반응표면분석법을 이용한 고려엉겅퀴로부터 항산화 성분의 초음파 추출 조건 최적화

김혜린 · 홍지우 · 전성진 · 김화영 · 김진우
선문대학교 식품과학과

Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidant from *Cirsium setidens* Using Response Surface Methodology

Hye Lin Kim, Ji Woo Hong, Seong Jin Jeon, Hwa Yeong Kim, and Jin Woo Kim

Department of Food Science, Sunmoon University

ABSTRACT This study was conducted to optimize the ultrasound-assisted extraction (UAE) conditions for maximizing the responses, including total phenolic compound (TPC), total flavonoid compound (TFC), and radical scavenging activity (RSA) from *Cirsium setidens* using a response surface methodology (RSM). The following three variables were used to optimize the UAE process using the central composite method: extraction time (X_1 : 5.0~55.0 min), extraction temperature (X_2 : 26.0~94.0°C), and ethanol concentration (X_3 : 0.0~99.5%). The maximum yield of TPC (5.21 mg GAE/g DM), TFC (1.00 mg QE/g DM) and radical scavenging activity (86.7%) were obtained under the optimal conditions of 34.5 min, 63.7°C, and 62.2%. No significant differences were observed between the predicted and experimental values, indicating the suitability of the fitted model and the successful application of CCD. Based on these results, the antioxidant activity of the *Cirsium setidens* extract can be increased by optimizing the UAE conditions, and the extract can be used as a material for cosmetics, food, and medicine.

Key words: *Cirsium setidens*, optimization, ultrasound-assisted extraction, central composite design model, antioxidant activity

서 론

모든 생명체는 대사과정 중 산소를 이용하여 생체 내 필요한 에너지를 만드는 과정에서 일부 산소가 superoxide anion radical(O_2^-), hydrogen peroxide(H_2O_2), hydroxyl radical($OH\cdot$) 및 peroxy radical($ROO\cdot$)과 같은 활성산소종(reactive oxygen species)으로 전환되어(Lee 등, 2018b) DNA 재생능력 감소와 세포막 단백질 손상에 의한 노화 및 질병이 발생하게 된다(Yoon과 Han, 2014). 활성산소는 자외선 노출, 비만, 흡연 및 스트레스에 의해 과량 생성되는 것으로 알려져 있으며, 이때 신체의 항산화 시스템이 파괴되면서 노화가 촉진되는 물론 각종 만성질환의 원인이 된다(Lee 등, 2016; Hong 등, 2016). 만성질환 발생은 체내에서 활성산소의 양을 조절하는 superoxide dismutase, 카탈라

아제 및 글루타치온 과산화효소 등의 항산화 효소의 방어시스템에 의해 지연 및 예방되고 있지만, 과도한 활성산소가 생성될 경우 산화적 스트레스의 증가로 방어시스템의 불균형이 발생하여 체내 세포 손상에 의한 노화 촉진, 고혈압 및 협심증 등의 심혈관계 질환이 발병하게 된다(Kim과 Lee, 2017; Kang 등, 2012). 노화를 방지하고 산화적 스트레스와 관련된 각종 만성질환 개선을 위해서는 신체 항산화 체계의 균형 유지가 필수적인데, 과도한 스트레스에 노출된 현대인에게는 섭취를 통해 항산화력을 증대시킬 수 있는 보다 효과적인 식이성 항산화제의 필요성이 높아지고 있는 추세이다(Yong 등, 2019).

합성 항산화제인 butylated hydroxytoluene, troxal-C와 butylated hydroxyanisole 등은 활성산소에 의한 산화기작을 차단 및 지연시키는 효과가 인정되었으나, 과량 사용시 독성 및 발암성을 포함한 안전성 문제로 인해 부작용이 없고 항산화능이 우수한 천연 항산화제의 개발이 요구되고 있다(Yun 등, 2018). 대표적인 천연 항산화제인 폴리페놀은 식물의 잎과 뿌리 등에 함유된 천연색소 성분으로 스트레스와 자외선 등에 의해 발생한 활성산소의 전자수용체 역할을 하여 생체막 구성물질의 산화를 억제함으로써 막 유동성 저하, 효소 및 수용체의 활성 저해, 막 단백질의 손상에 의한

Received 10 Dec 2020; Revised 1 Feb 2021; Accepted 2 Feb 2021
Corresponding author: Jin Woo Kim, Department of Food Science, Sunmoon University, 70, Sunmoon-ro 221beon-gil, Tangjeong-myeon, Asan-si, Chungnam 31460, Korea,
E-mail: kimjw1028@sunmoon.ac.kr

Author information: Hye Lin Kim (Student), Ji Woo Hong (Student), Seong Jin Jeon (Student), Hwa Yeong Kim (Student), Jin Woo Kim (Professor)

세포 불활성화 등을 방지한다고 알려져 있다(Jung 등, 2018). 폴리페놀과 같이 대부분이 색을 띠고 있는 천연 항산화제는 최근 플라보노이드, 안토시아닌, 타닌, 커큐민, 카테킨과 라이코펜 등 26종이 천연 색소로 미국에서 사용허가를 받았으며 EU에서는 40여 종의 색소가 첨가제로 사용되고 있다(Kim 등, 2016).

