

고등균류인 *Inonotus obliquus* 균사체의 대량 액상배양을 통한
항당뇨 효능의 기능성 식품개발

(Development of functional foods with anti-diabetic activity through
pilot-scale fermentation of a filamentous fungus, *Inonotus obliquus*)

전북대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “고등균류인 *Inonotus obliquus* 균사체의 대량 액상배양을 통한 항당뇨 효능의 기능성 식품개발” 과제 (제1 세부과제 “*Inonotus obliquus* 균사체의 pilot 규모 발효조에서의 자동화 액상배양공정 개발을 통한 항당뇨 효능의 단백질다당체 대량 생산”, 제2 세부과제 “순수 정제된 *Inonotus obliquus* 추출물질의 생리활성 평가를 통한 고안정성의 항당뇨/비만 효능의 기능성 식품 개발”, 제1 협동과제 “항당뇨 효능의 단백질다당체 고생산성의 *Inonotus obliquus* 변이주 개발 및 배양 특성 연구”, 제2 협동과제 “*Inonotus obliquus* 배양 균사체로부터 항당뇨 효능의 단백질다당체 고순도 청정 분리정제 공정 개발”)의 보고서로 제출합니다.

2009년 4월 24일

주관연구기관명 : 전북대학교

주관연구책임자 : 정 용 섭

세부연구책임자 : 차 연 수

협동연구기관명 : 강원대학교

협동연구책임자 : 전 계 택

협동연구기관명 : (주)에스티알 바이오텍

협동연구책임자 : 이 상 중

요 약 문

I. 제 목

고등균류인 *Inonotus obliquus* 균사체의 대량 액상배양을 통한 항당뇨 효능의 기능성 식품 개발

제1 협동과제: 항당뇨 효능의 단백다당체 고생산성의 *Inonotus obliquus* 변이주 개발 및 배양 특성 연구

제1 세부과제: *Inonotus obliquus* 균사체의 pilot 규모 발효조에서의 자동화 액상배양공정 개발을 통한 항당뇨 효능의 단백다당체 대량 생산

제2 협동과제: *Inonotus obliquus* 배양 균사체로부터 항당뇨 효능의 단백다당체 고순도 청정 분리정제 공정 개발

제2 세부과제: 순수 정제된 *Inonotus obliquus* 추출물질의 생리활성 평가를 통한 고안정성의 항당뇨/비만 효능의 기능성 식품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

- 고등균류(higher fungi)인 버섯은 오래전부터 맛과 영양이 풍부하여 식품으로 애용되어 왔을 뿐 아니라 약용 등의 목적으로도 널리 이용되어 왔다. 특히 질병의 치료 및 예방에 효과가 있는 천연물 중 가장 주목받고 있는 담자균류(*Basidiomycetes*) 버섯은 이들의 광범위한 약리작용으로 인해 한방의학에서도 널리 활용되고 있다. 최근 담자균류 유래 약용버섯들의 항암효과가 과학적으로 입증되고 있으며, 약용버섯 추출물 중에서 특별히 면역증강작용에 의해 탁월한 항암효능과 당뇨병 개선효과를 보이는 생리활성물질은 β -D-Glucan 구조를 갖는 수용성 단백다당체 (향후 “단백다당체”로 명명함)로 구성되어 있음이 밝혀졌다. 이중에서도 특히 대표적인 담자균류에 속하는 차가버섯 유래의 단백다당체는 면역증강 효과와 함께 인슐린 분비 촉진작용에 의한 혈당강하 효능이 탁월한 것으로 밝혀져 당뇨개선 약효를 갖는 새로운 생리활성물질로 주목을 받고 있다.
- 전적으로 수입에 의존하고 있는 고가의 *Inonotus obliquus* (차가버섯) 자실체를 대체할 뿐만 아니라 기존의 경구용 당뇨치료제의 한계를 극복할 수 있는 제품을 개발하기 위하여, 항당뇨 효능의 단백다당체를 고생산할 수 있는 *Inonotus obliquus* 균주를 개발함과 동시에, 항당뇨 효능이 있는 것으로 밝혀진 농산물을 배양배지화한 *Inonotus obliquus* 균사체의 고농도 배양기술을 개발하고(제1 협동과제), 대형 발효조를 이용해서 *Inonotus obliquus* 균사체의 대량 액상배양공정 기술을 구축하고자 한다(제1 세부과제). 또한 고품질의 항당뇨물질인 수용성 단백다당체를 고순도로 대량 회수하기 위한 청정 분리정제공정을 개발하고(제2 협동과제), 순수 정제된 단백다당체의 효능 실험을 통해 이들의 항당뇨 생리활성 기능을 체

계적으로 연구하고, 이 물질에 대한 안전성 평가 연구를 통해 고안정성의 항당뇨 기능성 식품을 개발하고자 한다(제2 세부과제).

2. 최종연구목표

- *Inonotus obliquus* 균사체의 원형질체 형성 및 재생을 통한 세포벽 단백질(IPS) 및 세포외 단백질(EPS) 고생산성 변이주 개발
- 단백질 고생산성 및 고성장성 변이주의 신속 선별과 대량 배양 시스템 확립
- 고생산성 *Inonotus obliquus* 균사체의 stock 보관법 개발
- 다단계의 배양공정으로 구성된 일련의 종균배양공정 기술 개발
- 통계적 방법에 의한 배지성분 및 배지농도 최적화
- Scale-up 생산배양 공정 및 분리정제 공정에 대비한 저가의 산업용 복합 배지 개발
- Bench-scale 발효조에서의 고생산성 균주의 배양 생리적 특성 및 배양 형태적 특성 조사
- 생물반응기 시스템 설계
- 고생산성 변이주의 scale-up 배양공정에 이르는 일련의 산업용 배양공정 확립
- Pilot 규모 발효조에서의 scale-up 배양 및 시제품 생산
- 배양공정 자동화를 통한 조업변수 예측 및 용존산소농도 자동 제어기술 개발
- 유용 물질 분석법 확립 및 추출 분리 정제 공정 개발
- β -glucan구조의 수용성 단백질 등 유용물질 분석법 확립
- 기능성을 개선시킨 β -glucan 구조의 수용성 단백질 제조
- Lab-scale의 청정 분리정제 공정 개발
- 기능성을 개선시킨 β -glucan 구조의 수용성 단백질 제조 연구 지속적 수행
- 청정 분리정제 공정의 규모 확대(scale-up) 연구
- Pilot 규모의 열수추출조 설계 및 pilot 규모의 여과 공정 개발
- Pilot 규모의 미세/한외여과공정 개발 및 pilot 규모의 단백질 건조공정 설계
- 청정 분리정제 공정의 scale-up 전략 확립
- 세포주를 이용한 차가버섯 균사체 및 자실체 추출물의 항비만/당뇨 효능 검증
- 식이유도 비만/당뇨 실험동물 모델에서 차가버섯 자실체 추출물 투여의 항비만/당뇨 효능평가 및 생체내 작용기전 연구
- 식이유도 비만/당뇨 실험동물 모델에서 차가버섯 균사체 추출물 투여의 항비만/당뇨 효능평가 및 생체내 작용기전 연구 및 건강기능식품 개발

3. 연구개발의 필요성

- 항당뇨 효능의 단백질 고생산성의 *Inonotus obliquus* 변이주 개발 및 배양 특성 연구 (제1협동과제)의 필요성
- 당뇨 개선 약효가 뛰어난 것으로 알려진 *Inonotus obliquus* 등의 담자균류는 성장조건이 까

다로워 번식이 잘 되지 않아 야생의 것은 너무 비싸고 희귀하여 구입하기가 쉽지 않다. 최근 들어 인공재배에 의해 자실체를 생산하고 있으나 긴 생산기간과 낮은 생산성으로 인해 소비자가 원하는 저렴한 가격에 판매가 어려운 실정이다. 최근 여러 종류 버섯들의 항당뇨작용 및 면역증강작용에 의한 항암효과가 과학적으로 입증되었으며 이러한 효능을 나타내는 성분은 β -D-glucan 구조를 갖는 단백다당체로 밝혀졌다.

- 발효조를 이용한 *Inonotus obliquus*의 성장배양 및 생산배양공정은 균사체를 이용한 액상배양공정이다. *Inonotus obliquus*의 경우 균사체로 존재할 때에는 포자를 형성하지 않기 때문에 종균의 액체 장기보관이 어렵고 액상배양에서 계속 계대하여 종균으로 사용할 경우 오염의 위험성 및 균주 변이의 위험성과 함께 종균 상태에 따라 생산성이 크게 달라지는 등 조업에 많은 어려움이 존재할 수밖에 없다. 일반적으로 종균보관은 solid-stock의 고체보관법에 의존하고 있으나, solid-stock으로 부터 발효조의 균사체 액체배양까지 걸리는 시간이 너무 길어 세포생산성 및 단백다당체의 생산성을 떨어뜨리는 주요 요인으로 작용하고 있다. 따라서 장기적인 보관이 가능한 액체보관법을 개발하여 균주를 안정적으로 관리함으로써 발효조 배양 시 단백다당체 생산의 안정성을 높이고 또한 높은 생산성을 유지시켜야 한다.
- *Inonotus obliquus*의 면역증강작용에 의해 항암 및 항당뇨 성분으로 밝혀진 베타글루칸 구조의 단백다당체는 특별히 고안된 정제과정을 거쳐 정제된 조단백다당체에도 5% 이하의 함량을 나타내는 미량성분이다. 따라서 rational screening 방법과 원형질체를 이용한 고생산성 변이주 선별 및 원형질체 융합균주 개발을 통해 항당뇨 효과가 높은 고농도의 단백다당체를 생합성할 수 있는 *Inonotus obliquus* 균주의 개발이 필수적이다.
- *Inonotus obliquus*와 같은 고등균류의 경우 배지 성분에 따라 배양생리적 및 배양형태적 특성이 확연히 달라진다. 따라서 생산성 향상을 위해서는 적절한 양의 배지가 공급되어야 함은 물론, 각 영양원의 성분 및 조성의 최적화가 필수적이다. 배지 최적화를 수행할 때 단일 요소에 대해서만 변화를 줄 경우, 영양원간의 상호작용을 제대로 파악할 수 없으므로 최적 조성을 찾기 힘들며, 여러 요소를 전체적으로 살펴볼 경우 과도한 실험양으로 인한 한계에 직면하게 된다. 이러한 어려움을 해결하기 위해 Plackett-Burman 디자인이나 Response surface 방법 등의 통계적 처리를 통해 신속하고 효율적인 산업용의 저가 복합배지 개발 연구가 수행되어야 한다.

○ *Inonotus obliquus* 균사체의 pilot 규모 발효조에서의 자동화 액상배양공정 개발을 통한 항당뇨 효능의 단백다당체 대량 생산 연구 (제1세부과제)의 필요성

- 고등균류인 *Inonotus obliquus* 균사체는 균사형성 미생물으로써 독특한 3차원적인 균사구조로 인해 발효배양액에 심각한 점도 증가 현상이 발생하여 산소 및 영양분 전달이 저조하고, 이를 방지하기 위해 무리하게 교반속도를 증가시킬 경우 전단응력(shear stress)이 발생하여 이에 민감한 균사체 배양경우 발효조에서의 고농도 액상배양이 어렵게 되는 문제점이 존재한다.
- 선별된 고생산성 균주들을 액체보관법에 의해 보관한 후, 이 liquid-stock으로부터 직접 액체 배양에 들어가면 적응시간 없이 바로 본격적인 배양에 들어갈 수 있어 많은 시간을 절약할 수 있으므로 생산성 향상을 기대할 수 있다. 따라서, liquid-stock으로 보관할 경우 초기 액

체배양에 있어서 균사체 성장을 활성화시킬 수 있는 배양공정 개발이 필요하다.

- 개발된 고생산성 균주의 발효조에서의 배양을 통해 고생산성 균주 각자의 배양생리적 특성 및 배양형태적 특성 조사가 이루어져야 한다. 특히, 배지 종류, 접종량, 접종시기, 교반기의 속도 및 종류에 따른 배양 특성 조사를 통해 최적의 pellet size (직경 1 mm 이하) 형성을 위한 배양조건이 확립되어야 한다. 또한 scale-up시 가장 중요한 배양변수인 용존산소농도가 단백질다당체 생합성 및 생산균주의 성장속도에 미치는 영향에 대한 집중 조사를 통해 배양공정의 scale-up 자료가 확보되어야 한다. 특히 배양기의 교반속도 증가에 따른 shear stress가 생산균주의 배양형태 및 단백질다당체 생산성에 미치는 영향 조사 및 이에 근거한 최적의 용존산소농도 결정이 이루어져야 하며, 동시에 최적의 용존산소 공급량이 결정되어야 한다.
- Pilot 규모 생산배양 시, *Inonotus obliquus* 균사체의 morphology를 균사형태가 아닌 작은 pellet으로 유도함으로써 점도 증가 방지와 함께 생산성을 향상시킬 수 있으나, 균사체가 pellet 형태로 유도되는 배양 환경적 조건에 대해서는 전혀 밝혀지지 않고 있다. 따라서접종량, 배지의 조성 및 배양기간 등의 초기 접종조건과 함께 배양기내 물리화학적 환경조건에 대한 최적화 연구를 통해 최적 morphology를 얻을 수 있는 액상배양공정이 개발되어야 한다.
- Lab-scale의 연구결과를 산업화하기 위해서는 확대된 규모의 pilot-scale의 발효공정에 대한 연구가 필수적으로 이루어져야 한다. 즉 대규모의 산업적 배양시스템에서는 균일성 유지가 어렵고, 부피에 대한 표면적 비의 변화로 인해 산소공급과 열 제거 등 복잡한 설계요건을 요구하며, 또한 배양 중 거품발생과 같은 다양한 문제가 발생한다. 산업적 발효조의 이러한 복잡한 특성 때문에 대규모 발효기의 배양환경은 크게 다르다고 할 수 있다. 따라서 산업화를 이루기 위해서는 pilot-scale의 배양공정에 대한 집중적인 연구가 체계적으로 이루어져야 한다.
- 기존의 발효조에서의 균사체 액상배양공정은 대부분 수동식 배양공정으로 세포대사의 정확한 조절이 어려울 뿐만 아니라 생산성이 낮은 단점이 있다. 따라서 액상배양공정 개발을 통한 균사형성 미생물인 *Inonotus obliquus* 균사체의 고농도 배양에 있어서 배양공정의 주요변수(예, 산소농도, 세포농도, 영양분 농도)를 on-line으로 측정할 수 있는 기술뿐만 아니라 공정운전을 컴퓨터로 정밀하게 제어할 수 있는 자동화 배양시스템이 개발될 경우, 이러한 문제점들이 효율적으로 극복될 수 있어서 기존의 수동식 배양공정에 비해 더 높은 생산성 향상을 기대할 수 있다.

○ *Inonotus obliquus* 배양 균사체로부터 항당뇨 효능의 단백질다당체 고순도 청정 분리정제 공정 개발 (제2협동과제)의 필요성

- 배양균사체에 있어서 면역활성물질인 베타글루칸 구조의 수용성 단백질다당체 등의 생리활성 물질은 단단한 세포벽에 결합되어 보호받고 있으므로 추출 조건이나 방법에 따라 최종수율이 크게 다르게 된다. 따라서 유용물질의 함량을 올리기 위해서는 단백질다당체 고생산성 균주 개발과 함께 효과적인 추출, 분리, 농축공정의 개발이 요구된다. 따라서 본 과제에서는 단백질다당체 등의 유용물질의 효율적 생산을 위한 환경친화적 청정 분리정제공정을 개발하고자 한다.

- 대부분의 생물산업 제품의 경우 배양액에 함유되어 있는 성분조성은 대단히 복잡함에도 불구하고 상대적으로 높은 순도가 요구된다. 또한 여러 단계의 분리정제 단위공정을 거쳐야 하고 이에 따라 분리정제공정이 차지하고 있는 생산비용은 발효공정을 포함한 전체공정의 절반 이상을 차지한다. 또한 발효제품이 분리정제공정을 거치는 동안 손실되어 수율이 저하되기 때문에 분리공정의 최적화는 전체 공정의 경제성을 향상시킬 수 있는 절실한 과제임에도 불구하고, 막분리 기술 등 효율적인 분리정제기술이 아직까지 확보되어 있지 못한 실정이다. 그러므로 상업성이 있고 회사에게 수익을 가져오기 위해서는 효과적이고 효율적이며 훌륭히 설계된 분리정제공정의 개발이 필수적이며 이를 위해 기초연구 및 실용화 공정 개발이 필요하다.
- 특히 약용버섯 유래 면역활성물질인 단백다당체는 단일성분이 아니라 α -glucan 등 수용성 고분자물질과 함께 분리정제되며 단백질 함량이나 분자량에 따라 활성이 다른 여러 분획을 갖고 있다. 이 중 어느 분획의 활성이 특히 더 높으며, 생리활성에 직접적으로 관여하는 분획은 어느 것인지 제대로 밝혀져 있지 않아, 본 연구에서는 단백다당체의 명확한 구조 해석과 정량분석, 그들의 구조와 면역활성과의 상관관계에 대한 연구를 수행하고자 한다.
- 실용화 분리정제공정 개발을 위해서는 lab-scale의 기초연구를 바탕으로 pilot plant-scale의 공정을 개발하면서 scale-up에 따르는 설계자료 및 운전 자료를 비교 분석하여 scale-up 전략 수립 및 설계인자 도출 등의 일련의 단계적 실용화 연구가 기본적으로 필요하다. 따라서 최종목표인 실용화 공정 개발을 위해서는 우수 균주 선정, 발효공정, 분리정제 공정 등 각 기능상의 공정 개발도 성공적으로 수행되어야 하지만, 각 공정에서도 scale에 따른 단계적 연구가 유기적으로 연관되어 수행되어야 하므로 각 분리정제 단위공정 하나하나에 대한 기초적인 연구를 바탕으로 최적 조합한 lab-scale의 분리정제 공정의 개발이 pilot-scale의 분리정제 공정개발 이전에 선행되어 수행되어야 한다.
- 또한 실용적인 단백다당체의 분리정제공정을 개발하기 위해서는 새로운 환경친화적 청정 분리정제공정의 개발이 요구된다. 즉 단일 용매만으로도 분리, 정제가 가능한 분리정제공정의 개발이 요구되므로 pilot scale의 공정 개발에 앞서 이러한 새로운 분리정제공정의 개발이 필요하다. 특히 최근 산업 전 분야에 청정공정으로의 전환이 세계적으로 요구되면서 1970년부터 다양한 막의 개발로 막에 의한 분리정제법이 각광을 받게 되었다. 따라서 이러한 막분리에 의한 분리정제 방법의 기초 연구 및 lab-scale, pilot-scale 공정으로의 개발이 절실히 요구된다.

○ 순수 정제된 *Inonotus obliquus* 추출물질의 생리활성 평가를 통한 고안정성의 향당뇨/비만 효능의 기능성 식품 개발 (제2세부과제)의 필요성

- *Inonotus obliquus* 유래 단백다당체 성분의 건강기능성 식품을 개발하기 위해서는 분리된 단백다당체를 함유한 건강기능성 식품의 안전성 확보가 매우 중요하다. *Inonotus obliquus* 추출물인 단백다당체에 대한 독성시험이나 임상평가를 통해 안전성과 효능을 확보한 가운데 건강성, 편의성, 관능성, 시장성을 고려한 제품의 연구개발이 이루어져야 한다. 또한 단백다당체 이외에도 알려진 효능에 대한 성분을 과학적으로 밝히는 것이 필요하다고 사료되어, 본 과제에서는 단백다당체 이외의 생리활성성분에 대해서도 연구를 수행하고자 한다.

- 당뇨병은 인슐린 처방이 필요한 제1형 당뇨와 인슐린저항성 혹은 인슐린분비의 상대적 결핍으로 인해 발생하는 제2형 당뇨가 있는데, 우리나라의 경우 제2형 당뇨가 전체 당뇨환자의 90~95%를 차지하고 있다. 제2형(인슐린 비의존형) 당뇨환자의 경우 대부분 약물요법으로 혈당을 조절하고 있으나 시간이 경과함에 따라 점점 많은 양의 약물 복용이 요구되므로, 그에 따른 부작용이 많다. 근래에 와서는 오랫동안 민간요법으로 사용되어 왔던 천연식물의 혈당강화 효과에 대한 관심이 증대되고 이 분야에 대한 많은 연구가 수행되고 있다.
- 최근 한약재를 이용한 식품이 환경호르몬의 영향을 상쇄하거나 면역시스템을 활성화 시켜 질병에 대한 생체방어 시스템을 보강 한다는 연구결과가 속속 밝혀짐에 따라 한약재를 이용한 건강기능식품 및 약용식품의 산업화가 주목을 받고 있다.
- 버섯은 세계적으로 약 8,000여종이 존재하는 것으로 알려져 있으나, 이들 중 대부분은 아직 개발되지 않고 있어 앞으로 이 분야의 개발 가능성이 풍부하다고 할 수 있다.
- 그중 차가버섯은 상황버섯 및 아가리쿠스에 비해 β -glucan의 함유량이 높아 혈중 콜레스테롤 감소효능이 매우 우수하며, 위 내용물의 점성을 증가시키고, 위 공복시간을 지연시키며, 포도당을 흡착하여 배설하게 함으로써 혈당증가를 억제시키는 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.
- 천연물을 이용한 건강기능 제품을 개발하기 위해서는 천연물로부터 유효성분을 추출·농축·정제·분리하는 기술의 확립이 필요하며, 한약재를 함유한 건강기능식품 개발에 있어서 안전성 확립이 매우 중요함. 한약재의 유효성분에 대한 독성시험이나 임상평가를 통해 안전성과 효능을 확보한 가운데 건강성, 편의성, 관능성, 시장성을 고려한 제품의 연구개발이 이루어져야 한다.
- 이러한 관점에서, 본 연구과제를 통해 항비만/당뇨 물질을 고생산할 수 있는 차가버섯균주를 개발하고 차가버섯균사체의 고농도 배양기술을 확립함으로써 항비만/당뇨 물질을 대량생산하기 위한 산업화 체제를 갖추며, 비만/당뇨 동물 모델을 통해 그 효능을 연구하는 것은 건강기능식품 산업에 도움을 줄 수 있는 현장적용기술개발사업이라 사료된다.
- 따라서, 본 제2세부과제는 비만 및 제2형 당뇨유발 세포 및 질병모델 실험동물에서 차가버섯균사체 추출물의 보강이 체내 지질개선 및 혈당조절 효과를 검증함으로써, 건강기능식품 개발을 위한 기초자료를 제공하여 새로운 건강기능식품을 개발 하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

○ 제 1 협동과제

- 원형질체 형성 및 재생을 통한 단백다당체 고생산성 변이주 개발
- Rational screening에 의한 고생산성 변이주의 신속 선별 방법 확립
- 단백다당체 고생산성 변이주의 대량 선별과 대량 배양 방법 확립
- 단백다당체 대량생산 scale-up 배양공정에 대비한 저가의 산업용 복합 생산배지 개발
- 고생산성 균주의 원형질체융합을 통한 단백다당체 고생산성 균주 개발
- 단백다당체 고생산성 원형질 융합균주의 대량 선별과 대량 배양 방법 확립

- 고생산성 원형질 융합 균주의 플라스크 배양에서의 배양특성 조사
- 신규 개발된 고생산성 원형질 융합균주에 적합한 배지 최적화 연구 지속적 수행
- 최종 확립된 고생산성 균주의 배양 생리적 특성 및 배양 형태적 특성 체계적 분석
- 고생산성 생산균주의 유가식 배양에서의 배양생리적 특성 조사
- 최종 확립된 생산균주의 scale-up 배양공정 연계 및 단백질다당체의 분리정제 공정과 연계된 저가의 복합 생산배지 최종 확립

○ 제 1 세부과제

- 발효조에서의 생산균주의 배양 생리적 특성 규명
- 발효조에서의 생산균주의 배양 형태적 특성 규명
- 담자균류 균사체의 액상배양을 위한 최적 발효조 설계
- 고생산성 균주의 유가식 배양공정 개발
- 고생산성 균주의 회분식 배양과 유가식 배양 공정 생산성 비교 분석
- 발효조의 용존산소 농도 자동 조절 배양 기술 개발
- 온라인 컴퓨터를 이용한 배양공정 자동제어 기술 개발
- 산소전달계수 (k_{La})에 근거한 담자균류 균사체의 액상배양 공정 scale-up 전략 확립
- Pilot 규모의 대형 발효조 운전조건 확립
- Pilot 규모의 대형 발효조 설계
- 배양변수의 온라인 자동 측정 및 추정을 위한 배양공정 자동화기술 개발

○ 제 2 협동과제

- β -glucan구조의 수용성 단백질다당체 등 유용물질 분석법 확립
- 기능성을 개선시킨 β -glucan 구조의 수용성 단백질다당체 제조
- Lab-scale의 청정 분리정제 공정 개발
- 기능성을 개선시킨 β -glucan 구조의 수용성 단백질다당체 제조 연구 지속적 수행
- 청정 분리정제 공정의 규모 확대(scale-up) 연구
- Pilot 규모의 열수추출조 설계 및 pilot 규모의 여과 공정 개발
- Pilot 규모의 미세/한외여과공정 개발 및 pilot 규모의 단백질다당체 건조공정 설계
- 청정 분리정제 공정의 scale-up 전략 확립

○ 제 2 세부과제

- 3T3-L1 preadipocyte의 분화진행 정도 조사
- 분화유도물질 첨가에 따른 지방축적 정도 조사
- 3T3-L1의 지질 및 단백질 함량 조사 및 CPT-I 등의 mRNA 발현 조사
- 베타세포라인에서의 인슐린 분비능 탐색 및 당대사관련 지표 조사
- 실험동물 사육
- 혈당, 내당능 조사 및 지질 성분 함량 조사
- 지방 및 간 조직 성장 조사 및 카르니틴 분석

- CPT-I, ACS 및 ACC mRNA 발현 조사 및 혈중 Insulin 조사 및 혈중 HbA1c 조사
- 간중 glycogen 함량 조사 및 α -glucosidase 및 aldose reductase 활성 조사
- 항당뇨 효능의 기능성 식품 개발

IV. 연구개발결과

(1) 제 1 협동과제: 항당뇨 효능의 단백다당체 고생산성의 *Inonotus obliquus* 변이주 개발 및 배양특성 연구

Inonotus obliquus 균사체의 액상배양을 통한 항당뇨 효능의 단백다당체 대량생산 배양공정 개발하고자, (i) 특별히 장기간의 배양시간이 요구되어 신속한 균주개발에 있어서 가장 큰 장애요소로 작용하는 계대배양(고체성장배양)시의 문제점을 극복하기 위해 통계적 방법에 의한 계대배양 배지 최적화, (ii) 원형질체 형성, 돌연변이 유발 및 원형질체 융합을 통한 지속적인 단백다당체 고생산성 균주의 선별, (iii) 통계적 방법을 적용한 IPS 대량 생산용 액상 배양배지 최적화, (iv) 고생산성 균주의 배양생리적 특성 및 배양 형태적 특성 연구, (v) 용존산소가 결핍된 배양환경에서도 고생산성 능력을 갖는 유전자재조합 *Inonotus obliquus* 개발 연구를 수행하였다.

특별히 장기간의 배양 시간이 요구되어 신속한 균주개발 시 가장 큰 장애요소로 작용하는 계대배양(고체성장배양) 단계의 문제점을 극복하고자, 계대배양 환경의 최적화에 대한 연구를 중점적으로 수행하였다. 계대배양 시 균사체 성장에 효능이 탁월한 배지성분을 선별하기 위해 Plackett-Burman design 실험을 통해서 유의성 높은 배지 성분을 찾아내었고, 이에 근거한 fractional factorial design(FFD) 실험을 통해 배지 성분 상호간의 관계를 분석할 수 있었다. 또한 이 FFD 실험결과에 근거해서 설계한 steepest ascent method 실험방법을 적용한 결과, 계대배양 시 균사성장 직경이 기존의 MA 배지 대비 약 41% 더 증가했을 뿐만 아니라 균사의 밀도도 크게 향상된 배지조성을 결정할 수 있었다. 또한 SAM 연구결과를 바탕으로 최적의 계대배양 배지조성을 확립하고자 각 배지성분의 최적 농도를 통계적으로 더욱 정밀하게 조사하는 RSM(response surface method) 실험을 수행하였다. 그 결과 최적 계대배양배지의 성분과 농도는 glucose 25.61g/l, brown rice 12.53 g/l, peptone 12.53 g/l, magnesium sulfate 5.53 g/l 인 것으로 최종 확인되었다.

한편 *Inonotus obliquus*는 균사체로 성장할 때 포자를 형성하지 못하므로 단일 세포를 얻기가 힘든 것으로 확인되었다. 따라서 원형질체로부터 형성된 단일 세포를 얻어 내어, 그 중에서 성장 능력과 단백다당체의 생산성이 높은 균주를 지속적으로 선별하였다. *Inonotus obliquus* 균사체의 경우 세포벽의 단백다당체의 함량이 세포 무게당 거의 일정한 양을 함유하고 있는 것으로 관찰되었으므로, 세포벽 단백다당체(intrapolysaccharides)(IPS)의 생산성을 증가시키기 위해서는 액상 배양 시 균사체의 생산량 증가가 가장 중요한 요인으로 확인되었다. 또한 세포의 단백다당체(extrapolysaccharides)(EPS)의 생산 시에도 고농도 균사체 배양이 우선되어야 하므로 원형질체 형성을 통한 고생산성 균주 개발 시 균사의 성장속도가 빠른 변이주를 우선 선별한 후, 이로부터 EPS의 생산능이 우수한 균주를 선별하는 전략을 채택하였다. 최종 액

상 생산배양에서 IPS 고생산성의 균주를 개발하기 위해, 이미 선별된 고생산성 균주들의 균사체를 UV 처리한 후, 생존한 원형질체로부터 고생산성 변이주들을 지속적으로 선별한 결과, 18~22 g DCW/L 범위의 균체생산성을 보이는 우량균주들을 다수 선별할 수 있었다. 특별히 본 연구를 통해 이미 선별된 고생산성 균주일지라도, 이 균주로부터 다시 우량균주를 선별하는 경우에는 고체배양에서 가능한 한 많은 수의 콜로니를 얻은 후에, 잘 자라지 않는 균주를 선별과정에서 미리 제외시켜야만 최종 액상배양에서의 균주 선별의 효율성을 매우 높일 수 있음을 확인하였다. 또한 고생산성 변이주들끼리의 원형질체 융합법을 개발하였으며, 특별한 표지인자를 사용하지 않고 융합 파트너 각각의 돌연변이에 의해 유전자 재조합 균주를 선별하는 방법을 확립하였는데, 일반적으로 원형질체 융합방법에서 유전자재조합빈도(recombination frequency)가 약 1×10^{-3} 인 것을 감안해 볼 때, 본 연구에서 개발한 변이원 처리를 통한 융합균주의 선별방법은 유전자재조합체의 선별 확률을 크게 증대시킬 수 있는 효율적인 방법인 것으로 확인되었다. 또한 EPS 고생산성 균주를 선별하기 위해 균사체 돌연변이 유발, 원형질체 형성, 재생 및 변이주 선별을 위한 고체배양 등의 전 과정을 IPS 고생산성 균주개발 방법과 동일하게 진행하였다. 그 결과 5.0 g/L 이상의 EPS 생산성을 보이는 7개의 균주를 선별할 수 있었으며, 각 균주들의 3배수 실험을 통해 EPS의 생산 안정성을 조사함으로써, EPS 고생산성 일뿐만 아니라 EPS의 생산 안정성도 뛰어난 EPS-13 균주를 최종 선별할 수 있었다.

또한 세포벽다당체(IPS) 생산성 증가를 위해 통계적 방법을 적용해 생산배지 성분과 농도를 최적화하는 연구를 수행하였다. 우선 OAFT(one factor at a time) 실험을 통해 각 배지성분이 균사체 생산성에 미치는 영향을 조사하였으며, Plackett-Burman design 방법에 의해 다양한 배지조합으로 배양한 실험결과로부터 각각의 배지성분 들에 대한 main effect를 분석함으로써 균사체 생산성에 큰 영향을 미치는 주요 성분을 찾아내었다. 또한 선별된 배지성분 들의 상호 영향까지 조사하기 위해 full factorial 또는 fractional factorial design(FFD) 실험을 수행하였고, 이 FFD 실험결과에 근거해서 추정된 steepest ascent method(SAM)의 설계값을 이용해서 각 배지성분의 최적 농도를 거의 결정한 후, 이 SAM의 실험결과를 바탕으로 배지성분의 최적 농도를 정밀하게 조사하는 통계적 방법인 RSM(response surface method) 실험을 수행하였다. 그 결과 기존의 생산배지 대비 균사체 생산성이 약 30% 더 증가했을 뿐만 아니라 생산 안정성도 뛰어난 배지조성을 결정할 수 있었다. 또한 RSM에 의해 수행된 최적 생산배지 조성에서의 생산균주의 배양형태(morphology)는 고농도 배양에 최적으로 알려진 compact한 pellet 형태(pellet 직경: 0.5~1.0 mm)의 morphology를 띄었는데, 이로부터 최적화된 배지조성 뿐만 아니라, 최적의 배지성분이 제공해주는 훌륭한 배양형태적 특성에 의해 균체생산성이 증가되었다고 결론지을 수 있었다. 다른 한편으로 특별히 oil 성분이 첨가된 생산배지를 개발하고자 하였는데, 그 이유는 오일의 경우 소모된 오일의 단위 질량당 생산된 균사체의 균체량($Y_{x/s}$)(생산수율)이 다른 탄소원보다 더 높을 뿐만 아니라, 오일이 첨가된 발효조 배양에서 오일이 antiform의 역할을 하기 때문에 배양공정 scale-up이 매우 용이하기 때문이다. 오일의 첨가 유무를 결정하기 위해 먼저 생산균주가 오일을 이용할 수 있는지의 여부를 조사한 결과, 본 생산균주는 오일분해 효소인 lipase의 분비 능력이 비교적 우수한 것으로 판명되었다. 따라서 이미 최적화된 생산배지에 오일을 첨가한 경우에 생산배지 조성의 변화 경향을 조사하였다. OAFT, FFD, SAM 방법 등의 통계적 방법을 적용하여 다양한 오일 성분들이 균체 생산성에 미치는 영향을

조사한 결과, oleic acid를 첨가한 최적 생산배지에서 최대 26.7g/L(SAM 실험의 19번 배지 조성)에 이르는 높은 균사체 생산성을 얻을 수 있었을 뿐만 아니라, scale-up된 발효조에서의 생산 재현성도 매우 훌륭한 것으로 확인되었다.

한편 균사형성 담자균류인 *Inonotus obliquus* 균사체의 대형 발효조에서의 액상배양 시 배양액에서의 용존산소 결핍현상이 항상 발생하곤 하는데, 본 연구에서는 용존산소가 결핍된 배양환경에서도 고생산성 능력을 갖는 유전자재조합 *Inonotus obliquus* 변이주를 개발하고자 하였다. 즉, 효과적인 세포내로의 용존산소 전달을 위하여 이미 제조된 pBARGPEVHB vector로부터 산소전달단백질로 널리 알려진 VHB(*Vitreoscilla* hemoglobin)의 유전자를 클로닝하여, 이를 constitutive promoter인 *Trametes versicolor*의 *gpd* promoter에, 또한 inducible promoter인 *Coprinus congregatus*의 pH-controlled promoter 뒤에 각각 연결시킴으로써 효율적인 vhb 발현백터를 제조하였다. 또한 *Coprinus congregatus*의 pH-controlled promoter의 활성을 조사하기 위한 pH-gfp fusion vector를 구축하는데 성공하였다. 이외에도 *A. niger*의 *hmb1* 유전자를 클로닝하여 이 유전자를 상기의 vhb 발현백터 제작시 수행했던 대로 *gpd* promoter와 pH-controlled promoter하에서 각각 발현되는 새로운 백터를 제조 중에 있다. 이러한 발현백터가 단백질다당체 고생산성 균주인 *Inonotus obliquus*에 효과적으로 도입될 경우, 용존산소가 부족한 배양환경 하에서도 매우 효율적인 세포내로의 산소전달이 가능할 것으로 예상되며, 따라서 최종 전자수용체로서 작용하는 산소의 용이한 공급으로 인해 ATP 생합성이 활발해져 생산 균주의 성장뿐만 아니라 유용대사산물인 단백질다당체의 고생산이 가능할 것으로 판단된다.

(2) 제 1 세부과제: *Inonotus obliquus* 균사체의 pilot 규모 발효조에서의 자동화 액상배양공정 개발을 통한 항당뇨 효능의 단백질다당체 대량 생산

본 연구에서는 균사형성 담자균류인 *Inonotus obliquus* 균사체의 발효조 액상배양을 통해 항당뇨 활성의 생리활성물질인 단백질다당체를 대량 생산하는 배양공정을 개발하고자 하였다. 실제적으로 *Inonotus obliquus* 균사체의 산업용 단백질다당체 생산공정은 발효조의 규모가 부피기준으로 약 10배씩 증가하는 다단계 발효공정(플라스크 seed culture 배양공정 + 다단계 발효조 성장배양 공정 + 최종 발효조 생산배양 공정)으로 이루어져 있으므로, 본 연구에서도 *Inonotus obliquus* 균사체의 다단계에 걸친 발효조 성장배양과 최종 발효조 생산배양 공정을 적용해서 생산균주의 활성과 단백질다당체의 생산성을 증가시키는 실험을 수행하였다. 이를 위해 제1협동연구팀에서 고생산성 균주를 분양받아 다단계에 걸친 발효조 배양 시 생산균주의 생산성에 가장 큰 영향을 미치는 두 가지 요인, 즉 각 발효 단계에서의 생산균주의 배양생리적 특성과 배양형태적 특성을 규명하고자 하였다. 우선적으로 다단계 배양공정의 재현성과 생산성에 큰 영향을 미치는 seed culture 배양공정을 개발하고자 *Inonotus obliquus* 균사체의 플라스크 성장배양 후, 1차 성장발효조로의 최적 접종량 조사에 대한 연구를 수행하였다. 또한 1차 성장발효조로 접종될 다양한 seed culture의 배양 방법과 접종량이 생산균주의 다단계 발효조 배양에서의 생산성에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 최종적으로 “process F 공정”으로 구성된 일련의 다단계 배양공정을 확립할 수 있었다.

한편 *Inonotus obliquus* 균사체의 경우 세포벽다당체(IPS)의 함량은 균사체 건조무게 당 거의 일정한 양을 함유하고 있으므로, IPS의 생산량을 증가시키기 위해서는 최종 발효조 생산배

양 시 균사체의 생산량 증가가 가장 중요한 요인인 것으로 확인되었다. 반면에 세포외다당체(EPS)의 생합성 경향은 균사체 성장과 비례해서 증가하는 것은 아닌 것으로 관찰되었으므로, 본 연구에서는 EPS와 IPS 생산성을 높일 수 있는 각각의 발효조 배양공정을 별도로 개발하였다. 발효에 의한 EPS의 생산 시 일반적으로 가장 중요한 요소는 탄소원과 질소원의 비(C/N ratio)인 것으로 알려져 있으므로 EPS 생산성 증가에 중요한 영향을 미치는 배지성분으로 밝혀진 glucose(C-source), ammonium tartrate(N-source) 및 yeast extract(N-source)가 조합된 최적의 생산배지를 5리터 발효조 배양공정을 통해 개발하였다. C/N ratio가 9:1인 생산배지 조성(90g/L의 glucose 사용)에서 EPS의 최종 생산성이 9.49g/L로 가장 높았으며, 기질수율인 $Y_{p/s}$ 수치(glucose 1g이 소모될 때 생산되는 EPS 양(g)) 역시 0.46으로 C/N ratio가 9:1인 배양에서 가장 높게 나타났다. 이 경우에 glucose에 의한 기질저해 현상이 발생하지 않아 세포 성장도 훌륭하며, 또한 더욱 많은 양의 glucose가 EPS 생합성 쪽으로 효율적으로 이용되어, EPS의 생산성이 가장 큰 폭으로 증가함을 알 수 있었다. 또한 상기의 5리터 발효조 배양연구를 바탕으로 EPS 대량 생산을 위한 배양공정 scale-up 연구를 수행하였다. 즉 중규모배양에서 최종 생산배양에 이르는 전체 공정을 "process F" 공정을 적용하여, 75리터의 생산발효조에서 40L와 45L의 조업부피로 2차례에 걸친 배양한 결과, 균체 생산성은 10~11 g/L로 비교적 낮은 반면 EPS 생산성은 8.2~9 g/L으로 꽤 높게 나타났다. 특별히 75리터 발효조에서의 배양조건을 별도로 최적화시키지 않았음에도 불구하고 EPS 생산성이 5L 발효조 수준으로 나타났음은 주목할 만하다.

또한 세포벽다당체(IPS)를 대량 생산하기 위해 균사 생산량을 증대시키는 발효조 배양 공정을 개발하였다. 특별히 오일 성분이 탄소원으로 첨가된 생산배지를 개발하고자 하였다. 그 이유는 더욱 환원된 상태로 존재하는 오일을 생산균주가 탄소원으로 이용할 경우, 기질에 근거한 균체 생산량($Y_{x/s}$)(생산수율)이 다른 탄소원 기질들에 비해 더 높을 뿐만 아니라, 산업용 발효조 배양에서 탄소원으로 첨가된 오일 성분이 항거품제의 역할을 동시에 수행하기 때문에 배양 중 과다 거품의 발생으로 인한 오염의 위험성이 크게 줄어들기 때문이다. 특별히 생산배지 조성에 oil 또는 oleic acid가 첨가된 경우에 최종 발효조 생산배양에서의 균체량이 모든 경우에 20g/L 이상으로 안정적으로 높게 생산되었으며, 특별히 생산배지에 최적량의 oleic acid가 첨가된 경우에는 거의 25g/L에 이르는 높은 균체 생산성을 얻을 수 있었다. 또한 75리터 생산 발효조 배양에서도 균사체 생산성이 거의 25g/L에 이르렀는데, 이로부터 에너지 효율성이 우수한 oleic acid가 scale-up된 발효조 배양공정에서도 제 역할을 훌륭하게 수행하고 있음을 확인할 수 있었다.

한편 발효조 배양에서 균사형성 *I. obliquus* 균사체 배양에 의한 IPS와 EPS의 생산성을 극대화 시키기 위해서는 우선적으로 전단응력에 의한 악영향을 함께 고려해 주면서 배양액에서의 용존산소 결핍현상을 극복해주어야 함을 확인할 수 있었다. 이를 위해 교반속도와 통기량의 동시 자동조절을 통해 생산균주 균사체의 발효조 배양 시 용존산소농도를 적정 수준으로 조절하기 위한 용존산소농도 자동조절 제어프로그램을 확립하였다. 또한 발효기 배양공정의 scale-up시 가장 중요한 배양변수인 산소물질전달계수(k_La)의 측정 방법을 확립하여, 교반기의 종류에 따른 k_La 비교연구를 통해 *I. obliquus* 균사체 배양에 적합한 paddle type의 impeller를 개발할 수 있었다. 실제 발효조 배양공정에 이 paddle type의 impeller를 적용한 경우, 높은 산

소전달계수로 인해 배양액으로의 용존산소 전달이 매우 훌륭하게 이루어져서, 배양공정에서 흔히 사용되는 6-blade-turbine impeller를 사용한 경우보다 최종 균체 생산량이 2배 정도 더 높은 주목할 만한 결과를 얻을 수 있었다. 한편 유가식으로 공급되는 glucose(탄소원)와, yeast extract 및 soypeptone(질소원이자 탄소원)을 이용하여 유가식 배양을 시도한 결과, pH가 일정 기간 동안 자동 조절(pH-stat) 되는 것을 확인할 수 있었다. 이외에도 *I. obliquus*의 scale-up 배양공정 개발을 위해 실시간 배양공정 모니터링 및 자동제어를 위한 배양공정 자동화시스템을 구축하였다. 특히 가스분석기를 이용하여 생산균주의 산소흡수율을 정확하게 측정하는 배양시스템을 확립하였는데, 이와 같이 측정된 산소흡수율로부터 생산균주의 비성장속도(specific growth rate)(μ), 산소전달계수(k_La), 세포농도(X)등을 정확하게 추정하는 배양공정 자동화시스템을 완성할 수 있었다.

(3) 2 협동과제: *Inonotus obliquus* 배양 균사체로부터 항당뇨 효능의 단백다당체 고순도 청정 분리정제 공정 개발

본 연구에서 자실체로부터 단백다당체의 추출조건인 열수추출 시 최적의 추출온도, 추출시간과 추출용매비는 각각 100°C, 3시간과 1:7.5 이었다. 초음파 추출의 경우, 최적의 추출온도는 온도가 높아질수록 당과 단백질 함량은 높게 측정이 되었고, 추출시간은 4시간이 가장 효과적이었다. 그러나 열수추출과 비교 시 상당히 낮은 추출효율을 나타내었으며, 초음파추출은 적절한 추출방법이 아닌 것으로 생각되었다. 전자파를 이용할 경우, 단백다당체추출의 최적 추출온도와 시간은 각각 180°C와 1시간이었다. 이는 열수추출과 초음파추출을 비교하여 각각 1.6배와 2.5배 향상된 결과이다.

균사체로부터 열수추출의 경우 단백다당체의 추출조건은 자실체 추출조건에서 확립된 온도 100°C와 용매비 1:7.5이었다. 그리고 추출시간 2시간경과후 당과 단백질 함량은 4.5와 4.9%로 가장 높은 값을 나타냈으며, 그 후 추출시간이 길어지면 서서히 감소하는 경향을 나타냈다. 초음파 추출에 의한 최적조건을 확립하기 위해 실험을 수행한 결과, 자실체와 마찬가지로 추출온도가 높을수록 당과 단백질 함량은 높게 측정 되었다. 4시간 추출의 경우 당과 단백질 함량은 각각 5.1%와 5.22%로 가장 높은 수치를 나타냈다. 균사체의 경우 전자파를 이용한 단백다당체 추출 시 최적의 온도와 시간은 자실체와 달리 150°C와 2시간이었으며, 당과 단백질함량이 각각 5.1%와 7.1%로 높게 측정되었다.

추출공정에서 고압과 고온으로 추출하는 경우, 열에 약하거나 휘발성이 강한 유효성분이 파괴되거나 반대로 유해한 성분의 용출 가능성이 있다. 상기 문제점들을 해결하기 위해 2단계 추출 방법을 수행하였다. 자실체인 경우 1차 추출 후 2차 추출 시 전처리 후 전자파추출 조건에 따른 당과 단백질 함량은 150°C에서 2시간 2차 추출 시 15.4%와 18.3%로 열수 추출 시 보다 약 15배 향상됨을 알 수 있었다. 균사체의 경우 자실체와 마찬가지로 1차와 2차 추출을 같은 조건으로 하여 당과 단백질 함량을 비교한 결과, 150°C에서 5시간 추출 시 당과 단백질 함량은 5.6%와 12.4%로 다른 조건에 비해 가장 높게 측정 되었다.

여러 종류(상황, 송이와 차가)의 버섯 자실체와 균사체에 대해 Ultrahydrogel 1000 column을 사용하여 단백다당체를 분석한 실험결과 대략 8.3분에서 단백다당체가 분리됨을 확인할 수 있었다. 그리고 표준물질로 사용한 메시마는 단백다당체와 단당류가 혼합되어 있으며, 상황버섯 단백다당체로 알려진 STR 제품은 순수한 단백다당체로 구성되어 있었다. 차가버섯의 균사체 1단계 추출 보다는

2단계 추출의 경우 단백다당체 함량이 높게 측정되었다. 그리고 균체를 분리한 배양여액에서도 상당한 단백다당체 함량이 측정되었다. 자실체의 경우는 1단계 추출보다 2단계 추출이 단당류의 함량이 줄어드는 것을 알 수 있었다. 1차 추출에서 단당류가 어느 정도 제거된 이유로 판단되었다.

또한 다양한 전처리 후 단백다당체 추출을 위해 효소처리와 기계적인 방법 등을 통한 단백다당체의 추출향상을 연구하였다. 효소처리에 의한 최적의 단백다당체 추출 조건은 셀룰라제 효소농도 0.5%로 처리 후 100℃에서 1시간동안 추출된 잔사를 전자파에서 20분 추출한 경우였다. 이러한 결과는 효소를 처리 하지 않은 것보다 단백다당체 분리가 약 1.5배 향상됨을 알 수 있었다.

기계적인 방법으로는 균체과쇄를 통한 전처리 후 초미세 분쇄기를 이용했을 때 대부분의 균체가 과쇄 됨을 확인 할 수 있었다. 자실체의 경우 코리아메디(주)의 KMS-200을 이용해 분쇄한 시료는 1차 추출 15.77 mg/g과 2차 추출 27.17 mg/g으로 총 42.94 mg/g이 추출되어 한국에너지 기술(주)의 HKP-05를 이용해 분쇄한 시료의 1차 추출 11.13 mg/g과 2차 추출 20.12 mg/g으로 총 31.25 mg/g이 추출된 것 보다 1차, 2차 추출 모두 높은 추출함량을 보였다. 균사체의 경우 코리아메디(주)의 KMS-200을 이용해 분쇄한 시료는 1차 추출 21.07 mg/g과 2차 전자파 추출 40.96 mg/g으로 총 62.03 mg/g이 추출되었으며, 한국에너지 기술(주)의 HKP-05를 이용해 분쇄한 시료는 1차 추출 25.6 mg/g과 2차 전자파추출 38.16 mg/g으로 총 63.76 mg/g이 추출되어 거의 비슷한 함량을 보였다. 실험 결과 한국에너지 기술(주)의 HKP-05와 코리아메디(주)의 KMS-200을 이용해 분쇄하였을 때 두 시료로부터 추출된 단백다당체의 함량은 비슷하다는 것을 알 수 있었다. 전자파를 이용해 추출하는 과정에서 고열로 인해 시료가 타는 일이 발생하여 추출된 단백다당체의 함량이 낮은 경우도 있었다. 시료가 타는 문제해결을 위해 추출온도 150℃에서 추출시간을 조절하는 것이 중요하다고 생각되었다.

막을 이용한 효율적인 단백다당체 분리를 위한 한계 분자량과 압력은 각각 30 kDa과 15 psi이었으며, gel filtration column 크로마토그래피에 의한 단백다당체(EPS)를 분획하기 위하여 Sepharose CL-4B(MWCO; 10^4 - 10^6)를 충전제로 gel filtration을 수행 한 결과, 가장 높은 peak인 첫 번째 분획(No. 16-28)이 표준물질과 같은 시간대에 검출되어 단백다당체라고 판단되어졌다. 상기 결과로부터 분획된 각각의 시료들이 단백다당체임을 확인하기 위해 GPC column을 이용하여 분석하였다. 결과적으로 16-28번 분획은 표준물질의 단백다당체와 같은 시간대에 검출되어 단백다당체임을 확인할 수 있었다. 그러나 이 컬럼으로는 많은 양의 시료를 분획할 수 없으며 처리시간이 긴 단점이 있어 이를 보완하고자 Shodex(Japan)사의 SB 2000(20 mm×300 mm)을 사용하여 gel filtration을 행하였다. 먼저 SB 2000 column의 분획결과 44-52분, 52-97분, 97-138분과 138-150분에서 4개의 peak가 검출되어 각 peak 별로 분획하였다. 52-97분의 분획은 표준물질의 단백다당체와 같은 시간대에 검출되어 단백다당체임을 확인할 수 있었고, 97-138분의 분획은 시간대가 뒷부분에서 용출되어 저분자의 당류로 추측되었다.

차가버섯 균사체 배양액으로부터 균체를 분리한 후, gel filtration을 이용한 분획과정 중 각 단계 별 단백다당체 수율은 lab-scale에서 규모 확대를 하는데 중요한 변수 중의 하나이다. 원액 중의 단백다당체 함량은 8.62 mg/L이었고, 에탄올 침전과 gel filtration 후의 단백다당체 함량이 각각 8.00mg/L과 7.4 mg/L로 수율은 92.7%에서 89.8%로 비교적 높은 수치를 나타냈다. 그러므로 발효 후 단백다당체의 순수분리는 농축 단계에서 부피를 최대한 줄이고, 그 후 에탄올 침전의 방법이 최적으로 생각되었다.

FT-IR 스펙트럼은 화합물 내의 결합 기능기들이 적외선 영역중의 특정과장에너지를 흡수하여 진동(Vibration), 신축(Stretching), 굽힘(Bending) 운동을 하는 성질을 이용하여 분자의 결합구조와 분광학적 성질을 측정할 수 있다. 따라서 gel filtration으로부터 분획된 시료(단백다당체)가 어떤 작용기를 가지고 있는지 알아보기 위해 FT-IR 스펙트럼을 이용하여 실험을 수행하였다. 분석 결과, O-H, C-H, C=O와 CH, C=O bending 등 표준물질과 같은 작용기를 가지고 있어 단백질다당체가 확인되었다. 또한 Vlasta 등은 표고, 영지, 느타리버섯 등 약 70여 종의 버섯에 대한 FT-IR 패턴 연구에서 890 cm^{-1} 영역은 β -glycosidic linkage를 나타내며, 930 cm^{-1} 은 α -glycosidic linkage를 나타낸다고 보고하였는데, 본 연구에서 추출한 시료의 경우 표준물질(Mesima)과 달리 단백질다당체를 나타내는 890 cm^{-1} 영역에서 진동이 일어남을 알 수 있었다.

최종적으로 단백질다당체를 균사체로부터 분리할 수 있는 상업화 공정을 확립하여 규모확대를 위한 방안을 제시하였다. 즉 균체와 배양액분리를 위한 압착여과, 균체 동결건조를 위한 조건, 초미세분쇄를 위한 장치, 전자파추출, 한외여과, 동결 혹은 분무건조 등의 단위공정을 발효조1톤 규모로 제시하였다.

(4) 2 세부과제: 순수 정제된 *Inonotus obliquus* 추출물질의 생리활성 평가를 통한 고안정성의 항당뇨/비만 효능의 기능성 식품 개발

3T3-L1세포에서 차가버섯 자실체 추출물(crude extract)의 분화 억제 및 지질 축적 억제 효과를 관찰한 결과, 각 추출물 처리 후 3T3-L1 세포내 중성 지질 함량은 control과 비교시 열수 추출물 및 100°C 열수 추출물은 $0.1\mu\text{l/ml}$, 초음파 추출물, 전자파단계별 추출물 및 70°C 열수 추출물은 $1\mu\text{l/ml}$ 농도부터 유의적으로 낮아졌다. 3T3-L1세포에서 차가버섯 자실체 및 균사체 추출물(crude extract) 동일량 처리시 분화 억제 및 지질 축적 억제 효과를 살펴본 결과, 자실체 추출물 중 열수 추출물, 70°C 열수 추출물, 100°C 열수 추출물 및 초음파 추출물은 control과 비교 시 3T3-L1 세포내 중성지질 함량이 유의적으로 감소하였다. 70°C 열수 추출물 및 100°C 열수 추출물의 경우 control보다 40%이상 중성지질 함량이 감소하여 모든 추출 조건 중 가장 낮은 지질 축적 억제 효과를 나타내었다. 3T3-L1세포에서 차가버섯 균사체 배양액 및 균사체 1차 추출물의 분화 억제 및 지질 축적 억제 효과는 균사체 배양액 및 균사체 1차 추출물은 $100\mu\text{g/ml}$ 부터 독성 없이 3T3-L1 세포내 중성지질 함량이 control과 비교시 유의적으로 감소하였다. 3T3-L1 세포에서 지방 축적 억제 효과를 나타낸 차가버섯 자실체 추출물(열수 추출물, 70°C 열수 추출물, 100°C 열수 추출물 및 초음파 추출물)을 $1\mu\text{l/ml}$ 농도로 배지에 처리하여 4일간 배양한 후 3T3-L1 세포 분화 및 지질대사 관련 단백질 및 효소의 mRNA 발현 변화를 조사하였다. 지방세포 분화 지표 단백질 중 하나인 PPAR α 의 mRNA 발현(발현 감소시 분화 유도)은 control과 비교 시 모든 추출물 시료 처리 시 유의적으로 증가하였고 열수 추출물 및 100°C 열수 추출물의 경우 가장 높은 발현 증가를 나타내었다. 역시 지방세포 분화 지표 단백질중 하나인 PPAR γ 의 mRNA 발현(발현 증가 시 분화 유도)은 control과 비교 시 100°C 열수 추출물에서 control과 비교 시 유의적으로 감소하였다.

차가버섯 균사체 배양액 및 균사체&자실체 1차 추출물의 췌장 보호 효과를 살펴보면, 균사체 배양액 추출물은 처리 농도 $62.5\mu\text{g/ml}$ 에서 Alloxan 처리군보다 생존능이 유의적으로 증가함으로써 췌장 세포 보호 효과를 나타내었다. 또한, 고지방식이로 비만 유도 후 2형 당뇨 특성

을 나타내는 C57BL/6J mice에서 차가버섯 균사체 유래 다당체 보강이 간 중 지질 및 글리코겐, 혈중 포도당, 인슐린, 아디포넥틴 수준에 미치는 영향을 검토 하였다. 실험동물은 정상 대조군(N-C group), 고지방 대조군(H-C group), 고지방식이 + 저농도 균사체 추출물 투여군(M150L, 1ml/kg bw, β -glucan 1.303 mg), 고지방식이 + 균사체 추출물 투여군(M150, 2ml/kg bw, β -glucan 2.606 mg), 고지방식이 + 고순도 단백다당체 투여군(PP, 200mg/kg bw), 고지방식이 + 메시마 투여군(M, 200mg/kg bw) 6군으로 나누어 사육하였으며 연구결과는 다음과 같다. 부고환 지방은 차가버섯 균사체 추출물 투여 농도 의존적으로 유의적인 감소를 나타냈다. 혈중 중성지방 및 VLDL에서 차가버섯 균사체 투여군(M150)은 고지방 대조군(H-C)과 비교했을 때 각각 유의하게 감소하였고, 혈중 총 콜레스테롤은 유의한 차이가 없었으며 HDL 콜레스테롤 농도는 높은 경향을 보였다. 간 조직의 중성지방 농도는 고지방 대조군(H-C)보다 차가버섯 균사체 투여 실험군(M150L, M150)이 각각 26.8%, 30.9% 감소되었고, 총 콜레스테롤은 각각 65.5%, 61.9% 낮아져 유의적인 감소효과를 확인하였다. 경구당부하 검사 결과 포도당 투여 3시간 후의 혈당이 고지방 대조군(H-C)보다 저농도 차가버섯 균사체 투여군(M150L) 4.9%, 차가버섯 균사체 투여군(M150) 9.5%, 고순도 단백다당체 및 메시마군(PP, M) 각각 8.7, 13.4% 감소하였다. 혈당반응면적 또한 차가버섯 균사체 투여군(M150)과 고순도 단백다당체 및 메시마군(PP, M)이 유의한 수준으로 낮았다. 혈중 인슐린 및 HOMA-IR 수준은 차가버섯 균사체 투여 실험군(M150L, M150)에서 고지방 대조군(H-C)보다 유의하게 감소되었다. 간 중 글리코겐은 고지방 대조군(H-C)에서 글리코겐 합성이 저하된 반면 차가버섯 균사체 투여 실험군(M150L, M150)에서는 유의하게 증가함을 확인하였다. 혈중 아디포넥틴은 고지방 대조군(H-C)보다 저농도 차가버섯 균사체 투여군(M150L)에서 높아지는 경향이 있었고, 차가버섯 균사체 투여군(M150)은 유의하게 높아졌다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 단백다당체 함유 차가버섯 균사체 추출물이 식이유도 비만/당뇨 모델인 C57BL/6J mice의 지질수준 개선 및 혈당조절에 긍정적인 영향을 미치고 있어 이를 이용한 기능성 식품으로의 개발 가능성이 높다고 사료된다.

또한, 식이유도 비만 mice를 이용하여 단백다당체 함유 차가버섯 자실체 추출물의 항비만 효능을 보기 위해 정상식이군, 고지방식이군, 고지방식이+차가버섯자실체 저용량 투여군, 고지방식이+차가버섯자실체 고용량 투여군, 고순도 다당체 투여군, 메시마 투여군으로 14주간 경구투여 하였다.

실험결과는 다음과 같다. 체중은 차가버섯 자실체 추출물을 저용량 투여한 군이 고지방식이군과 비교시 유의하게 감소하였다. 부고환 지방 비율은 고지방 식이와 자실체 고용량 및 저용량 투여한 군이 고지방식이군에 비해 뚜렷하게 낮아졌다. 혈중 중성지방 및 총 콜레스테롤은 고용량 및 저용량 투여군이 뚜렷하게 낮은 값을 나타내었다. 본 실험을 통해 단백다당체를 함유한 차가버섯 자실체 추출물의 투여는 식이로 비만이 유도된 생쥐에서 체중 및 부고환 지방율을 감소시키고 혈청 및 간중 지질을 개선하여 항비만에 긍정적인 효과가 있음을 알 수 있었다.

최종적으로, 차가버섯 균사체 추출물의 β -glucan 함량을 측정후, 사과, 대추 및 영지 농축액의 함량을 달리하여 제조한 차가버섯 드링크의 관능평가를 실시하여 맛과 기능성을 갖춘 차가버섯 음료를 개발하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

정량적 성과

[학술대회 발표 및 논문]

국내 외 구분	저자명	논문제목	게재 학술지명	권 및 쪽수 (년도)
국내	박남규, 송진주, 오미라, 유재수, 전계택, 정용섭	차가버섯의 단백다당체 분리를 위한 추출방법과 조건 확립	2006 International Symposium on Fermented Foods, 2006, 10. 20-22	(p. 188) (Abstract No. P-31)
국내	Jae-Soo Yoo, Nam-Kyu Park, Gie-Taek Chun, and Yong-Seob Jeong	Extraction and Separation of Pprotein-Bound Polysaccharides from Fruiting Body and Mycelium of <i>Inonotus obliquus</i>	생물공학회 추계학술대회 2007, 10. 18-19	(p. 146-150) (Abstract No. PME 20)
국외	W-S. Shin, Y.S. Jeong, and G.T. Chun	Enhanced production of exopolysaccharides(EPS) through strain improvement and control of C/N ratio of production medium in fungal mycelial fermentations of <i>Inonotus obliquus</i>	YABEC 2007 (The 13th Symposium of Young Asian Biochemical Engineer's Community), Seoul South Korea, Oct. 20-22. 2007	(p. 117) (Abstract No PP-78)
국내	유재수, 박남규, 정명준, 윤제형, 전계택, 정용섭	차가버섯균사체 (<i>Inonotus obliquus</i> mycelium) 배양액으로부터 막을 이용한 단백다당체 분리	2007 International Symposium on Fermented Foods, 2007, 10. 25-27	(p. 295) (Abstract No. p-47)
국내	Woo-Shik Shin, Hyoung-Pyo Hong, Yong-Seob Jeong, and Gie-Taek Chun	Development of exopolysaccharides(EPS) overproducers via fungal protoplast formation and investigation of the fermentative physiology and morphology in <i>Inonotus obliquus</i> bioreactor cultures	2008 Spring KSBB Meeting and International Symposium, 2008, 4. 18-19	(p.114) (Abstract No. PME21)
국내	Hyoung-Pyo Hong, Yong-Seob Jeong, and Gie-Taek Chun	Enhanced production of intra-cellular polysaccharides(IPS) through statistical optimization of production medium in fungal mycelial fermentations of <i>Inonotus obliquus</i>	2008 Spring KSBB Meeting and International Symposium, 2008, 4. 18-19	(p.115) (Abstract No. PME26)
국내	Nam-Kyu Park, Jae-Soo Yoo, Myung-Jun Choi, Gie-Taek Chun, and Yong-Seob Jeong	Separation of protein-bound polysaccharides from submerged culture broth of <i>Inonotus obliquus</i>	2008 Spring KSBB Meeting and International Symposium, 2008, 4. 18-19	(p.116) (Abstract No. PME30)
국외	Hyoung-Pyo Hong, Yong-Seob Jeong, and Gie-Taek Chun	Large screening of exopolysaccharides(EPS) overproducers through protoplast formation and bioreactor studies on the EPS production by suspended cultures of <i>Inonotus obliquus</i> mycelia	2008 Annual Meeting of Society for Industrial Microbiology of USA), Aug. 10-14, 2008, San Diego, CA, USA.	(p. 124) (Abstract No. P38)

국내	Hyoung-Pyo and Gie-Taek Chun	Fermentation studies for enhanced production of exopolysaccharides (EPS) in suspended mycelial cultures of <i>Inonotus obliquus</i>	2008 International Meeting of the Federation of Korean Microbial Societies, 2008. 10. 16-17	(p. 166) (Abstract No. D014)
국내	W-S. Shin, Y.S. Jeong, and G.T. Chun	Optimization of submerged production medium by controlling C/N ration for enhanced production of exopolysaccharides(EPS) by high-yielding mutants generated from the protoplasts of <i>Inonotus obliquus</i> mycelia	2008 International Symposium on Fermented Foods, 2008, 10. 24-25	(p. 128) (Abstract No. P-3)
국내	Nam-Kyu Park, Myung-Jun Choi, Gie-Taek Chun, and Yong-Seob Jeong	Separation strategies of protein-bound polysaccharides from submerged culture of <i>Inonotus obliquus</i>	2008 International Symposium on Fermented Foods, 2008, 10. 24-25	(p. 144) (Abstract No. P-33)
국내	Hyoung-Pyo Hong, Yong-Seob Jeong, and Gie-Taek Chun	Development of oil-supplemented production medium for enhanced and stable production of protein-bound polysaccharides in suspended mycelial fermentations of <i>Inonotus obliquus</i>	2009 KMB Intention Symposium and Annual Meeting (2009 한국미생물생명공학회 국제학술발표대회), 2009, 6. 25-26	논문 초록 제출
국외	Hyoung-Pyo Hong, Yong-Seob Jeong, and Gie-Taek Chun	Enhanced production of polysaccharides through strain improvement and medium optimization in suspended mycelial fermentations of <i>Inonotus obliquus</i>	2009 Asia Pacific Biochemical Engineering Conference, Nov. 24-28, 2009, Kobe, Japan.	논문 초록 제출
국내	Nam-Kyu Park, Myung-Jun Choi, Hea-Jong Chung, Gie-Taek Chun, and Yong Seob Jeong	Effect of Particle Size on Extraction of Protein-bound Polysaccharide from both Dried Fruit body and Mycelium of <i>Inonotus obliquus</i>	2009한국생명공학회 춘계 학술발표대회 및 국제심포지움 2009,4.9-11	(p.130) (Abstract No. PME08)
국내	신우식, 홍형표, 정용섭, 전계택	<i>Inonotus obliquus</i> 균사체의 원형질체 형성 및 재생을 통한 단백다당체 고생산성 변이주 개발 및 배양특성 연구	2009 한국생물공학회지	논문 제출 예정 (2009, 5월중)
국내	홍형표, 신우식, 정용섭, 전계택	단백다당체 고생산성의 <i>Inonotus obliquus</i> 균주의 신속 선별을 위한 계대배양용 고체배지 조성의 통계적 최적화	2009 한국생물공학회지	논문 제출 예정 (2009, 5월중)
국내	홍형표, 정용섭, 전계택	<i>Inonotus obliquus</i> 균사체의 발효조액상배양에서 세포외다당체의 생산성 향상을 위한 C/N ratio 최적화	2009 한국생물공학회지	논문 제출 예정 (2009, 6월중)
국내	홍형표, 박상민, 정용섭, 전계택	<i>Inonotus obliquus</i> 균사체의 발효조액상배양을 통한 단백다당체 생산공정에서 오일이 첨가된 생산배지의 우수성	2009 한국생물공학회지	논문 제출 예정 (2009, 6월중)

국제	You-Soo Cha, Ju-Ryoun Soh, Su-Hui Park, Bo-Ram Choi, Yong-Seob Jeong	Anti-adipogenic effects of cultured <i>Inonotus obliquus</i> extract in insulin promoted adipogenic differentiation of 3T3-L1 preadipocyte	2007 Asian Congress of Nutrition (국제 아시아영양학회 학술발표), 2007.9.9-13	논문초록 제출
국제	Ju-Ryoun Soh, Su-Hui Park, Bo-Ram Choi, Yong-Seob Jeong, You-Soo Cha,	Effects of <i>Inonotus obliquus</i> extract in insulin promoted adipogenic differentiation of 3T3-L1 cell	2008 International Symposium and Annual Meeting(국제식품영양과학회 학술발표), 2008. 10.17-19	논문초록 제출
국내	김민아, 차연수	C57BL/6J mice에서 단백다당체 함유 차가버섯 균사체의 지질개선 및 혈당조절효과	2009 한국식품영양과학회지	논문 심사 완료후 수정중

[특허 출원/등록]

국내 외 구분	출원인	제목	국가 및 출원/등록 구분	출원/등록번호 (날짜)
국내	홍형표, 신우식, 송성기, 전계택, 정용섭,	이노토스 오블리쿠스 균사체의 원형질체 형성 및 재생을 통한 단백다당체 고생산성 변이주 개발방법	대한민국 특허출원	출원 예정 (2009, 5월중)
국내	홍형표, 신우식, 송성기, 전계택, 정용섭,	이노토스 오블리쿠스 균사체의 계대배양용 고체배지 개발	대한민국 특허출원	출원 예정 (2009, 5월중)
국내	전계택, 정용섭, 홍형표, 송성기	이노토스 오블리쿠스 균사체의 고농도 액상배양을 위한 산업용 복합배지 개발	대한민국 특허출원	출원 예정 (2009, 5월중)
국내	홍형표, 박상민, 송성기, 전계택, 정용섭,	oil 및 oleic acid를 액상배양 배지로 이용한 이노토스 오블리쿠스 균사체의 고농도 제조방법	대한민국 특허출원	출원 예정 (2009, 5월중)
국내	홍형표, 송성기, 전계택, 정용섭,	균체의 분비를 통한 이노토스 오블리쿠스 균사체 유래 항당뇨성 단백다당체 대량 제조방법	대한민국 특허출원	출원 예정 (2009, 5월중)
국내	차연수	디자인 출원 (라벨)	대한민국 특허출원	30-2009-0011904 (2009. 3. 20)
국내	차연수	상표등록 출원	대한민국 특허출원	40-2009-0013091 (2009. 3. 20)
국내	차연수, 전계택, 정용섭, 김민아, 이은정	차가버섯 균사체 및 자실체 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 제2형 당뇨병의 예방 또는 개선용 조성물 및 이를 이용한 기능성 건강식품	대한민국 특허출원	출원 예정 (2009, 5월중)

[기술 이전]

국내외 구분	기술이전 기업체	기술이전 내용	기술이전날짜
국내	(주)에스티알바이오텍	① <i>Inonotus obliquus</i> 균사체의 liquid stock과 solid stock 장기보관법	2008년 2월
국내	(주)에스티알바이오텍	② <i>Inonotus obliquus</i> 균사체의 고체배양, 정치배양, 성장배양, 생산배양에 이르는 다단계 배양방법	2008년 2월
국내	(주)에스티알바이오텍	③ 단일 균주 선별을 위한 <i>Inonotus obliquus</i> 균사체의 원형질체 형성, 회수 및 재생 방법	2008년 2월
국내	(주)에스티알바이오텍	④ 돌연변이 방법에 의한 단백다당체 고생산성 <i>Inonotus obliquus</i> 균주개발 방법	2008년 2월
국내	(주)에스티알바이오텍	⑤ <i>Inonotus obliquus</i> 균사체의 액상 배양공정에서의 최적 배양형태 유도 방법	2008년 2월
국내	(주)에스티알바이오텍	⑥ 통계적 방법에 의한 배지성분 및 배지농도 최적화 방법	2009년 2월
국내	(주)에스티알바이오텍	⑦ 다단계 발효 배양공정 시 고생산성 균주의 최적 배양형태 유도 방법	2009년 2월
국내	(주)에스티알바이오텍	⑧ <i>Inonotus obliquus</i> 균사체의 고농도 액상 배양을 위한 발효기 시스템 설계 및 운전 방법	2009년 2월
국내	(주)에스티알바이오텍	⑨ <i>Inonotus obliquus</i> 균사체의 고농도 액상 배양 공정 자동화 방법	2009년 2월

[기 타]

- 균주 이전: *Inonotus obliquus* 균주 개발 및 발효공정 확립 후 (주)에스티알바이오텍에 고생산성의 *Inonotus obliquus* 변이주 이전
- 공정 이전: *Inonotus obliquus* 자동화 배양 공정 개발 완료 후 (주)에스티알바이오텍에 발효조 운전 기술 이전

V. 연구개발결과의 활용계획

- 산·학의 긴밀한 연구를 통해 *Inonotus obliquus* 고생산성 균주의 개발과 함께, 다단계 발효 조 배양공정의 최종 단계인 pilot-scale 발효조에서 산업용 균주의 액상 배양 및 청정 분리정제공정의 개발을 통해 세포외다당체 및 세포벽 단백질다당체의 시제품 생산이 성공적으로 수행되었다. 현재 개발된 여러 기술 중 5건에 대하여 한국특허를 출원 중에 있으며 나머지 기술내용들도 국내·외에 특허출원할 예정이다.
- 앞으로도 산·학의 지속적인 공동연구를 통해 공장규모에서의 기술적인 know-how를 더욱 축적하고, 공장규모에서의 문제점을 산·학간의 유기적인 연구를 통해 효율적으로 해결함으로써, 보다 경제적인 조단백다당체 생산공정을 구축하여야 세계 시장에서 경쟁적 우위를 확보할 수 있을 것으로 판단된다.
- 본 연구과제 추진과 관련하여 약용 버섯 균사체 유래 유용물질의 대량생산에 필요한 대부분의 핵심요소기술들을 확보하였고, 유용물질을 경제적으로 대량생산하여 산업화할 수 있는 혁신적인 공정의 개발을 이루었다. 즉 본 연구과제의 성공으로 유용물질 함량이 증대된 버섯 균주의 개발과 유효성분의 생체이용률 등이 개선된 기능성식품의 생산이 본격적으로 이루어질 수 있을 것으로 판단되며, 이 경우 고부가가치의 고기능성식품의 개발을 통해 효능은 물론 충분한 가격경쟁력으로 수입대체효과를 가져올 수 있을 것이며, 수출품목으로도 성장할 수 있을 것으로 사료된다.
- 약용 담자균류인 *Inonotus obliquus* 배양균사체에서 추출한 다당체 함유 추출물은 당뇨치료 관련 건강보조식품의 개발 이외에도 면역증강, 만성퇴행성질환의 예방과 치료에 도움을 줄 수 있는 노인용 기능성식품의 개발이 기대되며, 항생제 대체 가축사료첨가제로의 개발도 기대되는 등 커다란 개발 가능성을 가지고 있다.
- 고등균류인 담자균류 유래 단백질다당체의 국내 총 의약품시장은 년 150억원 규모이며 음료를 제외한 버섯 가공 기능성식품의 시장은 300억원 규모로, 본 연구를 통해 항당뇨 효과가 탁월한 *Inonotus obliquus* 추출물인 수용성 단백질다당체의 약리적 효능에 기초한 새로운 용도의 제품 개발은 기존제품에 비해 효능과 안전성이 뛰어난 신제품의 개발로 이어질 것이며, 이 제품에 대한 적정가격의 공급을 통하여 새로운 시장의 창출은 물론 기존시장의 확대도 가능할 것으로 판단된다.

SUMMARY

(영문요약문)

Studies on the production of both exopolysaccharide(EPS) and cell-wall bound innerpolysaccharides(IPS) have been carried out by use of the suspended mycelial cultures of *Inonotus obliquus*. Both products have promising potentials as an effective antidiabetic as well as an immunostimulating agents. To enhance IPS and EPS production, intensive strain improvement programs were carried out using large amounts of UV-mutated protoplasts, resulting in several overproducing variants with good fermentation properties. Rapid and large screening of high-yielding producers was possible because high concentration of protoplasts (5×10^5 protoplasts/ml) could be recovered by KOH-treatment of the producing mycelia with the cell wall disrupting enzymes. The mutant strains showing rapid growth rate in both the protoplast regeneration and the statistically optimized solid growth media were able to produce high amounts of EPS and IPS in stable manners. In addition, in order to overcome problems intrinsic in the traditional UV mutation methods, basic protocols necessary for protoplast fusion was developed using UV mutation method, leading to mass screening of various genetic recombinants without specific selectable markers. It was demonstrated that the recombinants obtained by the UV mutation method were able to biosynthesize as high level of IPS and cell mass as those of the parallel high-yielding mutants developed through the traditional UV mutation method. On the other hand, during the fermentation studies, it was found that the highly branched filamentous morphology of the producing mycelial cells made the culture broth highly viscose, leading to significant reductions in mass and oxygen transfer capacity. Therefore, for more facilitated utilization of dissolved oxygen by the high-yielding mutants, we constructed a expression vector system with *Vitreoscilla* hemoglobin(*VHb*) gene and pH inducible promoter, and tried to introduce them into the high-yielding producers.

In the fermentation studies performed with multi-step cultivation system consisting of shake flasks for seed culture, 5L growth-fermenter and 5L final production-fermenter, the production level of EPS was found to considerably depend on the medium compositions of both growth and production cultures, not to mention the morphology of the producers in the respective fermentation stage. Especially, the ratio of the constituent carbon and nitrogen sources (C/N ratio) of the production medium (such as glucose, ammonium tartrate and yeast extract) was found to be one of the most important factors for the enhanced production of EPS. Notably, fermentation scale-up was performed successfully using a 75L stirred-tank bioreactor. The scale-up process was possible, since various mutants of high-shear resistance that could proliferate rapidly in relatively high shear environments were developed through the intensive strain improvement programs.

In the case of IPS production, increase in cell mass was observed to be the most

important factor, since the extracted amount of IPS showed almost constant value based on the unit cell mass. Therefore, in order to increase cell growth, medium optimization was carried out in order to find optimal medium compositions, using the statistical methods such as Plackett–Burman and fractional factorial designs (FFD) for screening of medium components, and steepest ascent (SAM) and response surface methods (RSM) for determination of optimum concentrations of the selected components. Moreover, It was found that, in order to obtain as high cell mass as possible in the final production bioreactor cultures, the producing cells should be proliferated in condensed filamentous forms in the growth cultures, and optimum amounts of these filamentous cells should be transferred as active inoculums to the production bioreactor. In this case, ideal morphology consisting of compacted pellets less than 1,0 mm in diameter was successfully induced in the final production cultures. Therefore, it was concluded that not only the optimum medium composition but also the good morphological characteristics led to the higher biomass production and IPS productivity in the multistep fermentation process. Notably, the supplementation of oleic acid into the IPS production medium resulted in significant increase in IPS production, also demonstrating facilitated operation of bioreactors even under the high aeration conditions due to the intrinsic anti-forming property of the oleic acid. Also, the IPS production reproducibility of the high-yielding mutants was significantly enhanced in the 5L lab-scale and scaled-up 75L bioreactor cultures, when oleic acid-supplemented growth and production media were adopted for IPS production. Thus these results showed great promises for successful industrialization of the fermentation process developed throughout this research project.

A bioreactor fermentation strategy was developed for the production of IPS with the 4-blade paddle impeller which turned out to have higher oxygen mass transfer coefficient (k_La) than the traditional 6-blade-turbine impeller. Also, process automation system based on the off-gas data was developed. By use of a vent gas analyzer for the oxygen and carbon dioxide out of the fermenter, quantitative correlations between cell growth rate, oxygen uptake rate (OUR) and carbon dioxide evolution rate (CER) were established in *I. obliquus* fermentations. OUR , a critical indicator of the cells' activities, and oxygen mass transfer rate (k_La), a crucial parameter for the bioprocess scale-up, were calculated on-line by applying oxygen mass balance. In addition, by dividing the OUR by the total oxygen consumed, on-line estimation of the cells specific growth rate (μ), which is a very important parameter for the diagnosis of biosynthetic pattern of valuable metabolites, was successfully carried out. It was also possible to estimate cell concentration directly by use of oxygen-cell yield ($Y_{x/o}$) which was obtained based on a correlation between cell growth and total oxygen consumed. In addition, it was possible to establish an efficient bioprocess for the high density cultures of *I. obliquus* through automatic control of dissolved oxygen in a cascade mode.

For the separation and purification method of protein-bound polysaccharide from culture broth of *Inonotus obliquus*, three well known extraction methods were used like hot water, ultrasonic and microwave. For both of fruiting body and mycelium of *Inonotus obliquus*, the good extraction conditions were achieved for 1 hour at 180°C and 2 hours at 150°C by microwave, respectively. To separate the protein-bound polysaccharides, two step extraction method was much better than one step. For fruiting body of *Inonotus obliquus*, the protein-bound polysaccharides were separated by microwave extraction for 1 hour at 150°C after the extraction was done by hot water for 4 hours at 100°C. For mycelium of *Inonotus obliquus*, the protein-bound polysaccharides were separated by microwave extraction for 20 min at 150°C after the first extraction was achieved by hot water for 4 hours at 80°C.

The possibility of concentration of protein-bound polysaccharide solution by using membrane was studied. The protein-bound polysaccharides was concentrated effectively by using ultrafiltration membrane of which molecular weight cut off is 30 KDa. It had been observed that membrane concentration was essential not only for the development of clean separation technology but also for the enhanced production of protein-bound polysaccharides. Namely, we had reported that final concentrated solution showed approximately 10 times higher protein-bound polysaccharides than the crude solution by applying the developed separation systems. The yield of protein bound polysaccharides was about 90%, and purified product was confirmed as a protein-bound polysaccharides by using FT-IR.

The effect of particle size on extraction of PBP from both dried fruit body and mycelium of *Inonotus obliquus* was determined. Two kinds of milling systems were used. One is a blender(PB) which pulverizes *Inonotus obliquus*(particle sizes are higher than 100 μm), and the other is a ultra-fine pulverization(UFP) which is good enough to make the fine particles(particle sizes are less than 100 μm). The various extraction methods were also applied to extract the PBP like hot water extraction, microwave extraction and cascade extraction system which is consisted with the 1st step(hot water extraction) and the 2nd step(microwave extraction). The total content of PBP by using cascade extraction system was increased 3.6(fruit body) and 4.8(mycelium) times as compared to that of PB powder, respectively(fruit body; 31.25 mg/g, mycelium; 63.76 mg/g). Especially, the content of PBP by using microwave extraction using UFP powder was higher than total content of PBP by using combined 2 step extraction method. As a result, UFP might be useful to increase the extraction yield of both dried fruit body and mycelium of *Inonotus obliquus*.

The anti-adipogenic effect of cultured *Inonotus obliquus* extract on adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes was investigated. The differentiated 3T3-L1 adipocytes were treated with cultured *Inonotus obliquus* extracts for 4days. The test groups were divided into eight groups: non treatment control(Con) group, hot water extract(HWEx) group, 70°C hot water extract(70Ex) group, 100°C hot water extract(100Ex) group, ultrasonic extract(USEx) group, microwave extract(MWEx), hot water & microwave extract(HMEx) and microwave 2nd extract(MW2Ex)

group. The HWEx group, 70Ex, 100Ex and the USEx group had significantly greater decreases in triglyceride concentration compared with the Con group. The 100Ex and USEx group had significantly decreases in triglyceride concentration compared with the HWEx group. PAI-1 mRNA expression was decreased and PPAR α mRNA expression was increased in HWEx group, 70Ex, 100Ex and the USEx group compared with the Con group. TNF α mRNA expression was decreased in the HWEx group and PPAR γ mRNA expression was decreased in the 100Ex group compared with Con group. The results demonstrate beneficial effects of cultured *Inonotus obliquus* extract on preventing adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes.

The antihyperlipidemic and glycemic control effects of mycelia β -glucan of *Inonotus obliquus* were investigated. In high fat diet-induced obese C57BL/6J mice, the mycelia β -glucan of *Inonotus obliquus* showed significant decrease in epididymal fat tissue weight, blood triglyceride and VLDL level, triglyceride and total cholesterol level in liver, serum insulin and HOMA-IR level and AUCOGTT. Oral glucose tolerance test glucose level reduction were 4.9%(M150L; β -glucan 1.303 mg/kg bw), 9.5%(M150; β -glucan 2.606 mg/kg bw) after 180min of glucose loading than H-C group. Besides, the mycelia β -glucan of *Inonotus obliquus* treatment significantly increased glycogen contents in liver and adiponectin level in high fat diet-induced obese mice. In conclusion, the results showed that the *Inonotus obliquus* Mycelia β -glucan possesses significant antihyperlipidemic and glycemic control effects in C57BL/6J Mice.

Contents

Preface	1
Summary (in Korean)	2
Summary (in English)	23
Content	27
Contents (in Korean)	29
Chapter 1. Introduction	31
Section 1. Objectives of the research	31
Section 2. Significances of the research	33
Chapter 2. Domestic and overseas R&D Status	37
Section 1. Overseas R&D status	37
Section 2. Domestic R&D status	38
Chapter 3. Research and development accomplish contents and result	39
Section 1. Development of high yielding mutant strains of <i>Inonotus obliquus</i> and investigation of fermentation characteristics of these mutant mycelia	39
1. Material and Methods	39
2. Results and Discussion	47
3. Summary	72
Section 2. Development of computer-controlled bioreactor fermentation process for the production of polysaccharides by the high yielding mycelial cells of <i>Inonotus obliquus</i>	157
1. Material and Methods	157
2. Results and Discussion	159
3. Summary	181
Section 3. Development of bioseparation process for the polysaccharides produced by the high yielding mycelial cells of <i>Inonotus obliquus</i> in bioreactor cultures	260
1. Material and Methods	260
2. Results and Discussion	263
3. Summary	275
Section 4. Evaluation of the bioactive polysaccharide materials purified from the fermentation broth of the <i>Inonotus obliquus</i> mycelia and development of anti-diabetic biofood products	332
1. Material and Methods	332
2. Results and Discussion	336
3. Summary	343

Chapter 4. Achievement and contributions to the related research fields 414
 1. Achievement 414
 2. Contributions to the related research fields 418
Chapter 5. Plans on the practical application of the research results 419
Chapter 6. References 420

목 차

제 출 문	1
요 약 문	2
SUMMARY (영문요약문)	23
CONTENTS(영 문 목 차)	27
목 차	29
제 1 장 연구개발과제의 개요	31
제1절 연구개발의 목적	31
제2절 연구개발의 필요성	33
제 2 장 국내외 기술개발 현황	37
1. 국외	37
2. 국내	38
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	39
제1절 향당노 효능의 단백질다당체 고생산성의 <i>Inonotus obliquus</i> 변이주 개발 및 배양 특성 연구(제1협동과제)	9
1. 재료 및 실험방법	39
2. 결과 및 고찰	47
3. 연구결과 요약	72
제2절 <i>Inonotus obliquus</i> 균사체의 pilot 규모 발효조에서의 자동화 액상배양공 정 개발을 통한 향당노 효능의 단백질다당체 대량 생산	157
1. 재료 및 실험방법	157
2. 결과 및 고찰	159
3. 연구결과 요약	181
제3절 <i>Inonotus obliquus</i> 배양 균사체로부터 향당노 효능의 단백질다당체 고순도 청정 분리정제 공정 개발 (제2협동과제)	200
1. 재료 및 실험방법	260
2. 결과 및 고찰	263
3. 연구결과 요약	275
제4절 순수 정제된 <i>Inonotus obliquus</i> 추출물질의 생리활성 평가를 통한 고안 정성의 향당노/비만 효능의 기능성 식품 개발(제2세부과제)	332
1. 재료 및 실험방법	336
2. 결과 및 고찰	343
3. 연구결과 요약	414
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	414
1. 연구 개발 목표 달성도	414
2. 대외 기여도	418
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	419

제 6 장 참고문헌 420

제 1 장. 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발의 목적

1. 연구개발 목표

- 고등균류(higher fungi)인 버섯은 오래전부터 맛과 영양이 풍부하여 식품으로 애용되어 왔을 뿐 아니라 약용 등의 목적으로도 널리 이용되어 왔다. 특히 질병의 치료 및 예방에 효과가 있는 천연물 중 가장 주목받고 있는 담자균류(*Basidiomycetes*) 버섯은 이들의 광범위한 약리작용으로 인해 한방의학에서도 널리 활용되고 있다. 최근 담자균류 유래 약용버섯들의 항암효과가 과학적으로 입증되고 있으며, 약용버섯 추출물 중에서 특별히 면역증강작용에 의해 탁월한 항암효능과 당뇨병 개선효과를 보이는 생리활성물질은 β -D-Glucan 구조를 갖는 수용성 단백다당체 (향후 “단백다당체”로 명명함)로 구성되어 있음이 밝혀졌다. 이중에서도 특히 대표적인 담자균류에 속하는 차가버섯 유래의 단백다당체는 면역증강 효과와 함께 인슐린 분비 촉진작용에 의한 혈당강하 효능이 탁월한 것으로 밝혀져 당뇨개선 약효를 갖는 새로운 생리활성물질로 주목을 받고 있다.
- 전적으로 수입에 의존하고 있는 고가의 *Inonotus obliquus* (차가버섯) 자실체를 대체할 뿐만 아니라 기존의 경구용 당뇨치료제의 한계를 극복할 수 있는 제품을 개발하기 위하여, 항당뇨 효능의 단백다당체를 고생산할 수 있는 *Inonotus obliquus* 균주를 개발함과 동시에, 항당뇨 효능이 있는 것으로 밝혀진 농산물을 배양배지화한 *Inonotus obliquus* 균사체의 고농도 배양기술을 개발하고(제1 협동과제), 대형 발효조를 이용해서 *Inonotus obliquus* 균사체의 대량 액상배양공정 기술을 구축하고자 한다(제1 세부과제). 또한 고 품질의 항당뇨물질인 수용성 단백다당체를 고순도로 대량 회수하기 위한 청정 분리정제공정을 개발하고(제2 협동과제). 순수 정제된 단백다당체의 효능 실험을 통해 이들의 항당뇨 생리활성 기능을 체계적으로 연구하고, 이 물질에 대한 안전성 평가 연구를 통해 고안정성의 항당뇨 기능성 식품을 개발하고자 한다(제2 세부과제).

2. 최종 연구목표

- *Inonotus obliquus* 균사체의 원형질체 형성 및 재생을 통한 세포벽 단백다당체(IPS) 및 세포외 단백다당체(EPS) 고생산성 변이주 개발
- 단백다당체 고생산성 및 고성장성 변이주의 신속 선별과 대량 배양 시스템 확립
- 고생산성 *Inonotus obliquus* 균사체의 stock 보관법 개발
- 다단계의 배양공정으로 구성된 일련의 종균배양공정 기술 개발
- 통계적 방법에 의한 배지성분 및 배지농도 최적화
- Scale-up 생산배양 공정 및 분리정제 공정에 대비한 저가의 산업용 복합 배지 개발
- Bench-scale 발효조에서의 고생산성 균주의 배양 생리적 특성 및 배양 형태적 특성 조사
- 생물반응기 시스템 설계

- 고생산성 변이주의 scale-up 배양공정에 이르는 일련의 산업용 배양공정 확립
- Pilot 규모 발효조에서의 scale-up 배양 및 시제품 생산
- 배양공정 자동화를 통한 조업변수 예측 및 용존 산소 농도 자동 제어 기술 개발
- 유용 물질 분석법 확립 및 추출 분리 정제 공정 개발
- 기능성을 개선시킨 β -glucan 구조의 수용성 단백다당체 제조
- Lab-scale의 청정 분리정제 공정 개발 연구 지속적 수행
- 기능성을 개선시킨 β -glucan 구조의 수용성 단백다당체 제조 연구 지속적 수행
- 청정 분리정제 공정의 규모 확대(scale-up) 연구의 지속적 수행
- Pilot 규모의 열수추출조 설계 및 pilot 규모의 여과 공정 개발
- Pilot 규모의 미세/한외여과공정 개발 및 pilot 규모의 단백다당체 건조공정 설계
- 청정 분리정제 공정의 scale-up 전략 확립 연구 지속적 수행
- 실험동물 사육 및 시료 투여
- 혈당, 내당능 조사 및 지질 성분 함량 조사
- 지방 및 간 조직 성장 조사 및 카르니틴 분석
- 지질대사 관련 효소 및 단백질 (CPT-I, ACC, FAS, UCP2 등) mRNA 발현 조사 및 혈중 Insulin 조사
- 간중 glycogen 함량 조사
- 항당뇨 효능의 기능성 식품 개발

제 2 절. 연구개발의 필요성

1. 항당뇨 효능의 단백다당체 고생산성의 *Inonotus obliquus* 변이주 개발 및 배양 특성 연구의 필요성

- 당뇨 개선 약효가 뛰어난 것으로 알려진 *Inonotus obliquus* 등의 담자균류는 성장조건이 까다로워 번식이 잘되지 않아 야생의 것은 너무 비싸고 희귀하여 구입하기가 쉽지 않다. 최근 들어 인공재배에 의해 자실체를 생산하고 있으나 긴 생산기간과 낮은 생산성으로 인해 소비자가 원하는 저렴한 가격에 판매가 어려운 실정이다. 최근 여러 종류 버섯들의 항당뇨작용 및 면역증강작용에 의한 항암효과가 과학적으로 입증되었으며 이러한 효능을 나타내는 성분은 β -D-glucan 구조를 갖는 단백다당체로 밝혀졌다.
- 발효조를 이용한 *Inonotus obliquus*의 성장배양 및 생산배양공정은 균사체를 이용한 액상배양공정이다. *Inonotus obliquus*의 경우 균사체로 존재할 때에는 포자를 형성하지 않기 때문에 종균의 액체 장기보관이 어렵고 액상배양에서 계속 계대하여 종균으로 사용할 경우 오염의 위험성 및 균주 변이의 위험성과 함께 종균 상태에 따라 생산성이 크게 달라지는 등 조업에 많은 어려움이 존재할 수밖에 없다. 일반적으로 종균보관은 solid-stock의 고체보관법에 의존하고 있으나, solid-stock으로 부터 발효조의 균사체 액체배양까지 걸리는 시간이 너무 길어 세포생산성 및 단백다당체의 생산성을 떨어뜨리는 주요 요인으로 작용하고 있다. 따라서 장기적인 보관이 가능한 액체보관법을 개발하여 균주를 안정적으로 관리함으로써 발효조 배양 시 단백다당체 생산의 안정성을 높이고 또한 높은 생산성을 유지시켜야 한다.
- *Inonotus obliquus*의 면역증강작용에 의해 항암 및 항당뇨 성분으로 밝혀진 베타글루칸 구조의 단백다당체는 특별히 고안된 정제과정을 거쳐 정제된 조단백다당체에도 5% 이하의 함량을 나타내는 미량성분이다. 따라서 rational screening 방법과 원형질체를 이용한 고생산성 변이주 선별 및 원형질체 융합균주 개발을 통해 항당뇨 효과가 높은 고농도의 단백다당체를 생합성할 수 있는 *Inonotus obliquus* 균주의 개발이 필수적이다.
- *Inonotus obliquus*와 같은 고등균류의 경우 배지 성분에 따라 배양생리적 및 배양형태적 특성이 확연히 달라진다. 따라서 생산성 향상을 위해서는 적절한 양의 배지가 공급되어야 함은 물론, 각 영양원의 성분 및 조성의 최적화가 필수적이다. 배지 최적화를 수행할 때 단일 요소에 대해서만 변화를 줄 경우, 영양원간의 상호작용을 제대로 파악할 수 없으므로 최적 조성을 찾기 힘들며, 여러 요소를 전체적으로 살펴볼 경우 과도한 실험양으로 인한 한계에 직면하게 된다. 이러한 어려움을 해결하기 위해 Plackett-Burman 디자인이나 Response surface 방법 등의 통계적 처리를 통해 신속하고 효율적인 산업용의 저가 복합배지 개발 연구가 수행되어야 한다.

2. *Inonotus obliquus* 균사체의 pilot 규모 발효조에서의 자동화 액상배양공정 개발을 통한 항당뇨 효능의 단백다당체 대량 생산 연구의 필요성

- 고등균류인 *Inonotus obliquus* 균사체는 균사형성 미생물로써 독특한 3차원적인 균사구조로 인해 발효배양액에 심각한 점도 증가 현상이 발생하여 산소 및 영양분 전달이 저조하고, 이를 방지하기 위해 무리하게 교반속도를 증가시킬 경우 전단응력(shear stress)이 발생하여 이

에 민감한 균사체 배양경우 발효조에서의 고농도 액상배양이 어렵게 되는 문제점이 존재한다.

- 선별된 고생산성 균주들을 액체보관법에 의해 보관한 후, 이 liquid-stock으로부터 직접 액체 배양에 들어가면 적응시간 없이 바로 본격적인 배양에 들어갈 수 있어 많은 시간을 절약할 수 있으므로 생산성 향상을 기대할 수 있다. 따라서, liquid-stock으로 보관할 경우 초기 액체배양에 있어서 균사체 성장을 활성화시킬 수 있는 배양공정 개발이 필요하다.
- 개발된 고생산성 균주의 발효조에서의 배양을 통해 고생산성 균주 각자의 배양생리적 특성 및 배양형태적 특성 조사가 이루어져야 한다. 특히, 배지 종류, 접종량, 접종시기, 교반기의 속도 및 종류에 따른 배양 특성 조사를 통해 최적의 pellet size (직경 1 mm 이하) 형성을 위한 배양조건이 확립되어야 한다. 또한 scale-up시 가장 중요한 배양변수인 용존산소농도가 단백질다당체 생합성 및 생산균주의 성장속도에 미치는 영향에 대한 집중 조사를 통해 배양공정의 scale-up 자료가 확보되어야 한다. 특히 배양기의 교반속도 증가에 따른 shear stress가 생산균주의 배양형태 및 단백질다당체 생산성에 미치는 영향 조사 및 이에 근거한 최적의 용존산소농도 결정이 이루어져야 하며, 동시에 최적의 용존산소 공급량이 결정되어야 한다.
- Pilot 규모 생산배양 시, *Inonotus obliquus* 균사체의 morphology를 균사형태가 아닌 작은 pellet으로 유도함으로써 점도 증가 방지와 함께 생산성을 향상시킬 수 있으나, 균사체가 pellet 형태로 유도되는 배양 환경적 조건에 대해서는 전혀 밝혀지지 않고 있다. 따라서접종량, 배지의 조성 및 배양기간 등의 초기 접종조건과 함께 배양기내 물리화학적 환경조건에 대한 최적화 연구를 통해 최적 morphology를 얻을 수 있는 액상배양공정이 개발되어야 한다.
- Lab-scale의 연구결과를 산업화하기 위해서는 확대된 규모의 pilot-scale의 발효공정에 대한 연구가 필수적으로 이루어져야 한다. 즉 대규모의 산업적 배양시스템에서는 균일성 유지가 어렵고, 부피에 대한 표면적 비의 변화로 인해 산소공급과 열 제거 등 복잡한 설계요건을 요구하며, 또한 배양 중 거품발생과 같은 다양한 문제가 발생한다. 산업적 발효조의 이러한 복잡한 특성 때문에 대규모 발효기의 배양환경은 크게 다르다고 할 수 있다. 따라서 산업화를 이루기 위해서는 pilot-scale의 배양공정에 대한 집중적인 연구가 체계적으로 이루어져야 한다.
- 기존의 발효조에서의 균사체 액상배양공정은 대부분 수동식 배양공정으로 세포대사의 정확한 조절이 어려울 뿐만 아니라 생산성이 낮은 단점이 있다. 따라서 액상배양공정 개발을 통한 균사형성 미생물인 *Inonotus obliquus* 균사체의 고농도 배양에 있어서 배양공정의 주요변수(예, 산소농도, 세포농도, 영양분 농도)를 on-line으로 측정할 수 있는 기술뿐만 아니라 공정운전을 컴퓨터로 정밀하게 제어할 수 있는 자동화 배양시스템이 개발될 경우, 이러한 문제점들이 효율적으로 극복될 수 있어서 기존의 수동식 배양공정에 비해 더 높은 생산성 향상을 기대할 수 있다.

3. *Inonotus obliquus* 배양 균사체로부터 항당뇨 효능의 단백질다당체 고순도 청정 분리정제 공정 개발의 필요성

- 배양균사체에 있어서 면역활성물질인 베타글루칸 구조의 수용성 단백질다당체 등의 생리활성

물질은 단단한 세포벽에 결합되어 보호받고 있으므로 추출 조건이나 방법에 따라 최종수율이 크게 다르게 된다. 따라서 유용물질의 함량을 올리기 위해서는 단백다당체 고생산성 균주 개발과 함께 효과적인 추출, 분리, 농축공정의 개발이 요구된다. 따라서 본 과제에서는 단백다당체 등의 유용물질의 효율적 생산을 위한 환경 친화적 청정 분리정제공정을 개발하고자 한다.

- 대부분의 생물 산업 제품의 경우 배양액에 함유되어 있는 성분조성은 대단히 복잡함에도 불구하고 상대적으로 높은 순도가 요구된다. 또한 여러 단계의 분리정제 단위공정을 거쳐야 하고 이에 따라 분리정제공정이 차지하고 있는 생산비용은 발효공정을 포함한 전체공정의 절반 이상을 차지한다. 또한 발효제품이 분리정제공정을 거치는 동안 손실되어 수율이 저하되기 때문에 분리공정의 최적화는 전체 공정의 경제성을 향상시킬 수 있는 절실한 과제임에도 불구하고, 막분리 기술 등 효율적인 분리정제기술이 아직까지 확보되어 있지 못한 실정이다. 그러므로 상업성이 있고 회사에게 수익을 가져오기 위해서는 효과적이고 효율적이며 훌륭히 설계된 분리정제공정의 개발이 필수적이며 이를 위해 기초연구 및 실용화 공정 개발이 필요하다.
- 특히 약용버섯 유래 면역활성물질인 단백다당체는 단일성분이 아니라 α -glucan 등 수용성 고분자물질과 함께 분리 정제되며 단백질 함량이나 분자량에 따라 활성이 다른 여러 분획을 갖고 있다. 이 중 어느 분획의 활성이 특히 더 높으며, 생리활성에 직접적으로 관여하는 분획은 어느 것인지 제대로 밝혀져 있지 않아, 본 연구에서는 단백다당체의 명확한 구조 해석과 정량분석, 그들의 구조와 면역활성과의 상관관계에 대한 연구를 수행하고자 한다.
- 실용화 분리정제공정 개발을 위해서는 lab-scale의 기초연구를 바탕으로 pilot plant-scale의 공정을 개발하면서 scale-up에 따르는 설계자료 및 운전 자료를 비교 분석하여 scale-up 전략 수립 및 설계인자 도출 등의 일련의 단계적 실용화 연구가 기본적으로 필요하다. 따라서 최종목표인 실용화 공정 개발을 위해서는 우수 균주 선정, 발효공정, 분리정제 공정 등 각 기능상의 공정 개발도 성공적으로 수행되어야 하지만, 각 공정에서도 scale에 따른 단계적 연구가 유기적으로 연관되어 수행되어야 하므로 각 분리정제 단위공정 하나하나에 대한 기초적인 연구를 바탕으로 최적 조합한 lab-scale의 분리정제 공정의 개발이 pilot-scale의 분리정제 공정개발 이전에 선행되어 수행되어야 한다.
- 또한 실용적인 단백다당체의 분리정제공정을 개발하기 위해서는 새로운 환경친화적 청정 분리정제공정의 개발이 요구된다. 즉 단일 용매만으로도 분리, 정제가 가능한 분리정제공정의 개발이 요구되므로 pilot scale의 공정 개발에 앞서 이러한 새로운 분리정제공정의 개발이 필요하다. 특히 최근 산업 전 분야에 청정공정으로의 전환이 세계적으로 요구되면서 1970년부터 다양한 막의 개발로 막에 의한 분리정제법이 각광을 받게 되었다. 따라서 이러한 막분리에 의한 분리정제 방법의 기초 연구 및 lab-scale, pilot-scale 공정으로의 개발이 절실히 요구된다.

4. 순수 정제된 *Inonotus obliquus* 추출물질의 생리활성 평가를 통한 고안정성의 항당뇨/비만 효능의 기능성 식품 개발의 필요성

- *Inonotus obliquus* 유래 단백다당체 성분의 건강기능성 식품을 개발하기 위해서는 분리된

단백다당체를 함유한 건강기능성 식품의 안전성 확립이 매우 중요하다. *Inonotus obliquus* 추출물인 단백다당체에 대한 독성시험이나 임상평가를 통해 안전성과 효능을 확보한 가운데 건강성, 편의성, 관능성, 시장성을 고려한 제품의 연구개발이 이루어져야 한다. 또한 단백다당체 이외에도 알려진 효능에 대한 성분을 과학적으로 밝히는 것이 필요하다고 사료되어, 본 과제에서는 단백다당체 이외의 생리활성성분에 대해서도 연구를 수행하고자 한다.

- 당뇨병은 인슐린 처방이 필요한 제1형 당뇨와 인슐린저항성 혹은 인슐린분비의 상대적 결핍으로 인해 발생하는 제2형 당뇨가 있는데, 우리나라의 경우 제2형 당뇨가 전체 당뇨환자의 90~95%를 차지하고 있다. 제2형(인슐린 비의존형) 당뇨환자의 경우 대부분 약물요법으로 혈당을 조절하고 있으나 시간이 경과함에 따라 점점 많은 양의 약물 복용이 요구되므로, 그에 따른 부작용이 많다. 근래에 와서는 오랫동안 민간요법으로 사용되어 왔던 천연식물의 혈당강화 효과에 대한 관심이 증대되고 이 분야에 대한 많은 연구가 수행되고 있다.
- 왜 항비만/당뇨 기능성분으로 차가버섯과 카르니틴은 아미노산정도의 분자량을 가진 비필수 영양소이나 체내조건이 고에너지를 요하는 경우(신생아, TPN 환자) 또는 에너지원으로 많은 지질이 이용되는 경우(운동선수, 비만인)의 조건적 필수영양소라 여겨진다. 카르니틴 없이는 지방산을 에너지원으로 사용하지 못하기 때문에 비만증을 초래할 수 있고, 당대사의 문제를 야기시킬 수 있다는 논리적 근거를 바탕으로, 본 세부과제 연구에서는 체내의 지방산 산화에 필수적인 카르니틴과 지방대사에 관여하는 효소들의 활성, 발현 정도를 측정하여 생체내 지질 합성 및 산화 기작 규명 등의 연구를 수행할 뿐만 아니라, 당대사 관련 지표들을 측정하여 비만과 연계시키는 연구를 수행하고자 한다.
- 단백다당체와 같이 천연물 유래 기능성 성분은 대부분 특정질환 효능을 나타내기 위한 투여량의 안전성이 문제가 된다. 따라서 이를 이용한 식이요법은 약물요법과 달리 단일물질 투여농도의 안전성을 보완하기 위해, 단일물질을 통한 효과가 아닌 성분간의 상호 시너지 효과 극대화를 유도하기 위한 잘 고안된 복합체의 혼합투여 연구가 바람직하다.

제 2 장. 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 국 외

- 현재까지 *Inonotus obliquus*에 대한 연구는 주로 국외에서 연구가 진행되어 왔으나, 거의 대부분이 차가버섯 추출물의 약효에 대한 임상적인 데이터가 보고되고 있다. 현재 *Inonotus obliquus*을 전문적으로 연구하는 나라는 일본, 핀란드, 러시아 등이며 중국도 연구에 착수한 상태이다. 특히, *Inonotus obliquus*의 원산지인 러시아에서는 매우 일찍부터 이에 대한 연구가 진행되어 왔다. 여기서 밝혀진 주목할 만한 연구결과는 *Inonotus obliquus* 추출액이 동물 실험에서 종양조직의 상태를 호전시키고 종양 발달속도를 늦추며, 일련의 경우에는 종양을 소멸시키고 실험동물의 생명을 연장시켰다는 사실이다. 일본에서는 카바노아나다께란 이름으로 농축액을 제조하여 30ml에 34,000엔의 고가로 판매하고 있으며 인공재배기술 특허 등 활발히 연구가 진행되고 있다. 또한 핀란드에서는 *Inonotus obliquus* 내에 다당류, inotodiol을 포함한 isoprenoid계 triterpene 성분이 존재하여 여러 가지 의학적 효능을 발휘하고, triterpene, obliquol, lanosterol, inotodiol 및 다른 sterol이 풍부하게 함유되어 있어 인체의 면역력 증진, 종양 치료 등의 효능을 발휘하는 것으로 연구결과를 발표한 바 있다.
- *Inonotus obliquus* 와 같은 균사형성 미생물의 액상배양에 의한 생리활성물질의 대량 생산 기술은 본질적인 공정 개발상의 어려움으로 인해 기술개발 노력이 집중적으로 이루어지고 있음에도 불구하고, *Inonotus obliquus* 균사체 추출물인 베타글루칸 구조의 수용성 단백다당체 등의 생리활성물질을 대규모 발효조에서 대량 배양과 고순도 분리정제를 통해 제품화하고자 하는 연구는 아직까지 초보적인 수준에 머무르고 있다. 즉 *Inonotus obliquus* 추출물인 단백다당체의 면역증가효과에 기인한 항당뇨 및 항암 약효가 다양한 임상실험을 통해 입증된 이래, 단백다당체의 생합성 경로에 관한 기초 이론과 이들에 대한 임상효과에 대한 보고는 많이 발표되고 있으나, 고역가 균주 개발, 발효공정 개발 및 고순도 분리정제 등 생산기술에 대한 연구결과는 거의 발표되고 있지 않다. 일부 연구결과가 발표된 경우에도 이들은 실험실 수준의 정보만을 제한적으로 제공해 주고 있을 뿐, 생산 scale에서 생물공정 전반에 관한 연구는 회사를 중심으로 진행되어 그 결과가 know-how로서 외부에 거의 알려지지 않고 있는 실정이다.
- 대부분의 약용버섯의 경우 당뇨치료제 보다는 주로 면역증강제로서 개발되고 있다. 일본의 경우 기능성식품으로 표고버섯 균사체 추출물이 이미 일반화되어 있으며, 또한 1992년 아가리쿠스버섯 자실체로부터 추출한 고분자 다당체가 암세포 증식 억제뿐만 아니라 류머티즘 관절염이나 만성기관지염 및 위염처럼 면역기능 약화가 원인인 모든 질병에 효능이 있다고 알려지면서 그 활용방안에 대한 연구가 큰 진전을 보이고 있으며, 최근 기능성식품으로 상용화되었다.
- 면역증강효과에 의한 암치료(보조)제로 사용되는 의약품으로 구름(운지)버섯 배양균사체에서 추출한 단백다당체 PSK가 항암성 면역증강제 Krestin산제로, 치마버섯 균사체 배양의 배양여액에서 추출한 세포외 다당체 Shizophyllan이 항암성 면역증강제 Sizofilan주사제로 그리고 표고버섯 자실체에서 추출한 단백다당체 Lentinan이 항암성 면역증강제 Lentinan주사제로 판매되고 있다.

