

Agaricus blazei 자실체로부터 마이크로웨이브를 이용한 생리활성물질 추출공정

†최 정 우 · 류 동 열 · ¹홍 억 기 · ²권 명 상 · ³한 진 수 · 이 원 홍
서강대학교 화학공학과, ¹강원대학교 환경생물공학부, ²강원대학교 수의학과, ³삼성생명과학연구소
(접수 : 2000. 6. 13., 게재승인 : 2000. 6. 21.)

Microwave Assisted Extraction of Physiologically Active Materials from Agaricus blazei Fruiting Bodies

Jeong-Woo Choi†, Dong-Yeul Ryu, Eok-Ki Hong¹, Myung-Sang Kwun², Jin-Soo Han³, and Won Hong Lee
Department of Chemical Engineering, Sogang University, C.P.O. Box 1142, Seoul 100-611, Korea

¹Department of Environmental & Biological Engineering, Kangwon National University, Chuncheon, Kangwondo
200-701, Korea

²Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon, Kangwondo 200-701, Korea

³Samsung Biomedical Research Institute, Seoul, Korea

(Received : 2000. 6. 13., Accepted : 2000. 6. 21.)

Physiologically active material, β -glucan, extracted from mushroom has an antitumor effect. *Agaricus blazei murill* (*A. blazei*) fruiting bodies were reported to contain large amounts of β -glucan. The purpose of this study was to maximize β -glucan extraction from *A. blazei* by microwave assisted extraction method. Optimal extraction conditions were obtained under various extraction time and applied power, which was examined as 200, 500 and 650 watt. The structure and concentrations of the raffinates were analyzed by nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and infrared spectroscopy (IR). It was proved that the extraction yield of microwave assisted extraction method was higher than that of conventional solvent extraction method. It was also observed that microwave assisted extraction method requires less amounts of solvents and extraction time compared to the conventional solvent extraction method.

Key Words : *Agaricus blazei* Murill, β -glucan, microwave, extraction, mushroom

서 론

β -glucan의 항암능력에 대한 연구보고가 이루어진 이후 다양한 생리 활성 다당류의 항암활성에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다(1-4). 아가리쿠스 버섯은 β -glucan의 함유량이 매우 많고 이외에도 몇가지 생리활성물질을 가지고 있는 것으로 알려져 있어 종양에 대해 유용한 생물학적 반응조절물질의 생산체로 최근 관심을 끌고 있다. 현재까지는 아가리쿠스 버섯에 포함되어 있는 생리활성 다당류의 항암 활성 및 생물학적 반응조절에 대한 연구가 주로 수행되어 왔으며, 비교적 최근에 들어서 분리

및 추출조건에 따른 분리효율과 수율 향상에 대한 연구가 이루어지고 있다.

균체로부터 생리활성물질을 분리하기 위한 대표적인 분리방법으로는 열수 추출과 유기용매를 이용한 추출이 현재 주로 실행되고 있으며, 최근 기존방법에 비하여 높은 분리효율을 얻기 위하여 sonication, 초임계유체 추출법 등이 연구되고 있다. 본 연구팀은 기존에 유기용매를 이용한 추출방법의 최적화 연구를 수행한 결과 열수추출온도 80°C, 열수추출시간 10시간, 열수추출액의 4배에 해당하는 유기용매의 양, 유기용매 제거시간 1일의 최적 운전 조건 결과를 결정하였다(5). 하지만, 유기용매를 이용하는 열수추출 방법은 전체 공정에 소요되는 시간이 매우 길고, 수율이 높지 못하여 경제성이 떨어지는 분리방법임을 확인할 수 있었다. 따라서, 높은 분리 수율을 갖는 경제적인 추출방법의 개발이 필요하며, 이를 위하여 추출공정에 마이크로웨이브 발생장치를 결합한 새로운 추출방법을 시도하였다. 마이크로웨이브를 이용한 가열방식은

†Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,
Sogang University, C.P.O. Box 1142, Seoul 100-611, Korea
Tel : 02-705-8480
Fax : 02-711-0439
E-mail : jwchoi@ccs.sogang.ac.kr

종래의 가열방식이 물질의 표면을 가열하는 표면가열방식인데 비하여 전파에너지가 유전체의 내부에서 전달되어 열로 발생되는 원리를 이용한 것으로 가열시간이 짧고 온도분포가 균일하며, 대상물만 가열하므로 열효율이 높은 장점을 가지고 있다(6,7). 이러한 마이크로웨이브의 특징은 다당류의 분리정제에 기존의 열수추출방법에 비하여 효과적인 것으로 여겨진다.

