

반응 표면 분석법을 이용한 홍삼 사포닌으로부터의 사과산 활용 진세노사이드 Rg3 전환 최적화

김기성¹ · 박준성^{2*} · †

^{*}(주)골드레벤

^{**}충북대학교 공업화학과, 교수

(2023년 11월 23일 접수, 2023년 12월 8일 수정, 2023년 12월 11일 채택)

Optimization for Preparation of Malic acid-catalyzed Ginsenoside Rg3 by Response Surface Methodology

Ki Seong Kim¹ and Junseong Park^{2,*} · †

¹Goldleben Inc. 20 Deogam-ro, Heungdeok-gu, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do 28463, Korea

²Department of Engineering Chemistry, Chungbuk National University

(Received November 23, 2023; Revised December 8, 2023; Accepted December 11, 2023)

요약: 최근 다양한 피부 기능 개선 효과로 기능성 소재로서 활용도가 높은 홍삼 사포닌의 한 종류인 진세노사이드 Rg3를 위한 사과산(malic acid)활용 전환 방법을 확인하였다. 실험 계획법인 반응 표면 분석법(RSM)을 활용하여 진세노사이드 Rg3로의 전환에 영향을 주는 요인을 최적화하기 위한 실험 조건을 설계 및 검증하였다. 주요 독립변수는 사과산 농도, 반응 온도와 반응 시간이었고 Box-Behnken design (BBD)법에 따라 설계된 실험 조건으로 진세노사이드 Rg3로 전환을 수행하고 최적화 조건을 분석하였다. 전환된 진세노사이드 Rg3의 농도는 1.548 mg/L에서 최대 4.558 mg/L까지 확인되었고 사과산 1%, 50 °C, 9 h에서 가장 높은 양의 진세노사이드 Rg3생성량을 보였다. 결론적으로, 진세노사이드 Rg3의 생성에 가장 영향을 미치는 요인은 사과산의 농도, 반응 시간, 온도 순이었다. 또한, 사과산의 농도와 반응 시간의 교호작용이 반응 온도 요인보다 영향도가 큰 것을 확인하였다.

Abstract: Malic acid-catalyzed transformation has been developed to produce ginsenoside Rg3 which is increasingly in demand as a functional ingredient. The optimization of the conversion of red ginseng saponin (RGS) to ginsenoside Rg3 by acid catalyzed transformation was carried out using Box-Behnken design (BBD) based on Response Surface Analysis (RSM). The main independent variables were malic acid concentration, temperature, and reaction time. Conversion of ginsenoside Rg3 was performed according to BBD model and optimization conditions were analyzed. The concentration of the converted ginsenoside Rg3 ranged from 1.548 mg/L to 4.558 mg/L, and the highest production was obtained under the condition of reacting 1% malic acid, 50 °C and 9h. Consequently, The independent variables affecting the production of ginsenoside Rg3 were identified in the following order: malic acid concentration, reaction time and temperature. In addition, it was confirmed that the interaction between malic acid concentration and reaction time had a greater influence than the temperature.

Keywords: red ginseng extract, ginsenoside Rg3, malic acid, RSM

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

1. 서 론

인삼은 동아시아 지역, 특히 한국과 중국에서 신체적 생명력을 유지하기 위한 한약재로 오랫동안 사용되었다[1]. 인삼의 주요 활성제는 트라이테르펜 사포닌인 진세노사이드이며 인삼의 약효에 관한 대부분의 연구는 진세노사이드에 초점을 두고 있다[2-8]. 인삼의 추출물이 시상하부 뇌하수체 부신 축과 면역체계에 영향을 미친다는 연구가 있으며 이를 통해 인삼의 효과들의 많은 부분을 설명할 수 있다. 동물모델과 체외 연구를 통해 인삼이 식세포의 활동, 자연 킬러 세포 활성, 인터페론의 생성 촉진을 증가시키고 쥐들의 신체적, 정신적인 성능을 향상, 혈관의 확장을 유발, 외인성 스트레스 인자에 대한 내성 증가 또 저혈당 활동에 대한 영향을 끼친다는 것이 밝혀졌다[9,10].

진세노사이드는 C-3, C-6, C20 위치에 글루코스, 람노스, 자일로스, 아라비노스와 같은 당이 존재하는 담마레인 골격으로 이루어져 있다. 진세노사이드는 major 진세노사이드(Rb1, Rb2, Rd, Rg1, Re, Rf, etc.)와 minor 진세노사이드(Rg3, Rh2, Rh4, Rs3, Rs4, Rg5, etc.)로 나뉘며 그 중 minor 진세노사이드는 홍삼, 흑삼 그리고 발효 인삼과 같은 가공된 인삼에서 주로 보인다[11,12]. 진세노사이드는 그 형태에 따라 다른 생리활성과 생물학적 이용도를 가지며 인삼과 인삼을 이용한 제품들의 약리적 활성은 진세노사이드의 조성에 따라 다르게 된다. 진세노사이드에 물리적, 화학적, 생물학적 변화를 가하여 진세노사이드를 변화시킬 수 있으며, 화학적인 방법인 산 가수분해를 이용했을 경우 진세노사이드의 화학적인 구조는 C-20에서 일어나는 당의 가수분해와 탈수반응 때문에 변화하게 된다. 보통은 진세노사이드 Rb1, Rb2, Rc를 섭취했을 경우 위산과 같은 약산에 의해 몸속에서 진세노사이드 Rg3로 변환되며 이 진세노사이드 Rg3는 홍삼과 열 가공된 인삼의 주요 성분으로도 나타난다[13-15]. 진세노사이드 Rg3는 혈관 신생 및 종양 전이 억제, 간 및 신경보호, 면역 및 항당뇨 효과 등의 효능이 보고되었다[16-18]. 진세노사이드 Rg3는 인삼 중에서는 발견되지 않으며 수삼이나 백삼, 그리고 홍삼 중에는 거의 없거나 극히 미량으로 존재하기 때문에 산업적으로 생산하는 방법이 필요한 실정이다.

