonoids from *Dalbergia odorifera* T. Chen leaves, *Sep. Purif. Technol.*, **115**, 136-144 (2013).
8. H. Xu, Y. Zhang, and C. He, Ultrasonically assisted extraction of isoflavones from stem of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi and its mathematical model, *Chin. J. Chem. Eng.*, **15**, 861-867 (2007).
9. D. Pradal, P. Vauchel, S. Decossin, P. Dhulster, and K. Dimitrov, Integrated extraction- adsorption process for selective recovery of antioxidant phenolics from food industry by-product, *Chem. Eng. Process.*, **127**, 83-92 (2018).
10. F. Chen, Q. Zhang, J. Liu, H. Gu, and L. Yang, An efficient approach for the extraction of orientin and vitexin from *Trollius chinensis* flowers using ultrasonic circulating technique, *Ultrason. Sonochem.*, **37**, 267-278 (2017).
11. R. Mittal, H. A. Tavanandi, V. A. Mantri, and K. S. M. S. Raghavarao, Ultrasound assisted methods for enhanced extraction of phycobiliproteins from marine macro-algae, *Gelidium pusillum*

- (*Rhodophyta*), *Ultrason. Sonochem.*, **38**, 92-103 (2017).
12. G. Kumar, Ultrasonic-assisted reactive-extraction is a fast and easy method for biodiesel production from *Jatropha curcas* oilseeds, *Ultrason. Sonochem.*, **37**, 634-639 (2017).
 13. L. Bebrevska, K. Foubert, N. Hermans, S. Chatterjee, E. Van Marck, G. De Meyer, A. Vlietinck, L. Pieters, and S. Apers, In vivo antioxidative activity of a quantified *Pueraria lobata* root extract, *J. Ethnopharmacol.*, **127**, 112-117 (2010).
 14. K. A. Kang, S. Chae, Y. S. Koh, J. S. Kim, J. H. Lee, and J. W. Hyun, Protective effect of puerariae radix on oxidative stress induced by hydrogen peroxide and streptozotocin, *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1154-1160 (2005).
 15. Y. Gao, X. Wang, and C. He, An isoflavonoid-enriched extract from *Pueraria lobate* (kudzu) root protects human umbilical vein endothelial cells against oxidative stress induced apoptosis, *J. Ethnopharmacol.*, **193**, 524-530 (2016).
 16. P. Wang, H. Zhang, H. Yang, L. Nie, and H. Zang, Rapid determination of major bioactive isoflavonoid compounds during the extraction process of kudzu (*Pueraria lobate*) by near-infrared transmission spectroscopy, *Spectrochim. Acta A*, **137**, 1403-1408 (2015).
 17. K. Beekmann, L. H. J. de Haan, L. Actis-Goretta, R. Houtman, P. J. van Bladeren, and I. M. C. M. Rietjens, The effect of glucuronidation on isoflavone induced estrogen receptor (ER) and ER mediated coregulator interactions, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **154**, 245-253 (2015).
 18. C.-Y. Chiao, H.-J. Kwon, J.-S. Jeong, J.-H. Lee, and S.-P. Hong, Determination method of *Puerarin* and *Daidzin* from *Puerariae Radix* by reversed-phase HPLC with pulsed amperometric detection, *Korean J. Herbology*, **23**, 171-177 (2008).
 19. Y. Zhang, Z. Liu, Y. Li, and R. Chi, Optimization of ionic liquid-based microwave-assisted extraction of isoflavones from *Radix puerariae* by response surface methodology, *Sep. Purif. Technol.*, **129**, 71-79 (2014).
 20. P. li, L. Zhou, Y. Mou, and Z. Mao, Extraction optimization of polysaccharide from *Zanthoxylum bungeanum* using RSM and its antioxidant activity, *Int. J. Biol. Macromol.*, **72**, 19-27 (2015).
 21. K. H. Wong, G. Q. Li, K. M. Li, V. Razmovski-Naumovski, and K. Chan, Optimisation of *Pueraria* isoflavonoids by response surface methodology using ultrasonic-assisted extraction, *Food Chem.*, **231**, 231-237 (2017).
 22. C. Chen, Y. Shao, Y. Tao, and H. Wen, Optimization of dynamic microwave-assisted extraction of *Armillaria* polysaccharides using RSM, and their biological activity, *LWT-Food Sci. Technol.*, **64**, 1263-1269 (2015).
 23. X. Yin, Q. You, and Z. Jiang, Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* by response surface methodology, *Carbohydr. Polym.*, **86**, 1358-1364 (2011).
 24. K. Ameer, S.-W. Bae, Y. Jo, H.-G. Lee, A. Ameer, and J.-H. Kwon, Optimization of microwave-assisted extraction of total extract stevioside and rebaudioside-A from *Stevia rebaudiana* (*Bertoni*) leaves, using response surface methodology (RSM) and artificial neural network (ANN) modelling, *Food Chem.*, **229**, 198-207 (2017).
 25. J. Sharma, Sukriti, P. Anand, V. Pruthi, A. S. Chaddha, J. Bhatia, and B. S. Kaith, RSM-CCD optimized adsorbent for the sequestration of carcinogenic rhodamine-B: Kinetics and equilibrium studies, *Mater. Chem. Phys.*, **196**, 270-283 (2017).
 26. Y. H. Tan, M. O. Abdullah, and C. Nolasco-Hipolito, Application of RSM and Taguchi methods for optimizing the transesterification of waste cooking oil catalyzed by solid ostrich and chicken-eggshell derived CaO, *Renew. Energy*, **114**, 437-447 (2017).
 27. M. Yolmeh, M. B. Habibi Najafi, and R. Farhoosh, Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM), *Food Chem.*, **155**, 319-324 (2014).
 28. T. Wang, H. Liang, and Q. Yuan, Optimization of ultrasonic-stimulated solvent extraction of sinigrin from Indian mustard seed (*Brassica juncea* L.) using response surface methodology, *Phytochem. Anal.*, **22**, 205-213 (2011).
 29. T. Belwal, P. Dhyani, I. D. Bhatt, R. S. Rawal, and V. Pande, Optimization extraction conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Berberis asiatica* fruits using response surface methodology (RSM), *Food Chem.*, **207**, 115-124 (2016).
 30. A. Singh, H. Garg, and A. K. Lall, Optical polishing process: Analysis and optimization using response surface methodology (RSM) for large diameter fused silica flat substrates, *J. Manuf. Process.*, **30**, 439-451 (2017).