본 연구는 *Agaricus blazei*에서 항암 특성을 가지고 있는 생리활성물질을 분리하기 위하여 마이크로웨이브를 이용한 추출공정을 적용하고 공정 운전 변수를 최적화하여 기존 열수추출방법에 비하여 높은 분리 효율과 경제성을 가지는 분리공정 개발에 대한 것이다. 마이크로웨이브를 이용한 추출공정의 최적화를 위한 운전변수로는 추출 시간과 마이크로웨이브의 출력을 선정하여 이들 운전 조건의 최적화에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 장치

아가리쿠스버섯 자실체는 강원대학교 환경생물공학부 홍억기교수로부터 동결 건조된 상태의 것을 제공받아 실험에 사용하였다. 마이크로웨이브의 발생을 위한 장치는 일본 Zorirushi사의 ES-D105를 사용하였으며, 출력값으로는 200, 500, 650 watt를 이용하였다. 추출에 사용한 유기용매는 메탄올(시약용, 대정, 한국)과 아세톤(HPLC grade, Z.T. Baker, USA)을 사용하였으며, 추출을 위한 반응기로는 teflon vessel(MARS XTH, CEM, USA)을 이용하였다. 다당류의 정성 및 정량 분석을 위한 장치로는 IR(MAGNA-IR 560, NICORET, USA)과 NMR(500 MHz, UNITY-INOVA 500, VARIAN, USA)을 사용하였다.

실험방법

아가리쿠스 버섯 자실체는 이물질 제거를 위하여 메탄올로 세척한 후 막자사발을 이용하여 3~5 cm의 크기로 분쇄하여

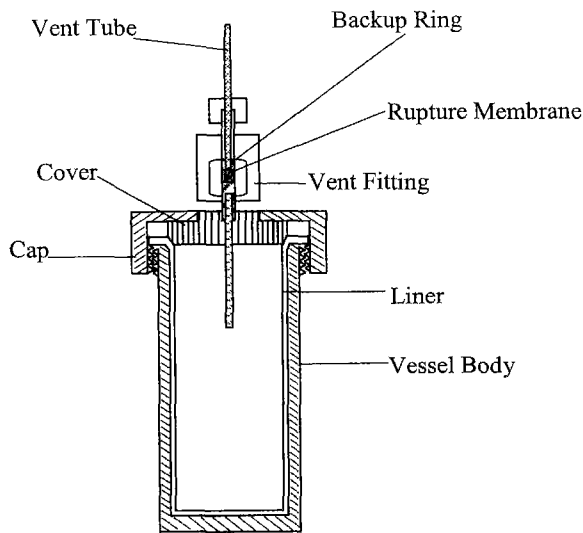


Figure 1. Schematic diagram of the lined digestion vessel.

사용하였다. 각각의 다당류 추출실험은 자실체 10 g을 증류수에 넣어 총부피를 500 mL로 하여 수행하였다. Figure 1.에 나타낸 마이크로웨이브 조사를 위한 반응기의 부피는 100 mL 정도이므로 각각의 실험은 50 mL씩 10번에 나누어 동일조건 하에서 수행하였다.

마이크로웨이브 조사는 반응기를 개방한 상태와 밀폐한 상태로 각각 수행하였으며, 이로부터 개방된 상태와 밀폐된 상태의 추출실험에서의 추출 수율과 추출 성분의 차이를 분석하였다. 개방된 상태란 반응기에서 rupture membrane을 통하여 나오는 vent tube를 개방하여 증기가 외부로 발산되는 상태를 말하며, 밀폐된 상태란 rupture membrane을 통해서 나오는 vent tube를 밀폐시켜 외부로 증기가 발산되지 않는 상태를 말한다.