본 연구에서는 홍삼으로부터 주요 진세노사이드를 포함하는 사포닌 분획을 추출 분리하고 홍삼에 포함된 주요 유기산 중의 하나인 사과산(malic acid)을 처리하여 진세노사이드 Rg3를 효과적으로 전환 시키는 최적화 조건을 결정

하여 산업적으로 이용할 수 있는 진세노사이드 Rg3제조 기술을 확립하고자 하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 실험재료

본 연구에 사용된 홍삼은 홍삼추출물(KGC 인삼공사, Korea)을 구입하여 추가적인 분리 정제를 통해 홍삼 사포닌(Red ginseng saponin, RGS)으로 활용하였다. 실험에 사용한 사과산(malic acid)은 Sigma (USA)에서 구매하였고, 기타 용매 등 실험에 사용한 시약들은 Sigma (USA)에서 구매하였다.

2.2. 홍삼 사포닌(Red Ginseng Saponin, RGS) 제조

홍삼 추출물(Red ginseng extract, RGE)을 증류수로 5% (w/w) 농도로 희석하고 합성 흡착제인 Diaion HP-20 (Mitsubishi Chemical Co., Japan)에 적용하여 증류수 세척 후 에탄올 농도를 증가시키며 용출시켜 분리능을 확인하였다. 5% 홍삼 추출물을 칼럼에 흡착시킨 후 정제수, 10, 30, 50 및 70 wt% 에탄올, 메탄올을 순서대로 적용하고 분획으로 분리하였다. 박막 크로마토그래피(thin layer chromatography (TLC), Merck, Germany)를 사용하여 각 분획을 확인하고 진세노사이드를 함유한 분획은 혼합하여 회전 증발 농축기(N-1110, Eyela Co., Japan)를 이용하여 농축 건조하고 홍삼 사포닌(RGS)으로 활용하였다.

2.3. 사과산을 활용한 진세노사이드 Rg3의 제조

유기산을 활용하여 RGS로부터 진세노사이드 Rg3를 제조하기 위하여 RGS (1%, w/w)를 증류수에 희석하고(98%, w/w) 사과산 수용액(0.5%, w/w)를 첨가하여 진행하였다. 반응액은 60 °C에서 200 rpm의 진탕 속도로 24 h 동안 반응 후 얼음을 사용하여 냉각시켜 반응을 정지시키고 반응이 진행됨에 따라 생성 및 감소하는 진세노사이드 함량을 TLC를 이용하여 분석하였다.

2.4. 진세노사이드 분석

박막 크로마토그래피 진행을 위해 진세노사이드 Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rg3, Ck 혼합물과 반응 산물을 메탄올에 용해하여 점적하였다. 전개 용매로서 CHCl₃ : CH₃OH : H₂O (65 : 35 : 10, v/v/v)를 사용하였고, 10%의 H₂SO₄을 분무한 뒤 5 min 동안 가열 건조하여 발색시켰다. HPLC (2695

Separations Module, Waters, USA)를 이용하여 진세노사이드 Rg3의 함량을 정량 분석하였다. 칼럼(column)은 Mightysil RP-18GP 5 μm 4.6 \times 250 mm (KANTO CHEMICAL, Japan)을 사용하였고 검출기는 waters 486 detector로 파장은 210 nm에서 확인하였으며, 이동상 A는 아세트니트릴, B는 이온수로 하여 샘플은 10 μL 를 주입하였고, column 온도 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 분석하였다. Column의 유속은 1.0 mL/min 이었고, 분석 시간은 0 min에서 15 min까지 이동상 A를 10%, 이동상 B를 90%로 용리하기 시작하였으며, 15 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 40 min 까지 이동상 A를 10%, 이동상 B를 90%로 유지하면서 분석을 진행하였다.

