

알로에 베라로부터 생리 활성 물질인 아세만난 분리 정제와 특성

이소영,* 류일환, 심창섭

김정문 알로에 과학연구소

Purification and Characterization of Bioactivity Compound Acemannan from *Aloe vera*

So Young Lee,* Il Whan Ryu and Chang Sub Shim

R & D Center, Kim Jeong Moon Aloe Co., LTD, Cheonan 330-880, Korea

Abstract - This study was carried out to purify and to characterize various bioactive material acemannan from *Aloe vera*. Purified acemannan was mannose (67%) and acetyl group (23%), and the rest of glucose was galactose that consists of long chain polydispersed beta-(1, 4) linked mannan polymers. The sugar and acetyl group in the molecule were linked by molar ratio of 3:1. This polysaccharide from *Aloe vera* may provide functional food and potential drug source with antiviral and immunomodulating properties.

Key words - *Aloe vera*: acemannan: functional food: drug source: antiviral: immunomodulating

알로에(*Aloe vera* L.)는 방사성에 의한 피부 상처 치료와 바이러스성 감염에 살균 작용을 갖고 있으며 소화 기관 궤양에 효과 있는 유용한 식물로 알려져 왔다.¹⁾ 알로에의 화학적 조성은 anthraquinone 유도체와 만노오즈, 글루코오즈가 주성분인 폴리사카라이드, 각종 아미노산(glutamic acid, arginine, asparagine) 지질(isoprenoids, alkane, n-alkyl alcohol, fatty acids, ester) 및 mineral 물질(K, Na, Mn, Ca) 등 100 여종이 보고되어 있다.²⁻⁴⁾ 알로에 성분의 생리활성 연구는 꾸준히 진행되어 왔으나 물질의 정체성은 불명확한 상태이다. 최근 알로에의 생리 활성 물질로서 겔내에 존재하는 다당체가 연구의 초점이 되고 있다. 이미 알로에 다당체는 Kawashima 등에 의해 소염, 방사성 치료에 효과 있는 물질로 보고된 바 있고,⁵⁾ agi는 *Aloe saponaria*에서 다당체인 asman-

nan I, II(acetylmannan I, II)을 분리하였고⁶⁾ Hart 등이 고분자 물질 분획하여 in vitro의 인간 pooled serum에서 Zymosan opsonization의 결과는 면역 증강에 의한 감염상처 치료로 생각했다.⁷⁾ McAnally는 분자량 100,000 또는 10,000 dalton 이상의 아세틸화된 만노오즈 다당체인 Acemannan을 분리 하여 화상, 피부와 위장관의 궤양의 치유 효능을 검증하였다. 이 물질은 조직 배양물 아섬유의 증식을 48 시간내에 300% 증가시키고, 아섬유 핵의 DNA 합성을 증가 시켜 치료과정의 기본 단계인 대사 활성화와 세포 증식 속도를 증가시키며 배양된 암세포에서도 저해 효능을 나타냈다. 캐나다의 AIDS 환자에게 AZT(azidotimidine)와 함께 투여시 면역 저하를 극적으로 개선시키는 효과를 나타냈으며 미국 식품 의약국(FDA)에서 그 안전성을 인정받았다.⁸⁻¹⁴⁾ 다당체 연구로 국내에서는 *Aloe vera* 겔에서 다당체 성분을 분리 ACE(Angiotensin converting enzyme) 저해효과를 확인한 민

의¹⁵⁾ 보고 이외에 구체적인 연구 사례는 없는 실정이다.

*Aloe vera*의 의약적인 활용 범위가 넓어짐에도 불구하고 효과에 근거한 생리활성 물질의 분리 과정과 그 제반 특성이 명확하게 규정되지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 국내에서 재배된 알로에 베라로 생리활성 물질인 Acemannan을 분리 정제하여 안정한 화합물을 수득하고 그 물리화학적 특성을 규명하고자 한다.

