

## 반응표면분석을 이용한 진생베리의 활성 성분 최적 추출 조건에 관한 연구

고 희 경<sup>1</sup> · 박 준 성<sup>2,†</sup>

<sup>1</sup>충북대학교 공업화학과, 대학원생

<sup>2</sup>충북대학교 공업화학과, 교수

(2020년 6월 11일 접수, 2020년 6월 22일 수정, 2020년 6월 26일 채택)

### Study of Optimized Simultaneous Extraction Conditions for Active Component of Ginseng Berry using Response Surface Methodology

Hee Kyoung Go and Junseong Park<sup>†</sup>

Department of Engineering Chemistry, Chungbuk National University, College of Engineering,  
1 Chungdae-ro, Seowon-gu, Cheongju-si, Chungbuk 28644, Republic of Korea  
(Received June 11, 2020; Revised June 22, 2020; Accepted June 26, 2020)

**요약:** 본 연구에서는 진생베리로부터 활성 성분인 ginsenoside Re와 Rb1의 함량과 항산화 활성이 높은 추출물을 얻기 위한 최적의 추출조건을 확인하였다. 70% 에탄올과 증류수를 추출 용매로 하여 교반, 초음파 및 마이크로파를 이용하여 추출한 후 ginsenoside Re와 Rb1의 함량, 총 폴리페놀 함량, 항산화 활성 및 친환경적 제조 방법 여부를 고려한 결과 증류수 용매의 마이크로파 추출법이 가장 적합한 추출방법인 것을 확인하였다. 마이크로파 추출법의 최적 추출조건을 설정하기 위해 반응표면분석법(RSM)을 사용하여 마이크로파 출력량(50 ~ 200 W, X1), 용매와 진생베리의 비율(5 ~ 20 times, X2), 추출시간(30 ~ 120 s, X3)을 독립변수로 최적화 실험을 진행한 결과 도출된 회귀방정식의 결정계수는 0.9보다 높으며 *p*-value값은 0.05보다 작아 모델의 적합성이 확인되었다. Ginsenoside와 총 폴리페놀 함량을 위한 최적 추출조건은 마이크로파 출력량(200 W), 진생베리와 추출 용매 비율(20 times), 추출시간(90 s)로 확인되었다. 최적 추출조건에서 총 폴리페놀 함량이 6.23 mg GAE/g, ginsenoside Re 17.69 mg/g, Rb1 16.01 mg/g으로 예측되었고, 실제 실측검증에서 각각 6.33 mg GAE/g, 17.79 mg/g, 15.59 mg/g으로 예측된 값에 대하여 유사한 결과를 확인할 수 있었다.

**Abstract:** This study was conducted to find out the optimal extraction conditions to obtain extracts with a high content of ginsenosides and antioxidant activity using the ginseng berry. After extraction by stirring, ultrasound and microwave method using 70% ethanol and distilled water as solvents, the results of considering the content of ginsenoside Re and Rb1, total polyphenol content, antioxidant activity, and whether it is an environmentally friendly manufacturing method, it was confirmed that the microwave method using distilled water is good method of extraction. The optimization of extraction conditions for microwave method were made by response surface methodology (RSM). Microwave power (50 ~ 200 W, X1), solvent and ginseng berry ratio (5 ~ 20 times, X2) and the extraction time (30 ~ 120 s, X3) were used as independent variables. The model showed a good fit having a determination coefficient of the regression equation of 0.9 or more and a *p*-value less than 0.05. Estimated conditions for the maximized extraction of ginsenoside contents and total polyphenols were 200 w in microwave power, 20 times in solvent and ginseng berry ratio, and 90 s in extraction time. Predicted values at the optimum conditions were total polyphenols of 6.23 mg GAE/g, ginsenoside Re of 17.69 mg/g, and ginsenoside Rb1 of 16.01 mg/g. In the verification of the actual measurement the obtained values showed 6.33 mg GAE/g, 17.79 mg/g, and 15.59 mg/g, respectively, in good agreement with predicted values.

**Keywords:** ginseng berry, ginsenoside, total polyphenol, microwave, RSM

† 주 저자 (e-mail: jsparkbio@cbnu.ac.kr)  
call: 043-261-3326

## 1. 서 론

최근 소득의 향상 수준만큼 웰빙과 건강관리에 대한 관심이 높아지면서 소비자들은 안전하고 건강한 먹거리를 선호하게 되었다. 한약의 개념을 넘어 상시 섭취할 수 있는 음식이면서 동시에 약이 될 수 있는 약초에 대한 관심이 산업에 반영되고 있다[1]. 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 두릅나무과에 속하는 여러해살이 풀이며 약리적 효능이 있는 식용 약물로서 질병을 예방하고 치료하는 제품으로 사용되어 왔다[2-4]. 인삼의 약리적 효능에는 심혈관계 장애 개선작용, 면역력 증대, 항피로, 항당뇨, 항우울 효과 등이 있다[5-10]. 인삼의 주요 생리활성 물질로는 진세노사이드, 폴리 아세틸렌, 다당류, 인삼 단백질, 페놀 화합물 등이 있다[11-13]. 인삼의 열매인 진생베리는 3 년 이상의 인삼에서 볼 수 있는 인삼의 열매로 인삼 뿌리를 수확하기 전 7 월 중순에 수확할 수 있는 열매로 슬러지 형태로 생산된다. 진생베리는 인삼의 뿌리보다 더 높은 함량의 ginsenoside를 함유하고 있으며 ginsenoside Re의 함량이 상대적으로 높은 것으로 알려져 있다[14].

천연물로부터 활성 물질의 추출방법에는 용매 추출, 환류 추출, 초음파 추출, 마이크로파 추출, 초임계 추출방법 등이 사용되고 있다[15,16]. 일반적인 추출방법인 용매 추출은 물, 에탄올, 메탄올, 아세토니트릴을 주로 사용하며, 낮은 용해도로 인하여 추출 효율이 높지 않다. 초음파 추출을 이용한 산업적 적용은 초음파 에너지의 세기에 따라 추출의 효율성을 조절할 수 있다[17]. 마이크로파 추출은 짧은 시간에 가열이 가능하고, 추출속도가 빨라 에너지 소모량이 적어 추출 효율이 매우 높으며 조작성 용이하다[18,19]. 이러한 추출법들의 특징을 고려해보았을 때 추출법과, 용매에 따른 수율의 변화를 관찰할 수 있을 것으로 판단된다.