2.5. 반응 표면 분석법(Response Surface

Methodology, RSM)을 활용한 사과산 반응 최적화 사과산을 활용한 RGS의 진세노사이드류에서 Rg3로의 전환 반응의 최적화는 반응 표면 분석법을 사용하여 조건을 설계하였다. 3 가지의 변수에 대해 3 수준을 정하고 실험을 통해 최적 조건을 확인할 수 있는 Box-Behnken 디자인 모델(BBD)을 도입하였는데 3 가지 이상의 요인을 가질 때 3 수준의 실험을 진행하여 정사면체의 각 꼭지점 사이의 위치한 중앙점과 전체 입방체의 중심점으로 구성된다[19]. 변수는 사과산 농도(X_1), 반응 온도(X_2), 반응 시간(X_3)으로 설정하였다(Table 1). 3 개의 독립변수의 범위를 -1, 0, 1(최저값, 중심값, 최대값) 총 3 단계로 부호화하였으며 독립변수로 선택된 조건 외에 다른 조건들은 동일하게 유지하였고, 최소의 오차를 위하여 총 17 회의 실험을 진행하였다. 각 반응에 대해 다음의 이차 다항식으로 표현할 수 있다.

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

$\beta_1, \beta_2, \beta_3$ 은 각각의 선형 계수이고 $\beta_{12}, \beta_{23}, \beta_{13}$ 은 변수들간

Table 1. Independent Variables Levels Used for BBD for RSM

X_n	Independent variables	Level	
		-1	+1
X_1	Malic acid concentration (%)	0.5	1.5
X_2	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	30	70
X_3	Reaction time (h)	6	12

의 상관관계에 관한 계수, $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ 은 각각의 변수의 이차 계수를 의미한다.

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. 홍삼 추출물 분리 정제

유기산 전환 반응의 효율을 높여주는 방법으로 홍삼 추출물(RGE)의 진세노사이드 부분을 분리하기 위해 홍삼 추출물을 5%로 증류수에 희석하여 흡착 레진인 Diaion HP-20를 사용하여 용매 비율별 분리능을 확인하였다. 5% 농도의 홍삼 추출물을 칼럼에 흡착시킨 후 동량의 정제수로 3 회 이상 세척하였다. 이후 10, 30, 50, 70 에탄올 수용액 그리고 메탄올 순서로 용액을 넣어 순차적으로 탈착시켰다. Figure 1의박막 크로마토그래피 분석 결과로 확인할 수 있

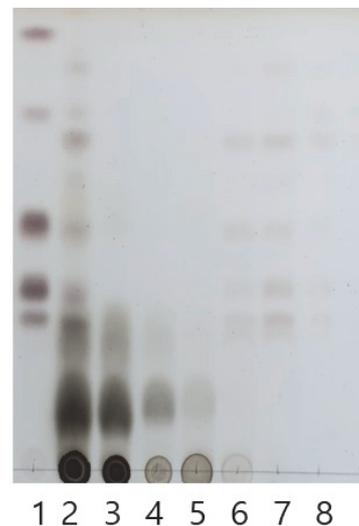


Figure 1. TLC analysis of elution process after RGE adsorption. 1. ginsenoside standard (Rb1, Rb2, Rc, Rd, F2, Ck), 2. red ginseng extract, 3. D.W, 4. 10 wt% ethanol, 5. 30 wt% ethanol, 6. 50 wt% ethanol, 7. 70 wt% ethanol, 8. methanol.

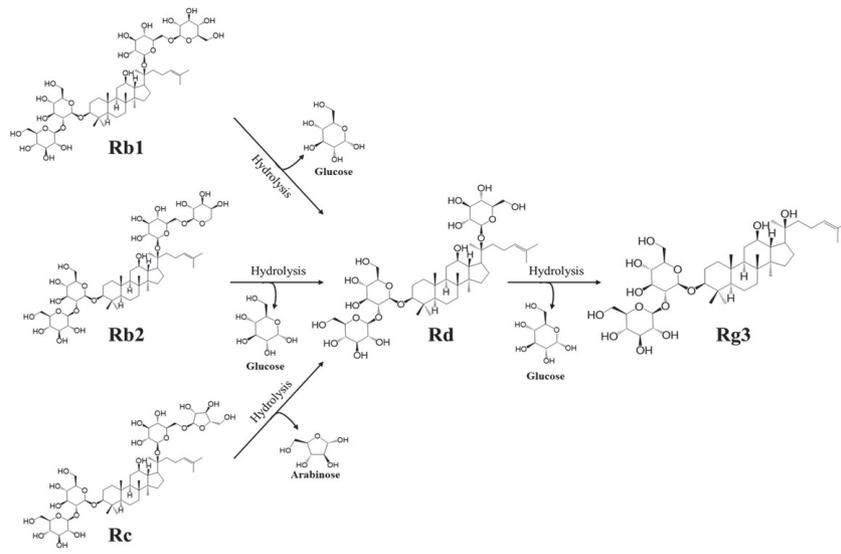


Figure 2. Deglycosylation pathway of Red ginseng ginsenosides to Rg3.

듯이 증류수와 30 wt% 에탄올을 사용하여 용리하였을 때 비진세노사이드 성분들이 분리되는 것을 확인할 수 있었다. 50 wt% 에탄올을 투여하였을 때부터는 진세노사이드 성분들이 용리되어 이후 70 wt% 에탄올 및 메탄올을 추가 투여하여 진세노사이드 성분들을 분리해 낼 수 있었고 이들 분획을 혼합하여 용매를 제거하고 최종적으로 홍삼 사포닌(RGS)을 확보하였다.