영경귀 속(*Cirsium*)의 고려영경귀(*Cirsium setidens*)는 우리나라에서만 자생하는 국화과의 식물로, 잎과 줄기에 단백질, 탄수화물, 칼슘, 비타민 A 및 폴리페놀 등이 함유된 생리활성 기능이 높은 약용식물이다(Lee 등, 2006). 영경귀의 지하부(뿌리) 또는 지상부는 대개라 칭하며 지상부는 개화기인 5~6월에 채취하고 뿌리는 가을철에 채취해 건조시켜 민간에서 널리 사용됐으며, 최근 한방 연구에서 열수 또는 알코올로 추출한 영경귀는 토혈, 혈뇨, 대하, 간염과 고혈압 등에 효과가 있다고 알려져 있다(Mok 등, 2011). 또한 영경귀 속 식물에 함유된 아피제닌, 루테올린과 미리세틴을 포함한 70여 종의 플라보노이드는 항염증, 항암, 항균과 면역증진 등에 효과가 있다(Park 등, 2019). 이에 따라 영경귀 속 식물을 식품 소재로 활용하려는 다양한 시도가 진행되고 있으나, 고려영경귀로부터 항산화 활성 등 생리활성에 관한 연구와 생산 비용 절감을 위한 추출 공정 개발은 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구는 고려영경귀로부터 항산화 성분 추출 최적화를 위해 중심합성계획법을 이용하여 초음파 추출 공정 최적화를 진행하였다. 종속변수인 총 폴리페놀, 총 플라보노이드와 라디칼 소거능의 최대화를 위해 독립변수로 추출 시간, 추출 온도 및 에탄올 농도를 설정하여 최적 추출 조건을 확립하고 추출비용 감소와 시간 단축을 통해 상업화에 적합한 추출 공정을 제안함과 동시에 항산화 성분을 함유한 고려영경귀에 대한 가치와 유용성에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

시료 및 시약

본 실험은 2020년 강원도 홍천에서 재배한 분말 제품을 농업회사법인 푸른산(주)(Seoul, Korea)에서 구매해 사용하였다. 고려영경귀 분말은 실온 보관 후 열풍건조기(FC 49, Lab House, Pocheon, Korea)에서 60°C로 12시간 건조시켜 밀봉비닐백에 보관하여 실험에 사용하였다. 항산화능 분석에 필요한 2 N Folin-Ciocalteu's phenol reagent, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), quercetin과 gallic acid는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여

사용하였고, sodium carbonate anhydrous(Na_2CO_3)를 포함한 이외의 시약은 덕산약품공업(주)(Ansan, Korea)의 순도 99.5% 이상의 특급시약을 사용하였다.

초음파 추출법

항산화 성분 추출을 위한 추출용매로 증류수와 99.5% 에탄올을 추출 조건별로 혼합하여 사용하였다. 밀폐형 유리 튜브(PYREX-1636, Scilab., Seoul, Korea)에 고려영경귀 분말 1 g과 추출용매 10 mL를 혼합하여 초음파 추출을 진행하였다. 초음파 추출기(SD-250H, Mujigae Co., Seoul, Korea)를 사용하였으며 수용상에서 초음파(40 KHz, 150 W)를 이용하여 추출 온도, 시간과 에탄올 농도를 달리한 조건에 따라 추출을 진행하였다. 추출 후 4°C, 5,000 rpm에서 원심분리하여 회수한 상등액을 총 폴리페놀, 총 플라보노이드와 라디칼 소거능의 측정에 사용하였다.

추출 조건 최적화를 위한 실험계획

고려영경귀의 초음파 추출 조건 최적화를 위해 반응표면 분석법(response surface methodology, RSM)을 실시하였고 실험 조건은 예비실험 결과를 토대로 중심합성계획법(central composite design, CCD)을 적용하여 설정하였다. 초음파 추출에 영향을 미치는 공정상의 주요 독립변수(X_n)는 추출 시간(X_1 , 5.0~55.0분), 추출 온도(X_2 , 26.0~94.0°C)와 에탄올 농도(X_3 , 0.0~99.5%)로 하였고, 독립변수에 대한 실험 범위는 -1.68, -1, 0, 1, 1.68 다섯 단계로 부호화하였다(Table 1). 이후 CCD로 중심점 수를 3개로 설정하여 도출된 17개의 실험 조건에 따라 실험을 진행하였고 종속변수로 총 폴리페놀, 총 플라보노이드와 라디칼 소거능을 선정하였다.

총 폴리페놀 측정

페놀성 물질이 인몰리브덴산과 반응하여 청색을 나타내는 원리를 적용한 Folin-Denis법을 일부 변형하여 총 폴리페놀(total phenolic compound, TPC) 함량을 측정하였다(Ahn 등, 2012). 조건별로 추출한 시료 0.14 mL에 2 N Folin-Ciocalteu's phenol reagent 시약을 0.7 mL 가하고 8분간 반응시킨 후, 7.5% Na_2CO_3 0.56 mL를 첨가하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 분광광도계(Optizen 2120 UV, Mecasys Co., Daejeon, Korea)로 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 발색법을 이용한 정량을 위해 gallic acid를 표준물질로 사용하여 농도별 표준용액을 제조한 후, 표준검량선($Y = 43.744X + 2.253$, $R^2 = 0.9884$)을 작성하여 추출

Table 1. Independent variables and their coded and actual levels for central composited design

X_i	Independent variable	Coded levels				
		-1.68	-1	0	+1	+1.68
X_1	Extraction time (min)	5.0	15.0	30.0	45.0	55.0
X_2	Extraction temperature (°C)	26.0	40.0	60.0	80.0	94.0
X_3	Ethanol concentration (%)	0.0	20.0	50.0	80.0	99.5

물의 TPC를 mg GAE(gallic acid equivalent)/g DM(dry matter)으로 나타내었다.

