

최 종  
연구보고서

GOVP1200628489

T 0009659

생리 활성이 우수한 잣버섯 자실체의 개발  
Development of fruit body from *Lentinus lepideus*  
with potent bioactivities

서울대학교  
(주)헬릭서  
강원대학교

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “생리 활성이 우수한 잣버섯 자실체의 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 9 월 14 일

주관연구기관명 : 서울대학교

총괄연구책임자 : 김 선 영

세부연구책임자 : 김 선 영

연 구 원 : 이 준 태

연 구 원 : 김 동 현

연 구 원 : 최 정 준

협동연구기관명 : (주)헬릭서

협동연구책임자 : 박 은 진

협동연구기관명 : 강원대학교

협동연구책임자 : 이 종 규

## 요 약 문

### I. 제 목

생리활성이 우수한 잣버섯 자실체의 개발

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 본 연구의 목적은 잣버섯 자실체의 조혈 및 면역 활성화 성분 및 그 작용을 분자적 수준에서 밝히고, 생리 조절 작용을 입증하며, 대량 배양 기술을 확립하는 것임.
- 잣버섯의 생리활성에 대한 연구는 기술적으로 전세계적으로 본 연구진이 독보적인 위치를 가지고 있으며 선행연구를 통하여 이미 잣버섯의 면역 조절 활성화 및 조혈작용에 대한 다수의 과학적 증거를 제시한 바, 산업화에 관련된 후속연구를 통해 단기간에 제품 개발을 완료할 수 있으며 이를 통하여 면역 활성화 기능을 갖는 개별인정형 건강기능식품으로서의 새로운 개발 사례를 제시할 수 있음.
- 경제, 산업적 측면에서도 잣버섯의 경우 식용 가능한 야생버섯으로 본 연구진에 의해 최초로 대량재배기술이 연구되었으며 이를 농가에 보급하여 상용화할 경우 식용 및 약용버섯으로서 뿐만 아니라 다양한 제품의 원료로 이용되어 막대한 경제적 가치를 생산할 수 있음.
- 사회, 문화적으로도 산업발달에 따른 환경문제 및 국민의 식생활 습관 변화에 따라 인류의 건강은 다양한 질병으로부터 위협받고 있으며 특히 면역기능 저하에 의해 초래될 수 있는 질환들에 대한 경각심으로 인해 면역 기능을 활성화하기 위한 건강기능식품 및 영양제 등의 사용이 대중화되고 있고 새로운 제품 개발에 대한 관심이 증가하고 있음.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

- 본 연구는 (1) 첨단 분자 생물학적 방법(chip technology)을 이용한 잣버섯 자실체의 조혈 및 면역 활성 작용의 메카니즘 및 생리활성성분 연구(서울대학교), 2) 질환모델연구, 기존 버섯과의 효능 비교, 제제화 연구를 통한 건강기능식품 개발((주)헬릭서), (3) 잣버섯 자실체의 생산성 향상 기술 개발(강원대학교)에 관한 연구들을 포함하고 있음.

### Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

- 생리활성성분의 대식세포 활성화 작용 및 사이토카인 활성화 작용의 메카니즘을 규명하였음.
- 잣버섯 자실체 추출물의 제형 연구를 통한 시제품 생산 완료하고 기능성 식품으로서의 개발을 위한 안전성 확보를 위해 잣버섯 자실체 추출물의 설치류 반복독성시험을 실시하여 유효용량의 10배량까지도 안전함을 확인하였음.
- 우량 액체종균을 선발하고 이를 집중하여 자실체를 대량재배할 수 있는 기술을 확보하고 이들의 생산을 종균별로 비교하므로써 최적의 대량생산 시스템을 확립하였음.
- 본 연구 성과는 학술지 논문 게재 및 학술대회 발표자료로 활용되었음.
- 본 연구 성과를 바탕으로 최적의 생리활성을 나타내는 종균 및 이를 이용한 자실체 생산 기술에 대한 신규 특허를 국내외에 출원할 계획임.
- 본 연구를 통해 대량생산된 잣버섯 자실체를 이용하여 인체에서의 기능성 및 안전성을 검증하기 위한 인체시험을 실시할 예정임.
- 인체시험이 성공적으로 종료되어 기능성 및 안전성이 검증되면 이를 개별인정형 건강기능식품으로 개발하기 위한 원료/성분 및 기준/규격에 대한 인정절차를 수행해야함.
- 이러한 절차를 수행함과 동시에 잣버섯 대량 배양 및 생산을 위한 농가와의 원료 OEM 계약을 실시하고 제약회사, 건강기능식품제조업체 및 식음료업체에 이를 기술이전하여 제품화를 실현할 계획임.

## SUMMARY

### (영문요약문)

Mushrooms are known to have diverse beneficial biological activities such as anti-cancer, immunomodulation, anti-bacteria and anti-virus. However, the molecular mechanisms underlying biological effects of many mushroom-derived materials have not yet been clearly elucidated. In this study, the immunomodulating activity and its molecular mechanisms of a water-soluble extract from *Lentinus lepideus* mycelium, named PG101, were investigated with an aim at developing it as an immunomodulating and hematopoietic agent, by performing *in vitro* and *in vivo* experimentals.

First, the effects of PG101 on human cells were investigated by analyzing the production of various cytokines using human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Treatment with PG101 increased the levels of TNF-, IL-1, IL-10, IL-12, GM-CSF and IL-18 in a dose- and time-dependent manner. The cytokines were expressed in a specific order respectively as following [TNF- → IL-1 → IL-12, IL-10 → GM-CSF, IL-18]. When the target cell types of PG101 was examined, CD11b-positive cells isolated from PBMCs and a human promonocytic cell line (U937) were responsive to PG101. Data from a transient transfection assay using reporter plasmids, a gel retardation assay and the experiment involving a specific NF- $\kappa$ B inhibitor, PDTC (pyrrolidinedithiocarbamate), indicated that NF- $\kappa$ B was a highly activated transcription factor by PG101 and played an important role in expression of the cytokines. These biological effects demonstrated that PG101 might have great potentials as a therapeutic immune modulator.

To understand the molecular mechanism(s) underlying the activation of cytokines by PG101, effects of the mushroom extract on production of cytokines were studied at the RNA and protein levels. Results from Northern blot analysis indicated that the steady-state RNA levels of TNF- and 7 other cytokines were highly increased in human PBMCs treated with PG101. The RNA level of TNF-, MIP-1, MIP-1, MIP-3 and IL-8 was not affected by the presence of cycloheximide, an inhibitor of the translation process, suggesting

that they are the direct targets of PG101. A significantly high protein level of TNF- $\alpha$ , MIP-1 and IL-8 remained detectable, even when cells were cultured with actinomycin D, 2 hrs prior to the PG101 treatment. These data indicate that PG101 controls selective cellular proteins, which play key roles in the innate immune system, at the transcriptional and post-translational levels.

To evaluate whether PG101 would affect the immune system *in vivo*, effects of the mushroom extract were tested on bone marrow cells using irradiated mice as a model for immunocompromised or immunosuppressed situation. Colony forming assay using bone marrow cells showed that in PG101-treated mice, the number of CFU-GM and BFU-E were increased to almost that of normal mice. FACS analysis suggested that PG101 might increase the number of granulocytes (ER-MP12-20med) and myeloid progenitors (ER-MP12+20+) in the bone marrow and analysis of surface c-Kit and Gr-1 proteins indicated that PG101 might induce differentiation of progenitor cells to granulocytes and/or proliferation of the committed cells. The levels of radioprotective cytokines such as GM-CSF, IL-6 and IL-1 were highly increased in the serum of PG101-treated mice. These results strongly suggested the great potential of PG101 as an immune enhancer during radiotherapy and/or chemotherapy.

In an effort to find an active compound(s), PG101 was analyzed by enzyme hydrolysis and column chromatography. To test whether PG101 contained  $\beta$ -1,3-glucan, one of the main active compounds of mushroom extracts, PG101 was hydrolyzed by laminarinase, a  $\beta$ -1,3-glucanase. Treatment of PG101 with this  $\beta$ -1,3-glucanase produced glucose and gentibiose and reduced the effect of PG101 on the activation of TNF- $\alpha$  in PBMCs. A carbohydrate fraction of DEAE-cellulose column chromatography, consisting of galactose and glucose, had stronger activity on TNF- $\alpha$  production than other fractions.

On the other hands, for the development of mass cultivation technology of the wild mushroom (*Lentinus lepideus*), softwood sawdust from timber thinning and liquid-cultured spawn, the obtained results were summarized as follows. Twelve isolates of *Lentinus lepideus* used in this experiment were collected or supplied by Kangwon Agricultural Research & Extension Service, IUM (Wild Mushroom Culture Collection, Incheon University), FRI (Korea Forest Research Institute), KACC (Korea Agricultural Culture Collection

RDA). TPML 02053 and TPML 03050 were shown to be the best isolates in mycelial growth. *L. lepideus* showed the most favorable growth on GPB culture media. Optimum pH, temperature, carbon source and nitrogen source for mycelial growth were pH 5.5, 30°C, starch and peptone, respectively. Mycelial growth of *L. lepideus* was generally increased on media with wood vinegar at the concentrations of 10µg/ml. *L. lepideus* isolates tested showed 83 to 99% homology by phylogenetic tree. Dry weight of mycelium cultured in culture media containing *P. koraiensis* extracts was relatively higher than that in media containing *P. densiflora* or *Quercus* sp. extracts. The optimum mixing ratio of coniferous sawdusts for preparing sawdust cultivation medium to produce fruiting bodies of *L. lepideus* was the mixture of *P. koraiensis* and *Larix leptolepis* at the ratio of 8:2. To obtain the basic data for mass cultivation of *L. lepideus*, mushroom cultivation using liquid-cultured spawn was carried out. *L. lepideus* showed the most favorable growth in BYM (Brown sugar, Yeast extract, and Malt extract) culture medium. The optimal culture period and aeration rate for liquid spawn were 6 days and 1.0 ℓ/min, respectively. Artificial cultivation of *L. lepideus* using liquid-cultured spawn in the sawdust cultivation media took 29 days less than the normal period required for the cultivation using sawdust spawn. Thus, mushroom cultivation using liquid-cultured spawn seems to be effective for the mass cultivation of *L. lepideus*. TPML 99161, TPML 03050 and TPML 03051 were shown to be the best isolates for fruiting body production of *L. lepideus*. Fruiting body production was increased by applying wood vinegar and mushroom nutrient on the process of sawdust media preparation. Dry weight of fruiting bodies from the cultivation using liquid-cultured spawn was much higher than that from sawdust spawn cultivation. The optimum incubation period for high production of fruiting body was 28 days.

In conclusion, the data presented in this thesis strongly support that PG101 isolated from *L. lepideus* has potentials as an effective immune-modulator that may control hematopoiesis as well as the innate immune system.

## CONTENTS (영 문 목 차)

<b>Chapter I. Research outline</b> .....	<b>9</b>
Section 1. Goal .....	9
Section 2. Background .....	9
Section 3. Research scope .....	14
<b>Chapter II. Current status of proposed research</b> .....	<b>15</b>
Section 1. Domestic status .....	15
Section 2. International status .....	16
<b>Chapter III. Results</b> .....	<b>18</b>
Section 1. Experimental goals .....	18
Section 2. Methods and results .....	18
<b>Chapter IV. Impact on related areas</b> .....	<b>107</b>
<b>Chapter V. Plan for the use of data</b> .....	<b>110</b>
Section 1. Expected effects .....	110
Section 2. Application plan .....	111
Section 3. Plan for commercialization .....	112
<b>Chapter VI. Other information obtained during research</b> .....	<b>113</b>
<b>Chapter VII. References</b> .....	<b>116</b>



## 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 .....	9
제 1절.	연구개발의 목적 .....	9
제 2절.	연구개발의 필요성 .....	9
제 3절.	연구개발의 범위 .....	14
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	15
제 1절.	국내 기술개발 현황 .....	15
제 2절.	국외 기술개발 현황 .....	16
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 .....	18
제 1절.	연구개발의 목표 및 내용 .....	18
제 2절.	실험방법 및 결과 .....	18
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	107
제 5 장	연구개발결과의 활용계획 .....	110
제 1절.	연구개발의 기대효과 .....	110
제 2절.	활용방안 .....	111
제 3절.	추가연구의 필요성과 기업화 방안 .....	112
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	113
제 7 장	참고문헌 .....	116

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1절. 연구개발의 목적

본 연구의 목적은 잣버섯 자실체의 조혈 및 면역 활성화 성분 및 그 작용을 분자적 수준에서 밝히고, 생리 조절 작용을 입증하며, 대량 배양 기술을 확립하는 것임.

## 제 2절. 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

- 본 연구의 대상은 잣버섯 (*Lentinus lepideus*)의 인공 배양 균사체 및 자실체이다.
- 잣버섯(*Lentinus lepideus*)은 주름버섯목(Phylloporales) 송이과(Tricholomataceae)에 속하는 목재부후균(wood decay fungi)으로서 갈색부후(brown rot)를 일으키고 일반적인 버섯들이 주로 활엽수에서 발생하는 것과 달리 침엽수의 고사목이나 그루터기에 서식하는 버섯이며 잣의 지름은 5-20 mm로 육질이고 표면은 담황흑색~황갈색을 띠고 있으며 인편과 구열이 있음.
- 자연 상태에서는 봄부터 가을에 걸쳐 소나무나 다른 침엽수 위에 발생하며 소나무의 향기를 지니고 있고 맛이 담백함.
- 그러나 인공 재배시 다른 재배버섯에 비해서 버섯생산성이 낮으며 아직 자실체에 대한 식용 또는 약용으로서의 시장성이 확보되지 않은 상태임.
- 한방에서는 인체조절, 건강증진 등의 효능이 있어 약용으로도 사용하고 있으나 연구면에서는 상황버섯, 영지버섯, 아가리쿠스와 같은 약용버섯 및 표고버섯, 느타리버섯, 송이버섯과 같은 식용버섯에 대한 연구가 국내외에서 많은 성과를 거둔 것과 달리 잣버섯의 생리활성에 대한 연구는 거의 이루어지고 있지 않으며 전세계적으로 본 연구진이 독보적인 위치를 가지고 있음.

### [본 연구팀의 그간의 연구 결과]

- 잣버섯 성분이 생쥐의 면역세포 중 B세포에 대한 증식 촉진 능력이 있으며 세포의 전사인자인 NF- $\kappa$ B를 활성화함을 밝혔으며, 최근 본 연구팀은 잣버섯 인공 배양 균사체의 열수 추출물 (이하 PG101이라 칭함)을 이용한 연구에서 PG101이 면역 증가 및 조절 작용을 나타내는 생리조절제 (Biological Response Modifier)로서 개발될 가능성을 보고한 바 있다.. (Experimental Biology and Medicine, revision, 부록 참조, 관련 기술 현황에서 자세히 기록).
- 잣버섯 추출물은 인간의 말초 혈액 세포에 작용하여 면역성 증가 및 조절 작용을 나타내는 사이토카인의 생성을 강력히 유도하며, PG101이 직접적으로 활성화하는 세포는 대식세포이며, 세포 전사인자인 NF- $\kappa$ B를 활성화한다는 것을 확인하였으며, 방사선 조사로 골수가 거의 파괴된 생쥐에 경구로 24일간 PG101을 투여한 결과 골수 세포내의 조혈모 세포의 증식이 빠르게 이루어져 8일 이후부터는 거의 정상 수준으로 회복되며 골수 세포내의 혈액조혈모 세포에 작용하여 과립구 및 대식세포의 증식을 촉진한다는 것을 밝혔다.
- 잣버섯의 이러한 생리 조절 작용은 그간 국내 및 세계의 다른 연구팀에 의해서 밝혀진바 없는, 본 연구팀에 의한 독창적인 발견이며, 분자적 수준에서 작용 메카니즘을 밝힘으로서 과학적인 증거가 뒷받침된 (science-based nutraceutical) 기능성 식품 및 제약으로의 개발이 가능하다.
- 선행연구를 통하여 이미 잣버섯의 면역 조절 활성 및 조절작용에 대한 다수의 과학적 증거를 제시한 바, 산업화에 관련된 후속연구를 통해 단기간에 제품 개발을 완료할 수 있음.
- 기존에 확보하고 있던 천연물 연구의 노하우와 첨단 생명공학 기술을 이용한 과학적인 작용기전 연구 성과를 통해 면역 활성 기능을 갖는 개별인정형 건강기능식품으로서의 새로운 개발 사례를 제시할 수 있음.
- 잣버섯의 대량 생산이 가능하게 되면 부가가치가 높은 균류 유래 약용물질 (mycomedicinal)의 생산 및 개발이 가능하게 되므로 잣버섯 대량 인공재배기술의 개발은 새로운 버섯의 대량 재배기술 확립과 기능성 성분의 개발에 의한 새로운 가치의 창출 등으로 농촌 주민의 수익증대와 신약 개발에 크게 이바지할 것으로 기대됨.

- 산업경쟁력 측면에서 고품질, 다수확 버섯재배기술과 생산비 절감에 더욱 노력할 필요가 있음. 그러므로 재배시설의 현대화, 새로운 버섯개발 및 보급에 의한 수요창출이 필요한 당면과제이므로 버섯균사의 배양기간이 짧고 활력이 좋아서 버섯생산기간을 대폭적으로 줄일 수 있는 우량 액체종균의 개발, 및 이를 이용한 대량생산기술의 개발이 절대적으로 요구된다.

## 2. 경제·산업적 측면

- 버섯을 포함한 세계 천연물 시장 규모는 공식적인 통계상 최소 200억 달러 이상으로 세계 천연약물의 주요 소비처는 유럽, 미국, 아시아 3대 지역에 집중되어 있음.
- 이중 아시아 지역의 경우 전통적으로 동양의학에 바탕을 둔 천연물 이용의 오랜 역사가 있으므로 다른 지역에 비해 상대적으로 소재가 풍부하고 문헌 등의 정보 이용이 용이함.
- 면역 활성 관련 제제는 고령화 사회 및 환경오염 등의 영향으로 시장규모의 지속적 확대가 예상됨 (2000년 세계시장 규모 : 48억불, 매년 13% 성장률 기록).
- 특히 감기/독감 관련 면역제제 및 항암제, 항암보조제 관련 시장의 규모는 미국에서만 약 14조원 규모로서 계속 증가되는 추세에 있음.

시장	규모	년도
감기/독감 관련 면역제제 시장	약 10조원	2000, 미국
항암제 관련 시장	약 3조원	2000, 미국
항암제 관련 보조제 시장	6600억 원	2000, 미국

- 따라서 첨단 생명과학 기술을 바탕으로 과학화된 면역 활성화 제품 개발이 이루어진다면 경쟁이 가속화되고 있는 면역 관련 제품 시장에서 주도적인 역할을 함은 물론 고부가가치 산업 활성화를 실현하므로써 생물산업 선진국으로 발돋움할 수 있음.
- 특히 잣버섯의 경우 식용 가능한 야생버섯으로 본 연구진에 의해 최초로 대량재배기술이 연구되었으며 이를 농가에 보급하여 상용화할 경우 식용 및 약용버섯으로서 뿐만 아니라 다양한 제품의 원료로 이용되어 막대한 경제적 가치를 생산할 수 있음.

다양한 버섯 추출물에 대한 연구는 오랜 기간 계속되어 왔지만 기존의 연구 수준은 매우 낮으며, 비슷한 연구 방법을 이용하여 비슷한 효능을 모방하는 수준(수준 높은 학술지에 게재되기 힘든 이유임)으로 고부가가치산업 (기능성 식품 및 제약)시장에 진출하는데 걸림돌이 되고 있음.

따라서 첨단 분자 생물학을 이용한 메카니즘의 연구는 학술적으로 뿐만 아니라 경제 산업적 가치 창출을 위하여 매우 중요함.

본 연구팀의 선행연구결과는 잣버섯 성분이 면역 및 조혈 작용을 나타내는 생리조절제로서 사용될 수 있다는 강력한 증거들을 보여준 것임.

잣버섯이 창출할 수 있는 경제적 산업적 전망은 비교적 빠른 시간 내에 고부가가치성 생리 조절형 기능성 식품 시장에 진출하는 것 (조혈 작용 및 감염증에 대한 저항성등을 포함하는 면역조절제 시장)과 농가에서 새로운 약용 버섯을 재배하게 되는 시장을 포함하며 장기적으로는 천연물 신약으로 개발하는 것이 가능함.

잣버섯은 식용으로서 안전성이 확보되어 있을 뿐만 아니라 경구투여에 의하여도 조혈 작용을 나타내기 때문에 새로운 생리 기능을 나타내는 기능성 식품으로 개발하기 위한 최적의 조건을 가지고 있음.

버섯은 농산촌의 고소득 작물이나 우리나라에서 재배되고 있는 버섯의 종류는 12종에 불과하므로 (일본에서는 25종이 대량생산) 버섯경쟁력 제고를 위하여 새로운 기능성 버섯재배기술의 개발 및 보급이 필요함.

우리나라에서 인공 재배되는 주요한 식용 및 약용 임산버섯(표고, 영지, 상황등)은 참나무류 원목을 이용한 원목재배가 주종을 이루고 있으나 버섯재배용 원목확보를 위한 참나무 원목의 무분별한 벌채는 환경보전의 측면에서 산림환경을 크게 훼손시키고 있음.

그러나 잣버섯은 우리나라에서 분포가 많은 소나무류를 포함하는 침엽수의 고사목에서 서식하는 버섯이기 때문에 공공근로사업으로 임지내에서 간벌되지만 경제적인 가치가 없어서 특별하게 사용될 용도가 없는 침엽수 소경재 또는 폐잔목을 이용한 버섯재배가 가능하여 산림환경의 보전과 폐자원의 재활용이라는 두 가지의 큰 이점을 가짐.

- 잣버섯의 생리활성효능이 구체적으로 밝혀져서 기능성 식품의 개발이 가능하다면 약리적 농산자원으로 개발됨으로써 농촌 주민의 경제에 크게 기여할 수 있음.

### 3. 사회·문화적 측면

- 노령화 사회가 가속화됨에 따라 건강한 노년, 질병 없는 노년에 대한 관심 및 비용 지출 증가
- 웰빙 문화가 대중적으로 자리잡음에 따라 유기농 제품이나 천연물 소재 제품에 대한 소비자들의 선호도 및 소비 증가
- 산업발달에 따른 환경문제 및 국민의 식생활 습관 변화에 따라 인류의 건강은 다양한 질병으로부터 위협받고 있으며 특히 면역기능 저하에 의해 초래될 수 있는 질환들에 대한 경각심으로 인해 면역 기능을 활성화하기 위한 건강기능식품 및 영양제 등의 사용이 대중화되고 있음.
- 특히 최근 몇 년간 전세계적으로 사회적 관심의 초점이 되고 있는 사스(SARS : 중증 급성 호흡기증후군)나 조류독감을 비롯한 감염성질환의 위험성 증가에 따라 이들의 예방 및 치료와 관련하여 선천성 면역 기능을 활성화시키는 건강기능식품 및 의약품에 대한 관심이 증가하고 있음.
- 버섯 추출물의 작용 기작을 분자 생물학적인 방법을 이용하여 밝히고, 동물 실험등을 통한 다른 버섯과의 비교 연구 등을 통하여 본 연구팀의 연구 결과를 세계적으로 수준 높은 학술지에 게재함으로써 기능성 작용, 약리 작용 등을 공식적으로 인정받을 수 있음.
- 인체시험 등을 통하여 기능성이 입증된 건강기능식품의 개발이 가능함.
- WTO 체제하에서 세계 농산물의 수입자유화 조치로 농임산물의 고품질, 다수확 작목재배를 위한 고부가가치 대체작목의 개발이 필요한 실정임.
- 따라서 새로운 기능성버섯의 대량재배는 유용버섯자원의 효율적인 이용, 상품 개발에 의한 지역경제를 활성화, 우수한 효능을 가진 한국고유의 천연물 및 기능성 식품소재의 개발이 가능함.

### 제 3절. 연구개발의 범위

본 연구는 (1) 첨단 분자 생물학적 방법(chip technology)을 이용한 잣버섯 자실체의 조혈 및 면역 활성 작용의 메카니즘 연구 및 생리활성성분 분석 (서울대 생명과학부), (2) 적응증 탐색, 기존 버섯과의 효능 비교, 제제화 연구를 통한 건강기능식품 개발 ((주)헬릭서) 및 (3) 잣버섯 생산성 향상 기술 개발을 통한 대량생산 (강원대 산림자원학부)에 관한 연구들을 포함한다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1절. 국내 기술개발 현황

#### 1. 버섯 관련 건강기능식품의 현황

가. 고시형 건강기능식품 : 버섯의 자실체 또는 균사체를 주원료로 하는 건강기능식품은 다음과 같음.

- 버섯자실체 제품 : 영지버섯, 운지버섯, 표고버섯의 자실체 건조물을 분말화한 것이나 자실체를 물 또는 주정으로 추출한 것을 주원료로 하여 제조, 가공한 제품
- 버섯균사체 제품 : 영지버섯, 운지버섯, 표고버섯의 균사체 배양물을 물 또는 주정으로 추출한 것을 주원료로 하여 제조, 가공한 제품
- 기능성 내용 : 상기 버섯 관련 제품의 기능성은 원활한 혈행을 돕고 생리활성 물질을 함유하며 건강을 증진 및 유지시키는데 있음.

나. 개별인정형 건강기능식품 : 현재까지 식약청으로부터 특이적인 기능성을 인정받은 버섯 제품의 사례는 다음의 1건이 유일함.

- 목이버섯 YJ001 : 목이버섯 분말로 45%의 식이섬유를 함유하여 배변활동을 원활히 하는데 도움을 줄 수 있다는 기능성을 인정받음 (2005년, (주)주신 R&D)

#### 2. 버섯 가공 건강보조식품의 생산 현황

- 2003년 국내 버섯가공식품의 생산실적은 151억원으로 알로에, 키토산에 이어 3위를 차지하고 있으나 제품의 다양성 및 차별화가 이루어지지 않은 상태임 (2004년 백서-식품산업, 한국보건산업진흥원).

#### 3. 버섯 관련 연구 동향

- 식용재배버섯의 품종이 매우 단순하여 수요자의 기호도에 알맞은 품종이 결여되어 있으므로 새로운 버섯품목의 확대개발이 절실히 요청되는 실정임.
- 본 연구과제의 대상인 잣버섯은 기존의 식용재배버섯과는 달리 송진향을 함유하고 있고 약리적 성분이 함유되어 있으므로 새로운 식용 및 약용 버섯으로서의 가치가 매우 큼.
- 그러나 향후의 소비수요에 대한 높은 기대치에도 불구하고 아직 액체종균을 이용한 대량재배기술, 성분 및 약리효과 분석, 기능성 향상 재배기술 개발 등에



대한 연구가 이루어지지 않고 있음.

- 따라서 잣버섯의 자실체의 대량재배기술 확립을 비롯하여 생리활성 성분에 대한 분석과 기능성, 효능에 관련된 연구가 매우 절실히 요구됨.

## 제 2절. 국외 기술개발 현황

### 1. 버섯 관련 연구 동향

- 주로 중국, 일본을 중심으로 영지버섯, 잎새버섯, 복령, 송이버섯, 아가리쿠스버섯, 상황버섯 등에 대해 항암효과, 조혈 및 면역조절작용에 관한 활발한 연구가 진행중임.
- 그러나 이들 버섯의 대부분은 이미 균사체 및 자실체의 대량배양을 통한 제품화가 이루어진 상태로서 특허적 요소나 상품성을 고려할 때 새로운 기능성 소재로서의 가치가 없음.
- 뿐만 아니라 이들 버섯의 분자생물학적 작용 메카니즘이나 약리 작용에 관한 심도있는 연구는 매우 부족한 실정임.
- 일본의 경우 첨단기술을 이용한 신종버섯이 다수 개발되어 농가에서 재배가능한 버섯의 종류가 25종이고 유사버섯들도 종이 다양하여 기후변화, 지역적 특성 등에 알맞은 버섯을 선택하여 주년재배가 가능한 실정임.

### 2. 건강기능식품 시장 동향

- 2004년도 미국의 건강기능식품시장은 800억불을 넘어설 것으로 예측되며 향후 10년간 매년 10% 이상의 성장이 지속될 것으로 전망되고 있으며, 이중에서도 특히 허브 등의 식물성 추출물을 비롯한 특별용도제품 시장의 성장률이 가장 크게 예상되고 있음(Nutrition Business Journal, 2003).
- 일본의 경우, 건강기능식품군 중 버섯류에 해당하는 것은 표고버섯과 영지버섯 가공식품 뿐이며, 그 외의 기능성 버섯류에 대해서는 특정보건용식품으로 허가가 필요함. 2001년 현재 특정보건용식품으로 가장 각광을 받는 제품은 콜레스테롤 및 혈당 저하, 체중감소, 치아 건강관련 제품이며 향후 면역증강 관련 제품의 성장이 예상되고 있음.

### 3. 면역조절 관련 연구 동향

- 항암치료의 경우 기존의 세균이나 바이러스성 물질을 이용한 비특이적 면역치료법, 사이토카인이나 항체를 이용한 면역치료법외에 확인된 종양항원을 이용한 백신법 및 미확인된 종양항원을 이용한 백신법 개발이 활발히 진행되고 있

음.

기존의 화학제제 및 새로운 치료제의 보조제로서 천연물 소재 개발의 중요성이 대두됨.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1절. 연구개발 목표와 내용

잣버섯 자실체의 조혈 및 면역 활성화 성분 및 그 작용을 분자적 수준에서 밝히고, 생리 조절 작용을 입증하며, 대량 배양 기술을 확립한다.

1. 제 1 세부과제 : 잣버섯 자실체의 생리 활성 성분 분석 및 작용 메카니즘 연구 (서울대 생명과학부)

- 잣버섯 자실체의 수용성 추출물에 의한 인간 말초 혈액세포에서의 사이토카인 활성화 메카니즘을 규명하고 잣버섯 자실체 추출물의 생리활성성분을 분리, 구조를 동정하며 이들의 면역세포 활성화에 관한 분자생물학적 작용기전을 연구하고자 함.

2. 제 1 협동과제 : 잣버섯 자실체로부터 건강기능식품 개발 ((주)헬릭서)

- 잣버섯으로부터 기능성 식품을 개발하기 위해 동물 모델에서의 잣버섯의 적응증 연구 및 분자적 작용 메카니즘 연구를 비롯하여 기존의 타 버섯 제품과의 비교 연구, 잣버섯 자실체 추출물의 제제화에 관한 연구를 시행 하며 이를 바탕으로 건강기능식품(nutraceutical) 개발 준비를 완료하고자 함.

3. 제 2 협동과제 : 잣버섯 생산성 향상 기술 개발 (강원대 산림자원학부)

- 잣버섯을 상업적인 규모로 대량 인공 재배하는 기술을 개발하기 위하여 잣버섯의 균주자원 확보 및 우량품종을 육종하고, 액체종균 배양기술을 확립하며, 액체종균을 사용하여 버섯생산성을 향상시킬 수 있는 최적 대량생산 시스템을 개발하고자 함.

### 제 2절. 실험방법 및 결과

1. 제 1 세부과제 (서울대학교)

가. 실험방법

1) 잣버섯 추출물에 의한 사이토카인 활성화의 작용기전 연구

가) cDNA microarray를 이용한 사이토카인 활성화 분석

- 건강한 사람으로부터 혈액을 얻은 뒤 Ficoll-hypaque를 사용하여 농도구배로 PBMC를 분리한다. PBMC에 PG101 (10 ug/ml) 또는 동일한 부피의 PBS를 24시간동안 처리한다. Trizol을 사용하여 세포로부터 RNA를 추출한다. PG101을 처리한 세포로부터 얻은 RNA는 Cy5-dUTP로, PBS를 처리한 세포로부터 얻은 RNA는 Cy3-dUTP로 AMV를 사용한 역전사반응을 시켜 형광표지된 cDNA를 얻는다. 두 cDNA를 합쳐 IntelliGene™ Human Cytokine CHIP (TaKaRa Shuzo, Kyoto, Japan)에 넣고 65°C에서 16시간 동안 혼성화 과정을 거친다. GMS 418 Array Scanner (Genetic MicroSystems, Woburn, MA, USA)로 형광을 읽은 뒤 ImaGene software로 형광의 정도를 수치화한다. 각 유전자의 상대적인 발현 정도는  $\beta$ -actin으로 표준화를 시킨 뒤 Cy5/Cy3의 비율로 활성화된 정도를 구하며 값이 2 이상이면 활성화된 유전자로 간주한다.

나) Cycloheximide 처리를 통해 잣버섯 추출물에 의해 직접적으로 활성화되는 사이토카인 규명

- PBMC를 위와 같은 방법으로 분리한다. 분리된 PBMC에 100  $\mu$ g/ml로 단백질 합성 억제제인 cycloheximide를 처리하고 세포를 두 그룹으로 나누어 한 곳에는 10  $\mu$ g/ml의 PG101을 처리하고 다른 한 곳에는 동일한 부피의 PBS를 처리한다. 4시간 동안 세포를 배양한 뒤 cDNA microarray를 위와 같은 방법으로 수행하여 PG101이 직접적으로 활성화시킨 사이토카인의 RNA으로의 발현을 확인한다.

다) Northern blot analysis를 통한 유전자 발현 확인

- PBMC를 위와 같은 방법으로 분리한다. 분리된 PBMC에 10  $\mu$ g/ml의 PG101 또는 동일한 부피의 PBS를 24시간 동안 처리한다. Trizol을 사용하여 세포로부터 RNA를 분리한 뒤 15  $\mu$ g의 RNA를 formaldehyde가 들어있는 1% 아가로스 젤로 전기영동 시킨다. 모세관이동방법으로 나일론 막에 전기영동된 RNA를 이동시킨 뒤 80°C에서 2시간 동안 보관하여 RNA를 막에 고착시킨다. DNA probe는 [<sup>32</sup>P]dCTP로 방사선 표지를 한다. 방사선 표지된 probe와 RNA가 고착된 나일론 막을 68°C에서 ExpressHyb hybridization solution (Clontech laboratories, Palo Alto, CA, USA)을 사용하여 1시간 동안 혼성화시킨다. 상온과 50°C에서 행굼과정을 거친 뒤 나일론에 혼성화된 probe는 X-ray 필름에 노출시켜 혼성화된 정도를 측정하여 발현된 RNA를 확인한다.

2) 생리활성 성분 분리 및 특성 규명

가) 잣버섯 자실체 추출물의 ethanol 침전물 제조

- 잣버섯을 조각낸 후 1 g의 잣버섯에 2 L의 물을 첨가하여 100°C에서 3번 추출한 뒤 Whatman filter paper로 수용성 물질만을 걸러내었다. 이 후 감압증발 및 동결건조를 통해 건조된 PG101을 얻었다. D.W.에 건조된 PG101을 녹인 뒤 4°C의 ethanol을 3배 부피 (75%)로 넣고 흔든 뒤 4°C에서 3일간 냉침시켰다. 냉침된 시료는 12,000 rpm에서 20분 동안 원심분리시켜 상등액(ES)과 침전물(EP)을 얻었다. 각 상등액과 침전물은 cellulose membrane (Sigma, Mw=12,000)에 넣고 7일 동안 4°C에서 D.W.로 투석시켜 잔류하는 ethanol을 제거하고 동결건조하였다. 동결건조된 ethanol 침전물을 D.W.에 풀어 낸 뒤, 12,000 rpm으로 20분동안 원심분리시켜 상등액(EPS)과 침전물(EPP)를 얻고 동결건조하였다.

나) DEAE-Cellulose 정제

- DEAE-Cellulose (Sigma, USA)를 제조사의 지시대로 activation 시킨 뒤 20분 동안 감압시켜 degasing 시킨다. Activation 된 resin을 2.5 X 40 cm 크기의 column (Biorad, USA)에 충전시킨 뒤 충전된 부피의 2배 만큼의 버퍼(10 mM NaOH • CH<sub>3</sub>COOH, pH9.5)를 흘려주어 equilibration 시켰다. Ethanol 정제된 PG101(EPP)을 1 mg/ml로 10 mM NaOH에 녹인 뒤 30분 동안 80°C에 물중탕시키며 강하게 stirring 해주어 녹였다. 초산을 사용하여 EPP 수용액의 pH를 9.5로 보정한 뒤 20 mg을 column에 loading하였다. Elution 조건은 다음과 같았다. Flow rate; 0.9 ml/min, fraction volume; 5.5 ml. NaCl을 gradient로 0 M에서 3 M까지 걸었으며 각기 100 ml 씩 200 ml을 elution 해냈다. 각 fraction에서 당 부분은 phenol-sulfuric acid assay를 통해 정량하였으며 protein 부분은 Bradford assay를 통해 정량하였다. Phenol-sulfuric acid assay는 다음과 같이 실행하였다. 유리시험관에 각 fraction을 200 µl 씩 넣은 뒤 5% 페놀을 200 µl 첨가하였다. Concentrated Sulfuric acid를 각 tube에 1 ml 씩 넣고 10분 동안 발색시킨 다음 spectrophotometer로 490 nm에서 발색정도를 확인하였다. 단백질 정량을 위해 각 fraction의 시료를 50 µl 씩 취하여 96-well에 넣고 1:5 희석시킨 Bradford 시약 (Biorad, USA)을 100 µl 씩 첨가한 뒤 15분동안 발색시켰다. 발색정도는 595 nm의 파장에서 microplate reader를 사용하여 측정하였다.

다) 세포배양

- 건강한 사람으로부터 혈액을 얻은 뒤 serum free RPMI1640과 동일 부피로 혈액을 섞는다. 혈액과 동일 부피의 Ficoll-hypaque (Amersham-Pharmacia,

USA)에 얹은 뒤 1,800 rpm, 4°C에서 원심분리시켜 농도구배를 형성하여 중간 층에 형성된 PBMC를 분리한다. PBMC를  $1 \times 10^6$ 으로 세포수를 맞춘 뒤 각 sample을 100 µg/ml 씩 처리하고 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 배양 시킨다. 원심분리를 통해 배양 여액만을 얻어 ELISA를 측정한다.

#### 라) TNF-α의 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

- 상용으로 시판되는 TNF-α ELISA kit (Pierce-Endogen, USA)을 구입한 뒤 제조자의 지시대로 실험하였다. 실험과정은 간단히 다음과 같다. 표준시약은 1:2연속희석을 통해 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 pg/ml의 농도로 만든다. 미리 TNF-α에 대한 항체를 붙여둔 96-well plate에 표준시약 및 농도를 구하고자하는 샘플을 50 µl씩 넣고 1시간 반응시킨다. 1시간 후 3번의 헹굼 과정을 거치고 biotin으로 표지된 TNF-α 항체를 100 µl씩 각 well에 넣는다. 1시간 동안의 반응 후 3번의 헹굼과정을 수행한다. 이곳에 biotin과 결합할 수 있는 streptavidin이 붙어있는 Horse Radish Peroxidase를 100 µl 넣고 30분간 반응시킨다. 3번의 세척 과정으로 반응이 되지 않은 여분의 효소들을 제거시킨 뒤 반응 용액인 TMB 용액을 100 µl 넣어 발색반응을 30분간 시키고 1 N 황산을 넣어 모든 효소활성을 정지시킨다. Microplate reader로 450 nm 파장에서 발색이 일어난 정도를 측정하여 표준시약의 발색반응정도와 비교하여 샘플에 들어있는 TNF-α의 농도를 측정하게 된다.

### 3) 생리 활성 물질 규명

#### 가) 단당류 조성 분석

- 건조된 시료 300 µg을 400 µl의 2 M, TFA (trifluoroacetic acid)에 녹인 뒤 4시간 동안 100°C에서 산 가수분해를 시킨다. Speedvac을 사용하여 TFA를 제거시킨 뒤 D.W.를 200 µl 넣고 다시 SpeedVac으로 건조시킨다. D.W.로 건조시키는 과정을 2회 반복한다. 완전히 건조된 시료를 물에 녹인 뒤 C18 Sep-Pak (Waters, USA)에 통과시켜 극성물질을 제거하고 45 µm pore size의 membrane filter를 사용하여 filtering 시킨다. 산 가수분해된 시료의 단당류는 Bio-LC (Dionex, USA)로 분석한다. Mobile phase는 200 mM NaOH이며 column은 CarboPac PA1 (4.6 X 250 mm, Dionex, USA)였으며 PAD (pulsed amperometric detector)를 사용하여 단당류를 검출하였다.

#### 나) Laminarinase 처리를 통한 잣버섯 추출물의 glucan 분석

- Ethanol 정제를 시킨 PG101 (10 mg/ml) 및 laminarin (1 mg/ml)에

laminarinase를 2.5 Unit/ml (40 mM sodium acetate, pH 5.0)을 넣고 37°C에서 24시간 동안 반응시킨다. Silica TLC (Merck, Germany)에 각기 30 µg 씩 spotting하고 1-butanol : 1-propanol : acetic acid : D.W.=30:10:10:10의 전개용액에 전개시킨다. 전개 후 10분 동안 air-dry시키고 DAP (Diphenylamine/aniline/phosphoric acid) 시약을 spray로 뿌리고 10분 동안 100°C에서 발색시킨다.

#### 다) SDS-PAGE

- PG101 100 µg을 sample buffer에 넣고 100°C에서 5분 동안 물 증탕으로 가열한다. 10 % SDS-PAGE에 sample을 loading하고 120V에서 전기영동을 하였다. Silver staining을 통해 protein의 band를 확인하였다.

#### 4) 대식세포 활성화의 작용 기전 연구

##### 가) RT-PCR을 이용한 IκB-β의 발현 확인

- RAW264.7 cell을  $2 \times 10^5$  cell/ml로 분주한 뒤 24시간 뒤에 PG101을 100 µg/ml로 처리하고 일정 시간 뒤에 cell을 harvest 하였다. 사람의 RNA는 PBMC를 앞서 제시한 방법으로 분리하였다. Trizol을 사용하여 cell에서 RNA를 분리한 각 group 별로 동량 (1 µg)의 RNA와 oligo d(T) (Invitrogen, USA)를 섞고 reverse transcriptase (Takara, Japan)를 이용하여 cDNA를 얻었다. 이 cDNA를 이용하여 각 유전자를 94°C, 30초; 50°C, 30초; 72°C, 30초동안 반응시키는 과정을 25번 반복하는 PCR을 하였다. Mouse IκB-β의 primer는 5'-TCG GGT GAC ACA GTT GGA C-3', 5'-ACA GGG CAA ATG GTC TAT GT-3'이었으며, mouse IL-6는 5'-TAC CTG GTC TTT TGG AGT TTG-3', 5'-ATG ATC TGG CTC TGA AAC AAA-3', mouse GAPDH는 5'-TGA GAA AGG GCT CTG CCT GA-3', 5'-GGG CAT CTG AGA GCG AGT CT-3'이었으며 human IκB-β는 5'-TGT GGA TCT TGA GGC AAC TA-3', 5'-CAG GAT ACG TCG GAT CTG T-3'을 사용하였다. PCR 산물을 1% agarose에서 전기영동하고 EtBr을 사용하여 band를 확인하였다.

##### 나) Northern blot analysis를 이용한 유전자 발현 확인

- 앞서 제시한 방법을 통해 얻은 PBMC를 얻은 뒤  $1 \times 10^6$  cells/ml 농도의 세포에 PG101을 100 µg/ml로 처리하고 6시간 뒤에 cell을 harvest 하였다. Trizol을 사용하여 세포로부터 RNA를 분리한 뒤 15 µg의 RNA를 formaldehyde가 들어있는 1% 아가로스젤로 전기영동 시킨다. 모세관이동방법으로 나일론 막에

전기영동된 RNA를 이동시킨 뒤 80°C에서 2시간 동안 보관하여 RNA를 막에 고착시킨다. RT-PCR을 통해 얻은 human 및 mouse의 I $\kappa$ B- $\zeta$  DNA를 T-easy vector (Promega, USA)에 삽입시킨 뒤 대장균에 transformation 시켜 대량의 I $\kappa$ B- $\zeta$ 에 대한 plasmid를 얻었다. 이 plasmid에 제한 효소인 EcoRI를 처리하고 전기영동하여 I $\kappa$ B- $\zeta$  부분만을 얻어내어 DNA probe로 만든다. DNA probe는 [<sup>32</sup>P]dCTP로 방사선 표지를 한다. 방사선 표지된 probe와 RNA가 고착된 나일론 막을 68°C에서 ExpressHyb hybridization solution (Clontech laboratories, Palo Alto, CA, USA)을 사용하여 1시간 동안 혼성화시킨다. 상온과 50°C에서 행굼 과정을 거친 뒤 나일론에 혼성화된 probe는 phosphoimage plate에 노출 시켜 혼성화된 정도를 측정하여 발현된 RNA를 확인한다.

## 나. 결과

### 1) 잣버섯 추출물에 의한 사이토카인 활성화의 작용기전 연구

#### 가) cDNA microarray를 이용한 사이토카인 활성화 분석

- 잣버섯 추출물이 세포에 미치는 영향을 총체적으로 이해하기 위해 정상인의 말초혈액으로부터 분리된 PBMC를 배양하면서 PG101을 처리한 다음 RNA를 분리하여 사람의 사이토카인 및 그와 관련된 유전자 발현에 대한 영향을 240개의 cDNA가 들어 있는 IntelliGene™ Human Cytokine CHIP (Takara Shuzo, Kyoto, Japan)을 사용하여 분석하였다.
- PG101 처리시 27개의 유전자에서 그 형광의 정도가 2배 이상 증가하는 것이 관찰되었다. I-309는 PG101에 의해 188배 증가된 발현을 보인 유전자로써 CC 케모카인이다. 이외에도 PG101이 활성화시킨 CC 케모카인은 MIP-3 $\alpha$ , LD-78 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1, 등이 있으며 이들은 각각 40, 10, 4.8, 2.4, 2.2배 활성화되었다. CXC 케모카인들도 PG101에 의해 활성화되어 IL-8, GRO- $\alpha$ , GRO- $\beta$ 가 각각 2.3, 34, 17배 활성화된 것이 관찰되었다. Interleukin에 속하는 사이토카인들 중에서는 IL-6, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-24, IL-10이 대조군에 비해 각각 69, 28, 20, 4.6, 2.0배 증가된 형광의 강도를 보여주었다. M-CSF, TNF- $\alpha$ , LIF도 PG101에 의해 활성화된 사이토카인들으로써 각각 49, 5.8, 5.1배 활성화되었다. 사이토카인은 아니더라도 세포의 증식 및 분화에 관련된 유전자들도 PG101의 영향을 받는 것으로 나타났는데 inhibin  $\beta_A$ , Flt-1, PDGF- $\alpha$ , PDGF R  $\alpha$ , PPBP, IL-2R $\alpha$  등의 유전자들은 PG101 처리시 RNA의 발현이 2배 이상 증가하였다.



나) Cycloheximide 처리를 통해 잣버섯 추출물에 의해 직접적으로 활성화되는 사이토카인 규명

- PG101이 직접적으로 영향을 주는 유전자와 간접적으로 영향을 미치는 유전자를 구별하기 위해 1시간 먼저 cyclohexamide를 처리한 후에 PG101을 처리한 세포와 PG101을 처리하지 않은 세포로부터 RNA를 분리하여 앞서와 같은 cDNA microarray를 이용하여 분석하였다.
- Cycloheximide를 처리하더라도 PG101에 의해 RNA의 발현이 2배 이상 증가한 사이토카인은 총 7개였다 (Table 1, 회색부분). 이 중 TNF- $\alpha$ 는 가장 크게 활성화된 사이토카인으로 PG101에 의해 직접 발현되어 다른 사이토카인에도 영향을 줄 수 있는 대표적인 표적 유전자로 생각된다. 이 외에도 6개의 유전자가 PG101에 의해 그 발현이 증가하였는데 이들은 대부분 케모카인 (chemokine)이었다. CC 케모카인에 속하는 LD78 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-3 $\alpha$ 는 PG101에 의해 발현량이 3배에서 10배 가량 증가하였다. 이들 CC 케모카인은 주로 단핵구/대식세포에서 발현되며 대식세포와 T 세포들을 불러들이는 기능을 가지고 있다. 나머지 두개는 CXC 케모카인 IL-8과 GRO- $\beta$ 로서 이들은 각기 약 4배와 6배 정도 RNA 양이 증가된 것으로 나타났다. 주로 단핵구/대식세포와 중성구에 의해 분비되는 CXC 케모카인은 초기 면역 반응에서 숙주를 병원균으로부터 방어하는 역할을 가지고 있다.

Table 1. cDNA microassay 분석법을 이용한 잣버섯 추출물의 세포내 유전자의 영향

Gene	GeneBank Accession No.	Activated Fold		Function
		PG101	PG101 + CHX	
TNF- $\alpha$	X02910	5.8	14.7	Local inflammation
LD78 $\beta$	D90145	10	9.4	
MIP-1 $\alpha$	D90144	4.8	7.2	Monocyte and T cell chemoattract
MIP-1 $\beta$	J04130	2.4	6.5	Monocyte and T cell chemoattract
GRO $\beta$	M36820	17	6.3	Neutrophil chemoattract
IL-8	M26383	2.3	3.9	Neutrophil Chemoattract
MIP-3 $\alpha$	U64197	40	2.5	T, B cell activation
I-309	M57506	188	N.D.†	T cell, monocyte chemoattract
IL-6	X04430	69	N.D.	T, B cell differentiation and monocyte development
M-CSF	M37435	49	N.D.	Monocyte/Macrophage activation
GRO $\alpha$	X54489	34	-3.83	Neutrophil chemoattract
Inhibin $\beta_A$	J03634	32	N.D.	FSH regulation, bone growth
Osteopontin	AF052124	30	N.D.	Bone resorption
IL-1 $\alpha$	M28983	28	-1.45	Macrophage and T cell activation
IL-1 $\beta$	M15330	20	1.3	Macrophage and T cell activation
MMP1	AK024818	16	N.D.	Collagenase
Hsp70	U56725	8.1	N.D.	Molecular chaperone
Flt-1	X51602	8.1	N.D.	VEGF receptor
PDGF $\alpha$	X06374	5.4	N.D.	Cell proliferation
LIF	NM_002309	5.1	N.D.	Macrophage differentiation
PDGF R $\alpha$	M21574	5.0	N.D.	PDGF receptor
IL-24	U16261	4.6	-7.78	Tumor growth inhibition
BMP6	NM_001718	4.3	N.D.	Osteoblast differentiation
Pro platelet basic protein	M54995	4.0	-5.02	Platelet activation
IL2R $\alpha$	X01057	2.4	N.D.	IL-2 receptor
MCP-1	M26683	2.2	N.D.	Monocyte activation
IL-10	M57627	2.0	N.D.	Inflammation inhibition

다) Northern blot analysis를 통한 사이토카인 유전자 발현의 확인

- 앞서의 유전자칩의 결과를 확인하기 위해 Northern blot을 시행하였다. 사람의 PBMC에 CHX를 1시간 동안 넣어주고 이를 다시 PG101 또는 생리식염수를 4시간 동안 처리한 후 세포에서 RNA를 분리하고 Northern blot을 수행하였다.

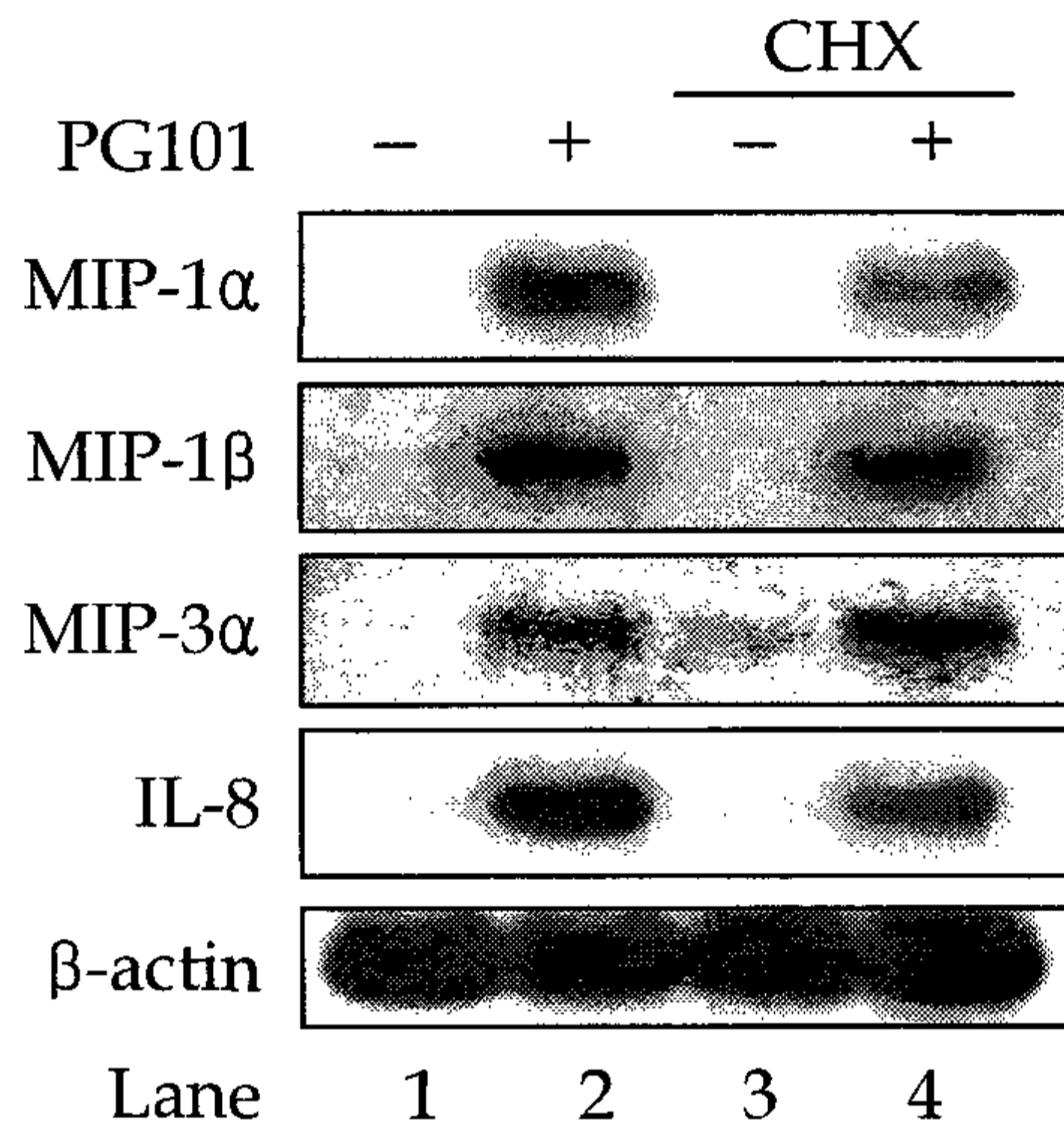


Fig 1. MIP-1α, MIP-1β, MIP-3α, IL-8에 대한 northern blot analysis 결과

- 실험 결과 MIP-1α, MIP-1β, MIP-3α, IL-8의 RNA는 PG101을 처리하지 않은 세포에서 거의 발견되지 않았다. 그러나 PG101을 처리하게 되면 그 양이 크게 증가하였다. 이러한 RNA의 생산은 cycloheximide를 처리하더라도 거의 변하지 않았다 따라서 이들 유전자의 발현은 PG101에 의해 직접적으로 영향을 받아 증가되었음을 확인할 수 있었다.

라) PG101에 의한 MIP-1α와 IL-8의 조절 기전

- PG101에 의해 직접적으로 생산이 증가하는 케모카인 중 구입할 수 있는 ELISA kit은 MIP-1α와 IL-8이었다. 따라서 PG101이 MIP-1α와 IL-8의 발현을 TNF-α와 마찬가지로 해독 후 단계에서 조절하는지 알아보려고 actinomycin D를 처리하여 ELISA로 이들 케모카인이 발현되는 가를 분석하였다.
- 실험 결과, 아무것도 처리하지 않은 평범한 PBMC에서는 MIP-1α가 거의 발현되지 않으나 PG101을 처리하면 2시간 이내에 3.5 ng/ml의 MIP-1α가 생산되었다 (Fig. 2A). TNF-α의 경우와 마찬가지로 ATD를 처리할수록 MIP-1α의 발현이 점점 줄어들고는 있었으나 완전히 억제되지는 않았다. 이를 재확인하기 위해 PG101으로 처리하기 1시간 또는 2시간 전에 ATD로 미리 전사를 억제시

켜도 1 ng/ml의 MIP-1 $\alpha$ 가 발현되고 있었다 (Fig. 2B).