본 연구에서는 진생베리를 여러 조건으로 추출하여 각 추출물의 활성 성분 함량과 항산화 효능을 비교하고, 반응 표면분석법(response surface methodology, RSM) 중 Box-Behnken 모델(box-behnken design model, BBD)을 이용하여 진생베리에서 ginsenoside Re, Rb1과 폴리페놀을 효과적으로 추출할 수 있는 추출 공정을 최적화하고자 하였다.

## 2. 재료 및 실험

### 2.1. 진생베리 추출물 제조

본 실험에 사용된 진생베리는 충청남도 금산군 금산읍 소

재의 올댓진생영농조합법인(Korea)에서 구입하여 사용하였다. 과육 상태의 진생베리를 회전증발농축기(N-1110, Eyela Co., Japan)와 진공펌프(A-1000S, Eyela Co., Japan)를 이용하여 수분을 제거하였으며, 수분이 제거된 진생베리를 수분측정기(XY-100MW-T, Changzhou XingYun Electronic Co., China)로 수분을 측정된 결과 73.72%의 수분을 함유하는 것을 확인하였다. 진생베리의 교반추출은 진생베리 2 g을 40 g의 증류수와 70% 에탄올을 이용하였으며 Thermostatic Oscillator (THZ-92A, Shanghai Longyue Co., China)로 상온의 조건에서 각각 2 h 동안 추출하였다. 초음파 추출은 진생베리 2 g을 40 g의 증류수와 70% 에탄올을 이용하여 초음파 세척기(JAC-2010, Sonics Co., USA)로 25 °C에서 각각 2 h 동안 추출하였다. 마이크로파 추출은 진생베리 2 g을 40 g의 증류수와 70% 에탄올을 이용하였으며 마이크로웨이브 반응 장비(MWO-1000S, Wave magic, Japan)를 추출에 사용하였으며, 마이크로파 출력 100 W로 1 min 동안 2 번 추출을 진행하였다. 각 추출물은 감압여과기로 여과시켜 분석에 사용하였다.

반응표면분석을 위한 추출에는 증류수와 마이크로웨이브 반응 장비를 사용하였으며 용매 50 g에 진생베리 2.5, 4, 10 g을 넣고 출력량 50, 125, 200 W에서 30, 75, 120 s 동안 추출하였다. 각 추출물은 감압여과기로 여과시켜 분석에 사용하였다.

### 2.2. ABTS Free Radical 소거능 평가 시험

진생베리 추출물의 ABTS free radical 소거능은 Dong Hwa Park 등의 방법을 응용하여 측정하였다[20]. ABTS와 potassium persulfate를 각각 7.4 mM과 2.45 mM의 농도가 되도록 용액을 제조하고 두 용액을 같은 비율로 혼합한 후 암실에서 24 h 동안 방치시켜 푸른색을 띠는 ABTS radical 용액을 제조하였다. ABTS radical 용액을 증류수로 20 배 희석하여 730 nm에서 측정된 흡광도가  $0.7 \pm 0.005$ 가 되도록 조정하였다. 진생베리 추출물 용액 10  $\mu$ L에 ABTS radical 용액 190  $\mu$ L를 첨가한 뒤 혼합물을 암실에서 10 min 동안 놓아두었다. 이후 Microplate reader (BKMPR-1096A, Konvision Inc., China)를 이용하여 730 nm에서 흡광도를 측정하였다. 진생베리 추출물의 ABTS free radical 소거능은 양성대조군인 L-ascobic acid의 free radical 소거능과 비교하여 나타내었다. free radical 소거능은 아래의 수식으로 계산하였다.

$$\text{ABTS free radical 소거능(\%)} = (1-A/B) \times 100$$

A: 시료첨가구의 흡광도

B: 시료 무첨가구의 흡광도

### 2.3. 총 폴리페놀 함량 평가 시험

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu법을 응용하여 분석하였다[21]. 진생베리 추출물 100  $\mu\text{L}$ 에 50% Folin-ciocalteu 시약(Folin & Ciocalteu's phenol reagent, Sigma Aldrich, USA)을 20  $\mu\text{L}$ 를 첨가하고 5 min 후에 5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  100  $\mu\text{L}$ 를 추가로 첨가한 후 암실에서 60 min 동안 놓아두었다. 이후 Microplate reader를 이용하여 730 nm에서 흡광도를 측정하였다. 진생베리 추출물의 총 페놀 화합물 함량은 gallic acid (98%, Sigma Aldrich, USA)를 표준물질로 삼아서 1 g의 진생베리에 포함되어 있는 gallic acid equivalent (GAE)의 mg수로 표시하였다.

### 2.4. High Performance Liquid Chromatography 조건

진생베리의 추출 용액은 HPLC (2695 Separations Module, Waters, USA)를 이용하여 ginsenoside의 함량을 정량 분석하였다. 칼럼(column)은 Mightysil RP-18GP 5  $\mu\text{m}$  4.6 x 250 mm (KANTO CHEMICAL, Japan)을 사용하였고 검출기는 Waters 486 Tunable Absorbance Detector로 파장은 210 nm에서 검출하였으며, 이동상 A는 acetonitrile, B는 deionized water으로 하여 1.0 mL/min의 속도로 샘플은 10  $\mu\text{L}$ 를 주입하였고, column 온도 30  $^{\circ}\text{C}$ 에서 분석하였다. Column의 유속은 1.0 mL/min 이었고, 분석 시간은 0 min에서 10 min 까지 이동상 A를 10%, 이동상 B를 90%로 용리하기 시작하였으며, 10 min에서 25 min까지 이동상 A를 90%, 이동상 B를 10%가 되도록 용리하였고, 25 min에서 30 min까지 다시 이동상 A를 10%, 이동상 B를 90%가 되도록 한 다음, 30 min에서 35 min까지 이동상 A를 10%, 이동상 B를 90%로 유지하면서 분석을 진행하였다.