수 있듯이 전환 반응의 기질로써 사용된 RGS 내의 진세노사이드 Rd가 반응 시간 12 h 이후 상당량 감소하는 것으로 확인이 되었고 Rc와 Rb2의 분해를 확인할 수 있었다. 이후 24 h 이후 Rb1의 감소도 확인이 되어 반응 24 h 이후 초기 대비 Rg3의 생성이 증가하는 것으로 확인할 수 있었다.

3.2. 사과산을 활용한 Ginsenoside Rg3 전환 반응

진세노사이드 Rg3는 진세노사이드 Rb1, Rb2, Rc의 장내 대사중의 중간체로서 생성이 되는데 C20 위치에 결합되어 있는 glycoside 부분이 가수분해된 배당체이다. 대사 반응이 추가로 진행이 되면 이후 연속적인 당의 가수분해를 통해 진세노사이드 F2로 전환이 되고 이후 compound K로 전환이 된다. 각 대사 단계에서 생성되는 진세노사이드의 유효 효능이 개별 물질에 따라 다양하게 보고되어 있어 각 진세노사이드 성분의 제조 목적에 따른 대사 단계의 전환 반응 조절은 목적 진세노사이드의 생산에 중요한 요소라 할 수 있다. 본 연구에서는 효율적인 진세노사이드 Rg3의 개발을 위해 진세노사이드 Rb1, Rb2, Rc로부터의 1 차 전환 반응 및 Rd로 부터의 2차 전환반응 은 유효하게 진행이 되지만 이후의 F2로의 전환은 이루어지지 않도록 조절하는 것이 핵심이라 할 수 있다(Figure 2). 이를 위해 홍삼에 함유되어있는 것으로 보고된 유기산 중 사과산(malic acid)를 활용한 반응에서 유효한 Rg3의 생성이 관찰되었다. Figure 3에서 확인할

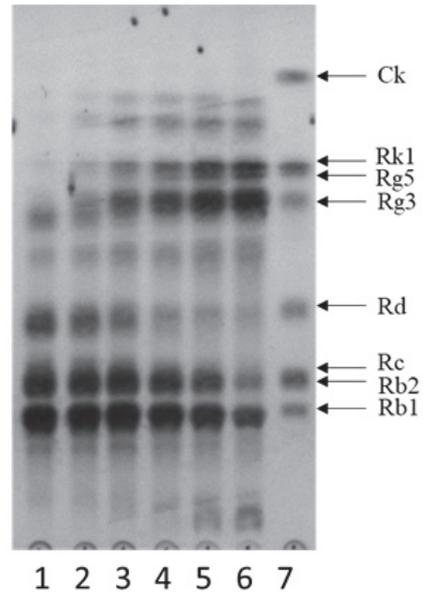


Figure 3. Time coursed malic acid-catalyzed transformation to ginsenoside Rg3 from RGS. lane 1: RGS, lane 2 ~ 6: 2 ~ 24 h reaction time, lane 7: ginsenoside standard mixture

3.3. 반응표면분석법에 의한 진세노사이드 Rg3 전환 최적화

RGS로부터 진세노사이드 Rg3로의 변환 조건을 설계하기 위하여 반응표면분석법을 사용하였다. 실험 계획법으로는 BBD를 사용하였다. 선행된 요인별 실험결과를 토대로 변수로는 사과산의 농도(malic acid concentration), 반응 온도(temperature), 반응 시간(time)을 선택하였고 이 변수들의

Table 2. Ginsenoside Rg3 Content of RGE Treated with Malic Acid in Box-Behnken Design

Run	Malic acid concentration (% w/w)	Temperature (°C)	Time (h)	Ginsenoside Rg3 content (mg/L)
1	1.5	70	9	2.111
2	0.5	50	12	3.671
3	0.5	70	9	2.458
4	1	50	9	4.156
5	1	70	6	1.856
6	1.5	30	9	2.881
7	1	70	12	2.859
8	1	30	12	2.449
9	1	30	6	2.575
10	1	50	9	4.103
11	1	50	9	4.225
12	0.5	30	9	1.548
13	1.5	50	6	4.152
14	1.5	50	12	3.457
15	1	50	9	4.558
16	0.5	50	6	1.994
17	1	50	9	4.311