- IL-8의 경우 정상적인 PBMC에서 이미 2 ng/ml 정도가 생산되고 있었다. PG101을 처리하게 되면 2시간 이내에 4 ng/ml의 IL-8이 생산되었다. 이 때 10  $\mu$ g/ml의 ATD로 처리하더라도 2시간 이내에 3 ng/ml 이상이, 6시간 이후에도 10배 정도로 IL-8이 생산되었다 (Fig. 2C). 뿐만 아니라 ATD를 2시간 동안 전처리한 경우에도 5 ng/ml 이상의 IL-8이 생산됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 2D). 이러한 결과는 MIP-1 $\alpha$ 와 IL-8도 TNF- $\alpha$ 의 경우와 같이 PG101의 직접적인 표적 유전자이고 이들의 발현이 다양한 단계에서 조절되고 있음을 보여주는 것이다.

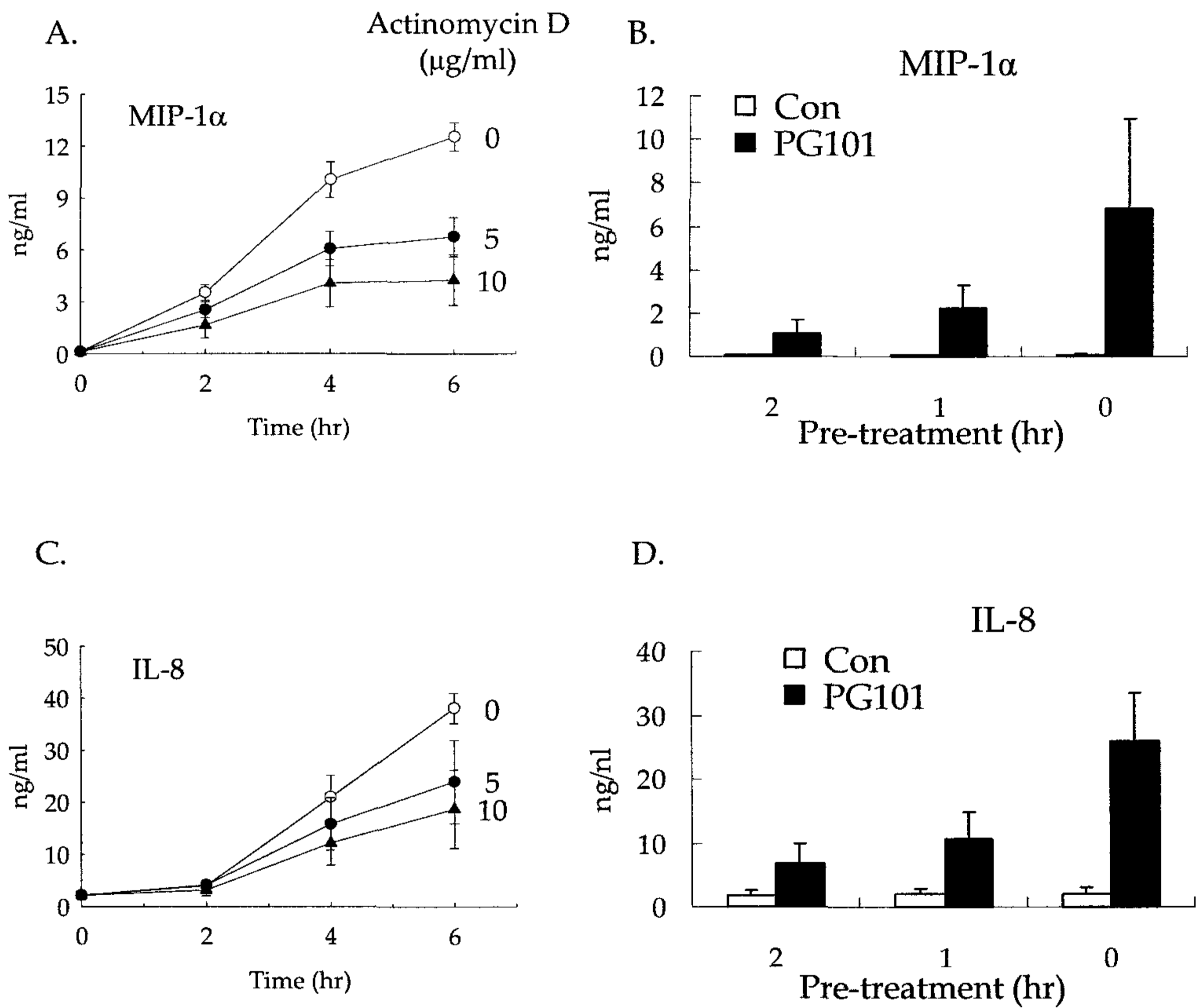


Fig 2. Actinomycin D의 처리를 통한 MIP-1 $\alpha$ 과 IL-8에 대한 PG101의 효과 분석

## 2) 생리활성 성분 분리 및 특성 규명

가) 잣버섯 자실체 추출물의 ethanol 침전물 제조 및 활성 측정

(1) 잣버섯 자실체 추출물의 ethanol 침전물 제조

- 잣버섯 생리 활성 성분의 특성을 규명하고자 다음과 같이 추출물을 정제하였다. 증류수에 녹아있는 잣버섯 추출물에 3배 부피의 ethanol을 첨가하여 침전을 시켰다. 원심분리를 통해 침전물(EP)과 상등액(ES)을 분리시켰다. Ethanol 침전물을 증류수에 suspension시키고 원심분리를 통해 침전물(EPP)과 상등액(ES)을 구별하였다. 침전물은 DEAE-Cellulose를 통해 정제과정을 거쳤다.

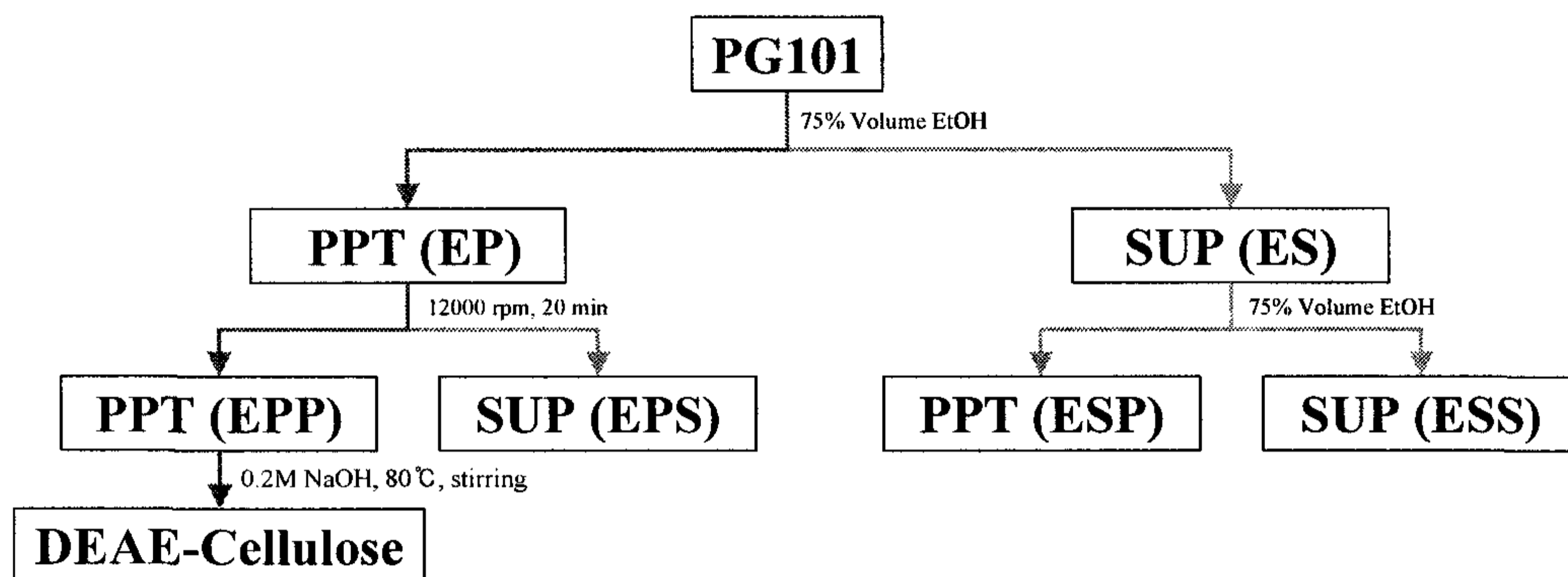


Fig. 3. 잣버섯 추출물 정제 과정.

(2) Ethanol 침전물의 활성 측정

- 잣버섯 추출물의 ethanol 침전물이 가지는 생리활성을 측정하고자 사람의 PBMC에 각기 100 ug/ml씩 처리한 후 24시간 후에 세포배양액으로 분비시킨 TNF- $\alpha$ 의 양을 ELISA로 측정하였다.

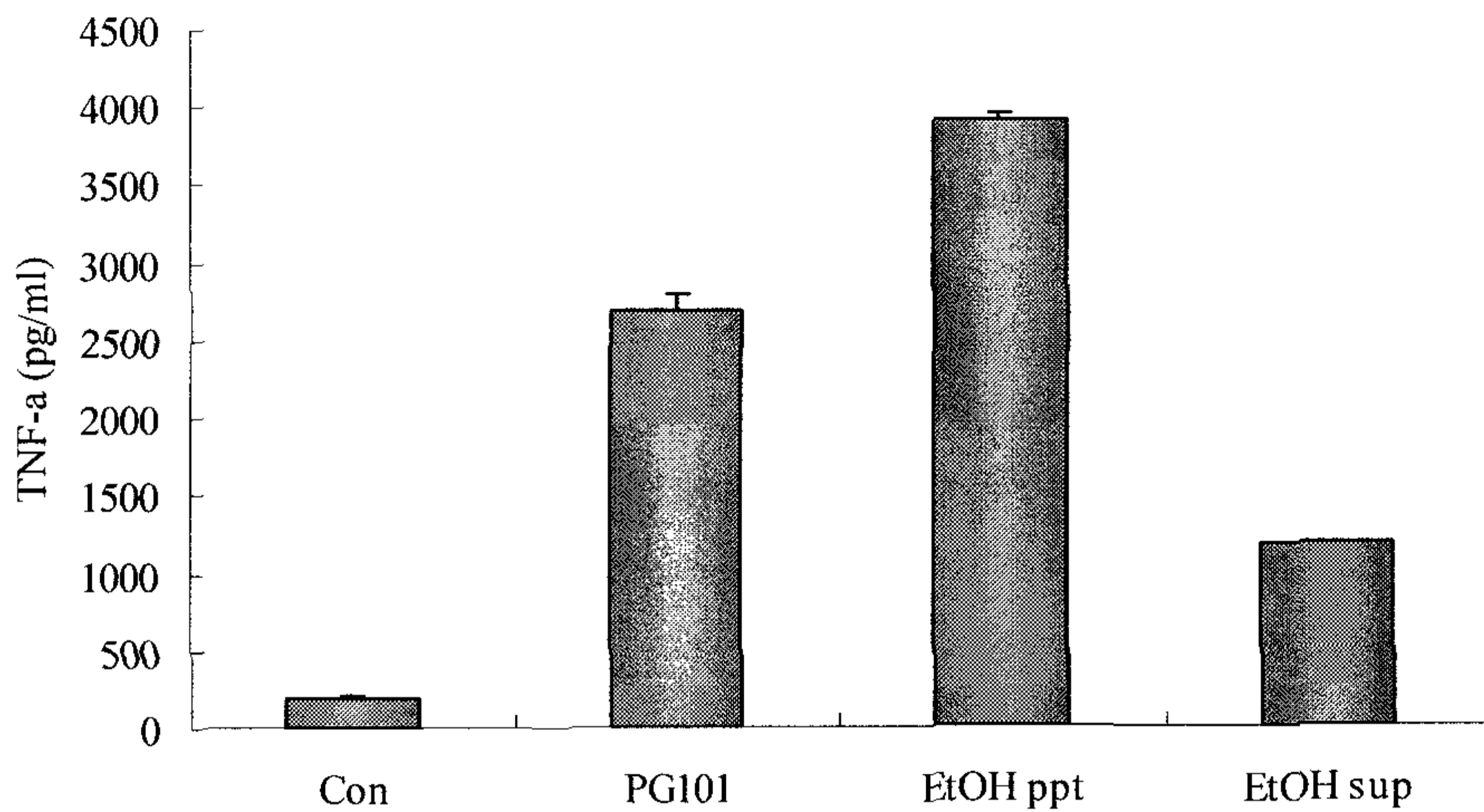


Fig. 4. 잣버섯 추출물의 EtOH 침전물과 상등액에 있는 물질이 TNF- $\alpha$ 의 발현에 미치는 영향.

- 잣버섯 추출물의 생리활성 물질은 ethanol 침전 시 침전이 일어난 부분으로 이동하고 있었다. 이를 통해 생리활성 물질은 고분자 물질임을 알 수 있었다. Ethanol 침전 시 상등액에도 어느 정도의 활성이 있었다. 이는 일부 침전물이 상등액으로 들어갔기 때문으로 여겨진다. 이것은 Fig. 5.에서 ethanol 침전을 통해 확인하였다.

### (3) Ethanol 침전물의 2차 분리 및 활성 측정

- Cellulose membrane (Mw=12,000)을 사용하여 ethanol 침전물을 증류수에 투석시키면 water insoluble한 부분이 나타난다. 원심분리를 통해 water soluble한 부분(EPP)과 water insoluble한 부분(EPS)이 나타난다. 또한 ethanol 침전 시 상등액을 ethanol 침전을 1회 반복하여 ethanol 침전물(ESP)과 상등액(ESS)을 분리하였다. 각기 100  $\mu$ g/ml로 사람의 PBMC에 24시간 동안 처리하고 세포 배양액으로 분비된 TNF- $\alpha$ 를 ELISA로 측정하였다.

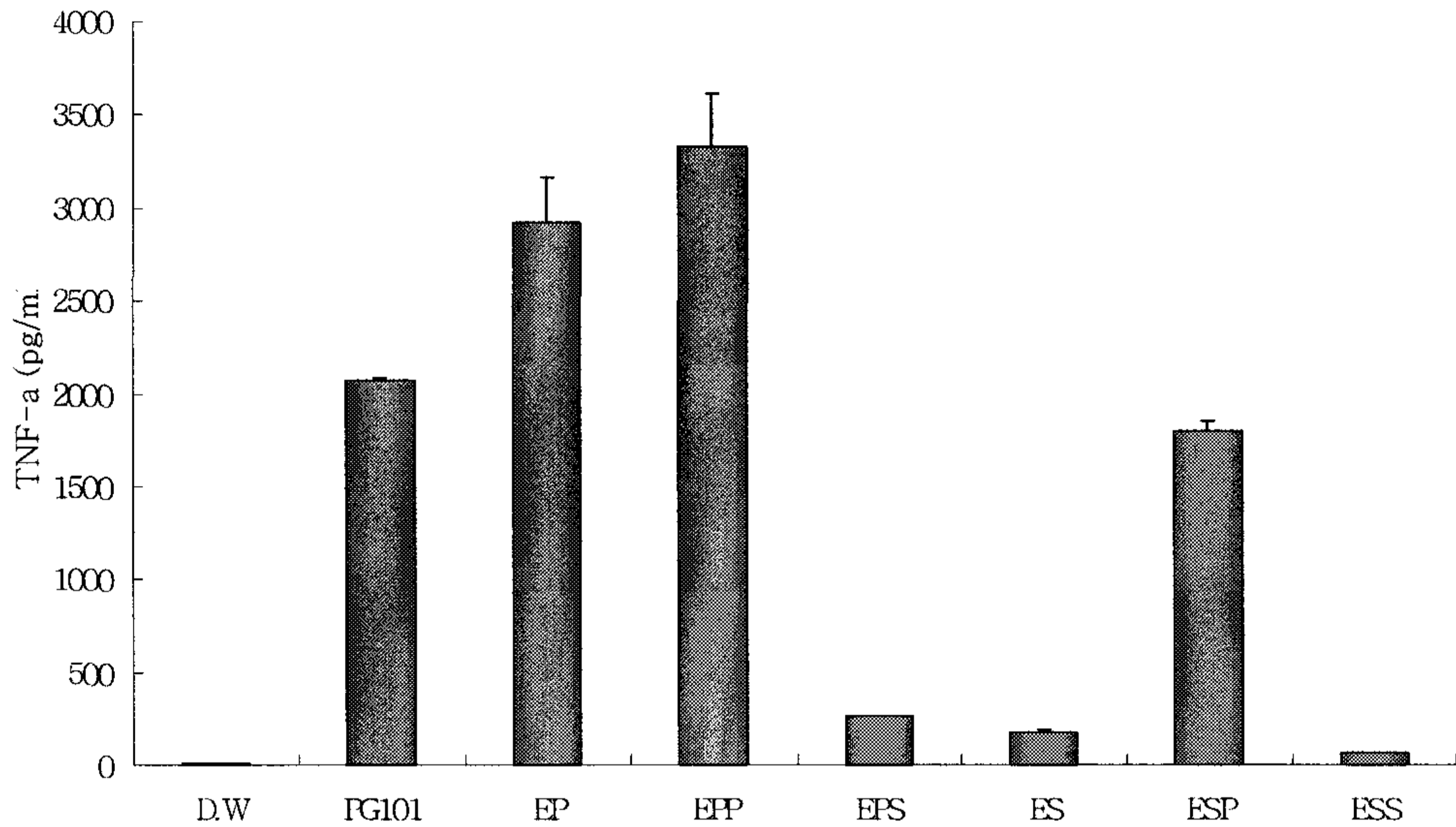


Fig. 5. Water soluble과 insoluble로 구별한 fraction이 TNF- $\alpha$ 의 발현에 미치는 영향.

- Water 침전을 통해 침전이 일어난 EPP가 EPS에 비해 월등히 강한 생리활성을 보이고 있었다. 이것은 생리활성 물질이 water insoluble한 상태로 되었음을 의미한다. 이 후의 정제 과정은 모두 EPP를 사용하여 시행하였다. 일부 활성이 나타난 ES fraction에 ethanol 침전을 1회 반복하여 ESP를 얻었을 때 상당히 생리활성이 ES에 비해서 증가한 것을 알 수 있었다. 이는 ES에 EPP에 해당하는 생리활성물질이 섞여있을 가능성을 시사한다.

#### 나) DEAE-Cellulose 정제 및 활성 측정

##### (1) DEAE-Cellulose를 이용한 활성 성분의 분리

- 생리활성성분의 정제를 위해 anion exchange column의 한 종류인 DEAE-Cellulose를 사용하여 정제를 하였다. Flow through는 170 ml 정도 흘린 뒤 NaCl gradient를 0 M부터 1.5 M까지 걸어주어 fraction을 받아내었다. 각 fraction에 들어있는 당 함유량과 단백질 함유량을 phenol-sulfuric assay 와 bradford assay로 측정하였다.

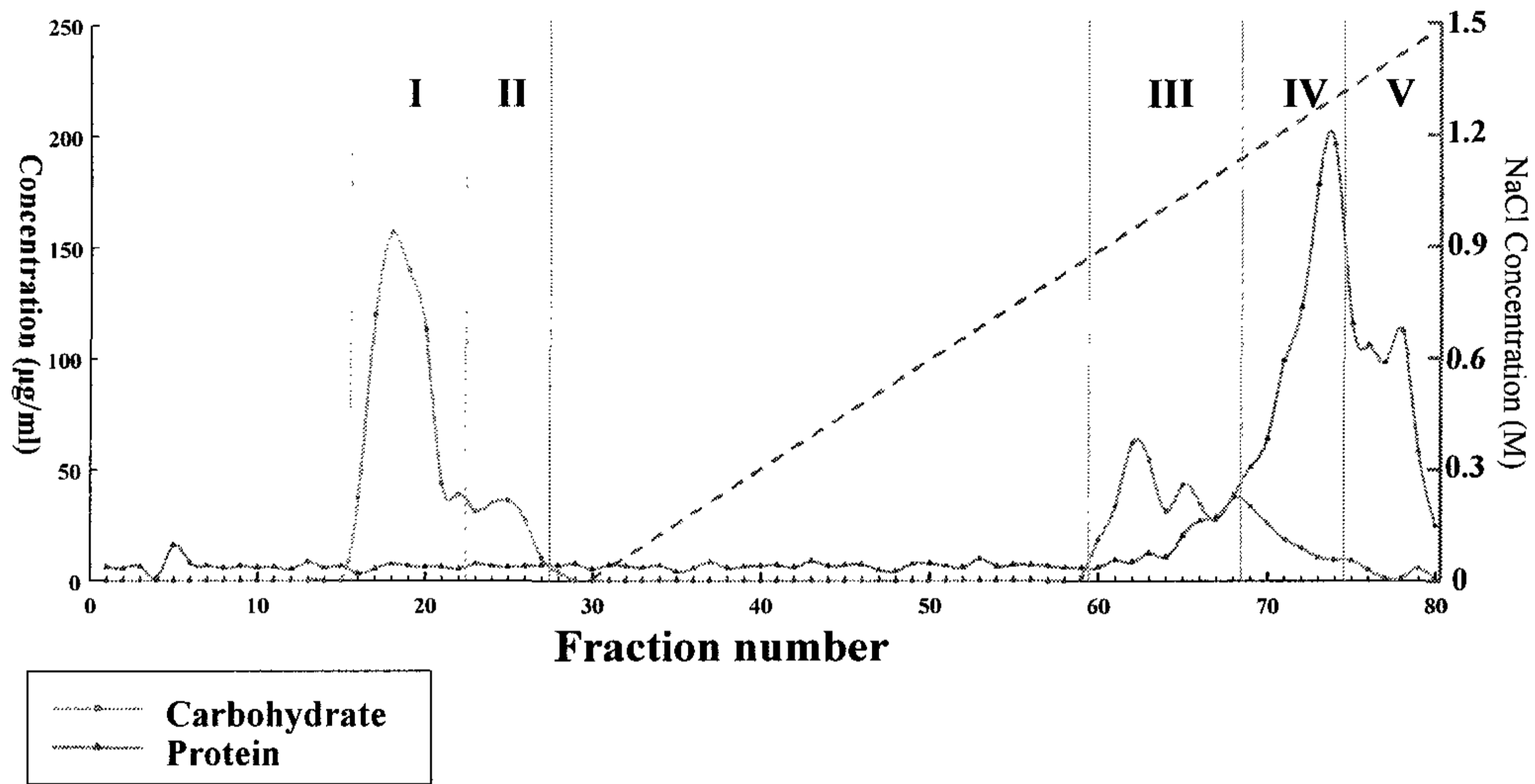


Fig. 6. 잣버섯 추출물의 DEAE-Cellulose column 정제.

- 단백질 및 당 함량 분석 결과, 그림에서와 같이 당 부분과 단백질 부분이 상당히 분리되어 있음을 확인할 수 있었다. 이는 생리활성성분이 당과 단백질의 결합체인 단백다당체일 가능성보다는 당과 단백질이 서로 분리되어 있는 형태일 가능성을 보여주고 있다. 각 fraction을 5개의 영역으로 나누어 단백질 부분과 당질 부분을 구별하였다.

(2) 활성 측정

- 각 fraction이 가지는 생리활성을 알아보기 위해 사람의 PBMC에 각기 100 µg/ml 씩 처리하고 24시간 후 세포배양액에 분비된 TNF-α를 ELISA를 통해 확인하였다.



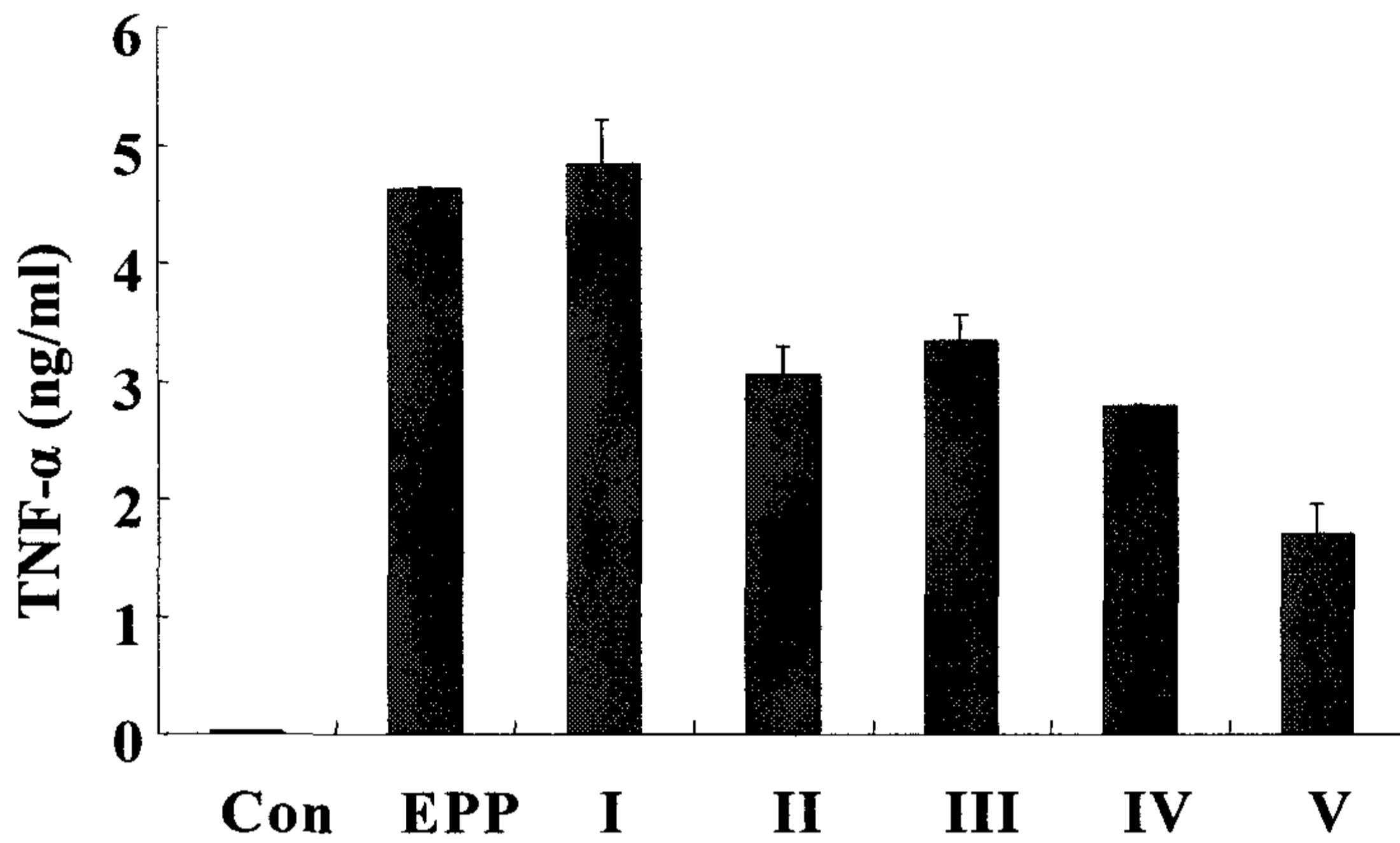


Fig. 7. DEAE-Cellulose의 각 fraction 별 TNF- $\alpha$ 를 발현시키게 하는 specific activity.

- 각 fraction 별로 생리활성을 측정한 결과, fraction I에서 가장 강한 활성을 보였으며 III번 fraction과 II번 fraction이 다음으로 강한 활성을 보였다. 이 부위는 단백질은 없고 오직 탄수화물만이 있는 영역으로서 잣버섯 추출물의 생리활성은 많은 부분 탄수화물이 보이고 있었다. 단백질이 포함된 IV 과 V에서도 I의 50 ~ 60% 정도에 해당하는 활성이 나타나고 있었다. 이는 탄수화물 이외에도 다른 물질이 생리활성을 보이거나 일부 탄수화물에 해당하는 생리활성물질이 IV와 V fraction으로 이동했음을 의미한다.
- Fig. 7.에서 보여주었던 specific activity에 각 fraction에 얻어진 질량을 곱해 total activity를 구하였다. 이것을 통해 잣버섯 추출물 안에서 실제로 표현되는 각 fraction의 활성을 구할 수 있다.

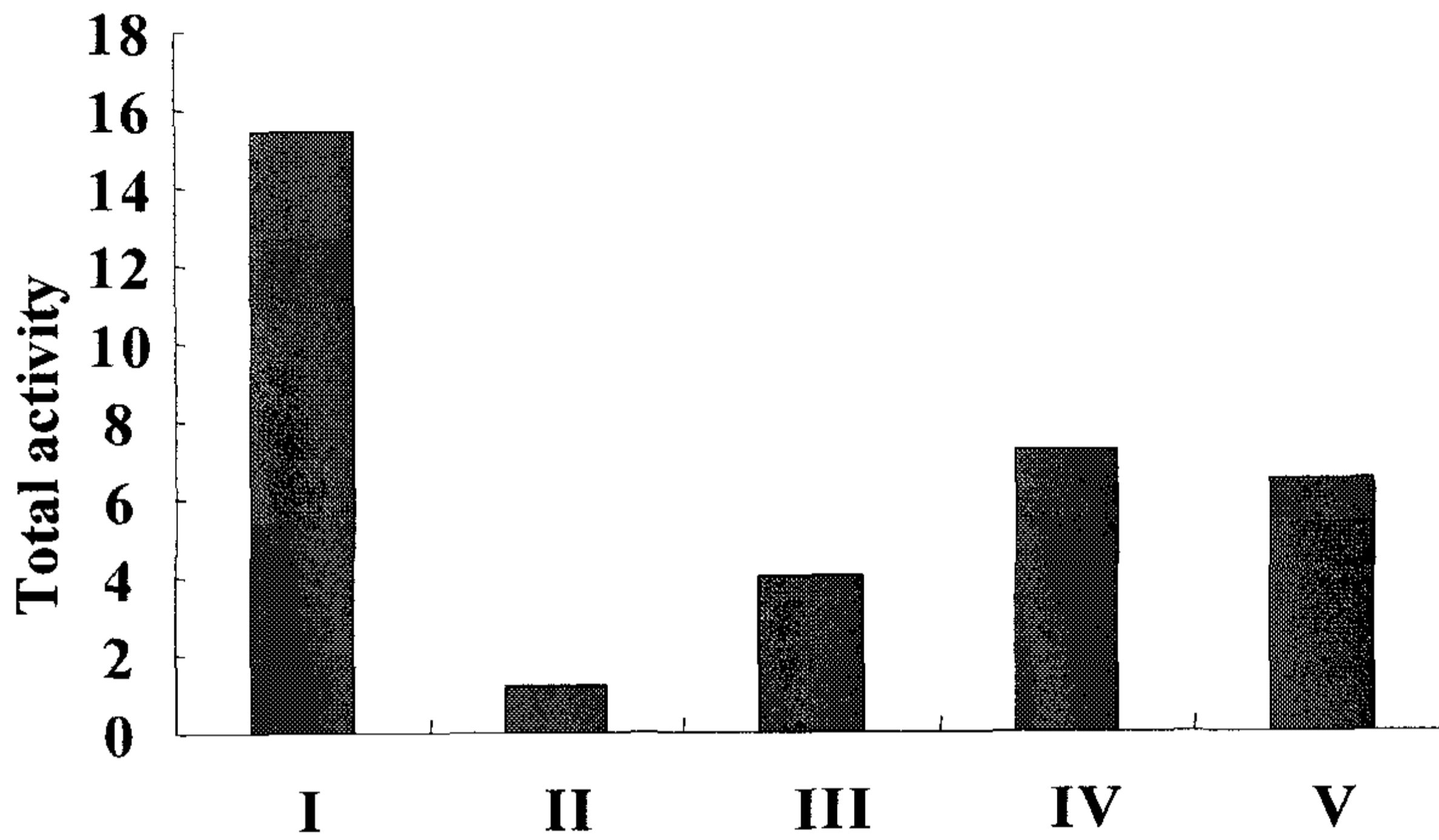


Fig. 8. DEAE-Cellulose의 각 fraction 별 TNF- $\alpha$ 를 발현시키게 하는 total activity.

- Specific activity와 마찬가지로 I의 fraction에서 total activity가 가장 크게 나왔다. 이는 fraction I 이 specific activity는 물론 양 적으로도 많은 비중을 차지하고 있었기 때문이다. 따라서 탄수화물을 포함하는 fraction I을 대상으로 활성물질을 정제하였다.

### 3) 생리 활성 물질 규명

#### 가) 잣버섯 추출물의 단당류 조성 분석

- 잣버섯 추출물의 생리활성물질로 추정되는 다당체의 단당류 조성을 알아보고 이후 다당체의 구조를 분석하기 위하여 단당류 조성 분석을 하였다. 분석을 위해 각 시료에 2 M TFA를 넣고 100°C에서 산가수분해를 하였다. Dionex사의 Bio-LC를 사용하여 단당 분석을 하였다. 이때 사용한 column은 Carbopak PA1이었으며 5개의 표준당(glucose, galactose, mannose, xylose, fucose)을 standard로 잡았다. 각기 극성물질을 제거하기 위해 C18 Sep-pak을 사용하였다. 분석에 사용한 시료는 EPP 및 DEAE-Cellulose에 의해 나온 각 fraction들이다.

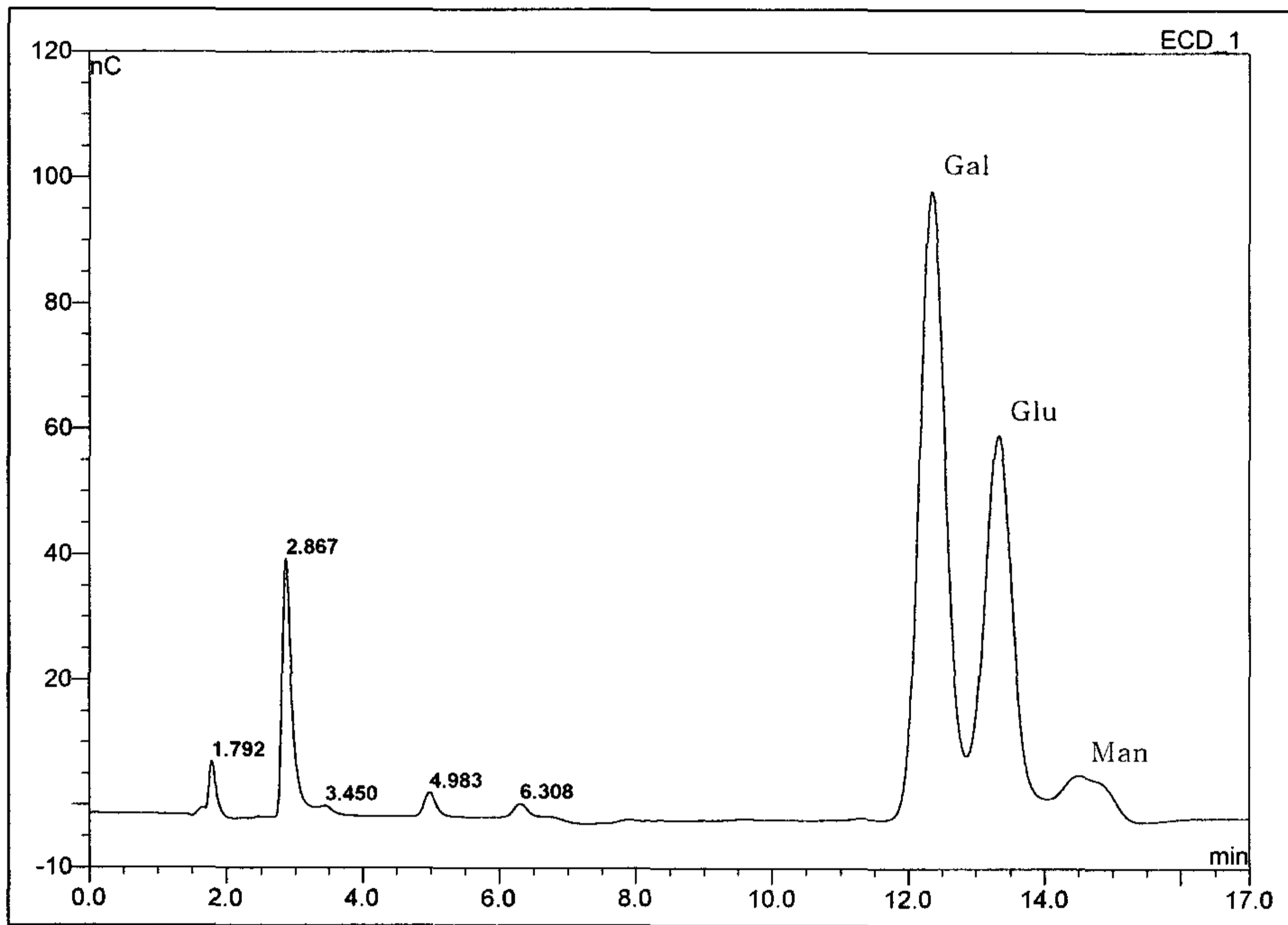


Fig. 9. 잣버섯 추출물의 EtOH 침전물인 EPP의 단당 조성.

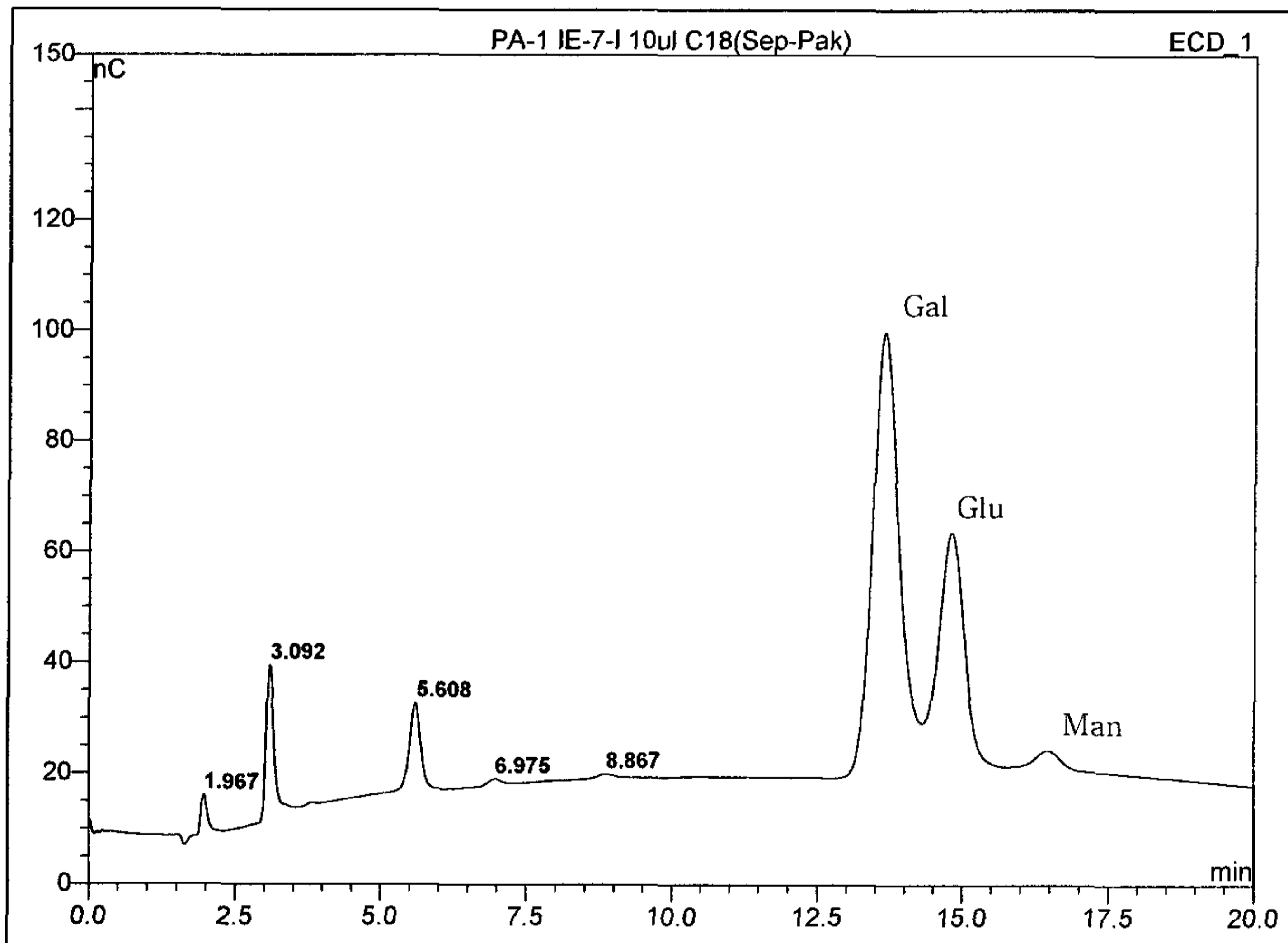


Fig. 10. DEAE-Cellulose I변 fraction의 단당류 조성.

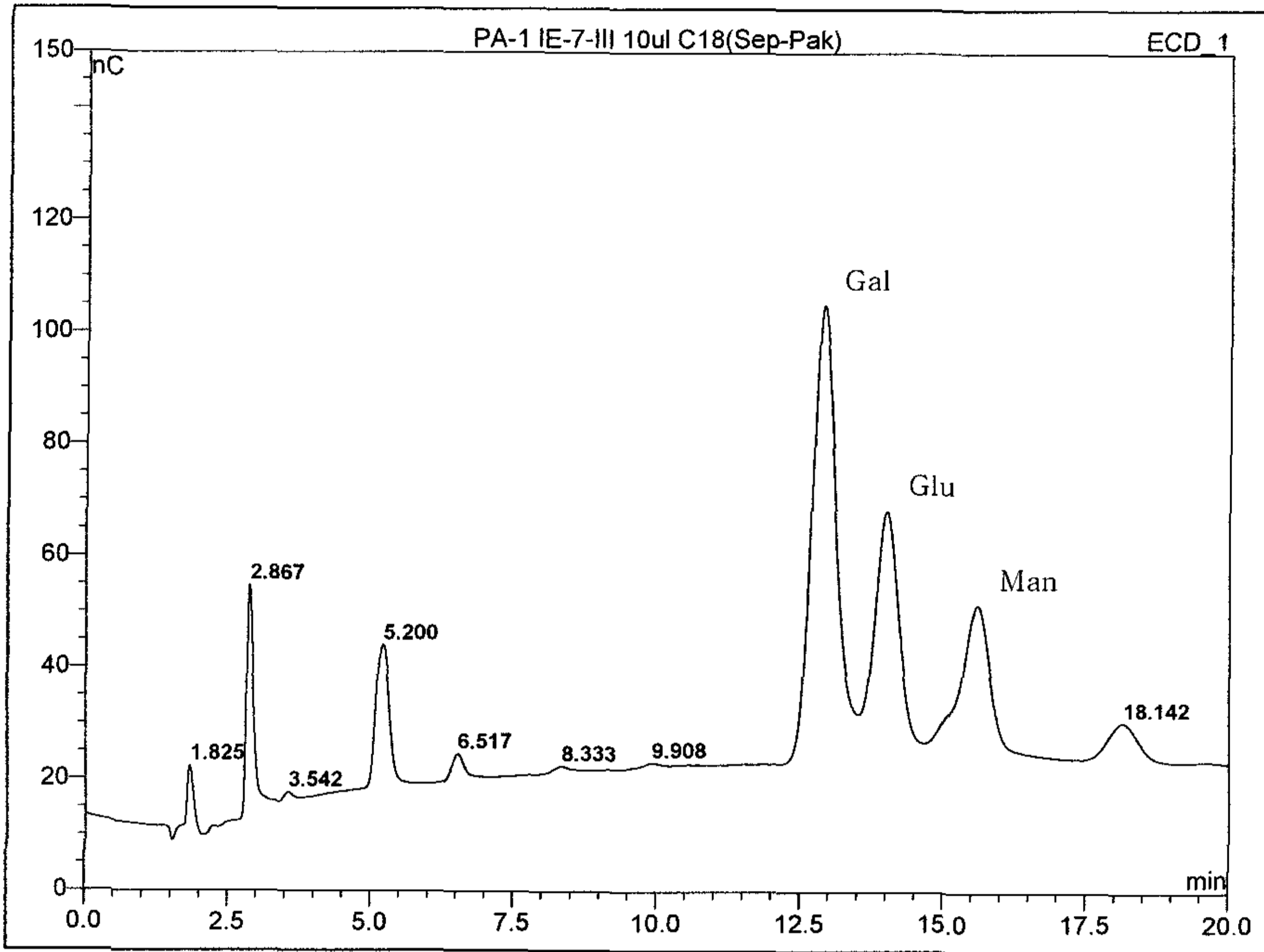


Fig. 11. DEAE-Cellulose III번 fraction의 단당류 조성.

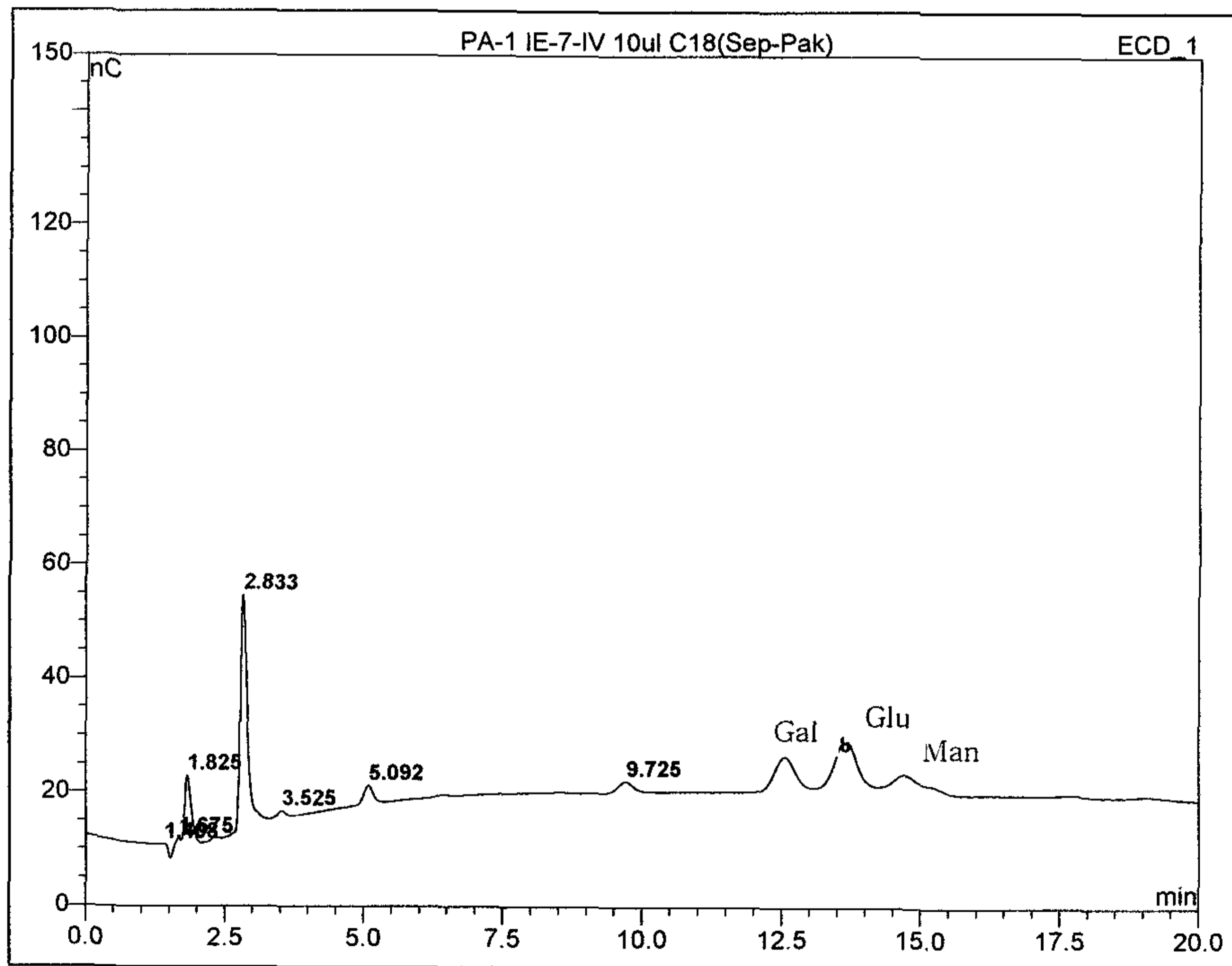


Fig. 12. DEAE-Cellulose IV번 fraction의 단당류 조성.

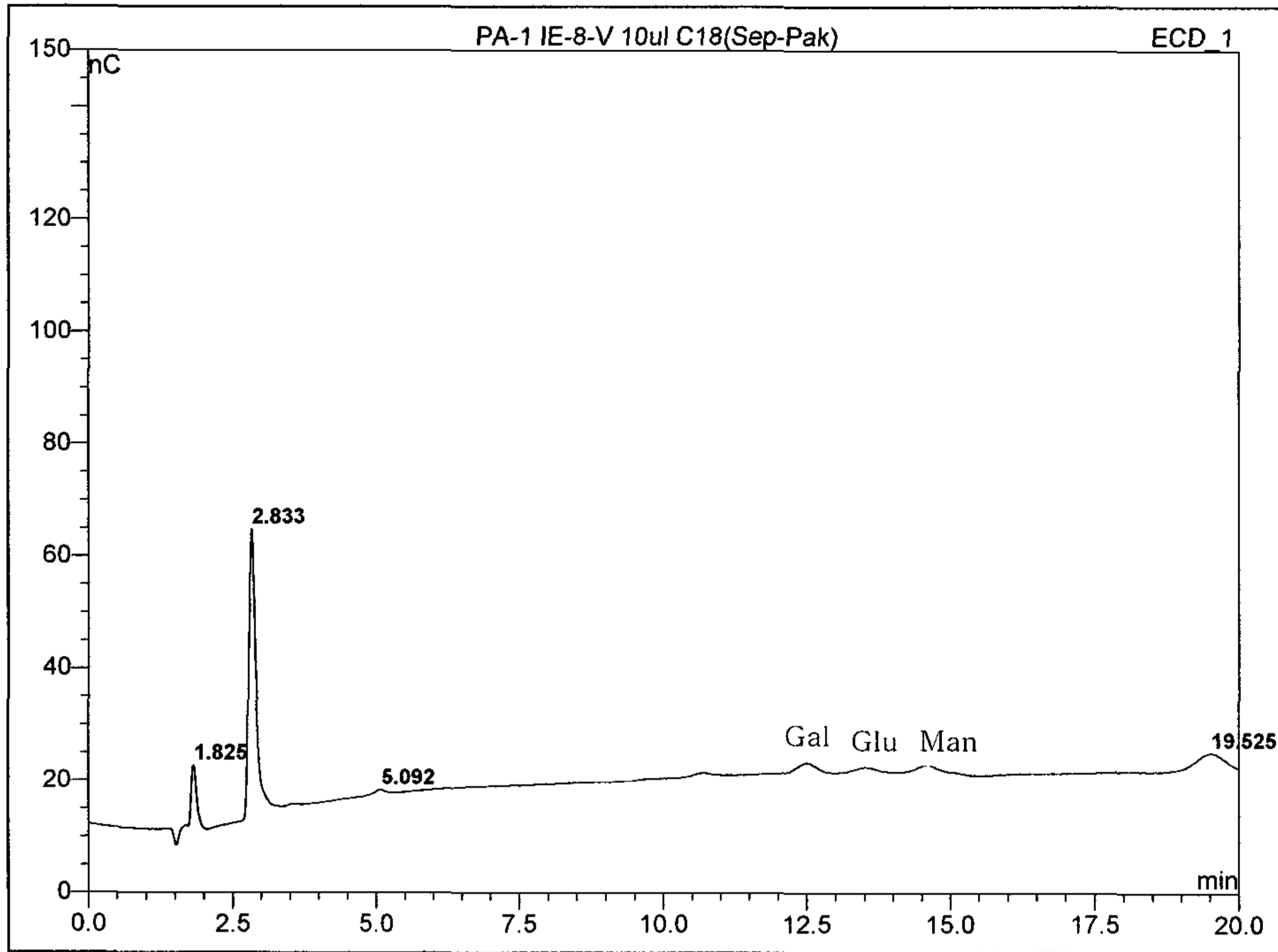


Fig. 13. DEAE-Cellulose V번 fraction의 단당류 조성.

Table 2. 잣버섯 추출물 및 fraction들의 단당조성 비율.

	EPP	Fraction I	Fraction III	Fraction IV	Fraction V
Galactose	55.3%	59.4%	48.3%	29.3%	46.2%
Glucose	40.1%	38.3%	28.1%	48.5%	23.1%
Mannose	4.6%	2.3%	23.7%	22.2%	30.8%

- 상기 그림 및 표에서와 같이 EPP 및 정제된 fraction들의 단당류 조성 분석 결과 가장 많이 차지하고 있는 단당류는 galactose였다. 가장 강한 활성을 나타내었던 fraction I의 경우 60% 정도를 차지할 정도로 대부분의 단당류를 차지하고 있었다. EPP보다 glucose와 mannose의 비율이 galactose에 비해 더 줄어들고 있었다. 반면 활성이 적어지는 III, IV, V의 경우 galactose의 비율이 줄어드는 대신 glucose와 mannose의 비율이 증가하고 있었다.

나) Laminarinase 처리를 통한 잣버섯 추출물의 glucan 분석

(1) 잣버섯 추출물에 포함된  $\beta(1\rightarrow3)$ -glucan의 분석

- 기존의 연구결과에 의하면 많은 버섯에서 활성물질이  $\beta(1\rightarrow3)$ -glucan으로 규명되어왔다. 잣버섯에도 이러한 성분을 가지고 있는지 확인해 보기 위해  $\beta(1\rightarrow3)$ -glucan만을 특이적으로 분해하는 효소인  $\beta(1\rightarrow3)$ -glucanase의 즉, laminarinase를 사용하여 잣버섯 추출물이 분해되는지 확인하여 보았다. 잣버섯 추출물에 laminarinase를 처리하고 silica TLC에 spotting 하였다. 잣버섯이  $\beta(1\rightarrow3)$ -glucan을 포함한다면 단당류인 glucose와 분해가 덜된  $\beta(1\rightarrow3)$  결합의 glucose dimer인 laminaribiose가 확인될 것이다. 또한 버섯의 다당체가 포함하고 있는  $\beta(1\rightarrow6)$ -glucan side chain을 가지고 있다면  $\beta(1\rightarrow6)$  결합의 dimer인 gentibiose가 나타날 것으로 예상할 수 있다. Fig. 12.에서 잣버섯 추출물 자체에는 대량의 glucose를 포함하고 있기 때문에 이를 제거하기 위해서 ethanol 침전 및 투석을 거친 잣버섯 추출물 (EP)을 사용하였다.