재료 및 방법

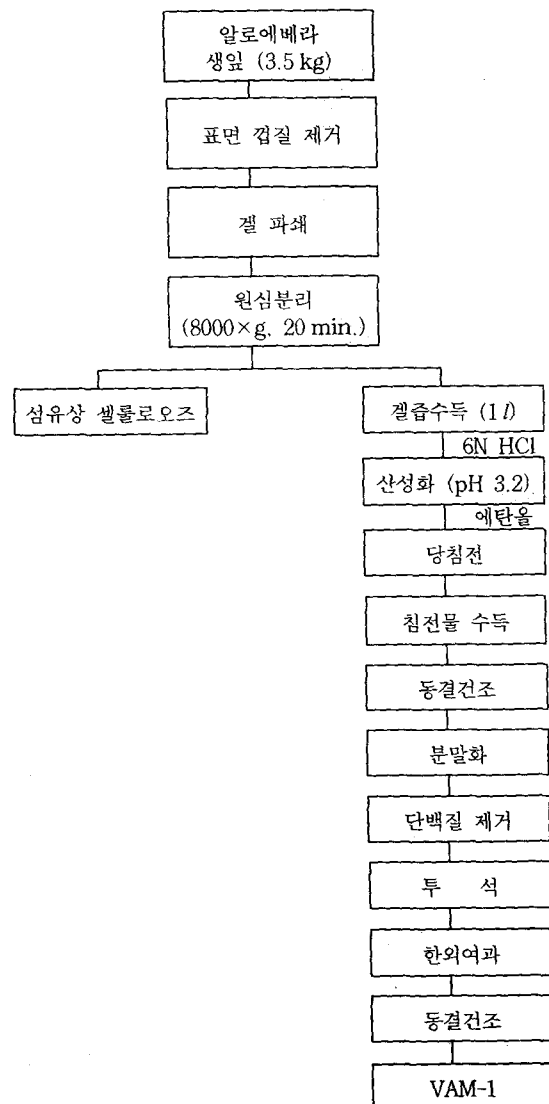
재료 - *Aloe vera* 생잎은 (주) 김정문 알로에의 김제 농장에서 재배한 1kg 이상의 잎을 사용하였으며 수확한지 12시간 이내의 것을 사용하였다. 표준 시료는 미국 캐링톤 연구소에서 구입하여 비교 하였다.

시약 및 기기 - 추출 용매는 Sigma Aldrich Co., Ltd와 용매는 1급 시약을 사용하였으며 무기염은 Junsei Chemical Co., Ltd. 초자 및 측정 용기는 Pyrex, Iwaki, Horex을 사용하였다. 기기는 Se-comam S1000 UV Spectrophotometer, HP 5890 Series 2 Column SP 2380, 300×2.5 mm Gas chromatography, Satorius & Amicon ultrafilte, Satorius satocon mini & Amicon 8400 ultrafiltration system, Mettler Toledo 320 pH 측정기, Nissei Am-10 Homogenizer, Brookfield 점도 측정기, Christ Beta 1-8 동결건조기, Sanyo MDF 192 급속 냉동기, Hitachi himac CR 215 원심분리기, Shimadzu TGA-50 열중량 분석기, SEM 전자 현미경, Bio-rad FT-IR Spectrophotometer를 사용하였다.

알로에 베라로부터 Acemannan 분리 정제 - 생잎 3.5 kg을 깨끗이 물로 세척하고 외피를 제거한 후 내부의 겔을 Homogenizer로 100 rpm에서 20초간 분쇄하여 발생한 기포는 4℃ 냉장고에 2시간 가량 방치하여 가라 앉혔다. 겔즙은 속도 8,000×g, 20분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액에 6N HCl 용액 5-15 ml를 혼합 pH 3.2로 조절한 후 시켰다. 차가운 4배의 에탄올을 서서히 첨가하고 30분간 교반하여 2시간 실온에서 방치한 후 침전물을 4000×g에서 20분간 원심 분리하여 침전물을 수득하였다. 에탄올 침전물을 동결건조하고 분말화하

여 실험에 사용하였다. 동결건조시료를 pH 7.5 Phosphate 완충용액에 녹이고 일정량의 Protease(Sigma)를 첨가하여 37℃에서 1시간 반응시켜 내부에 존재하는 단백질을 제거하였다. 반응물은 cellulose tubing(Sigma)을 사용하여 증류수로 48시간 투석을 행하였다. 투석 처리된 용액은 ultrafiltration system을 이용하여 분자량 10,000 dalton 이상의 분획을 모으고 동결건조하여 백색의 분말을 얻었다. 이 물질을 VAM-1이라 명명 하였다.

