

반응표면분석법을 이용한 차가버섯(*Inonotus obliquus*)의 생리활성물질 최적 추출조건 탐색

김재철 · 이해창 · 이기욱 · 황금택* · 유기춘¹
서울대학교 식품영양학과 · 생활과학연구소, ¹(주)디에이치에프

Optimization of the Extraction of Bioactive Compounds from Chaga Mushroom (*Inonotus obliquus*) by the Response Surface Methodology

Jaechool Kim, Haechang Yi, Kiuk Lee, Keum Taek Hwang*, and Gichun Yoo¹

Department of Food and Nutrition, and Research Institute of Human Ecology, Seoul National University
¹DHF Co., Ltd.

Abstract This study determined the optimum extraction conditions based on five response variables (yield, total phenolics, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) free radical scavenging activity, oxygen radical absorbance capacity (ORAC), and β -1,3-glucan content) in chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) using the response surface methodology, where three independent variables (ethanol concentration, extraction temperature, and extraction time) were optimized using a central composite design. The optimum ethanol concentration, extraction temperature, and extraction time were 50% (w/w), 88.7°C, and 14.5 h; 9.2%, 92.7°C, and 14.5 h; 50.8%, 92.7°C, and 14.5 h; 9.2%, 92.7°C, and 1.5 h; and 90.8%, 92.7°C, and 1.5 h for yield, total phenolics, ABTS, ORAC, and β -1,3-glucan content, respectively. The predicted values of the response variables were compared with those of the extracts under the optimal extraction conditions to verify the models. The optimum extraction condition for the five response variables was predicted to be 81.4% ethanol at 92.7°C for 14.5 h.

Keywords: antioxidant activity, chaga mushroom, extraction condition, β -1,3-glucan, response surface methodology

서 론

차가버섯(*Inonotus obliquus*)은 기생 곰팡이류(parasitic fungus)로 주로 자작나무에 기생하여 나무의 영양분을 축적하며 껍질을 뚫고 점점 외부로 돌출되어 단단한 덩어리 형태로 나무의 표면에 성장하는 특성을 가진 소나무비늘버섯과(Hymenochaetaceae)에 속하는 버섯이다. 차가버섯은 북위 45-50°에 위치한 러시아의 시베리아, 캐나다 북부, 일본의 북해도, 중국과 북한의 일부 지역에서 자생하고 있으며, 형태학적으로 표면이 검은 큰 덩어리로 이루어져 갓(pileus)이 존재하지 않으며, 버섯의 90% 이상이 균핵(sclerotia)으로 이루어진 것이 특징이다(1). 전통적으로 차가버섯은 16세기부터 러시아와 폴란드 및 발틱 국가에서 약용 버섯으로 이용되어왔으며, 주로 폐결핵, 간질환, 위염, 위장관 암, 심혈관계 질환, 당뇨병 등에 처방되어 온 기록이 남아있다(2). 최근 차가버섯의 기능성에 대한 연구가 활발히 진행되었고, 차가버섯 추출물은 다양한 폴리페놀과 플라보노이드를 함유하고 있어 강력한 항산화제로 작용한다고 보고되었다(2-4). 또한 다른 버섯들처럼 차

가버섯은 다양한 다당류를 가지고 있으며, 그 중 β -glucan은 다양한 기능성을 갖고 있어 주목 받고 있다. β -Glucan은 면역계를 활성화시키고(5) 항종양 효과를 가지는 것으로 보고되었다(6). 또한 β -glucan의 종류 중 하나인 β -1,3-glucan은 면역력 강화와 항종양 효과가 있다고 보고되었다(7). 이처럼 차가버섯은 다양한 기능성물질을 가지고 있으므로 기능성 버섯으로의 활용가능성에 대하여 활발히 연구되고 있다.

차가버섯은 단단한 조직으로 인하여 버섯 자체로 식용이 불가능하기 때문에 추출하여 섭취하는 것이 일반적이다. 반응표면분석법은 통계적 방법을 이용하여 최소한의 실험 횟수로 최대의 정보를 얻기 위해 시행하는 실험계획법(design of experiments, DOE)의 하나로 실험 계획에 따라 실험하여 얻은 데이터에서 적절한 모델 함수를 얻어 반응 변수가 최대가 되는 반응 조건을 최적화시키는 수리 통계적 기술이다(8). 식품산업에서 반응표면분석법은 추출물의 제조 시 최적화된 추출조건 확립을 위하여 사용되고 있다(9). 반응표면분석법을 버섯에 적용한 선행연구로는 BaChu 버섯과 아가리쿠스 버섯(*Agaricus blazei*)의 다당류 추출조건 최적화에 대한 연구가 있다(10,11). 또한 반응표면분석법은 양송이 버섯의 건조공정 최적화에 사용되기도 하였다(12).

일반적으로 차가버섯 추출 분말은 열수추출 방식으로 제조된다. 물은 약용버섯을 비롯한 식품 추출물 제조 시 가장 널리 사용되는 용매이지만 친수성의 물질만 추출할 수 있다는 한계를 가지고 있다. 또한 추출조건에 따른 차가버섯 추출물의 생리활성물질 함량과 항산화능이 최대가 되는 추출 공정의 최적화에 관한

*Corresponding author: Keum Taek Hwang, Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
Tel: 82-2-880-2531
Fax: 82-2-884-0305
E-mail: keum@snu.ac.kr
Received January 29, 2015; revised March 2, 2015;
accepted March 11, 2015

연구는 없는 실정이다. 이에 본 연구에서는 차가버섯 추출물의 제조조건에 세가지 독립변수(에탄올 함량, 추출 온도, 추출 시간)를 이용하여 반응표면분석법을 통해 추출 수율, 총 폴리페놀 함량, 항산화능(ABTS free radical scavenging activity, ORAC), 총 glucan 함량, β -glucan 함량, β -1,3-glucan 함량이 최대로 나타나는 조건을 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 시약

러시아의 튜멘 지역에서 채취한 차가버섯을 (주)DHF (Seoul, Korea)를 통하여 제공받아 사용하였다.