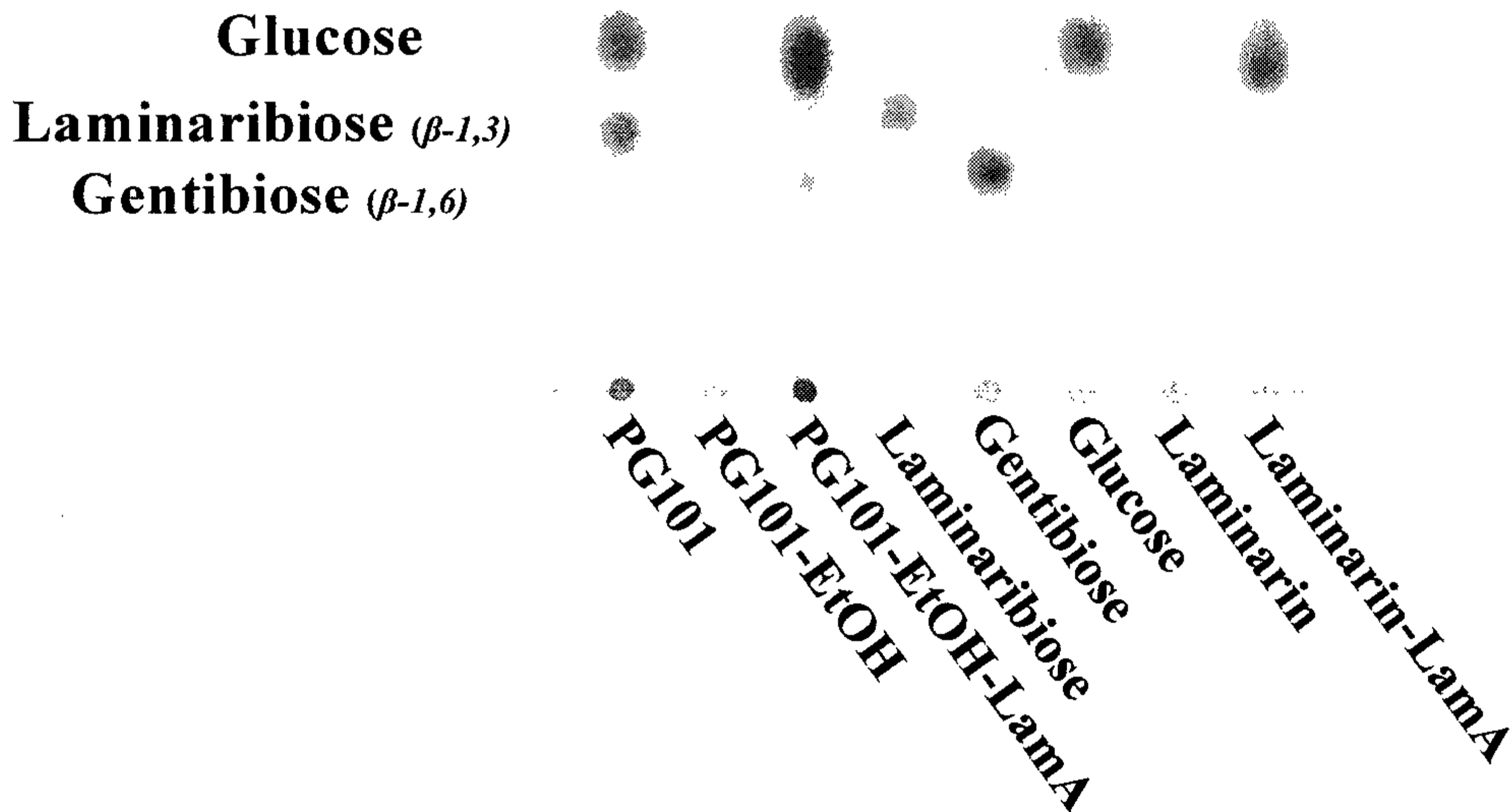


Fig. 14. 잣버섯 추출물은  $\beta(1\rightarrow3)$ - 및  $\beta(1\rightarrow6)$ -glucan을 함유하고 있다.

(2) Laminarinase 처리후의 활성 측정

- Laminarinase를 처리하여  $\beta(1\rightarrow3)$ -glucan을 분해하였을 경우 잣버섯 추출물이 나타내는 활성을 알아보기 위하여 사람의 PBMC에 분해산물을 처리하고 세포배양액에 분비된 TNF- $\alpha$ 의 농도를 ELISA로 측정하였다.

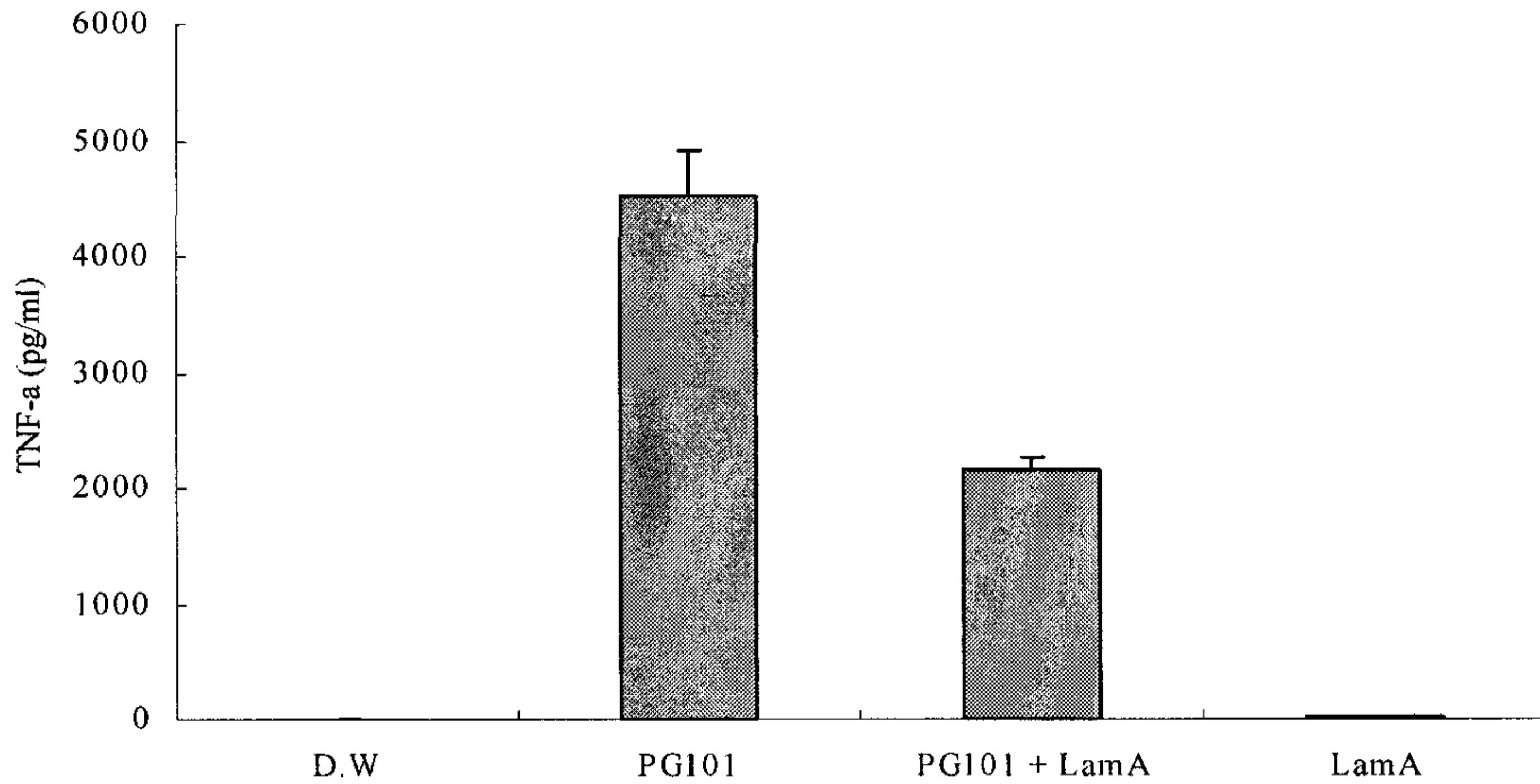


Fig. 15. Laminarinase가 잣버섯 추출물의 활성화에 미치는 영향.

- Laminarinase를 처리하면 잣버섯 추출물에서 glucose가 검출되었다. 이는 잣버섯 추출물에  $\beta(1\rightarrow3)$ -glucan을 포함하고 있다는 것을 의미한다. 또한  $\beta(1\rightarrow6)$  결합의 dimer인 gentibiose도 TLC 상에 나타난 것으로 보아 잣버섯 추출물은  $\beta(1\rightarrow6)$ 을 포함하고 있었다. 그러나 gentibiose의 양이 glucose에 비해 매우 적은 것으로 보아  $\beta(1\rightarrow6)$  결합은 side chain으로서 소량 함유한 것으로 보인다. 이렇게 laminarinase가 처리된 잣버섯 추출물은 생리활성이 원래의 추출물에 비해 약 50% 정도 줄어들어 있었다. laminarinase를 처리함에도 불구하고 활성이 계속 나타날 가능성은 두 가지이다. 그 가능성은 잣버섯 추출물에 포함된  $\beta(1\rightarrow3)$ -glucan이 laminarinase에 의해 완전히 분해되지 않았거나  $\beta(1\rightarrow3)$ -glucan 외에 다른 물질이 잣버섯 추출물의 생리활성을 나타낼 가능성이 있다.

### (3) 다당류 성분에 대한 비교 분석

- 연구 배경 : 잣버섯에 존재하는 다당류 성분의 활성화에 대한 근거는 다른 버섯으로부터 추출한 다당체의 면역 증강효과에 관한 문헌으로부터 확인할 수 있다. 그 예로서 잎새버섯으로부터 추출한  $\beta$ -glucan인 그리폴란은 대식세포에 작용하여 IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ 와 같은 다양한 사이토카인 발현을 유도하며 그리폴란을 이루는 성분 중에서 불용성 성질을 갖는 100 kDa 이상의 고분자 물질 TNF- $\alpha$  발현에 있어 활성성분임이 확인된 바 있다. 또 잎새버섯 자실체로부터 분리한 다당체인 D-fraction을 생쥐에게 복강주사하면 대조군에 비해 비장세포가 발현하는 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 가 크게 증가된다는 사실도 확인되었다. 이밖에 상황버섯이나 영

지버섯으로부터 분리한 다당체 역시 암 모델 생쥐나 암환자에게 투여하였을 때 NK 세포의 세포살상능력을 높일 뿐 아니라 사이토카인 및 항체 생산을 증가시켰으며 꽃송이버섯의  $\beta$ -glucan 역시 생쥐에서 비장세포를 활성화시켜 IFN- $\gamma$  및 IL-12 생산을 높이고 대식세포 및 과립구 수를 증가시키는 것으로 나타났다. 버섯에서 추출한 활성 물질은 대부분은  $\beta$ -glucan 같은 고분자 다당체로서 함암, 면역, 항균, 항바이러스 같은 다양한 활성을 나타는 것으로 보고되어 있다.

이처럼 버섯이 나타내는 생리 활성의 주요 물질로 생각되는 다당체는 자실체와 균사체 모두에서 추출할 수 있으며 버섯의 세포벽의 주된 구성 물질로 알려져 있다. 표고버섯에서 추출한 다당체인 렌티난은  $\beta$ -1,3-glucan으로서 항암효과 및 면역 증강 효과가 있다. 그 구조는  $\beta$ -1,3-glucan을 기본 골격 구조로 하면서  $\beta$ -1,6-glucan이 가지를 형성하고 있다. 시계방향으로 3중나선 구조를 하고 있는데 평균 분자량은  $40 \sim 80 \times 10^4$ 이다. 스키조필란은 치마버섯에서 추출한  $\beta$ -1,3-glucan으로써 3개에서 4개의 글루코오스마다 한 개의  $\beta$ -glucopyranosyl group을 가지고 있다. 3차원적인 구조는 렌티난과 비슷해서 3중 나선 구조로 되어있으며 이 구조에 따라 생리 활성이 차이가 난다. 평균 분자량도 렌티난과 비슷한  $45 \times 10^4$ 이다 (Ohno et al., 1995). 활성 물질이 단백다당체인 경우도 많아서 운지버섯 (*Coriolus versicolor*)에서 추출한 단백다당체인 PSK (Krestin)는 25 ~ 38%의 단백질을 포함하고 있는  $\beta$ -glucan이며 평균 분자량은  $94 \times 10^3$ 로  $\beta$ -1,4-glucan이 주된 다당체로서 4개의 글루코오스마다 한 개씩  $\beta$ -1,3-gluopyranose 가지를 뻗고 있다.

- 잣버섯 추출물인 PG101을 구성하는 다당체 성분에 대한 비교 분석 : 상기 연구 결과를 고려할 때 PG101을 구성하는 다당체에는  $\beta$ -(1,6)-D-glucan을 포함하는  $\beta$ -(1,3)-D-glucan이 포함된 것으로 여겨진다. PG101을 laminarinase로 처리하였을 때 글루코오스 외에도 gentibiose가 형성되었는데 이것은  $\beta$ -(1,6)-D-glucan 결합도 PG101에 존재하고 있음을 의미한다. 그러나 효소 분해에 의해 생성된 gentibiose의 양은 단당류 형태의 글루코오스에 비해 적은 양이었는데, 이는  $\beta$ -(1,6)의 결합의 수가  $\beta$ -(1,3) 결합에 비해 상대적으로 적기 때문으로 생각된다. 또한  $\beta$ -(1,3) 결합을 가수분해할 때  $\beta$ -(1,6) 결합도 같이 검출되었다는 것은  $\beta$ -(1,6) 결합이 독립적으로 존재하는 것이 아니라  $\beta$ -(1,3) 결합에 연결되어 있음을 의미한다고 할 수 있다. 따라서 PG101의 다당체가  $\beta$ -(1,3)-D-glucan을 뼈대로 해서 가지 형태로  $\beta$ -(1,6)-D-glucan이 분지되어 있는 구조로 이루어져있음을 추정할 수 있다.

한편,  $\beta$ -(1,3)-D-glucan 외의 다른 물질들도 PG101의 활성에 관여하고 있을 가능성을 배제할 수 없는데 그 이유는 laminarinase를 처리했을 때 PG101의 활성



이 거의 절반 수준으로 낮아졌지만 그 활성이 완전히 억제되지는 않았기 때문이다. 이것은 아마도  $\beta$ -(1,3)-D-glucan 외에도 다른 활성 물질이 나머지의 부분에 대한 활성을 가지고 있기 때문으로 여겨지며 이 나머지 활성은 galactan 또는 단백질 등이 나타내는 것으로 생각되어지고 있다. 크로마토그래피를 통해 탄수화물만을 얻은 F-I 분획의 단당류 조성을 보면 글루코오스의 비율이 약 38% 정도 차지하는 반면 갈락토오스는 60%에 육박할 정도로 비율이 증가하였다. 이는 PG101에  $\beta$ -(1,3)-D-glucan 외에 galactan이 혼재되어 있으며 이 물질이 활성을 나타낼 수도 있을 것임을 의미한다. 실제로 능이버섯 (*Sarcodon aspratus*)에서 추출한 galactan이 대식세포를 활성화시켜 TNF- $\alpha$ 의 발현을 증가시켰다는 Mizuno 등의 보고가 있다.

단백질도 PG101의 활성 물질일 가능성이 있다. 각 분획 별 총활성은 F-I이 가장 크다 하더라도 탄수화물의 양이 적거나 거의 없는 반면 주로 단백질로 구성된 F-III나 F-IV에서 여전히 활성이 나타났다. 따라서 다당체 이외의 물질, 특히 PG101에 포함된 단백질이 면역활성을 나타낼 가능성이 있다. 영지버섯에서 추출한 단백질인 LZ-8나 *Volvariella volvacea*로부터 추출한 VVL이 같은 단백질등이 면역 활성을 나타낸다는 보고는 단백질이 PG101의 활성 물질일 가능성을 뒷받침해준다 (Kino et al., 1989; She et al., 1998). 이러한 결과들은 PG101의 활성 물질이 단일 물질이라기보다는 몇 가지 종류의 화합물의 혼합물이라는 가능성을 제시해 준다.

잣버섯 균사체의 열탕추출물 중에서 수용성 부분인 PG101을 가지고 분획을 시작하였으나 분획이 진행될수록 물질이 점점 난용성으로 변해갔다. 에탄올 침전을 통해 얻은 EP부터 그 성질이 거의 난용성으로 변해 EPP의 경우 0.01 M의 NaOH에 넣고 고온처리를 해야만 수용성으로 만들 수 있었다. 그러나 이온교환수지를 통해 얻은 F-I 분획은 더욱 난용성으로 변해 고온의 NaOH (0.1 M)에서 일부가 녹으나 용액의 온도가 내려가면 다시 용출되어 나왔다. F-I은 유기용매 중에서도 DMSO를 제외한 다른 유기용매인 acetonitrile, chloroform, dichloromethane 등에 전혀 녹지 않았다. 이러한 현상들은 다른 버섯 유래 다당체에서도 관찰되었다. 따라서 이와 같은 난용성 물질들을 수용성으로 만들기 위한 여러 방법들이 개발되었다. 대표적인 것으로는 메틸기 또는 황산기를 붙이는 것이 있다. 느타리버섯 (*Pleurotus ostreatus*), *Agrocybe aegerita*, *Pleurotus tuber-regium* 등에서 추출한 다당체에 carbomethylation시킨 결과, 불용성 다당체가 수용성으로 변하면서 그 활성이 더욱 증가되었다는 보고가 있다 (Paulik et al., 1996; Yoshida et al., 1996; Zhang et al., 2003b). 황산기를 붙이는 연구도 진행되어, 스키토필란에 황산기를 붙이면 수용성 상태로 되고, HIV (human immunodeficiency virus)의 성장을 억제시키는 기능이 커진 것이 보고되어 있다

(Itoh et al., 1990). 이와 비슷하게 인위적으로 황산기를 붙인 *Pleutorus tuber-regium*의 추출물은 붙이지 않은 대조군과 비교하여 항바이러스 효과가 증가된다는 보고도 있다 (Zhang et al., 2004). 난용성 또는 불용성 상태의 다당체는 구조를 분석하기가 힘들 뿐만 아니라 약물로 이용하기가 어려워 수용성 다당체를 만들려는 노력이 있어왔다. 이와 같은 노력이 정제된 PG101에도 필요할 것으로 여겨진다. 결론적으로 PG101의 활성 물질을 완전히 분석할 수는 없었지만  $\beta$ -(1,3)-D-glucan이 PG101에 포함되어 있으며 이것이 활성을 나타내는데 최소한 50% 정도의 기여를 하고 있는 것으로 생각된다. 다만 PG101의 활성에 기여하는 성분 중 다당체 이외의 성분에 대해서는 추가 연구가 필요할 것으로 여겨진다.

#### 다) SDS-PAGE

- 잣버섯 추출물에는 다당체뿐만 아니라 단백질도 들어있었으며 정제 시에도 어느 정도 활성을 나타내고 있었다. 따라서 잣버섯 추출물에 들어있는 단백질을 SDS-PAGE를 통해서 확인하였다.

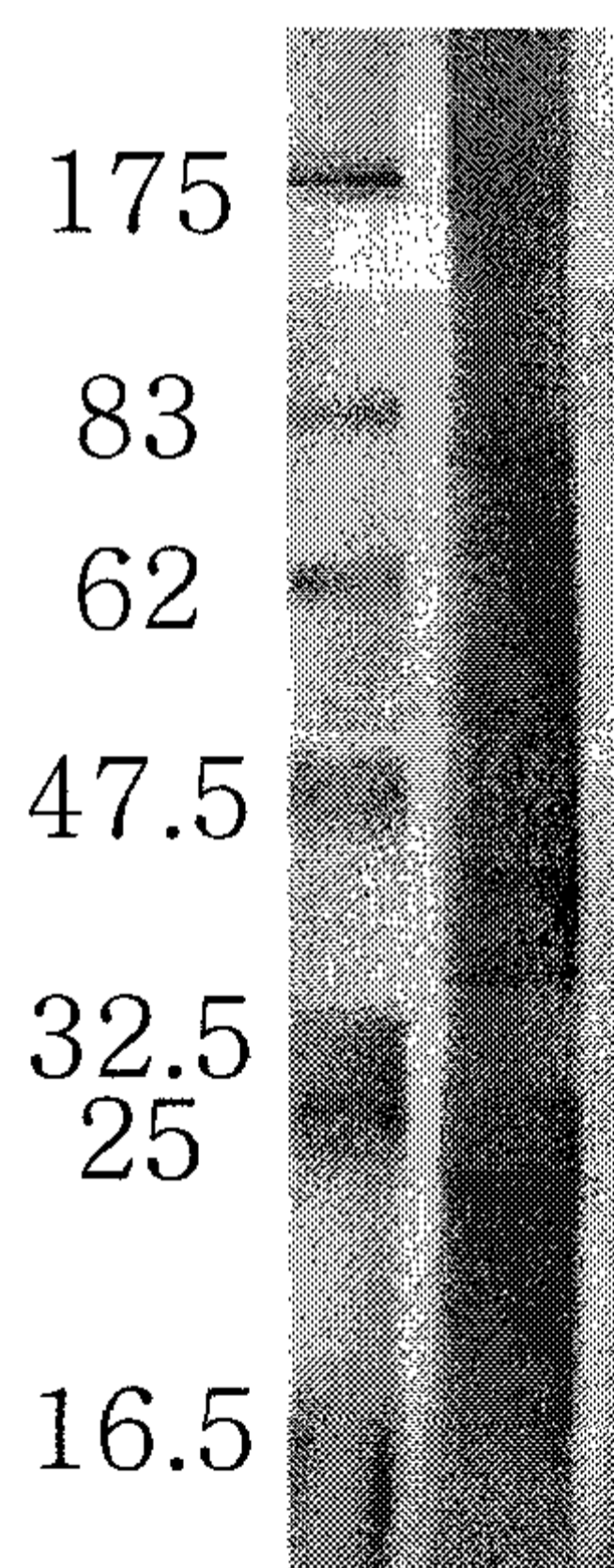


Fig. 16. 잣버섯 추출물의 SDS-PAGE 전기영동.

- 그림에서와 같이 잣버섯 추출물을 전기영동시킨 결과 6개 정도의 단백질 band를 확인할 수 있었다.

#### 4) 대식세포 활성화의 작용 기전 연구

가) RT-PCR 및 Northern blot analysis를 이용한 IκB-ζ의 발현 확인

- 잣버섯 추출물에 의해 발현되는 IL-6의 발현 특성에 알아보기 위해 최근 새로 발견된 유전자인 IκB-ζ의 발현이 잣버섯 추출물에 의해 조절되고 있는지 확인하였다. IκB-ζ는 IL-6의 발현을 유도시키는 유전자로서 면역을 억제시키는 다른 IκB 유전자들과는 그 기능성에 있어서 차이를 보이는 특이성을 가지고 있다.
- 잣버섯 추출물이 사람의 PBMC에서 IκB-ζ의 유전자 발현을 유도시키는지 확인하기 위하여 사람의 PBMC에 잣버섯 추출물을 6시간동안 처리한 뒤 세포로부터 RNA를 얻고 northern blot을 수행하였다.

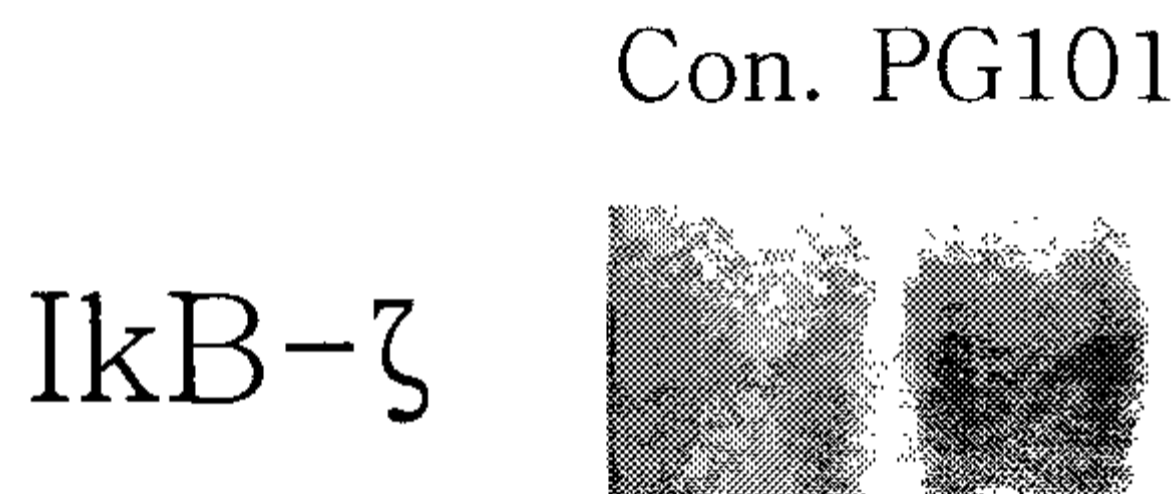


Fig. 17. Human PBMC에서 잣버섯 추출물에 의해 발현되는 IκB-ζ.

- 사람의 PBMC외에도 mouse macrophage cell line인 RAW264.7 세포주에서 잣버섯 추출물에 의해 IκB-ζ가 발현되는지를 semi-qualitative RT-PCR을 통해 확인하였다.

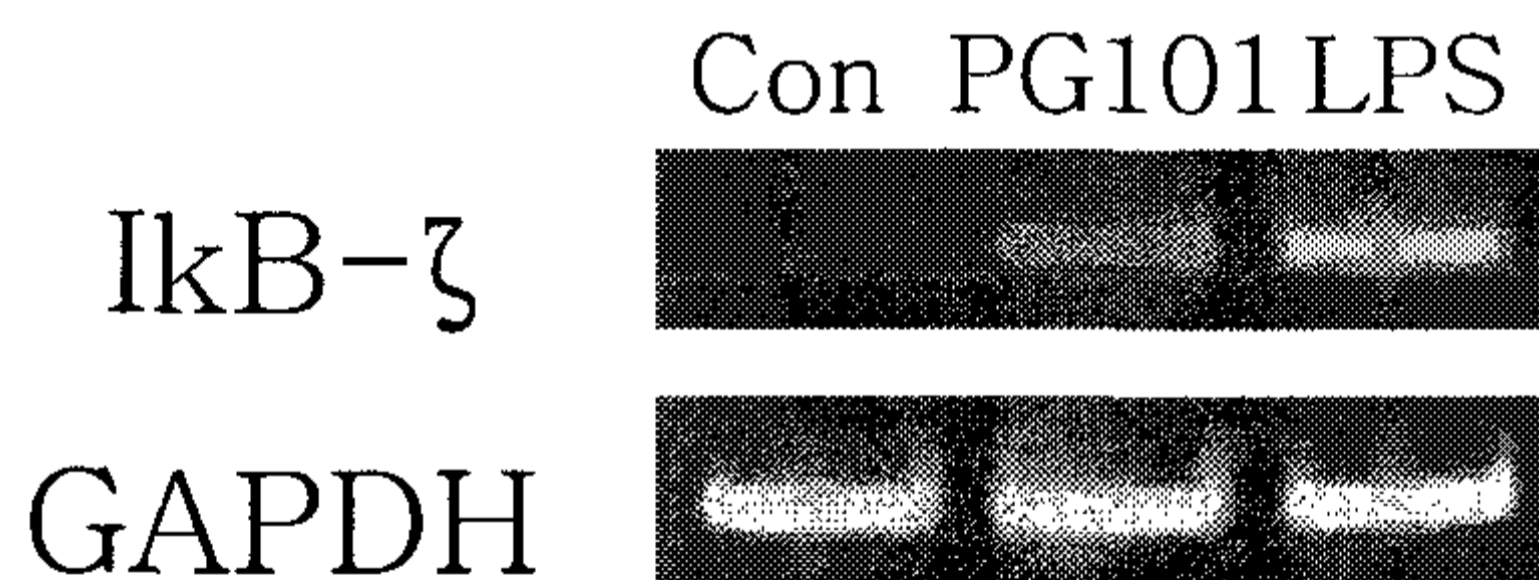


Fig. 18. Raw264.7에서 잣버섯에 의해 발현되는 IκB-ζ.

- 잣버섯 추출물은 사람의 PBMC 뿐만 아니라 mouse macrophage인 RAW264.7 세포주에서도 IκB-ζ의 발현을 유도시키는 것으로 나타났다.

나) 잣버섯 및 잔나비결상버섯 추출물에 의해 직접적으로 발현되는 IκB-ζ

- IκB-ζ의 발현이 IL-6의 발현에 직접적인 영향을 주는지 확인하기 위해 단백질

합성 억제제인 cycloheximide 및 버섯 추출물을 RAW264.7 세포에 처리하였다. 버섯추출물은 잣버섯 추출물외에 협동과제의 연구성과를 통해 활성을 확인한 잔나비겉상버섯 추출물을 시료로 사용하였다. 세포로부터 RNA를 얻고 poly d(T)를 통해 cDNA를 합성하였다. I $\kappa$ B- $\zeta$  specific primer를 사용하여 semi-quantitative RT-PCR을 수행하였다. IL-6의 발현이 I $\kappa$ B- $\zeta$ 와 같은 다른 단백질의 발현에 의해 이루어진다면 cycloheximide 처리 시 IL-6의 발현이 일어나지 않을 것이다. 또한 이 실험을 통해 I $\kappa$ B- $\zeta$ 의 발현이 다른 단백질의 발현이 이루어져야 발현이 이루어지는지, 잣버섯 추출물 자체가 I $\kappa$ B- $\zeta$ 의 발현을 이루는지 확인해 볼 수 있다.

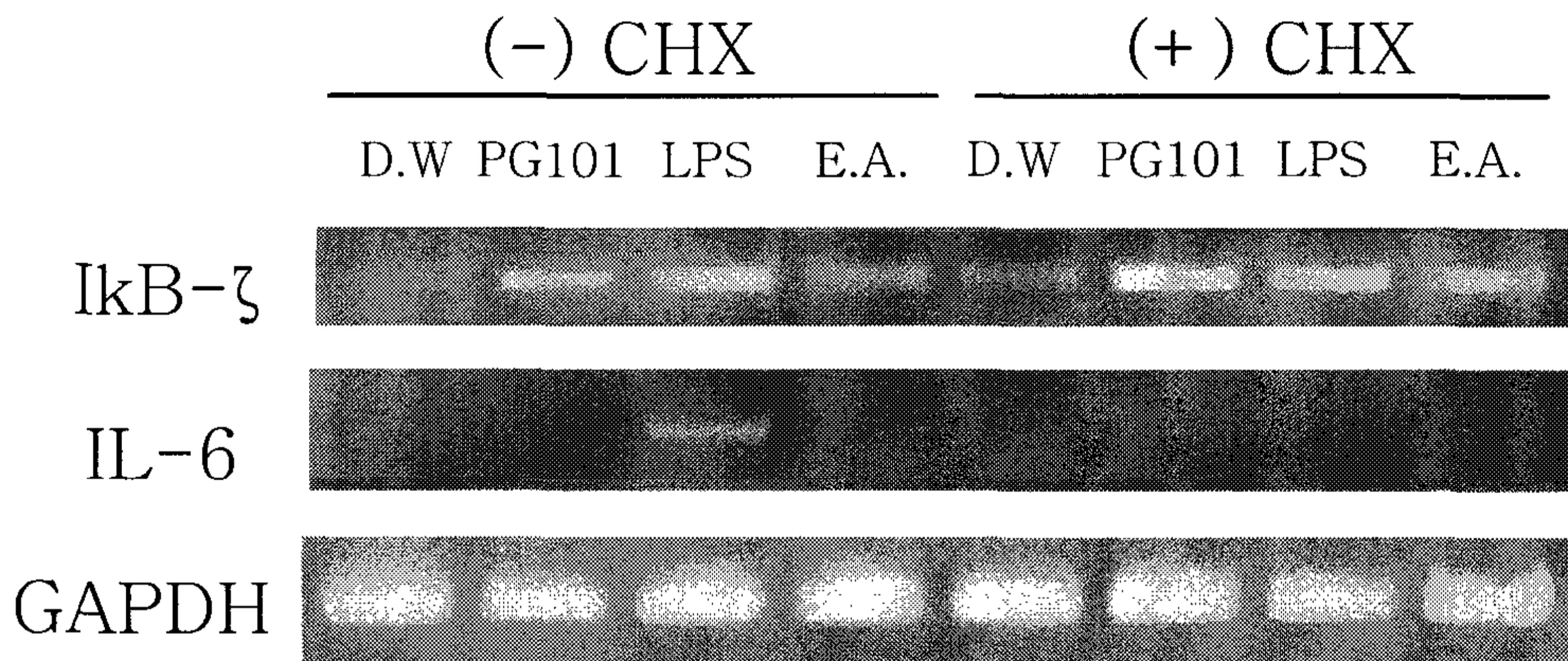


Fig. 19. I $\kappa$ B- $\zeta$ 와 IL-6의 발현에 미치는 cycloheximide의 영향. CHX; cycloheximide, PG101; 잣버섯 추출물, LPS; lipopolysaccharide, E.A.;잔나비겉상버섯 추출물

- 잣버섯은 물론 잔나비겉상버섯에 의해서 모두 cycloheximide의 처리와는 상관 없이 I $\kappa$ B- $\zeta$ 의 발현이 이루어지고 있었다. 이로서 잣버섯은 물론 잔나비겉상버섯은 I $\kappa$ B- $\zeta$ 의 발현을 직접적으로 시키고 있음을 알 수 있었다. 잣버섯 및 잔나비겉상에서 cycloheximide 처리를 하지 않은 부분에서 IL-6의 발현이 너무 적어 본 결과에서는 band가 보이지 않았다 (-CHX, PG101 & E.A. lane). LPS에 의해 발현된 IL-6에 의하면 cycloheximide를 처리하였을 경우 IL-6의 발현이 현저히 감소해버렸다 (LPS lane). 이는 I $\kappa$ B- $\zeta$ 와 달리 IL-6의 경우 다른 단백질의 발현이 이루어져야만 IL-6의 발현이 될 수 있음을 시사한다.

다) 처리시간에 따른 잣버섯 및 잔나비결상버섯 추출물의 I $\kappa$ B- $\zeta$  및 IL-6에 대한 영향

- IL-6의 발현이 I $\kappa$ B- $\zeta$ 의 발현 이후에 이루어지는 것을 보여주기 위하여 잣버섯 및 잔나비결상버섯 처리시간에 따른 각 유전자의 발현을 semi-quantitative RT-PCR을 통해 알아보았다. RAW264.7 세포주에 잣버섯 및 잔나비결상버섯 추출물을 처리하고 각 시간별로 세포로부터 RNA를 추출한 뒤 cDNA를 만들고 각 유전자에 specific한 primer를 사용하여 PCR을 하였다.

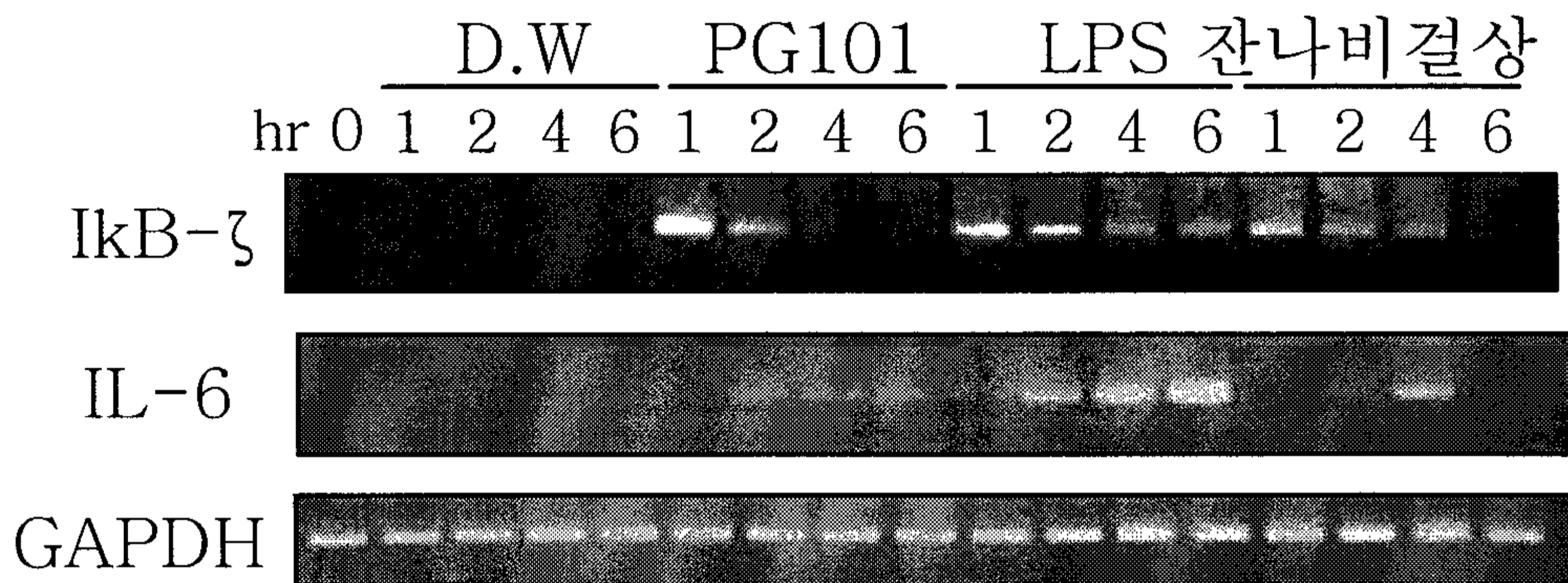


Fig. 20. 잣버섯과 잔나비결상버섯 추출물이 I $\kappa$ B- $\zeta$ 와 IL-6 발현에 대한 시간적 영향.

라) Northern blot analysis를 통한 유전자 발현의 확인

- Northern blot을 통해 Fig. 17의 결과가 유의미함을 재확인하였다.

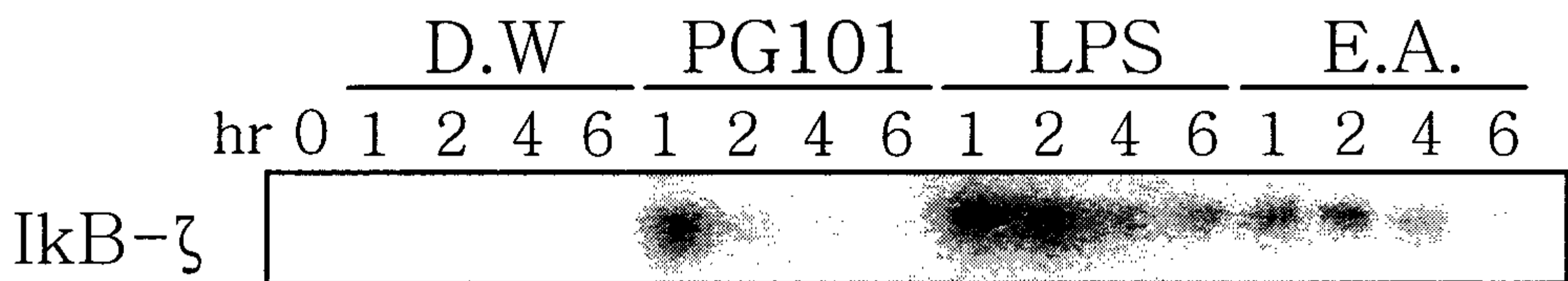


Fig. 21. 잣버섯과 잔나비결상버섯 추출물이 I $\kappa$ B- $\zeta$ 와 IL-6 발현에 대한 시간적 영향.

- 잣버섯과 잔나비결상버섯 추출물 모두에서 I $\kappa$ B- $\zeta$ 의 발현이 1시간 이내에 이루

어지고 있었다. 이것은 추출물들이 I $\kappa$ B- $\zeta$ 의 발현을 즉각적으로 시키고 있음을 의미한다. 반면 IL-6의 경우 I $\kappa$ B- $\zeta$ 의 발현이 일어난 이후인 2시간째부터 발현이 되고 있다. 즉, IL-6의 발현은 I $\kappa$ B- $\zeta$ 의 발현이 이루어져야 발현이 되고 있는 간접적인 증거로, I $\kappa$ B- $\zeta$ 가 IL-6의 발현을 조절하고 있음을 암시하고 있다.

- 한편, 잣버섯과 잔나비겉상 버섯 추출물의 경우 I $\kappa$ B- $\zeta$ 의 발현을 조절함에 있어서 서로 다른 영향을 보이고 있었다. 잣버섯의 경우 I $\kappa$ B- $\zeta$ 의 발현이 1시간째에 강하게 일어난 이후 2시간째에는 크게 감소하고 4시간 이후에는 거의 발현이 관찰되지 않고 있다. 반면 잔나비겉상버섯 추출물의 경우 1시간 이내에 I $\kappa$ B- $\zeta$ 의 발현이 이루어지고 난 뒤 4시간째까지 그 발현량이 유지되면서 서서히 감소하고 있었다.

## 2. 제 1 협동과제 ((주)헬릭서)

### 가. 실험방법

#### 1) 면역저하모델에서의 잣버섯 균사체 및 자실체 추출물의 조절작용

##### 가) 실험동물

(1) 종 (계통) : SPF (Specific Pathogen Free) mouse (Balb/c)

(2) Supplier : 중앙실험동물

(3) 시험계의 선택이유

- 랫드는 급성 및 아급성 독성시험에 많이 사용되는 동물로서 기초자료가 풍부하여 시험결과에 대한 해석과 평가에 이용할 수 있다.

(4) 성별 및 입수시 주령 : 4주령

(5) 입수 동물수 : 수컷 그룹 당 각 4 마리

(6) 검역, 순화 및 그 기간

- 동물 입수 후 일주일간 순화 기간을 두어 실험환경에 적응하게 하였다.

##### 나) 사육조건

(1) 환경조건

- 본 시험은 온도  $23 \pm 2$  °C, 상대습도  $60 \pm 10$  %, 환기횟수 15-20 회/시간, 조도 150-600 Lux, 조명시간 12 시간(07:00 점등 - 19:00 소등)으로 설정된 사육실에서 실시하였다.

(2) 사료 및 음수

- 사료는 방사선 조사 (2 rad) 실험동물용 고품사료 (Orient, Korea)를 자유섭취시켰으며, 음수는 살균 수도수를 자유섭취시켰다. 사료 조성, 일반세균검사는 공급자측에서 제공하였으며, 사료 및 음수에 있어서 시험에 영향을 미칠 만한 요인은 관찰되지 않았다.

다) 시험계획

(1) 시험군의 구성

- 아무런 처치하지 않은 Naive group(N=12), cyclophosphamide i.p.한Control group(N=12), cyclophosphamide i.p.하기 3일전부터 PG101 10 mg/kg을 투여한 pre 10(N=12), cyclophosphamide i.p.하기3일전부터 PG101 40 mg/kg을 투여한 pre 40(N=12), cyclophosphamide i.p.후 PG101 10 mg/kg 투여한 post 10 group(N=12), cyclophosphamide i.p.후 PG101 40 mg/kg 투여한 post 40 group(N=12), cyclophosphamide i.p.후 잔나비 10 mg/kg을 투여한 그룹으로 나누어 cyclophosphide i.p. 후 7일, 10일 13일에 4마리씩 sacrificed 시켰다.

(2) 군분리 및 개체식별

- 건강한 동물을 이용하여 무작위법으로 군분리를 실시하였다. Cage내의 동물의 식별은 개체 식별법에 따라 귀에 구멍을 뚫어 사용하였다.

라) 시험물질의 투여

(1) 시험물질의 조제방법

- 각 투여용량군의 시험물질은 증류수에 용해하여 용시 조제하였다.

(2) 시험물질 투여 경로, 방법 및 횟수

- 시험물질의 투여는 임상적용 경로인 경구로 하였으며, 존데를 사용하여 강제적으로 3주간 동안 반복하여 경구투여 하였다.

(3) 투여액량의 계산

- 시험물질의 투여액은 PG101 10 mg/kg, 40 mg/kg으로 잔나비 10 mg/kg의 액량으로 하여 투여하였다.

#### 마) 관찰 및 부검

##### (1) 폐사 및 일반증상

- 투여당일에는 약물투여 이후 수회 일반증상 및 폐사여부를 관찰하였으며, 그 이후에는 1일 1회씩 폐사유무 및 일반증상을 관찰하여 그 종류를 개체별로 기록하였다.

##### (2) 체중측정

- 모든 동물에 대하여 시험물질 투여 전 (군분리시)에 체중을 측정하였으며, 투여개시이후에는 1주 당 한번씩 체중을 측정하였다.

##### (3) 혈액학적 검사

- WBC, Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte의 수치를 Korea Animal Hospital Association's Veterinary laboratory에 의뢰하여 검사하였다.

##### (5) Splenocyte proliferation

- Mouse spleen으로부터 splenocyte를 분리하여 well plate에  $1 \times 10^6$  cell/well로 배양한 다음 MTS assay를 통하여 splenocyte proliferation에 대한 잣버섯 추출물 경구투여의 효과를 관찰하였다.

##### (6) Bone marrow cell을 이용한 colony forming assay (CFA)

- 대퇴부로부터 골수세포를 분리하여 IMDM 배지로 세포수를  $1 \times 10^5$ /ml로 맞춘 후, 세미솔리드 메틸 셀룰로즈 배지에 깔아주었다. colony 분화를 자극하기 위한 인자로서 이 배지는 15% FBS, 10<sup>-4</sup> M beta mercaptoethanol, 10 ng/ml의 IL-3, 50 ng/ml의 SCF, 3 unit/ml erythropoietin을 함유 하도록 하였다. 세포는 5% CO<sub>2</sub>를 함유한 37 °C 배양기에서 10일 간 배양한 후, colony를 현미경하에서 관찰하며 숫자를 셸다. 50개 이상의 세포로 구성된 것을 1개의 colony로 하였으며, 실험은 3 회 이상 실시한 값의 평균값과 편차를 통계 처리하였다.

#### 바) 통계학적 방법

- 시험에서 얻어진 자료의 분석을 위하여 Student *t-test*를 실시하여  $p < 0.05$  수준에서 구간 유의성을 검정하였다.



## 2) 잣버섯 자실체 추출물 제제의 pilot 생산

### 가) 생물학적 활성 검증법 확립

- 잣버섯 자실체 추출물의 생산과정에서 각 생산별 추출물의 품질을 유지하기 위해 bioassay법을 확립해야한다. 사람의 PBMC에서는 혈액을 제공하는 개체 간의 차이로 인해 발현되는 사이토카인의 양이 달라진다. 따라서 일률적인 잣버섯 자실체 추출물의 품질을 규정하기가 어렵다. 이러한 단점을 극복하기 위해서는 기존에 확립된 세포주를 이용하여 잣버섯 자실체 추출물이 세포주를 활성화시키는 정도를 지표로 삼아 추출물의 세포활성정도를 표준화시킨다. Bioassay에 사용할 세포주는 잣버섯 추출물의 표적이 되는 세포인 대식세포주를 사용한다. 대식세포주는 사람에게서 나온 U937, THP-1이 있으며, 쥐에게서 나온 Raw264.7 세포주가 있다. 각 세포주를  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  개의 세포를 각기 12 well의 세포배양판에 분주한다. 세포분주 18시간 후, 각 세포에 잣버섯 추출물을  $10 \mu\text{g/ml}$ ,  $100 \mu\text{g/ml}$ ,  $1 \text{ mg/ml}$ 로 넣어 세포를 활성화시킨다. 잣버섯 추출물을 넣은 뒤 4시간, 12시간, 24시간 마다 세포 배양액을 얻어 ELISA 분석으로 각 사이토카인의 발현양을 측정한다. 측정할 사이토카인은 기존의 실험에 의해 발현된다고 알려진 TNF- $\alpha$ 와 IL-10을 사용한다. 상업적으로 판매되는 TNF- $\alpha$ 의 ELISA assay(Pierce-Endogen, USA)의 실험방법은 다음과 같다. 1:2 연속희석방법을 통해  $1000 \text{ pg/ml}$ ,  $500 \text{ pg/ml}$ ,  $250 \text{ pg/ml}$ ,  $125 \text{ pg/ml}$ ,  $62.5 \text{ pg/ml}$ ,  $31.2 \text{ pg/ml}$ ,  $15.6 \text{ pg/ml}$ ,  $0 \text{ pg/ml}$ 로 표준농도를 만든다. 미리 TNF- $\alpha$ 에 대한 항체를 고착시킨 96-well plate에 sample diluent를  $50 \mu\text{l}$ 를 넣는다. 이후 표준농도와 잣버섯 추출물을 처리한 세포배양액을 각기  $50 \mu\text{l}$ 씩 넣고 1시간 동안 상온에서 반응시킨다. 반응 후 3번의 헹굼과정을 거치고 biotin으로 표지된 TNF- $\alpha$ 의 항체를  $100 \mu\text{l}$ 씩 각 well에 넣는다. 1시간동안 상온에서 다시 반응시킨 뒤 3번의 헹굼과정을 거치고 streptavidin-HRP를 각 well에  $100 \mu\text{l}$ 씩 넣고 30분간 반응시켜 biotin으로 표지된 항체에 HRP가 붙게 한다. TMB용액을  $100 \mu\text{l}$ 를 넣어 HRP에 의해 발색반응이 일어나게 한다. 30분동안 발색반응을 진행시킨뒤 1N의 황산을  $100 \mu\text{l}$ 로 넣어 반응을 중지시키고 발색의 정도를 ELISA reader로 통해 수치화시킨다. 450nm의 파장에서 각 well의 optical density를 측정 후 표준농도가 들어있는 well의 optical density를 통해 optical density와 농도간의 표준곡선을 그린다. 표준곡선을 통해 내삽의 방식으로 잣버섯 추출물에 의해 활성화된 세포에게서 나온 TNF- $\alpha$ 의 농도를 구하게 된다. IL-10의 사이토카인 농도도 마찬가지로 제조사의 방법을 따라 측정한다. 각 세포주 중에서 사람의 PBMC와 가장 유사하게 사이토카인을 분비하게 한 세포주를 선택한 뒤 3번 이상의 독립적인 실험을 통해 평균

적인 사이토카인의 발현양을 측정한다. 이 방법으로 통해 bioassay에 사용할 세포주의 선택, 세포주의 수, 잣버섯 추출물의 처리농도, 잣버섯 추출물의 처리 시간, 표준이 될 사이토카인 등을 결정한다.

나) 생물학적 활성 검증을 통한 시험생산 원료의 확보

- 강원대학교에서 다양한 균사체 종균들의 활성을 비교한 후, 이들로부터 자실체를 발생시켜 각각의 추출물을 제조하고 위에서 기술한 생물학적 활성 검증법을 사용하여 균사체 및 자실체들의 활성을 비교, 생리 활성이 가장 우수한 균사체 종균 및 자실체를 선발한다. 이후 선발된 자실체를 대량생산하여 시제품 및 안전성 검사의 원료로 사용한다.

다) 제형연구를 통한 시제품 제작

- 상기 시험을 통해 선발된 잣버섯 자실체 추출물의 물리, 화학적 성질을 확인한 후, 일일용량, 용법, 제품의 안정성, 용해성 및 소비자의 선호도를 고려하여 제형을 확립하고, 확립된 제형으로 시제품을 제작한다.

3) 다른 버섯과의 활성 비교

가) 상용화된 기존 버섯과의 효능 비교 연구

- 잣버섯과 타버섯의 추출물을 세포에 처리했을 때 분비되는 사이토카인의 발현양을 측정하여 각 버섯들의 면역세포의 활성작용을 비교한다. 자연적으로 자란 상황버섯, 영지버섯과 인공재배되어 지역시장에서 판매되고 있는 표고버섯, 현재 건강기능식품으로 개발되어 판매되고 있는 AHCC를 구입하여 잣버섯과 동일한 방법으로 추출물을 얻는다. 송이 및 꽃송이 버섯의 균사체도 임업연구원으로부터 얻어 동일한 방식으로 추출물을 얻는다. AHCC는 추출물이므로 D.W에 곧장 녹인다. 각 추출물을 0.22  $\mu\text{m}$ 의 멸균필터에 통과시켜 멸균시킨 뒤 사람의 PBMC와 세포주인 U937, THP-1, Raw264.7등의 세포에 처리를 한다. 처리하는 농도는 10  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\text{mg/ml}$ 로 한다. 24시간 동안 각 추출물로 세포를 활성화시킨 뒤 세포배양액만을 얻어 ELISA assay를 통해 각 사이토카인이 활성화된 정도를 측정한다. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12, GM-CSF등 다양한 사이토카인을 측정하여 각 추출물들이 사이토카인을 발현하게 하는 정도, 발현되는 사이토카인의 종류, 발현되는 사이토카인의 특징등을 분석한다. 이 방법을 통해 잣버섯이 타버섯의 추출물들과 비교하였을 때 세포활성화를 얼마나 시킬 수 있는지 비교하고 잣버섯과 타버섯간의 세포면역방식의 차이를 확인하여 잣버섯의 면역강화작용에 대한 타버섯과의 차별이 있음을 보여준다.

## 나) 잔나비겉상버섯 추출물의 활성 연구

### (1) 잔나비겉상버섯의 추출

- 잔나비겉상버섯 균사체를 ethanol로 씻은 뒤 열수추출을 통해 수용성 물질인 수용성 추출물을 얻는다. 수용성 추출물에 80% ethanol을 넣고 원심분리를 통해 상등액은 버리고 침전물 형태인 수용성 단백다당체를 얻는다. 수용성 단백다당체에  $\alpha$ -glucan을 분해할 수 있는 효소인  $\alpha$ -amylase와  $\alpha$ -amylglucosidase를 처리한다. Ethanol을 80%로 다시 처리하여 침전물로 나오는 효소처리 수용성 단백 다당체를 얻는다. 한편, 열수추출후 particle로 나오는 침전물에  $\alpha$ -amylase와  $\alpha$ -amylglucosidase를 처리하고 ethanol 침전을 시켜 침전되는 물질인 효소추출 가용성 단백다당체를 얻었다.

### (2) Cytokine 측정

- 상술한 바와 동일한 ELISA방법을 통해 측정을 하였다. TNF- $\alpha$ 외에도 IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12, GM-CSF도 상용으로 판매되는 ELISA kit (Pierce-Endogen, USA)을 사용하여 측정하였다.

### (3) Luciferase assay

- 사람의 kidney epithelial cell인 293에서 유래한 293T 세포 또는 mouse macrophage cell인 RAW264.7 세포를  $2 \times 10^5$  cell/ml로 분주한 뒤 24시간 후에 promoter를 NF- $\kappa$ B, AP-1, CRE, ISRE를 가지고 있으며 luciferase가 발현되는 construct를 transfection 시킨다. 잔나비겉상버섯 추출물을 transfection 후 24시간 뒤에 200  $\mu$ g/ml의 농도로 처리하고 24시간 뒤에 luciferase substrate (Promega, USA)를 넣어주어 형광 정도를 측정한다.

## 4) 기능성식품으로서의 개발을 위한 안전성 평가

### 가) 정상 생쥐를 통한 반복독성시험

- 잣버섯 자실체는 식품으로 인정되는 원료이므로 안전성은 이미 확보되어 있는 상태이다. 그러나 현재 다양한 in vitro/in vivo 실험을 통하여 입증된 강력한 면역 활성을 고려할 때, 인체에서 장기투여시에도 안전성이 확보되는지 확인하는 것은 매우 중요한 문제이다. 따라서 향후 시행될 인체시험에 대비하여 설치류(마우스 및 랫드)를 이용한 반복투여독성에 대한 연구가 이루어 져야한다. 시험방법 및 시험항목은 다음과 같다.

(1) 일반증상관찰

- 시험 기간에 걸쳐 매일 2회 (투여 전 및 투여 후)로 일반 증상 및 사망 유무에 관하여 관찰하고, 이상이 있을 경우에는 증상의 종류, 발현일 및 빈도에 따라 증상의 정도를 Path/Tox System (version 4.2.2)을 이용하여 정리한다. 빈사동물에 대해서는 시험책임자의 판단으로 도살 처분하여 부검하고, 사망동물에 대해서는 가능하면 발견 직후에 바로 부검한다. 모든 부검동물에 대해서 부검소견을 관찰하고 장기를 고정한다. 일반 증상이 악화된 동물에 대해서는 다른 동물에 의한 공식을 피하기 위하여 격리할 수 있다.

(2) 체중측정

- 투여개시 전, 투여개시 후 주 1회씩 및 부검일에 측정한다.

(3) 사료섭취량 측정

- 투여개시 전 및 투여개시 후 주 1회씩 사료섭취량을 측정한다. 측정방법은 측정일에 사육상자별로 정량을 급여하고 익일에 잔량을 측정하여 1일간의 섭취량을 계산하며, 개체당 일일 평균섭취량 (g/rat/day)으로 산출한다.

(4) 혈액학적 검사

- 계획 도살되는 모든 생존동물에 대하여 하룻밤 절식시킨 다음 혈액학적 검사를 실시한다. 동물을 isofluorane 마취 하에 개복하여 후대정맥으로 부터 채혈하고 이를 이용하여 아래의 항목에 관하여 측정을 행한다. 혈액응고방지제로서는 EDTA-2K를 이용한다. ㉠~㉡의 각 항목은 혈구자동계측장치(ADVIA120 Hematology System, Bayer, USA)를 이용하여 검사한다. ㉢ 및 ㉣의 항목은 채혈한 혈액의 일부를 3.2% sodium citrate로 처리 후 혈액응고분석기(ACL 300 plus, Instrumentation Laboratory, Italy)를 이용하여 측정한다.