값을 최적화하고자 -1, 0, +1로 부호화하였다. BBD 설계법에 의해 설계된 17 가지의 실험 조건에 대해 3 회 반복을 통해 총 51 회의 실험이 수행되었다. 독립변수에 영향을 받는 종속변수(Y)는 진세노사이드 Rg3의 함량으로 HPLC 분석을 통해 확인하였고 회귀분석에 사용되었다. 설계된 실험 조건에 따라 진행된 반응 이후 검출된 진세노사이드 Rg3의 양을 Table 2에 나타내었고 17 회의 설계 실험 조건 중 대표적인 반응의 HPLC 분석 결과를 Figure 4에 나타내었다. 진세노사이드 Rg3는 1.548 mg/L에서 최대 4.558 mg/L까지 전환이 되었다. 사과산 1%, 50 °C, 9 h 동안 반응시킨 조건에서 가장 많은 양의 진세노사이드 Rg3를 생성하였다. 회귀분석에 의한 모델식은 Design Expert ver. 12.0를 사용하여 예측하였다. 통계처리를 통해 실험결과를 분석하였고 분산분석표(analysis of variance, ANOVA)를 통하여 전체적인 실험 모델의 *p*-value를 확인하였다(Table 3). *p*-value는 각 계수의 유의성을 확인하는 도구 역할을 하며 작을수록 해당 계수가 더 유의하다[19]. 실험을 통하여 확인된 *p*-value는 0.0001 이하로 사과산 전환 조건 설계에 따른 모델의 유의성이 있는 것을 확인하였다. *F*-value는 45.19로 특성값이 우연한 실험 오차로 인해 변화할 확률보다 높음을 확인하였다. 모델의 R²(결정계수)는 0.9831로 1에 근접한 값으로 신뢰할 수 있는 반응 모형임을 확인하였다. 사과산 농도의 *F*-value는 27.94이었고, 반응 온도의 *F*-value는 0.093이었으며, 반응 시간의 *F*-value는 11.25로 사과산을 이용한 RGS로부터 진세노사이드 Rg3로의 전환 최적화 모델에서 가장 영향을 미치는 요인은 사과산의 농도, 반응 시간, 온도 순이었다. 또한, 사과산의 농도와 반응 시간의 교호작용이 온도요인보다 영향도가 큰 것을 확인하였다.

Figure 5에 진세노사이드 전환 반응 모형진단에 관한 결과

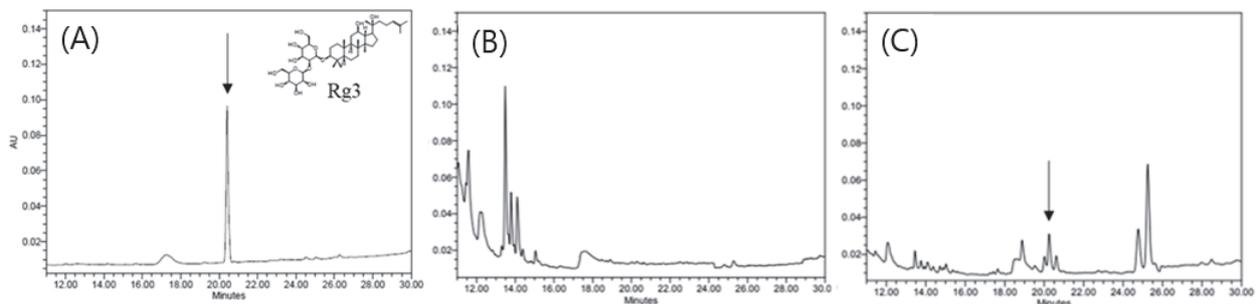


Figure 4. HPLC analysis of representative transformation of RGS by malic acid for RSM. (A) ginsenoside Rg3 standards, (B) RGS (N) reaction condition 2.

Table 3. ANOVA of ginsenoside Rg3 for Response Surface Quadratic Model

Source	Sum of squares	DF	Mean square	F-value	p-value	
Model	15.62	9	1.74	45.19	< 0.0001	significant
A	1.07	1	1.07	27.94	0.0011	
B	0.0036	1	0.0036	0.0930	0.7693	
C	0.4320	1	0.4320	11.25	0.0122	
AB	0.7056	1	0.7056	18.37	0.0036	
AC	1.41	1	1.41	36.63	0.0005	
BC	0.3187	1	0.3187	8.30	0.0236	
A ²	1.36	1	1.36	35.46	0.0006	
B ²	8.88	1	8.88	231.28	<0.0001	
C ²	0.6190	1	0.6190	16.12	0.0051	
Residual	0.2688	7	0.00384			
Lack of fit	0.1413	3	0.00471	1.48	0.3478	not significant
Pure error	0.1275	4	0.0319			
Cor total	15.89	16				
Std Dev	0.1960		R ²	0.9831		