실험 시약 중 Folin Ciocalteu's phenol reagent, gallic acid, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), potassium persulfate, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), fluorescein salt, glycine은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Sodium carbonate, sodium hydroxide, potassium hydroxide, acetic acid (glacial), hydrochloric acid, 99.5% ethanol, aniline blue는 삼전화학(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 2,2-Azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH)와 curdlan은 Wako-Chemical (Osaka, Japan)에서 구입하였다. Potassium phosphate monobasic은 동양제철화학(Seoul, Korea)에서 구입하였으며, potassium phosphate dibasic은 Junsei Chemical (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 총 glucan과 β -glucan 함량은 mushroom β -glucan kit (K-YBGL, Megazyme International, Wicklow, Ireland)를 구입하여 측정하였다.

반응표면분석법 설계

세 가지의 독립변수(인자)로 에탄올 농도(X_1 , % (v/v)), 추출 온도(X_2 , °C), 추출시간(X_3 , h)을 사용하여 반응표면분석법 중 중심 합성계획법(central composite design)을 이용하였다. 실험 범위에 따라 부호화된 독립변수와 코드화되지 않은 독립변수는 Table 1과 같다. 본 연구는 3개의 인자와 3개의 수준으로 이루어져 중심점이 6개(cube: 4, axial: 2)이며 축점($\alpha=1.633$)에서의 실험이 추가된 총 20개의 실험으로 구성하였다(Table 2). 추출조건과 순서는 Table 2와 같이 임의의 순서로 진행하였다. 최적화하려는 반응 변수(response variable)는 추출수율, 총 폴리페놀 함량, ABTS 자유 라디칼 소거능, ORAC, 총 glucan 함량, β -glucan 함량, β -1,3-glucan 함량이며, 다음과 같은 반응변수 각각의 이차 회귀식을 유도하였다(9).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j$$

차가버섯의 추출물 제조

차가버섯은 껍질을 분리한 후 믹서를 이용하여 분쇄하였고 분쇄한 가루를 35 mesh의 testing sieve (Chunggye Sanggongsa,

Seoul, Korea)로 거른 후 진공 포장기(M-6TM, Leepack Co., Incheon, Korea)를 이용하여 polyethylene pouch (Rollpack, Pyeongtaek, Korea)에 포장하여 실온에 보관하며 추출에 사용하였다.

차가버섯 분말을 항온수조(Daihan Scientific Co., Seoul, Korea)를 이용하여 환류 추출하였다. 차가버섯 분말 10 g을 둥근 플라스크에 넣고 추출 용매 400 mL를 사용하여 추출하였다. 추출이 끝난 후 5000×g에서 15분간 원심분리(Mega21R, Hanil Corp., Seoul, Korea)한 후 Whatman #4 filter paper (Whatman Co., Maidstone, UK)를 이용하여 여과하였다. 여과액을 감압 농축기(N-1000VW, Eyela Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 농축한 후, 동결건조(NB-504, Ilshin Co., Dongducheon, Korea)하여 -20°C 에서 냉동 보관하며 실험에 사용하였다.

추출 수율

시료의 추출 수율(% (w/w))은 추출물 제조에 사용된 차가버섯 분말 무게에 대한 동결 건조 고형분의 무게의 백분율로 나타내었다.

총 폴리페놀 함량

각 시료의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 시약을 이용한 Singleton 등(13)의 방법을 이용하여 분석하였다. 시료의 농도는 gallic acid를 표준물질로 사용하여 작성한 검량선의 범위가 되도록

Table 2. Experimental order of central composite design used for response surface methodology with three independent variables for chaga mushroom extraction

Standard order	Run order	Ethanol concentration (X_1 , % (v/v))	Temperature (X_2 , °C)	Time (X_3 , h)
1	8	-1 (25)	-1 (40)	-1 (4)
2	6	1 (75)	-1 (40)	-1 (4)
3	4	-1 (25)	1 (80)	-1 (4)
4	10	1 (75)	1 (80)	-1 (4)
5	2	-1 (25)	-1 (40)	1 (12)
6	3	1 (75)	-1 (40)	1 (12)
7	5	-1 (25)	1 (80)	1 (12)
8	11	1 (75)	1 (80)	1 (12)
9	9	0 (50)	0 (60)	0 (8)
10	7	0 (50)	0 (60)	0 (8)
11	12	0 (50)	0 (60)	0 (8)
12	1	0 (50)	0 (60)	0 (8)
13	16	$-\alpha$ (9.2)	0 (60)	0 (8)
14	19	α (90.8)	0 (60)	0 (8)
15	14	0 (50)	$-\alpha$ (27.3)	0 (8)
16	17	0 (50)	α (92.7)	0 (8)
17	18	0 (50)	0 (50)	$-\alpha$ (1.5)
18	15	0 (50)	0 (50)	α (14.5)
19	13	0 (50)	0 (50)	0 (8)
20	20	0 (50)	0 (50)	0 (8)

Table 1. Independent variables and their coded and actual values used for optimization of extraction condition of chaga mushroom

Independent variable	Units	Symbol	Coded levels				
			$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Ethanol concentration	% (v/v)	X_1	9.2	25	50	75	90.8
Temperature	°C	X_2	27.3	40	60	80	92.7
Time	h	X_3	1.5	4	8	12	14.5

록 물에 희석하였다. 이 희석한 추출물 20 µL에 증류수 1.58 mL를 첨가하고 2 N Folin-Ciocalteu 시약을 100 µL씩 넣어서 3분간 반응시켰다. 이 반응액에 20% (w/v) Na₂CO₃ 용액 300 µL를 가하고 40°C에서 30분 동안 반응시켰다. 그 후 각 시료들의 흡광도를 Spectramax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)을 이용하여 765 nm에서 측정하였다.