(5) 혈액생화학적 검사

- 혈액학적 검사를 실시한 모든 동물에 대해서 혈액생화학적 검사를 실시한다. 후대정맥으로부터 채혈된 혈액을 3000 rpm으로 10분간 원심분리하여 얻은 혈청을 이용하여 아래의 혈액생화학항목에 관하여 측정한다. ㉠~㉤의 항목에 대해서는 혈액생화학 자동분석장치(Toshiba 200FR NEO, Toshiba Co., Japan)를 이용하여 측정한다.

(6) 부검

- 최종투여후에 부형제대조군 및 투여군의 모든 생존동물에 대하여 하룻밤 절식

시킨 다음 계획도살하여 부검을 실시한다. 사망동물은 발견 직후 가능하면 속히 부검하고 빈사동물은 절박도살하여 부검한다. 빈사 동물에 대해서는 시험책임자의 판단으로 도살 처분하여 부검하고, 사망 동물에 대해서는 가능하면 발견 직후에 바로 부검한다. 부검동물에 대해서는 부검소견을 관찰하고 장기를 고정한다.

Table 1. 혈액학적 검사 항목

항 목	단 위	방 법
㉑ White blood cell count (WBC)	$\times 10^3/\mu^2$	Laser optical with cytochemical reaction
㉒ Red blood cell count (RBC)	$\times 10^6/\mu^2$	Laser optical (Flow cytometry)
㉓ Hemoglobin concentration (HGB)	g/dL	시안메트헤모글로빈법
㉔ Hematocrit (HCT)	%	㉒, ㉓항목으로 산출
㉕ Mean corpuscular volume (MCV)	fl	Laser optical (Flow cytometry)
㉖ Mean corpuscular hemoglobin (MCH)	pg	㉓, ㉔항목으로 산출
㉗ Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)	g/dL	㉓, ㉔항목으로 산출
㉘ Platelet (PLT)	$\times 10^3/\mu^2$	Laser optical (Flow cytometry)
㉙ Differential leucocyte count (neutrophils: NEU%, lymphocytes: LYM%, monocytes: MON%, eosinophils: EOS%, basophils: BAS%, large unstained cells: LUC%)	%	Perox optical with chemical reacton
㉚ Reticulocyte (RET)	%	Laser optical with cytochemical reaction
㉛ Prothrombin time (PT)	sec	Clotting time method
㉜ Activated partial thromboplastin time (APTT)	sec	Nephelometric analysis

Table 2. 혈액생화학적 검사항목

항 목	단 위	방 법
㉑ AST (Aspartate aminotransferase)	IU/L	UV-Rate 법
㉒ ALT (Alanine aminotransferase)	IU/L	UV-Rate 법
㉓ ALP (Alkaline phosphatase)	IU/L	P-NPP 법
㉔ BUN (Blood urea nitrogen)	mg/dl	UV-rate 법
㉕ CREA (Creatinine)	mg/dl	Jaffe 법
㉖ GLU (Glucose)	mg/dl	Hexokinase 법
㉗ TCHO (Total cholesterol)	mg/dl	Enzyme 법
㉘ A/G (Albumin, globulin ratio)	ratio	㉑, ㉒로 자동계산
㉙ TP (Total protein)	g/dl	Biuret 법
㉚ ALB (Albumin)	g/dl	BCG 법
㉛ CK (Creatine kinase)	IU/L	UV-Rate 법
㉜ TG (Triglyceride)	mg/dl	글리세롤소거법
㉝ PL (Phospholipid)	mg/dl	Enzyme 법
㉞ TBIL (Total bilirubin)	mg/dl	Enzyme 법
㉟ Ca (Calcium)	mg/dl	OCPC 법
㊱ P (Inorganic phosphorus)	mg/dl	UV 법
㊲ GGT (Gamma glutamyl transferase)	IU/L	r-GPNA법
㊳ Cl (Chloride)	mmol/l	전극 법
㊴ Na (Sodium)	mmol/l	전극 법
㊵ K (Potassium)	mmol/l	전극 법

(7) 장기중량측정 및 조직병리검사  
- 조직병리검사계획에 따라 실시한다.

#### 나. 결과

##### 1) 면역저하모델에서의 잣버섯 균사체 및 자실체 추출물의 조혈작용

###### 가) 면역저하모델에서의 조혈작용

- 면역 저하모델에서의 잣버섯 추출물의 조혈 작용을 확인하기 위한 방법으로 cyclophosphamide를 복막내 주사를 통해 투여하여 면역 저하를 유도한 후 잣버섯 추출물을 투여 시 변화양상을 관찰하였다.

###### (1) 폐사율

- 시험기간 중 시험물질 투여에 기인하여 폐사한 동물은 관찰되지 않았다.

###### (2) 임상증상

- 모든 시험군에서 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다.

### (3) 혈액학적 검사

- 마우스 혈액을 채취하여 잣버섯 추출물 경구투여에 따른 면역세포의 변화를 관찰한 결과, DW 투여군에 비해 총백혈구수, 임파구수, 호산구 및 호중구수에는 유의미한 차이가 없었으나 면역저하모델 유도전 잣버섯 추출물을 전처리한 경우 투여 6일 이후부터 monocyte 수가 정상 마우스와 유사한 수준까지 증가됨을 확인할 수 있었다.

### (4) Splenocyte의 증식 속도

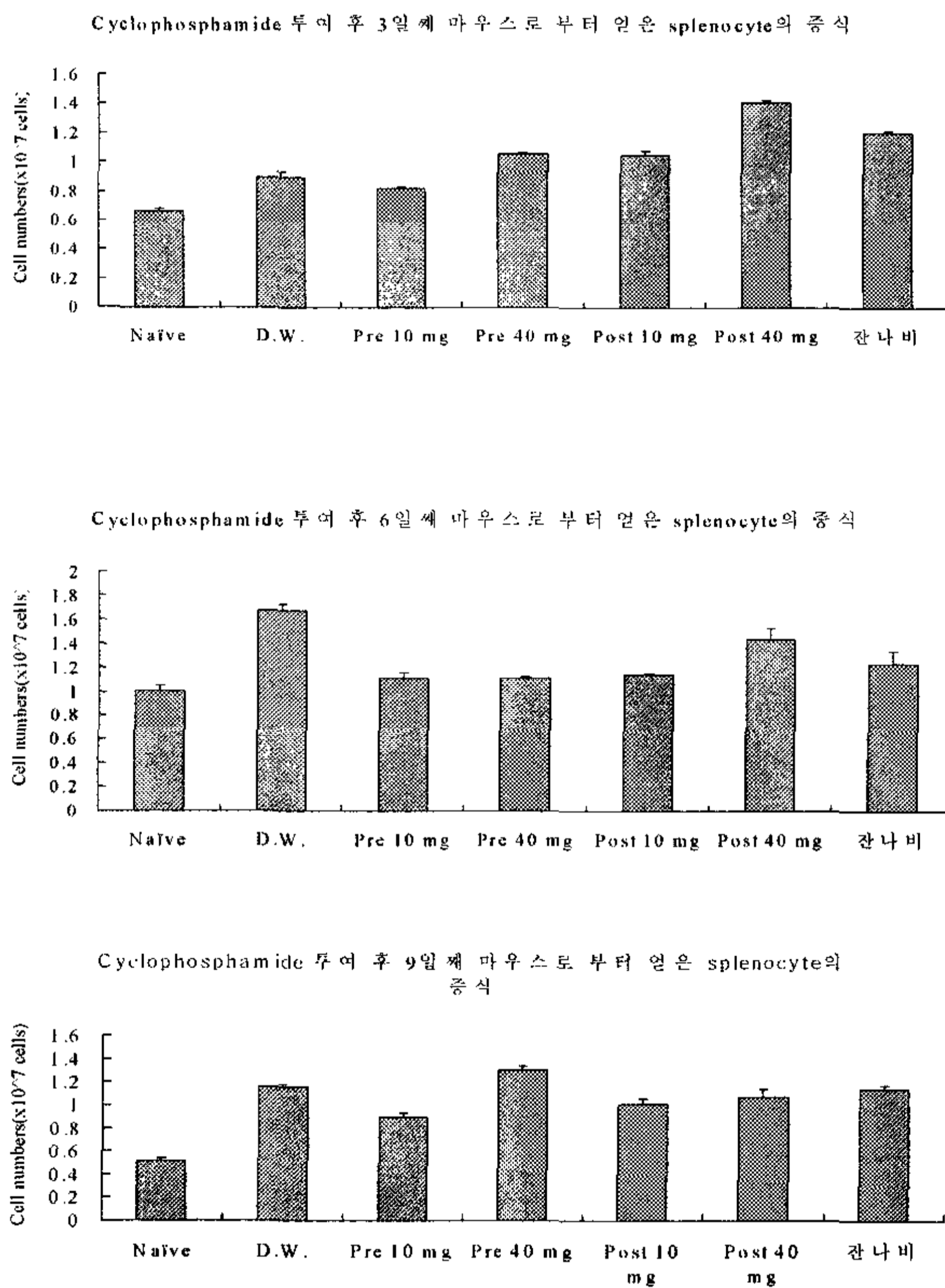


Fig. 1. 잣버섯 추출물 경구투여가 cyclophosphamide를 이용한 면역저하모델에서 splenocyte 증식에 미치는 영향.

- 상기 그림에서와 같이 splenocyte의 증식속도에는 통계적으로 유의미한 차이를 보이지 않았다.

(5) Bone marrow

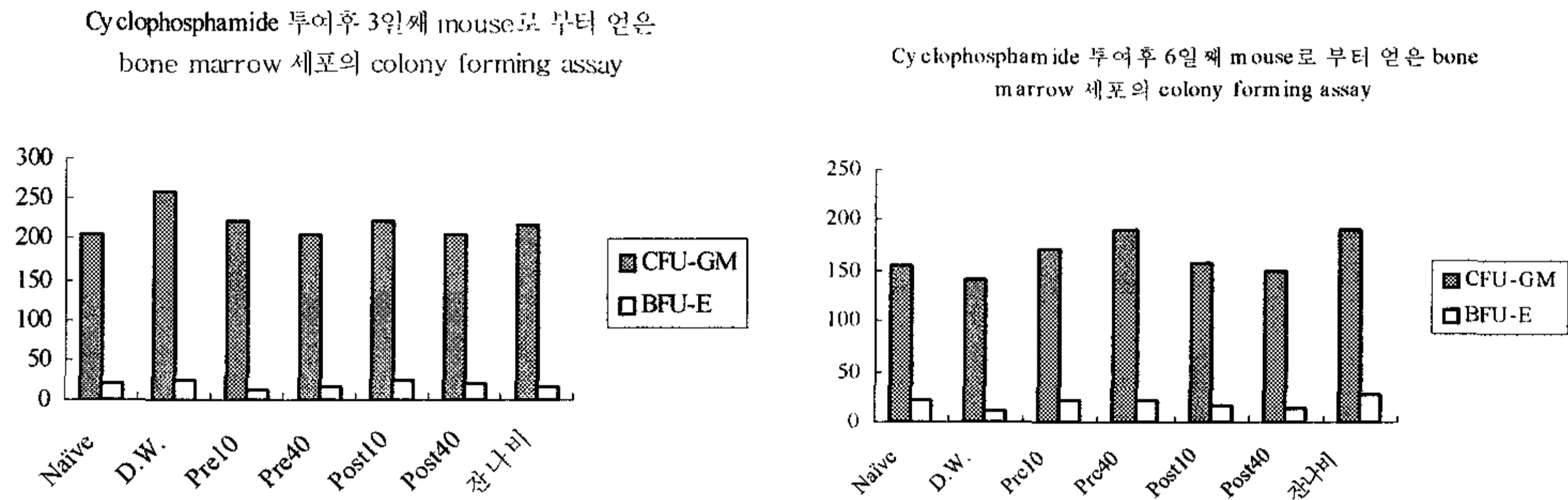


Fig. 2. cyclophosphamide를 이용한 면역저하모델에서 골수세포에 대한 colony forming assay.

- PG101 투여 후 혈액학적인 결과에서 물만을 먹인 대조군이 cyclophosphamide로 유도를 통해 의도한 면역 억제가 제대로 발생하지 않는 것으로 보여지며, 이는 splenocyte를 3일간 culture 하면서 세포 증식 속도를 비교한 MTS 결과 및 colony forming assay를 통해 나타난 결과에서도 물만을 먹인 대조군에서 cyclophosphamide의 주입을 통한 면역 억제가 제대로 나타나고 있지 않음이 보여지고 있다. 하지만 전체적으로 cyclophosphamide의 주입을 통해 면역억제를 유도한 후 잣버섯 혹은 잔나비결상버섯 추출물을 투여한 그룹에서 3일째보다 6일째에 모든 항목에서 세포수의 증가를 보이고 있다. 9일째 군에서는 대부분의 군에서 세포수가 다시 감소하는 양상을 보이나 pre10군에서는 lymphocyte, monocyte 항목이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 세포 증식 속도를 측정된 MTS assay 결과에서는 약물 투여군에서 투여 약물의 농도가 높은 40 mg/kg로 투여한 경우 상대적으로 낮은 농도인 10mg/kg보다 높은 splenocyte의 증식 속도를 보여주고 있음을 모든 결과에서 확인할 수 있었다. Bone marrow의 colony forming assay 결과에서는 3일째에는 그룹 간 차이를 보이지 않았으나 6일째에는 물만 먹인 대조군보다 약물을 투여한 군에서 약간 증가하는 경향을 보였다. 이로 보아 면역 억제 유도 후 물만 먹인 대조군에서의 면역 억제 유도 제대로 이루어지고 있지 않았으나 혈액학적인 결과에서 유의적이진 않지만 pre10그룹에서 lymphocyte의 상승 및 bone marrow 6일째 결과에서 PG101 및 잔나비 투여군에서 어느 정도의 면역 증강 효과를 보이고 있었으며 잣버섯의 투여에 따른 세포의 증식속도가 증가할 수 있다는 가능성을 보여주고 있다. 따라서 이번 실험에서 나타난 결점을 보완한 추가 실험을 통해



잣버섯 및 잔나비겉상버섯의 추출물에 대한 면역 증강 효과를 재확인할 필요성이 있다고 사료되어진다.

## 2) 잣버섯 자실체 추출물 제제의 pilot 생산

### 가) 생물학적 활성 검증법 확립

- 생산되는 잣버섯 추출물에 대해서 품질을 항상 유지시키기 위해서는 일정한 세포주를 통해 일정한 활성이 나타나고 있음을 지속적으로 측정할 필요가 있다. 사람의 PBMC의 경우 개인별 차이는 물론 한 개인에 있어서도 신체의 변화에 따라 같은 추출물이라도 다른 반응양상을 보일 수 있다. 따라서 일정한 세포주를 품질 유지의 기준으로 삼을 필요가 있다. 잣버섯 추출물에 영향을 받는 세포인 대식세포(macrophage)들이 잣버섯 추출물에 어떤 반응을 보이는지 확인하여 보았다. 사용한 세포주는 사람의 세포주인 U937과 HL-60였으며 mouse의 세포주로는 RAW264.7 cell을 사용하였다. 이때 잣버섯 추출물이 가장 먼저 발현시키면서 직접적으로 활성화시키는 cytokine이고 면역활성에 있어서 가장 중추적인 역할을 담당하고 있는 TNF- $\alpha$ 의 발현을 활성 측정의 지표로 삼았다.

#### (1) Differentiated U937.

- 사람의 pro-monocytic cell line인 U937을 PMA(phorbol myristate acetate)로 분화시키면 면역반응을 일으키기 쉬운 대식세포로 분화하게 된다. 이렇게 분화된 U937세포에 잣버섯 추출물을 처리하여 TNF- $\alpha$ 의 발현이 증가하게 되는 양을 측정하여 보았다. 각기  $1 \times 10^5$  cell/ml의 농도로 U937을 분주한 뒤 1 또는 10 ng/ml의 농도로 PMA를 24시간 동안 처리하여 분화를 시켰다. 각기 100  $\mu$ g/ml의 농도로 잣버섯 추출물을 처리하고 24시간 뒤 세포배양액에 분비된 TNF- $\alpha$ 의 양을 ELISA로 측정하였다.

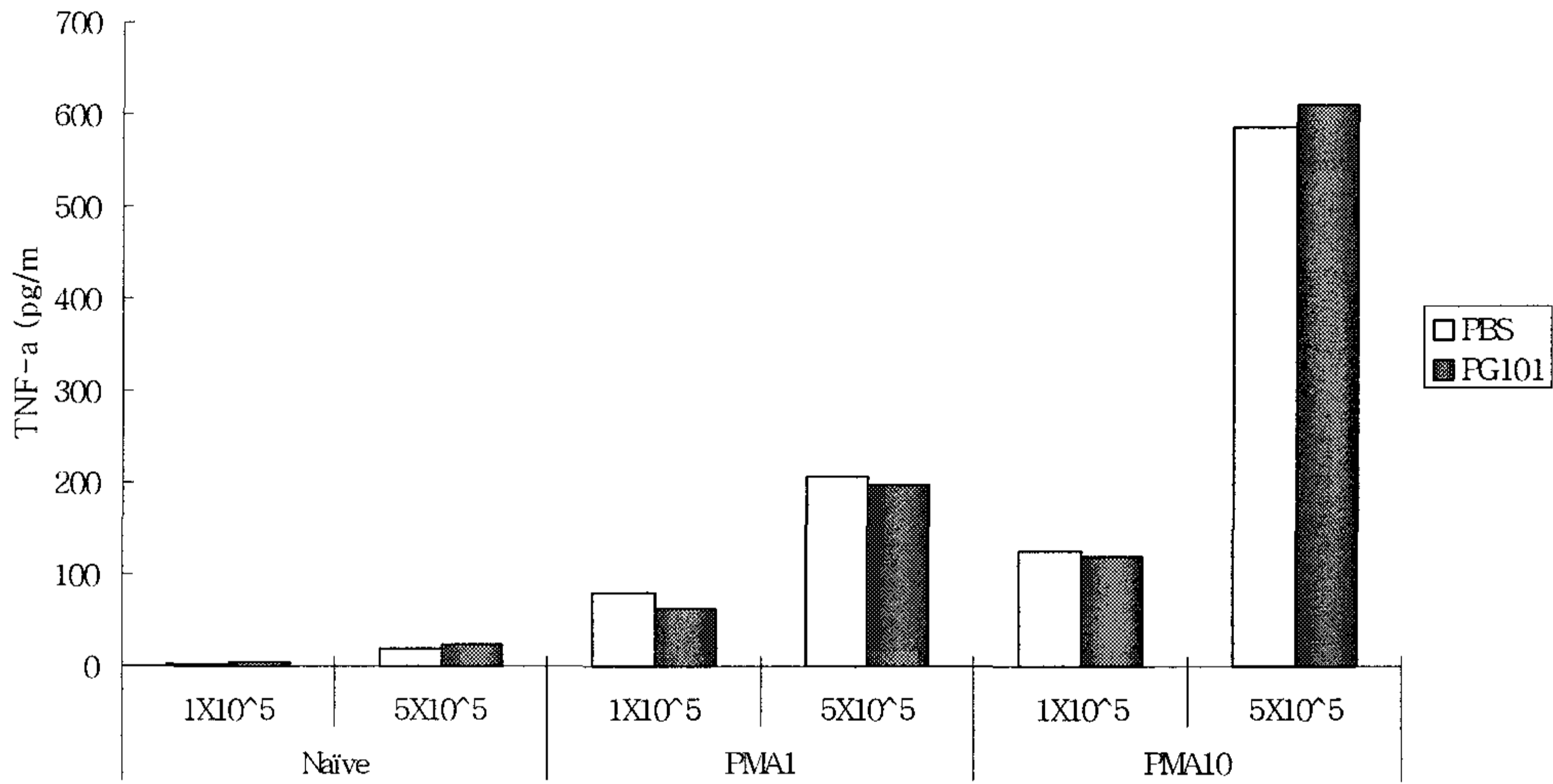


Fig. 3. Differentiated U937 세포에 미치는 PG101의 효과.  $1 \times 10^5$  및  $5 \times 10^5$ ; 각기 세포의 농도로서  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ . Naive; non-differentiated U937, PMA1; PMA 1 ng/ml, PMA10; PMA 10 ng/ml.

- U937 세포를 분화없이 잣버섯 추출물을 처리할 경우 TNF- $\alpha$ 의 발현이 거의 이루어지지 않게 된다 (Naive). PMA로 U937을 분화시킨 뒤 잣버섯 추출물을 처리하게 되면 PMA에의해서 발현되는 TNF- $\alpha$ 의 양이 증가하게 된다. 그럼에도 잣버섯 추출물은 분화된 U937에서 더욱 많은 양의 TNF- $\alpha$ 가 나오게 하지는 못하고 있다. 따라서 U937은 적절한 잣버섯 추출물의 bioassay system이 아닌 것으로 판단된다.

(2) HL-60 세포주.

- 사람의 대식세포주에 속하는 HL-60에 대하여 잣버섯 추출물에 대한 반응을 알아보았다. HL-60 역시 TNF- $\alpha$ 를 분비할 수 있는 세포로 알려져 있다. 이 세포를  $5 \times 10^5$  cell/ml로 분주를 한 뒤 24시간 동안 잣버섯 추출물을 처리하였다. 세포배양액을 취하여 세포가 분비한 TNF- $\alpha$ 의 양을 ELISA로 측정하였다.
- HL-60의 경우 잣버섯 추출물을 처리하더라도 전혀 TNF- $\alpha$ 를 분비하지 못하였다. 따라서 잣버섯 추출물의 bioassay system으로 사용하기 힘들 것 같다.

(3) RAW264.7 세포주.

- RAW264.7 세포주는 mouse 대식세포주로서 U937이나 HL-60에 비해서 대식

세포로 더욱 분화가 되어있는 것으로 알려져있다. 따라서 앞의 두 세포주에 비해 더욱 쉽게 잣버섯 추출물에 반응할 것으로 여겨지기 때문에 RAW264.7 세포주가 잣버섯 추출물에 대한 bioassay system으로 사용가능한지 확인하여 보았다. RAW264.7 세포주를  $5 \times 10^5$  cell/ml로 분주한 뒤 24시간 후에 잣버섯 추출물을 24시간 동안 반응시킨다. 세포배양액을 취하여 TNF- $\alpha$ 의 양을 ELISA로 측정하였다.

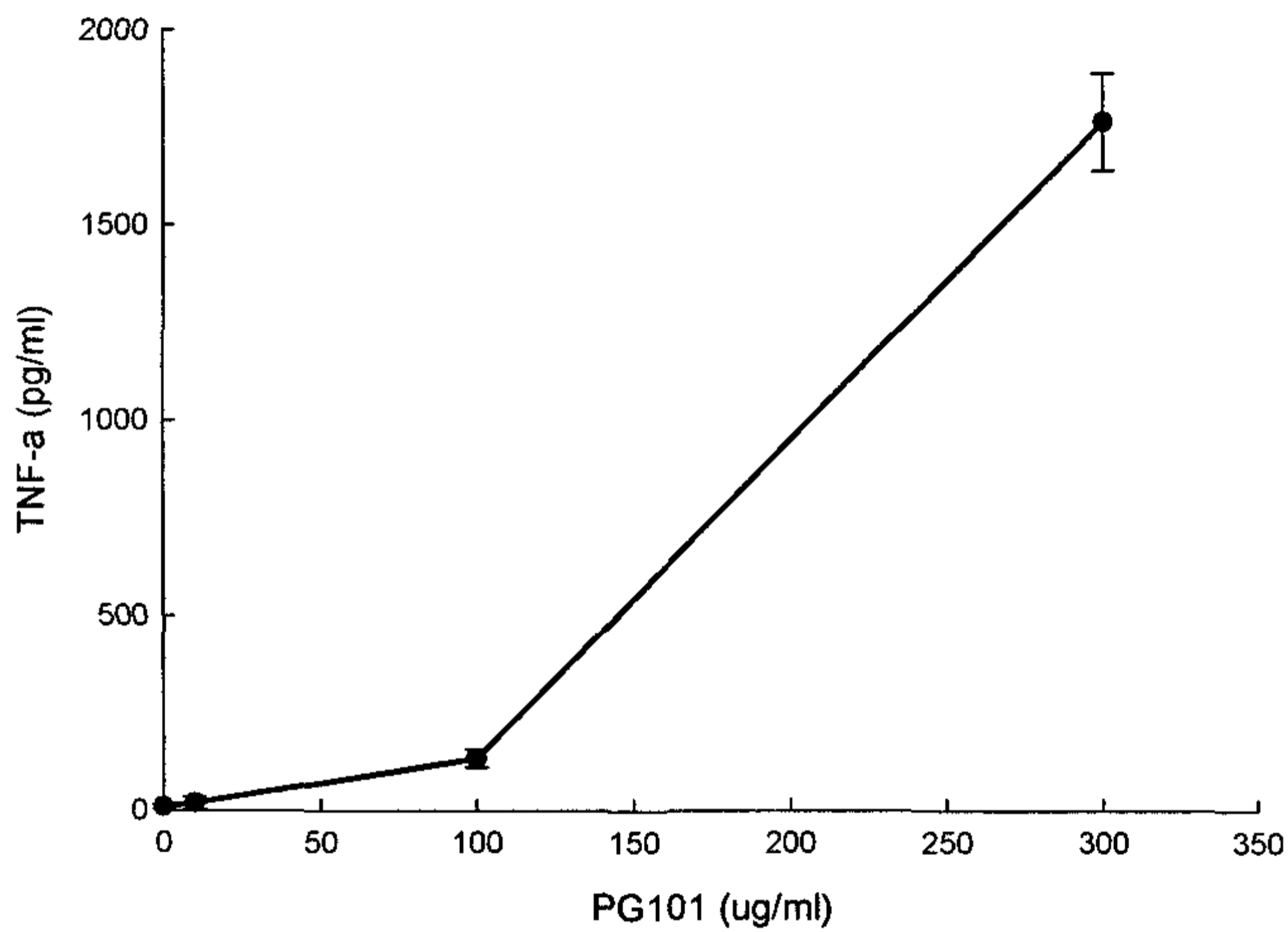


Fig. 4. Raw264.7 세포에 미치는 PG101의 농도 효과.

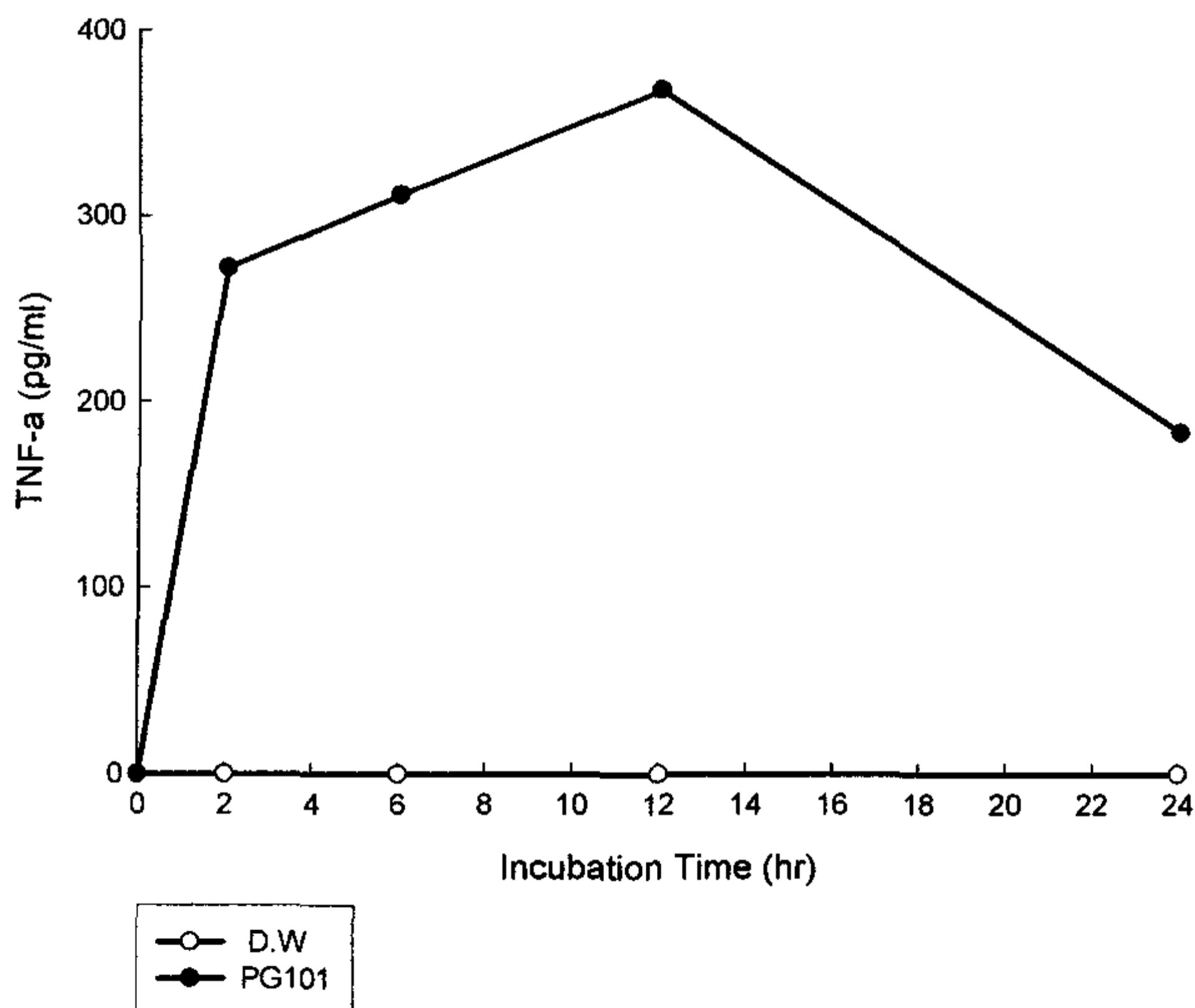


Fig. 5. Raw264.7 세포에 미치는 PG101의 시간 효과.

- RAW264.7 세포는 잣버섯 추출물에 대해서 TNF- $\alpha$ 를 분비하는 반응을 보여주었다. RAW264.7 세포는 잣버섯 추출물에 대하여 농도의존적인 반응을 보여주고 있었다. 그러나 그 반응에 있어서 선형적인 결과는 아니었다. 잣버섯 추출물을 10  $\mu\text{g/ml}$ 로 처리할 경우 18  $\text{pg/ml}$ 의 TNF- $\alpha$ 가 발현되었다. 이의 10배에 해당하는 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 약 7배에 해당하는 134  $\text{pg/ml}$ 의 TNF- $\alpha$ 가 분비되었으며 다시 이것의 3배에 해당하는 300  $\mu\text{g/ml}$ 의 잣버섯 추출물에서는 무려 13배에 해당하는 1767  $\text{pg/ml}$ 의 TNF- $\alpha$ 가 발현되었다. 이러한 반응은 일정 농도 이내의 잣버섯 추출물의 농도에 따른 TNF- $\alpha$ 의 분비는 기하급수적인 관계있는 것으로 여겨진다. 시간의존적인 반응에 있어서 2시간 이내에는 매우 급격한 TNF- $\alpha$ 의 발현이 이루어진 후 12시간째까지 선형적인 반응이 일어났다. 24시간에는 오히려 12시간째보다 TNF- $\alpha$ 의 발현이 감소하는 현상이 나타나고 있다. RAW264.7 세포주가 잣버섯 추출물에 대하여 반응을 일으킨다는 점에서 bioassay system으로 사용할 수 있는 세포주로 사용할 수 있는 가능성을 제시하였으나 추출물에 대한 독특한 반응에 대한 더 많은 정보를 얻을 필요가 있다.

#### 나) 생물학적 활성 검증을 통한 시험생산 원료의 확보

##### (1) 자실체 시험생산을 위한 원료 종균 선별

- 종균별 자실체의 활성도에 대한 확인을 수행한 후 대량의 시험생산을 수행하기로 하였다. 다양한 산지에서 얻은 잣버섯 균사체 종균을 확보하여 실험실 규모에서 톱밥배양을 통해 자실체로 배양한 후 이를 동일한 조건으로 추출한 후 활성을 확인하고자 하였다. 이번에 사용한 잣버섯 자실체 종균은 총 13종으로 배치 번호는 다음과 같다. [02050, 02052, 02053, 02054, 03050, 03051, 03052, 03054, 03100, 04100, 20641, 99161, PEN.]

##### (2) 자실체 추출물의 활성 측정

- 확보한 잣버섯 추출물을 배치별로 PBMC에 처리하여 배지에 유리되는 TNF- $\alpha$ 의 양을 ELISA를 통해 측정 비교하였다.

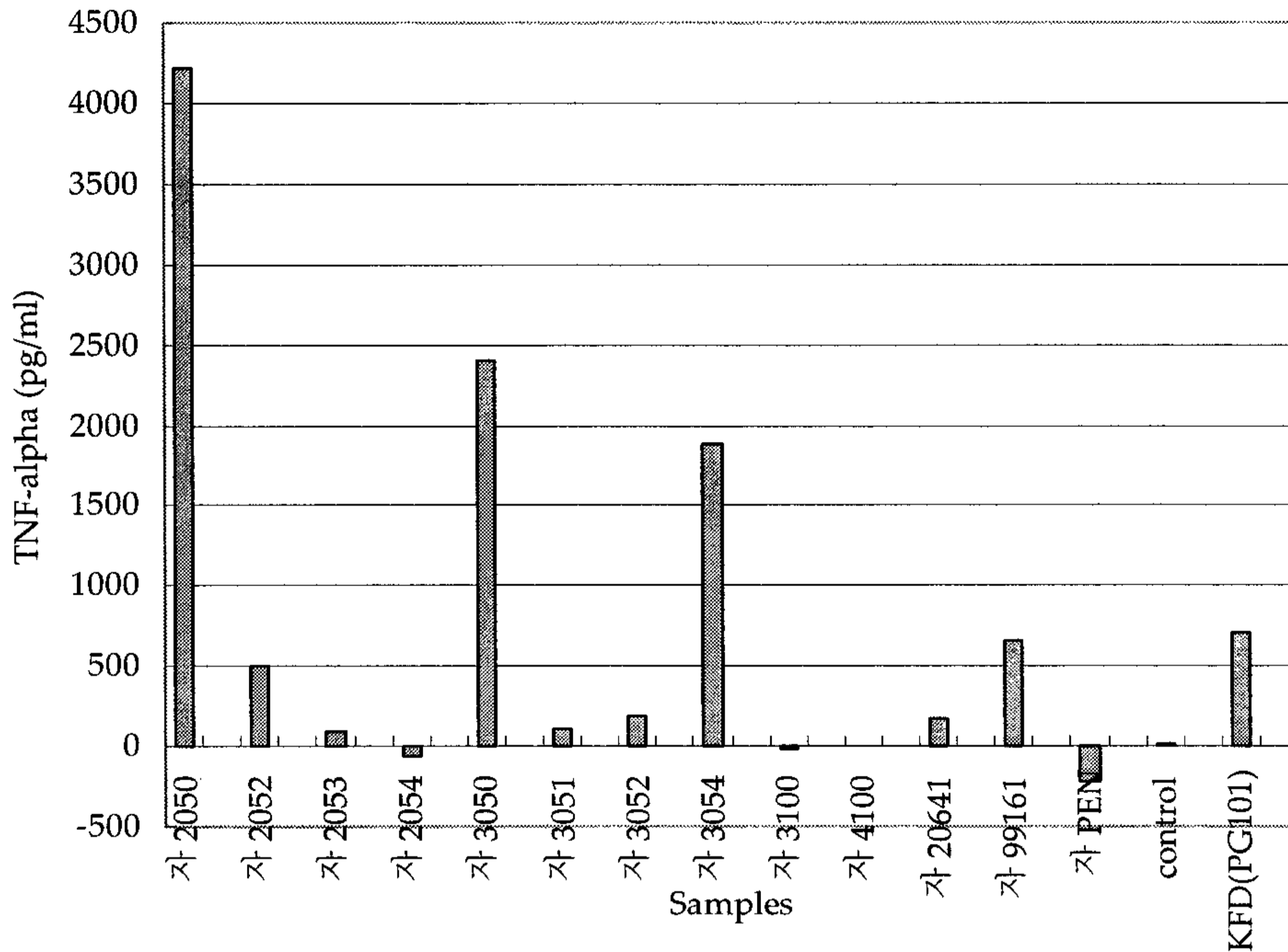


Fig. 6. PBMC에서의 잣버섯 자실체 추출물 처리 시 종균별 TNF- $\alpha$  발현양의 비교

- 기존에 양성 대조군으로 사용하던 PG101 배치(KFD)보다 TNF- $\alpha$ 의 발현양보다 높은 네가지 종균(배치번호: 2060, 3050, 3054, 99161)에 대해서 대량 시험 생산을 수행하기로 하였다.

### (3) 자실체 추출물의 제조

- 4가지 종균으로부터 대량 배양된 잣버섯 자실체를 정선하여 가로X세로X높이가 각기 1 cm 이하가 되게 절단한 다음 이를 세척하고 건조하였다. 건조된 자실체 100 kg에 10배량의 증류수 넣고 추출기에서 5시간 동안 열수 추출한 후 이를 여과하여 75 $^{\circ}$ C 이하에서 감압농축한 다음, 동결건조하여 잣버섯 추출물(PG101) 건조엑스 11.3kg을 얻었다 (수득율 : 11.3%). PG101 건조엑스의 성상은 특이한 향이 있는 적갈색의 분말이다.

### 다) 제형연구를 통한 시제품 제작

- 상기 시험을 통해 선발된 잣버섯 자실체 추출물의 물리, 화학적 성질을 확인한

후, 일일용량, 용법, 제품의 안정성, 용해성 및 소비자의 선호도를 고려하여 캡슐제로 제형을 결정하고, 아래와 같이 시제품을 제작하였다.

- 주성분 및 부원료의 배합비율 (1 캡슐당)

PG101 건조엑스 : 150 mg

경질무수규산 : 80 mg

히드록시프로필셀룰로오즈 : 20 mg

---

총량 250 mg

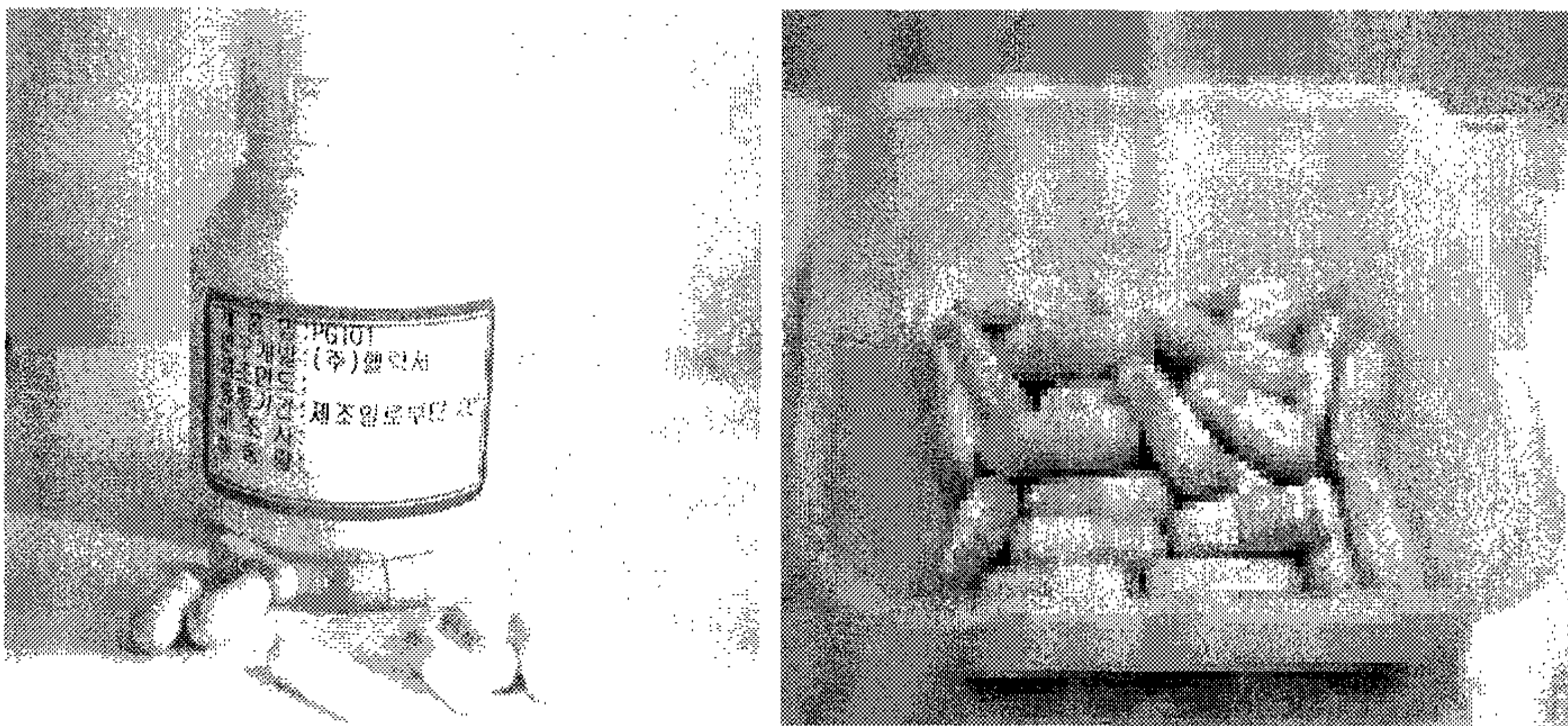


Fig. 7. PG101 시제품. 병포장 모습(좌), 캡슐제(우).

### 3) 다른 버섯과의 활성 비교

#### 가) 상용화된 기존 버섯과의 효능 비교 연구

- 잣버섯이 타버섯에 비해 얼마나 활성이 강한지 확인하기 위하여 각 버섯의 균사체 및 자실체의 추출물이 TNF- $\alpha$ 를 발현하게 하는 활성을 비교하였다.
- 각 버섯의 균사체 및 자실체로부터 열수추출을 통해 추출물을 얻었다. 각 추출물은 사람의 PBMC에 100  $\mu$ g/ml씩 처리하고 24시간 뒤 세포배양액에 분비된 TNF- $\alpha$ 를 측정하여 활성의 정도를 비교하였다.

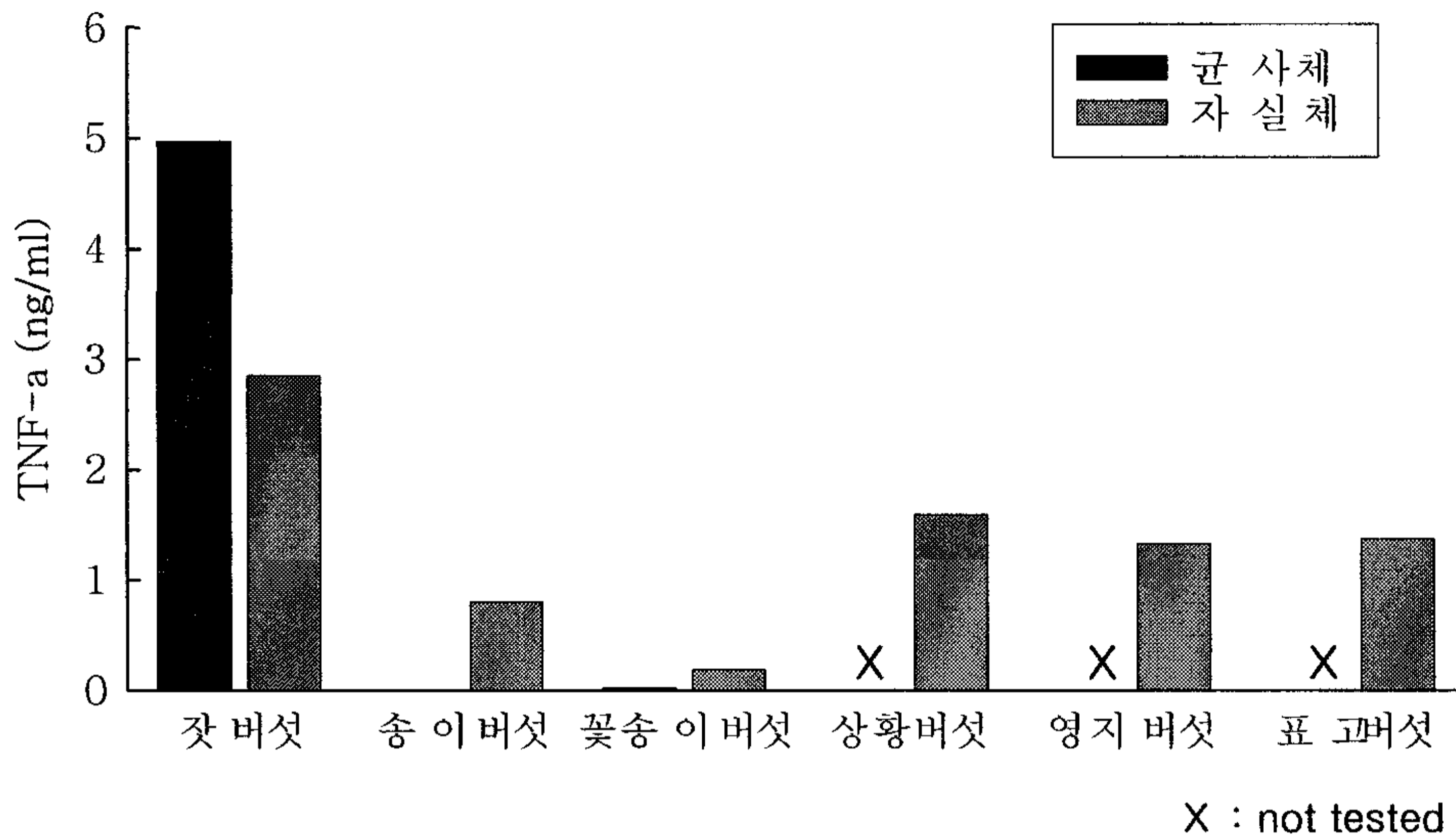


Fig. 8. 잣버섯 및 다양한 버섯의 활성비교.

- 여러 버섯 중에서 잣버섯이 가장 강한 활성을 나타내고 있다. 잣버섯의 균사체가 가장 강한 활성을 나타내었으며 잣버섯 자실체가 다음으로 강한 활성을 보이고 있다. 면역활성이 크다고 알려진 표고버섯 및 영지, 상황버섯의 자실체도 충분한 양의 TNF- $\alpha$ 를 분비하게 하였으나 잣버섯보다는 약한 활성을 보였다. 송이버섯의 경우 자실체에서 활성을 보였으나 균사체에서는 가장 약한 활성을 보였다. 꽃송이버섯은 모든 버섯 중에서 가장 낮은 활성을 보였다. 따라서 잣버섯이 산업적으로 충분히 개발할 가능성이 있는 버섯임을 알 수 있다.

#### 나) 잔나비겉상버섯 추출물의 활성 연구

- 잔나비겉상버섯은 잔나비불로초버섯이라고도 불리며 학명은 *Elfvigia applanata* (Pers.) 또는 *Ganoderma applanata* (Fr.)이다. 여름과 가을에 활엽수의 생나무나 고목에 발생하는 다년생 목재백색부후균으로서 반원 모양의 말굽형의 자실체를 형성한다. 잔나비겉상버섯의 자실체는 코르크질로서 그 자체는 식용할 수 없으나 약용으로서 널리 사용되어왔다. 본 실험에서는 잔나비겉상버섯의 균사체를 생물배양기에 배양한 뒤 균사체에서 열수추출을 통해 추출물을 얻고 실험에 사용하였다.

(1) 잔나비결상버섯의 추출

- 생물배양기에 15일 동안 배양시킨 잔나비결상버섯 균사체에서 열수추출을 통해 나온 수용성 물질을 얻은 뒤 '수용성 추출물'이라 명하였다. 수용성추출물에 80%의 ethanol을 첨가하여 침전시킴으로서 고분자물질을 얻은 뒤 '수용성 단백 다당체'라 명하였다. 사람의 당분해 효소인  $\alpha$ -amylase와  $\alpha$ -amylglucosidase를 수용성 단백다당체에 처리함으로써 섭취시에도 추출물의 활성이 유지되는지 확인하였다. 열수추출 시 나온 침전물에  $\alpha$ -amylase와  $\alpha$ -amylglucosidase를 처리한 뒤 ethanol 침전을 시켜 '효소추출 가용성 단백다당체'를 얻음으로서 균사체의 침전부분이 가지는 활성을 확인하여보았다. 또한 송이버섯의 자실체도 같은 방법으로 추출을 하였다.

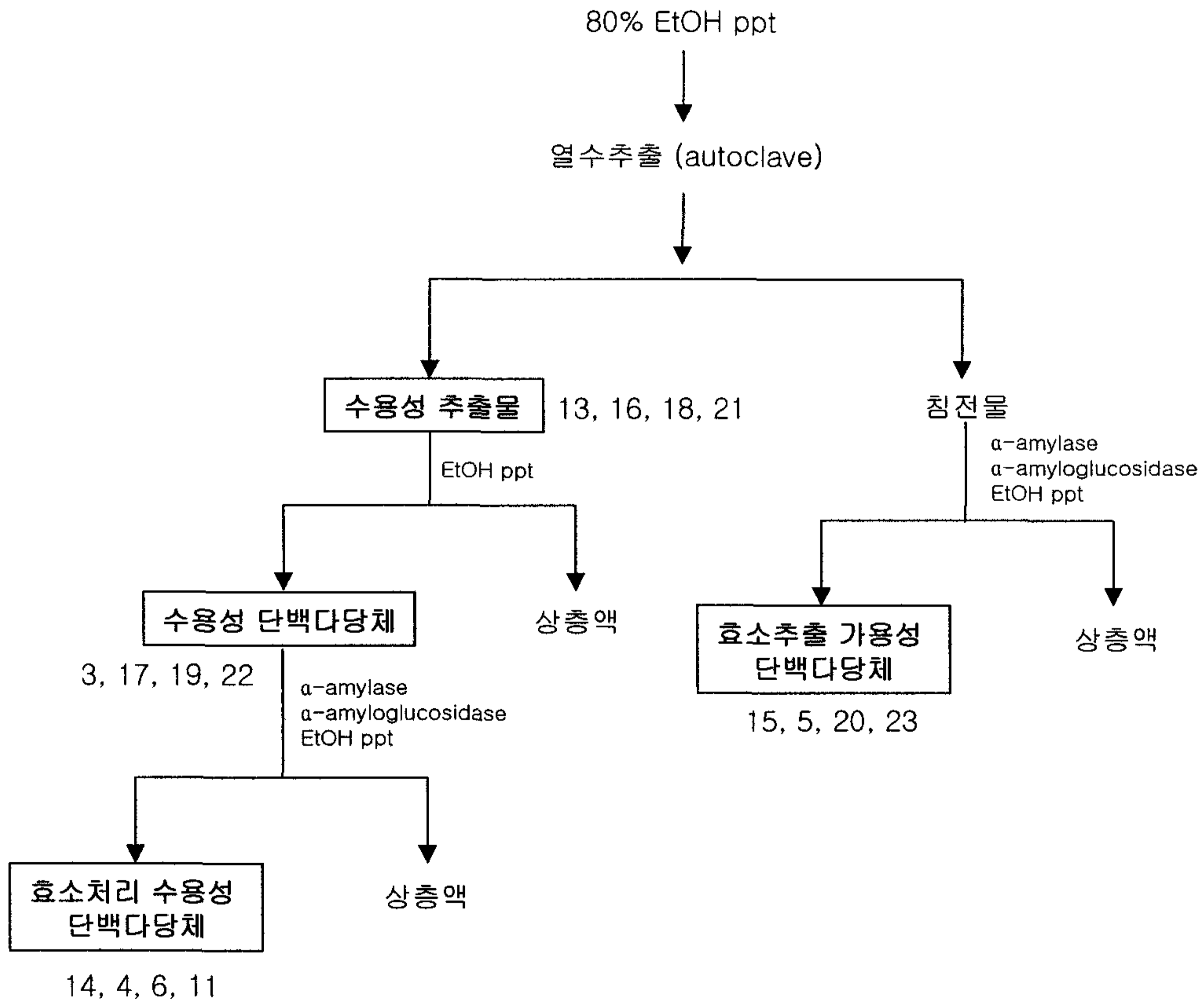


Fig. 9. 잔나비결상버섯 추출물 추출과정. 각 추출물 옆의 번호는 sample의 번호이다.



(2) 잔나비결상버섯 추출물의 활성화

- 잔나비결상버섯의 균사체를 배양시 배양액의 탄소원의 종류에 따른 활성화 차이를 보기 위하여 탄소원의 종류로 glucose 또는 starch를 첨가하였다. 각 배양액에서 자란 균사체를 Fig. 23.에서 제시한 방법대로 추출하였다. 또한 잔나비결상버섯 자실체의 추출물도 같은 방법으로 얻었으며 송이버섯의 자실체 추출물도 같은 방법으로 얻었다. 각 추출물의 활성을 보기 위하여 사람의 PBMC에 각기 100 µg/ml의 농도로 시료를 처리하고 24시간 뒤 TNF-α에 대한 ELISA를 실시하여 활성의 정도를 비교하였다.