제 2 절. 국 내

- *Inonotus obliquus* 와 같은 균사형성 고등균류에 속하는 약용버섯 균사체의 액상배양에 의한 고부가가치 생리활성물질의 대량생산기술은 균주개발 및 배양공정개발이 까다로울 뿐만 아니라, scale-up 발효조에서 생물산업의 경제성을 결정하는 가장 중요한 기술로 인식되어져 선진국에서는 이 분야에 대한 기술개발 노력이 매우 활발하게 진행되고 있다. 그러나 국내의 경우 *Inonotus obliquus*에 대한 연구는 자실체 추출물의 암세포 저해활성을 조사하는 학술적 수준의 연구가 대부분이며, 본 연구팀이 추구하고자 하는, 고등균류에 속하는 고생산성 *Inonotus obliquus* 균사체의 산업적 대량배양을 통한 단백질단백체의 대량 생산, 순도 분리정제를 통한 제품화, 그리고 순수 분리된 추출 물질에 대한 체계적인 임상연구 등에 대한 연구는 전혀 이루어지지 않고 있다.
- *Inonotus obliquus* 추출물인 단백질단백체에 대한 연구는 거의 이루어진 것이 없으며, 대신 다른 약용버섯에 속하는 다른 담자균류 유래의 생리활성 추출물에 대한 연구가 주로 이루어졌다. 예를 들어 표고버섯, 아가리쿠스 버섯 및 상황버섯 균사체의 액상배양을 통해 추출한 생리활성물질들에 대한 약효 검사 등을 비교 검토한 바 있다. 특히 표고버섯과 보리로부터 분리정제한 단백질단백체를 당뇨 마우스에 경구투여한 후 체중의 변화, 혈당 농도, 지질 성분의 조성 등을 관찰하여 당뇨병에 대한 개선 효과를 발표한 바 있다.
- *Inonotus obliquus* 과 관련된 국내 특허로는 3건이 등록되어 있는 상태이나, 이들은 모두 *Inonotus obliquus* 추출물의 생리활성 효과를 조사한 내용이다. 한편 당뇨와 관련된 특허가 1건 출원 중에 있으나, 이는 생장 특성상 재배가 어려워 원산지인 러시아로부터 고가로 수입된 자실체를 이용한 것이어서 본 연구에서 개발하고자 하는 *Inonotus obliquus*의 균사체 배양에 비해 생산하고자 하는 생리활성물질에 비해 그 경쟁력이 떨어지는 것으로 판단된다. 한편 국내의 항당뇨 생리활성 물질에 대한 연구는 주로 민간요법으로 사용되어온 천연식물이나 약용버섯을 중심으로 주로 연구되었으며, 그 대부분이 혈당강하 효과를 확인한 수준에 그치는 연구결과를 발표하였다.
- 약용버섯에 속하는 담자균류 균사체의 액상배양공정에 의한 생리활성 물질과 관련한 국내의 기술 수준을 일본 등의 생명공학 선진국과 비교하면 다음과 같다.

표 1. 국내외 기술수준 비교

항 목	기술수준		문제점
	국내	국외	
약용 버섯 균사체 균주 개량 기술	+	+++	전문인력 부족 균사체의 원형질체 유도 및 세포융합기술 미흡
발효공정 최적화 기술	+	+++	고점도성 균주 배양기술 및 고농도 배양기술 부족, 배양공정 자동화 기술 미흡
생물반응기 설계 기술	++	+++	전문인력 부족, 균사형성 고등균류의 scale-up 배양공정 기술 부족
발효산물의 분리정제 기술	++	+++	설비투자 부족, scale-up 배양공정 기술 부족
제품화기술	+	+++	전문인력 및 설비투자 부족

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 항당뇨 효능의 단백다당체 고생산성의 *Inonotus obliquus* 변이주 개발 및 배양 특성 연구(제1협동과제)

1. 재료 및 실험방법

가. 사용균주 및 균주보관

Inonotus obliquus strain을 모균주로 하여 계대배양 배지(Table 1-1)를 이용하여 11~15일 마다 계대배양을 수행하였다. 정치배양은 자체 제작한 지름 1 cm의 agar cylinder를 이용하여 정치배양 배지(Table 1-2)를 이용하였으며 균주보관은 정치배양을 통해 얻은 균사체를 blending하여 액상 성장배양을 약 4일 수행한 후 4°C에 보관하거나 20% glycerol stock을 만들어 -80°C에 보관하였고, 필요시마다 보관된 stock을 꺼내어 100 mm petridish의 고체 계대배양 배지에 접종하여 약 14일 동안 28°C에서 재활성화(reactivation)한 후 일련의 배양공정(즉 계대용 고체배양, 정치배양, 액상 종배양(성장배양), 액상 생산배양)을 수행하였다.

나. 배양배지 및 배양조건

배양 목적에 따라 계대배양 배지, 정치배양 배지, 성장배지(Table 1-3), 세포벽 다당체(IPS) 생산 배지 및 세포외 다당체(EPS) 생산배지(Table 1-4), 재생배지(Table 1-5)를 이용하였다. 배지멸균은 당과 질소원, 무기염류를 분리하여 121°C에서 15분간 autoclave 했으며, 경우에 따라 0.45 µm의 filter로 멸균하였다.

다. 정치배양과 플라스크 액상배양 및 접종 방법

계대배양 배지에서 11~15일 동안 배양한 균사체를 1 cm agar cylinder를 이용하여 7~10개씩 정치배양 배지로 무균상태에서 옮겨준 후 28°C에서 7~10일간 배양하였다. 본 연구에서는 종배양(성장배양)의 초반 단계에서 정치배양 방법을 추가로 도입하여 종배양에서 원하는 균사모양의 배양형태를 유도하고자하였다. 정치배양을 위해 계대배양 배지에서 11~15일 배양한 균사체를 직경 1 cm의 agar-cutting용 cork borer No.3을 이용하여 7~10개씩 떼어내어 정치배양용 배지로 무균상태에서 옮겨준 후 28°C에서 7~10일간 배양하였다. 이후 플라스크 배양을 위해, 선행된 정치배양을 Waring blender를 이용하여 20초간 균질화하였다. 균일하게 blending된 균사체를 500 ml flask (culture volume: 100 ml)로 30%(v/v)를 접종하였으며 28°C, 150 rpm에서 플라스크 액상배양을 수행하였다. 플라스크 액상배양은 성장배지 및 생산배지의 조성을 기본으로 하여 1차 성장배양은 500 ml 플라스크에서 수행했으며, 다음 단계의 배양(2차 성장배양 또는 생산배양)을 위해 이로부터 10%(v/v)를 접종하였다. 플라스크 생산배양은 진탕배양기에서 28°C, 150 rpm으로 7~10일간 배양하거나, 3~5일 배양한 후 다른 플라스크로 계대배양하였다.

라. 균체농도 측정 및 세포의 단백다당체(EPS) 회수

균체농도 측정은 균사체 건조중량(DCW)을 이용하였다. 배양액으로부터 균일하게 균사체를 회수한 다음 20 ml의 세포를 4,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 회수하여 1.5 ml tube에 옮겨 남아있는 당의 측정에 사용하였고, 나머지 상등액을 제거한 후 3번의 세척과정을 통해서 남아있는 당, 불용성 물질이나 염류들을 제거하였다. 이후 weighting dish에 담아 90°C에서 12시간 건조하여 DCW의 무게에 변화가 없는 것을 확인한 후 건조중량을 측정하여 1 /당 세포농도로 환산하여 나타내었다. 경우에 따라서는 회수한 배양액을 paper filter로 washing한 후, 이를 microwave oven을 이용하여 20분간 건조하여 DCW를 측정하였다. 세포의 단백다당체(EPS)는 DCW 측정을 위해 최초 10분간 원심분리한 배양액으로부터 상등액 5 ml 또는 10 ml를 취한 후 2배수의 100% 에탄올을 첨가하여 -20°C에서 하룻밤을 방치한 후 4,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 이 후 상등액을 제거하고, 남아있는 pellet을 90°C oven에서 12시간 정도 건조시킨 후 무게를 측정하였다.

마. 당 분석

배양액 중의 당 분석은 배양액을 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 12,000 rpm에서 10분간 3회 원심분리를 반복 수행하여 상등액 만을 취한 후 0.45 µm HPLC용 filter를 이용하여 filtration을 수행하였다. HPLC를 이용한 당 분석 조건은 다음과 같으며, HPLC chromatogram을 Figure 1-1에 나타내었다:

- Column A: RS tech, NH₂ column (250 mm x 46 mm)
- Column No : 091264AE
- Column temperature : 40°C
- Mobile phase : 75:25 (Acetonitrile : Water)
- Flow rate : 1.2 ml/min
- Detection : RI

바. HPLC를 이용한 균사체내의 단백다당체 정량분석

*Inonotus obliquus*로부터 β-D-glucan의 구조를 갖는 세포벽다당체(IPS)의 정량분석을 위해, 배양한 균사체를 원심분리하여 상등액을 제거한 후 증류수를 이용하여 3번의 세척과정을 수행하였다. 이후 90°C에서 12시간 건조하여 분쇄된 건조균사체 25 g을 증류수 50 ml에 현탁한 후, 수증기 증탕기를 이용하여 2시간 추출하고 다시 40 ml의 증류수를 가하여 6시간 추출하였다. 이후 0.45 µm filter를 이용하여 2번의 filtration 과정을 수행한 후, 추출액 15 ml를 새로운 tube로 옮겨 2배수의 99.9% 에탄올에서 6시간 동안 침전시켰다. 이를 2,800 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 제거하고 동결건조한 후, HPLC용 gel chromatography column과 ELSD detector를 이용하여 분석하였다(Figure 1-2).

한편 세포외다당체(EPS)의 분석은 상기의 방법에 의해 회수한 세포의 단백다당체를 막자사발을 이용하여 잘게 부순 후 적당량의 증류수에 녹이고, 0.45 µm filter를 이용하여 최종적으로 얻은 시료를 상기의 HPLC 방법으로 분석하였다.

사. 단일 콜로니를 얻기 위한 원형질체의 형성, 회수 및 재생 방법

*Inonotus obliquus*는 포자를 형성하지 않기 때문에 단일 콜로니를 얻기 위해서 원형질체를 형성시키는 방법을 개발하였다. 원형질체 형성을 위한 전배양을 수행하여 균사를 획득하였다. 전배양의 경우 정치배양으로부터 30%를 flask로 접종한 후 성장배지에서 2일 동안 배양하고, 50% v/v로 새로운 flask로 계대배양한 후 다시 1일간 더 배양하여 균사체를 회수하였다. 균사체의 회수는 filtration (pore size 20~25 μm , Watman NO.4)방법 또는 원심분리방법을 이용하였다. 회수한 균사체를 0.6 M KCl로 수차례 washing한 후 균사체 1 g(wet weight)을 측정하여 원형질체 형성에 이용하였다. 원형질체 형성을 위해서 OM-A buffer(1.2 M MgCl_2 , 10 mM Phosphate buffer, pH 5.8- Trizma acid[®] and Trizma alkali[®]) 5 ml에 균사체 1 g과 1~2%의 Novozyme 234를 첨가하여 잘 섞어준 후 28°C, 100 rpm에서 2~3시간 동안 반응시켰다. 원형질체가 형성되는 상태를 30~40분 간격으로 현미경을 통해 관찰하면서 반응 시간을 결정하였다. 형성된 원형질체는 세포벽이 제거된 상태로 삼투압에 매우 약한 형상을 보이며 물리적인 충격에도 다소 약한 특성이 있기 때문에 가능한 한 충격을 완화하면서 이 원형질체들을 회수하여야 한다. 회수방법으로는 filtration (Watman paper #1) 방법, 또는 trapping buffer 방법을 이용하였다(Figure 1-3). Filtration 방법의 경우 짧은 시간에 실험을 수행할 수 있는 반면, 분절된 일부의 균사체가 회수된다는 단점이 있으며, trapping buffer 방법의 경우 원형질체만을 회수할 수 있는 장점이 있는 반면 여러 번의 원심분리과정이 필요해서 다소 시간이 걸리므로 원형질체의 재생 시에 어느 정도 영향을 받는 것으로 관찰되었다.

Trapping method를 적용하기 위해 trapping buffer (0.6 M sucrose, 0.1 M Tris-HCl, pH 5.8) 10 ml를 천천히 첨가하여 원형질체 혼합물을 조심스럽게 섞고 2,500 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 이와 같은 과정을 2~3회 정도 반복 수행한 후, 3,000 rpm으로 20분간 원심분리 하여 상등액을 조심스럽게 제거하였다. 이후 약 5 ml 정도만 남긴 후 washing buffer인 STC buffer (1.2 M sorbitol, 10 mM CaCl_2 , 10 mM Tris-HCl pH 7.0)를 이용하여 3,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 제거하고 1 ml 정도만 남겨서 원형질체를 세척함과 동시에 농축하였다. 원형질체의 재생을 위해 이와 같이 준비된 원형질체를 STC buffer 또는 phosphate buffer에 현탁하여 $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ (protoplasts/ml) stock을 제조하였다. 이들 원형질체 stock 0.1 ml를 soft 배지(1% agar, 1.2 M sucrose) 5 ml에 첨가하여 고체최소배지(2% agar, 1.2 M sucrose), 또는 원형질체 재생배지(Table 1-5)위에 pour plating하였다. 접종한 배지를 28°C에서 10~12일 정도 배양한 후 재생된 원형질체를 측정하였으며, 원형질체형성률(Protoplast formation frequency)를 알아보기 위해 원형질체를 삼투압 안정제가 첨가되지 않은 최소배지 또는 원형질체 형성배지에 접종하고, 이로부터 균사체 재생 여부를 비교하였다. 재생률과 원형질체 형성률은 다음의 식에 따라 계산되었다. 형성된 원형질체는 자체 제작한 0.5 mm agar cylinder를 이용하여 주변의 다른 균사체가 닿지 않도록 하여 각각 분리해낸 후, 계대배양 배지에 옮겨서 배양하였다.

$$\text{재생률} = \frac{\text{형성된 원형질체 수}}{\text{접종한 원형질체 수}} \times 100$$

$$\text{원형질체 형성률} = \left(1 - \frac{\text{삼투압안정제 비첨가배지에서 형성된 균사체 수}}{\text{삼투압안정제 첨가배지에서 형성된 균사체 수}}\right) \times 100$$

형성된 원형질체는 자체 제작한 0.5 mm agar cylinder를 이용하여 주변의 다른 균사체가 닿지 않도록 하여 각각 분리해 낸 후 이미 만들어진 계대배양배지에 옮겨서 배양한 후 균사가 성장한 길이를 측정하여 다음 실험에 사용하였다.

아. 고생산성 균주의 genome shuffling에 의한 단백질다당체 고생산성 유전자재조합체 개발

(1) 원형질 융합방법의 개발

본 연구에서는 변이주 개발방법으로 획득한 고생산성 균주들을 이용해서 상호 원형질체 융합 (protoplast fusion)을 수행함으로써 고생산성 균주의 genome shuffling을 다양하게 유도하고자하였다. 즉 균사 모양의 모균주를 UV로 변이처리한 후 효소 처리하여 이로부터 돌이변이된 원형질체를 유도한 후, 이 원형질체에 polyethylene glycol(PEG)과 같은 융합유도물질(fusogenic agent)을 첨가함으로써 원형질체간의 융합에 의해 순간적인 hybrid나 diploid를 형성시켜 hybrid 단계 동안에 유전적인 재조합이 발생하도록 유도하였다. 즉 genome shuffling에 의해 획득한 유전자 재조합체는 단순 변이주에 비해 유전함량의 증가로 유전적 안정성이 뚜렷하게 증가되고, 성장속도 및 생산성 등과 같은 배양 생리적 특성이 큰 폭으로 향상된 고생산성 균주들이 될 것으로 판단되었다.

원형질체 융합을 위한 각 원형질체의 형성은 이전의 단일 콜로니를 얻기 위한 실험방법과 동일하게 진행되었다. 단 유전자 재조합체를 개발하기 위한 본 실험에서는 원형질체를 회수하기 위해 삼투압과 물리적 충격이 매우 적은 회수방법인 protoplast banding technique 방법(또는 trapping buffer 방법)(Figure 1-3)을 적용하였는데, 이 방법에 대해서는 위에서 이미 설명한 바 있다.

형성된 원형질체를 인위적으로 융합시키기 위해서, 미생물의 융합에 주로 사용되며, 세포에 무독한 PEG를 주로 사용하였다. 본 실험에서 사용한 PEG 분자량은 4,000 과 6,000을 40% 내외로 사용하였으며 Ca^{2+} 를 함께 사용하였다. 융합하고자 하는 두 가지 다른 균주의 원형질체를 상기의 회수방법을 통해 얻은 다음, STC buffer로 5×10^5 protoplasts/ml로 희석하여 섞었다. 두 가지 원형질체가 섞여 있는 혼합액을 4,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후, 회수한 원형질체에 30°C로 예열된 PEG fusion solution(40% PEG 4000, 10 mM $CaCl_2$, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5)을 1 ml 가하여 상온에서 10분간 반응시켰다. 융합반응 후 융합을 중지시키기 위해 STC buffer를 첨가한 후, 적당히 희석한 현탁액 0.1 ml를 환원용 고체 soft 배지에 첨가한 후, 이를 환원형 고체배지에 overlay 하였다.

(2) 돌연변이 유도를 통한 유전자재조합체 선별 방법 (표지인자 무사용)

표지인자를 사용하지 않고, 돌연변이 방법을 통해 유전자재조합체를 선별하기 위해 우선 융합하고자 하는 균사 모양의 두 종류의 모균주를 약 200초 동안 UV로 변이처리한 후(치사율 약 80% 이상), 효소 처리하여 이로부터 돌이변이된 각각의 원형질체를 유도한 후, 이 각각의 원형질체 1 ml씩을 centrifuge tube에 섞어 4,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 이와 같이 회수한 두 종류의 원형질체 혼합물을 30°C로 예열된 fusion solution(40% PEG 4000, 10 mM $CaCl_2$, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) 1 ml를 가하여 상온에서 10분간 반응시켰다. 융합반응 후 융합을 중지시키기 위해 STC buffer를 첨가한 후 현탁액 0.1 ml를 환원용 고체 soft 배지에 첨가하고, 이를 환원형 고체배지에 overlay하여 28°C에서 배양하였다. 그리고 원형질 융합과정(fusion)을 수행한 것과,

융합을 수행하지 않은 것의 재생된 colony를 계수한 후, 돌연변이원을 처리하지 않은 대조군(control)과 비교하여 생존률을 확인하였다.

본 실험에서 치사율이 높은 조건(85% 이상)으로 돌연변이원(UV)을 처리하였다. 돌연변이원 처리 후 얻은 각 균주의 원형질체를 partner로 이용하여 원형질 융합을 수행하였으며, 이 중에서 세포벽을 재생하여 살아남은 colony를 유전자재조합 균주라고 간주하여 선별하였다. 그 이유는 돌연변이된 원형질체 중의 85% 이상이 사멸되는 조건으로 UV를 처리하였기 때문에, 돌연변이된 대부분의 원형질체는 거의 재생되지 않지만, 이들이 원형질체 융합(protoplast fusion) 단계를 거치게 되면 재생율이 약 4배 이상으로 뚜렷하게 증가하는 것으로 나타났다(결과에서 설명). 이는 돌연변이된 두개의 원형질체가 융합과정 중에 손상된 유전자를 서로 상호 보완시켜 주기 때문에 나타나는 현상인 것으로 판단되며, 따라서 이렇게 재생된 균주의 대부분을 유전자재조합체로 간주하였다.

자. miniaturized 액상배양 방법에 의한 단백다당체 고생산성 *Inonotus obliquus* 균주의 신속 선별

일반적으로 단백다당체 고생산성 *Inonotus obliquus* 균주 개발에 있어서 가장 중요한 단계 중 하나는 가능한 한 대량의 균주를 테스트하여 그 가운데서 고생산성 균주를 신속히 선별하는데 있다. 본 연구에서는 기존의 플라스크 균사체 배양 이외에도 Figure 1-4에 제시한 바대로 miniature 배양 방법(10 ml 튜브배양 시스템 이용)을 개발, 적용하여 배양을 소규모화 시킴으로써 원형질체 형성 방법을 통해 얻을 수 있는 변이주들을 대량 선별하였다. 단 10 ml tube 배양시 적정 배양형태(morphology)를 유도해주는 것이 miniature 배양의 성패를 좌우하는 것으로 나타났다. 플라스크배양의 경우 1회분 배양시 1인당 약 60개의 균주를 테스트할 수 있으나, tube를 이용한 소규모 배양시에는 1회분 배양시 약 300개 정도의 균주를 테스트할 수 있으며, 플라스크배양보다 조작성이 훨씬 간편하여 신속하게 균주개량을 수행할 수 있는 것으로 관찰되었다.

차. 통계적 방법을 이용한 정치배양 배지 및 생산배지 최적화

(1) OFAT(One Factor At a Time)에 의한 최적 생산배지 성분 탐색

생산배지 구성에 대한 최적 조건을 탐색하기 위해 우선적으로 하나의 요인을 여러 수준으로 놓고 나머지 요인들을 고정시켜 실험하는 "one factor at a time (OFAT) method"를 적용하였다. 이 방법은 주어진 조건에서 그 배지성분의 영향을 파악할 수 있다는 장점이 있지만, 다른 성분들의 조건이 동시에 변하면 그 결과를 예측하기 어렵고, 특히 성분들 간에 상호작용이 존재할 경우 얻어진 결과가 그 성분만의 효과인지, 또는 다른 성분들과의 교호작용에 의한 것인지를 구분할 수 없는 단점이 있다.

(2) Plackett-Burman design 및 요인설계(Full or fractional factorial design, FFD)를 이용한 최적 배지 성분의 통계적 결정,

많은 배지성분들 중에서 중요한 성분을 추려내는 초반의 선발실험에서는 실험의 규모를 줄이면서 많은 성분들에 대한 정보를 얻을 수 있는 방법이 절실히 요구된다. 따라서 통계적 방법으로 최

적의 배지성분을 결정하기 위해 Plackett-Burman design을 통해 유효 성분들을 조사하였으며, 이 결과를 바탕으로 배지성분들의 중요도를 평가하였다. Plackett-Burman design을 통해 조사하고자 한 배지 성분으로는 (i) 잘 알려진 산업용 배지 성분, (ii) 문헌조사를 통해 생산성에 중요하다고 판단된 성분, (iii) 미량의 중요 성분 등을 포함하여 다양하게 조사하였다. 이 방법은 n 회 실험으로 $(n-1)$ 개 변수까지 선별할 수 있는 방법인데, 4의 배수로 실험을 수행하므로, $(4k-1)$ 성분까지 선별할 수 있도록 하는 실험계획법이다. 본 연구에서는 세포 성장에 비교적 크게 영향을 주는 것으로 생각되는 11개의 배지성분을 사용하여 각 이 배지성분들의 조합이 근사체 성장에 미치는 영향을 조사하였다(Table 1-6). 최종적으로 Plackett-Burman design에 의한 실험 결과를 분석하기 위해 Design-Expert 6.0 program를 사용하였다.

Plackett-Burman design은 배지성분 각자가 기여하는 정도를 보여주는 반면, 2^m 요인설계법(factorial design)에 의한 실험에서는 각 배지성분 간의 상호 영향까지도 분석할 수 있다. 3개의 변수(factor)를 가진 실험을 factorial design에 의해 수행하는 과정을 설명하기 위해 Figure 1-5에 나타난 정육면체를 이용하면, 정육면체의 각 변은 각각의 변수 X_1, X_2, X_3 를 나타내고 각 변수를 두 개의 단계(level)로 나누었을 때 이와 같은 형태의 디자인을 2^3 (즉 공식화하면 n^m , n 은 number of level 이며 m 은 number of factor임) factorial이라 한다. 변수 X_1 은 정육면체의 왼쪽에 있는 4개의 꼭지점에 낮음, 그리고 오른쪽에 있는 4개의 꼭지점에 높음이 할당되고, X_2, X_3 의 경우에는 전면과 밀면의 낮음과 후면과 윗면의 높음이 각각 배정된다. 결과적으로 정육면체와 그 내부공간은 실험에 사용될 수 있는 변수의 변화공간이 된다. 이와 같은 2단계(two-level) factorial은 각 변수의 주요 효과와 변수간의 상호작용을 결정할 수 있다. 이러한 결과는 고정된 X_2, X_3 의 값에서만 결과를 얻게 되는 OFAT의 접근방법의 단점을 보완하게 되고, 동시에 X_1 의 주요 효과를 측정하기 위해 8개의 실험치 모두가 사용되어 자연스러운 반복효과를 갖게 된다. 연구의 초기 단계에서 많은 변수를 실험해서 중요한 인자를 추려내는 선별실험(screening experiments)에서는 주효과와 1차 교호작용에 대한 정보를 얻는 것이 중요하므로 실험의 규모를 줄이면서 많은 변수에 대한 정보를 얻을 수 있는 방법이 절실히 요구된다. 따라서 2^m 요인 실험 갯수의 1/2인 2^{m-1} , 1/4인 2^{m-2} , 1/8인 2^{m-3} 반복만을 실험하는 소위 부분실험(fractional factorial experiments)을 본 연구에서도 적용하였다.

(3) 배지 농도의 통계적 최적화를 위한 최급상승법(SAM) 및 반응표면분석법(RSM)의 적용

최적화된 배양배지를 확립하기 위해 배지성분 각각의 농도 변화가 생산성에 미치는 영향을 최급상승법(SAM)과 반응표면분석법(RSM)을 이용하여 분석하였다. 상기의 FFD의 실험에 의해 선별된 배지성분을 이용해서 각 배지성분의 최적 농도를 선정하기 위한 반응표면분석법을 곧바로 실행할 경우, 어떤 농도 범위에서 최적의 농도가 존재하는지를 추정하기가 매우 어려운 문제점이 존재한다. 따라서 Figure 1-6에 체계적으로 제시한 바와 같이, 최종적인 RSM 실험을 수행하기 전에 최적 농도가 존재하는 근사치를 추정하기 위해서 최급상승법(steepest ascent method, SAM)을 이용한 배양실험을 먼저 수행하였다.

그 후 선별된 배지성분의 최적 농도를 최종적으로 결정하기 위해 배지성분 각각의 농도 변화가 근체 생산성에 미치는 영향을 반응표면분석법을 이용하여 통계적으로 분석하였다. 이를 위한 실험 계획법으로 중심합성계획법(central composite design, CCD)를 이용하였다(Figure 1-7). 중심합성계획법에서는 중심점(no)의 수는 제한이 없으며 (본 실험에서는 4개의 중점을 사용), 축점(a)의 수는

2k로서 (본 실험의 4가지의 배지성분 농도를 조사한 경우를 예를 들면) 총 8개의 측정 실험을 수행하였다. 따라서 4가지 성분의 농도를 최적화시키는 경우, 총 실험횟수는 $2^k + 2k + n_0 = 2^4 + (2 \times 4) + 4$ 가 되므로 28개의 선정된 조건에서 실험을 수행하였다. 각각의 실험인자 변화에 따른 건조균체량(DCW)의 반응표면이 곡선으로 나타날 것으로 예상되어 아래와 같은 2차다항식에 적용시켰다.

$$f = y_0 + a_1X_1 + a_{11}X_1^2 + a_2X_2 + a_{22}X_2^2 + a_3X_3 + a_{33}X_3^2 + a_4X_4 + a_{44}X_4^2 + a_{12}X_1X_2 + a_{23}X_2X_3 + a_{31}X_3X_1 + a_{14}X_1X_4 + a_{24}X_2X_4 + a_{34}X_3X_4$$

여기서 f 는 균사체 농도(g/L)이고, X_1, X_2, X_3, X_4 는 각각 주요한 생산배지 성분이며 y_0 는 절편, a_n 은 회귀계수이다. 중심합성계획법에 의거해 얻은 배양결과를 Design-Expert 6.0 program을 이용하여 통계적으로 분석하여 회귀방정식을 얻음으로써 각각의 배지성분들에 대한 상호 영향을 분석하고, 이 결과를 바탕으로 최고 생산성을 위한 각 배지성분의 최적 농도를 결정하였다. 이때 전체 model에 대한 유의성은 ANOVA 분석시 주어지는 P값에 의해 결정되며, P값이 0.05 보다 작을 때 그 유의성이 인정된다고 간주하였다. 최적 배지농도는 2차다항식의 Y값인 균사체의 생산성이 최대가 되는 지점을 3차원 반응표면도와 contour plot을 이용하여 결정하였다.

카. 배양액의 용존산소 제한환경에서도 고생산성을 지닌 유전자재조합 *Inonotus obliquus* 개발: 발효조의 shear stresss 상태에서도 고생산성 특성을 갖는 *Inonotus obliquus* 생산균주 개발 전략

(1) 산소전달단백질인 VHB(*Vitreoscilla* hemoglobin)의 유전자 발현을 위한 *gpd* promoter system 개발: *gpd* promoter donor인 *Trametes versicolor*의 chromosomal DNA 분리

상기의 성장배지에서 4일간 배양한 담자균류의 일종인 *Trametes versicolor* (KCCM 11650)를 28°C, 150 rpm에서 진탕배양하였다. 배양액을 원심분리하여 상등액을 제거한 후 멸균수를 이용하여 3번의 washing을 반복하여 잔류 배지성분들을 제거하였다. 준비된 균체를 막자사발에 옮긴 후 액체 질소를 첨가하거나 glass bead 0.4 g을 첨가한 후 lysis buffer (200 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 2% SDS)를 이용해서 분말형태로 만들었다. 1.5 ml tube에 0.05~0.1 g의 균체를 옮기고 lysis buffer 500 μ l와 protease K 100 μ g을 첨가하여 60°C에서 1시간 배양하였다. 그 후 5 M NaCl을 1.4 M로 농도를 조절한 후 0.1 volume의 10% CTAB를 첨가하고, 65°C에서 10분간 배양한 후 SEVEC (chloroform : Isoamylalcohol = 24:1)을 1 volume 가하고 0°C에서 30분간 배양하였다. 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 새로운 tube로 옮긴 후 5 M NH₄Ac 0.5 volume을 더하여 ice에서 60분간 배양하였다. 이를 다시 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하였고 상등액을 새로운 tube로 옮긴 후 0.55 volume의 isopropanol을 가한 뒤 10분간 원심분리하여 남아있는 DNA를 100%와 70% 에탄올로 washing한 후 잔류 에탄올 성분을 증발시켜 DNA를 추출하였다. 이후 50 μ l의 증류수를 가하여 녹이고 실험에 사용하였다.

(2) *Trametes versicolor* *gpd* promoter를 이용한 유전자 발현벡터 제조

*Trametes versicolor*의 *gpd* promoter 유전자를 증폭하기 위해 이용된 primer는 NCBI(AY081189)

에 게재된 염기서열을 기초로 하여 제작하였다. Primer의 양 5' 말단에 제한효소 인식부위를 첨가하여 forward primer의 경우 *NdeI* site가, reverse primer에는 *BamHI* site가 존재하게 하였다(Table 1-6). *Trametes versicolor*의 *gpd* promoter 유전자가 있는 chromosomal DNA를 주형으로 DNA 0.5 μ g, 10X buffer 5 μ l, 2.5 mM dNTP 5 μ l, 20 pmol specific primer 각각 2 μ l, *Taq* polymerase 5 units, 그리고 최종부피가 50 μ l가 되도록 멸균 증류수를 첨가하여 PCR 반응액을 조제하였으며 DNA 증폭반응을 수행하였다. PCR은 95 $^{\circ}$ C 5분 1 cycle 과 92 $^{\circ}$ C 1분, 57 $^{\circ}$ C 2분, 72 $^{\circ}$ C 1분으로 30 cycle을 수행한 후, 반응을 완결하기 위해서 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 더 반응시킨 후 PCR을 종료하였다. 형질전환에 이용된 발현벡터는 pBARGPEVHB를 사용하였다(Figure 1-8(A)). 이 벡터는 glutamic acid의 유사체인 phosphinotricin에 대해 저항성을 갖는 *bar* 유전자를 선택적 표지인자(selective marker)로 포함하고 있으며, 본 연구를 통해 클로닝한 *Vitreoscilla spp.*의 hemoglobin(VHB) 유전자(용존산소전달유전자)가 삽입되어 있다. 한편 이 벡터의 경우 VHB 유전자의 promoter로서 *Aspergillus nidulans*의 *gpdA* 유전자를 포함하고 있으므로, 본 연구에서 사용하는 담자균류인 *Inonotus obliquus*를 host cell로 이용 시에는 발현이 제대로 되지 않을 것으로 판단되었다. 따라서 매우 효율적인 발현벡터를 제조하기 위해서 pBARGPEVHB를 *NdeI* 과 *BamHI* 제한효소로 각각 처리하여 선형벡터를 제조하였고, 또한 위에서 증폭시킨, 담자균류 *Trametes versicolor*의 *gpd* promoter도 같은 제한효소로 처리하였다. 제한효소로 처리한 두 반응물을 이용하여 ligation을 수행하였고, 결과적으로 *Trametes versicolor*의 *gpd* promoter에 의해서 VHB가 발현되는 벡터인 pBARGPDVHB를 제조할 수 있었다(Figure 1-8(B)). 따라서 본 연구 결과 제조된 이 발현벡터를 이후의 *Inonotus obliquus*의 형질전환에 의한 고생산성 균주 개발 연구에 사용하고자 하였다.

(3) 발현벡터 증폭을 위한 *E. coli*의 형질전환

*Trametes versicolor*의 *gpd* promoter와 pBARGPEVHB1를 이용하여 재조합된 pBARGPDVHB1를 *E. coli* DH25에 도입하였다. Competent한 *E. coli* cell의 조제는 CaCl₂ 방법을 이용하였다. LB-broth를 이용하여 3~4시간 정도 배양된 *E. coli* cell(OD600=0.4)을 4,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 ice에 15분간 방치하였다. 0.1 M CaCl₂(-4 $^{\circ}$ C) 25 ml을 가하여 5분 정도 방치한 후, 4,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상등액을 제거하였다. 다시 0.1 M CaCl₂(-4 $^{\circ}$ C)를 5 ml 첨가한 후 200~500 μ l 정도씩 분주하여 -80 $^{\circ}$ C에 보관하고 필요시마다 해동하여 사용하였으며, 보관기간은 한 달 정도로 하였다. *E. coli*를 형질전환 시키기 위해 competent cell을 -80 $^{\circ}$ C로부터 꺼내어 ice에서 천천히 해동하였으며, 준비된 DNA 10 μ l를 competent *E. coli* cell 200 μ l에 넣은 후 ice에서 30분간 방치하여 *E. coli*와 DNA가 접합하도록 하였다. 이후 미리 준비된 42 $^{\circ}$ C incubator에서 90초간 열 충격을 가한 후 ice에서 2분간 방치하였고, LB broth 500 μ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 배양하였다. 그 후 원심분리를 1분간 수행하여 상등액 400 μ l를 제거하고 나머지를 ampicillin이 첨가된 LB-agar 배지에 도말하여 8시간 후 colony를 확인하였다.

(4) Plasmid DNA preparation

Ampicillin에 저항성을 나타내는 형질전환된 *E. coli* colony로부터 QIAprep. Spin Miniprep Kit(QIAGEN)를 이용하여 plasmid를 준비하였다.

(5) 생산균주인 *Inonotus obliquus*의 phosphinothricin에 대한 MIC 측정

상기 방법에 의해 얻어진 원형질체를 phosphate buffer에 현탁하여 5×10^5 protoplasts/ml stock를 준비하였다. 원형질체 현탁액 100 μ l를 약 40~50°C 정도의 이미 만들어진 고체최소배지에 넣은 후 잘 섞은 다음 0, 30, 50, 70, 100, 150, 200, 250, 300 ppm의 phosphinothricin이 도말된 고체최소배지에 pour plating한 후, 12일간 배양하여 재생된 균사체를 분석함으로써 최종 MIC (minimum inhibition concentration)을 결정하였으며, 이 실험 결과를 이용하여 형질전환 실험시 phosphinothricin 저항성 균주, 즉 형질전환된 생산균주를 선별하는데 이용하였다.

(6) 생산균주인 *Inonotus obliquus*의 형질전환

Phosphate buffer 1ml에 5×10^5 protoplasts를 현탁하여 원형질체 stock을 준비하였다. 원형질체 stock 80 μ l를 tube에 옮기고 PEG solution (40% PEG 4000, 50 mM CaCl₂, Tris-HCl, pH 7.5) 20 μ l와 플라스미드 DNA 5 μ g을 첨가하고 조심스럽게 섞은 후 ice에 30분간 놓아두었다. 30분 후 PEG solution 1 ml를 첨가하고 실온에서 다시 20분간 놓아두었다. 형질전환된 반응물을 STC buffer로 10배 희석하였고 희석액 100 μ l를 phosphinothricin 50 ppm이 첨가된 5 ml 최소배지(1% agar, 1.2 M sucrose)와 섞어 고체최소배지(2% agar, 1.2 M sucrose)에 pour plating하였다. 이 후 선별된 colony를 100 ppm의 phosphinothricin이 첨가된 고체배지에 다시 옮겨 배양함으로써 최종적으로 phosphinothricin 저항성의 형질전환 생산균주를 선별하였다.

(7) *Aspergillus niger*로부터 산소전달단백질인 헤모글로빈의 역할을 담당하는 유전자 hmb1 (hemoglobin domain 유전자) 유전자의 cloning

hmb1 유전자 클로닝에 이용된 primer는 NCBI(AJ628840)에 게재된 염기서열을 기초로하여 제작하였으며(Table 1-8), ligation 반응에 이용하고자 primer의 양 5'-end에 제한효소 인식부위를 첨가하여 forward primer의 경우 *Bam*HI site가, reverse primer는 *Eco*RI site가 존재하게 하였다. 상기 방법에 의해서 얻은 *A. niger*의 chromosomal DNA를 주형으로 DNA 0.5 μ g, 10X buffer 5 μ l, 2.5 mM dNTP 5 μ l, 10 pmole specific primer 각 1 μ l, *pfu* polymerase 5 units, 그리고 최종 부피가 50 μ l가 되도록 증류수를 첨가하여 PCR 반응액을 각각 조제하였으며 DNA 증폭을 수행 하였다. PCR 반응 조건은 다음과 같다. 95°C 5분 1 cycle과 95°C 1분, 60°C 1분, 72°C 45초로 30 cycle을 수행한 후 반응을 완결하기 위해 72°C에서 10분간 더 반응시킨 후 PCR을 종료하였다. 또한 hmb1 유전자는 PCR후 T-vector (Promega, USA)에 클로닝하여 보관하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 정치배양으로 집중되는 계대배양(고체성장배양)에서의 배양환경 최적화

본 연구에서 개발하고 있는 균사형성 담자균류인 *Inonotus obliquus*의 전체 배양공정에 대한 모식도를 Figure 1-9에 체계적으로 제시하였다. 즉 liquid stock, 고체성장배양에서의 계대배양, 정치배양, 플라스크 성장배양을 거쳐 최종적으로 플라스크 생산배양 또는 발효조 생산배양을 수행하여야 최종 생산배양에서 생산성이 높은 배양형태가 유도되며, 배양 생리적 특성도 우수한 것으로 확인되었다.

한편 이 일련의 배양공정에서 균주개발시 가장 큰 장애요인은 고체성장배지에서의 계대배양(고체 성장배양)인데, 그 이유는 이 배양에서 특별히 장기간의 배양 시간이 요구되어 신속한 균주개발이 매우 어렵기 때문이다. 계대배양(고체성장배양)시의 이러한 문제점을 극복하고자, 계대배양 환경의 최적화에 대한 연구를 중점적으로 수행하였다.

(1) *Inonotus obliquus*의 최적 배양온도 조사

고체성장배지에서 *Inonotus obliquus* 계대배양을 위한 최적 온도 조사 실험을 수행하였다. 계대배양 배지는 우선적으로 MA 배지를 이용하였으며, 15일간 고체배양을 수행하였다. 20°C, 25°C, 28°C, 30°C, 32°C, 35°C에서 배양온도 조사를 수행하였으며, 그 결과를 Figure 1-10 과 1-11에 제시하였다. *Inonotus obliquus*는 mesophilic의 성질을 지닌 균주로 판단되었으며, 최적 온도는 28°C~30°C인 것으로 나타났다. 따라서 이 후의 배양실험은 28°C에서 수행하였다.

(2) 계대배양(고체성장배양) 배지 최적화: 기존의 다양한 고체성장배지 조사

Inonotus obliquus 계대배양(고체성장배양) 배지 조사를 Table 1-9와 같은 조합을 만들어 plant culture용 petri-dish에 20 ml를 무균적으로 부은 후 15일 동안 28°C에서 배양하였다. 계대배양 배지는 PDA, MYA, PDYA, MGA, MA의 다섯 가지 배지를 사용하였다. 15일 배양 후 성장한 균사체의 직경을 측정하고 결과 malt extract와 agar powder가 첨가된 배지(MA)에서 비교적 빠른 성장을 보이며, MYA에서는 MA보다 균사의 성장이 다소 늦은 것으로 관찰되었다(Figure 1-12). 한편 본 실험에서 주목한 점은 고등균류 고체배양을 위해 기존에 사용되던 다양한 배지를 사용했음에도 불구하고, 생산균주가 왕성하게 자라지 않는 것으로 보아 고생산성 균주개발 연구 및 배양공정 개발 연구가 신속히 진행되기 위해서는 우선적으로 *Inonotus obliquus*의 계대배양에 적합한 최적 고체배지가 개발되어야 한다는 것이다.

(3) 최적 계대배양 일수 조사 실험: 계대배양 배지로 MA 배지 사용

Flask 액상배양에서 최대 생산성을 얻기 위해서는 계대배양 일수가 중요한 영향을 미칠 것으로 판단하여 계대배양 배지를 MA 배지로 고정하고 배양 일수 조사를 수행하였다. 계대배양 일수 조사를 위해 10~20일 까지 배양한 균사를 정치배양한 후 플라스크 액상배양을 통해 균체생산량(DCW)과 EPS를 측정하였다(Figure 1-13). 균체생산량은 계대배양 18일에서 가장 높게 나타났으나, 데이터의 오차 등을 감안해서 계대배양 일수를 15일로 결정하였다. EPS의 경우에는 12일 배양에서 가장 높은 결과를 보여주었다. 또한 액상배양 균사체의 현미경 관찰시 clamp connection이 관찰되지 않는 것으로 보아, 이 균주는 haploid 상태의 단일 균사체인 것으로 확인되었으며, 플라스크 액상배양시 대부분이 성장배양에 적합한 균사모양의 배양형태를 보여주었다.

(4) Plackett-Burman design 실험에 의한 최적 계대배양 배지 조사

상기 실험에서 MA 계대배양 배지를 다른 종류의 배지와 비교했을 때 균사체의 성장속도가 빠른 반면 균사체의 밀도가 낮음을 확인한 바 있다. 따라서 다양한 성분들의 첨가에 의해서 빠른 성장과 동시에 균사체의 밀도를 높임으로써 최적의 계대배양 배지를 개발하고자 Plackett-Burman design 방법에 의한 통계적 배지최적화 실험을 수행하였다. 이 실험은 각각의 배지성분들에 대한 main

effect를 분석함으로써 다양한 배지의 조합에서 생산성에 큰 영향을 미치는 주요 성분을 찾아내는 방법이다. Plackett-Burman design을 위해 Table 1-10에 제시한 바와 같이 11가지의 배지 조합을 설계하였다.

1차 Plackett-Burman design 실험을 수행한 결과, 배지 조합 중에 corn oil이 첨가된 경우 균사의 성장이 심각히 저해되는 현상이 관찰되었다(Figure 1-14). 이는 배지 표면의 corn oil로 인해 생산균주의 영양분의 흡수가 저해되었기 때문인 것으로 판단된다. 따라서 corn oil을 제외한 2차 Plackett-Burman design(Table 1-11)에 의해 수행한 계대배양 결과를 Table 1-12에 제시하였다. 계대배양 시 균사체의 성장에 있어서 glucose, brown rice가 전체 배지 성분 중에서 각각 30%와 35%의 기여도가 있는 것으로 나타났으며, corn meal, peptone, magnesium sulfate의 경우는 각각 8.8%, 6.5%, 6.5% 정도로 기여하고 있는 것으로 분석되었다.

또 한편으로는 1차조사 실험의 조합에서 corn oil을 dummy variable로 교체하여 3차 Plackett-Burman design 실험(Table 1-13)을 수행하였다. 그 결과 기존의 MA 배지에서는 균사성장 직경이 71 mm이었으나, 5번 배지조합의 경우에서 균사의 성장속도가 약 23% 증가(균사성장 직경 92 mm)하는 주목할 만한 결과를 얻을 수 있었다(Table 1-14, Figure 1-15) (단 이 실험의 경우에는 배양기간을 기존의 15일에서 20일로 증가시켰음. 이로 인해 균사성장 직경이 기존에 비해 크게 증가되었음). 배지의 기여도를 일차다항식으로 분석한 결과(Table 1-15), 2차 Plackett-Burman design 실험 결과에서와 비슷한 경향을 보여주는 것으로 나타났다. 즉 이 경우에도 glucose(27% 기여도)와 brown rice(20% 기여도)가 균사 성장에 심각한 영향을 주며 magnesium sulfate(32% 기여도)의 경우에서 가장 큰 영향을 미치고 있는 것으로 분석되었다(Table 1-16, Figure 1-16). 통계 프로그램으로부터 주어진 평가식으로부터 glucose는 농도가 감소하는 쪽(즉 (-) 영향)으로 배지조합이 이루어져야 하며, brown rice 및 magnesium sulfate는 농도가 모두 증가하는 쪽(즉 (+) 영향)으로 배지조합이 이루어져야 한다고 결론내릴 수 있었다(Figure 1-22).

(5) Factorial factorial design(FFD) 실험에 의한 최적 계대배양 배지 조사

상기의 Plackett-Burman design은 배지성분 각자가 기여하는 정도를 보여주는 반면, factorial design에 의한 실험에서는 두 가지 배지성분의 상호 영향까지도 분석할 수 있다. 본 항에서는 배지 성분들의 상호 영향까지 조사하기 위해 Table 1-17에 제시된 factorial design 조합법으로 계대배양 배지에 대한 성분 조사를 계속 수행하였다. Factorial design의 경우 2^n 개의 실험 조합이 필요하지만 factor들이 많아질 경우에는 통계학적 방법에 의해 2^{n-1} 개의 실험을 수행할 수도 있다. 따라서 5개의 factor에 의해서 2^{5-1} 개의 조합인 16가지의 실험조합과, 실험의 오차를 줄이기 위해 중점으로 구성된 두 개의 실험조합을 추가해서 fractional factorial design(FFD) 실험을 수행하였다. FFD 실험을 위한 배지성분으로는 기존의 Plackett-Burman design 실험에 의해 기여도가 높다고 분석된 5 가지 성분(즉 glucose, brown rice, yeast extract, peptone, magnesium sulfate)을 이용하였다.

FFD 실험 결과에 대한 통계학적 분석을 통해 각각의 성분이 균사의 성장의 미치는 영향을 1차다항식으로 표현할 수 있었다. 즉 다섯 가지 성분이 균사의 성장(diameter)에 미치는 영향을 통계적으로 보여주는 다음 식이 제시되었다:

$$Diameter = +1.00(glucose) + 2.25(brown\ rice) - 4.00(yeast\ extract) + 6.25(peptone) + 8.5(magnesium\ sulfate) + 65.61$$

이로부터 계수가 가장 큰 magnesium sulfate가 균사 성장에 있어서 가장 긍정적인 영향을 미치고 있으며, yeast extract의 경우에는 오히려 농도가 낮아지는 방향에서 긍정적인 효과가 나타남을 추정할 수 있었다(Table 1-18). 따라서 이 배지성분과 기여도를 이용해서 계대배양 배지성분의 최적 농도지점을 대략적으로 결정하기 위해 우선 steepest ascent method를 수행하였다. 즉 steepest ascent method의 실험에 의해 추정된 각 배지성분의 농도 근처에서 최적의 배지성분 농도가 존재하리라고 판단하였다.

(6) Steepest ascent method를 이용한 계대배양 배지성분의 농도 최적화

Plackett-Burman design 또는 FFD에 의해 선별된 배지성분을 이용해서 곧바로 각 배지성분의 최적 농도를 선정하기 위한 response surface method(RSM)를 실행할 경우, 어느 정도의 농도 범위에서 최적의 농도가 존재하는지를 추정하기가 매우 어려운 문제점이 존재한다. 따라서 Figure 1-17에 체계적으로 제시한 바와 같이 최종적인 RSM 실험을 수행하기 전에 최적농도가 존재하는 근사치를 추정하기 위해서 steepest ascent method(SAM)를 이용한 실험을 먼저 수행하는 것이 바람직하다. Steepest ascent method를 이용하는 실험설계방법을 Figure 1-18에 도식화 하여 제시하였다.

배지성분 상호간의 영향을 조사한 상기의 FFD 실험결과에 근거해서 추정한 steepest ascent method의 실험설계값을 Table 1-19에 제시하였다. 통계 소프트웨어가 계산한 new step이 상당히 큰 값으로 제시되어 있으므로, 만일 이 값대로 실험을 수행한다면 소수의 실험밖에 수행할 수 없으므로, 이 new step 값들을 1/10로 축소(이 경우에도 steepest ascent로의 방향은 일치함)시킨 배지조합으로 배지농도 최적화 실험을 수행하였다. 그 결과 new step의 방향으로 균사의 성장이 지속적으로 증가되고 있는 것으로 나타났다(Table 1-20, Figure 1-19). 15일 동안의 고체성장배지에서의 배양 결과 초반에 사용했던 MA 배지의 경우에는 약 50 mm(직경)까지 균사체가 성장한 반면, steepest ascent method를 이용한 15번의 배지조합에서는 약 86 mm(직경)까지 균사체 성장이 증가했을 뿐만 아니라 균사의 밀도도 크게 향상된 주목할 만한 결과를 얻을 수 있었다(Figure 1-20).

결론적으로 고체성장배지에서 수행한 배지성분 농도의 최적화 실험결과를 요약하면 fractional factorial design 실험을 통해서 균사성장 직경이 기존의 MA 배지 대비 약 23% 정도 증가하였고, 또한 steepest ascent method 실험방법을 적용함으로써 기존의 MA 배지 대비 약 41% 더 증가한 배지성분의 조합과 농도를 결정할 수 있었다(Figure 1-21).

(7) Response surface method(RSM) 실험을 통한 계대배양 최적 배지농도 결정

상기의 SAM 실험결과를 바탕으로 배지성분의 최적 농도를 통계적으로 더욱 정밀하게 조사하고자 RSM(response surface method) 실험을 수행하였다. 이를 위해 4개의 중요한 배지성분인 glucose와 brown rice(현미가루), peptone(primagen p), magnesium sulfate를 이용하여 중심합성계획(central composite design, CCD)에 의해 실험을 수행하였다. 중점은 glucose 24 g/L, brown rice 12 g/L, peptone(primagen p) 12 g/L, magnesium sulfate 5 g/L로 수행되었고, 각 요인들의 수준을 Table 1-21에 제시하였다. 요인의 행렬 4^2 개, 축점 8개, 중심점 6개를 합하여 총 30가지의 조합으로 통계적 배지 최적화 실험을 수행하였는데, CCD 설계법을 적용한 전체 실험조합을 Table 1-22에 제시하였다. 탄소원으로 사용한 glucose의 농도는 16~32 g/L, brown rice 8~16 g/L 질소원으로

peptone primagen p를 8~16 g/L로 사용하였고, magnesium sulfate의 농도가 3~8 g/L까지의 다양한 조합에서 실험한 결과, 고체배양배지에서의 균사체의 diameter가 70~83 mm 범위의 값을 보여주는 것으로 나타났다(Table 1-22). 이 결과를 이차다항식의 형태로 표현하였으며, 각 항에 대한 계수를 회귀분석방법으로 결정하기 위해 Design Expert Pro S/W를 사용하였다. 그 결과 중심합성계획법에 의해 계산된 최종 모델식을 하기와 같이 표현할 수 있었다.

$$\begin{aligned} \text{Diameter} = & +81.50 + 0.87 \times A - 0.21 \times B + 0.62 \times C + 1.04 \times D \\ & - 2.22 \times A^2 - 0.59 \times B^2 - 2.22 \times C^2 - 1.59 \times D^2 \\ & + 0.44 \times A \times B + 0.81 \times A \times C + 1.31 \times A \times D - 0.44 \times B \times C + 0.31 \times B \times D + 0.44 \times C \times D \end{aligned}$$

또한 Table 1-23에 본 실험결과에 대한 ANOVA 분석표를 제시하였다. ANOVA 분석의 p-value인 0.0224가 제시하는 바와 같이 본 실험 결과는 매우 유의성이 있는 것으로 확인되었다. 특히 A²의 p-value, 0.0015, C²의 p-value, 0.0015, D²의 p-value, 0.0136에서 이들 성분 및 농도가 균사체의 고체배지에서의 성장에 매우 크게 기여함을 알 수 있었다.

Figure 1-22에 반응표면도와 contour plot을 이용해서 각 배지성분들의 농도에 따른 균사체의 성장 정도를 나타내었다. 각 배지조합에 관계없이 최대 생산치를 주는 stationary point가 존재하는 것으로 확인되었다. 궁극적으로 본 연구를 통해 통계적으로 결정된 최적 고체배지의 성분과 농도는 glucose 25.61 g/L, brown rice 12.53 g/L, peptone 12.53 g/L, magnesium sulfate 5.53 g/L인 것으로 최종 확인되었으며(Table 1-24), 또한 이 조건에서 고체배지에서의 균사체의 직경은 약 82 mm 정도인 것으로 예상되었는데, 이 결과는 상기의 SAM 연구에서 배지조합 14번(RUN 14) 및 배지조합 15번(RUN 15번)의 농도 주변임을 알 수 있었다.

(8) 반응표면분석법(RSM)에 의해 최적화된 계대배양배지의 질소원 변경

상기의 통계적 배지 최적화 실험에서 질소원으로 사용했던 peptone 성분인 primagen p 시약의 경제성 문제로 인해, 또 한편으로는 이 시약 제조사의 생산 중단으로 인해 좀 더 값싼 질소원에 대한 조사가 불가피 하게 되어 질소원 변경실험을 수행하게 되었다. 질소원의 농도는 기존에 첨가했던 농도를 사용하여 다음의 성분을 조사하였다: cotton seed flour, casein enzymatic hydrolysate, peptone(N-Z-soy BL7), peptone(primatone HS), peptone(primatone CLT), bacto peptone, peptone enzymatic hydrolysate.

Table 1-25와 Figure 1-23에 제시한 바와 같이, cotton seed flour, casein enzymatic hydrolysate, peptone enzymatic hydrolysate에서 14일간 배양 결과 각각 81 mm, 80 mm, 77 mm에 도달하는 직경을 얻을 수 있었다. 특별히 cotton seed flour가 질소원으로 사용된 경우의 결과는 상기의 RSM 실험에 의해 얻은 수치인 82 mm에 거의 도달하는 직경일 뿐만 아니라, 균사체의 밀도 또한 가장 높은 것으로 관찰되었으므로(Figure 1-24), 질소원으로 cotton seed flour로 대체하고, 28°C에서 14일 배양하는 조건을 최적 배양조건으로 결정하였다. 최종 요약하면 고체배양배지의 최적 농도로서 glucose 24 g/L, brown rice 12 g/L, cotton seed flour 12 g/L, MgSO₄ 5 g/L를 사용하여 이를 고체 성장배양에 이용하였다. 그 결과 특별히 장기간의 배양 시간이 요구되어 신속한 균주개발에 있어서 가장 큰 장애요소로 작용했던 계대배양(고체성장배양)시의 문제점을 효과적으로 극복할 수 있었다.

(9) 정치배양을 위한 계대배양(고체성장배양) 균사체의 위치 조사

계대배양(고체성장배양)의 경우 배양에 따라 균사가 고체성장배지의 중심부에서 외부로 뻗어 나가며 성장하게 되는데, 이 경우 균사의 바깥쪽 부분은 균사밀도가 안쪽보다 낮다. 따라서 균사의 밀도가 높은 안쪽 부위를 그 다음 실험단계인 정치배양으로 옮길 경우 정치배양뿐만 아니라 균사체 액상배양에서도 생산성이 높을 것으로 판단되었다(Figure 1-25). 따라서 15일 동안 고체성장배지에서 배양된 균사체를 기존의 바깥쪽 부분과 바로 그 안쪽 부분으로 나누어 정치배양을 수행한 후, 균사체의 플라스크 액상배양을 통해서 균체 생산성을 조사하였다. 그 결과 세포 건조중체량(DCW)이나 세포외다당체(EPS)의 생산성이 오차 범위 정도로 큰 차이가 나지 않음을 알 수 있었다(Figure 1-26). 이로부터 계대배양에서 바깥쪽과 안쪽 piece의 경우 균사의 밀도에서는 차이가 있지만, 각 경우의 정치배양 시 다량의 접종량으로 인해서 플라스크 액상배양에서는 별로 차이가 나지 않음을 알 수 있다.

(10) 정치배양으로 접종된 solid piece(고체성장배양에서의 solid piece)의 개수 조사 실험

정치배양의 바로 직전 단계인 계대배양으로부터 몇 개의 piece를 정치배양으로 옮기느냐에 따라, 정치배양 직 후에 수행되는 액상성장배양에서 균체의 생산성이 직접적으로 영향을 받을 것으로 판단되었다. 따라서 계대배양(고체성장배양)에서 정치배양으로 옮긴 piece 개수에 따른 액상성장배양에서의 균체 생산성을 조사한 결과, 7개의 solid piece를 정치배양으로 접종한 경우에서 가장 높은 균사체 생산성이 나타났으므로(Figure 1-27), 이후의 실험부터는 이 조건을 정치배양 조건으로 채택하였다.

(11) 정치배양에서의 최적 배양일수 조사

활성이 높은 생산균주를 액상성장배지로 접종하기 위해서는 정치배양에서 최적의 배양환경 조사가 이루어져야 한다. 따라서 기존의 정치배양 일수인 7일을 기준으로 해서 10일 까지 배양 기간을 늘리는 실험을 수행하였다. 정치배양 일수에 따라서 액상플라스크 성장배양에서의 균체생산량은 거의 유사한 것으로 나타났다(Figure 1-28). EPS의 경우 0.8~1.6 g/L 정도로 낮은 생산성을 나타내며, 정치배양 기간이 증가함에 따라 생산균주에 의해 이용되지 못하고 배양액 내에 잔류하고 있는 glucose의 양이 증가하는 것으로 보아, 긴 정치배양 기간으로 인해 생산균주의 활성이 점차 줄어드는 것으로 판단된다. 따라서 정치배양일수는 7일로 결정하였다.

(12) 균사체의 액상 플라스크 성장배양에서의 배양 일수 조사

7일 동안 정치배양된 균사체를 액상성장배지로 접종한 후 플라스크배양을 통해 최적의 액상성장배양 일수를 조사하였다. 액상배양 일수가 증가함에 따라 균체생산량이 다소 증가하는 것으로 나타났다(Figure 1-29). 10일까지 배양한 경우, 생산균주가 이용하지 못하고 남아 있는 glucose의 양이 2 g/L이하로 매우 낮고 세포 생산성도 가장 높았으나, 이 균주를 생산배양으로의 접종 시 세포의 활성에 문제가 있는 것으로 확인되었다. 따라서 액상 생산배양에서 고생산성 균주선별을 위해 수행하는 액상 성장배양의 일수는 4~5일로 하기로 최종 결정하였다.

나. 액상 플라스크 배양에서의 고생산성 우량 변이주 선별 및 배양 특성 연구

(1) 원형질체 형성을 통한 고성장성 균주 선별: 우량 균주 선별

균사형성 담자균류에 속하는 *Inonotus obliquus*의 균주 개량을 위해서는 유전자형이 동일한 단일 세포로부터 유래된 균주를 사용해야 한다. 그러나 *Inonotus obliquus*는 균사체로 성장할 때 포자를 형성하지 못하므로 단일 세포를 얻기가 힘든 것으로 확인되었다. 따라서 원형질체로부터 형성된 단일 세포를 얻어 내어, 그 중에서 성장 능력과 단백질다당체의 생산성이 높은 균주를 선별하고자 했다.

원형질체 형성방법에 의해 얻은 단일 콜로니를 이용하여 균주 개량을 수행하기 위해서 우선 원형질체의 형성, 회수 및 재생 조건을 조사하였다. 원형질체를 제조하기 위해서는 삼투압안정제의 종류, pH, 세포벽분해효소의 종류와 양, 반응시간 등이 중요하다. 또한 전배양에 따른 세포의 상태가 무엇보다도 중요한 요건 중의 하나인 것으로 알려져 있다. 세포벽 분해효소가 효율적으로 작용하기 위해서는 전배양이 되도록 짧은 시간 안에 완전히 균사모양(filamentous form)의 배양형태로 수행되어야 하는 것으로 관찰되었다. 따라서 전배양용 배지의 선택과 접종량이 중요한 요소가 됨을 알 수 있었다.

한편 본 실험실의 선행 연구 결과에 따르면 *Inonotus obliquus* 균사체의 경우 세포벽의 단백질다당체(intracellular polysaccharides, IPS)의 함량이 세포 무게당 거의 일정한 양을 함유하고 있는 것으로 관찰되었으므로(데이터 미제시), 세포벽 단백질다당체(IPS)의 생산성을 증가시키기 위해서는 액상 본배양시 균사체 생산량 증가가 가장 중요한 요인으로 판단되었다. 또한 세포외 단백질다당체(extracellular polysaccharides, EPS)의 생산시에도 고농도 균사체 배양이 우선되어야 하므로 원형질체 형성을 통한 고생산성 균주 개발 시 균사의 성장속도가 빠른 변이주를 선별하는 것이 가장 중요한 전략으로 판단되었다.

이번 연구에서는 더욱 많은 원형질체를 얻기 위해 기존의 원형질체 형성방법을 개량하여 고생산성 균주를 선별하고자 하였다. 기존에 사용하던 trapping 방법은 원형질체를 회수하는 과정에서 손실되는 protoplast의 양이 비교적 많은 것으로 나타나(최대 회수된 원형질체수 = 5×10^5 protoplasts/ml), 개량된 filtration 방법을 적용해서 원형질체를 회수하였다. 그 결과 trapping 방법에 의해 회수한 수보다 약 5배 증가한 2.3×10^6 protoplasts/ml의 원형질체를 회수할 수 있었다. Figure 1-30에 개량된 filtration 방법에 대한 실험조건을 제시하였으며, Figure 1-31에 회수된 protoplast의 현미경 사진을 제시하였다. 원형질체 회수시, 전 배양 조건이 매우 중요한 것으로 관찰되었는데, 특별히 합성배지인 Cy 배지를 사용시 생산균주의 배양형태가 protoplast 형성을 증가에 필수적인 균사(filamentous) 모양으로 유지되는 것으로 나타났다. 이와 같이 형성된 원형질체를 재생배지에서 5×10^5 (protoplasts/ml) 정도의 농도로 재생시킴으로써 단일 콜로니를 획득할 수 있었으며, 이로부터 유전자형이 동일한 단일 균주를 스크리닝 할 수 있었다. 이들 단일 균주들을 각각 재생배지로부터 분리하여 고체성장배지(계대배양배지)에서 일정 시간 배양하여 균사의 성장속도를 비교하였다. 최초로 수행된 1차 균주 선별 결과를 Figure 1-32에 제시하였다. 대부분의 균주들이 직경 40 mm에서 45 mm의 성장속도를 보인 반면 11번 균주의 경우 51 mm로서 가장 높은 성장속도를 보이는 것으로 나타났다. 한편 다른 재생균주를 이용한 실험에서는 직경 50 mm 이상을 보이는 3종류의 균주들을 성공적으로 분리해 낼 수 있었다(Figure 1-33).

상기의 방법에 의해 선별된 다수의 원형질체를 이용해서 기존의 균주보다 더 좋은 배양형태적 특

성 및 배양생리적 특성을 보이는 생산균주를 지속적으로 선별하였다. 그 결과 최고의 생산성을 보이는 균주를 선별할 수 있었으며, 이를 OBLQ32 균주로 명명하였다. 이를 모균주로 사용하며, filtration method를 이용하여 원형질체를 회수하고, 이들을 재생배지에 pour plating하여 12일 동안 배양한 후 120개의 colony를 고체성장배지(SGM)(계대배양배지)에 옮겨서 재생균주의 배양특성을 조사하였다. 최적화된 고체배지(SGM) 상에서 11일 동안 자란 균사체의 직경을 측정한 결과 control인 OBLQ32 균주(직경 57.2mm) 보다 직경이 더 큰 균주들을 다수 선별할 수 있었다. 이로부터 OBLQ47, 56, 68, 71, 72, 84, 89, 117의 8개의 균주를 선별할 수 있었으며, 몇몇 균주들의 stock을 -80°C와 4°C에서 각각 냉동 및 냉장보관하면서, 보관방법 및 보관조건에 따른 균주들의 활성을 지속적으로 조사하였다.

궁극적으로는 이들의 플라스크배양 실험을 통하여 배양생리적 특성 및 배양형태적 특성을 규명한 후, 이로부터 최종적으로 안정적인 생산성을 보인 OBLQ89 균주를 최종 선별했으며, 다시 이 균주를 모균주로 이용하여 하기의 UV 변이저리를 통한 지속적인 균주개량을 수행하였다.

(2) OBLQ 89 균주로부터 형성된 원형질체의 UV 처리에 의한 고생산성 변이주의 지속적 선별: 돌연변이된 우량균주 선별

온화한 돌연변이원으로 알려진 UV의 처리에 의해 생산균주를 돌연변이시킴으로써 *Inonotus obliquus* 균사체의 scale-up 배양 시 색소 저생산성, 고성장성 및 고안정성 변이주를 효율적으로 선별하고자 하였다. 균사상태의 모균주를 UV로 변이처리한 후 세포벽 분해효소로 처리하고, 이로부터 돌연변이된 원형질체를 유도한 후 재생과정을 거쳐 돌연변이 균주를 획득할 수 있었다(Figure 1-34). 변이처리 시 치사율이 90%인 MIC(최소저해농도)를 구했으며, 이 조건에서 살아남은 균주를 이용하여 균주개량을 수행해 나갔다(Figure 1-35). OBLQ89 균주의 경우 치사율이 90%인 MIC 조건은 UV 변이처리시간이 약 320초 사이인 것으로 확인되었다. 400초를 조사할 경우에 거의 모든 세포가 재생되지 않는 것을 확인 할 수 있었다. Figure 1-36에 균사체를 UV로 일정시간 씩 돌연변이 처리 후, 재생배지에서 재생된 각 균주들의 morphology를 제시하였다.

UV 변이처리시간에 따라 재생된 변이주를 선별하여 최적화된 고체배지(SGM) 상에서 *Inonotus obliquus* 균사의 성장속도를 비교한 결과, 11일 동안 배양 시 대부분의 균주들은 직경이 50~60mm 정도에 분포하고 있었으나, Table 1-26에 강조해서 나타낸 바와 같이 모균주인 OBLQ89 균주 보다 더 빠른 성장속도를 보이는 변이주 들을 다수 획득할 수 있었다. 또한 control로서 UV 변이처리를 하지 않고 재생시킨 모균주 보다도 변이주들의 균사 성장속도가 상당히 빠른 것을 확인할 수 있었으며, 기존의 모균주 보다 비교적 더 흰색으로 자라는, 색소 저생산성의 우량 균주도 관찰되었다. 이들 균주 중에 균사체의 성장속도가 빠르면서 동시에 단백다당체 생산에 양호한 흰색의 pigment를 생산하는 특성을 갖는 균주인 OBLQ234번 균주를 최종 선별하였다.

(3) 개량 균주인 OBLQ 234 균주의 돌연변이에 의한 고생산성 변이주의 지속적 선별

선행 연구 결과에 따르면 *Inonotus obliquus* 균사체의 경우 세포벽 단백다당체 (intrapolysaccharides, IPS)의 함량이 세포 무게당 거의 일정한 양을 함유하고 있는 것으로 관찰되었으므로, 세포벽 단백다당체의 생산성을 증가시키기 위해서는 액상 본배양 시 균사체 생산량 증가가 가장 중요한 요인으로 판단되었다. 또한 세포의 단백다당체(extrapolysaccharides, EPS)의 생산

시에도 고농도 균사체 배양이 우선되어야 하므로, 원형질체 형성을 통한 고생산성 균주 개발시 균사의 성장속도가 빠른 변이주를 선별한 후, 이로부터 EPS의 생산능이 우수한 균주를 선별하는 것이 가장 중요한 전략으로 판단되었다.

UV에 의한 균사체의 돌연변이는 상기와 동일한 조건에서 진행되었다. 즉 치사율이 약 90%인 조건으로 UV를 균사체에 조사한 후 이 조건에서 살아남은 균주를 이용하여 균주개량을 수행해 나갔다. 재생된 변이주를 선별하여 최적화된 고체배지(SGM) 상에서 *I. obliquus* 균사의 성장속도를 비교한 결과, 12일 동안 배양 시 대부분의 균주들은 직경이 60~85mm 정도에 분포하고 있는 것으로 관찰되었다. 그러나 몇몇 변이주의 경우(OBLQ301, 347, 432, 517, 528, 620, 756), Table 1-27에 강조해서 제시한 바와 같이 모균주인 OBLQ 234 균주 보다 성장속도 뿐만 아니라 성장밀도 또한 높은 특성을 보이는 고생산성의 특성을 보여주었다. 이들 균주들은 control로서 UV 변이처리를 하지 않고 재생시킨 모균주인 OBLQ234 보다도 고체배양배지에서 균사 성장속도 뿐만 아니라 성장밀도도 꽤 높은 것으로 확인되었다. 이러한 우량균주들의 stock을 -80°C와 4°C에서 각각 냉동 및 냉장보관 하면서, 보관방법 및 보관조건에 따른 균주들의 활성을 지속적으로 조사하였다.

궁극적으로는 이들의 플라스크배양 실험을 통하여 배양생리적 특성 및 배양형태적 특성을 규명한 후, 이로부터 안정적인 생산성을 보인 OBLQ 432, 528, 756 균주를 최종 선별했으며, 이 균주들을 액상배양에서의 배지 최적화 연구, 세포벽다당체(IPS), 또는 세포외다당체(EPS)의 고생산성 우량균주를 선별하기 위한 모균주로 사용하였다.

(4) 최적 고체배양배지에서 고성장성 균주 선별한 후 액상배양을 이용한 세포벽다당체(IPS) 고생산성 균주의 지속적 개발

최적의 고체배양배지에서 가장 높은 생산성과 안정성을 보인 OBLQ 432, 528, 756 변이주를 각각 모균주로 하여 액상배양을 통해 높은 균사체 생산성을 보이는 우량 변이주를 선별하는 균주개량 실험을 수행하였다. 각각의 모균주를 UV 변이처리 한 후, 회수된 protoplast를 원형질체 재생배지에 pour plating 하여 다시 재생시켰으며 이 중 빠르게 성장하는 균사체 colony를 획득하여, Figure 1-37에 제시된 배양공정에 따라, 즉 두 번에 걸친 고체계대배양과 정치배양을 수행한 후, 성장배양에서 4일, 생산배양에서 7일 동안 플라스크 액상배양을 수행하여 각 변이주의 균사체 생산성을 조사하였다. 앞서 언급한 바와 같이 *Inonotus obliquus* 균사체의 경우 세포벽의 단백다당체(IPS)의 함량이 세포 무게당 거의 일정한 양을 함유하고 있는 것으로 관찰되었으므로, IPS의 생산성을 증가시키기 위해서는 액상 배양 시 균사체의 생산량 증가가 가장 중요한 요인으로 판단되었다.

(가) 액상 배양에서의 IPS 고생산성의 우량균주 선별 (OBLQ432를 모균주 이용)

고체배양배지에서 고성장성을 보인 OBLQ432를 모균주로 하여 이로부터 유래된 우량 변이주들의 액상배양을 통해, 실제 생산배양에서 IPS 고생산성을 보이는 균주를 선별하는 실험을 수행하였다. 고체배지로부터 총 21개의 단일 colony를 분리하여 성장배양과 생산배양을 거친 우량균주들의 세포생산성을 Figure 1-38과 Figure 1-39에 제시하였다. 모균주인 OBLQ432와 비슷하거나 더 높은 균체생산성(15 gDCW/L 이상)을 보이는 균주가 다수를 차지했는데(Figure 1-39), 특별히 OBLQ432-2, OBLQ432-9, OBLQ432-11번 균주와 같이 액상 배양에서 모균주보다 우수한 생산성을 보이는 우량균주를 찾을 수 있었고, 이를 20% glycerol로 회수하여 -80°C에 보관하였으며 필

요시 해동하여 사용하였다.

(나) 액상 생산배양에서의 IPS 고생산성 우량균주 선별(OBLQ528 균주를 모균주 사용)

상기의 OBLQ432 균주 실험에서 관찰된 현상으로서, 계대배양 과정인 고체성장배지에서 자라나는 형태, 즉 밀도나 직경에 따라서 최종적 액상배양의 생산성에 차이를 보이는 것으로 나타났다. 따라서 OBLQ528을 모균주로 하여 액상 생산배양에서의 고생산성 균주를 선별하는 이번 실험에서는 OBLQ528 유래의 균주들을 고체계대배양 과정의 균사체의 밀도나 환의 크기에 따라서 3가지 그룹으로 나누어(Figure 1-40), 각 그룹에 속한 균주들의 최종 액상 생산배양에서의 생산성을 조사하는 실험을 수행하였다. 이와 같은 실험을 수행한 이유는 비록 이미 검증된 고생산성 균주들이라고 하더라도, 이로부터 또 다시 균주를 선별하는 경우에 한 번에 많은 양의 균주를 테스트하기가 어렵기 때문에, 최초 고체계대배양 screening 과정에서부터 선별하는 균주의 수를 줄임으로써, 보다 신속하고 효율적으로 균주를 선별하고자 함이었다.

예상했던 바대로, 또한 이전에 균주선별의 초기 단계에서 관찰되었던 결과처럼, 고체계대배양에서 균체의 환의 크기와 밀도가 가장 작았던 27~32번 균주의 경우에 최종 액상 생산배양에서도 가장 낮은 균체생산성을 보여주었다(Figure 1-41). 한편 대다수의 균주는 모균주인 OBLQ528에 비해 더 높은 균체생산성(15 gDCW/L 이상)을 보이는 것으로 나타났는데(Figure 1-42), 이로부터 17~18 g/L 범위의 균체생산성을 보이는 세 균주(OBLQ528-3, OBLQ528-19, OBLQ528-22)를 최종 선별할 수 있었다.

본 연구를 통해 이미 선별된 고생산성 균주일지라도, 이 균주로부터 다시 우량균주를 선별하는 경우에는 고체배양에서 가능한 한 많은 수의 콜로니를 얻은 후에, 이로부터 잘 자라지 않는 균주들을 선별과정에서 미리 제외시켜야만 최종 액상배양에서의 균주 선별의 효율성을 높일 수 있음을 확인할 수 있었다. 한편 OBLQ528 균주의 히스토그램(Figure 1-42)과 OBLQ432 균주의 히스토그램(Figure 1-39)을 비교해보면, 두 우량 균주로부터 유래한 균주들의 최종 액상 생산배양에서의 균사체 생산성 정도가 거의 비슷함을 알 수 있다.

(다) 액상생산배양에서의 IPS 고생산성의 우량균주 선별 (OBLQ756을 모균주 이용)

상기의 균주개량 실험과 마찬가지로 이번에는 고체배양배지에서 고성장성을 보인 OBLQ756 균주를 모균주로 하여 이로부터 유래된 변이주들의 액상배양을 통해 최종 액상생산배양에서 성장 정도가 큰 균주를 선별하는 실험을 수행하였다. 고체배지에서 단일 colony를 이룬 90개의 균주들 중에서 균사체의 밀도와 직경을 비교하여 31개의 우량 균주들을 최종 선별한 후, 액상 생산배양에 이들의 균사체의 생산성을 조사하였다. Figure 1-43과 Figure 1-44에 제시한 바와 같이 약 50% 정도가 모균주인 OBLQ756보다 더 높은 균체생산성(14 gDCW/L 이상)을 보여주는 것으로 관찰되었다. 한편 균체생산성의 범위는 8~18 gDCW/L에 이르는 광범위한 분포를 보여주었는데(Figure 1-44). 이로부터 OBLQ756 균주로부터 유래된 변이주들의 생산 안정성이 다른 균주들에 비해 비교적 불안정함을 확인할 수 있었다(OBLQ432 series 균주와 OBLQ528 series 균주의 균체생산성 범위는 각각 13~18 gDCW/L(Figure 1-39)과 12~18 gDCW/L(Figure 1-42)임). 본 실험으로부터 16~18 g/L 범위의 균체생산성을 보이는 세 균주(OBLQ756-4, OBLQ756-13, OBLQ756-15)를 최종 선별하여 이들의 glycerol stock을 -80°C에 보관하였다. OBLQ432 series, OBLQ528 series 및 OBLQ756 series 세

균주의 균체생산성과 균체수를 비교한 각각의 히스토그램(Figure 1-39, 1-42, 1-44)을 살펴보면, 중심에서 가장 높은 분포를 보이는 정규분포곡선으로 나타남을 알 수 있는데, 이러한 결과는 균주개량 시 흔히 나타나는 현상이다.

(라) 액상 생산배양에서의 IPS 고생산성의 우량균주 선별(OBLQ756-15을 모균주 이용)

본 실험에서는 상기의 액상 플라스크 실험에서 가장 생산성이 높게 나타난 변이주인 OBLQ756-15를 모균주로 하여 이로부터 유래된 변이주들의 액상배양을 통해 성장 정도가 큰 균주를 최종 선별하는 실험을 수행하였다. 이번에는 돌연변이 조건을 더욱 강화하기 위해 UV 조사시간을 MIC를 380초(약 97% 사멸조건)로 정하고, wet cell 1g을 320초 동안 243nm 파장의 UV를 조사하였고, photo reactivation을 막기 위해 7일 동안의 재생기간 동안 호일로 밀봉하여 배양하였다. 돌연변이된 원형질체로부터 재생된 변이주들을 회수한 후, 이 중 고체배지에서 성장속도가 빠른 우량균주를 1차적으로 선별하였고, 선별된 각각 균주들의 균체생산성을 확인하기 위해 플라스크 성장배양 및 생산배양에 이르는 일련의 배양공정을 수행하였다 (Figure 1-37).

이전의 돌연변이 유도 실험 결과와는 대조적으로, 균체 생산성에 대한 histogram이 정규분포를 보이는 대신 비교적 넓은 범위로 분포하고 있는 것으로 나타났다(Figure 1-45, Figure 1-46). 한편 상기의 OBLQ756 series 세 균주의 균체생산성과 균체수를 비교한 각각의 히스토그램(Figure 1-39, 1-42, 1-44)에서는, 중심에서 가장 높은 분포를 보이는 정규분포곡선으로 관찰되었다. 이와 같은 차이가 발생한 이유는 이번 실험의 경우 돌연변이 치사율을 이전의 90%에서 97%로 강화시켰기 때문으로 보이는데, 즉 이 97%의 조건에서 대부분의 균주들의 성장에 중요한 유전자들이 변이됨으로써 성장이 비교적 심각하게 저해받는 균주들이 다수 존재하는 것으로 관찰되었다(Figure 1-46). 그러나 주목할 만하게도 5번 균주와 같이 균사체 생산성이 약 22 g/L에 이르는 우량균주 균주를 획득할 수 있었으며, 이 균주들 OBLQ756-15-5로 명명한 후, 이를 20% glycerol로 회수하여 -80°C에 보관하였다. 또한 제1세부과제 연구에서 발효조를 이용한 *Inonotus obliquus* 균사체의 대량배양 연구를 위해 제1세부과제연구팀에게 분양하였으며, 본 연구팀의 경우에도 배지 최적화 등의 향후 실험에 본 균주를 사용하였다.

다. 세포벽다당체(IPS) 생산용 생산배지 최적화: 액상 플라스크 배양 이용(OBLQ528 균주를 이용한 배지 최적화)

선행 연구결과에 따르면 *Inonotus obliquus* 균사체의 경우 세포벽다당체(IPS)의 함량은 균사체 건조무게 당 거의 일정한 양을 함유하고 있으므로, IPS의 생산량을 증가시키기 위해서는 최종 발효조 생산배양 시 균사체의 생산량 증가가 가장 중요한 요인이 되는 것으로 관찰되었다. 반면에 세포외다당체(EPS)의 생합성 경향은 균사체 성장과 비례해서 증가하는 것은 아닌 것으로 나타났으므로, 본 연구에서는 IPS와 EPS 각각의 생산성을 높일 수 있는 IPS 용 생산배지와 EPS 용 생산배지를 별도로 개발하였다.

여기서는 우선 세포벽다당체(IPS) 고생산을 위해 통계적 방법을 적용하여 생산배지 성분과 농도를 최적화한 연구결과를 제시하고자 한다. 즉 OAFT(one factor at a time) 실험을 통해 각 배지성분이 균사체 생산성에 미치는 영향을 조사하였으며, Plackett-Burman design을 적용해 다양한 배지 조합으로 배양한 실험결과로부터 각각의 배지성분들에 대한 main effect를 분석함으로써 균사체 생

산성에 큰 영향을 미치는 주요 성분을 찾아내었다. 또한 선별된 배지성분 들의 상호 영향까지 조사하기 위해 full factorial 또는 fractional factorial design(FFD) 실험을 수행하였고, 이 FFD 실험결과에 근거해서 추정된 steepest ascent method(SAM)의 설계값을 이용해서 각 배지성분의 최적 농도를 결정한 후, 이 SAM의 실험결과를 바탕으로 배지성분의 최적 농도를 더욱 정밀하게 조사하는 통계적 방법인 RSM(response surface method) 실험을 수행하였다. 본 연구에서 수행한 통계적 생산 배지 최적화를 위한 실험설계 방법은 실험재료 및 방법에서 자세히 제시한 바 있다.

(1) One factor at a time(OAFT) 실험을 통한 배지성분 선별

세포벽다당체(IPS) 생산용 액상배양 공정개발을 위해 본 실험에서 사용한 *Inonotus obliquus* 균주는 균주 개량 단계 중 비교적 초기 단계에 선별한 균주로서, 우수한 균체 생산성과 배양 안정성을 보인 OBLQ528 이다. 이 생산균주의 탄소원 이용 특성과 일반적인 고등 담자균류의 특성을 고려하여 15가지의 탄소원이 *I. obliquus* 균사체의 생산성에 미치는 영향을 조사하기 위해 OFAT 실험을 수행하였다(Figure 1-47). 15가지 탄소원 중에서 높은 효과를 보여주는 5개의 성분들을 찾아 낼 수 있었다. 주의할 점은 soluble starch, brown rice, rice bran의 경우 균사체 생산성이 높게 나타났지만, 이 탄소원들은 배지 중에 부분적으로 용해되어 분리정제 공정에서 회수된 IPS를 오염시키는 문제점으로 인해 이 성분들을 생산배지에서 제외시키기로 하였다. 따라서 나머지 성분 중 가장 높은 효과를 보인 fructose와, 일반적인 배양에서 주로 사용되는 glucose를 적절한 탄소원이자 에너지원으로 선별하였다.

한편 최적의 질소원을 찾기 위해 상기의 실험 결과 최적으로 밝혀진 glucose를 탄소원으로 고정하고, 25가지의 질소원 성분이 균체 생산성에 미치는 영향을 조사하기 위해 OFAT 실험을 다시 수행하였다. 25개의 질소원 성분을 Figure 1-48에 제시하였는데, 이 중 몇몇 질소원 성분들이 배지 중에 잘 녹지 않는 것으로 관찰되었다. 세포외 생산물인 항생제와 같은 2차대사산물이나 유기산 등은 배양 여액을 추출, 분리정제하여 최종 산물을 회수하므로 배지 중에 녹지 않는 성분이 존재해도 별로 문제가 되지 않지만, 세포벽다당체(IPS)의 경우는 배지 중에 용해되지 않는 성분이 포함되어 있을 경우 IPS의 분리 정제공정에서 문제가 발생할 수 있기 때문에 잘 녹지 않는 질소원 성분은 결과가 좋더라도, 배지성분 선별과정에서 제외하기로 하였다. 그 결과 배지 중에 완전히 녹으며 생산균주가 잘 이용하는 질소원으로 판명된 casein enzymatic hydrolysate, soytone peptone, yeast extract를 최종 선정할 수 있었으며, 또한 ammonium 계열 중 균사체 성장에 꼭 필요한 인을 포함하고 있는 ammonium phosphate monobasic, ammonium phosphate dibasic을 질소원으로 추가 선정하여, 전체 5개의 질소원을 선별하였다. 한편 OFAT 실험은 배지의 한 성분만을 변화시키고 다른 성분들은 고정시키는 것이므로, 배지성분들 상호간의 작용을 전혀 고려하지 않는 원래의 단점이 존재한다. 따라서 OAFT 방법으로 선별한 탄소원 2가지와 질소원 5가지, 그 외의 중요한 다른 배지성분을 추가하여 이 성분들이 생산균주의 균체생산성에 미치는 효과를 통계적으로 조사할 수 있는 Plackett-Burman design 실험을 수행하였다.

(2) Plackett-Burman design을 이용한 배지 성분 선별

상기 실험을 통해 2가지의 탄소원과, 5가지의 질소원, EPS 생산 발효에서 좋은 효과를 보인 ammonium ttrate를 질소원으로 추가하였고, 배지 성분으로 필수적으로 요구되는 철, 인산, 황과 같

은 배지 성분을 추가하여 Plackett-Burman design 실험을 수행하였다(Table 1-28)(전체 11가지 성분의 조합으로 12가지 배지조합의 플라스크 배양실험 수행). Table 1-29에 그 결과를 제시한 바와 같이 main effect 면에서 fructose, casein enzymatic hydrolysate와 soytone peptone에서 큰 효과가 있었으며, 부수적으로 첨가한 ammonium phosphate dibasic과 potassium phosphate monobasic에서도 효과가 큰 것으로 관찰되었다. EPS 생산용 최적 배지성분으로 결정되었던 ammonium tartrate의 경우는 low factor의 수치를 0 으로 수행했기 때문에(Table 1-28), 세포벽다당체인 IPS의 생산배지 성분에서는 제외시켜야 함(negative effect)을 알 수 있었다. Figure 1-49의 one factor plot 그래프에서 알 수 있듯이 좋은 효과를 보인 배지성분인 경우 농도가 증가할수록 직선의 기울기가 커져 균사체의 생산성도 증가함을 알 수 있으며, 균사체 생산성에 부정적인 효과를 보였던 ammonium tartrate의 경우에는 기울기가 크게 감소함을 알 수 있다. Plackett-Burman design을 통해 12 종류의 배지조합으로 12 set의 플라스크 배양을 수행한 결과 균사체 생산성이 약 14 g/L 정도에서 최대인 것으로 나타났다(Figure 1-50). 이 결과는 OFAT실험에 비해 비교적 낮은 균체량인데, 이는 Plackett-Burman design 실험과 같이 한 배양액에 여러 가지 성분이 한꺼번에 다량 존재하기 때문에 서로 간에 저해 효과가 나타난 것 때문으로 보인다. 따라서 최적 배지를 결정하기 위해서는 배지성분 상호간의 저해 현상을 감안하여 불필요한 성분은 제거해 준 후, 나머지 배지 성분들의 상호간의 효과를 분석할 수 있는 factorial design 실험이 필요하다는 것을 확인할 수 있었다. Plackett-Burman design 실험 결과에 근거해서 glucose, fructose, casein enzymatic hydrolysate, soytone peptone, ammonium phosphate dibasic을 최종 선정하였고, KH_2PO_4 와 MgSO_4 의 경우는 꼭 필요한 배지성분이므로 일정한 농도로 항상 첨가하여 통계적 배지 최적화 실험을 계속 수행하였다.

(3) Full factorial 또는 fractional factorial design(FFD)을 적용한 IPS 생산배지 최적화

Plackett-Burman design에서는 분석할 수 없는, 배지성분들의 상호작용에 대한 정보를 얻는 것이 중요하므로 실험의 규모는 가능한 한 줄이면서 보다 많은 요인에 대해 분석할 수 있는 방법이 절실히 요구된다. 이를 위해서 본 연구에서는 2^m 요인설계법(full factorial design), 또는 2^m 요인 설계법의 1/2, 즉, (2^{m-1}) 반복을 실험하는 부분요인실험법(fractional factorial design)을 도입하였다. 본 연구의 경우, 상기의 OFAT와 Plackett-Burman design 실험에 의해 최종 선별된 질소원과 탄소원의 숫자가 모두 4~5개이므로 full factorial design을 적용하여 배지성분 상호간의 영향을 조사해도 별로 무리가 되지 않을 것으로 판단하였다.

(가) 4가지 배지성분을 이용한 4-factor full factorial design 실험

Table 1-30에 제시한 바대로 4가지 배지성분의 +, - level의 농도에서 4-factor full factorial design 배양실험을 통해 배지성분 상호간의 영향을 조사하였다. 각 배지조합에 따른 배양 set와 각 배양의 균체생산성을 Table 1-31에 나타내었다. 이때 배지성분의 다양한 조합에 따라 균체생산량이 11.5 g/L~15.0 g/L의 넓은 범위에 분포하고 있는 것으로 관찰되었다. 이 실험결과를 fractional factorial model에 적용시켜 통계처리한 분산분석표(Analysis of variance, ANOVA), effect list 및 각 변수들의 통계값을 Table 1-32에 제시하였다. *I. obliquus*의 균사체 생산에 영향을 주는 4개의 요인의 모델식은 P-value가 0.032로서 통계적으로 유의한 것으로 나타났으며, 여기에 제시하지 않았지만 변수변화량(CV)의 값이 4.66이므로 실험의 정확성과 신뢰도도 양호하고, 또한 R^2 값(0.8610)으

로부터 균체생산성에 있어서 실제 실험값과 요인모델로 예상한 값이 거의 일치한다는 것을 알 수 있었다. 한편 각 요인, 즉 배지성분의 농도가 증가할 때 균체생산성에 미치는 영향을 살펴보면 (Table 1-33의 % contribution), 탄소원 가운데에서 B 요인인 fructose가 9.11로서 IPS 생산에 미치는 기여도가 가장 높았고, 질소원 중에서는 C 요인인 casein enzymatic hydrolysate가 58.09로서 생산성에 가장 높게 기여하는 것으로 나타났다. 주목할 점은 factorial design 방법을 적용하여 통계적 실험을 수행할 경우 배지성분 상호 작용에 대한 효과를 그래프를 이용해서 분석할 수 있다는 점이다. 한 예로 균체생산성에 좋은 효과를 보였던 fructose와 casein enzymatic hydrolysate의 상호관계 그래프를 살펴보면(Figure 1-51), casein enzymatic hydrolysate 농도가 높으면서 동시에 fructose의 농도도 증가할 때 균사체의 생산성이 더욱 증가함을 알 수 있다.

(나) 5가지 배지성분을 이용한 5-factor fractional factorial design 실험

Table 1-34에 제시한 바대로 이번 실험에서는 5가지 배지성분들을 이용하여 fractional factorial design 방법에 의해 배지성분 상호간의 영향을 조사하였다. 5가지 각 배지성분의 +, - level 농도의 배지조합에서 수행한 각 배양결과를 Table 1-35에 제시하였는데, 균체생산성이 11.95~16.47 g/L의 범위에 분포하는 것으로 나타났다. 이 실험결과를 fractional factorial model에 적용시켜 통계처리한 분산분석표(Analysis of variance, ANOVA), effect list와 각 변수들에 대한 통계값을 Table 1-36과 Table 1-37에 제시하였는데, 모델식의 P-value가 0.0202로서 통계적으로 유의함을 알 수 있었다. 한편 각 요인, 즉 배지성분들의 농도가 낮은 값에서 높은 값으로 변화시킬 경우에 대한 각 요인들의 효과(Table 1-37의 % contribution)를 살펴보면, 탄소원 가운데에서 B 요인인 fructose가 12로서 균체 생산성에 미치는 기여도가 가장 높았고, 감소하는 방향으로 13.04의 기여도를 보인 ammonium phosphate dibasic은 낮은 수준에서의 농도를 0 으로 해서 실험을 수행했으므로 배지성분 중에서 제거해야 한다는 결론을 얻을 수 있었다. 질소원 중에서는 C 요인인 casein enzymatic hydrolysate가 0.87로 가장 높은 기여도를 보였다. 한편 상기의 4-factor full factorial design의 실험결과 비교해 볼 때, casein enzymatic hydrolysate의 기여도가 많이 떨어진 것으로 나타났는데, 이는 ammonium phosphate dibasic의 첨가로 인한 negative한 상호작용의 효과 때문으로 판단된다. 그러나 전체적으로 나타난 기여도 패턴은 fructose의 경우에는 높은 농도에서, soytone peptone의 경우에는 낮은 농도에서 균사체 생산성에 긍정적인 효과를 보였는데, 이는 상기의 4-factor full factorial design 실험에서 나타났던 결과와 비슷하다.

(4) 균사체 생산배지 성분의 농도 최적화를 위한 Steepest ascent method(SAM)실험

(가) 4-factor SAM을 이용한 IPS 생산용 각 배지성분의 농도 최적화

상기의 FFD 실험 결과에 대한 통계적 분석을 통해 4가지의 각 배지성분이 균사체의 성장, 즉 IPS의 생산량에 미치는 영향을 하기의 1차다항식으로 표현할 수 있었다.

$$D.C.W = +13.29 + 0.19A + 0.33B + 0.84C - 0.038D - 0.035AB - 0.32AC - 0.10AD + 0.077BC + 0.068BD + 0.23CD$$

이 공식은 각 성분의 농도에 대하여 positive(증가)한 방향과 negative(감소)한 방향을 제시해줄 뿐

만 아니라, 각 항의 계수값에 의해 각각의 배지성분(요인)이 균체 생산성에 미치는 영향을 수치로 나타내 준다. 따라서 각 배지성분과 기여도를 이용해서 생산배지 성분의 최적 농도값을 대략적으로 결정하기 위해 우선 steepest ascent method(SAM)를 수행하였다. 즉 SAM 실험에 의해 추정된 각 배지성분의 농도 근처에서 최적의 농도가 존재하리라고 판단하였다. 실제로 Plackett-Burman design 또는 FFD에 의해 선별된 배지성분을 이용해서 곧바로 이들의 최적 농도를 선정하기 위한 response surface method(RSM)를 실행할 경우, 어느 정도의 농도 범위에서 최적의 농도가 존재하는지를 추정하기가 매우 어려운 문제점이 존재한다. 따라서 실험방법에서 체계적으로 설명한 바와 같이 최종적인 RSM 실험을 수행하기 전에 최적 농도가 존재하는 근사치를 추정하기 위해서 SAM을 이용한 배양실험을 먼저 수행하는 것이 바람직하다고 판단하였다.

배지성분 상호간의 영향을 조사한 상기의 4-factor FFD 실험결과에 근거해서 추정한 SAM의 실험설계값을 Table 1-38에 제시하였다. SAM을 위한 시작점으로 full factorial design의 중심점을 이용하였다. SAM 축차 실험을 수행한 결과 trace elements가 포함되지 않은 경우 2번 배지조합에서 균체생산성이 매우 높게 나타났고(Table 1-38(B)와 Figure 1-52), 그 이상으로 배지농도가 증가되어도 균체생산성은 별로 차이가 나지 않는 것으로 관찰되었다. 이 결과에 근거하여 2번의 배지조합을 RSM을 수행하기 위한 배지조성으로 결정하였다. 또한 trace elements의 효과를 알아보기 위해 각 배지조합에 trace elements가 포함된 경우와 포함되지 않은 경우로 나누어 실험을 수행하였으나, Figure 1-52에 제시한 바와 같이 균사체 성장에 대한 trace elements의 효과가 나타나지 않아, 이후 실험부터는 trace elements를 생산배지에 추가로 첨가하지 않기로 결정하였다. 한편 SAM에 의해 수행된 최적 생산배지 농도 근처에서의 생산균주의 배양형태(morphology)는 모든 배지조합에서 Figure 1-53에 제시한 바와 같이 고농도 배양을 위한 최적 morphology로 알려진 compact한 pellet 형태(pellet 직경: 0.5~1.0 mm)를 띠고 있는 것으로 관찰되었다.

(나) 5-factor SAM을 이용한 IPS 생산용 각 배지성분의 농도 최적화

이번에는 상기의 FFD 실험 결과에 대한 통계적 분석을 통해, 5가지 성분(즉, 상기의 4가지 성분 에 ammonium phosphate dibasic이 포함된 경우)이 균사체의 성장, 즉 IPS의 생산성에 미치는 영향을 보여주는 하기의 1차다항식을 얻을 수 있었다.

$$D.C.W = +13.88 - 0.080A + 0.60B + 0.16C - 0.23D - 0.62E - 0.19AB - 0.58AC + 0.11AD - 0.61AE + 0.18BC - 0.20BD + 0.32BE + 0.16CD - 0.10CE - 0.29DE$$

각 배지성분과 기여도를 이용해서 생산배양 배지성분의 최적 농도지점을 대략적으로 결정하기 위해 SAM을 수행하였다. 즉 상기의 1차다항식을 토대로 SAM을 이용하여 5가지 배지성분의 농도를 순차적으로 변화시켜 균체량, 즉 IPS의 생산성이 어느 지점에서 최대치를 주는지 조사하였다. 5가지 배지성분 상호간의 영향을 조사한 상기의 FFD 실험결과에 근거해서 계산한 SAM의 실험설계값을 Table 1-39에 제시하였다. Ammonium phosphate dibasic의 경우에는 negative effect가 매우 크기 때문에 3번 이후의 조합에서는 자연적으로 이 성분의 농도가 0이 되어(Table 1-39(B)), 배지 중에 더 이상 이 성분이 존재하지 않음을 알 수 있다. 그 결과 본 실험이 상기의 4-factor SAM의 실험과 비슷한 것처럼 보이지만, 실제로는 3번 이후의 배지조합에서 4가지 성분의 각각의 농도가 상기의 4-factor SAM 실험과는 꽤 다르므로(Table 1-38(B)와 Table 1-39(B), Table 1-40), 여기서 추

정된 각 배지성분의 최적 농도는 상기의 4-factor SAM에서 얻은 결과와는 다를 것이라고 판단하였다. Figure 1-54에 5-factor SAM의 배지 조합에서 얻은 배양 결과를 제시하였다.

실제로 상기의 4-factor SAM의 경우와 이번의 5-factor SAM의 결과를 비교해 보면(Figure 1-55), 4-factor SAM의 경우 최대 균체 생산성이 20.05 g/L 이지만, 5-factor SAM의 경우는 16 g/L인 것을 확인할 수 있다. 즉 ammonium phosphate dibasic을 미리 제거한 후, 수행한 4-factor SAM에서 얻은 최적 농도에서 훨씬 좋은 효과를 보이는 것으로 나타났는데, 이로부터 5-factor SAM의 경우 4-factor SAM과 그 형태는 유사하지만 4가지의 각 배지성분의 농도가 꽤 다르므로, 최적 농도에 도달하는 방향이 다르다고 결론지을 수 있었다. 이는 SAM 설계법에 의해 더 좋은 방향, 즉 더욱 훌륭한 최대치를 발견하기 위해서는 SAM 설계 시 올바른 방향 설정이 매우 중요함을 제시해 준다. 지금까지의 통계적 생산배지 최적화 연구 결과를 요약하면 full factorial 또는 fractional factorial design 실험과 SAM 실험방법을 적용함으로써 균사체 생산성이 기존 생산배지 대비 약 25% 정도 더 증가한 배지조성을 얻을 수 있었다.

(5) 반응표면분석법(response surface method, RSM)을 통한 IPS 생산배지 최적화

상기의 SAM 실험 결과에 따라 IPS 생산배지의 최적점을 근사적으로 찾을 수 있었다. 따라서 생산배지의 농도를 더욱 정밀하게 최적화시키기 위하여 SAM에서 얻은 농도 부근에서 반응표면분석 실험을 수행하였다. 이를 위해 4개의 중요한 요인인 glucose와 fructose, casein enzymatic hydrolysate, soytone peptone에 대하여 중심합성계획(central composite design, CCD) 실험설계를 수행하였다(Table 1-41에 각 배지성분의 수준 제시). 탄소원인 glucose는 8~16g/L, fructose는 20~32g/L의 범위를, 질소원인 casein enzymatic hydrolysate는 1~9g/L, soytone peptone은 4~8g/L의 배지조합에서 실험을 수행하였다. 최소 실험횟수는 요인의 행렬 24개, 축점 8개, 중심점 6개로서 총 30가지의 배지조합으로 통계적 배지농도 최적화를 위한 배양실험을 수행하였다. 각 배지조합과 그 배지조합에서 얻은 최종 균체량(16.31~20.90 g/L)을 Table 1-42에 제시하였다. 또한 상기의 RSM 실험에 의해 얻어진 균체생산량을 통계적 처리를 통해 다음과 같은 이차다항식의 형태로 표현하였는데, 이 식에서 각 항의 계수는 Design Expert Pro S/W의 다중 회귀분석에 의한 결과이다.

$$D.C.W = +19.94 - 0.099 \times A + 0.066 \times B - 0.22 \times C + 0.84 \times D \\ - 0.22 \times A^2 - 0.44 \times B^2 - 0.57 \times C^2 - 0.43 \times D^2 \\ - 0.22 \times A \times B + 0.42 \times A \times C - 0.17 \times A \times D - 0.016 \times B \times C + 0.30 \times B \times D + 0.11 \times C \times D$$

본 실험 결과에 대한 ANOVA 분석표를 살펴보면(Table 1-43), p-value가 0.0312로서 0.05보다 작으므로 상기의 RSM 실험 결과는 매우 유의성이 있는 것으로 확인되었다. 특히 soytone peptone(D) 성분이 가장 큰 유의성을 보여주었다(p-value=0.001). Design expert pro에 의한 회귀분석 결과(Table 1-44), 6번 solution 값에서, 즉 glucose 8.13 g/L, fructose 29.44 g/L, casein enzymatic hydrolysate 3.49 g/L, soytone peptone 7.82 g/L를 사용할 경우에 가장 높은 균체생산성인 20.9 g/L를 얻을 수 있는 것으로 분석되었는데, 이 농도 범위는 Table 1-42의 배지조합 14번(RUN 14)의 주변인 것으로 확인되었다. 한편 Figure 1-56에 3차원 반응표면도와 2차원 contour plot을 이용해서 각 배지성분의 농도에 따른 균체 생산량을 제시하였다. 거의 모든 배지 성분의 중점 근처에서 생산성이 가장 높게 나타났으며, soytone peptone의 경우만 농도를 조금 증가시켜 줄 때 가장 좋은 효과

가 나타남을 알 수 있었다. 한편 RSM에 의해 수행된 최적 생산배지 농도 부근에서의 생산균주의 배양형태(morphology)는 상기의 SAM 실험에서 관찰된 바와 같이 고농도 배양에 최적으로 알려진 compact한 pellet형태(pellet 직경: 0.5~1.0 mm)의 morphology를 보여주었다(Figure 1-57). 이로부터 최적화된 배지조성 뿐만 아니라, 최적의 배지성분이 제공해주는 훌륭한 배양형태적 특성에 의해 균체 생산량이 향상되었다고 결론지을 수 있었다.

라. Oil을 주 탄소원으로 사용하는 IPS 생산배지 최적화 (OBLQ756-15-5 균주를 이용한 액상 플라스크배양)

본 실험에서는 상기의 균주 개발 액상배양 실험에서 가장 생산성이 높게 나타난 변이주인 OBLQ756-15-5를 모균주로 하여 IPS의 생산배지를 최적화하는 연구를 수행하였다. 특별히 oil 성분이 첨가된 생산배지를 개발하고자 하였는데, 그 이유는 오일의 경우 소모된 오일의 단위 질량당 생산된 균사체의 균체량($Y_{x/s}$)(생산수율)이 다른 탄소원보다 더 높을 뿐만 아니라, 오일이 첨가된 발효조 배양에서 오일이 antiform의 역할을 하기 때문에 배양공정 scale-up이 매우 용이하기 때문이다. 오일의 첨가 유무를 결정하기 위해 먼저 생산균주가 오일을 이용할 수 있는지의 여부를 조사한 결과, 본 생산균주는 오일분해 효소인 lipase의 분비 능력이 비교적 우수한 것으로 판명되었다(데이터 미제시). 여기서는 이전에 최적화된 생산배지에 오일을 첨가한 경우에 생산배지 조성의 변화 경향을 조사함으로써, 생산배지를 다시 최적화한 연구 결과를 제시하고자 한다.

오일이 비첨가된 이전의 최적 생산배지에서 14~18 g/L의 균체 생산성을 나타낸 배지성분(Table 1-45)을 기초로 하여 생산배지에 오일 첨가 실험을 수행하였다. 11가지의 오일 성분을 선정하여 각각 5 ml과 10 ml을 첨가하였다. 2회에 걸쳐 oil 첨가실험을 수행한 결과 control 보다 높은 균체 생산성을 나타내었는데, 특히 wheat germ oil과 lard oil에서 높은 생산성을 나타내었다(Figure 1-58). 따라서 높은 생산성을 보인 wheat germ oil과 lard oil, 그리고 생산성이 비교적 높았던 corn oil을 이용하여 첨가 농도 실험을 더 상세하게 수행하였다. 즉 임의적으로 5 ml과 10 ml을 첨가하였기 때문에 더 낮거나 더 높을 경우 생산성 향상을 나타낼 수 있다고 생각하여 첨가된 농도를 변화시켜 가며 (Table 1-46) 균체생산성을 조사하였다. 그 결과 lard oil의 경우는 11 ml/L, wheat germ oil 5 ml/L, corn oil 11 ml/L에서 가장 높은 생산성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다(Figure 1-59). 플라스크 배양과 발효조의 배양조건이 같지 않기 때문에 발효조에서의 오일 첨가의 영향을 조사하기 위해, 본 실험결과를 제1세부과제 팀에게 보내어 산업용 배양에서도 적용가능한지의 확인 실험을 수행하도록 요청하였다.

또 한편으로는 glucose와 fructose를 제외시키고, 오일만을 탄소원으로 사용한 경우의 오일 효과를 조사하는 실험을 수행하였다. 충분한 양인 30 ml/L의 oil을 탄소원으로 첨가하였으며(Table 1-47), 나머지 배지성분들인 casein enzymatic hydrolysate, soytone peptone, KH_2PO_4 , MgSO_4 모두 이전 실험과 동일하게 유지시켜주었다. 당 성분의 첨가 없이 오일만을 단일 탄소원으로 이용할 경우에, 전체적으로 균체 생산량은 낮은 값을 보여주었다(Figure 1-60). 단 주목할만하게도 oleic acid의 경우에는 다른 oil에 비해서 훨씬 좋은 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구 결과 당 성분들이 함께 존재할 경우에는 오일 성분이 부족한 영양분을 보충할 수 있는 주요한 요인으로 작용함을 유추할 수 있었다. 특별히 oleic acid의 경우 필요한 적당량의 glucose가 공급될 경우에 wheat germ oil보다 더 좋은 효과를 보일 것이라고 예상하였다. 또한 oleic acid의 경우에 동일한

분자로 이루어진 순수 물질인데 비해 wheat germ oil은 성분이 불분명하여 분리정제에도 oleic acid가 더 좋은 효과를 나타낼 것이라고 생각되었다.

이를 확인하기 위해서 oleic acid와 lard oil이 각각 첨가된 생산배지에서 glucose의 첨가 농도를 조사하는 실험을 수행 하였다. 오일과 glucose의 비율은 Table 1-48에 제시한 바와 같이, glucose를 5 g/L에서 30 g/L까지 변화시켜주었으며, 오일은 10 ml, 20 ml 30 ml를 각각 첨가하여 glucose와 오일 간의 상호 효과를 조사하였다. Figure 1-61에 lard oil과 oleic acid를 사용했을 때의 균사체 생산량을 나타내었고, Figure 1-62에 사용하고 남아있는 잔류 glucose의 양을 제시하였다. 가장 높은 균사체 생산성은 19 g/L 정도였는데, oleic acid가 30 ml/L, glucose가 15~20 g/L로 첨가되었을 때인 것으로 확인되었다. 또한 잔류 glucose의 양도 거의 존재하지 않는 것을 확인하였다. 여기서 주목할 점은 생산배지에 첨가된 glucose 양에 비해 훨씬 더 높은 균체 생산성을 보인 배양 결과들이 꽤 존재했다는 점이다. 이 결과로부터 본 연구진이 개발한 모든 미생물들이 쉽게 이용할 수 있는 당 성분은 물론 잘 이용하지만, 이와 동시에 함께 첨가된 오일 성분도 이용하여 성장한다는 것을 다시 한번 확인 할 수 있었다. 따라서 일정 비율의 glucose와 함께 오일이 존재할 경우 가장 좋은 효과를 나타낼 것이라고 추정하여 통계적 배지 최적화 연구를 수행하였다.

마. 통계적 방법을 이용한 IPS 생산배지 최적화 (Oleic acid 첨가된 생산배지 개발) (OBLQ756-15-5 균주 이용)

(1) Oil을 첨가한 FFD 실험

상기의 농도 변화 실험을 통해 oleic acid와 glucose의 상관관계가 어느 정도 존재함을 인식하였으므로, 이를 좀 더 정확하게 조사하고자 두 요인 간의 상관관계를 알 수 있는 통계적 방법인 fractional factorial design(FFD) 실험을 수행하였다. 상기의 농도실험에서 높은 생산성을 보인 농도를 중점으로 하고, Table 1-49에 제시한 바와 같이 높은 농도와 낮은 농도의 범위를 정해주어 37가지의 배양조건에서 배양을 수행한 결과, 21~26.7 g/L에 이르는 균사체 생산성을 얻을 수 있었다 (Figure 1-63). 특히하게 높은 결과를 나타낸 26.7 g/L의 결과는 실험상의 오차일 수도 있지만, 전체적으로 볼 때 약 22 g/L의 결과를 얻을 수 있었다(Table 1-50). Table 1-51에 FFD 실험결과를 통계적으로 분석한 main effect를 표시하였는데, soytone peptone을 제외한 4가지 성분에서 모두 높은 기여도를 나타내었으며, 특히 casein enzymatic hydrolysate에서 11.73으로 가장 높게 나타났다. (E) factor인 KH_2PO_4 만이 (-) 방향의 값을 나타내었으며, 다른 factor 들은 모두 (+) 값의 효과를 보여주었기 때문에 KH_2PO_4 의 농도는 낮춰주고 나머지 성분들의 농도는 높여주었을 때 가장 좋은 효과를 보일 것으로 예상되었다.