총 플라보노이드 측정

염화알루미늄 발색법을 일부 변경하여 총 플라보노이드(total flavonoid compound, TFC) 함량을 측정하였다(Min 등, 2017). 고려엉겅퀴 추출물 0.1 mL에 증류수 0.56 mL와 99.5% 에탄올 1.3 mL를 가하고 1 M potassium acetate와 10% aluminium chloride를 각 0.02 mL 첨가해 상온에서 30분간 반응을 수행하여 발색을 유도하고 분광광도계(Optizen 2120UV, Mecasys Co.)를 사용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 정량을 위해 표준물질인 quercetin을 농도별로 제조해 사용했으며 표준검량선($Y=132.47X+2.253$, $R^2=0.9995$)을 도출하여 추출물의 TPC를 mg QE(quercetin equivalent)/g DM으로 나타내었다.

라디칼 소거능 측정

보라색의 DPPH는 산화된 형태의 자유라디칼로 페놀 화합물과 결합하는 경우 비가역적으로 결합하는 전자에 비례하여 diphenylpicrylhydrazine(nonradical)으로 탈색되는데, 이 기작은 다양한 천연소재의 항산화능 판단에 널리 이용되고 있으며(Eun 등, 2016) Brand-Williams 등의 방법을 일부 변형하여 사용하였다(Lee와 Kim, 2020). 추출물의 라디칼 소거능(radical scavenging activity, RSA) 측정은 교반기(RH basic 2, IKA-Werke, Staufen, Germany)를 이용하여 0.1 mM의 DPPH를 메탄올에 희석하여 흡광도가 1.0이 되도록 한 후 사용하였다. 실험은 시료를 계열 희석하여 희석액 0.25 mL에 0.1 mM DPPH 1.25 mL를 가하여 실온의 암실 조건에서 20분간 반응시켰다. 반응 종료 후, 분광광도계를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며 아래의 수식을 이용해 RSA를 산출하였다.

$$RSA(\%) = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

A: 시료 추출물 첨가구의 흡광도

B: 시료 추출물 무첨가구의 흡광도

통계처리

모든 실험은 3회 반복 실시하였고 조음과 추출 조건 간의 상호작용과 경향을 알아보기 위해 Design Expert® 8.0 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA)을 이용하였다. 반응표면분석법은 독립변수로 추출 시간(X_1 , 5.0~55.0분), 추출 온도(X_2 , 26.0~94.0°C)와 에탄올 농도(X_3 , 0.0~99.5%)를 설정하였고, 종속변수는 TPC, TFC와 RSA로 하였다. 독립변수와 종속변수에 대한 2차 회귀방정식은 아래와 같이 도출하였고 분산분석 및 회귀분석을 실시하여 유의성이 인정되는 변수만을 채택하였다. 또한 조음과 추출 조건 최적화를 위해 일변수 최적화 곡선, 3차원 반응표면곡선과 변수 간의 교호작용을 확인하였으며, 독립변수의 변화에 따른 종

속변수의 반응표면을 분석하였다.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_1^2X_1^2 + b_1^3X_1X_3 + b_2^2X_2^2 + b_1^1X_1^2 + b_2^2X_2^2 + b_3^3X_3^2 \quad (\text{Eq. 2})$$

Y=종속 변수, X_1 =추출 시간(분), X_2 =추출 온도(°C)

X_3 =에탄올 농도(%), b_0 =절편, b_n =회귀계수

결과 및 고찰

TPC 최적 추출 조건 탐색

폴리페놀은 장기간 섭취할 경우 심혈관 질환 및 신경 퇴행성 질환 발병에 대한 예방 효과를 나타내어 인체에 유익한 천연 항산화 성분으로 주목받고 있다(Lee와 Lee, 2018). 식물의 폴리페놀 추출은 열수, 가압, 조음과 및 Soxhlet 추출법 등이 주로 사용되는데(Park과 Hong, 2014), 그중 조음과 추출법(ultrasonic-assisted extraction, UAE)은 열에 의한 폴리페놀의 변성과 파괴가 적어 추출 효율 증가, 열변성 방지와 용매 절약 등의 효과가 있음이 알려진 추출법으로 본 실험에 폴리페놀 추출을 위해 적용하였다(Park 등, 2017). 고려엉겅퀴로부터 폴리페놀의 효과적인 추출 조건 도출을 위해 RSM 중 하나인 CCD를 적용하여 17개 조건을 설정하였다(Table 2). 각 조건에 따른 TPC 수율은 2.78~5.48 mg GAE/g DM으로 나타났으며 94.0°C에서 30.0분간 50.0% 에탄올로 추출한 조건에서 5.48 mg GAE/g DM의 최댓값이 확인되었다(Run#12). 17개 추출 조건과 실험값을 바탕으로 도출된 2차 회귀방정식의 적합성 평가는 최적화 조건 예측을 위한 필수적인 요소이다. 각 독립변수가 종속변수에 미치는 영향을 판단하는 주요 도구로 P 값이 0.05보다 작을수록 높은 통계학적 의미가 있는 것으로 판단하는데(Lee 등, 2018a), 도출된 2차 회귀함수의 일차항에서 추출 온도(X_2)와 에탄올 농도(X_3)는 각각 $P<0.0388$ 과 $P<0.0076$ 으로 유의적인 결과를 보였으며, 이차항에서의 에탄올 농도는 $P<0.0062$ 로 P 값이 0.05 이하로 통계학적으로 유의성이 인정되었다(Table 3). 또한, 2차 회귀방정식의 적합성을 나타내는 R^2 값은 0.8370으로 83% 이상의 높은 신뢰수준에서 예측값에 대한 실험값의 적합성이 확인되었다. 한 가지 독립변수에 따른 종속변수의 변화는 일변수 최적화 곡선으로 시각화하여 확인했으며 한 가지 독립변수의 변화에 따른 TPC 수율의 변화를 나타내었다(Fig. 1). 독립변수가 TPC 수율에 미치는 영향은 에탄올 농도(X_3) > 추출 온도(X_2) > 추출 시간(X_1)으로 확인되었는데, 이는 앞선 ANOVA에서도 에탄올 농도의 영향이 가장 유의하다는 결과를 재확인하는 것으로 TPC의 최적 추출 공정은 에탄올 농도를 우선으로 최적화함이 보다 효율적일 것으로 사료된다. 두 개의 독립변수 간 상호작용에 따른 TPC의 변량 확인을 위하여 각 변수 간의 상관관계를 3차원 반응표면곡선으로 시각화하였다. Fig. 2A에서는 추출 온도의 증가에 따라 TPC 수율이 비례하여 증가하다 83.7°C 이후 감소하는 경향을 확인할 수 있었고 추출 시간은 수율에 큰 영향을 주지 않음이 확인되었지만, 높은