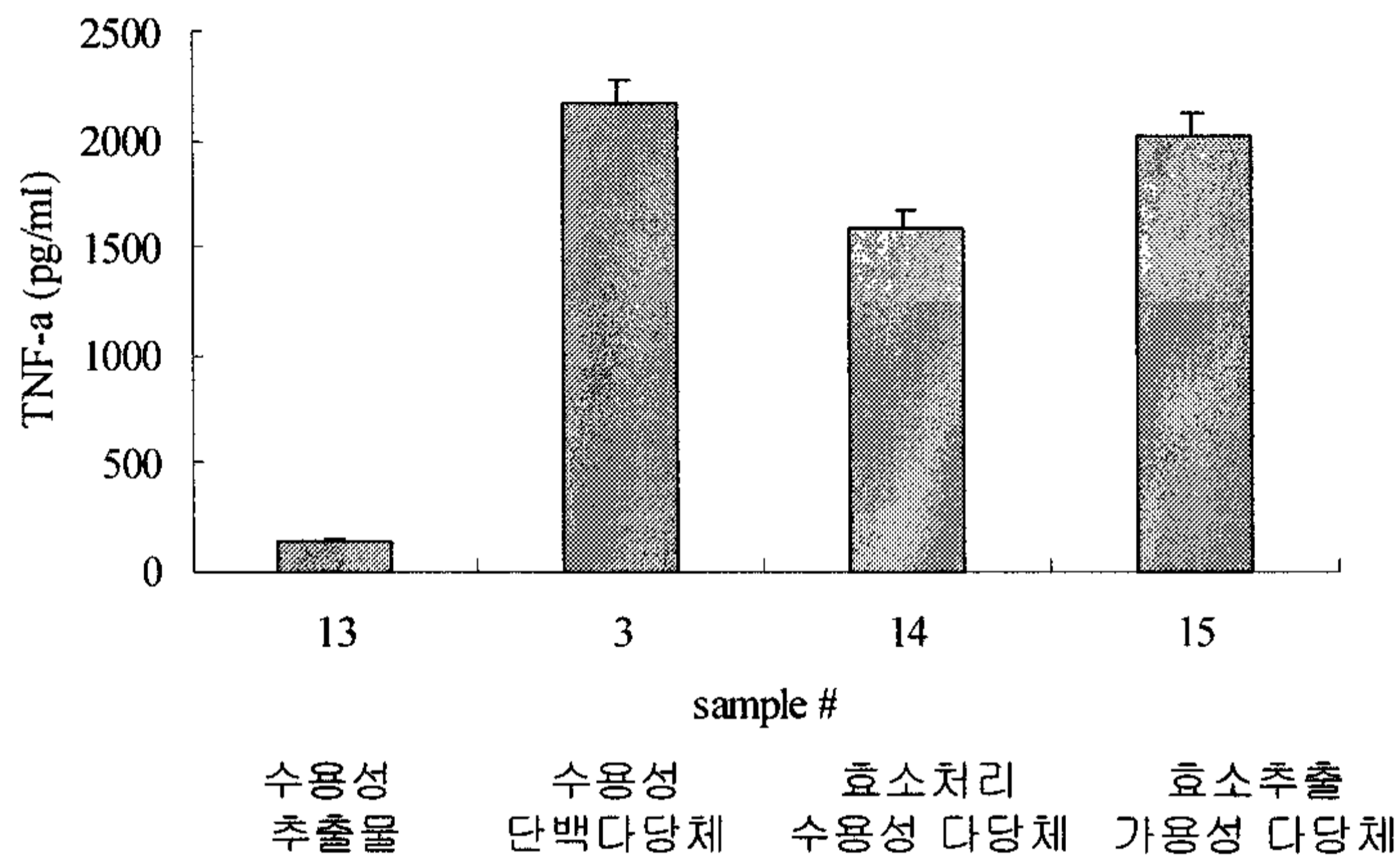


Fig. 10. 잔나비결상버섯 glucose 배양 균사체의 활성화

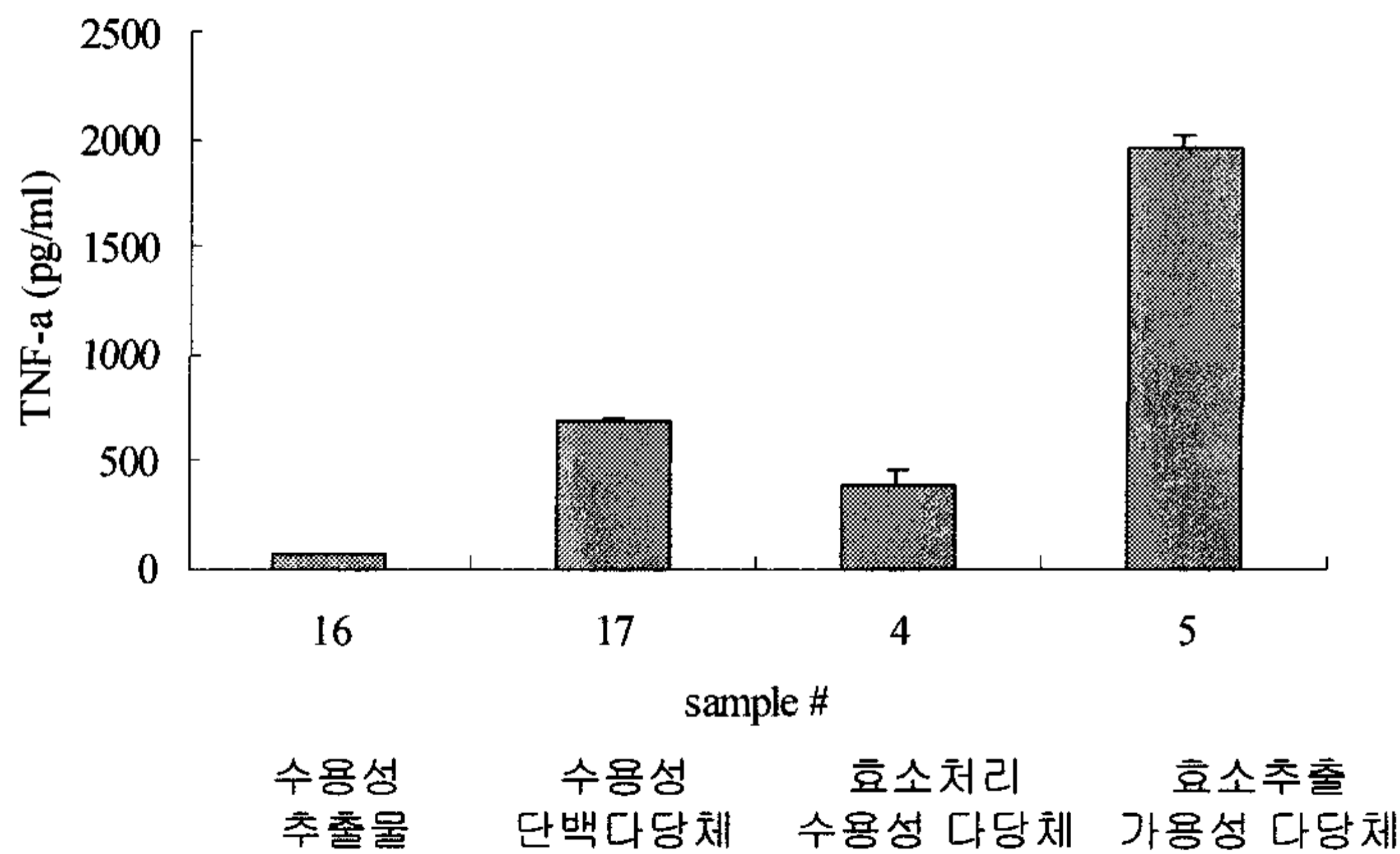


Fig. 11. 잔나비결상버섯 starch 배양 균사체의 활성화

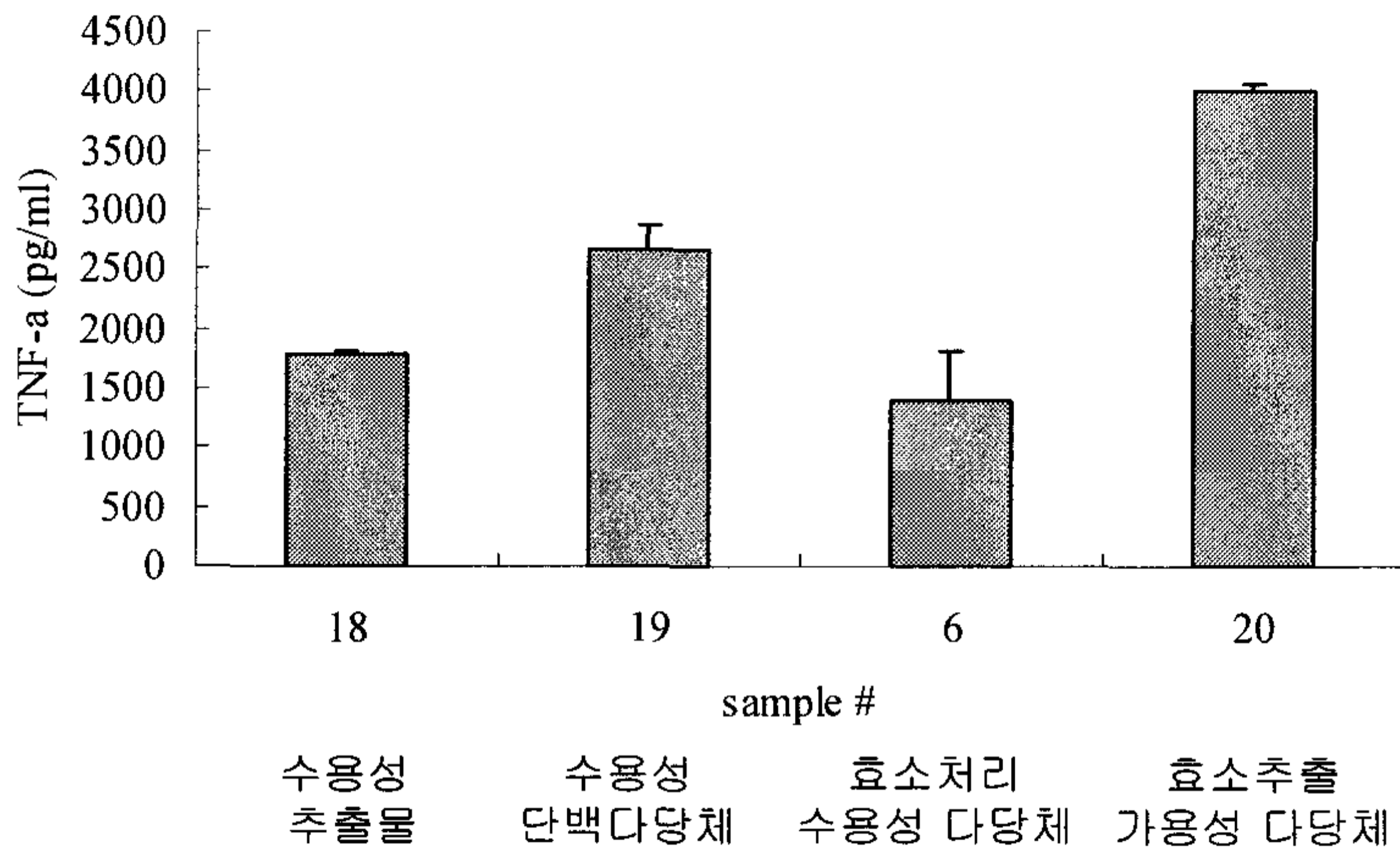


Fig. 12. 잔나비결상 자실체의 활성화

- 잔나비결상버섯의 자실체에서 전반적으로 가장 강한 활성을 보였다. 특히 효소추출 가용성 다당체 부분에서 가장 강한 활성이 나타났다. 활성의 순서는 전반적으로 보았을 때 잔나비결상버섯 자실체 > 잔나비결상버섯 glucose 배양 균사체 > 잔나비결상버섯 starch 배양 균사체의 순서였다. 잔나비결상버섯 자실체에서도 효소추출 가용성 다당체의 활성이 가장 컸는데 이것은 잔나비결상버섯이 코르크질의 성분으로 되어있어서 자실체 내부에 많은 양의 활성물질이 남아있었을 가능성이 있기 때문으로 여겨진다. 잔나비결상버섯의 균사체의 경우 starch에 비해 glucose를 배양액의 탄소원으로 사용했을 때 더 많은 활성을 나타내었는데 이는 glucan을 많이 함유하고 있는 균사체의 특징 때문으로 판단된다. 전반적으로 가장 활성이 많은 부분은 효소추출 가용성 다당체 부분이었는 데 이는 열수추출이후에도 많은 양의 활성 성분이 잔류물에 남아있기 때문으로 여겨진다. 따라서 활성성분의 추출 효율을 높일 수 있는 방법을 고안할 필요가 있다. 다음으로는 수용성 추출물의 ethanol 침전물인 수용성 단백다당체의 활성이 강하였고 다음으로는 이것에  $\alpha$ -glucosidase를 처리한 효소처리 수용성 다당체의 활성이 강하였다. Ethanol 침전물인 수용성 단백다당체의 경우 수용성 추출물에 비해 매우 강한 활성을 나타내었는데 이는 잔나비결상버섯의 추출물이 고분자 물질로 이루어져있음을 의미하는 것이다. 효소처리 수용성 다당체에 해당하는  $\alpha$ -glucosidase 처리 추출물의 경우 수용성 단백다당체에 비해 활성이 10~50% 정도까지 떨어지나 여전히 그 활성이 강하게 남아있었다. 이것은 이 물질을 섭취하더라도 그 활성성분이 소화과정 중에도 충분히 유지될 수 있음을

의미한다. 따라서 산업적으로 개발할 수 있는 가능성을 보여주는 결과라 할 수 있다.

(3) PBMC에서 잔나비결상버섯 추출물의 사이토카인 발현에 대한 효과

- 잔나비결상버섯 추출물의 활성이 강하게 나타났던 glucose 배양 균사체 수용성 단백다당체, glucose 배양 균사체 수용성 다당체, glucose 배양 균사체 수용성 단백다당체, 잔나비결상버섯 자실체 수용성 단백다당체, 잔나비결상버섯 자실체 수용성 다당체를 대상으로 사람의 PBMC에서 어떤 cytokine을 발현하게 하는지 확인해 보기 위하여 각 시료를 1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 PBMC에 24 시간 동안 처리한 뒤 세포 배양액에 분비된 TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12, IL-1 $\beta$ , GM-CSF의 농도를 ELISA로 측정하였다.

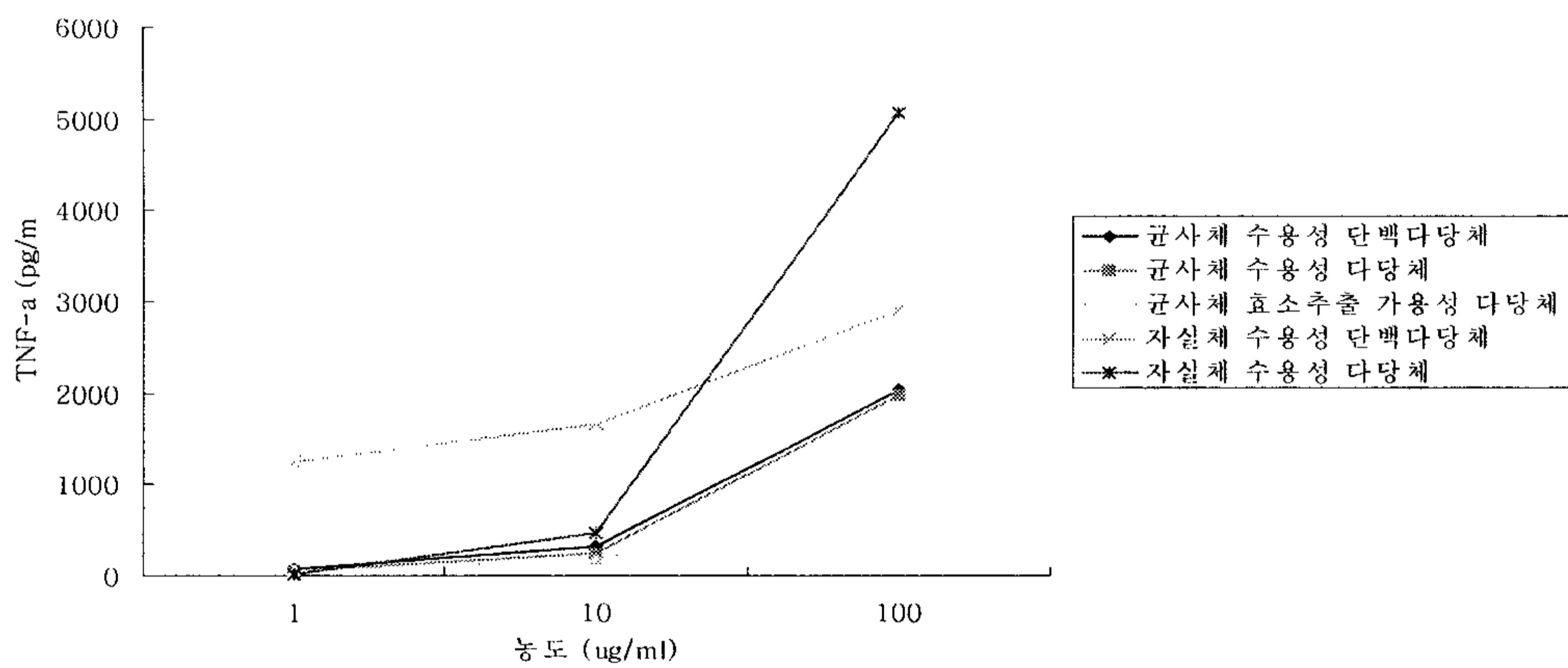


Fig. 13. TNF- $\alpha$  발현에 미치는 잔나비결상버섯 추출물의 농도 효과

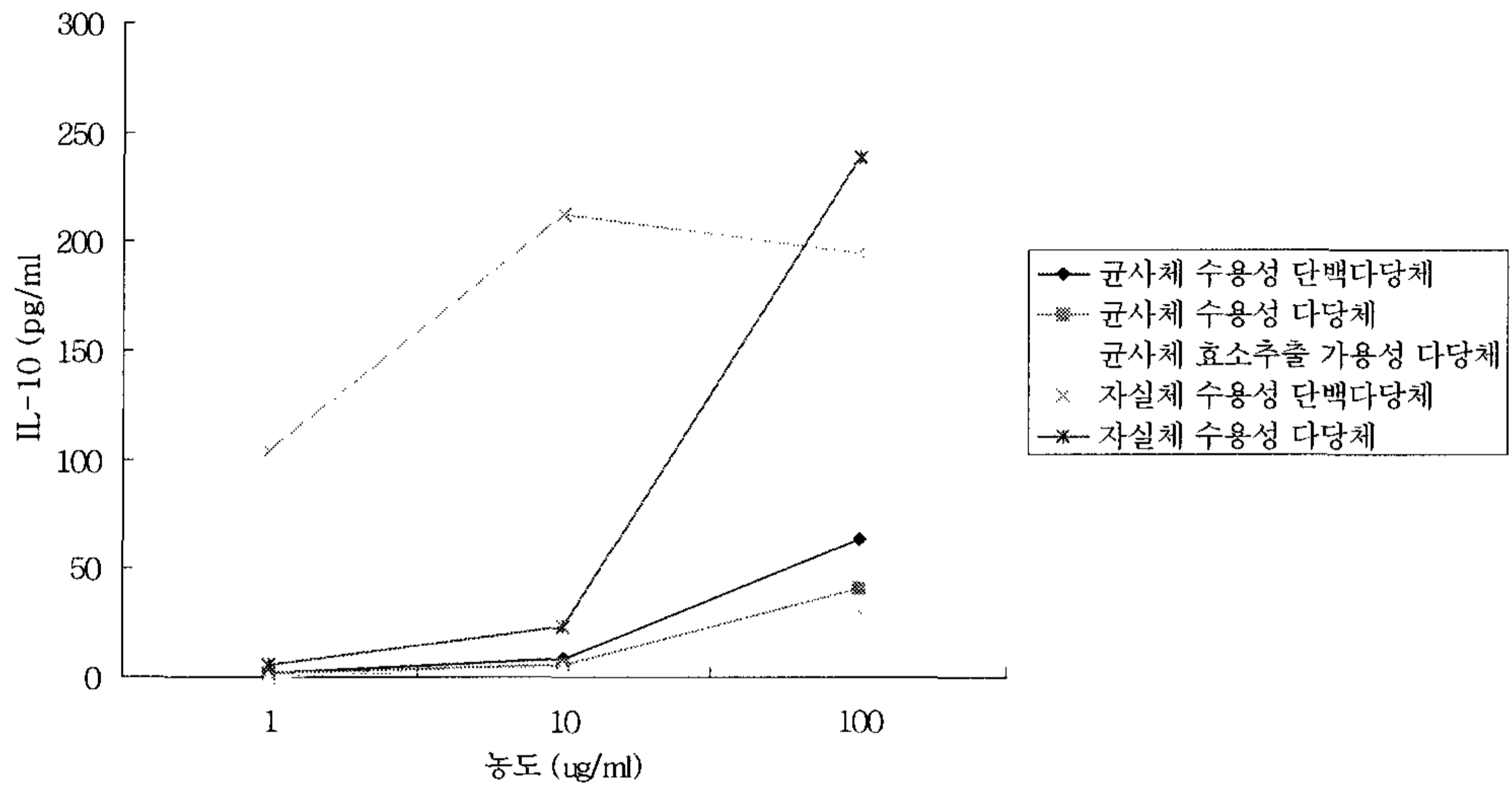


Fig. 14. IL-10 발현에 미치는 잔나비결상버섯 추출물의 농도 효과

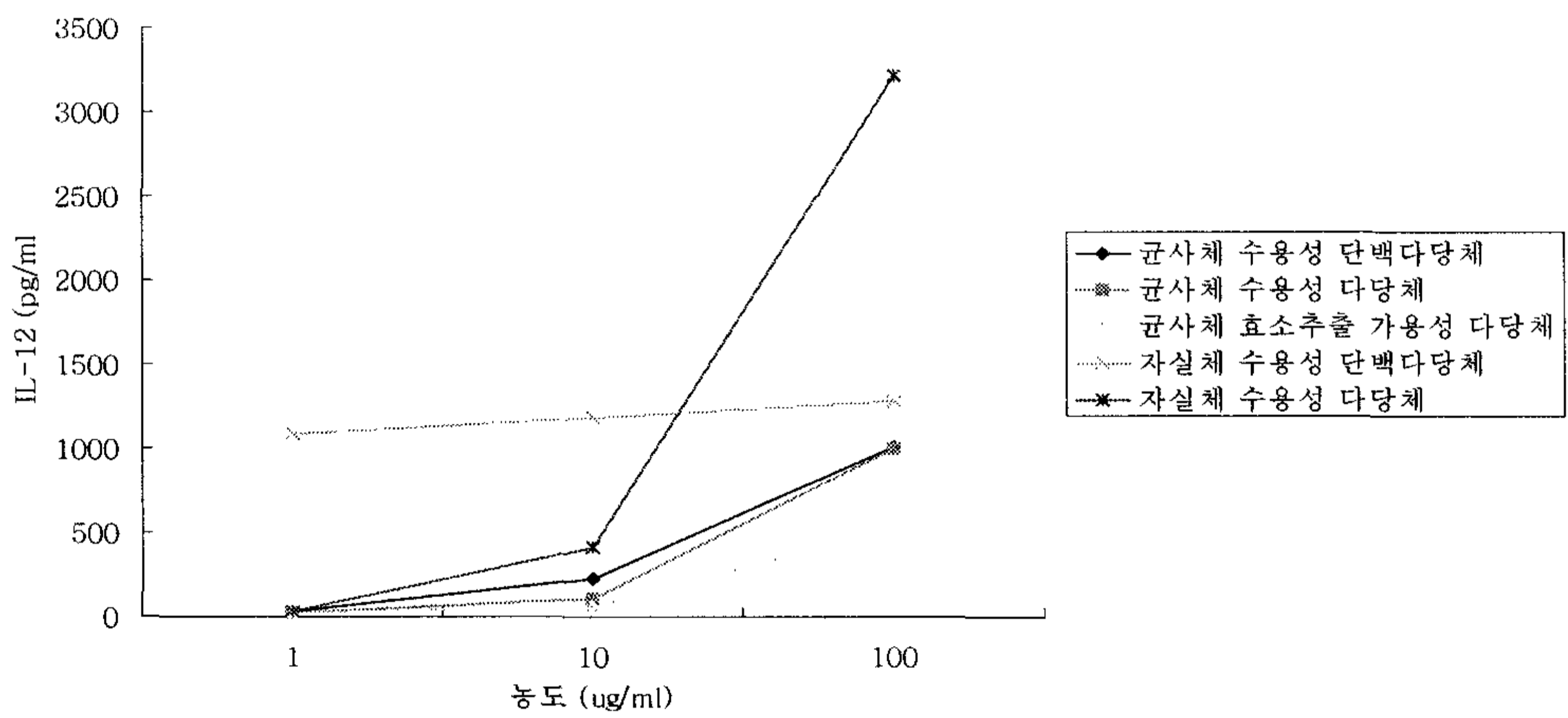


Fig. 15. IL-12 발현에 미치는 잔나비결상버섯 추출물의 농도 효과

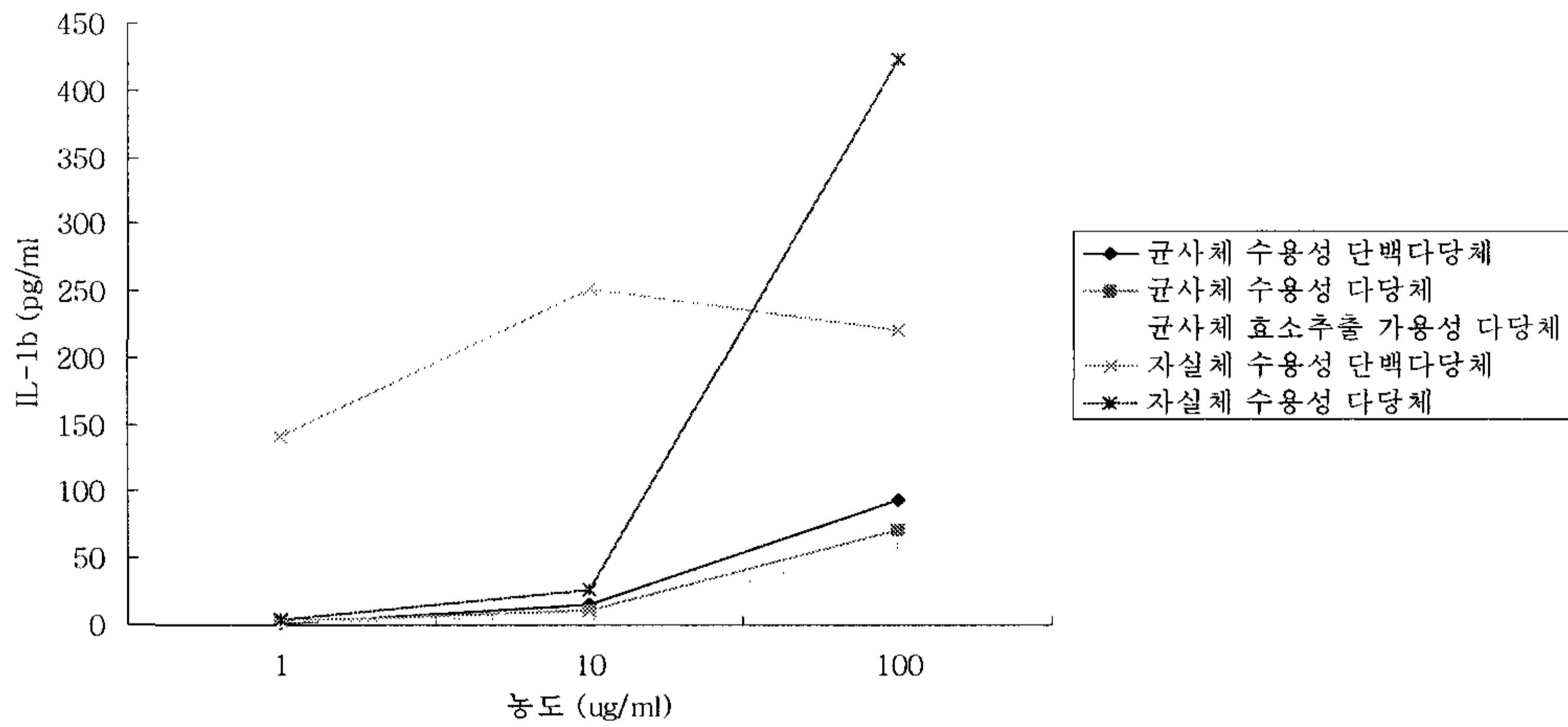


Fig. 16. IL-1 $\beta$  발현에 미치는 잔나비결상버섯 추출물의 농도 효과

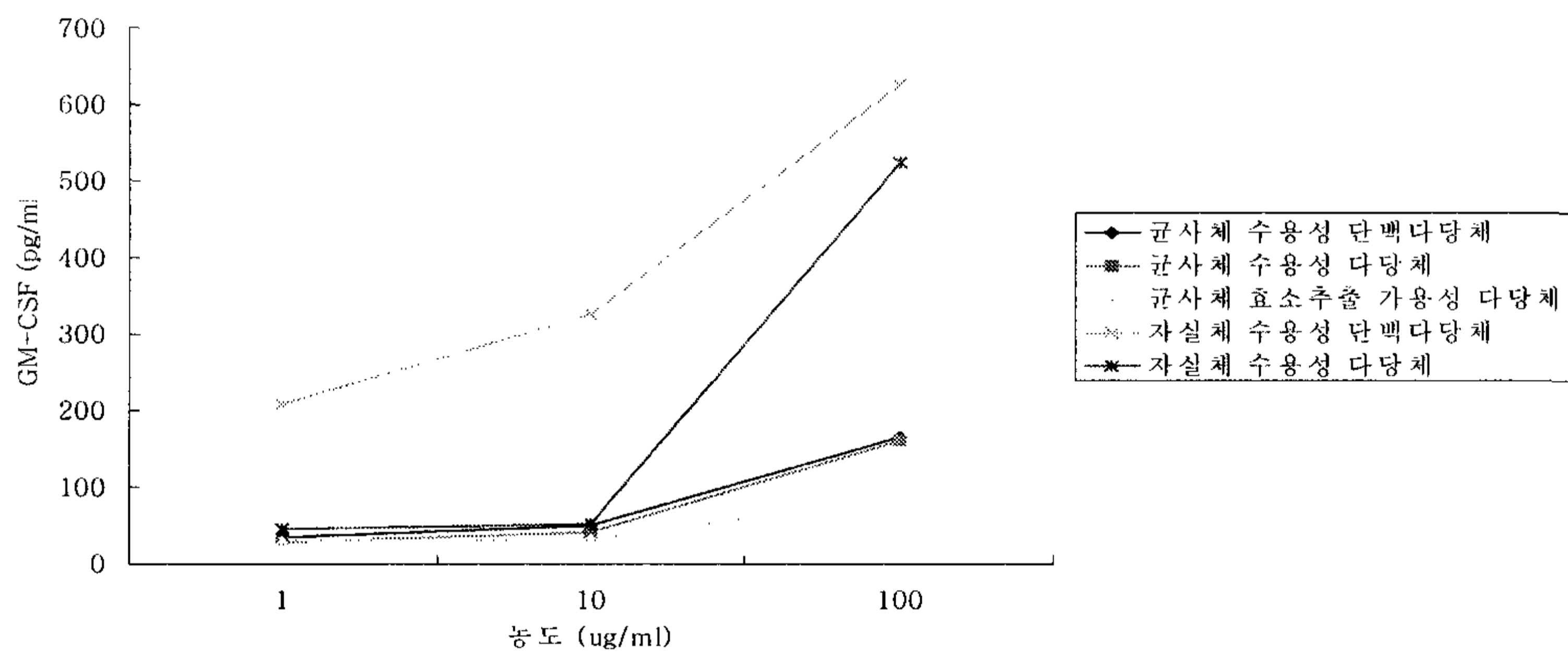


Fig. 17. GM-CSF의 발현에 미치는 잔나비결상버섯 추출물의 농도 효과

- 잔나비결상버섯 추출물의 경우 자실체 수용성 단백다당체를 제외한 모든 시료에 있어서 dose-dependent한 효과를 볼 수 있었다. Pro-inflammatory cytokine인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12의 발현을 촉진시키는 활성을 모두에게서 볼 수 있었으며 조절작용을 나타내는 cytokine인 GM-CSF의 발현도 증가하였다. 더욱이 IL-10의 발현도 모든 시료에서 나타났는데 anti-inflammatory cytokine의 역할을 하는 IL-10의 발현은 신체에서 생길 수 있는 과도한 면역반응을 억제시킬 수 있다는 점에서 추출물 자체가 면역증진의 효과에 있어서 안정적인 면역활성

이 나타날 수 있게 한다는 점에서 중요한 의미를 갖는다.

- 활성이 가장 강한 것은 자실체의 추출물이었다. 그러나 자실체 수용성 단백다당체는 IL-10과 IL-1 $\beta$ 의 발현에 있어서 dose-dependent한 효과를 보여주지 못했다. GM-CSF를 제외한 모든 cytokine에 있어서 자실체 수용성 단백다당체는 자실체 수용성 다당체보다 1과 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 그 활성이 강하게 나타나다가 100  $\mu\text{g/ml}$ 이 되면 자실체 수용성 다당체보다도 그 활성이 낮게 나타나는 특이성을 나타냈다. 균사체 수용성 단백다당체가 균사체의 시료중에서는 모든 cytokine의 발현에 있어서 가장 강력한 효과를 보여주고 있었다. 다음으로 균사체 수용성 다당체 시료였으며 균사체 효소추출 가용성 다당체가 가장 낮은 활성을 나타냈다.
- 위에서 제시한 cytokine외에도 allergy 반응을 유발하는 cytokine인 IL-4, IL-13의 발현 활성도 살펴보았으나 모든 시료에 있어서 이들 cytokine의 발현을 유도시키지 못했다. 이 결과는 잔나비결상버섯 추출물이 유해한 cytokine의 발현에는 영향을 주지 않는다는 점에서 중요한 의미를 갖는다고 할 수 있다. 또한 pro-inflammatory cytokine의 한 종류로서 Th1 T cell을 활성화 시키는 IFN- $\gamma$ 에 대해서도 발현의 유무를 살펴보았으나 이 cytokine 또한 발현되지 않았다. 이것은 잔나비결상버섯의 추출물이 임의의 cytokine을 분비하게 하는 것이 아닌 특이적인 cytokine만을 분비하게 한다는 점에서 주목할 필요가 있다.

(4) 잔나비결상버섯 추출물이 transcription factor에 미치는 영향.

- 잔나비결상버섯 추출물이 세포에 활성을 주는 영향을 알아보기 위하여 4가지 transcription factor의 활성을 측정하였다. 각기 293T 세포 및 RAW264.7세포에 NF- $\kappa\text{B}$ 를 비롯한 AP-1, CRE, ISRE promoter 뒤에 luciferase 유전자가 삽입된 플라스미드를 transfection 시킨 뒤 잔나비결상버섯 균사체의 수용성 단백다당체를 처리하고 luciferase의 발현정도를 측정하였다.

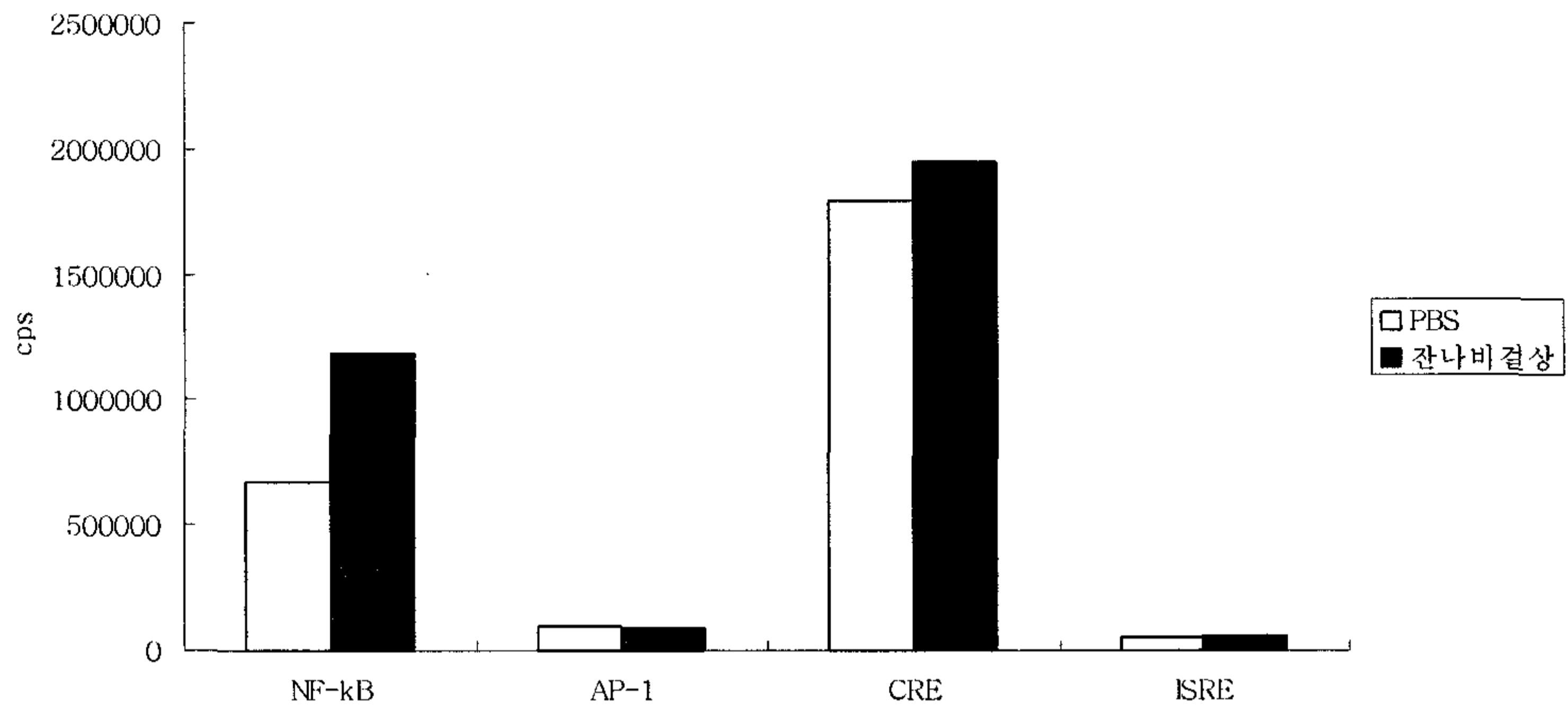


Fig. 18. 293T세포에서 잔나비결상버섯 추출물이 transcription factor에 미치는 영향

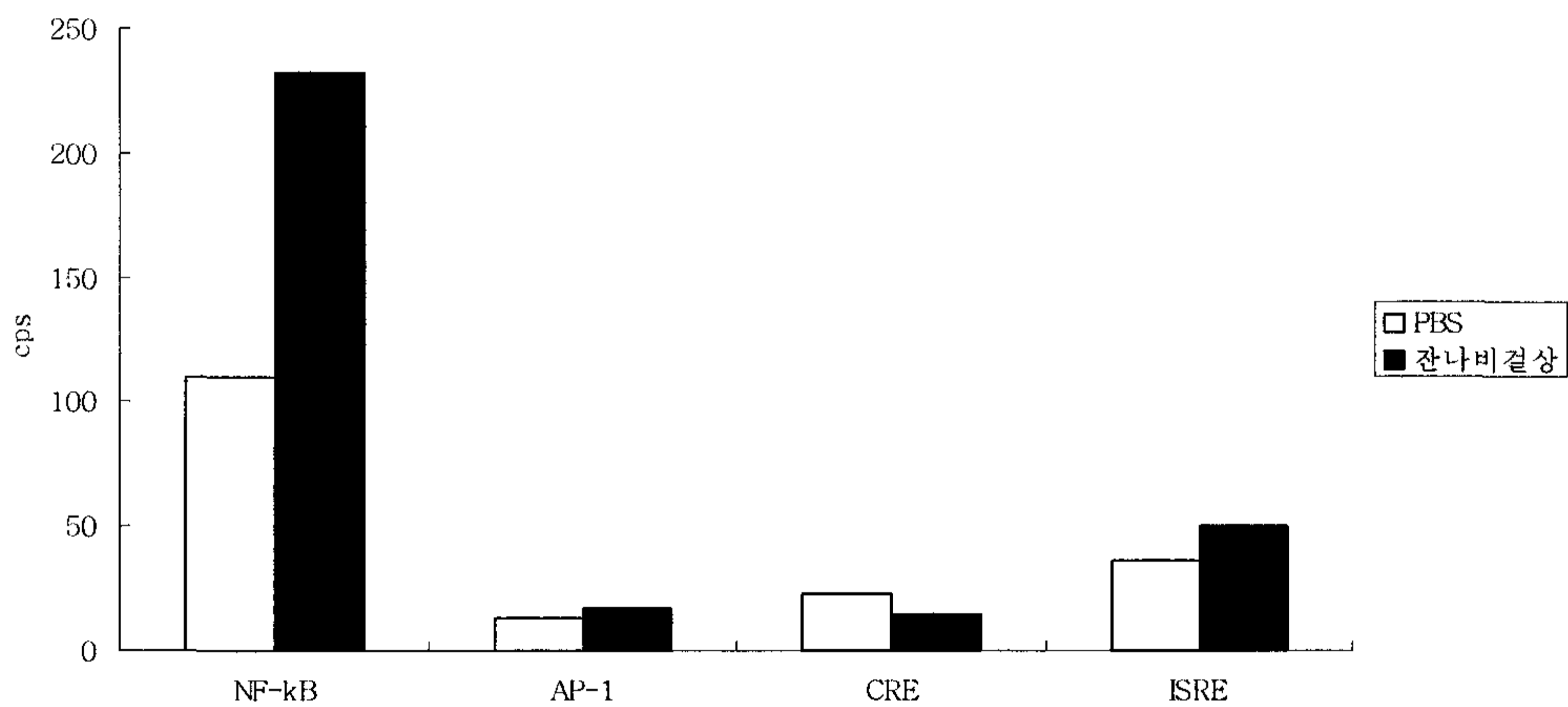


Fig. 19. Raw264.7 세포에서 잔나비결상버섯 추출물이 transcription factor에 미치는 영향

- 잔나비결상버섯 추출물의 경우 AP-1, CRE, ISRE에 대해서는 활성을 보이지 않은 반면 293T 및 RAW264.7 세포 모두에서 NF-κB의 활성을 약 2배정도 증가시켰다. 면역세포의 활성화에 있어서 가장 중요한 transcription factor인 NF-κB의 활성증가는 잔나비결상버섯 추출물이 면역세포의 활성을 증가시킬 수 있음을 의미한다.

#### 4) 기능성식품으로서의 개발을 위한 안전성 평가

##### 가) 정상 생쥐를 통한 반복독성시험

###### (1) 폐사율

- 시험기간 중 시험물질 투여에 기인하여 폐사한 동물은 관찰되지 않았다.

###### (2) 임상증상

- 모든 시험군에서 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다.

###### (3) 혈액학적 검사

- 각 그룹간의 유의적인 변화는 보이지 않았다.

###### (4) 혈액생화학적 검사

- BUN검사 결과 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다.

###### (5) 부검소견

- 부검 시 PG101 투여군 한 마리에서 폐에 농이 차 있는 것을 확인하였으며, 대조군 실험동물 한 마리에서 신장에 부종이 발생한 것을 확인할 수 있었다.

###### (6) 장기중량

- 절대 중량에서 간의 중량이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으나, 상대 중량에서는 모든 검사에서 유의적인 변화는 보이지 않았다.

###### (7) 체중변화

- 대조군에 비해 시간이 갈수록 HX 101 투여군의 체중이 유의적으로 감소 하였다.

###### (8) 고찰

- PG101의 독성양상을 알아보기 위하여 마우스에 대한 3주간 경구 반복투여 독성시험을 실시하였다. 시험결과, 시험기간 중 폐사한 동물은 없었으며 각 주마다 유의적인 체중 변화를 보였다. 시험 물질 투여에 의한 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다. 시험결과, 시험기간 중 폐사한 동물은 없었으며 각 주마다 유의적인 체중 변화를 보였으나 PG101의 농도가 짙고, 불림이 많아서 사료섭취에 영향을 미치는 것으로 사료되어지나 독성 작용으로 의심되지는 않았다. 혈청화학검



사에서는 PG101투여군에서 BUN 항목이 유의적으로 증가하였으나 정상치에 가까웠다. 장기들의 절대 중량에서 간의 중량이 유의적으로 감소하였으나 상대 장기 중량에는 아무런 유의적인 변화를 보이지 않았으며, 다른 검사 항목에서 유의적인 변화는 보이지 않았다. 부검 시 PG101 투여군에서 폐렴의 소견을 나타낸 개체가 있었으나 경구 투여 시 기도 내 이물이 들어간 것으로 판단되어지며, 대조군의 신장부종은 개체적인 차이 때문에 발병한 것으로 보여진다. 이외 다른 장기 육안소견에서는 병변이 보이지 않았으며 혈액 검사에서도 특이적인 변화는 보이지 않았다. 5g/kg로 3주간 투여하였을 때 특이적인 독성작용은 보이지 않은 것으로 사료되어지나 투여 농도 길고, 투여 부량이 높아 실험동물들의 정상적인 식이 섭취에 영향을 미치는 것으로 판단되어진다.

Table 3. 혈액학적 분석 결과

	Contorl	PG101
WBC (K/ $\mu$ l)	5.48±0.46	6.88±1.92
Neutrophil (%)	27.112±2.95	27.12±2.95
Lymphocyte (%)	68.5±1.64	64.13±2.63
Monocyte (%)	7.16±1.44	5.95±0.78
Eosinophil (%)	2.82±0.37	2.2±0.39
Basophil (%)	0.72±0.14	0.6±0.1
RBC (M/ $\mu$ l)	8.82±1.4	10.06±0.17
Hemoglobin (g/dL)	13.38±1.47	14.6±0.19
HCT(%)	47.43±7.75	52.53±0.69
Platelet (K/ $\mu$ l)	603±135.97	741.75±160.9

Table 4. 각 장기의 절대중량

	Contorl	PG101
Spleen (mg)	153.98±42.68	154.94±70.97
Kidney (mg)	355.1±26.79	325.62±69.28
Liver (mg)	1339.7±50.89	1055.4±52.23*
Thymus (mg)	50.78±2.86	58.32±4.28
Heart (mg)	127.52±4.4	116.9±9.81
Lung (mg)	148.98±6.49	195.92±66.08

Table 5. 각 장기의 상대중량

	Contorl	PG101
Spleen (%)	0.70±0.19	0.79±0.37
Kidney (%)	1.63±0.1	1.63±0.31
Liver (%)	6.16±0.14	5.37±0.32
Thymus (%)	0.23±0.01	0.23±0.06
Heart (%)	0.58±0.02	0.59±0.05
Lung (%)	0.68±0.02	1±0.35

### 3. 제 2 협동과제 (강원대학교)

#### 가. 서론

- 버섯은 예전부터 특유한 맛과 향기 때문에 전세계적으로 많이 애용되었던 자연음식 중 하나이다. 현대에 와서 버섯에 비타민, 각종 무기염류, 양질의 단백질이 다량으로 함유되어 있을 뿐만 아니라 약리효과가 과학적으로 구명되면서 건강식품으로 인기를 끌고 있다. 새로운 버섯자원에 대한 연구는 우리나라 뿐만 아니라 외국에서도 활발하게 진행되고 있다. 우리나라에서는 표고, 느타리, 영지, 팽이, 양송이 등 몇 종류의 버섯이 인공 재배되고 있을 뿐 그 종류가 다양하지 않아 새로운 버섯의 개발과 재배법이 필요한 실정이다.
- 우리나라에서 버섯에 관한 최초의 기록은 신라 선덕여왕 3년(서기704년)에 저술된 김부식의 삼국사기로 이에 기술된 바에 의하면, 버섯을 금지(金芝 : 木菌)

라 하여 목재 부후균에 속하는 자실체를 형성하는 버섯과 서지(瑞芝 : 地下菌)라는 현재의 붕령 처럼 땅속에서 번식되는 것으로 두 가지 부류로 나누어 언급한 것으로 보아 버섯을 일찍부터 우리 민간 생활과 친밀하게 인식 되어왔음을 알 수 있다 (강, 1999).

жат버섯 [*Lentinus lepideus* (Fr. ex Fr.)Fr]은 느타리과 жат버섯속에 속하는 목재 부후균으로 소나무와 같은 침엽수 고사목에 서식하는 버섯이다. 형태적 특징은 발생초기에 공모양의 형태이나 후에 표고처럼 갓이 펼쳐지고 중앙이 움푹한 접시모양으로 갓의 직경은 약 4~12cm에 이른다. 백색에서 담황색 또는 옅은 황토색을 띠고, 갈색의 잔잔한 균열이 보인다. 주름은 조밀한 편이며 백색이고 폭이 넓으며 두껍고, 자루에 홈이 파져 붙거나 내려 붙으며 주름 끝이 길게 자루에 붙어있다.

жат버섯에 대한 연구는 일본과 우리나라에서 일부 이루어져 있으나 아직 인공 재배의 실용화단계에는 미치지 못하고 있다. 박 등(1988)이 최초로 жат버섯의 생리적 특성과 원목재배법에 대하여 보고하였는데, 배양기간이 길고 생산성이 낮기 때문에 톱밥을 이용한 재배법 개발이 요구되었다. 김과 고(1995)는 톱밥 배지에서 생산되는 버섯의 양이 1kg 배지 당 평균 80-90g 정도라고 보고하여 표고버섯의 350g에 비교할 때, 생산성이 낮다고 보고하였다. 따라서 적은 비용으로 종균 배양 기간과 버섯 생산 기간을 크게 단축시킬 수 있고 균일한 품질의 종균을 대량생산할 수 있는 액체 종균을 이용한 재배법이 요구되고 있고 강(1995)과 홍 등(1986)은 버섯 균사체의 액체배양은 앞으로 그 수요와 공급이 계속 증가할 것으로 예상되며, 버섯 종류에 따른 배지조성 및 배양조건의 최적화와 효율적인 배양장치의 고안 등이 해결해야 할 과제로 남아 있는 실정이다. 또한 장(2003)은 대부분의 식용버섯균이 백색부후균인 것과는 달리 жат버섯은 갈색부후균으로 알려져 있지만 목재부후의 미시형태적 특징을 조사한 결과, 백색부후균의 부후 특징인 세포벽의 침식과 박벽화 등을 관찰하였다.

한편, 진(1999)의 연구결과에 의하면 жат버섯은 표고와 함께 항암성분인 lentinan과 lepidan을 함유하고 있어 항종양, 항바이러스, 면역증강 또는 조혈, 혈압강하 등의 효과가 있다고 하였다.

이러한 жат버섯 추출물의 약리적 효과가 규명되면서 건강에 대한 관심이 증가하고 있는 요즘, 적은 섭취량으로 충분한 영양공급과 약리효과를 겸비한 건강식품인 жат버섯의 인공재배는 충분한 경쟁력을 가지며, 대량재배기술 개발은 버섯농가의 소득증대에 크게 이바지할 것으로 기대된다.

따라서 이 연구는 다양한 지역으로부터 채집된 жат버섯 균주의 생리적 특성을 규명하고 침엽수톱밥을 이용한 인공재배 시 이들 간의 버섯생산량 비교를 통한 жат버섯 우량균주의 확보와 균주들 간의 RAPD에 의한 유전적 유연관계의 분석

을 통하여 기초 자료를 확보하고 액체종균 배양기술개발과 액체종균을 이용한 잣버섯 인공재배를 통해 대량재배 기술을 개발하기 위한 목적으로 실시하였다.

#### 나. 실험방법

##### 1) 잣버섯 균주자원 확보 및 우량품종 육성

###### 가) 잣버섯 균주자원 확보

- 잣버섯 균주는 국립산림과학원, 강원도 농업기술원, 인천대학교 야생버섯 균주은행과 농업과학원 농용미생물보존센터(KACC)에서 분양받은 균주와 강원대학교 연습림에서 채집한 잣버섯 자실체의 조직에서 순수분리하여 배양한 균주를 포함하여 총 12가지의 잣버섯 균주를 확보하였다 (Table 1).

Table 1. *Lentinus lepideus* isolates collected and used in the experiment

No.	TPML	Origin	Location
1	99161	Kangwon Agric. Res. & Ext. Service	
2	02050	Korea Forest Research Institute (FRI 513)	Hwajinpo Kangwon Korea
3	02052	Inchon Univ. (IUM 00119)	Gimpo Gyeonggi Korea
4	02053	Incheon Univ. (IUM 00321)	Seoul Korea
5	02054	Incheon Univ. (IUM 00344)	Songnisan Chungbuk Korea
6	20641	Korea Forest Research Institute (FRI 20641)	Japan
7	03050	Research Forests of Kangwon Univ.	Hongcheon Kangwon Korea
8	03051	Research Forests of Kangwon Univ.	Hongcheon Kangwon Korea
9	03052	Korea Agric. Culture Collection (KACC 50120)	Chiaksan Kangwon Korea
10	03054	Incheon Univ. (IUM 00425)	Guri Gyeonggi Korea
11	03100	Incheon Univ. (IUM 00752)	Gimpo Gyeonggi Korea
12	04100	Research Forests of Kangwon Univ	Hongcheon Kangwon Korea

TPML: Tree Pathology and Mycology Laboratory, Kangwon National University

IUM : Wild Mushroom Culture Collection, Incheon University

FRI : Korea Forest Research Institute

KACC : Korea Agricultural Culture Collection, RDA

###### 나) 잣버섯 균주의 특성 규명

- 본 실험에 공시한 잣버섯 균주는 Table 1에 나열된 바와 같이 국립산림과학원, 강원도 농업기술원, 인천대학교 야생버섯 균주은행, 농업과학원 농용미생물보존

센터에서 분양받은 균주와 강원대학교 연습림에서 채집한 잣버섯 자실체의 조직에서 순수분리하여 배양한 균주를 포함하여 총 12가지 균주를 사용하였다. 균주의 보관은 동결보호제(10% glycerol 용액)가 담긴 cryotube에 넣어 액화질소탱크에 보관하였으며, 사용 직전에 꺼내어 PDA(Potato Dextrose Agar) 배지에 치상하고 30℃ 암상태 배양기에서 10일간 배양하여 사용하였다.

(1) 균주별 균사 성장

- 잣버섯 균주간의 균사성장 정도를 확인하기 위하여 PDA 배지에서 10일 동안 배양한 잣버섯 99161, 02050, 02052, 02053, 02054, 20641, 03050, 03051, 03052 균주 (Table 1)의 균사 끝부분을 cork borer(6mm)로 절취한 후 Petri dish의 중앙에 접종하고 5반복으로 하여 30℃ 암상태의 배양기에서 5일간 배양한 후 균사 성장량을 측정하였다.

(2) 배지별 균사 성장

- 잣버섯의 균사생육에 적합한 배지를 선발하기 위하여 고체 배지의 경우, Table 2의 배지 조성을 갖는 Czapek-Dox, Lilly, PDA(Potato Dextrose Agar), MEA(Malt Extract Agar), GPA(Glucose Peptone Agar), MCM(Mushroom Complete Media) YMA(Yeast Malt Agar) 합성배지를 고압살균하여 Petri dish에 분주하여 굳힌 후 PDA배지에서 10일간 배양한 99161, 03050 균주의 균사 끝부분을 cork borer(6mm)로 절취하여 Petri dish의 중앙에 접종하고 균주별, 배지별로 3반복으로 하여 30℃ 암상태의 배양기에서 7일간 배양한 후 균사의 성장량(radial mycelial growth)을 측정하였다.

Table 2. Chemical composition of the culture media used in this experiment  
 PDA: Potato Dextrose agar, MEA: Malt extract agar, GPA: Glucose Peptone agar, MCM: Mushroom Complete Media, YMA: Yeast Malt Agar.

Nutritional reagents	Medium and composition (g/d.w. 1 ℓ)						
	PDA	MEA	GPA	Czapek-Dox	Lilly	MCM	YMA
PDA (Difco)	39						
Malt extract		20	15				3
Yeast extract			10			2	3
Peptone		1	10			2	5
Glucose			10			20	
Sucrose				30			
Dextrose		20					10
Maltose					10		
Asparagine					2		
NaNO <sub>3</sub>				3			
KCl				0.5			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>					1	0.5	
MgSO <sub>4</sub>					0.5		
FeSO <sub>4</sub>				0.01			
MgSO <sub>4</sub>				0.5		0.5	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>				1		1	
CaCl <sub>2</sub>							
Agar		15	15	15	15	15	15

- 액체배지의 경우, Table 2의 배지 조성에서 agar성분을 제외하고 배지 멸균 후 160ml Easy flask (Nunc)에 50ml씩 배지별로 분주한 후 무균상 안에서 식히고 PDA배지에서 10일동안 배양한 99161, 03050균주의 균사 끝부분을 cork borer(6mm)를 이용하여 고체 배지와 잣버섯 균사를 같이 떼어 내어 5개의 조각을 액체배지에 접종하였다. 균주별, 배지별 배양법에 따라 3반복으로 하여 30℃, 암상태로 용기를 눕혀서 항온기에서 정치배양하였다. 10일간 배양한 후 균사체를 270 mesh 채에 거르고 증류수로 수세하여 생중량을 측정하고, dry oven에서 48℃, 48시간 동안 건조시킨 후 건중량을 측정하였다.

### (3) 온도별 균사 생장

- 잣버섯의 균사생장의 적정온도를 조사하기 위하여 PDA (Potato Dextrose

Agar) 배지를 기본배지로 하여 균주별 접종원(99161, 02052, 20641, 03050)의 균사 끝부분을 배지 중앙에 접종한 후 온도를 각각 20, 25, 30, 35℃ 범위로 조절된 항온기에서 7일간 배양하면서 균사의 성장량을 측정하였다.

(4) pH별 균사 성장

- 잣버섯의 균사배양에 적합한 산도범위(pH)를 조사하기 위하여 10% HCl과 KOH 용액으로 pH를 각각 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5로 조절한 PDA (Potato Dextrose Agar)배지에 각 균주별 접종원(99161, 02052, 20641, 03050)의 균사 끝부분을 cork borer(6mm)로 절취하여 배지 중앙에 접종한 후 30℃의 항온기에서 7일간 배양한 후 균사 성장량을 측정하였다.

(5) 탄소원별 균사 성장

- 잣버섯의 균사생장에 적합한 탄소원을 선별하기 위하여 합성배지인 Czapek-Dox (Table 2) 배지를 기본배지로 하여 glucose, sucrose, fructose, starch, xylose 5종의 탄소원 농도를 기본배지의 탄소원과 동일한 량이 되도록 배지를 제조하였으며 처리당 3반복으로 실시하였다. 각 균주별 접종원(99161, 02052, 20641, 03050)의 균사 끝부분을 cork borer(6mm)로 절취하여 배지 중앙에 접종하고 30℃의 항온기에서 7일간 배양하면서 균사 성장량과 밀도를 조사하였다.

(6) 질소원별 균사 성장

- 기본배지는 탄소원 선별실험과 동일하게 실시하였으며 질소원으로 Sodium nitrate, Ammonium sulfate, Asparagine, Peptone 등 4가지 질소원을 비교하였고, 나머지 과정은 탄소원 실험과 동일하게 실시하였다.