ABTS 자유 라디칼 소거능

ABTS 자유 라디칼 소거능은 Re 등(14)의 방법에 따라 측정하였다. 7 mM의 ABTS diammonium salt를 증류수에 용해시켜 만든 용액과 2.45 mM potassium persulfate 용액을 2:1의 비율로 섞어 암소에서 12시간 동안 반응시켜 ABTS 자유 라디칼 용액을 만든 후 734 nm에서 용액의 흡광도 값이 0.700±0.05가 되도록 에탄올로 희석하였다. 시료 10 µL를 1 mL의 ABTS 자유 라디칼 용액과 1분 동안 반응시키고 5분 내에 혼합한 후 Spectramax 190를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 분석 결과는 trolox를 비교 물질로 사용하여 TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity)로 나타내었다.

Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

ORAC은 Huang 등(15)의 방법을 변형하여 측정하였다. AAPH는 75 mM phosphate buffer (pH 7.4)에 녹여 최종농도가 153 mM이 되도록 한 후 냉장보관하여 사용하였다. Fluorescein stock solution (4×10⁻³ mM)은 75 mM phosphate buffer (pH 7.4)에 녹여 빛에 노출시키지 않고 4°C에 보관하였다. Fluorescein stock solution은 사용 시 75 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 희석하여 40 nM의 농도가 되도록 하였다. µClear® black clear bottom 96-well microplate (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany)에 40 nM fluorescein solution 150 µL와 75 mM phosphate buffer (pH 7.4)에 녹인 시료 25 µL를 가하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 25 µL의 153 mM AAPH 용액을 가한 후 37°C에서 90초 간격으로 100 cycle 동안 fluorescence microplate reader FLx800 (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)을 이용하여 excitation 485 nm와 emission 520 nm에서 형광 값을 측정하였다. 총 cycle 동안 측정된 형광 값은 아래의 방법으로 AUC (area under the curve; (a))와 net AUC (b)를 구하였다.

$$AUC=0.5+f_1/f_0+... f_i/f_0+...+f_{100}/f_0+0.5(f_{100}/f_0) \quad (a)$$

f_0 =initial fluorescence reading at 0 min

f_i =fluorescence reading at cycle i

$$Net AUC=AUC sample-AUC blank \quad (b)$$

표준물질로 사용한 trolox의 농도별 net AUC 값을 이용하여 검량선을 그리고 각 시료별 TEAC를 산출했다.

Glucan 함량

Mushroom β-glucan kit에서 제공한 방법에 따라 이 kit를 사용하여 총 glucan과 α-glucan 함량을 측정하고 α-glucan 함량을 제외한 나머지를 β-glucan의 함량으로 계산하였다. β-1,3-Glucan의 함량 분석은 β-1,3-glucan의 β-1,3 결합에 aniline blue 염색약이 반응하여 fluorescence가 발현되는 현상을 이용한 Ko와 Lin(16)의 방법으로 측정하였다. 시료를 1 N NaOH로 희석하여 300 µL를 취해 1.5 mL tube에 넣은 뒤 30 µL의 6 N NaOH를 가하고 80°C에서 30분간 배양하였다. 배양이 끝나면 즉시 얼음 위로 옮겨 방냉한 후 0.1% aniline blue 수용액과 1 N HCl과 1 M glycine-

NaOH buffer (pH 9.5)를 40:21:59의 비율로 혼합한 dye mixture를 630 µL를 가하였다. 그 후 50°C에서 30분간 배양하여 β-1,3-glucan과 fluorochrome complex를 형성시킨 후 실온에서 30분간 방냉하였다. 그 후 excitation 398 nm와 emission 502 nm에서 fluorescence를 측정(FLx800, Bio-Tek Instruments Inc.)하였다. 표준물질로는 curdlan을 이용하여 검량선을 그려 β-1,3-glucan 함량을 구하였다.

통계 분석 및 반응표면모델의 검증

모든 반응 변수는 다중회귀분석(multiple regression analysis)과 분산분석(ANOVA)을 수행하였고, 이로부터 얻은 이차 회귀식을 통하여 반응모델의 적합성을 검증하였으며, 통계 분석은 Minitab 14 software (Minitab Inc., State College, PA, USA)를 이용하였다. 반응모델의 반응표면그래프와 등고선도는 SciDAVis software v0.2.4 (open source software)를 이용하였다. 최적 추출조건을 찾기 위한 과정으로 정상점(stationary point)의 형태를 통하여 반응표면그래프와 등고선도가 최대점(maximum point), 최소점(minimum point), 안장점(saddle point) 및 능선(rising ridge)의 형태인지를 판단하였다. 그 후 Minitab software를 이용하여 최적 추출조건을 예측하였고, 실제 실험을 통하여 예측된 값의 정확도를 검증하였다. 예측 값과 실험 값의 차이는 상대오차(relative error)로 나타내어 모델의 정확도를 검증하였다. 각 반응변수에 대한 반응모델의 정확도를 검증하여 추출조건에 따른 반응을 설명하는데 적합하다고 판단되면 모든 반응변수를 최적화할 수 있는 하나의 추출조건을 설정하였다.