마이크로웨이브를 이용한 추출조작 후, 여과지(Whatman No. 1 filter paper, USA)를 이용하여 여과하여, 여액을 상온에서 6시간 냉장시킨 후 여액부피의 두배의 아세톤과 혼합하여 4℃에서 24시간동안 방치하였다. 방치후 침전물의 형성을 육안으로 확인하였으며, 침전물의 분리를 위해 증발기를 이용하여 액체성분을 증발시켰다. 얻어진 침전물은 약간의 증류수와 혼합하여 삼투압필터를 이용하여 48시간동안 투석시켰으며, 투석으로 얻은 생성물을 7일간 동결 건조하여 최종 생성물을 얻었다. 이상의 실험방법을 개략적으로 정리하여 Figure 2에 표현하였다.

추출실험으로부터 얻은 최종생성물의 수율을 계산하였으며, infrared spectroscopy(IR) 분석을 통하여 나타난 피크값으로부터 각 성분의 농도를 측정하였으며, nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) 분석을 통하여 최종생성물의 구조를 분석하였다.

결과 및 고찰

분리 수율 비교

개방형 추출실험과 밀폐형 추출실험에서 추출시간과 마이크로웨이브 출력 등 운전조건을 달리하여 얻은 결과를 Table 1과 Table 2에 각각 표시하였다. 실험결과를 보면, 모든 실험조건에서 개방형의 경우보다 밀폐형 추출실험의 수율이 약 5%정도 높게 나타났으며, 수율향상을 위해서는 밀폐형 추출공정이 적절함을 알 수 있었다.

추출시간과 마이크로웨이브 출력에 따른 수율의 변화를 살펴보면, 추출시간과 마이크로웨이브 출력의 증가는 모두 수율을 향상시키는 결과를 보였다. 수율을 향상시키는 정도는 마이크로

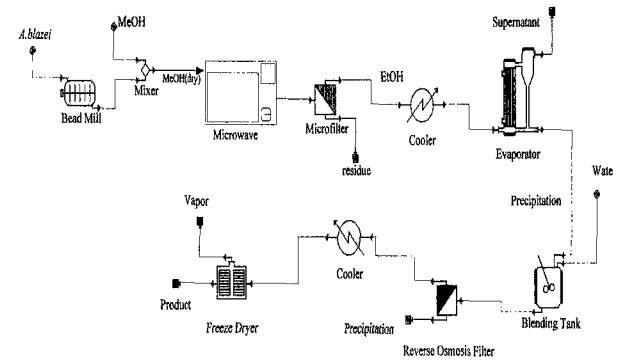


Figure 2. Experimental equipment setup for the extraction of physiological active materials from *A. blazei*.