유의성 확인을 위해 ANOVA 분석을 수행하였고, 이를 Table 1-52에 제시하였다. 본 실험 결과에 대한 ANOVA 분석에서 전체적인 유의성을 나타내는 prob > F의 값이 0.0303을 나타내었기 때문에 본 실험결과는 전체적으로 유의성을 보임을 확인할 수 있었다. FFD 분석을 통해 두 factor 간의 교호작용을 알 수 있는데, 교호작용이 높게 나타난 3개의 결과를 Figure 1-64에 제시하였다. 높은 농도의 casein enzymatic hydrolysate가 제공되었을 경우, glucose가 높아질수록 높은 생산성을 나타내며(Figure 1-64(A)), KH_2PO_4 의 경우는 낮은 농도로 유지되는 경우에 oleic acid의 농도가 높을수록 생산성이 증가하며(Figure 1-64(B)), casein enzymatic hydrolysate와 oleic acid의 경우에는

두 성분 모두 농도가 높게 첨가되었을 때 균체 생산성이 높은 것(Figure 1-64(C))으로 분석되었다. 한편 FFD 실험에 대한 통계적 분석결과, 다음의 식에 의해 각 factor 간의 상호작용을 알 수 있었다 (여기서 A, B, C, D, E의 배지 성분은 Table 1-51에 제시된 성분임).

$$D.C. W = +17.50 + 0.84A + 0.88B + 0.94C + 0.25D - 0.80E + 0.30AB + 0.55AC + 0.35AD + 0.19AE \\ + 0.40BC + 0.11BD - 0.76BE - 0.59CD - 0.099CE + 0.15DE$$

상기의 FFD 실험에 대한 분석 결과를 바탕으로 각 배지성분의 최적 농도를 구하기 위해, Steepest Ascent Method (SAM)에 의한 통계적 배지 최적화 실험을 계속 수행하였다.

(2) Oil 첨가배지에서 steepest ascent method 및 Response Surface method (RSM)를 통한 배지최적화 통한 최적 배지조성 결정

상기의 FFD 실험결과에 근거해서 추정된 steepest ascent method의 실험설계값을 Table 1-53에 제시하였다. Table 1-54에 제시한 바와 같이 통계 소프트웨어가 계산한 new step을 적용한 배지조합으로 배지농도 최적화 실험을 수행하였다. 배양조건은 다른 배지최적화 실험과 동일하게 유지해주었다. 그 결과 new step의 방향으로 5번의 배지 조합까지는 균사체의 생산성이 지속적으로 증가되다가 6번의 배지조합 이후부터는 점차로 감소하는 것으로 나타났다 (Figure 1-65).

상기의 SAM 실험 결과에 의해 거의 최적이라고 결정된 각 배지성분의 농도 부근에서 배지농도를 더욱 정밀하게 최적화시키기 위하여 반응표면분석(RSM)을 수행하였다. 4개의 중요한 요인인 glucose와 oleic acid, casein enzymatic hydrolysate, soytone peptone을 이용하여 중심합성계획(central composite design, CCD) 실험을 수행하였다. 각 요인들의 수준을 Table 1-55에 제시하였고, 최소 실험 횟수는 요인의 행렬 2^4 개, 축점 8개 (즉 2×4), 중심점 6개를 합하여 총 30가지의 배지조합으로 실험을 수행하였는데, 이를 Table 1-56에 나타내었다.

SAM 실험 결과에 의해 통계적으로 제시된 농도에 따라 배양실험을 수행한 결과(Table 1-56) 균사체 생산량은 15.48 g/L에서 26.68 g/L까지 다양하게 나타내는데, 특별히 19번 조성의 생산배지에서 26.68 g/L로 가장 높은 값을 나타내었다. 이상의 실험에 의해 얻어진 균사체 생산량을 다음의 이차함수의 형태로 표현하였는데, 각 항에 대한 2차다항식의 계수는 Design Expert Pro 소프트웨어를 사용하여 다중회귀분석법에 의해 구할 수 있었다.

$$D.C. W = +18.13 + 0.067A - 0.50B + 0.92C + 0.58D + 0.57A^2 + 0.057B^2 + 0.11C^2 + 0.15D^2 \\ + 0.51AB - 0.80AC - 0.69AD - 0.17BC - 0.39BD + 1.36CD$$

여기서 A, B, C, D는 각각 glucose, oleic acid, casein enzymatic hydrolysate 및 soytone peptone 성분을 부호화 한 것이다.

각 배지성분 간의 유의성을 확인하기 위해 ANOVA분석을 수행하였다. Table 1-57로부터 전체의 모델의 유의성에 대한 p value의 값은 0.0324로, 이 값은 ($p < 0.05$)인 경우에 해당하므로 본 실험결과는 유의성이 있으며 신뢰성이 있음을 알 수 있었다. 특히 (C)성분인 casein enzymatic hydrolysate의 p-value, 0.013에서 이 성분 및 농도가 균사체의 액상배지에서의 성장에 매우 크게 기여함을 알 수 있었다.

Figure 1-66에 반응표면도와 contour plot을 이용해서 각 배지성분들의 농도에 따른 균사체의 성장 정도를 나타내었다. 본 연구 결과에서는 최대 생산치를 주는 stationary point를 얻을 수 없어서, 최적점을 찾아낼 수는 없었지만, oleic acid, casein enzymatic hydrolysate와 soytone peptone의 농도를 더 높여 주는 방향으로 배지조성을 변경시킬 때, 더 좋은 효과를 볼 수 있음을 확인 할 수 있었다. 반면에 glucose의 경우 오히려 감소하는 방향으로 배지 농도를 변경시켜야 최적점에 접근할 수 있다는 결론에 도달할 수 있었다. RSM 중점을 본 연구 결과에 근거해서 주어진 농도 부근으로 변경시켜 RSM 실험을 다시 수행할 경우 더 좋은 결과를 나타낼 수 있을 것이라 기대하면서, 현재 배지 최적화의 마지막 단계 실험을 수행 중이다. 한편 제 1세부연구팀에게는 오일을 첨가한 생산배지를 이용한 발효조 연구가 동시에 진행될 수 있도록 배지 최적화 실험에 대한 각 연구결과를 매 실험이 끝날 때마다 알려 줌으로써, 규모 확대된 발효조에서의 배양이 거의 같은 시기에 수행될 수 있도록 유기적으로 협력하였다.

바. 원형질체 융합 방법에 의한 IPS 고생산성 유전자재조합 균주 개발

(1) IPS 고생산성의 원형질 융합 균주 개발: 표지인자를 사용하지 않고 돌연변이법에 의한 유전자 재조합 균주 선별

원형질체 융합법에 의해 균주를 개발함으로써 전통적인 돌연변이 방법을 통해 얻은 다중저항성 균주들의 배양생리적인 한계를 극복할 수 있는 유전자 재조합체를 얻을 수 있을 것으로 판단되었다. 즉 산업적으로 널리 적용되고 있는 균주 개발 방법으로서 자연에서 분리된 야생균주에 UV이나 NTG등을 통한 무작위적인 돌연변이 유발 방법을 사용해서 획득한 다중 저항성균주들의 생산성은 이들 돌연변이주가 유도된 모균주에 비해 향상되기는 한다. 그러나 일반적으로 저항성 균주들의 경우 항생제나 antimetabolites의 농도가 어느 수준 이상이 되면 더 이상의 생산성 향상이 어렵게 되거나 그 증가 폭이 감소하는 경향이 있다. 반면에 원형질체 융합균주는 단순 변이주에 비해 유전함량의 증가로 유전적 안정성이 증가되고, 성장속도 및 단백다당체 생산성 등과 같은 배양생리적 특성이 어느 정도 향상된 고생산성 균주들이 될 것으로 기대되었다.

원형질융합빈도는 일반적으로 10^{-4} 에서 10^{-3} 정도로 그 비율이 매우 낮은 편이다. 이에 따라 많은 수의 원형질체를 형성하였다더라도 그로부터 융합체(fusant)를 얻을 확률은 매우 낮을 수밖에 없다. 본 연구에서는 융합균주의 선별을 위한 표지인자(selective marker)의 특성을 이용하지 않고 융합율을 높이기 위한 방법을 개발하고자 하였다. 즉 형성된 원형질체를 치사율이 약 90% 정도 되도록 UV나 NTG를 처리한 후 융합을 시도할 경우, 융합빈도가 $10^{-2} \sim 10^{-1}$ 까지 높아질 수 있는, 본 연구진의 이전의 연구결과에 따라 표지인자 없이 random screening을 통해 원형질융합체를 선별하고자 하였다.

실험방법에서 설명한 바대로, 표지인자를 사용하지 않고 돌연변이 방법을 통해 유전자재조합체를 선별하기 위해, 우선 융합하고자 하는 균사 모양의 모균주(OBLQ528-22와 OBLQ756-15 균주)를 약 200초 동안 UV로 변이처리한 후(치사율 약 85% 이상) 효소 처리하여, 이로부터 돌이변이된 각각의 원형질체를 유도한 후, 변이처리된 각각의 원형질체 1 ml 씩(5×10^5 protoplasts/ml)을 centrifuge tube에 섞어 4,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 이와 같이 회수한 두 종류의 원형질체 혼합물을 30°C로 예열된 fusion solution(40% PEG 4000, 10 mM CaCl₂, 10 mM

Tris-HCl, pH 7.5) 1 ml를 가하여 상온에서 10분간 반응시킨 후, 재생배지에 pour plating하여 생존한 colony를 융합균주(fusants)로 간주하였다.

Table 1-58에 제시한 바와 같이, 돌연변이된 원형질체 중에서 85% 이상이 사멸하는 조건에서 UV를 처리하였기 때문에, 돌연변이된 대부분의 원형질체는 거의 재생되지 않지만(각각 15.3%와 13.7% 재생), 주목할 만하게도 이 파트너들이 원형질체 융합(protoplast fusion) 단계를 거치게 되면 재생율이 약 61.7%로 뚜렷하게 증가하는 것으로 나타났다. 이는 돌연변이된 두개의 원형질체가 융합과정 중에 손상된 유전자를 서로 상호 보완시켜 주기 때문에 나타나는 현상인 것으로 판단되었다. 돌연변이된 원형질체로부터 재생된 변이주를 회수한 후, 고체 계대배양배지 도말하고, 이로부터 세포 성장 속도가 훌륭한 87개의 융합균주를 회수하여 상기에서와 동일한 방법으로 각각의 생산성을 확인하기 위해 플라스크 성장배양 및 생산배양을 수행하였다. 일련의 전체 공정, 즉 고체배양, 정치배양, 액상 성장배양, 액상 생산배양에 이르는 배양공정을 Figure 1-37에 제시한 바대로 수행하였다.

Table 1-59에 제시한 바와 같이 약 40% 정도가 융합 파트너 균주인 모균주인 OBLQ528-22(균체생산성: 17.5 g/L)와 OBLQ756-15(균체생산성: 17.8 g/L)의 균체 생산성 범위에 존재하는 것으로 나타났고, 약 24% 정도가 18 gDCW/L 이상의 높은 균체생산성을 보여주는 것으로 관찰되었다. 한편 대부분의 융합균주는 균사체 생산성이 대부분이 16~19 g/L의 범위에 분포하고 있는 것으로 나타났다(Table 1-59). 이로부터 균체 생산성이 좋고 배양 안정성이 높으며, 특히 배양형태가 공장규모의 다단계 배양공정에 적합할 것으로 판단되는 균주를 선별하여 FUS27 균주 (균체생산성: 20.7 g/L)와 FUS33 균주 (균체생산성: 19.4 g/L)로 명명하였고 (단 21.2 g/L으로 균체생산량이 가장 높았던 융합균주는 액상배양시 그 재현성이 매우 떨어지는 것으로 확인되어 제외시켰음), 이 균주들을 규모 확대된 발효조에서의 연구를 위해 제 1세부과제 연구팀에서 분양하였다.

본 결과를 요약하면 선별된 putative fusants의 균체 생산성이 비록 눈에 띄게 증가하지는 않았지만, 단순 재생체인 융합파트너들 보다 성장속도도 빠르고 균체 생산성도 우수한 균주를 다수 확인할 수 있었음은 주목할 만하다. 일반적으로 원형질체 융합방법에서 유전자재조합빈도(recombination frequency)가 약 1×10^{-3} 인 것을 감안해 볼 때, 본 연구에서 개발한 변이원 처리를 통한 융합균주의 선별방법은 유전자재조합체의 선별 확률을 크게 증대시킬 수 있는 효율적인 방법인 것으로 확인되었다.

사. 세포외다당체(EPS) 고생산성 균주 개발(액상 생산배양을 통한 고생산성 우량균주 선별)

세포외다당체(EPS) 고생산성 균주를 선별하기 위해, 고체계대배양, 정치배양, 액상 성장배양(성장배지 이용), 액상 생산배양(생산배지 이용)에 이르는 일련의 배양과정은 상기의 IPS 고생산성 균주 선별 절차와 동일하나(Figure 1-37), 최종 액상생산배양에서 사용하는 EPS 생산용 생산배지 조성은 IPS 생산용 생산배지 조성과는 큰 차이를 보인다. 즉 IPS 생산배지 조성에서 알 수 있듯이 IPS 생산배지의 경우 균사체의 최대 성장을 위해 매우 균형 잡힌 배지조성으로 이루어진 반면, EPS 생산배지의 조성은 세포성장은 억제하는 대신 가능한 한 많은 양의 탄소원이 EPS 생합성 쪽으로 이용되도록 조제한 불균형적인 배지조성으로 이루어져 있다(Table 1-4).

EPS 고생산성 균주를 선별하기 위한 원형질체 형성, 재생 및 변이주 선별을 위한 고체배양 전 과정은 IPS 고생산성 균주개발 방법과 동일하게 진행되었다. 즉 균사체를 UV 변이처리 한 후 유도된

원형질체로부터 재생된 변이주를 선별하여 최적화된 고체배지(SGM)상에서 12일 동안 배양해서 균사의 성장속도와 성장밀도가 높게 나타난 OBEP301과 OBEP347 (IPS 고생산성 균주 개발 시 OBLQ301과 347 균주에 각각 해당함)를 모균주로 하여 이들로부터 유래한 변이주들을 고체배양, 액상 배양, 액상 성장배양(성장배지 이용), 액상 생산배양(생산배지 이용)의 일련의 과정을 거쳐 최종 생산배양에서 고농도의 EPS 생산성을 보여주는 균주를 선별하는 반복 실험을 반복 수행하였다.

고체배지(SGM) 상에서 OBEP301과 OBEP347로부터 유래된 약 150개의 변이주들을 선별한 후, 액상 생산배양에 의해 이들의 EPS 생산성을 비교한 결과 (Table 1-60), 9일 동안 배양시 대부분 균주들의 EPS 생산성은 3.0~4.0 g/L 정도에 분포하고 있었으나, Table 1-60에 강조한 바와 같이 모균주인 OBEP301과 OBEP347 균주 보다 더 높은 EPS 생산성을 보이는 우량균주 들을 다수 획득할 수 있었다. 이들 중에서 특별히 5.0 g/L 이상의 EPS 생산성을 보이는 7개의 균주를 선별한 후 (EPS-11, EPS-12, EPS-13, EPS-14, EPS-15, EPS-16, EPS-17로 명명), 각 균주에 대해 3배수 액상 생산배양 실험을 통해 EPS의 생산 안정성을 조사함으로써, EPS 고생산성 일뿐만 아니라, EPS의 생산 안정성도 뛰어난 EPS-13 균주를 최종 선별하였다. 한편 대부분의 균체농도는 10~14 g/L의 범위에 존재하는 것으로 관찰되었는데, 이 결과로부터 본 연구에서 개발한 EPS 생산용 액상생산배지의 성분이 IPS 생산용 배지 성분에 비해 영양면에서 떨어짐을 알 수 있었다. 한편 본 연구 결과 개발된 EPS-13 균주를 발효조 배양을 통한 EPS의 대량 생산 연구를 위해 제1세부과제연구팀에게 분양하였다.

아. 용존산소 제한배양환경에서도 고생산성을 지닌 유전자재조합 *Inonotus obliquus* 개발

(1) 산소전달단백질인 VHB의 유전자 발현을 위한 *Trametes versicolor*의 *gpd* promoter 클로닝 및 이를 이용한 발현백터 제작

*Inonotus obliquus*와 같은 호기성 미생물을 이용한 대부분의 산업용 생물공정에서 공정의 최종 생산성을 결정하는 가장 중요한 인자중의 하나는 생산균주로의 원활한 산소 공급이다. 호기성 미생물은 최종 전자수용체로서 산소를 필요로 하며 이 전자전달계를 통하여 세포의 성장뿐만 아니라 단백질과 같은 유용 대사산물을 생합성하는데 필요한 에너지인 ATP를 생합성할 수 있기 때문이다. 특별히 균사형성 담자균류인 *Inonotus obliquus* 균사체를 대형 발효조에서 액상배양 시 배양액에서의 용존산소 결핍현상으로 인해 생산균주의 균체 생산성 및 단백질의 생산성이 심각하게 저해 받는 현상이 발생하곤 한다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서 발효조의 교반속도와 통기량을 증가시킬 경우 배양중의 용존산소 결핍의 문제점은 해결할 수 있으나, 생산균주에게 심각한 shear damage를 끼치는 또 다른 문제점이 발생하곤 한다. 따라서 본 연구에서는 용존산소 제한 조건의 배양환경에서도 고생산성을 지닌 *Inonotus obliquus* 균사체를 개발하기 위해서 산소전달단백질로 널리 알려진 VHB(*Vitreoscilla* hemoglobin)의 유전자를 생산균주에 도입하고자 하였다. *Vitreoscilla* sp.는 그람 음성 박테리아로서 *Beggiatoa*과에 속하는 호기성 박테리아인데, VHB는 이 박테리아에서 생합성되는 단백질로서 hemoglobin과 유사한 특징이 있는 것으로 확인되었다. VHB는 분자량이 15.7 kDa인 두 개의 같은 subunit이 복합체를 형성한 homodimer 구조로 이루어져 있으며 각각의 subunit는 protoheme XI를 포함하고 있다. Vhb 유전자의 발현은 산소에 의해서 조절되는데 미호기

성 환경에서 약 50배 정도 증가하며 용존산소에 대한 친화성이 horse hemoglobin 보다 4~8 배 높다고 보고되었다.

본 연구에서는 용존산소 제한 조건의 배양환경에서도 고생산성을 지닌 *Inonotus obliquus* 균사체를 개발하기 위해 산소전달단백질로 널리 알려진 VHB(*Vitreoscilla* hemoglobin)의 유전자(vhb gene)를 생산균주에 도입하고자 하였다. 이를 위해 vhb의 유전자의 promoter로서 *Inonotus obliquus*와 동일한 담자균류에 속하는 *Trametes versicolor*의 constitutive promoter인 *gpd* promoter를 사용하였는데(Figure 1-67), colony PCR과 restriction enzyme으로 확인한 결과(Figure 1-68), *Trametes versicolor*의 *gpd* promoter를 갖는 expression vector인 pBARGPDVHB를 구축하는데 성공하였다.

생산균주인 *Inonotus obliquus*의 발효조 배양 결과 지수기 성장단계에서 배양액의 pH가 매우 낮게 유지되는 배양 특성에 근거하여, 낮은 pH에서 발현되는 inducible promoter인 pH-controlled promoter를 이용하여 vhb 유전자가 발현되는 expression vector를 제조하고자 하였다. 이와 같이 제조된 발현벡터로 생산균주를 형질전환 시킬 경우 용존산소가 매우 부족한 지수기 단계에서 VHB 단백질이 효과적으로 생합성되기 때문에(배양액의 pH가 매우 낮기 때문에 pH-controlled promoter가 "on" 되는 현상 발생), 생산균주가 용존산소 제한현상에 의한 세포성장 저해 및 단백질당체 생산 저해 현상을 효과적으로 극복할 수 있을 것으로 판단되었다. pH-controlled promoter는 먹물버섯(*Coprinus congregatus*)에서 발현되는 유전자로서 laccase의 일종으로 *clac2*로 명명되어 보고되었다. 이 유전자는 먹물버섯에서 균체로부터 버섯을 만드는 과정, 즉 분화단계에 관련이 있으며 낮은 pH에서 발현하는 것으로 알려져 있다. 따라서 이 promoter를 이용할 경우 pH가 낮은 산성조건하에서 발현하는 expression vector의 개발이 가능할 것으로 판단하였다. 이 vector를 사용할 경우 *gpd* promoter와 같은 constitutive promoter가 가지고 있는 문제점, 즉 배양기간 동안 계속하여 target gene이 발현되는 현상을 극복할 수 있을 것으로 판단되었다.

pH-controlled promoter의 cloning을 위하여 NCBI에 게재된 AJ271339 유전자 서열을 이용하여 primer를 제작하였으며 PCR을 수행하여 1200(bp)의 염기 서열을 cloning 하였고, 이를 T vector에 삽입하였다(Figure 1-69). 이 후 Figure 1-70의 모식도와 같이 기존의 pBARGPDVHB에서 *gpd* promoter를 제거한 후, 상기의 방법에 의해 cloning된 pH-controlled promoter를 도입하여 pBARPHVHB expression vector를 제조하였다. 제한효소 처리에 의해 pH-controlled promoter인 1200(bp)의 단편과, vhb 유전자인 440(bp)의 단편이 pBARPHVHB expression vector에 제대로 삽입되었음을 확인한 전기영동 결과를 Figure 1-71과 Figure 1-72에 제시하였다.

(2) pH-controlled promoter의 활성을 조사하기 위한 pH-gfp fusion vector의 제조

pH-controlled promoter의 활성을 조사하기 위하여 gfp 유전자를 pH-controlled promoter의 뒤쪽으로 fusion하였다. Green fluorescence protein은 Jellyfish *Aequorea victoria*에서 처음 발견되어 "aequorin"이라 명명되었으며, 동물세포나 대부분의 박테리아에서도 광범위하게 이용되고 있다. 그러나 고등균류에서는 일부 종에서 발현이 되지 않는다고 보고되었고, 따라서 본 연구에서는 gfp에서 하나의 아마노산을 치환함으로써 발현효율을 높여준 sgfp 유전자를 클로닝하여 이용하였다(Figure 1-73). 이를 T vector에 ligation 하여 sequencing한 결과 이미 밝혀진 유전자 염기서열과 동일한 결과를 얻을 수 있었다(Figure 1-74). 이를 기존의 pBARPHVHB expression vector의 vhb 유전자와

교체하기 위하여 Figure 1-75에 제시된 방법으로 실험을 수행하여 pH-controlled promoter 하에서 발현되는 sgfp expression vector를 구축하고자, 기존의 pBARPHVHB에서 VHB를 제거하고, sgfp gene이 삽입되어 있는 T vector(T+SGFP)에서 sgfp 만을 자른 후, pBARPHVHB와 sgfp 부분을 ligation하였다. 구축된 vector를 *EcoRI*과 *NdeI*로 자른 경우 1920(bp), *EcoRI*과 *BamHI*으로 자른 경우 720(bp), 그리고 *BamHI*과 *NdeI*으로 자른 경우는 1200(bp)의 절편이 각각 관찰되었는데 (Figure 1-76), 이로부터 pH-controlled promoter하에서 SGFP 단백질을 발현하기 위한 expression vector인 pBARPHSGFP가 성공적으로 제조되었음을 확인할 수 있었다.

(3) *Aspergillus niger*에서 산소전달단백질인 헤모글로빈의 역할을 담당하는 유전자 hmb1(hemoglobin domain 유전자) 유전자의 cloning

*Vitreoscilla sp.*로부터 유래한 산소전달유전자인 vhb의 탁월한 효과가 발표되면서 다양한 미생물에서 여러 가지 hemoglobin 관련 유전자들이 발견되었다. 또한 생산균주에 다양한 hemoglobin 관련 유전자들을 발현시켰을 때 생산균주의 성장 및 유용 대사물질의 생산성이 높아졌다는 연구결과가 속속 보고되고 있다. 따라서 본 연구에서도 *Aspergillus niger*로부터 hmb1(hemoglobin domain 유전자)을 클로닝 하여 단백다당체 생산균주인 *Inonotus obliquus*에 도입하는 전략을 수립하였다. hmb1 유전자를 발현하는 expression 벡터를 제작하고자, 먼저 *A. niger*로부터 hmb1 유전자를 클로닝 하였다. hmb1 유전자 클로닝에 이용된 promoter는 NCBI (AJ628840)에 게재된 염기서열을 기초로 하여 제작하였으며(forward: 5' taggatccatgccgctcacaccagag 3', reverse: 5' gagaattctcagccctggctttgctt 3'), ligation 반응에 이용하고자 forward primer의 양 5' 말단에는 *BamHI* 제한 효소가, reverse primer의 5' 말단에는 *EcoRI* 제한효소가 존재하도록 primer를 제작하였다. *A. niger*의 chromosomal DNA를 주형으로 하여 PCR을 수행하였으며 PCR 조건은 PCR은 95°C 5분 1cycle 과 92°C 1분, 60°C 1분, 72°C 45초로 30 cycle로 수행하였다. Gradient annealing temperature로 실험을 수행한 결과 PCR산물로서 444(bp)의 유전자 단편을 확인하였으며, PCR 수행 과정에서 mismatch 유발을 방지하기 위하여 가장 높은 온도인 60°C을 annealing 온도로 결정하였다(Figure 1-77). 이를 elution agarose gel로부터 회수하여 T vector에 cloning한 후, hmb1의 유전자 서열을 분석한 결과를 Figure 1-78에 제시하였다. 그 결과 NCBI에 게재된 염기서열과 일치하는 것을 확인하였으며, 이 유전자를 상기의 vhb 발현벡터 제작 시 수행했던 대로, constitutive promoter인 *Trametes versicolor*의 *gpd* promoter에, 그리고 inducible promoter인 *Coprinus congregatus*의 pH-controlled promoter에 ligation하는 실험을 현재 수행 중에 있다.

현재까지의 형질전환된 고생산성 균주를 개발하기 위한 유전자 재설계 연구결과를 요약하면 다음과 같다: 효과적인 세포내로의 용존산소 전달을 위하여 이미 제조된 pBARGPEVHB vector로부터 vhb 유전자를 클로닝하여, 이를 constitutive promoter인 *Trametes versicolor*의 *gpd* promoter에, 또한 inducible promoter인 *Coprinus congregatus*의 pH-controlled promoter에 각각 연결함으로써 효율적인 vhb 발현벡터를 제조하였다. 또한 *Coprinus congregatus*의 pH-controlled promoter의 활성을 조사하기 위한 pH-gfp fusion vector를 구축하는데 성공하였다. 이외에도 *A. niger* 산소전달단백질의 유전자로 알려진 hmb1을 클로닝하여, 이 유전자를 상기의 vhb 발현벡터 제작 시 수행했던 대로 *gpd* promoter와 pH-controlled promoter하에서 각각 발현되는 새로운 벡터를 제조 중에 있다. 이러한 발현벡터가 단백다당체 고생산성 균주인 *Inonotus obliquus*에 효과적으로 도입될 경우, 산소

전달 제한조건의 배양환경 하에서도 매우 효율적인 세포내로의 산소전달이 가능할 것으로 예상되며, 따라서 최종 전자수용체로서 작용하는 산소의 용이한 공급으로 인해 ATP 생합성이 활발해져 생산균주의 성장뿐만 아니라 유용대사산물인 단백다당체의 고생산이 가능할 것으로 판단된다.

자. 세포벽 다당체(IPS)의 추출 효율성 조사 및 HPLC 정량분석

이전의 실험을 통해서 균사체의 질량과 비례해서 세포벽다당체(IPS)가 존재하는 것으로 확인되었다. 즉 단위 질량당의 IPS의 생산성은 거의 모든 균주에서 동일하게 나타났다. 본 연구에서는 4 종류의 추출 방법을 적용하여 IPS의 실제 추출 효율을 높이기 위한 실험을 수행하였다(Figure 1-79). 일반적으로 IPS의 경우 고온 고압에서 처리하는 공정을 많이 사용하며, 이때 그 추출 효율이 높게 나타나는 것으로 알려져 있다. 모든 방법의 전처리 과정으로 우선 sonicator를 이용하여 1시간 동안 40도에서 균사의 세포벽을 약하게 하는 과정을 수행하였다. 그 후 (i) 끓는 물에서 균사체를 추출하는 법, (ii) 멸균기를 이용해서 추출하는 법, (iii) 약탕기로 알려져 있는 health cooking 제품을 이용한 추출법, 그리고 (iv) 균류의 세포벽 성분인 glucan 구조를 잘라줄 수 있는 glucanase를 포함하는 lysing enzyme을 처리하여 추출하는 방법을 수행하였다. 이 4가지 추출 방법을 요약하여 Figure 1-79에 제시하였다. 또한 각각의 추출방법으로 얻은 물질들(즉 IPS 및 다른 물질들도 포함되어 있는 조추출물)을 동결건조하여 최종적으로 회수한 조추출물을 Figure 1-80에 제시하였는데, 육안으로도 뚜렷하게 차이가 나는 것을 확인할 수 있었다. 즉 효소 처리를 통해 추출한 경우에 가장 많은 양의 조추출물을 얻을 수 있었고, 약탕기만을 사용한 방법에서 조추출물들이 가장 낮게 회수되는 것으로 나타났다.

추출에 사용된 *Inonotus obliquus* 균사체의 질량 당 회수된 추출물질(조추출물)의 양을 통해 걸보기 전체회수율을 계산하였다(Figure 1-81). 효소처리 후 추출한 방법에서 걸보기 추출효율이 가장 높은 것으로 나타났지만, 각 추출법에 의해 회수된 물질들을 ELSD로 정량분석한 결과, 효소처리에 의해 추출 회수된 조추출물 중에는 단백질과 같은 세포 부산물들이 실질적으로 다량 포함된 것으로 나타났다(데이터 미제시). 이를 통해 효소처리 후 추출하는 방법을 적용할 경우, 균체가 완전히 파괴되는 현상이 발생하기 때문에 세포벽 성분만 추출하기 위해서는 효소처리 조건(효소량 및 효소 반응시간 등)에 대한 정밀 조사가 필요한 것으로 확인되었다. 한편 멸균기를 통해 열수 추출할 경우 고온 고압에서 추출이 가능하기 때문에 비교적 적은 시간에 효율적인 추출이 가능함을 확인할 수 있었다.

한편 열수와외의 접촉 표면적에 따른 IPS의 실제 추출 효율을 조사하기 위해 균사체를 초미세 분말화한 후 열수 추출하여 그 조추출물들에 대한 ELSD 분석을 시행하였다. 초미세 분쇄는 (주)코리아 메디의 탁상형 미세분쇄기를 이용해서 수행하였다. 이때 배양을 통해 얻은 균사체 뿐만 아니라, 비교 분석을 위한 목적으로 *Inonotus obliquus*의 자실체에 대해서도 IPS의 추출 효율을 조사하였다. 자실체와 배양 균사체를 초미세 분쇄한 후 얻은 조추출물들을 Figure 1-82에 제시하였다. 균사체의 경우, 동결건조 산물은 일반적으로 다당체를 분리 동결건조 하였을 때 나타나는 슈사탕과 같은 형태의 추출물들의 모양을 하고 있었으며, 자실체 추출물의 경우에는 *Inonotus obliquus* 자실체의 색을 나타내는 검은색 분말의 형태를 띠고 있었다.

자실체와 균사체의 초 미세분말의 추출효율을 알아보기 위해서 앞의 추출방법에 따른 데이터와 비교 분석하였고, 그 결과를 Figure 1-83에 나타내었다. 조추출물의 양은 균사체를 미세 분말화 한

경우에 효소처리 방법 이외의 다른 추출 방법들과 비슷한 양의 회수율을 보였으며, 자실체의 경우에는 다른 추출법들에 비해서 비교적 많은 양의 조추출물을 얻을 수 있었다. 조추출물 중의 실질적인 IPS 만을 정량 분석하고자 조추출물들에 대해 ELSD 분석을 수행하였고, 그 결과를 Figure 1-84에 제시하였다. 큰 분자로 구성된 IPS의 경우 분자량이 일정하지 않고 비교적 넓은 범위에 퍼져있기 때문에, elution peak가 비교적 넓게 분포하므로, 이 elution 시간대에 대한 peak의 면적을 계산함으로써 정량분석을 수행하였다 (크로마토그램의 앞부분에 존재하는 작은 peak가 IPS를 나타내는 peak 임). ELSD 분석 결과, 주목할 만하게도 미세 분말화한 균사체 추출물에서 가장 많은 양의 IPS가 존재하는 것으로 확인되었다. 초미세 분말로 전처리하는 과정을 도입함으로써, 일반적인 열수 추출의 경우보다 약 1.6배, 효소처리 후 추출한 IPS의 양 보다 약 3배 이상 더 높은 IPS의 추출 효율을 확인할 수 있었다(Figure 1-84). Figure 1-84의 분석 결과를 더욱 쉽게 비교하기 위해 Figure 1-85에 이들을 통합한 그래프를 제시하였다. 이 결과는 거의 동일한 질량의 조추출물을 얻은 다른 추출 조건에 비해, 초미세분말을 통해 회수한 조추출물 안에 IPS의 실질적인 양이 훨씬 높게 존재한다는 것을 의미한다. 즉 배양 균사체의 미세 분말화를 통해 IPS의 실제 추출효율을 크게 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다.

3. 연구결과 요약

Inonotus obliquus 균사체의 액상배양을 통한 향당노 효능의 단백다당체 대량생산 배양공정 개발하고자, (i) 특별히 장기간의 배양시간이 요구되어 신속한 균주개발에 있어서 가장 큰 장애요인으로 작용하는 계대배양(고체성장배양)시의 문제점을 극복하기 위해 통계적 방법에 의한 계대배양 배지 최적화, (ii) 원형질체 형성, 돌연변이 유발 및 원형질체 융합을 통한 지속적인 단백다당체 고생산성 균주의 선별, (iii) 통계적 방법을 적용한 IPS 대량 생산용 액상 배양배지 최적화, (iv) 고생산성 균주의 배양생리적 특성 및 배양 형태적 특성 연구, (v) 용존산소가 결핍된 배양환경에서도 고생산성 능력을 갖는 유전자재조합 *Inonotus obliquus* 개발 연구를 수행하였다.

특별히 장기간의 배양 시간이 요구되어 신속한 균주개발 시 가장 큰 장애요인으로 작용하는 계대배양(고체성장배양) 단계의 문제점을 극복하고자, 계대배양 환경의 최적화에 대한 연구를 중점적으로 수행하였다. 계대배양 시 균사체 성장에 효능이 탁월한 배지성분을 선별하기 위해 Plackett-Burman design 실험을 통해서 유의성 높은 배지 성분을 찾아내었고, 이에 근거한 fractional factorial design(FFD) 실험을 통해 배지 성분 상호간의 관계를 분석할 수 있었다. 또한 이 FFD 실험결과에 근거해서 설계한 steepest ascent method 실험방법을 적용한 결과, 계대배양 시 균사성장 직경이 기존의 MA 배지 대비 약 41% 더 증가했을 뿐만 아니라 균사의 밀도도 크게 향상된 배지조성을 결정할 수 있었다. 또한 SAM 연구결과를 바탕으로 최적의 계대배양 배지조성을 확립하고자 각 배지성분의 최적 농도를 통계적으로 더욱 정밀하게 조사하는 RSM(response surface method) 실험을 수행하였다. 그 결과 최적 계대배양배지의 성분과 농도는 glucose 25.61g/l, brown rice 12.53 g/l, peptone 12.53 g/l, magnesium sulfate 5.53 g/l인 것으로 최종 확인되었다.

한편 *Inonotus obliquus*는 균사체로 성장할 때 포자를 형성하지 못하므로 단일 세포를 얻기가 힘든 것으로 확인되었다. 따라서 원형질체로부터 형성된 단일 세포를 얻어 내어, 그 중에서

성장 능력과 단백다당체의 생산성이 높은 균주를 지속적으로 선발하였다. *Inonotus obliquus* 균사체의 경우 세포벽의 단백다당체의 함량이 세포 무게당 거의 일정한 양을 함유하고 있는 것으로 관찰되었으므로, 세포벽 단백다당체(intrapolysaccharides)(IPS)의 생산성을 증가시키기 위해서는 액상 생산배양 시 균사체의 생산량 증가가 가장 중요한 요인으로 확인되었다. 또한 세포의 단백다당체(extrapolysaccharides)(EPS)의 생산 시에도 고농도 균사체 배양이 우선되어야 하므로 원형질체 형성을 통한 고생산성 균주 개발 시 균사의 성장속도가 빠른 변이주를 우선 선별한 후, 이로부터 EPS의 생산능이 우수한 균주를 선별하는 전략을 채택하였다. 최종 액상 생산배양에서 IPS 고생산성의 균주를 개발하기 위해, 이미 선별된 고생산성 균주들의 균사체를 UV 처리한 후, 생존한 원형질체로부터 고생산성 변이주들을 지속적으로 선별한 결과, 18~22 g DCW/L 범위의 균체생산성을 보이는 우량균주들을 다수 선별할 수 있었다. 특별히 본 연구를 통해 이미 선별된 고생산성 균주일지라도, 이 균주로부터 다시 우량균주를 선별하는 경우에는 고체배양에서 가능한 한 많은 수의 콜로니를 얻은 후에, 잘 자라지 않는 균주를 선별과정에서 미리 제외시켜야만 최종 액상배양에서의 균주 선별의 효율성을 매우 높일 수 있음을 확인하였다. 또한 고생산성 변이주들끼리의 원형질체 융합법을 개발하였으며, 특별한 표지인자를 사용하지 않고 융합 파트너 각각의 돌연변이에 의해 유전자 재조합 균주를 선별하는 방법을 확립하였는데, 일반적으로 원형질체 융합방법에서 유전자재조합빈도(recombination frequency)가 약 1×10^{-3} 인 것을 감안해 볼 때, 본 연구에서 개발한 변이원 처리를 통한 융합균주의 선별 방법은 유전자재조합체의 선별 확률을 크게 증대시킬 수 있는 효율적인 방법인 것으로 확인되었다. 또한 EPS 고생산성 균주를 선별하기 위해 균사체 돌연변이 유발, 원형질체 형성, 재생 및 변이주 선별을 위한 고체배양 등의 전 과정을 IPS 고생산성 균주개발 방법과 동일하게 진행하였다. 그 결과 5.0 g/L 이상의 EPS 생산성을 보이는 7개의 균주를 선별할 수 있었으며, 각 균주들의 3배수 실험을 통해 EPS의 생산 안정성을 조사함으로써, EPS 고생산성 일뿐만 아니라 EPS의 생산 안정성도 뛰어난 EPS-13 균주를 최종 선별할 수 있었다.

또한 세포벽다당체(IPS) 생산성 증가를 위해 통계적 방법을 적용해 생산배지 성분과 농도를 최적화하는 연구를 수행하였다. 우선 OAFT(one factor at a time) 실험을 통해 각 배지성분이 균사체 생산성에 미치는 영향을 조사하였으며, Plackett-Burman design 방법에 의해 다양한 배지조합으로 배양한 실험결과로부터 각각의 배지성분 들에 대한 main effect를 분석함으로써 균사체 생산성에 큰 영향을 미치는 주요 성분을 찾아내었다. 또한 선별된 배지성분 들의 상호 영향까지 조사하기 위해 full factorial 또는 fractional factorial design(FFD) 실험을 수행하였고, 이 FFD 실험결과에 근거해서 추정된 steepest ascent method(SAM)의 설계값을 이용해서 각 배지성분의 최적 농도를 거의 결정한 후, 이 SAM의 실험결과를 바탕으로 배지성분의 최적 농도를 정밀하게 조사하는 통계적 방법인 RSM(response surface method) 실험을 수행하였다. 그 결과 기존의 생산배지 대비 균사체 생산성이 약 30% 더 증가했을 뿐만 아니라 생산 안정성도 뛰어난 배지조성을 결정할 수 있었다. 또한 RSM에 의해 수행된 최적 생산배지 조성에서의 생산균주의 배양형태(morphology)는 고농도 배양에 최적으로 알려진 compact한 pellet 형태(pellet 직경: 0.5~1.0 mm)의 morphology를 띄었는데, 이로부터 최적화된 배지조성 뿐만 아니라, 최적의 배지성분이 제공해주는 훌륭한 배양형태적 특성에 의해 균체생산성이 증가되었다고 결론지을 수 있었다. 다른 한편으로 특별히 oil 성분이 첨가된 생산배지를 개발하고자 하였던

데, 그 이유는 오일의 경우 소모된 오일의 단위 질량당 생산된 균사체의 균체량($Y_{x/s}$)(생산수율)이 다른 탄소원보다 더 높을 뿐만 아니라, 오일이 첨가된 발효조 배양에서 오일이 antiform의 역할을 하기 때문에 배양과정 scale-up이 매우 용이하기 때문이다. 오일의 첨가 유무를 결정하기 위해 먼저 생산균주가 오일을 이용할 수 있는지의 여부를 조사한 결과, 본 생산균주는 오일 분해 효소인 lipase의 분비 능력이 비교적 우수한 것으로 판명되었다. 따라서 이미 최적화된 생산배지에 오일을 첨가한 경우에 생산배지 조성의 변화 경향을 조사하였다. OAFT, FFD, SAM 방법 등의 통계적 방법을 적용하여 다양한 오일 성분들이 균체 생산성에 미치는 영향을 조사한 결과, oleic acid를 첨가한 최적 생산배지에서 최대 26.7g/L(SAM 실험의 19번 배지 조성)에 이르는 높은 균사체 생산성을 얻을 수 있었을 뿐만 아니라, scale-up된 발효조에서의 생산 재현성도 매우 훌륭한 것으로 확인되었다.

한편 균사형성 담자균류인 *Inonotus obliquus* 균사체의 대형 발효조에서의 액상배양 시 배양액에서의 용존산소 결핍현상이 항상 발생하곤 하는데, 본 연구에서는 용존산소가 결핍된 배양환경에서도 고생산성 능력을 갖는 유전자재조합 *Inonotus obliquus* 변이주를 개발하고자 하였다. 즉, 효과적인 세포내로의 용존산소 전달을 위하여 이미 제조된 pBARGPEVHB vector로부터 산소전달단백질로 널리 알려진 VHB(*Vitreoscilla hemoglobin*)의 유전자를 클로닝하여, 이를 constitutive promoter인 *Trametes versicolor*의 *gpd* promoter에, 또한 inducible promoter인 *Coprinus congregatus*의 pH-controlled promoter 뒤에 각각 연결시킴으로써 효율적인 vhb 발현 벡터를 제조하였다. 또한 *Coprinus congregatus*의 pH-controlled promoter의 활성을 조사하기 위한 pH-gfp fusion vector를 구축하는데 성공하였다. 이외에도 *A. niger*의 *hmb1* 유전자를 클로닝하여 이 유전자를 상기의 vhb 발현벡터 제작 시 수행했던 대로 *gpd* promoter와 pH-controlled promoter하에서 각각 발현되는 새로운 벡터를 제조 중에 있다. 이러한 발현벡터가 단백질다당체 고생산성 균주인 *Inonotus obliquus*에 효과적으로 도입될 경우, 용존산소가 부족한 배양환경 하에서도 매우 효율적인 세포내로의 산소전달이 가능할 것으로 예상되며, 따라서 최종 전자수용체로서 작용하는 산소의 용이한 공급으로 인해 ATP 생합성이 활발해져 생산균주의 성장뿐만 아니라 유용대사산물인 단백질다당체의 고생산이 가능할 것으로 판단된다.

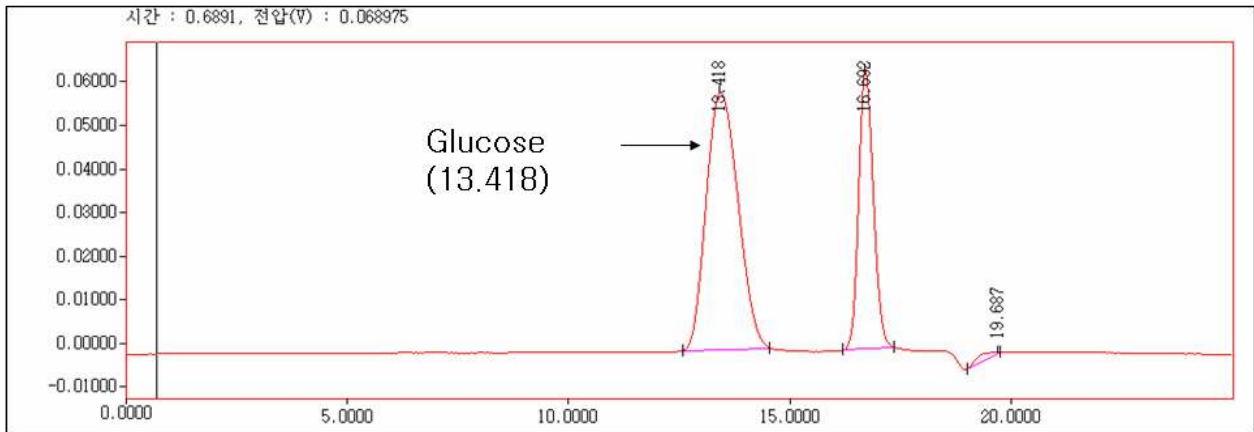


Figure 1-1. HPLC chromatogram for the standard glucose

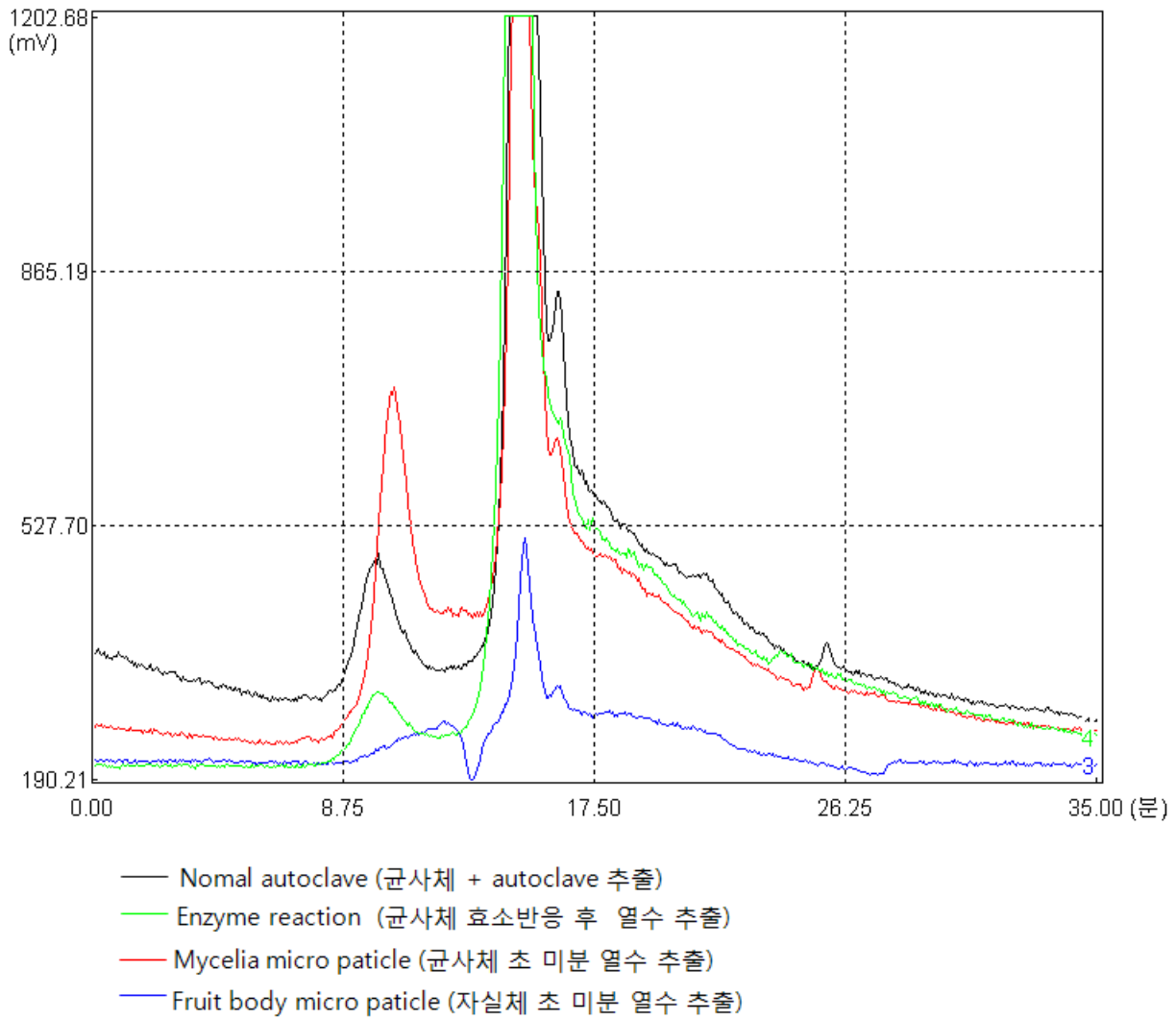
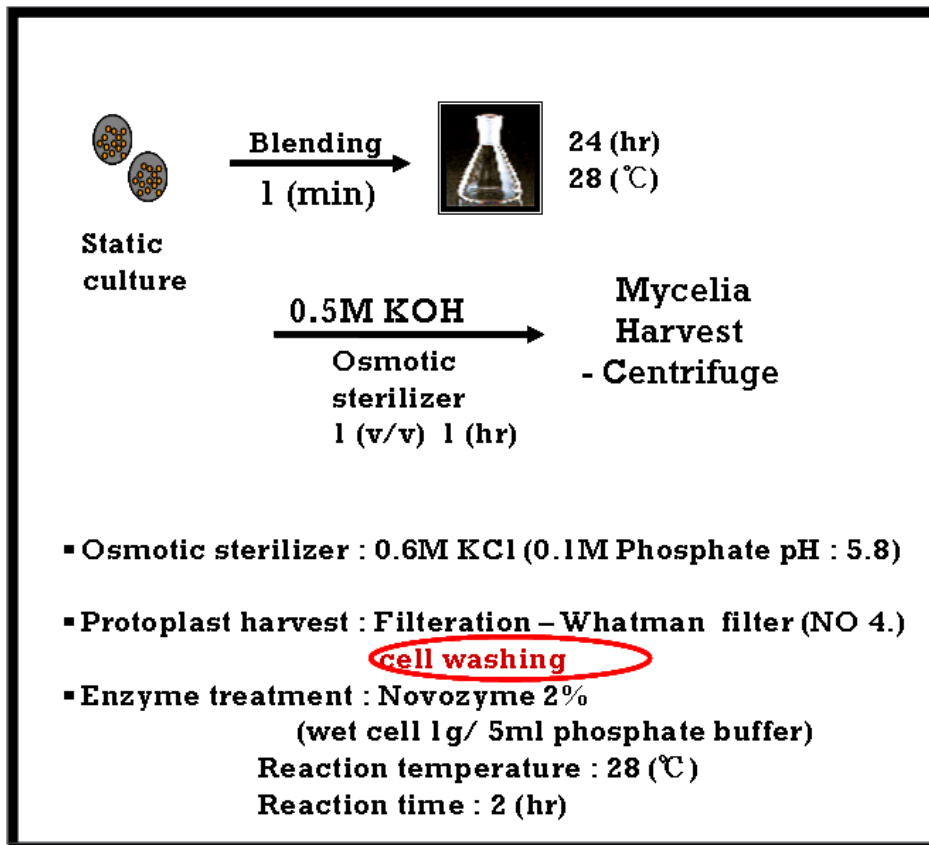


Figure 1-2. HPLC chromatogram for the analysis of proteineous polysaccharides with β -D-glucan structure, exreacted from cell walls of fruit body, and the mycelium of *Inonotus obliquus* obtained through suspended mycelial fermentations

(A)



(B)

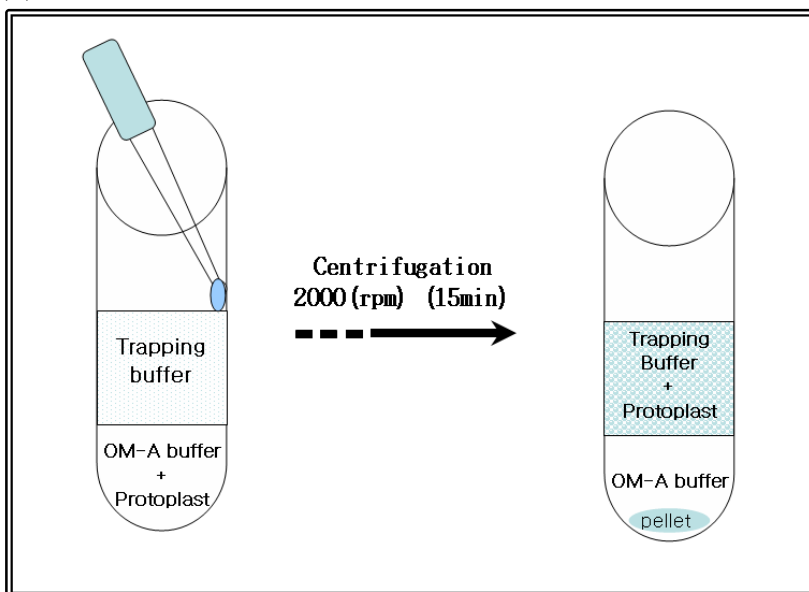


Figure 1–3. Protoplast formation and harvesting: (A) Protoplast harvesting by filtration, (B) Protoplast banding technique. About 20ml of trapping buffer is gently loaded onto the top of the protoplasting solution.

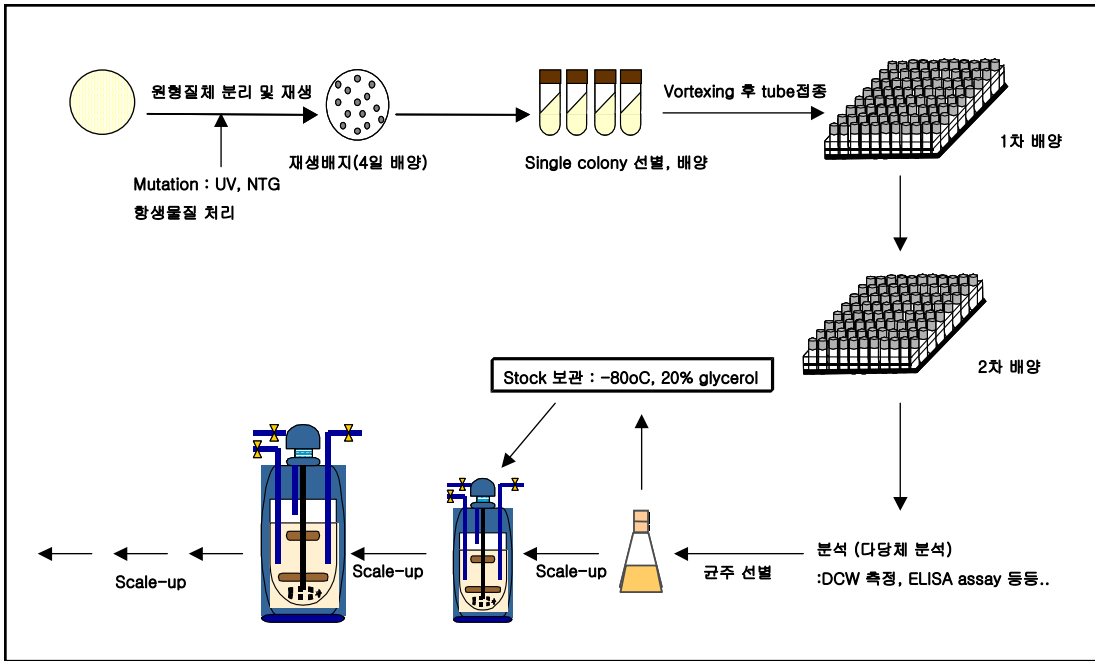


Figure 1-4. Schematic diagram for the miniaturized cell cultivation procedures for rapid large screening of high yielding variants

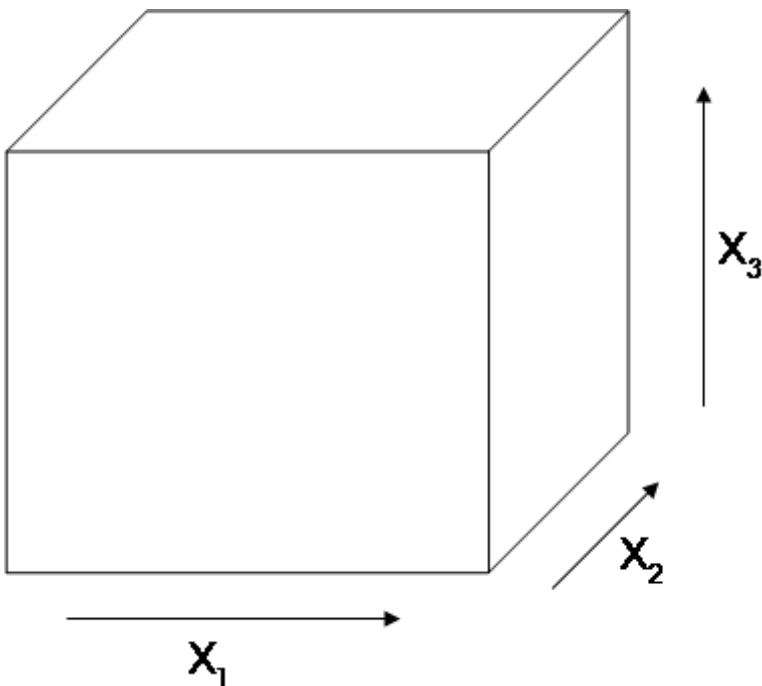


Figure 1-5. Full factorial or fractional factorial design (X_1 , X_2 and X_3 denote respective medium component)

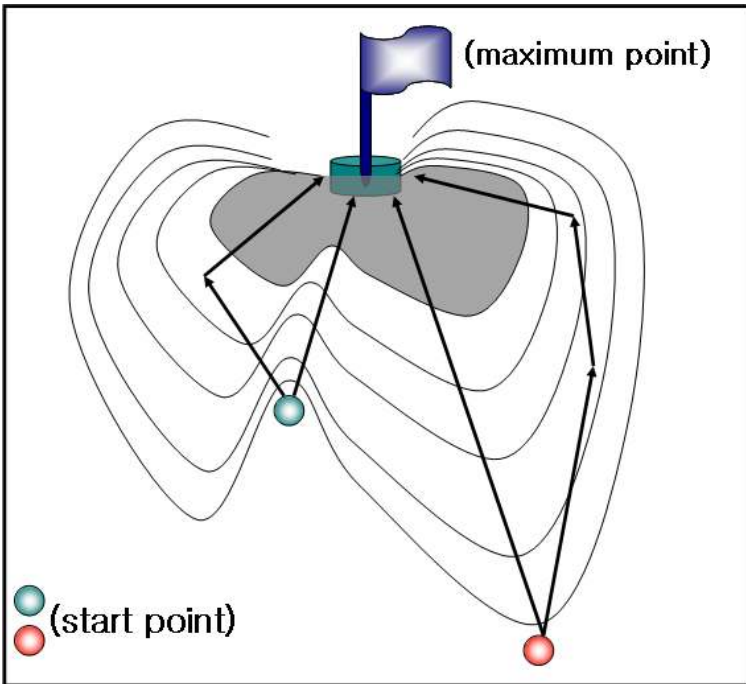


Figure 1–6. Schematic diagram of the steepest ascent method (SAM).

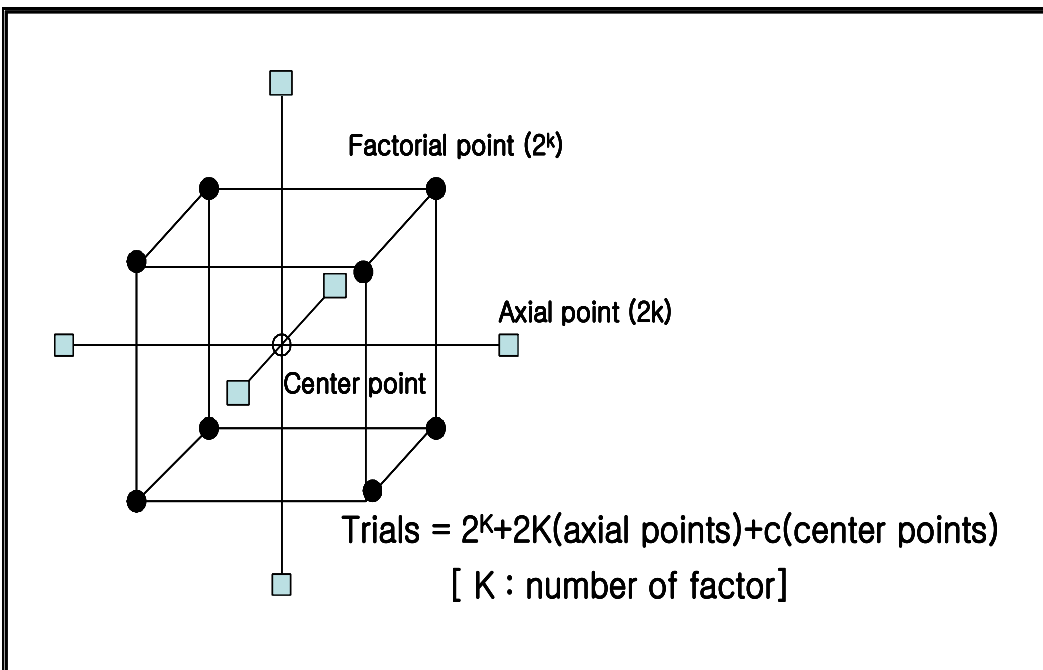


Figure 1–7. Central composite design (CCD) for statistical medium optimization through response surface method (RSM)

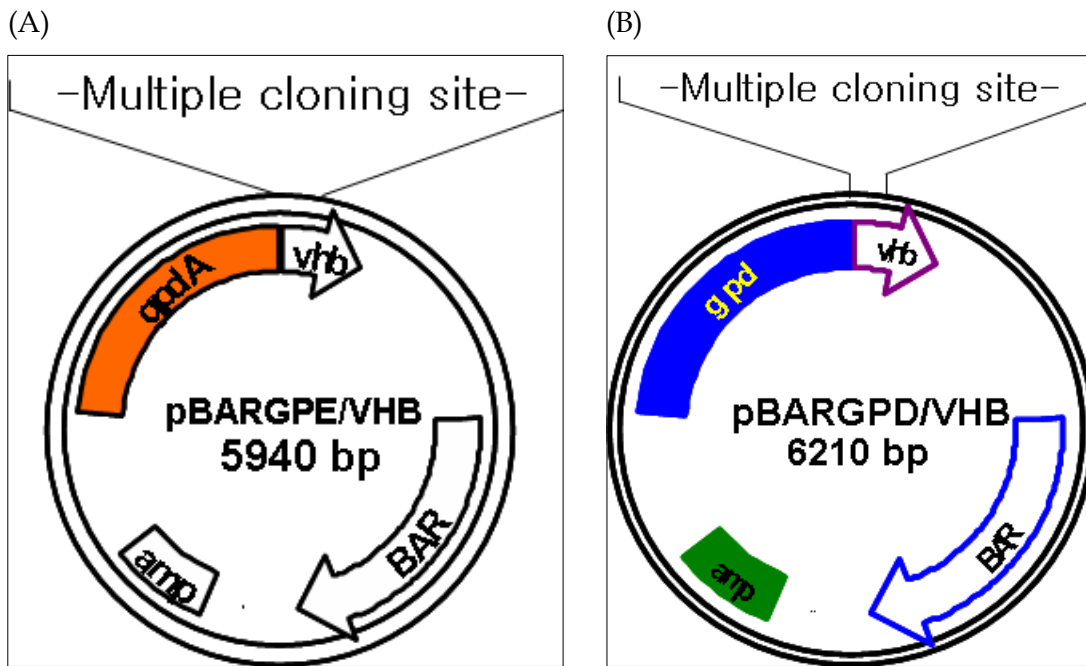


Figure 1-8. Maps of (A) pBARGPEVHB and (B) pBARGPDVHB expression vectors

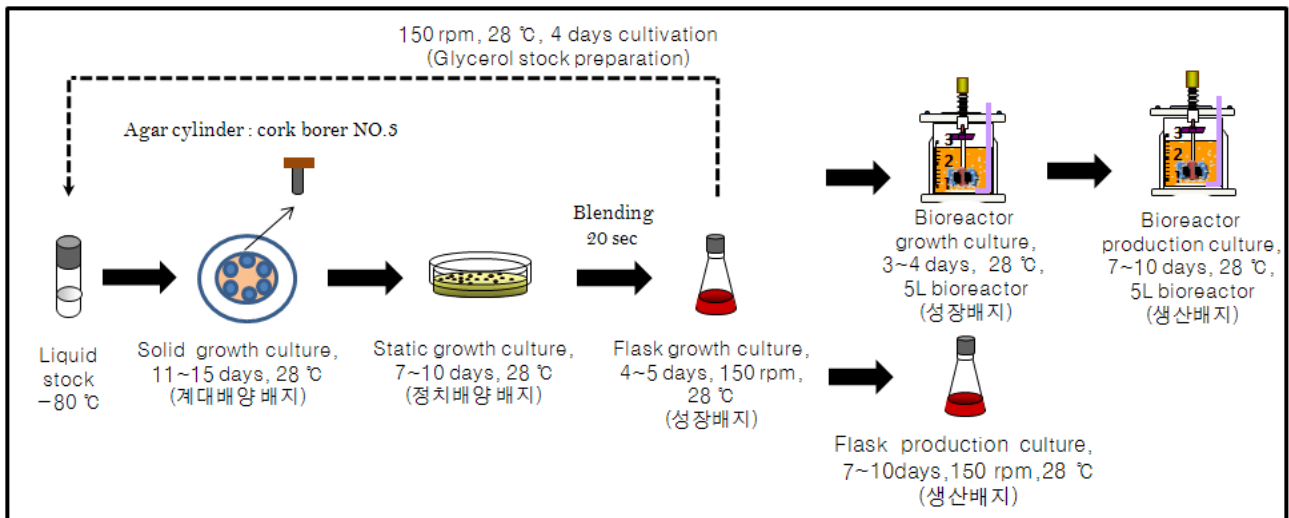


Figure 1-9. schematic diagram for the methods for the cultivation of mycelial cells (liquid stock preparation, solid growth culture, static growth culture, flask growth culture and production cultures, and bioreactor growth culture and production cultures)

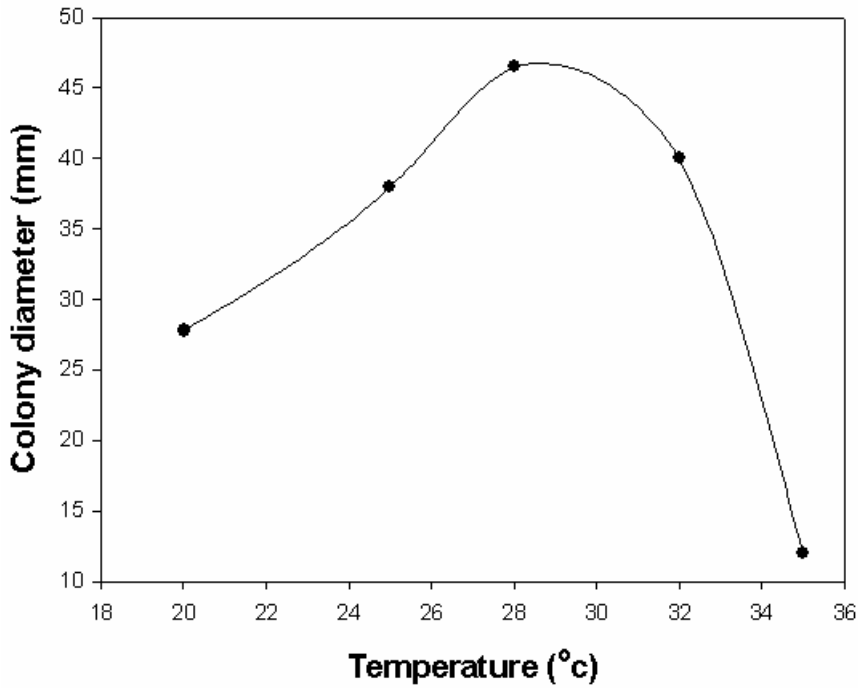


Figure 1-10. Investigation of optimum temperature for the cultivation of *Inonotus obliquus* on the solid growth medium (MA medium)

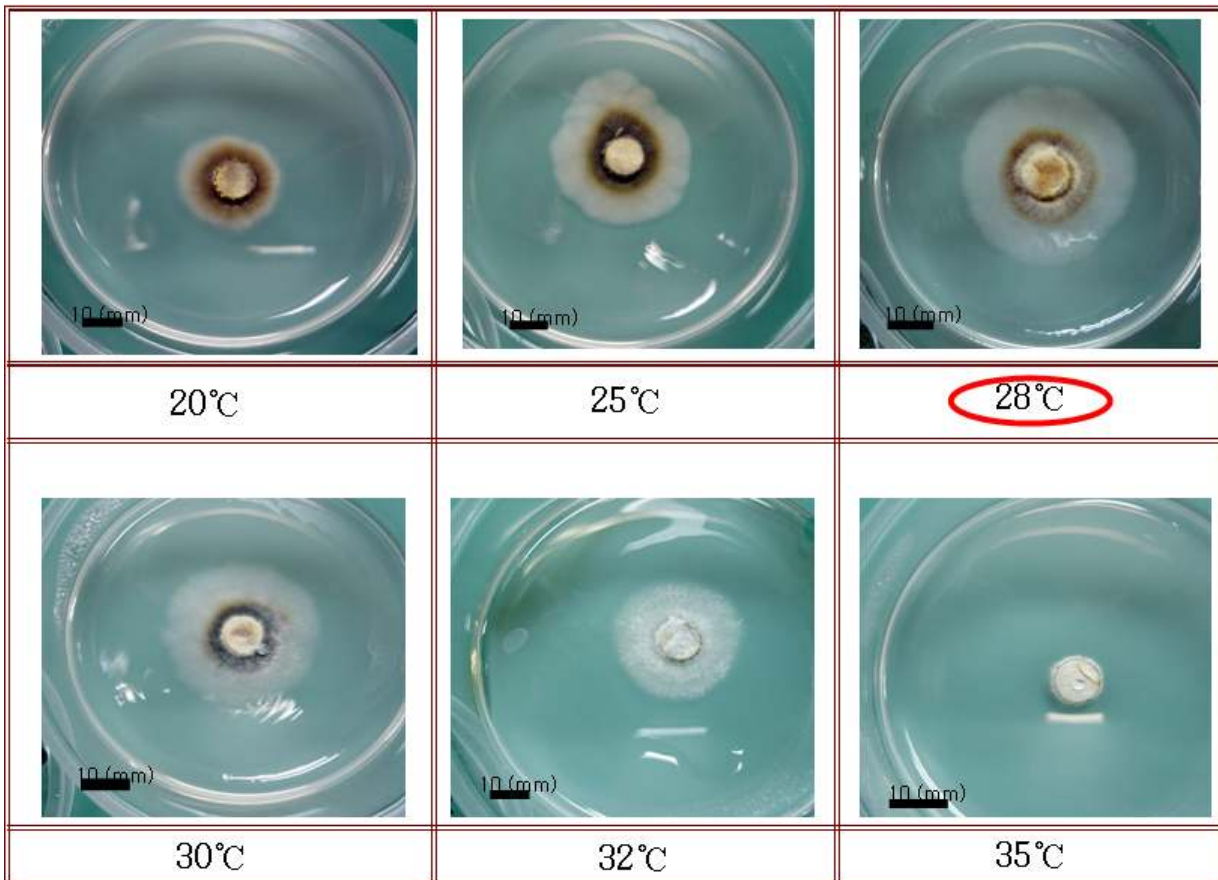


Figure 1-11. Morphology of *Inonotus obliquus* according to temperature on the solid growth medium (MA medium)

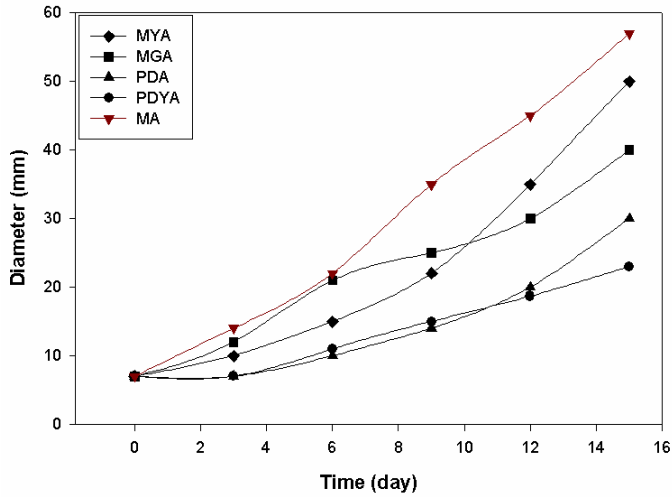


Figure 1-12. Comparison of mycelial growth on the various solid growth media, as represented in the diameter of mycelial growth zone.

(A)



(B)

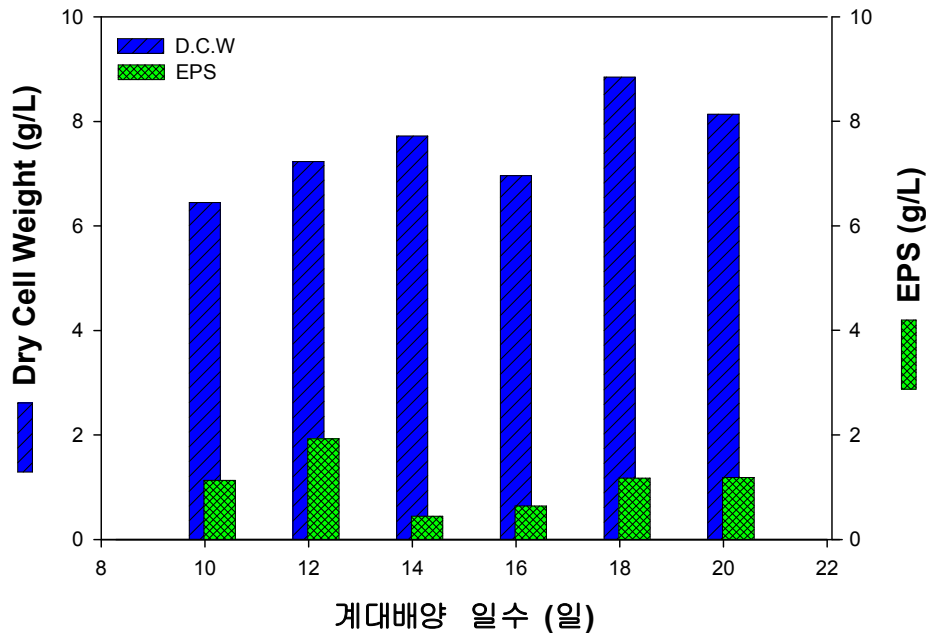


Figure 1-13. (A) Experimental scheme for determination of period of the solid growth culture, which will be inoculated into the static cultures. (B) Comparison of dry cell weight and EPS production according to period of the solid growth cultures

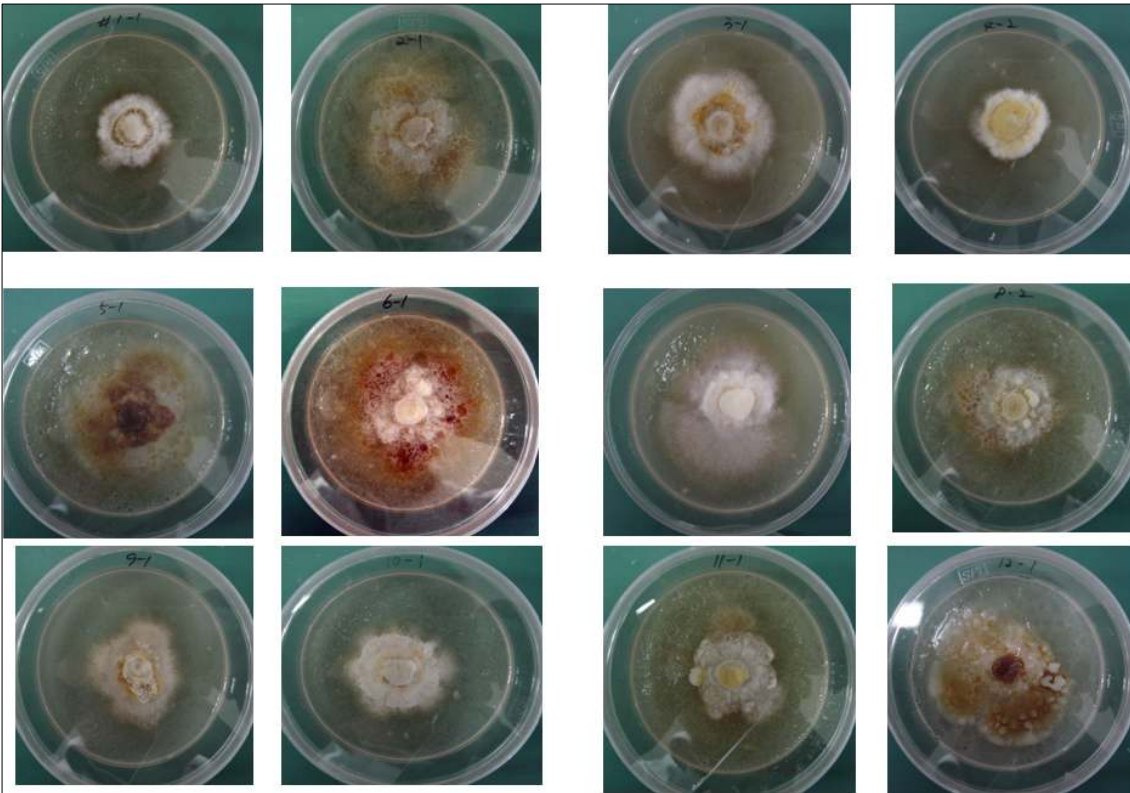


Figure 1–14. Results of the 1st Plackett–Burman design experiment (Inhibition of the mycelial growth was caused by the added corn oil.)

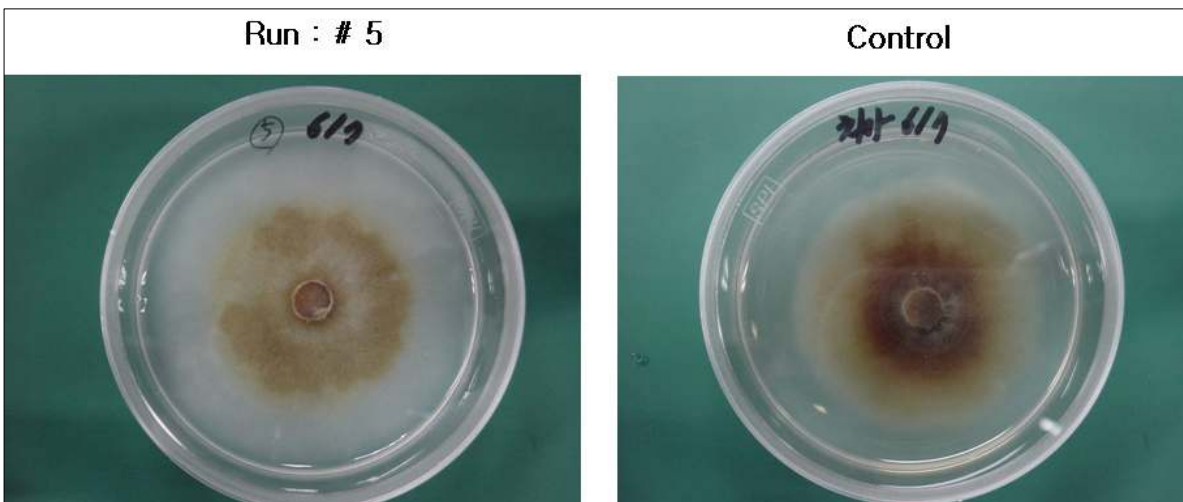


Figure 1–15. Mycelial morphology of the #5 and control cultures on each of the solid growth medium (Diameters of the each mycelium were measured for the analysis of the 3rd Plackett–Burman design experiment.)

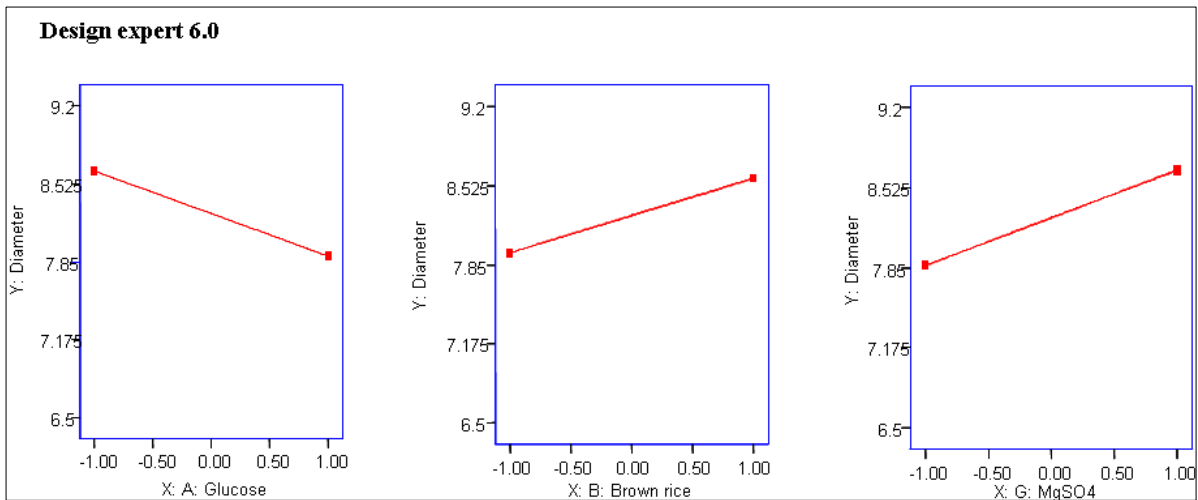


Figure 1–16. Graphic ANOVA analysis for the glucose, brown rice and magnesium sulfate (the 3rd Plackett–Burman design experiment)

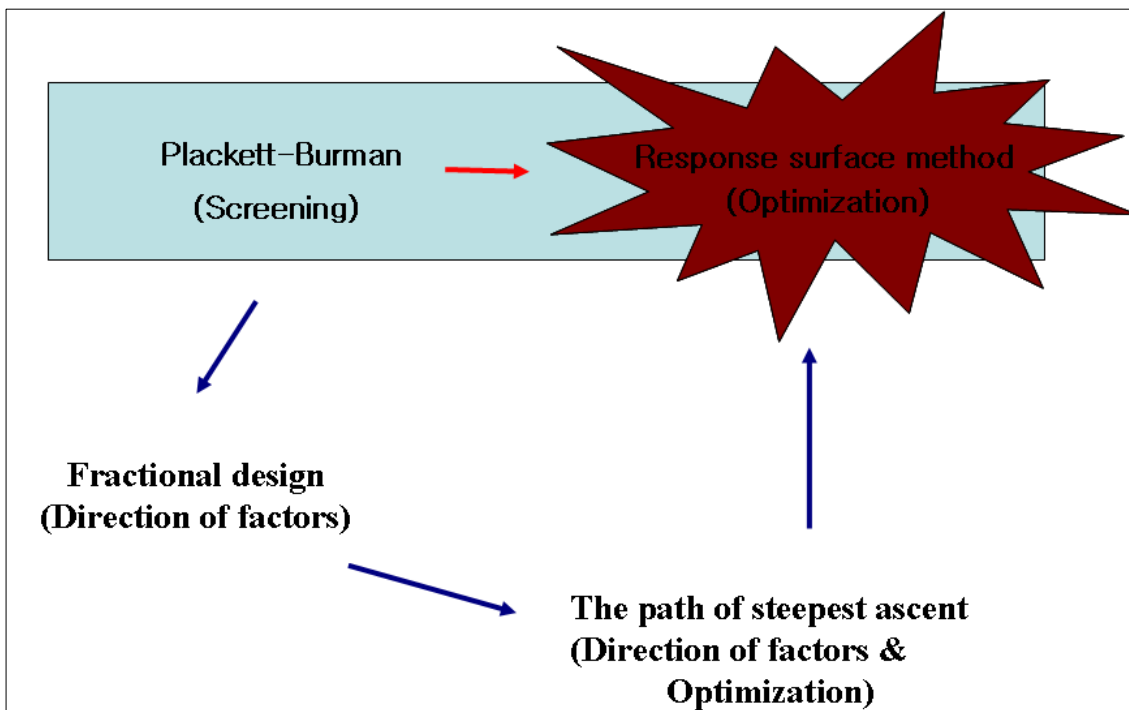
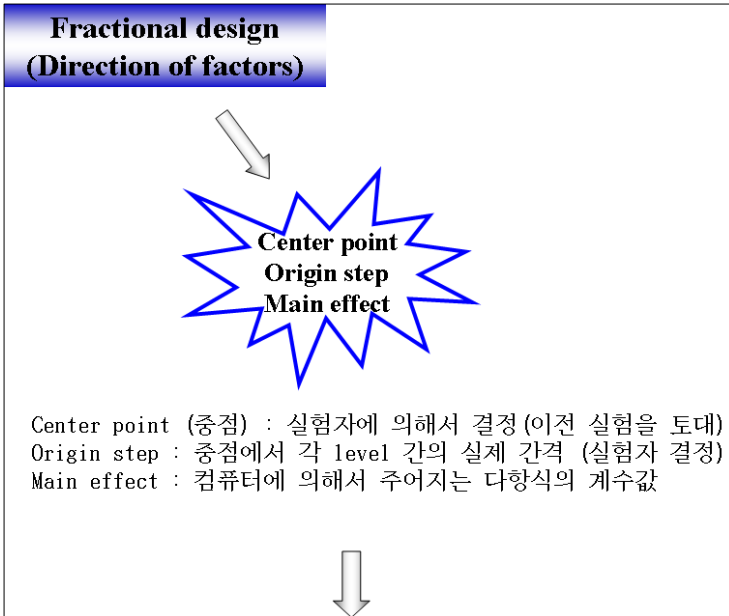


Figure 1–17. Schematic diagram for the strategy for the optimization of the solid growth medium for the cultures of mycelial cells of *Inonotus obliquus*



Microsoft Excel - sam solution

	A	B	C	D	E
1		X1	X2	X3	X4
2	center point	2	1	0.5	0.5
3	origin step	1	0.5	0.1	0.1
4	main effect	-25.15	-15.75	-59.58	33.8
5	coefficient	-12.575	-7.875	-29.79	16.9
6	Fractional factorial design 으로부터 구한 값				
7	r value	1.126942767			
8	slope value	-0.379667189	-0.237763747	-0.899426287	0.510248548
9	new step	-0.379667189	-0.118881873	-0.089942629	0.051024855

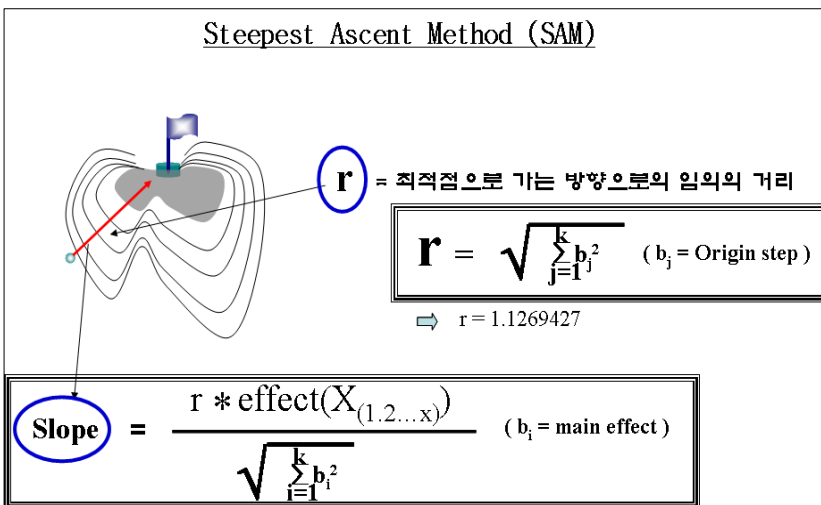


Figure 1-18. Schematic diagram for the steepest ascent method(SAM) based on the results from the fractional factorial design experiment

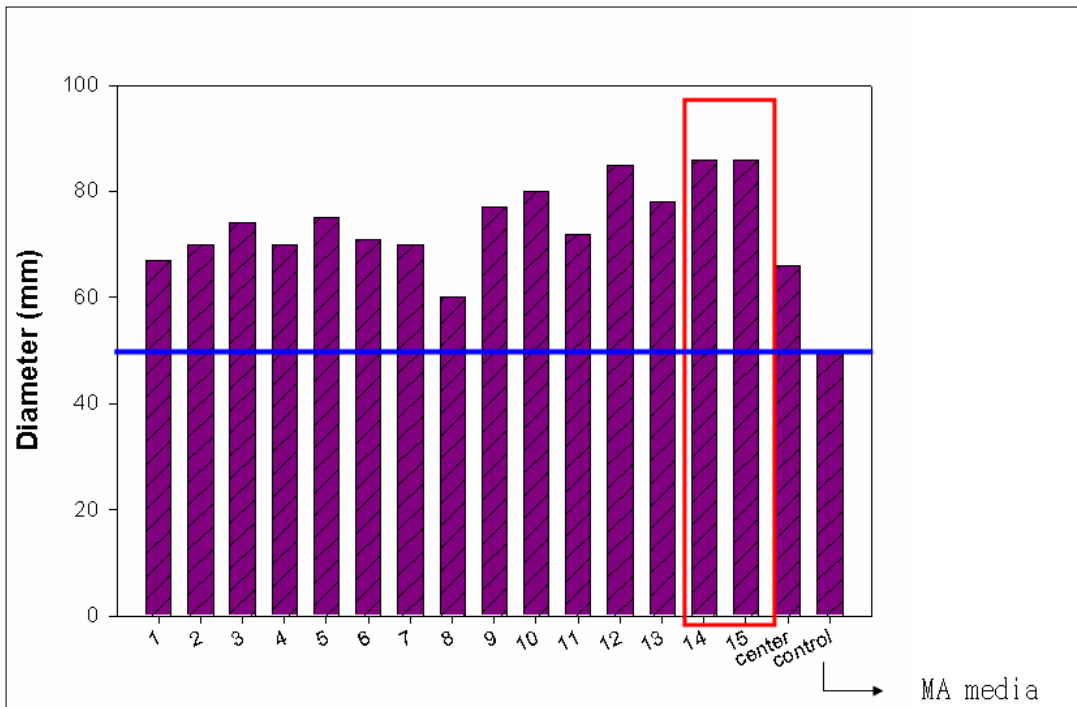


Figure 1-19. Experimental results performed according to the design of the steepest ascent method

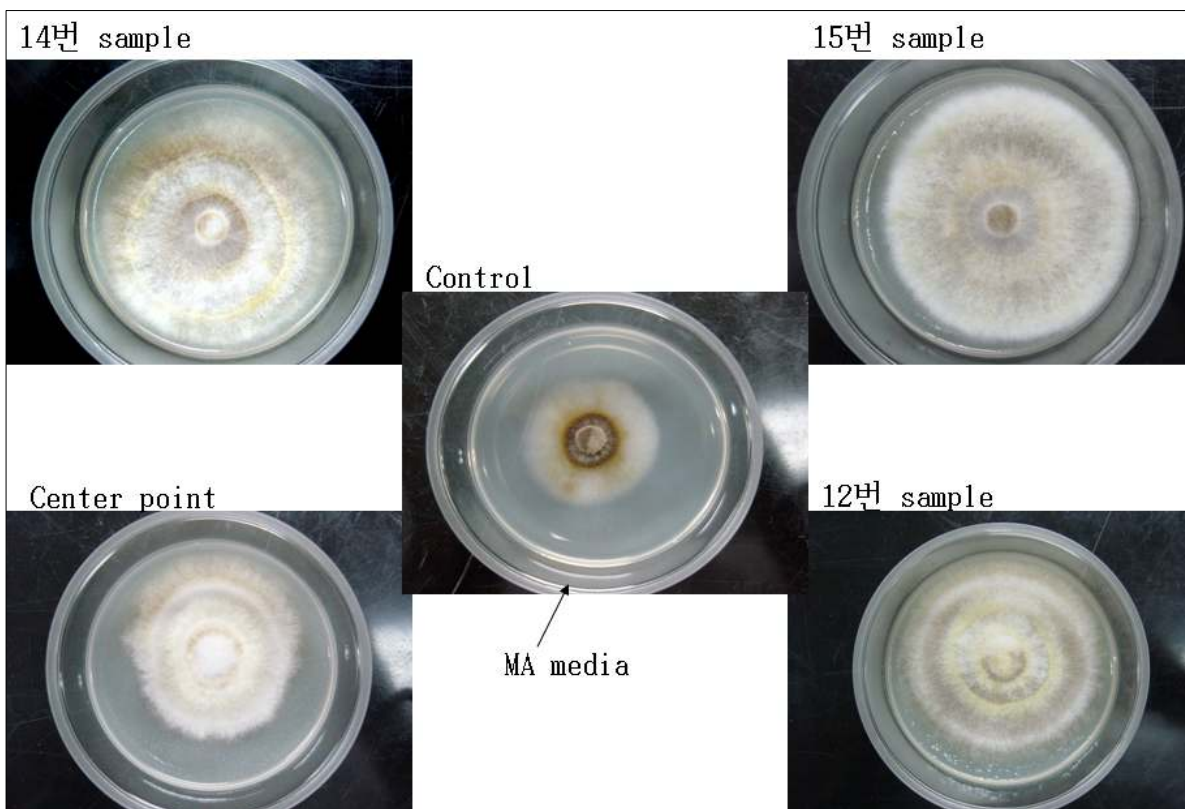


Figure 1-20. Mycelial morphology of the various cultures on the solid growth medium (Diameters of the each mycelium were measured for the analysis of the steepest ascent method experiment.)

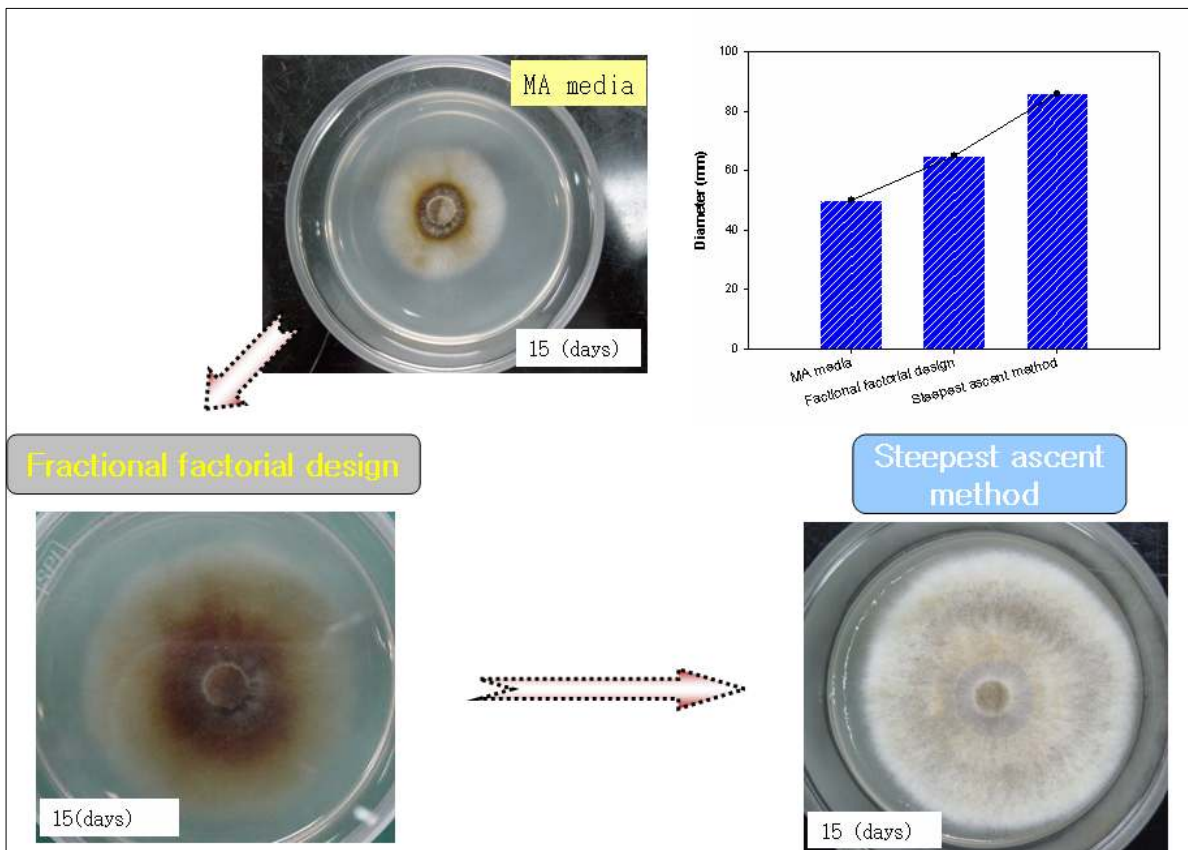


Figure 1-21. Schematic diagram for the optimization of the solid growth medium by adopting steepest ascent method and fractional factorial design (15 days cultivation on each of solid growth medium)

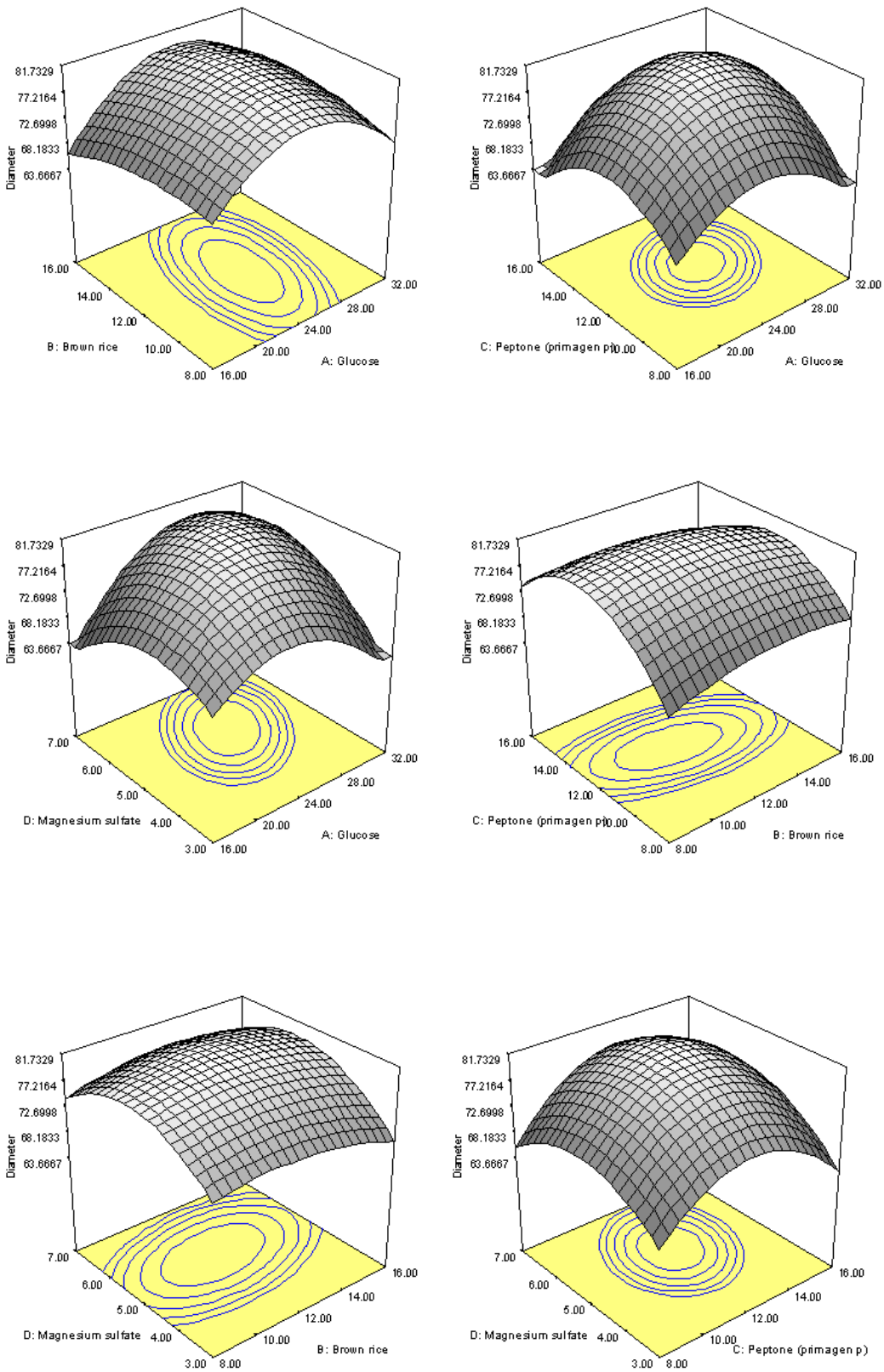


Figure 1-22. 3-D response surface curves for IPS concentration as a function of medium components

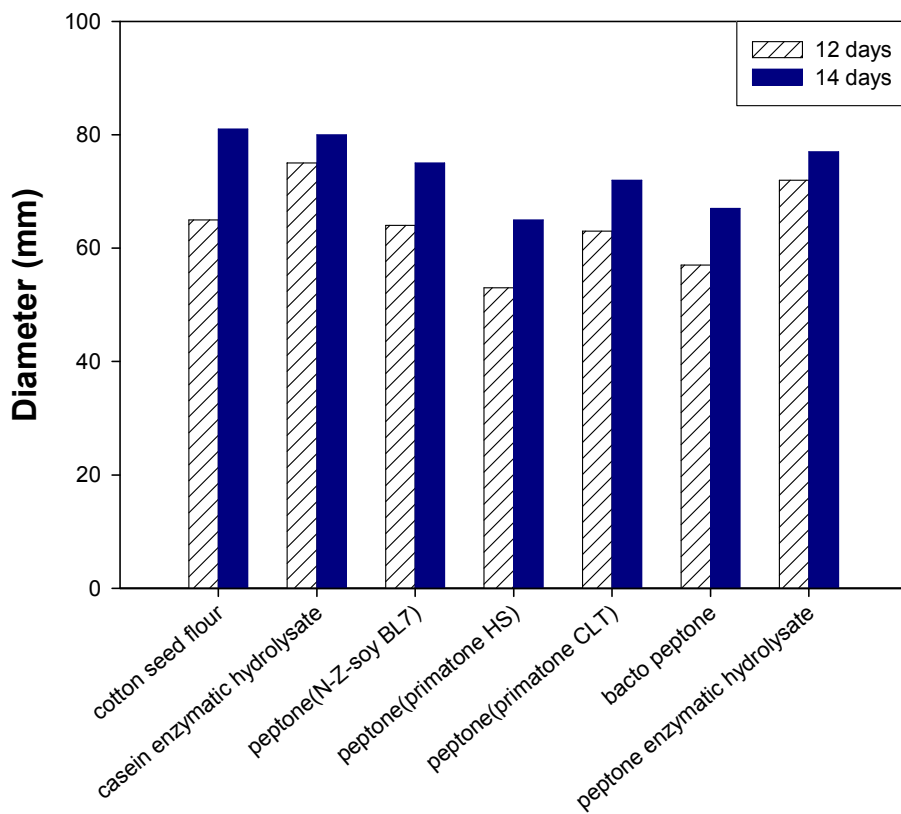


Figure 1-23. Diameter according to the various nitrogen sources

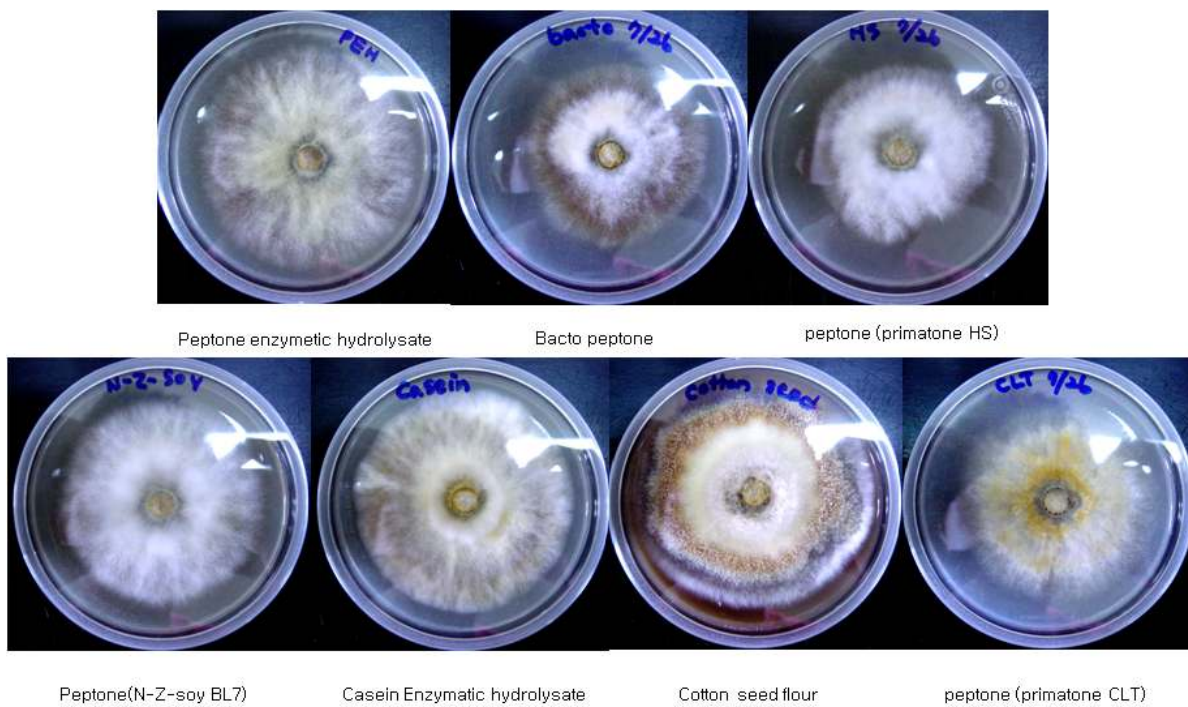


Figure 1-24. Morphology and diameter according to various nitrogen sources



Figure 1-25. Experimental scheme for the inoculum of mycelial solid pieces on the solid growth medium(SGM) into the liquid growth medium of shake flask cultures.

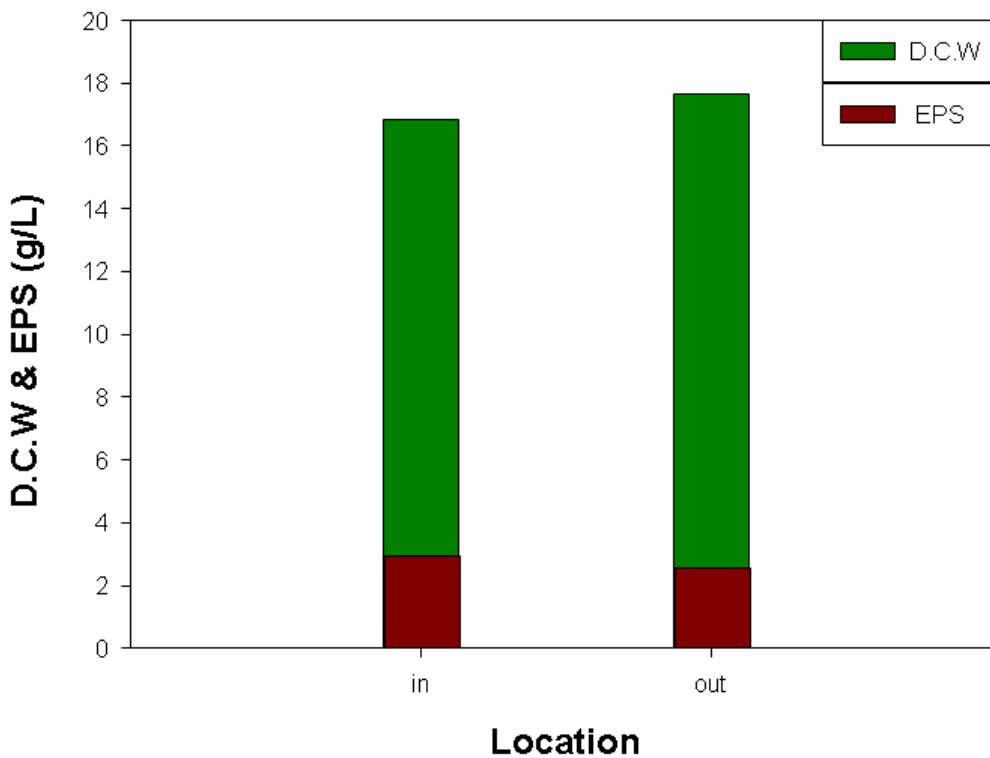


Figure 1-26. Comparison of DCW and EPS according to the location of the solid pieces inoculated into the liquid growth medium.

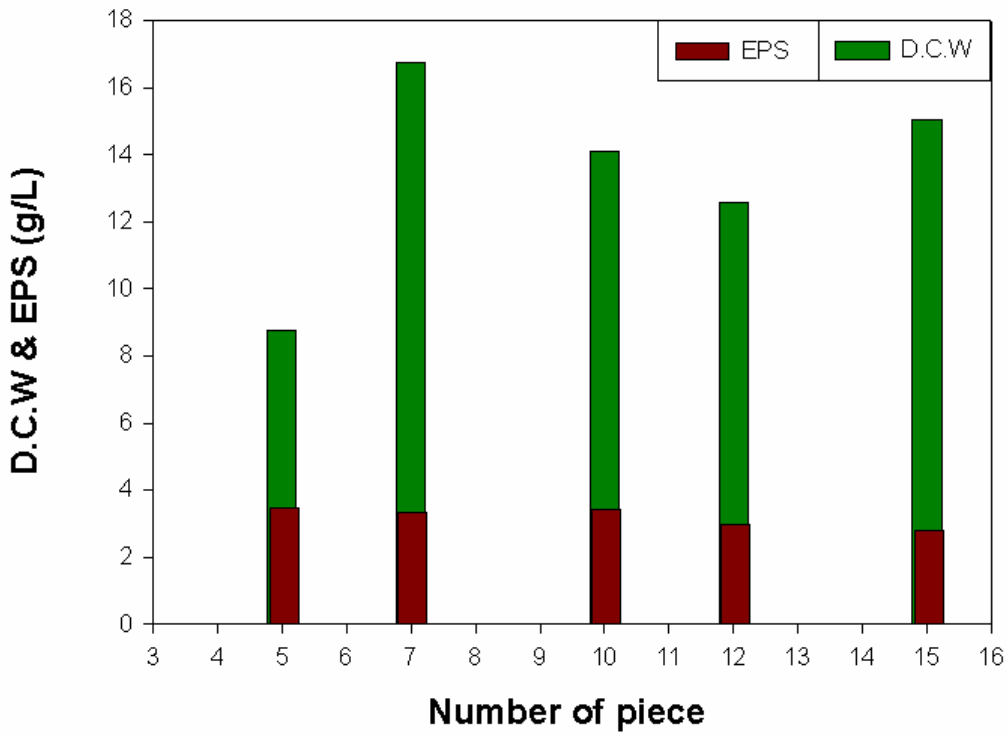


Figure 1-27. Determination of optimum numbers of solid pieces inoculated into the static growth cultures from the solid growth cultures.