결과 및 고찰

반응변수의 통계분석

본 연구에서는 반응표면분석법 중 중심합성법을 이용하여 추출조건에 따른 총 20회의 실험을 계획하였고 각 반응 변수의 실험값을 다중회귀분석 및 분산분석을 통하여 분석하였다. 실험 조건에 따른 각 반응변수의 실험값은 Table 3과 같고 유도된 이차 회귀식은 Table 4와 같다.

추출 수율은 실험 조건 14번(X_1 : 90.8%, X_2 : 60°C, X_3 : 8 h)에서 가장 낮았고(4.7±0.3%), 실험 조건 16번(X_1 : 50%, X_2 : 92.7°C, X_3 : 8 h)에서 26.3±0.7%로 가장 높았다(Table 3). 이는 에탄올 함량이 가장 높은 용매를 사용한 추출조건에서 추출 수율이 최저로 나타난 선행연구의 결과와 일치하였다(17,18). 반응모델의 적합도를 나타내는 이차 회귀식의 R² 값은 0.984이었고 $p<0.001$ 수준에서 유의하였다(Table 4). 회귀분석 결과 에탄올 함량의 이차항(X_2^2)이 $p<0.001$ 수준에서 유의하였으므로(Table 5), 에탄올 함량이 추출 수율에 가장 큰 영향을 주는 조건이라고 판단된다.

총 폴리페놀 함량은 실험 조건 16번(X_1 : 50%, X_2 : 92.7°C, X_3 : 8 h)에서 최대(329±18 mg GAE/g)였으며, 실험 조건 6번(X_1 : 75%, X_2 : 40°C, X_3 : 12 h)에서 최소(71±3 mg GAE/g)였다(Table 3). 이차 회귀식의 R² 값은 0.859로 $p<0.01$ 수준에서 유의하였다(Table 4). 총 폴리페놀 함량은 추출 온도가 높아지고 추출 시간이 길어짐에 따라 증가하였고, 회귀 분석 결과, 추출 온도(X_2)와 추출 온도의 이차항(X_2^2)이 $p<0.01$ 수준에서 유의하였다(Table 5). 본 연구의 결과는 노랑느타리 버섯에서 추출 시간과 에탄올 농도가 총 폴리페놀 함량에 유의적인 영향을 주지 않는다는 보고와 일치하였으나(18), 송이버섯에서 추출 온도와 추출 용매의 비율이 유의적으로 총 폴리페놀 함량에 영향을 미친다는 보고(19)와는 다른 경향을 나타내었다. 이러한 추출조건에 따른 총 폴리페놀 함량의

Table 3. Experimental data of response variables for optimization of extraction condition of chaga mushroom

Experiment number	Extraction yield (% w/w)	Total phenolics (mg GAE/g)	ABTS ($\mu\text{M TEAC/mg}$)	ORAC ($\mu\text{M TEAC/mg}$)	Total glucans (mg/g)	β -Glucans (mg/g)	β -1,3-Glucans (mg/g)
1	17.3±0.7	124±24	537±14	1294±59	33.8±0.4	25.7±0.4	nd*
2	6.3±0.1	121±16	377±7	1330±112	37.1±1.4	31.6±0.9	10.7±1.3
3	23.2±0.3	126±17	604±16	1739±66	35.0±1.5	25.3±1.7	nd
4	12.7±0.5	113±4	724±24	1774±174	36.9±1.2	28.9±1.4	18.7±1.3
5	17.5±0.1	122±12	280±8	1430±145	31.5±0.6	23.1±0.9	nd
6	7.2±0.2	71±3	661±14	1448±108	34.4±0.8	28.8±0.6	22.7±1.3
7	25.8±0.1	281±26	916±17	1908±36	39.0±0.3	30.3±1.6	nd
8	15.4±0.3	178±8	670±16	1437±133	36.8±0.2	27.0±0.4	22.7±1.3
9	19.8±0.5	98±3	695±6	1294±139	35.2±0.4	26.8±0.6	nd
10	19.8±0.1	103±6	695±11	1339±119	35.6±0.6	26.2±1.1	nd
11	19.1±0.5	105±7	686±24	1281±38	34.6±0.5	26.9±1.7	nd
12	19.9±0.2	108±9	687±11	1172±47	34.3±0.2	27.5±0.3	nd
13	18.3±0.8	136±8	522±24	1053±135	20.7±0.2	14.3±0.3	nd
14	4.7±0.3	96±13	757±22	1552±63	29.7±0.5	24.3±0.6	22.3±0.8
15	10.7±0.5	153±16	449±34	910±165	22.1±0.3	16.2±0.3	nd
16	26.3±0.7	329±18	980±30	1547±123	42.8±1.6	34.3±1.8	9.4±1.3
17	18.8±0.5	179±12	284±28	1670±223	23.5±0.5	16.7±0.3	nd
18	20.1±0.6	117±4	578±28	1668±59	26.3±0.5	18.4±0.4	5.4±1.3
19	20.2±0.8	109±4	675±13	1184±125	35.3±0.2	28.3±0.3	nd
20	21.1±0.4	105±3	650±9	1137±35	35.1±0.4	28.1±0.3	nd

*nd: not detected

Table 4. Second-order polynomial equations for yield, total phenolics, ABTS, ORAC, and β -1,3-glucans in the extracts from chaga mushroom