(7) 목초액 농도별 균사 성장

- 목초액이 잣버섯 균사생장에 미치는 영향을 알아보기 위해 PDA배지를 멸균하여 식히고(약 60℃), 멸균필터(pore size: 0.2 $\mu$ m)를 통과시킨 참나무 목초액을 농도별로 첨가하여 petri-dish에 부어 균힌 후에 PDA에 배양한 접종원(TPML99161)의 균총 끝부분을 cork borer(6mm)로 절취하여 목초액 첨가배지의 중앙에 접종하고 30℃ 암상태의 항온배양기에서 7일간 배양한 후 균사 성장량을 측정하였다.

(8) 잣버섯 균주의 RAPD에 의한 유전적 유연관계 분석

(가) Genomic DNA 분리

- 각 균주들은 Petri dish에 분주하여 고화시킨 PDA배지 위에 멸균된 셀로판지를 올린 후 PDA 평판배지에서 10일간 배양된 균총의 끝부분을 cork borer (6mm)로 절취하여 셀로판지 위에 접종하고 30°C 항온배양기에서 8-12일간 배양한 후 수확한 균사체를 동결 건조하여 DNA 분리를 위한 공시 재료로 사용하였다. DNA 추출 방법은 Lee 등(1988)의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 건조한 균사체는 액체질소를 이용하여 마쇄한 후 0.5ml의 Lysis buffer [50mM EDTA(pH8.0), 3% SDS, 50mM Tris-HCl (pH7.2), 1% mercaptoethanol]에 넣고 65°C에서 1시간동안 반응시킨 후 phenol : chloroform : isoamylalcohol (25:24:1)을 0.5ml 첨가 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 0.4ml의 상층액을 새로운 튜브에 옮겨담고 phenol : chloroform : isoamylalcohol (25:24:1)용액을 1 volume 첨가한 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 얻은 상층액 0.3ml에 3M sodium acetate (pH8.0) 30 $\mu$ l와 isopropanol 750 $\mu$ l를 첨가한 후 1,3000rpm으로 10분간 원심분리한 후 얻은 펠렛에 0.1ml TE buffer를 첨가 후 65°C에서 20분간 반응시킨 후 3M sodium acetate (pH8.0) 10 $\mu$ l와 100% EtOH(-20°C) 250 $\mu$ l를 첨가하여 침전시킨 후 13,000 rpm으로 원심분리 후 얻어진 펠렛을 70% EtOH(-20°C) 0.2ml로 세척한 후 0.1ml TE buffer에 펠렛을 녹인 후 1 $\mu$ l RNase A solution(Promega Co.)을 넣어 65°C에서 30분간 반응시켜 RNA를 제거한 후 -20°C에 보관하면서 각 실험에 필요한 template DNA로 사용하였다.

(나) 실험에 사용한 Primer

- Genomic DNA의 RAPD 분석에 사용된 random primer는 Operon사의 10-mer random primer를 사용하였으며 code name과 sequence는 Table 3과 같다.

Table 3. Code name and sequence of the primers used in this experiment

No	Code name	Sequence(5' to 3')
1	OPB-01	GTTTGGCTCC
2	OPB-03	CATCCCCCTG
3	OPB-05	TGCGCCCTTC
4	OPB-14	TCCGCTCTGG
5	OPB-15	GGAGGGTGTT
6	OPC-04	CCGCATCTAC



#### (다) PCR 조건

- PCR을 위한 reaction mixture의 조성은 template DNA 2 $\mu$ l, Random primer 2  $\mu$ l(5pM), Taq polymerase (Promega Co.) 2.5 unit, 25mM MgCl<sub>2</sub> 2.5 $\mu$ l, 10 $\times$ Taq buffer 2.5 $\mu$ l, 10mM dNTP 1 $\mu$ l를 넣어 총 반응 용액을 25 $\mu$ l가 되게 하였다. PCR에 사용한 thermal cycler는 GeneAMP<sup>®</sup> PCR System 2700(Applied Biosystems Co.)을 사용하였고, PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 pre-heating시킨 다음, 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 40 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension을 1 cycle로 하여, 총 43 cycle을 돌린 후 72 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 post extension 후 4 $^{\circ}$ C로 유지하였다. PCR 증폭산물의 분석은 Mupid 21(Cosmo Bio Co.)을 사용하여 ethidium bromide(0.05 $\mu$ l/ml)를 첨가한 1.2% agarose gel(TBE buffer)에서 50V 30~60분간 전기영동을 실시하였으며 1kb DNA ladder (Promega Co.)를 marker로 사용하였다. 전기영동 후 Gel Documentation System(Bio-Rad)의 UV transilluminator 상에서 밴드를 관찰하였다. Dendrogram은 균주간 유사도를 근거로 UPGMA(Unweighted Paired Group Methods with Arithmetic average)법을 이용한 군(cluster)분석을 통해 phylogenetic tree를 작성하여 분리 균주 간의 유연관계를 분석하였다.

#### 다) 잣버섯 균주의 버섯생산량 비교

##### (1) 균주별 발생량 조사

- 잣버섯 균주(99161, 02050, 20641, 02052, 02053, 02054, 03050, 03051, 03052, 03053, 03054)의 자실체 생산량을 측정하기 위하여 잣나무 톱밥을 24시간 침수시켜 수분 함량을 65%로 조절한 후 1.2 $l$  종균병당 무게를 600g으로 조절하여 각 균주별 5반복으로 하여 고압증기 멸균한 후, 균주별로 종균병 1병당 PDA배지에서 10일간 배양한 접종원을 1/2 plate씩 접종하였다. 접종 후 30 $^{\circ}$ C 암상태의 배양기에서 50일간 배양 후 항온항습실에서 24시간 광을 주고 온도 30 $^{\circ}$ C 습도 95% 이상을 유지하며 CO<sub>2</sub> 농도 1,000ppm 이하로 유지하였으며 온도는 재배사내 열선과 라디에이터로 조절하였고, 습도는 버섯재배용 가습기(중앙가습기 JA-600)로 조절하였으며, CO<sub>2</sub>농도는 HEPA 필터가 장착된 공기흡입 장치를 통해 외부의 신선한 공기를 재배사내로 공급하였으며 가스배출기를 통해 재배사 내부의 공기를 배출하며 발생을 유도하였다. 자실체는 갓이 2/3 정도 피었을 때 수확하였다. 11일간 수확한 잣버섯의 톱밥배지 1병당 평균 자실체 생중량과 건중량을 조사하였다.

(2) 톱밥 병재배시 톱밥크기와 종균의 종류, 배지 첨가물이 생산량에 미치는 영향

(가) 톱밥 크기에 따른 생산량 조사

- 잣버섯 대량 재배시 톱밥의 크기가 생산량에 미치는 영향을 알아보기 위해 4mm채로 거른 가는 톱밥과 걸러지지 않은 굵은 톱밥을 사용하여 톱밥배지 제조 후, 처리별 5반복으로 하여 균주별로 종균병 1병당 PDA배지에서 10일간 배양한 접종원(99161)을 1/2 plate씩 접종하였다. 접종 후 30℃ 암상태의 배양기에서 50일간 배양 후 버섯 재배사에서 24시간 광을 주고 온도 30℃ 습도 95% 이상을 유지하며 CO<sub>2</sub> 농도 1000ppm 이하로 유지하였다. 자실체는 갓이 2/3 정도 피었을 때 수확하였다. 30일간 수확한 잣버섯의 톱밥배지 1병당 평균 자실체 생중량을 조사하였다.

(다) 종균 종류에 따른 생산량 조사

- 잣버섯 대량 재배시 종균의 종류가 생산량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 톱밥배지 제조 후 5반복으로 하여 종균병 1병당 PDA배지에서 10일간 배양한 고체 접종원(99161)을 1/2 plate씩 접종하였고, PDB배지에서 50일간 배양한 액체 접종원(99161)을 종균병 1병당 10ml씩 접종 후 30℃ 암상태의 배양기에서 50일간 배양하고 버섯 재배사로 옮겨 24시간 광을 조사하면서 온도 30℃, 습도 95% 이상을 유지하며 CO<sub>2</sub> 농도는 1,000ppm 이하로 유지하였다. 자실체는 갓이 2/3 정도 피었을 때 수확하였다. 30일간 수확한 잣버섯의 톱밥배지 1병당 평균 자실체 생중량을 조사하였다.

라) 선발육종 및 교잡육종에 의한 잣버섯 균주 육성

(1) 균주별 clamp connection 검경

- PDA배지에서 자란 2차 균사를 절취하여 광학현미경을 이용하여 균주별로 clamp connection 형성 유무를 검경하였다.

(2) 균주별 단포자 분리

- 균주별 자실체 수확 후 갓을 절취하여 멸균된 페트리디쉬 뚜껑에 바셀린으로 부착 후 24시간동안 포자를 자유낙하시켰다. 포자 수확후 멸균수로 희석하여 물한천배지(WA)에서 배양하면서 실체현미경으로 발아한 포자를 검경하여 새로운 배지(PDA)에 이식한 후 30℃ 암상태 배양기에서 7일간 배양하고 광학현미경으로 균사체의 clamp connection 형성 유무를 확인하여 clamp connection

이 형성되지 않은 균주를 단포자 균주로 확보하였다.

### (3) 1핵 균사의 교배

- 단포자로부터 1핵 균사를 만들어 서로 다른 균주간의 교잡을 시도하였다. 두 균주의 균사를 PDA평판배지 상에서 대치배양하면 수일 후 균사가 융합하게 된다. 이 때 균사부위를 떼어내어 교잡의 성공여부를 현미경하에서 관찰하였다. 교잡된 균주가 모균주와 동일한 지 또는 독립적인지를 확인하기 위하여 모균주와 대치 배양하였다.

### 마) 잣버섯 원목재배

#### (1) 저온성 균주 선발

- 잣버섯 원목재배를 위한 저온성 균주 선발을 위하여 PDA 배지에서 10일 동안 배양한 잣버섯 99161, 02050, 02052, 02053, 02054, 20641, 03050, 03051, 03052, 03053, 03054, 03100 (Table 1) 균주의 균사 끝부분을 cork borer(6mm)로 절취한 후 페트리디시의 중앙에 접종하고 3반복으로 하여 20℃ 암상태의 배양기에서 7일간 배양한 후 균사 성장량을 측정하였다.

#### (2) 침엽수 수종별 잣버섯 생산량 조사

- 침엽수 수종별로 잣버섯 원목재배를 실시한 후 생산량을 측정하였다.

#### (가) 추출물 첨가배지별 균사생장량 비교

- PDB배지 제조시 알콜로 추출한 소나무, 잣나무, 신갈나무 추출액을 각각의 플라스크에 10% 농도로 배지를 제조하였다. 2N의 HCl과 NaOH를 사용하여 pH 5.5를 맞추어 autoclave에서 30분 동안 고압 멸균하였다. 액체배지를 식힌 후 PDA배지에서 10일 동안 배양한 접종원(TPML99161)의 균사 끝부분을 cork borer (6mm)를 이용하여 고체 배지와 잣버섯 균사를 같이 떼어 내어 5개의 조각을 액체배지에 접종한 후 30℃ 암상태 120rpm의 진탕배양기에서 15일간 배양한 후 균사체를 270 mesh 체에 거르고 증류수로 세척하여 48℃의 dry oven에서 48시간 동안 건조시킨 후 건중량을 측정하였다.

#### (나) 톱밥 혼합비율에 따른 자실체생산량 비교

- 잣나무, 소나무, 낙엽송 톱밥을 소나무:잣나무 2:8, 4:6, 소나무:낙엽송 2:8, 8:2, 잣나무:낙엽송 8:2, 6:4의 배합비로 만들었고 무게를 470±10g로 일정하게 하여 종균병에 넣은 후 autoclave에서 90분간 고압 멸균하여 무균상에서 완전히 식

했다. 접종원은 PDA배지에서 10일 동안 배양한 TPML99161 균주를 사용하였고 접종량은 petri dish에서 균사와 배지를 1/2를 떼어내어 접종한 후 30℃ 암상태에서 50일 동안 배양한 후 24시간 산광을 주고 온도 30±2℃, 상대습도 95% 이상을 유지하며 CO<sub>2</sub> 농도 1000±200ppm 이하로 유지하여 버섯 발생을 유도하였다. 온도는 재배사내 열선과 라디에이터로 조절하였고, 습도는 버섯재배용 가습기(중앙가습기 JA-600)로 조절하였으며, CO<sub>2</sub>농도는 HEPA 필터가 장착된 공기 흡입 장치를 통해 외부의 신선한 공기를 공급하였다. 자실체는 갓이 2/3 정도 피었을 때 수확하였고 수확한 자실체의 톱밥배지 1병당 자실체 평균 건중량을 조사하였다.

## 2) 잣버섯 우량 액체종균 배양기술 개발

### 가) 잣버섯 액체종균 배양배지별 균사 생산량 비교

- 잣버섯의 균사생육에 적합한 배지를 선별하기 위해 Table 3.에 기술된 배지 조성을 갖는 Czapek-Dox, YMB (Yeast Extract Broth), Lilly, MCM(Mushroom Complete Medium), PDB(Potato Dextrose Broth), MEB(Malt Extract Broth), GPB(Glucose Peptone Broth) 합성배지를 121℃, 1.2기압에서 20분간 고압살균 후 160ml Easy flask(Nunc)에 50ml씩 배지별로 분주한 후 무균상 안에서 식히고 PDA배지에서 10일동안 배양한 균주(99161, 03050)의 균사 끝부분을 cork borer (6mm)를 이용하여 고체 배지와 잣버섯 균사를 같이 떼어 내어 5개의 조각을 액체배지에 접종하였다. 균주별 배지별 3반복으로 하여 30℃, 암상태로 정지 배양하였다. 15일간 배양한 후 균사체를 270 mesh 체에 거르고 증류수로 세척하여 48℃의 dry oven에서 48시간 동안 건조시킨 후 건중량을 측정하였다.

### 나) 잣버섯 액체종균 배양기간별 균사체 생산량 비교

- 배양기간에 따른 균사체량의 변화를 알아보기 위하여 2ℓ air-lift fermenter에 PDB(Potato Dextrose Broth)배지를 사용하여 잣버섯 99161균주를 접종한 후 30℃ 암상태로 1vvm의 통기량으로 16일간 액체배양하면서 4일 간격으로 균사체의 건중량을 측정하였다.

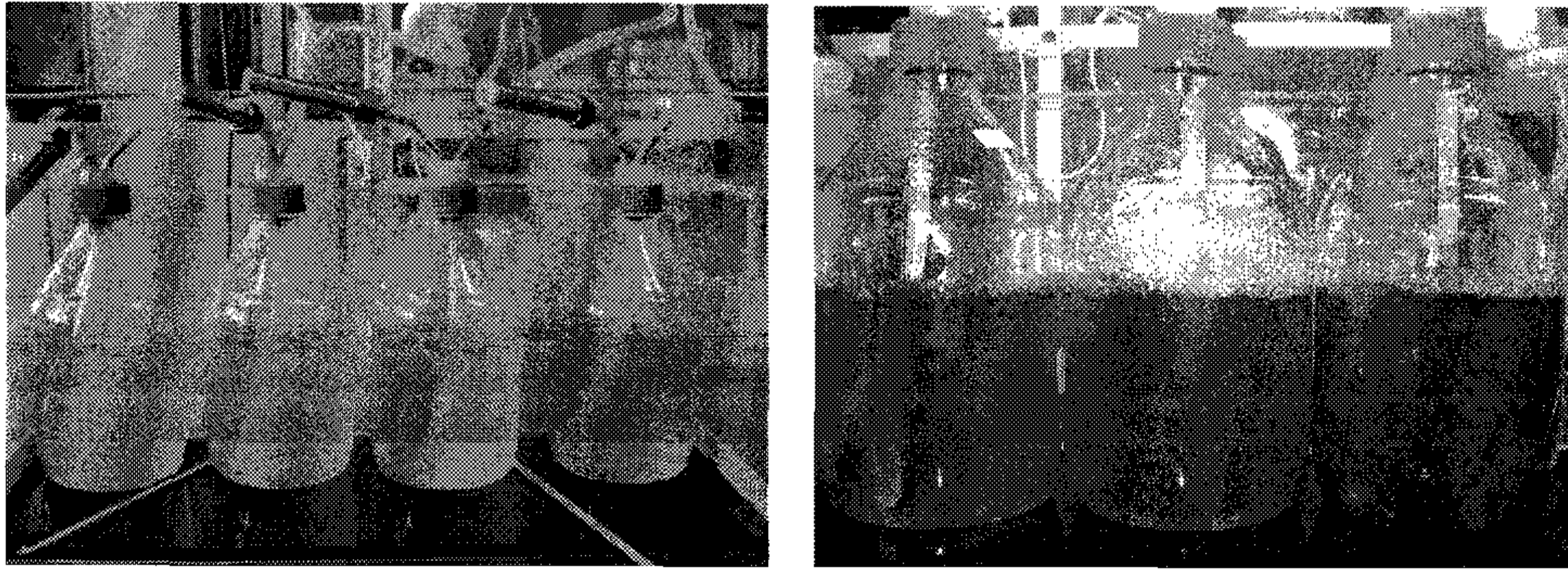


Fig. 1. Liquid spawn culture of *Lentinus lepideus* in air-lift fermenters.

다) 접종원 접종량에 따른 균사생장량 비교

- 잣버섯 액체배양시 접종원 접종량에 따른 균사체의 생산량을 알아보기 위하여 2ℓ air-lift fermenter에 BPYM배지를 사용하여 잣버섯 99161균주의 접종량을 배지량의 0.5, 1, 2, 5%부피로 조절하여 접종한 후 30℃ 암상태로 6일간 배양 후 균사체의 건중량을 측정하였다.

라) 통기량에 따른 균사생장량 비교

- 잣버섯 액체배양시 통기 조건에 따른 균사체의 생산량을 알아보기 위하여 2ℓ air-lift fermenter에 BPYM배지를 사용하여 잣버섯 99161균주를 접종한 후 30℃ 암상태로 통기 조건을 0.5, 1, 1.5, 2vvm(vol. of air/vol. of medium/min)으로 조절하여 6일간 배양한 후 균사체의 건중량을 측정하였다.

마) 액체종균과 고체종균 사용시 톱밥배지에서의 원기형성까지 소요되는 기간 조사

- 톱밥재배시 접종원으로 잣나무 톱밥배지에서 50일간 배양된 고체종균과 PDB 배지에서 15일간 배양된 액체종균을 톱밥배지에 각각 접종하여 30℃ 암상태에서 배양하면서 자실체 발생의 초기 단계인 원기(primordia)가 형성되는데 요구되는 기간을 비교하였다.

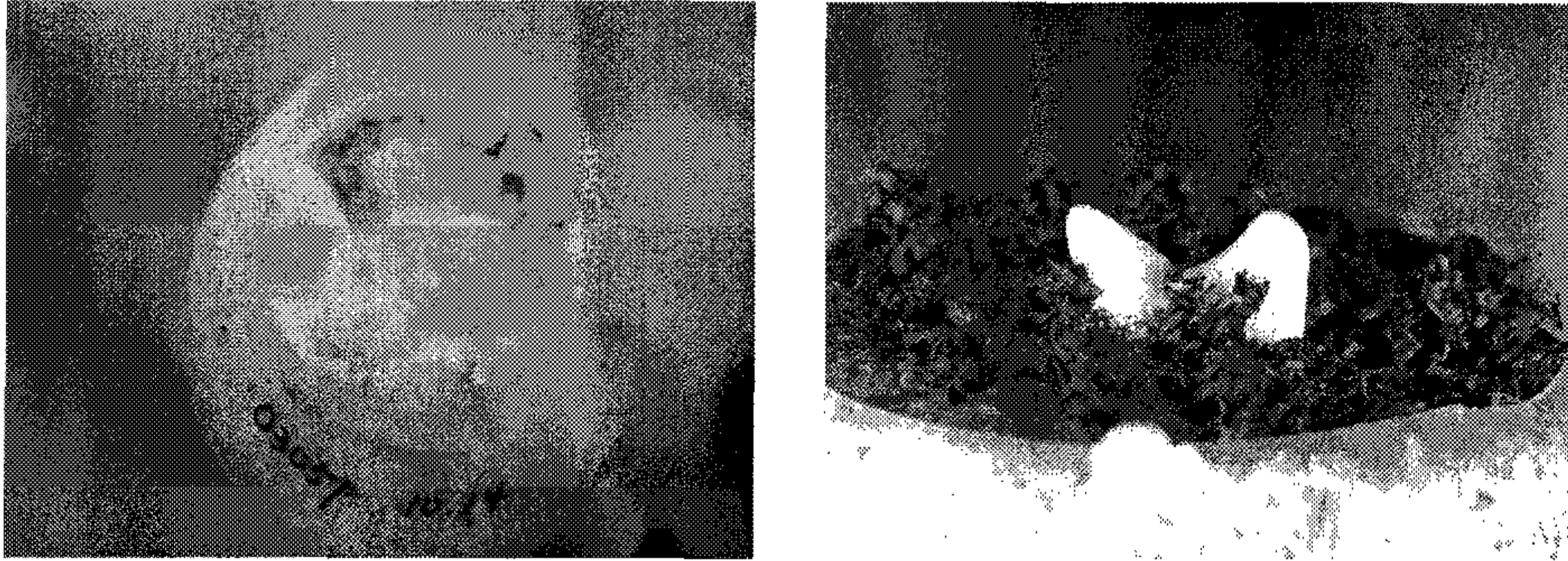


Fig. 2. Primordia formation of *Lentinus lepideus* on sawdust media.

바) 액체배지 관련 잣버섯 생산량 비교

- 잣버섯 톱밥재배시 접종원으로 톱밥종균과 액체종균을 사용하여 자실체 생산량을 조사하기 위해 잣나무 톱밥을 24시간 침수시켜 수분 함량을 60-65%로 조절한 후, 톱밥을 담은 PP봉지의 무게를 1kg으로 조절하고 121℃ 1.2기압에서 90분간 고압증기멸균한 후 상온에서 식힌 다음 크린벤치 내에서 톱밥종균과 액체종균을 각각 접종하였다. 접종 후 30℃ 암상태의 항온배양기에서 50일간 배양 후 24시간 산광을 주고 온도 30±2℃, 상대습도 95% 이상을 유지하며 CO<sub>2</sub> 농도 1000±200ppm 이하로 유지하여 버섯 발생을 유도하였다. 자실체는 갓이 2/3 정도 피었을 때 수확하였고 처리별 수확한 자실체의 톱밥배지 1봉지당 자실체 평균 건중량을 조사하였다.

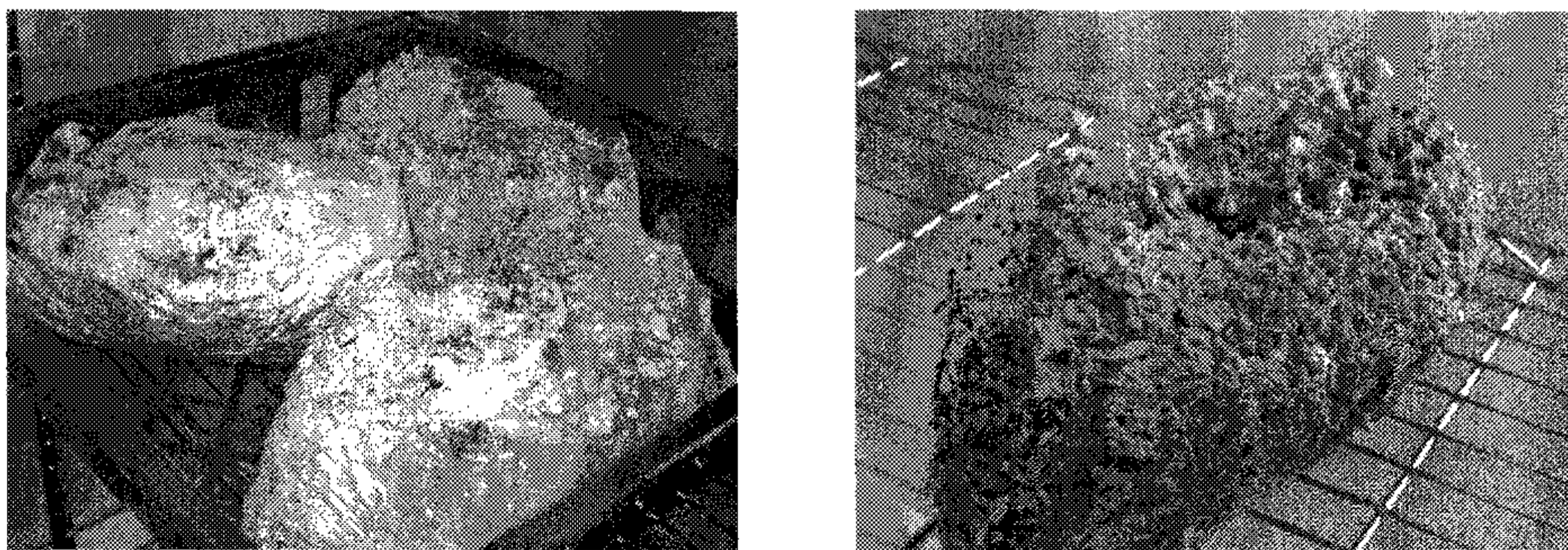


Fig. 3. Pot cultivation of *Lentinus lepideus* on sawdust media.

3) 잣버섯 대량생산기술 개발

가) 잣버섯 균주별 자실체 생산량 비교

- 잣버섯 균주(TPML99161, 02050, 02052, 02053, 02054, 20641, 03050, 03051, 03052, 03054, 03100)의 자실체 생산량을 조사하기 위해 잣나무 톱밥을 24시간 침수시켜 수분 함량을 60-65%로 조절한 후, 톱밥을 담은 1.2ℓ 종균병의 무게를 600g으로 조절하고 121℃ 1.2기압에서 90분간 고압증기멸균한 후 상온에서 식힌 다음 크린벤치 내에서 균주별로 종균병 1병당 PDA배지에서 10일간 배양한 접종원을 1/2 plate씩 각 균주별로 5반복으로 접종하였다. 접종 후 30℃ 암상태의 항온배양기에서 50일간 배양 후 24시간 산광을 주고 온도 30±2℃, 상대습도 95% 이상을 유지하며 CO<sub>2</sub> 농도 1000±200ppm 이하로 유지하여 버섯 발생을 유도하였다. 온도는 재배사내 열선과 라디에이터로 조절하였고, 습도는 버섯재배용 가습기(중앙가습기 JA-600)로 조절하였으며, CO<sub>2</sub>농도는 HEPA 필터가 장착된 공기 흡입 장치를 통해 외부의 신선한 공기를 공급하였다. 자실체는 갓이 2/3 정도 피었을 때 수확하였고 30일간 수확한 자실체의 톱밥배지 1병당 자실체 평균 건중량을 조사하였다.

#### 나) 배지 첨가물이 자실체 생산량에 미치는 영향 비교

- 톱밥배지 제조시 증류수, 목초액(100배 희석액), 버섯나라(버섯영양제; 250배 희석액) 등을 첨가하여 배지의 수분함량을 60-65%로 조절하여 처리별 5반복으로 배지 제조 후 접종원(TPML99161)을 접종하여 50일간 배양 후 버섯 발생을 유도하였다. 자실체는 갓이 2/3 정도 피었을 때 수확하였고 30일간 수확한 자실체의 톱밥배지 1병당 자실체 평균 건중량을 조사하였다.

#### 다) 종균 종류에 따른 자실체생산량 비교

- 잣버섯 균주(TPML 99161)의 톱밥재배시 종균 종류에 따른 자실체 생산량을 비교하기 위해 톱밥을 담은 PP봉지의 무게를 1kg으로 조절하고 121℃ 1.2기압에서 90분간 고압증기멸균한 후 상온에서 식힌 다음 크린벤치 내에서 잣나무 톱밥배지에 55일간 배양된 고체 종균과 BPYM배지에서 7일간 배양된 액체종균을 접종 후 30℃ 암상태의 항온배양기에서 50일간 배양한 후 자실체를 발생시켜 톱밥배지 1봉지당 자실체 평균 건중량을 조사하였다.

#### 라) 액체종균 접종시 배양기간에 따른 자실체생산량 및 발이개수 비교

- 잣버섯 톱밥재배시 접종원으로 액체종균을 사용하여 자실체 생산량과 자실체 수를 조사하기 위해 잣나무 톱밥을 24시간 침수시켜 수분 함량을 60-65%로 조절한 후, 톱밥을 담은 종균병의 무게를 550g으로 조절하고 121℃ 1.2기압에서 90분간 고압증기멸균한 후 상온에서 식힌 다음 크린벤치 내에서 BPYM배지에서 6일간 배양된 액체종균을 접종하였다. 접종 후 30℃ 암상태의 항온배양기에

서 28일, 35일, 42일간 배양 후 각각 24시간 산광을 주고 온도 30±2℃, 상대습도 95% 이상을 유지하며 CO<sub>2</sub> 농도 1000±200ppm 이하로 유지하여 버섯 발생을 유도하였다. 자실체는 갓이 2/3 정도 피었을 때 수확하였고 처리별 수확한 자실체의 톱밥배지 1병당 자실체 평균 건중량을 조사하였다.

#### 다. 결과 및 고찰

##### 1) 잣버섯 균주자원 확보 및 우량품종 육성

##### 가) 잣버섯 균주의 배양특성 규명

##### (1) 균주별 균사 성장

- PDA배지에서 9종의 균주(Table 1)를 5일간 배양하고 균사 성장을 측정한 결과, 강원도 농업기술원에서 분양받은 99161, 국립산림과학원에서 분양받은 20641, 인천대학교 균주은행에서 분양받은 02053 균주가 생장이 우수하였다.

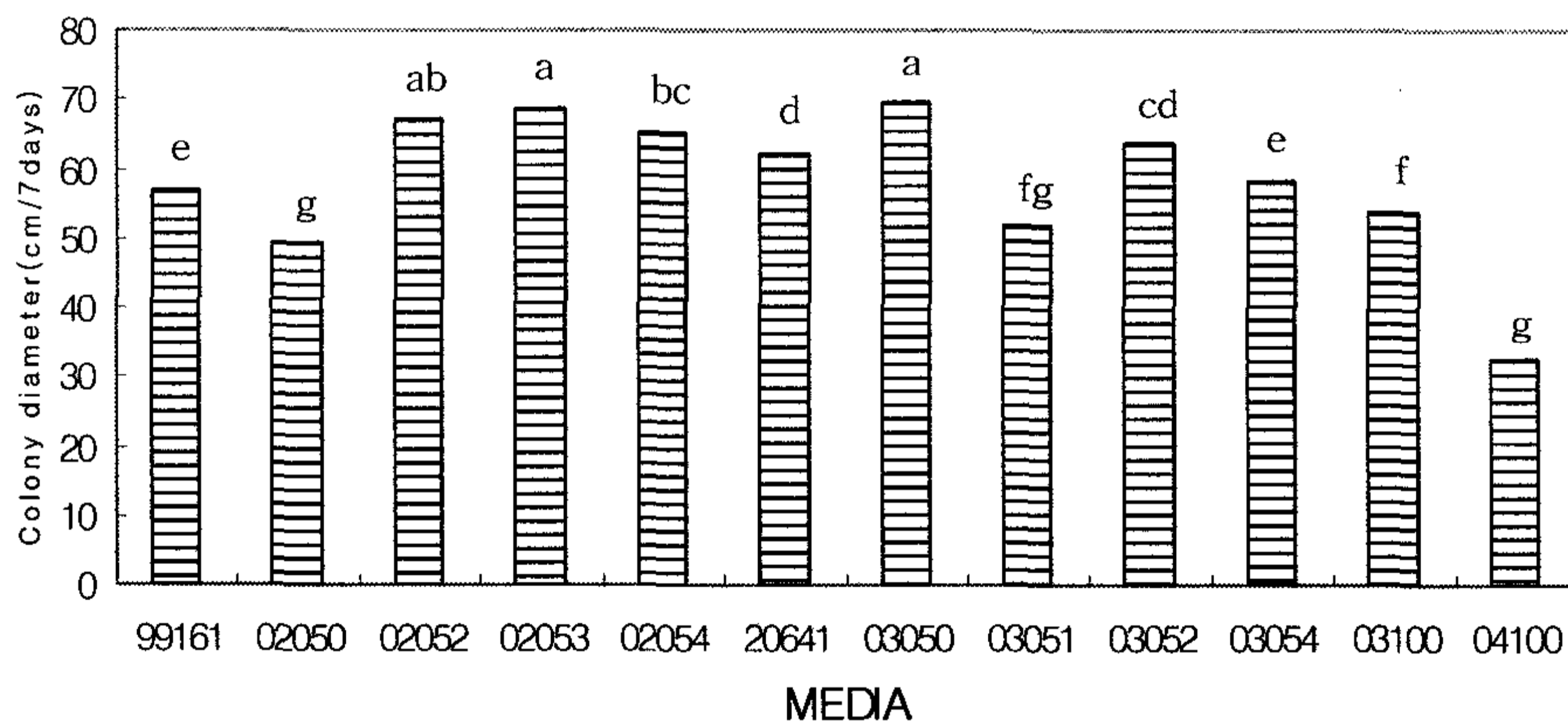


Fig. 4. Comparison in mycelial growth of *Lentinus lepideus* isolates on PDA. The same letters on the bar are not significantly different (P = 0.05) by Duncan's multiple range test.

##### (2) 배지별 균사 성장

- 3종의 합성배지에서 30℃ 암상태로 7일간 배양한 후 균사 성장량을 측정한 결과, 99161균주는 YMA배지에서, 03050 균주는 MEA 배지에서 가장 우수한 균



사 성장량을 보였으나 GPA배지에서 두 균주 모두 가장 높은 균사 밀도를 나타내었다. (Fig.5)

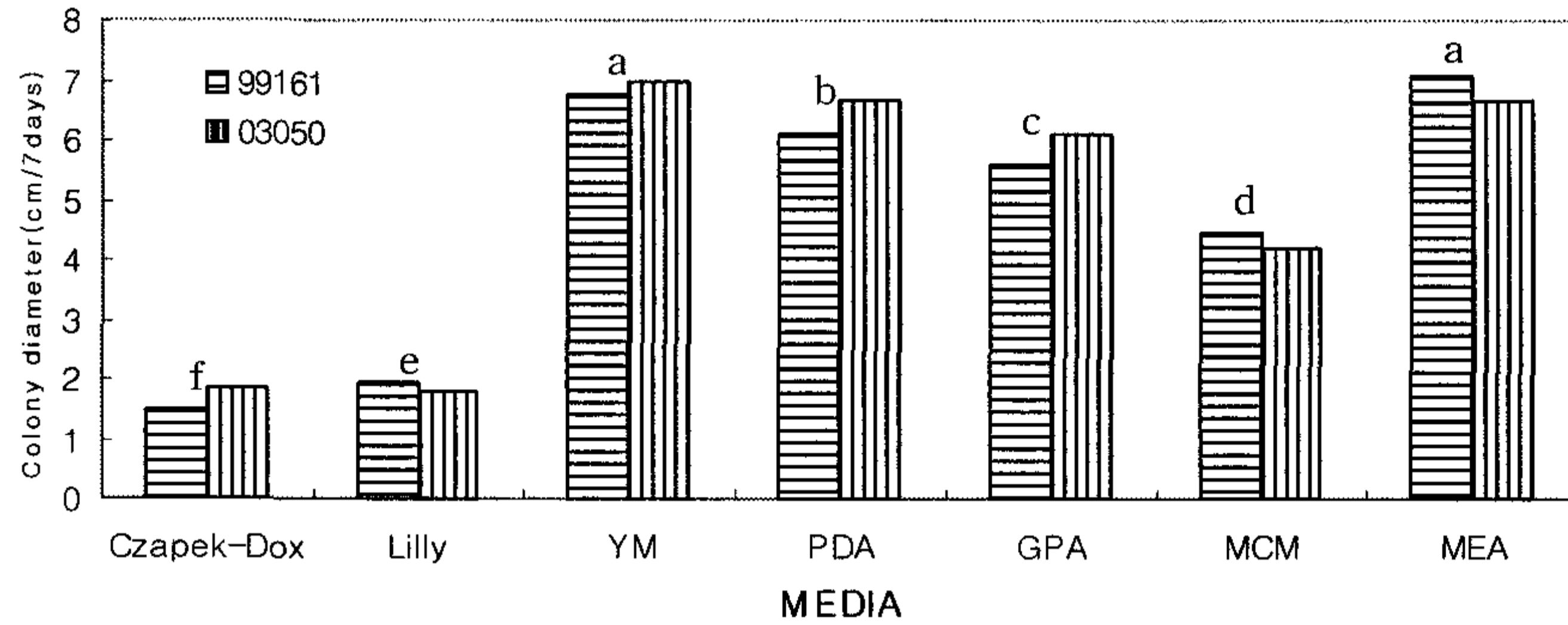


Fig. 5. Comparison in mycelial growth of *Lentinus lepideus* isolates on different culture media. The same letters on the bar(TPML99161) are not significantly different (P = 0.05) by Duncan's multiple range test.

- 7종의 액체 배지에서 배양한 후 균사체량을 측정된 결과, 99161 균주의 경우 MEB 배지에서, 03050 균주의 경우 GPB 배지에서 생중량과 건중량이 가장 많았다. (Fig.6)

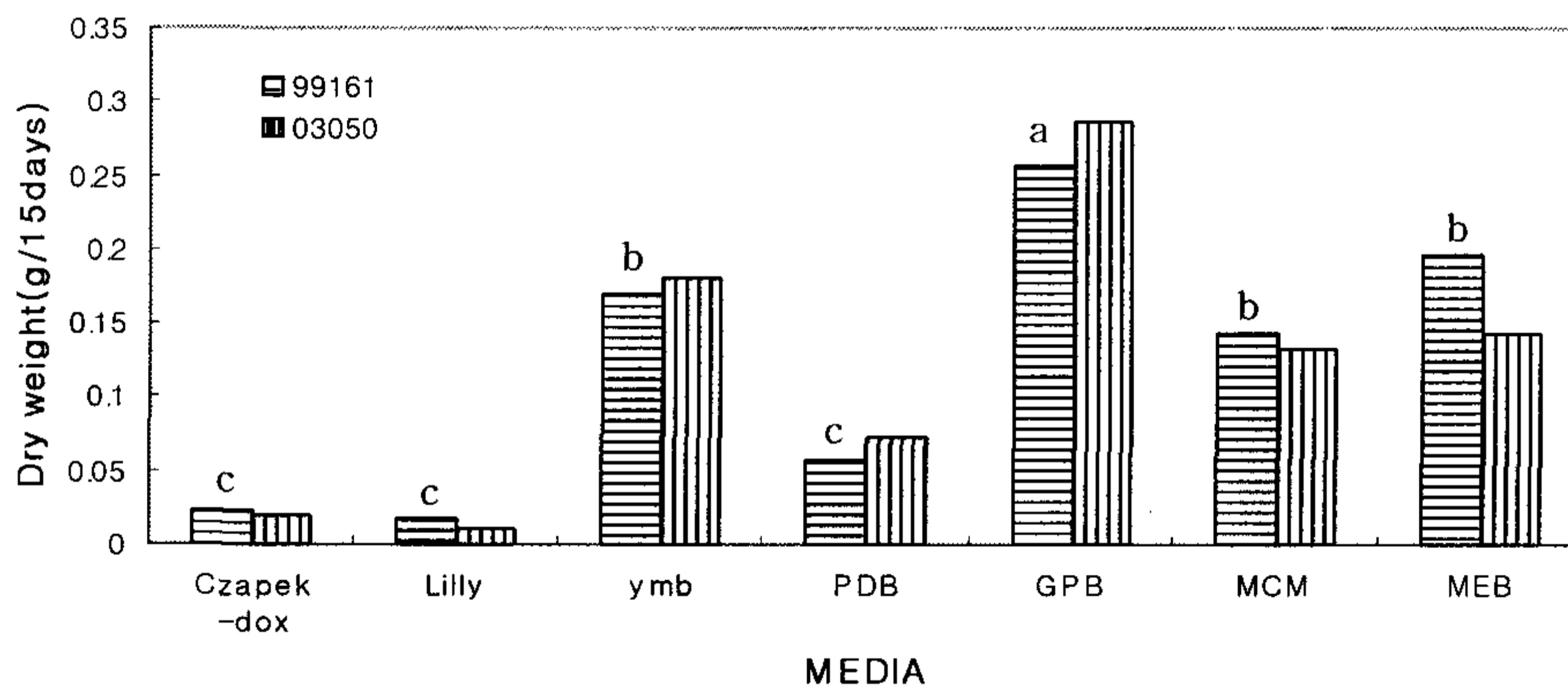


Fig. 6. Comparison in mycelial growth of *Lentinus lepideus* in different liquid culture media. The same letters on the bar(TPML99161) are not significantly different (P = 0.05) by Duncan's multiple range test.

### (3) 온도별 균사 성장

- 잣버섯 99161, 20641, 02052, 03050 균주를 7일간 배양 온도별로 측정된 결과,

모든 균주가 30℃에서 균사 성장량이 가장 우수하였다. (Fig.7)

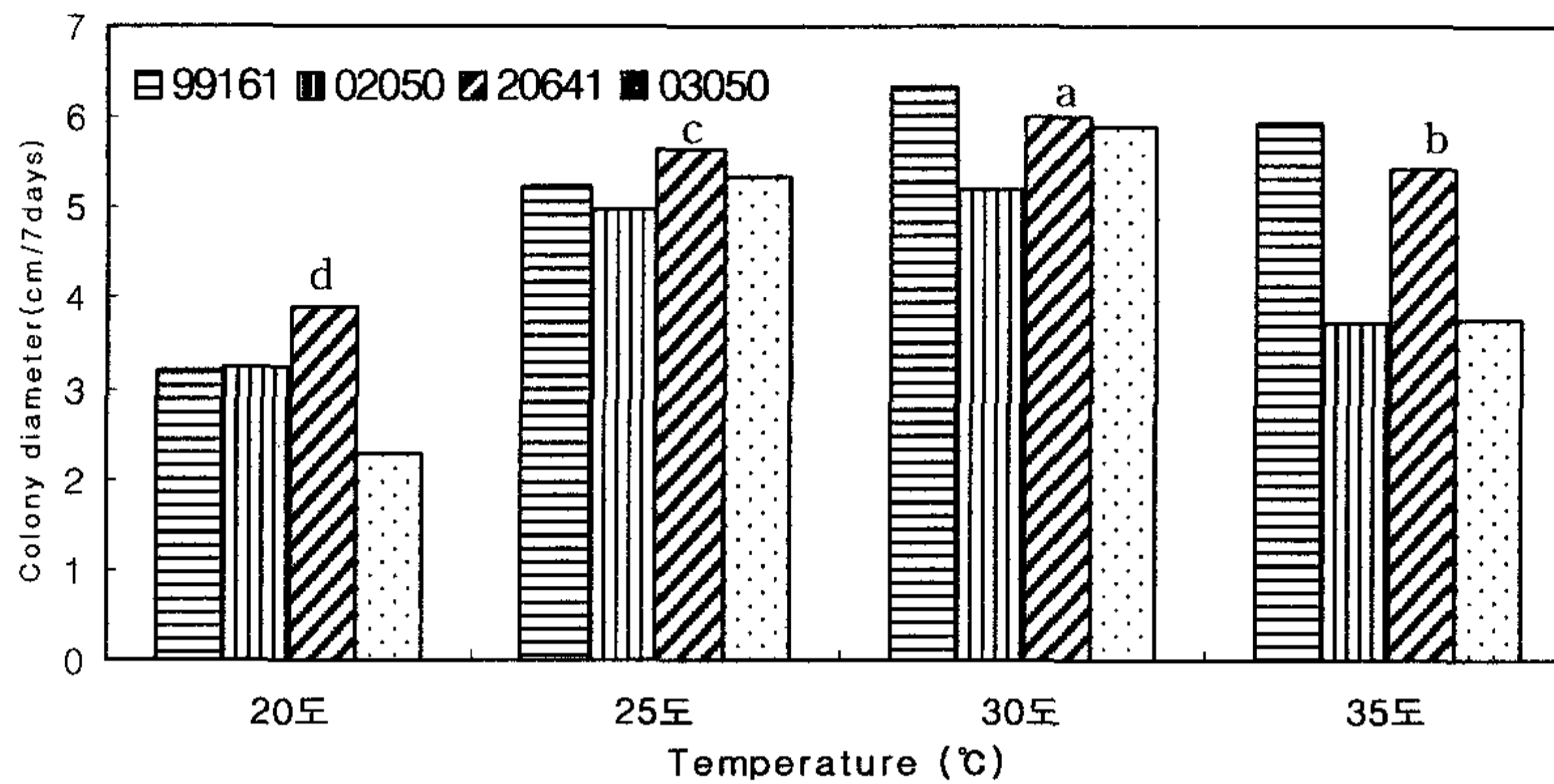


Fig. 7. Effect of temperature on the mycelial growth of *Lentinus lepideus*. The same letters on the bar(TPML20641) are not significantly different (P = 0.05) by Duncan's multiple range test.

(4) pH별 균사 성장

- 균사생장에 적합한 최적 pH를 구명하기 위해서 배지의 pH를 4.5에서 8.5까지 조절하여 7일간 배양 후 균사 성장량을 측정한 결과, 모든 균주가 산성인 pH 5.5에서 균사 성장이 가장 우수하였다. (Fig.8)

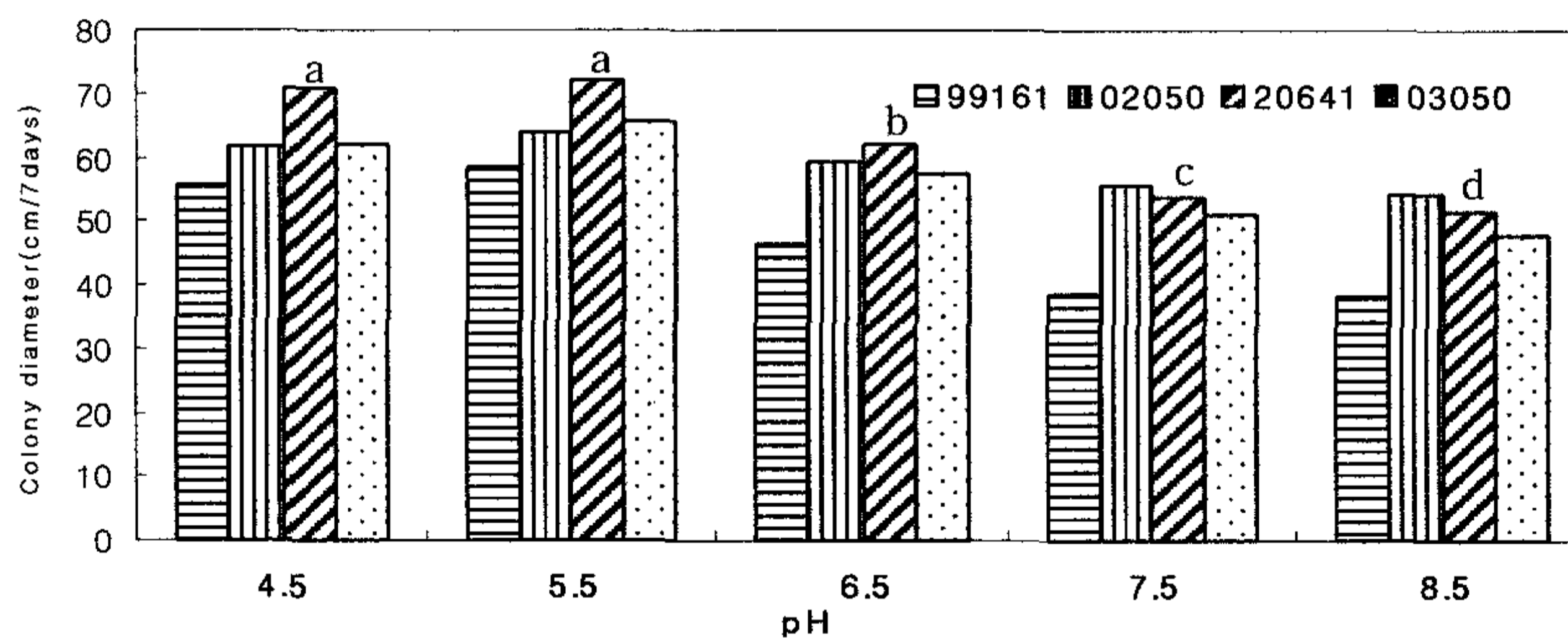


Fig. 8. Effect of pH on the mycelial growth of *Lentinus lepideus*. The same letters on the bar(TPML20641) are not significantly different (P = 0.05) by Duncan's multiple range test.

(5) 탄소원별 균사 성장

- 각종 탄소원이 잣버섯의 균사 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 기본배지로 Czapek-Dox 배지에 각각 동일한 농도의 탄소원을 첨가한 후 접종하고 7일간 배양한 결과, 모든 균주가 Starch 첨가 배지에서 균사 성장량은 가장 우수하였으나 균사의 밀도는 비슷한 수준이었다. (Fig.9)

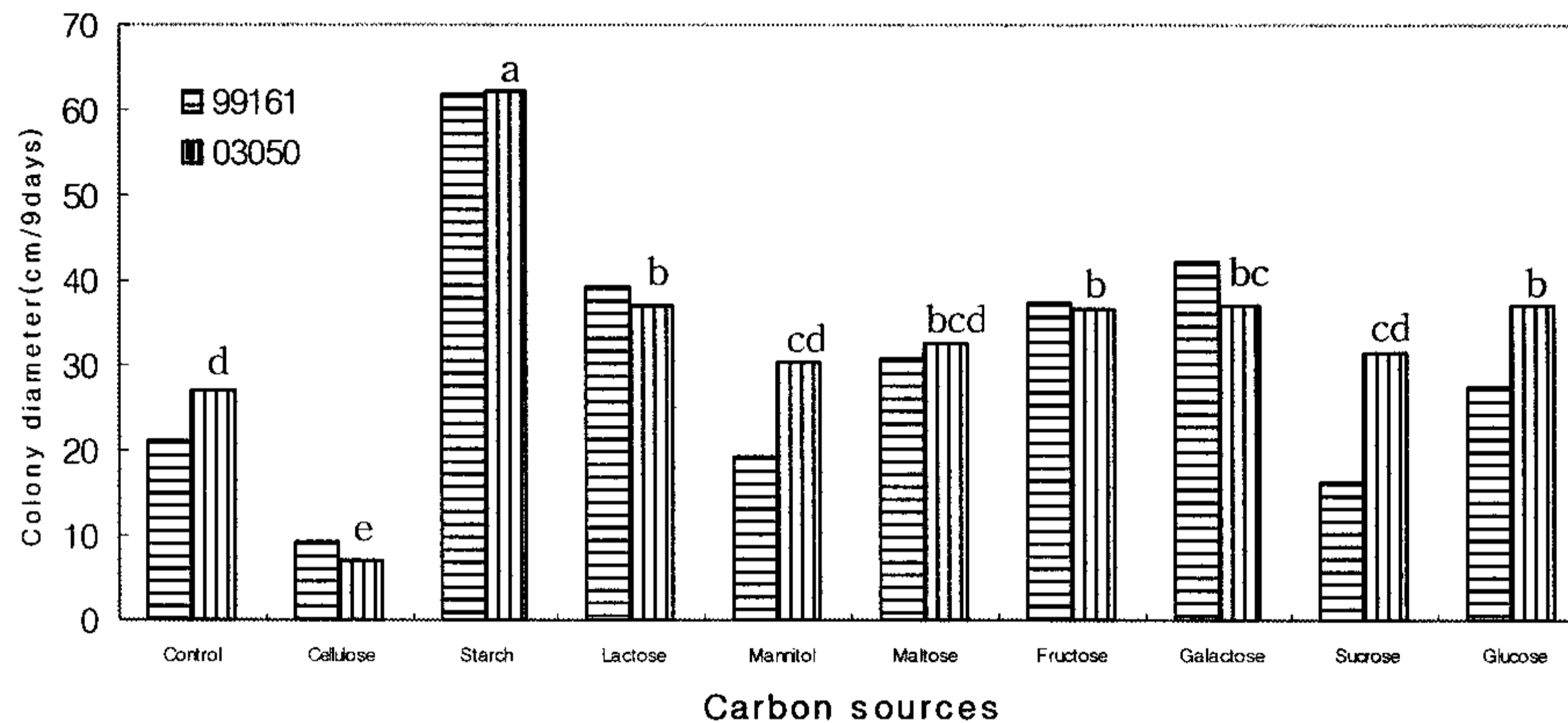


Fig. 9. Effect of carbon sources on the mycelial growth of *Lentinus lepideus*. The same letters on the bar(TPML03050) are not significantly different (P = 0.05) by Duncan's multiple range test.

(6) 질소원별 균사 성장

- 각종 질소원이 잣버섯의 균사 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 기본배지로 Czapek-Dox 배지에 각각 동일한 농도의 질소원을 첨가한 후 접종하고 7일간 배양한 결과, 모든 균주가 peptone 첨가 배지에서 균사 생장이 가장 우수하였으며, ammonium sulfate와 peptone 첨가배지에서 균사의 밀도가 높았다. (Fig.10)

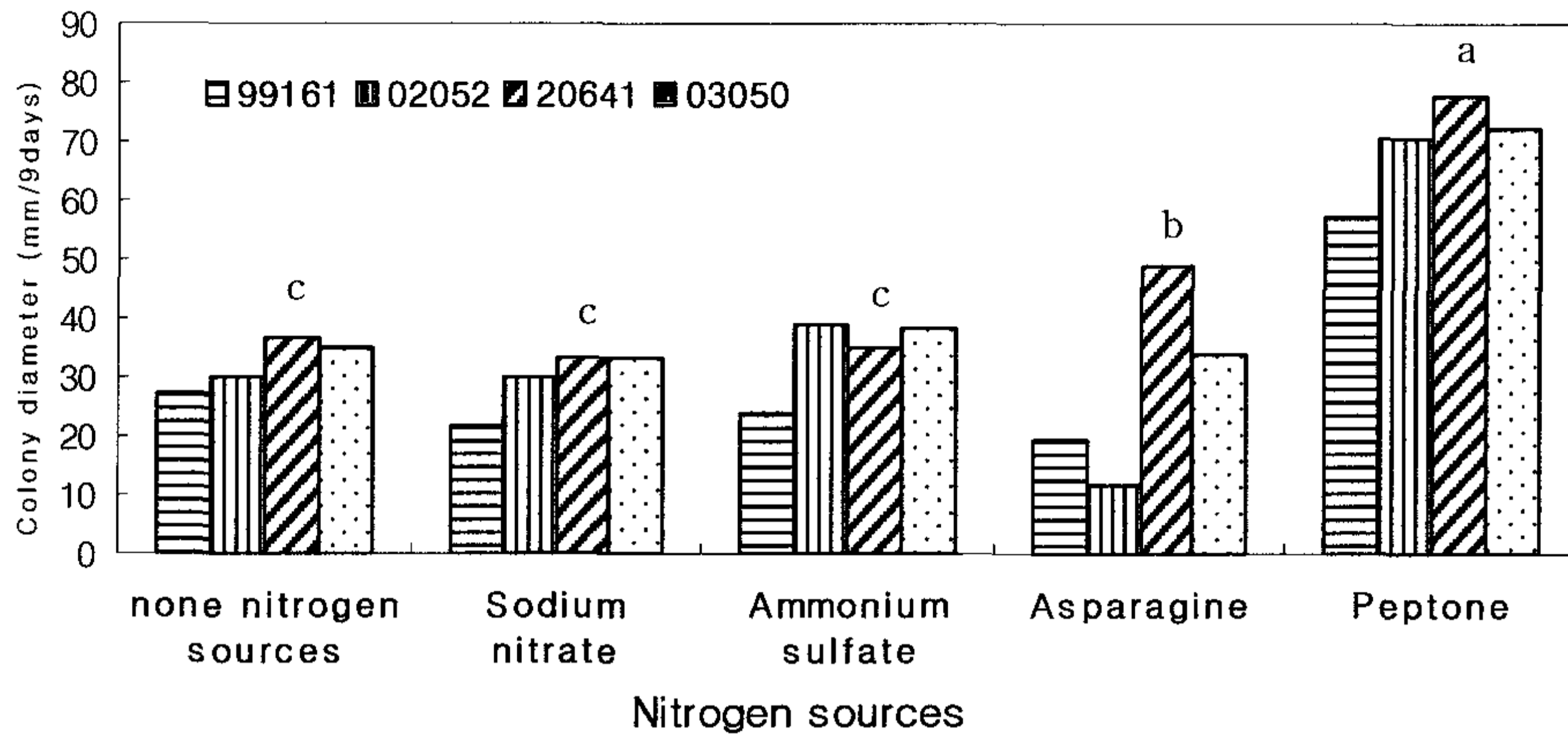


Fig. 10. Effect of nitrogen sources on the mycelial growth of *Lentinus lepideus*. The same letters on the bar(TPML20641) are not significantly different ( $P = 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

(7) 목초액 농도별 균사 성장 비교

- 목초액이 잣버섯 균사 성장에 미치는 영향을 알아보기 위해 PDA기본배지에 참나무 목초액을 농도별로 첨가하여 배지 제조하고 7일간 배양한 후 균사 성장량을 측정한 결과, 목초액 100배 희석액 첨가 배지에서 가장 우수한 균사 성장량을 나타내었다 (Fig. 11).