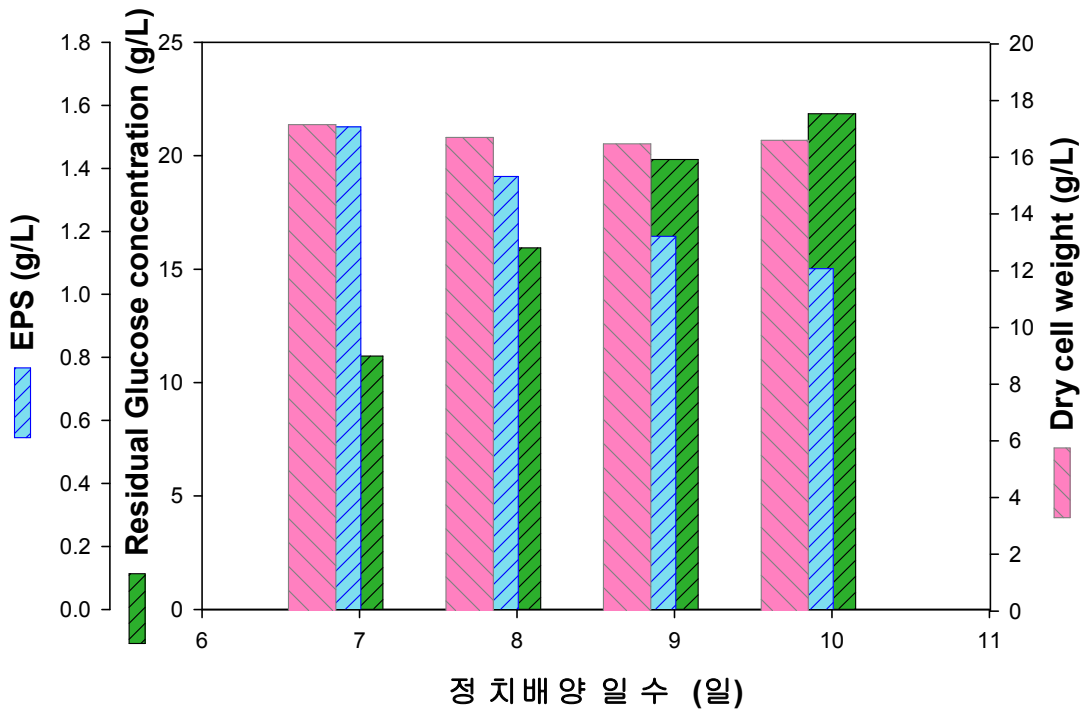


Figure 1-28. Investigation of optimum culture period in the static cultures.

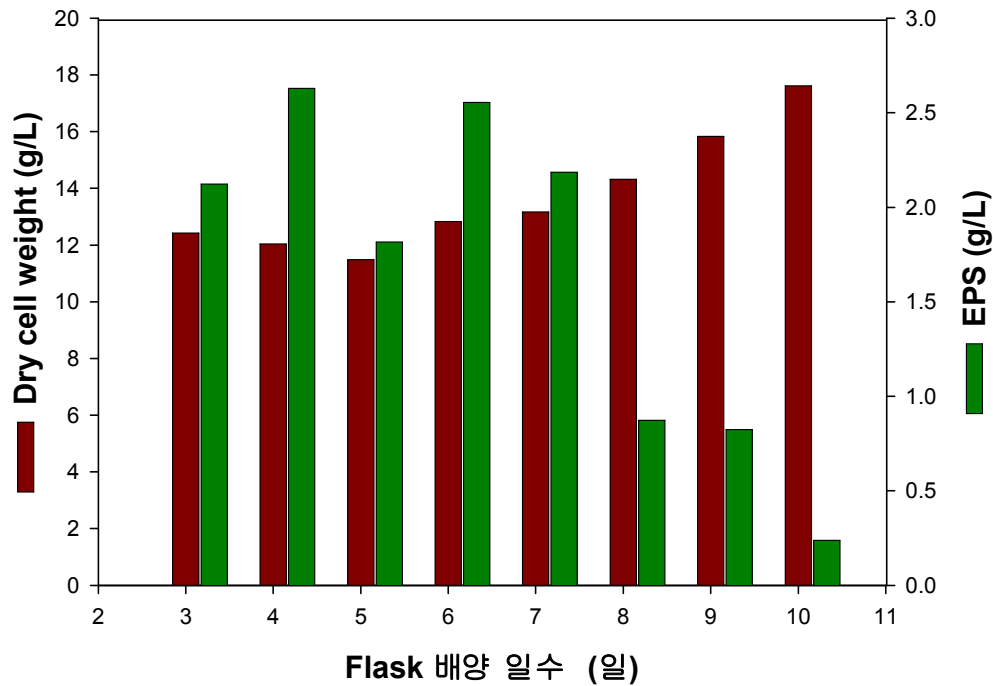


Figure 1–29. Investigation of optimum culture period in the shake flask mycelial growth cultures.

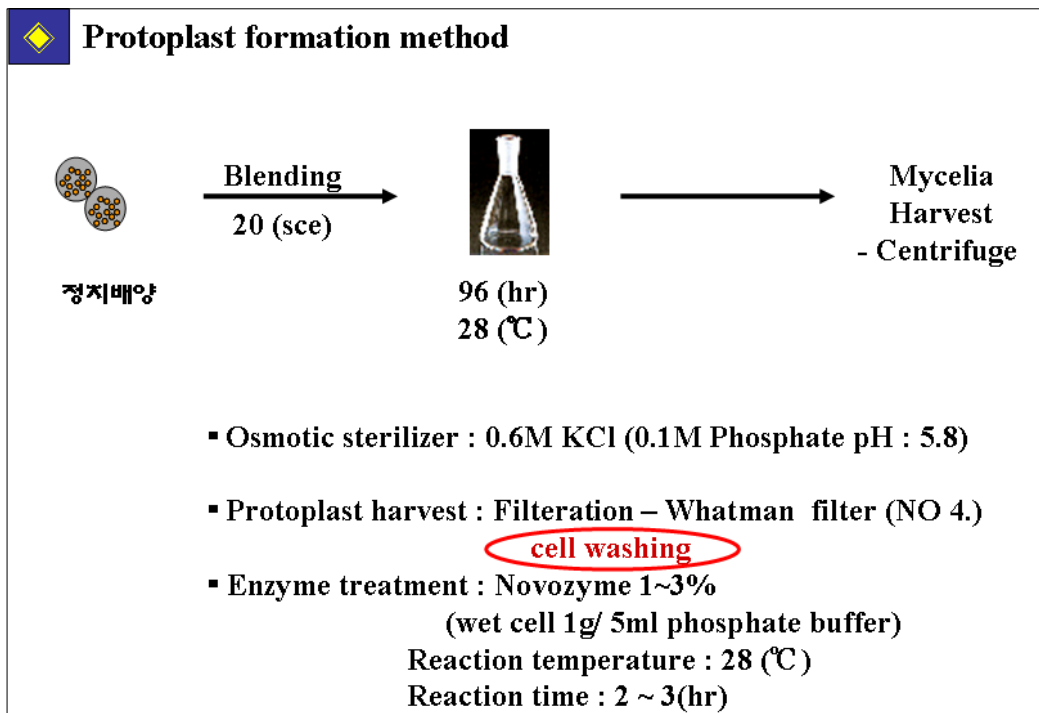
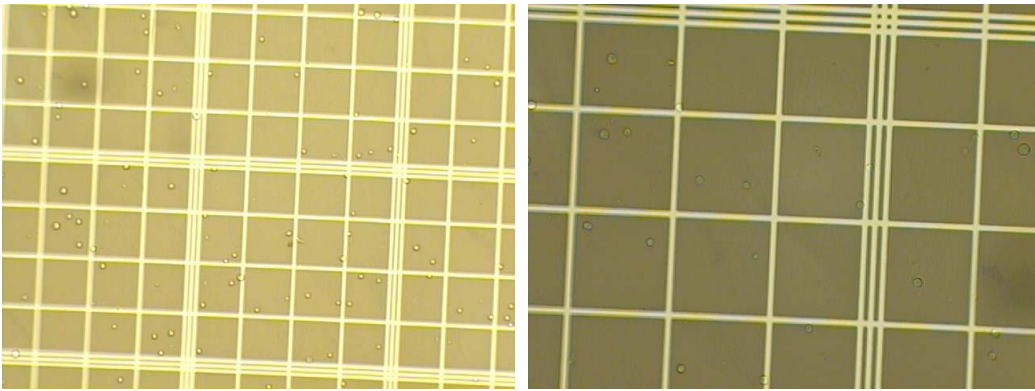


Figure 1–30. Formation and harvesting of protoplasts by filtration method



(A)

(B)

Figure 1–31. Microphotographs of the protoplasts of *Inonotus obliquus* harvested by filtration method ((A): 200×, (B): 400×)

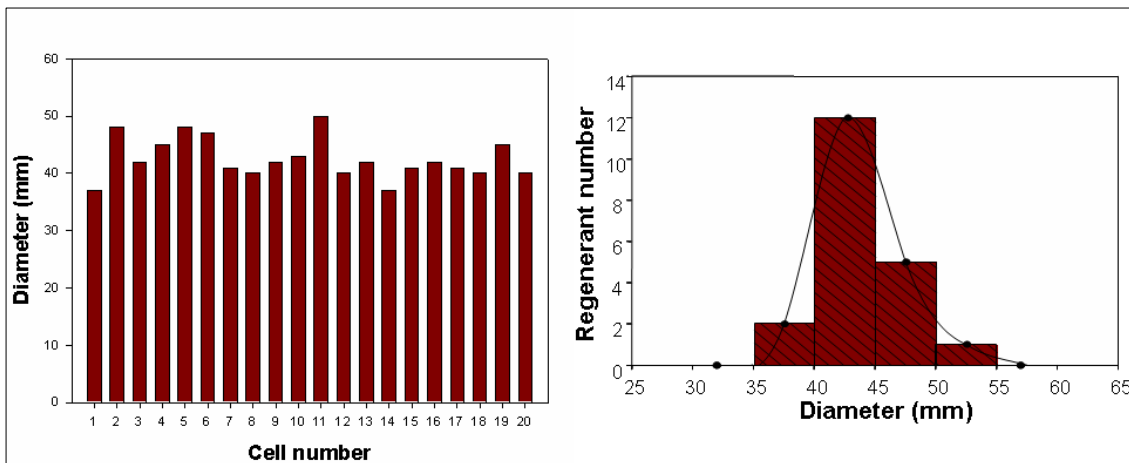


Figure 1–32. Screening of high–yielding producers regenerated from the protoplasts of *Inonotus obliquus* (1st trial)

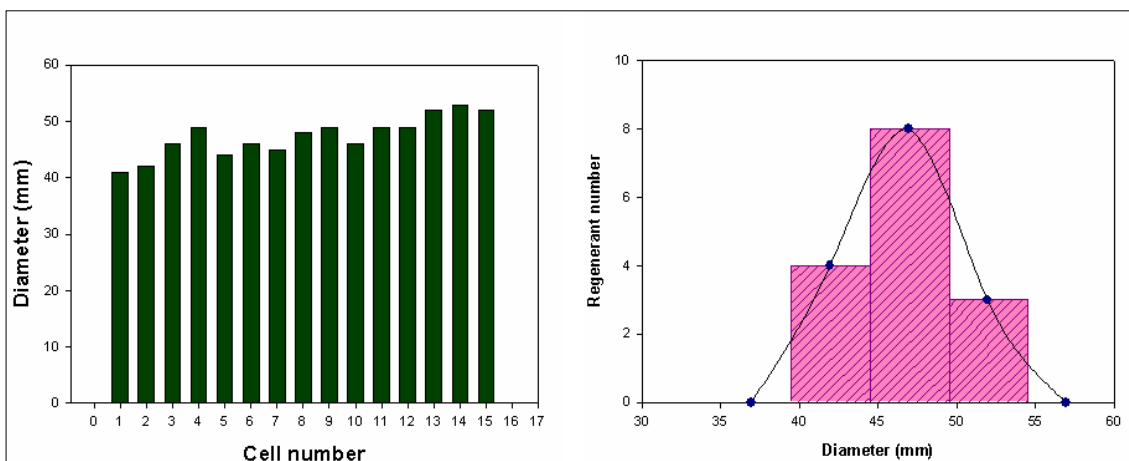


Figure 1–33. Screening of high–yielding producers regenerated from the protoplasts of *Inonotus obliquus* (2nd trial)

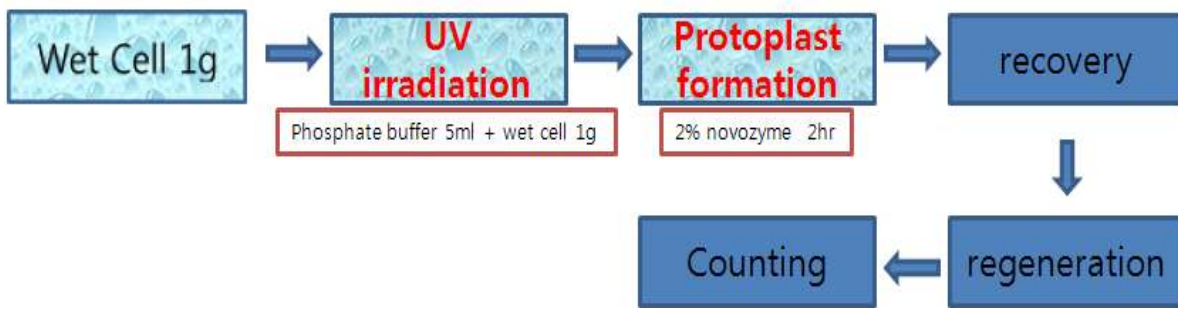


Figure 1-34. Procedures for the screening of IPS high-yielding mutants from UV mutation of filamentous mycelial cells (After UV irradiation of mycelia, many protoplasts were formed by enzymatic treatments, and then regenerated.)

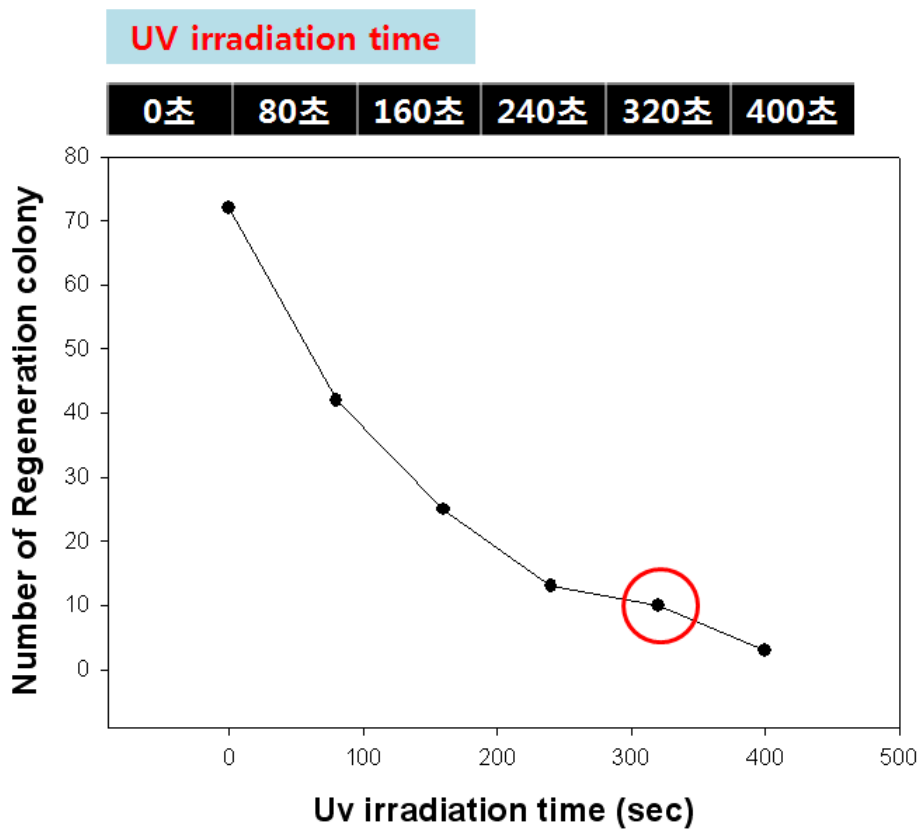


Figure 1-35. Investigation of UV irradiation time for mutation of mycelial cells

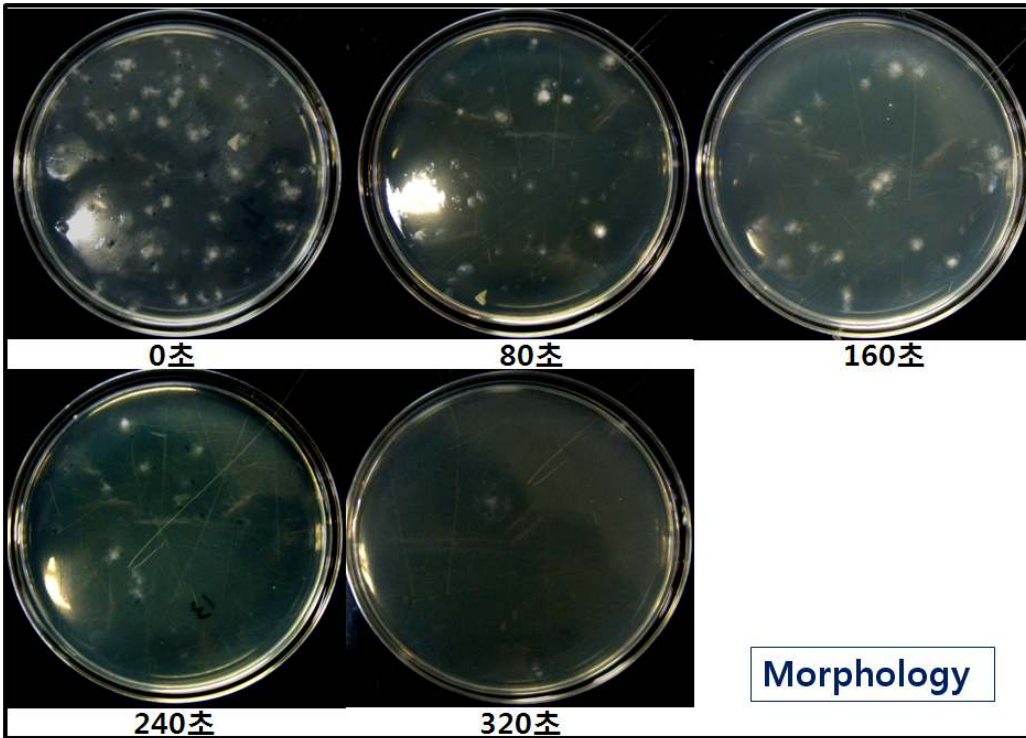


Figure 1-36. Photographs for the survived mycelial cells from the UV mutation (Respective UV irradiation time and morphology are shown in the photographs)

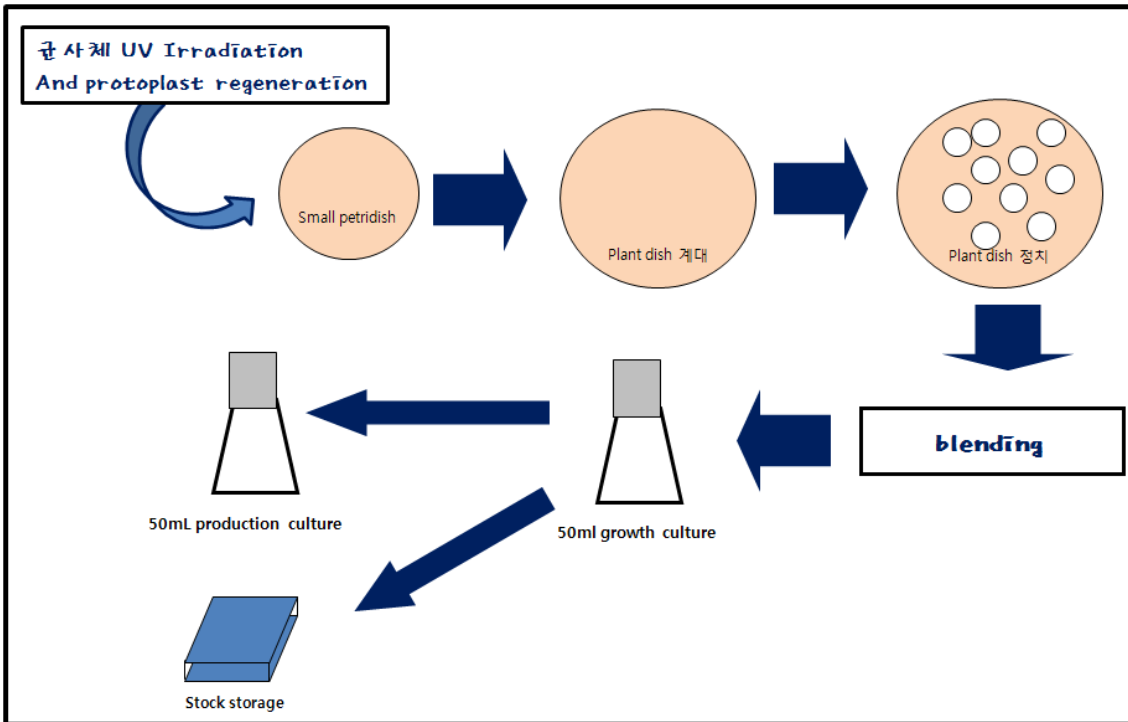


Figure 1-37. Procedure for the screening of IPS high-yielding mutants of *Inonotus obliquus* in the final submerged shake flask cultures

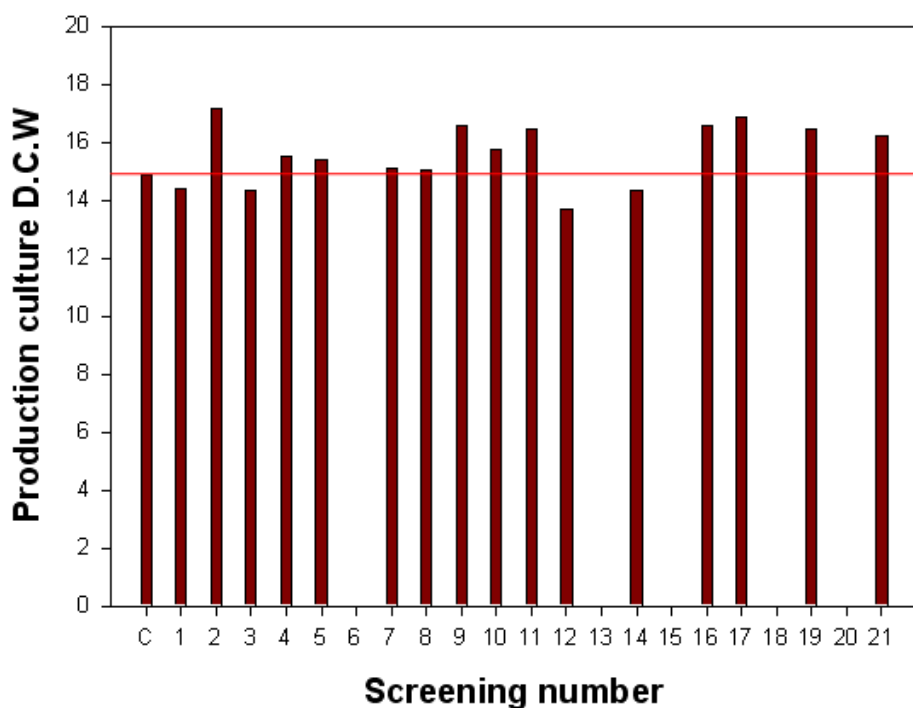


Figure 1–38. Cell growth extent of the variants screened from the high yielding strain(OBLQ432) in submerged production cultures

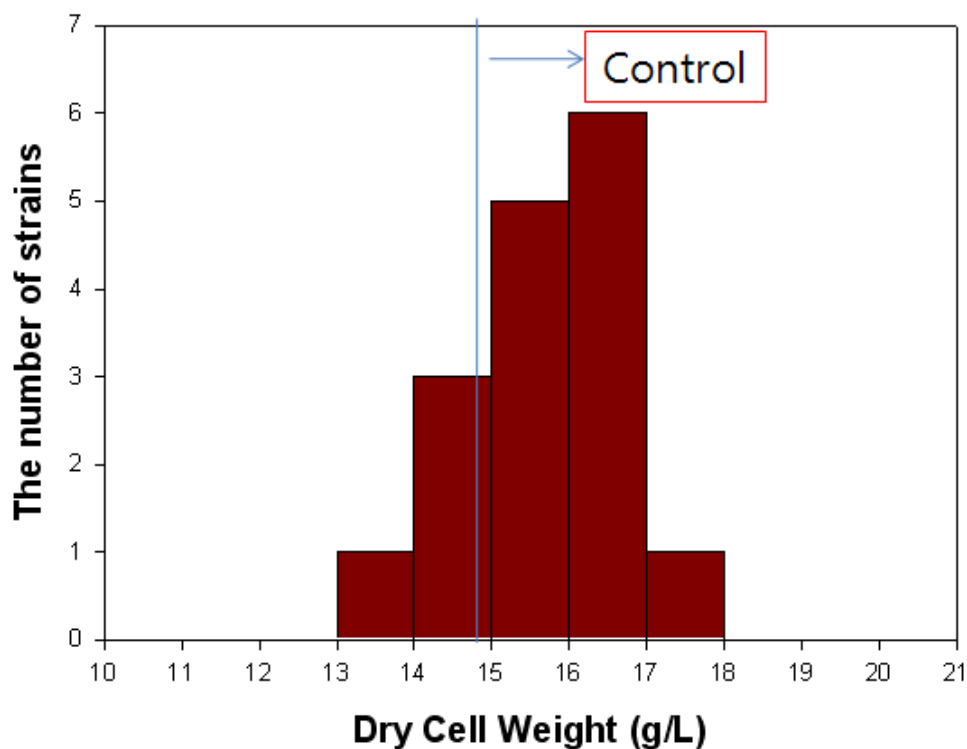


Figure 1–39. Histogram for the cell growth extent of the variants screened from the high yielding strain(OBLQ432) in submerged production cultures

high density and large diameter	Low density and large diameter	Low density and small diameter
1~14번	15~27번	27~32번

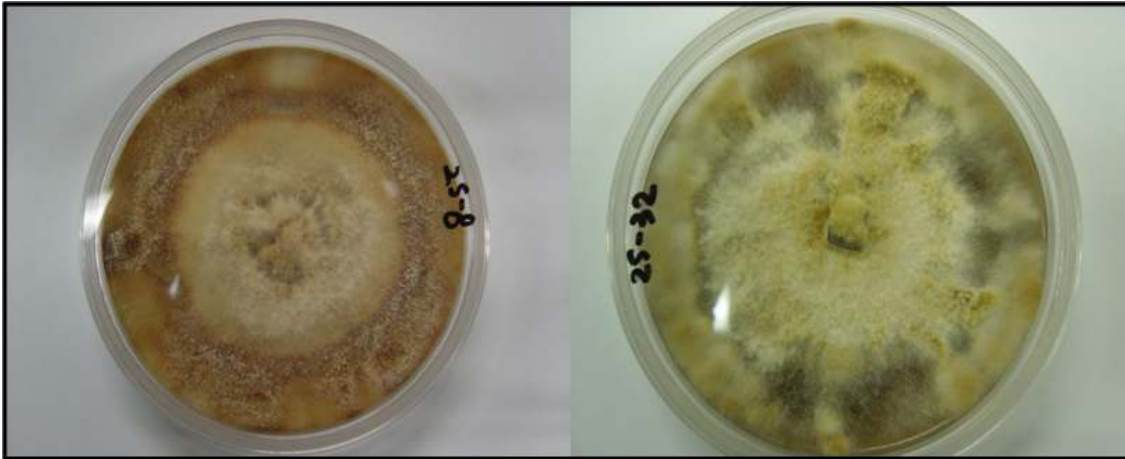


Figure 1-40. Mycelial morphology and cell density of the variants screened from the high yielding strain(OBLQ528) in the solid growth cultures

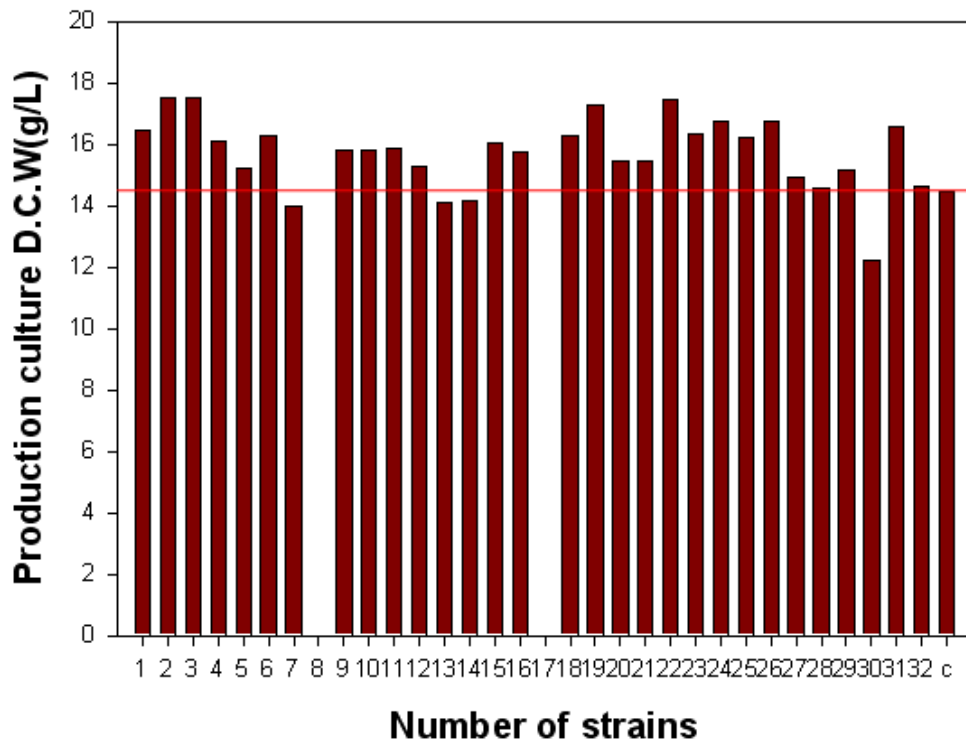


Figure 1-41. Cell growth extent of the variants screened from the high yielding strain(OBLQ528) in submerged production cultures

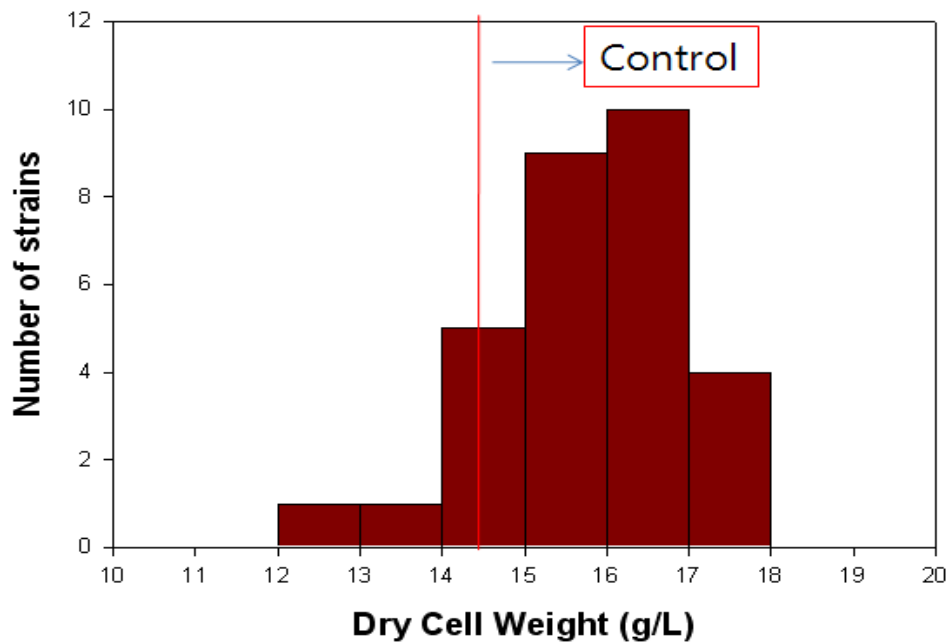


Figure 1-42. Histogram for the cell growth extent of the variants screened from the high yielding strain(OBLQ528) in submerged production cultures

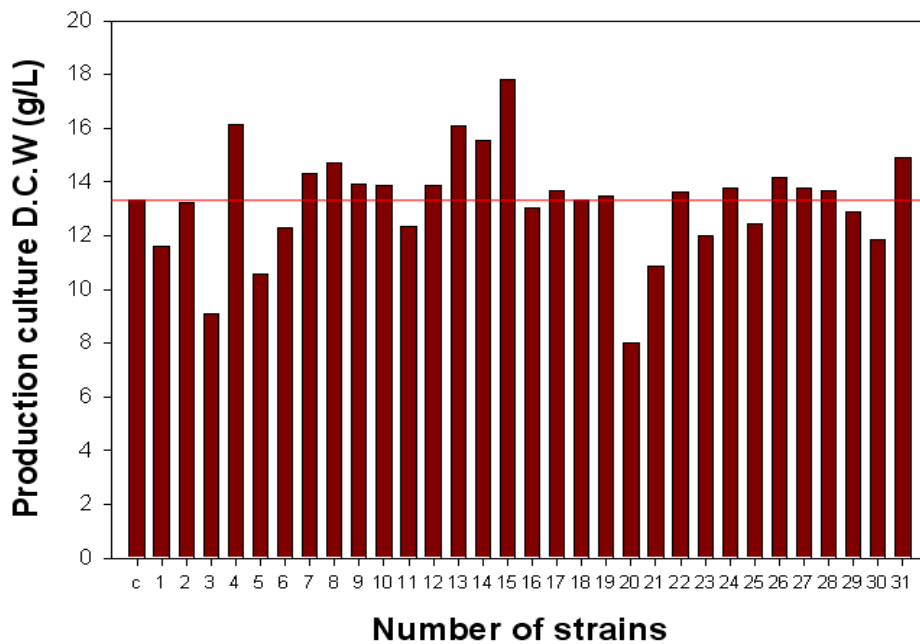


Figure 1-43. Cell growth extent of the variants screened from the high yielding strain(OBLQ756) in submerged production cultures

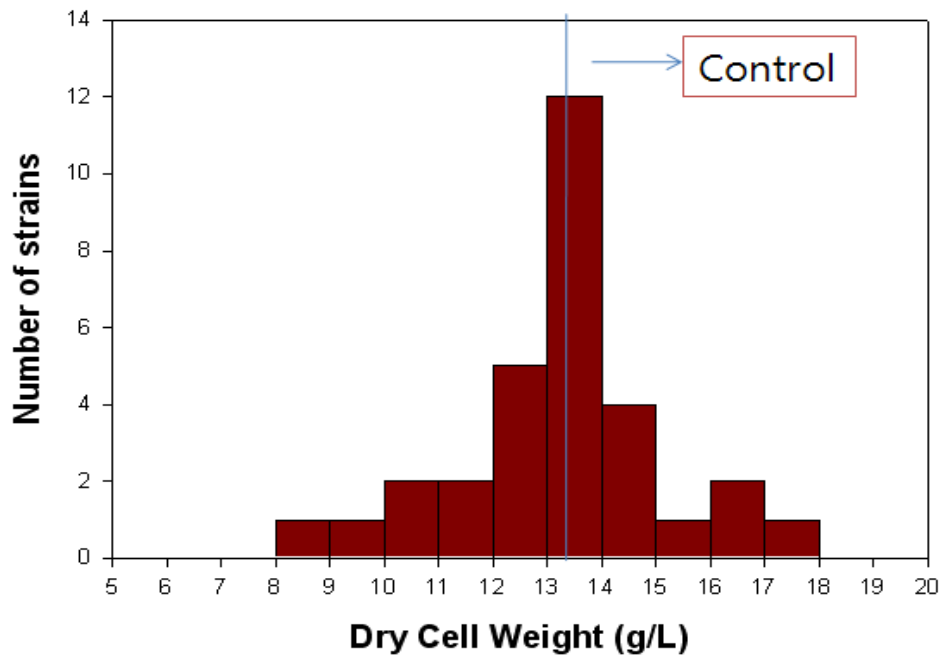


Figure 1-44. Histogram for the cell growth extent of the variants screened from the high yielding strain(OBLQ756) in submerged production cultures

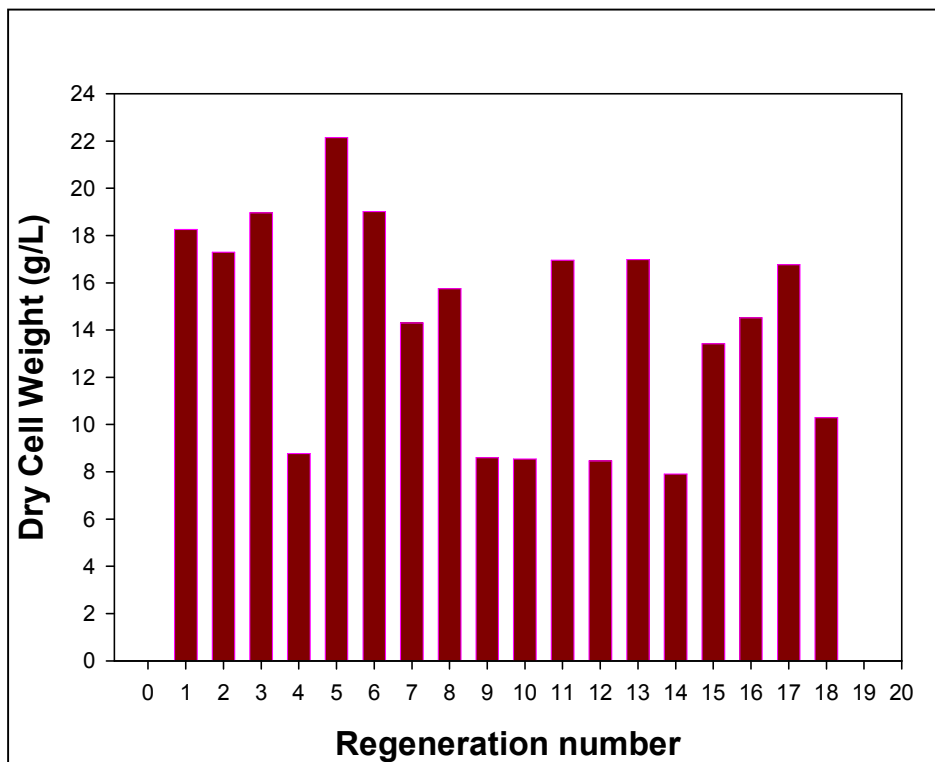


Figure 1-45. Cell growth extent of the variants screened from the high yielding strain(OBLQ756-15) in submerged production cultures

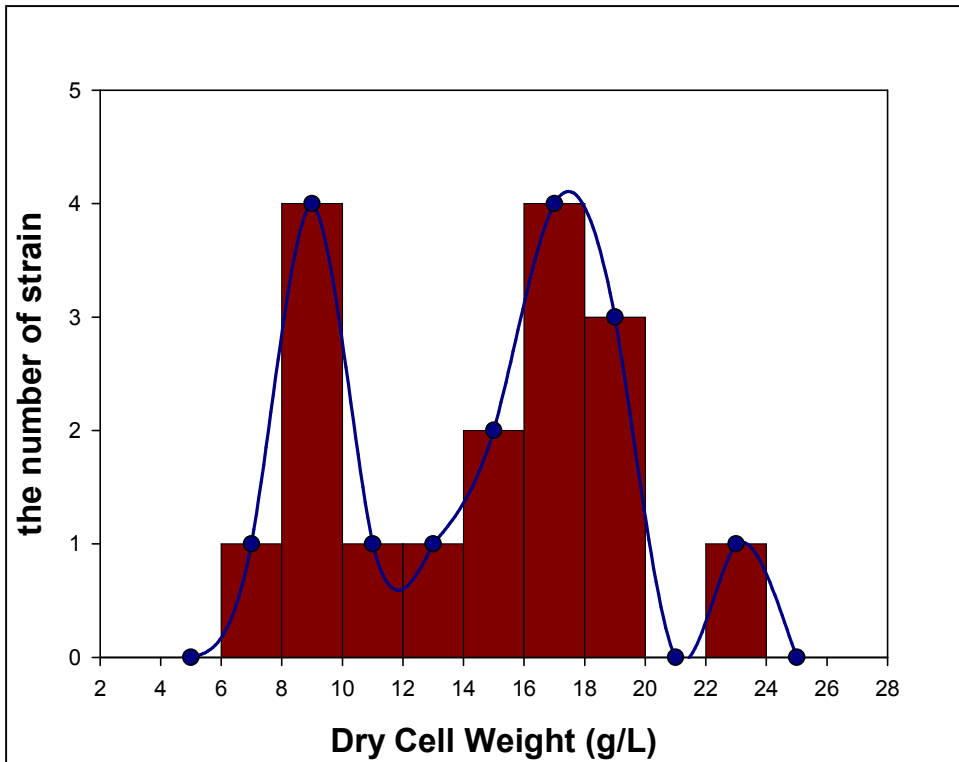


Figure 1-46. Cell growth extent of the variants screened from the high yielding strain(OBLQ756-15) in submerged production cultures

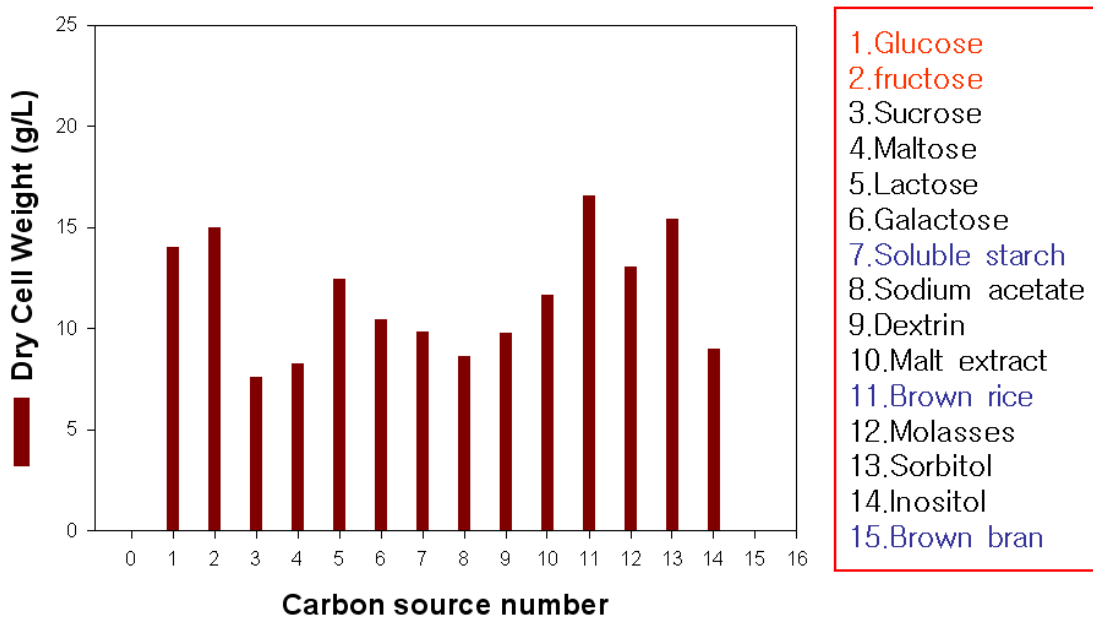


Figure 1-47. Effect of various carbon sources on mycelial growth of *I. obliquus* (OFAT experiment design)

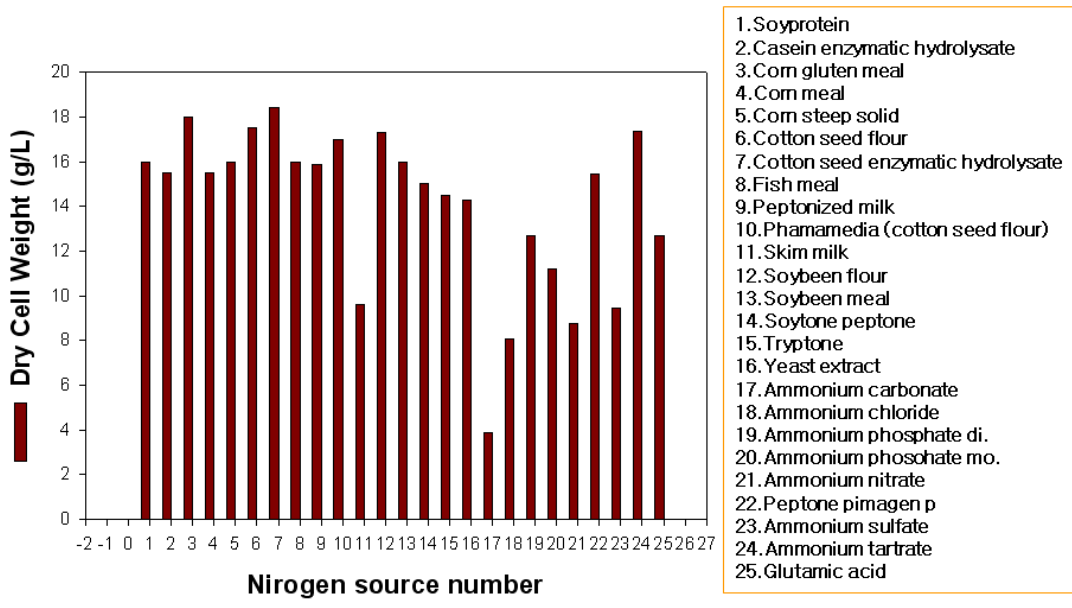


Figure 1-48. Effect of various nitrogen sources on mycelial growth of *I. obliquus* (OFAT experiment design)

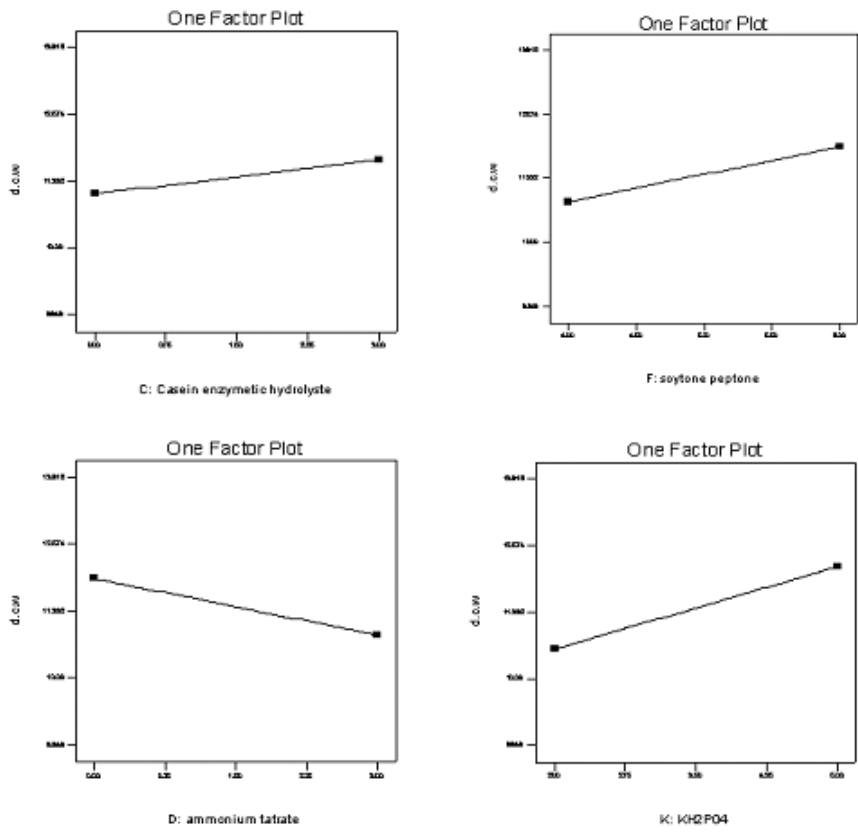


Figure 1-49. One factor plot of Plackett-Burman design experiment

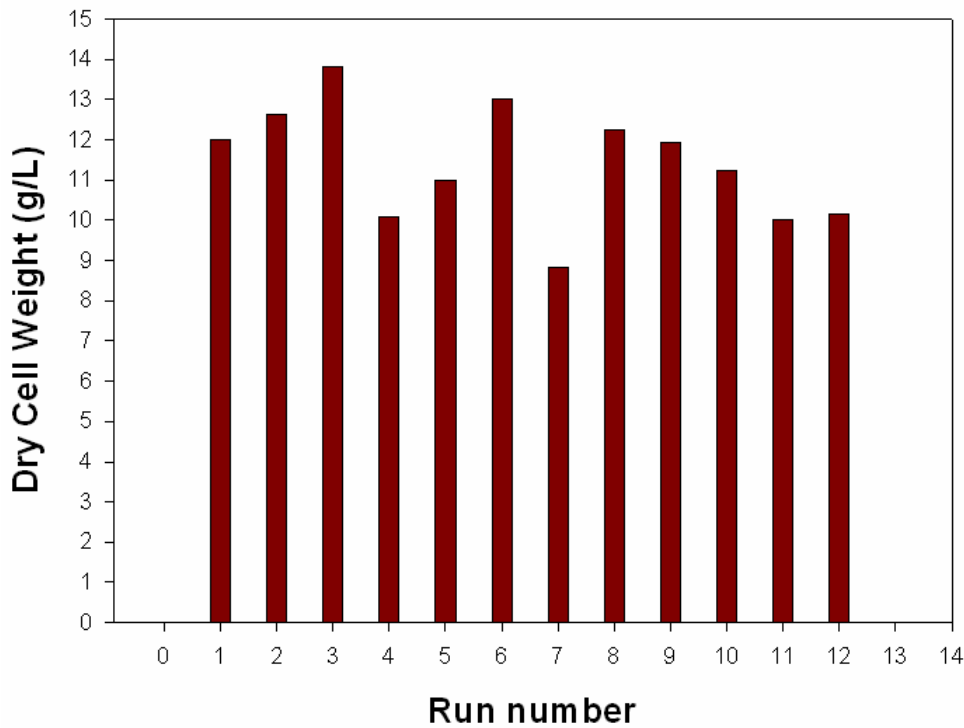


Figure 1–50. Mycelial growth of *I. obliquus* according to various medium compositions determined by Plackett–Burman design

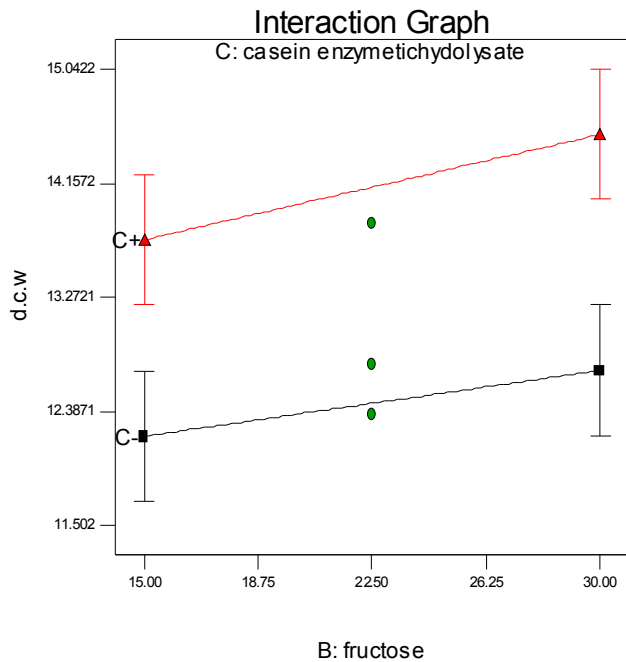


Figure 1–51. Combined effect of fructose and casein enzymatic hydrolysate on mycelial growth of *I. obliquus* (Interaction graph of 4–factor full factorial design experiment)

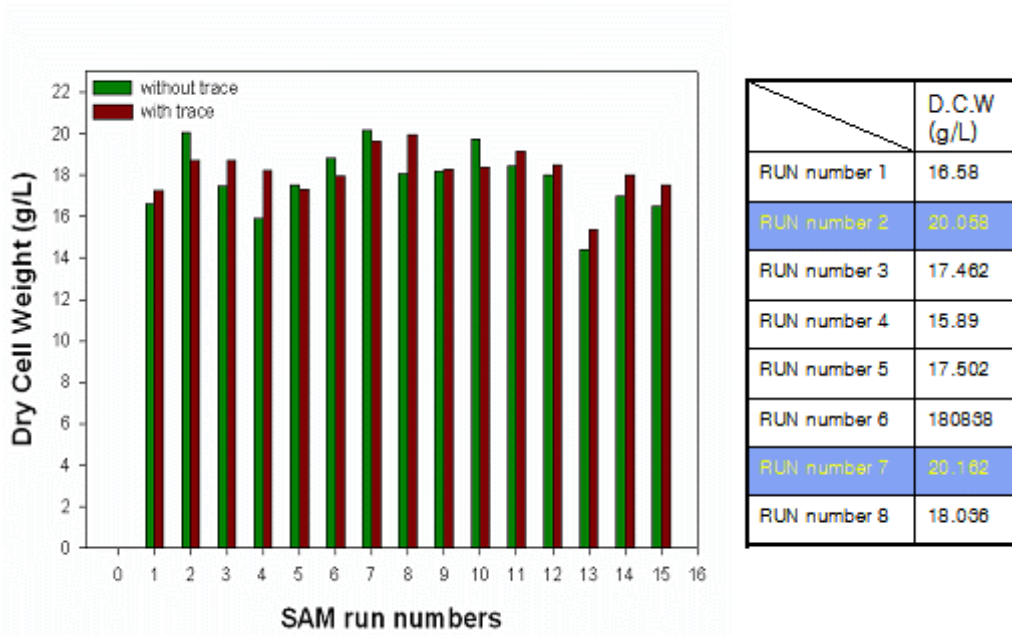


Figure 1-52. Mycelial growth of *I. obliquus* in each production medium compositions designed by the 4-factor SAM

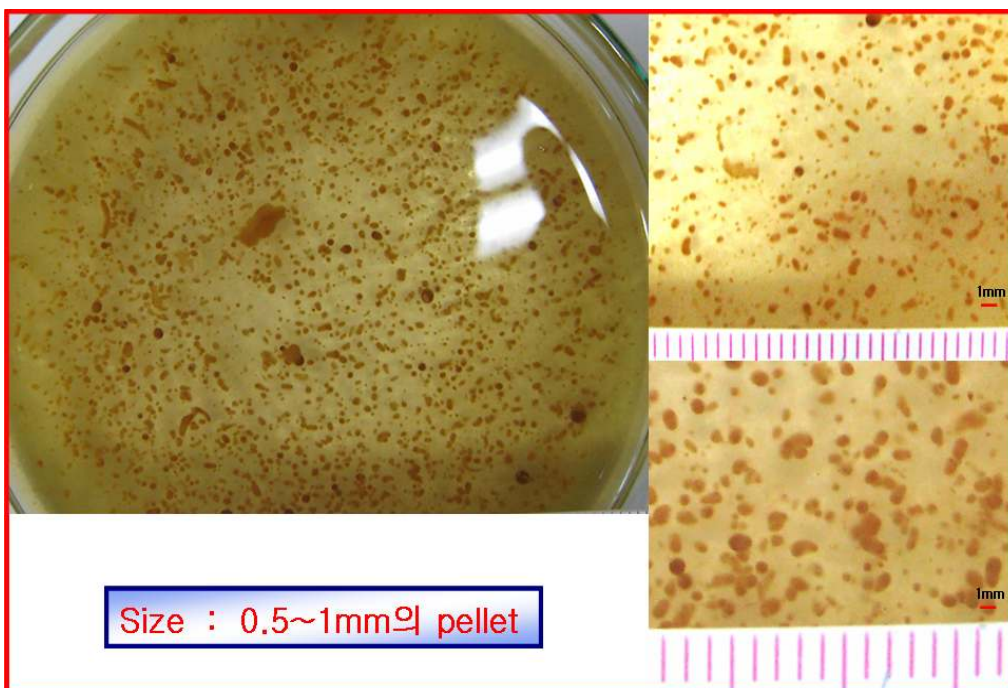


Figure 1-53. Mycelial morphology in the submerged production cultures, the medium compositions of which were determined by use of SAM

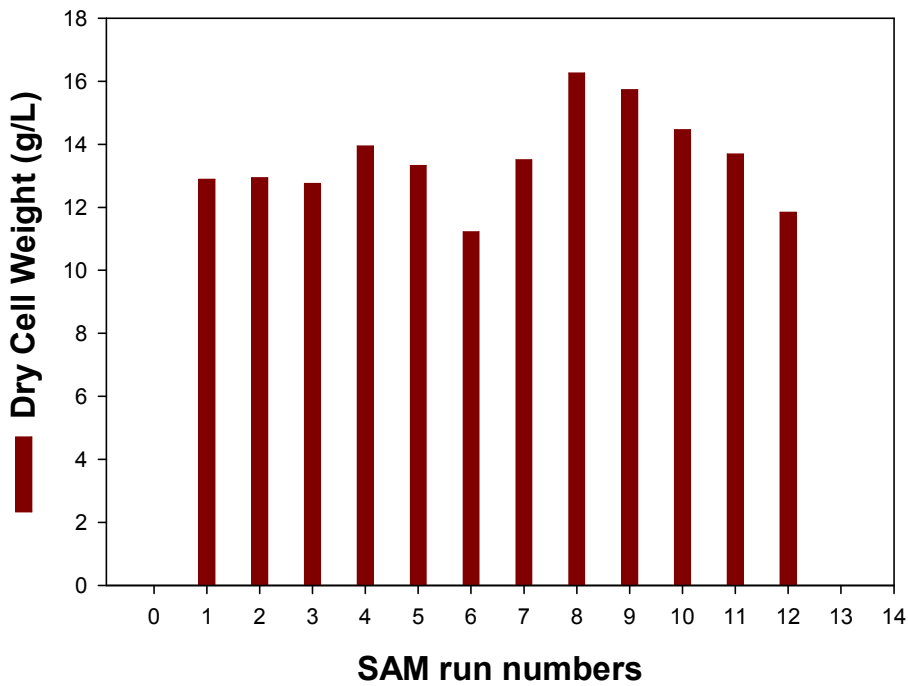


Figure 1-54. Mycelial growth of *I. obliquus* in each production medium compositions designed by the 5-factor SAM

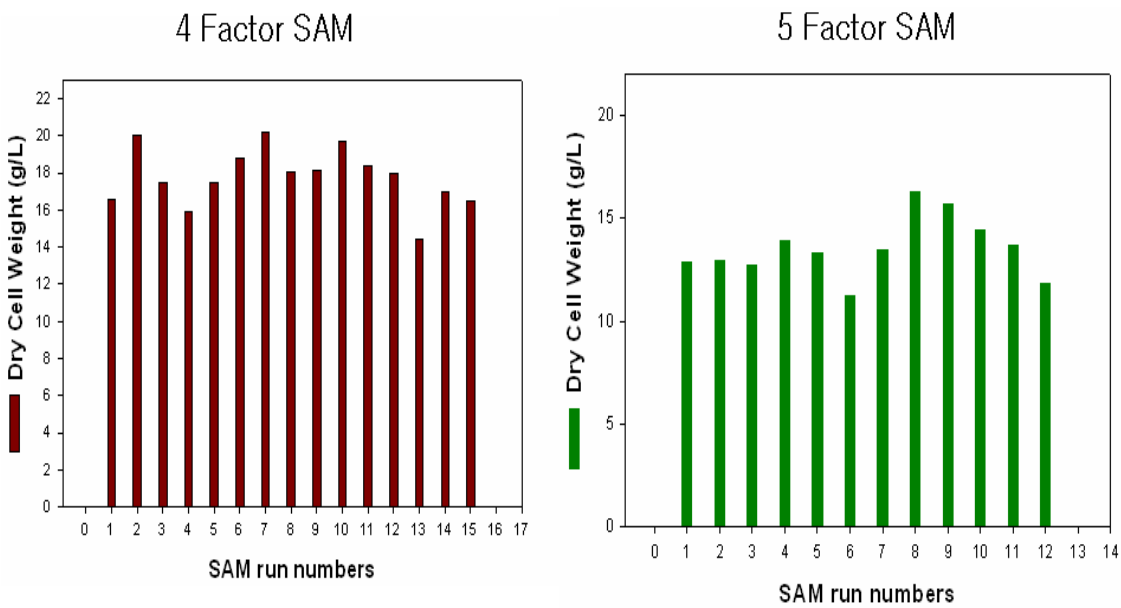


Figure 1-55. Comparison of mycelial growth of *I. obliquus* in each production medium compositions designed by use of the 4-factor and the 5-factor SAM

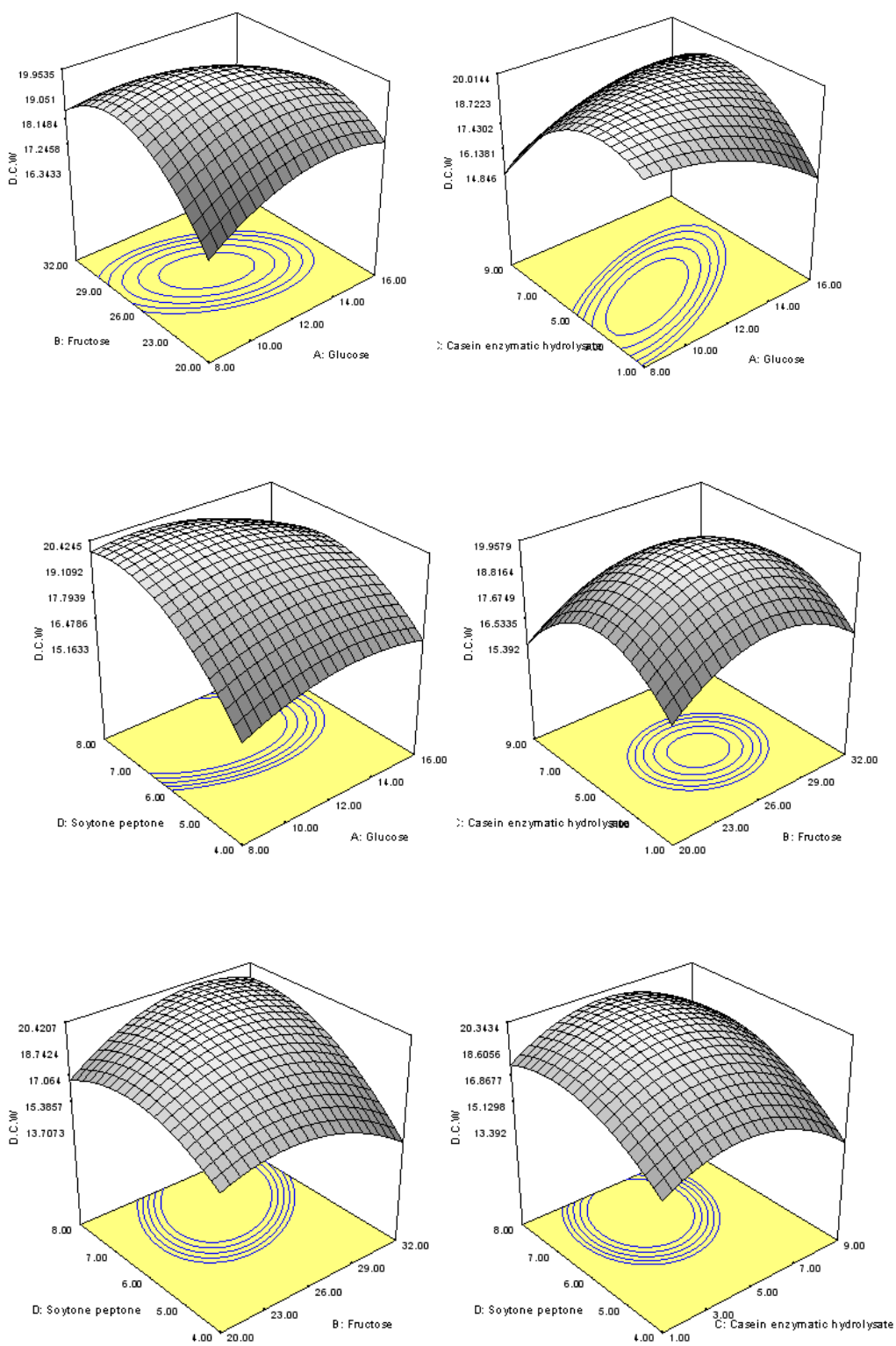


Figure 1-56. 3-D response surface curves for the mycelial growth of *I. obliquus* as a function of medium components

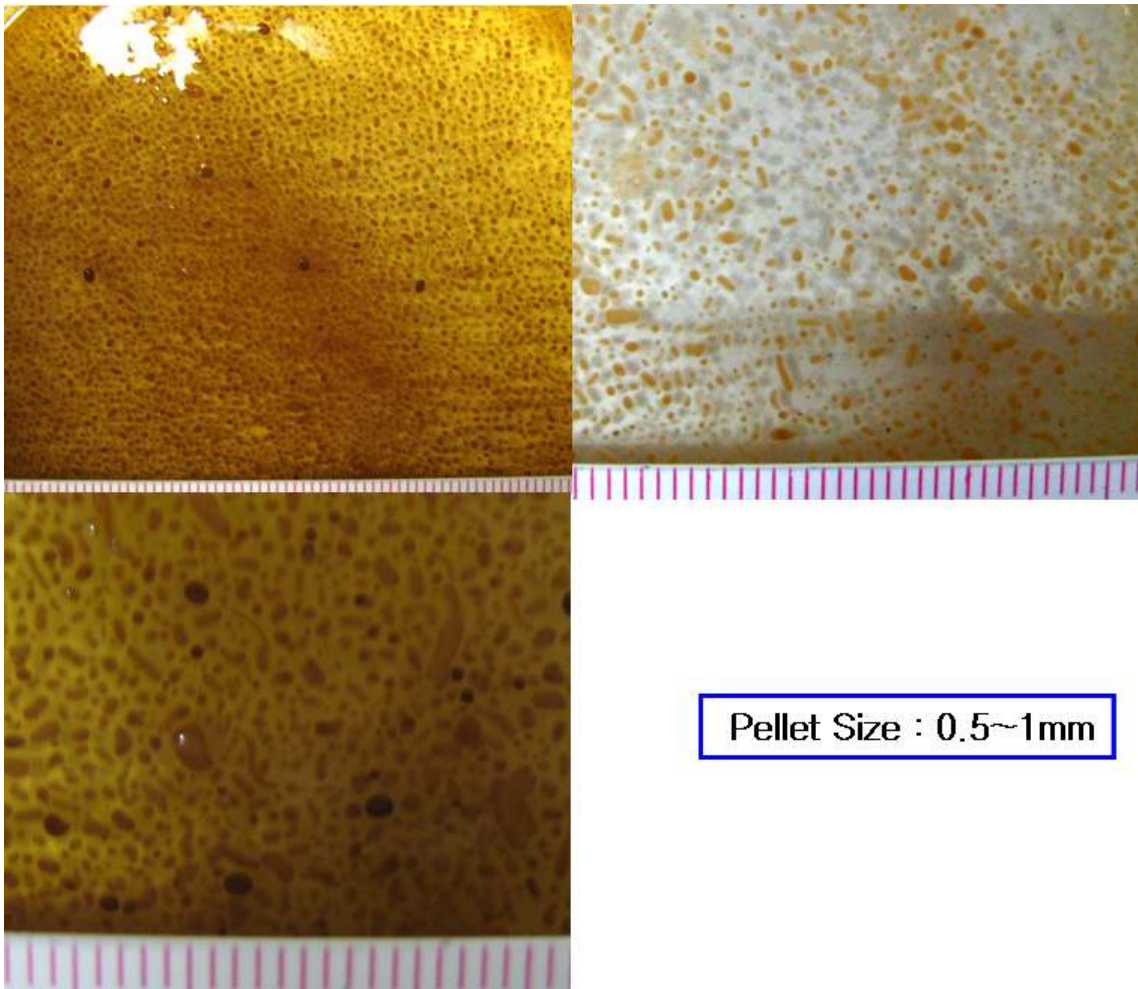
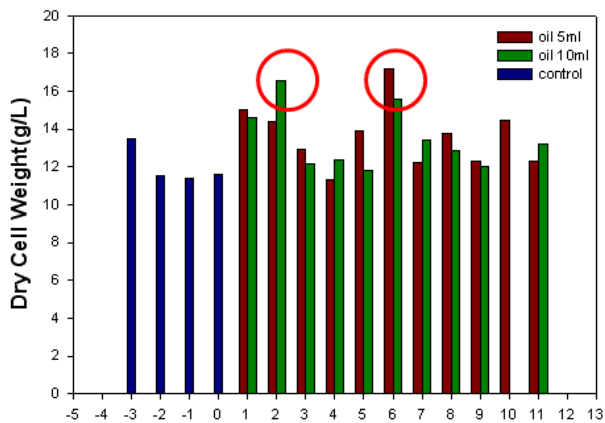
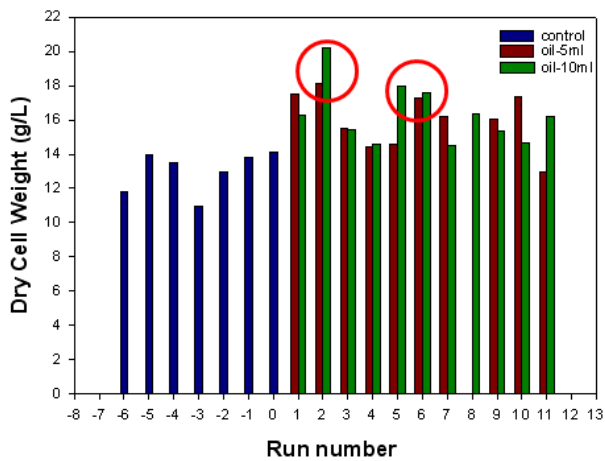


Figure 1-57. Mycelial morphology in the submerged production cultures, the optimum medium concentrations of which were estimated by use of the response surface quadratic model



1ST Oil test



2nd Oil test

Oil number	Oil
1	Corn oil
2	Wheat germ oil
3	Soybean oil
4	Cottenseed oil
5	Sunflower oil
6	Lard oil
7	Olive oil
8	Peanut oil
9	Almond oil
10	Sesame oil
11	Oleic acid

Figure 1–58. The effect of oil supplementation into the production medium on the mycelial growth oil in IPS production cultures (5 ml and 10 ml of various oils were added to the production medium, and compared to the control cultures with no addition of oils.)

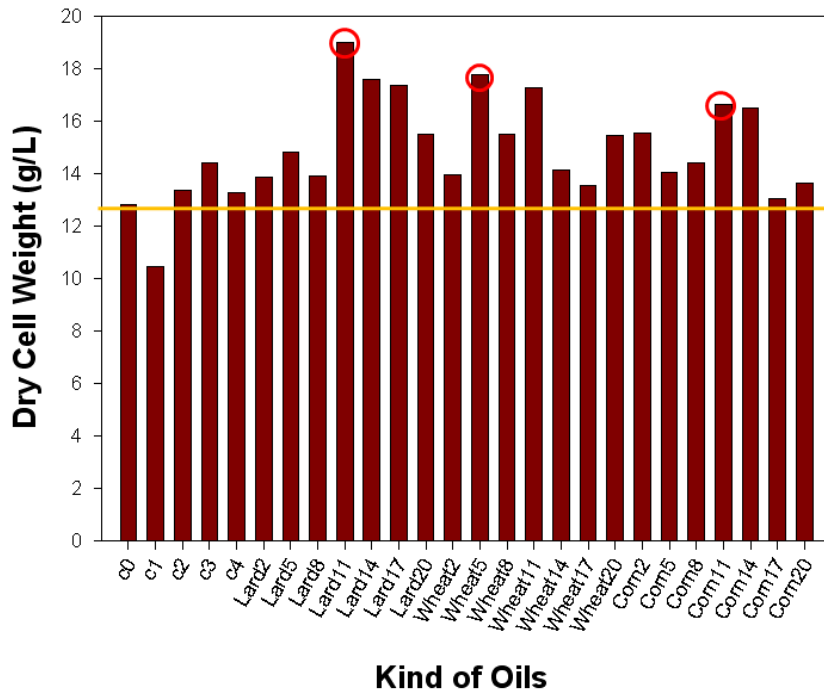


Figure 1–59. The effect of various amounts of lard oil, corn oil and wheat germ oil supplemented into the IPS production medium on the mycelial growth oil in IPS production cultures

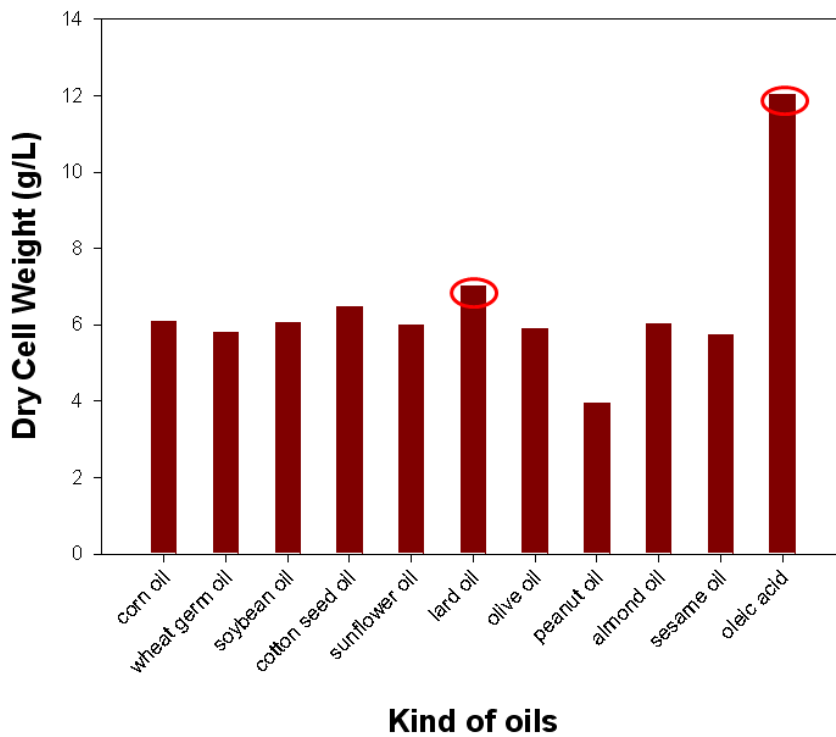


Figure 1–60. The effect of various kinds of oil supplemented as a sole carbon source into the IPS production medium on the mycelial growth oil in IPS production cultures

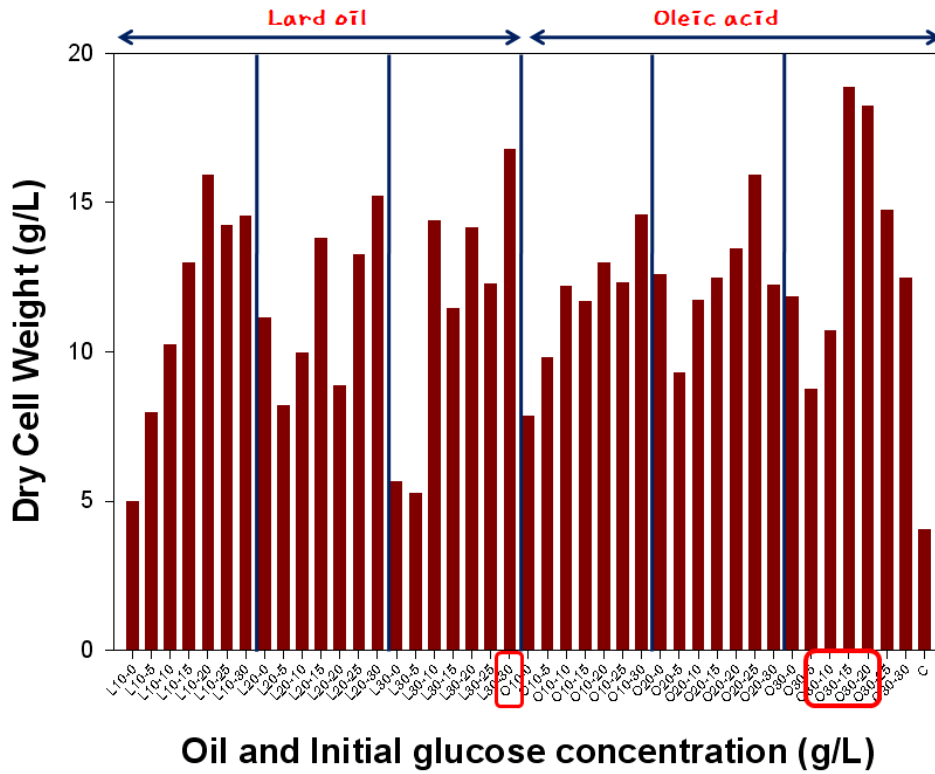


Figure 1–61. The effect of various concentrations of glucose and oils (lard oil and oleic acid) supplemented into the IPS production medium on the mycelial growth in IPS production cultures

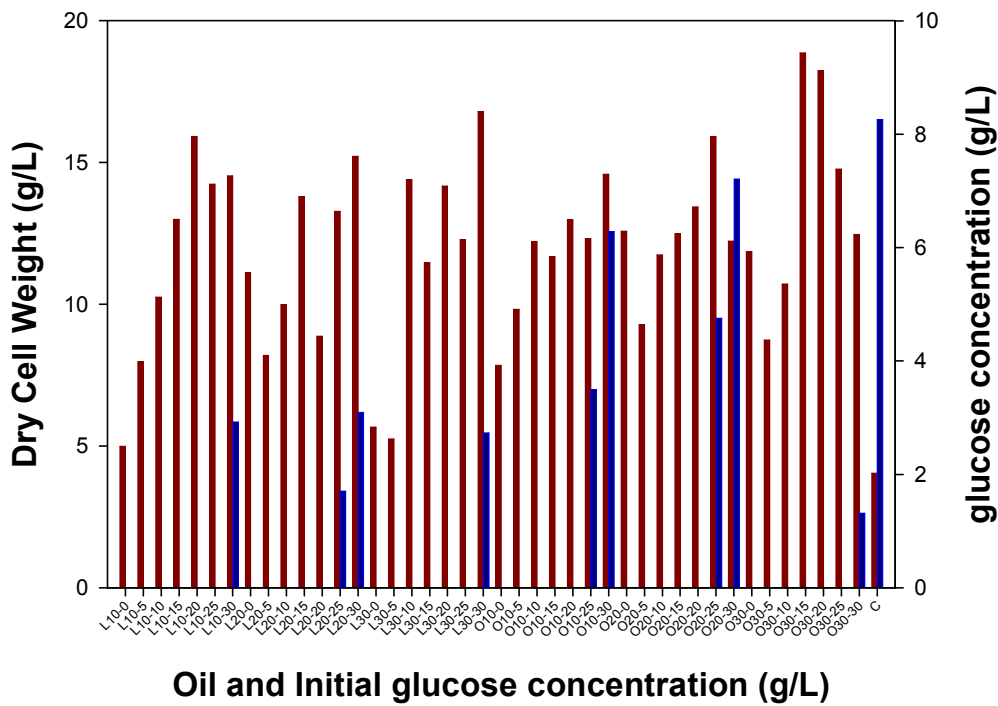
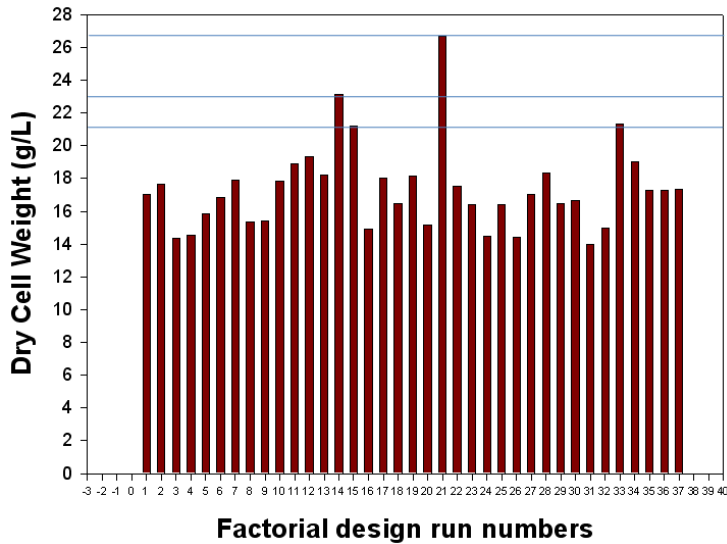


Figure 1–62. Residual glucose concentration and cell mass obtained in IPS production cultures when various concentrations of glucose and oils (lard oil and oleic acid) were added into the IPS production medium



Run	Block	Factor 1 A: Glucose g/L	Factor 2 B: Oleic acid g/L	Factor 3 C: casein h.I g/L	Factor 4 D: soytone pep g/L	Factor 5 E: KH ₂ PO ₄ g/L	Response 1 D.C.W g/L
1	Block 1	22.00	30.00	2.00	6.00	6.00	17.03
2	Block 1	22.00	25.00	6.00	10.00	6.00	17.68
3	Block 1	18.00	27.50	4.00	8.00	4.50	14.36
4	Block 1	22.00	25.00	2.00	6.00	6.00	14.53
5	Block 1	22.00	25.00	6.00	10.00	3.00	15.88
6	Block 1	22.00	30.00	2.00	10.00	6.00	16.83
7	Block 1	14.00	25.00	2.00	10.00	3.00	17.93
8	Block 1	14.00	25.00	2.00	6.00	6.00	15.35
9	Block 1	14.00	25.00	2.00	6.00	3.00	15.38
10	Block 1	22.00	25.00	2.00	10.00	6.00	17.82
11	Block 1	22.00	30.00	2.00	10.00	3.00	18.93
12	Block 1	22.00	30.00	6.00	10.00	6.00	19.34
13	Block 1	18.00	27.50	4.00	8.00	4.50	18.19
14	Block 1	22.00	30.00	6.00	6.00	3.00	23.13
15	Block 1	14.00	30.00	6.00	6.00	3.00	21.23
16	Block 1	14.00	25.00	2.00	10.00	6.00	14.92
17	Block 1	14.00	30.00	2.00	10.00	3.00	18
18	Block 1	14.00	25.00	6.00	10.00	6.00	16.46
19	Block 1	14.00	30.00	2.00	6.00	3.00	18.17
20	Block 1	18.00	27.50	4.00	8.00	4.50	15.19
21	Block 1	22.00	30.00	6.00	10.00	3.00	26.66
22	Block 1	18.00	27.50	4.00	8.00	4.50	17.51
23	Block 1	14.00	30.00	2.00	10.00	6.00	16.42
24	Block 1	14.00	25.00	6.00	6.00	6.00	14.5
25	Block 1	14.00	30.00	6.00	6.00	6.00	16.42
26	Block 1	22.00	25.00	2.00	6.00	3.00	14.4
27	Block 1	22.00	30.00	2.00	6.00	3.00	17
28	Block 1	22.00	25.00	2.00	10.00	3.00	18.35
29	Block 1	14.00	30.00	6.00	10.00	3.00	16.45
30	Block 1	18.00	27.50	4.00	8.00	4.50	16.69
31	Block 1	14.00	30.00	2.00	6.00	6.00	13.97
32	Block 1	14.00	25.00	6.00	10.00	3.00	15
33	Block 1	22.00	25.00	6.00	6.00	6.00	21.3
34	Block 1	14.00	25.00	6.00	6.00	3.00	19.04
35	Block 1	22.00	30.00	6.00	6.00	6.00	17.27
36	Block 1	14.00	30.00	6.00	10.00	6.00	17.3
37	Block 1	22.00	25.00	6.00	6.00	3.00	17.33

Figure 1–63. Results of full factorial design(FFD) experiments and FFD experimental design with oleic acid supplemented into the IPS production medium

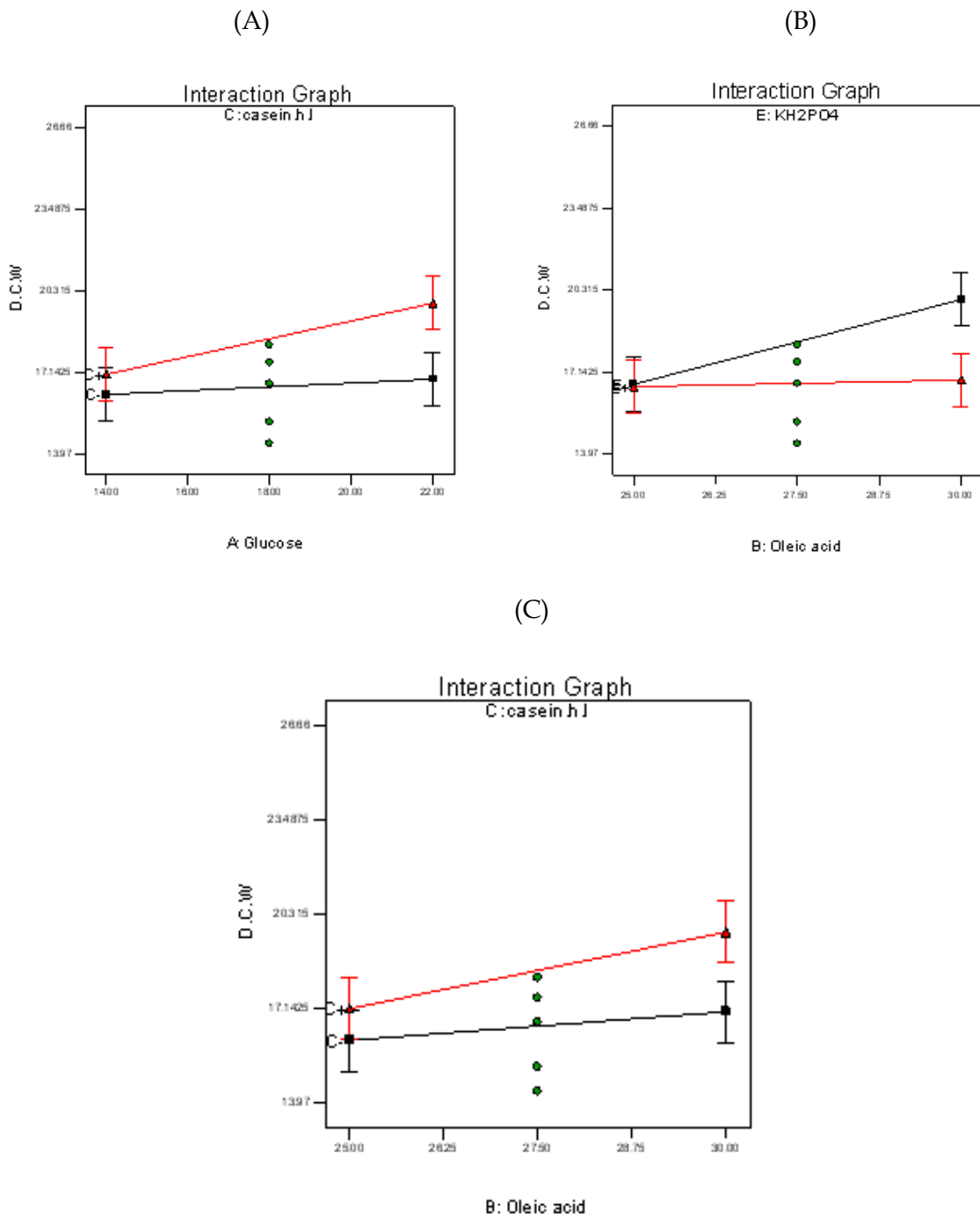


Figure 1-64. Interaction graph from the ANOVA analysis for glucose, oleic acid and KH₂PO₄ (Full factorial design experiment with oleic acid supplemented into the IPS production medium)

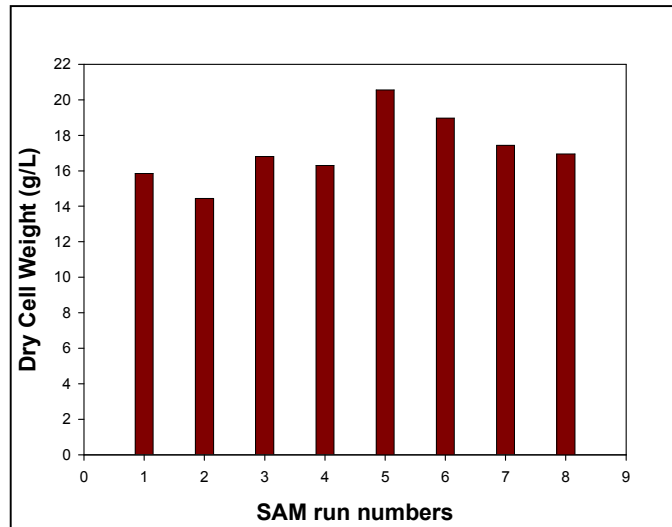


Figure 1-65. Experimental results obtained by applying steepest ascent method(SAM) in IPS production cultures

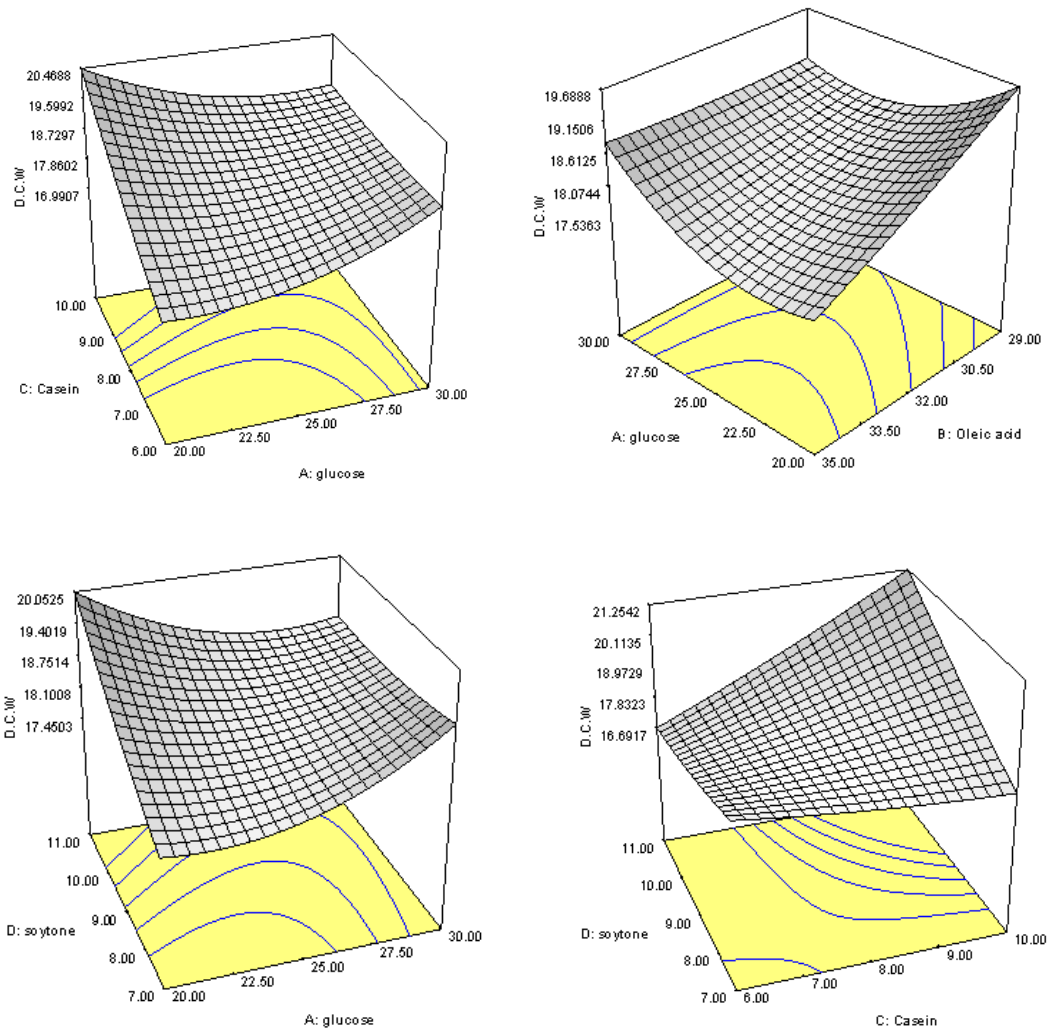


Figure 1-66. 3-D response surface curves for mycelial growth(IPS production) as a function of medium components

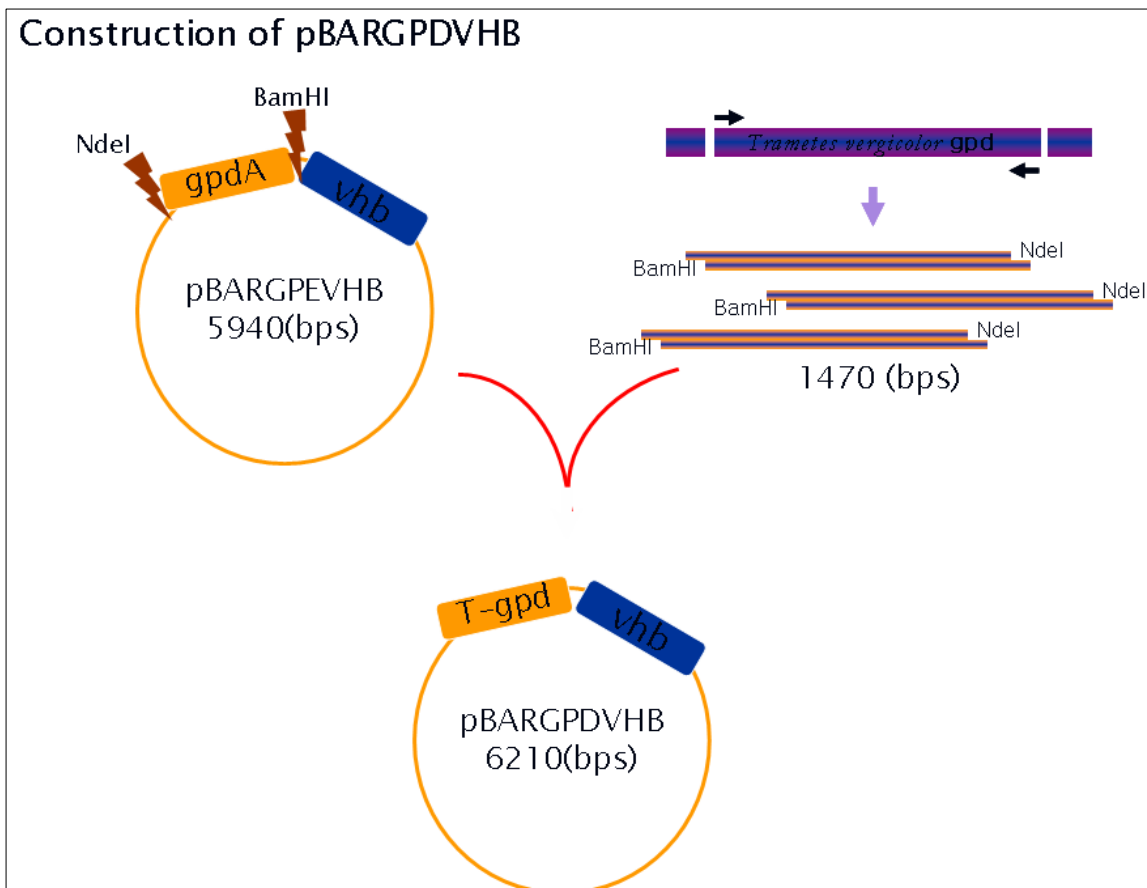


Figure 1–67. Strategies for the construction of *vhb* expression vector pBARGPDVHB to be expressed in the mycelial cells of *Inonotus obliquus*

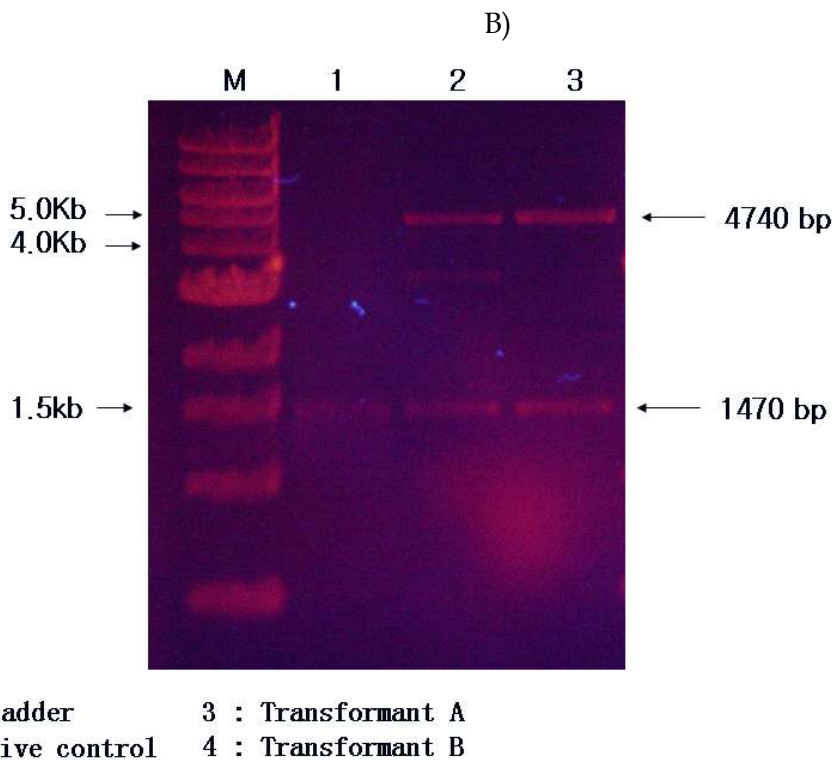
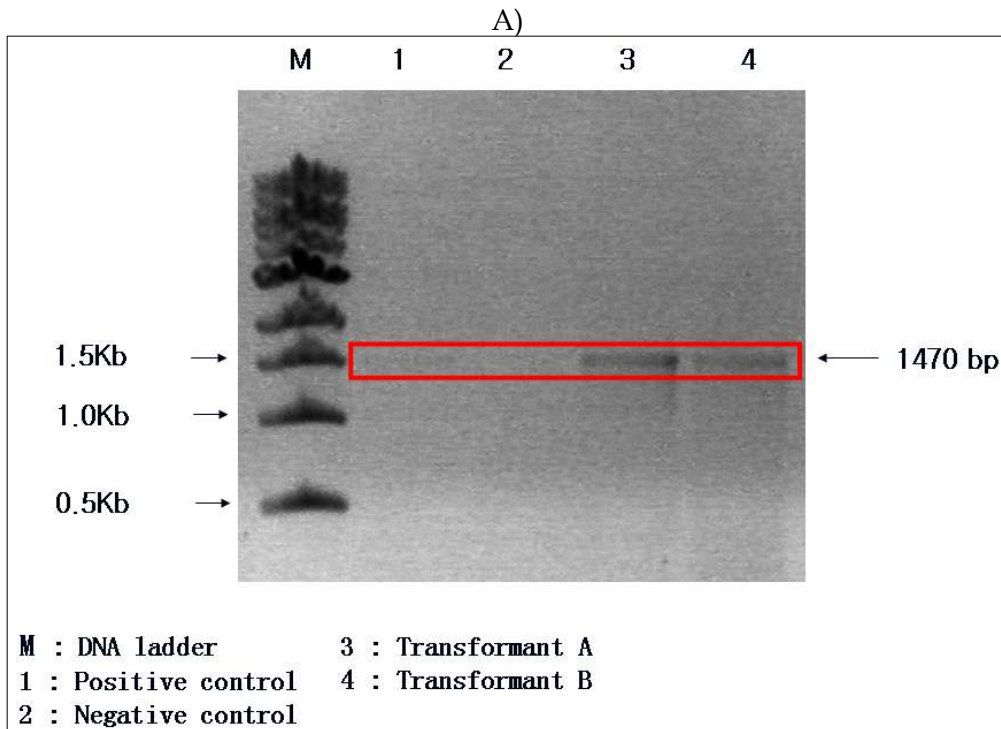
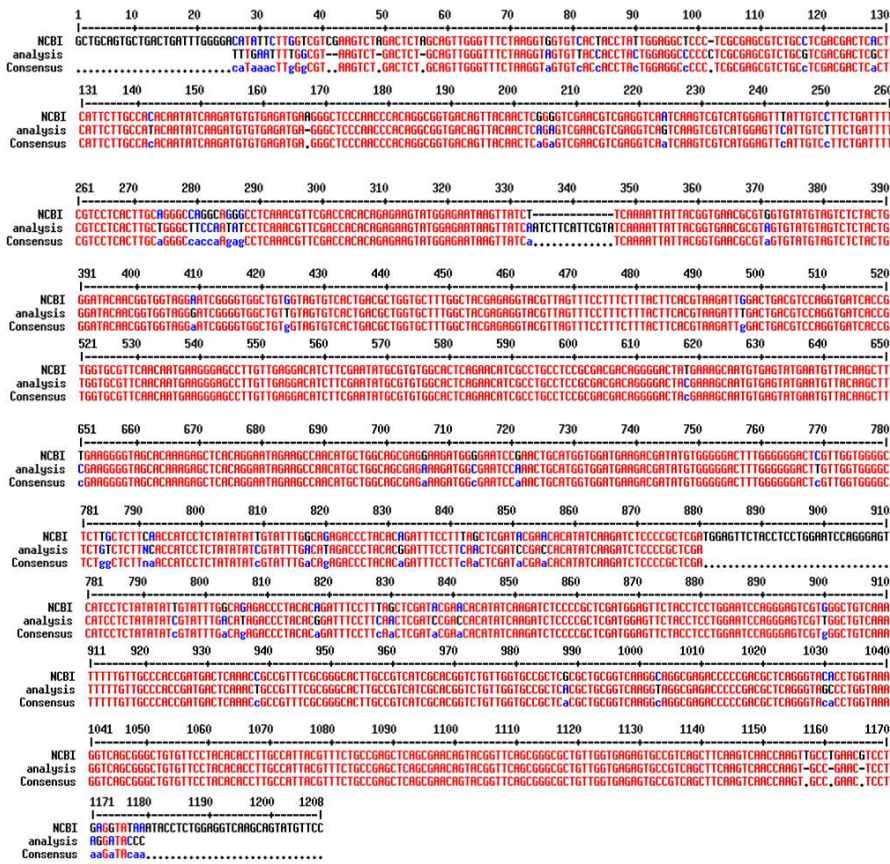


Figure 1-68. Identification of the ligation by colony PCR and cutting pBARGPDVHB with restriction enzymes(NdeI , BamHI)

A)



B)

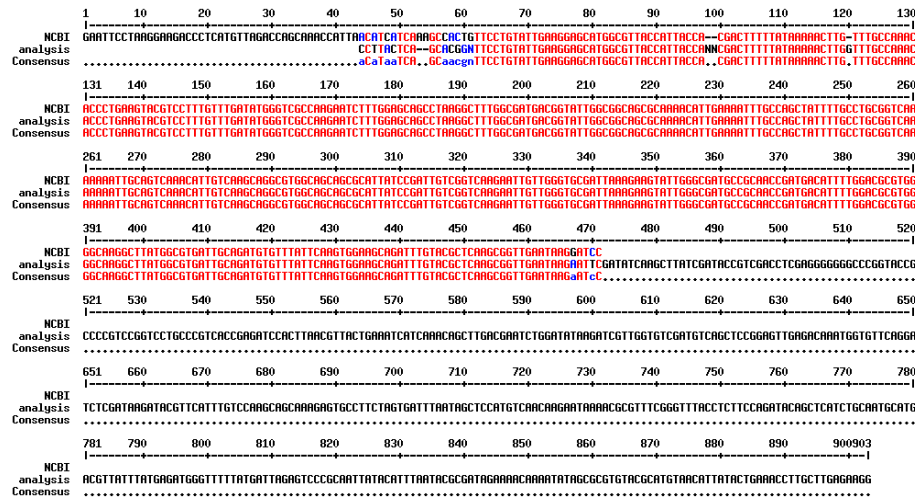


Figure 1-69. Sequencing of gpd promoter cloned in the T-vector

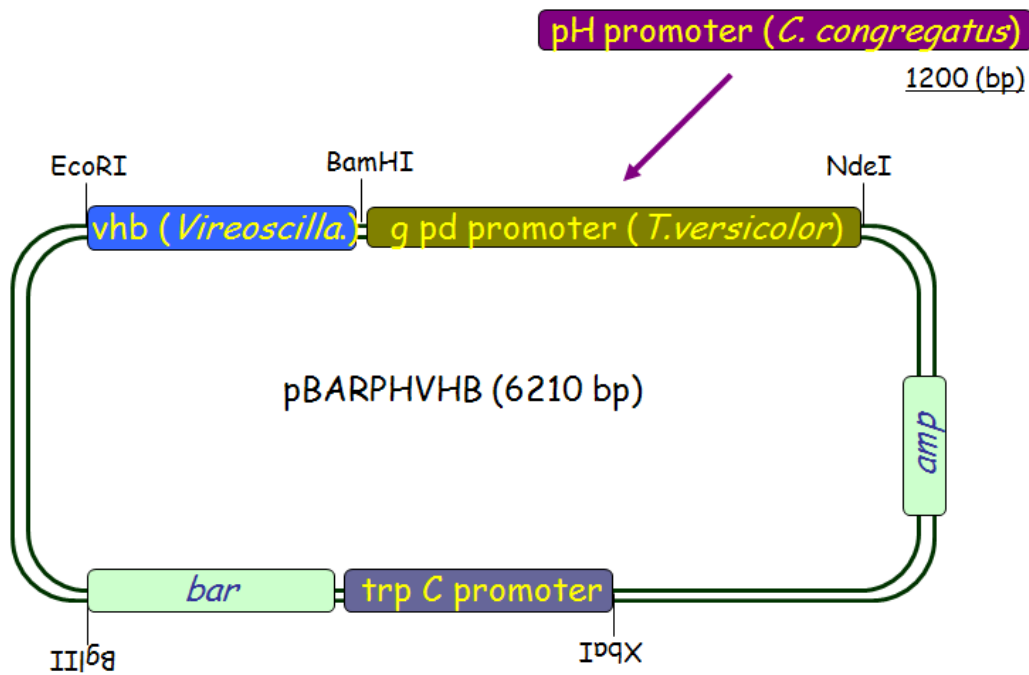


Figure 1-70. Construction of vhb expression vector pBARPHVHB (the gpd promoter of pBARGPDVHB expression vector was replaced with pH-controlled promoter cloned from *C. congregatus*.)