Responses	Second-order polynomial equations	R ²	p-Value
Yield	$Y = -0.560329 + 0.321986X_1 + 0.346059X_2 + 0.042405X_3 - 0.005236X_1^2 - 0.001619X_2^2 - 0.018209X_3^2 + 0.000050X_1X_2 + 0.000750X_1X_3 + 0.006250X_2X_3$	0.984	<0.001
Total phenolics	$Y = 502.008 + 2.231X_1 - 13.491X_2 - 23.729X_3 - 0.006X_1^2 + 0.108X_2^2 + 0.511X_3^2 - 0.016X_1X_2 - 0.174X_1X_3 + 0.425X_2X_3$	0.858	0.003
ABTS	$Y = -218.418 + 6.961X_1 + 4.117X_2 + 72.876X_3 - 0.021X_1^2 + 0.038X_2^2 - 5.695X_3^2 - 0.087X_1X_2 + 0.219X_1X_3 + 0.361X_2X_3$	0.789	0.018
ORAC	$Y = 885.544 + 5.219X_1 + 12.455X_2 - 117.760X_3 + 0.087X_1^2 + 0.066X_2^2 + 11.976X_3^2 - 0.123X_1X_2 - 0.655X_1X_3 - 0.659X_2X_3$	0.813	0.011
β -1,3-glucan	$Y = 28.2220 - 0.7037X_1 - 0.6069X_2 - 1.3496X_3 + 0.0076X_1^2 + 0.0058X_2^2 + 0.0978X_3^2 + 0.0020X_1X_2 + 0.0200X_1X_3 - 0.0125X_2X_3$	0.962	<0.001

차이는 버섯류를 비롯한 다양한 식물에 존재하는 폴리페놀의 구성이 서로 다르며 이에 따라 추출 용매에 대한 용해도가 달라지는 것(20)이 원인이라 생각한다.

ABTS 자유 라디칼 소거능은 실험 조건 16번(X_1 : 50%, X_2 : 92.7°C, X_3 : 8 h)에서 최대(980±30 mM TEAC/mg)이었고, 실험 조건 17번(X_1 : 50%, X_2 : 60°C, X_3 : 1.5 h)에서 최소(284±27 mM TEAC/mg)이었다(Table 3). 이차 회귀식의 R² 값은 0.789로 $p < 0.05$ 수준에서 유의하였다(Table 4). 회귀 분석 결과, 추출 시간의 이차항(X_3^2)이 $p < 0.05$ 수준에서 유의하므로 추출 시간이 ABTS 자유 라디칼 소거능에 가장 큰 영향을 주는 추출조건이라고 판단한다(Table 5). ORAC은 실험 조건 7번(X_1 : 25%, X_2 : 80°C, X_3 : 12 h)에서 최대(1908±36 $\mu\text{M TEAC/mg}$)였으며, 실험 조건 15번(X_1 : 50%, X_2 : 27.3°C, X_3 : 8 h)에서 최소(910±165 $\mu\text{M TEAC/mg}$)였다(Table 3). 이차 회귀식의 R² 값은 0.813으로 $p < 0.05$ 수준에서 유의하였다(Table 4). 회귀 분석 결과, 추출 시간의 이차항(X_3^2)이 $p < 0.01$ 수준에서 유의하였다(Table 5). 항산화능을 나

타내는 지표인 ABTS free radical scavenging activity와 ORAC은 추출 시간이 반응 변수에 유의적인 영향을 미치는 것으로 나타났다.

총 glucan과 β -glucan 함량에서 얻어진 이차 회귀식의 R² 값은 각각 0.465 ($p = 0.517$)와 0.468 ($p = 0.509$)으로 유의적이지 않아 추출조건을 최적화할 수 없었다. XuJie 등(10)의 BaChu 버섯 다당류 추출조건 최적화에 관한 연구에서 다당류의 최적 추출 온도는 94°C이며, 다당류의 추출함량은 추출 온도가 80°C 이상일 때 급격히 증가하였다. 또한 상황버섯(*Phellinus igniarius*)의 다당류 추출 최적화 연구에서 다당류 추출 수율의 증가는 70°C 이상에서 이루어졌다(21). 이로부터 다당류 추출량은 70°C 이상의 고온에서 증가함을 알 수 있다. 본 연구는 다양한 반응 변수를 고려하기 위하여 실험 조건에 따라 추출 온도를 최소 27.3°C와 최대 92.7°C로 설정하였으나, 추출 온도가 80°C 이상인 실험 조건이 5개에 불과하여 실험조건에 따른 추출량의 차이가 크지 않아 유의적인 이차 회귀식의 유도에 실패하였으나, 총 glucan과 β -glucan

Table 5. Significance of regression equations (*p*-value) and ANOVA for yield (*Y*₁), total phenolics (*Y*₂), ABTS (*Y*₃), ORAC (*Y*₄), and β-1,3-glucans (*Y*₅) in the extracts from chaga mushroom