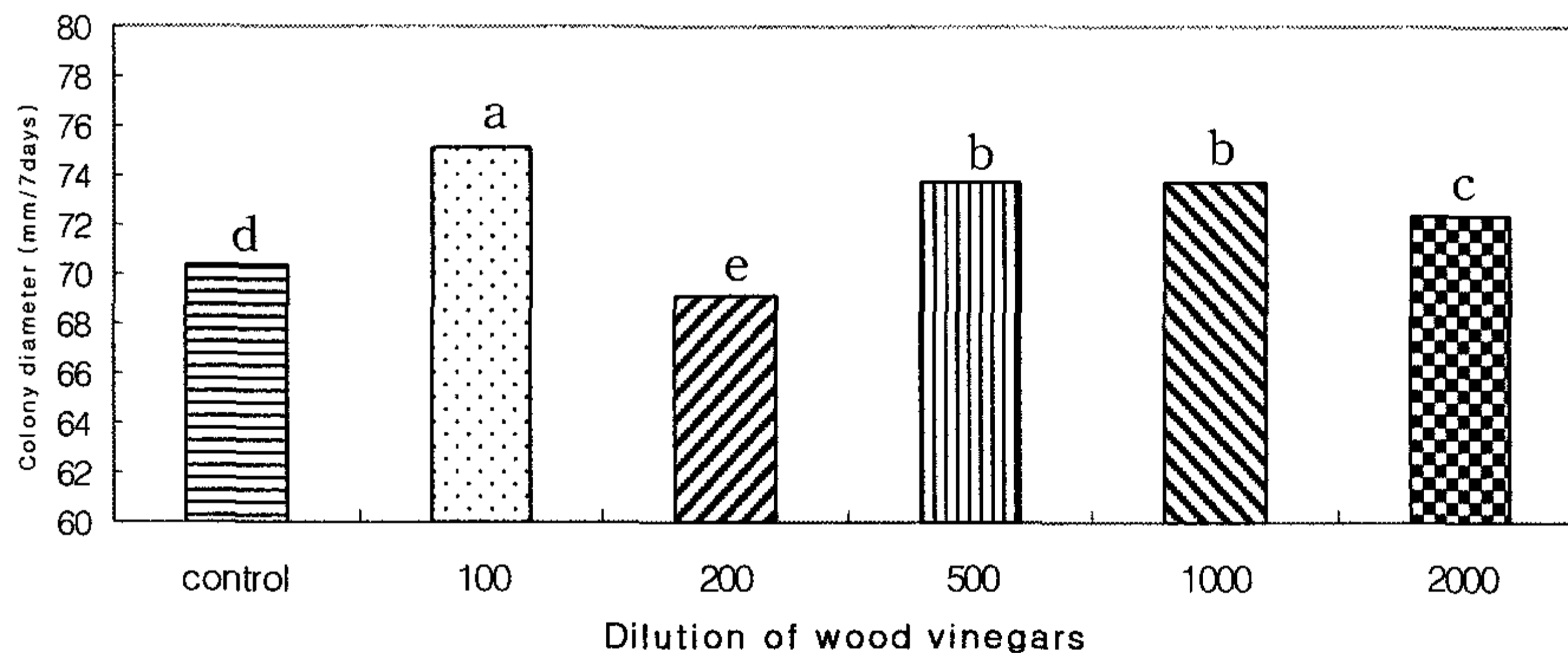


Fig. 11. Effect of wood vinegars on the mycelial growth of *Lentinus lepideus*. The same letters on the bar are not significantly different ( $P = 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

(8) 잣버섯 균주의 RAPD에 의한 유전적 유연관계 분석

- 잣버섯 12균주를 대상으로 6개의 random primer를 사용하여 RAPD를 분석한 결과, primer당 2~5개의 band를 나타내었으며, 종간에 서로 차이를 나타내거나 종내의 지역 개체군 간에 동일하거나 서로 다른 밴드양상이 관찰되었다.(Fig.12) 6개의 random primer로부터 자료분석에 유용한 89개의 band가 최종분석에 이용되었고, 이를 근거로 UPGMA program을 이용하여 phylogenetic tree를 작성한 결과, 83%~100%의 상동성을 보였다.(Fig.13)

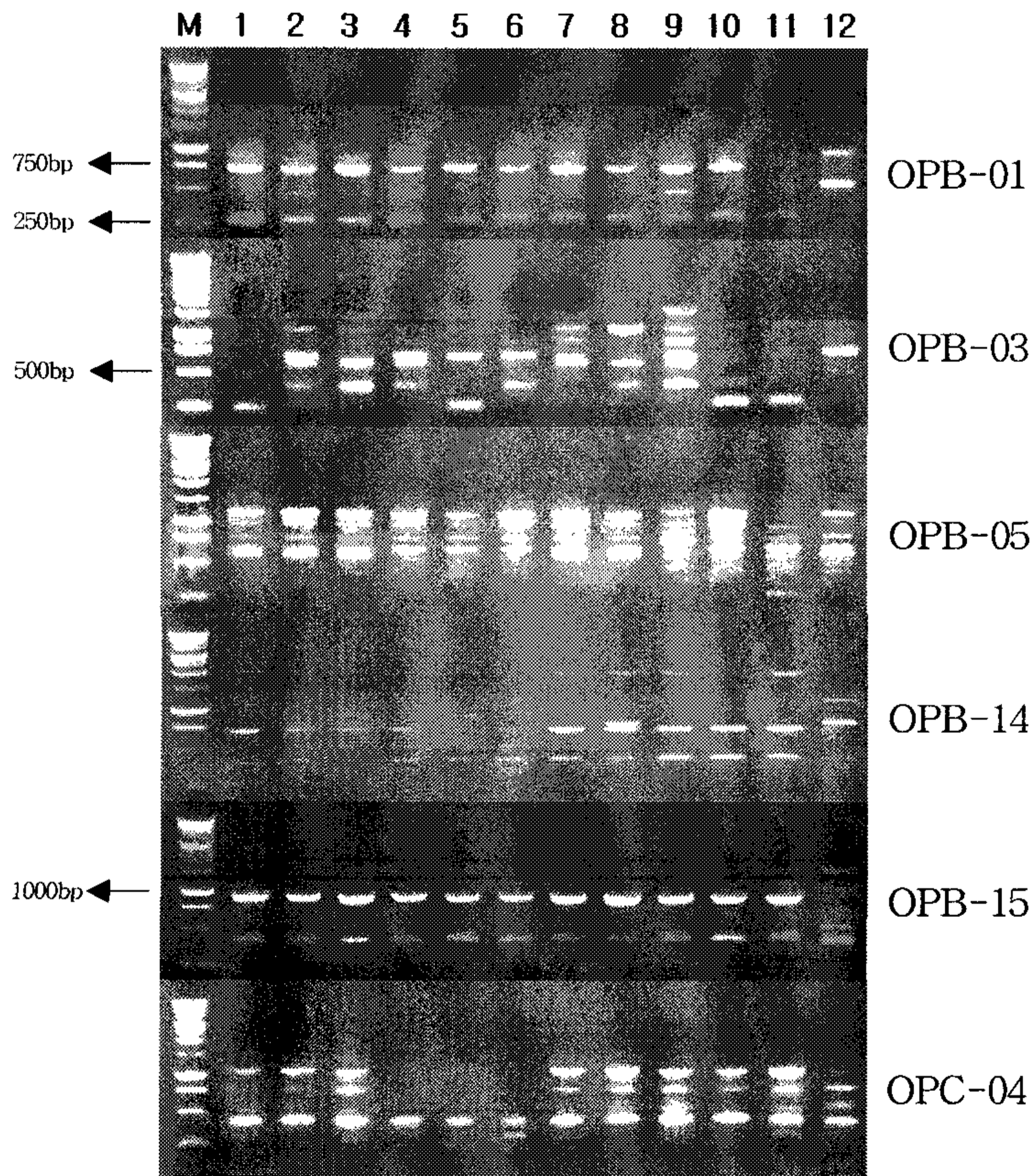


Fig. 12. plified products from DNA of 12 isolates of *Lentinus lepideus* using random primers, OPB-01, OPB-03, OPB-05, OPB-14, OPB-15, OPC-04, Lane M: 1kb DNA ladder, lanes 1-12: Sample numbers are listed in Table 1.

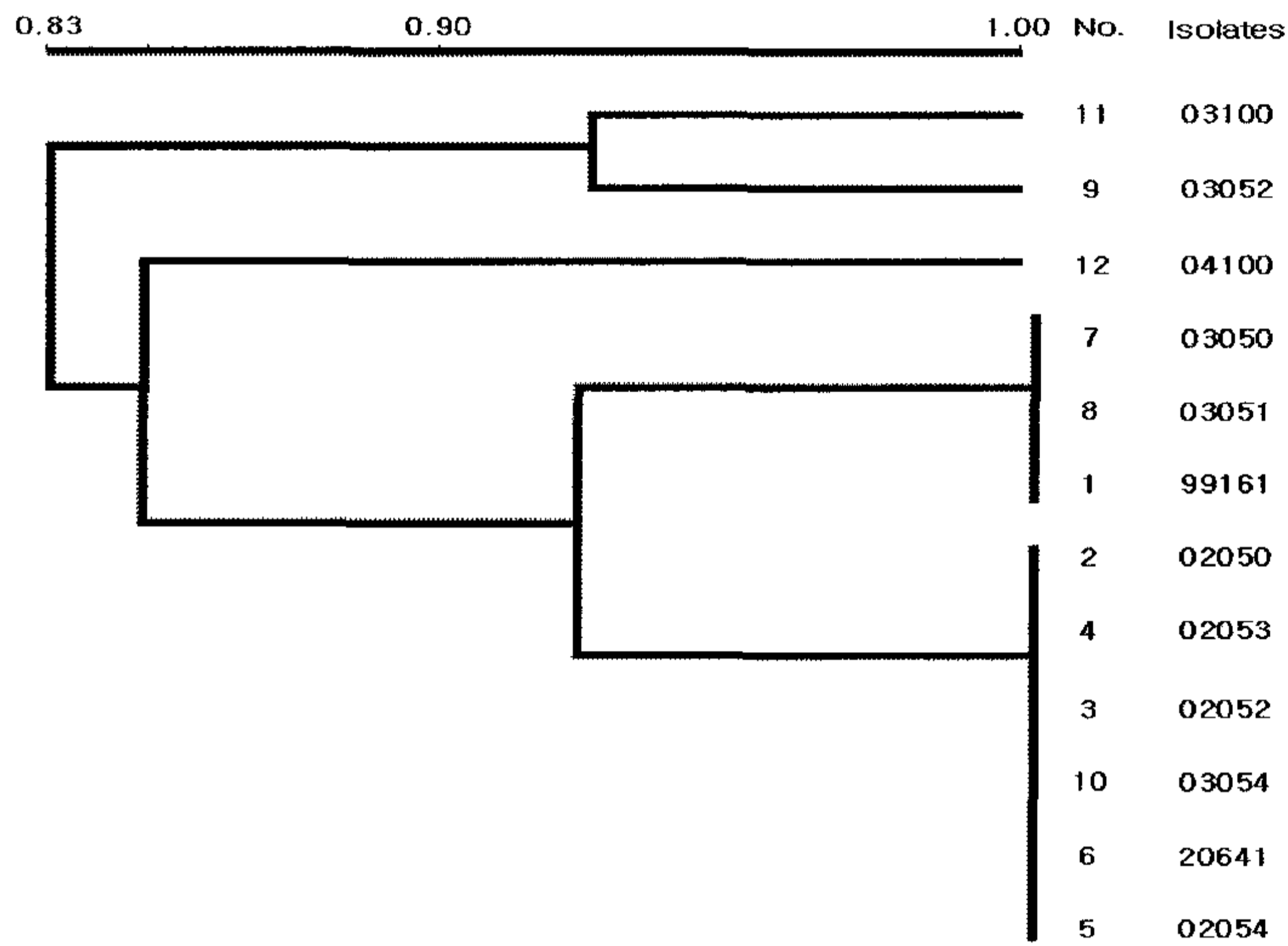


Fig. 13. Phylogenetic tree derived from the RAPD profiles of genomic DNA of 12 isolates of *Lentinus lepideus* with 6 different random primers.

나) 잣버섯 균주의 버섯생산량 비교

(1) 균주별 생산량 비교

- 잣버섯 균주별 자실체 생산량을 조사한 결과, 99161, 02052, 03050, 03051 균주에서 버섯 생산량이 많았다. (Fig.14)

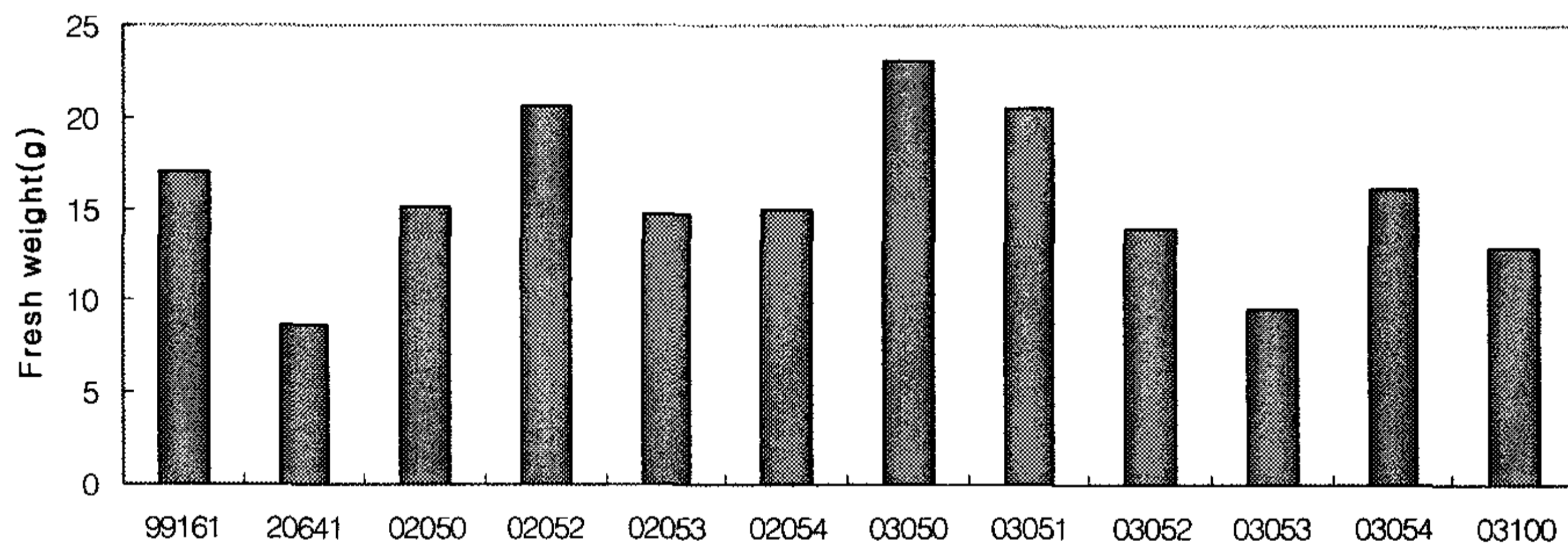


Fig. 14. Comparison of *Lentinus lepideus* isolates in the amounts of fruiting body production.

(2) 인공 톱밥 병재배시 톱밥 크기와 종균 종류가 생산량에 미치는 영향

톱밥 배지 제조시 톱밥 크기의 차이와 종균의 종류에 따른 버섯 생산량을 조사한 결과, 굵은 톱밥, 고체종균 사용시 버섯 생산량이 가는 톱밥, 액체종균 사용시보다 더 많은 것으로 조사되었다. (Fig.15, 16)

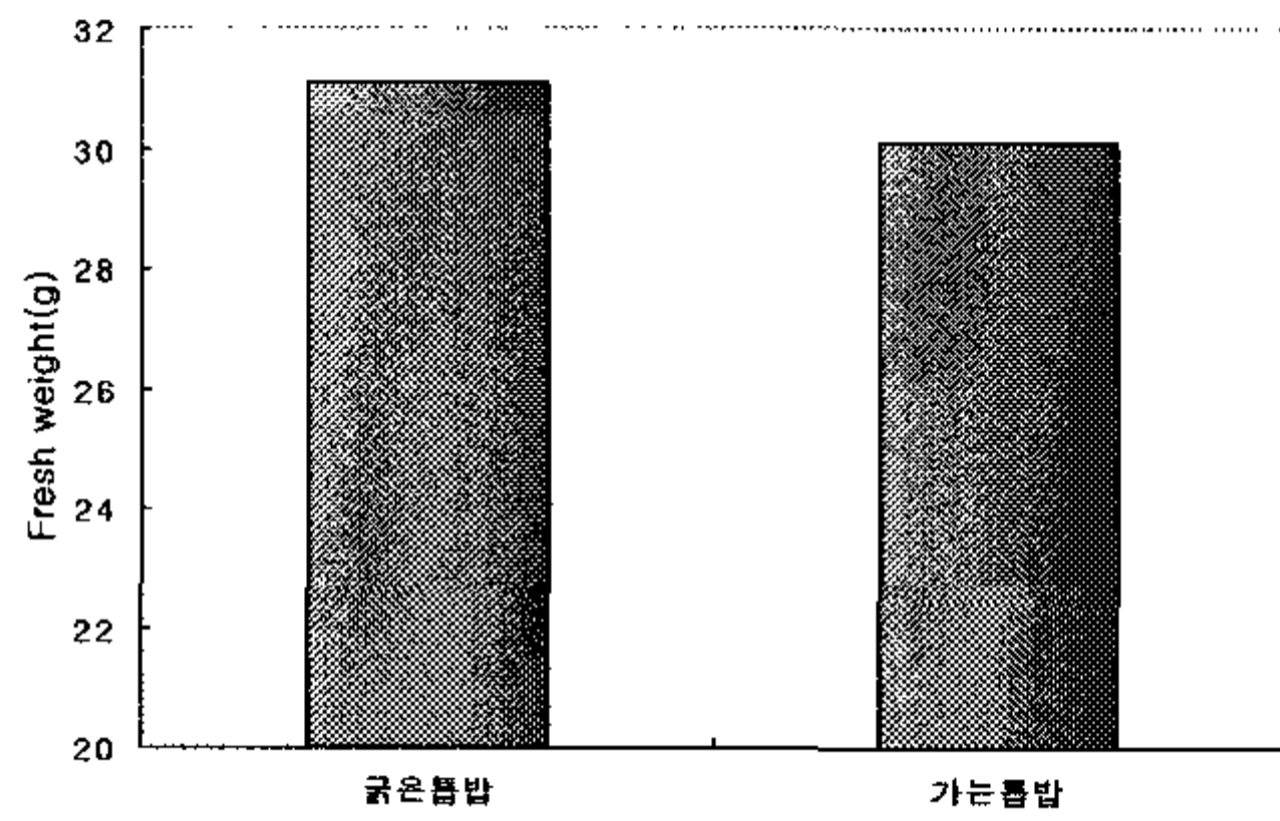


Fig. 15. Comparison of fruiting body production by the size of sawdust used as media.

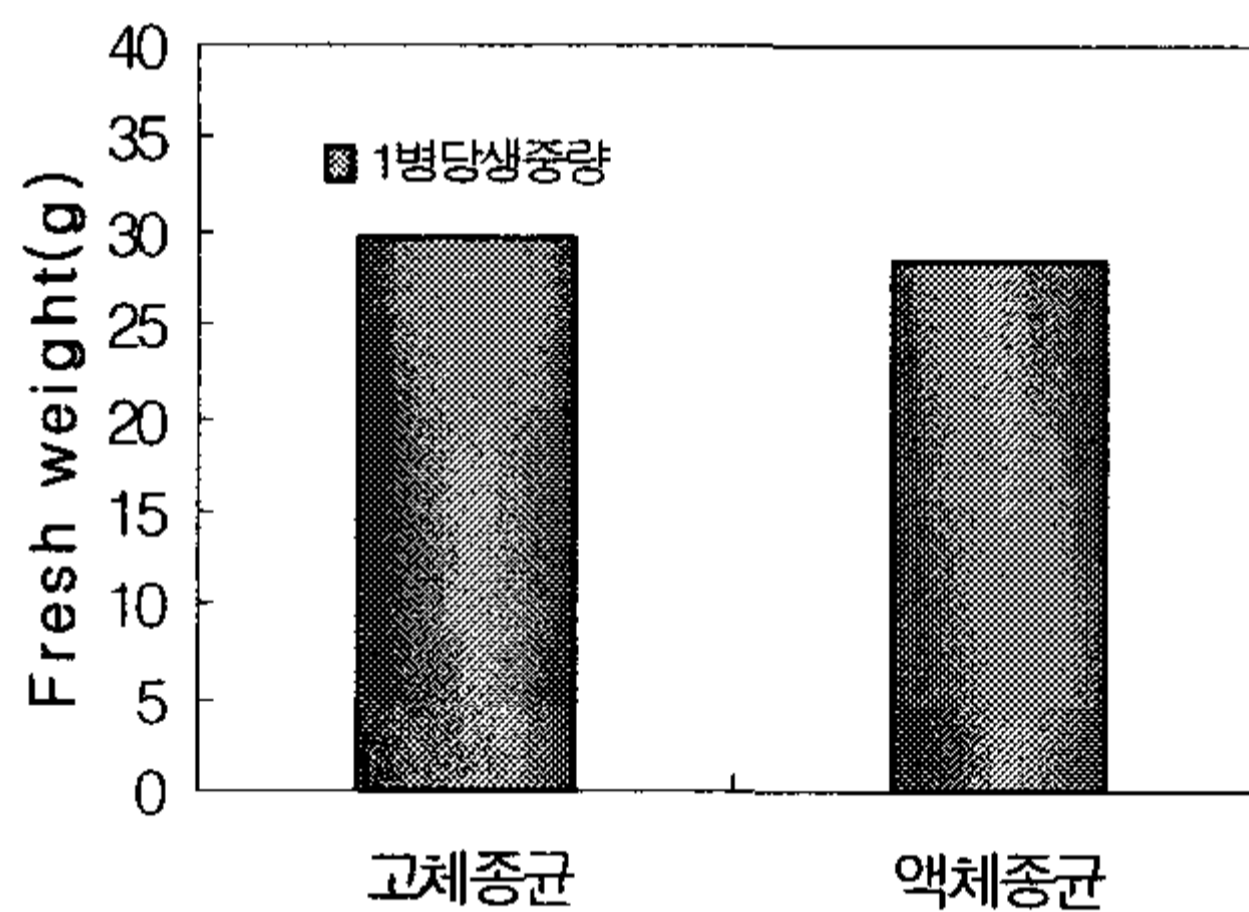


Fig. 16. Comparison of fruiting body production by two spawn types (solid and liquid).

다) 선발육종 및 교잡육종에 의한 잣버섯 균주 육성

(1) 균주별 clamp connection 검경

- 광학현미경을 사용하여 균사체를 검경한 결과, 12 균주 모두 clamp connection을 형성하였다. (Fig.17)

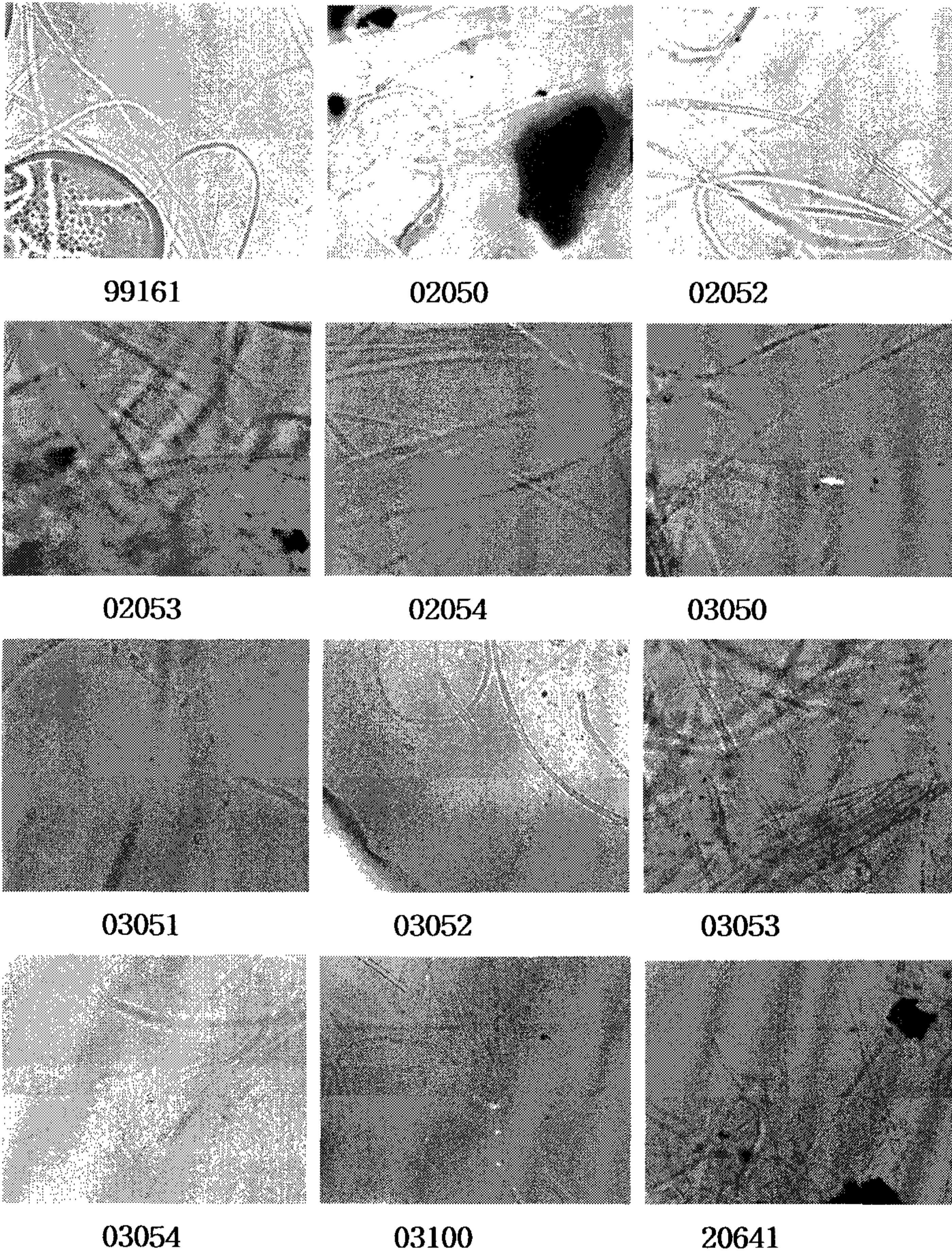


Fig. 17. Light micrographs of clamp connections for each isolate of *Lentinus lepideus*.



(2) 균주별 단포자 분리

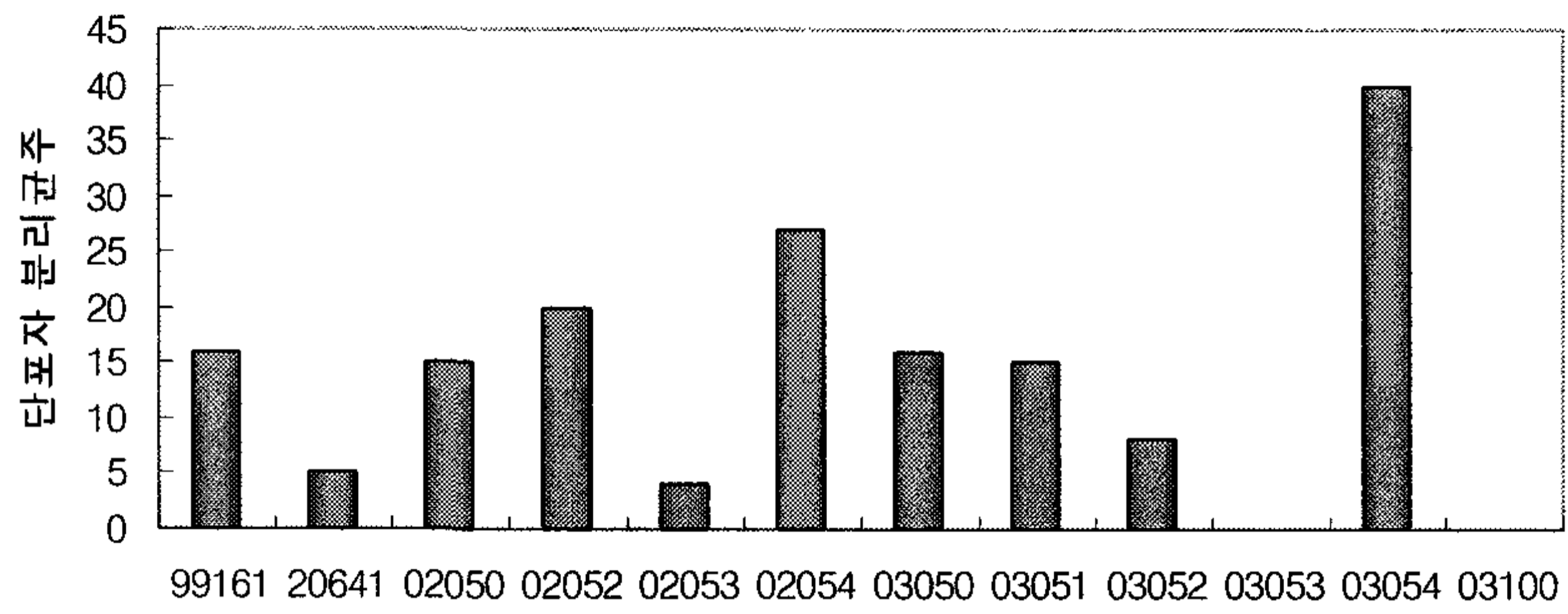


Fig.18. Numbers of single spore isolates from each isolate of *Lentinus lepideus*.

(3) 1핵 균사의 교배

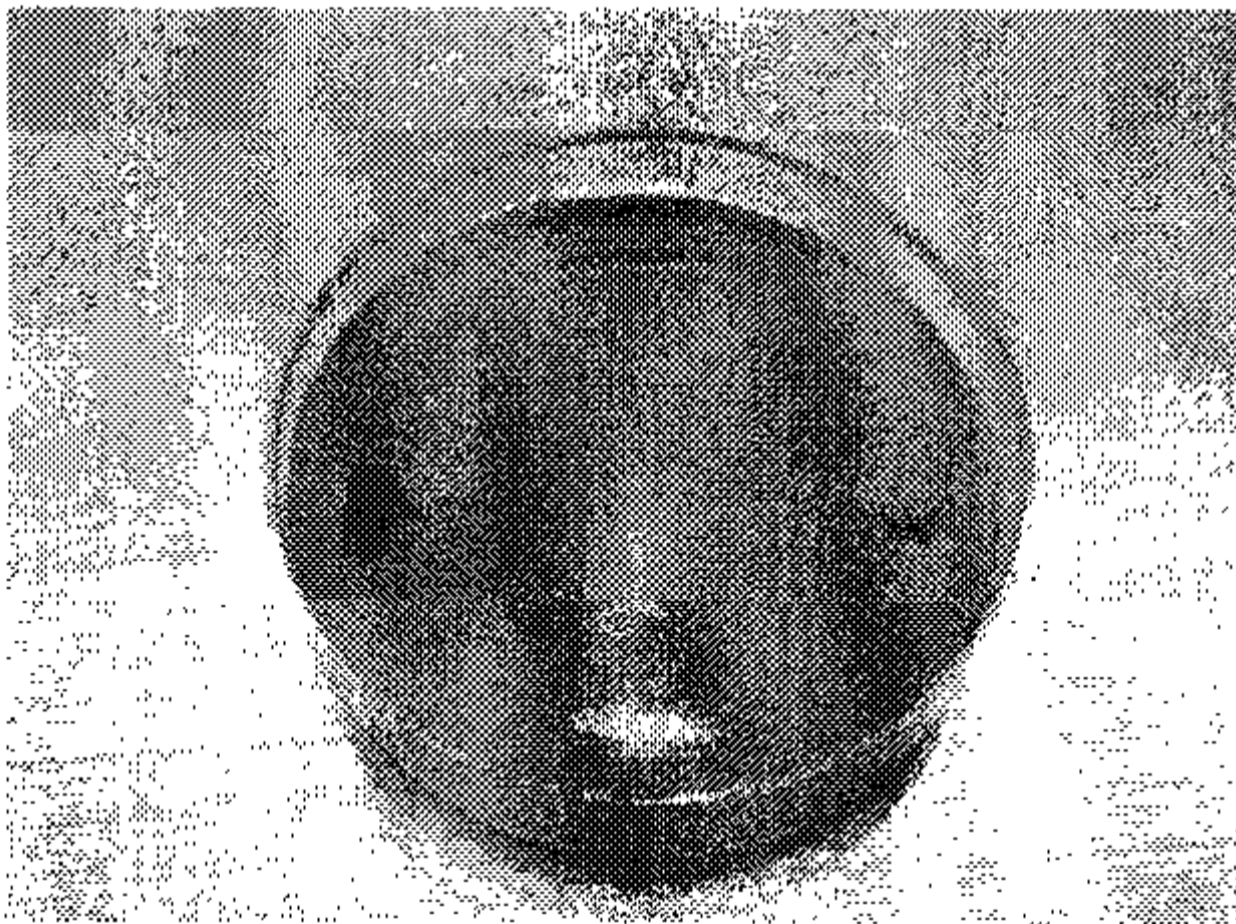


Fig. 19. Mono-mono dual culture

라) 잣버섯 원목재배

(1) 저온성균주 선발

- 잣버섯 99161, 02050, 02052, 02053, 02054, 20641, 03050, 03051, 03052, 03053, 03054, 03100 (Table 1) 균주를 20℃에서 각각 7일간 배양한 결과, 20641 균주가 균사 성장량이 가장 우수하였다. (Fig.20)

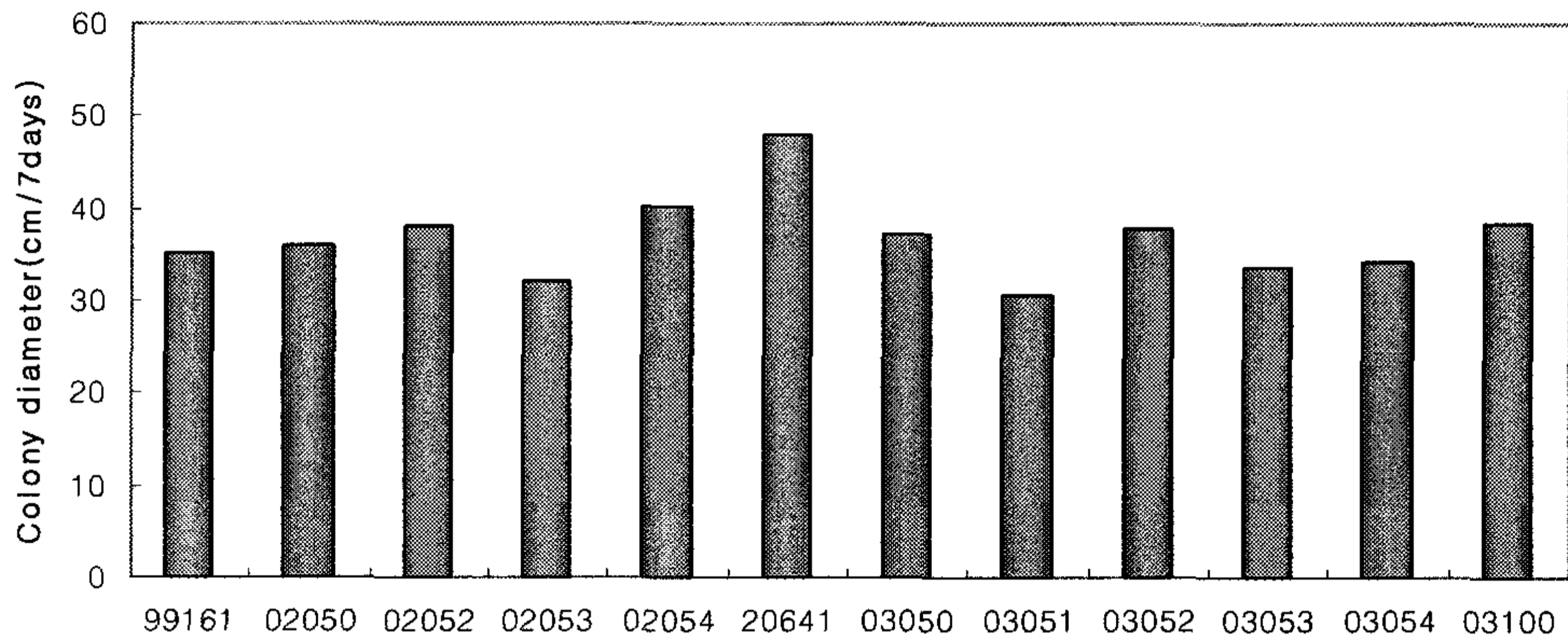


Fig. 20. Mycelial growth of *Lentinus lepideus* isolates at 20°C.

(2) 침엽수 수종별 잣버섯 생산량 조사

(가) 추출물 첨가배지별 균사생장량 비교

- 소나무, 잣나무, 신갈나무 추출액을 첨가한 PDB배지에서 TPML99161 균주의 균사 성장량을 비교한 결과, 잣나무 추출액을 첨가한 배지에서 1.64g, 소나무 추출액 첨가 배지에서 1.21g, 신갈나무 추출액 첨가배지에서 0.99g, 대조구 0.77g으로 나타났다. 잣나무 추출액을 첨가한 배지에서 균사 성장량이 상대적으로 양호하였고 추출액을 첨가한 배지가 추출액을 첨가하지 않은 배지보다 많았다 (Fig. 21).

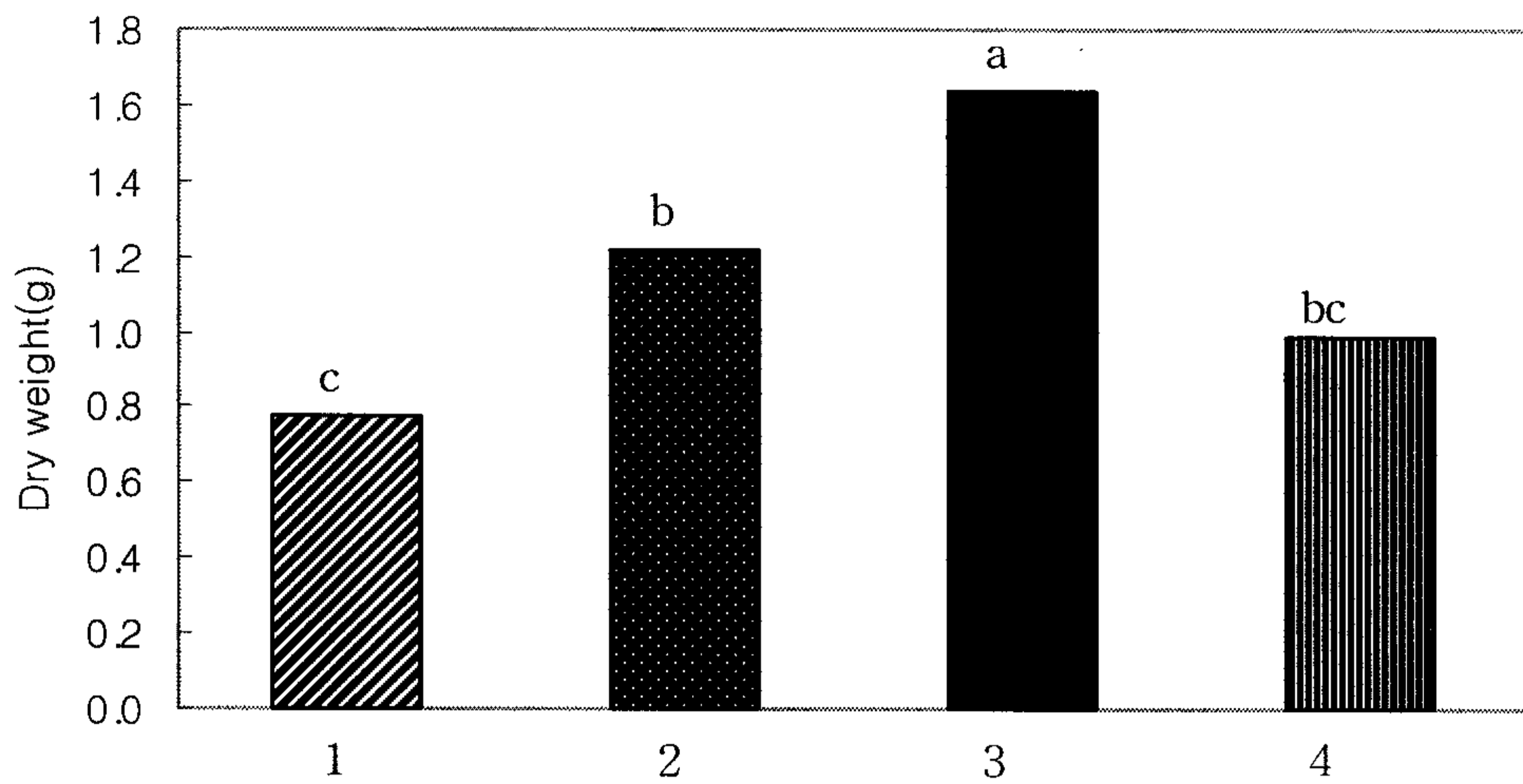
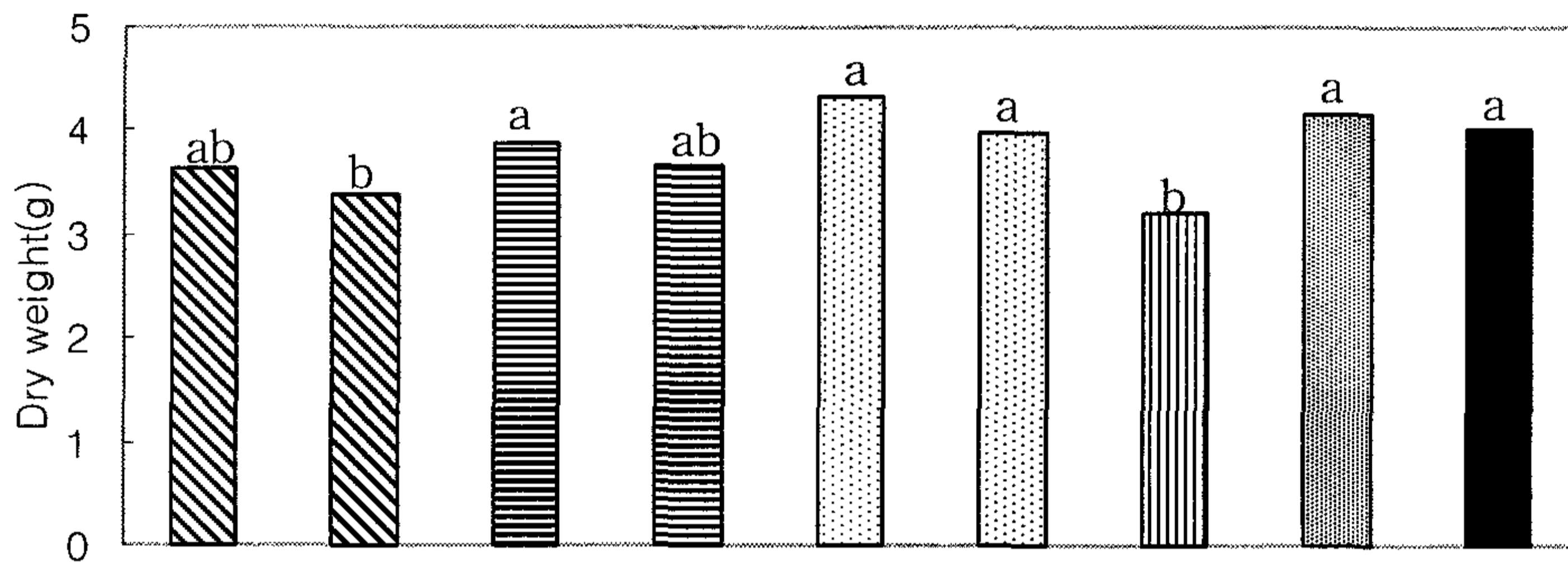


Fig. 21. Effect of softwood extracts on the mycelial growth of *Lentinus lepideus*. The same letters on the bar are not significantly different ( $P = 0.05$ ) by Duncan's multiple range test. Treatments 1 : Control, 2 : *Pinus densiflora*, 3 : *Pinus koraiensis*, 4 : *Quercus mongolica*.

(나) 톱밥 혼합비율에 따른 자실체생산량 비교

- 소나무, 잣나무, 낙엽송의 톱밥을 배합비를 각각 다르게 만든 톱밥배지에서 자실체 생산량을 비교한 결과, 잣나무와 낙엽송이 8:2로 혼합된 톱밥배지에서 자실체 생산량이 상대적으로 양호하였다 (Fig. 22).



Mixed ratio of coniferous sawdust

<sup>A</sup>Pine : K.Pine 2:8, <sup>B</sup>Pine : K.Pine 4:6, <sup>C</sup>Pine : Larch 2:8, <sup>D</sup>Pine : Larch 8:2  
<sup>E</sup>K.Pine : Larch 8:2, <sup>F</sup>K.Pine : Larch 6:4, <sup>G</sup>Pine, <sup>H</sup>Korean Pine, <sup>I</sup>Larch

Fig. 22. Comparison of the mixture ratio on softwood sawdust in the amounts of fruiting body production. The same letters on the bar are not significantly different (P = 0.05) by Duncan's multiple range test.

2) 잣버섯 우량 액체종균 배양기술 개발

가) 잣버섯 액체종균 배양배지별 균사 생산량 비교

- 7종의 액체 배지에서 15일간 배양한 후 균사체량을 측정한 결과, 99161과 03050 균주 모두 GPB 배지에서 가장 높은 균사 생산량을 보였다.(Fig. 23)

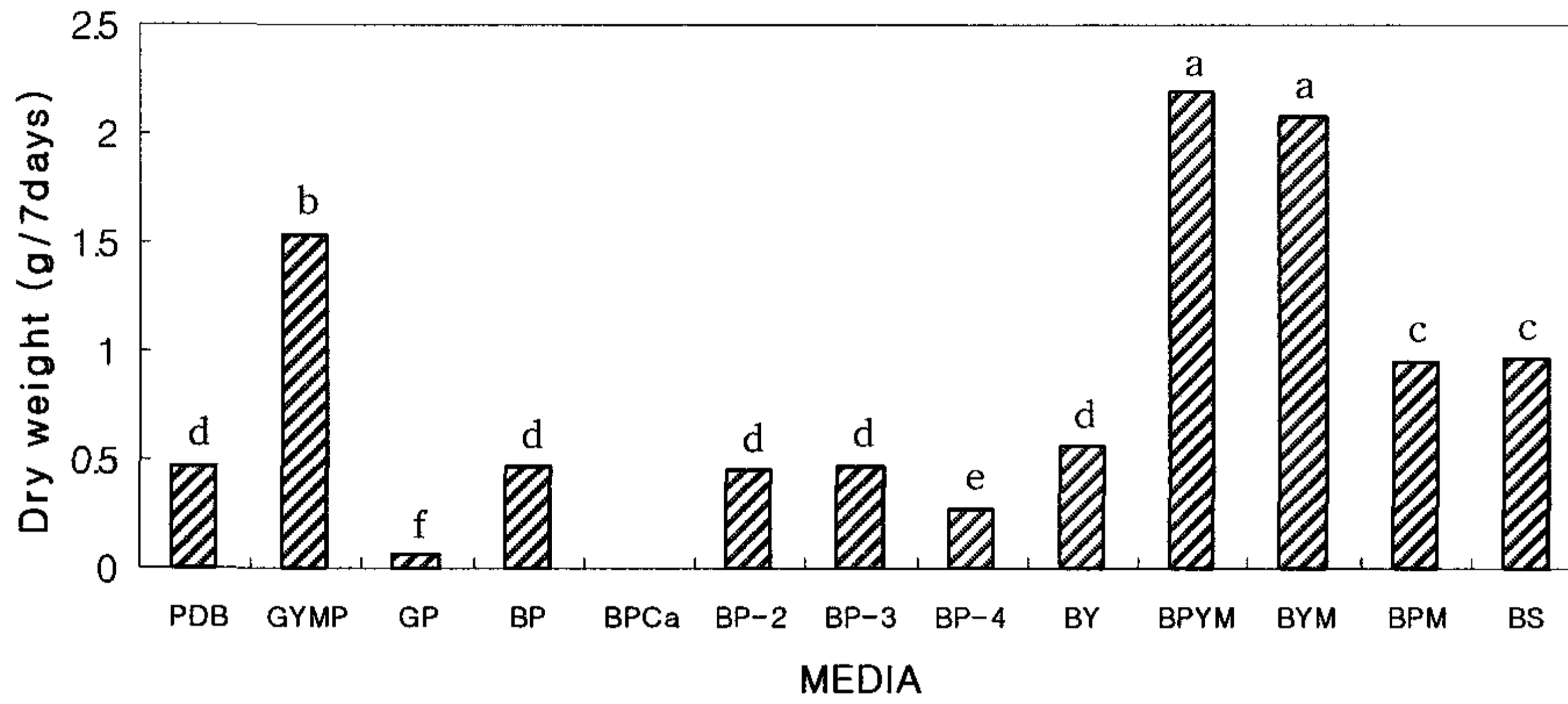


Fig. 23. Comparison in mycelial growth of *Lentinus lepideus* in different liquid culture media. The same letters on the bar are not significantly different ( $P = 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

나) 잣버섯 액체종균 배양기간별 균사 생산량 비교

- 배양기간에 따른 균사체량의 변화를 조사한 결과, 12일까지 균사체량은 급격히 증가하였고 그 후 부터는 증가량에 큰 변화가 없었다. (Fig. 24)

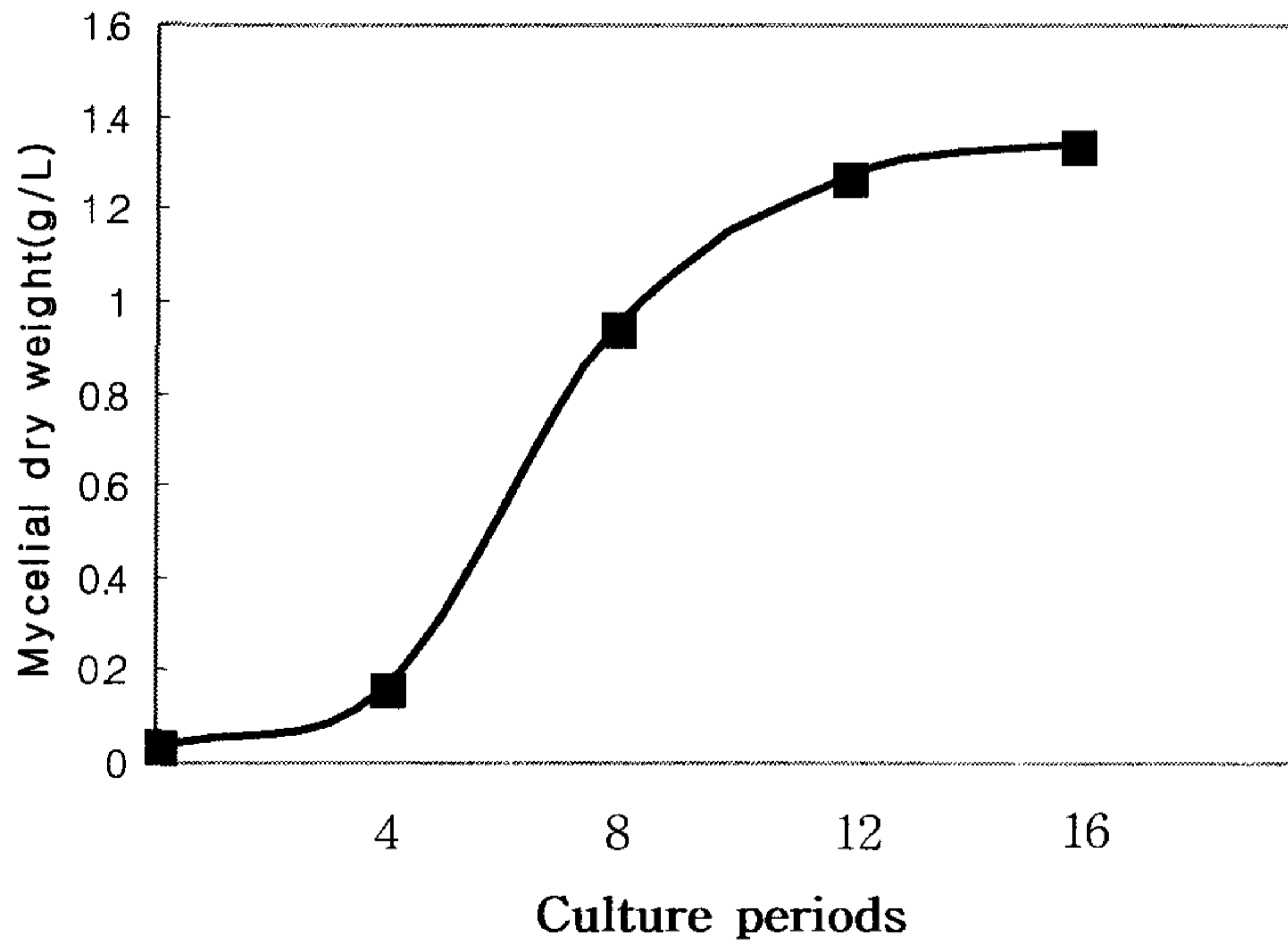


Fig. 24. Mycelial growth of *Lentinus lepideus* by culture periods.

다) 접종원 접종량에 따른 균사생장량 비교

- 잣버섯 액체배양시 접종원 접종량에 따른 균사체의 생산량을 조사한 결과 접종원을 배지 부피의 1%에서 가장 높은 균사 생장량을 보였고 접종량이 증가해도 균사체량에는 변화가 없었다 (Fig. 25).