아세틸 그룹 정량 - Hestrin법¹⁶⁾에 의하여 실험하였으며 시료 1 ml을 취하고 알카리성 Hydro-



Scheme. Isolation diagram of VAM-1.

Hydroxylamine 시약 (2 M Hydroxylamine · HCl과 3.5 N NaOH의 1:1 혼합용액) 2 ml를 가하여 pH가 약 1.2가 되도록 조정하고 1 ml FeCl₃ 용액 (FeCl₃ · 6H₂O 10 g을 0.1N HCl에 용해)을 가하고 540 nm에서 흡광도를 측정 한 후 다음의 계산식을 이용하여 acetyl group을 정량 하였다.

$$\% \text{ acetyl content} = \frac{At \times Cs \times Ma \times 100 \times 0.91}{As \times Ws \times Vs}$$

- At=시료의 흡광도
- Cs=표준시료의 농도
- Ma=Acetyl의 분자량
- Ws=시료의 무게
- Vs=시료의 부피이다.

당 정량-phenol-sulfuric acid법¹⁷⁾으로 비색 정량 하였다. 시험관에 시료 1 ml와 5% phenol 용액 1 ml를 취하여 pipette으로 C-H₂SO₄ 5 ml를 가한 후 교반 하였다. 반응물을 30분간 방치한 후 490 nm에서 흡광도를 측정하고 표준용액을 사용하여 작성하였다.

단백질 정량-분광 광도계를 사용하여 Lowry 등¹⁸⁾의 방법에 따라 bovine serum albumin (Sigma Co.)을 표준단백질로 사용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하여 표준직선으로 부터 시료의 단백질의 양을 구하였다.

회분 정량-전기로 600℃에서 수 시간 회화하여 향량이 될 때까지 반복 한 후 다음 식을 이용하여 회분을 정량 하였다.¹⁹⁾

$$\text{회분}(\%) = r \frac{W_1 - W_0}{S}$$

- W₁: 회화 후의 회화용기와 재의 중량(g)
- W₀: 향량이 된 회화 용기의 중량(g)
- S: 시료의 채취량

점도 측정-시료는 1 mg/ml의 농도가 되도록 희석하고 glass filter로 감압 여과하여 조제하였다. 점도는 Blookfield(DV-II) 점도계를 사용하였으며 측정 조건은 spindle은 LV 1, speed 60 rpm이며 temperature 17℃이다.

만노오스 정량-Hassid법²⁰⁻²¹⁾에 의하여 시료 2 mg을 100℃에서 1시간동안 6 N 황산으로 가수분해 한 후 아세트산 1.5 ml과 페닐하이드라진 1.0 ml

로 100℃에서 30분간 반응시켜 실온 방치하여 결정을 유도하였다. 유도된 결정용액을 여과하여 정체와 여액으로 나누고 각각을 60% 에탄올을 사용하여 2회 재결정의 모양은 전자 현미경(SEM)으로 촬영 하였다.

요오드 반응-Gilbert법²²⁾에 준하여 0.1%, 2.5% (w/v)의 시료용액 0.5 ml에 Dimethylsulfoxide (DMSO) 5 ml 첨가하여 80℃에 40분간 흔들여 주면서 가열 시켰다. 요오드 용액(0.2% I₂-2% KI) 2 ml를 첨가하고 증류수로 100 ml되게 하여 실온에서 20분 동안 발색시킨 후 650 nm에서 흡광도를 측정하였다.