Table 2. The independent variables experimental data to central composite design of total phenolic compound (TPC), total flavonoid compound (TFC), and radical scavenging activity (RSA)

Run No	Extraction condition ¹⁾			TPC (mg GAE/g DM) ²⁾	TFC (mg QE/g DM) ³⁾	RSA (%)
	X ₁	X ₂	X ₃			
1	15.0	40.0	20.0	2.78	0.18	38.4
2	45.0	40.0	20.0	3.02	0.23	62.5
3	15.0	80.0	20.0	3.63	0.27	39.1
4	45.0	80.0	20.0	3.78	0.25	67.1
5	15.0	40.0	80.0	4.68	0.76	64.7
6	45.0	40.0	80.0	4.82	0.75	74.9
7	15.0	80.0	80.0	5.21	0.61	67.1
8	45.0	80.0	80.0	5.14	0.73	73.8
9	5.0	60.0	50.0	4.98	0.52	51.9
10	55.0	60.0	50.0	5.04	0.51	94.8
11	30.0	26.0	50.0	3.97	0.40	90.5
12	30.0	94.0	50.0	5.48	0.42	83.3
13	30.0	60.0	0.0	3.26	0.35	27.6
14	30.0	60.0	99.5	3.62	1.18	25.7
15	30.0	60.0	50.0	4.77	0.92	85.8
16	30.0	60.0	50.0	5.16	0.94	86.3
17	30.0	60.0	50.0	5.13	0.93	86.0

¹⁾X₁: extraction time (min), X₂: extraction temperature (°C), X₃: ethanol concentration (%).

²⁾mg GAE/g DM: mg GAE (gallic acid equivalent)/g DM (dry matter).

³⁾mg QE/g DM: mg QE (quercetin equivalent)/g DM (dry matter).

Table 3. Quadratic regression model by central composite design for the optimization of ultrasonic-assisted extraction process variables of *Cirsium setidens* extraction conditions

Response	Quadratic regression model ¹⁾	R ² ²⁾	P-value
TPC (mg GAE/g DM)	$Y_{TPC} = -1.16741 + 0.028593 \cdot X_1 + 0.075849 \cdot X_2 + 0.098579 \cdot X_3 - 1.25 \times 10^{-4} \cdot X_1 X_2 - 8.89 \times 10^{-5} \cdot X_1 X_3 - 1.58 \times 10^{-4} \cdot X_2 X_3 - 2.32 \times 10^{-4} \cdot X_1^2 - 3.82 \times 10^{-4} \cdot X_2^2 - 6.85 \times 10^{-4} \cdot X_3^2$	0.8370	0.0407
TFC (mg QE/g DM)	$Y_{TFC} = +0.93 + 9.02 \times 10^{-3} \cdot X_1 - 1.93 \times 10^{-3} \cdot X_2 + 0.24 \cdot X_3 + 0.75 \times 10^{-3} \cdot X_1 X_2 + 0.1 \times 10^{-3} \cdot X_1 X_3 - 0.035 \cdot X_2 X_3 - 0.16 \cdot X_1^2 - 0.20 \cdot X_2^2 - 0.074 \cdot X_3^2$	0.9843	<0.0001
RSA (%)	$Y_{RSA} = +86.03 + 10.34 \cdot X_1 - 0.40 \cdot X_2 + 5.14 \cdot X_3 + 0.050 \cdot X_1 X_2 - 4.40 \cdot X_1 X_3 - 0.50 \cdot X_2 X_3 - 4.46 \cdot X_1^2 + 0.33 \cdot X_2^2 - 20.98 \cdot X_3^2$	0.9483	0.0010

¹⁾X₁: extraction time (min), X₂: extraction temperature (°C), X₃: ethanol concentration (%), Y_n: the predicted response.

²⁾R²: coefficient of determination.

Fig. 1. Perturbation plot of the total phenolic compound affected by the three independent variable extraction time, extraction temperature, and ethanol concentration. X₁=extraction time (min), X₂=extraction temperature (°C), X₃=ethanol concentration (%).