Source	Term	Response variable				
		<i>Y</i> ₁	<i>Y</i> ₂	<i>Y</i> ₃	<i>Y</i> ₄	<i>Y</i> ₅
Regression analysis	Constant	0.908	0.006**	0.676	0.229	0.025*
	<i>X</i> ₁	0.001**	0.348	0.39	0.632	0.002**
	<i>X</i> ₂	0.007**	0.002**	0.717	0.428	0.026*
	<i>X</i> ₃	0.927	0.115	0.163	0.105	0.214
	<i>X</i> ₁ ²	<0.001***	0.691	0.687	0.232	<0.001***
	<i>X</i> ₂ ²	0.051	0.001**	0.637	0.548	0.005**
	<i>X</i> ₃ ²	0.341	0.374	0.015*	0.001**	0.038*
	<i>X</i> ₁ <i>X</i> ₂	0.948	0.516	0.305	0.289	0.263
	<i>X</i> ₁ <i>X</i> ₃	0.845	0.165	0.597	0.259	0.039*
	<i>X</i> ₂ <i>X</i> ₃	0.212	0.014*	0.488	0.357	0.263
ANOVA	Regression	<0.001***	0.003**	0.018*	0.011*	<0.001***
	Linear	0.004**	0.005**	0.480	0.214	0.008**
	Quadratic	<0.001***	0.005**	0.080	0.008**	<0.001***
	Interaction	0.625	0.047*	0.594	0.357	0.094

p*<0.05; *p*<0.01; ****p*<0.001

Table 6. Optimum extraction conditions of chaga mushroom and comparison of predicted and observed values for verification

Response	Optimum extraction condition			Predicted	Observed ^a	Relative error (%)
	Ethanol content (% v/v)	Temperature (°C)	Time (h)			
Yield (% w/w)	50	88.7	14.5	26	25.9±0.1	0.4
Total phenolics (mg GAE/g)	9.2	92.7	14.5	495	460±6	7
ABTS (μM TEAC/mg)	50.8	92.7	14.5	885	880±15	0.6
ORAC (μM TEAC/mg)	9.2	92.7	1.5	2313	2023±18	12.5
β-1,3-glucans (mg/g)	90.8	92.7	1.5	36.3	38.6±1.6	6.3

^aMean±standard deviation (*n*=3)

함량은 추출 온도가 가장 높은 92.7°C에서 최대값을 보여 선행 연구와 유사하였다(10,21).

β-1,3-Glucan 함량의 이차 회귀식의 R² 값은 0.962로 *p*<0.001 수준에서 유의하였다(Table 4). 회귀 분석 결과, 에탄올 함량의 일차항(*X*₁)과 이차항(*X*₁²)이 각각 *p*<0.01와 *p*<0.001 수준에서 유의하였고(Table 5), 에탄올 함량이 50% 이하인 추출조건 중 최고 추출 온도(92.7°C)인 실험 조건 16번과 최장 추출 시간(14.5 h)인 실험 조건 18번을 제외한 추출조건에서는 검출되지 않아(Table 3), 에탄올 함량이 β-1,3-glucan 추출에 유의적인 영향을 주는 것으로 판단된다. β-1,3-Glucan의 추출법을 연구한 Ko와 Lin(16)의 연구에 따르면 여러 식품 중 표고버섯(*shiitake pileus*)과 흰목이버섯(snow mushroom)에서 열수추출 시 소량의 β-1,3-glucan이 각각 0.07±0.02 mg/g과 0.58±0.05 mg/g 검출되었다고 보고하였으나, 본 연구에서는 에탄올 함량이 낮은 추출조건에서는 검출되지 않았다. 반면에 본 연구는 β-1,3-glucan 함량이 최대 22.7±1.3 mg/g로 나타나, 앞서 보고된(16) 다른 버섯에 비하여 추출량의 차이가 크므로 차가버섯을 이용한 β-1,3-glucan의 추출은 효율적이라고 판단한다.

최적 추출조건의 결정 및 모델의 검증

추출조건에 따른 반응변수의 이차 회귀식이 유의적일 때 추가적으로 반응표면그래프와 등고선도를 사용하여 이차 회귀식 모델의 형태를 파악하였고 최적 추출조건을 결정하였다. 각 반응변

수의 반응표면그래프와 등고선도는 추출 시간은 8 h로 고정하고 에탄올 함량(*X*₁)과 추출 온도(*X*₂)에 따른 상호작용을 나타내었다(Fig. 1). 추출 수율의 반응표면그래프와 등고선도는 능선형으로 나타나, 추출 수율의 최대값은 에탄올 함량 50% 이상, 추출 온도 92.7°C 이상의 추출조건에 존재할 것으로 예측되었다. 추출 수율은 에탄올 함량의 비율이 높아질수록 급격히 감소 하는 것으로 예측되어, 차가버섯을 에탄올 함량이 높은 용액으로 추출하면 추출 수율이 매우 낮아지므로 산업적으로 효율적이지 않다고 생각한다. 총 폴리페놀 함량의 반응표면그래프는 추출 수율과 비교할 때 뒤집힌 능선형을 나타내었다. 총 폴리페놀 함량은 추출 온도가 40-60°C일 때 가장 낮았고 추출 온도가 40°C 이하일 때보다 추출 온도가 60°C 이상일 때 더 많은 양이 추출될 것으로 예측되었다. 이는 추출 온도가 높아지면 용매가 활발히 환류하여 추출량이 증가한 것으로 생각한다. ABTS free radical scavenging activity와 ORAC의 반응표면그래프와 등고선도는 9.2%의 에탄올 함량과 92.7°C의 추출 온도에서 최대값이 나타나는 형태로 예측되었으며, 반응표면그래프와 등고선도에 따른 항산화능의 최대 추출조건은 총 폴리페놀의 함량의 최대 추출조건과 일치하였다. β-1,3-Glucan 함량의 반응표면그래프와 등고선도는 다른 반응변수와 달리 반응표면그래프에 최저값이 나타났으며 에탄올 함량에 따라 큰 차이를 보였다. β-1,3-Glucan은 에탄올 함량이 26% 이하일 때 추출되지 않을 것으로 예측되었고, 실제 실험에서는 에탄올 함량 50% 미만의 추출조건에서 추출한 시료에서는 측정