구성당 TLC-시료 2 mg에 2 M TFA(Trifluoroacetic acid) 1 ml를 첨가하고 120℃에서 60분 동안 가수분해한 후 가수분해물을 alditol acetate 유도체로 합성하여 TLC(Thin layer chromatography)분석을 행하였다. TLC는 ethylacetate:pyridine:H₂O(2:1:2, v/v)를 전개용매로 사용하여 cellulose coated plastic sheet (Merck 5577)에서 행하였다.²³⁾

Gas chromatography-시료 2 mg을 2M TFA (Trifluoroacetic acid) 1 ml에서 120℃ 1시간동안 가수분해 시킨 후 NaBH₄(in 50% Metanol) 용액 1 ml를 가하고 실온에서 1시간 환원 반응 후 Pyridine 1 ml, Acetic anhydride 1 ml, 120℃ 20분간 재반응시켜 alditol acetate 유도체를 얻었다. 얻은 유도체를 Column temperature는 250℃, Detector(HP 5890 Series 2) temperature는 300℃ 그리고 Flow rate 1 ml/min의 조건에서 GC 를 행하였다.²⁴⁾

IR 스펙트럼-IR spectrophotometer를 사용하여 4,000-200 cm⁻¹의 범위에서 측정하여 시료는 KBr가압 정제법으로 조제하였다.

구성당의 결합양상-시료 10 mg을 10 mM Sodium metaperiodate 100 ml을 가하여 4℃ 암실에서 7일간 산화를 행하면서 경시적으로 채취하여 과요오드 음이온(IO₄⁻) 소비량을 분광광도법²⁵⁾으로 구하였다. 그리고 Formic acid 생성량은 0.5% 페닐프탈레인용액을 사용하여 1 mM NaOH로 적정 한 후 구한다. 환원은 0.1 g의 Sodium borohydride 로 12시간 반응하였으며 과량의 환원 시약은 0.1 N HCl용액으로 분해하여 2일간 투석을 행하였다.

$$\text{포름산 생성량(몰수)} = \frac{[\text{소비된 알칼리의 양 (ml)}] \times [\text{사용한 알칼리의 농도 (N)}] \times [\text{시료전체양 (ml)}]}{[\text{채취시료의 양 (ml)}] \times 1,000}$$

얻어진 polyol 다당을 6 N HCl로 100°C 용액에서 2시간 가수분해하고 이를 중화하여 얻은 시료 일부를 Paper chromatography 하였다. Paper chromatography는 각 시료의 산 가수분해물을 Whatman No. 1 여지로 n-BuOH: Pyridine: Water (6:4:3, v/v)의 용매계에 전개한 후 풍건하여 Alkaline silver nitrate 시약으로 발색하며, 산화된 여지 부분은 5% Sodium thiosulfate 용액에 담구어 제거하였다.

열중량 분석 - 70 ml 알루미나 도가니에 시료 10 mg을 담고 25°C에서 온도 진행 속도를 20°C/분으로 하였다. 가열은 25°C 내지 490°C에서는 질소가스 대기하에서 수행하였다. 최고 온도에서는 2분 동안 추가로 지연시켜 측정하였다.

결과 및 고찰

아세만난 분리 및 정제 - *Aloe vera* 생잎 3.5 kg 으로부터 1.73 kg의 껍질을 수득하고 이를 산성화하여 무기염인 칼슘 옥살산을 제거하여 에탄올에 추출 일련의 정제과정을 통해 아세틸만난 건조분말

(VAM-1) 0.9 g (yield 0.025%)을 얻었다. MP 304°C, Sugar 67%, Mannose 60%, acetyl 23%, Ash 6%, Iodine test negative, IR $\nu_{\text{Max}}^{\text{KBr}}(\text{H}_2\text{O})$ 3435 cm^{-1} (O-H), 1746 cm^{-1} (C=O), 1244 cm^{-1} (C-O-C), 895 cm^{-1} . 정제 VAM-1의 구성 성분 함량은 acetyl group이 23%였으며 당은 63%로 구성되어 있고 3%의 단백질과 5%의 회분으로 확인되었다. 이러한 결과로 *Aloe vera*로부터 분리한 VAM-1은 당 3개의 분자당 하나의 acetyl group을 갖고있는 다당체일 것으로 추정하였다.²⁶⁾ 1 mg/ml 농도에서 다당체의 점도는 4.6 mPa·s이며 요오드 정색 반응 결과 음성으로 나타나 전분이 존재하지 않음을 확인하였다. Hassid법에 의한 만노오즈 정량에서는 폴리사카라이드 가수분해물과 페닐 하이드라진 반응에서 osazone 형성에 대한 수득율은 VAM-1의 mannosephenylhydrazone은 60%, glucosephenylhydrazone은 8%로 나타났다. mannosephenylhydrazone은 바늘 침상의 결정을 갖고 있으며 glucosephenylhydrazone은 눈 꽃모양의 결정을 갖고있음을 확인하였다(Fig. 1). 이상의 결과를 Table I에 요약하였다.