A: Malic acid concentration, B: Temperature, C: Reaction time

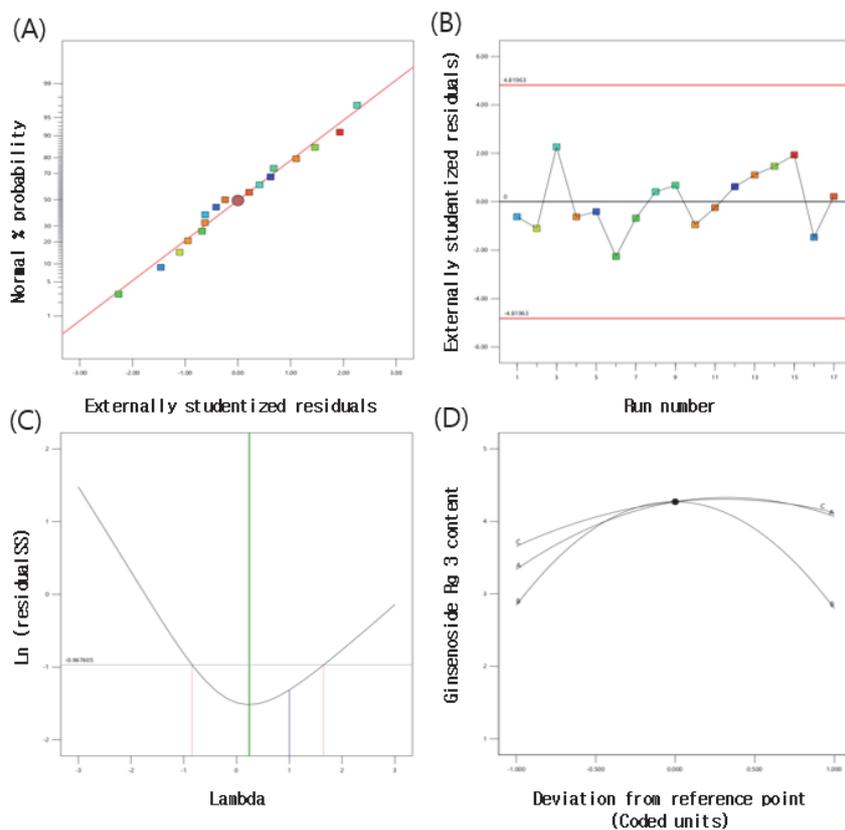


Figure 5. Diagnostics of testing model. (A) perturbation, (B) normal plot of residuals, (C) residuals vs run, (D) box-cox plot for power transforms.

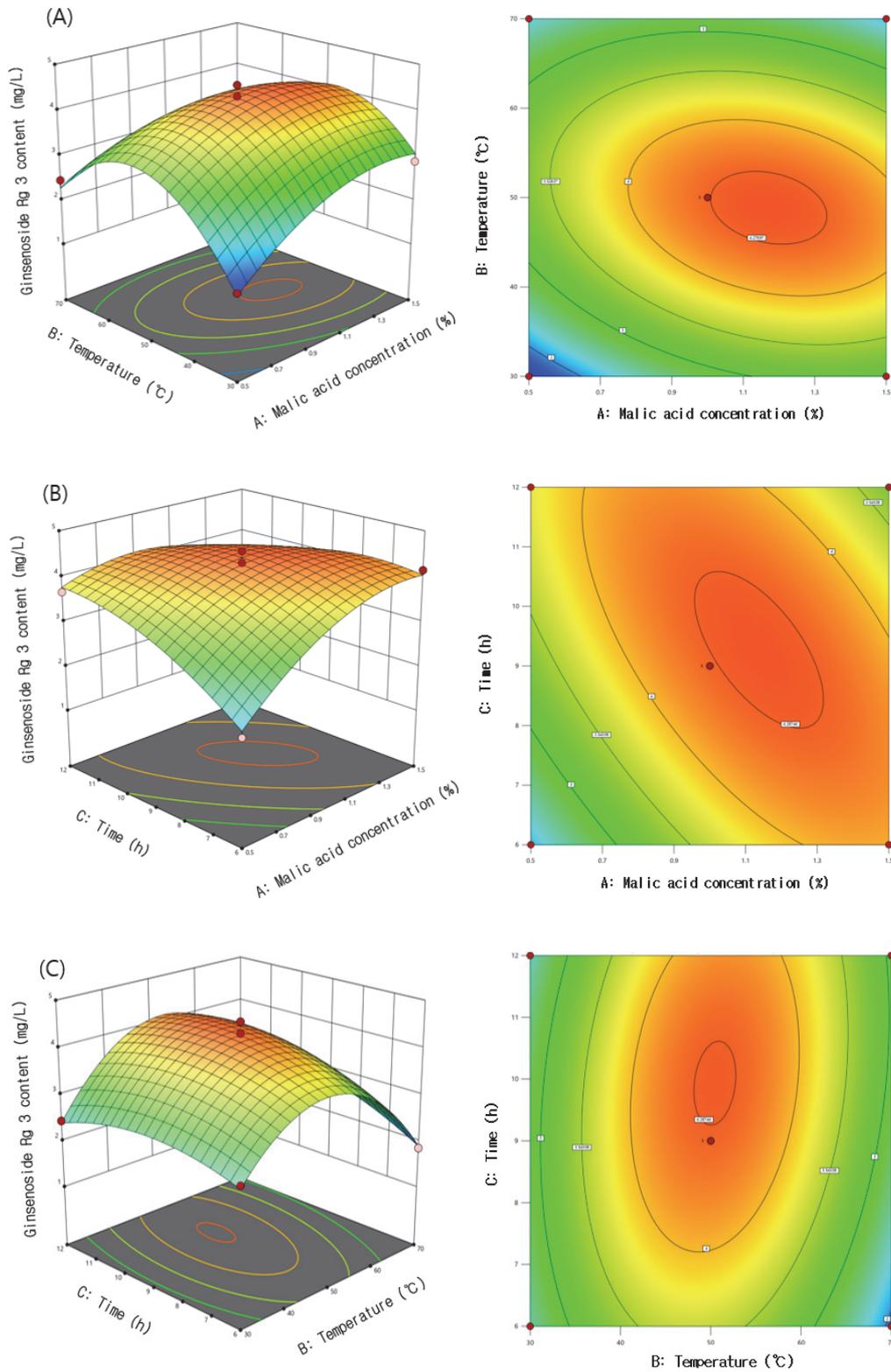


Figure 6. 3D response surface and contour plot as three variables. (A) malic acid concentration vs temperature; (B) malic acid concentration vs time; (C) time vs temperature.