온도에서 추출 시간이 증가함에 따라 TPC가 감소하는 경향을 보였다. Fig. 2B와 2C에서는 에탄올 62.7%일 때 TPC 수율이 최대로 나타나는 반응표면을 확인하였고, 앞서 확인된 바와 같이 TPC는 추출 온도와 에탄올 농도에 유의적인 영향을 받아 수율이 증가하는 경향이 있으며 추출 시간에는 크게 영향을 받지 않는 것을 확인하였다. 이는 식물체의 TPC 추출 시 추출 온도가 증가하면 세포벽의 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스 또는 단백질과 결합되어 있는 페놀성 물질이 가열에 의해 유리형 페놀 형태로 변화되어 TPC가 증가할 수 있으나(Kwak 등, 2013), 높은 추출 온도 조건에서 추출 시간이 증가하는 경우에는 타닌 등의 폴리페놀 물질이 장시간의 열처리에 분해 또는 중합되어 불용화되므로 추출이 감소한 것으로 해석된다(Park 등, 2013).

결과적으로 Table 2에 나타난 것과 같이 고려엉겅퀴의 TPC 최적 추출 공정에 있어 50.0% 에탄올 조건에서 30.0분

Fig. 2. 3-D response surface plots for total phenolic compound of the *Cirsium setidens* at constant value of (A) extraction time (min), (B) extraction temperature (°C), and (C) ethanol concentration (%).

동안 94.0°C로 추출 시 5.48 mg GAE/g DM의 TPC 추출이 가능함을 확인하였다. 이 결과는 Lee 등(2014)이 고려엉겅퀴로부터 TPC 추출에 있어 에탄올 농도의 영향이 크며 최적 추출 조건을 추출 온도 81.0°C와 에탄올 52.8%로 보고한 연구 결과와도 유사한 경향을 나타내어, 고려엉겅퀴의 TPC 최적 추출 공정은 에탄올에 대한 최적화를 우선으로 진행할 필요가 있으며 50.0~52.8%의 에탄올로 81.0~94.0°C의 온도에서 최대 TPC의 획득이 가능할 것으로 사료된다.

TFC 최적 추출 조건 탐색

플라보노이드는 식물의 꽃, 잎과 줄기 등에 존재하는 노란색 계열의 항산화 성분으로서 항암과 항염증 효과가 있어 건강 기능 식품 소재로 널리 이용되고 있다(Choi 등, 2012). 고려엉겅퀴 UAE에 있어 17개 조건별 TFC 수율을 측정했을 때, 99.5%의 에탄올로 60.0°C에서 30.0분간 추출을 수행한 조건에서 TFC 1.18 mg QE/g DM의 최댓값이 확인되었다(Table 2). 각 실험 조건에 따른 실험값의 상관관계를 기반으로 2차 회귀함수를 도출하고 TFC 최적 추출 조건 예측을 위해 ANOVA로 적합성과 유의성을 확인하였다(Table 3). R^2 값은 2차 회귀방정식을 이용한 예측의 정확도를 평가하는 지표로, 1에 가까울수록 독립변수와 종속변수 간의 높은 합치도를 의미한다(Yoon 등, 2014; Seo 등, 2014). TFC 예측을 위한 2차 회귀방정식의 R^2 값은 0.9843으로 98% 이상의 신뢰수준에서 적합성이 인정되었다. P 값은 0.0001 이하로 통계적 독립변수들의 유의성이 입증되어 도출된 2차 회귀방정식이 TFC 수율 예측에 적합한 모델이라고 판단할 수 있었다(Table 3). 2차 회귀방정식에 미치는 각 독립변수의

영향을 평가했을 때 세 개의 독립변수 중 에탄올 농도(X_3)의 P 값은 일차항에서 $P < 0.0001$, 이차항에서 $P < 0.0033$ 으로 나타나 유의성이 인정되었으며, 추출 시간(X_1)과 추출 온도(X_2)의 이차항의 P 값이 $P < 0.0001$ 로 통계적 유의성이 확인되었다. 한 개의 독립변수가 종속변수에 미치는 영향을 확인하기 위해 Fig. 3과 같이 독립변수의 개별적인 주요효과를 일변수 최적화 곡선으로 평가하였다. 그 결과 추출 시간, 추출 온도 및 에탄올 농도의 증가에 따라 TFC도 증가하는 곡선을 나타내어 TFC의 최대점이 존재함을 확인하였다. 독립변수 중 에탄올 농도에 대한 TFC의 증가가 가장 큰 것으로 확인되었는데, 이는 앞선 ANOVA에서 에탄올 농도가 TFC

Fig. 3. Perturbation plot of the total flavonoid compound affected by the three independent variables: extraction time, extraction temperature, and ethanol concentration. X_1 = extraction time (min), X_2 = extraction temperature (°C), X_3 = ethanol concentration (%).

Fig. 4. 3-D response surface plots for total flavonoid compound of the *Cirsium setidens* at constant value of (A) extraction time (min), (B) extraction temperature (°C), and (C) ethanol concentration (%).

에 가장 유의한 독립변수($P < 0.0001$)라는 사실과 일치하는 결과이다. 두 개의 독립변수에 대한 TFC의 변량 확인을 위해 한 개의 독립변수 값을 고정하여 두 변수의 상호관계를 3차원 반응표면곡선으로 도시하였다. Fig. 4A에서 고정된 독립변수가 에탄올 농도일 때 두 변수의 증가에 따라 TFC가 증가하여 59.9°C와 31.3분에서 최대 TPC 수율을 달성한 후 다시 감소하는 경향을 보였다. Fig. 4B에서 TFC는 에탄올 농도가 98.1%까지 증가하나 추출 온도가 65°C 이상 증가함에 따라 최대 TFC 이후 다시 감소함이 확인되었다. 에탄올 농도는 TFC에 가장 유의한 영향을 미치므로 수율 증가를 위해 높은 에탄올 농도는 필수적이며, 최적 UAE 공정 조건은 추출 시간과 추출 온도의 중간점에서 발생함을 반응표면곡선을 통해 예측하였다.