VAM-1의 구성당 확인 - 다당체인 VAM-1을 alditol acetate 유도체로 전환시켜 ethylacetate: pyridine:H₂O(2:1:2, V/V)를 전개용매로 사용하여 Cellulose coated plastic sheet(Merck



Fig. 1. Photography of mannosephenylhydrazone and glucosephenylhydrazone.

Table I. Composition of VAM-1

	Content of Acemannam (%)					
	Sugar	Mannose	Glucose	Acetyl group	Protein	Ash
VAM-1	67±0.5	60±0.5	8±0.5	23±0.5	3±0.5	6±0.5

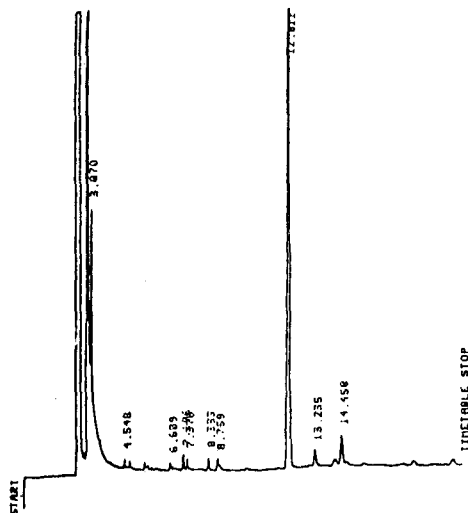


Fig. 2. Gas chromatogram of the alditol acetate of VAM-1.

5577)에서 TLC를 행하여 정성분석한 결과 주로 Mannose Rf 0.5와 소량의 galactose Rf 0.45, glucose Rf 0.4로 구성되어 있음을 확인 하였다.

Gas chromatography - VAM-1를 alditol acetate 유도체한 후 GC 측정 구성 성분을 확인하였으며 retention time에 대한 구성 성분은 mannose는 12분, galactose는 13분, glucose는 15분 이었으며 만노오스가 이 다당체의 주 구성성분임을 확인 하였다(Fig. 2).

IR spectrum - IR spectrometer 측정에서는 3435 cm⁻¹ 주위에서 O-H stretching 기인한 강한 흡수를 나타내었다. 카보닐 및 아세틸 그룹의 C-O-C stretching 각각 1746 cm⁻¹, 1244 cm⁻¹, 844 cm⁻¹ 부근이 아닌 895 cm⁻¹ 부근의 축 C₁-H의 존재는 아세만난이 β-glycoside bond를 갖고있는 D-mannose임을 확인하였다.

구성당의 결합양상 - 과요오드산 이온은 히드록시기, 카보닐기, 일차 아미노기들은 두 개가 인접한 탄소원자들 사이에 결합되어 있을 때 두 탄소 원자들 사이를 특이하게 산화시킨다. 산화물이 1,3 glu-

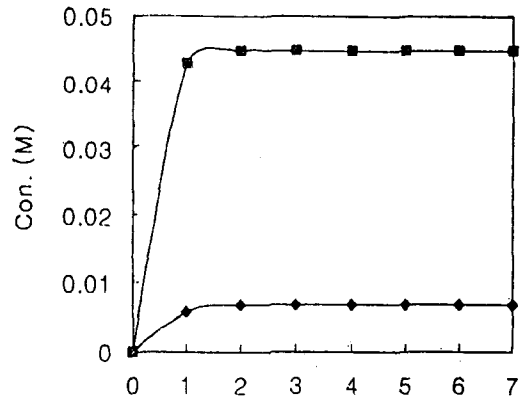
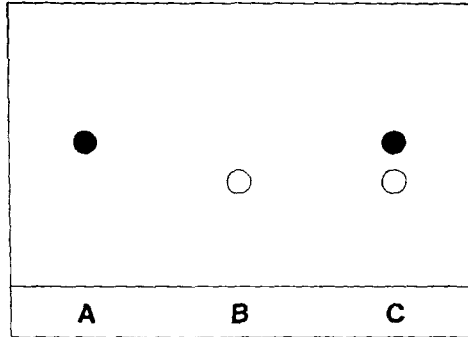