를 나타내었다. Figure 5A는 오차의 정규성을 확인한 결과로 표준화 잔차의 정규 확률도가 직선형태로 나타나고 정규 분포를 따른다는 것을 확인할 수 있었다. Figure 5B에서 확인할 수 있듯이 표준화 잔차가 ± 3 이내에 고르게 분포하므로 등분산 가정을 만족하고 모형이 적합하다는 것을 보여준다. Figure 5C는 box-cox 변환에 의한 데이터의 분산이 안정적으로 이루어져 있음을 나타내었고, Figure 5D는 RGS로부터 진세노사이드 Rg3 변환이 상대적으로 반응 온도 (B)의 수준 변화에 가장 민감하게 반응하였고, 반응 시간 (C)의 수준 변화에 가장 둔감하게 반응하였다.

3.4. 진세노사이드 Rg3 생물 전환 최적 조건 분석

모수 추정에 의한 특성값인 진세노사이드 Rg3의 2 차 회귀방정식은 다음과 같이 제시되었다.

$$\begin{aligned} \text{Ginsenoside Rg3 content} = & 4.2700 + 0.3662A - 0.0211B \\ & + 0.2324C - 0.4200AB - 0.5930AC \\ & + 0.2823BC - 0.5687A^2 - 1.45B^2 - 0.3834C^2 \end{aligned}$$

A: Malic acid concentration, B: Temperature, C: Time

회귀방정식을 이용하여 사과산의 농도, 온도와 반응 시간에 따른 교호작용을 3차원 반응 표면도와 2차원으로 표현한 등고선은 Figure 6에 나타나 있다. Figure 6A는 반응 시간이 9 h일 때, 사과산의 농도와 온도에 따라 변하는 진세노사이드 Rg3의 생성량을 나타낸 3D 반응 표면 그래프와 등고선 그래프이다. 진세노사이드 Rg3의 생성량은 사과산의 농도가 높아짐에 따라 증가하였다가 1.3%일 때부터 유지되는 곡선을 확인하였고, 반응 온도가 높아짐에 따라 증가하였다가 온도가 50 °C일 때부터 감소하는 곡선을 확인하였다. Figure 6B 반응 온도가 50°C일 때, 사과산 농도와 반응 시간에 따라 변하는 진세노사이드 Rg3 생성량을 나타낸 3D 반응 표면 그래프와 등고선 그래프이다. 진세노사이드 Rg3의 생성량은 사과산 농도가 높아짐에 따라 증가하는 것으로 확인되었고 반응 시간이 증가함에 따라 진세노사이드 Rg3의 생성량이 증가하는 곡선을 확인하였다. Figure 6C는 사과산 농도가 1%일 때, 반응 온도와 반응 시간에 따라 변하는 진세노사이드 Rg3의 생성량을 나타낸 반응 표면 그래프와 등고선 그래프이다. 반응 온도가 높아짐에 따라 Rg3의 생성량이 증가하다 50 °C 이후부터 감소하는 곡선을 확인하였다.

4. 결 론

홍삼 추출물로부터 사포닌(RGS)을 추출 분리하고 이를 활용하여 미량 희귀 진세노사이드 중의 하나인 진세노사이드 Rg3를 효과적으로 생성시키기 위하여 사과산을 활용한 전환 방법과 이의 최적화 조건을 결정하여 산업적으로 이용 가능한 진세노사이드 Rg3제조 기술을 확립하였다.

RGS 내의 진세노사이드들을 홍삼에 함유되어 있는 유기산인 사과산을 활용한 반응을 통해 Rg3로 전환 시킬 수 있음을 확인하였고 더 나아가 Rg3생성량에 영향을 주는 요인을 확인하기 위하여 RSM을 통하여 실험 조건을 설계하였다. 주요 독립변수는 사과산 농도, 반응 온도, 반응 시간이었고 BBD 설계법에 따라 선정된 17 가지 실험 조건으로 진세노사이드 Rg3의 생성량을 통계처리에 의해 분석하였다. 진세노사이드 Rg3는 1.548 mg/L에서 최대 4.558 mg/L까지 생성이 되었다. 사과산 1%, 50 °C, 9 h 동안 반응시킨 조건에서 가장 많은 양의 진세노사이드 Rg3를 생성하였다. 이러한 설계 모델의 *p*-value는 0.0001 이하로 신뢰성 있는 모델이며 귀무가설을 채택하지 않음을 확인하였고 각각 독립변수의 유의성과 독립변수들 사이의 교호작용을 분산분석을 통하여 확인하였다. 결론적으로, 진세노사이드 Rg3의 생성에 가장 영향을 미치는 요인은 사과산의 농도, 반응 시간, 온도 순이었다. 또한, 사과산의 농도와 반응시간의 교호작용이 온도요인보다 영향도가 큰 것을 확인하였다. 이러한 연구 결과는 홍삼 희귀 진세노사이드 성분으로서 미량 존재하지만, 약리적 효과가 뛰어난 진세노사이드 Rg3를 산업적으로 생산하기 위한 응용 자료로 사용될 수 있으며 향후 화장품 분야의 기능성 물질로의 활용이 가능할 것으로 보인다.