RSA의 최적 조건 탐색

UAE 공정을 이용한 항산화 성분 생산에 중요한 독립변수로 고려되는 인자에 대한 실험범위는 추출 시간(5.0~55.0 분), 추출 온도(26.0~94.0°C)와 에탄올 농도(0.0~99.5%)를 사용하였다. 초음파 추출 공정 최적화를 위해 설계된 17 개의 조건별 고려영역의 추출물의 RSA의 범위는 Table 2에 보는 바와 같이 25.7~94.8%로 나타내었으며, 최적 추출 조건은 에탄올 50.0%, 추출 시간 55.0분과 추출 온도 60.0°C로 확인되었다. 17개 실험조건에 따른 RSA를 기반으로 독립변수와 종속변수 간의 상관관계를 2차 회귀방정식으로 나타내었다(Table 3). 2차 회귀방정식 모델의 적합성은 UAE 조건 최적화를 위한 필수적인 부분으로 ANOVA를 수행하여 모델의 적합성과 각 항의 계수의 유의성에 대하여 확인하였다(Table 4). 2차 회귀방정식의 유효성 및 정확성의 지표

Table 4. Analysis of variance (ANOVA) for quadratic regression model of the experimental results

	TPC (mg GAE/g DM)			TFC (mg QE/g DM)			RSA (%)		
	Sum of squares	F-value	P-value	Sum of squares	F-value	P-value	Sum of squares	F-value	P-value
Model ¹⁾	10.22	3.99	0.0407*	1.40	48.63	<0.0001	7464.99	14.27	0.0010
X ₁	0.023	0.081	0.7841	0.11×10^{-3}	0.35	0.5737	1458.83	25.09	0.0015
X ₂	1.83	6.44	0.0388	5.19×10^{-5}	0.016	0.9030	2.22	0.038	0.8506
X ₃	3.91	13.76	0.0076	0.81	252.32	<0.0001	360.89	6.21	0.0415
X ₁ X ₂	0.011	0.040	0.8480	4.5×10^{-4}	0.14	0.7184	0.020	3.4×10^{-4}	0.9857
X ₁ X ₃	0.013	0.045	0.8380	0.8×10^{-3}	0.25	0.6319	154.88	2.66	0.1457
X ₂ X ₃	0.072	0.25	0.6289	9.8×10^{-3}	3.07	0.1231	2.00	0.034	0.8581
X ₁ ²	0.031	0.11	0.7520	0.30	92.67	<0.0001	224.68	3.86	0.0900
X ₂ ²	0.26	0.93	0.3674	0.45	140.02	<0.0001	1.20	0.021	0.8898
X ₃ ²	4.23	14.88	0.0062	0.061	19.12	0.0033	4959.87	85.31	<0.0001

¹⁾X₁: extraction time (min), X₂: extraction temperature (°C), X₃: ethanol concentration (%), X₁X₂: extraction time · extraction temperature, X₁X₃: extraction time · ethanol concentration, X₂X₃: extraction temperature · ethanol concentration.

Fig. 5. Perturbation plot of changes in radical scavenging activity of the *Cirsium setidens* according to extraction conditions. X_1 =extraction time (min), X_2 =extraction temperature ($^{\circ}\text{C}$), X_3 =ethanol concentration (%).

이와 적합성을 나타내는 결정계수(R^2)는 0.9483으로 높은 적합성이 인정되었다. 각 독립변수의 일차항에 대한 P 값은 추출 시간(X_1)과 에탄올 농도(X_3)가 각각 $P<0.0015$ 와 $P<0.0415$ 로 나타나 RSA에 유의한 수준($P<0.05$)으로 인정되었으나, 상호 항은 통계적으로 유의하지 않아 독립변수 간의 상호작용이 발생하지 않은 것으로 평가되었다($P>0.1$). 따라서 고려엉겅퀴 추출물의 RSA는 추출 시간과 에탄올 농도가 2차 회귀함수에 큰 중요도가 있는 것으로 판단되었다. 개별 독립변수의 영향은 일변수 최적화 곡선으로 시각화하여 추출 조건이 다른 17개 고려엉겅퀴 추출물에 대한 RSA의 변화를 시각적으로 확인하였다(Fig. 5). RSA는 추출 온도의