### 2.5. 반응표면분석법

반응표면분석법 중 3 개의 변수에 대해 3 개의 범위를 정해 2차 회귀방정식과 최적의 조건을 확인할 수 있는 Box-Behnken 모델(box-behnken design model, BBD)을 사용하였다[22,23]. 변수로는 마이크로파 출력량( $X_1$ , 50 W, 125 W, 200 W), 용매와 진생베리의 비율( $X_2$ , 5 배, 12.5 배, 20 배), 추출 시간( $X_3$ , 30 s, 75 s, 120 s)를 설정하였다. 3 개의 독립변수의 범위를 -1, 0, 1 (최저값, 중심값, 최대값) 총 3 단계로 부호화 하였으며 BBD의 17-run방법에 따라 추출 조건을 설정하여 추출을 진행하였다. 각 반응에 대해 다음의 이차다항식으로 표현할 수 있다.

$$Y_n = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2$$

$\beta_1, \beta_2, \beta_3$ 는 각각의 변수에 대한 선형 계수이고  $\beta_{12}, \beta_{23}, \beta_{13}$ 은 각 변수간의 상관관계에 대한 계수이며  $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ 은 각 변수의 이차 계수를 나타낸다.

### 2.6. 통계 처리

반응 표면 분석법은 Design Expert 12.0 (Stat-Ease Inc., USA)를 사용하여 통계학적 최적화를 수행하였다. 전체 모델의 적합성을 파악하기 위해 analysis of variance (ANOVA)를 수행하였으며 분석된  $p$ -value가 0.05보다 작은 값을 가질 때, 모델의 유의성이 있다고 판단하였다. 각 실험은 신뢰할 수 있는 결과를 얻기 위해 3 회 이상 반복 실험을 수행하였으며 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 추출법 별 추출물의 활성 성분 및 항산화 효능

#### 3.1.1. ABTS Free Radical 소거능 활성

각 추출물을 증류수로 2 배 희석하여 ABTS free radical 소거능 활성을 이용하여 항산화능을 비교하였다. 추출방법을 달리한 진생베리 추출물의 ABTS free radical 소거능 활성을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 추출방법에 따른 증류수와 70% 에탄올 추출물 모두 항산화 활성을 보였으며 이는 양성대조군인 L-ascobic acid 100 ppm의 ABTS free radical 소거능과 유사한 수준으로 확인된다. 모든 추출 방법 중 70% 에탄올 교반추출 추출물이  $48.47 \pm 0.28\%$ 로 가장 높은 활성을 나타내었다. 증류수를 이용한 추출 방법에

**Table 1.** ABTS Free Radical Scavenging Activities of Ginseng Berry

Solvent	Method	ABTS free radical scavenging activities (% inhibition)
70% EtOH	Stirring	$48.47 \pm 0.28$
	Sonication	$48.03 \pm 0.21$
	Microwave	$46.86 \pm 0.51$
Distilled water	Stirring	$41.13 \pm 0.84$
	Sonication	$43.73 \pm 5.18$
	Microwave	$44.04 \pm 1.12$
L-Ascorbic acid 50 ppm		$10.20 \pm 2.05$
L-Ascorbic acid 100 ppm		$43.23 \pm 3.89$
L-Ascorbic acid 200 ppm		$79.08 \pm 1.29$

서는 마이크로파 추출물이  $44.04 \pm 1.12\%$ 로 가장 높은 활성을 나타내었다. 70% 에탄올과 증류수를 사용하여 추출 방법에 따른 비교를 진행한 결과 ABTS free radical 소거능 활성에는 최소  $41.13 \pm 0.84$ 에서 최고  $48.47 \pm 0.28$  범위에서 확인이 되어 큰 차이가 없는 것이 확인되었다.

### 3.1.2. 총 폴리페놀 함량

추출방법을 달리한 진생베리 추출물의 총 폴리페놀 함량은 Table 2과 같다. Gallic acid를 표준물질로 하여 추출 용매와 추출방법을 달리한 추출물의 총 폴리페놀 결과 70% 에탄올 추출보다 증류수 추출에서 더 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다. 증류수 교반추출과 초음파추출에서  $5.34 \pm 0.10$  mg GAE/g으로 추출법 중 가장 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다. 70% 에탄올을 이용한 추출방법의 비교에서는 교반추출에서  $4.01 \pm 0.09$  GAE/g으로 가장 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다. 마이크로파 추출법을 이용한 경우 70% 에탄올균에서  $3.60 \pm 0.14$  mg GAE/g, 증류수를 이용한 실험군에서  $5.05 \pm 0.11$  mg GAE/g으로 확인되어 같은 추출방법을 사용하더라도 추출 용매에 따라 폴리페놀의 함량은 상당한 차이가 있음을 확인 할 수 있었다.

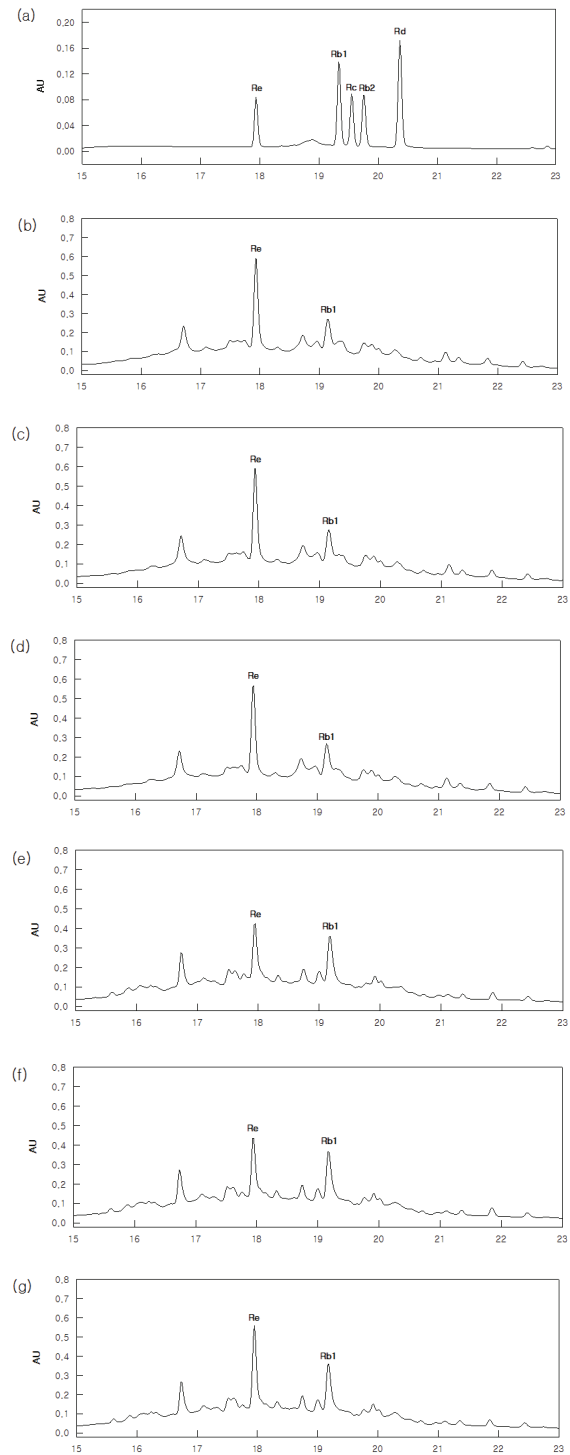
**Table 2.** Total Polyphenols Content of Ginseng Berry