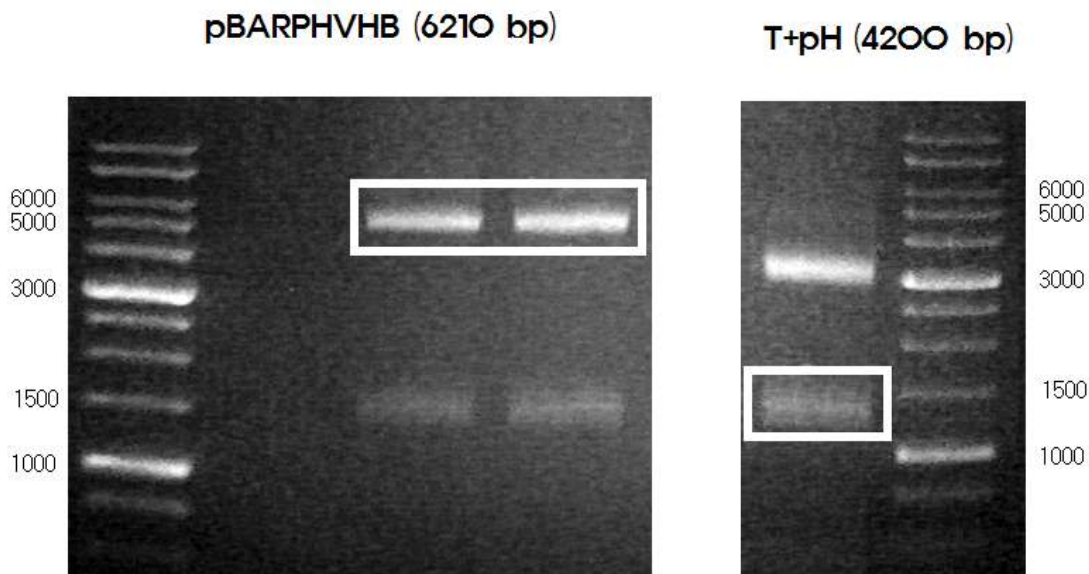


Figure 1-71. (Left) Successful construction of the pBARPHVHB expression vector and (Right) identification of pH-controlled promoter in T vector

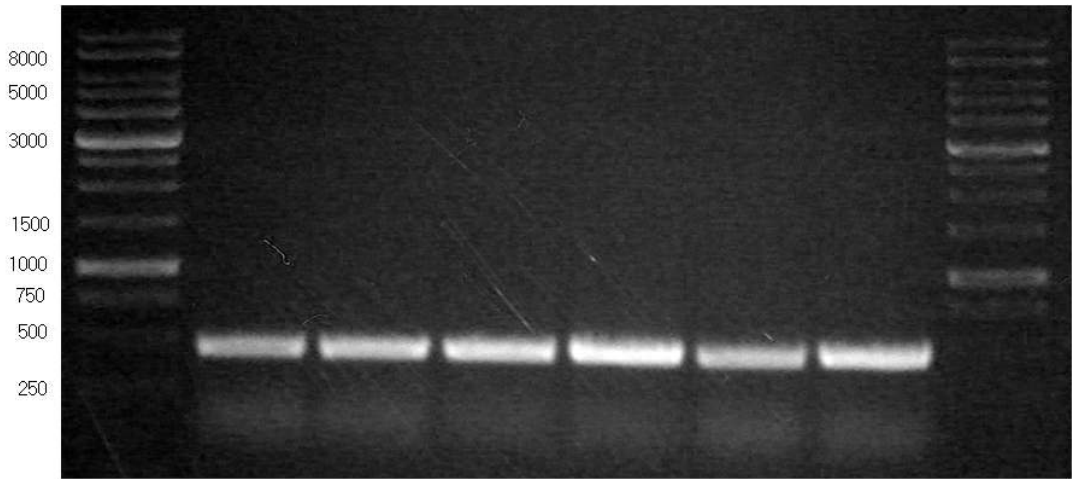


Figure 1-72. Identification of vhb gene in the pBARPHVHB expression vector with the restriction enzymes (EcoRI , BamHI)

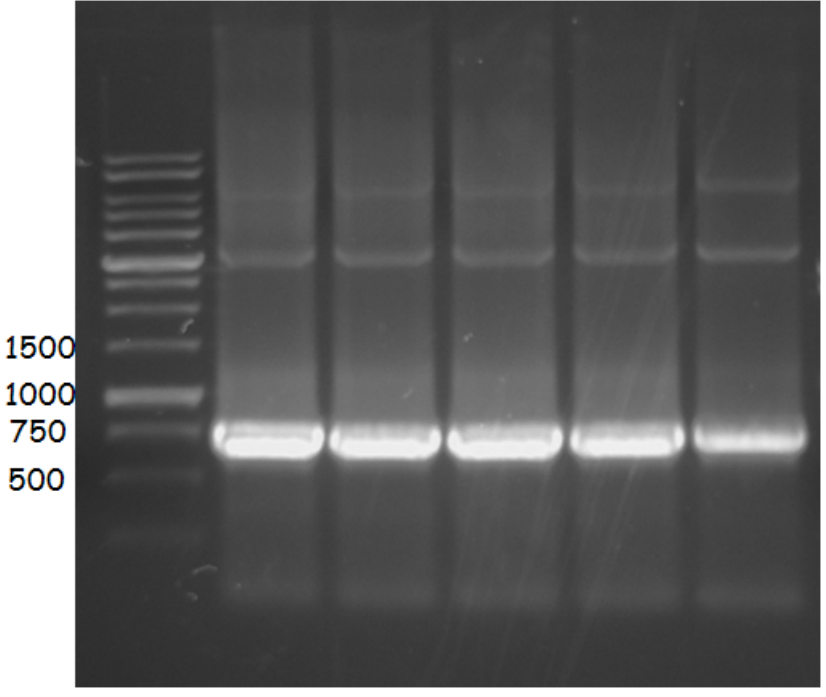


Figure 1-73. Cloning of sgfp gene of Aequorea victoria

```

1      10     20     30     40     50     60     70     80     90     100    110    120    130
sgfp  ATGGTGAGCAGAGGGCGAGAGCTATTGACCGGGTGGTCCCATCTGTGCTCAGGCTGACCGGACGTTACGGCCACAGTTCCGCTGCTCCGGCAGGGCCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAGCTGA
sgpf-1 AAAAGCCGTTTTAC--GGGTGG--CCATCTGTCTCAGCTGACCGGACGTTACGGCCACAGTTCCAGCTGTCTCCGGCAGGGCCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAGCTGA
Consensus .....AaAGCgGTTcAc...GGGTGGg...CCATCTGTGCTCAGGCTGACCGGACGTTACGGCCACAGTTCCAGCTGTCTCCGGCAGGGCCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAGCTGA

131    140    150    160    170    180    190    200    210    220    230    240    250    260
sgfp  CCCGAAATTCATCTGACACCCGGCAGAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCCTCGTACACACCTTCACCTACGGCGTGCAGTGTCTCAGCCGCTACCCCAGCCACATGAAAGCAGCAGACTTCTTCAGAGTC
sgpf-1 CCCGAAATTCATCTGACACCCGGCAGAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCCTCGTACACACCTTCACCTACGGCGTGCAGTGTCTCAGCCGCTACCCCAGCCACATGAAAGCAGCAGACTTCTTCAGAGTC
Consensus CCCGAAATTCATCTGACACCCGGCAGAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCCTCGTACACACCTTCACCTACGGCGTGCAGTGTCTCAGCCGCTACCCCAGCCACATGAAAGCAGCAGACTTCTTCAGAGTC

261    270    280    290    300    310    320    330    340    350    360    370    380    390
sgfp  CGCCATGCCCGAAGGCTACGTCGAGAGCGCACCATCTTCTTCAGGACGACGGCAGCTACAGACCCGCGCCAGGTTGAAAGTTCGAGGGCGACACCTTGGTGAACCCGATCAGCTGAAGGGCATCGAC
sgpf-1 CGCCATGCCCGAAGGCTACGTCGAGAGCGCACCATCTTCTTCAGGACGACGGCAGCTACAGACCCGCGCCAGGTTGAAAGTTCGAGGGCGACACCTTGGTGAACCCGATCAGCTGAAGGGCATCGAC
Consensus CGCCATGCCCGAAGGCTACGTCGAGAGCGCACCATCTTCTTCAGGACGACGGCAGCTACAGACCCGCGCCAGGTTGAAAGTTCGAGGGCGACACCTTGGTGAACCCGATCAGCTGAAGGGCATCGAC

391    400    410    420    430    440    450    460    470    480    490    500    510    520
sgfp  TTCAGGAGGACGCGACACATCTCGGGCACAGCTGGAGTACACACACAGCCACACGCTATATATGCCCAGCAGCAGAGAGACGGCATCAGGTTGAACTTCAGATCCGCCACACATCGAGG
sgpf-1 TTCAGGAGGACGCGACACATCTCGGGCACAGCTGGAGTACACACACAGCCACACGCTATATATGCCCAGCAGCAGAGAGACGGCATCAGGTTGAACTTCAGATCCGCCACACATCGAGG
Consensus TTCAGGAGGACGCGACACATCTCGGGCACAGCTGGAGTACACACACAGCCACACGCTATATATGCCCAGCAGCAGAGAGACGGCATCAGGTTGAACTTCAGATCCGCCACACATCGAGG

521    530    540    550    560    570    580    590    600    610    620    630    640    650
sgfp  ACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCGCAGACACCCCACTCGGCGACGGCCCGTGTCTGCCCAGCAGCACCCTACCTGAGCACCAGTCCGCCCTGAGCAGAGACCCACAGCAGAGCGCGA
sgpf-1 ACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCGCAGACACCCCACTCGGCGACGGCCCGTGTCTGCCCAGCAGCACCCTACCTGAGCACCAGTCCGCCCTGAGCAGAGACCCACAGCAGAGCGCGA
Consensus ACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCGCAGACACCCCACTCGGCGACGGCCCGTGTCTGCCCAGCAGCACCCTACCTGAGCACCAGTCCGCCCTGAGCAGAGACCCACAGCAGAGCGCGA

651    660    670    680    690    700    710    720    730    740    750    760    770    780
sgfp  TCACATGGTCTCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGATCAGCTCGGATGGACGAGCTGTACAGTAA
sgpf-1 TCACATGGTCTCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGATCAGCTCGGATGGACGAGCTGTACAGTAA
Consensus TCACATGGTCTCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGATCAGCTCGGATGGACGAGCTGTACAGTAA

781    790    800    810    820    830    840    850    860    870    876
sgfp  TAGTGAGTCTGATTACCAATCTACTGCCGCTGTTTACACAGCTGCTGACTGGGAARACCTTGGCGTTACCCAACTTAACTCGCCTTGACAGCACATCC
sgpf-1 TAGTGAGTCTGATTACCAATCTACTGCCGCTGTTTACACAGCTGCTGACTGGGAARACCTTGGCGTTACCCAACTTAACTCGCCTTGACAGCACATCC
Consensus .....

```

Figure 1-74. Sequencing of sgfp gene of *Aequorea victoria* cloned in T-vector

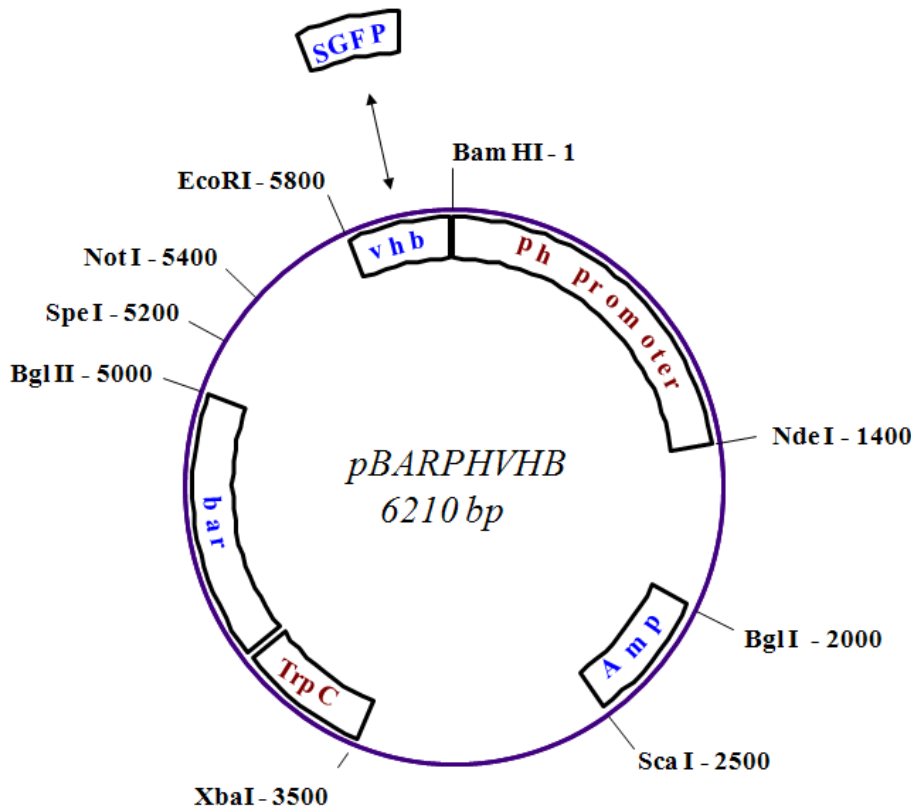


Figure 1-75. Construction of pBARPHSGFP expression vector

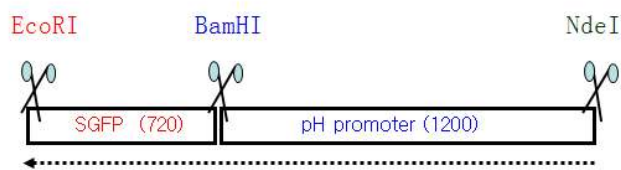
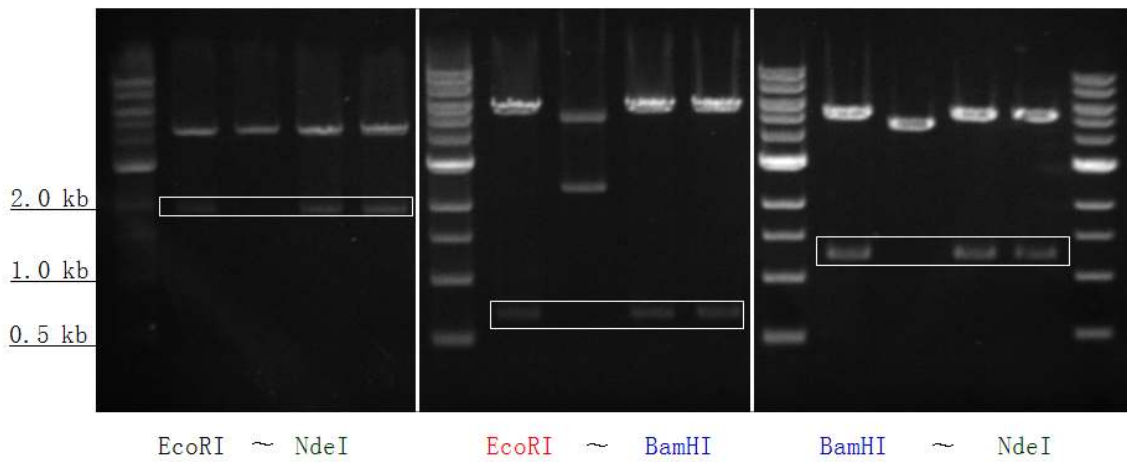


Figure 1-76. Identification of pH-controlled promoter and sgfp gene by restriction enzyme analysis of the pBARPHSGFP expression vector

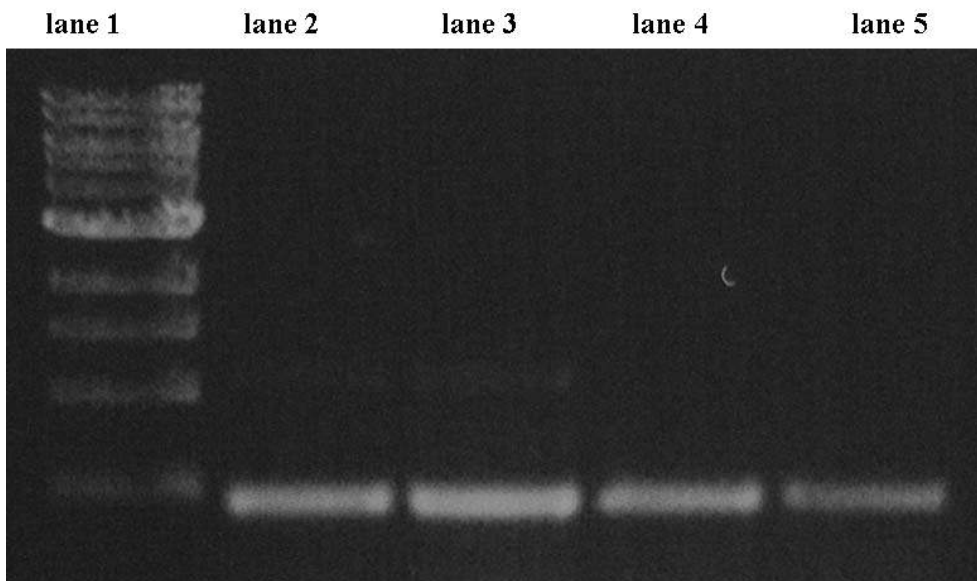


Figure 1-77. Gradient PCR product of hmb1 gene of *Aspergillus niger* analyzed on a 1.2% agarose gel (lane 1: ladder size marker; lane 2, 3, 4, 5: hmb1 gene of *A. niger* amplified by gradient PCR; lane 2: annealing temperature 60°C; lane 3: annealing temperature 57°C; lane 4: annealing temperature 55°C; lane 5: annealing temperature 50°C)

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
HBD   AACGATATAGGGC-CAGTCC-TGTTCTC-AGAA-ATGGAAACCAAAATCACACCTGCCTTCTACAGAACATGTTGACCCGCGCATCCAGATTGATGCTGTGT
A.niger ATGCCGCTCACACCCAGAGCAGATCAAAATATCAGAGCCACAGCTCCCTGTTCTACAGAAATGGAAACCAAAATCACACCTGCCTTCTACAGAACATGTTGACCCGCGCATCCAGATTGATGCTGTGT
Consensus .....AAAcAaaaAGGCC_CAGTCC_TGTTCTa..AGAA_ATGGAAACCAAAATCACACCTGCCTTnTACAgAACATGTTGACCCGCGCATCCAGATTGATGCTGTGT

131     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240     250     260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
HBD   TCACACTGCGAACACAGGTCATGGCCACACAGCAGCTGCCTAGCTGGTGCACCTGTTCCGATATGCATCCACATCGACACCTCGGGGCCCTCGGTCTGCCGTCGAATTAATATGGAAACAGCATGC
A.niger TCACACTGCGAACACAGGTCATGGCCACACAGCAGCTGCCTAGCTGGTGCACCTGTTCCGATATGCATCCACATCGACACCTCGGGGCCCTCGGTCTGCCGTCGAATTAATATGGAAACAGCATGC
Consensus TCACACTGCGAACACAGGTCATGGCCACACAGCAGCTGCCTAGCTGGTGCACCTGTTCCGATATGCATCCACATCGACACCTCGGGGCCCTCGGTCTGCCGTCGAATTAATATGGAAACAGCATGC

261     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360     370     380     390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
HBD   ATCTCTATACATCCAGCTGCACGATACAGATCGTTGGCAGGTACTACTGGAGCTATGAAAGGGTACTTGGAGATGCTTGCACATGATATCTCGATGCGTGGGGTCCCGCATACTGGGCCCTG
A.niger ATCTCTATACATCCAGCTGCACGATACAGATCGTTGGCAGGTACTACTGGAGCTATGAAAGGGTACTTGGAGATGCTTGCACATGATATCTCGATGCGTGGGGTCCCGCATACTGGGCCCTG
Consensus ATCTCTATACATCCAGCTGCACGATACAGATCGTTGGCAGGTACTACTGGAGCTATGAAAGGGTACTTGGAGATGCTTGCACATGATATCTCGATGCGTGGGGTCCCGCATACTGGGCCCTG

391     400     410     420     430     440     450     460     470     480     490     500     510     520
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
HBD   GCCGACATCATGATCAACCCGAGGCCGACTCTACAGCAAGCCAGGGCTGAGAAATCTCCAAATCCCGGGCCATGGCGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCAATTCGCCCTATAGTAGTCTGAT
A.niger GCCGACATCATGATCAACCCGAGGCCGACTCTACAGCAAGCCAGGGCTGAGAAATCTCCAAATCCCGGGCCATGGCGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCAATTCGCCCTATAGTAGTCTGAT
Consensus GCCGACATCATGATCAACCCGAGGCCGACTCTACAGCAAGCCAGGGCTGAGAAATCTCCAAATCCCGGGCCATGGCGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCAATTCGCCCTATAGTAGTCTGAT

521     530     540     550     560     570     580     590     600     610     620     630     640     650
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
HBD   TACAAATCACTGGCCGCTGTTTACACAGCTCGTGCATGGGAARACCTGGCGTTACCCAACTAATCGCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAAAGCAAGAGGCCCGACACGATCGCC
A.niger TACAAATCACTGGCCGCTGTTTACACAGCTCGTGCATGGGAARACCTGGCGTTACCCAACTAATCGCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAAAGCAAGAGGCCCGACACGATCGCC
Consensus .....

651     660     670     680     690     700     710     720     730     740     750     760     770     780
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
HBD   CTCCCAACAGTGGCGAGCCTGAATGGCAATGGACGCGCCCTGTAGCGGGCATTAGCGCGGGGTGTGGTGTACGCGACGCTGACCCGTACACTTGGCAGCGCCCTAGCGCCCGCCTCCCTTC
A.niger CTCCCAACAGTGGCGAGCCTGAATGGCAATGGACGCGCCCTGTAGCGGGCATTAGCGCGGGGTGTGGTGTACGCGACGCTGACCCGTACACTTGGCAGCGCCCTAGCGCCCGCCTCCCTTC
Consensus .....