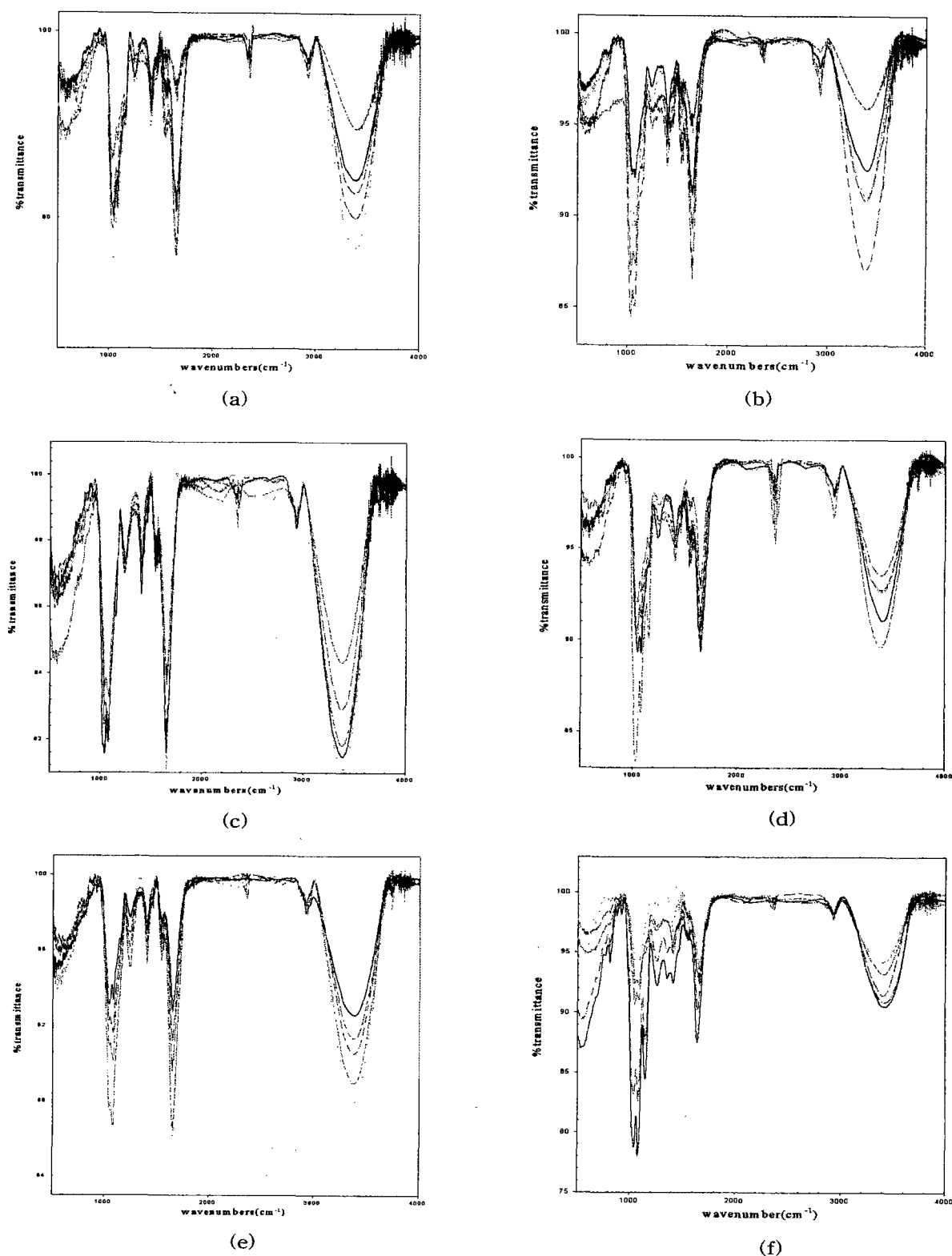


Figure 3. IR spectra of products extracted by microwave assisted extraction. (a) results of 200 watt applied power in open system (medium dashed line: 30 min, solid line: 40 min, long dashed line: 50 min, dash-dot-dot line: 60 min, dotted line: 70 min) (b) results of 200 watt applied power in closed system (medium dashed line: 30 min, solid line: 40 min, dotted line: 50 min, long dashed line: 60 min, dash-dot-dot line: 70 min) (c) results of 500 watt applied power in open system (medium dashed line: 30 min, long dashed line: 40 min, dash-dot-dot line: 50 min, solid line: 60 min, dotted line: 70 min) (d) results of 500 watt applied power in closed system (long dashed line: 30 min, dash-dot-dot line: 40 min, dotted line: 50 min, solid line: 60 min, medium dashed line: 70 min) (e) results of 650 watt applied power in open system (solid line: 30 min, long dashed line: 40 min, dash-dot-dot line: 50 min, medium dashed line: 60 min, dotted line: 70 min) (f) results of 650 watt applied power in closed system (dotted line: 30 min, medium dashed line: 40 min, long dashed line: 50 min, dash-dot-dot line: 60 min, solid line: 70 min)

Table 1. Yield (g/g) of product at various operation conditions in open system

Watt \ time(min)	30	40	50	60	70
200	0.0311	0.0321	0.0341	0.0342	0.0343
500	0.0354	0.0363	0.0382	0.0384	0.0389
650	0.0377	0.0382	0.0405	0.0411	0.417