Solvent	Method	Total polyphenol (mg GAE <sup>1)</sup> /g)
70% EtOH	Stirring	$4.01 \pm 0.09$
	Sonication	$3.94 \pm 0.02$
	Microwave	$3.60 \pm 0.14$
Distilled water	Stirring	$5.34 \pm 0.10$
	Sonication	$5.34 \pm 0.10$
	Microwave	$5.05 \pm 0.11$

<sup>1)</sup> mg gallic acid equivalent (GAE) per ginseng berry weight g.

### 3.1.3. 활성 성분 분석

진생베리의 추출방법에 따른 추출물의 활성 성분의 차이를 비교하기 위하여 HPLC를 이용하여 분석하였다. 활성 성분으로 ginsenoside Rb1, Re를 정량분석 하였고 진생베리의 원물 1 g에 포함되어있는 ginsenoside의 mg수로 표시하였다. ginsenoside Re와 Rb1이 검출된 결과를 Figure 1에 나타내었으며, 검출된 ginsenoside 성분의 양은 Table 3에 나타내었다. Ginsenoside Re의 경우 추출방법에 따라 최소  $12.76 \pm 0.57$ 에서 최대  $0.36 \pm 0.87$  mg/g이 확인되었다. 이



**Figure 1.** HPLC chromatogram of ginseng berry (a) ginsenoside standard (b) 70% ethanol stirring extract, (c) 70% ethanol sonication extract, (d) 70% ethanol microwaving extract, (e) distilled water stirring extract, (f) distilled water sonication extract, (g) distilled water microwaving extract.

중 증류수를 활용한 경우 마이크로파를 이용한 추출법이 가장 높은 추출 효율을 보였으나 70% 에탄올을 활용한 경우 추출방법에 따른 추출 효율은 큰 차이가 없는 것으로 확인되었다. Ginsenoside Rb1 의 경우 추출방법에 따라 최소  $19.48 \pm 0.85$ 에서 최대  $24.01 \pm 2.39$  mg/g 이 확인 되었다. 70% 에탄올을 활용한 교반 추출방법이 가장 높은 추출 효율을 보였고 증류수를 이용한 경우 교반 추출을 이용한 방법이 좋은 효율을 보였지만 초음파, 마이크로파를 이용한 추출법과 비교하여 오차범위 내에서 비슷한 효율을 보여 큰차이는 없는 것으로 확인되었다.

**Table 3.** Ginsenoside Contents of Ginseng Berry by HPLC

Solvent	Method	Re (mg/g)	Rb1 (mg/g)
70% EtOH	Stirring	$20.36 \pm 0.87$	$24.01 \pm 2.39$
	Sonication	$20.19 \pm 0.80$	$23.18 \pm 1.54$
	Microwave	$19.65 \pm 1.07$	$22.10 \pm 1.32$
Distilled water	Stirring	$12.76 \pm 0.57$	$21.19 \pm 1.47$
	Sonication	$13.87 \pm 0.24$	$20.51 \pm 0.75$
	Microwave	$17.20 \pm 0.15$	$19.48 \pm 0.85$

### 3.2. 반응표면분석법을 이용한 활성 성분의 최적추출 조건 선정 및 분석

진생베리를 70% 에탄올, 증류수를 용매로 교반, 초음파 및 마이크로파 추출을 진행하였을 때 총 폴리페놀 함량과 ginsenoside 함량을 확인하였다. 70% 에탄올과 증류수에서 큰 차이가 보이지 않았지만, 친환경적인 부분을 고려하였을 때 유기용매인 에탄올보다 증류수를 이용하여 추출을 진행하는 것이 친환경적이므로 증류수를 선정하였다. 교반, 초음파 및 마이크로파 추출이 큰 차이를 나타내지 않았으나 추출시간이 2 h인 교반추출과 초음파추출과 비교하면 마이크로파 추출의 경우 추출시간이 짧은 2 min 동안 추출하여 가장 효율적인 추출방법으로 고려된다. 이러한 유기 용매를 사용하지 않는 친환경적인 장점과 항산화 및 활성 성분의 추출 효율에 대한 실험결과를 바탕으로 증류수를 용매로 한 마이크로파 추출을 최종 추출법으로 선정하였다.

최적 추출조건 확인을 위한 분석 변수로 마이크로파 출력량( $X_1$ ), 용매와 진생베리의 비율( $X_2$ ), 추출 시간( $X_3$ )으로 설정하였다. 중앙의 다섯 점을 포함하고 세 가지 독립변수와 그 세 가지 레벨을 가지는 17-run BBD을 실행하였으며

**Table 4.** Independent Variables Levels Used for BBD

Variables	Level		
	-1	0	1
Microwaving power ( $X_1$ )(W)	50	125	200
Liquid/solid ratio ( $X_2$ )(times)	5	12.5	20
Extraction time ( $X_3$ )(s)	30	75	120