781     790     800     810     820     830     840     850     860     870     877
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
HBD   GCTTCTCCCTTCCCTTCTCGCACGTTCCGCGGCTTCCCGTCAGCTCTAATCGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTAGTGCTTTACGGC
A.niger GCTTCTCCCTTCCCTTCTCGCACGTTCCGCGGCTTCCCGTCAGCTCTAATCGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTAGTGCTTTACGGC
Consensus .....

```

Figure 1-78. Result of sequencing analysis of hmb1 gene cloned from *Aspergillus niger*

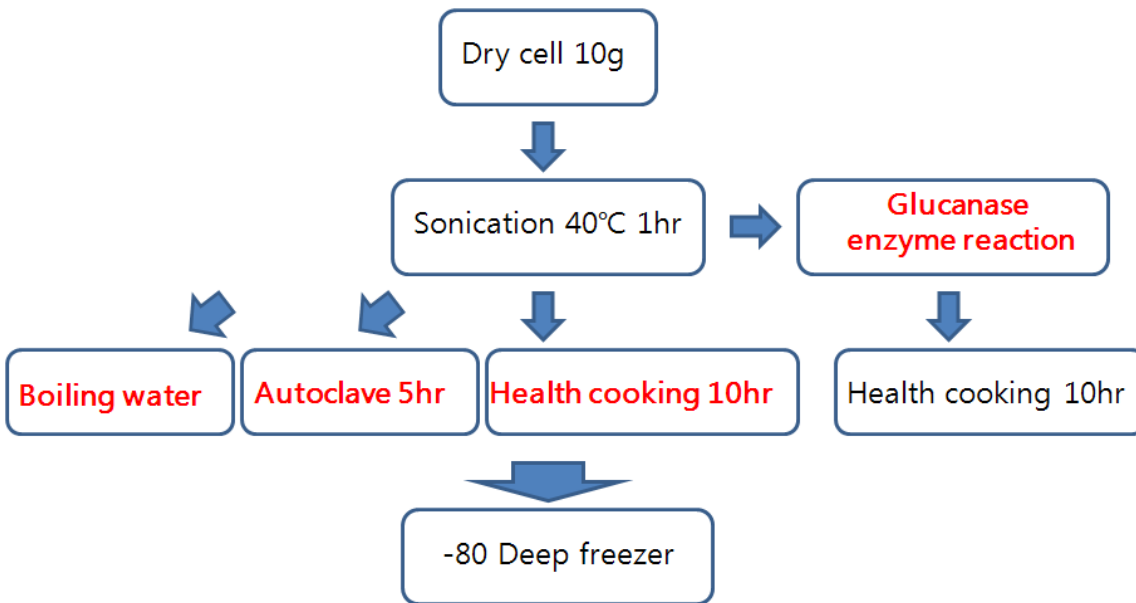
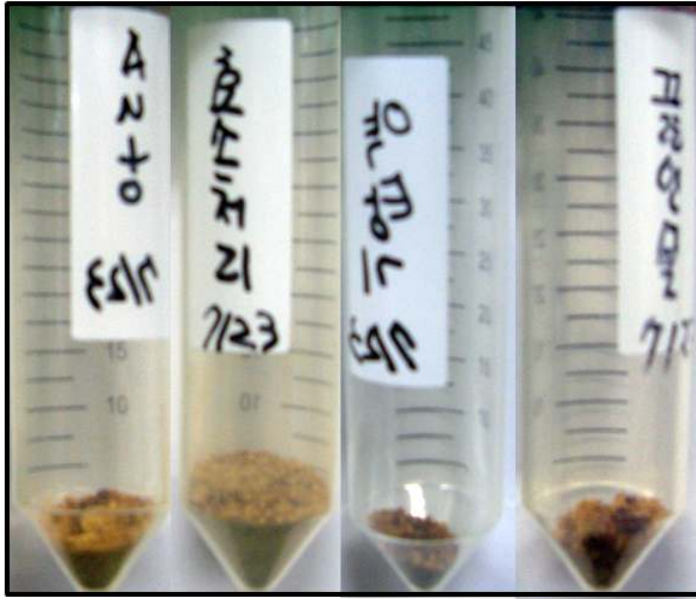
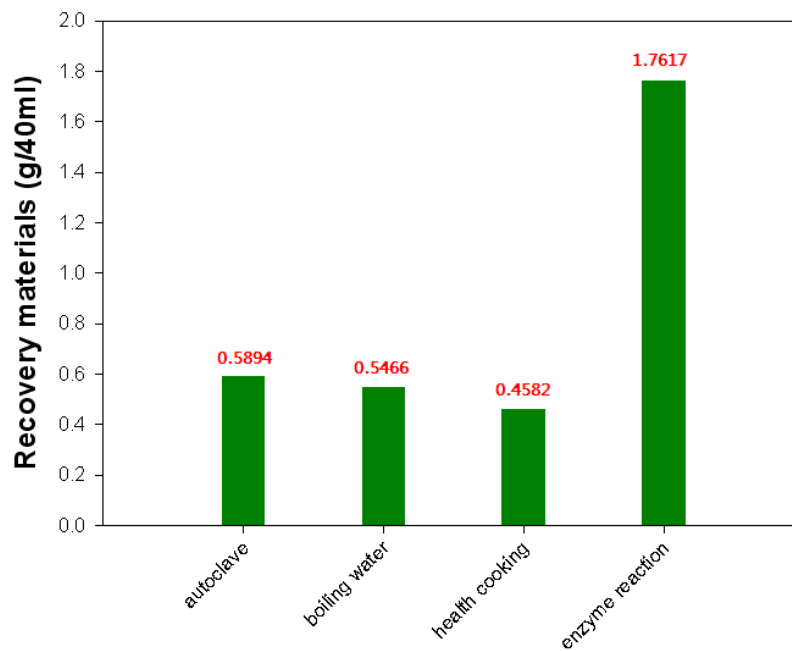


Figure 1-79. Four kinds of extraction method applied for the extraction of proteineous polysaccharides with β -D-glucan structure, from cell walls of the mycelia of *Inonotus obliquus* obtained through suspended mycelial fermentations



Enzyme reaction > autoclave , boiling water > health cooking

Figure 1–80. Crude extracts obtained from the mycelia of *Inonotus obliquus* through applying four kinds of extraction methods (from the left: autoclave, enzyme reaction, health cooking, boiling water)



	Autoclave	Boiling water	Health cooking	Enzyme reaction
Recovery percentage	29.45%	27.33%	22.91%	88.085%

Figure 1–81. Comparison of the amounts of the extracted crude materials from the mycelia of *Inonotus obliquus* through applying the various extraction methods above

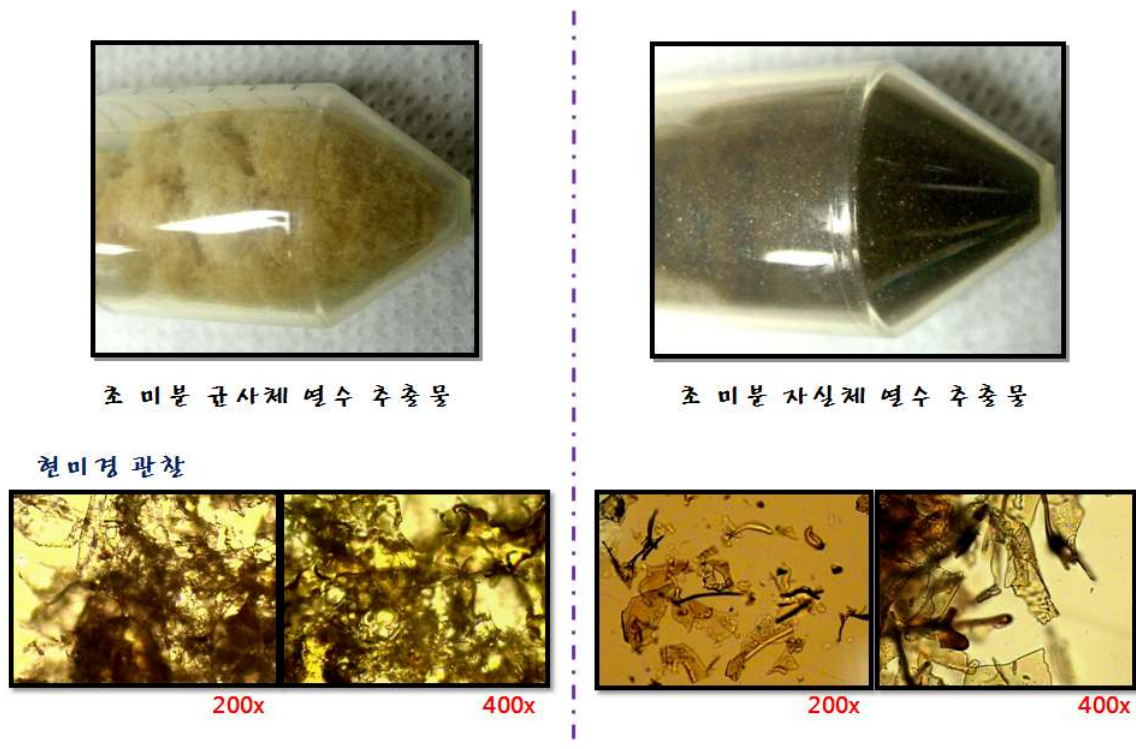
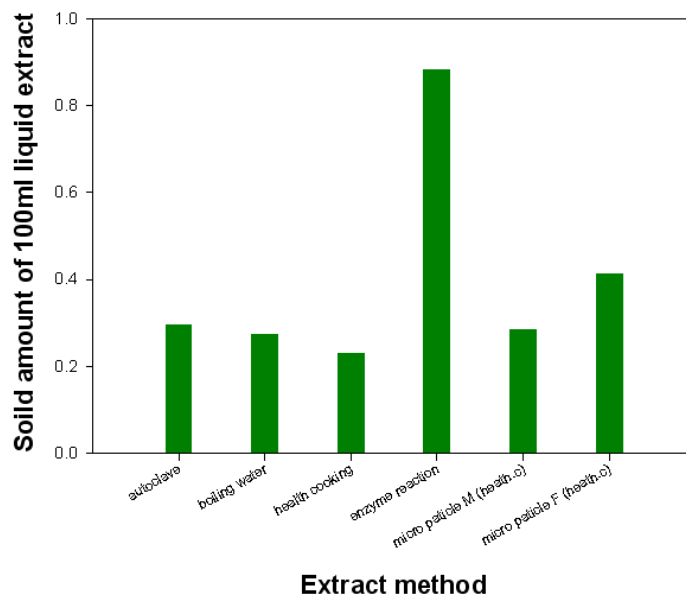


Figure 1-82. Morphology of crude extracts from the very finely ground mycelia and fruit body of *I. obliquus*(top), and microphotographs of each extracts (bottom)



	Autoclave	Boiling water	Health cooking	Enzyme reaction	Mycelia micro particle	Fruit body micro particle
Recovery percentage	29.45%	27.33%	22.91%	88.085%	24.14286%	34.85021%

← Health cooking →

Figure 1-83. Comparison of the amounts of the extracted crude materials from the mycelia of *Inonotus obliquus* through applying various extraction methods

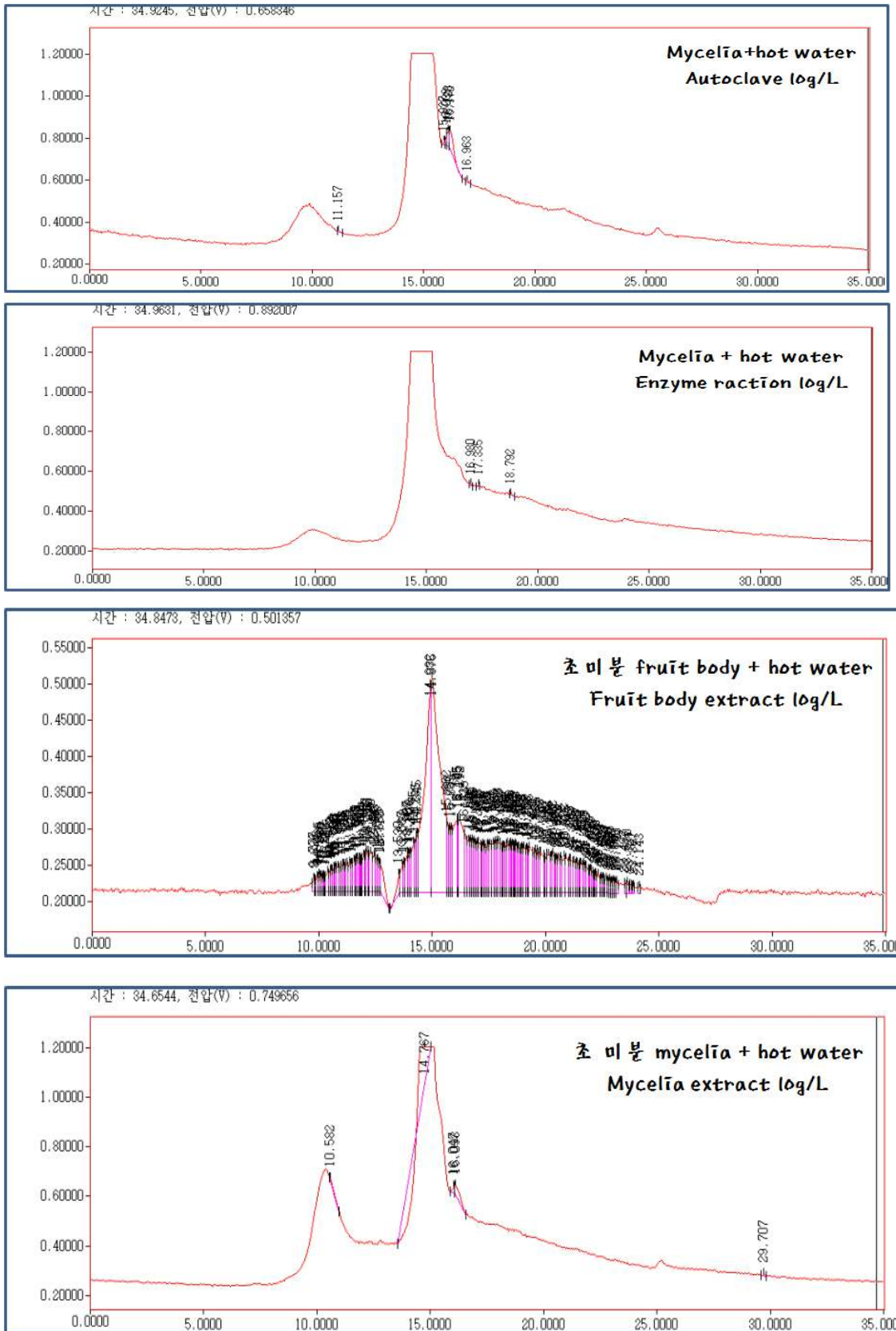


Figure 1-84. HPLC chromatogram for the analysis of proteineous polysaccharides with β -D-glucan structure (from the top: crude extracts from the ground mycelia; from the ground mycelia with enzyme treatment; from the very finely ground fruit body (fruit body microparticle)); from the very finely ground mycelia (mycelia microparticle)

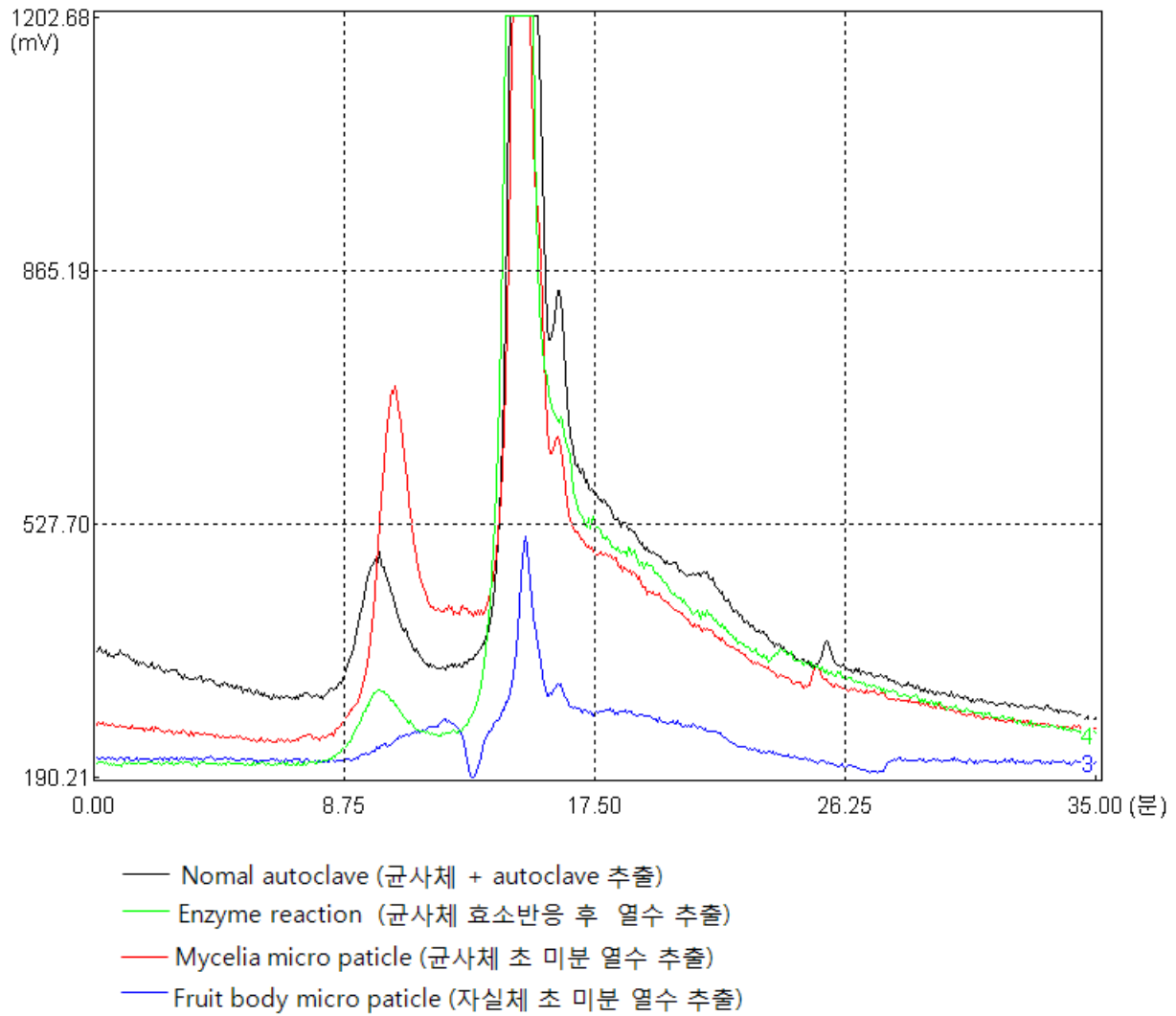


Figure 1-85. Comparison of HPLC chromatogram for the extracted proteineous polysaccharides with β -D-glucan structure from both the mycelia and fruit body of *Inonotus obliquus*. (Note: Various extraction methods were applied and the small peaks in the left are the peaks of proteineous polysaccharides with β -D-glucan structure.)

(From the highest polysaccharides peak: crude extracts from the very finely ground mycelia (mycelia microparticle); from the ground mycelia; from the ground mycelia with enzyme treatment; from the very finely ground fruit body (fruit body microparticle))

Table 1-1. Medium composition for the solid growth culture

MYA media	
Malt extract	20 (g/L)
Yeast extract	2 (g/L)
Agar powder	20 (g/L)

Table 1-2. Medium composition for the static-culture

Static media	
Glucose	22.5(g/L)
Yeast extract	2 (g/L)
Soytone peptone	2 (g/L)
KH ₂ PO ₄	2 (g/L)
MgSO ₄	0.6 (g/L)

Table 1-3. Medium composition for the liquid growth culture

Liquid growth culture (shake flask and fermenter cultures)	
Glucose	30 (g/L)
Brown rice	10 (g/L)
Yeast extract	8 (g/L)
Soytone peptone	4 (g/L)
K ₂ HPO ₄	2 (g/L)
MgSO ₄	0.6 (g/L)
FeSO ₄ (Stock : 10g/L)	1 (ml/L)

Table 1–4. Medium composition for (A) IPS production and (B) EPS production cultures
(A)

Liquid growth culture for IPS production (shake flask and fermenter cultures)	
Glucose	30 (g/L)
Brown rice(enzyme-treated)	10 (g/L)
Yeast extract	8 (g/L)
Soytone peptone	4 (g/L)
K ₂ HPO ₄	2 (g/L)
MgSO ₄	0.6 (g/L)
FeSO ₄ (Stock : 10g/L)	1 (ml/L)

(B)

Liquid production culture for EPS production (shake flask and fermenter cultures)	
Glucose	30 (g/L)
ammonium tartrate	8 (g/L)
Yeast extract	2 (g/L)
K ₂ HPO ₄	2 (g/L)
MgSO ₄	0.6 (g/L)
FeSO ₄ (Stock : 10g/L)	1 (ml/L)

Table 1–5. Medium composition for the regeneration of protoplasts

Regeneration media	
Peptone	1 (g/L)
Yeast extract	5 (g/L)
Sucrose	1.2 M
Agar powder	20(g/L)

Table 1–6. Plackett–Burman design for twelve–trials used to study eleven medium components in *Inonotus obliquus* fermentation

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	H	Diameter
1	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	
2	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	
3	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	
4	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	
5	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	
6	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	
7	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	
8	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	
9	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	
10	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	
11	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	
12	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	

Table 1–7. Sequences of the primers for the cloning of gpd promoter

Primer	Primer sequence
gpd–A	5' – GGTCATATGACTAGTGGGTGCT ATTAGAAG –3'
gpd–A	5' – AATGGATCCGAACATGTAGACC ATGTACTC –3'

Table 1–8. Sequences of hmb1 gene primers for PCR amplification

Primer	sequence	linker
forward primer	5'–taggatccatgccgctcacaccagag–3'	<i>Bam</i> HI
reverse primer	5'–gagaattctcagcccttgcttgctt–3'	<i>Eco</i> RI

Table 1–9. Various kinds of solid growth media(SGM) for the cultivation of mycelial cells of *Inonotus obliquus*

MYA		MA		PDA	
Malt extract	20 (g/L)	Malt extract	20 (g/L)	PDA	39 (g/L)
Yeast extract	2 (g/L)	Agar	10 (g/L)		
Agar	10 (g/L)	MGA			
PDYA		Malt extract	20 (g/L)		
PDA	39 (g/L)	Glucose	10 (g/L)		
Yeast extract	2 (g/L)	Agar	10 (g/L)		

Table 1–10. un table for the 1st Plackett–Burman design experiment

Main effect	Factors	Ingredient(g/l)		Trials (combination)											
		+	–	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Glucose	30	20	+	+	–	–	+	–	+	–	+	+	–	–
	Brown rice	10	5	+	–	–	+	+	+	+	–	–	–	–	+
	Malt extract	20	10	–	–	+	+	–	+	+	–	+	+	–	–
	Yeast extract	6	4	+	–	+	+	+	–	–	+	–	+	–	–
	Soytone peptone	4	2	–	+	+	–	+	+	+	+	–	–	–	–
	KH ₂ PO ₄	2	0	–	+	–	+	–	–	+	+	–	+	–	+
	MgSO ₄	1	0	–	+	+	+	+	–	–	–	+	–	–	+
	FeSO ₄	0.01	0	+	–	+	–	–	–	+	+	+	–	–	+
	CaCl ₂	2	0	+	+	–	+	–	+	–	+	+	–	–	–
	Corn oil	10	5	+	+	+	–	–	+	–	–	–	+	–	+
	Dummy	0	0	–	–	–	–	+	+	–	+	+	+	–	+
	Diameter														

Table 1–11. Run table for the 2nd Plackett–Burman design experiment

Run	Block	Factor 1 A:Glucose	Factor 2 B:Brown rice	Factor 3 C:Starch	Factor 4 D:Corn meal	Factor 5 E:Yeast	Factor 6 F:Peptone	Factor 7 G:Corn steep li	Factor 8 H:(NH ₂) ₄ SO ₄	Factor 9 J:KH ₂ PO ₄	Factor 10 K:MgSO ₄	Factor 11 L:Dummy	Response 1 Diameter mm
1	Block	1.00	-1.00	1.00	-1.00	-1.00	-1.00	1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	
2	Block	1.00	-1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	-1.00	-1.00	-1.00	1.00	1.00	
3	Block	-1.00	1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	-1.00	-1.00	
4	Block	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	
5	Block	-1.00	-1.00	-1.00	1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	
6	Block	1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	-1.00	-1.00	-1.00	
7	Block	-1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	-1.00	-1.00	-1.00	1.00	1.00	1.00	
8	Block	-1.00	1.00	-1.00	-1.00	-1.00	1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	1.00	
9	Block	1.00	-1.00	-1.00	-1.00	1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	1.00	-1.00	
10	Block	1.00	1.00	-1.00	1.00	-1.00	-1.00	-1.00	1.00	1.00	1.00	-1.00	
11	Block	-1.00	-1.00	1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	-1.00	
12	Block	1.00	1.00	-1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	-1.00	-1.00	-1.00	1.00	

Table 1–12. ANOVA analysis of the 2nd Plackett–Burman design experiment












	Term	Stdized Effects	Sum of Squares	% Contribution
	Intercept			
	A Glucose	4.33	56.33	30.51
	B Brown rice	4.67	65.33	35.38
	C Soluble starch	0.000	0.000	0.000
	D Corn meal	2.33	16.33	8.84
	E Yeast extract	1.67	8.33	4.51
	F Peptone	-2.00	12.00	6.50
	G Corn steep liquor	-0.33	0.33	0.18
	H Ammonium sulfate	0.33	0.33	0.18
	J Potassium phosphate	-1.67	8.33	4.51
	K Magnesium sulfate	2.00	12.00	6.50
	L Dummy	1.33	5.33	2.89

Table 1–13. Run table for the 3rd Plackett–Burman design experiment

Main effect	Factors	Ingredient(g/l)		Trials (combination)											
		+	–	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Glucose	30	20	+	+	–	–	+	–	+	–	+	+	–	–
	Brown rice	10	5	+	–	–	+	+	+	+	–	–	–	–	+
	Malt extract	20	10	–	–	+	+	–	+	+	–	+	+	–	–
	Yeast extract	6	4	+	–	+	+	+	–	–	+	–	+	–	–
	Soytone peptone	4	2	–	+	+	–	+	+	+	+	–	–	–	–
	KH ₂ PO ₄	2	0	–	+	–	+	–	–	+	+	–	+	–	+
	MgSO ₄	1	0	–	+	+	+	+	–	–	–	+	–	–	+
	FeSO ₄	0.01	0	+	–	+	–	–	–	+	+	+	–	–	+
	CaCl ₂	2	0	+	+	–	+	–	+	–	+	+	–	–	–
	Dummy	10	5	+	+	+	–	–	+	–	–	–	+	–	+
	Dummy	0	0	–	–	–	–	+	+	–	+	+	+	–	+
	Diameter														

Table 1–14. Analysis of the 3rd Plackett–Burman design experiment (20 days cultivation on the solid growth medium)

Std	Run	Block	Factor 1 A:Glucose g/L	Factor 2 B:Brown rice g/L	Factor 3 C:Malt extract g/L	Factor 4 D:Yeast extract g/L	Factor 5 E:Soytone pep g/L	Factor 6 F:KH ₂ PO ₄ g/L	Factor 7 G:MgSO ₄ g/L	Factor 8 H:FeSO ₄ mL	Factor 9 J:CaCl ₂ g/L	Factor 10 K:Dummy1 g/L	Factor 11 L:Dummy2 g/L	Response 1 Diameter cm
8	1	Block 1	-1.00	-1.00	1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	-1.00	8.6
4	2	Block 1	1.00	-1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	-1.00	-1.00	-1.00	1.00	1.00	6.5
3	3	Block 1	-1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	-1.00	-1.00	-1.00	1.00	1.00	1.00	9
2	4	Block 1	1.00	1.00	-1.00	1.00	-1.00	-1.00	-1.00	1.00	1.00	1.00	-1.00	7.9
7	5	Block 1	-1.00	1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	-1.00	-1.00	9.2
5	6	Block 1	1.00	1.00	-1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	-1.00	-1.00	-1.00	1.00	8.6
1	7	Block 1	1.00	-1.00	1.00	-1.00	-1.00	-1.00	1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	8
11	8	Block 1	-1.00	1.00	-1.00	-1.00	-1.00	1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	1.00	9
10	9	Block 1	1.00	-1.00	-1.00	-1.00	1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	1.00	-1.00	8.6
6	10	Block 1	1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	-1.00	-1.00	-1.00	7.8
9	11	Block 1	-1.00	-1.00	-1.00	1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	8
12	12	Block 1	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	8

Control

Malt extract : 20 (g/L) **➔** **7.1 (cm)**

Agar power : 20 (g/L)

Table 1–15. Polynomial equation derived from the analysis of the 3rd Plackett–Burman design experiment

$$\begin{aligned} \text{Diameter} = & +8.26667 - 0.36667 * \text{Glucose} + 0.31667 * \text{Brown rice} - 0.083 * \text{Malt extract} - 0.13 * \text{Yeast extract} \\ & + 0.16667 * \text{Soytone peptone} - 0.083333 * \text{KH}_2\text{PO}_4 + 0.4000 * \text{MgSO}_4 - 0.050 * \text{FeSO}_4 + 0.18333 * \text{CaCl}_2 \\ & - 0.000001 * \text{Dummy1} - 0.083333 * \text{Dummy2} \end{aligned}$$

Table 1–16. ANOVA analysis of the 3rd Plackett–Burman design experiment

<i>Transform</i>	<i>Effects</i>	<i>ANOVA</i>	<i>Diagnostics</i>	<i>Model Graphs</i>
Term	Stdized Effects	Sum of Squares	% Contribution	
Intercept				
A	-0.73	1.61	27.04	
B	0.63	1.20	20.17	
C	-0.17	0.083	1.40	
D	-0.27	0.21	3.58	
E	0.33	0.33	5.59	
F	-0.17	0.083	1.40	
G	0.80	1.92	32.18	
H	-0.100	0.030	0.50	
J	0.37	0.40	6.76	
K	0.000	0.000	0.000	
L	-0.17	0.083	1.40	

Table 1-17. Run table of the fractional factorial design(FFD) experiment for mycelial growth on the solid growth medium

Name	Units	Type	Std. Dev.	Low	High
Glucose	g/L	Factor	0	15	25
Brown rice	g/L	Factor	0	5	10
Yeast extract	g/L	Factor	0	3	6
Peptone	g/L	Factor	0	3	6
Magnesium su	g/L	Factor	0	1	2
Diameter	mm	Response	0		

Std	Run	Block	Factor 1 A:Glucose g/L	Factor 2 B:Brown rice g/L	Factor 3 C:Yeast extrac g/L	Factor 4 D:Peptone g/L	Factor 5 E:Magnesium s g/L	Response 1 Diameter mm
6	1	Block 1	25.00	5.00	6.00	3.00	2.00	
11	2	Block 1	15.00	10.00	3.00	6.00	2.00	
4	3	Block 1	25.00	10.00	3.00	3.00	2.00	
17	4	Block 1	20.00	7.50	4.50	4.50	1.50	
18	5	Block 1	20.00	7.50	4.50	4.50	1.50	
13	6	Block 1	15.00	5.00	6.00	6.00	2.00	
5	7	Block 1	15.00	5.00	6.00	3.00	1.00	
14	8	Block 1	25.00	5.00	6.00	6.00	1.00	
12	9	Block 1	25.00	10.00	3.00	6.00	1.00	
10	10	Block 1	25.00	5.00	3.00	6.00	2.00	
8	11	Block 1	25.00	10.00	6.00	3.00	1.00	
15	12	Block 1	15.00	10.00	6.00	6.00	1.00	
9	13	Block 1	15.00	5.00	3.00	6.00	1.00	
7	14	Block 1	15.00	10.00	6.00	3.00	2.00	
3	15	Block 1	15.00	10.00	3.00	3.00	1.00	
16	16	Block 1	25.00	10.00	6.00	6.00	2.00	
2	17	Block 1	25.00	5.00	3.00	3.00	1.00	
1	18	Block 1	15.00	5.00	3.00	3.00	2.00	

Table 1-18. Analysis of the fractional factorial design experiment

Term	Stdized Effects	Sum of Squares	% Contribution
Intercept			
A (Glucose)	1.00	4.00	0.45
B (Brown rice)	2.25	20.25	2.30
C (Yeast extract)	-4.00	64.00	7.25
D (Peptone)	6.75	182.25	20.66
E (MgSO ₄)	8.50	289.00	32.76

Diameter = +1.00 (glucose) +2.25(Brown rice) -4.00 (Yeast extract)
+6.75 (Peptone) +8.5 (Magnesium sulfate) +65.61

Table 1–19. Run table for the experiment by the steepest ascent method

<u>Steepest ascent method</u>					
	Glucose	Brown rice	Yeast extract	Peptone	Magnesium sulfate
center point	20	7.5	4.5	4.5	1.5
origin step	5	2.5	1.5	1.5	0.5
main effect	1	2.25	-4	6.75	8.5
coefficient	0.5	1.125	-2	3.375	4.25
r value	6				
slope value	0.50	1.14	-2.02	3.42	4.31
new step	2.53	2.85	-3.04	5.13	2.15
New step (new step x 1/10)	0.25	0.28	-0.30	0.51	0.21

Table 1–20. Experimental results performed according to the design of the steepest ascent method

Experiments	Glucose (g/L)	Brown rice (g/L)	Yeast extract (g/L)	Peptone (g/L)	Magnesium sulfate (g/L)	Diameter (mm)
Center point	20.00	7.50	4.50	4.50	1.50	66
1	20.25	7.78	4.19	5.01	1.17	67
2	20.50	8.07	3.89	5.52	1.93	70
3	20.76	8.35	3.58	6.04	2.14	74
4	21.01	8.64	3.28	6.55	2.36	70
5	21.26	8.92	2.97	7.06	2.57	75
6	21.52	9.21	2.67	7.58	2.79	71
7	21.77	9.49	2.36	8.09	3.00	70
8	22.02	9.78	2.06	8.60	3.22	60
9	22.28	10.06	1.76	9.12	3.44	73
10	22.53	10.35	1.45	9.63	3.65	80
11	22.78	10.63	1.15	10.41	3.86	72
12	23.03	10.91	0.85	10.65	4.07	85
13	23.28	11.19	0.55	11.16	4.28	78
14	23.53	11.47	0.25	11.67	4.49	86
15	23.78	11.75	0	12.18	4.7	86

Table 1–21. Assigned concentrations(g/L) of the variables at different levels of the respective medium components (central composite design)

	-2	-1	0	1	2
Glucose	16	20	24	28	32
Brown rice	8	10	12	14	16
Peptone (primagen p)	8	10	12	14	16
Magnesium sulfate	3	4	5	6	7

Table 1–22. Experimental design and the results of the central composite design(CCD) experiments

	Std	Run	Block	Factor 1 A:Glucose g/L	Factor 2 B:Brown rice g/L	Factor 3 C:Peptone (pri g/L	Factor 4 D:Magnesium s g/L	Response 1 Diameter mm
	24	1	Block 1	24.00	12.00	12.00	7.00	80
	21	2	Block 1	24.00	12.00	8.00	5.00	71
	12	3	Block 1	28.00	14.00	10.00	6.00	80
	27	4	Block 1	24.00	12.00	12.00	5.00	82
	2	5	Block 1	28.00	10.00	10.00	4.00	75
	10	6	Block 1	28.00	10.00	10.00	6.00	70
	4	7	Block 1	28.00	14.00	10.00	4.00	72
	28	8	Block 1	24.00	12.00	12.00	5.00	84
	23	9	Block 1	24.00	12.00	12.00	3.00	72
	8	10	Block 1	28.00	14.00	14.00	4.00	74
	30	11	Block 1	24.00	12.00	12.00	5.00	81
	17	12	Block 1	16.00	12.00	12.00	5.00	72
	19	13	Block 1	24.00	8.00	12.00	5.00	80
	13	14	Block 1	20.00	10.00	14.00	6.00	72
	1	15	Block 1	20.00	10.00	10.00	4.00	76
	11	16	Block 1	20.00	14.00	10.00	6.00	72
	29	17	Block 1	24.00	12.00	12.00	5.00	81
	25	18	Block 1	24.00	12.00	12.00	5.00	83
	26	19	Block 1	24.00	12.00	12.00	5.00	78
	9	20	Block 1	20.00	10.00	10.00	6.00	75
	14	21	Block 1	28.00	10.00	14.00	6.00	83
	22	22	Block 1	24.00	12.00	16.00	5.00	76
	6	23	Block 1	28.00	10.00	14.00	4.00	73
	16	24	Block 1	28.00	14.00	14.00	6.00	76
	3	25	Block 1	20.00	14.00	10.00	4.00	73
	15	26	Block 1	20.00	14.00	14.00	6.00	72
	20	27	Block 1	24.00	16.00	12.00	5.00	80
	5	28	Block 1	20.00	10.00	14.00	4.00	74
	7	29	Block 1	20.00	14.00	14.00	4.00	74
	18	30	Block 1	32.00	12.00	12.00	5.00	75

Table 1–23. Analysis of variance(ANOVA) for the response surface quadratic model

ANOVA for Response Surface Quadratic Model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares]						
Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	370.88	14	26.49	2.97	0.0224	significant
A	18.38	1	18.38	2.06	0.1719	
B	1.04	1	1.04	0.12	0.7374	
C	9.38	1	9.38	1.05	0.3217	
D	26.04	1	26.04	2.92	0.1083	
A ²	135.03	1	135.03	15.12	0.0015	
B ²	9.67	1	9.67	1.08	0.3145	
C ²	135.03	1	135.03	15.12	0.0015	
D ²	69.67	1	69.67	7.80	0.0136	
AB	3.06	1	3.06	0.34	0.5668	
AC	10.56	1	10.56	1.18	0.2939	
AD	27.56	1	27.56	3.09	0.0993	
BC	3.06	1	3.06	0.34	0.5668	
BD	1.56	1	1.56	0.18	0.6816	
CD	3.06	1	3.06	0.34	0.5668	
Residual	133.92	15	8.93			
Lack of Fit	112.42	10	11.24	2.61	0.1502	not significant
Pure Error	21.50	5	4.30			
Cor Total	504.80	29				

Table 1–24. Optimum concentrations of the solid growth medium estimated by the response surface quadratic model.

Solutions							
Number	Glucose	Brown rice	Peptone (prim	Magnesium su	Diameter	Desirability	
1	<u>25.61</u>	<u>12.03</u>	<u>12.53</u>	<u>5.53</u>	<u>82.0352</u>	<u>0.860</u>	<u>Selected</u>

Table 1–25. diameter according to various nitrogen source

Nitrogen source	Diameter(mm)	
	12days	14days
Cotton seed flour	65mm	81mm
Casein Enzymatic hydrolysate	75mm	80mm
Peptone(N-Z-soy BL7)	64mm	75mm
peptone (primatone HS)	53mm	65mm
peptone (primatone CLT)	63mm	72mm
Bacto peptone	57mm	67mm
Peptone enzymatic hydrolysate	72mm	77mm

Table 1–26. Distribution of cell growth extent of the variants derived from protoplasts of the high–yielding mother strain, OBLQ89

Distribution of cell growth extent of the variants derived from the protoplasts of the mother strain, OBLQ89 (screened from the solid state cultures for 11 days)	
Range of cell growth extent (mm diameter)	Number of colonies and remarks
31–35	5
34–40	13
41–45	18
46–50	26
51–55	34
56–60	21
61–65	5 (OBLQ234 strain was selected due to its rapid cell growth and low production of pigments)
Total	122

Table 1–27. Distribution of the cell growth extent of the variants derived from protoplasts of the high–yielding mother strain, OBLQ 234

Distribution of cell growth extent of the variants derived from the protoplasts of the mother strain, OBLQ234 (screened from the solid state cultures for 12 days)	
Range of cell growth extent (mm diameter)	Number of colonies and remarks
30–40	3
41–45	11
46–50	18
51–55	17
56–60	24
61–65	36
66–70	27
71–75	14
76–80	11
81–85	7 (The strains of OBLQ 432, 528 and 756 were selected due to their rapid cell growth high density)
Total	168

Table 1–28. High and low factor of Plackett–Burman design(11 components)

	Glucose (g/L)	Fructose (g/L)	Casein Enzymatic hydrolysate (g/L)	Ammonium Tatrate (g/L)	Yeast extract (g/L)	Soytone peptone (g/L)	Ammonium phosphate mono (g/L)	Ammonium phosphate dibasic (g/L)	FeSO4 (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	MgSO ₄ (g/L)
+	30	30	3	3	6	6	4	4	1	5	2
–	15	15	0	0	3	3	2	2	0	2	1

Table 1–29. Main effects of Plackett–Burman design

	Term	Stdized Effects	Sum of Squares	% Contribution
	Intercept			
M	A	0.065	0.013	0.055
M	B	0.70	1.48	6.33
M	C	0.63	1.19	5.08
M	D	-1.05	3.32	14.25
M	E	0.34	0.35	1.49
M	F	1.07	3.46	14.82
M	G	-0.20	0.12	0.50
M	H	0.92	2.52	10.82
M	J	-0.26	0.20	0.86
M	K	1.53	7.06	30.27
M	L	-1.10	3.62	15.52

A : Glucose
 B : Fructose
 C : Casin enzymetic hydrolysate
 D : Ammonium tartrate
 E : Yeast extract
 F : Soytone peptone
 G : Ammonium phosphate mo
 H : Ammonium phosphate di
 J : FeSO_4
 K : KH_2PO_4
 L : MgSO_4

Table 1–30. Levels of each medium component for 4–factor full factorial design(FFD)

	Glucose	Fructose	Casein enzymatic hydrolysate	Soytone
+	15	30	5	8
–	7.5	15	0	4

Table 1–31. Experimental matrix for 4–factor full factorial design(FFD) and the resulting mycelial growth of *I. obliquus*(DCW)

Std	Run	Block	Factor 1 A:glucose g/L	Factor 2 B:fructose g/L	Factor 3 C:casein enzy g/L	Factor 4 D:soytone pep g/L	Response 1 d.c.w g/L
2	1	Block 1	15.00	15.00	0.00	4.00	13.418
5	2	Block 1	7.50	15.00	5.00	4.00	13.95
12	3	Block 1	15.00	30.00	0.00	8.00	12.696
17	4	Block 1	11.25	22.50	2.50	6.00	13.848
6	5	Block 1	15.00	15.00	5.00	4.00	13.058
7	6	Block 1	7.50	30.00	5.00	4.00	14.426
1	7	Block 1	7.50	15.00	0.00	4.00	11.822
19	8	Block 1	11.25	22.50	2.50	6.00	12.362
13	9	Block 1	7.50	15.00	5.00	8.00	13.64
3	10	Block 1	7.50	30.00	0.00	4.00	11.924
15	11	Block 1	7.50	30.00	5.00	8.00	15.012
18	12	Block 1	11.25	22.50	2.50	6.00	12.752
4	13	Block 1	15.00	30.00	0.00	4.00	13.704
14	14	Block 1	15.00	15.00	5.00	8.00	14.226
16	15	Block 1	15.00	30.00	5.00	8.00	14.4
10	16	Block 1	15.00	15.00	0.00	8.00	12.028
8	17	Block 1	15.00	30.00	5.00	4.00	14.308
11	18	Block 1	7.50	30.00	0.00	8.00	12.494
9	19	Block 1	7.50	15.00	0.00	8.00	11.502

Table 1–32. Analysis of variance(ANOVA) for the 4–factor full factorial design(FFD) experiment

Response: d.c.w						
ANOVA for Selected Factorial Model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares]						
Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	16.52	10	1.65	4.34	0.0320	significant
A	0.59	1	0.59	1.54	0.2540	
B	1.77	1	1.77	4.64	0.0681	
C	11.28	1	11.28	29.60	0.0010	
D	0.023	1	0.023	0.061	0.8113	
AB	0.020	1	0.020	0.052	0.8258	
AC	1.65	1	1.65	4.33	0.0759	
AD	0.17	1	0.17	0.45	0.5220	
BC	0.094	1	0.094	0.25	0.6352	
BD	0.075	1	0.075	0.20	0.6716	
CD	0.85	1	0.85	2.23	0.1793	
Curvature	0.23	1	0.23	0.60	0.4641	not significant
Residual	2.67	7	0.38			
Lack of Fit	1.48	5	0.30	0.50	0.7707	not significant
Pure Error	1.19	2	0.59			
Cor Total	19.41	18				

Table 1–33. Main effect of medium components in 4–factor full factorial design experiment

	Term	Stdized Effects	Sum of Squares	% Contribution
	Intercept			
M	A	0.38	0.59	3.03
M	B	0.66	1.77	9.11
M	C	1.68	11.28	58.09
M	D	-0.077	0.023	0.12
M	AB	-0.070	0.020	0.10
M	AC	-0.64	1.65	8.51
M	AD	-0.21	0.17	0.89
M	BC	0.15	0.094	0.48
M	BD	0.14	0.075	0.38
M	CD	0.46	0.85	4.37

Table 1–34. Levels of each medium component for 5–factor fractional factorial design(FFD)

	Glucose	Fructose	Casein enzymatic hydrolysate	Soytone peptone	Ammonium phosphate di
+	15	30	5	8	3
-	7.5	15	0	4	0

Table 1–35. Experimental matrix for 5–factor fractional factorial design(FFD) and the resulting mycelial growth of *I. obliquus*(DCW)

Std	Run	Block	Factor 1 A:glucose g/L	Factor 2 B:fructose g/L	Factor 3 C:casein enzym g/L	Factor 4 D:soytone pep g/L	Factor 5 E:ammonium pt g/L	Response 1 D.C.W g/L
36	1	Block 1	11.25	22.50	2.50	6.00	1.50	13.804
19	2	Block 1	7.50	30.00	0.00	4.00	3.00	16.456
32	3	Block 1	15.00	30.00	5.00	8.00	3.00	13.636
9	4	Block 1	7.50	15.00	0.00	8.00	0.00	12.774
34	5	Block 1	11.25	22.50	2.50	6.00	1.50	13.224
7	6	Block 1	7.50	30.00	5.00	4.00	0.00	16.472
4	7	Block 1	15.00	30.00	0.00	4.00	0.00	15.978
16	8	Block 1	15.00	30.00	5.00	8.00	0.00	16.052
13	9	Block 1	7.50	15.00	5.00	8.00	0.00	13.892
38	10	Block 1	11.25	22.50	2.50	6.00	1.50	12.088
21	11	Block 1	7.50	15.00	5.00	4.00	3.00	15.774
6	12	Block 1	15.00	15.00	5.00	4.00	0.00	14.402
3	13	Block 1	7.50	30.00	0.00	4.00	0.00	13.098
25	14	Block 1	7.50	15.00	0.00	8.00	3.00	11.95
2	15	Block 1	15.00	15.00	0.00	4.00	0.00	14.538
5	16	Block 1	7.50	15.00	5.00	4.00	0.00	13.612
1	17	Block 1	7.50	15.00	0.00	4.00	0.00	12.938
27	18	Block 1	7.50	30.00	0.00	8.00	3.00	13.176
14	19	Block 1	15.00	15.00	5.00	8.00	0.00	14.45
33	20	Block 1	11.25	22.50	2.50	6.00	1.50	12.744
31	21	Block 1	7.50	30.00	5.00	8.00	3.00	14.948
24	22	Block 1	15.00	30.00	5.00	4.00	3.00	13.322

Table 1–36. Analysis of variance(ANOVA) for the 5–factor fractional factorial design(FFD) experiment

Response: D.C.W						
ANOVA for Selected Factorial Model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares]						
Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	60.41	15	4.03	2.65	0.0202	significant
A	0.20	1	0.20	0.13	0.7191	
B	11.45	1	11.45	7.52	0.0122	
C	0.83	1	0.83	0.55	0.4681	
D	1.65	1	1.65	1.09	0.3089	
E	12.44	1	12.44	8.18	0.0094	
AB	1.14	1	1.14	0.75	0.3962	
AC	10.79	1	10.79	7.09	0.0146	
AD	0.40	1	0.40	0.26	0.6140	
AE	12.10	1	12.10	7.95	0.0102	
BC	1.04	1	1.04	0.68	0.4184	
BD	1.23	1	1.23	0.81	0.3795	
BE	3.27	1	3.27	2.15	0.1575	
CD	0.85	1	0.85	0.56	0.4637	
CE	0.34	1	0.34	0.22	0.6419	
DE	2.69	1	2.69	1.77	0.1980	
Curvature	3.03	1	3.03	1.99	0.1726	not significant
Residual	31.95	21	1.52			
Lack of Fit	29.19	16	1.82	3.30	0.0961	not significant
Pure Error	2.76	5	0.55			
Cor Total	95.40	37				

Table 1–37. Main effect of medium components in 5–factor fractional factorial design experiment

Term	Stdized Effects	Sum of Squares	% Contribution
Intercept			
A	-0.16	0.20	0.21
B	1.20	11.45	12.00
C	0.32	0.83	0.87
D	-0.45	1.65	1.73
E	-1.25	12.44	13.04
AB	-0.38	1.14	1.20
AC	-1.16	10.79	11.31
AD	0.22	0.40	0.42
AE	-1.23	12.10	12.69
BC	0.36	1.04	1.09
BD	-0.39	1.23	1.29
BE	0.64	3.27	3.43
CD	0.33	0.85	0.89
CE	-0.21	0.34	0.35
DE	-0.58	2.69	2.82

Table 1–38. Experimental design for the optimization of production medium concentration through 4–factor steepest ascent method(SAM)

(A) Experimental design according to SAM

	Glucose	Fructose	Casein Enzymatic Hydrolysate	Soytone Peptone
center point	11.25	22.5	2.5	6
origin step	3.75	7.5	2.5	2
main effect	0.38	0.66	1.68	-0.077
coefficient	0.19	0.33	0.84	-0.0385
r value	1			
slope value	0.205831975	0.357497641	0.909993996	-0.041708058
new step	0.771869907	2.681232309	2.274984989	-0.083416116

(B) Run table for the shake flask experiments designed by SAM

new step	Glucose	Fructose	Casein enzymatic hydrolysate	Soytone peptone
new step	0.77	2.68	2.27	-0.08
1	11.25	22.5	2.5	6
2	12.02	25.18	4.77	5.92
3	12.79	27.86	7.05	5.83
4	13.57	30.54	9.32	5.75
5	14.34	33.22	11.6	5.67
6	15.11	35.91	13.87	5.58
7	15.88	38.59	16.15	5.5
8	16.65	41.27	18.42	5.42
9	17.42	43.95	20.7	5.33
10	18.2	46.63	22.97	5.25
11	18.97	49.31	25.25	5.17
12	19.74	51.99	27.52	5.08
13	20.51	54.67	29.8	5
14	21.28	57.36	32.07	4.92
15	22.05	60.04	34.34	4.84

Table 1–39. Experimental design for the optimization of production medium concentration through 5–factor steepest ascent method(SAM)

(A) Experimental design according to SAM

	Glucose	Fructose	Casein enzymatic hydrolysate	Soytone peptone	Ammonium phosphate dibasic
center point	11.25	22.5	2.5	6	1.5
origin step	3.75	7.5	2.5	2	1.5
main effect	–0.16	1.2	0.32	–0.45	–1.25
coefficient	–0.08	0.6	0.16	–0.225	–0.625
r value	1				
slope value	–0.08763999	0.65729993	0.175279983	–0.246487476	–0.684687432
new step	–0.32864996	4.92974951	0.438199957	–0.492974951	–1.027031148

(B) Run table for the shake flask experiments designed by SAM

new step	Glucose	Fructose	casein enzymatic hydrolysate	Soytone peptone	ammonium phosphate dibasic
new step	–0.33	4.93	0.44	–0.49	–1.03
1	11.25	22.50	2.50	6.00	1.50
2	10.92	27.43	2.94	5.51	0.47
3	10.59	32.36	3.38	5.01	0
4	10.26	37.29	3.81	4.52	0
5	9.94	42.22	4.25	4.03	0
6	9.61	47.15	4.69	3.54	0
7	9.28	52.08	5.13	3.04	0
8	8.95	57.01	5.57	2.55	0
9	8.62	61.94	6.01	2.06	0
10	8.29	66.87	6.44	1.56	0
11	7.96	71.80	6.88	1.07	0
12	7.63	76.73	7.32	0.58	0

Table 1–40. Comparison of C/N ratio of the production medium compositions determined by 4–factor SAM and 5–factor SAM

run number	C/N ratio	C/N ratio
	4 Factor	5 Factor
1	3.970588	3.970588
2	3.479888	4.538462
3	3.156056	5.11919
4	2.927007	5.708283
5	2.753909	6.299517
6	2.623136	6.896719
7	2.515935	7.510404
8	2.42953	8.123153
9	2.357664	8.743494
10	2.297307	9.395
11	2.244576	10.67848
12	2.200307	
13	2.160345	
14	2.12598	
15	2.095202	

Table 1–41. Concentrations of the respective medium components at each level (central composite design for the response surface method)

	-2	-1	0	1	2
Glucose	8	10	12	14	16
Fructose	20	23	26	29	32
Casein enzymatic hydrolysate	1	3	5	7	9
Soytone peptone	4	5	6	7	8

Table 1–42. Experimental matrix for the CCD experiment and the resulting mycelial growth of *I. obliquus* (DCW)

	Std	Run	Block	Factor 1 A:Glucose g/L	Factor 2 B:Fructose g/L	Factor 3 C:Casein enzy g/L	Factor 4 D:Soytone pep g/L	Response 1 D.C.W g/L
	21	1	Block 1	12.00	26.00	1.00	6.00	18.944
	22	2	Block 1	12.00	26.00	9.00	6.00	17.662
	9	3	Block 1	10.00	23.00	3.00	7.00	18.904
	11	4	Block 1	10.00	29.00	3.00	7.00	20.312
	29	5	Block 1	12.00	26.00	5.00	6.00	19.608
	23	6	Block 1	12.00	26.00	5.00	4.00	16.8
	17	7	Block 1	8.00	26.00	5.00	6.00	20.084
	8	8	Block 1	14.00	29.00	7.00	5.00	17.3
	10	9	Block 1	14.00	23.00	3.00	7.00	17.052
	19	10	Block 1	12.00	20.00	5.00	6.00	18.492
	30	11	Block 1	12.00	26.00	5.00	6.00	20.068
	28	12	Block 1	12.00	26.00	5.00	6.00	19.428
	5	13	Block 1	10.00	23.00	7.00	5.00	16.316
	24	14	Block 1	12.00	26.00	5.00	8.00	20.902
	15	15	Block 1	10.00	29.00	7.00	7.00	19.212
	12	16	Block 1	14.00	29.00	3.00	7.00	18.788
	7	17	Block 1	10.00	29.00	7.00	5.00	16.872
	27	18	Block 1	12.00	26.00	5.00	6.00	20.614
	3	19	Block 1	10.00	29.00	3.00	5.00	16.564
	6	20	Block 1	14.00	23.00	7.00	5.00	17.236
	25	21	Block 1	12.00	26.00	5.00	6.00	19.8
	4	22	Block 1	14.00	29.00	3.00	5.00	16.972
	14	23	Block 1	14.00	23.00	7.00	7.00	20.326
	18	24	Block 1	16.00	26.00	5.00	6.00	19.29
	20	25	Block 1	12.00	32.00	5.00	6.00	19.142
	1	26	Block 1	10.00	23.00	3.00	5.00	18.604
	2	27	Block 1	14.00	23.00	3.00	5.00	17.81
	26	28	Block 1	12.00	26.00	5.00	6.00	20.1
	13	29	Block 1	10.00	23.00	7.00	7.00	17.244
	16	30	Block 1	14.00	29.00	7.00	7.00	17.75

Table 1-43. Analysis of variance(ANOVA) for response surface quadratic model of the CCD experiment

Response: D.C.W						
ANOVA for Response Surface Quadratic Model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares]						
Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	39.29	14	2.81	2.74	0.0312	significant
A	0.24	1	0.24	0.23	0.6379	
B	0.10	1	0.10	0.10	0.7547	
C	1.18	1	1.18	1.15	0.3009	
D	16.86	1	16.86	16.46	0.0010	
A ²	1.36	1	1.36	1.32	0.2678	
B ²	5.31	1	5.31	5.18	0.0379	
C ²	8.86	1	8.86	8.65	0.0101	
D ²	5.11	1	5.11	4.98	0.0413	
AB	0.77	1	0.77	0.75	0.4002	
AC	2.83	1	2.83	2.76	0.1173	
AD	0.46	1	0.46	0.45	0.5123	
BC	4.032E-003	1	4.032E-003	3.935E-003	0.9508	
BD	1.44	1	1.44	1.40	0.2549	
CD	0.18	1	0.18	0.18	0.6802	
Residual	15.37	15	1.02			
Lack of Fit	14.48	10	1.45	8.15	0.0159	significant
Pure Error	0.89	5	0.18			
Cor Total	54.67	29				

Table 1-44. Determination of optimum concentrations of the production medium and DCW estimated at the optimum concentrations

Solutions								
Number	Glucose	Fructose	Casein enzym	Soytone	pepto	D.C.W	Desirability	
1	8.54	29.53	3.59	7.57		20.9059	1.000	
2	8.41	29.09	3.69	7.45		20.9077	1.000	
3	8.20	29.69	3.21	7.69		20.9164	1.000	
4	8.58	29.46	3.60	7.66		20.9063	1.000	
5	8.40	29.10	3.27	7.58		20.9096	1.000	
6	<u>8.13</u>	<u>29.44</u>	<u>3.49</u>	<u>7.82</u>		<u>20.9245</u>	<u>1.000</u>	Selected
7	8.21	28.81	3.58	7.65		20.9155	1.000	
8	8.00	29.07	3.71	7.84		20.9037	1.000	
9	8.43	29.26	3.52	7.57		20.9186	1.000	
10	8.32	28.79	3.80	7.61		20.9036	1.000	

Table 1–45. Various kinds of oil supplemented into the IPS production medium

IPS production medium(control)		Oil	5ml/L	10ml/L
Glucose	8g/L	Corn oil		
Fructose	26g/L	Wheat germ oil		
Oil	5ml,10ml/L	Soybean oil		
Casein . h . l	3.5g/L	Cottenseed oil		
Soytone peptone	7.5g/L	Sunflower oil		
KH ₂ PO ₄	6g/L	Lard oil		
MgSO ₄	3g/L	Olive oil		
		Peanut oil		
		Almond oil		
		Sesame oil		
		Oleic acid		

Table 1–46. Various amounts of lard oil, corn oil and wheat germ oil supplemented into the IPS production medium

	Addition concentration						
Lard oil	2ml/L	5 ml/L	8 ml/L	11 ml/L	14 ml/L	17 ml/L	20ml/L
Corn oil	2ml/L	5 ml/L	8 ml/L	11 ml/L	14ml/L	17ml/L	20 ml/L
Wheat germ oil	2ml/L	5 ml/L	8 ml/L	11 ml/L	14 ml/L	17 ml/L	20 ml/L

Table 1–47. Various kinds of oil supplemented as a sole carbon source into the IPS production medium

Medium composition		Oil
IPS production medium(control)		Corn oil
Oil	30ml/L	Wheat germ oil
Casein . h . l	3.5g/L	Soybean oil
Soytone peptone	7.5g/L	Cottenseed oil
KH ₂ PO ₄	6g/L	Sunflower oil
MgSO ₄	3g/L	Lard oil
		Olive oil
		Peanut oil
		Almond oil
		Sesame oil
		Oleic acid

Culture time : 8day
Agitation speed : 130RPM
Temperature : 28°C

Table 1–48. Various concentrations of glucose and oils (lard oil and oleic acid) supplemented into the IPS production medium

Medium composition		Oil
IPS production medium(control)		Lard oil
Glucose	0,5,10,15,20,25,30	Oleic acid
Oil	10,20,30ml/L	
Casein . h . l	3.5g/L	
Soytone peptone	7.5g/L	
KH ₂ PO ₄	6g/L	
MgSO ₄	3g/L	

Culture time : 8day
Agitation speed : 130RPM
Temperature : 28°C

Table 1–49. Levels of medium components including oil in the full factorial design(FFD) experiments

	LOW	HIGH
Glucose	14	22
Oil(oleic acid)	25	30
Casein . E. H	2	6
Soytone peptone	6	10
KH ₂ PO ₄	3	6

Culture condition

Culture time : 7day
 Culture volume : 50mL
 Agitation speed : 130RPM
 Temperature : 28°C

Table 1–50. The compositions of production medium showing high productivity of mycelial cell mass in the full factorial design(FFD) experiments

RUN NUMBER	Glucose	Oleic acid	Casein enzymatic hydrolysate	Soytone peptone	KH ₂ PO ₄	D.C.W(g/L)
14	22	30	6	6	3	23.13
15	14	30	6	6	3	21.23
21	22	30	6	10	3	26.66
33	22	25	6	6	6	21.3

Table 1–51. Analysis of main effects of each medium component on the mycelial cell mass(IPS production) in the full factorial design(FFD) experiments

Main effect

Term	Stdized Effects	Sum of Squares	% Contribution
Intercept			
A	1.68	22.68	9.49
B	1.77	24.99	10.45
C	1.87	28.05	11.73
D	0.49	1.96	0.82
E	-1.61	20.70	8.66
AB	0.60	2.83	1.18
AC	1.09	9.50	3.98
AD	0.69	3.84	1.60
AE	0.37	1.12	0.47
BC	0.81	5.23	2.19
BD	0.22	0.38	0.16
BE	-1.51	18.36	7.68
CD	-1.18	11.07	4.63
CE	-0.20	0.31	0.13
DE	0.31	0.74	0.31

A: glucose
 B: oleic acid
 C: casein enzymatic hydrolysate
 D: soytone peptone
 E: KH₂PO₄

Table 1–52. ANOVA analysis the results of mycelial growth(IPS production) in various production media designed for the full factorial design(FFD) experiments

ANOVA analysis

ANOVA for Selected Factorial Model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares]						
Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	151.78	15	10.12	2.47	0.0303	significant
A	22.68	1	22.68	5.53	0.0290	
B	24.99	1	24.99	6.10	0.0227	
C	28.05	1	28.05	6.84	0.0165	
D	1.96	1	1.96	0.48	0.4971	
E	20.70	1	20.70	5.05	0.0360	
AB	2.83	1	2.83	0.69	0.4156	
AC	9.50	1	9.50	2.32	0.1434	
AD	3.84	1	3.84	0.94	0.3448	
AE	1.12	1	1.12	0.27	0.6073	
BC	5.23	1	5.23	1.28	0.2719	
BD	0.38	1	0.38	0.093	0.7630	
BE	18.36	1	18.36	4.48	0.0470	
CD	11.07	1	11.07	2.70	0.1159	
CE	0.31	1	0.31	0.076	0.7854	
DE	0.74	1	0.74	0.18	0.6746	

Table 1–53. Parameters for the steepest ascent method(SAM) in IPS production cultures

	GLUCOSE	OLEIC ACID	CASEIN ENZYMATIC HYDROLYSATE	SOY TONE PEPTONE	KH₂PO₄
center point	18	27.5	4	8	4.5
origin step	4	2.5	2	2	1.5
main effect	1.68	1.77	1.87	0.49	-1.61
coefficient	0.84	0.885	0.935	0.245	-0.805
r value		1			
slope value	0.479327457	0.505005714	0.53353711	0.139803842	-0.45935548
new step	1.917309828	1.262514284	1.06707422	0.279607683	-0.68903322

Table 1–54. Medium compositions as determined by the design of the steepest ascent method(SAM) in IPS production cultures

	GLUCOSE	OLEIC ACID	CASEIN ENZYMATIC HYDROLYSATE	SOY TONE PEPTONE	KH ₂ PO ₄
new step	1.92	1.26	1.07	0.28	-0.69
1	18.00	27.50	4.00	8.00	4.50
2	19.92	28.76	5.07	8.28	3.81
3	21.83	30.03	6.13	8.56	3.12
4	23.75	31.29	7.20	8.84	2.43
5	25.67	32.55	8.27	9.12	1.74
6	27.59	33.81	9.34	9.40	1.05
7	29.50	35.08	10.40	9.68	0.37
8	31.42	36.34	11.47	9.96	0.00

Table 1–55. Levels of IPS production medium components in the response surface method(RSM)

	-2	-1	0	1	2
Glucose	15	20	25	30	35
Oleic acid	26	29	32	35	38
Casein.e.h	4	6	8	10	12
Soytone peptone	5	7	9	11	13

Table 1–56. Experimental results performed according to the design of the response surface method(RSM) in IPS production cultures

Run	Block	Factor 1 A:glucose g/L	Factor 2 B:Oleic acid g/L	Factor 3 C:Casein g/L	Factor 4 D:soytone g/L	Response 1 D.C.W g/L
1	Block 1	25.00	32.00	8.00	9.00	18.13
2	Block 1	20.00	35.00	6.00	11.00	15.48
3	Block 1	20.00	29.00	6.00	7.00	16.81
4	Block 1	25.00	32.00	4.00	9.00	18.52
5	Block 1	30.00	35.00	10.00	11.00	20.41
6	Block 1	25.00	32.00	8.00	9.00	18.11
7	Block 1	30.00	29.00	10.00	11.00	20.68
8	Block 1	25.00	32.00	8.00	9.00	16.75
9	Block 1	25.00	32.00	8.00	9.00	19.13
10	Block 1	25.00	32.00	8.00	5.00	19.42
11	Block 1	25.00	32.00	12.00	9.00	19.39
12	Block 1	30.00	29.00	6.00	11.00	16.61
13	Block 1	30.00	35.00	10.00	7.00	18.91
14	Block 1	30.00	29.00	6.00	7.00	19.43
15	Block 1	20.00	35.00	10.00	11.00	21.87
16	Block 1	35.00	32.00	8.00	9.00	20.65
17	Block 1	20.00	35.00	10.00	7.00	17.93
18	Block 1	25.00	32.00	8.00	13.00	18.79
19	Block 1	20.00	29.00	10.00	11.00	26.68
20	Block 1	30.00	35.00	6.00	11.00	19.16
21	Block 1	15.00	32.00	8.00	9.00	20.89
22	Block 1	25.00	32.00	8.00	9.00	19.01
23	Block 1	20.00	29.00	6.00	11.00	17.33
24	Block 1	25.00	32.00	8.00	9.00	17.64
25	Block 1	20.00	29.00	10.00	7.00	16.63
26	Block 1	25.00	26.00	8.00	9.00	21.09
27	Block 1	25.00	38.00	8.00	9.00	16.32
28	Block 1	30.00	35.00	6.00	7.00	18.78
29	Block 1	30.00	29.00	10.00	7.00	17.72
30	Block 1	20.00	35.00	6.00	7.00	16.89

Table 1–57. ANOVA analysis of the results of mycelial growth in various IPS production media designed for the response surface method (RSM)

ANOVA for Response Surface Quadratic Model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares]						
Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	98.20	14	7.01	2.71	0.0324	significant
A	0.11	1	0.11	0.041	0.8418	
B	6.00	1	6.00	2.32	0.1485	
C	20.31	1	20.31	7.86	0.0134	
D	8.00	1	8.00	3.10	0.0989	
A ²	8.87	1	8.87	3.43	0.0838	
B ²	0.075	1	0.075	0.029	0.8670	
C ²	0.36	1	0.36	0.14	0.7137	
D ²	0.64	1	0.64	0.25	0.6271	
AB	4.10	1	4.10	1.59	0.2272	
AC	10.34	1	10.34	4.00	0.0640	
AD	7.67	1	7.67	2.97	0.1055	
BC	0.46	1	0.46	0.18	0.6784	
BD	2.48	1	2.48	0.96	0.3429	
CD	29.65	1	29.65	11.47	0.0041	
Residual	38.78	15	2.59			
Lack of Fit	34.87	10	3.49	4.45	0.0566	not significant
Pure Error	3.92	5	0.78			
Cor Total	136.98	29				

Table 1–58. Effect of UV treatment on non–fused protoplasts and fusants as represented by the survival percent (fusion partner: OBLQ528–22 and OBLQ756–15)

High–yielding producers	Survival percent (%)
OBLQ528–22: fusion partner	15.3 %
OBLQ756–15: fusion partner	13.7 %
Putative Fusants	61.7 %

Table 1-59. Distribution of cell growth extent of the putative fusants derived from the protoplast fusion of the two protoplast partners, OBLQ528-22 and OBLQ756-15

Distribution of cell growth extent of the putative fusants derived from the protoplast fusion of the two protoplast partners, OBLQ528-22 and OBLQ756-15 (screened from the solid state cultures for 12 days) (shake flask cultures for 9 days)	
Range of cell growth extent (g DCW/L)	Number of colonies
12.0 ~ 12.9	0
12.0 ~ 13.9	2
14.0 ~ 14.9	1
15.0 ~ 15.9	4
16.0 ~ 16.9	24
17.0 ~ 17.9	35
18.0 ~ 18.9	13
19.0 ~ 19.9	4
20.0 ~ 20.9	3
21.0 ~ 21.9	1
22.0 ~ 22.9	0
Total	87

Table 1-60. Distribution of EPS production by the variants derived from the mother strains, OBEP301 and OBEP347, in submerged shake flask cultures for 9 days

Distribution of exopolysaccharides(EPS) production by the variants derived from the mother strains, OBEP301 and OBEP347 in submerged shake flask cultures	
Range of EPS prodduction (g/L)	Number of colonies and remarks
0 ~ 1.49	0
1.5 ~ 1.99	11
2.0 ~ 2.49	27
2.5 ~ 2.99	24
3.0 ~ 3.49	34
3.5 ~ 3.99	36 (The range of EPS production by the mother strains, OBEP301 and OBEP347
4.0 ~ 4.49	14
5.0 ~ 5.99	7 (7 strains were selected due to their stability and high production of EPS in submerged shake flask cultures. The high-yielding 7 strains are EPS-11, EPS-12, EPS-13, EPS-14, EPS-15, EPS-16, EPS-17.)
Total	153

제2절 *Inonotus obliquus* 균사체의 pilot 규모 발효조에서의 자동화 액상배양공정 개발을 통한 향당노 효능의 단백다당체 대량 생산 (제1세부과제)