Fig. 3. The results of periodate oxidation. 포름산 생성량 ◆◆, 과요오드산 음이온 소비량 ■■

can이고 1,6 분지일 경우에는 IO₄ 소비량과 HCOOH의 생성량의 몰 비가 2:1이다. 크로마토그래피 후 검출되는 글루코오스는 과요오드산화 산화되지 않은 1,3 글루칸에서 온 것이며, glycerol은 환원말단, 비환원 말단에서 및 1,6 분지로부터 생성된 것이다. 1,4 글루칸인 경우에는 환원 말단과 비 환원 말단이 산화하여 IO₄ 소비함과 동시에 HCOOH를 생성 하지만 backbone은 산화되어 IO₄ 소비되나 HCOOH는 생성되지 않는다. 비환원말단 2 M의 IO₄를 소비하고 1 M의 HCOOH를 생성한다. 환원 말단에서는 3 M의 IO₄를 소비하고 2 M의 HCOOH를 생성한다. 1,6 잔기를 가진 1,4 glucan의 경우도 산화되어 IO₄를 소비하지만 HCOOH는 생성하지 않는다. 분리된 BAM-1은 과요오드산 음이온 (IO₄⁻)의 소비량과 포름산(HCOOH) 몰 비가 7:1로 큰 차이를 보였다(Fig. 4). 또한 Smith 분해에 의한 산화환원물인 경우 비환원말단과 환원말단에서 glycerol이 생기고 1,4 결합의 경우 erythritol이 검출되었다. 이상의 과요오드산법과 paper chromatography 결과 VAM-1은 1,4결합으로 이루어져 있는 다당체임을 확인하였다(Fig. 3, 4).

열 중량 분석 - 열 안정성과 분해온도를 측정 온도 상승에 따른 아세만난의 무게감량을 정량적으로 확



A: Glycerol B: Erythritol C: VAM-1

Fig. 4. Paper chromatogram of Smith degradation.

Table II. TGA characteristics of acemannan

	Temperature (°C)				
	Start	Onset	Midpoint	Endset	End
VAM-1	29.7	304.3	339.8	372.6	398.8

인하기 위한 실험에서 분리한 VAM-1은 304-372°C의 무게감량을 나타내 두 시료가 비교적 열 안정성이 높음을 알 수 있으며 분리한 아세만난에서는 약간의 무기염을 함유하고 있는 것으로 사료되었다 (Table II).

결 론

국내에서 재배된 *Aloe vera*에서 생리활성 물질인 acetylmannan(VAM-1)을 분리 하고 그 제반의 특성을 규명한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 알로에 베라 3.5 kg으로 부터 에탄올에 불용성 다당체를 수득, 백색의 분말형태인 0.9 g의 VAM-1을 얻었다. 분리한 VAM-1은 탄수화물 67%를 함유하고 있으며 만노오즈는 60% 소량의 글루코오즈와 갈락토오즈로 이루어져 있고 아세틸기는 23%를 함유하고 있으며 acetyl group은 IR 스펙트럼에서 1746 cm⁻¹, 1244 cm⁻¹ peak으로서 확인하였다. 과요오드 산화법에서 과요오드 음이온 소비량이 포름산 생성량에 비해 많고 smith분해와 paper chromatography 결과로부터 1, 4 글리코사이드 결합으로 이루어져 있음을 확인하였다. 또한 열중량 분석 결과 비교적 높은 열 안정성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