**Table 5.** Box-Behnken Design (BBD) Matrices and Responses for Experimental Values

Run	Micro-waving power (W) $X_1$	Liquid/solid ratio (times) $X_2$	Extraction time (s) $X_3$	Total polyphenol content (GAE mg/g) $Y_1$	Ginsenoside Re (mg/g) $Y_2$	Ginsenoside Rb1 (mg/g) $Y_3$
1	0	0	0	5.541	8.618	15.000
2	0	0	0	5.689	8.568	15.069
3	1	0	1	5.880	17.706	11.961
4	1	0	-1	5.484	6.883	14.840
5	1	-1	0	4.058	7.347	14.452
6	0	-1	-1	3.970	3.687	11.859
7	1	1	0	6.104	15.352	16.493
8	0	-1	1	4.074	7.202	12.265
9	0	0	0	5.687	8.588	15.224
10	0	1	1	6.204	15.154	16.485
11	-1	1	0	6.553	7.019	18.670
12	0	0	0	5.729	8.559	15.157
13	0	1	-1	6.083	7.437	15.422
14	0	0	0	5.589	8.432	15.061
15	-1	-1	0	3.966	3.540	13.540
16	-1	0	1	5.534	6.485	15.065
17	-1	0	-1	5.003	4.709	13.553

각 변수에 대한 실험범위를 설정하여 각각을 -1, 0, +1과 같이 부호화한 것을 Table 4에 나타내었다. 독립변수에 영향을 받는 종속변수는, 총 폴리페놀 함량( $Y_1$ ), ginsenoside Re ( $Y_2$ ), Rb1 ( $Y_3$ )에 대한 분석값을 측정하여 회귀 분석에 사용하였다. BBD에 의해 설계된 추출조건에서 얻어진 종속변수의 결과는 Table 5와 같다.

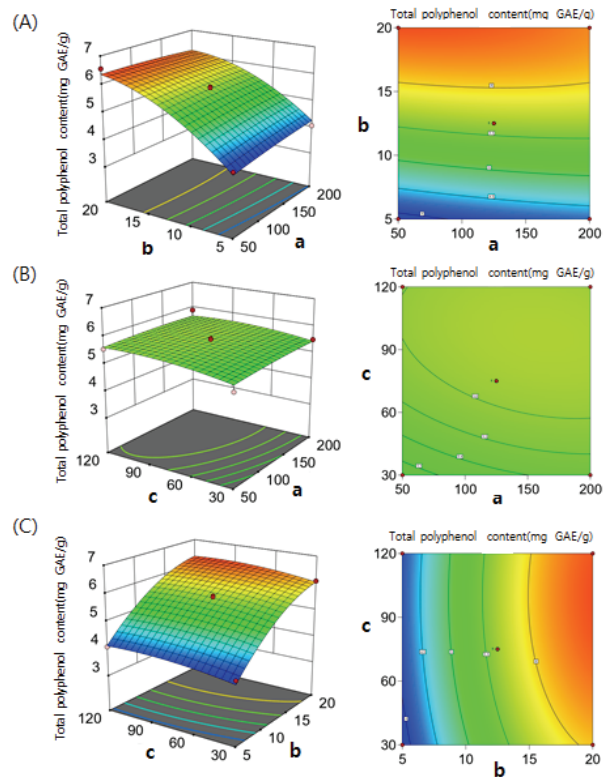
**Table 6.** Polynomial Equation Calculated by RSM Program for Extraction Conditions of Ginseng Berry Extract

Response	Second order polynomials	R <sup>2</sup>	F-value	p-value
Total polyphenol content	$Y_1 = 1.31644 + 0.00642X_1 + 0.37027X_2 + 0.01391X_3$ $- 0.00024X_1X_2 - 0.00001X_1X_3 + 0.00001X_2X_3$ $- 0.00001X_1^2 - 0.00773X_2^2 - 0.00006X_3^2$	0.9752	30.63	< 0.0001
Ginsenoside Re content	$Y_2 = 5.74203 - 0.04034X_1 + 0.08242X_2 - 0.07308X_3$ $+ 0.00201X_1X_2 + 0.00067X_1X_3 + 0.00311X_2X_3$ $+ 0.00003X_1^2 - 0.00724X_2^2 + 0.00011X_3^2$	0.9982	426.54	< 0.0001
Ginsenoside Rb1 content	$Y_3 = 5.57011 + 0.02457X_1 + 0.197772X_2 + 0.14703X_3$ $- 0.00137X_1X_2 - 0.00033X_1X_3 + 0.0004911X_2X_3$ $+ 0.00005X_1^2 + 0.00764X_2^2 - 0.00075X_3^2$	0.9766	32.46	< 0.0001

3.2.1. 총 폴리페놀 함량 최적 추출조건

총 폴리페놀 함량을 추출물 내 gallic acid 함량으로 나타내었으며 gallic acid (98%, Sigma Aldrich, USA)를 표준물질로 삼아서 1 g의 진생베리에 포함되어 있는 gallic acid equivalent (GAE)의 mg 수로 표시하였다. Box-Behnken 설계모형을 통해 각 종속변수와 독립변수의 관계를 보여주는 회귀방정식과 결정계수 R<sup>2</sup>, p-value, F-value 값을 Table 6에 나타내었다. 총 폴리페놀 함량은 quadratic 모델이 선정되었고, 회귀곡선 결정계수 R<sup>2</sup> 값은 0.9752으로 모델의 적합성이 인정되었다. p-value값은 < 0.0001로 실험결과가 적절함을 나타냈고 F-value 값은 30.63으로 높은 값으로 나타났다. Table 6의 Y<sub>2</sub> 식을 보면 용매/진생베리 비율 X<sub>2</sub> (0.37027), 추출시간 X<sub>3</sub> (0.01391), 마이크로파 출력량 X<sub>1</sub> (0.00642)순으로 계수가 크게 나와 X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>1</sub> 순서로 주효과 과도가 큰 것을 확인하였다.

회귀방정식을 이용하여 3차원 그래프와 그것을 위에서 바라본 등고선도를 Figure 2에 나타내었다. Figure 2A는 추출시간을 level 0 (75 s)로 고정하였을 때 마이크로파 출력량과 용매/진생베리 비율이 총 폴리페놀 함량에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 이 그래프에서는 용매/진생베리 비율의 값이 작아질수록 총 폴리페놀 함량이 감소하는 것을 나타낸다. Figure 2B는 용매/진생베리 비율을 level 0 (12.5)로 고정하였을 때 시간과 마이크로파 출력량이 총 폴리페놀 함량에 미치는 영향을 나타내었다. 이 그래프는 시간과 마이크로파 출력량이 총 폴리페놀 함량에 큰 영향을 주지 않는 것을 나타낸다. Figure 2C는 시간과 용매/진생베리 비율이 총 폴리페놀 함량에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 이 그래프에서는 용매/진생베리 비율의 값이 작아질수록 총 폴리페놀 함량이 감소하는 것을 나타내며 시간의 변화는 큰 영향을 나타내지 않았다. 종합해 보았을 때 총 폴리페놀 함량은 용매/진생베리 비율이 가장 큰 영향력



**Figure 2.** Response surface for total polyphenol content of extraction condition as a (A) liquid/solid ratio and microwaving power, (B) time and microwaving power, (C) time and liquid/solid ratio. a: microwaving power, b: liquid/solid ratio, c: extraction time.