증가에 큰 변화량을 보이지 않고 직선성을 보였으나 추출 시간과 에탄올 농도가 증가함에 따라 RSA가 증가하는 곡선이 나타나 추출 시간과 에탄올이 RSA에 유의한 영향을 나타내었고 에탄올 농도보다 추출 시간이 상대적으로 큰 영향을 미치는 독립변수인 것을 알 수 있었으며, 이는 ANOVA 결과를 통해 재확인할 수 있었다. 두 개의 독립변수에 의한 RSA의 변화는 하나의 독립변수를 고정하여 Fig. 6과 같이 3차원 반응표면곡선으로 나타내었다. 일정한 추출 시간에서 추출 온도가 증가함에 따라 고려엉겅퀴로부터 추출된 유효성분의 RSA 변화가 없는 것으로 나타났으며, 일정한 온도에서 추출 시간에 대한 RSA는 증가하는 경향을 보여 추출 시간의 영향이 미미함을 알 수 있었다(Fig. 6A). 추출 시간과 에탄올 농도의 상호작용이 RSA에 미치는 영향은 Fig. 6C에 나타냈는데, RSA가 에탄올 49.6%에서 최댓값을 보였고 추출 시간이 47.4분까지 증가함에 따라 RSA도 증가하는 경향을 보였으나 그 이후 감소하였다. 따라서 고려엉겅퀴로부터 항산화 성분 추출에 있어 변화폭이 큰 추출 시간과 에탄올 농도의 최적화가 우선되어야 함을 알 수 있었다. Fig. 6B에서 보는 바와 같이 RSA는 추출 온도보다 에탄올 농도에 영향을 받아 에탄올 농도가 증가함에 따라 큰 증감을 보였다. 이는 Kim 등(2009)의 연구에서 프로폴리스 에탄올 추출물의 최대 RSA가 78.3%로 에탄올 농도가 높을수록 전자공여능이 증가한다는 보고와 유사한 경향으로, 고려엉겅퀴 추출물은 에탄올의 농도가 증가할수록 극성이 낮아져 수용성 페놀 화합물의 용해가 증가하여 항산화 활성이 유의적으로 증가한 것으로 사료된다.

Fig. 6. 3-D response surface plots for radical scavenging activity of the *Cirsium setidens* at constant value of (A) extraction time (min), (B) extraction temperature ($^{\circ}\text{C}$), and (C) ethanol concentration (%).

Fig. 7. Superimposed contour plots showing the optimized condition of extraction time, extraction temperature, and ethanol concentration for the maximization of total phenolic compound (TPC), total flavonoid compound (TFC) and radical scavenging activity (RSA) simultaneously. X_1 = extraction time (min), X_2 = extraction temperature ($^{\circ}$ C).

최적 추출 조건 예측

최적 추출 조건의 예측은 Fig. 7에서 보는 바와 같이 TPC, TFC와 RSA를 동시에 최대화하는 UAE 조건 탐색을 위해 2차 회귀방정식을 통해 그려진 개별 반응표면곡선을 중첩해 공통으로 나타나는 부분의 범위를 완전히 또는 부분적으로 일치하는 범위로 결정하였다. 앞선 실험에서 중요도가 가장 높은 것으로 확인된 에탄올의 농도(X_3)를 우선으로 최적화하여 62.2%로 고정하고, 추출 시간(X_1)과 추출 온도(X_2)는 고려엉겅퀴 추출 조건과 동일한 5.0~55.0분과 26.0~94.0 $^{\circ}$ C로 설정하여 종속변수 TPC, TFC와 RSA의 반응표면을 최대 중첩하였다. 최대 중첩으로 얻어진 공통 영역에서 UAE 공정비용 감소를 위해 에탄올 농도와 추출 시간이 최소가 되는 점을 선택했을 때, 에탄올 62.2%, 추출 온도 34.5 $^{\circ}$ C와 추출 시간 63.7분에서 TPC 5.21 mg GAE/g DM, TFC 1.00 mg QE/g DM과 RSA 86.7%로 공통 최대화 조건이 예측되었다. 예측 결과에 대한 신뢰성 확인을 위해 예측된 최대화 조건의 범위를 이용하여 검증 실험을 진행했을 때, TPC 5.45 mg GAE/g DM, TFC 0.95 mg QE/g DM과 RSA 84.2% 실험값이 도출되어 예측값과 실험값의 합치도가 높음을 확인하였으며, 본 조건이 CCD를 이용한 UAE 추출 조건 최적화에 적용이 용이함을 결론지을 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 고려엉겅퀴로부터 폴리페놀과 같은 항산화 성분을 효율적으로 추출하고 평가하는 데 있어 CCD를 이용하여 추출 조건을 최적화하였다. 각 종속변수를 최대화하는 최적 추출 조건은 추출 시간이 34.5분, 추출 온도가 63.7 $^{\circ}$ C이며 에탄올은 62.2%인 조건이 산출되었고 최적화된 공정에 따라 TPC는 5.21 mg GAE/g DM, TFC는 1.00 mg QE/g DM, RSA는 86.7%로 예측되었다. 이를 검증하기 위해 실제 실험을 진행한 결과 TPC 5.45 mg GAE/g DM, TFC 0.95

mg QE/g DM과 RSA 84.2%로 예측값과 실험값의 합치도가 높아 RSM의 적합성을 확인하였다. 위 결과는 식품에 한정적으로 이용되던 고려엉겅퀴를 항산화 성분 추출 최적화를 통해 기능성 보조 식품으로 개발하거나 향후 인체질환의 약용성분으로서의 개발 가능성을 높여 보다 효과적인 이용을 통해 고부가가치 향상을 기대할 수 있다. 또한 국내에서 자생하는 고려엉겅퀴를 제품 개발에 활용할 시 수입 원료를 사용할 때보다 농가의 소득 증대와 기업의 원료수급 비용 절감으로 인한 산업적 활용 가치가 증대될 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Ahn HY, Lee JH, Kang MJ, Cha JY, Cho YS. Fibrinolytic activity and chemical properties of cordycepin-enriched *Cordyceps militaris* JLM 0636. J Life Sci. 2012. 22:226-231.
- Choi IS, Cha EJ, Lee YR, Kim JK. Antioxidant and anticancer activities of Yak-Sun tea prepared by oriental medicinal herbs. Korean J Food Nutr. 2012. 25:447-453.
- Eun CS, Hwang EY, Lee SO, Yang SA, Yu MH. Anti-oxidant and anti-inflammatory activities of barley sprout extract. J Life Sci. 2016. 26:537-544.
- Hong IK, Park BR, Jeon GS, Lee SB. Extraction of flavonoid components from persimmon leaf, thistle and new green. Appl Chem Eng. 2016. 27:276-279.
- Jung HJ, Han YJ, Lee DK, Gam DH, Kim JW. Optimization of alkaline hot-water extraction conditions for production of polyphenolic compounds and flavonoids from Korean thistle (*Cirsium japonicum*). J Adv Eng Tech. 2018. 11:95-99.
- Kang HJ, Mok JY, Cho JK, Jeon IH, Kim HS, Park JM, et al. Protective effects of leaf and flower extracts from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* on oxidative damage in normal human erythrocytes and plasma. Kor J Pharmacogn. 2012. 43: 66-71.
- Kim HJ, Lee WJ. Exercise and reactive oxygen species. J Life Sci. 2017. 27:1078-1085.
- Kim SH, Kim IH, Kang BH, Lee KH, Lee SH, Lee DS, et al. Optimization of ethanol extraction conditions from propolis (a bee product) using response surface methodology. Korean J Food Preserv. 2009. 16:908-914.