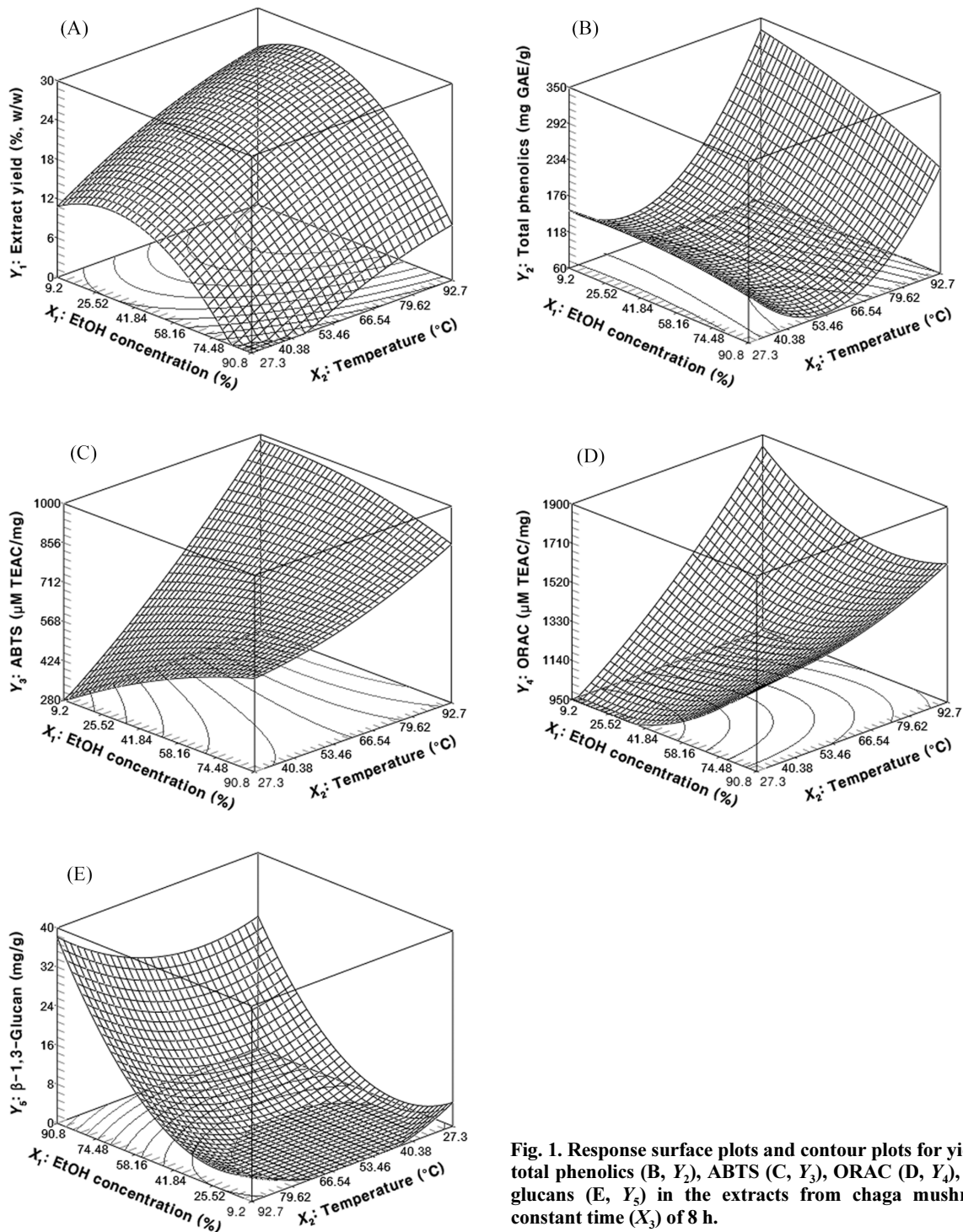


Fig. 1. Response surface plots and contour plots for yield (A, Y_1), total phenolics (B, Y_2), ABTS (C, Y_3), ORAC (D, Y_4), and β -1,3-glucans (E, Y_5) in the extracts from chaga mushroom at a constant time (X_3) of 8 h.

되지 않았다. 따라서 β -1,3-glucan의 추출에 가장 큰 영향을 미치는 것은 에탄올 농도임을 알 수 있으며, 열수 추출법을 이용하면 β -1,3-glucan이 함유된 차가버섯 분말 제조에 어려움이 있을 것으로 판단된다.

각 반응변수의 최적 추출조건은 Minitab software의 'response optimizer'를 이용하여 예측하였다. 각 최적 추출조건은 Table 6과 같으며, 예측된 최적 추출조건에서 실제 추출 및 실험을 수행하여 예측된 값과 실제 실험값의 비교를 통하여 모델의 정확도를 검증하였다. 예측 값과 실험 값의 차이는 상대오차를 통해 표현

하였다. 상대오차는 추출 수율이 0.4%로 가장 낮았고, ORAC이 12.5%로 가장 높았다(Table 6). 결론적으로 각 반응변수의 이차 회귀식이 유의하고, 예측 값과 실험 값의 오차가 크지 않아 각 반응표면모델이 추출조건에 따른 반응변수를 설명하는데 적합하다고 판단하였다. 이에 다섯 가지의 반응 변수를 모두 고려하면 에탄올 농도 81.4%, 추출 온도 92.7°C, 추출 시간 14.5 h의 추출 조건이 모든 반응변수에서 최대값을 가지는 최적 추출조건으로 예측하였다.