을 가지며 시간과 마이크로파 출력량은 영향력이 거의 없다고 판단된다.

3.2.2. Ginsenoside Re 최적 추출조건

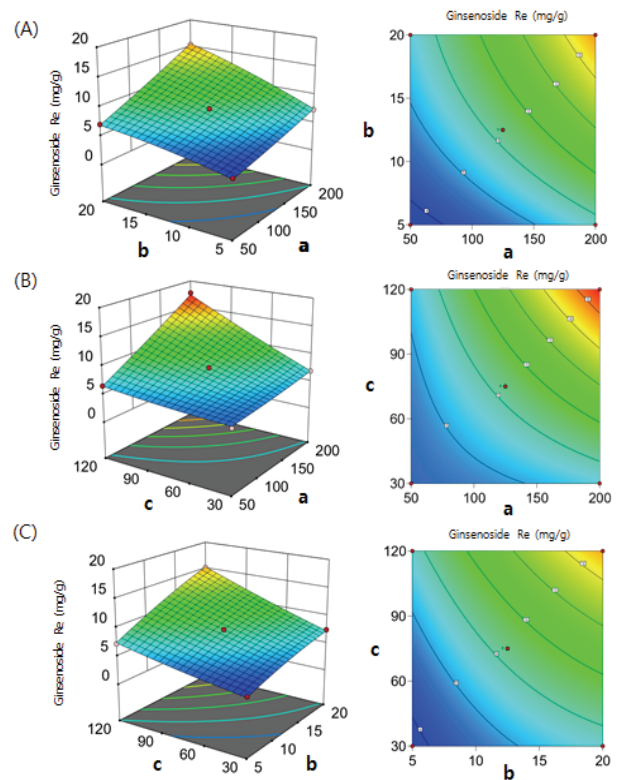
Ginsenoside Re의 함량은 1 g의 진생베리에 포함되어 있는 ginsenoside Re의 mg수로 나타내었다. Box-Behnken 설계

모델을 통해 각 종속변수와 독립변수의 관계를 보여주는 회귀방정식과 결정계수  $R^2$ ,  $p$ -value,  $F$ -value값을 Table 6에 나타내었다. Ginsenoside Re 함량은 quadratic 모델이 선정되었고, 회귀곡선 결정계수  $R^2$ 값은 0.9982으로 모델의 적합성이 인정되었다.  $p$ -value값은  $< 0.0001$ 로 실험결과가 적절함을 나타냈고  $F$ -value값은 426.54로 종속변수 중 높은 값을 나타냈다. Table 6의  $Y_2$ 식을 보면 용매/진생베리 비율  $X_2$  (0.08242), 추출시간  $X_3$  (0.07308), 마이크로파 출력량  $X_1$  (0.04034)순으로 계수가 크게나와  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_1$  순서로 주요 과도가 큰 것을 확인하였다.

회귀방정식을 이용하여 3차원 그래프와 그것을 위에서 바라본 등고선도를 Figure 3에 나타내었다. Figure 3A는 추출시간을 level 0 (75 s)로 고정하였을 때 마이크로파 출력량과 용매/진생베리 비율이 ginsenoside Re 함량에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 이 그래프에서는 용매/진생베리 비율의 값이 작아질수록 Re 함량이 감소하는 것을 나타내며 마이크로파 출력량이 증가할수록 Re 함량이 증가하는 것을 나타낸다. 용매/진생베리 비율과 마이크로파 출력량이 함께 증가하면 Re 함량이 급격하게 증가한다. Figure 3B는 용매/진생베리 비율을 level 0 (12.5)로 고정하였을 때 시간과 마이크로파 출력량이 ginsenoside Re 함량에 미치는 영향을 나타내었다. 이 그래프는 시간과 마이크로파 출력량의 증가에 따라 Re 함량이 서서히 증가하지만, 시간과 마이크로파 출력량의 상호작용에 의해 Re가 급격하게 증가하는 것을 나타낸다. Figure 3C는 시간과 용매/진생베리 비율이 ginsenoside Re 함량에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 이 그래프에서는 이 그래프는 시간과 용매/진생베리 비율 증가에 따라 Re 함량이 서서히 증가하지만, 시간과 용매/진생베리 비율의 상호작용에 의해 Re가 급격하게 증가하는 것을 나타낸다. 이상의 결과를 종합해 보았을 때 ginsenoside Re 함량의 증가는 각 독립변수의 교호작용에 큰 영향을 받는다는 것을 예측할 수 있다.

### 3.2.3. Ginsenoside Rb1 최적 추출조건

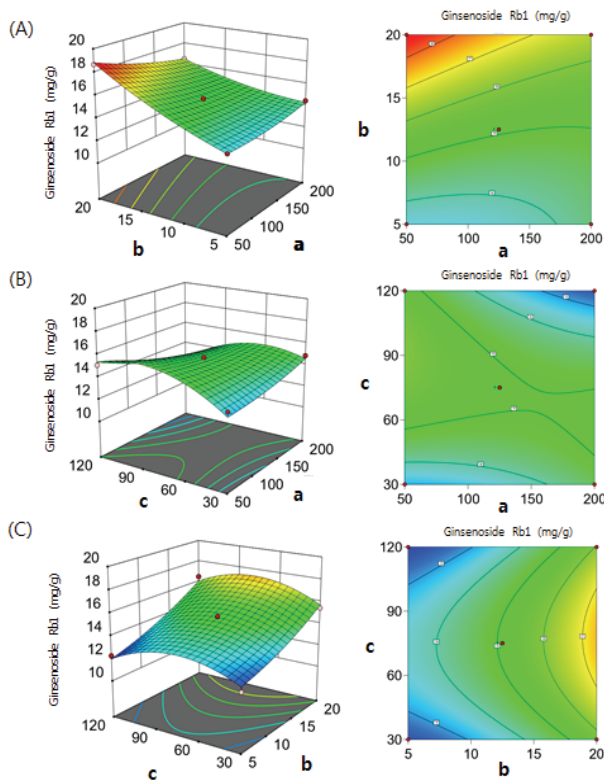
Ginsenoside Rb1의 함량은 1 g의 진생베리에 포함되어 있는 ginsenoside Rb1의 mg수로 나타내었다. Box-Behnken 설계모델을 통해 각 종속변수와 독립변수의 관계를 보여주는 회귀방정식과 결정계수  $R^2$ ,  $p$ -value,  $F$ -value을 Table 6에 나타내었다. Ginsenoside Rb1 함량은 quadratic 모델이 선정되었고, 회귀곡선 결정계수  $R^2$ 값은 0.9766으로 모델의 적합성이 인정되었다.  $p$ -value값은  $< 0.0001$ 로 실험결과가