1. 재료 및 실험방법

가. 사용균주, 배지 및 균주보관

제1협동연구팀에서 원형질체 형성방법을 통해 개발한 고생산성 *Inonotus obliquus* 균주를 분양받아 사용하였다. 플라스크 배양과 발효조 배양을 위해 사용한 고체성장배지(계대배양배지), 정치배양배지, 액상성장배지는 제1협동과제에서 사용한 배지와 동일하나, 액상 생산배지의 경우는 다양한 통계적 방법을 통해 최적화된 배지를 사용하였다. 균주보관은 정치배양한 균사체를 blending하여 성장배지에서 액상배양을 4~5일간 수행한 후 20% glycerol stock을 만들어 -80°C 에 보관하였으며 필요할 때마다 해동하여 사용하였다. 배지 멸균은 당과 질소원, 무기염류를 분리하여 멸균기에서 121°C 에서 20분간 수행하였다.

나. 균체농도 측정, 당 분석, 단백다당체 회수 및 분석

제1협동과제 연구방법과 동일하게 수행되었다. 즉 균사체 농도는 세포건조중량(DCW)을 이용하여 측정하였고, 생산된 단백다당체 분석과 배양액에 잔류 중인 당 분석은 HPLC를 이용하여 수행하였다. 또한 배양액으로부터 단백다당체의 회수도 제1협동과제의 방법과 동일하게 수행되었다.

다. 플라스크에서의 성장배양 또는 생산배양을 위한 계대배양(고체성장배양) 및 정치배양

-80°C 에 보관한 seed stock을 필요시마다 100 mm 계대배양배지(제1협동과제와 동일)에 접종하여 15일간 28°C 에서 배양하였다. 이 배지에서 자란 균사체를 1 cm agar cylinder를 이용하여 1 piece 씩 떼어 내어 미리 만들어 놓은 다른 계대배양배지로 옮겨준 후 14~15일 동안 28°C 에서 배양하였다. 그 후 이 고체배지에서 자란 균사체를 1 cm agar cylinder를 이용하여 10 piece씩 떼어내어 정치배양배지(SGM)(제1협동과제와 동일)로 옮겨준 후 28°C 에서 7~9일간 배양하였다. 정치배양된 적정량의 *Inonotus obliquus* 균사체를 blender를 이용하여 잘 갈아준 후 500 ml flask(70 m의 성장배지(GM)) 또는 2 l 플라스크(300m의 성장배지(GM))를 이용해서 100~150rpm, 28°C 에서 3~5일 동안 발효조 배양을 위한 성장배양을 수행하거나, 경우에 따라 6~8일 동안 플라스크에서 생산배양을 수행하였다. 발효조 성장배양을 위해서 플라스크에서 배양된 배양액을 20%~33% (v/v)의 양으로 5 l 발효조(조업부피 3 l)에서의 1차 성장배양을 위한 inoculum으로 사용하였다(Figure 2-1).

라. 발효조에서의 성장배양 및 최종 발효조 생산배양

발효조에서의 성장배양(성장배지 사용)은 5 l 교반배양기(3 l 조업부피)로 4~5일 동안 수행하였으며, 배양온도는 28°C , 교반속도는 100~300 rpm에서 적절히 조절하여 가능한 한 용존산소 농도가 배양기간 내내 포화용존 산소 농도의 25~30%가 유지되도록 하였다. 용존산소는 1 vvm의 공기로 공급하였으며, 배양과정 중에 배양액의 pH는 조절하지 않았다. 이와 같이 배양한 생산균주를 10%

v/v의 inoculum으로 5 l 발효조에서 최종 생산배양(생산배지 사용)을 7~8일 동안 수행하였다 (Figure 2-1). 발효조에서 발효조로의 접종은 오염원을 효율적으로 차단하기 위해 발효조에 직접 연결된 연동펌프를 이용하여 on-line 상에서 수행되었다. 발효 기간 내에 sampling은 성장 단계의 경우 약 12시간 간격으로 sampling port를 이용하여 수행하였으며 배양 기간이 긴 최종 생산배양의 경우에는 줄어드는 배양액의 부피를 감안하여 humidifier를 장착하여 발효기의 배지가 증발되는 현상을 방지하였다. 배양변수에 대한 모니터링은 발효기 시스템에 장착된 computer interface를 이용하여 실시간으로 컴퓨터에 저장하여 데이터화 하였다.

마. 발효조 배양 및 배양공정자동화 시스템

5 l의 발효조(조업부피 3 l, 접종량 10% v/v)에서 공기 공급장치로서 9-hole sparger를, 교반기로서 본 연구 결과 개발된 paddle impeller를 사용하였으며, 교반속도는 다양하게 변화시켜가며 성장발효조 배양과 최종 생산 발효조 배양을 수행하였다. 고에너지를 필요로 하는 세포외다당체(EPS)와 생산균주 자체의 생산량을 증가시키기 위해서는 높은 교반속도시 발생하는 전단응력에 의한 악영향을 최소화시키면서, 용존산소 결핍 현상을 배양 중 적시에 해결해 주어야 한다. 이를 위해 교반속도와 통기량의 자동 조절에 의해 운영되는 용존산소 제어프로그램을 확립하였다. 우선 1차적인 제어로서 교반속도의 변화를 통해 용존산소를 원하는 농도로 제어한 후, 미리 설정해 놓은 최대값에 도달하면 1차제어가 그대로 유지되거나, 또는 2차 제어 (통기량 자동 조절)가 시작되도록 하였다. 또한 1차제어와 2차제어를 순차적으로 진행하지 않고 동시에 조절하는 경우, 즉 교반속도와 통기량을 동시에 증가시키는 조절방법도 병행하였다.

발효조 배양공정 데이터 수집, 분석 및 연산을 위한 프로그램으로는 Autolab V2.0을 이용하였다. 한편 배양공정 시스템의 자동화를 위해 가스분석장치시스템(gas-analyzer)를 발효기시스템에 연결하여 배양 기간 동안 발효조 내부로 공급 또는 배출되는 가스를 60초 간격으로 측정하고, 측정된 데이터를 실시간으로 분석하였다. 또한 I. obliquus 균사체의 액상배양공정 자동화를 위해 생산균주의 비성장속도(specific growth rate)(μ) 등의 배양 중요 변수들(즉 용존산소(DO), 산소흡수율(OUR), 이산화탄소발생율(CER), 총산소흡수량(SOUR), 총이산화탄소배출량(SCER), 산소전달계수(k_La), 세포농도, 탄소원 농도 등)을 온라인 상에서 직접 측정할 수 있는 알고리즘을 개발하여 실제 배양공정에 적용함으로써, 개발된 시스템의 정확도 및 효율성을 조사하였다. 배양공정 자동화시스템과 관련된 실험방법 및 이론식은 실험결과에서 상세하게 설명하였다.

마. Dynamic method에 의한 산소전달계수(k_La) 측정 시스템 구축

Dynamic method는 세포 배양액과 호기적 미생물이 존재하는 발효에서 비정상상태의 용존산소 물질수지식을 이용해서 산소전달계수(k_La)를 구하는 방법이다. 즉, 기체산소에서 용존산소로의 산소 전달률(OTR = oxygen transfer rate)을 나타내는 부피산소전달계수(volumetric oxygen transfer coefficient, k_La)와 미생물의 산소흡수율(OUR = oxygen uptake rate)을 계산하는 방법이다. k_La 값의 측정을 위해 다음과 같은 용존산소 물질수지식을 적용하였다.

$$\frac{dC_L}{dt} = k_La(C_L^* - C_L) - q_oX$$

C_L^* ; 기체상과 평형을 이룬 용존산소농도 [$g O_2/L$]

C_L : 발효배양액 내의 용존산소농도 [g O₂/L]

q_0 : 세포당의 산소흡수율 [specific oxygen uptake rate, g O₂/L cell/h]

X : 배양액 내의 세포농도 [g cell/L]

이 식을 적용하여 최종적으로 얻어지는 $\ln\left(\frac{C_L^0 - C_{L1}}{C_L^0 - C_{L2}}\right) = k_L a(t_2 - t_1)$ 을 이용해서 Figure 2-2에 제시한 바와 같이 좌변을 y 좌표로 우변의 $(t_2 - t_1)$ 을 x 좌표로 설정한 후, 교반속도나 공기유량, impeller의 종류 등의 변화에 따른 x-y 그래프를 그린 후, 그 기울기로부터 산소전달계수를 구하였다. 이 식에서 C_L^0 (final steady dissolved oxygen concentration)는 산소공급과 세포의 산소소비비가 균형이 이루어지는 정상상태의 용존산소농도 값을 의미한다. 산소전달계수의 측정을 위하여 초당 하나의 데이터를 컴퓨터를 이용하여 받아들이고, 물질수지식에 의한 계산은 모두 컴퓨터 내에서 수행하였다. 이 방법에 의해 실제 발효기배양에서 통기량을 1.0vvm으로 고정하고 각 교반속도에 따른 용존산소의 변화상태를 측정된 후, 상기의 식에 의해 계산한 결과를 Figure 2-5에 나타내었다. 각각의 교반속도에 대해서 정확한 직선이 얻어진 점으로 보아 실험이 정확히 수행되었음을 확인할 수 있었으며, 또한 교반속도의 증가에 따라 산소전달효과가 증가하여 산소전달계수($k_L a$)인 기울기 값이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

2. 결과 및 고찰

가. 산업용 배양공정에 의한 단백다당체 생산공정 구성도 및 산업용 배양공정 개발을 위한 다단계 배양공정 테스트

담자균류인 *Inonotus obliquus* 균사체의 산업용 배양공정에 의한 단백다당체 생산공정은 Figure 2-1에 제시한 바와 같이 발효조의 규모가 부피기준으로 약 10배씩 증가하는 다단계 발효공정(shake flask seed culture + 다단계 성장배양공정 + 최종 생산배양공정)으로 이루어진다. 발효조 배양의 궁극적인 목적은 최종 생산발효조 배양에서 원하는 단백다당체를 경제적으로 대량 생산할 수 있어야 하는데, 이를 위해서는 생산균주인 *Inonotus obliquus* 균사체의 다단계에 걸친 성장배양과 최종 생산배양시 세포의 활성과 그에 따른 단백다당체의 생산성이 높게 유지될 수 있어야 한다. 본 연구에서는 실제 산업용 생물공정에서 다단계에 걸친 발효기 배양시 생산균주의 생산성에 가장 큰 영향을 미치는 두 가지 요인, 즉 각 발효 단계에서의 생산균주의 배양생리적 특성과 배양형태적 특성을 단백다당체의 생산성 증가를 위해 최대한 이용하는 산업용 회분식 배양공정을 개발하고자 한다.

(1) *Inonotus obliquus* 균사체의 플라스크 성장배양 후 1차성장발효조로의 최적 접종량 조사

제1협동연구팀에서 고생산성 균주로 개발한 *Inonotus obliquus* OBLQ234 균주를 이용하여 이 균주의 배양생리적 특성 및 배양형태적 특성에 관한 연구를 수행하였다. 일반적으로 균사체 액상배양에 있어서 접종량은 생산균주의 활성과 배양형태에 심각하게 영향을 미치며, 또한 발효조 액상배양시 생산균주의 lag phase가 차지하는 기간과도 밀접한 관련성이 있다. 따라서 플라스크 액상성장배양에서 1차성장발효조로의 최적 접종량에 관한 연구가 필요하다. 본 실험에서는 기존의 조건들을 바탕으로 발효조 유효배양액의 부피(3 리터)를 기준으로 10% (v/v), 15% (v/v), 20% (v/v), 25% (v/v), 30% (v/v), 35% (v/v)까지 접종량에 변화를 주면서 1차 발효조 성장배양을 수행하였다

(Figure 2-3). 그 결과 25% (v/v) 이상에서 균체생산성이 가장 높게 나타났고, 10-20% (v/v)에서는 균체생산량이 약 13 g/L 정도로 낮게 관찰되었다(Figure 2-4). 즉 접종량이 낮은 경우에는 플라스크 배양환경에서 발효조 배양환경으로 갑자기 변함에 따라 생산균주의 lag phase가 길어져서 균사체의 성장이 늦어진 것으로 판단된다. 따라서 이후의 발효조 실험에서는 1차 성장발효조로의 접종량을 특별한 경우를 제외하고는 일반적으로 33% (v/v)로 하여 1차 발효조 성장배양을 수행하였다. 그러나 그 후의 배양단계는 특별한 경우를 제외하고는 산업용 배양공정과 동일하게 수행하였다. 즉 1차 성장발효조(성장배지 사용)에서 배양한 배양액을 성장배양을 위한 2차발효조로 10% (v/v)로 접종하여 성장배양(성장배지 사용)을 다시 반복한 후, 이로부터 10% (v/v)의 inoculum을 취하여 5L 발효조에서 최종 생산배양(생산배지 사용)을 7-8일 동안 수행하였다(Figure 2-1).

(2) “Process A”와 “Process F”를 통한 *Inonocus obliquus*의 배양생리적 특성 및 배양형태적 특성 규명을 통한 산업용 다단계 배양공정 확립 연구

Inonotus obliquus 균주에 대한 배양생리적 특성 및 배양형태적 특성 규명을 통해 생산성을 높이고자 발효기를 이용한 배양을 수행하였다. 1차 성장발효조로 접종될 seed culture 방법으로 “process A” 공정(Figure 2-3)을 적용하여 발효조 배양을 수행하였다. 1차 성장발효조로 20% (v/v)를 접종하여 5일간 배양했으며, 이후 2차 성장발효조로 10% (v/v)를 접종하여 다시 4일간 배양한 후, 생산발효조로 10% (v/v)의 양을 접종하여 최종 발효조 생산배양을 수행하였다. 생산 발효조배양은 상기에 제시한 생산배양 배지에서 brown rice 만을 raw brown rice와 enzyme treated brown rice로 구분하여 실험을 수행하였다. 최종 생산 발효조배양은 5일간 수행하였으며, 그 외의 배양조건은 Figure 2-3에 함께 제시하였다.

1차 발효조 성장배양을 수행한 결과와 배양 형태를 Figure 2-5와 2-6에 각각 제시하였다. 생산균주가 16 g/L 정도까지 성장하였다. 배양 시작부터 건조균체량이 높게 잡힌 이유는 배지 성분으로 첨가해준 brown rice가 물에 녹지 않은 상태로 있다가 세포가 성장하면서 이를 이용하기 때문으로 보인다. 한편 탄소원이자 에너지원인 glucose는 23 g/L 정도가 이용되지 못하고 남아 있었으며, 사용한 glucose의 양은 약 13 g/L 정도로 상당히 낮은 것으로 관찰되었다. 즉 접종 후 약 48시간까지 lag phase인 점으로 봐서 세포성장이 상당히 저해받은 것으로 판단된다. 이러한 사실은 pH 변화 경향에서도 유추할 수 있는데, 즉 glucose를 효과적으로 사용하지 못하고 성장이 지연됨에 따라 배양 기간 내내 pH가 감소하는 현상을 관찰할 수 없었다. 용존산소 농도의 경우 교반속도를 점차 증가시키기는 하였지만 배양액 중 용존산소의 감소속도가 늦은 것으로 보아 성장속도가 그다지 높지 않음을 다시 확인할 수 있었다. 이 결과로부터 발효조 배양 시 발생하는 전단응력에 대해 균사형성 담자균류인 *Inonotus obliquus* 균주가 제대로 적응하지 못하는 전단응력 민감성의 배양특성을 갖고 있는 것으로 판단되었다. 1차 성장발효조에서 5일간 배양한 후에 접종량 10%를 2차 성장발효조로 접종하여 수행한 배양결과를 Figure 2-7에 제시하였다. 2차 성장배양시에도 glucose는 약 15 g/L 정도만 소모하였으며 최종 균체생산량은 약 13 g/L 정도로 1차 보다 약간 낮게 나타났다. pH 변화 경향 역시 1차성장배양에서 관찰된 바와 같이 계속적으로 상승하였으며, 용존산소 소모속도 역시 느린 것으로 나타났다. 두 성장 데이터를 비교한 결과 2차 성장배양의 경우 약 24시간 정도 lag phase가 더 길어지는 것으로 관찰되었는데, 이는 1차 성장배양 기간이 다소 길어져서 2차 성장발효조로 접종된 세포들의 활성이 어느 정도 감소한데 그 원인이 있는 것으로 보인다(Figure 2-8).

최종 발효조 생산배양은 raw brown rice와 enzyme 처리에 의해서 전분성분을 glucose로 전환한 enzyme-treated brown rice를 생산배지 성분으로 사용하였다. 균사체 생산량은 19~20 g/L로 거의 차이가 없었으며 세포성장 역시 비슷한 경향을 보여주었다(Figure 2-9, 2-10). 이로부터 두 종류 배지간의 차이가 균사체 생산성에 별로 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있다. 한편 pH의 경우 초반부에 계속 증가하다가 배양 약 120시간 정도에서 감소하는 것으로 나타났다. 1차 및 2차 성장배양과 최종 생산배양을 비교해 보면 성장속도에서 큰 차이가 나지 않는 것으로 관찰되었는데(Figure 2-11), 이는 생산균주의 배양형태가 균사형태를 지님과 동시에 pellet이 형성되었더라도 그 크기가 1 mm 이하로 배양기간 내내 유지되었기 때문인 것으로 판단된다.

상기의 실험에서 1차 및 2차 발효조 성장배양에서 나타나는 여러 가지 문제점을 해결하기 위해 이번에는 seed culture용 flask 배양을 “process F” 공정에 의해 수행하고 1차 성장발효조로의 접종량을 33%로 증가시켜 실험을 수행하였다(Figure 2-12). 1차 발효조 성장배양의 결과 “process A”와 비교했을 때 lag phase에서의 차이점은 별로 발생하지 않았으나, 4일 동안의 배양 결과 “process A”에서는 균체생산량이 약 14 g/L 인데 비해, “process F”에서는 약 17 g/L의 높은 균체 생산성을 얻을 수 있었다(Figure 2-13, 2-14). Figure 2-15에 “process F” 공정에 의해 수행한 1차 성장 발효조에서의 용존산소 및 pH의 변화 경향을 제시하였다. 또한 1차 성장 발효조에서 얻은 inoculum을 이용해서 계속적으로 2차 성장 발효조 배양을 수행하였는데, 불행하게도 2차 배양 기간 중에 용존 산소를 공급하는 air compressor의 고장으로 인해 약 5시간 정도 공기 공급이 차단되는 사건이 발생했다(Figure 2-16). 이로 인해 1차 성장배양과 비교해서 2차 성장배양의 성장속도가 현저히 낮아지는 것을 확인할 수 있었다(Figure 2-17). 따라서 *Inonotus obliquus*는 전단응력 민감성 특성뿐만 아니라, 용존산소 농도에 의해서도 심각하게 영향을 받는 균주로 판단된다.

최종 발효조 생산배양에서 “process A” 배양과 동일한 조건에서 배양한 결과를 Figure 2-18에서 Figure 2-20에 제시하였다. “process F”에 의한 최종생산배양 결과를 “process A”의 결과와 비교해 볼 때, “process F” 배양에서 균사체 생산량이 다소 증가한 것으로 나타났다(Figure 2-21). 이 결과에서 주목할 점은 2차 성장배양에서 기계고장으로 인한 용존산소 부족으로 심각한 용존산소 결핍현상을 겪은 생산균주가 접종되었음에도 불구하고 최종 생산배양에서 이 정도로 성장할 수 있었다는 점이다. 또한 “process F”에서도 생산균주의 배양형태가 균사형태를 지님과 동시에 pellet이 형성되더라도 그 크기가 1 mm 이하로 배양기간 내내 유지되는 것으로 관찰되었다(Figure 2-22). Seed culture 공정으로 “process A”와 “process F”를 비교한 현재까지의 배양결과를 요약하면 균사형성 담자균류인 *Inonotus obliquus* 균주는 산소 민감성, 전단응력 민감성 균주라고 판단할 수 있었으며, 생산균주의 배양생리적 특성을 최대한 활용하여 발효조 배양환경에서 생산성을 극대화하기 위해서는 플라스크 배양과는 별도로 발효조 배양만을 위한 최적 성장배지와 최적 생산배지가 개발되어야 함을 알 수 있었다.

(3) 1차 발효조 성장배양에 있어서 접종량의 차이에 의한 배양생리적 특성 규명을 통한 산업용 다단계 배양공정 확립 연구

“Process F”의 경우 1차 발효조 성장배양으로 33%를 접종하였는데, 이 접종량을 줄일 경우 이전 단계인 flask seed culture 공정의 간소화와 배양의 재현성을 더 높일 수 있을 것으로 판단되어 접종량을 반으로 줄이는 실험을 테스트해 보았다. 배양은 4일간 1차 성장발효조에서 수행하였다. 배양

초반의 용존산소의 소모속도를 살펴보면 접종량이 많은 경우(1 l, 즉 33 % v/v 접종)에는 16시간에 산소가 거의 고갈되었으나, 접종량을 반으로 줄인 경우(500 ml 접종)에는 36시간 경에 산소가 고갈되고 있는 것으로 나타났다(Figure 2-23). 또한 균사체 생산량 역시 1 l 접종의 경우에 17 g/L인데 비해, 500 ml 접종의 경우에는 약 12.5 g/L로서 큰 차이가 발생하였다. pH는 두 배양조건 모두 계속해서 증가하였으며, glucose 이용량에 있어서도 1 l 접종 배양의 경우가 더 활발한 것으로 관찰되었다. 또한 1 l 접종의 경우에 접종량의 증가로 인해서 lag phase가 500 ml 접종의 경우에는 36시간인 반면, 1 l 접종의 경우에는 16시간으로 감소하는 것으로 나타났다(Figure 2-24). 따라서 이상의 결과에 근거해서 이 후의 발효조배양 실험에서는 seed culture를 위해서는 “process F”공정을 사용하며, 1차 성장발효조로의 접종량은 33%로 하기로 최종 결정하였다.

나. 발효조 배양에서의 세포외다당체(EPS) 최적 생산배지 개발 및 생산균주의 배양 특성 조사

(1) 세포외다당체(EPS) 생산성 증가에 초점 맞춘 생산배지 조사 및 생산균주의 배양생리적 특성 조사: 최종 발효조 생산배양

세포외다당체(EPS)의 효율적 생산을 위해 다양한 생산배지를 조사하는 실험을 발효조 배양을 통해 수행하였다. 다양한 배지 성분을 조사한 이전의 플라스크 배양실험을 통해 EPS 생산성 증가에 적합하다고 선정된 다음의 탄소원과 질소원 성분들을 이용해서(데이터 미제시), 발효조 배양에 적합한 최적의 EPS 생산용 배지조성을 확립하고자 하였다. Glucose와 fructose를 탄소원으로, 그리고 N을 포함하고 있는 5가지 배지성분을 질소원(soybean meal, ammonium tartrate, ammonium mono-phosphate, yeast extract, soyprotein)으로 하여 다양한 조합의 생산배지 조건에서 발효조 생산배양을 수행하였다. 그 외의 배양조건은 Table 2-1에 제시한 바와 같으며(P1, P2 P3, P4 생산배지 조건), 또한 Table 2-2에 제시한 바대로 P5, P6, P7, P8의 생산배지 조건에서 생산균주의 배양생리적 특성 및 단백다당체의 생산성 조사 실험을 수행하였다.

우선적으로 P1, P2, P3, P4 생산배지로 발효조배양(5 l 발효기)을 동시에 수행한 결과 플라스크 배양에서 관찰되었던 결과와는 대조적으로 균사체 생산성과 세포외다당체(EPS)의 생산성이 별로 높지 않은 것으로 확인되었다(데이터 미제시). 그렇지만 이 실험을 통해 탄소원으로 glucose를 첨가하는 것이 fructose를 첨가하는 것보다 균체 및 EPS 생산성 면에서 모두 높게 나왔으므로, 다음 실험으로 플라스크 배양 시 긍정적인 효과가 있었던 세 가지의 질소원(ammonium monophosphate, yeast extract, soy protein) 중 두 가지의 질소원을 조합한 생산배지로 발효조배양을 수행하였다(P5, P, P7, P8 생산배지)(Table 2-2).

이전의 연구 결과 다단계 배양공정에 적합한 것으로 확인된 “Process F” 공정에 의해 2차 발효조 성장배양까지 일련의 성장배양공정을 수행한 후, 최종 발효조 생산배양을 P5, P6, P7, P8의 각각의 생산배지 조건에서 수행하였으며, 그 배양결과를 Figure 2-25, 2-26, 2-27, 2-28에 각각 제시하였으며, 각 배양의 균사체 생산량을 비교한 결과를 Figure 2-29에 나타내었다. 균사체 생산량의 경우 P7과 P8의 생산배지 조건에서 약 21 g/L로 높게 나타났으나(Figure 2-29), 여기에는 soyprotein의 불용성 성분이 DCW로 첨가되어 오차가 크게 발생한 측면이 고려되어야 한다. 한편 생산균주의 최대비성장속도(maximum specific growth rate)를 비교해 본 결과 P5조건에서 가장 높은 것으로 나타났다(Table 2-3). pH의 변화 경향을 비교해 보면, P6와 P8의 생산배지 조건에서는 배양 말기에

pH가 상승하는 반면, P5와 P7의 경우에는 이와 같은 현상이 나타나지 않고 pH가 계속 감소하는 경향을 관찰할 수 있다(Figure 2-30). 또한 P6과 P8 생산배지를 이용한 배양에서는 탄소원인 glucose가 거의 다 소모된 반면, P5와 P7의 배양에서는 배양 종료시점까지 glucose가 다 소모되지 못하고 잔류하고 있음을 알 수 있다(Figure 2-31). 이와 같은 각 배양의 pH 변화 경향으로부터 생산균주의 배양생리적 특성을 어느 정도 유추할 수 있는데, 즉 P6과 P8 생산배지의 경우 탄소원이 고갈된 시점에서부터 배지중의 복합질소원(주로 단백질 성분)에 포함되어 있던 탄소원을 더욱 이용함에 따라 복합질소원으로부터 유리된 암모니아로 인해 배양액의 pH가 증가하게 된 것으로 보인다. 반면에 P5와 P7 생산배지를 이용한 배양에서는 glucose로 제공된 탄소원을 배양 종료 시점까지 다 이용하지 못하였기 때문에 복합질소원에 포함된 다른 탄소원을 더 이용하는 현상이 발생하지 않았고, 그 결과 배양액의 pH가 여전히 감소한 것으로 판단된다.

EPS의 생산성 면에서 볼 때, P6 배양의 경우 약 3 g/L, P8 배양의 경우에는 약 3.5 g/L로서 P5와 P7의 배양에 비해 비교적 낮게 나타났다(Figure 2-32). 그러나 상기에서 설명한 바와 같이 P5와 P7 배양에서 EPS의 생산량이 높은 이유는 이들 배양의 종료 시점까지 사용되지 못하고 남아있는 배양액 중의 단백질 성분 등이 에탄올 침전과정에서 EPS와 함께 침전되어 측정되었기 때문인 것으로 추정된다. 이 실험을 통해서 배지중의 이용되지 못하고 잔류하고 있는 복합질소원 성분이 EPS 회수를 위한 에탄올 침전과정에서 함께 침전되어 EPS 측정에 오차를 유발시킴을 알 수 있다. 이와 같은 생산균주의 배양생리적 특성과 EPS 측정의 오차범위를 감안해 볼 때, EPS의 생산에 있어서 P6 생산배지 조성(즉 탄소원으로 glucose, 질소원으로 ammonium tartrate와 yeast extract)이 가장 좋은 배지조합인 것으로 판단된다. 한편 P8 생산배지 조합이 EPS 생산 용 배지로 더욱 가능성이 높아 보이지만, P8 보다는 P6 배지 조성을 다음 실험을 위한 적정 배지로 선택한 이유는 다음과 같다: Figure 2-29의 DCW 결과로부터 유추해 볼 수 있는데, 배양 초기부터 DCW로 측정되어 오차를 유발시키고 있는 P8의 soyprotein의 일부 성분이 EPS 측정 시에도 오차를 유발시켜, 그 결과 P8 생산배지를 이용한 배양에서 EPS의 생산량이 증가된 것처럼 보인다.

(2) 발효조 액상배양을 통한 세포외다당체(EPS) 생산용 최적 배지 조사 (ammonium tartrate와 yeast extract의 첨가 농도 정밀 조사)(C/N 비율 조사)

세포외다당체(EPS) 생산성 증가를 위한 액상 배양배지 최적화 실험에서 위에서 살펴 본 바와 같이 가장 뛰어난 효과를 보인 ammonium sulfate와 yeast extract 두 질소원에 대해 상호작용을 자세히 조사하고자 발효조 배양에 의해 full factorial design 실험을 수행하였다. Factorial design 실험을 수행한 4조건의 배양 모두 동일한 성장배양을 거친 후 각각 다른 생산배지(Table 2-4에 제시한 바와 같이 각 배지성분이 -1과 +1의 두 가지 농도를 갖는 4 종류의 생산배지, 즉 P6-1, P6-2, P6-3, P6-4 사용)에서 9일 동안 배양하였다. 각 생산배지에서 수행된 3리터 발효조에서의 배양결과를 Figure 2-33, 2-34, 2-35, 2-36에 제시하였으며, 이들을 종합한 결과를 Figure 2-37과 Figure 2-38에 비교 제시하였다. 최종 건조중체량은 네 가지 배양조건에서 큰 차이가 없이 대부분 14~15g/L인 것으로 나타났다(Figure 2-37). EPS의 생산성을 살펴보면 모든 배양에서 처음부터 매우 높은 수준인 것으로 나타났는데, 이는 배양 처음에 높은 농도로 배지 중에 첨가되었지만 생산균주가 이용하지 못하고 잔류하고 있는 yeast extract의 단백질 성분이 에탄올 침전시 EPS와 함께 침전된 것으로 판단된다. 특히 P6-4의 경우 데이터 상으로는 매우 높은 EPS 수치를 보였으나 실제로는 대부분이

잔류한 단백질 성분이며, 따라서 EPS의 농도는 Figure 2-37의 수치보다 훨씬 낮을 것으로 예상된다(3 g/L 이하 수준). 이에 대한 이유는 하기에 논리적으로 설명하겠지만, glucose 30 g/L, ammonium tartrate 12 g/L, yeast extract 12 g/L와 같이 영양분이 매우 풍부한 배지(rich medium) 조건에서는 일반적으로 생산균주가 세포외다당체(EPS)를 거의 생합성하지 못하는 것으로 확인되었기 때문이다. 하기에 배지 중에 잔류하고 있는 단백질의 양을 정량 분석함으로써 정확하게 EPS의 생산량을 측정하는 방법을 제시할 예정이다. pH와 용존산소의 변화를 살펴보면(Figure 2-38), P6-1과 P6-2와 같이 yeast extract의 농도가 낮은 경우에는 buffer 역할이 충분치 않아서 pH가 계속해서 감소하는 것으로 나타났으며, 반대로 P6-3과 P6-4과 같이 yeast extract의 농도가 높은 경우에는 pH가 거의 일정하게 유지되다가 조금씩 증가하는 경향을 보여주었다. 용존산소는 배지성분이 매우 균형 잡혀있는 P6-3의 경우에만 생산균주의 대사가 활발하여 낮은 농도로 유지되고 나머지 조건들에서는 대부분 비교적 높게 유지되다가 180시간 이후에 영양분의 고갈로 인해 용존산소의 농도가 점차 증가하는 것으로 나타났다. 본 실험 결과 yeast extract와 같이 다량의 단백질이 포함된 복합 배지 성분을 생산배지로 사용할 경우에 EPS의 생산 농도를 정확하게 측정할 수 없으므로 단백질의 양에 대한 정확한 측정이 반드시 이루어져야 함을 알 수 있었다.

(3) EPS 생산배지 최적화: ammonium tartrate와 yeast extract의 첨가 농도 정밀 조사

본 실험에서는 세포외다당체(EPS)의 최적 생산배지를 더욱 정밀하게 조사하기 위해 ammonium tartrate와 yeast extract의 두 가지 질소원 중에서 ammonium tartrate의 농도는 8 g/L로 고정하고, yeast extract의 농도를 2 g/L에서 8 g/L까지 변경시켜가며 발효조 액상배양을 수행하였다(Table 2-5). 한편 이 실험에서 사용된 성장배지와 질소원을 제외한 생산배지의 조성은 Table 2-6과 Table 2-7에 각각 제시하였다. 또한 각 생산배지에서 수행된 3 l 발효조에서의 배양결과를 Figure 2-39, 2-40, 2-41, 2-42에 제시하였으며, 이들을 종합한 결과를 Figure 2-43과 Figure 2-44에 비교 제시하였다. 균사체 농도는 영양소 고갈 시점까지 계속적으로 증가하다가 영양소 고갈시 천천히 감소하는 경향을 보여주었다(Figure 2-43). EPS 생산성은 질소원의 양이 가장 적은 경우(ammonium tartrate 8 g/L 와 yeast extract 2 g/L), 즉 Figure 2-43의 P6-8에서 EPS와 함께 회수되는 yeast extract 유래의 단백질 양이 가장 적음에도 불과하고 발효 종료시점에서 약 6 g/L로서 가장 높게 나타났다. 이로부터 C/N ratio 비율이 EPS의 형성에 꽤 심각한 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었는데, 즉 생산균주가 성장에 적합하지 않은 조건인 영양소의 불균형 조건(P6-5, P6-6, P6-7, P6-8 조건 중 P6-8의 배지 성분이 세포성장에 가장 열악한 조건임)에서 더욱 많은 EPS가 생합성되는 것을 확인할 수 있었다. 배양 중의 pH는 어느 정도 일정 수준으로 유지되다가 지수기 성장 단계에서 급속히 감소하는 것으로 나타났는데, 이는 탄소원인 glucose와, 탄소원 과 질소원 모두의 특성을 갖는 yeast extract와 ammonium tartrate의 배지 중에서의 소모 경향과 깊은 관련이 있는 것으로 보인다(Figure 2-44). 또한 배지 중의 용존산소는 생산균주가 성장함에 따라 계속 감소하다가 배양 후반기에 필수 영양소의 고갈로 인해 다시 증가하는, 미생물 배양 시 전형적으로 관찰되는 변화 경향을 보여주었다(Figure 2-44).

한편 이번 실험에서는 상기의 경우와는 대조적으로 ammonium tartrate와 yeast extract의 두 가지 질소원 중에서 yeast extract의 농도는 8 g/L로 고정하고 ammonium tartrate의 농도를 2 g/L에서 8 g/L까지 변경시켜 가며 생산균주의 EPS 생산성과 그 외의 발효특성을 조사하였다(Table 2-8,

2-9, 2-10). 각 생산배지에서 수행된 3리터 발효조에서의 배양결과를 Figure 2-45, 2-46, 2-47, 2-48에 제시하였으며(P6-9, P6-10, P6-11, P6-12 배양), 이들을 종합한 결과를 Figure 2-49과 Figure 2-50에 요약 제시하였다. 모든 배양 조건에서 glucose 30 g/L와 yeast extract 8 g/L가 첨가되었으므로 배지의 균형도가 매우 높아져, 첨가된 ammonium tartrate 농도에 상관없이 세포성장과 glucose 소모 경향이 거의 비슷한 것으로 나타났다(Figure 2-49). 그러나 EPS의 생산성은 과량으로 사용된 yeast extract 유래의 단백질이 배양 중에 다 소모되지 않고 잔류하는 이유 때문에 EPS의 생산량이 일정하지 않고 꽤 흔들리는 경향을 보였는데(Figure 2-49)(이 경우 잔류된 yeast extract가 에탄올 침전 시 EPS와 함께 회수되어 EPS의 농도를 정확하게 측정하기 어려움), 따라서 침전된 단백질량을 감안해서 EPS 생산량을 보정해 주어야 하는 함을 알 수 있었다(EPS 생산량 보정에 대한 실험 결과는 다음 절에서 제시할 예정임). Figure 2-50에 pH와 용존산소의 변화를 제시하였는데 상기 ammonium tartrate를 고정해서 수행한 실험보다 더 오래 동안 pH가 일정 수준에서 유지되는 것을 알 수 있었다. 이는 pH를 유지시켜줄 수 있는 복합 배지성분인 yeast extract가 다량 사용된 결과인 것으로 판단된다. 한편 용존산소의 변화는 ammonium tartrate를 고정한 상기의 실험 결과와 거의 비슷한 경향을 보여주었다(Figure 2-50).

요약하면 현재까지의 발효조 배양을 통한 EPS 생산용 생산배지 최적화 실험결과, ammonium tartrate 8g/L와 yeast extract 2 g/L가 함께 첨가된 배지조합에서 EPS 생산성이 가장 높게 나타났으며, 따라서 이 생산배지 성분과 본 연구 결과 확립된 다단계 배양공정을 적용해서 배양공정 scale-up 연구를 수행하였다.

다. 75 l 규모의 scale-up된 발효조를 이용한 세포외다당체 생산(Process F 공정 적용)

(1) 75 l 규모의 scale-up 발효조에서의 EPS 생산 및 생산균주의 배양특성 조사: 1차 생산배양 시도

5 l 발효조에서 *I. obliquus* 균사체의 세포외다당체(EPS) 생산배지 최적화 연구에 대한 상기의 실험 결과를 토대로 본 연구에서는 75 l 규모로 확대된 발효조 배양을 시도하였다. 종균배양에서 최종 생산배양에 이르는 전체 공정은 상기의 5 l 발효조 배양과 동일하게 1차년도 연구결과 최적의 배양공정으로 확정된 "Process F 공정"의 공정을 대부분 적용하였다(Figure 2-51). 최종 성장배양은 5 l 발효조에서 3 l의 조업부피로 수행했으며(Table 2-11), 이 배양액을 전량 다 75 l의 최종 생산발효조(40 l 조업부피)로 접종하였다(단 process F의 경우는 접종량이 10%(v/v)인 반면 이 경우는 7.5%(v/v) 접종량 사용). 성장배지는 기존에 확립된 배지(Table 2-12)를 이용하였으며, 최종 EPS 생산배지는 선행 실험에서 EPS 생산성이 가장 높은 것으로 확인된 P6-8배지(ammonium tartrate 8 g/L, yeast extract 2 g/L)를 사용하였다(Table 2-12).

Figure 2-52에 5 l 발효조에서 수행한 최종 성장배양 결과를 제시하였다. 최종 세포농도는 16 g/L이었으며, 잔류하고 있는 glucose는 약 13 g/L정도 이었다. 초반에 세포농도가 감소하다가 증가하는 것으로 나타났는데, 이로부터 배지성분 중 다 용해되지 않는 현미가루가 생산균주가 분비하는 분해효소에 의해 탄소원으로 이용되고 있음을 알 수 있다. 한편 성장배지에 다량의 복합 배지성분이 존재하기 때문에 배양 기간 내내 pH는 증가하는 경향을 보였으며, 용존산소는 적절하게 교반 속도를 조절한 결과 포화용존산소의 약 20% 수준 이상으로 유지되었다.

Figure 2-53에 75 l의 최종 생산발효조에서 40 l의 조업부피로 배양한 실험결과를 제시하였다. 또한 이 실험을 위한 배양조건을 Table 2-12에 요약 제시하였다. 생산배양에서의 pH는 5 l 생산배양에서 관찰된 것처럼 일정하게 유지되다가 급히 감소하는 경향을 보였으며 세포농도는 11 g/L로서 비교적 낮은 양으로 나타났는데, 이는 영양분 중 많은 양이 EPS 생합성(9 g/L) 쪽으로 사용된 것으로 판단된다. 특별히 주목할 만하게도 75 l 생산발효조에서의 배양조건을 별도로 최적화시키지 않았음에도 불구하고 이 발효조에서의 EPS 생산성이 이전의 5 l 발효조보다 더 높은 수준으로 나타났다. 한편 배양액에 잔류한 glucose의 양은 약 2 g/L로 관찰되었다. 첫 번째로 시도한 75 l 발효조 생산배양 중 몇 가지 문제점이 관찰되었는데, 배양 종료 후의 발효조 내부를 찍은 사진에서 알 수 있듯이 발효조 벽면에 많은 양의 균사체가 붙어있는 것을 확인할 수 있었다(Figure 2-54, Figure 2-55). 이와 같은 현상은 3개의 교반기(impeller) 중 하나가 40 l 배양액 표면과 거의 같은 높이에 위치한 결과, 교반 중 배양액이 발효조 벽면으로 튀는 현상 때문에 발생한 것으로 판단된다. 따라서 2차배양에서는 이러한 문제점을 해결하고자 발효조의 조업부피를 45 l로 하여 생산배양을 수행하였다.

(2) 75 l 규모의 scale-up 발효조에서의 EPS 생산 및 생산균주의 배양특성 조사: 2차 생산배양 시도

상기의 75 l 발효조에서 관찰된, 발효조의 벽면에 균사체가 다량 부착하는 문제점을 개선하기 위해, 이번 실험에서는 배양공정을 다소 변화시켜 75 l 규모의 발효조 배양 연구를 다시 시도하였다. 종균배양에서 최종 생산배양에 이르는 전체 공정은 상기의 배양과 동일하지만, 이번 실험에서는 교반기의 위치를 고려해서 배양액의 부피를 45 l로 변경하여 배양하였고, 적절한 접종량을 확보하기 5 l 발효조에서의 성장배양은 4 l 조업부피로 수행하였다(Table 2-13)(75 l 발효조로의 접종량은 상기의 7.5% v/v에서 8.8% v/v로 증가). 5 l 성장발효조에서의 배양특성을 살펴보면(Figure 2-56), 이전에 비해 배양액의 부피가 증가하였기 때문에 산소전달 부족으로 인해 세포성장 속도가 다소 느려졌으며, 따라서 75 l 최종 생산발효조로의 접종량은 이전에 비해 다소 줄어든 것으로 나타났다. 또한 5 l 성장배양 중 생산균주에 의해 이용되지 못한 잔류 glucose의 양 역시 22 g/L로 이전에 비해 높게 남아 있는 것으로 관찰되었다.

Figure 2-57에 75 l의 최종 생산발효조에서 45 l의 조업부피로 배양한 실험결과를 제시하였다. 또한 이 생산배양에 대한 실험조건을 Table 2-14에 제시하였다. 이전의 75 l 생산배양에서는 glucose를 거의 다 이용하였지만 이번의 75 l 배양에서는 접종조건의 변화로 인해 배양 종료 후에도 약 9.5 g/L가 잔류하고 있는 것으로 나타났다(Figure 2-57). 생산배양에서의 pH 변화는 이전과 동일한 경향을 보여 주었으며, 10 g/L의 비교적 낮은 균체생산량에서 유추할 수 있듯이 이번 배양에서도 영양분 중 많은 양이 EPS 생합성(8.2 g/L) 쪽으로 이용된 것으로 보인다. 이번 75 l 생산발효조 배양에서도 EPS 생산성이 이전의 5 l 발효조보다 더 높은 수준으로 나타났음은 매우 주목할 만하다.

상기의 두 번에 걸친 75 l의 배양결과에 근거하여 균주개발부터, 종균배양, 발효조 성장배양, 발효조 최종 생산배양에 이르는 전 배양공정을 최적화 할 경우 EPS의 생산성은 더 큰 폭으로 증가시킬 수 있을 것으로 판단된다. 현재 더욱 규모가 확대된 발효조를 이용하여 세포벽다당체(IPS)와 세포외다당체(EPS)의 대량 생산을 위한 생물배양공정 최적화 연구를 수행 중에 있다.

(3) 발효조 생산배양 중 배양액 중의 잔류 단백질량의 정량분석을 통한 정확한 EPS 생산성 조사

상기의 EPS 생산배지 최적화 실험에서 배양액 중에 남아있는 yeast extract 유래의 단백질 성분이 EPS 회수를 위한 에탄올 침전 시 EPS와 함께 침전되므로 배지 중에 잔류한 단백질 양을 감안해서 EPS 생산량을 보정해 주어야 한다고 제시한 바 있다. 즉 질소원이자 탄소원으로 사용되는 복합배지 성분들, 즉 yeast extract, casein enzymatic hydrolysate, soytone peptone, cotton seed flour 와 같은 영양분이 사용될 경우, 생산된 EPS의 회수를 위해 99.9% 에탄올침전법을 적용할 때, 단백질이 EPS와 함께 침전되어 회수되기 때문에 EPS의 양을 정확하게 측정하기가 어려워진다. 따라서 배지 중의 단백질 농도만을 따로 측정하여 침전된 전체 양에서 이 단백질 양 만큼을 빼주어야 정확한 EPS의 측정이 가능해진다.

본 연구에서는 Lowry 방법(Figure 2-58)을 적용하여 복합배지 성분 중에 포함되어 있는 총 단백질 농도를 측정하였다. Table 2-15와 같은 농도로 bovine serum albumin를 처리하여 파란색으로의 발색반응을 유도한 후, 500nm 파장에서 흡광도를 측정하여 단백질의 정량분석을 위한 표준곡선을 구한 후, 이를 이용하여 배지 중에 잔류하고 있는 총 단백질량을 측정할 수 있었다. 한 예로서 상기의 75 l 발효조 배양에서 얻은 샘플을 본 실험에 적용하여 배양기간 동안 변화하는 단백질의 양과 에탄올에 의해 회수된 EPS의 양을 Figure 2-59에 제시하였다. 배양 초반에 생산배지에 첨가된 yeast extract의 농도가 2 g/L이었는데, 이 중 대부분이 단백질 성분이므로 배양시작 시점에서도 약 1.65 g/L의 단백질이 존재하는 것으로 나타났다. 그 후 배양액에 잔류하는 단백질 농도는 생산균주에 의해 계속 소모되기 때문에 지속적으로 감소하다가 배양이 종료된 시점에서는 0.9 g/L로서 거의 존재하지 않는 것으로 확인되었다. 따라서 본 연구를 통해 상기의 75 l 규모의 발효조 생산배양에서 에탄올 회수 시 침전된 물질이 생산균주에 의해 생합성된 세포외다당체(EPS)임을 최종 확인할 수 있었다.

(4) C/N 비율의 변화(3:1, 6:1, 9:1)에 의한 EPS 최적 생산배지 개발 및 발효조에서의 배양생리학적 연구

발효에 의한 EPS(Exopolysaccharide)의 생산 시 일반적으로 가장 중요한 요소는 탄소원과 질소원의 비(C/N ratio)인 것으로 알려져 있다. 즉 탄소원의 농도를 질소원에 비해 적정 수준 이상으로 높일 경우, 질소원의 농도 제한 조건으로 인해 세포 성장이 어느 정도 저해되므로, 상대적으로 많은 양의 탄소원이 EPS 생합성 쪽으로 이용되기 때문이다. 따라서 본 연구에서는 선행 연구에서 결정된 농도인 glucose 30 g/L, ammonium tartrate 8 g/L, yeast extract 2 g/L을 바탕으로 C/N 비율을 더욱 높이는 실험을 수행하였다. 우선적으로 glucose를 30~90 g/L까지 높여주고 질소원은 현 상태를 유지함으로써, C/N ratio를 3:1(glucose 30 g/L), 6:1(glucose 60 g/L) 및 9:1(glucose 90 g/L)의 경우에 대해 EPS 생산성 조사 실험을 수행하였다(Table 2-16).

Figure 2-60, 2-61 및 2-62에 C/N ratio에 따른 각 배양 결과를 제시하였으며, Figure 2-63과 Figure 2-64에 그 결과를 비교 분석하였다. pH 패턴은 모두 동일한 형태로 초기에 조금 상승하는 모습을 보이다가 72시간에 접어들면서 떨어지는 경향성을 나타내었다(Figure 2-63). 배양 종료시 pH는 약 4 정도로 나타났는데, 이 pH 값은 곰팡이인 생산균주의 성장에 별로 영향을 주지 않는 것

으로 보인다. 용존산소는 glucose 30 g/L와 glucose 90 g/L를 첨가한 경우 모두 거의 비슷한 경향을 보였는데, 배양기간 내내 비교적 높은 수준으로 유지되는 것으로 나타났다 (glucose 60 g/L인 경우는 배양 도중 용존산소 전극에 문제가 생겨 데이터를 제시하지 않았음). 한편 균사체의 성장 경향은 EPS의 생산 경향과 비슷한 형태를 보였다(Figure 2-64). 즉 균사체의 성장에 있어서 glucose가 30 g/L 첨가된 경우에 가장 낮게 나타났고, 90 g/L에서 16 g/L로서 가장 높게 나타났다. EPS 생산 경향을 살펴보면, 배양 초기에는 배지 성분 중에 존재하는 단백질로 인한 오염 때문에 EPS 생산량이 조금 흔들리는 경향성이 있지만, 배양 말기에는 이 단백질 성분을 생산균주가 다 소모하는 것으로 이미 관찰된 바 있으므로 배양이 끝나는 시점에서의 EPS 생산성은 상당히 정확한 것으로 생각된다. 결과적으로 EPS의 생산량은 glucose가 90 g/L로 첨가된 경우(C/N ratio=9:1)에 가장 높게 나타났고, C/N ratio의 값이 낮아질수록 EPS의 생산성이 감소하는 것으로 관찰되었다 (Figure 2-65).

Table 2-17에 상기의 배양결과를 배양변수로 요약해서 비교 제시하였다. 90 g/L의 glucose를 넣어준 배양에서 최종 EPS의 생산성은 9.49 g/L로 가장 높았으며, 단위 시간당 생산되는 EPS (average production rate)의 양도 0.0527 g/L/hr로서 가장 높게 나타났다. 또한 기질수율인 $Y_{p/s}$ 수치(glucose 1g이 소모될 때 생산되는 EPS 양(g)) 역시 0.46으로 glucose 90 g/L의 배양에서 가장 높게 나타났다. 이번 실험을 통해 가장 높은 EPS 생산성을 보인 배양조건이 3가지의 실험 조건 중 가장 높은 C/N ratio인 9:1에서 관찰되었으므로, 이보다 더 높은 비율의 C/N ratio에서 배양을 수행할 경우 EPS의 생산성이 더 향상될 수 있을 것이라고 가정하고, 13:1 및 15:1의 C/N ratio를 적용하는 실험을 다시 수행하였다.

배양 실험은 9:1의 C/N ratio를 조사했을 때와 동일하게 수행했으며, 단지 C/N ratio 만을 13:1과 15:1로 증가시키는 실험을 수행하였다(Table 2-18). 또한 control로 원래의 배지 조성인 3:1의 C/N ratio를 가진 배양을 수행하였다. Figure 2-66, 2-67, 2-68에 C/N ratio에 따른 각 조건에서의 배양 결과를 제시하였으며, Figure 2-69와 Figure 2-70에 그 결과를 비교 분석하였다. Figure 2-69로부터 pH나 용존산소의 변화는 세 종류의 배양에서 모두 비슷한 경향을 보였다. 각 실험 부근에서 $\ln X$ 와 시간에 따른 슬로프의 기울기를 통해 미세포 성장속도를 확인하였는데, 배양 초반에 세포량이 매우 적으므로 미세포성장속도가 큰 값을 보였지만 정확한 측정이 이루어지지 않았기 때문에 초반의 약 24시간은 실험상의 오차로 판단하였다.

Figure 2-70에 배지 중에 존재하는 단백질 양과 이를 감안해서 보정해 준 EPS의 생산성을 제시하였다. 150 g/L의 glucose가 제공되었을 때에는(C/N ratio=16:1), 7.57 g/L의 EPS를, glucose가 130 g/L이었을 때에는(C/N ratio=13:1) 6.4 g/L의 EPS를 생산하는 것으로 나타났다. 또한 이 두 경우의 생산성은 control 배양(C/N ratio=3:1)의 EPS 생산성과 거의 비슷한 것으로 확인되었다. 각 배양의 배양변수를 비교한 Table 2-19에서도 이러한 결과를 확인할 수 있었다. 이로부터 glucose가 과도한 수준으로 제공된 경우에는 삼투압으로 인한 기질방해(substrate inhibition) 현상이 나타나, 오히려 생산균주의 세포성장과 EPS의 생산 능력이 저해된 것으로 보인다. 지금까지 C/N ratio 배양 실험을 한 결과를 Figure 2-71에 비교 제시하였다 (오른 쪽 결과가 배양액 중의 단백질양을 감안하여 보정해준 EPS 생산량임). 90 g/L의 glucose가 제공되었을 때, 즉 C/N ratio가 9:1 정도로 유지될 때, glucose에 의한 기질저해 현상이 발생하지 않아 세포 성장도 훌륭하며, 또한 더욱 많은 양의 glucose가 EPS 생합성 쪽으로 효율적으로 이용되어, EPS의 생산성이 가장 큰 폭으로 증가함을 알 수 있었다. 결론적으로 이 배지 조성을 EPS의 대량 생산을 위한 최적배지로 최종 결정할 수 있었

다.

라. 세포벽 다당체(IPS) 생산 배양공정 개발 및 scale-up 배양 연구

(1) 발효조 배양을 통해 brown rice가 제외된 IPS 생산배지 개발 및 발효조 배양 공정 연구

앞서 이미 설명한 다단계 배양에 의한 산업화 공정 개발 연구 부분에서 성장배지와 생산배지 성분으로 복합 탄소원 성분인 brown rice를 사용하였는데, 이 경우 모든 배양에서 균사체 생산성이 꽤 높게 나타난 바 있다. 그러나 이 생산배지를 세포벽다당체(Intracellular polysaccharides)(IPS) 생산을 위한 산업용 배지로 사용했을 경우, 분리정제 공정에서 문제점이 발생하는 것으로 지적되었다. 즉 생산배양 종료 후 배양액 중에 잔류하고 있는 brown rice의 다당체 성분인 전분(starch)이 분리정제 공정 단계에서 IPS를 심각하게 오염시키는 것으로 확인되었다. 따라서 본 연구에서는 생산배지 중의 brown rice 성분이 비록 균사체 성장을 크게 향상시켰지만, 산업용 공정에 적합하지 않은 것으로 확인되어 brown rice를 제외시킨 IPS 생산배지를 새로이 개발하고자 하였다. 단 성장배지에는 brown rice가 포함되어도 최종 생산배양 공정에서 분리정제 공정에 전혀 영향을 끼치지 않는 것으로 확인되어 성장배양에서는 예전의 배지 성분을 그대로 이용하였다 (Process F 참고).

이전의 연구결과에 따르면 *Inonotus obliquus* 균사체의 액상 발효조 배양시 세포벽다당체(IPS)의 함량은 균사체 건조무게 당 거의 일정한 양을 함유하고 있으므로, 균사체의 생산량 증가가 IPS의 생산량 증가를 위해 가장 중요한 요인임을 알 수 있다. 즉 생산균주의 세포벽 내에 IPS 다당체가 포함되어 있으므로 발효조 배양시 균사체의 고농도 배양이 가장 중요한 전략이 된다. 본 연구에서는 제1협동과제 연구팀에서 플라스크 배양을 통해 통계적으로 최적화한 IPS 생산배지 조성을 기초로 하여 5L 발효조 배양을 수행함으로써 생산균주의 배양 생리적 특성 및 배양 형태적 특성을 조사하였다.

발효조를 이용한 선행 실험 결과, 배지 최적화 조건이 플라스크 배양과는 다소 차이가 나는 것으로 확인되어, 발효조 배양을 통해 IPS 생산배지를 다소 수정하는 실험을 수행하였다. 즉 두가지 탄소원인 glucose와 fructose가 동시에 존재할 때, glucose가 우선적으로 모두 이용되기 전까지는 fructose가 거의 이용되지 않는 현상을 확인하였는데, 이로부터 1 가지 탄소원만 존재하는 경우에 catabolite repression 현상도 극복되면서 더 좋은 성장을 할 것으로 예측되었다. 또한 저렴한 산업용 배지성분인 glucose만을 배지내의 탄소원으로 이용할 경우에 배양공정이 더욱 경제적이 될 것이라고 예상하였다.

세 종류의 배양에서 탄소원의 전체 탄소원 농도는 모두 35 g/L로 고정하였다(Table 2-20). Control 배양에서는 원래의 조건대로 두 종류의 탄소원을 모두 사용하였고(IPS-1 배양), IPS-2 배양에서는 glucose만을 35 g/L로, IPS-3배양에서는 fructose만을 35 g/L로 첨가하여 발효조 배양을 수행하였고, 그 결과를 Figure 2-72, 2-73, 2-74에 각각 제시하였다. 주목할 만하게도 control 배양의 경우(Figure 2-72), glucose 만이 우선적으로 사용되고, glucose가 거의 다 소모되었을 때, 비로소 fructose가 사용되는 전형적이 catabolite repression 현상이 관찰되었다. Figure 2-75에 각 배양을 비교한 결과를 제시하였는데, 모든 배양에서 pH는 배양 중반까지 천천히 증가하다가 120시간 이후 감소하는 패턴을 보였다. IPS의 생산성, 즉 균체 생산량은 fructose만을 사용했을 때 가장 낮았으며, glucose와 fructose가 조합된 배지가 중간, 그리고 glucose만을 탄소원으로 사용한 배지에서 18 g/L

로서 가장 높게 나타났다. 이 결과는 저렴한 glucose만을 IPS 생산배지의 탄소원으로 사용할 수 있음을 제시해 주는데, 그 결과 발효조 배양에 적합한 최적의 생산배지 조성을 다음과 같이 결정할 수 있었다: 탄소원으로 glucose 35 g/L, 질소원으로 casein enzymatic hydrolysate 3.5 g/L, soytone peptone 7.5 g/L, KH_2PO_4 6 g/L, MgSO_4 3 g/L.

(2) 발효조 배양을 통해 oil 성분이 첨가된 IPS 생산배지 개발 및 이를 이용한 scale-up 발효조 배양공정 연구

본 실험에서는 제 1협동과제팀에서 개발한 오일이 포함된 생산배지가 발효조에서도 적용되는지를 확인하고, 이를 이용해서 scale-up된 발효조에서 균체 생산량을 극대화시키는 연구를 수행하였다. 오일이 포함된 생산배지가 산업화 공정에서 매우 유용함은 이미 많은 연구에서 밝혀졌다. 매우 환원된 상태로 존재하는 오일을 탄소원으로 이용하는 배양의 경우, 기질에 근거한 생산균주의 균체량 ($Y_{x/s}$)(생산수율)이 다른 탄소원 기질들에 비해 더 높은 것으로 알려져 있다. 또한 산업용 발효조 배양에서, 탄소원으로 첨가된 oil 성분이 항거품제의 역할을 동시에 수행하기 때문에 배양중 과다 거품의 발생으로 인한 오염의 위험성이 크게 줄어드는 것도 oil 사용의 한 장점이 된다. 제 1협동과제팀에서 생산균주가 오일을 이용할 수 있는지의 여부를 조사한 결과, 이 생산균주는 오일분해 효소인 lipase의 분비 능력이 비교적 우수한 것으로 나타났고, 이에 근거하여 오일이 첨가된 IPS 배지를 최적화 했다. 따라서 본 연구팀은 제 1협동과제팀의 연구결과에 근거해서 오일이 포함된 생산배지를 발효조 배양을 통해 다시 테스트 해보고, 궁극적으로는 오일이 포함된 발효조 배양용 저가의 산업용 배지를 개발하고자 하였다. 이를 위해 5 l 발효조 배양은 물론, 유망한 배지조성의 경우에는 pilot 규모의 75 l 발효조 배양도 수행하였다.

제 1협동과제팀이 다양한 오일을 조사하여 개발한 배지 조성을 바탕으로, 오일을 첨가한 IPS 생산배지로 발효조 배양 연구를 수행하였다. Control 배양은 oil은 전혀 첨가되지 않고 glucose 35 g/L만이 탄소원으로 첨가된 생산배지, 즉 이전에 최적화된 배지 조성을 이용하여 수행되었다. Oil 이 첨가된 배지는 기존의 배지성분 이외에 lard oil과 wheat germ oil이 각각 10 ml/L씩 더 첨가된 배지조성이다(Table 2-21). 각각의 생산배지로 수행한 실험결과를 Figure 2-76, 2-77, 2-78에 각각 제시하였다. 부피성장속도는 초반에 비교적 빠르게 성장하는 wheat germ oil의 경우에 가장 높게 나타났다. 또한 시간에 따른 $\ln X$ 그래프를 이용해서 지수기 성장단계인 65~138시간 동안의 세포비성장속도(μ)(specific growth rate)를 비교해본 결과, wheat germ oil의 경우가 lard oil이나 control 배양에 비해 더 높게 나타났다 (이는 Figure 2-76, 2-77, 2-78의 시간에 따른 $\ln x$ 의 그래프에서 직선으로 나타난 부분의 기울기를 비교함으로써 알 수 있음). 각 배양 결과에 대한 비교는 Figure 2-79, 2-80, 2-81에 나타내었다. Figure 2-79로부터 control 배양의 경우 균체 생산성이 16.0 g/L인데 비해, wheat germ oil이 첨가된 경우에는 약 20.1 g/L로 생산성이 뚜렷하게 증가하는 것을 알 수 있었다. 특히 wheat germ oil의 경우 84시간 이후에 성장이 지속적으로 유지되는 것을 확인할 수 있었다. glucose가 이용되는 속도는 초반부에는 비슷한 경향을 보였으나, 후반부(120 시간 이후)로 가면서 oil이 존재하지 않는 control 배양에서 가장 빠르게 나타났다. pH 변화 경향은 세 배양 모두 비슷하게 나타나다(Figure 2-80). 한편 각 배양에 대한 주요 배양변수를 Table 2-22에 비교 제시하였다. 생산균주의 glucose의 평균소모속도(average consumption rate)는 wheat germ oil을 첨가한 배양에서 가장 낮게 나타났는데, 이로부터 이 경우의 배양이 oil을 가장 효율적으로 사용하고 있음을

알 수 있었다. 또한 평균성장속도(average growth rate)와 비성장속도(specific growth rate) 모두 wheat germ oil의 경우에 가장 높았고, glucose의 이용 효율을 나타내는 세포수율(소모된 단위 기질 당 세포 생산량)에서도 wheat germ oil이 가장 높게 나타났다(Table 2-22).

(3) 통계적 배지최적화(full factorial design)(FFD)를 위한 플라스크 배양 실험에서 생산성이 높은 두가지의 배지 조합에 대한 발효조에서의 배양 연구

Wheat germ oil 첨가배지에서 좋은 효과가 나타나는 것을 확인하였지만, 플라스크 배양을 통해 더욱 다양한 배지 성분과 조합으로 최적화 실험을 수행한 결과, 주목할 만하게도 oleic acid의 경우에 다른 oil에 비해서 더 좋은 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다(제1협동과제팀의 연구 내용). 특별히 oleic acid의 경우 필요한 적당량의 glucose가 공급될 경우에 wheat germ oil 보다 플라스크 배양에서 더 좋은 효과를 보이는 것으로 나타났는데, 이는 배양 공정과 분리정제를 연계시켜 볼 때 꽤 중요한 의미를 지닌다. 즉 oleic acid의 경우에 동일한 분자로 이루어진 단일 물질인데 비해 wheat germ oil은 복합성분으로 구성되어 있어, 분리정제 공정에서 oleic acid가 더 좋은 효과를 나타낼 것이기 때문이다.

따라서 oleic acid, glucose, casein enzymatic hydrolysate, soytone peptone, KH_2PO_4 를 다양하게 조합한 통계적 배지최적화(full factorial design, FFD)를 위한 플라스크 배양 실험에서 균사체 생산성이 높게 나타난 두가지의 배지 조합(Table 2-23)에 대해 발효기 배양에서도 동일한 결과를 나타내는지 확인하는 실험을 수행하였다. 각각의 배양 결과를 Figure 2-82과 Figure 2-83에 제시하였고, 또한 이들을 비교한 결과를 Figure 2-84와 Figure 2-85에 나타내었다. 균사체 생산성, pH 변화, glucose 소모 경향 등의 발효 특성이 두 발효기 배양 모두(FFD run #21과 FFD run # 33)에서 거의 비슷한 경향을 나타내었는데, 특별히 최종 균사체 생산성이 단일 fatty acid 성분인 oleic acid를 첨가했음에도 불구하고, 20 g/L 이상에 이르렀음은 주목할 만하다. 또한 pH도 배양기간 내내 5.4에서 6.0 이내의 비교적 좁은 범위에서 변화하는 안정적인 경향을 보인 결과(Figure 2-84), 발효기 배양의 안정성(재현성)도 우수한 것으로 확인되었다 (한편 oil을 첨가하지 않은 control 배양의 경우는 균사체의 생산 재현성이 낮게 나타났다. 따라서 oil이 첨가되지 않은 이전의 최적배지로 발효 공정을 scale-up하기가 까다로운 본질적인 문제점이 존재하는 것을 확인하였다). 이 결과는 매우 환원된 상태로 존재하여 에너지 효율성이 우수한 oleic acid를 주 탄소원으로 이용할 뿐만 아니라, 특성상 oleic acid를 향겨품제로도 사용할 수 있는 IPS 생산 발효조 배양공정이 확립되었음을 의미한다.

(4) Oleic acid를 함유한 생산배지를 이용한 생산균주의 배양생리적 및 형태적 연구(접종량 조사 실험)

Oleic acid를 주 탄소원으로 이용하는 배양공정을 확립하기 위한 기본 실험으로 우선 생산 발효 조로의 접종량 변화가 균체의 생산성에 미치는 영향을 조사하였다. 균사형성 고등균류인 *Inonotus obliquus* 균사체는 액상 발효조 배양시 일반적으로 filamentous한 형태로 성장한다. 이로 인해 발생하는 배양액의 점도 증가 현상으로 인해 산소공급이 제한되어 지수기 성장단계에서 생산균주의 성장이 저해 받는 현상이 발생하곤 한다. 본 연구에서도 이러한 문제점이 발생하는지 조사하기 위해 최종 생산 발효조로의 접종량을 원래의 10%(v/v)로 해서 배양한 경우와, 5%(v/v)로 감소시켜 배양하는 경우를 비교하는 실험을 수행하였다.

Figure 2-86과 2-87에 10%와 5%로 접종해서 수행한 생산배양 결과를 각각 나타내었고, 각 배양을 비교한 결과를 Figure 2-88과 2-89에 제시하였다. 균체 성장은 5%의 경우가 lag phase가 더 길어지는 현상으로 인해 감소하는 것으로 나타났다. pH의 변화 경향은 비슷하게 나타났지만 용존산소의 경우는 10% 접종률의 경우 세포 성장이 배양 초반부터 매우 활발하여 이 기간 동안 급속도가 감소하는 것으로 관찰되었다. 배양 morphology는 접종량에 관계없이 일부의 pellet 형태가 존재하지만 filamentous한 형태도 같이 존재하는 거의 비슷한 모양을 띠는 것으로 나타났다 (Figure 2-90). 본 실험 결과 생산발효조로의 접종량은 여전히 10%가 적절한 것으로 판단되었는데, 이 경우에 이전의 실험과 비교해서 거의 비슷한 균체 생산성을 여전히 얻을 수 있었는데, 이로부터 oleic acid를 주 탄소원으로 사용하는 경우 배양 안정성과 생산 재현성이 매우 우수함을 알 수 있었다. 이에 대한 더 자세한 실험결과는 뒤에서 자세히 논의할 예정이다.

(5) 성장배지에 oil 첨가 유무에 따른 oil 첨가된 최종 생산배지에서의 균체 생산성 조사 (75리터 scale-up 발효조 배양)

지금까지의 연구를 통해 oleic acid를 첨가한 IPS 생산배지 조성의 우수함을 알 수 있었으므로, 더욱 최적화된 배지조성을 이용해서 두 번에 걸친 pilot scale의 발효공정을 운영하였다. 이 pilot-scale의 발효조는 세포외다당체(EPS) 생산 시에 적용했던 배양공정과 동일하게 운전되었다. 즉 75L 규모의 발효조에서 배양액의 부피를 45 l로 하여 배양하였고, 적절한 접종량을 확보하기 5리터 발효조에서의 성장배양은 4 l 조업부피로 수행하였다(75 l 발효조로의 접종량은 8.8%(v/v) 임). 두 번에 걸쳐 75 l 생산배양을 수행하였는데, 첫 번째 배양의 경우는 5 l 성장배양에서 지금까지 사용해 온 brown rice가 포함된 성장배지를, 두 번째 배양의 경우는 5 l 성장배지의 성분들이 oil을 포함하고 있는 생산배지의 성분들과 동일하지만, 각 성분들의 농도는 50%로 줄인 배지조성을 사용하였다(Table 2-24). 이와 같이 조성이 매우 다른 성장배지를 테스트한 이유는 최적화된 생산배지의 배양 안정성, 즉 균사체 생산의 재현성이 pilot 규모의 생산배양에서 훌륭하게 유지될 수 있는지를 조사하고자 함이었다. 한편 75 l의 발효기에서 사용한 최적 생산배지는 상기에서 사용한 “FFD run #21”의 배지 조성을 조금 변형시킨 배지조성으로 구성되어 있는데, 이 배지는 제 1협동과제 연구팀에서 통계적 배지 최적화 연구를 통해 최종 추천한 배지이다(Table 2-23의 “FFD run #21”과 Table 2-24의 “IPS production medium(with oil)”의 배지 조성 비교).

Figure 2-91과 Figure 2-92에 75 l의 최종 생산 발효조에서 45 l의 조업부피로 배양한 각각의 실험결과를 제시하였으며, 또한 이들을 비교한 결과를 Figure 2-93에 나타내었다. 75 l의 최종 생산배양에서의 균사체 생산성, glucose 소모 경향 등이 배지조성이 매우 다른 성장배지를 사용했음에도 불구하고, 두 경우 모두 매우 비슷한 경향을 나타내었다 (Figure 2-93). 또한 pH의 경우도 이전의 oleic acid를 사용한 배양결과와 거의 동일한 pH 변화 경향을 관찰할 수 있었다. 즉 배양 초반에 glucose의 사용으로 pH가 어느 정도 감소하다가 배양 후반에 접어들면서 상승하기 시작하는데 이때 oleic acid가 다량 이용되기 시작하는 것으로 보인다(Figure 2-91, 2-92). 이상의 배양 결과로부터 본 연구를 통해 최종 확립한 생산배지와 생산균주의 배양 안정성 및 생산 재현성이 매우 우수함을 다시 한번 확인할 수 있었다. 특히 주목할 점은 이번 75 l 생산발효조 배양에서 최종 균사체 생산성이 두 배양 모두에서 매우 높은 수치인 25 g/L에 이르렀다는 점이다. 이 수치는 지금까지 5 l 발효조로 얻은 균사체 생산량에 비해 약 25% 증가된 생산성인데, 이로부터 에너지 효율성이 우수한

oleic acid가 scale-up된 발효조 배양공정에서도 제 역할을 훌륭하게 수행하고 있음을 확인할 수 있었다. 현재 더 scale-up된 발효조를 이용하여 세포벽다당체(IPS)의 대량 생산을 위한 생물배양공정 연구를 집중적으로 수행 중에 있다.

(6) 생산배지의 주요 탄소원 성분으로 oil 또는 oleic acid를 사용할 때의 발효공정의 우수성과 균체 생산 안정성 확인

생산배지의 주요 탄소원 성분으로 oil 또는 oleic acid를 사용할 때 그 우수성과 생산 안정성을 다시 한번 강조하기 위해 발효조에서 지금까지 수행한 다양한 배양 결과를 Figure 2-94에 요약해서 제시하였다. Figure 2-94의 그림 설명에서 growth(BR)은 성장배지 성분으로 brown rice가 사용된 경우이며, growth(oil)은 oil 성분이 성장배지의 한 성분으로 사용된 경우인데, 이로서 성장배양에서 oil의 첨가 유무를 구분하였다. 또한 production(oil)과 production(without oil)의 표시를 이용해서 생산배지에서의 oil 또는 oleic acid 성분의 첨가 유무를 구별하였다. 물론 같은 부호인 production(oil)을 사용했는지라도 그 세부적인 배지 성분은 약간씩 다르게 첨가되었음을 이전에 설명한 바 있다.

이 결과로부터 생산배지 성분으로 oil이 첨가되지 않은 경우에는는 균체 생산성이 15 g/L 이하에서 19.5 g/L에 이르기 까지 넓게 분포하는 것으로 나타났는데, 이로부터 발효조를 이용한 생산배양에서의 균체 생산성이 각 배양의 배양조건에 의해 민감하게 영향 받는다는 것을 확인할 수 있었다. 즉 균체 생산성이 비교적 낮을 뿐만 아니라, 생산 재현성 면에서도 불안정한 모습을 보여주었다. 이와는 대조적으로, 생산배지 조성에 oil이 또는 oleic acid가 첨가된 경우에는, 성장배양 시 oil의 사용 유무에 관계없이, 최종 발효조 생산배양에서의 균체 생산성이 모든 배양에서 20 g/L 이상으로 높게 유지되며, 특별히 생산배지가 더욱 최적화된 경우는 거의 25g/L에 이르는 결과를 얻을 수 있었다(Figure 2-94). 특히 이 경우(production(oil))에 전 배양 기간에 걸쳐 균체의 성장 속도가 거의 비슷하게 유지될 뿐만 아니라, 최종 균체 생산성도 동일한 조건에서는 거의 같게 나타났는데, 이로부터 생산배지에 매우 환원된 상태인 오일 성분을 탄소원으로 첨가할 경우 배양 재현성과 균체 생산성이 모두 훌륭함을 다시 확인할 수 있었다.

마. *I. obliquus* 균사체의 발효조 액상 배양공정 자동화 및 scale-up을 위한 배양시스템 구축

(1) 균사형성 담자균류 균사체의 액상배양시 용존산소 결핍현상 해결을 위한 용존산소농도 자동제어 방법 확립: *I. obliquus* 균사체의 발효조 액상배양 시 용존산소 결핍현상 고찰

균사형성 담자균류인 *I. obliquus* 균사체의 발효조 배양 시 용존산소 공급의 중요성을 조사하기 위해 공기공급량은 일정하게 유지한 채로(1.0 vvm), 교반속도만 변화시켜가며 수행한 배양결과를 Figure 2-95에 제시하였다. 교반기의 속도를 100 rpm에서 220 rpm까지 변화시키며 배양했지만 용존산소량이 배양 시작 후 48시간 이내에 급격히 감소하여서, 배양 7.5일째 까지 계속 “0” (zero)로 유지되었다. 배양기간 내내 생산균주의 배양형태는 모두 균사모양인 것으로 관찰되었다. 또한 세포외다당체(EPS)의 생산으로 인해 배양액의 점도가 크게 증가해서 배양액 내로의 용존산소 전달이 매우 부족한 것으로 판단되었다. 배양 9일째의 최종 균사체 농도는 약 17 g/L이고 세포외다당체의 생산량은 약 5.2 g/L이었다. 약 8일이 경과한 후에는 배양액 중의 중요 영양원의 고갈로 인해 용존산소 농도가 다소 증가하는 경향을 보여주었다. 이 실험결과로부터, 발효조에서 균사형성 *I. obliquus*

균사체 배양에 의한 단백다당체의 생산성을 극대화시키기 위해서는 우선적으로 전단응력에 의한 악영향을 함께 고려해 주면서 배양액에서의 용존산소 결핍현상을 극복해주어야 함을 확인할 수 있었다. 이는 용존산소의 정밀조절을 통해 최적의 용존산소 공급이 이루어져야 함을 제시해 준다.

(2) 발효기 배양공정의 scale-up시 가장 중요한 산소물질전달계수(k_La) 측정방법 확립 및 교반기의 종류에 따른 산소전달계수 비교 연구

실험실 내의 5 l 소규모 발효기를 이용해서 얻은 배양결과를 5,000~50,000 l 규모의 대규모 산업용 발효기 배양에서도 동일하게 얻기 위해서는, scale-up시 가장 중요한 산소전달계수(k_La)에 대한 측정이 이루어져야 한다. 일반적으로 용존산소를 제외한 거의 모든 배양 조건(예를 들면 각 배지 성분의 농도, pH, 온도 등)은 두 규모의 발효기에서 동일하게 유지될 수 있으나, 용존산소의 경우는 그 용해도가 매우 낮으므로(30°C에서 약 7ppm 정도), 배양 중 지속적으로 산소를 공급해 주어야만 용존산소의 결핍현상이 극복될 수 있다. 이 경우 기체산소를 용존산소로 변화시키는 속도인 산소전달계수가 가장 중요한 인자가 된다. 즉 소규모 발효기에서의 산소전달계수의 값과 대규모 발효기에서의 값이 거의 동일한 수준으로 유지되어야만 비로소 용존산소를 포함한 모든 배양조건이 거의 비슷하다고 결론지을 수 있다. 본 연구팀은 dynamic method에 의한 산소전달계수의 측정에 의해(실험방법에 제시), *I. obliquus* 균사체 배양을 위한 최적의 교반기(impeller)를 탐색하고자 하였다. 산소전달계수의 측정을 위해 컴퓨터를 이용하여 초당 하나의 데이터를 받아들이고 용존산소 물질수지식에 대한 계산은 모두 컴퓨터 내에서 수행하였다. 모든 전기적 신호를 컴퓨터에서 읽을 수 있도록 컴퓨터 내부에 software를 설치하여 일정 시간 동안 전달되는 데이터를 저장한 후 분석하였다.

두 종류의 impeller, 즉 6-blade-turbine impeller(이하 turbine impeller)와 paddle impeller(Table 2-25)를 사용하여 이들의 산소전달 능력을 비교 조사하였다. 각 교반기의 교반속도에 따른 산소전달계수를 측정한 결과, paddle impeller가 turbine impeller에 비해 약 0.2배 높았고, 300 rpm 이상의 교반속도에서는 그 증가폭이 감소하는 것으로 나타났다(Figure 2-96(A)). 또한 공기공급량에 따른 산소전달계수를 비교한 결과 두 경우 모두 1.0vvm 이상의 공기 공급 시에는 산소전달계수의 증가가 거의 없는 것으로 관찰되었다. 특히 paddle impeller의 경우, 1.3 vvm 이상의 공기 공급 시에는 channeling 현상이 발생하여 산소전달계수가 오히려 감소하는 현상이 나타났다(Figure 2-96(B)). 따라서 공기 공급량이 증가한다고 해서 산소공급량이 동일한 경향으로 증가하지는 않는다는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같이 산소전달계수를 측정한 결과, turbine impeller보다 paddle impeller의 산소전달률이 높음을 확인하였다.

실제로 여기서 밝혀진 paddle impeller의 산소전달 우수성이 실제 배양에서도 구현되는지 확인하기 위하여 turbine impeller와 paddle impeller를 각각 장착한 발효조로 *I. obliquus* 균사체의 생산배양을 수행하였다. 배양 조건, oleic acid가 첨가된 생산배지 조성 및 각 impeller의 사진을 Figure 2-97에 제시하였다. 각각의 생산배양을 위한 성장배양에서는 oil이 첨가된 성장배지를 사용하였다(Table 2-34의 IPS growth medium(with oil) 배지 조성). Figure 2-98와 Figure 2-99에 각 생산배양 결과를, 또한 Figure 2-100과 2-101에는 이들을 비교한 결과를 나타내었다. 최종 생산배양에서의 균사체 생산성, glucose 소모 경향 등이 동일한 배양조건에서 동일한 배지조성으로 수행했음에도 불구하고, paddle impeller를 사용한 경우에 매우 우수한 것으로 확인되었다. 즉 paddle impeller의 경우에 glucose의 섭취속도가 지수기 성장기에서 훨씬 높아 배양 중반에 glucose를 다 소모하였고,

최종 균체 생산량도 turbine impeller에 비해 거의 2배나 높게 나타났다(Figure 2-100). 또한 pH의 경우도 이전의 oleic acid를 사용한 배양결과와 거의 동일한 pH 변화 경향을 보였으나, paddle impeller의 경우에 pH가 생산균주의 성장에 더 적합한 범위인 pH 5.5~6.0정도(turbine impeller의 경우에는 pH 4.5~4.8 수준에서 유지됨) 수준에서 유지되는 것으로 관찰되었다(Figure 2-101). 두 경우 모두 배양 초반에 glucose의 사용으로 pH가 어느 정도 감소하다가 배양후반에 접어들면서 상승하기 시작하는데 이 때 oleic acid가 다량 이용되기 시작하는 것으로 보인다. 특히 배양중의 용존 산소 변화 경향에서 뚜렷한 차이가 나타났는데, paddle impeller의 경우 높은 산소전달계수로 인해 배양액으로의 용존산소 전달이 매우 훌륭하게 이루어져서, 배양기간 내내 포화용존산소 농도가 35% 이상으로 유지된 반면, turbine impeller의 경우에는 이와는 정 반대되는 현상으로 인해 배양 1일째 부터 용존산소 고갈현상이 나타나기 시작해서 배양기간 내내 이 현상이 지속되는 것으로 관찰되었다. 따라서 shear stress에 민감한 배양 생리적 특성을 보이는 *I. obliquus* 균사체의 발효조 배양 시 전단응력은 낮지만 산소전달계수는 훌륭한 paddle impeller를 사용하기로 최종 결정하였다.

이와 같이 균체 생산성에 매우 중요한 요소로 작용하는 배양액의 용존산소 농도를 발효기 운전자가 원하는 수준으로 유지시키기 위해 발효공정을 자동 조절하는 시스템을 개발하고자 하였다. 상기에서 paddle impeller 사용 시 용존산소를 자동 조절하기 위해서는 공기공급량(vvm)을 조정하기보다는 교반속도를 변화시키는 것이 훨씬 효율적임을 위에서 확인한 바 있으므로, 본 연구에서는 공기공급량은 일정하게 유지(1.0 vvm)한 상태에서 교반속도만 자동 조절(100~300 rpm)시켜가며 *I. obliquus* 균사체의 발효조 배양을 수행하였다. 그 결과를 Figure 2-102에 제시하였는데, 약 24~48 시간에 속하는 지수기 성장단계에서 교반속도를 증가시킴에 따라 용존산소 농도가 배양 전 기간에 걸쳐 약 30% 이상의 포화용존산소 수준으로 유지되었으며, 정체기에 들어가기 시작한 60시간 이후에는 교반속도를 130 rpm 정도로 낮추어도 용존산소농도가 감소하지 않고, 오히려 배양액 중의 중요 영양원의 고갈로 인해 다시 증가하는 경향을 보여주었다 (이 배양의 최종 균사체 농도는 약 16 g/L 임). Bench-scale 발효조에서의 용존산소 자동조절 공정은 성공적으로 수행되었으므로, 지금은 scale-up된 발효조를 이용하여 용존산소 농도의 자동 조절을 통한 *I. obliquus* 균사체의 대량 생산을 위한 자동화 연구를 집중적으로 수행하고 있다.

(3) 통기량과 교반속도의 동시 조절을 통한 용존산소 농도 조절 시스템 확립

생산균주의 배양 중 용존산소의 적정 유지는 배양공정의 효율성을 높이는 데 필수적인 요소이다. 즉 생합성 시 고에너지를 필요로 하는 단백질단체의 생산성 증가를 위해서는 높은 교반속도 시 발생하는 전단능력에 의한 악영향을 최소화시키면서 용존산소 결핍현상을 배양 중 적시에 해결해 주어야 한다. 본 연구의 대상 균사체인 *I. obliquus*는 균사형성 고등균류에 속하는 담자균류로서 액상 배양 시 균사모양의 성장으로 인해 배양액의 점도가 높아짐에 따른 산소전달계수의 급격한 감소현상이 나타나게 되어, 배양 중 용존산소 조절이 매우 어렵다. 이를 위해 본 연구에서는 교반속도와 통기량의 동시 자동조절을 통해 생산균주 균사체의 발효조배양 시 용존산소농도를 적정 수준으로 조절하기 위한 용존산소농도 자동조절 제어프로그램을 확립하였다.

우선 1차적인 제어로서 교반속도의 변화를 통해 용존산소를 원하는 조건으로 제어한 후, 미리 설정해 놓은 최대값에 도달하면 1차제어가 그대로 유지되거나, 또는 2차 제어(통기량 자동 조절)가 시작되도록 하였다. 배양 중 생산균주의 농도가 지속적으로 증가하므로, 용존산소농도를 원하는 설정

값으로 유지하기 위해 교반속도를 계속 증가시킬 경우, 생산균주에게 악영향을 미치는 전단응력이 증가하게 된다. 전단응력을 고려해서 설정해 놓은 교반속도가 최대값에 도달하게 되면 통기량을 변화시키는 2차제어를 시작하도록 설계하였다. 2차 제어 역시 설정해 놓은 최대값에 도달하게 되면 더 이상 증가하지 않고 그대로 유지되거나, 배양 상태에 따라 점차로 감소하도록 설계하였다. 즉 원하는 제어값에 도달하기 위해 교반속도 또는 통기량이 적용비율에 따라 조금씩 변화하도록 설계하였다.

이와 같은 용존산소 제어프로그램이 제대로 작동하는지의 여부를 조사하기 위해 5 l 발효조에서 3 l 조업부피로 생산균주를 배양하였다. 이 때 교반기와 공기 공급장치로는 4-blade paddle impeller 와 9-hole ring sparger를 사용하였다. 배양액의 용존산소농도를 조절하기 위하여 용존산소농도를 실시간으로 측정하여 아날로그 신호를 디지털 신호로 변환하여 컴퓨터로 전달되도록 하였다. 정해진 용존산소 고정값(set point)으로부터 실제 측정된 용존산소농도 값이 벗어난 정도에 따라서 교반속도와 공기공급량을 자동으로 감소 또는 증가시켰다. 교반속도와 공기공급량이 상한값 과 하한값 인 100~380 rpm, 1~2.0 vvm (3~6 L/min) 사이에서 작동되도록 제어프로그램을 작성하여, 배양 전반에 걸쳐 용존산소를 30% 이상으로 유지시키는 배양을 수행하였다. Figure 2-103에 용존산소, 교반속도 및 통기량의 변화를 제시하였다. 생산균주의 급격한 성장에 의해 용존산소는 배양 약 24 시간 정도에 30%로 감소하는 것으로 나타났다. 이 지점에서 30%의 용존산소를 유지하기 위해 교반속도와 공기공급량이 동시에 증가하다가 상한값에 도달한 후 그 상태를 유지하였다. 그리고 약 48 시간 이후부터 교반속도 및 공기 공급량이 천천히 감소하는 것을 알 수 있다. 이러한 현상은 배양이 지속될수록 배양액 내의 영양분이 고갈됨에 따라 세포의 산소요구량이 감소하기 때문이며, 그 결과 배양 후반부에서는 용존산소가 급격히 증가하는 것으로 나타났다. 즉 배양 약 140시간 이후에 용존산소의 급격한 증가 현상이 관찰되었는데, 이로 인해 교반속도와 공기공급량이 하한값으로 자동적으로 줄어드는 것으로 나타났다. 결론적으로 본 연구에서 설계한 용존산소 자동 제어프로그램이 매우 훌륭히 작동함을 확인할 수 있었다.

(4) 발효기 배양공정의 pH 자동제어: pH-stat 유가식 배양에 의한 pH 제어 방법 확립