인용문헌

1. Mcanally, B. H. (1993) 알로에 추출물 및 이의 제조 방법. 한국특허공고, 93-1062.
2. Anonymous, (1983) *Aloe vera* L. and its products applications and nomenclature. *Cosme. & Toilet* 98: 99-104.
3. Hennessee, O. M. and Cook, B. R. (1989) *Aloe Myth Magic Medicine*, 66-72. Universal Graphics, London.
4. Gage, D. (1988) *Aloe vera Healing*, 80-83. Vermont Arts Press, Rocheste.
5. Suga T. Hirata T. (1983) The efficiency of the aloe plants chemaical constituents and biological activities. *Cosme. & Toilet*. 98: 105-110.
6. Yaki, A., Hamada, K., Mihashi, K., Harada, N. and Nishioka, I. (1984) Structure determination of Polysaccharides in *Aloe saponaria* (Hill.) Haw.(Liliaceae). *J. Pharm. Sci.* 73: 62-65.
7. Hart, L. A., Nibbering, P. H., Barselaar, M. T., van den Berg, A. J. and Ladadie, R. P. (1990) Effect of low molecular constituents from *Aloe vera* gel on oxidative metabolism and cytotoxic and bactericidal activites of human neutrophils. *Inter. J. Iummu.* 12: 427-431.
8. Kahlon, J. B., Kemp, M. C., Tawei, N., Carpenter, R. H. and Shannon, W. M. (1991) *In vitro* evaluation of the synergistic antiviral effects of acemannan inbination with azidothymidine and acyclovir. *Mol. Biother.* 3: 214-223.
9. Kahlon J. B., Kemp M. C., Carpenter R. H., McAnalley B. H, McDaniel H. R. and Shannon, W. M. (1993) Inhibition of AIDS virus replication by acemannnan *in vitro*. *Mol. Biother.* 3: 127-135.
10. Mcanally, B. H. (1993) Acemannan (Carrisyn) for injection. *AIDS Report*. 1-80.
11. Mcanally, B. H. and Tex, G. P. (1990) Proceses for preparation of aloe products, products produced thereby and compositions thereof. US 4, 959, 214.
12. 서화중 (1995) *Aloe vera*의 생리 효과에 대한 고찰. 한국영양식량학회지 24: 1026-1034.
13. Gowda, D. C., Neelisiddaiah, B. and Aniancyaih, Y. V. (1979) Structural studies of Polysaccharides from *Aloe vera*. *Carbohydr. Res.* 72: 201-205.

14. McAnally, B. H. (1990) Process for preparation of aloe products. US 4,957,907.
15. 민병주 (1995) *Aloe vera* L. 점질물의 기능성 탐색 연구. 강원대학교 석사논문.
16. Hestrin, S. (1949) The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. *J. Biochem.* 180: 249-261.
17. Chapline, M. F. and Kennedy, J. F. (1986) Carbohydrate Analysis, 3-4. IRL Press, Oxford.
18. Bollag, D. M. and Edelstein, S. J. (1991) Protein method, 56-59. Wiley-Interscience Press.
19. 한국식품공업협회 (1995) 식품공전 2: 642-643.
20. Roboz, E. and Haagen, A. J. (1948) A mucilage from *Aloe vera*. *J. American Chem. Soc.* 70: 3248-3249.
21. Hassid, W. Z. and McCread, R. M. (1942) Identification of sugars. *Ind. Chem. Analytical Edition* 14: 683-686.
22. Whistler, R. L. (1960) Iodimetric determination of amylose. In Gilbert, G. A. and Spragg, S. P. (ed.), *Method in Carbohydrate Chemistry*, 168-175. Academic Press, New York.
23. Stahl, E. (1969) Thin layer chromatography. 815-820. Spin. Int. Stu., Berlin.
24. Tephani, A. M. (1995) Food polysaccharides, 586-591. Mar. Dek. Inc., New York.
25. Whistler, R. L. (1960) *Methods in carbohydrate chemistry* 5: 357-360. Academic Press, New York.
26. McAnally, B. H. and Manna, S. (1993) Determination of position of O-acetyl group in a β -(1 \rightarrow 4)-mannan (acemannan) from *Aloe barbardensis* Miller. *Carbohydr. Res.* 241: 317-319.

(1997년 3월 14일 접수)