**Figure 3.** Response surface for ginsenoside Re content of extraction condition as a (A) liquid/solid ratio and microwaving power, (B) time and microwaving power, (C) time and liquid/solid ratio. a: microwaving power, b: liquid/solid ratio, c: extraction time.

적절함을 나타냈고  $F$ -value은 32.46으로 높은 값을 나타냈다. Table 6의  $Y_2$ 식을 보면 용매/진생베리 비율  $X_2$  (0.197772), 추출시간  $X_3$  (0.14703), 마이크로파 출력량  $X_1$  (0.02457)순으로 계수가 크게나와  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_1$  순서로 주요 과도가 큰 것을 확인하였다.

회귀방정식을 이용하여 3 차원 그래프와 그것을 위에서 바라본 등고선도를 Figure 4에 나타내었다. Figure 4A는 추출시간을 level 0 (75 s)로 고정하였을 때 마이크로파 출력량과 용매/진생베리 비율이 ginsenoside Rb1 함량에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 이 그래프에서는 용매/진생베리 비율의 값이 작아질수록 Rb1 함량이 감소하는 것을 나타내며 마이크로파 출력량이 증가할수록 Rb1 함량이 약간 증가하는 것을 나타낸다. Figure 4B는 용매/진생베리 비율을 level 0 (12.5)로 고정하였을 때 시간과 마이크로파 출력량이 ginsenoside Rb1 함량에 미치는 영향을 나타내었다. 이 그래프는 시간이 증가함에 따라 Rb1 함량이 증가하다



**Figure 4.** Response surface for ginsenoside Rb1 content of extraction condition as a (A) liquid/solid ratio and microwaving power, (B) time and microwaving power, (C) time and liquid/solid ratio. a: microwaving power, b: liquid/solid ratio, c: extraction time.

가 감소하며, 마이크로파 출력량이 증가함에 따라 Rb1이 서서히 증가하는 것을 나타낸다. Figure 4C는 시간과 용매/진생베리 비율이 ginsenoside Rb1 함량에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 이 그래프는 시간이 증가함에 따라 Rb1 함량이 증가하다가 감소하며, 용매/진생베리 비율이 증가함에 따라 Rb1이 서서히 증가하는 것을 나타낸다. Figure 4에서 확인된 결과를 종합해 보았을 때 ginsenoside Rb1 함량에서 시간에 대한 최적의 조건이 중요하게 여겨짐을 예측할 수 있다.

### 3.2.4. 최적 추출조건 예측

각 분석 항목의 추출 조건으로 얻은 결과를 토대로 최적의 추출 조건 설정과 예상값을 Table 8에 나타내었다. 그 결과 마이크로파 추출물의 총 폴리페놀, ginsenoside Re, Rb1 함량을 최대화할 수 있는 마이크로파 추출 조건은 마이크로파 출력량은 200 W, 용매/진생베리 비율은 20 times, 추출 시간은 90 s로 나타났다. 이 추출 조건에서 총 폴리페놀 함량은 6.23 mg GAE/g, ginsenoside Re는 17.69 mg/g, ginsenoside Rb1은 16.01 mg/g으로 예측되었다. 반응표면분석법에 의해 예측된 조건으로 실험을 수행한 결과 총 폴리페놀 함량  $6.33 \pm 0.15$  mg GAE/g, ginsenoside Re  $17.79 \pm 0.61$  mg/g, ginsenoside Rb1  $15.59 \pm 0.40$  mg/g으로 95% 신뢰구간에 속하여 재연성이 검증되었다.

## 4. 결론

본 연구에서는 진생베리를 여러 조건으로 추출하여 각 추출물의 활성 성분 함량과 항산화 효능, 미백 효능을 비교하였을 때 용매의 환경친화성과 추출시간에 대한 효율에서 증류수를 이용한 마이크로파 추출이 가장 효율적이었다. 최적 추출조건에 증류수와 마이크로파 추출법을 적용하였고, 반응표면분석법을 이용하여 활성 성분 및 항산화 활성에 대한 최적의 추출조건을 설정하기 위해 마이크로파 출력량(50 ~ 200 W,  $X_1$ ), 용매와 진생베리의 비율(5 ~ 20 times,  $X_2$ ), 추출시간(30 ~ 120 s,  $X_3$ )을 독립변수로 선정하였다. Box-Behnken 모델(BBD)에서 선정된 17가지 조건으로 진생베리를 추출한 뒤 총 폴리페놀, ginsenoside Re, ginsenoside Rb1 함량을 측정하였다. 반응표면분석법을 통해 진생베리의 활성 성분과 항산화 활성에 대한 최적 추출조건은 마이크로파 출력량 200 W, 용매와 진생베리 비율 20 times, 추출 시간 90 s로 분석되었으며, 이 조건에서 예측된 값에 대하여 실험값이 95% 신뢰구간 내에서 재연성이 확인되었다. 따라서 본 연구는 진생베리의 마이크로파 추출을 활용하는 많은 연구들의 기초로 참고 될 수 있을 것이다.