Table 2. Yield (g/g) of product at various operation conditions in closed system

Watt \ time(min)	30	40	50	60	70
200	0.0332	0.0336	0.0352	0.0353	0.0358
500	0.0369	0.0368	0.0393	0.0396	0.0397
650	0.0383	0.0387	0.0411	0.0414	0.0421

웨이브의 출력증가가 훨씬 효과적이었다. 추출시간의 증가에 따른 수율의 증가는 추출시간이 50분까지 증가함에 따라서 선형적 수율 증가가 이루어지지만 50분 이후의 추출 시간 증가가 유도하는 수율의 증가는 매우 낮았다. 반면에 마이크로웨이브 출력의 증가에 따라서는 실험한 조건 내에서 추출 수율의 선형적 증가가 유지되는 것으로 나타났다. 따라서, 다당류 추출 수율의 향상을 위한 최적 운전조건으로 50분의 추출시간과 실험조건내에서는 650 watt의 마이크로웨이브 출력으로 밀폐형 추출방법을 이용하는 것으로 결정하였다.

본 연구자들에 의해 수행되었던 열수추출방법과 본 연구의 다당류 추출 수율을 비교해 보면 열수추출의 경우 10시간의 추출 시간, 추출액대비 4배의 유기용매량, 3일의 투석시간의 최적조건 하에서 0.0301 g/g의 다당류를 얻을 수 있었으며(5), 마이크로웨이브를 이용한 밀폐형 추출의 경우에는 50분의 추출시간, 추출액대비 2배의 유기용매량, 2일의 투석시간과 마이크로웨이브 출력 650 watt의 최적조건하에서 0.0411 g/g의 다당류를 얻음으로써 추출수율이 열수추출에 비해 36.5% 증가하였다. 수율의 증가 뿐 아니라, 마이크로웨이브를 이용한 추출은 기존의 열수추출에 비하여 추출시간은 1/10 이하로, 사용되는 용매의 양은 1/2로, 투석에 소요되는 시간은 2/3를 줄일 수 있어 추출공정의 집적화와 소형화가 가능하다.

IR 분석

Figure 3에 나타난 IR 분석결과를 보면 wave number 3000~3600 cm^{-1} 부근에 O-H 신축진동을 하는 피크가 나타나며, 2960~2820 cm^{-1} 부근에 -CH₂- 지방족이 신축진동을 하는 것이 나타난다. 그리고, 1730~1620 cm^{-1} 부근에는 C=O 결합이 나타나며, 1000~1300 cm^{-1} 부근에서 C-O 결합을 하는 두 개의 혹은 그 이상의 피크를 볼 수 있다(8-10). Figure 3을 전체적으로 보면 마이크로웨이브 출력이 높은 영역에서는 추출시간의 차이가 피크의 크기에 큰 영향을 주지 않음을 볼 수 있으며, watt수가 클수록 피크의 크기가 증가함을 알 수 있다. 추출시간은 50분까지의 증가가 피크 크기의 상당한 증가를 보이고 있어 50분의 최적추출 시간 설

정이 타당함을 알 수 있었다.

¹³C-NMR 분석

¹³C-NMR로 최종생성물을 분석한 결과, 다른 연구자들에 의한 β -glucan 분석결과와 같은 위치에서 피크를 나타내었으며(11-12), 탄소의 위치에 따른 성분을 분석하면 Table 3과 같이 같은 탄소 위치에 여러 개의 값이 나타남을 알 수 있었다. 그 이유는 가지로 연결된 당과 주 체인인 당사이의 수소이온이 서로 자리 이동을 하면서 영향을 미치는 것으로 추정하였다.