요 약

본 연구에서는 차가버섯(*Inonotus obliquus*)의 유효성분과 항산화능이 최대가 되는 추출물의 제조를 위하여 반응표면분석법을 이용하여 최적 추출조건을 탐색하였다. 추출 수율, 총 폴리페놀 함량, 항산화능(ABTS 자유 라디칼 소거능, ORAC), β -1,3-glucan 함량의 총 다섯 가지 반응변수에서 유의적인 이차 회귀식을 얻었고, 반응표면그래프와 등고선도를 통하여 최적 추출조건을 예측하였다. 각 반응변수에 따른 최적 추출조건은 추출 수율에서 50% (v/v), 88.7°C, 14.5 h, 총 폴리페놀 함량에서 9.2%, 92.7°C, 14.5 h, ABTS free radical scavenging activity에서 50.8%, 92.7°C, 14.5 h, ORAC에서 9.2%, 92.7°C, 1.5 h, β -1,3-glucan 함량에서 90.8%, 92.7°C, 1.5 h으로 예측되었다. 각 반응변수의 예측 최대추출조건에서 실제 실험을 실행하여 예측 값과 비교해본 결과, 상대오차는 0.4-12.5%였다. 각 반응 변수에서 유의적인 이차 회귀식을 얻었으며, 예측 값과 실험 값의 오차가 크지 않아 반응표면모델이 최적 추출조건을 예측하는데 적합하다고 판단하였으며, 다섯 가지 반응 변수를 통합하는 최적 추출조건은 81.4%, 92.7°C, 14.5 h으로 예측하였다. 본 연구는 주로 열수추출물의 형태로 유통되는 차가버섯 추출물의 품질 개선을 위하여 에탄올 용매를 포함한 최적 추출조건을 설정하였고, 구체적인 추출 수율과 생리활성물질 함량 및 항산화능이 최대가 되는 추출조건을 제시하였다.

References

- Park KC, Kil KJ, Lee YJ. The Comparative study of the effects of fructification *Inonotus obliquus* aqueous extract according to the extraction temperature (I) -Anti-oxidative effect-. Korean J. Herbol. 22: 177-185 (2007)
- Cui Y, Kim DS, Park KC. Antioxidant effect of *Inonotus obliquus*. J. Ethnopharmacol. 96: 79-85 (2005)
- Liang L, Zhang Z, Wang H. Antioxidant activities of extracts and subfractions from *Inonotus obliquus*. Int. J. Food Sci. Nutr. 60: 175-184 (2009)
- Kim MY, Seguin P, Ahn JK, Kim JJ, Chun SC, Kim EH, Seo SH, Kang EY, Kim SL, Park YJ, Ro HM, Chung IM. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. J. Agr. Food Chem. 56: 7265-7270 (2008)
- Goodridge HS, Wolf AJ, Underhill DM. β -Glucan recognition by the innate immune system. Immunol. Rev. 230: 38-50 (2009)
- Chan GC, Chan WK, Sze DM. The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. J. Hematol. Oncol. 2: 25-35 (2009)
- Hazama S, Watanabe S, Ohashi M, Yagi M, Suzuki M, Matsuda K, Yamamoto T, Suga Y, Suga T, Nakazawa S, Oka M. Efficacy of orally administered superfine dispersed lentinan (β -1,3-glucan) for the treatment of advanced colorectal cancer. Anticancer Res. 29: 2611-2617 (2009)
- Sim CH. Application of response surface methodology for the optimization of process in food technology. Food Eng. Prog. 15: 97-115 (2011)
- Bas D, Boyacı IH. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. J. Food Eng. 78: 836-845 (2007)
- Xu Jie H, Wei C. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from wild edible BaChu mushroom by response surface methodology. Carbohydr. Polym. 72: 67-74 (2008)
- Liu J, Miao S, Wen X, Sun Y. Optimization of polysaccharides (ABP) extraction from the fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murill using response surface methodology (RSM). Carbohydr. Polym. 78: 704-709 (2009)
- Giri SK, Prasad S. Optimization of microwave-vacuum drying of button mushrooms using response-surface methodology. Dry Technol. 25: 901-911 (2007)
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Method. Enzymol. 299: 152-178 (1999)
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Bio. Med. 26: 1231-1237 (1999)
- Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. J. Agr. Food Chem. 50: 4437-4444 (2002)
- Ko YT, Lin YL. 1,3- β -Glucan quantification by a fluorescence microassay and analysis of its distribution in foods. J. Agr. Food Chem. 52: 3313-3318 (2004)
- Choi MA, Park NY, Woo SM, Jeong YJ. Optimization of extraction conditions from *Hericium erinaceus* by response surface methodology. Korean J. Food Sci. Technol. 35: 777-782 (2003)
- Lee HJ, Do JR, Chung MY, Kim HK. Optimization of extraction conditions of *Pleurotus cornucopiae* by response surface methodology. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 43: 1565-1570 (2014)
- Kang BH, Lee JM, Kim YK. Optimization of hot water extraction conditions for *Tricholoma matsutake* by response surface methodology. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 39: 1206-1212 (2010)
- Silva EM, Rogez H, Larondelle Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. Sep. Purif. Technol. 55: 381-387 (2007)
- Guo X, Zou X, Sun M. Optimization of extraction process by response surface methodology and preliminary characterization of polysaccharides from *Phellinus igniarius*. Carbohydr. Polym. 80: 344-349 (2010)