**Table 8.** Comparison Between Predicted and Observed Values of Response Variables within the Range of the Optimum Condition

Response	Predicted conditions	Predicted value	Experimental value
Total polyphenol content		6.23 (mg GAE/g)	$6.33 \pm 0.15$ (mg GAE/g)
Ginsenoside Re	200 W, 20 times, 90 s	17.69 (mg/g)	$17.79 \pm 0.61$ (mg/g)
Ginsenoside Rb1		16.01 (mg/g)	$15.59 \pm 0.40$ (mg/g)



## Acknowledgement

이 논문은 충북대학교 국립대학육성사업(2019)지원 및 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No.2019R1F1A1058645)

## Reference

1. J. W. Lee, Research direction for value enhancement of korean ginseng and herbal crops, *Korean Society For Horticultural Science*, **5**, 28 (2017).
2. D. D. Kitts, A. N. Wijewickreme, and C. Hu, Antioxidant properties of a north american ginseng extract, *Mol. Cell. Biochem.*, **203**(1-2), 1 (2000).
3. R. M. Corbit, J. F. Ferreira, S. D. Ebbs, and L. L. Murphy, Simplified extraction of ginsenosides from American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) for highperformance liquid chromatography-ultraviolet analysis, *J. Agric. Food Chem.*, **53**(26), 9867 (2005).
4. T. K. Yun, *Panax ginseng*-a non-organ-specific cancer preventive?, *Lancet Oncol.*, **2**(1), 49 (2001).
5. D. H. Jeong, M. Irfan, S. D. Kim, S. Kim, J. H. Oh, C. K. Park, H. K. Kim and M. H. Rhee, Ginsenoside Rg3-enriched red ginseng extract inhibits platelet activation and *in vivo* thrombus formation, *J Ginseng Res.*, **41**(4), 548 (2017)
6. Y. H. Jie, S. Cammisuli, and M. Baggiolini, Immunomodulatory effects of *Panax ginseng* C. A. Meyer in the mouse, *Agents and Actions*, **15**(3-4), 386 (1984).
7. Y. C. Kim, S. R. Kim, G. J. Markelonis, and T. H. Oh, Ginsenosides Rb1 and Rg3 protect cultured rat cortical cells from glutamate-induced neurodegeneration, *J. Neurosci. Res.*, **53**(4), 426 (1998).
8. C. N. Joo, J. D. Koo, D. S. Kim, and S. J. Lee, Biochemical studies of ginseng saponins. XI. The effects of ginseng saponins on alcohol dehydrogenase. *Hanguk Saenghwa Hakhoe Chi*, **10**, 109 (1977).
9. T. Yokozawa, T. Kobayashi, H. Oura, and Y. Kawashima, Studies on the mechanism of the hypoglycemic activity of ginsenoside-Rb2 in streptozotocin-diabetic rats. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**(2), 869 (1985).
10. W. Wang, Y. Zhao, E. R. Rayburn, D. L. Hill, H. Wang, and R. Zhang, In vitro anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated from fruits of *Panax ginseng*. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **59**(5), 589 (2007).
11. J. D. Park, Recent studies on the chemical constituents of Korean ginseng (*Panax ginseng* CA Meyer). *Korean J. Ginseng Sci.*, **20**(4), 389 (1996).
12. S. Shibata, O. Tanaka, T. Ando, M. Sado, S. Tsushima, and T. Ohsawa, Chemical studies on oriental plant drugs. XIV. Protopanaxadiol, a genuine saponin of ginseng saponins. *Chem. Pharm. Bull.*, **14**(6), 595 (1966).
13. L. Dey, J. T. Xie, A. Wang, J. Wu, S. A. Maleckar and C. Yuan, Antihyperglycemic effects of ginseng: comparison between root and berry, *Phytomedicine*, **10**(6-7), 600 (2003).
14. S. K. Ko, H. M. Bae, O. S. Cho, B. O. Im, S. H. Chung, and B. Y. Lee, Analysis of ginsenoside composition of ginseng berry and seed, *Food Sci. Biotechnol.*, **17**(6), 1379 (2008).
15. D. A. Esquivel-Hernández, I. P. Ibarra-Garza, J. Rodríguez-Rodríguez, S. P. Cuéllar-Bermúdez, M. D. J. Rostro-Alanis, G. S. Alemán-Nava, and R. Parra-Saldívar, Green extraction technologies for high-value metabolites from algae: a review. *Biofuel Bioprod Biorefin*, **11**(1), 215 (2017).
16. G. S. Kim, D. Y. Hyun, Y. O. Kim, S. W. Lee, Y. C. Kim, S. E. Lee, Y. D. Son, M. J. Lee, C. B. Park, H. K. Park, S. W. Cha, and K. S. Song, Extraction and preprocessing methods for ginsenosides analysis of *Panax ginseng* C. A. Mayer, *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **16**(6) 446 (2008).
17. M. R. González-Centeno, K. Knoerzer, H. Sabarez, S. Simal, C. Rosselló, and A. Femenia, Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.)—a response surface approach, *Ultrason Sonochem*, **21**(6), 2176 (2014).
18. X. Pan, G. Niu, and H. Liu, Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from

- green tea leaves, *Chem Eng Process*, **42**(2), 129 (2003).
19. R. G. Diagne, G. D. Foster, and S. U Khan, Comparison of soxhlet and microwave-assisted extractions for the determination of fenitrothion residues in beans, *J. Agric. Food Chem.*, **50**(11), 3204 (2002).
  20. D. H. Park, S. T. Lee, D. Y. Jun, J. Y. Lee, M. H. Woo, K. Y. Kim, M. C. Seo, J. Y. Ko, K. S. Woo, T. W. Jung, D. Y. Kwak, M. H. Nam, and Y. H. Kim, Comparative evaluation of antioxidant activities of ethanol extracts and their solvent fractions obtained from selected miscellaneous cereal grain, *Life Sci.*, **24**(1), 26 (2014).
  21. S. Benvenuti, F. Pellati, M. Melegari and D. Bertelli, Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of rubus, ribes and aronia, *J. Food Sci.*, **69**(3), 164 (2004).
  22. H. W. Kim, H. S. Shin, S. K. Han and S. E. Oh, Response surface optimization of substrates for thermophilic anaerobic codigestion of sewage sludge and food waste, *Journal of the Air & Waste Management Association*, **57**(3), 309 (2007).
  23. D. H. Shin, S. Heo, C. L. Cheng, T. H. Kim and J. W. Jung, Performance /noise optimization of centrifugal fan using response surface method, *The Korean Society of Mechanical Engineering*, **41**(3), 165 (2017).