Figure 4의 (a), (b), (c)는 마이크로웨이브의 출력세기에 따른 탄소원자 하나 하나의 세기를 대략적인 값으로 표시한 것이다. Figure 4의 (a), (b), (c)는 각각 200 watt, 500 watt, 650 watt의 마이크로웨이브 출력에서 생성된 물질의 탄소 위치에 따른 세기를 표시한 것으로 추출시간이 50분 이상에서는 거의 비슷한 세기를 나타내었다. 또한, Figure 4와 Table 3의 데이터를 통하여 Figure 5에 표시한 구조를 갖는 물질이 *A. blazei*에서 추출되었음을 확인할 수 있었으며, Figure 5에 나타난 구조의 물질은 (b)부분의 -CH₂-와 (d)부분의 -O-가 연결되어 있는 형태로, (b)~(c)구조가 n개 연속적으로 연결되어 있으며 이 부분의 (1→6)

Table 3. ¹³C-NMR chemical shifts (δ) and signal assignments for natural products in D₂O (25°C, 500 MHz)

C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
104.23	74.86	87.83	71.45	77.59	69.66
104.12	74.02	87.52	69.88	77.32	62.35
	73.87	87.45	69.73	76.00	62.15
	73.80	87.25	69.66		62.04
		77.85			

가지될 수 ~수만 개 가지는 것으로 알려져 있다. 따라서, 분자량은 대략 2만~200만 정도가 될 수 있으며, *A. blazei*에서 추출한 성분은 본 연구자들의 이전 연구에 의해 분자량이 2만~100만 정도인 것으로 추정되었다(5).

요약

버섯에서 추출되는 생리활성물질인 β -glucan은 탁월한 항암 효과를 갖는 물질이다. 특히 *Agaricus blazei*에 β -glucan이 많이 포함되어 있는 것으로 보고되어져 있다. 본 연구의 목적은 마이크로웨이브를 사용하여 아가리쿠스버섯으로부터 β -glucan을 추출하는 공정의 추출효율을 극대화하는 것으로, 다양한 추출시간과 마이크로웨이브 출력을 이용하여 최적 운전조건을 결정하였다. 최적 마이크로웨이브의 최적 출력은 200, 500, 650 watt의 경우에서 실험하여 결정하였다. 추출물질의 구조와 농도 분석은 nuclear magnetic resonance spectroscopy와 infrared spectroscopy를 이용하여 수행하였다. 본 실험 결과로 마이크로웨이브를 이용한 추출의 다당류 수율이 전통적인 열수추출방법보다 향상됨을 확인하였고, 소량의 용매와 짧은 추출 시간으로 향상된 수율을 얻을 수 있음을 알 수 있었다.