- Kim YS, Kwon OJ, Suh HJ, Park S. Antioxidant properties of brownish natural dyeing agents from medicinal plant. Korean J Food Preserv. 2016. 23:387-392.
- Kwak J, Oh SK, Kim DJ, Lee JH, Yoon MR, Kim HW, et al. Effects of heat-treated brown rice on total phenolics and antioxidant activities. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2013. 42:534-541.
- Lee H, Lee H. The roles of dietary polyphenols in brain neuro-modulation. J Life Sci. 2018. 28:1386-1395.
- Lee HJ, Shin YS, Kim SY, Lee SW. Optimization of hot water extraction conditions for *Cirsium japonicum* var. *maackii* by response surface methodology. Proceedings of the Annual Meetings of the Korean Society of Medicinal Crop Science. 2014 Oct 16-Oct 17. Jeongseon, Korea. p 267-268.
- Lee JY, Kim CY. Anti browning and antioxidant properties of *Foeniculum vulgare* seed extracts. Korean J Food Preserv. 2020. 27:188-196.
- Lee SB, Kim SI, Hong IK. Optimization of iso-flavonoids extraction process from kudzu using ultrasonic irradiation energy. Appl Chem Eng. 2018a. 29:503-509.
- Lee SG, Lee JH, Chung MS, Kang H. Antioxidants and anti-neuroinflammatory effect of ethanol extracts from *Boehmeria nivea* (L.) Gaudich. J Naturop. 2016. 5:33-37.
- Lee SH, Jin YS, Heo SI, Shim TH, Sa JH, Choi DS, et al. Composition analysis and antioxidative activity from different organs of *Cirsium setidens* Nakai. Korean J Food Sci Technol. 2006. 38:571-576.
- Lee SL, Song BR, Shin HS, Lee YJ, Park SN. Antioxidant, anti-aging and antimicrobial effects of ethanolic extract and ethyl acetate fraction from *Eclipta prostrata*. J Soc Cosmet Sci Korea. 2018b. 44:349-362.
- Min B, Han Y, Lee D, Jung H, Jo J, Kim JW. Optimization of microwave-assisted extraction conditions for production of bioactive material from corn stover. Korean Chem Eng Res. 2017. 56:66-72.
- Mok JY, Kang HJ, Cho JK, Jeon IH, Kim HS, Park JM, et al. Antioxidative and anti-inflammatory effects of extracts from different organs of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*. Kor J Herbol. 2011. 26:39-47.
- Park HJ, Yoon GM, Lee SH, Jang GY, Kim MY, Meishan L, et al. Effects of extraction temperature and time on antioxidant activities of *Rhus verniciflua* extract. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2013. 42:1776-1782.
- Park HM, Hong JH. Effect of extraction methods on antioxidant activities of *Mori ramulus*. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2014. 43:1709-1715.
- Park SJ, Kwon SP, Rha YA. Enhancement of antioxidant activities of *Crataegus pinnatifida* Bunge fruit by ultrasonification extraction processes. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2017. 46: 891-895.
- Park YE, Kwon GS, Kim BH, Lee JB. Evaluation of the usefulness of the fermented thistle (*Cirsium japonicum*) with *Lactobacillus rhamnosus* BHN-LAB105 for antioxidative and whitening effects. Asian J Beauty Cosmetol. 2019. 17:1-13.
- Seo SH, Roh MI, Shin H. A study on the weight estimation model of floating offshore structures using the non-linear regression analysis. J Soc Nav Archit Korea. 2014. 51:530-538.
- Yong YS, Lee S, Byun NY, Sun S, Kim MJ, Jang SW, et al. Antioxidant activities and validation of analytical method of marker compounds in strawberry fruits from various cultivars. Korean J Food Sci Technol. 2019. 51:517-523.
- Yoon MY, Han YS. Effect of anti-oxidant activity and the skin whitening action on *Plantago asiatica* L. root extract. Korean Soc Biotechnol Bioeng J. 2014. 29:199-204.
- Yoon SL, Lee SR, Park JY, Seong JH, Lee DH. A prediction of entrainment growth rate for debris-flow hazard analysis using multiple regression analysis. J Korean Soc Hazard Mitig. 2014. 15:353-360.
- Yun ME, Lee YS, Lee YJ, Park YM, Park SN. Antimicrobial, antioxidant and cellular protective effects of *Houttuynia cordata* extract and fraction. Appl Chem Eng. 2018. 29:452-460.