Acknowledgement

이 논문은 충북대학교 국립대학육성사업(2022)지원을 받아 작성되었음.

References

1. L. P. Christensen, Ginsenosides chemistry, biosynthesis, analysis, and potential health effects, *Adv. Food Nutr. Res.*, **55**, 1 (2009).
2. H. Nabata, H. Saito, and K. Takagi, *Pharmacological*

- studies of neural saponins (GNS) of *Panax ginseng* root, *Jpn. J. Pharmacol.*, **23**(1), 29 (1973).
3. Y. S. Chang, E. K. Seo, C. Gyllenhaal, and K. I. Block, *Panax ginseng*: A role in cancer therapy?, *Integr. Cancer Ther.*, **2**(1), 13 (2003).
 4. C. H. Lee and J. H. Kim, A review on the medicinal potentials of ginseng and ginsenosides on cardiovascular diseases, *J. Ginseng Res.*, **38**(3), 161 (2014).
 5. E. Z. Tchilian, I. E. Zhelezarov, and C. I. Hadjiivanova, Effect of ginsenoside Rg₁ on insulin binding in mice liver and brain membranes, *Phytotherapy Res.*, **5**(1), 46 (1991).
 6. T. Yokozawa and H. Oura, Facilitation of protein biosynthesis by ginsenoside-Rb₂ administration in diabetic rats, *J. Natural Products*, **53**(6), 1514 (1990).
 7. 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).
 8. C. S. Lee, G. B. Nam, and J. S. Park, Protopanaxatriol inhibits melanin synthesis through inactivation of the pCREB-MITF-tyrosinase signalling pathway in melanocytes, *Clin. Exp. Dermatol.*, **44**(3), 295 (2019).
 9. G. B. Mahady, C. Gyllenhaal, H. S. Fong, and N. R. Farnsworth, Ginsengs: a review of safety and efficacy, *Nutr. Clin. Care*, **3**(2), 90 (2000).
 10. B. K. Vogler, M. H. Pittler, and E. Ernst, The efficacy of ginseng. A systematic review of randomised clinical trials, *E. J. Clin. Pharmacol.*, **55**(8), 567 (1999).
 11. H. Matura, R. Kasai, O. Tanaka, Y. Saruwatari, K. Kunihiro, and T. Fuwa, Further studies on dammarane-saponins of ginseng roots, *Chem. Pharm. Bull.* **32**(3), 1188 (1984).
 12. G. S. Lee, K. Y. Nam, and J. E. Choi, Ginsenoside composition and quality characteristics of red ginseng extracts prepared with different extracting methods, *Korean J. Med. Crop. Sci.*, **21**(4), 276 (2013).
 13. K. Y. Nam, The comparative understanding between red ginseng and white ginsengs process ginsengs (*Panax ginseng* C. A. Meyer), *J. Ginseng Res.*, **29**(1), 1 (2005).
 14. B. H. Han, M. H. Park, Y. N. Han, L. K. Woo, U. Sankawa, S. Yahara, and O. Tanaka, Degradation of ginseng saponins under mild acidic conditions, *Planta Med.*, **44**(3), 146 (1982).
 15. S. W. Kwon, S. B. Han, I. H. Park, J. M. Kim, M. K. Park, and J. H. Park, Liquid chromatographic determination of less polar ginsenosides in processed ginseng, *J. Chromatogr. A.*, **921**(2), 335 (2001).
 16. K. Y. Nam, J. E. Choi, S. C. Hong, M. K. Pyo, and J. D. Park, Recent progress in research on anticancer activities of ginsenoside-Rg₃, *Kor. J. Pharmacogn.*, **45**(1), 1 (2014).
 17. J. Y. Cho, Inhibitory effect of ginsenoside Rg₃ and its derivative ginsenoside Rg₃-2H on NO production and lymphocyte proliferation, *J. Ginseng Res.*, **32**(3) 264 (2008).
 18. C. Zhang, L. Liu, Y. Yu, B. Chen, C. Tang, and X. Li, Antitumor effects of ginsenoside Rg₃ on human hepatocellular carcinoma cells, *Mol. Med. Rep.*, **5**(5), 1295 (2012).
 19. S. D. Ryu, M. G. Heo, and K. S. Yoon, Factors affecting physical properties of solid sunscreen using response surface methodology, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **45**(3), 237 (2019).