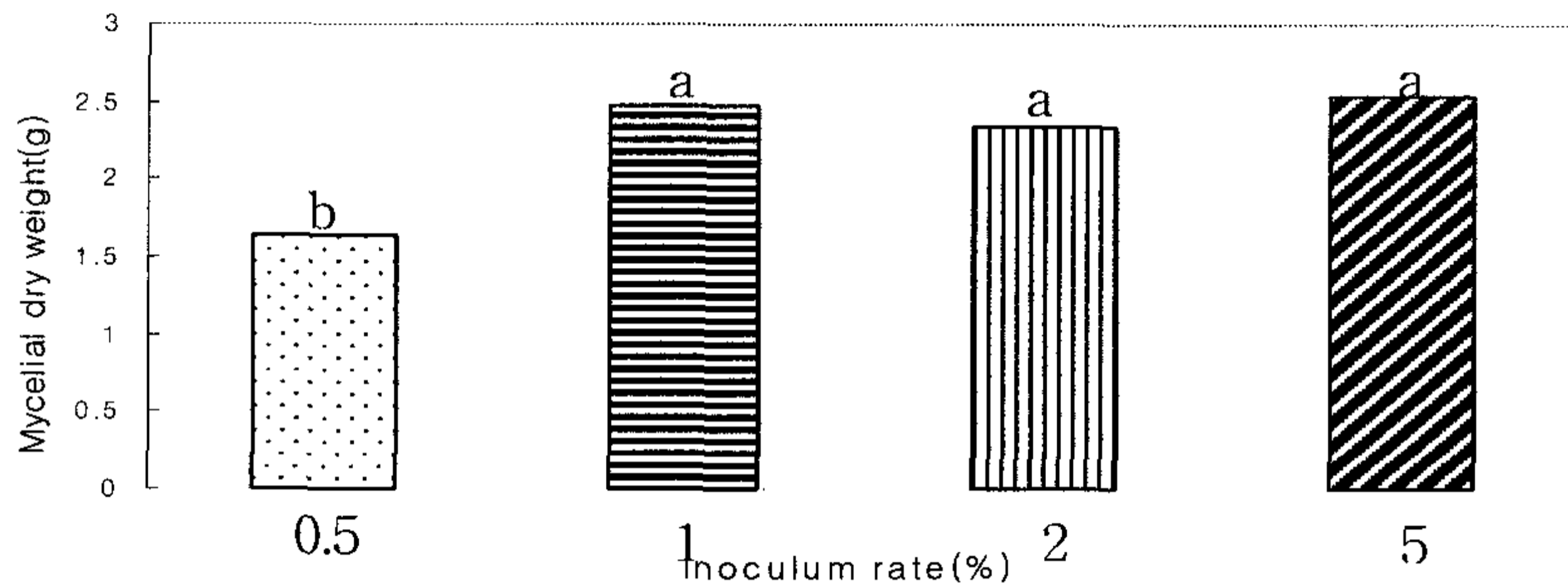


Fig. 25. Comparison in mycelial growth of *Lentinus lepideus* in different inoculum rate. The same letters on the bar are not significantly different ( $P = 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

라) 통기량에 따른 균사생장량 비교

- 잣버섯 액체배양시 통기 조건에 따른 균사체의 생산량을 조사한 결과 통기량 1vvm 처리에서 가장 높은 균사 생장량을 보였다 (Fig. 26).

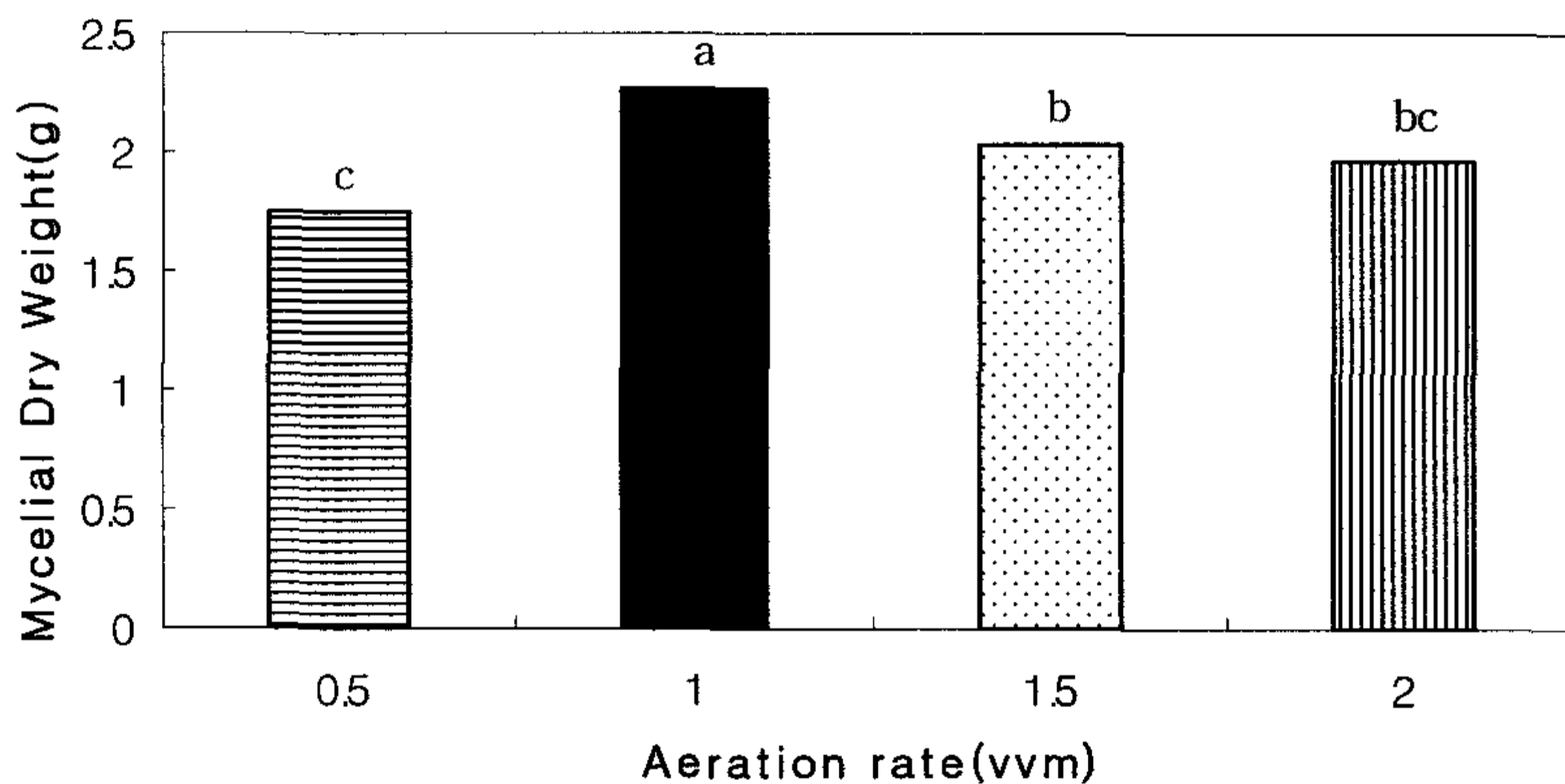


Fig. 26. Comparison in mycelial growth of *Lentinus lepideus* in different aeration rate. The same letters on the bar are not significantly different ( $P = 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

마) 액체종균과 톱밥종균 접종시 버섯생산 요구 기간 조사

- 액체종균과 톱밥종균을 동일한 톱밥배지에 접종하여 배양하였을 때, 원기가 형성되는데 까지 소요되는 기간은 액체종균 접종시 43일이 소요되고 톱밥종균 접종시 52일이 소요되어 톱밥재배에 의한 잣버섯 생산시 톱밥종균 대신 액체종균을 사용하면 종균의 생산부터 버섯생산의 초기단계인 원기형성시까지 총 44일의 기간을 단축할 수 있어서 버섯생산력을 증대시킬 수 있는 효과적인 방법으로 판단되었다. (Fig. 27)

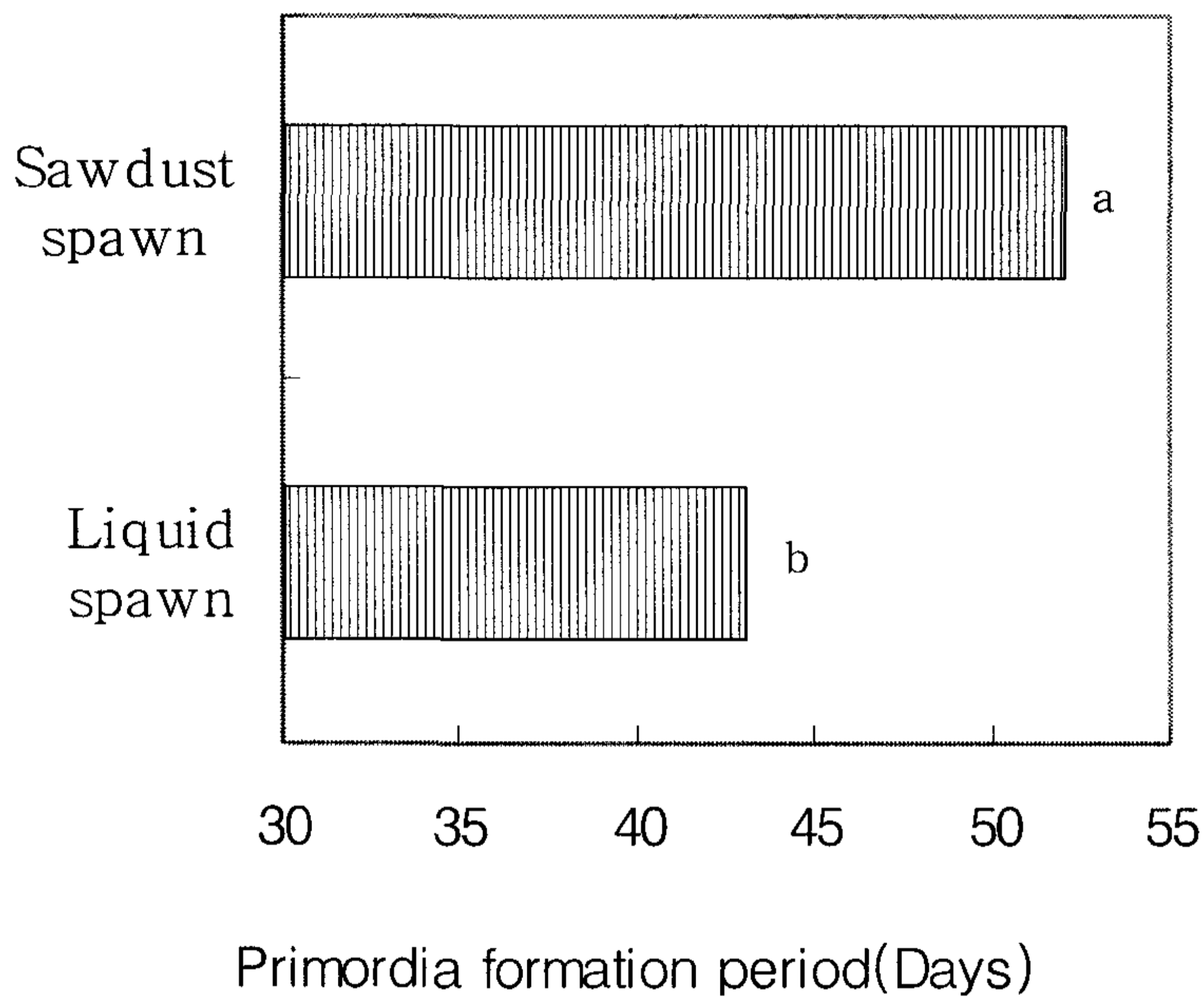


Fig. 27. Comparison of liquid and sawdust spawns in the periods required for primordia formation after inoculation onto sawdust media in bottle. The same letters on the bar are not significantly different ( $P = 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

바) 액체배지관련 잣버섯 생산량 비교

- 액체종균과 톱밥종균을 동일한 톱밥배지에 접종하여 배양한 후 자실체의 생산량을 비교한 결과, 액체종균 접종시 톱밥종균에 비해 상대적으로 생산량이 우수하였고 자실체 발생시 봉지를 완전히 개봉했을 때 생산량에 큰 변화는 없었다. (Fig. 28)

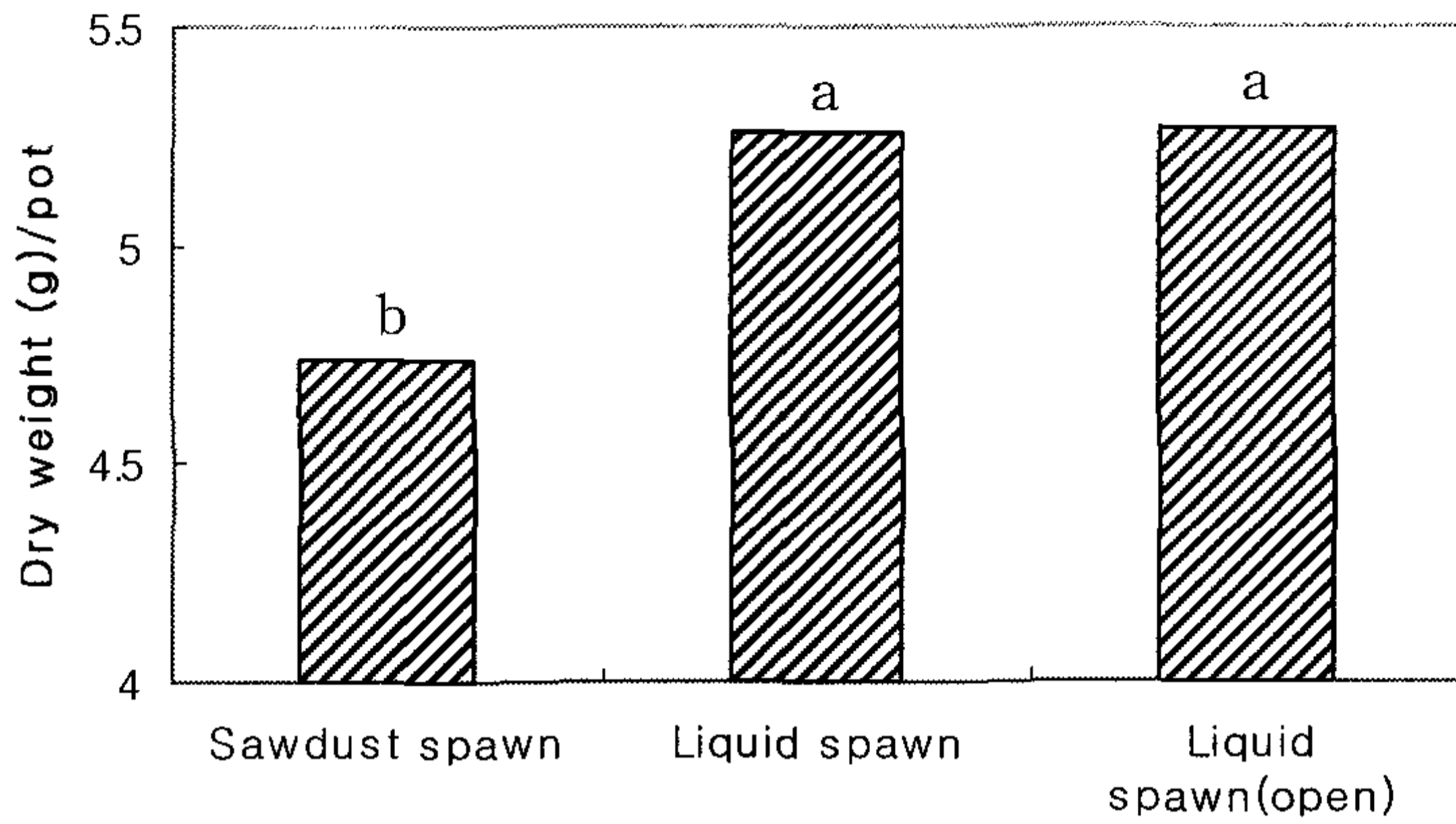
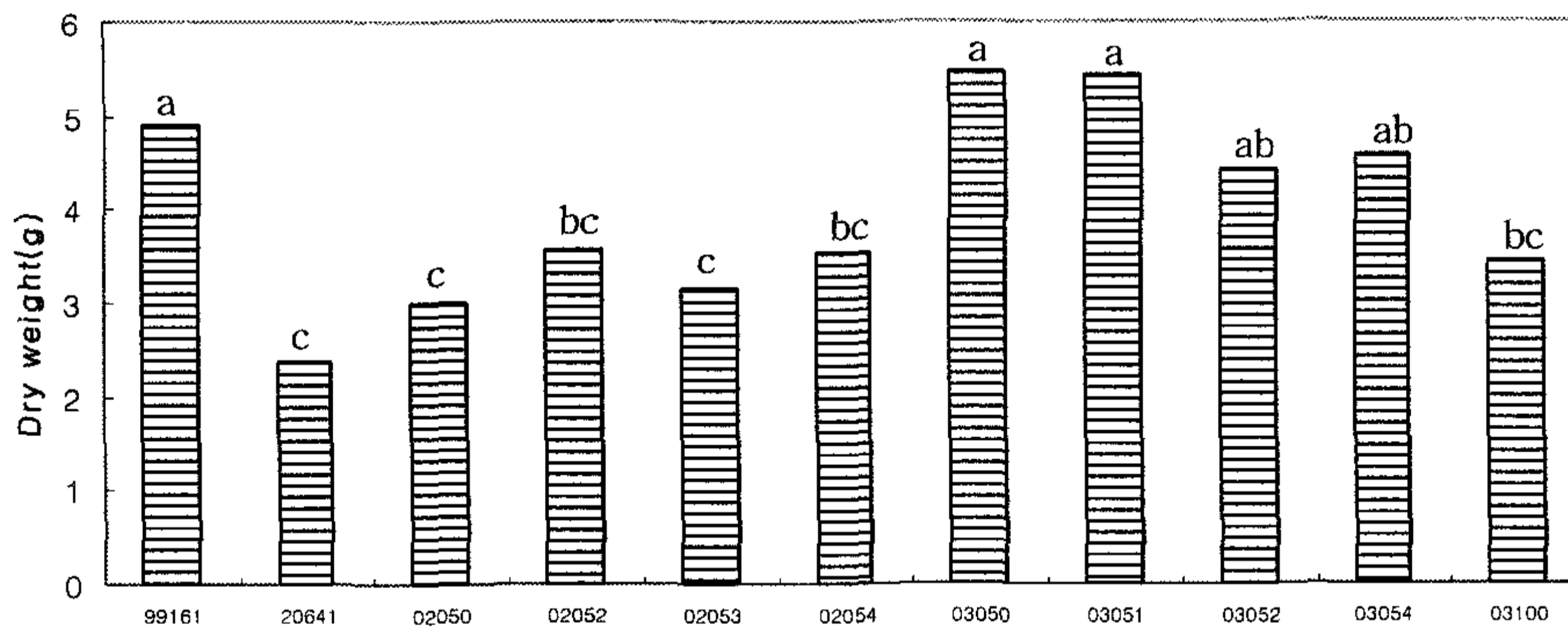


Fig. 28. Comparison of liquid and sawdust spawns in the amounts of fruiting body production. The same letters on the bar are not significantly different ( $P = 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

### 3) 잣버섯 대량생산기술 개발

#### 가) 잣버섯 균주별 자실체 생산량 비교

- 잣버섯 균주별 자실체 생산량(건중량)을 조사한 결과, 99161, 03050, 03051 균주가 자실체 생산량에 있어서 우수하였다 (Fig. 29).



#### *Lentinus lepideus* isolates

Fig. 29. Comparison of *Lentinus lepideus* isolates in the amounts of fruiting body production. The same letters on the bar are not significantly different ( $P = 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



나) 배지 첨가물이 자실체 생산량에 미치는 영향 비교

- 톱밥 배지 제조시 버섯나라와 목초액을 첨가하여 자실체 생산량을 비교한 결과, 버섯나라와 목초액 첨가물 모두 버섯생산량을 증가시켰으며, 특히 목초액 첨가시 가장 높은 생산량을 나타내었다 (Fig. 30).

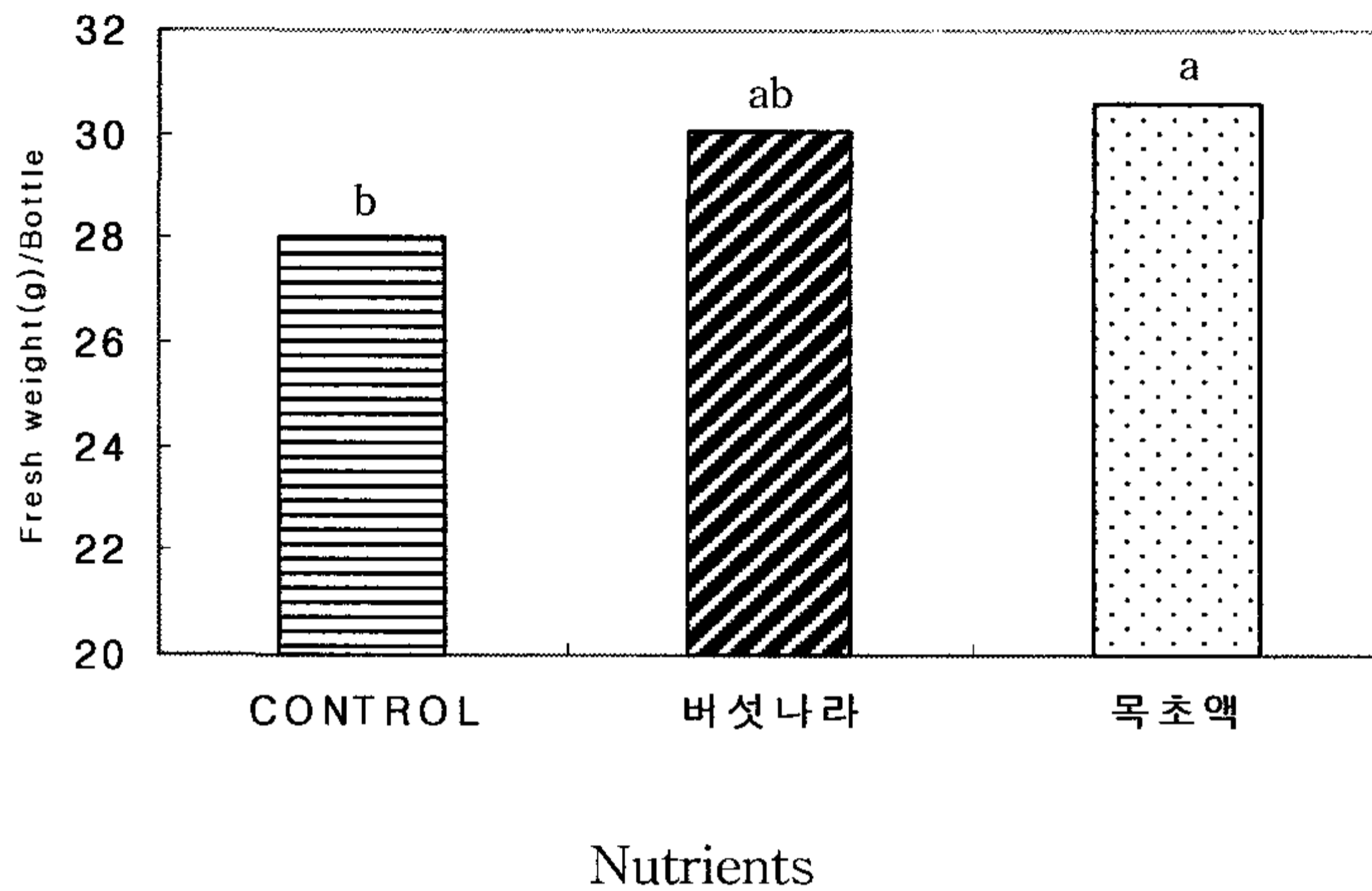
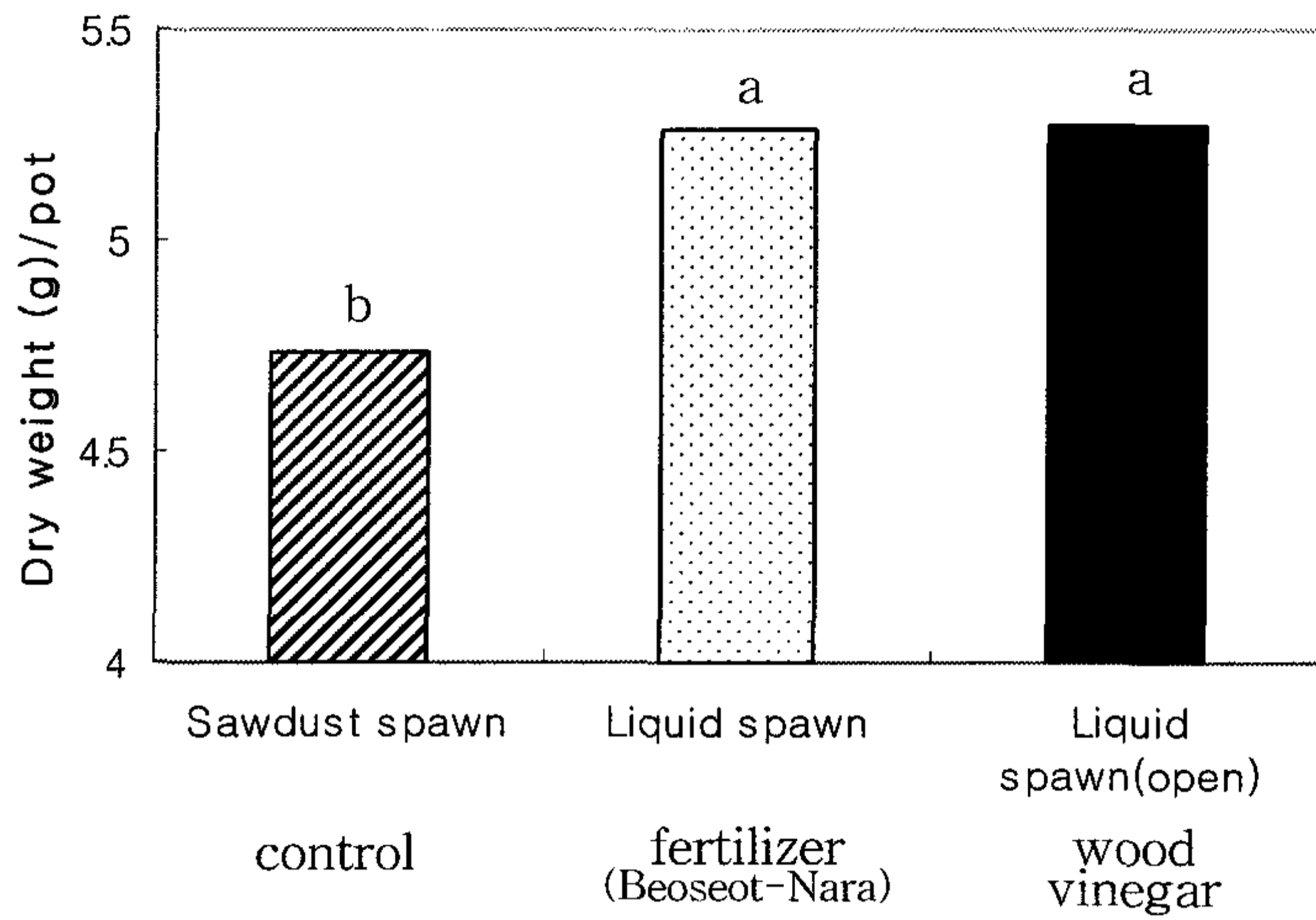


Fig. 30. Effects of additives to the sawdust media on the fruiting body production of *Lentinus lepideus*. The same letters on the bar are not significantly different ( $P = 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

다) 종균 종류에 따른 자실체 생산량 비교

- 액체종균과 톱밥종균을 동일한 톱밥배지에 접종하여 배양한 후 자실체의 생산량을 비교한 결과 액체종균 접종시 톱밥종균에 비해 상대적으로 생산량이 우수하였고 자실체 발생시 봉지를 완전히 개봉했을 때 생산량에 큰 변화는 없었다 (Fig. 31).



### Spawn types

Fig. 31. Comparison of liquid and sawdust spawns in the amounts of fruiting body production. The same letters on the bar are not significantly different ( $P = 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

라) 액체종균 접종시 배양기간에 따른 자실체 생산량 및 발이개수 비교  
 - 액체종균을 톱밥배지에 접종하여 28, 35, 42일간 배양한 후 자실체의 생산량을 비교한 결과, 28일간 배양한 처리에서 상대적으로 생산량이 우수하였고 35일간 배양한 처리에서 자실체 발생 개수가 상대적으로 많았다 (Fig. 32).

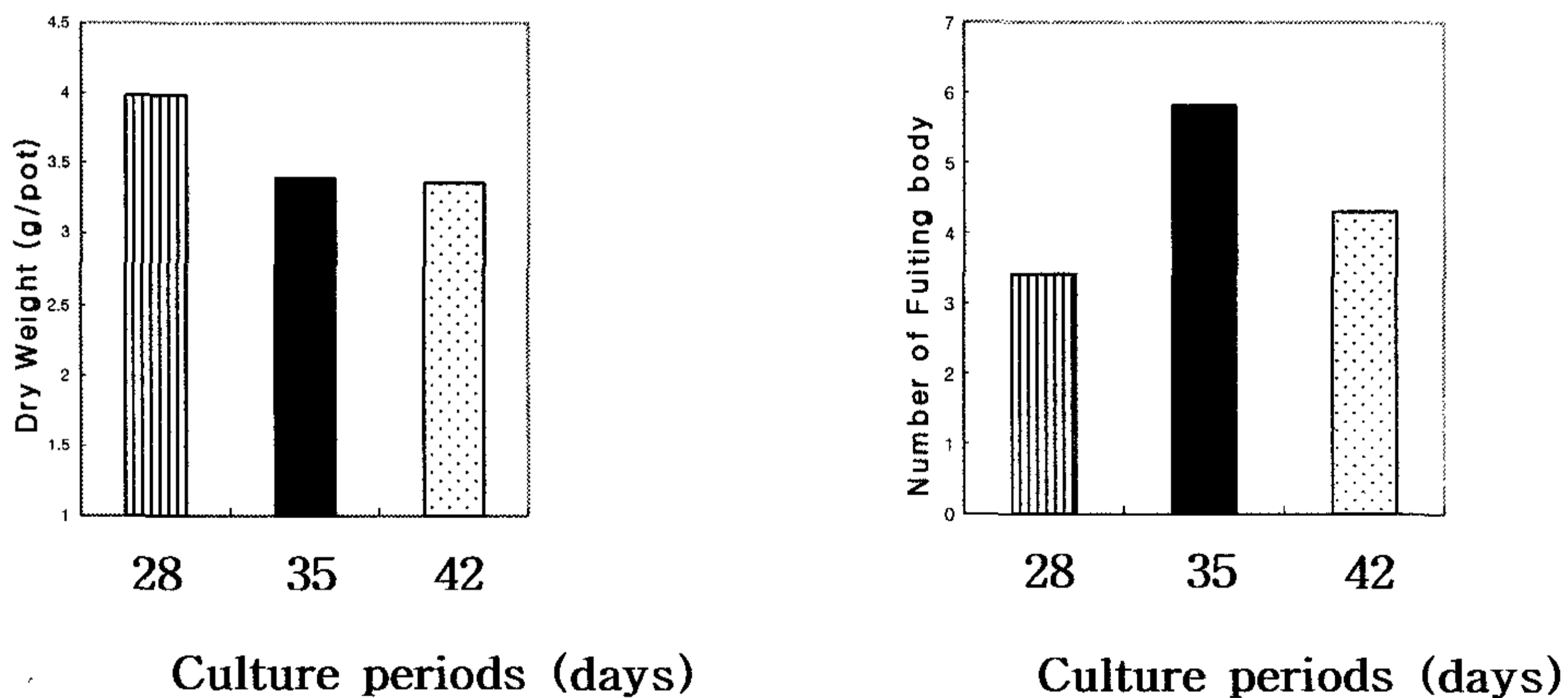


Fig. 32. Comparison in the amounts of fruiting body production of *Lentinus lepideus* in different culture period. The same letters on the bar are not significantly different ( $P = 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



Fig. 33. Fruiting bodies of *Lentinus lepideus* developed in sawdust medium

## 제 4 장      목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### [1차년도]

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	평가의 착안점	달성도 및 기여도 (%)	
1 차 년 도 (2 0 0 3)	잣버섯 추출물 의 사 이토카 인 활 성 화 작 용 메카니 즘 의 규명	<b>◆ 사이토카인 활성화 기전 연구</b> - Microarray를 통하여 인간 말초혈액에 활성화되는 사이토카인의 탐색 - cyclophosphamide 처리후 잣버섯 추출물에 의해 활성화되는 사이토카인을 microarray로 확인 - 사이토카인 유전자 발현을 Northern blot analysis에 의해 규명	잣버섯 추출물에 의한 사이토카인 활성화 확인 여부	15%	
			사이토카인의 활성화 기전 규명 여부	10%	
			유전자 발현 분석 여부	10%	
	잣버섯 추출물 의 적 응 증 탐색	<b>◆ 잣버섯 추출물의 면역 증가 활성의 분자생물학적 메카니즘 연구</b> - 조혈 및 면역증가 작용 - 면역세포의 활성화작용 - 항체 형성능 증가 및 대식세포 활성화 작용 연구	잣버섯 추출물의 조혈작용 확인 여부	15%	
			잣버섯 추출물의 면역활성 작용 확인 여부	10%	
			잣버섯 추출물의 면역세포 및 사이토카인에 대한 영향 확인 여부	10%	
	잣버섯 균주자 원 확 보 및 양 품 종 육 성	<b>◆ 잣버섯 균주자원 수집</b> - 잣버섯 자실체 채집 및 균주분리 - 국내외 유관기관 보유 잣버섯 균주 수집 <b>◆ 선발육종에 의한 균주 제조</b> <b>◆ 교잡육종에 의한 균주 제조</b> - 1핵 군사 교배(mono-mono 교배법) - 1핵 군사와 2핵 군사와의 교배(di-mon교배법)	잣버섯 균주 자원 확보 여부	15%	
			육종법에 의한 새로운 균주 제조 여부	15%	
	합계				100 %

[2차년도]

구분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	평가의 착안점	달성도 및 기여도 (%)
2차 년도 (2 0 0 4)	생리 활성 성분 분리 및 특성 규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 잣버섯 자실체 추출물의 ethanol 침전</li> <li>- DEAE-columechromatography, gel filtration 이용하여 분획화 한 후, 활성 성분의 동정</li> <li>◆ 생리활성성분에 대한 특성 규명</li> <li>- 분자량 규명</li> <li>- 구조 규명</li> </ul>	잣버섯 자실체의 생리활성 물질 분리 여부	15%
			생리활성 물질의 특성 규명 여부	15%
	잣버섯 추출물 의 효 능 연 구 및 제제화	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 면역 저하 동물 모델에서 효능 비교 및 작용 기작 연구</li> <li>- 기존 버섯제제와의 비교연구</li> <li>◆ 잣버섯 추출물의 제제화 연구</li> <li>- 생리활성성분 결과에 따른 잣버섯 추출물의 QC 분석법 확립</li> <li>- Boosaay 확립</li> <li>- 제제화 연구 및 안정성 연구</li> </ul>	잣버섯의 효능 비교 여부	10%
			잣버섯 추출물의 QC법 확립 여부	10%
			잣버섯 추출물의 제제 연구 여부	10%
	잣버섯 우량 액체 종균 배양 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 잣버섯의 배양 특성 규명</li> <li>- 배지별, 온도별, 수분정도별, pH별 균사생장</li> <li>◆ 액체종균배지의 조성에 따른 균사생장 및 활력 비교</li> <li>- 탄소원, 질소원, 무기염류, 비타민 등</li> <li>◆ 액체종균 배양조건 및 배양기간에 따른 균사생장량 비교</li> <li>- 정치배양, 진탕배양(요동, 통기) 등</li> <li>◆ 액체종균의 오염 및 활성 검사</li> <li>- 세균 및 진균의 오염, 균사의 활력 검사</li> <li>◆ 액체종균 대량배양 조건 규명</li> <li>- 액체종균 대량배양 조건 확립</li> </ul>	잣버섯의 배양특성 규명 여부	10%
			액체종균의 배지 조성, 배양조건 및 기간에 따른 균사생장비교 여부	10%
			액체종균의 활성 확인 여부	10%
			액체종균의 대량 배양조건 확립 여부	10%
	합계			

[3차년도]

구분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	평가의 착안점	기여도 및 달성도 (%)	
3차 년도 (2 0 0 5)	생리활성 성분의 면 역 활성화 메카니즘 규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 잣버섯 생리활성성분의 작용 메카니즘 연구</li> <li>- 생리활성성분에 의한 사이토카인 활성화 메카니즘 연구</li> <li>- 생리활성성분에 의한 대식세포 수용체 활성화 작용 메카니즘 연구</li> </ul>	잣버섯 생리활성 성분의 사이토카 인 활성화 작용 기전 규명 여부	10%	
			생리활성 성분의 대식세포 활성화 작용 기전 규명 여부	15%	
	잣버섯 추 출물의 제 제화	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 잣버섯 자실체 추출물 제제의 pilot 생산 및 다른 버섯과의 활성 비교</li> <li>- 생물학적 활성 검증을 통한 자실체 균주선발</li> <li>- 시험생산 원료 확보</li> <li>- 제형연구를 통한 시제품 제작</li> <li>- 다른 버섯과의 활성 비교</li> <li>◆ 기능성식품으로서의 개발을 위한 안전성 평가</li> <li>- 정상 생쥐를 통한 반복독성시험</li> </ul>	잣버섯 자실체 추출물 제제의 시험 생산 여부	15%	
			잣버섯 자실체 추출물의 안전성 평가 여부	15%	
	잣버섯 대 량생산기 술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 액체종균 접종에 의한 대량생산 기술 개발</li> <li>- 우량액체종균 접종에 의한 대량재배</li> <li>◆ 버섯생산성 비교</li> <li>- 고체 및 액체종균 재배시 버섯생산성 비교</li> <li>◆ 대량생산 시스템 최적화</li> <li>- 액체종균을 이용한 대량재배기술</li> </ul>	잣버섯 자실체의 대량생산 기술 개발 여부	15%	
			잣버섯의 생산성 비교 여부	15%	
			대량생산 시스템 의 최적화 여부	15%	
	합계				100%

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1절. 연구개발의 기대효과

#### 1. 기술적 측면

- 버섯추출물의 효능을 첨단 분자생물학적 방법을 이용하여 밝힘으로서 국제 경쟁력을 가짐
- 생리활성물질의 측정방법을 위한 새로운 기술을 축적.
- 생리활성물질의 구조결정을 위한 기술을 축적
- 농산자원의 생리활성성분에 대한 추출방법을 확립.
- 기능성을 표시할 수 있는 건강기능식품 개발을 위한 기술 축적 (효능 연구, 제제화 및 인체시험)
- 잣버섯 우량 액체종균 배양기술 개발.
- 새로운 식용/약용버섯 재배기술 개발 및 보급.
- 버섯재배기술 및 시설의 현대화, 자동화로 경쟁력 강화.

#### 2. 경제적 측면

- 차별화된 버섯의 상품화로 소비촉진 및 농산촌 수익증대.
- 고품질버섯의 생산으로 국내 수요 뿐만 아니라 수출품목으로 유망.
- 농산자원의 기능성소재가 밝혀진다면 경제작물은 물론 기능성 작물로서 각광.
- 약리적 농산자원으로서 개발됨으로써 농가 경제에 크게 기여.
- 신의약 소재 개발로 새로운 소득원의 창출.

#### 3. 파급효과

- 대량생산 기술개발로 잣버섯 재배를 희망하는 버섯재배농가가 다수 출현
- 새로운 식용/약용버섯의 재배에 대한 관심 고조로 버섯산업 육성
- 농산자원의 약리 효능 검증에 따른 소비촉진.
- 잣버섯 자실체 재배기술 보급으로 인한 농가의 소득 증대
- 버섯을 이용한 제품의 개발 범위 확대
- 연구 성과로부터 국내외 기술이전을 실시하여 수출 증대 및 수입 대체 효과 기대

- 과학적인 제품 개발을 통해 상품가치를 높이고 소비자의 신뢰도를 증진시킬 수 있음.
- 관련 논문 및 특허 획득에 기여할 수 있음.

## 제 2절. 활용방안

기능성 식품이 선진국 시장에 성공적으로 진출하기 위해서는 시장성과 독립성을 가진 ① 신규 제품이어야하며, ② 원료 확보가 가능하고, ③ 생물학적 효과를 증명하는 것은 물론 메카니즘을 규명할 수 있는 과학적 데이터가 있어야하며, ④ 동물실험에서 유효성과 안전성이 입증되어야 하고, ⑤ 관계기관에 적절한 인허가 과정을 거쳐야 한다. 본 연구는 이러한 모든 조건을 만족하기 위한 연구들로 잘 이루어져 있으므로 본 연구가 성공적으로 수행되면 선진국 시장에 진출 가능한 건강기능식품을 개발하게 된다.

- 본 연구 성과는 다수의 학술지 논문 게재 및 학술대회 발표자료로 활용되었음.
- 본 연구 성과를 바탕으로 최적의 생리활성을 나타내는 종균 및 이를 이용한 자실체 생산 기술에 대한 신규 특허를 국내외에 출원할 계획임.
- 잣버섯의 액체종균 개발기술은 특허 출원 및 산업화 기술이전이 가능하고 현장에서의 종균에 관련된 애로사항을 해결.
- 잣버섯의 생산기술 개발은 특허출원 뿐만 아니라 차별화된 상품화로의 개발이 가능.
- 대량생산 시스템의 최적화를 통하여 약리작용이 있는 기능성 물질의 추출 및 균류 유래 약용물질의 개발.
- 면역 조절 활성 및 조혈작용 기능을 갖는 잣버섯 자실체 추출물을 이용한 개별인정형 건강기능성식품 개발
- 축적된 연구 성과를 통해 다양한 식품 형태 (음료, 동물사료, 식품첨가제 등)로의 개발이 가능함.
- 다양한 면역 조절 활성 연구 및 산업화 연구를 통해 축적된 기반기술을 바탕으로 잣버섯 외의 새로운 소재 도출에 활용할 수 있으며 이 분야의 국제경쟁력을 획득할 수 있음.



### 제 3절. 추가연구의 필요성 및 기업화 방안

- 본 연구를 통해 대량생산된 잣버섯 자실체를 이용하여 인체에서의 기능성 및 안전성을 검증하기 위한 인체시험을 실시할 예정임.
- 인체시험이 성공적으로 종료되어 기능성 및 안전성이 검증되면 이를 개별인정형 건강기능식품으로 개발하기 위한 원료/성분 및 기준/규격에 대한 인정절차를 수행해야함.
- 이러한 절차를 수행함과 동시에 잣버섯 대량 배양 및 생산을 위한 농가와의 원료 OEM 계약을 실시하고 제약회사, 건강기능식품제조업체 및 식음료업체에 이를 기술이전하여 제품화를 실현할 계획임.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 1. 제품기술정보

- 첨단 분자생물학적 기법을 활용한 신기능 소재의 발굴은 건강기능식품은 물론 천연물신약 개발까지 가능하게 하며 이들의 주요 타겟은 면역 관련 질환임.

Table 1. 1998년 이후 전세계 주요 시장에서 발매된 천연물 신약

(Source: Nat Prod Rep. 2005 Apr;22(2):162-95)

발매년도	일반명 (상품명)	Lead compound	유래	적응증
1998	Orlistat (Xenical)	Lipstatin	반합성	항비만
1998	Cefoselis (Wincel)	Cephalosporin	천연물 유래	항박테리아
1999	Dallopristin and quinupristin (7:30 혼합물) (Synercid)	Streptogramin B and streptogramin A	반합성	항박테리아
1999	Vaurubicin (Vaistar)	Doxorubicin 144	천연물 유래	항종양
1999	Colforsin daropate (Adele, Adehl)	Forskolin	반합성	강심제
2000	Arteether (Artemotil)	Artemisinin 40	반합성	항말라리아
2001	Ertapenem (Invanz)	Thienamycin	천연물 유래	항박테리아
2001	Caspofungin (Candicid)	Pneumocandin B	반합성	항진균제
2001	Telithromycin (Keleek)	Erythromycin 19	반합성	항박테리아
2001	Pimecrolimus (Elidel)	Ascomycin	반합성	아토피성 피부염
2002 (유럽, 미국)	Galantamine (Reminyl)	Galantamine	천연물	알츠하이머
호주에서는 Nivalin이라는 상품명으로 1996년 발매				
2002	Amrubicin hydrochloride (Caised)	Doxorubicin	천연물 유래	항종양제
2002	Micafungin (Funguard)	FF901379	반합성	항진균제
2002	Biapenem (Omegaicin)	Thienamycin	천연물 유래	항박테리아
2002	Nitisinone (Orfadin)	Leptospermone	천연물 유래	anti-tyrosinaemia
2003	Miglustat (Zavesca)	1-Deoxynojirimycin	반합성	type 1 Gaucher disease
2003	Mycophenolate sodium (Myfortic)	Mycophenolic acid	천연물	면역억제
2003	Rosuvastatin (Crestor)	Mevastatin	천연물 유래	이상지질혈증
2003	Pitavastatin (Livalo)	Mevastatin	천연물 유래	이상지질혈증
2003	Daptomycin (Cubicin)	Daptomycin	천연물	항박테리아
2004	Everolimus (Certican)	Sirolimus 91	반합성	면역억제

주: 천연물: 임상시험이나 시판을 위하여 합성된 경우 포함  
 천연물 유래: 천연물을 주형(template)으로 하여 합성  
 반합성 (Semi-synthetic): 천연물을 주형으로 하여 반합성  
 생약혼합물 (herbal mixture)등은 제외

## 2. 학술정보

- 학술적인 연구 측면에서 잣버섯에 대해 현재까지 발표된 논문은 다음과 같음.

1. Choi JJ, Jin M, Lee JK, Lee WY, Park YI, Han YN, Kim S. Control of cytokine gene expression by PG101, a water-soluble extract prepared from *Lentinus lepideus*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Jan 20;339(3):880-7.

2. Jin M, Jeon H, Jung HJ, Kim B, Shin SS, Choi JJ, Lee JK, Kang CY, Kim S. Enhancement of repopulation and hematopoiesis of bone marrow cells in irradiated mice by oral administration of PG101, a water-soluble extract from *Lentinus lepideus*.

*Exp Biol Med (Maywood)*. 2003 Jun;228(6):759-66.

3. Jin M, Jung HJ, Choi JJ, Jeon H, Oh JH, Kim B, Shin SS, Lee JK, Yoon K, Kim S. Activation of selective transcription factors and cytokines by water-soluble extract from *Lentinus lepideus*. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003 Jun;228(6):749-58.

4. Kim BK, Kang JH, Jin M, Kim HW, Shim MJ, Choi EC. Mycelial protoplast isolation and regeneration of *Lentinus lepideus*. *Life Sci*. 2000 Feb 25;66(14):1359-67.

5. Jin M, Kim S, Kim BK. Induction of B cell proliferation and NF-kappa B activation by a water soluble glycan from *Lentinus lepideus*. *Int J Immunopharmacol*. 1996 Aug-Sep;18(8-9):439-48.

6. Duncan CG, Deverall FJ. Degradation of Wood Preservatives by Fungi. *Appl Microbiol*. 1964 Jan;12(1):57-62.

7. SHIMAZONO H. Investigations on lignins and lignification. XXI. Identification of phenolic esters in the culture medium of *Lentinus lepideus* and the O-methylation of methyl P-coumarate to methyl P-methoxycinnamate in vivo. *Arch Biochem Biophys*. 1959 Jul;83(1):206-15.

8. SHIMAZONO H, NORD FF. Identification of methyl-p-coumarate as a metabolic product of *Lentinus lepideus*. Arch Biochem Biophys. 1958 Nov;78(1):263-4.

9. Birkinshaw JH, Findlay WP. Biochemistry of the wood-rotting fungi: Metabolic products of *Lentinus lepideus* Fr. Biochem J. 1940 Jan;34(1):82-8.

- 상기와 같이 현재까지 게재된 잣버섯 관련 논문은 전세계적으로 총 9편에 불과하며 이중 잣버섯의 생리활성에 대한 논문은 본 연구진의 의해 발표된 4편의 논문(1, 2, 3, 5)이 전부임.

## 제 7 장      참고문헌

1. Agrios, G. N 1997. Plant Pathology. 4th ed. Academic press. New York and London.
2. Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., and Blackwell, M. 1996. Introductory Mycology. John Wiley.
3. Block, S. S., Taso, G. and Han, L. 1958. Production of mushrooms from sawdust. J. Agric. Food. Chem. 6 : 923-927
4. Borchers AT, Stern JS, Hackman RM, Keen CL, Gershwin ME. Mushrooms, tumors, and immunity. Proc Soc Exp Biol Med 221: 281-293, 1999
5. Bruns, T. D., White, T. J. and Taylor, J. W. 1991. Fungal molecular systematics. Ann. Rev. Eco. syst. 22 : 525-565
6. Chang, S. T., and Miles, P. G. 1989. Edible Mushrooms and Their Cultivation. 345 pp. CRC Press.
7. Chang, S. T. et al. 1993. Mushroom Biology and Mushroom Products. 370 pp. The Chinese University of Hong Kong.
8. Chase, T. E. and Ullrich, R.C. 1985. Genetics of intersterility in *Heterobasidion annisins*. Mycolgical of Americ, News letter 36(1):20
9. Day, P, R. 1978. Evolutionary of incompatibility. In Genetics and Morphogenesis in the Basidiomycetes. Academic press : New york. pp. 67-69.
10. Elliott, T. J. 1995. Mushroom Science XIV. Science and Cultivation of Edible Fungi. Proc. 14th Int'l Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi. Vol. I, II. Oxford, Sep. 17-22, 1995. Balkema, Rotterdam.

11. Fraser, I. M. and Fujikawa, B. S. 1958. The growth promoting effect of several amino acids on the common cultivated mushroom, *A. bisporus*. *Mycologia*. 50 : 538-549.
12. Hammond, J. B. W. 1986. Carbon and mushroom growth. *The Mush. J.* 165 : 316-321.
13. Hasimoto, K. and Takahashi, Z. 1974. Studies on the growth of *Pleurotus ostreatus*. *Mush. Sci.* 9(1) : 585-593.
14. Hong, J. S. 1978. Studies on the physiochemical properties and the cultivation of Oyster mushroom. *Kor. J. Agri. Chem. soc.* 21 : 150-184.
15. Hong, J. S. and Kang, K. H. 1983. Fruit-body formation of *Pleurotus florida* on the synthetic medium. *Kor. J. Mycol.* 11(3) : 121-128.
16. Jin M, Kim S, Kim BK. Induction of B cell proliferation and NF-kappa B activation by a water soluble glycan from *Lentinus lepideus*. *Int J Immunopharmacol* 18: 439-448, 1996.
17. Jin, M., Jung, H.J., Choi, J.J., Jeon, H., Oh, J.W., Kim, B., Shin, S.S., Lee, J.K., Yoon, K., and Kim, S.Y. 2003. Activation of selective transcription and cytokines by water-soluble extracts from *Lentinus lepideus*. *Experimental Biology and Medicine* 228(6):749-758.
18. Jin, M., Jeon, H., Jung, H.J., Kim, B., Shin, S.S., Choi, J.J., Lee, J.K., Kang, C.Y., and Kim, S.Y. 2003. Enhancement of repopulation and hematopoiesis of bone marrow cells in irradiated mice by oral administration of PG101, a water-soluble extracts from *Lentinus lepideus*. *Experimental Biology and Medicine* 228(6):759-766.
19. Kang, T. S. and Chun, B. I. 1988. Studies on the production of liquid spawn of *Pleurotus ostreatus*. The Institute of Industrial Technology. Kangwon National University. 8 : 13-21.

20. Kies, U. and Liu, Y. 2000. Fruiting body production in basidiomycetes. *Appl. Microbiol.* 54 : 141-152. Song, C. H. and Cho, K. Y. 1987. A synthetic medium for the production of submerged cultures of *Lentinus edodes*. *Mycologia* 79(6) : 866-876.
21. Lee, S.B., Milgroom, M.G. , and Taylor, J.W. 1988. A rapid, high yield miniprep method for isolation of total genomic DNA from fungi. *Fungal Genet. Newsletter* 35:23-24.
22. Liu F, Ooi VE, Fung MC. Analysis of immunomodulating cytokine mRNAs in the mouse induced by mushroom polysaccharides. *Life Sci* 64: 1005-1011, 1999.
23. Maher, M. J. 1991. Mushroom Science XIII. Science and Cultivation of Edible Fungi. Proc. 13th Int'l Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi. Vol. I, II. Dublin, Sep. 1-6, 1991. Balkema, Rotterdam.
24. Przybylowicz, P. and Donoghue, J. 1988. Shiitake Growers Handbook. the Art and Science of Mushroom Cultivation. 217 pp. Kendall/Hunt Publishing Co.
25. Song, C. H., Moon, H. Y. and Ryu, C. H. 1997. Artificial cultivation of *Phellinus linteus*. *Kor. J. Mycol.* 25(2) : 130-132.
26. Van Griensven, L.J.L.D. 2000. Mushroom Science XV. Science and Cultivation of Edible Fungi. Proc. 15th Int'l Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi. Vol. I, II. Maastricht, Netherland, May 15-19, 2000. Balkema, Rotterdam.
27. Wasser SP, Weis AL. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit Rev Immunol* 19: 65-96, 1999
28. Zadrazil, F. 1974. The ecology and industrial production of *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus cornucopiae*, and *Pleurotus eryngii*.

Mush. Sci. 9 : 621-652.

29. 강안석, 1999, 개암버섯균의 생리적특성 및 자실체 유도에 관한 연구. 충남대학교 박사학위논문. p5.
30. 강안석, 차동열, 홍인표, 장현유, 유승현. 1994. 개암버섯의 균사생장에 영향을 미치는 배양조건에 관한 연구. 한국균학회지 Vol. 22, No 2, p153-159.
31. 강원대학교 농촌개발연구소. 1996. 버섯경쟁력 제고방안 세미나. 42 pp.
32. 강치덕. 2001. 중앙면역치료법연구동향-보건산업기술동향. 한국보건산업진흥원
33. 강태수, 1995, 영지균사체의 액체배양에 의한 세포내 생물고분자의 생산에 관한 연구. 강원대학교 박사학위논문, p10-17.
34. 고민규, 김현중. 1995. 잣버섯 톱밥재배기술 개발. 산림과학논문집. 51:96-100.
35. 김성원. 1979. 잣버섯의 성분 연구(I) 한국균학회지 Vol 7, No 1, p9-11.
36. 김창진, 이동훈, 신광수. 1996. 한국산 고등 담자균류의 배양적 특성. Natural Science (Taejon University) Vol. 7, No. 2, p39-46.
37. 김한경. 1998. 팽나무버섯(*Flammulina velutipes*)의 재배적 특성과 흰곰팡이병의 병원학 및 방제. 동아대학교 박사학위논문.
38. 김한경, 박용환, 차동열, 정환채. 1987. 표고버섯톱밥 인공재배에 관한 연구. 한국균학회지. Vol 15, No 1, p42-47.
39. 김한경, 박정식, 김양섭, 차동열, 문병주. 1994. 잣버섯 인공 재배에 관한 연구 (I)-균사 배양 조건에 관하여-. 한국균학회지 Vol. 22, No 2, p145-152.
40. 김현중, 고민규. 1995. 새로운 임산버섯 “잣버섯과 뽕나무버섯”의 톱밥재배. 버섯재배 신기술 개발 특별강연회, 한국균학회 p54-66.



41. 김현중, 고민규. 1995. 잣버섯 톱밥재배기술 개발. 산림과학논문집 51 : p96-100.
42. 박동수. 1998. 원형느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*)의 액체종균의 배양적 특성 및 인공재배에 관한 연구. 강원대학교 석사학위논문.
43. 박찬준, 김교수, 전개상, 박용길. 1988. 잣버섯의 생리적 특성에 대한 연구. 임업연구원 연구보고 36 : p110-114.
44. 박찬준 외. 1988. 잣버섯의 생리적 특성에 대한 연구. 임연 연보. 36:110-114.
45. 성재모, 유영복, 차동열. 1998. 버섯학. 교학사. 589-594 pp.
46. 심재욱, 손서규, 윤상욱, 이윤수, 이태수, 이상선, 이갑득, 이민웅. 1998. 꽃송이버섯의 균사생장을 위한 최적요인. 한국균학회지 Vol 26, No 1, p39-46.
47. 이지열. 1988. 원색 한국버섯도감. 365 pp. 아카데미서적.
48. 윤건호. 2004 면역조절기술개발연구동향-보건산업기술동향. 한국보건산업진흥원
49. 장성희. 2003. 잣버섯균의 생리적특성 및 부후특성. 전남대학교 석사학위논문.
50. 정광교, 한영환. 1997. 잣버섯(*Lentinus lepideus* DGUM 25050)의 균사생육을 위한 배지조성의 최적화. 동국대학논문집 16권 2호, 동국대학교 경주캠퍼스.
51. 조용백. 2006. 천연물의약품국외시장동향 157p-168p. 시장동향. 한국보건산업진흥원
52. 진미림, 정규선, 1999. 잣버섯 균사체로부터 분리한 수용성 단백질단백체 lepidan의 면역 증가 작용. 약학회지 Vol 43, No 5, p635-641.
53. 홍재식, 이지열, 김명숙, 김동한. 1986. *Lyophyllum decastes*의 심부배양에 의한 균체생장에 관한 연구. 한국균학회지 Vol 14, No 2, p131-139.