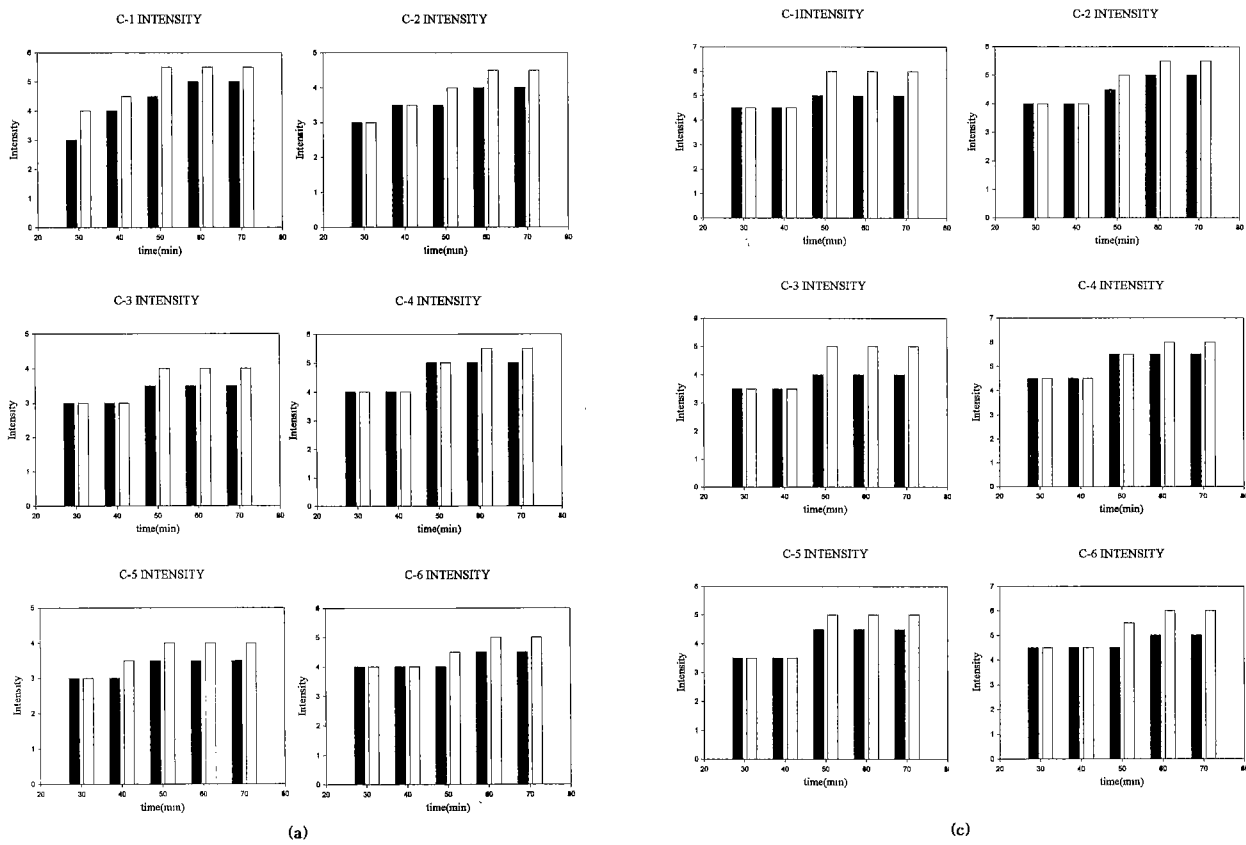


Figure 4. The results of ¹³C-N MR analysis (black bar: open system, white bar: closed system). (a) Applied power 200 watt (b) Applied power 500 watt (c) Applied power 650 watt.

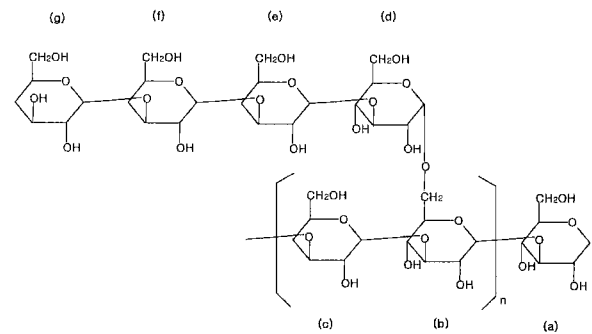
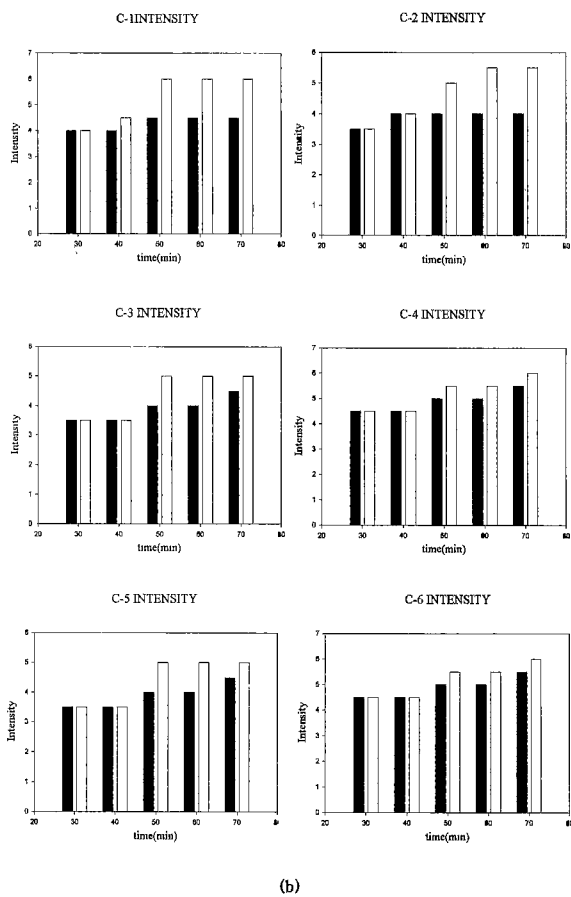


Figure 5. Chemical structure of products; n represent the number of repeating sequences of residues b and c commensurate with the length of the branch.

감사의 글

본 연구는 농림부의 농림기술개발사업(과제번호 : 297075-3)의 지원에 의하여 수행된 연구의 결과이며 연구비 지원에 대하여 깊은 감사를 드립니다.

REFERENCES

1. Takashi, M., T. Hagiwara, T. Nakamura, I. Hitoshi, K. Shimura, T. Sumiya, and A. Akihiro (1990), Antitumor Activity and Some Properties of Water-soluble Polysaccharides from

- Himematsutake, the Fruiting Body of *Agaricus blazei murill*, *Agric. Biol. Chem.*, **54**(11), 2889-2896.
- Nakamura, T., I. Hitoshi, S. Keishiro, S. Toshimitsu and A. Akihiro (1990), Antitumor Activity and Some Properties of Water-insoluble Hetero-glycans from Himematsutake, the Fruiting Body of *Agaricus blazei murill*, *Agric. Biol. Chem.*, **54**(11), 2897-2905.
 - Tabata, K., I. Wataru, K. Takemasa, K. Shozo, and M. Akira (1981), Ultrasonic Degradation of Schizophyllan, an Antitumor Polysaccharide Produced by *Schizophyllum commune* Fries, *Carbohydr. Res.*, **89**, 121-135.
 - Misaki, A., M. Kakuta, T. Sasaki, T. Motohiro, and M. Hideki (1981), Studies on Interrelation of Structure and Antitumor Effects of Polysaccharides: Antitumor Action of Periodatemoified, Branched (1→3)-β-D-glucan of *Auricularia auricula-judae*, and Other Polysaccharides Containing (1→3)-glycosidic Linkages, *Carbohydr. Res.*, **92**, 115-129.
 - Choi, J. W., D. Y. Ryu, Y. K. Kim, E. G. Hong, M. S. Kwun, and J. S. Han (2000), Extraction and Purification of Bioactive Materials from *Agaricus blazei* Fruiting Bodies, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, accepted.
 - David, M. P. (1990), *Microwave Engineering*, 2nd ed, p1-11, Addison- Wesley Publishing Company, New York.
 - John, M. O. (1984), A History of Microwave Heating Applications, *Transactions on Microwave Theory and Techniques*, **9**, 1200-1223.
 - Kim, B. K., E. R. James, K. S. Chung, H. S. Chung, and E. C. Choi (1982), Antitumor Components of *Cryptoporus volvatus*, *Kor. J. Mycol.*, **10**(3), 111-117.
 - Kawagishi, H., I. Ryuichi, T. Kanao, M. Takashi, S. Keishiro, I. Hitoshi, H. Toshihiko, and N. Takuji (1989), Fractionation and Antitumor Activity of the Water-in-soluble Residue of *Agaricus blazei* Fruiting Bodies, *Carbohydr. Res.*, **186**, 267-273.
 - Gandon, C. and B. Maud (1998), Structural Studies of the Extracellular β-D-glucans from *Phytophthora parasitica dastur*, *Carbohydr. Res.*, **313**, 259-263.
 - Dais, P. and S. P. Arthur (1982), High-Field, ¹³C-NMR. Spectroscopy of β-D-glucans, Amylopectin, and Glycogen, *Carbohydr. Res.*, **100**, 103-116.
 - Kitamura, S., H. Tsutomu, K. Kurita, K. Takeo, H. Chihiro, I. Wataru, K. Tabata, A. Elgsaeter, and T. S. Bjorn (1994), An Antitumor, Branched (1→3)-β-D-glucan from a Water Extract of Fruiting Bodies of *Cryptoporus volvatus*, *Carbohydr. Res.*, **263**, 111-121.