수소이온농도(pH)는 세포의 효소 활성에 영향을 미치므로 세포성장과 대사에 미치는 영향이 매우 크다. 이는 *I. obliquus*과 같은 고등균류 배양 시 적극적으로 pH를 제어해 주어야 함을 제시해 준다. 고등균류 배양 중에는 배지의 pH를 변화시킬 수 있는 다양한 영양분이 생산균주에 의해 이용되거나, 다양한 대사물질들이 생산균주에 의해 생합성 된다. 종종 질소원의 성질이 pH 변화에 중요하게 작용하는데, 암모늄이 유일한 질소원일 경우, 암모니아가 세포에 의해 소모됨에 따라 배지내로 수소이온이 방출되어 결과적으로 pH가 감소하게 된다. 또한 pH는 탄소원의 이용에 따른 유기산의 생성, 배지 중에 영양분으로 공급된 산(특히 아미노산 등)의 소모, 또는 혐기성 물질의 생산에 의해 변할 수도 있다.

본 연구에서 개발한 pH-stat을 통한 유가식 배양 운영방식은 영양분을 흡수하는 세포의 생리적 특성에 바탕을 두었다. 즉 생산균주가 glucose를 소모할 경우 TCA cycle을 통해 많은 유기산들이 만들어짐에 따라 배양액내의 pH가 감소하는 반면, 질소원으로 단백질 또는 아미노산을 이용 시에는 ammonium ion의 배양액으로의 배출로 인해 pH가 증가하는 현상을 이용하고자 하였다. 이와 같은 세포의 배양생리적 특성을 이용할 경우, 산과 알칼리 용액의 첨가에 의해 pH를 단순 조절하는 방식

이 아니라, 공급되는 탄소원과 질소원을 사용함으로써 생산균주에 적정량의 영양분을 공급함과 동시에 배양액의 pH도 최적으로 유지시켜 줄 수 있기 때문에, 생산균주의 생산성을 극대화시킬 수 있는 배양공정(pH-stat 유가식 배양공정)이 개발될 수 있을 것으로 판단하였다.

본 연구에서 pH-stat 유가식 배양공정을 개발하기 위해 유가식으로 공급되는 탄소원으로는 glucose를, 질소원으로는 yeast extract와 soypeptone을 동시에 이용하여 pH-조절 유가식 배양을 수행한 결과를 Figure 2-104와 Figure 2-105에 제시하였다. 탄소원과 질소원의 주입시간은 30초로 하였으며, 이 영양분들을 최초로 공급하는 시점은 생산균주가 배양초기에 공급된 질소원을 이용하기 시작하기 때문에 pH가 증가하는 시점으로 결정하였다. 탄소원과 질소원의 공급은 발효기에 장착에 산/알칼리 feedign 펌프를 이용하였고, pH의 조절값은 5.3~5.5로 정하였다. Figure 2-105에 나타난 바와 같이 지수기 성장단계에서 약 2일 동안 pH가 원하는 값에서 일정하게 조절되었으나, 그 이후에는 탄소원을 추가로 공급해도 pH가 제대로 조절되지 않는 것으로 관찰되었다. 배양중의 잔류 glucose의 변화 경향을 살펴보면, 배양 84시간까지는 감소하다가 84시간 이후 증가하는 것으로 관찰되었는데(데이터 미제시), 이로부터 pH가 증가함에 따라 탄소원은 제대로 공급되었지만 질소원의 적정 공급은 제대로 이루어지지 않았음을 알 수 있다. 그 결과 배양 후반에 배양액의 잔류 탄소원은 충분하나 질소원이 부족한 상태가 발생하는 배지의 영양비균형 상태가 발생한 것으로 판단된다. 본 연구 결과 유가식 배양을 통해 pH가 일정기간 동안 자동 조절되는 것을 확인할 수 있었음은 고무적이었지만, 최적의 pH-stat 유가식 배양공정을 개발하기 위해서는 feeding 해주는 배지의 성분, 농도, 공급량 등에 대한 더욱 세밀한 연구가 진행되어야 할 것으로 판단되어 이에 대한 연구를 계속 진행하고 있다.

바. 배양공정 자동화시스템 구축: 배양공정의 실시간 모니터링 및 조절을 위한 공정 자동화시스템 확립 및 실제 배양공정에의 적용

(1) *I. obliquus* 배양공정의 온라인 예측 및 측정 시스템 구축을 위한 이론식 확립

본 연구에서는 생산균주인 *I. obliquus*의 scale-up 배양공정을 자동화하기 위해 주요 배양변수의 수집 및 분석을 통한 실시간 배양공정 모니터링 및 자동제어를 위한 배양공정 자동화시스템을 구축하고자 하였다. 기존의 수동적 발효 방법에 의해서는 EPS 또는 IPS와 같은 단백다당체 생산성에 가장 중요한 영향을 미치는 세포비성장속도(specific growth rate)(μ)의 실시간 측정이 거의 불가능하다. 왜냐하면 일정 배양 시점에서의 specific growth rate(μ)의 측정을 위해서는 각 시점에서의 균사체의 농도가 필요한데, 고등 균류 균사체 배양의 경우 균체 농도를 측정하는데 상당한 시간이 필요하기 때문이다. 또한 (반복)유가식 배양공정을 적용 시, 사용한 배지를 빼내고 새로운 배지를 첨가해 주는 시점과, 컴퓨터 조절에 의해 자동으로 배지를 첨가해 주는 속도가 가장 중요한데, 이러한 시점과 속도를 결정해 주는 기준이 바로 specific growth rate(μ)인 점을 고려한다면, 실시간으로 specific growth rate(μ)를 측정할 수 있는 시스템을 구축하는 것이 가장 중요하다고 판단되었다. 기존의 방법에 의해 용존산소 농도(DO)와 pH를 판단 기준으로 삼을 때, 두 종류 전극의 불안정성으로 인해 공정의 정확성을 확신할 수 없으며, 이 전극들을 이용해서는 온라인상에서 specific growth rate(μ)의 실시간 측정이 완전히 불가능하므로, 고등 균류 배양 공정을 효율적으로 운전할 수 없는 커다란 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 가스분석장치(gas-analyzer)를 이용해서 생산균주의

specific growth rate(μ) 등의 배양 중요 변수들(즉 용존산소(DO), 산소흡수율(OUR), 이산화탄소발생율(CER), 총산소흡수량(SOUR), 총이산화탄소배출량(SCER), 산소전달계수(k_La), 세포농도(X) 등)을 온라인상에서 직접 예측 및 측정할 수 있는 시스템 구축을 위해 다음과 같은 이론식을 확립하였다. 또한 개발된 자동화시스템을 실제 *I. obliquus* 균사체 배양 공정에서의 적용을 통해, 개발된 자동화 시스템의 정확도 및 효율성을 조사하고자 하였다.

(가) 발효조에서의 가스 물질수지식 확립

$$OUR = OTR = N_A = \frac{7.32 \times 10^5}{V} \left(\frac{Q_i P_i Y_i}{T_i} - \frac{Q_o P_o Y_o}{T_o} \right) \quad (1)$$

$$CER = \frac{7.32 \times 10^5}{V} \left(\frac{Q_i P_i C_o}{T_i} - \frac{Q_o P_o C_i}{T_o} \right)$$

N_A : oxygen transfer rate(OTR) (mmol/L/hr)

$Q_i=Q_o=Q$: volumetric air flow rate (L/min)

P_i, P_o : total pressure of inlet and outlet air (atm)

Y_i, Y_o : mole fraction of oxygen at inlet and outlet air

T_i, T_o : temperature at inlet and outlet (K)

C_i, C_o : mole fraction of carbon dioxide at inlet and outlet air

7.32×10^5 : conversion factor [PV = nRT]

(60min/1hr)·[mole/22.4 l (STP)]·[273K/1atm]

(나) 온라인 상에서 OUR 값의 측정에 의한 발효기 내의 세포농도 추정식 확립

$$OUR = Y_{o/x} \frac{dx}{dt} = \frac{1}{Y_{x/o}} \frac{dx}{dt} \quad (2)$$

$$\frac{dx}{dt} = Y_{x/o} (OUR) \quad (3)$$

$$\int_0^x dx = Y_{x/o} \int_0^t (OUR) dt, \text{ at } t=0, x=0$$

$$\approx Y_{x/o} \sum_{t=0} (OUR) \Delta t$$

$$\hat{X}(t) = Y_{x/o} \cdot SOUR(t) \quad (4)$$

여기서

$\hat{X}(t)$: calculated cell concentration by use of OUR (g/L)

X : real cell concentration from experiment (g/L)

$Y_{x/o}$: cell yield based on oxygen (g cell/mmol O₂)

한편

$$SOUR(t) = SOUR(t-1) + \frac{1}{2} [OUR(t-1) + OUR(t)] \Delta t \quad (5)$$

여기서

$OUR(t)$: current oxygen uptake rate (mmol/L/hr)

$OUR(t-1)$: last oxygen uptake rate (mmol/L/hr)

$SOUR(t)$: total oxygen consumed until time, t (mmol/L)

$SOUR(t-1)$: total oxygen consumed until time, t-1 (mmol/L)

(다) 온라인 상에서 단위시간당 세포비성장속도(μ)의 추정식 확립

세포농도인 X 값은 식(4)에 의해 $Y_{x/o} \cdot SOUR(t)$ 이고, $\frac{dx}{dt}$ 의 값은 식 (3)에 의해 $\frac{dx}{dt} = Y_{x/o}(OUR)$ 으로 계산이 되므로, 다음의 수식을 적용함으로써 단위시간당 세포성장속도 (μ)를 추정할 수 있었다.

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} = \frac{Y_{x/o} \cdot OUR(t)}{Y_{x/o} \cdot SOUR(t)} = \frac{OUR(t)}{SOUR(t)} \quad (6)$$

(라) 기체산소의 물질수지식에 의해 온라인 상에서 산소전달계수(k_La) 추정식 확립

기체산소의 물질수지식을 적용함으로써 온라인 상에서 다음의 수식에 의해 배양액 내로의 산소 전달계수를 구할 수 있었다.

$$k_La = \frac{OUR}{C_L^* \left(1 - \frac{D.O.}{100}\right)} \quad (7)$$

(2) IPS 생산용 *I. obliquus*의 균사체 액상배양을 통한 배양공정 자동화시스템의 정확도 및 효율성 조사

(가) 배양공정 데이터 수집, 분석시스템 확립 및 산소흡수율(OUR) 및 이산화탄소생성율(CER)의 온라인 분석

Figure 2-106과 Figure 2-107에 제시한 바와 같이 생산균주인 *I. obliquus*의 발효조 배양 중에 변화하는 주요 배양변수의 수집 및 분석을 통해 배양 공정을 최적화할 수 있는 on-line computer control 및 monitoring system을 구축하였다. 배양공정 데이터 수집 및 분석을 위한 프로그램으로는 (주)로카스의 Autolab V2.0을 이용하였고, 발효기에 배양 중 발생하는 가스의 성분 분석을 위해 가스분석기 시스템을 연결하였다.

본 연구에서 설계된 배양공정 자동화시스템과 상기에서 설립한 이론식의 정확성을 테스트하기 위해, IPS 생산균주인 *I. obliquus*의 균사체를 5 l 발효조에서 약 8일 동안 액상배양하면서 주요 배양변수를 온라인상에서 직접 추정하고자 하였다. 배양 조건 및 oil이 불 포함된 생산배지의 조성을 Table 2-26에 제시하였다. 배양 기간 동안 발효조 내부로 공급 또는 배출되는 가스를 60초 간격으로 측정하고, 측정된 데이터를 실시간으로 분석하여 산소흡수율, 세포비성장속도, 세포농도 및 산소전달계수 등을 실시간으로 추정하고자 하였다. Figure 2-108에 생산배양에서의 용존산소, pH, glucose 농도 및 균체 농도의 변화 양상을 나타내었다. 용존산소의 경우 72시간 까지 서서히 감소한 후 일정 수준(포화용존산소 농도의 약 30% 수준)으로 유지되다가, 180시간 이후에는 glucose가 거의 고갈됨에 따라 DO가 약 70% 수준으로 급격히 증가하는 것으로 나타났고, 약 190시간까지 glucose가 존재하는 것을 확인할 수 있었다. pH는 5.0~5.8 정도의 비교적 좁은 범위에서 변화하였고, 최종 균사체 생산량은 약 17 g/L인 것으로 관찰되었다. 생산균주의 산소흡수율(OUR)과 이산화탄소발생율(CER)의 측정을 위하여 발효기로부터 배출되는 가스로부터 이산화탄소 분압 및 산소 분압을 조사한 결과를 Figure 2-109에 제시하였다. 발효기로부터 배출되는 산소의 분압이 감소하는 시기와 이산화탄소의 분압이 증가하는 시기가 대체로 일치(배양 후 약 80 시간)하는 것으로 나타났다. 이는 생산균주가 공급되는 용존산소를 대사에 활발히 이용하면서 대사산물로서 이산화탄소를 방출하는 전형적인 결과이다. 배양 초반에 약간의 오차가 발생했으나, 배양 170시간까지 산소의 배출분압이 천천히 감소하다가, 19.4%까지 다시 증가하였고, 이산화탄소 분압은 배양 60시간 이후에 천천히 증가하는 경향을 보이다가 약 180시간 이후에 감소하는 경향이 뚜렷하게 나타났다.

산소흡수율 및 이산화탄소 생성율은 발효기에서 배출되는 가스의 산소 및 이산화탄소의 분압 (Figure 2-109)을 이용하는 (1)식을 적용하여 계산하였는데, 그 결과를 Figure 2-110에 제시하였다. 산소흡수율을 살펴보면, 배양 시작 후 170시간까지 천천히 증가하다가 배양 180시간 정도에서 급격히 감소하여 약 28 mmol/L/hr을 나타내었다. 산소흡수율이 감소하는 시점은 탄소원이 고갈되는 시점과 거의 일치하는 것으로 나타났는데(Figure 2-108, Figure 2-110), 이로 부터 산소흡수율 및 이산화탄소생성율이 세포의 상태를 간접적으로 확인할 수 있는 유용한 지표가 될 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

주목할 점은 Figure 2-110에 제시된 산소흡수율에 관한 데이터가 발효기간 동안 배양 균주의 대사 상태를 나타내 주는 가장 중요한 지표 중의 하나라는 점이다. 왜냐하면 위에서 이미 설명한 바와 같이 실시간의 산소흡수율을 적분해서 그 시점까지 누적된 총 산소흡수량을 계산하는 경우, 생산균주의 비성장속도(specific growth rate)(μ), 산소전달계수(k_{La}), 세포농도(X) 등의 가장 중요한 배양변수를 온라인 상에서 직접 추정할 수 있기 때문이다. 이들 배양변수들을 실시간으로 측정한 실제 배양결과를 아래에 제시하였다.

(나) 세포비성장속도(specific growth rate; μ) 온라인 분석

세포비성장속도(specific growth rate)는 IPS 또는 EPS와 같은 단백다당체의 생산성에 가장 큰 영향을 미치는 매우 중요한 배양변수이다. 본 실험에서는 배양기간 동안 세포비성장속도를 실시간으로 모니터링 함으로써 생산균주의 대사상태를 정확하게 파악하고자 하였다. 상기의 *I. obliquus*의 균사체 액상배양에서의 총 산소흡수량과 산소흡수율에 대한 분석 데이터를 이용하여 배양기간 동안 생산균주의 비성장속도를 계산하였다. Figure 2-110의 산소흡수율과 식(4)에 의해 계산된 총산소흡

수량(SOUR) (Figure 2-111의 위쪽 왼쪽 그래프)을 이용하여 비성장속도를 추정하였고, 그 결과를 Figure 2-112에 제시하였다. 배양 초반의 경우에는 균사체 량이 매우 적어 비성장속도가 너무 높게 나타나는 실험오차가 발생했지만, 이 시간대를 제외하고 48시간 이후의 결과를 관찰해 본다면 배양 중반부인 약 115시간까지 비교적 높게 상승하였다가 그 후 비교적 천천히 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

(다) 균체 생산량 온라인 분석

오프라인 상에서 시료 채취에 의해 실험적으로 측정된 건조균체량과, 온라인 상에서 산소흡수율의 분석을 통해 계산된 총산소흡수량(SOUR)의 연관성이 직선 관계를 보이는 것으로 나타났으므로 (Figure 2-111의 오른쪽 그래프), linear regression 분석을 통해 산소에 근거한 세포수율 $Y_{x/o}$ (yield factor)를 산출할 수 있었다(이 과정을 Figure 2-111에 제시). 한편 실제 배양으로부터 얻은 균체량을 Figure 2-113에 open circle로 나타내었다. 그리고 상기의 방법을 통해 얻은 균체량을 linear regression 분석을 통해 산소에 근거한 세포수율 $Y_{x/o}$ (yield factor)을 이용하여 예측된 균체량과 비교하였다(Figure 2-113). 배양기간 동안 실제 실험적으로 얻은 균체량의 증가 경향이 온라인 분석에 의해 실시간으로 예측한 세포량의 증가 경향과 거의 일치하는 훌륭한 결과를 얻을 수 있었다. 이는 본 연구팀이 추구하는 바대로 고등균류 균사체의 액상배양 시 시료를 채취하지 않고도 실시간으로 균체 생산성을 예측할 수 있음을 제시해 준다. 본 연구 결과에서 온라인과 오프라인 세포농도가 168시간 이후의 배양 후반부에 약간의 차이가 나는 이유는 생산균주의 총산소소모량을 기초로 한 $Y_{x/o}$ 산출시 세포증식 전 기간에 걸쳐 동일한 $Y_{x/o}$ 값을 적용한 때문이며, 또한 실제 배양시 발효기 벽면에 부착되어 성장하는 세포로 인해 온라인 상에서의 총산소소모량이 어느 정도 부정확하게 계산되었기 때문인 것으로 판단되었다.

(라) 산소전달계수(k_La)의 온라인 측정

대부분의 고등균류 균사체의 성장 및 단백질대체인 IPS 또는 EPS의 생합성에 있어서 산소전달은 매우 중요한 요소로 작용한다. 즉 산소요구 정도는 생산균주에 따라 다르지만, 단백질대체의 생합성은 고에너지를 요구하는 대사과정이므로, 배양 중에 항상 최적의 용존산소를 발효조 내로 공급해 주어야 한다. 발효조의 배양액내로 공급되는 산소를 측정하는 방법 중의 한 가지가 실험실적으로 산소전달계수(k_La)를 측정하는 것이다. 온라인상에서의 기체산소 물질수지식을 이용하는 식(6)에 의해 *I. obliquus*의 균사체 배양 전반에 걸쳐 실시간으로 산소전달계수를 측정한 결과를 Figure 2-114에 제시하였다. 산소전달계수는 배양 전반에 걸쳐 평균 약 0.4 hr⁻¹ 정도로 유지되는 것을 관찰할 수 있었다. 본 연구 결과, 산소전달계수를 용존산소의 물질수지식에 기초해서 계산하는 dynamic method를 이용하지 않고 (dynamic method의 경우 배양액의 용존산소 농도가 낮으면 배양 중 산소전달계수를 측정할 수 없음), 기체산소의 물질수지식((1)식)에 근거해서 측정할 수 있는 시스템이 확립되었음은 매우 주목할 만한데, 그 이유는 산소전달계수가 발효조로의 용존산소 전달의 기준이 될 뿐만 아니라 배양공정의 scale-up시 가장 중요한 인자로 사용되기 때문이다.

3. 연구결과 요약

본 연구에서는 균사형성 담자균류인 *Inonotus obliquus* 균사체의 발효조 액상배양을 통해 항당뇨

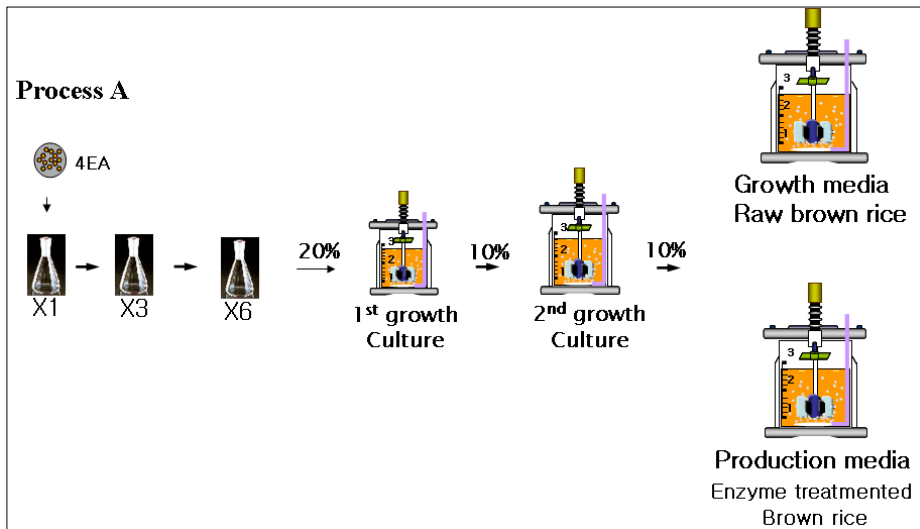
활성의 생리활성물질인 단백다당체를 대량 생산하는 배양공정을 개발하고자 하였다. 실제적으로 *Inonotus obliquus* 균사체의 산업용 단백다당체 생산공정은 발효조의 규모가 부피기준으로 약 10배씩 증가하는 다단계 발효공정(플라스크 seed culture 배양공정 + 다단계 발효조 성장배양 공정 + 최종 발효조 생산배양 공정)으로 이루어져 있으므로, 본 연구에서도 *Inonotus obliquus* 균사체의 다단계에 걸친 발효조 성장배양과 최종 발효조 생산배양 공정을 적용해서 생산균주의 활성과 단백다당체의 생산성을 증가시키는 실험을 수행하였다. 이를 위해 제1협동연구팀에서 고생산성 균주를 분양받아 다단계에 걸친 발효조 배양 시 생산균주의 생산성에 가장 큰 영향을 미치는 두 가지 요인, 즉 각 발효 단계에서의 생산균주의 배양생리적 특성과 배양형태적 특성을 규명하고자 하였다. 우선적으로 다단계 배양공정의 재현성과 생산성에 큰 영향을 미치는 seed culture 배양공정을 개발하고자 *Inonotus obliquus* 균사체의 플라스크 성장배양 후, 1차 성장발효조로의 최적 접종량 조사에 대한 연구를 수행하였다. 또한 1차 성장발효조로 접종될 다양한 seed culture의 배양 방법과 접종량이 생산균주의 다단계 발효조 배양에서의 생산성에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 최종적으로 "process F 공정"으로 구성된 일련의 다단계 배양공정을 확립할 수 있었다.

한편 *Inonotus obliquus* 균사체의 경우 세포벽다당체(IPS)의 함량은 균사체 건조무게 당 거의 일정한 양을 함유하고 있으므로, IPS의 생산량을 증가시키기 위해서는 최종 발효조 생산배양 시 균사체의 생산량 증가가 가장 중요한 요인이 것으로 확인되었다. 반면에 세포외다당체(EPS)의 생합성 경향은 균사체 성장과 비례해서 증가하는 것은 아닌 것으로 관찰되었으므로, 본 연구에서는 EPS와 IPS 생산성을 높일 수 있는 각각의 발효조 배양공정을 별도로 개발하였다. 발효에 의한 EPS의 생산 시 일반적으로 가장 중요한 요소는 탄소원과 질소원의 비(C/N ratio)인 것으로 알려져 있으므로 EPS 생산성 증가에 중요한 영향을 미치는 배지성분으로 밝혀진 glucose(C-source), ammonium tartrate(N-source) 및 yeast extract(N-source)가 조합된 최적의 생산배지를 5리터 발효조 배양공정을 통해 개발하였다. C/N ratio가 9:1인 생산배지 조성(90g/L의 glucose 사용)에서 EPS의 최종 생산성이 9.49g/L로 가장 높았으며, 기질수율인 $Y_{p/s}$ 수치(glucose 1g이 소모될 때 생산되는 EPS 양(g)) 역시 0.46으로 C/N ratio가 9:1인 배양에서 가장 높게 나타났다. 이 경우에 glucose에 의한 기질저해 현상이 발생하지 않아 세포 성장도 훌륭하며, 또한 더욱 많은 양의 glucose가 EPS 생합성 쪽으로 효율적으로 이용되어, EPS의 생산성이 가장 큰 폭으로 증가함을 알 수 있었다. 또한 상기의 5리터 발효조 배양연구를 바탕으로 EPS 대량 생산을 위한 배양공정 scale-up 연구를 수행하였다. 즉 종균배양에서 최종 생산배양에 이르는 전체 공정을 "process F" 공정을 적용하여, 75리터의 생산발효조에서 40L와 45L의 조업 부피로 2차례에 걸친 배양한 결과, 균체 생산성은 10~11 g/L로 비교적 낮은 반면 EPS 생산성은 8.2~9 g/L으로 꽤 높게 나타났다. 특별히 75리터 발효조에서의 배양조건을 별도로 최적화시키지 않았음에도 불구하고 EPS 생산성이 5L 발효조 수준으로 나타났음은 주목할 만하다.

또한 세포벽다당체(IPS)를 대량 생산하기 위해 균사 생산량을 증대시키는 발효조 배양 공정을 개발하였다. 특별히 오일 성분이 탄소원으로 첨가된 생산배지를 개발하고자 하였다. 그 이유는 더욱 환원된 상태로 존재하는 오일을 생산균주가 탄소원으로 이용할 경우, 기질에 근거한 균체 생산량($Y_{x/s}$)(생산수율)이 다른 탄소원 기질들에 비해 더 높을 뿐만 아니라, 산업용 발효조 배양에서 탄소원으로 첨가된 오일 성분이 항거품제의 역할을 동시에 수행하기 때문에 배양 중

과다 거품의 발생으로 인한 오염의 위험성이 크게 줄어들기 때문이다. 특별히 생산배지 조성에 oil 또는 oleic acid가 첨가된 경우에 최종 발효조 생산배양에서의 균체량이 모든 경우에 20g/L 이상으로 안정적으로 높게 생산되었으며, 특별히 생산배지에 최적량의 oleic acid가 첨가된 경우에는 거의 25g/L에 이르는 높은 균체 생산성을 얻을 수 있었다. 또한 75리터 생산 발효조 배양에서도 균사체 생산성이 거의 25g/L에 이르렀는데, 이로부터 에너지 효율성이 우수한 oleic acid가 scale-up된 발효조 배양공정에서도 제 역할을 훌륭하게 수행하고 있음을 확인할 수 있었다.

한편 발효조 배양에서 균사형성 *I. obliquus* 균사체 배양에 의한 IPS와 EPS의 생산성을 극대화시키기 위해서는 우선적으로 전단응력에 의한 악영향을 함께 고려해 주면서 배양액에서의 용존산소 결핍현상을 극복해주어야 함을 확인할 수 있었다. 이를 위해 교반속도와 통기량의 동시 자동조절을 통해 생산균주 균사체의 발효조 배양 시 용존산소농도를 적정 수준으로 조절하기 위한 용존산소농도 자동조절 제어프로그램을 확립하였다. 또한 발효기 배양공정의 scale-up시 가장 중요한 배양변수인 산소물질전달계수(k_{La})의 측정 방법을 확립하여, 교반기의 종류에 따른 k_{La} 비교연구를 통해 *I. obliquus* 균사체 배양에 적합한 paddle type의 impeller를 개발할 수 있었다. 실제 발효조 배양공정에 이 paddle type의 impeller를 적용한 경우, 높은 산소전달계수로 인해 배양액으로의 용존산소 전달이 매우 훌륭하게 이루어져서, 배양공정에서 흔히 사용되는 6-blade-turbine impeller를 사용한 경우보다 최종 균체 생산량이 2배 정도 더 높은 주목할 만한 결과를 얻을 수 있었다. 한편 유가식으로 공급되는 glucose(탄소원)와, yeast extract 및 soypeptone(질소원이자 탄소원)을 이용하여 유가식 배양을 시도한 결과, pH가 일정기간 동안 자동 조절(pH-stat) 되는 것을 확인할 수 있었다. 이외에도 *I. obliquus*의 scale-up 배양공정 개발을 위해 실시간 배양공정 모니터링 및 자동제어를 위한 배양공정 자동화시스템을 구축하였다. 특히 가스분석기를 이용하여 생산균주의 산소흡수율을 정확하게 측정하는 배양시스템을 확립하였는데, 이와 같이 측정된 산소흡수율로부터 생산균주의 비성장속도(specific growth rate) (μ), 산소전달계수(k_{La}), 세포농도(X)등을 정확하게 추정하는 배양공정 자동화시스템을 완성할 수 있었다.



Growth culture	Production culture
* Culture period : 5 (day)	* Culture period : 6~7 (day)
* Aeration rate : 1 (vvm)	* Aeration rate : 1 (vvm)
* Agitation speed : 100 ~ 300 (rpm)	* Agitation speed : 100 ~ 300 (rpm)
* Working volume : 3 (L)	* Working volume : 3 (L)

Figure 2–1. Schematic diagram for multi–stage bioreactor cultures, and culture conditions in the growth and production fermentations ("process A" for the shake–flask seed culture as explained in Figure 3)

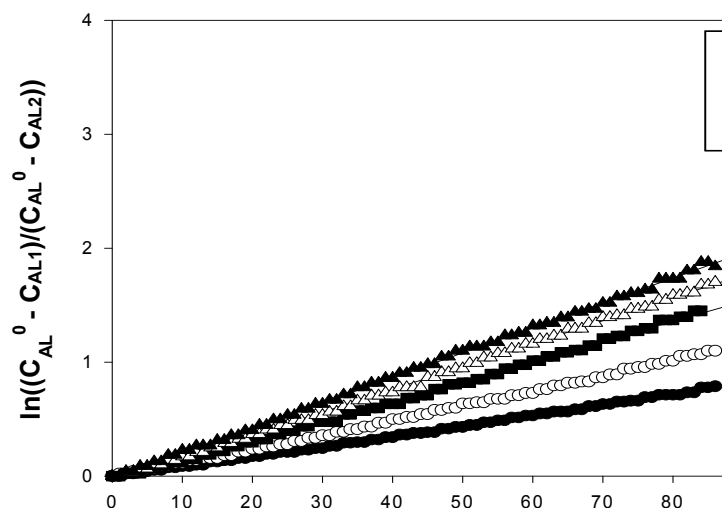


Figure 2–2. Real example for the plot of $\ln\left(\frac{C_L^0 - C_{L1}}{C_L^0 - C_{L2}}\right)$ versus $(t_2 - t_1)$ for $k_L a$ determined by the dynamic method (agitation speed from 100 rpm through 500 rpm with a fixed aeration rate 1 vvm)

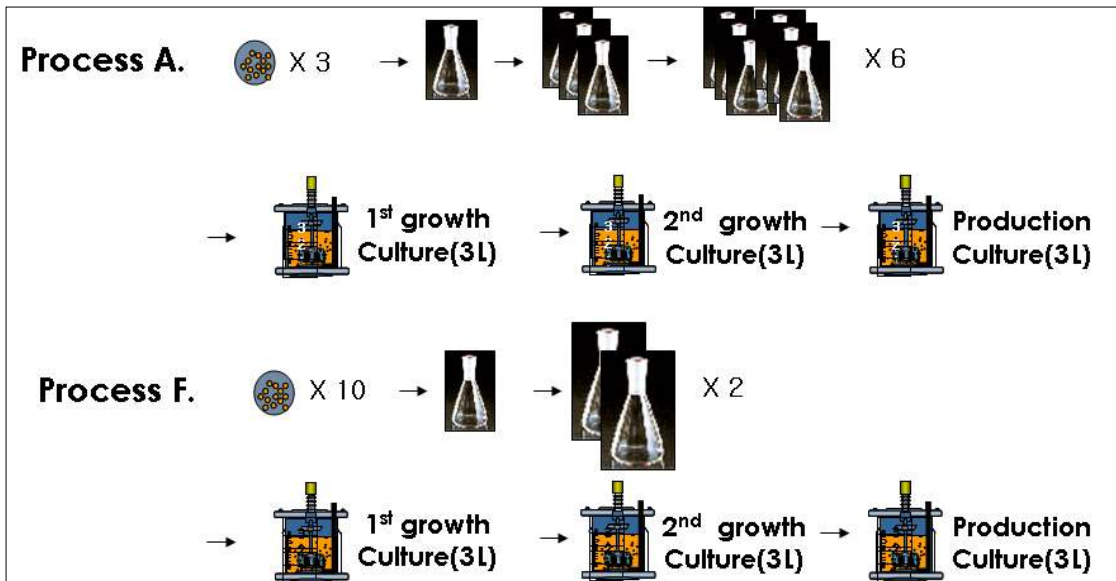


Figure 2-3. Schematic diagram for multi-stage bioreactor cultures (two or three step shake-flask seed cultures + two step growth bioreactor-cultures + final one step production bioreactor-culture)

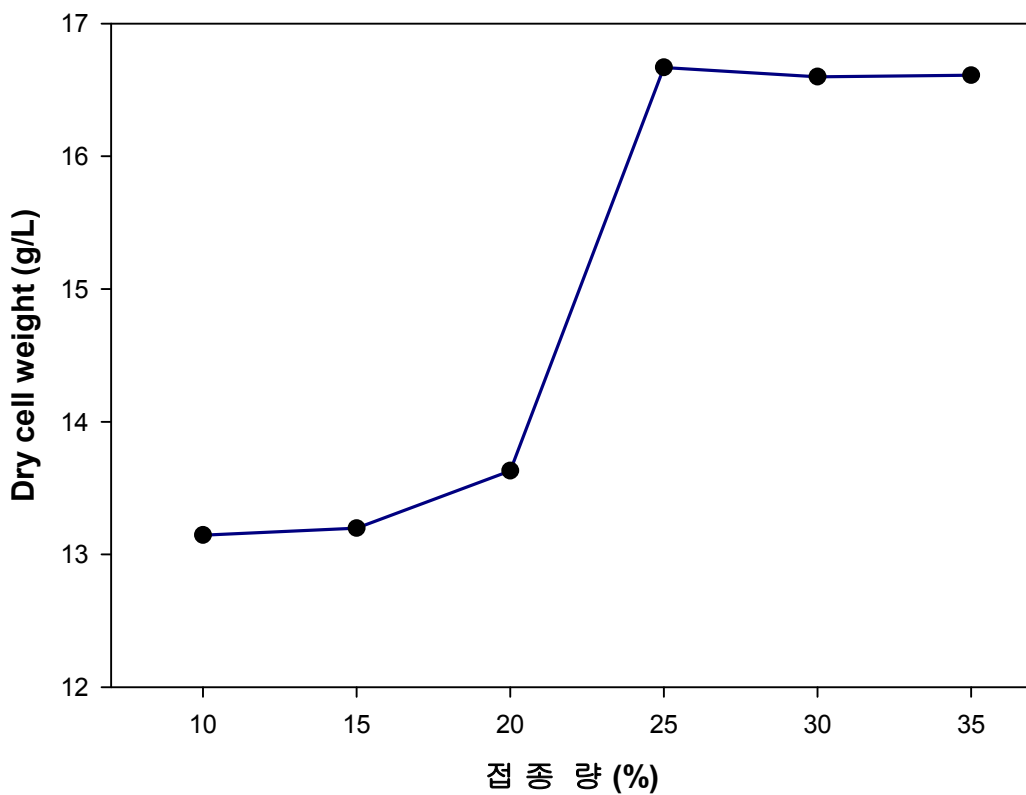


Figure 2-4. Investigation of mycelium production in the 1st bioreactor growth cultures according to the inoculum amounts inoculated from the final shake flask culture

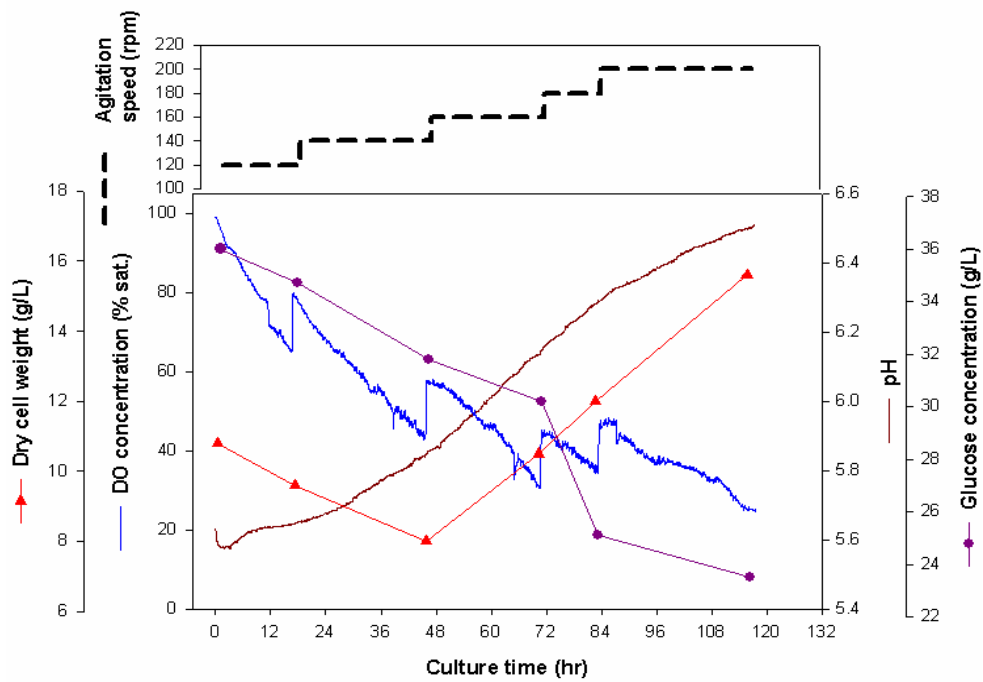


Figure 2-5. Time-course profiles of DCW, DO, pH, residual glucose and agitation speed in the 1st bioreactor culture for cell growth ("process A" used for the shake flask seed culture)

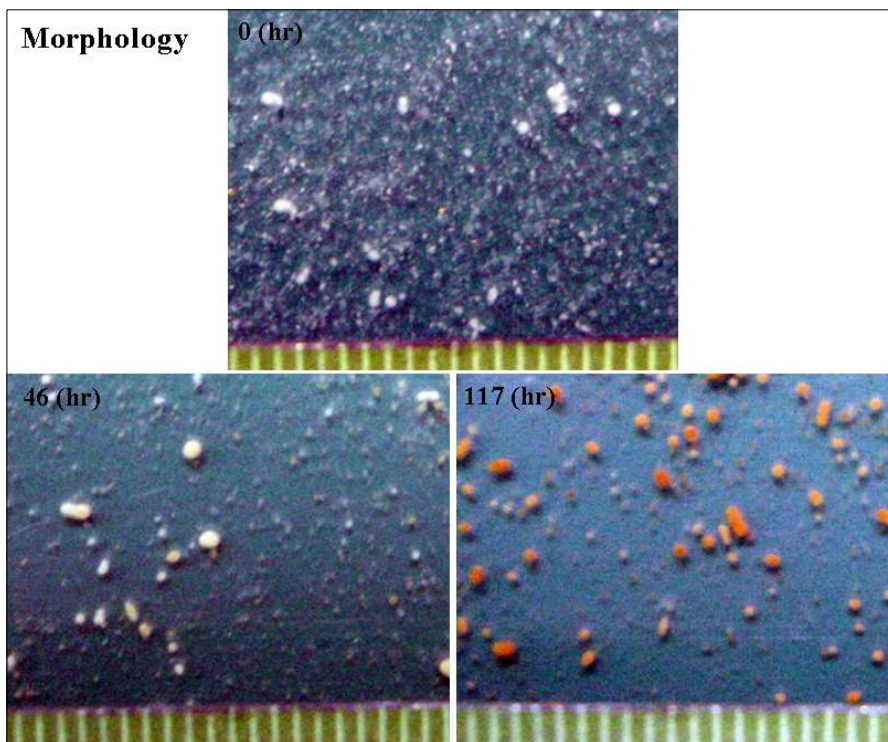


Figure 2-6. The producing cells' morphology at different fermentation time (0 hr, 46 hr, and 117 hr) in the 1st bioreactor culture for the cell growth ("process A" used for the shake flask seed culture)

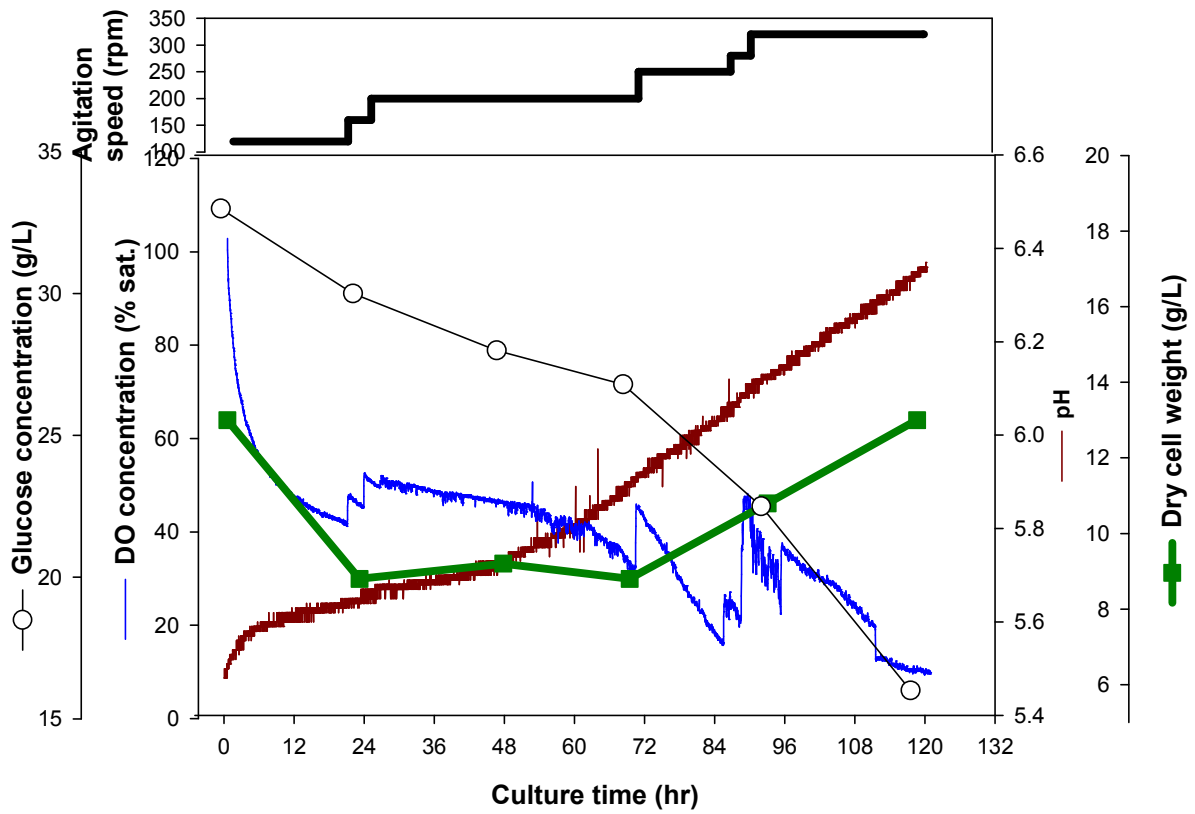


Figure 2-7. Time-course profiles of DCW, DO, pH, residual glucose and agitation speed in the 2nd bioreactor culture for the cell growth ("process A" used for the shake flask seed culture)

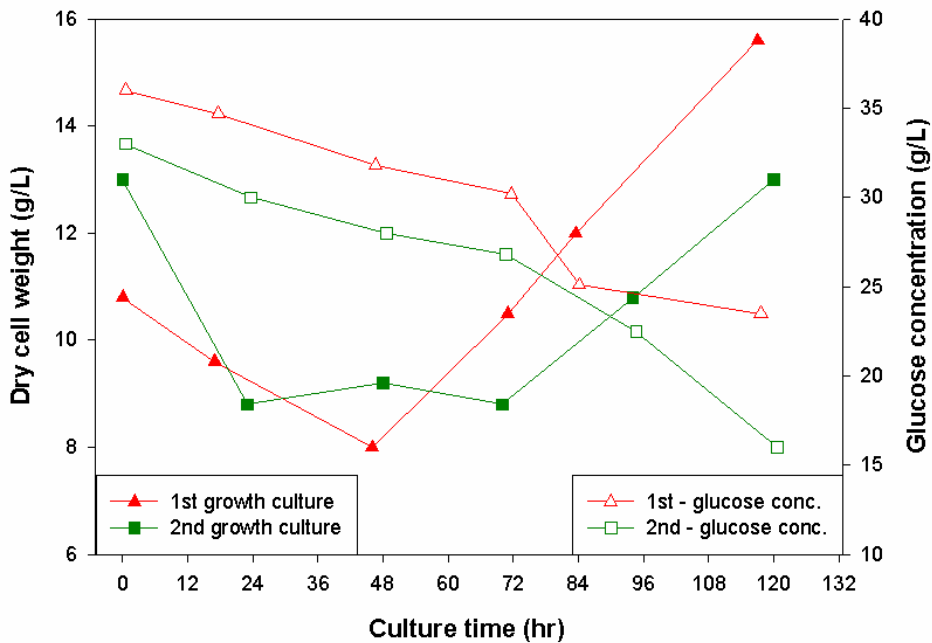


Figure 2-8. Comparison of cell growth and glucose consumption between the 1st and the 2nd bioreactor cultures for the cell growth ("process A" used for the shake flask seed culture)

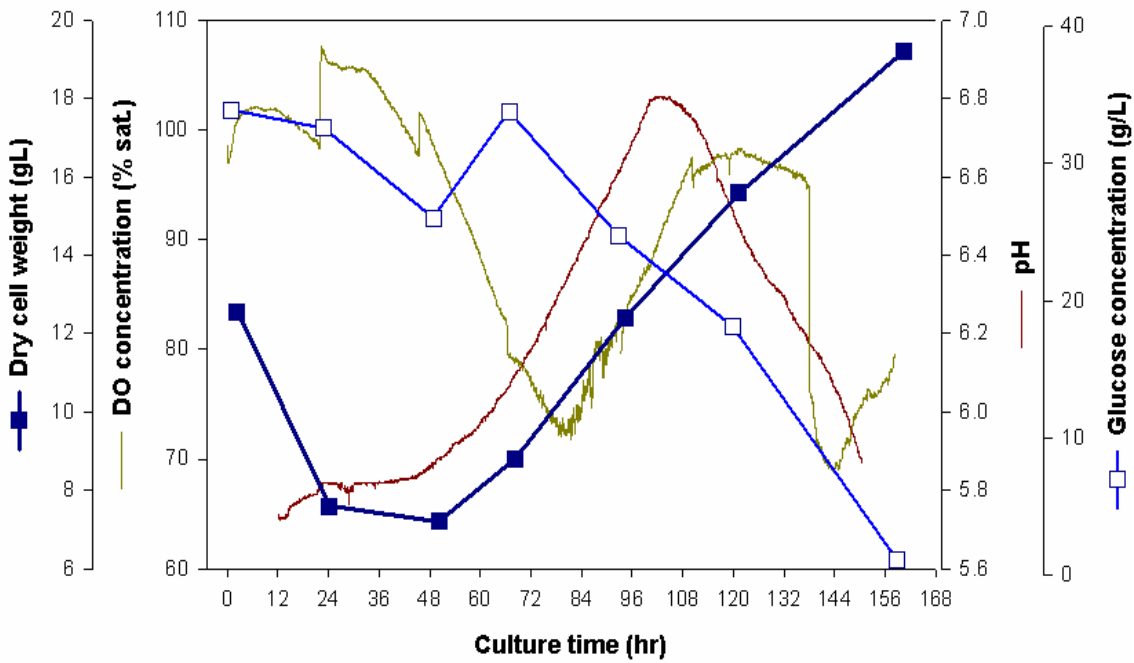


Figure 2-9. Time-course profiles of DCW, DO, pH and residual glucose in the final production bioreactor culture (Raw brown rice was used as a carbon source.)("process A" used for the shake flask seed culture)

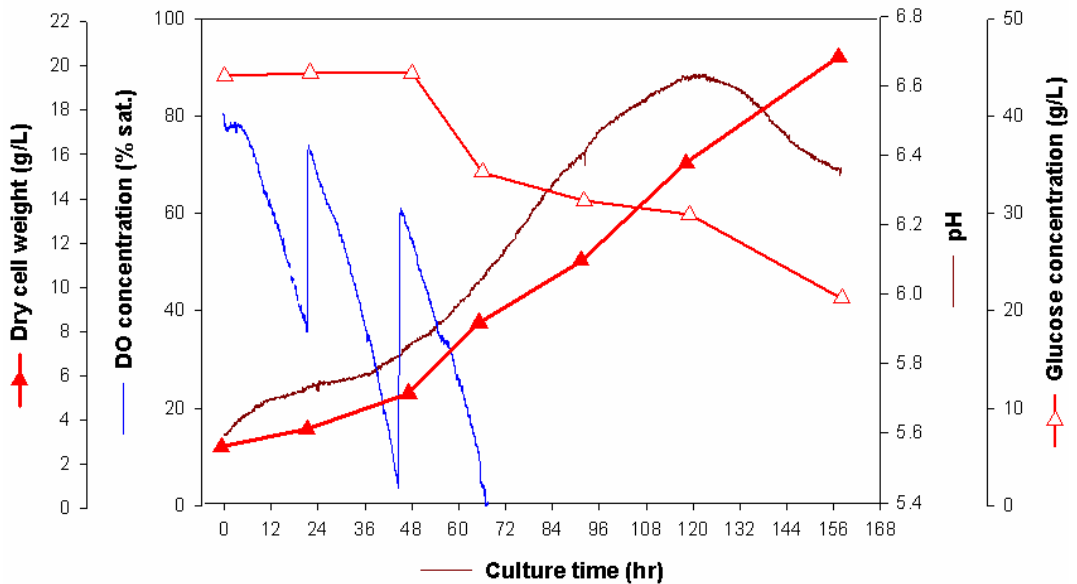


Figure 2-10. Time-course profiles of DCW, DO, pH and residual glucose in the final production bioreactor culture (Enzyme-treated brown rice was used as a carbon source.)("process A" used for the shake flask seed culture)

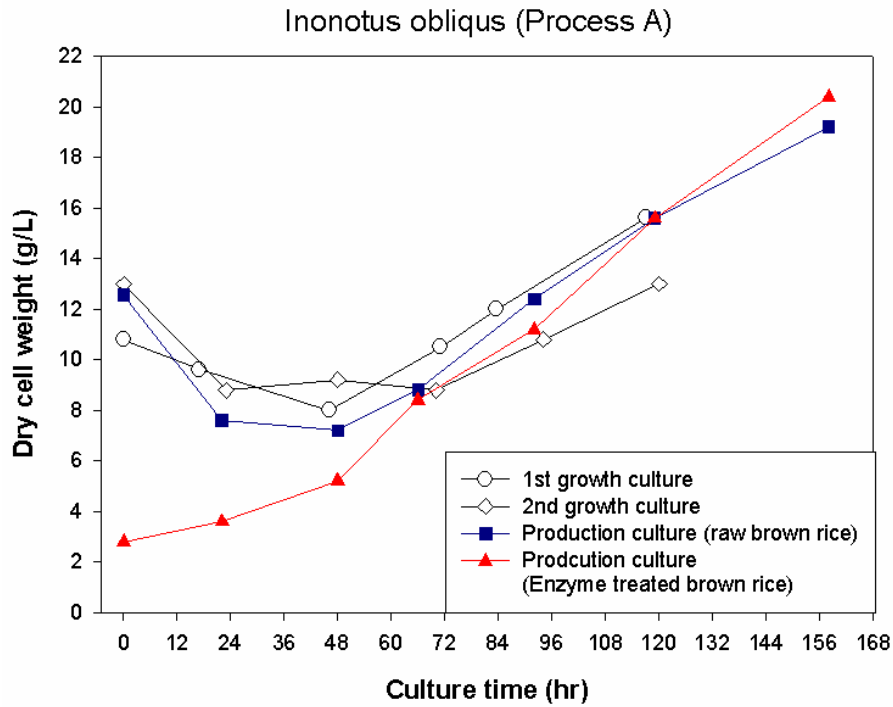


Figure 2–11. Comparison of cell growth kinetics among the 1st growth bioreactor culture, the 2nd growth bioreactor culture, and the final production culture with the raw and the enzyme–treated brown rices as C–sources ("process A" used for the shake–flask seed culture)

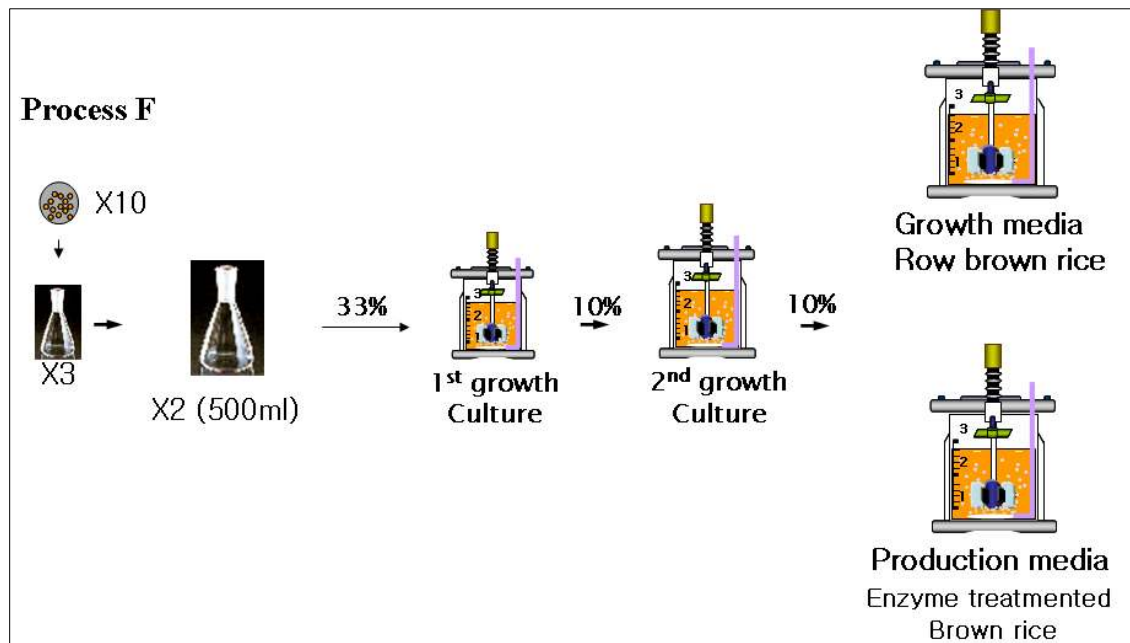


Figure 2–12. Schematic diagram for multi–stage bioreactor cultures ("process F" used for the shake–flask seed culture)

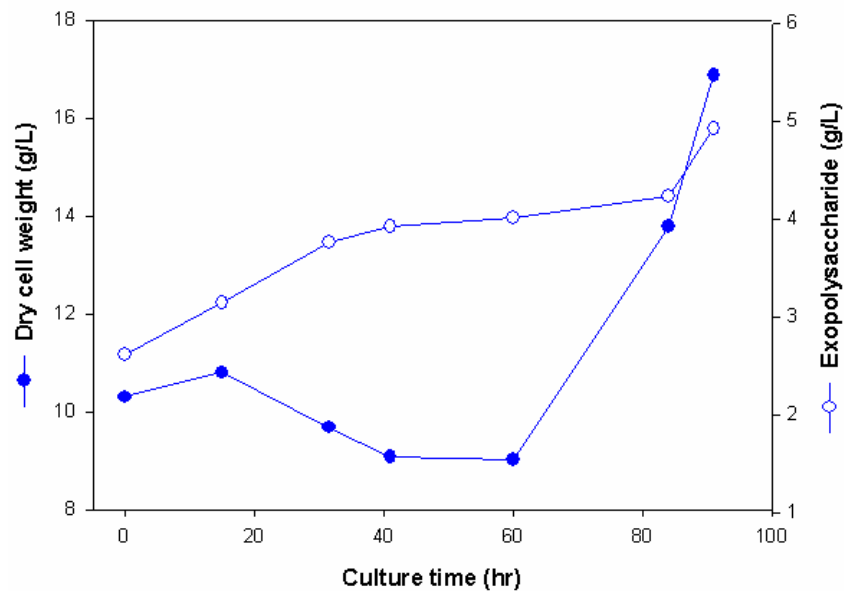


Figure 2–13. Time–course profiles of DCW and EPS productions in the 1st bioreactor culture for the cell growth ("process F" used for the shake flask seed culture)

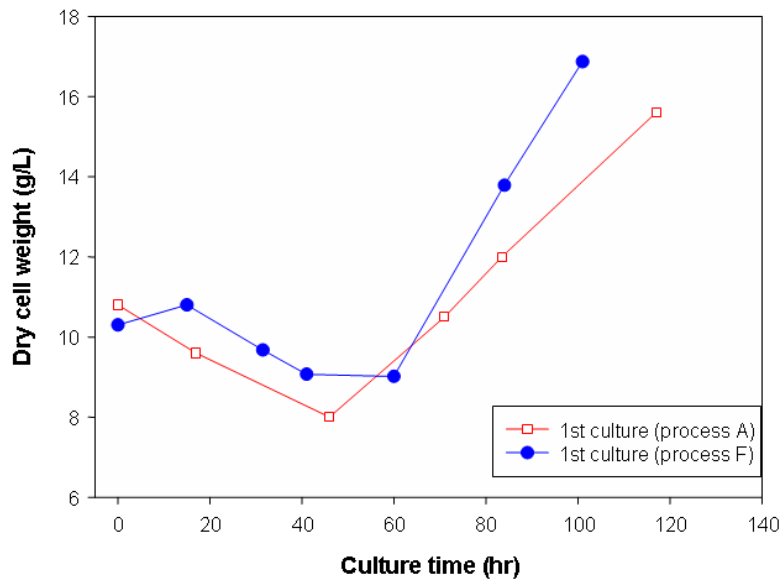


Figure 2–14. Comparison of cell growth kinetics in the 1st bioreactor cultures for the cell growth between the "process A" and "process F" used for the shake flask seed cultures

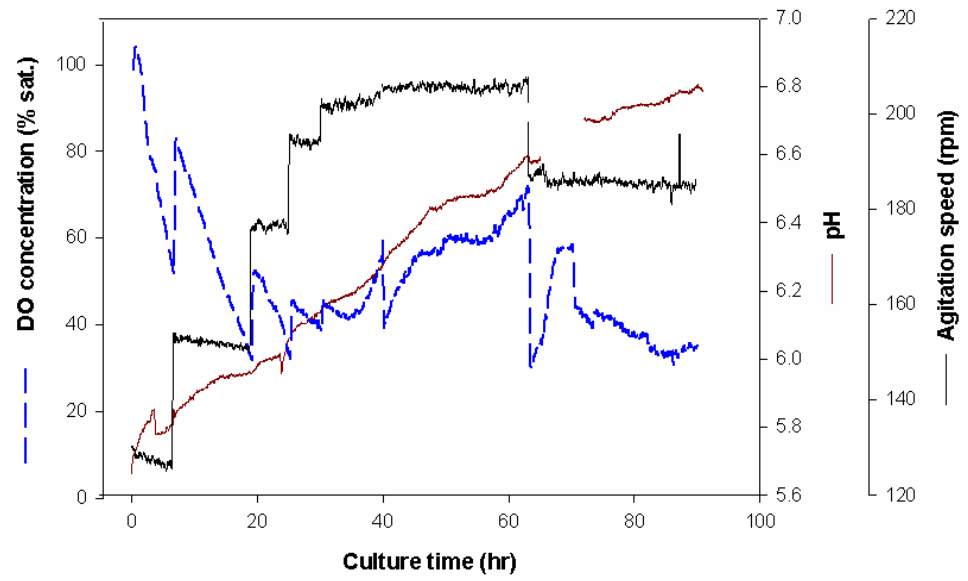


Figure 2-15. Time-course profiles of DO, pH and agitation speed in the 1st bioreactor culture for the cell growth ("process F" used for the shake flask seed culture)

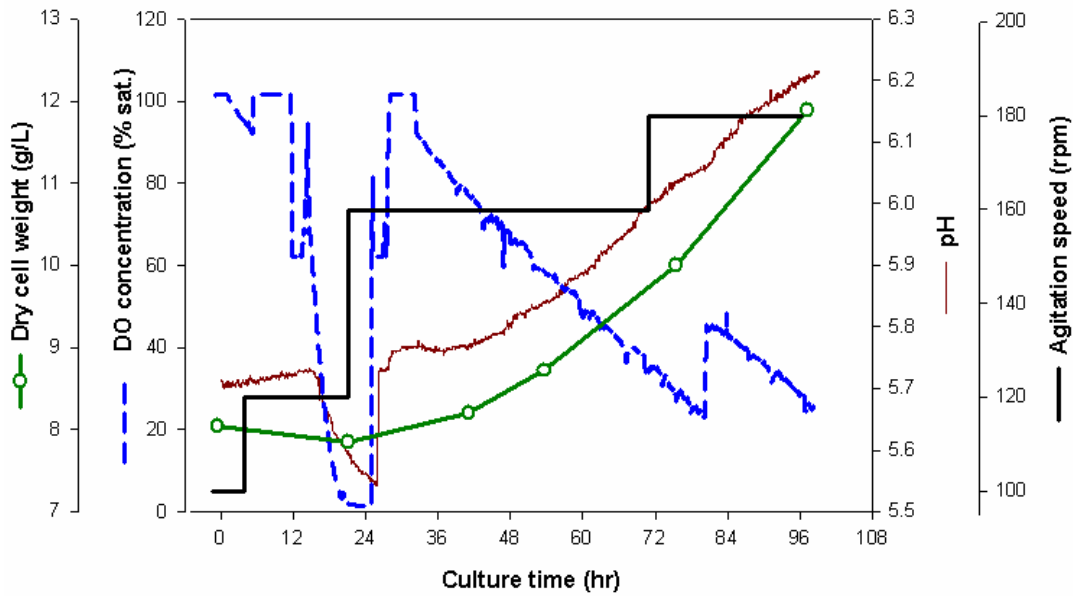


Figure 2-16. Time-course profiles of DCW, DO, pH and agitation speed in the 2nd bioreactor culture for the cell growth ("process F" used for the shake-flask seed culture)

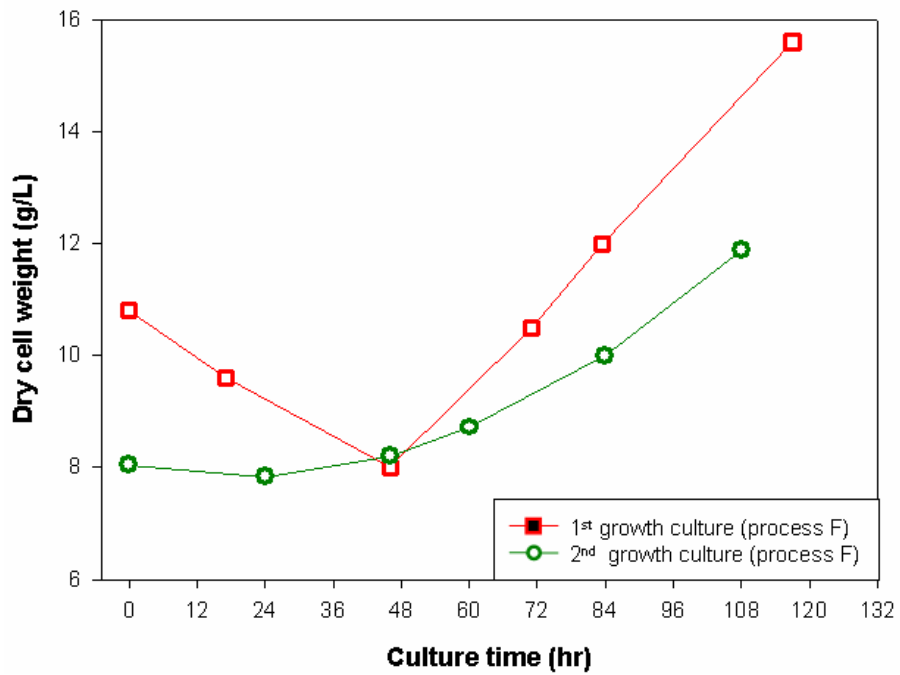


Figure 2-17. Comparison of cell growth kinetics in the 2nd bioreactor cultures for the cell growth between the "process A" and "process F" used for the shake flask seed cultures

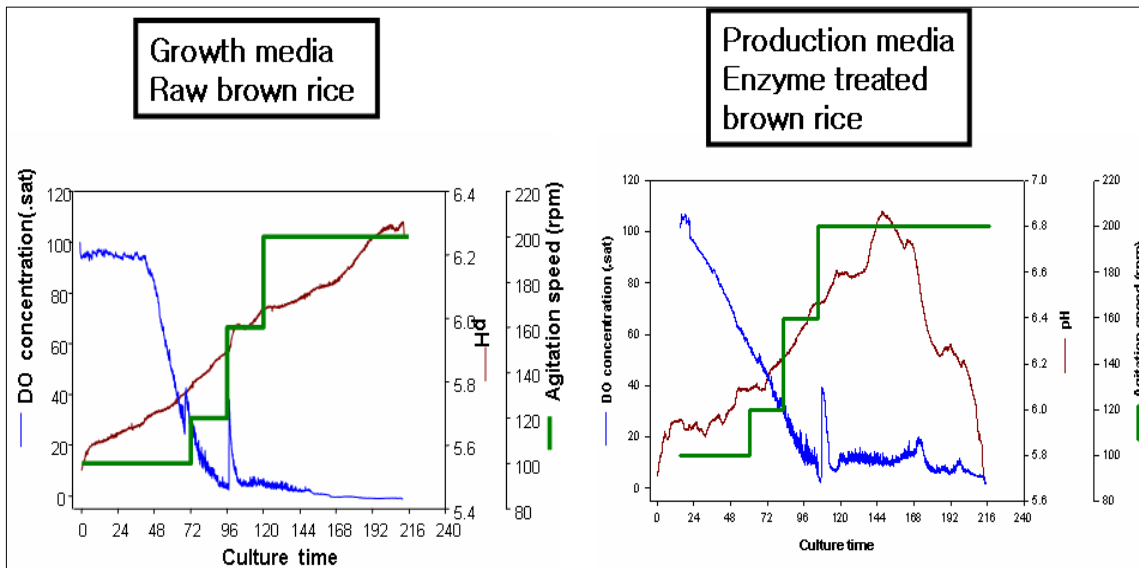


Figure 2-18. Comparison of fermentation parameters (DO, pH and agitation speed) between the final production cultures with raw brown rice and enzyme-treated brown rice as a respective C-source ("process F" used for the shake flask seed culture)

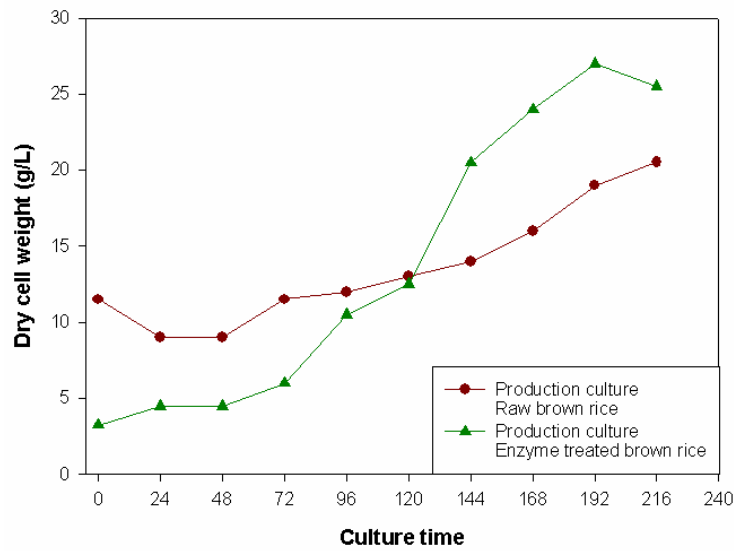


Figure 2–19. Comparison of cell growth kinetics between the final production cultures with raw brown rice and enzyme–treated brown rice as a respective C–source ("process F" used for the shake flask seed culture)

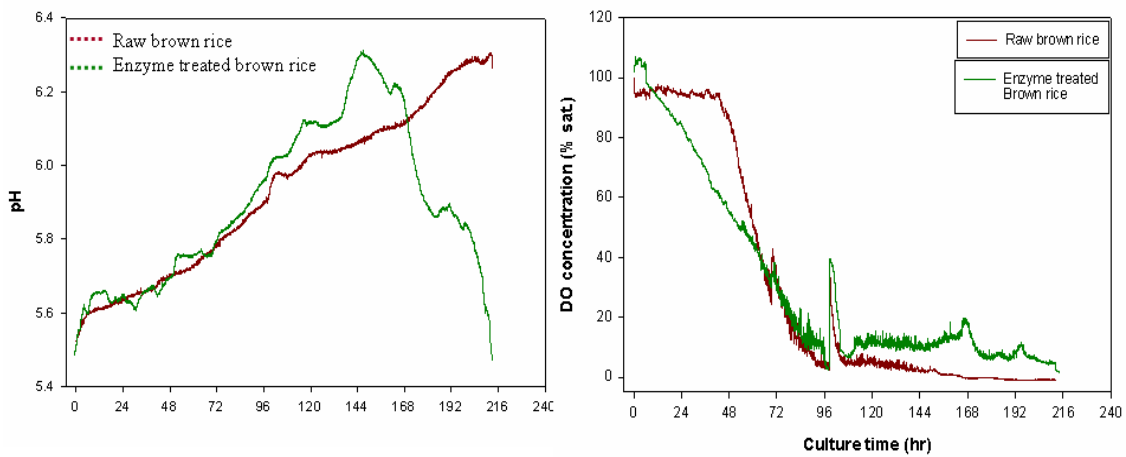


Figure 2–20. Comparison of time–course profiles of pH and DO between the final production cultures with raw brown rice and enzyme–treated brown rice as a respective C–source ("process F" used for the shake flask seed culture)

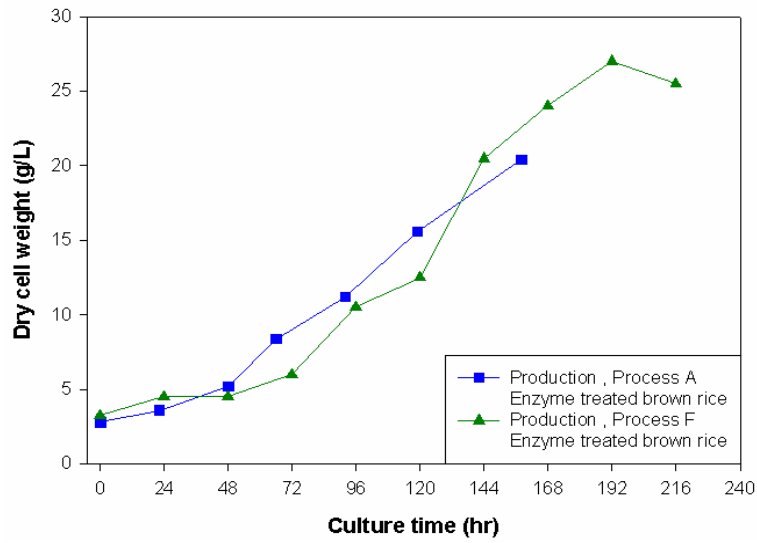


Figure 2-21. Comparison of cell growth kinetics in the final production bioreactor cultures between the "process A" and "process F" used for the shake flask seed cultures (Enzyme-treated brown rice was used as a C-source.)

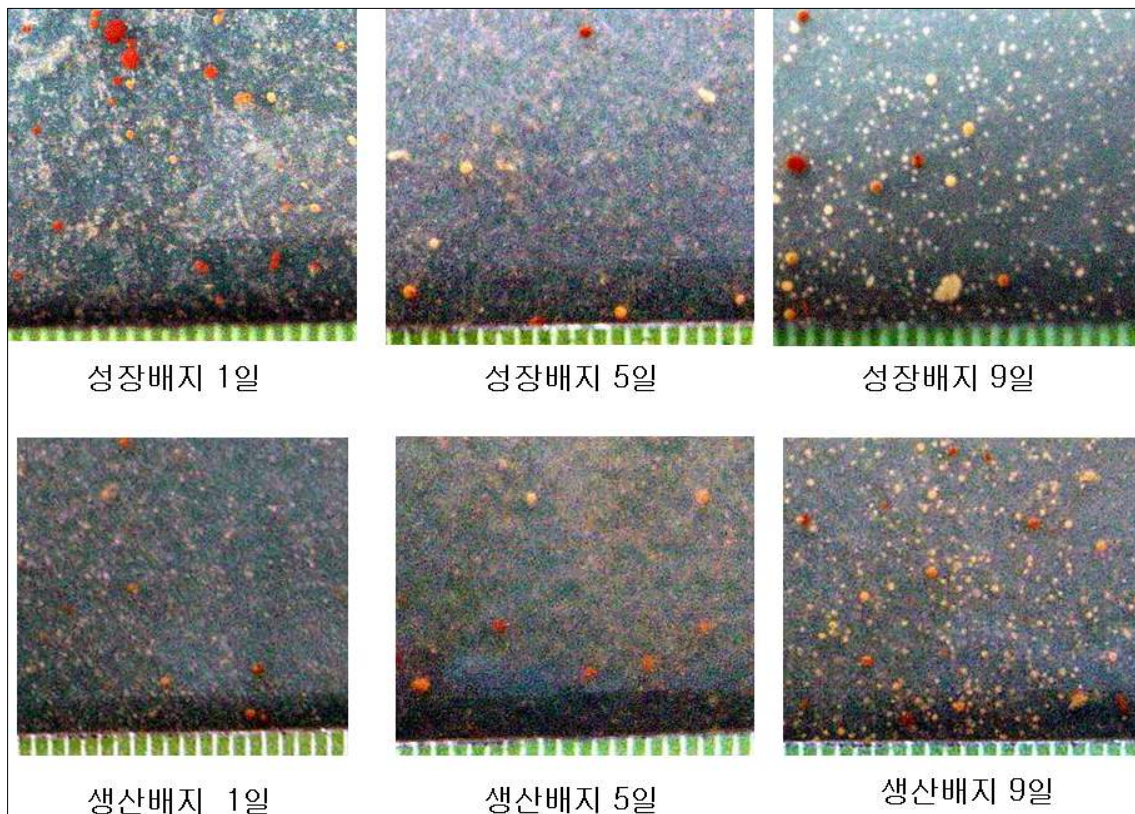


Figure 2-22. The producing cells' morphologies at different fermentation time in the final production bioreactor cultures ("process F" used for the shake flask seed culture)

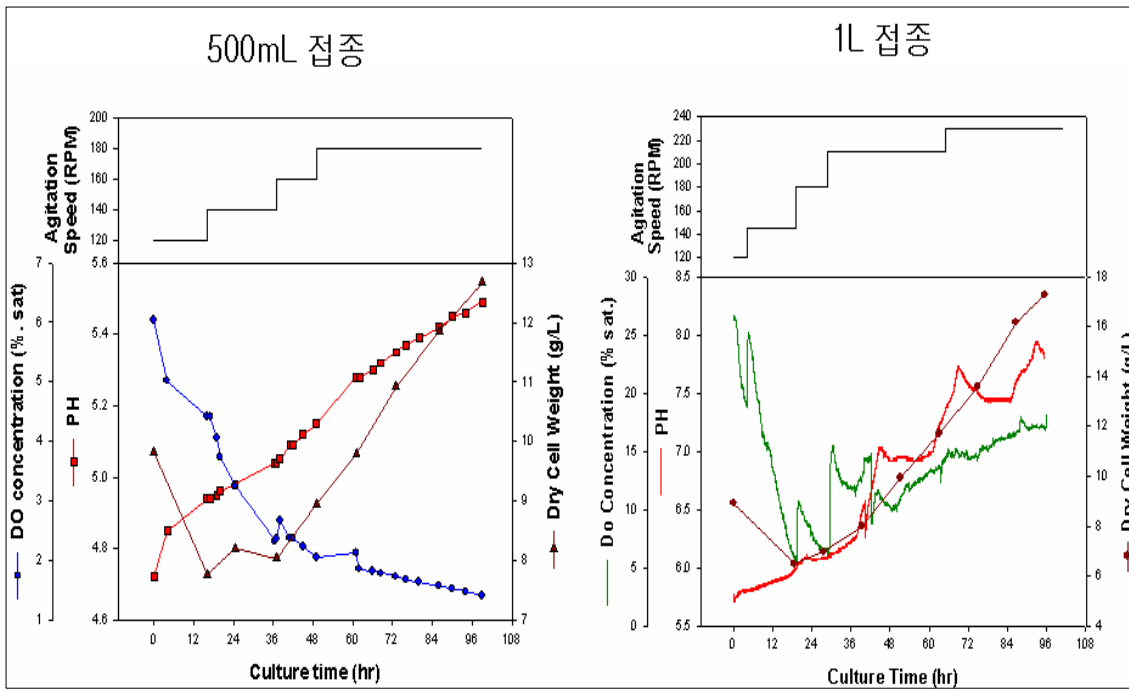


Figure 2-23. Comparison of time-course profiles of DO, pH and DCW in the 1st bioreactor growth cultures according to the inoculum amounts inoculated from the shake flask seed culture ("process F" used for the shake flask seed culture)

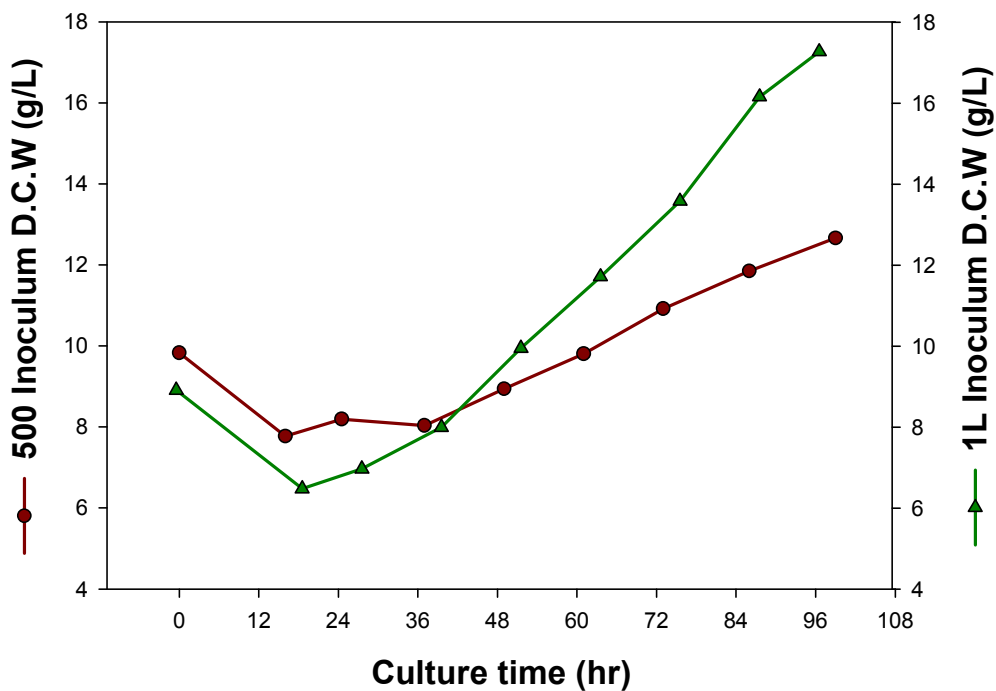


Figure 2-24. Comparison of cell growth kinetics in the 1st bioreactor growth cultures according to the inoculum amounts inoculated from the shake flask seed culture ("process F" used for the shake-flask seed culture)

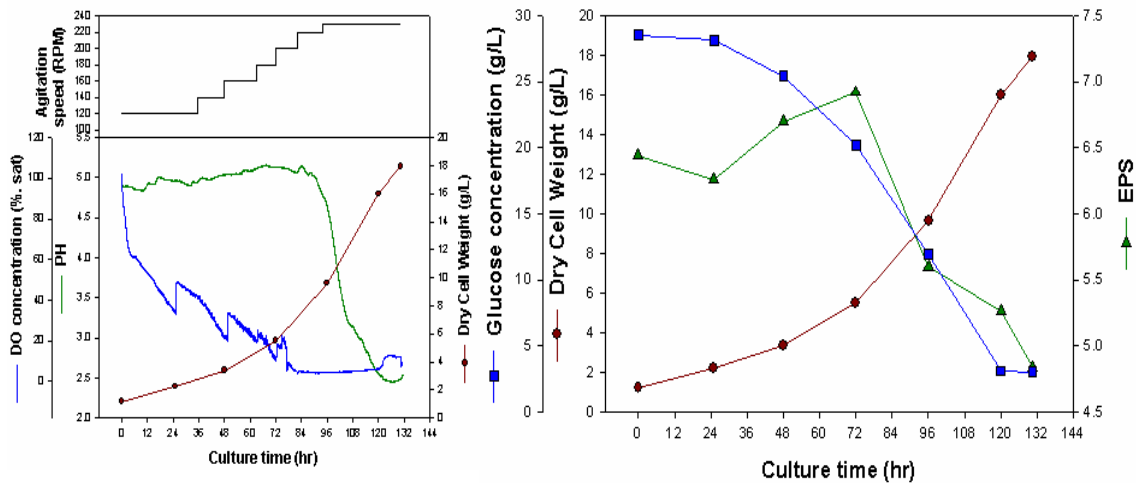


Figure 2-25. Time-course profiles of fermentation parameters(DO, pH, DCW, agitation speed, residual glucose and EPS) in the final bioreactor culture for EPS production (P5 production medium was used.)

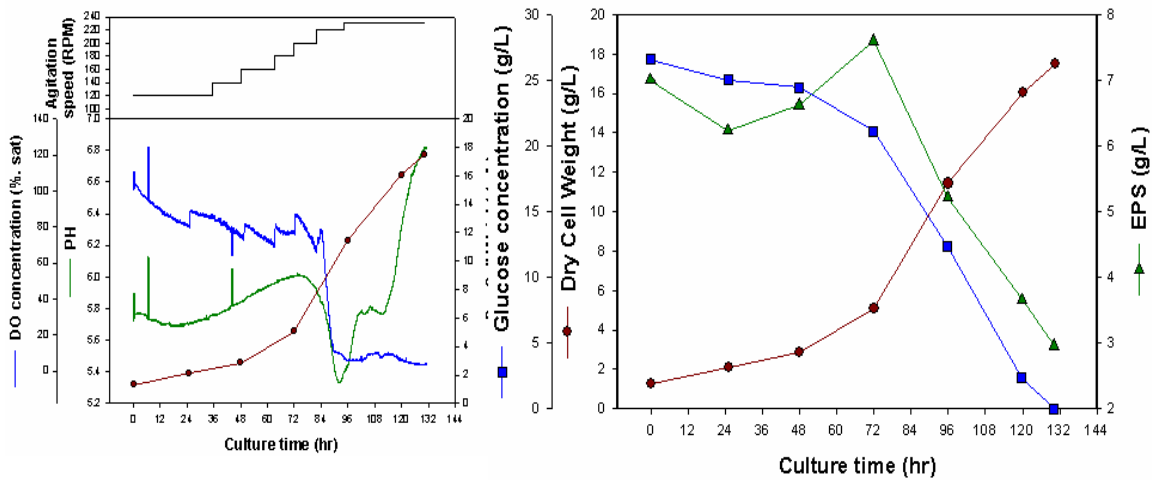


Figure 2-26. Time-course profiles of fermentation parameters(DO, pH, DCW, agitation speed, residual glucose and EPS) in the final bioreactor culture for EPS production (P6 production medium was used.)

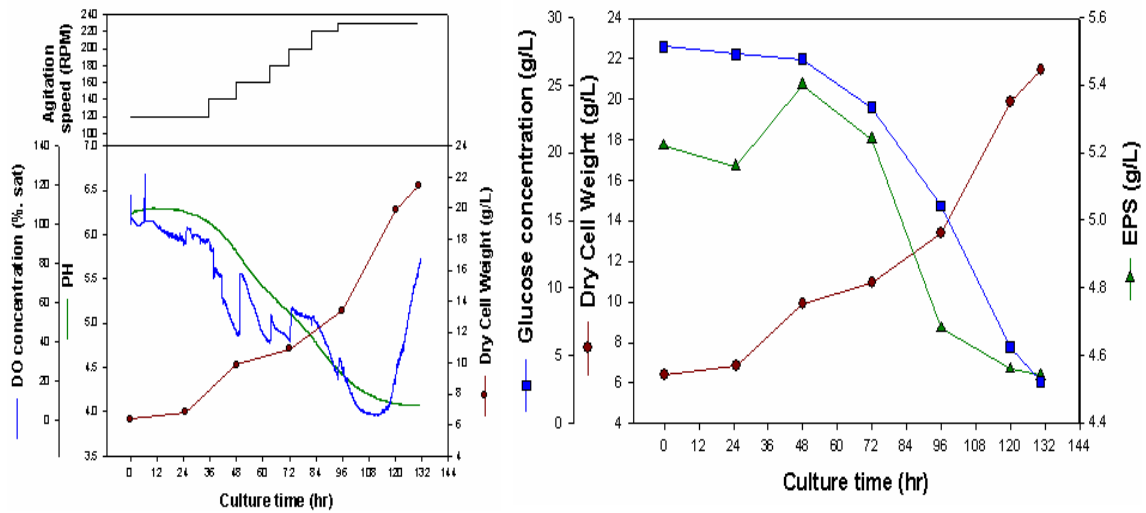


Figure 2–27. Time–course profiles of fermentation parameters(DO, pH, DCW, agitation speed, residual glucose and EPS) in the final bioreactor culture for EPS production (P7 production medium was used.)

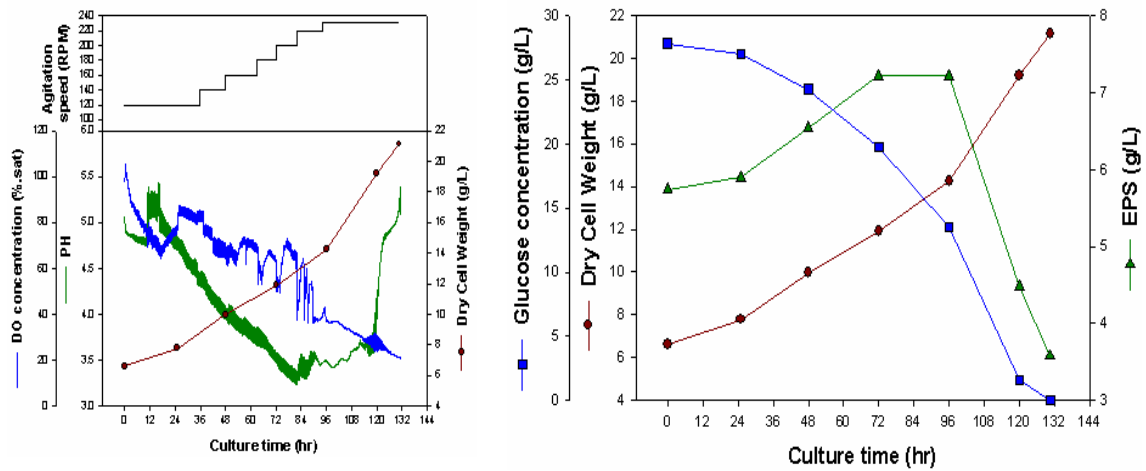


Figure 2–28. Time–course profiles of fermentation parameters(DO, pH, DCW, agitation speed, residual glucose and EPS) in the final bioreactor culture for EPS production (P8 production medium was used.)

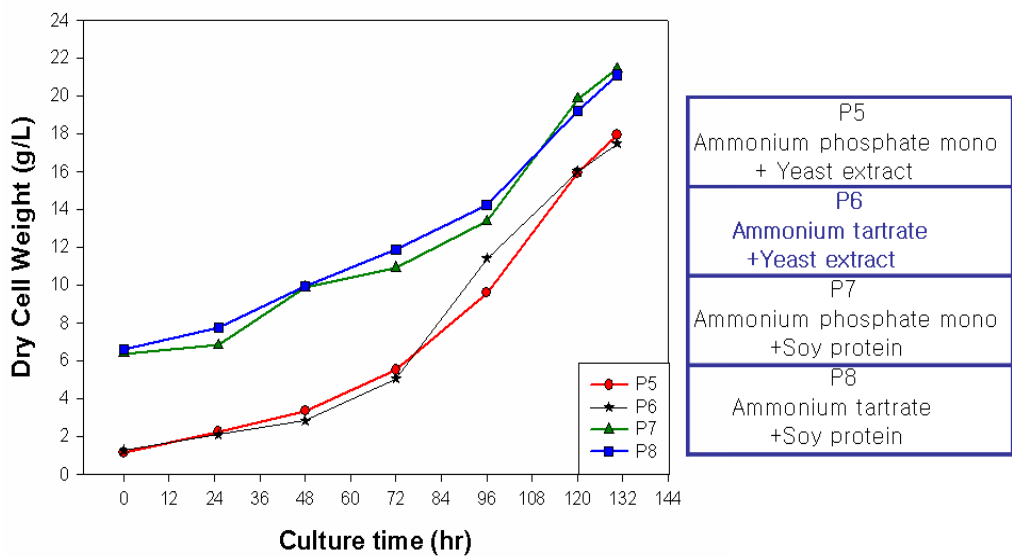


Figure 2–29. Comparison of cell growth kinetics in the final production bioreactor cultures performed with P5, P6, P7, and P8 production media respectively

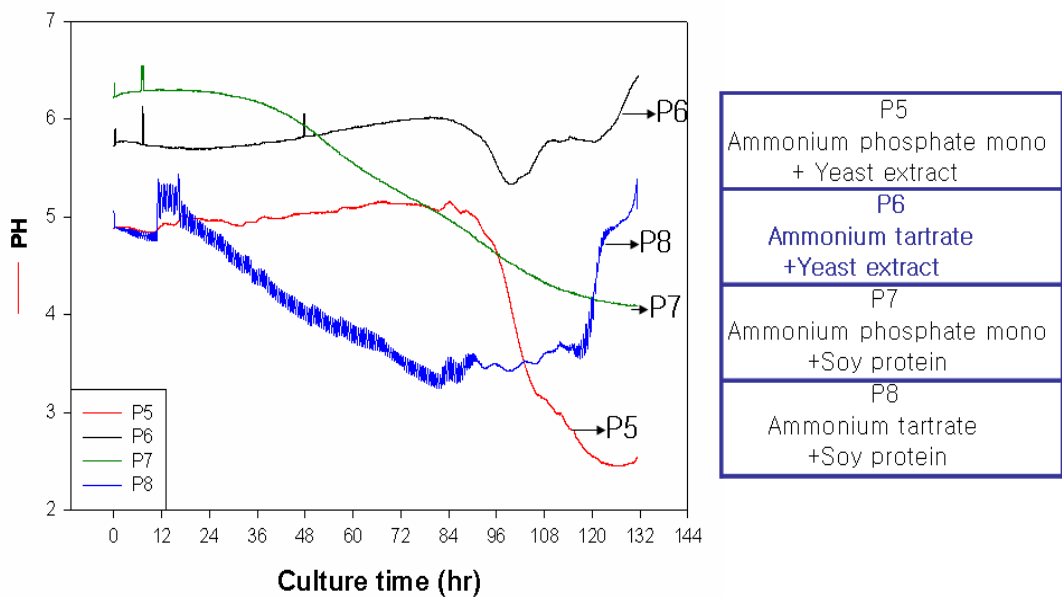


Figure 2–30. Comparison of time–course profiles of pH in the final production bioreactor cultures performed with P5, P6, P7, and P8 production media respectively

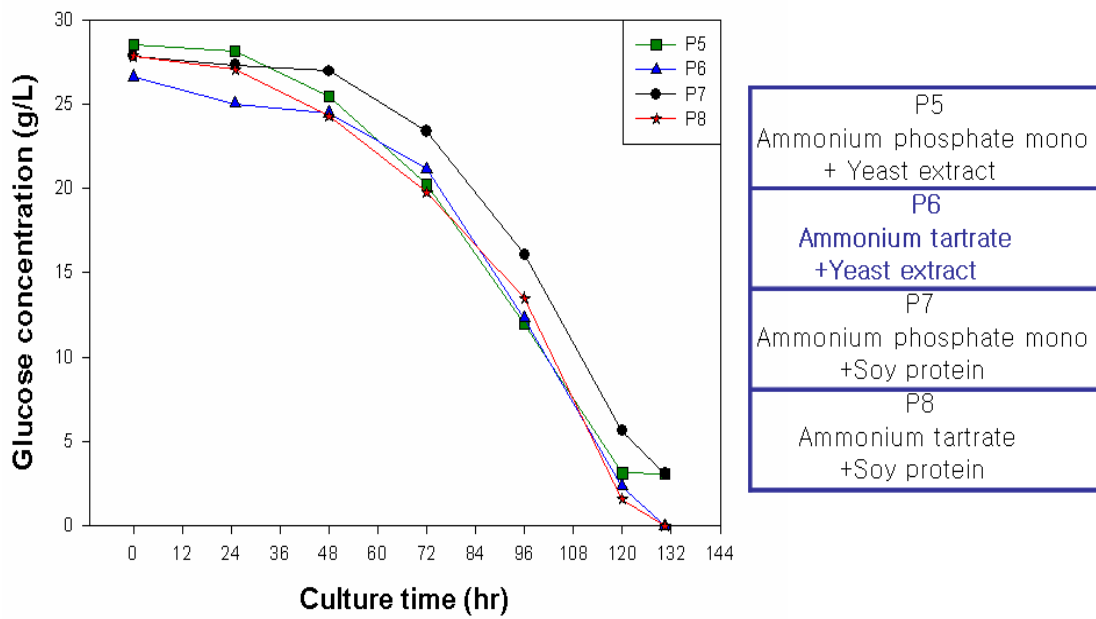


Figure 2–31. Comparison of time–course profiles of glucose consumption in the final production bioreactor cultures performed with P5, P6, P7, and P8 production media respectively

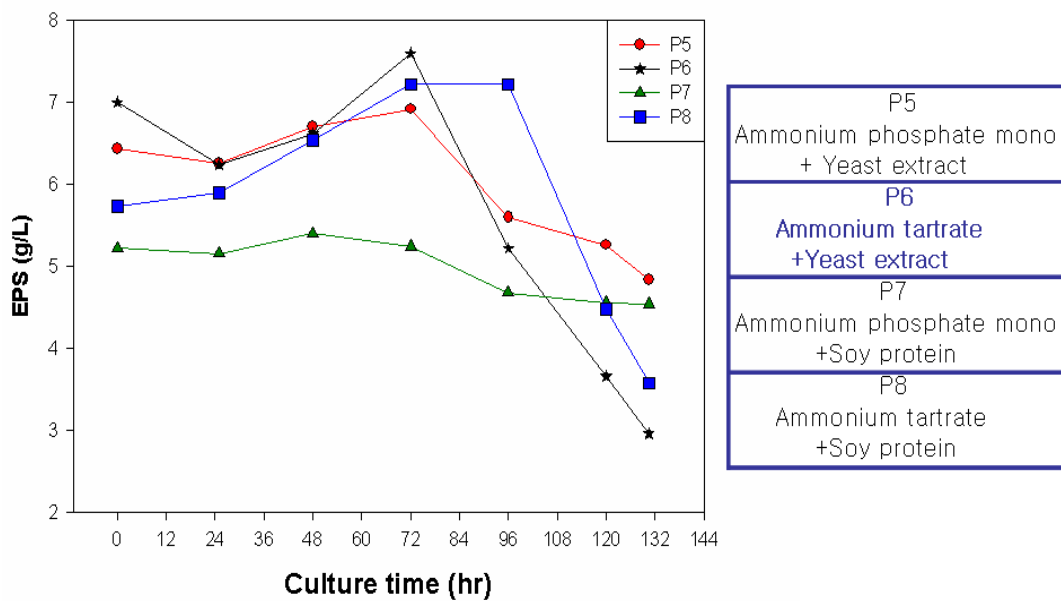


Figure 2–32. Comparison of time–course profiles of EPS production in the final production bioreactor cultures performed with P5, P6, P7, and P8 production media respectively response surface quadratic model

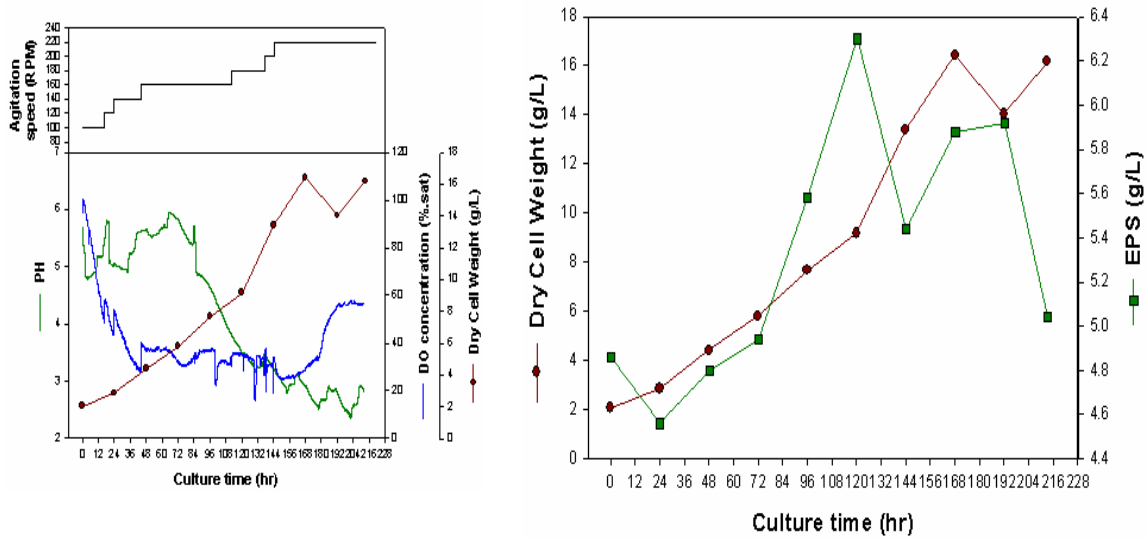


Figure 2-33. Time-course profiles of fermentation parameters in the bioreactor culture performed with P6-1 medium composition

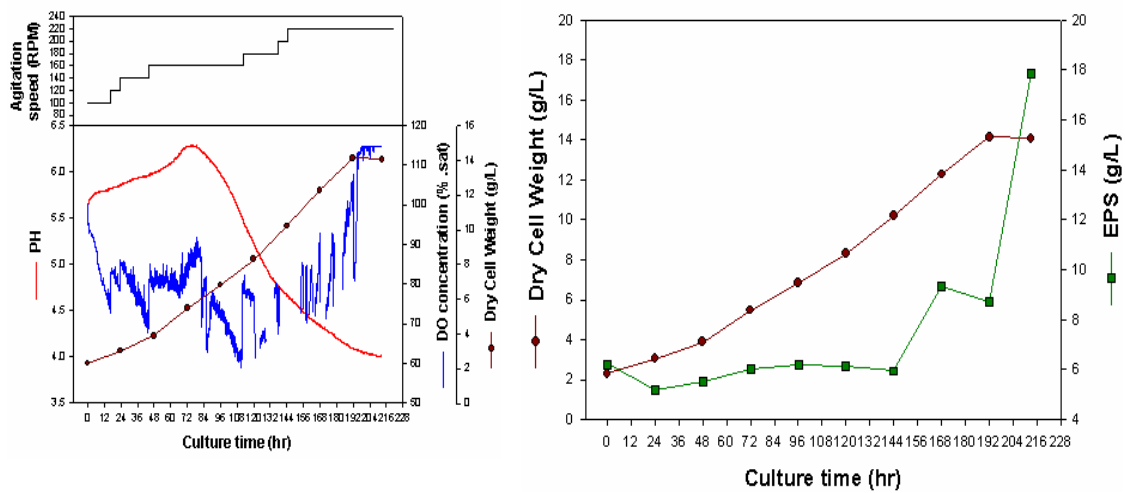


Figure 2-34. Time-course profiles of fermentation parameters in the bioreactor culture performed with P6-2 medium composition

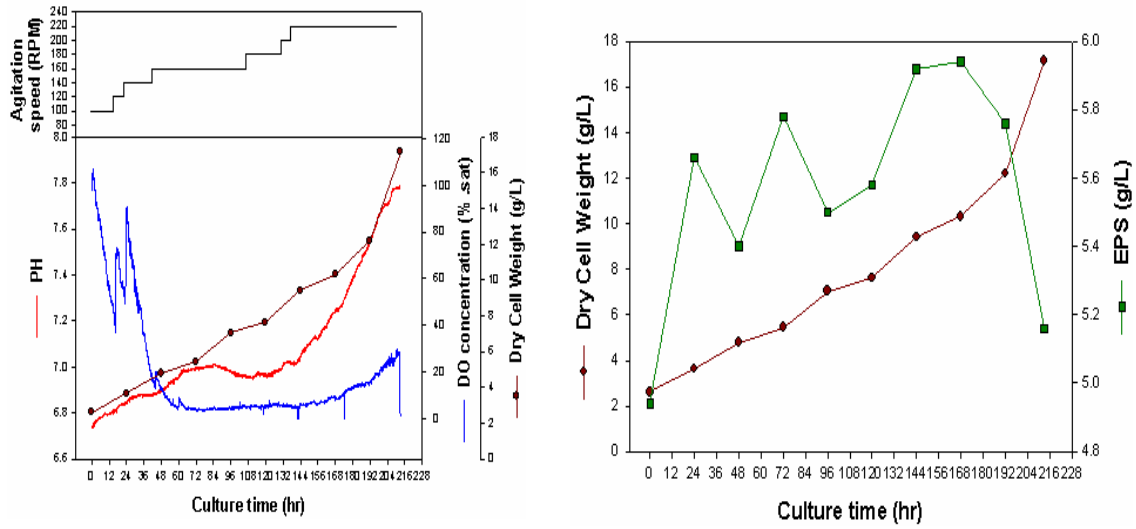


Figure 2-35. Time-course profiles of fermentation parameters in the bioreactor culture performed with P6-3 medium composition

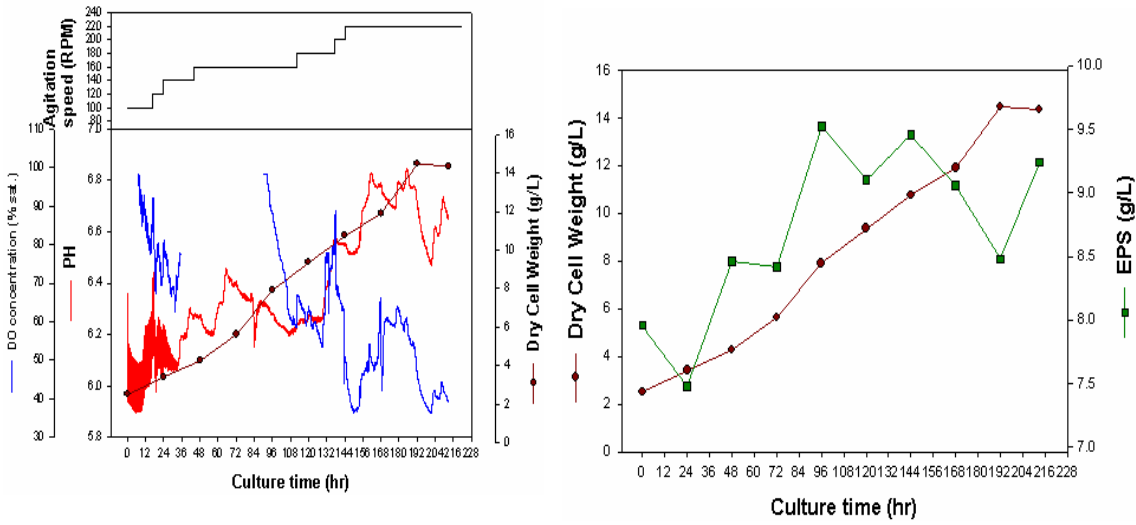


Figure 2-36. Time-course profiles of fermentation parameters in the bioreactor culture performed with P6-4 medium composition

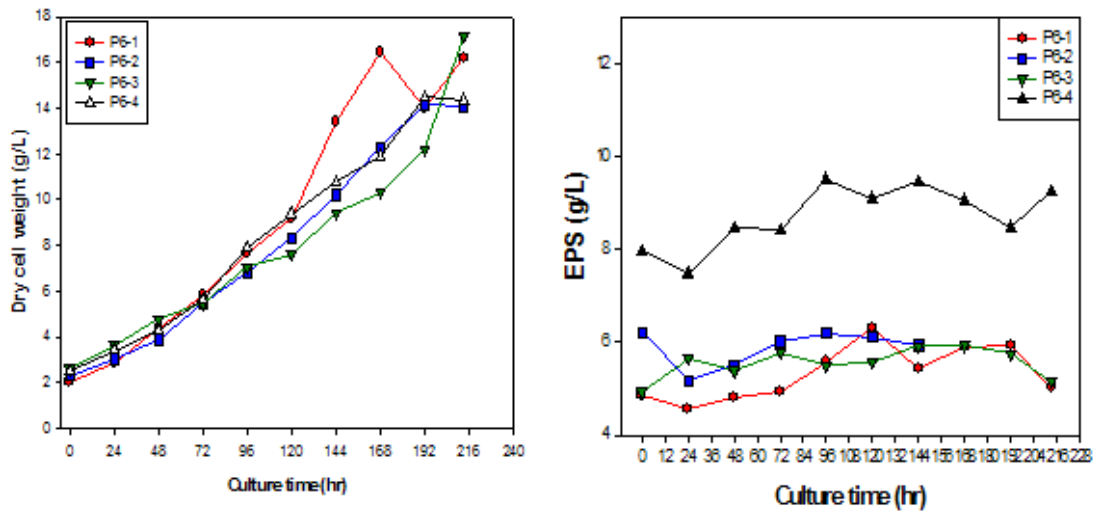


Figure 2-37. Comparison of dry cell weight and EPS concentration (The medium compositions of P6-1, P6-2, P6-3 and P6-4 were used respectively in each bioreactor culture)

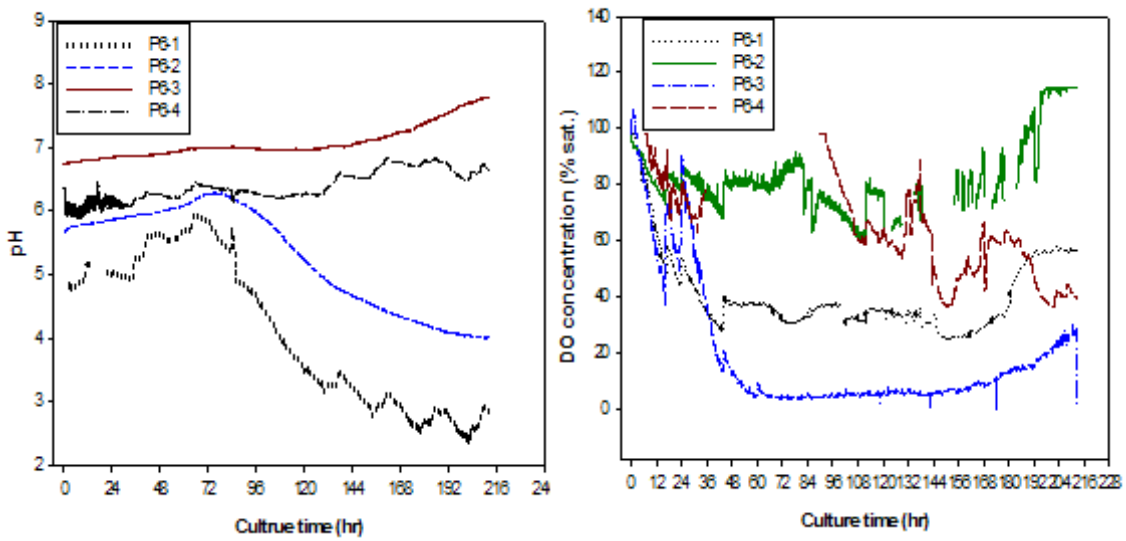


Figure 2-38. Comparison of pH and DO concentration (The medium compositions of P6-1, P6-2, P6-3 and P6-4 were used respectively in each bioreactor culture)

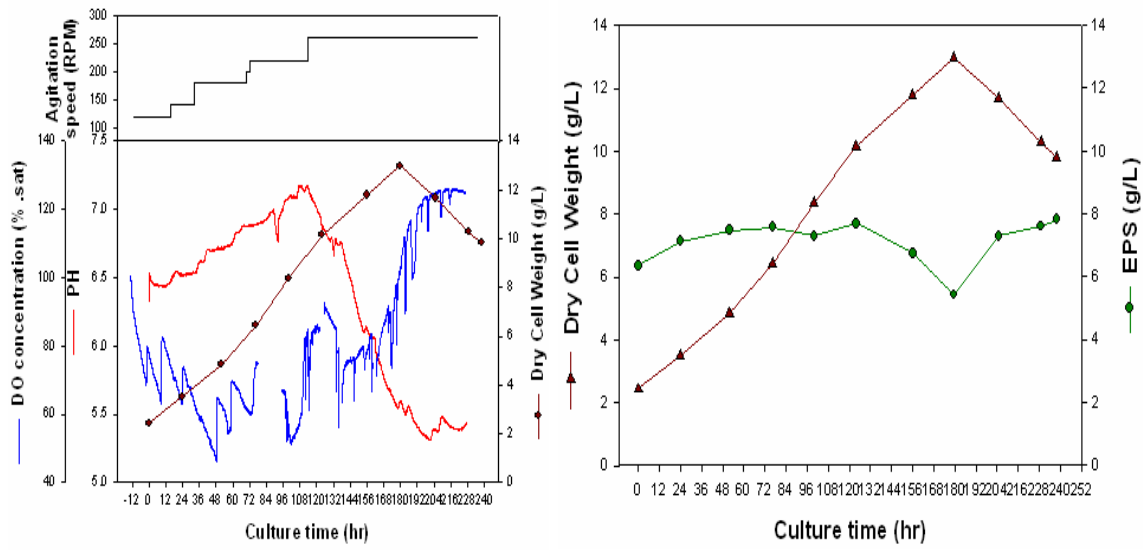


Figure 2-39. Time-course profiles of fermentation parameters in the bioreactor culture performed with P6-5 medium composition

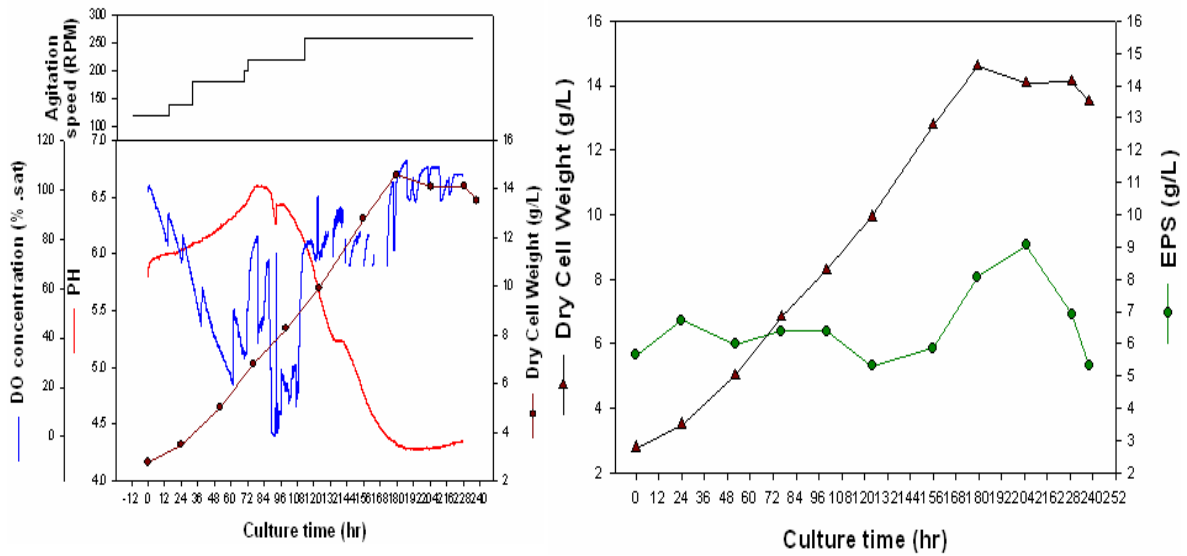


Figure 2-40. Time-course profiles of fermentation parameters in the bioreactor culture performed with P6-6 medium composition

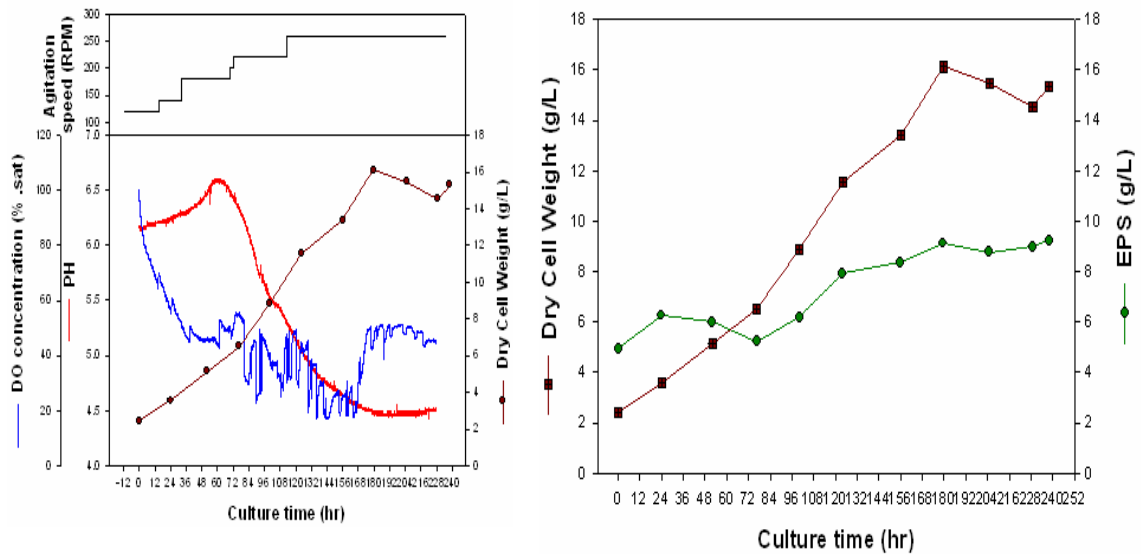


Figure 2-41. Time-course profiles of fermentation parameters in the bioreactor culture performed with P6-7 medium composition

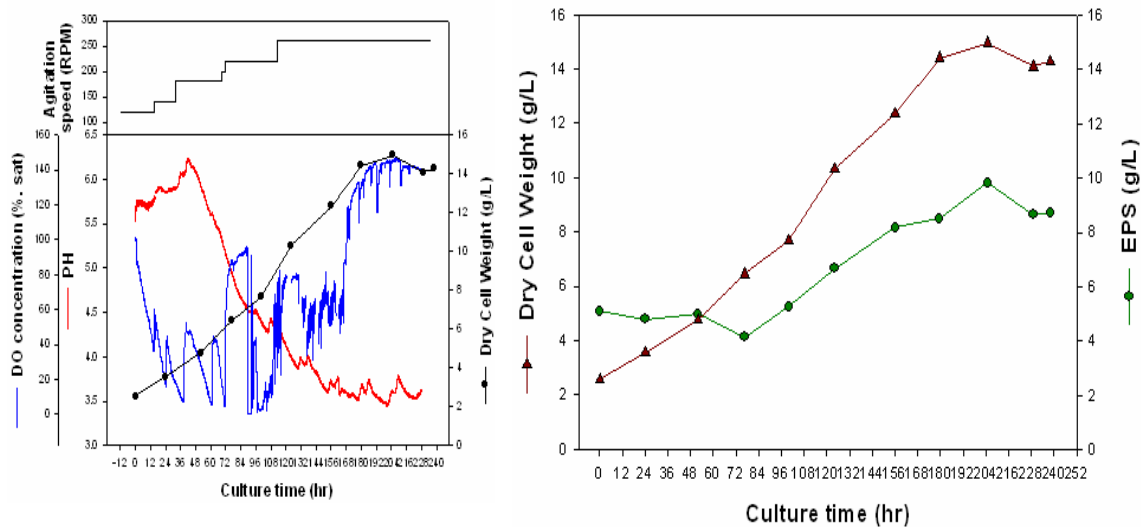


Figure 2-42. Time-course profiles of fermentation parameters in the bioreactor culture performed with P6-8 medium composition

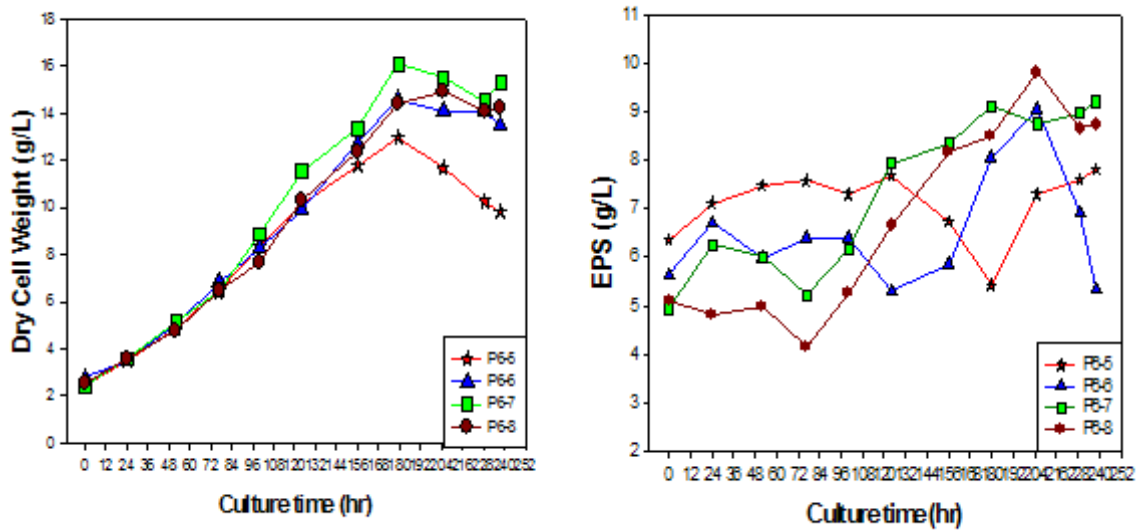


Figure 2-43. Comparison of dry cell weight and EPS concentration (The medium compositions of P6-5, P6-6, P6-7 and P6-8 were used respectively in each bioreactor culture)

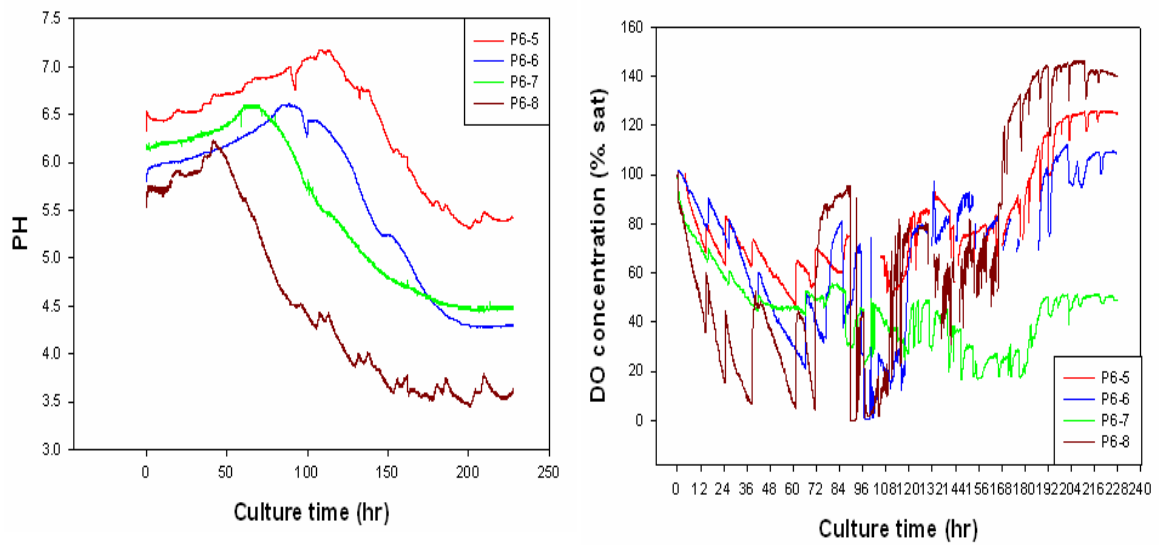


Figure 2-44. Comparison of pH and DO concentration (The medium compositions of P6-5, P6-6, P6-7 and P6-8 were used respectively in each bioreactor culture)

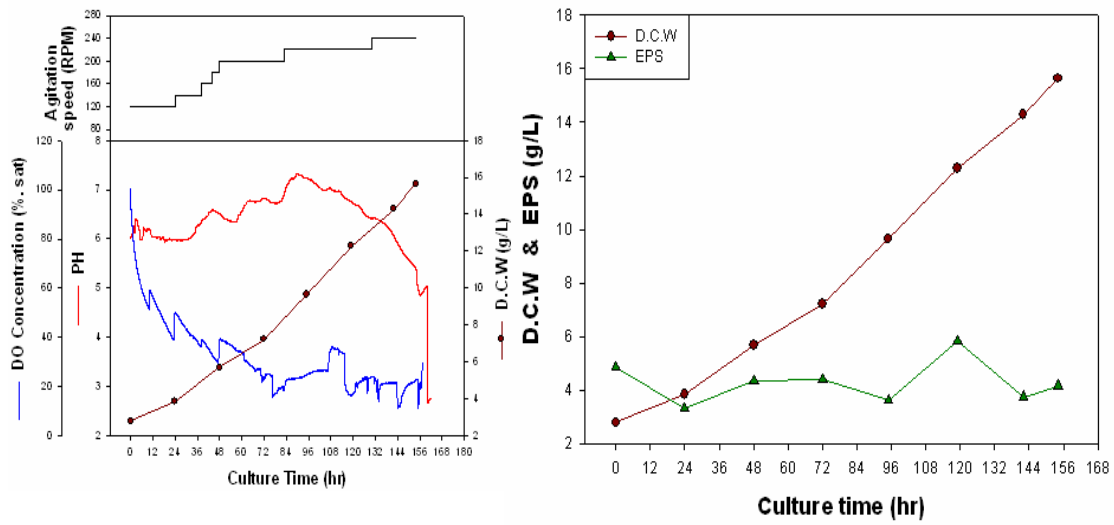


Figure 2-45. Time-course profiles of fermentation parameters in the bioreactor culture performed with P6-9 medium composition

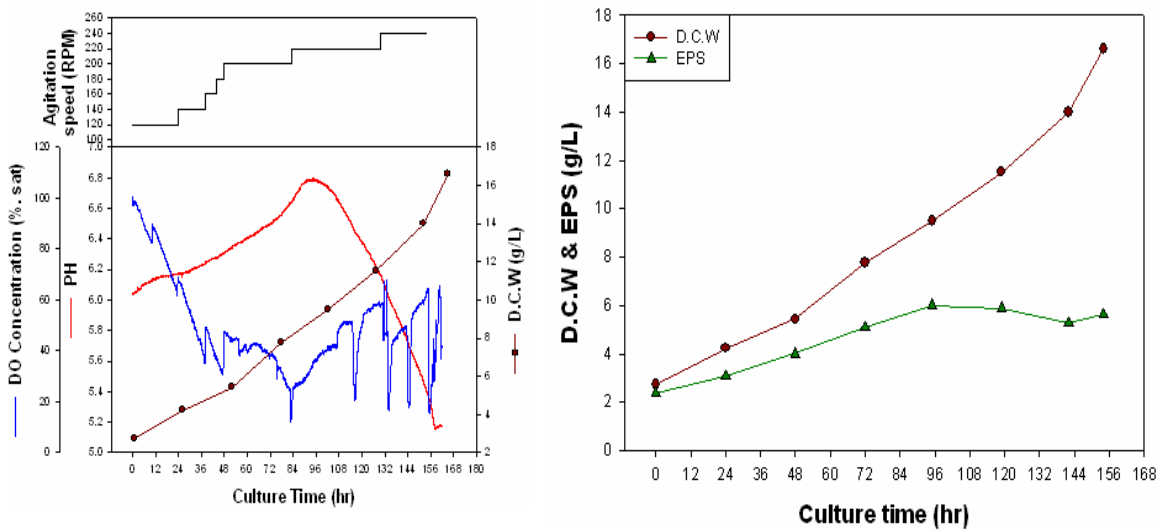


Figure 2-46. Time-course profiles of fermentation parameters in the bioreactor culture performed with P6-10 medium composition

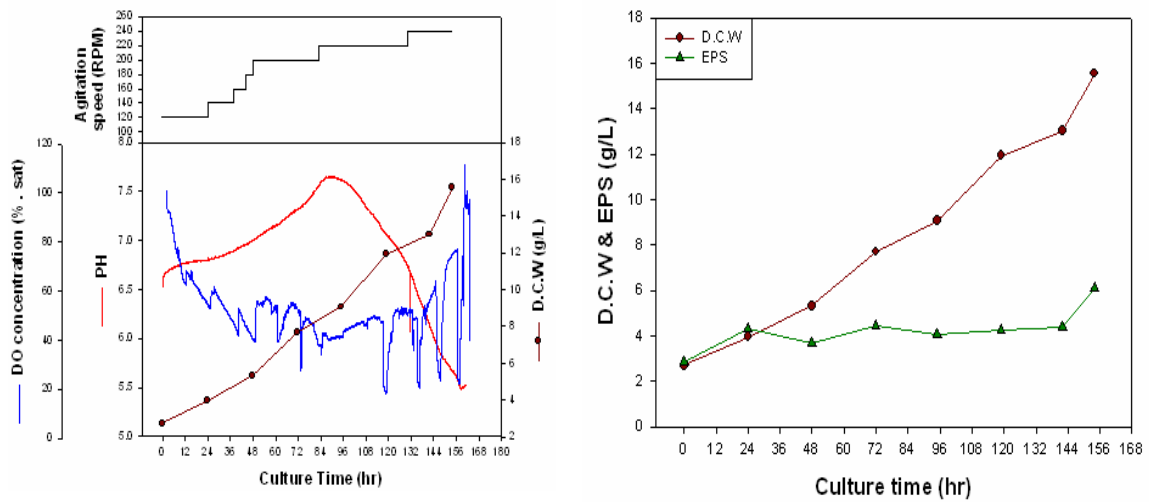


Figure 2-47. Time-course profiles of fermentation parameters in the bioreactor culture performed with P6-11 medium composition

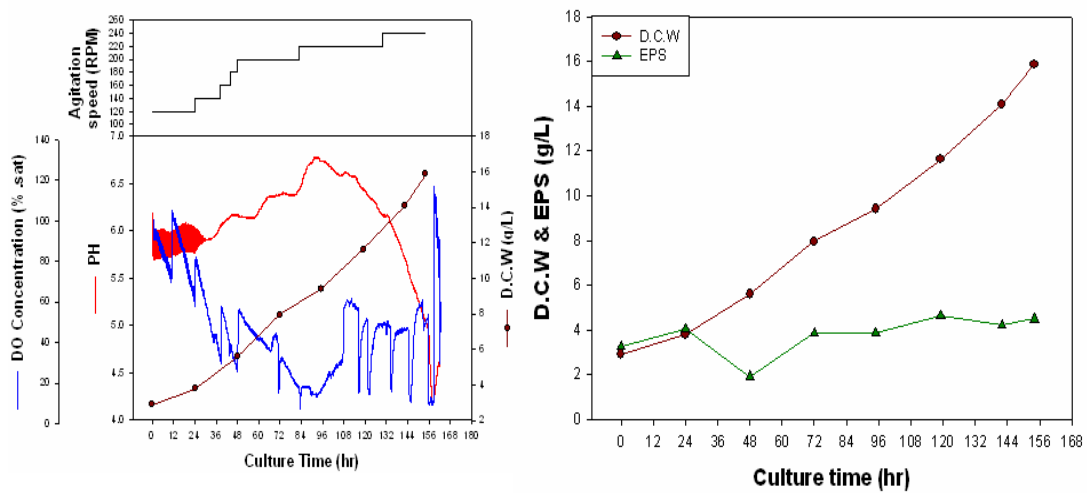


Figure 2-48. Time-course profiles of fermentation parameters in the bioreactor culture performed with P6-12 medium composition

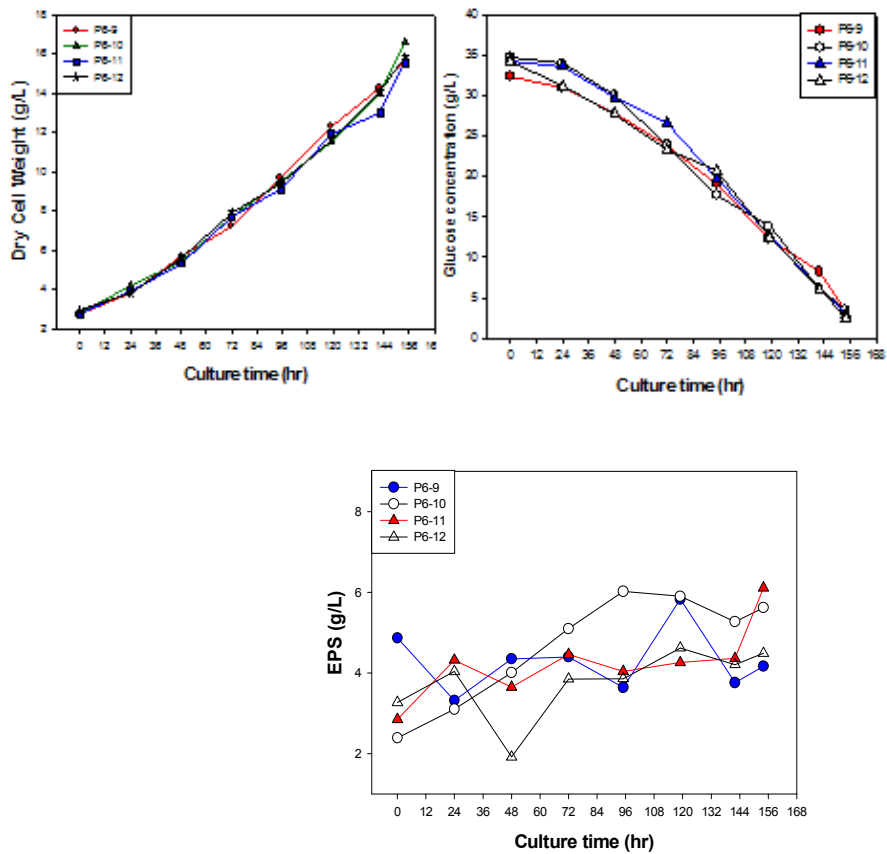


Figure 2-49. Comparison of dry cell weight, glucose consumption and EPS concentration (The medium compositions of P6-9, P6-10, P6-11 and P6-12 were used respectively in each bioreactor culture)

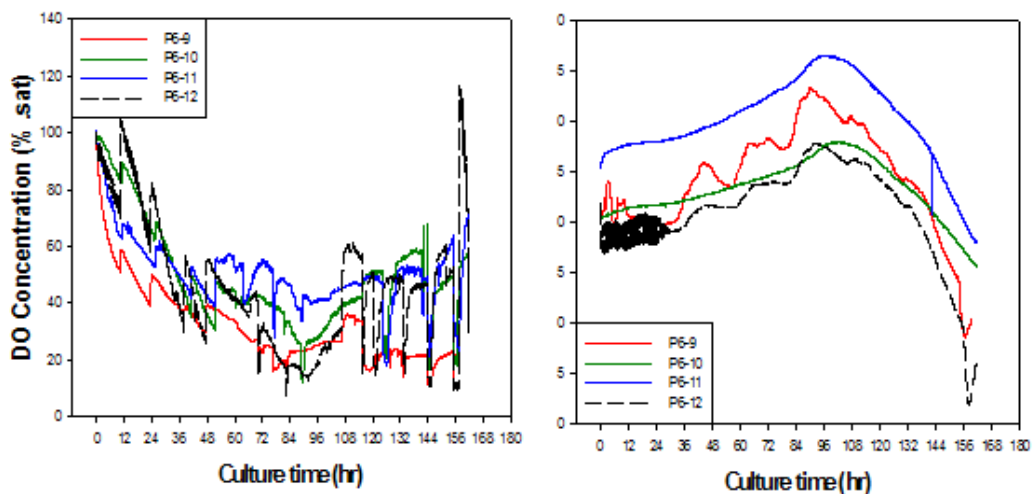


Figure 2-50. Comparison of pH and DO concentration (The medium compositions of P6-9, P6-10, P6-11 and P6-12 were used respectively in each bioreactor culture)

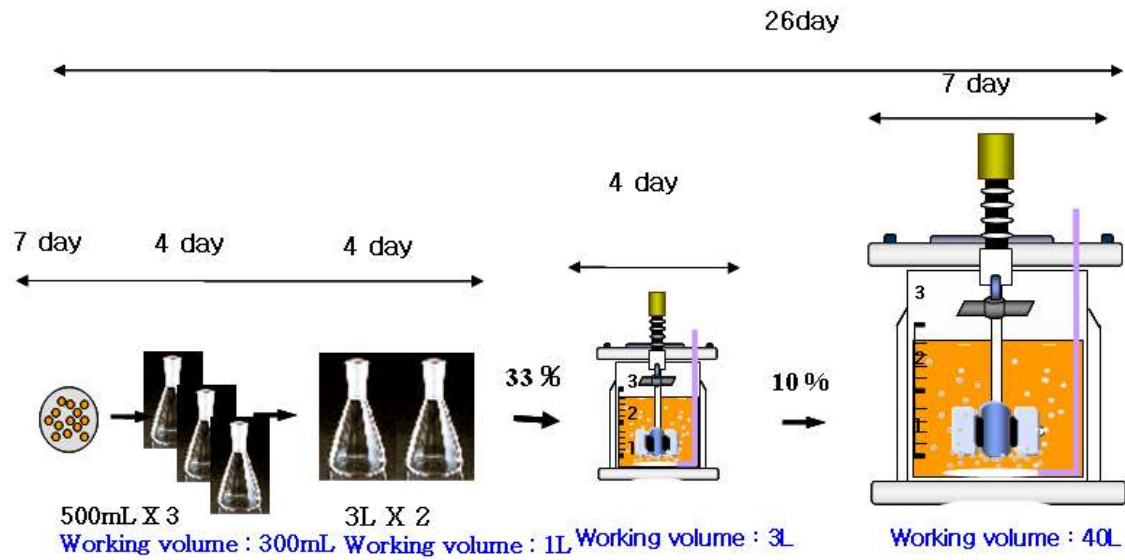


Figure 2-51. Fermentation bioprocess for the submerged fermentations of mycelial cells of *I. obliquus* in 75 l bioreactor

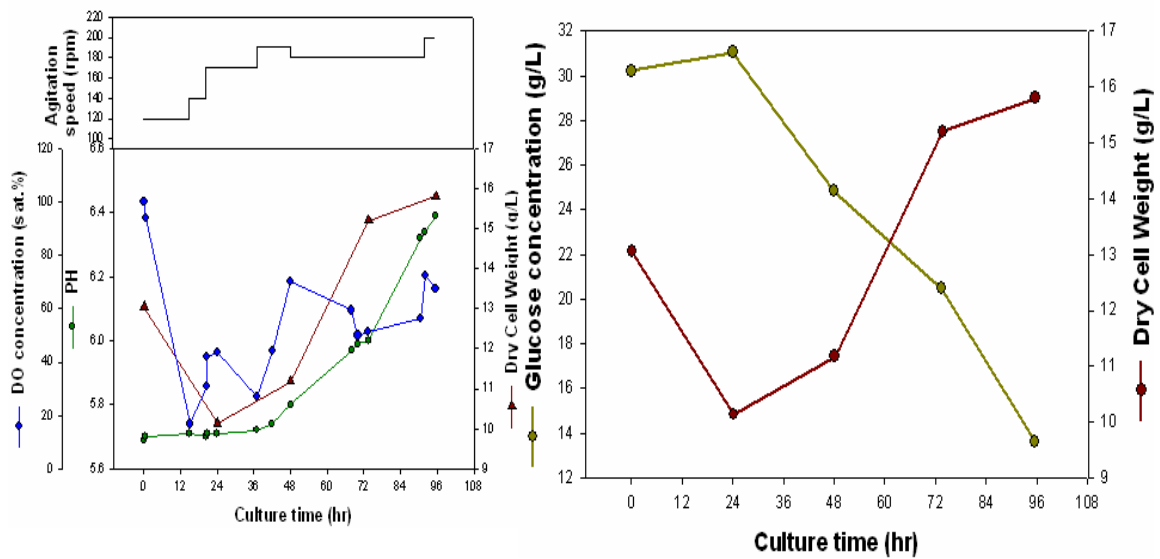


Figure 2-52. Time-course profiles of fermentation parameters in 5 l bioreactor (3 l working volume) growth culture

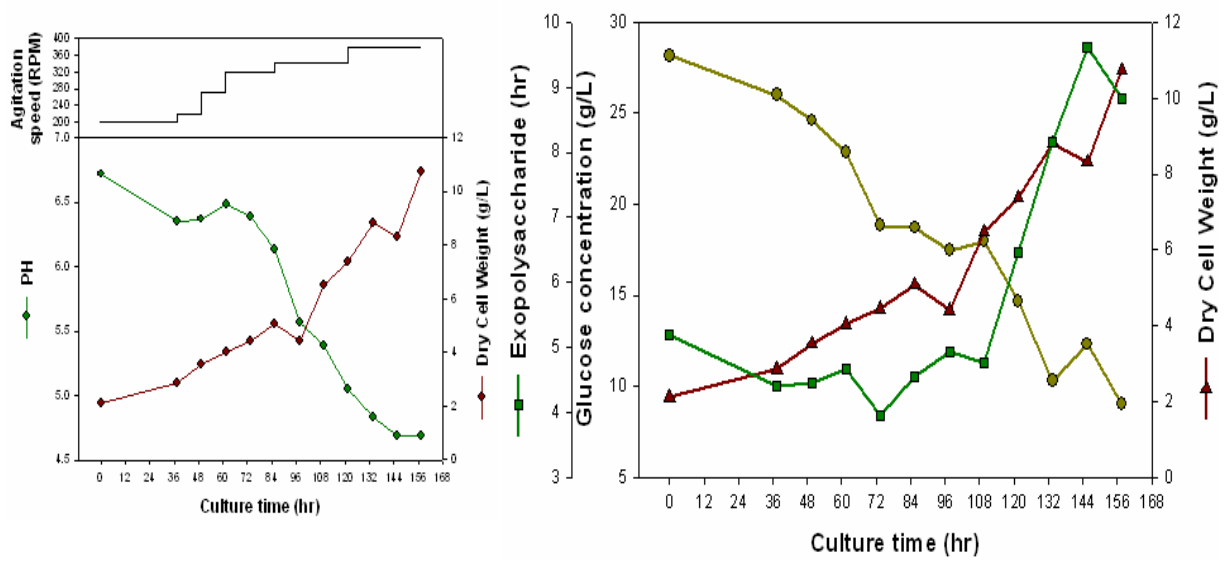
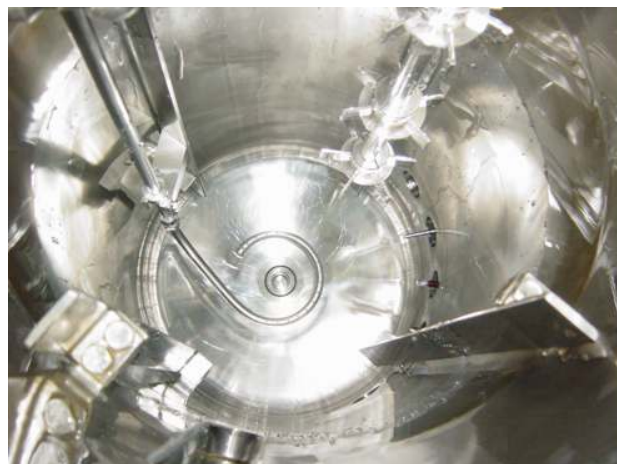


Figure 2-53. Time-course profiles of fermentation parameters in 75 l bioreactor (40 l working volume) production culture (P6-8 medium composition was used)



6_blaed_rushton_impeller

Figure 2-54. Inside of the 75 l pilot-scale fermentor used in the scaled-up fermentation bioprocess (6-blade rushton impeller was used for EPS production)

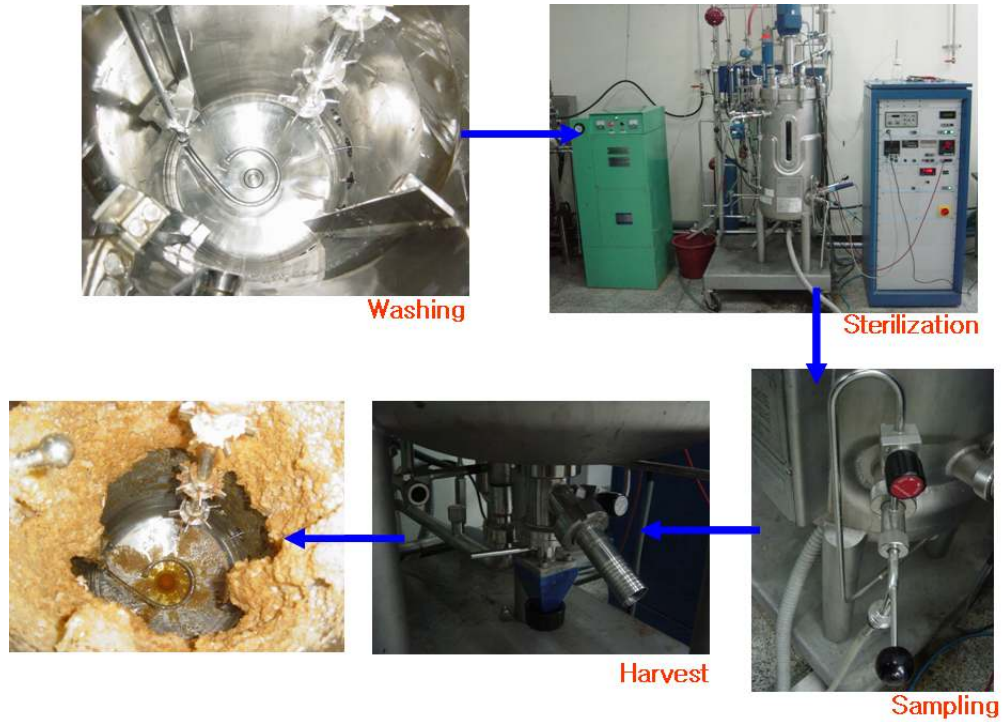


Figure 2–55. 75 l pilot-scale fermentor and various equipments (Final picture shows the mycelial cells attached to the inner surface of the fermentor at the end of the production culture)

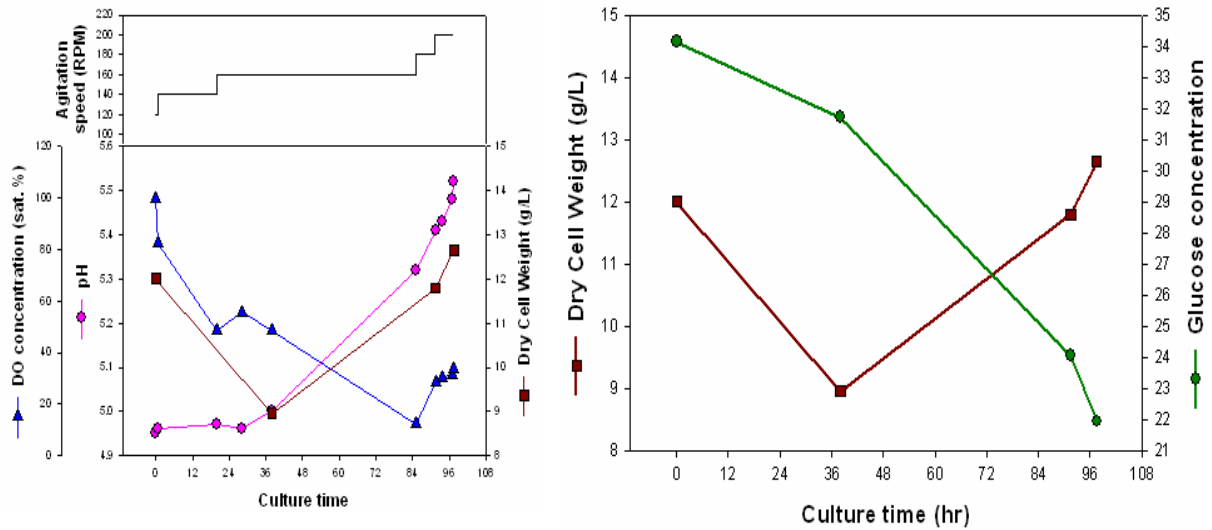


Figure 2–56. Time-course profiles of fermentation parameters in 5 l bioreactor (4 l working volume) growth culture

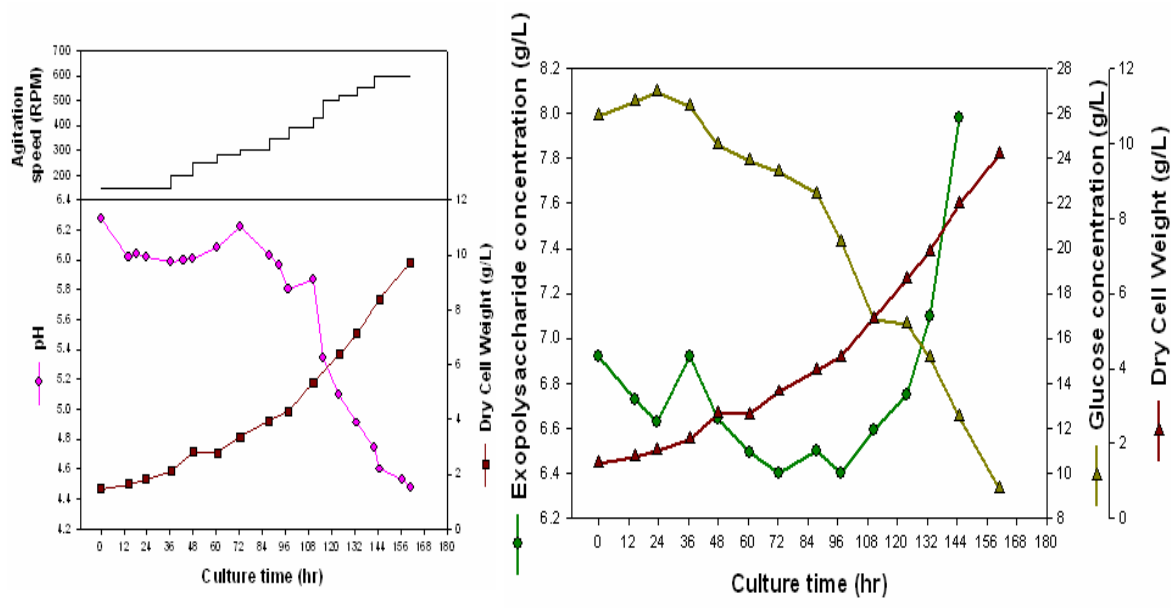


Figure 2-57. Time-course profiles of fermentation parameters in 75 l bioreactor (45 l working volume) production culture (P6-8 medium composition was used)



Figure 2-58. Protein determination contained in the fermentation broth by use of Lowry method (Bovine serum albumin was used as a standard for the determination of protein amounts)

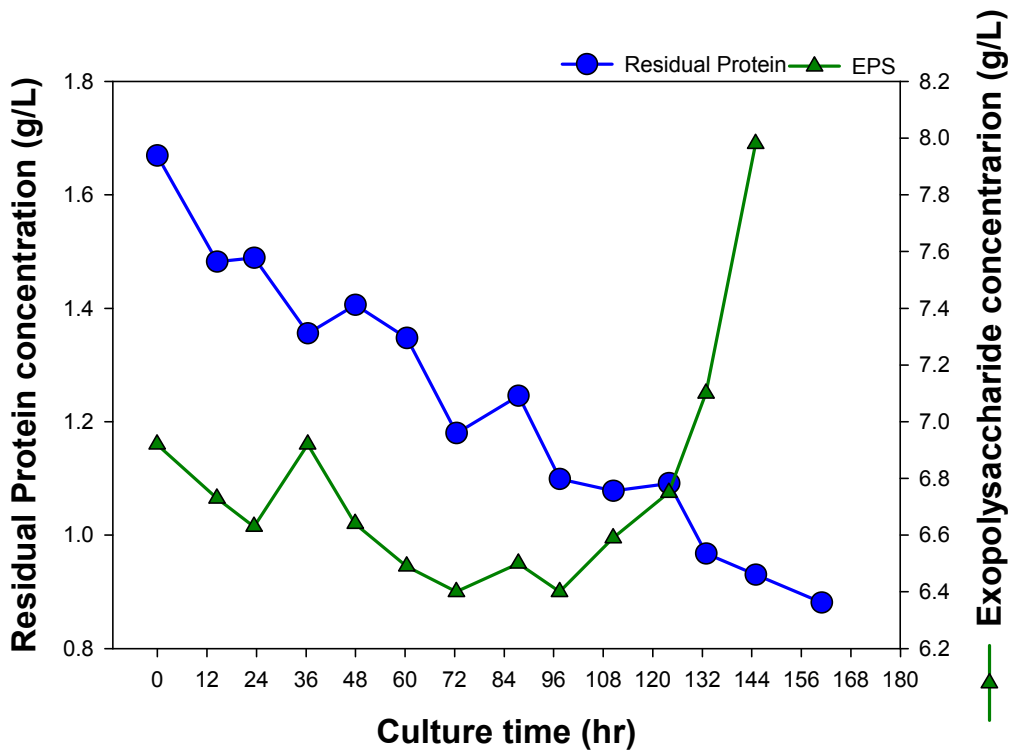


Figure 2-59. Time-course profiles of EPS and the residual protein amounts in 75 l bioreactor (45 l working volume) production culture (P6-8 medium composition was used)

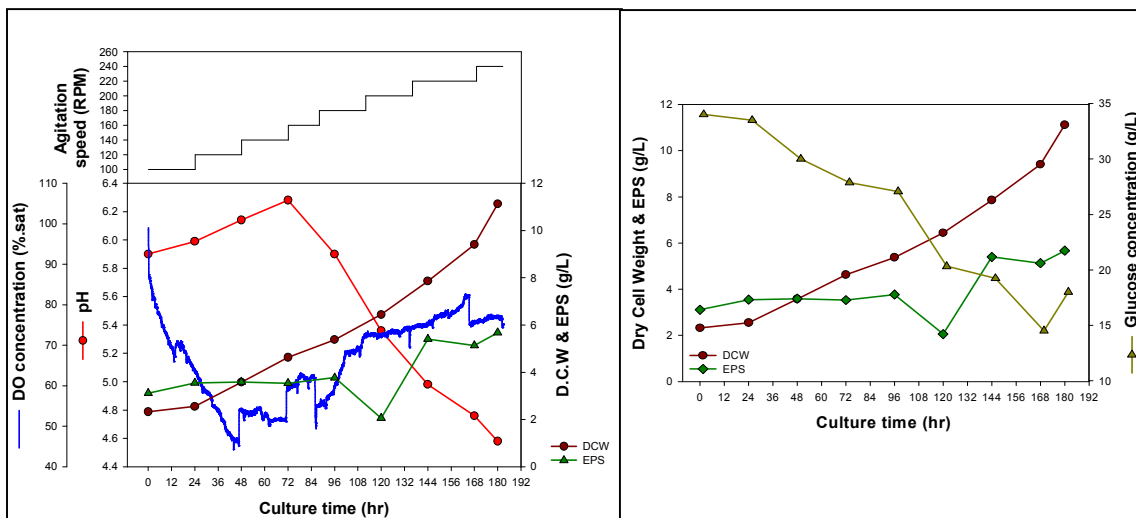


Figure 2-60. Fermentation results for the production of EPS in 5 l bioreactor culture (C/N ratio of 3:1 in the production medium) (carbon 30 g/L : nitrogen 10 g/L)

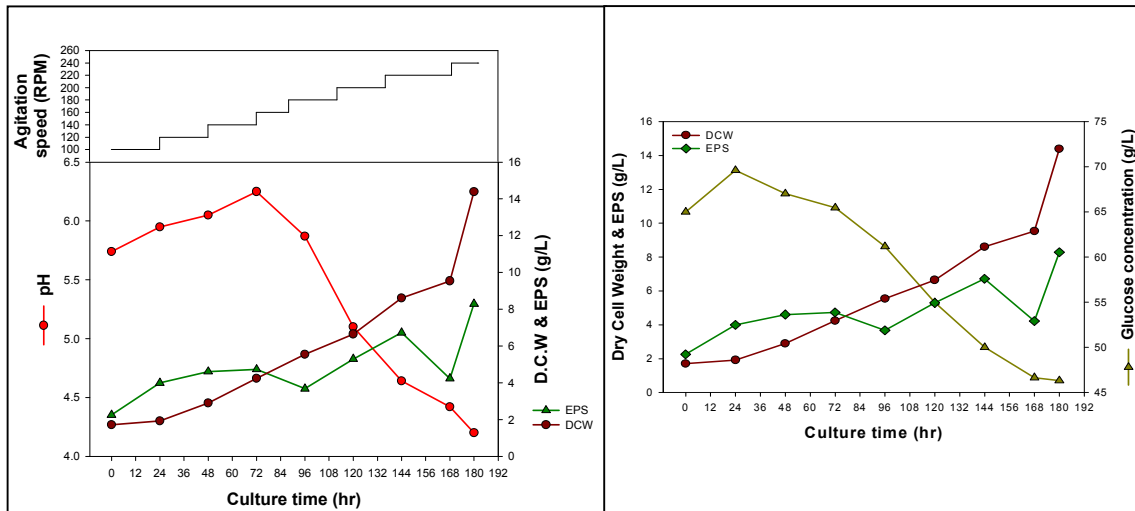


Figure 2–61. Fermentation results for the production of EPS in 5L bioreactor culture (C/N ratio of 6:1 in the production medium) (carbon 60 g/L: nitrogen 10 g/L)

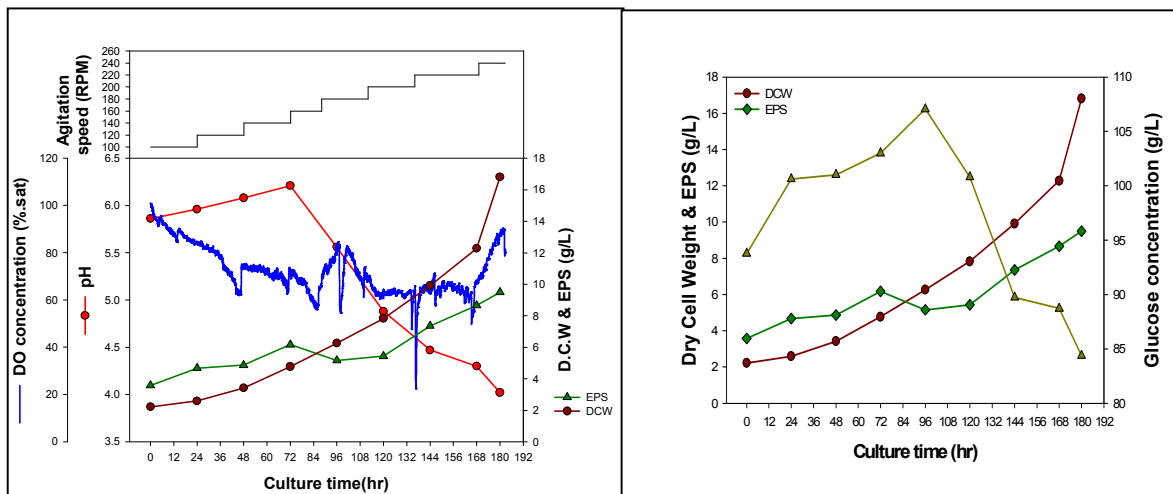


Figure 2–62. Fermentation results for the production of EPS in 5 / bioreactor culture (C/N ratio of 9:1 in the production medium)(carbon 90 g/L : nitrogen 10 g/L)

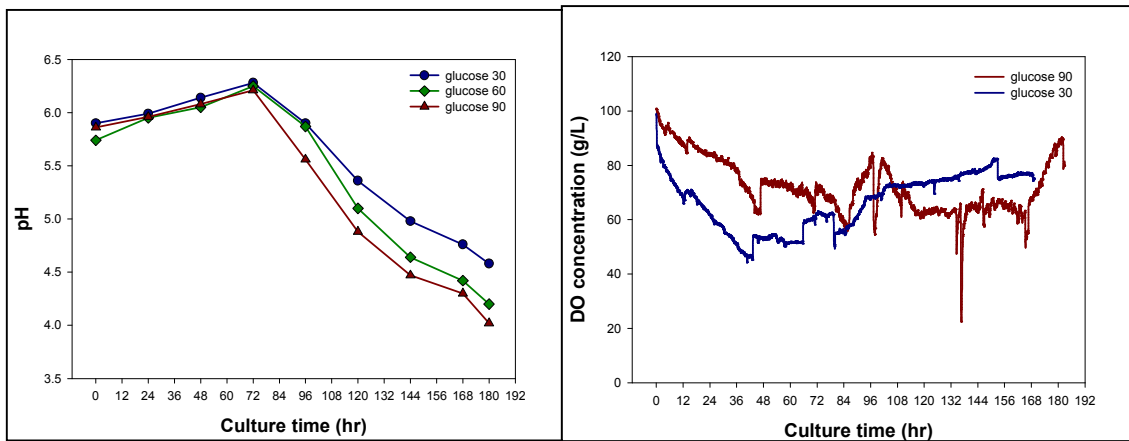


Figure 2-63. Comparison of pH and DO concentration (Production media with the C/N ratios of 3:1, 6:1 and 9:1 were used respectively in each 5 l bioreactor culture.)

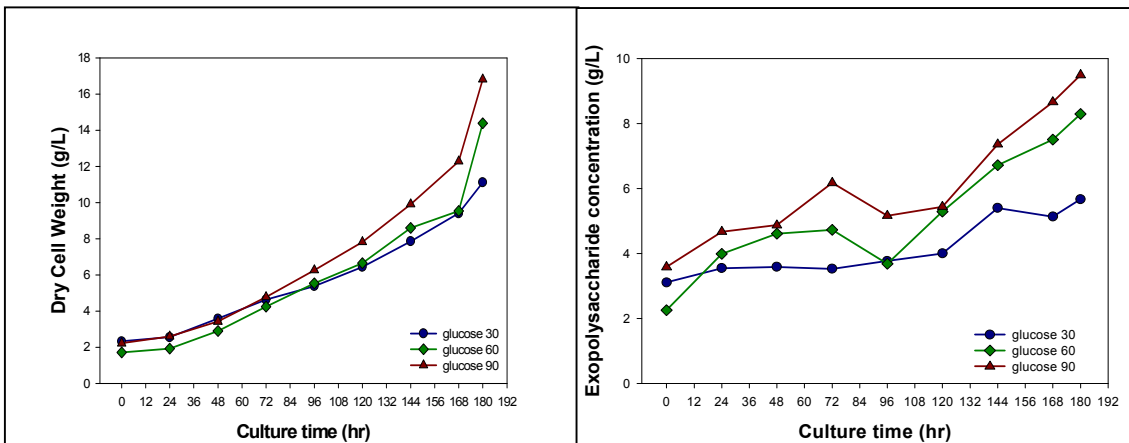


Figure 2-64. Comparison of DCW and EPS production (Production media with the C/N ratios of 3:1, 6:1 and 9:1 were used respectively in each 5 l bioreactor culture.)

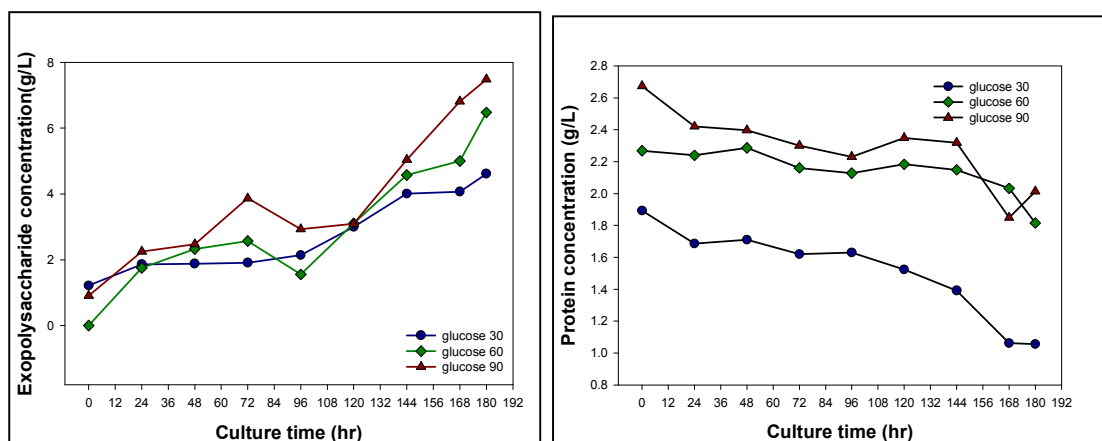


Figure 2-65. Comparison of EPS production, and protein amounts contained in each fermentation broth (C/N ratios of 3:1, 6:1 and 9:1 were used respectively in each 5 l bioreactor culture) (EPS amounts were modified based on the protein contents contained in the fermentation broths)

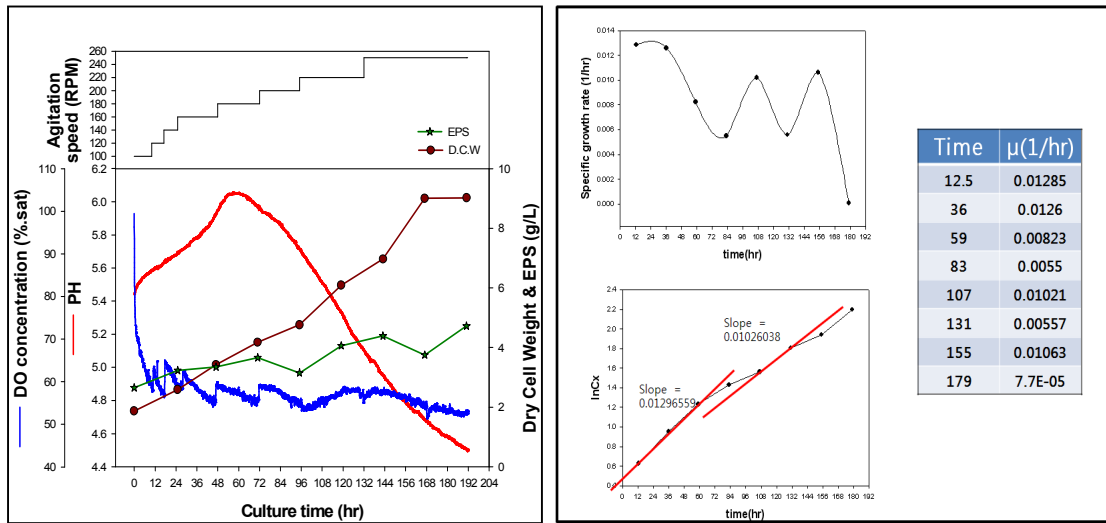


Figure 2-66. Fermentation results for the production of EPS in 5 l bioreactor culture (C/N ratio of 3:1 in the production medium)(carbon 30 g/L : nitrogen 10 g/L) (The slope of the linear line in the right-hand side graph is the specific cell growth rate)

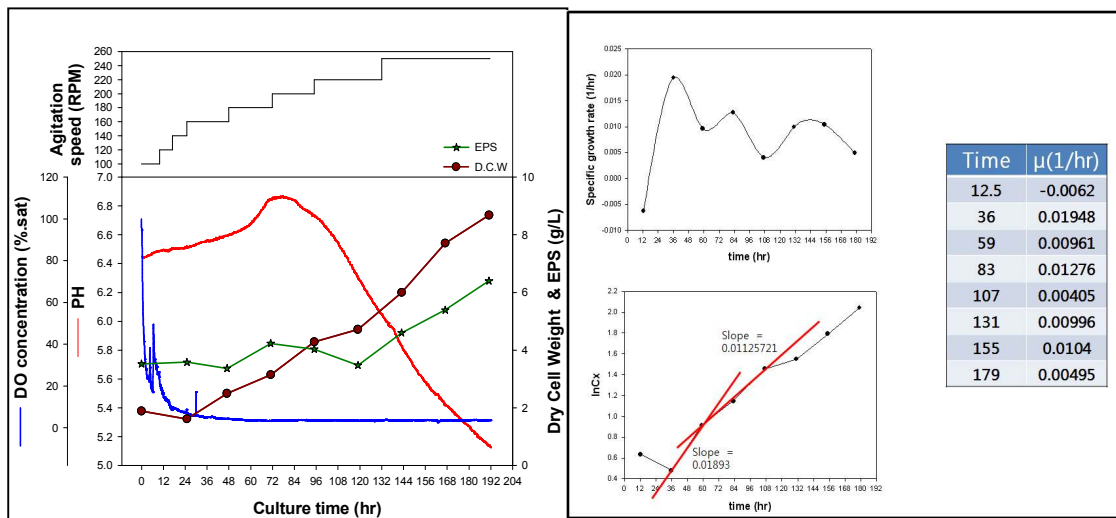


Figure 2-67. Fermentation results for the production of EPS in 5 l bioreactor culture (C/N ratio of 13:1 in the production medium) (carbon 130 g/L : nitrogen 10 g/L) (The slope of the linear line in the right-hand side graph is the specific cell growth rate)

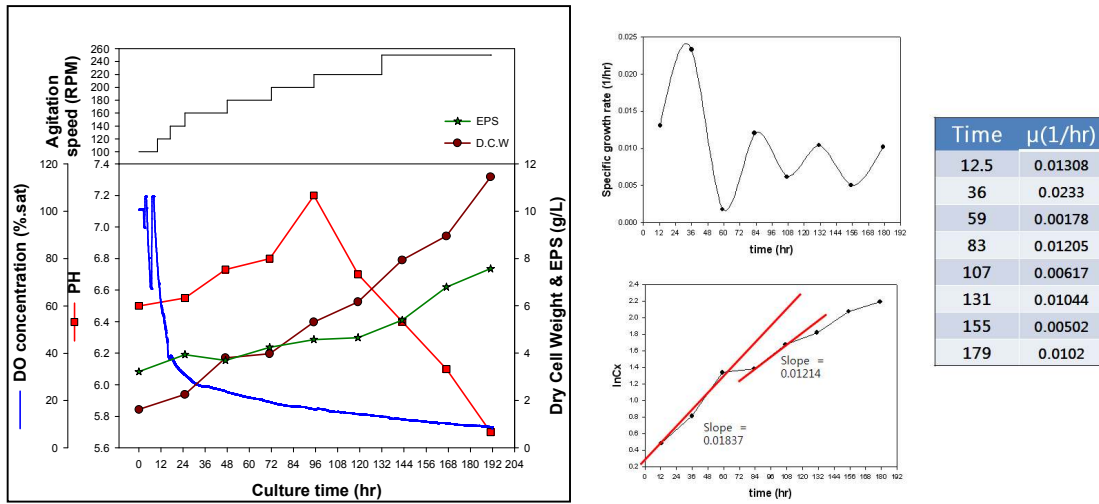


Figure 2-68. Fermentation results for the production of EPS in 5 l bioreactor culture (C/N ratio of 15:1 in the production medium) (carbon 150 g/L : nitrogen 10 g/L) (The slope of the linear line in the right-hand side graph is the specific cell growth rate)

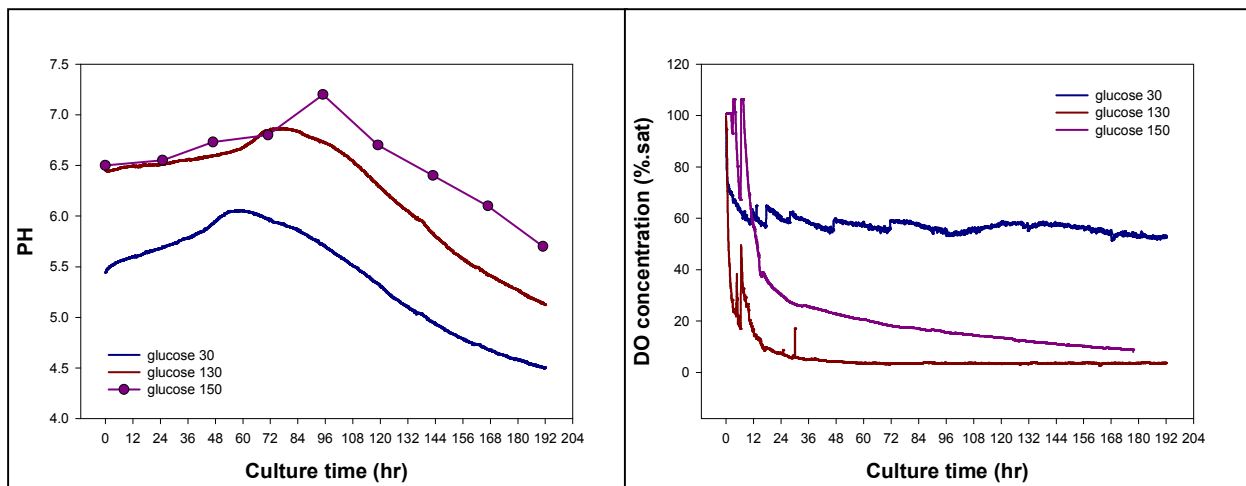


Figure 2-69. Comparison of pH and DO (Production media with the C/N ratios of 3:1, 13:1 and 15:1 were used respectively in each 5 l bioreactor culture.)

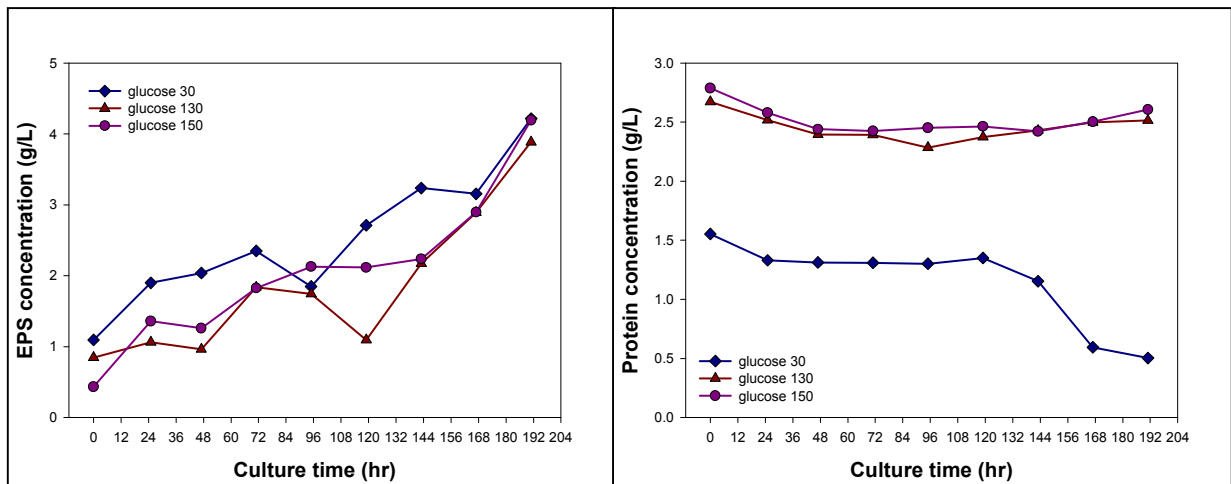


Figure 2-70. Comparison of EPS production, and protein amounts contained in each fermentation broth (C/N ratios of 3:1, 13:1 and 15:1 were used respectively in each 5 l bioreactor culture) (EPS amounts were modified based on the protein contents contained in the fermentation broths)

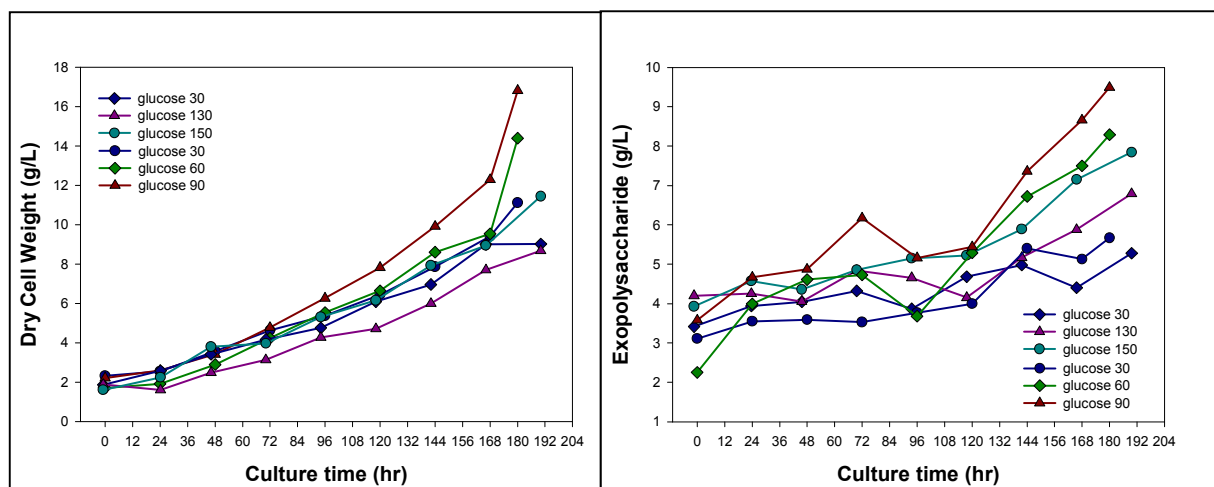


Figure 2-71. Summary of the EPS production (C/N ratios of 3:1, 6:1, 9:1, 13:1 and 15:1 were used respectively in each 5 l bioreactor culture) (left graph: EPS amounts unmodified; right graph: EPS amounts modified based on the protein contents contained in the fermentation broths)

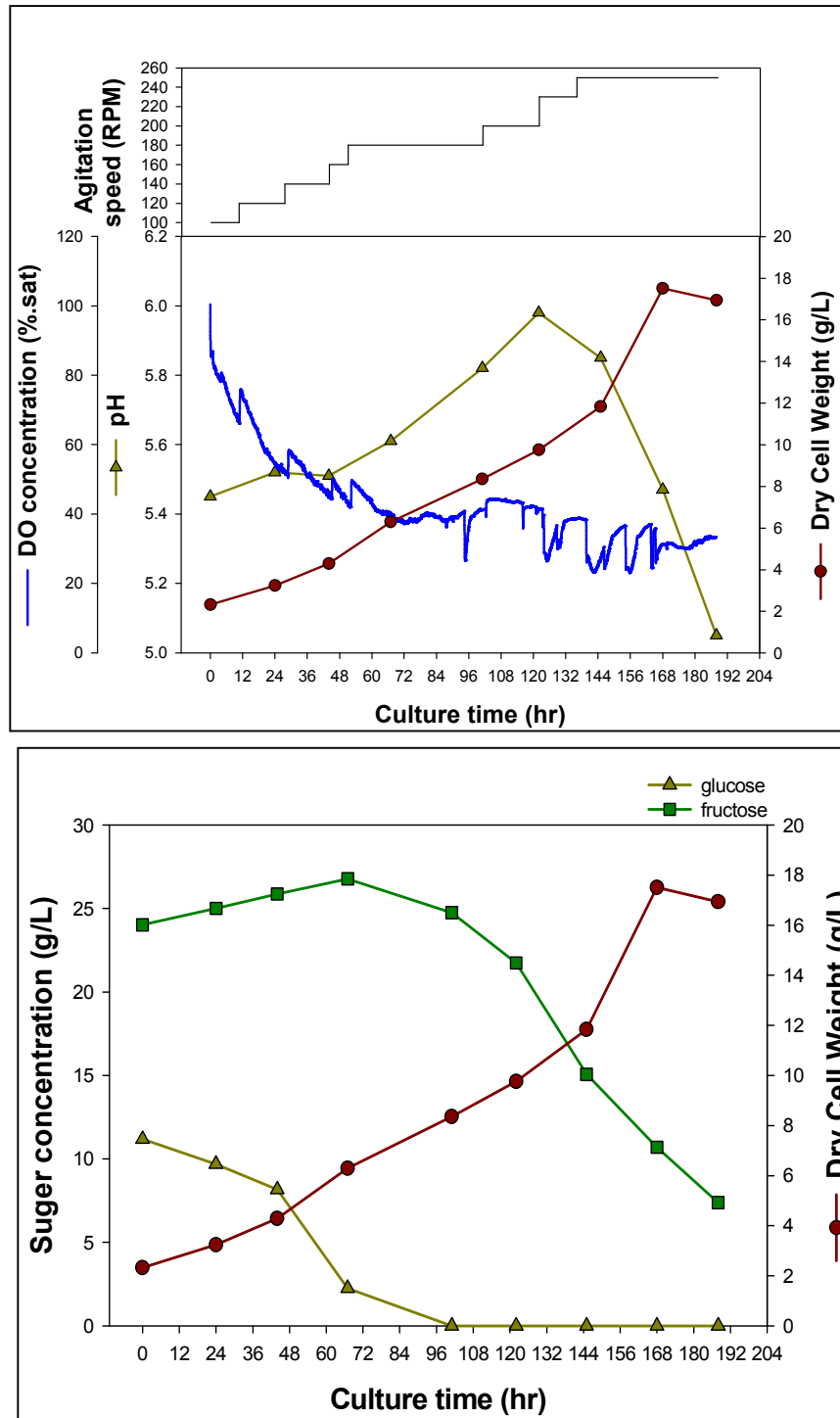


Figure 2-72. Fermentation results for the production of IPS in 5 l bioreactor culture (IPS-1 production culture) (Both glucose and fructose were supplemented into the IPS production medium as carbon sources.)

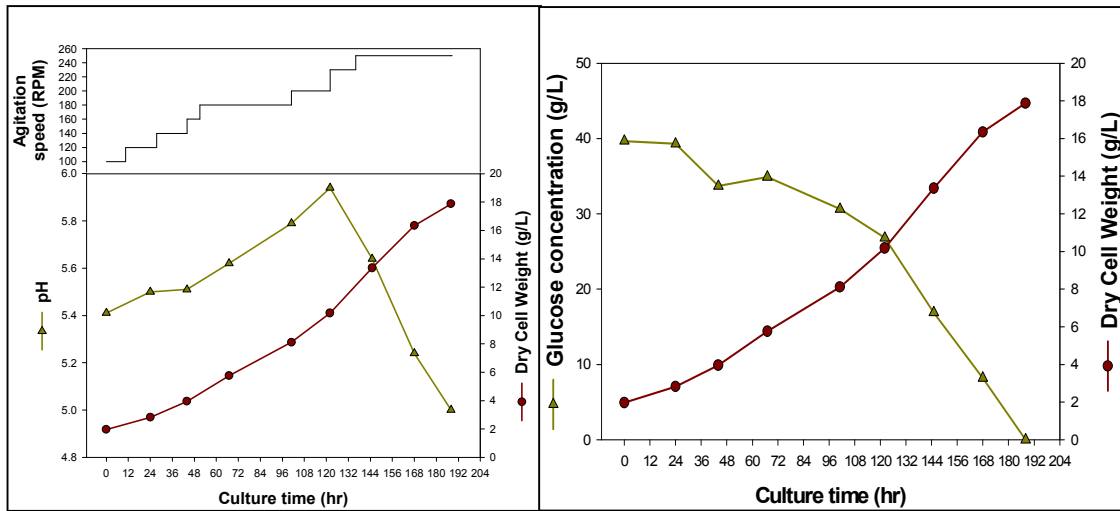


Figure 2-73. Fermentation results for the production of IPS in 5 l bioreactor culture (IPS-2 production culture) (Only glucose was supplemented into the IPS production medium as a carbon source.)

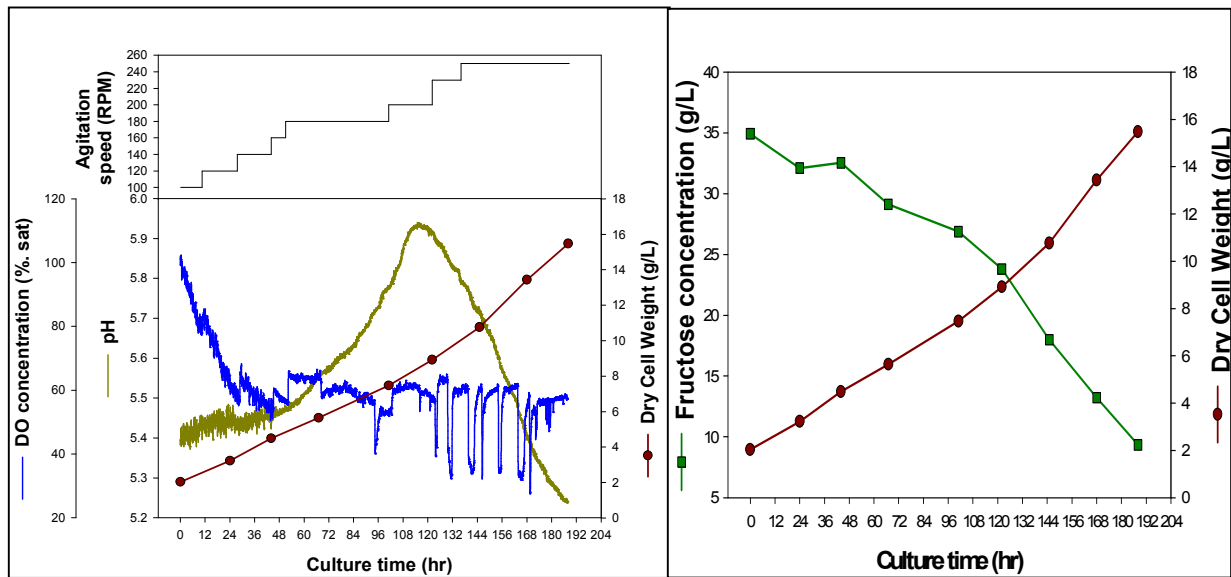


Figure 2-74. Fermentation results for the production of IPS in 5 l bioreactor culture (IPS-3 production culture) (Only fructose was supplemented into the IPS production medium as a carbon source.)

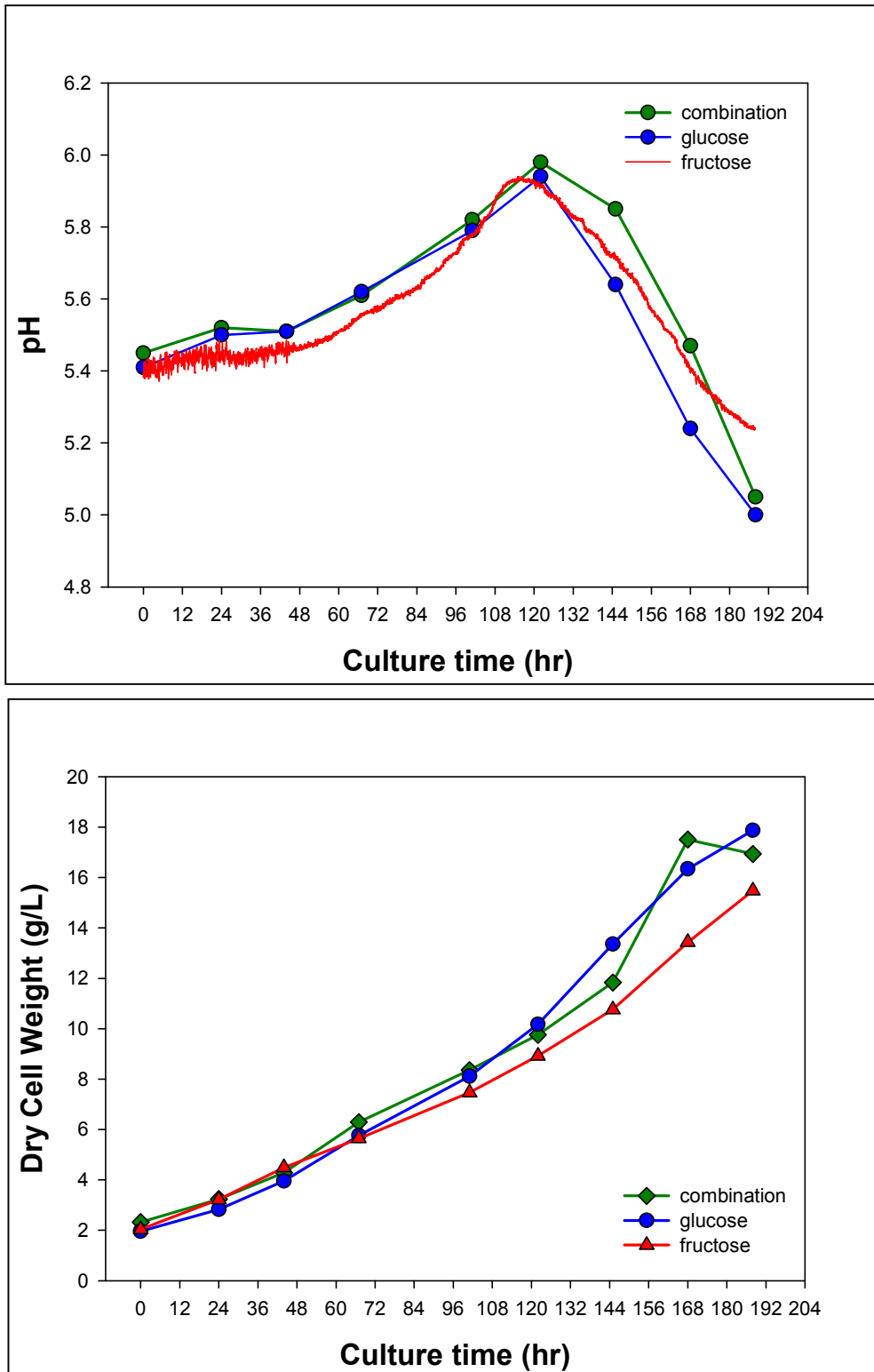
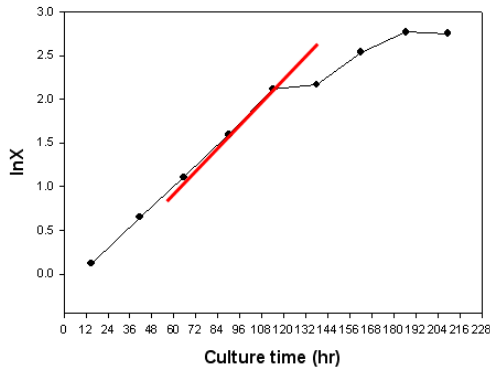
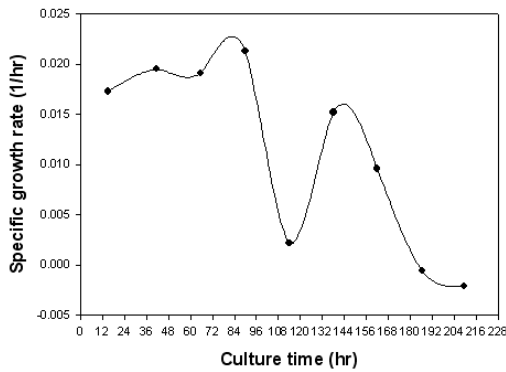
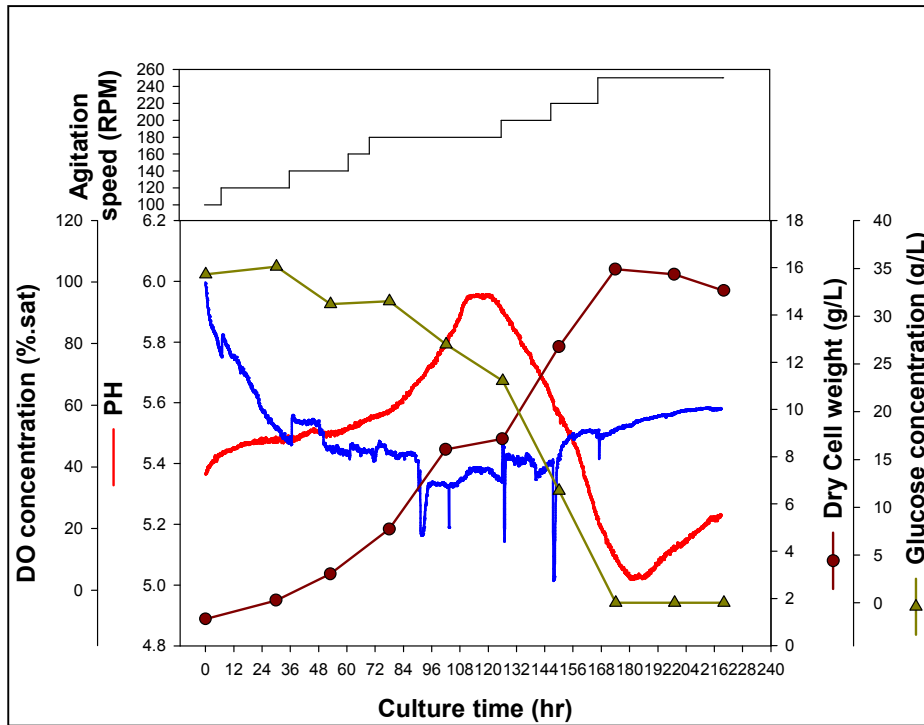
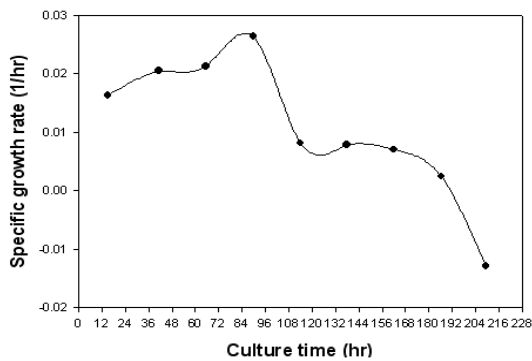
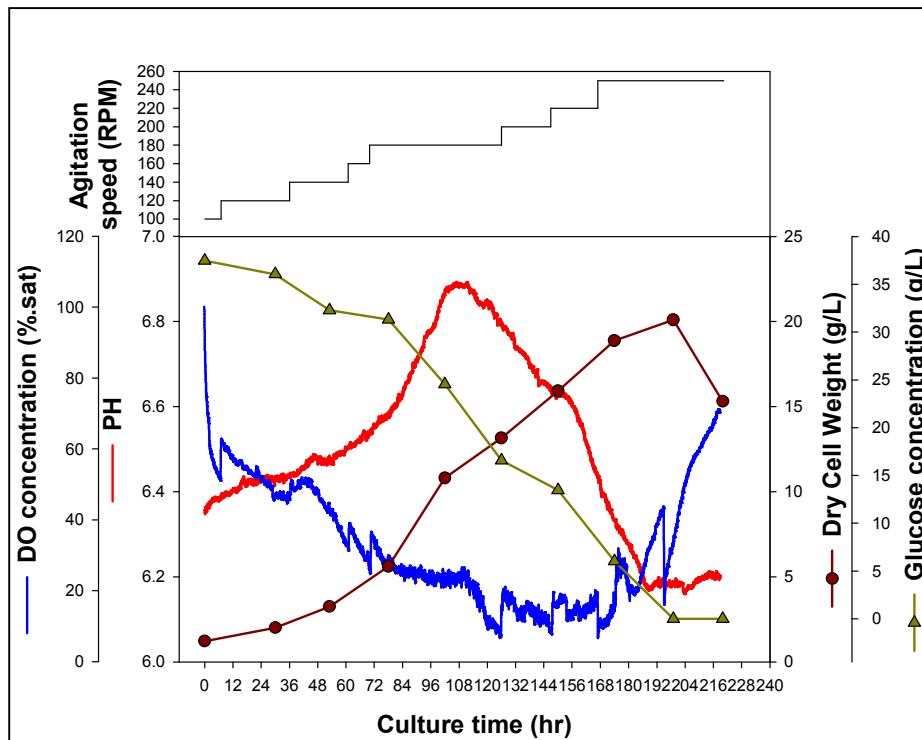


Figure 2-75. Comparison of pH and DCW (5 l bioreactor cultures of IPS-1, IPS-2 and IPS-3 were carried out respectively for the production of IPS.)



Time	$\mu(1/hr)$
15	0.01727
41.5	0.0195
65.5	0.0191
90	0.02127
114	0.00215
138	0.01519
162	0.00956
186.5	-0.0006
209.5	-0.0021

Figure 2-76. Fermentation results for the production of IPS in 5 l bioreactor culture (Only glucose was used as a carbon source with no addition of oils.) (The slope of the linear line in graph below is the specific cell growth rate.)



Time	$\mu(1/hr)$
15	0.01631
41.5	0.0205
65.5	0.02131
90	0.02639
114	0.00817
138	0.00791
162	0.00707
186.5	0.00251
209.5	-0.0129

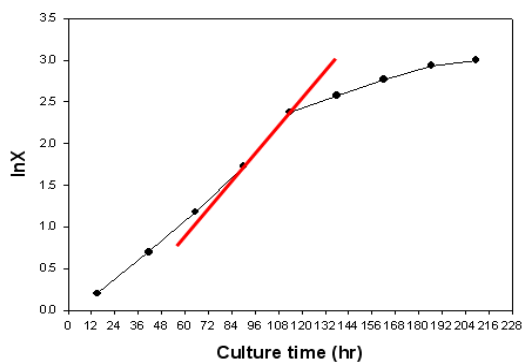
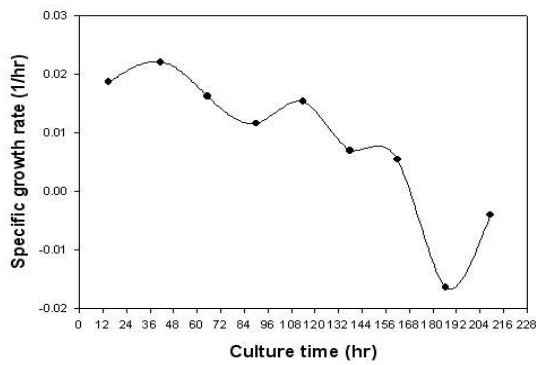
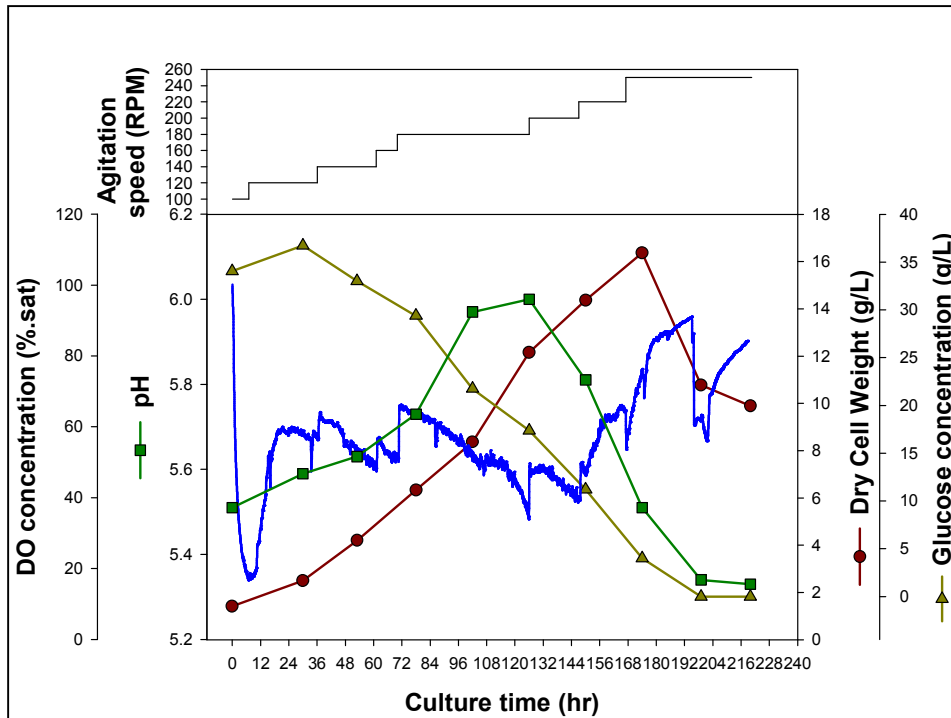


Figure 2–77. Fermentation results for the production of IPS in 5 l bioreactor culture (Both wheat germ oil and glucose were used as carbon sources.) (The slope of the linear line in graph below is the specific cell growth rate.)



Time	$\mu(1/hr)$
15	0.01858
41.5	0.02206
65.5	0.01618
90	0.01156
114	0.01538
138	0.00694
162	0.00542
186.5	-0.0165
209.5	-0.0041

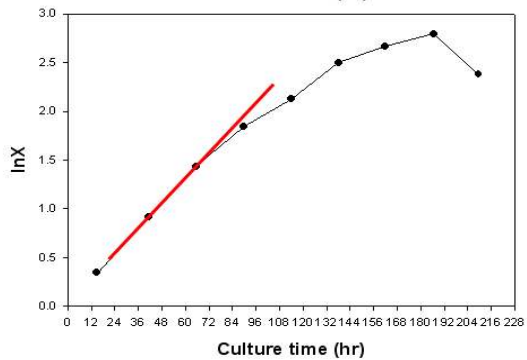


Figure 2-78. Fermentation results for the production of IPS in 5 l bioreactor culture (Both lard oil and glucose were used as carbon sources.) (The slope of the linear line in graph below is the specific cell growth rate.)

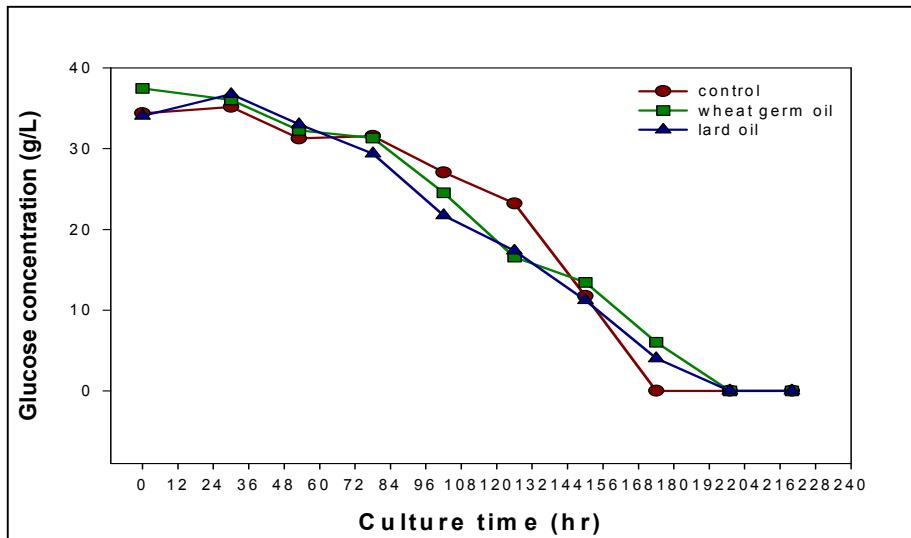
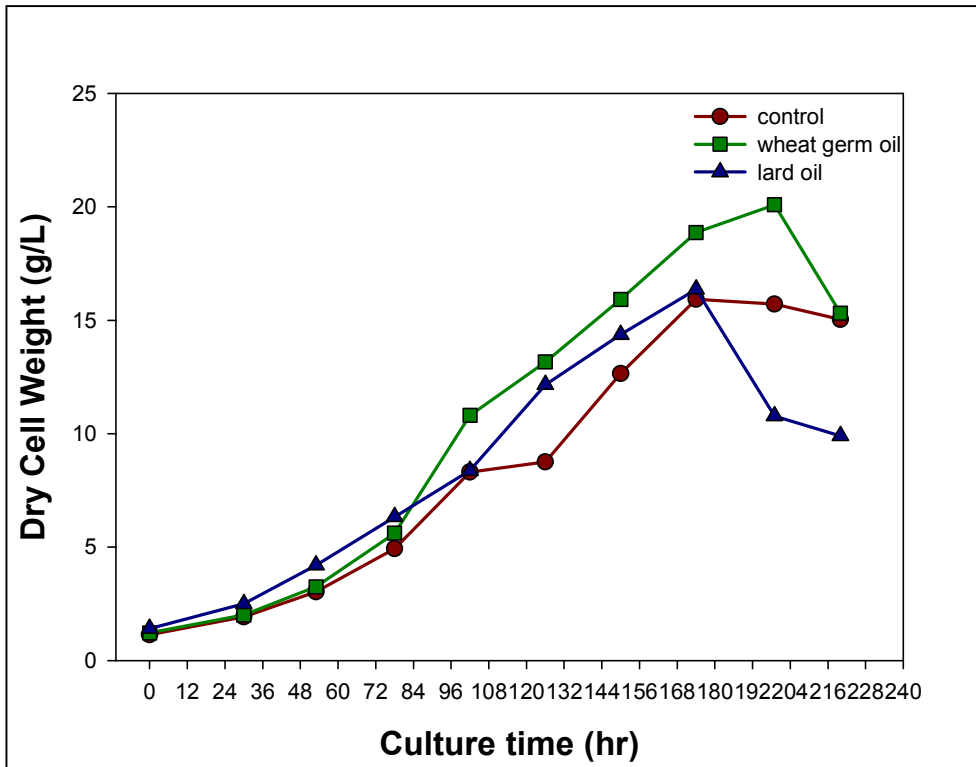


Figure 2-79. Comparison of DCW and glucose consumption (Production media with glucose only, glucose plus wheat germ oil, and glucose plus lard oil as carbon source(s) were used respectively in each 5 l bioreactor culture.)

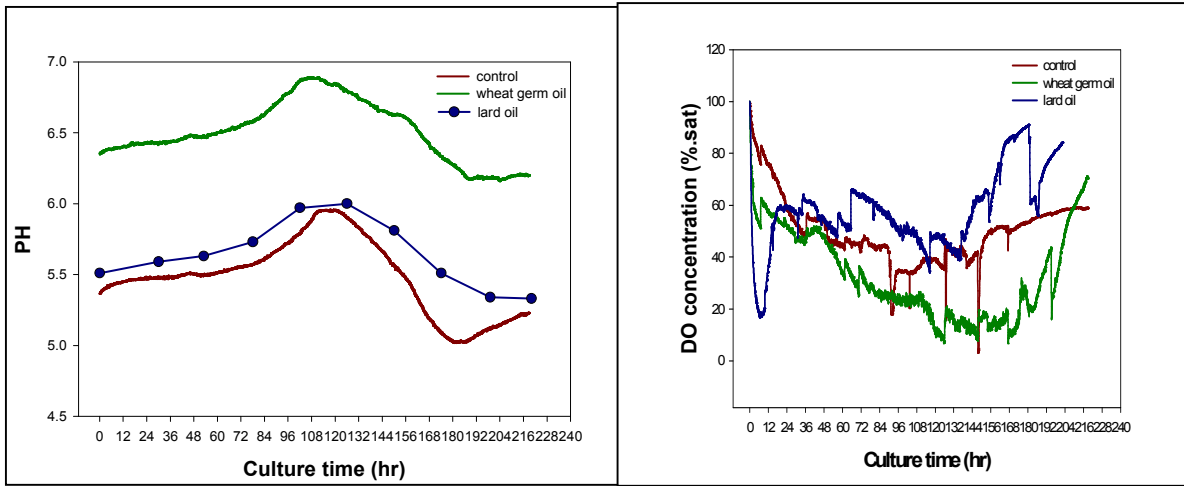


Figure 2–80. Comparison of pH and DO (Production media with glucose only, glucose plus wheat germ oil, and glucose plus lard oil as carbon source(s) were used respectively in each 5 l bioreactor culture.)

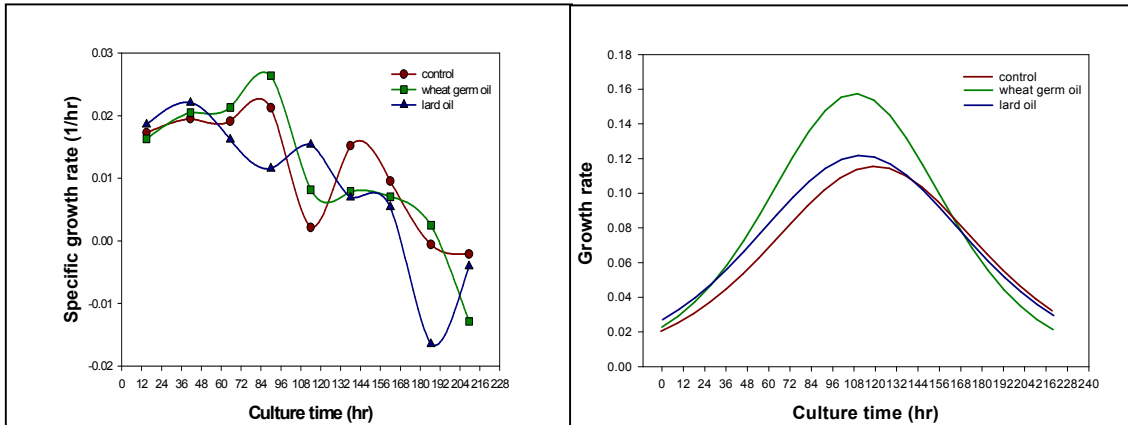


Figure 2–81. Comparison of specific and volumetric growth rate (Production media with glucose only, glucose plus wheat germ oil, and glucose plus lard oil as carbon source(s) were used respectively in each 5 l bioreactor culture.)

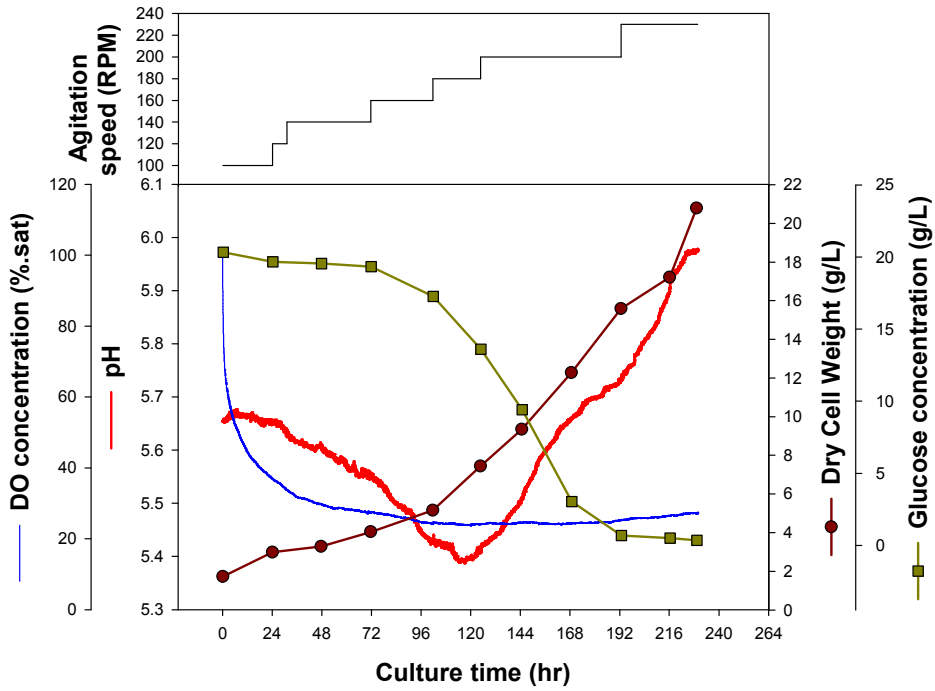


Figure 2-82. Fermentation results for the production of IPS in 5 l bioreactor culture (Optimum production medium with the compositions of FFD run number #21 was used.)

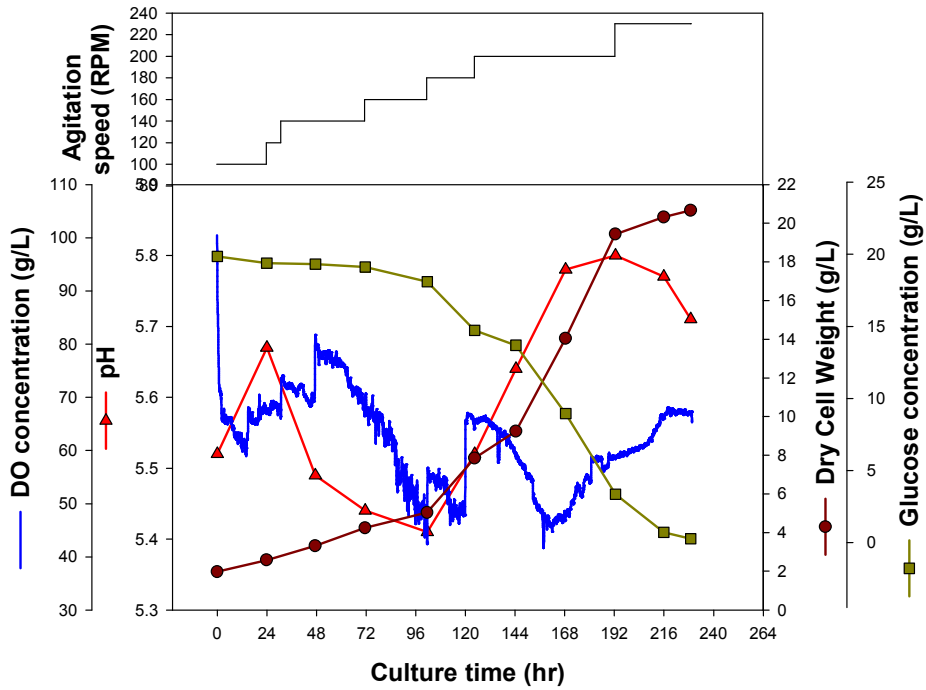


Figure 2-83. Fermentation results for the production of IPS in 5 l bioreactor culture (Optimum production medium with the compositions of FFD run number #33 was used.)

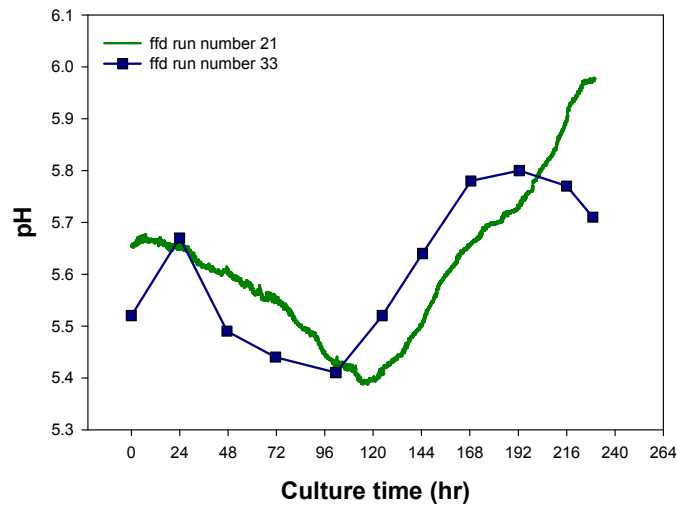
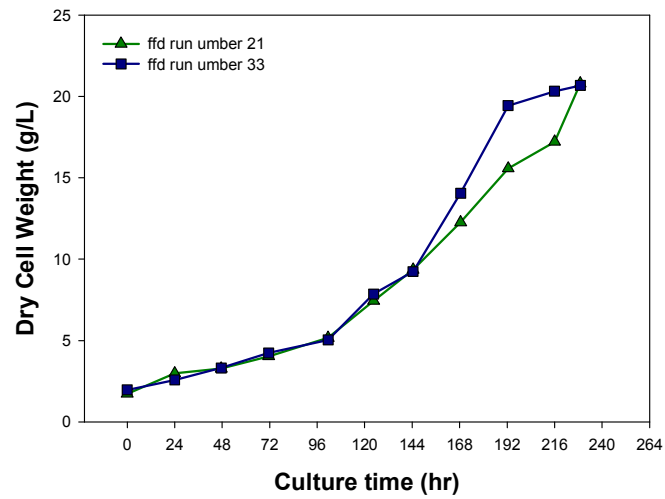


Figure 2–84. Comparison of DCW and pH (Optimum production media with the compositions of FFD run number #21 and #31 were used respectively in each 5 l bioreactor culture.)

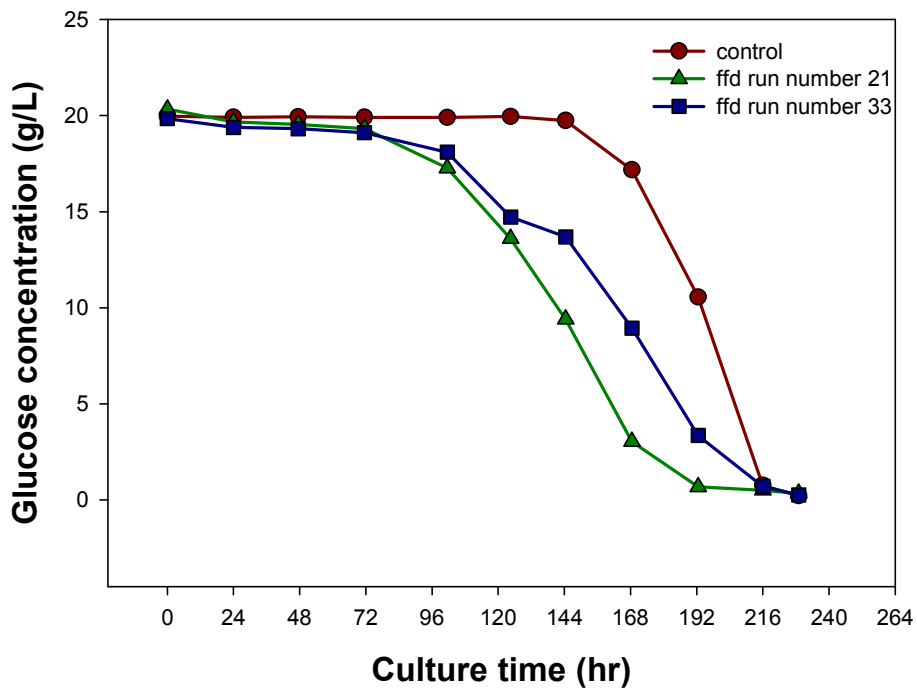


Figure 2-85. Comparison of glucose consumption (Optimum production media with the compositions of FFD run number #21 and #31 were used respectively in each 5 l bioreactor culture.)

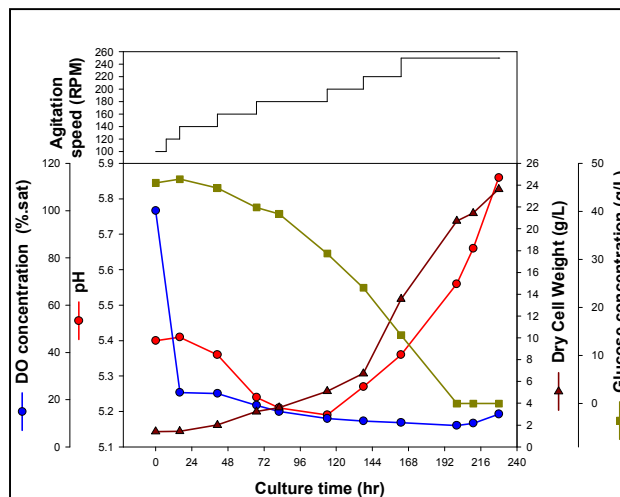


Figure 2-86. Fermentation results for the production of IPS in 5 l bioreactor culture performed with 10% (v/v) inoculum into the production fermentor (Both oleic acid and glucose were used as carbon sources.)

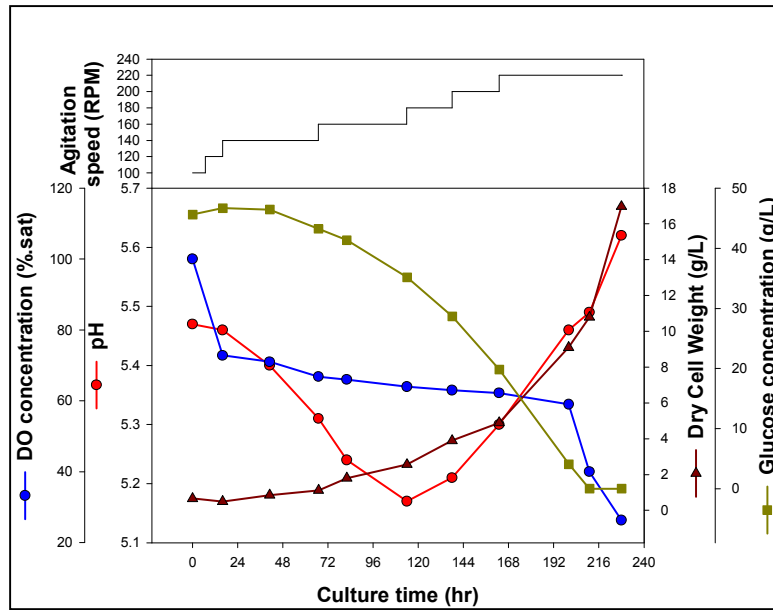
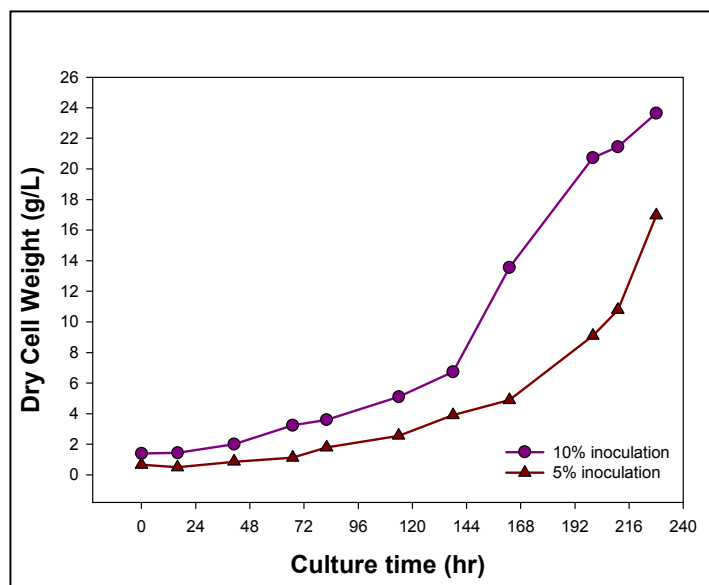


Figure 2-87. Fermentation results for the production of IPS in 5 l bioreactor culture performed with 5% (v/v) inoculum into the production fermentor (Both oleic acid and glucose were used as carbon sources.)

(A)



(B)

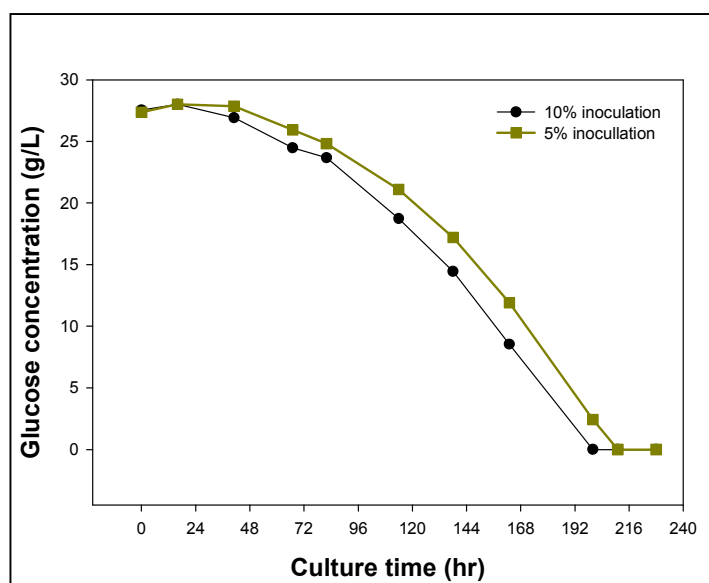


Figure 2-88. Comparison of (A) DCW and (B) glucose consumption when 10% and 5% (v/v) inoculum into the production fermentor were used respectively in each 5 l bioreactor culture. (Both oleic acid and glucose were used as carbon sources.)

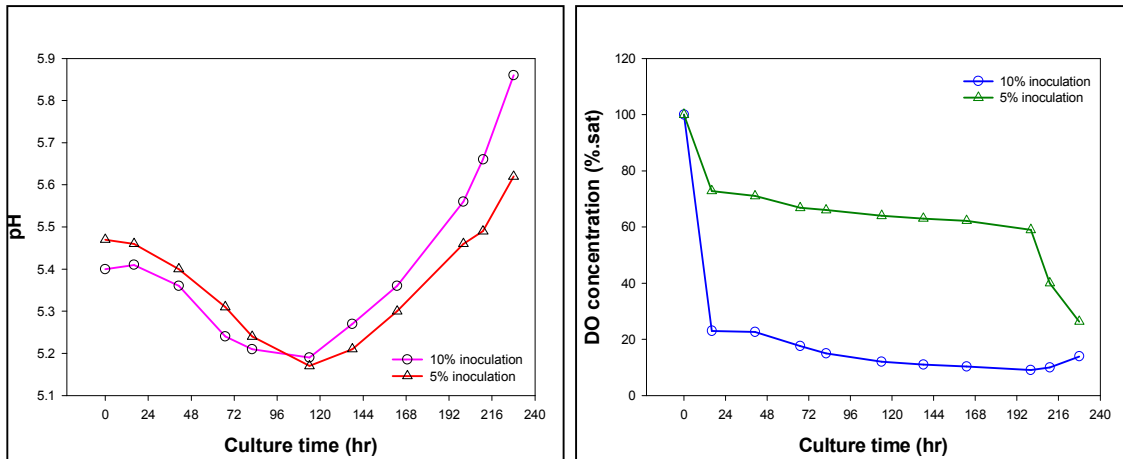


Figure 2-89. Comparison of pH and DO when 10% and 5% (v/v) inoculum into the production fermentor were used respectively in each 5 l bioreactor culture. (Both oleic acid and glucose were used as carbon sources.)

Morphology

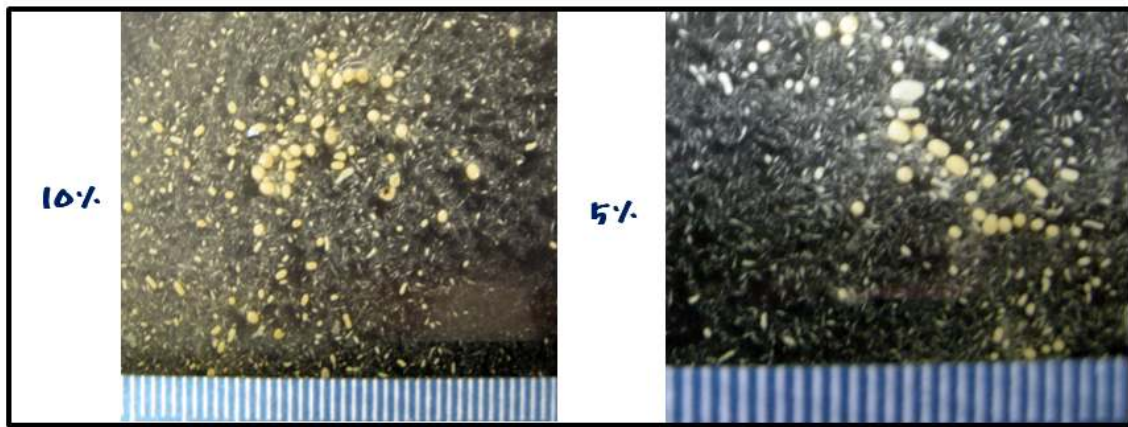


Figure 2-90. Comparison of morphology of the producing microorganism when 10% and 5% (v/v) inoculum into the production fermentor were used respectively in each 5 l bioreactor culture. (Both oleic acid and glucose were used as carbon sources.)

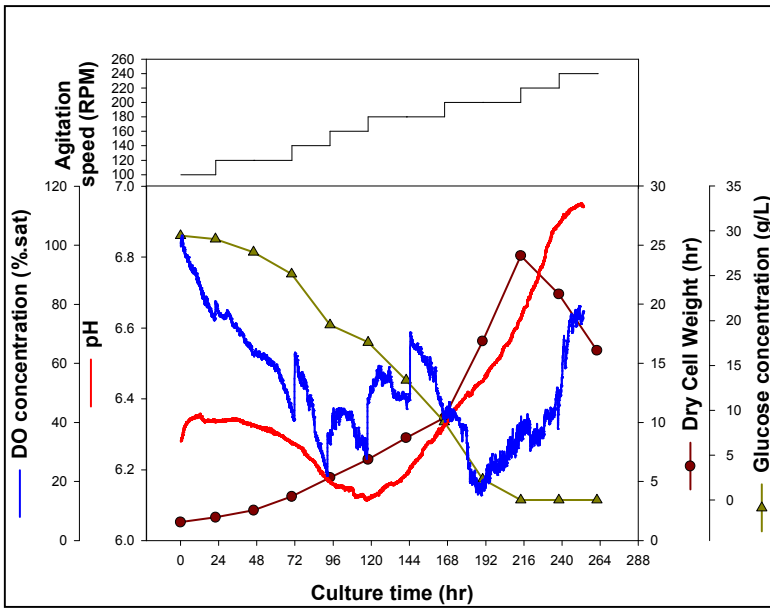


Figure 2-91. Time-course profiles of fermentation parameters in the 75 l bioreactor culture (45 l working volume) for the production of IPS (Optimum production medium with both oleic acid and glucose as carbon sources were used.) (Growth culture was performed in 5 l bioreactor with the growth medium containing brown rice only as a carbon source.)

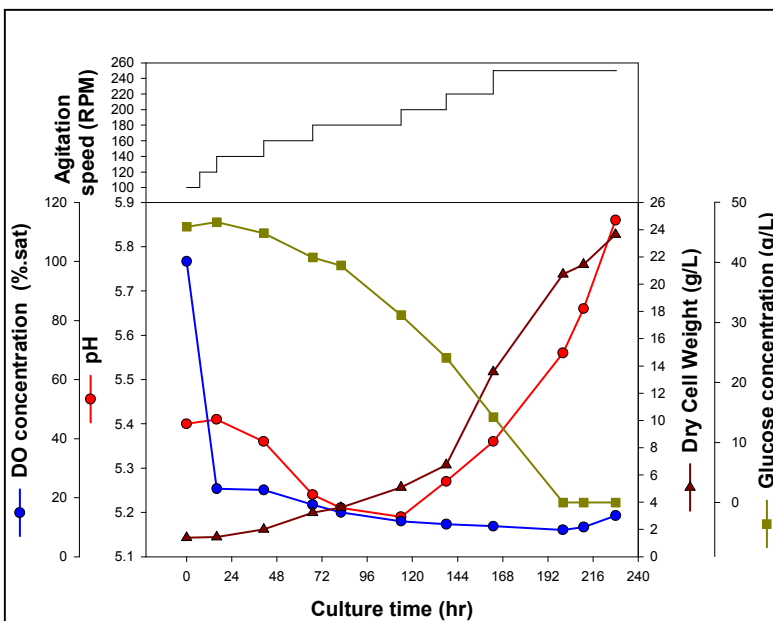
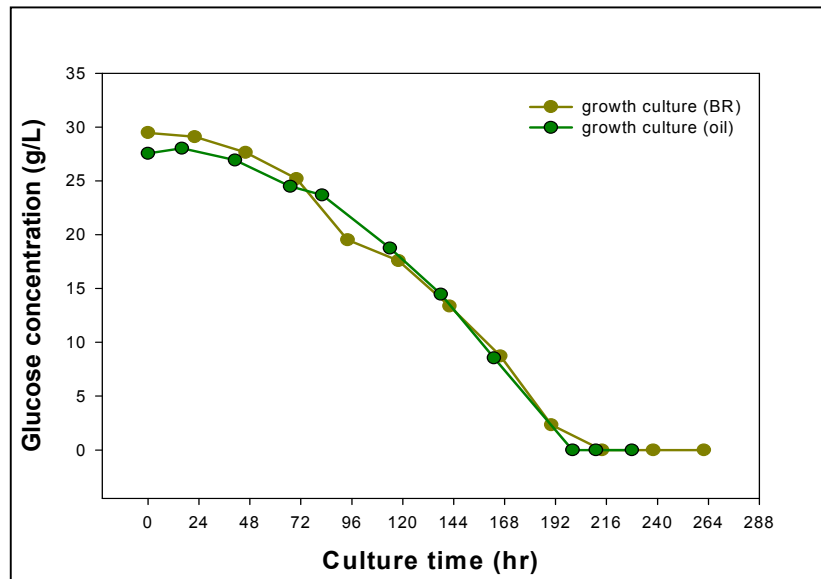


Figure 2-92. Time-course profiles of fermentation parameters in the 75 l bioreactor culture (45 l working volume) for the production of IPS (Optimum production medium with both oleic acid and glucose as carbon sources were used.) (Growth culture was performed in 5 l bioreactor with the growth medium containing both oleic acid and glucose as carbon sources.)

(A)



(B)

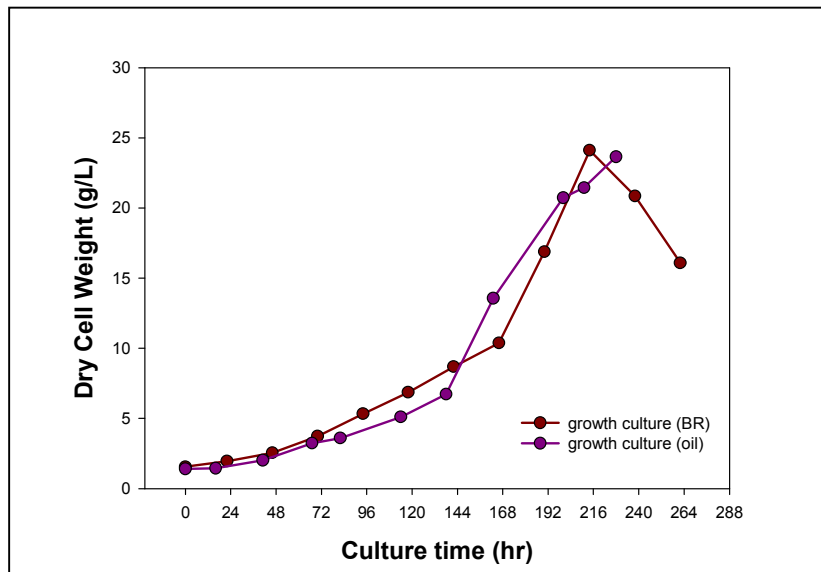


Figure 2-93. Comparison of (A) DCW and (B) glucose consumption in the 75 l bioreactor culture (45 l working volume) for the production of IPS when different growth media were used respectively in each 5 l bioreactor growth culture (brown rice vs. oleic acid plus glucose as carbon source(s))

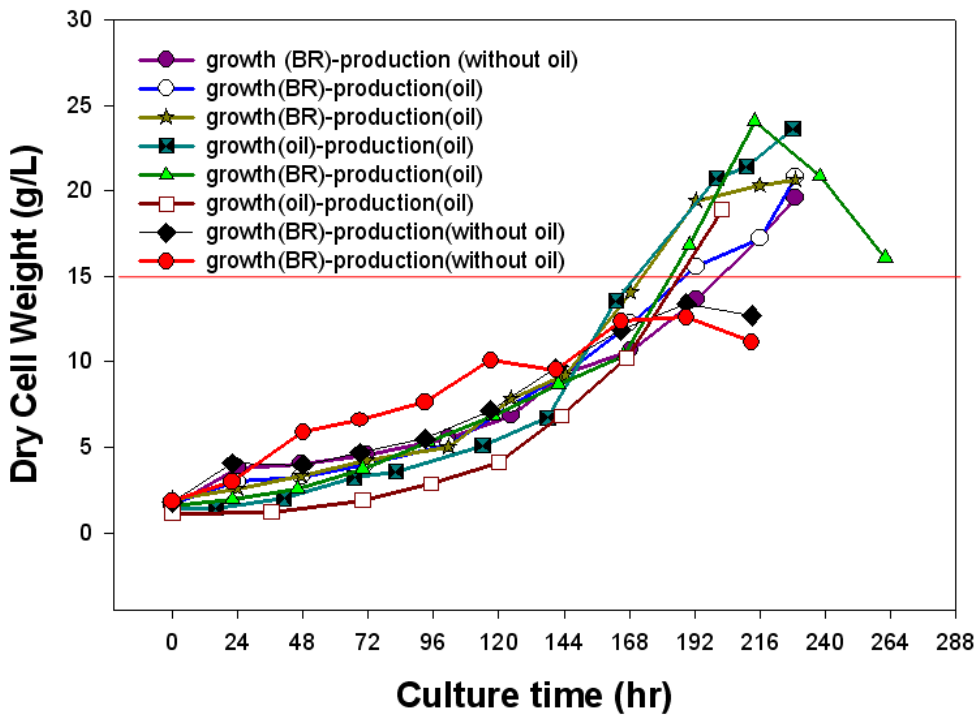


Figure 2-94. Comparison of the IPS production (Various IPS production media with and without supplementation of oils were used in each 5 l and 70 l bioreactor cultures, together with different growth media with brown rice or oil(s) as carbon source(s))

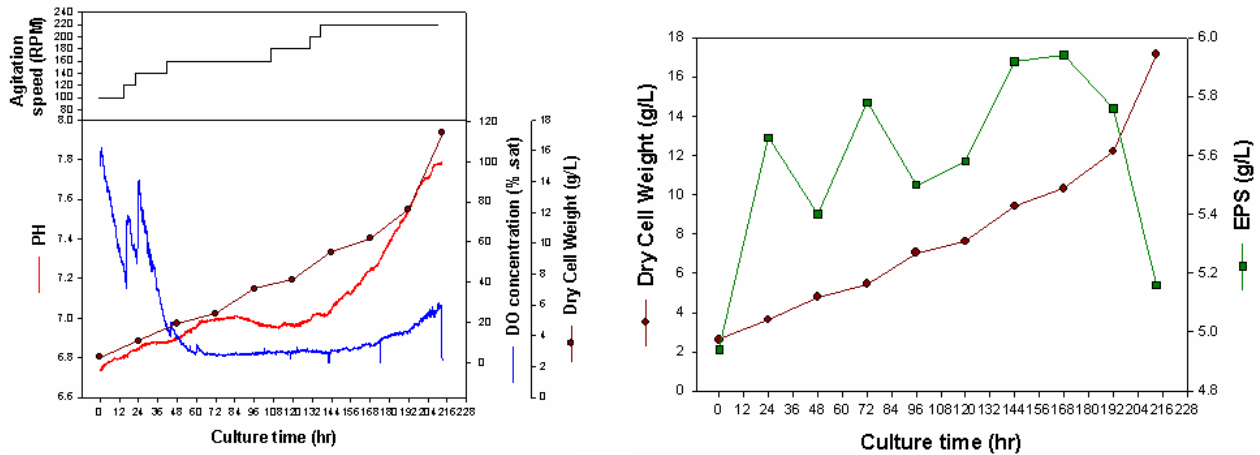
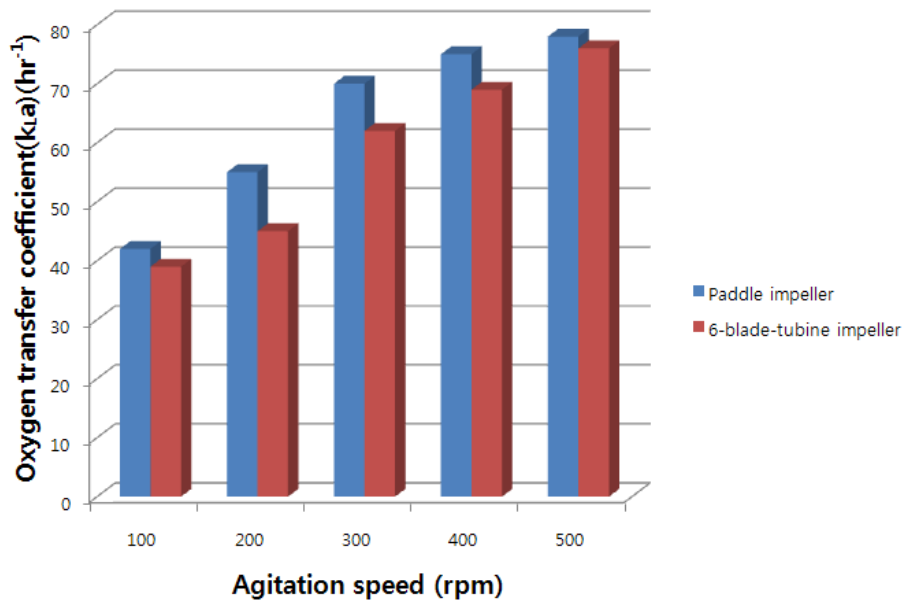


Figure 2-95. Time-course profiles of fermentation parameters in 5 l bioreactor (3 l working volume) cultures of *I. obliquus* mycelia (It should be noted that DO concentration was rapidly reduced to almost zero around day 2, causing significant DO-limited cultivation conditions.)

(A)



(B)

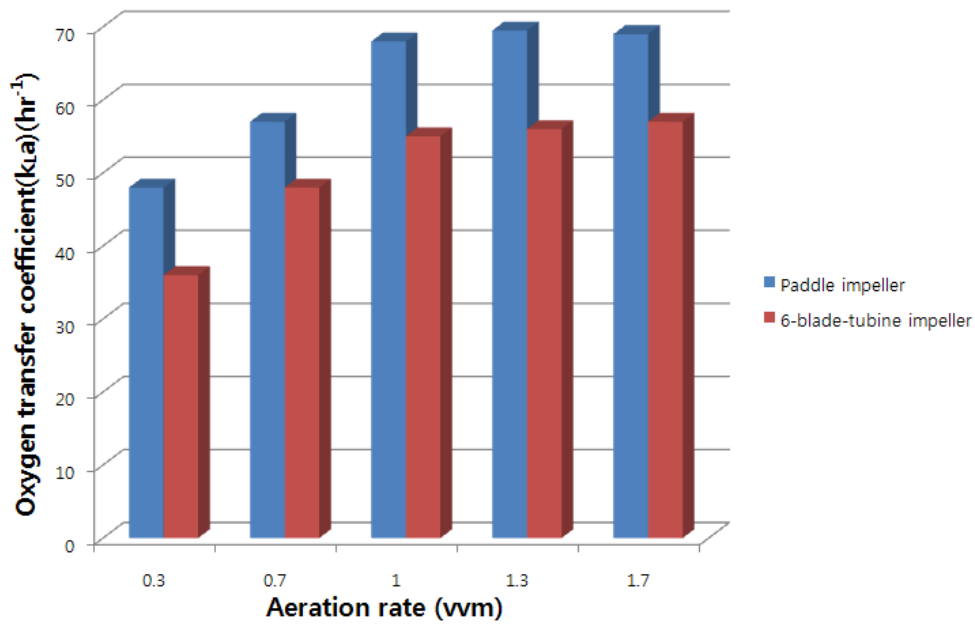


Figure 2–96. Comparison of oxygen transfer coefficient($k_L a$) as a function of (A) agitation speed and (B) aeration rate between 6–flat–blade disc turbine impeller and paddle impeller

Culture condition

Culture time : 9day
Culture volume : 3.5L
Agitation speed : 100~250RPM
Temperature : 28°C

production medium

Glucose	25g/L
Oleic acid	32g/L
Casein enzymatic hydrolysate	8g/L
Soytone peptone	9g/L
KH_2PO_4	6g/L
MgSO_4	3g/L

A



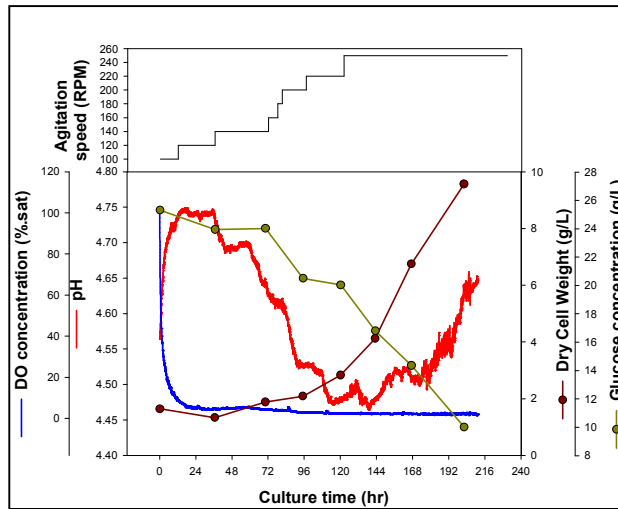
B



Figure 2-97. Cultivation conditions, IPS production medium composition and two types of impellers used in each 5L bioreactor for the production of IPS

(A) : 6-blade-turbine impeller

(B) : 4-blade paddle impeller



A



Figure 2-98. Time-course profiles of fermentation parameters for the production of IPS in the 5 l fermentor equipped with 6-blade-turbine impeller (Optimum production medium with both oleic acid and glucose as carbon sources were used.)

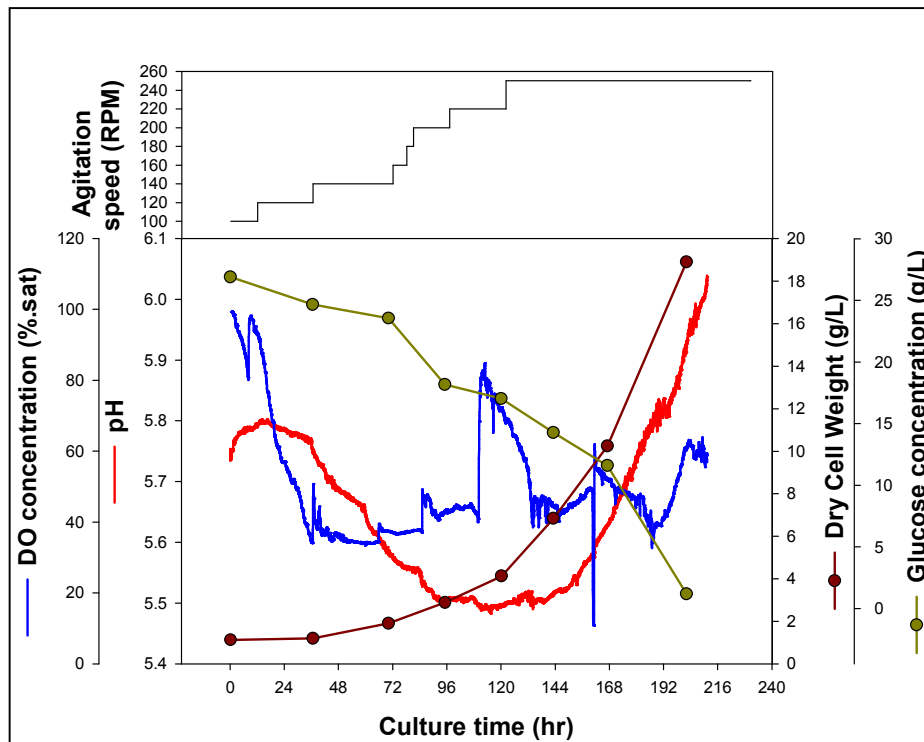


Figure 2-99. Time-course profiles of fermentation parameters for the production of IPS in the 5 l fermentor equipped with 4-blade-paddle impeller (Optimum production medium with both oleic acid and glucose as carbon sources were used.)

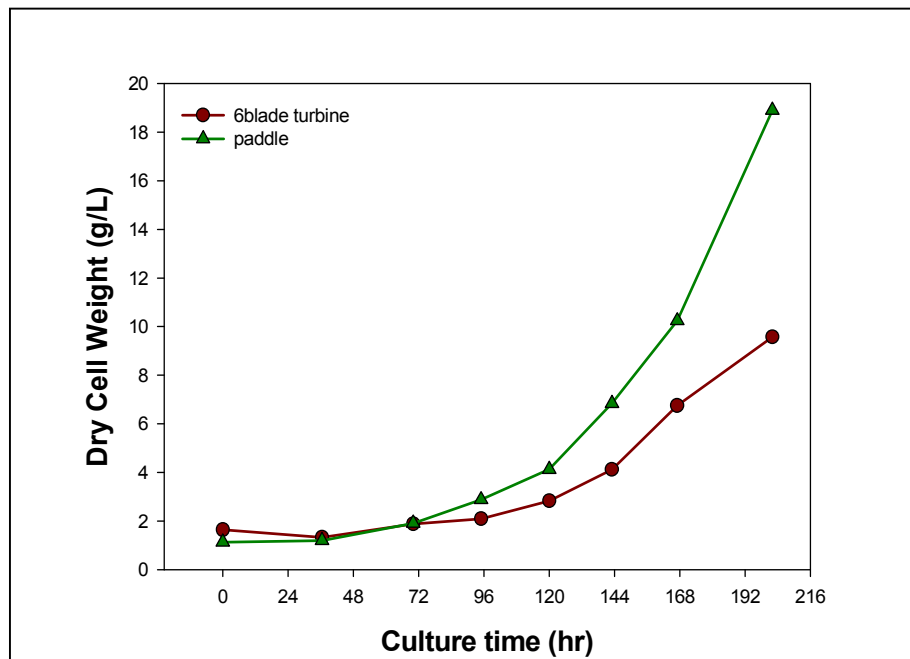
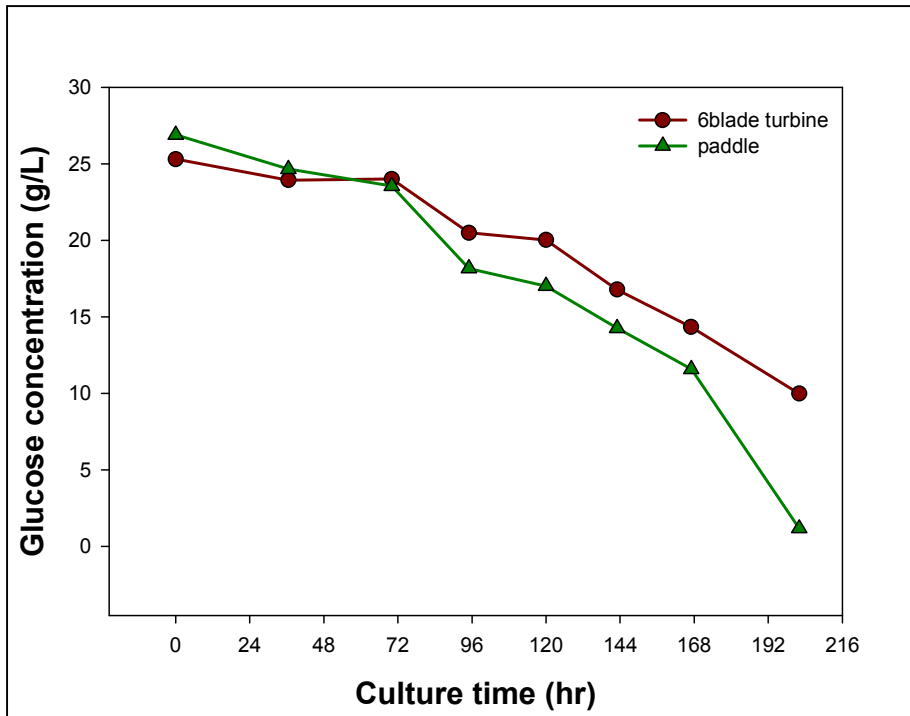


Figure 2-100. Comparison of glucose consumption and DCW in the 5 l bioreactor equipped with 6-blade-turbine impeller and 4-blade-paddle impeller respectively (Optimum production medium with both oleic acid and glucose as carbon sources were used.)

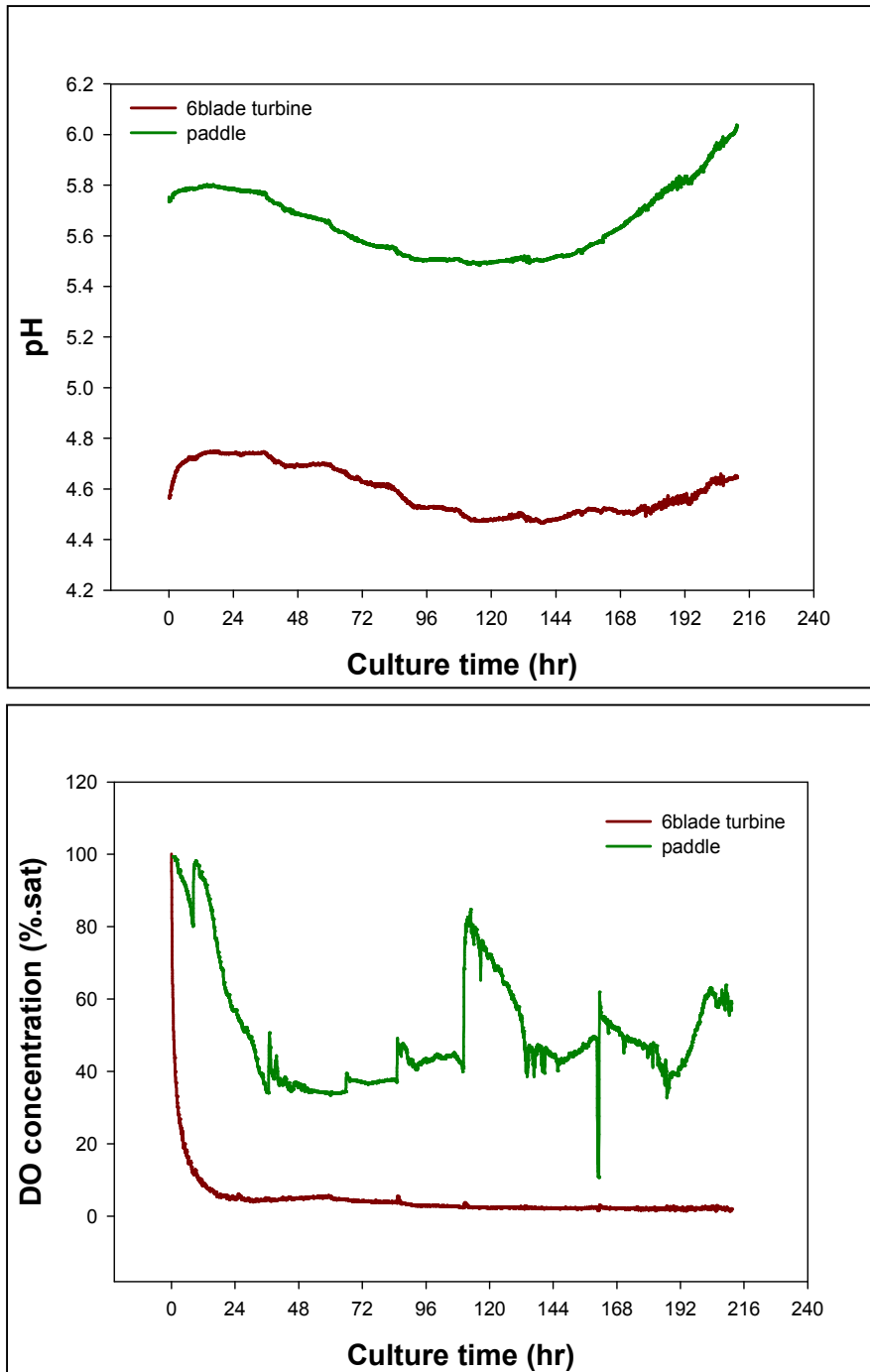


Figure 2-101. Comparison of pH and DO in the 5 l bioreactor equipped with 6-blade-turbine impeller and 4-blade-paddle impeller respectively (Optimum production medium with both oleic acid and glucose as carbon sources were used.)

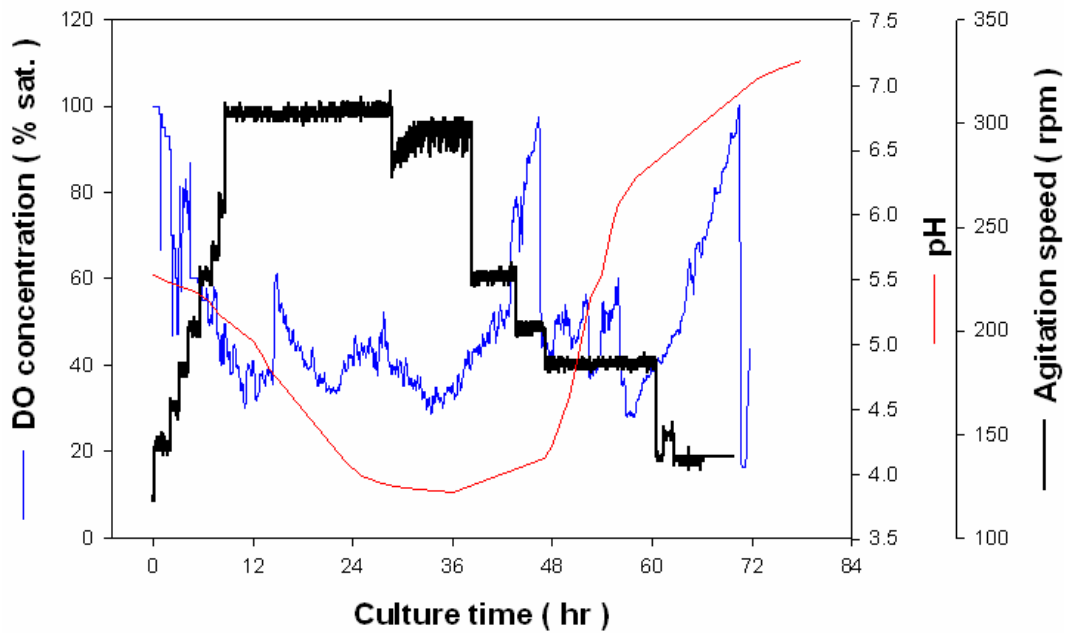


Figure 2-102. Time-course profiles of DO, pH and agitation speed in the 1st bioreactor culture for cell growth ("process F" for the shake-flask seed culture)

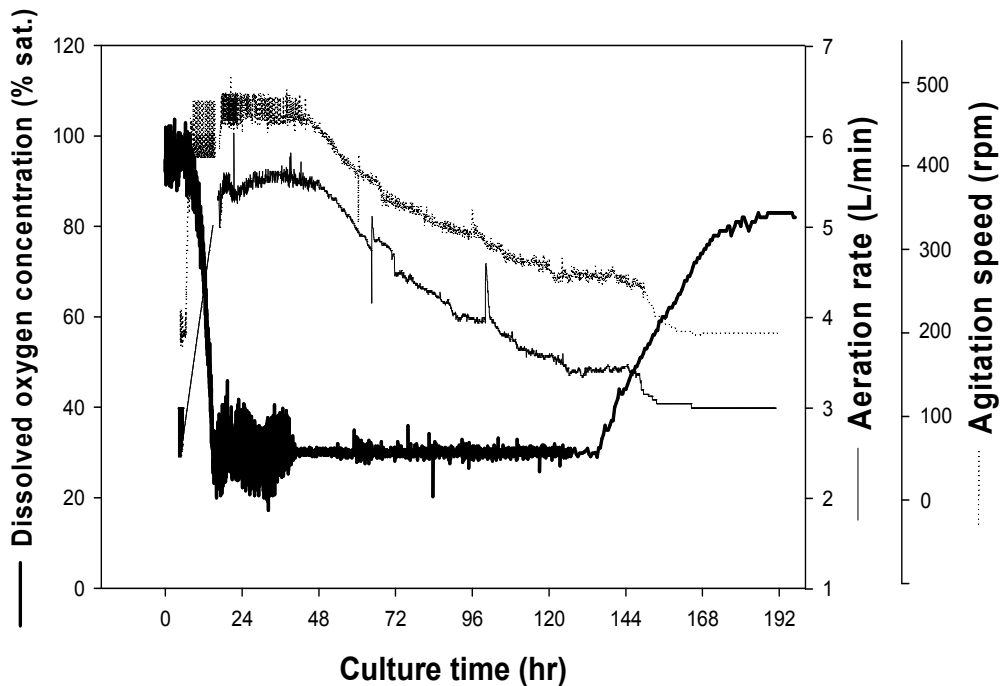


Figure 2-103. Time-course profiles of DO, aeration rate, and agitation speed in growth cultures performed with a mixed DO control method (DO was controlled at 30% of saturated DO concentration)

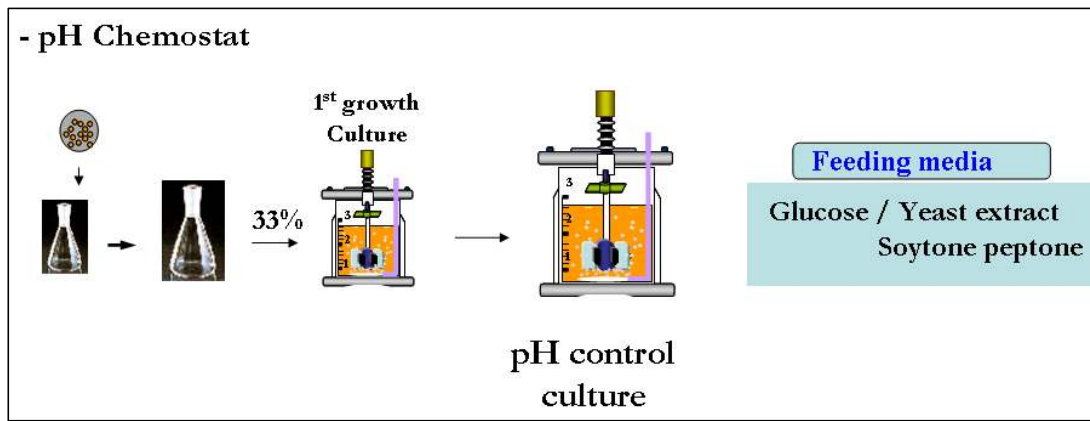


Figure 2-104. Schematic diagram for the pH-stat fed-batch culture using carbon source as an acid and nitrogen source as a base for the automatic pH-control

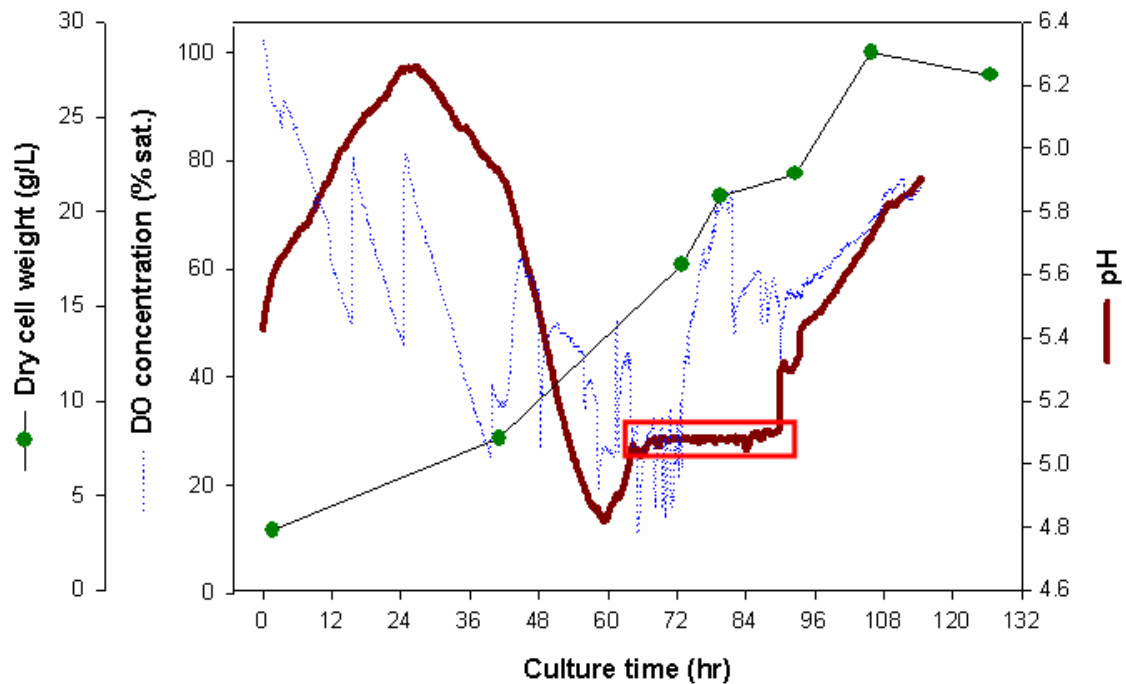


Figure 2-105. Time-course profiles of fermentation parameters in the pH-stat fed-batch culture

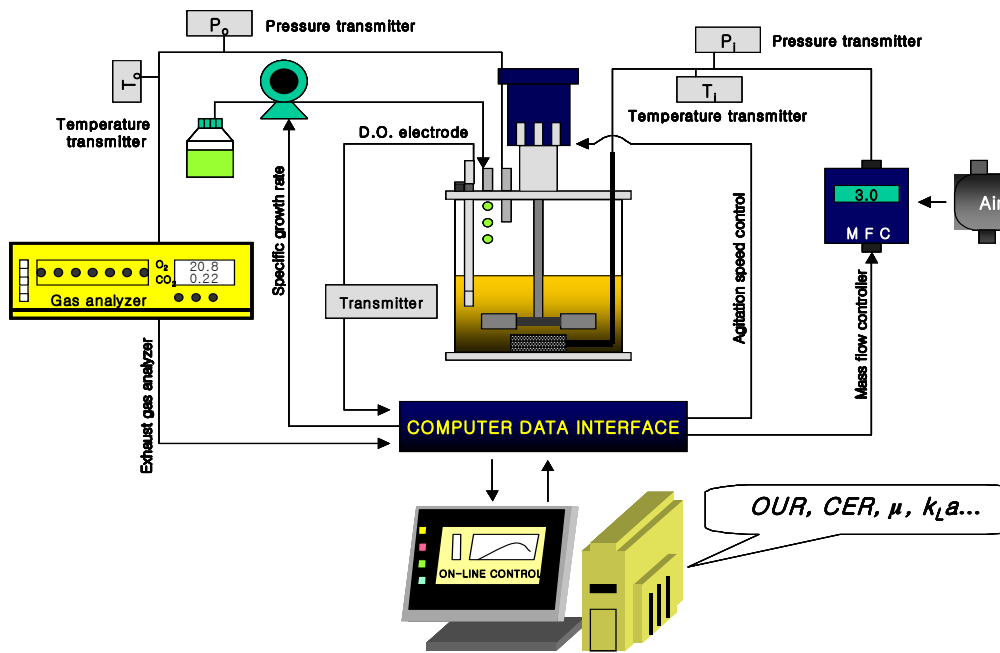


Figure 2-106. Schematic diagram for data acquisition and parameter analysis system.

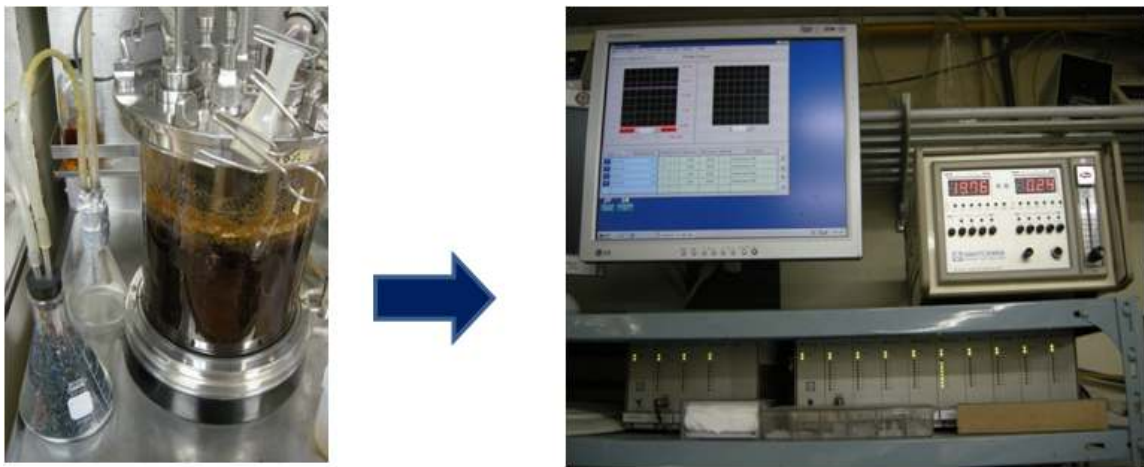


Figure 2-107. Photographs for the gas analyzer and on-line data acquisition system used for the computer-controlled fermentation bioprocess

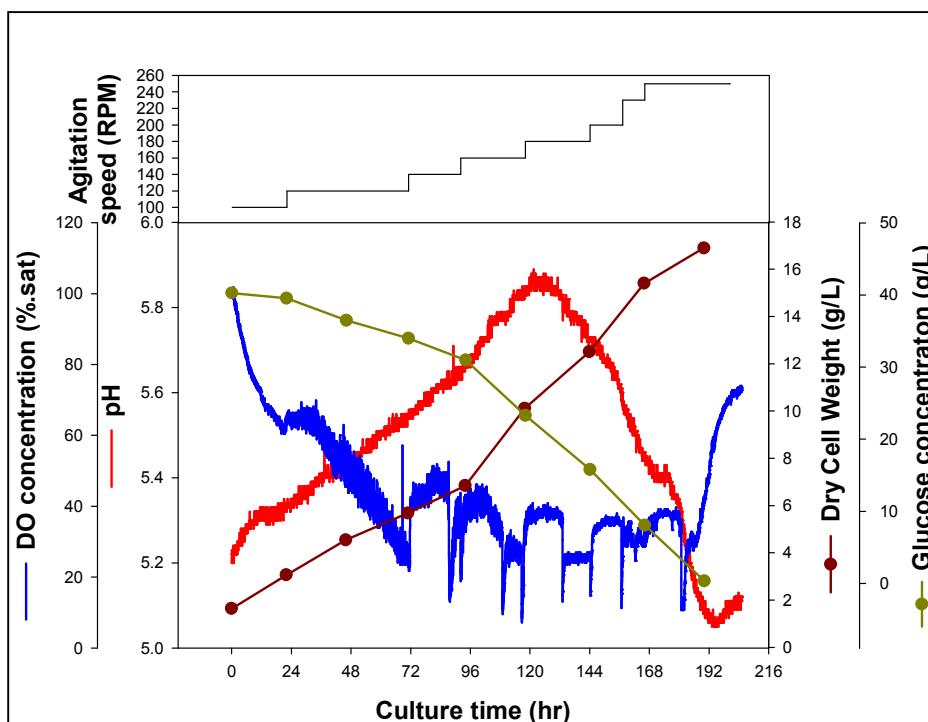


Figure 2-108. Time-course profiles of fermentation parameters for the production of IPS in the 5 l fermentor equipped with the gas analyzer for on-line monitoring and data acquisition during the fermentation period

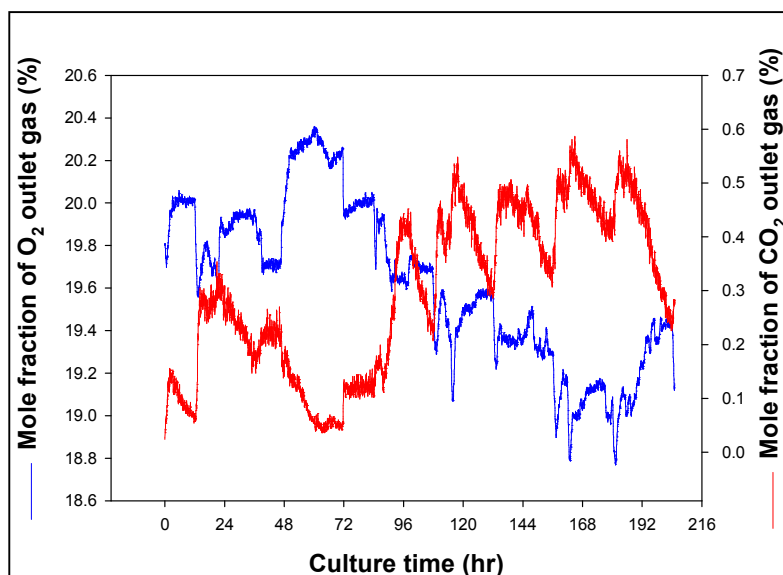


Figure 2-109. Time-course profiles of mole fraction of oxygen and carbon dioxide in the 5 l fermentor equipped with the gas analyzer for the production of IPS

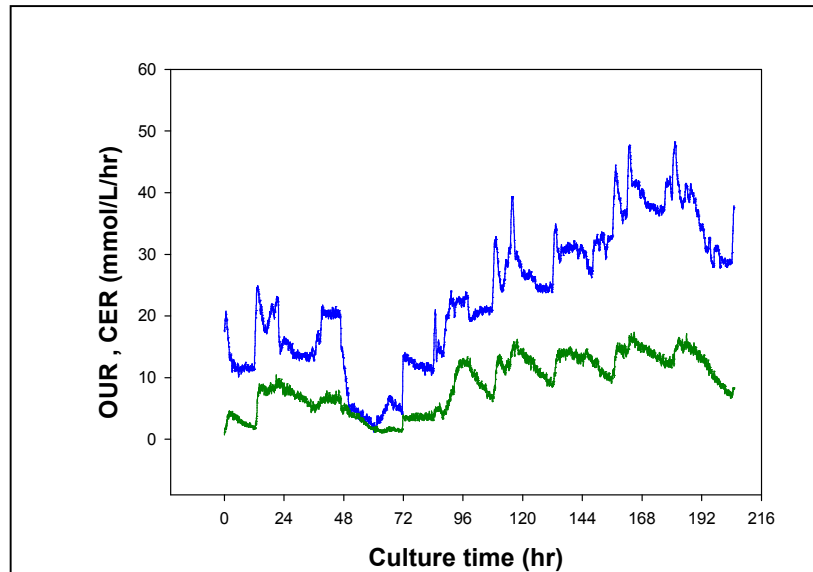


Figure 2-110. Time-course profiles of OUR and CER in the 5 l fermentor equipped with the gas analyzer for the production of IPS

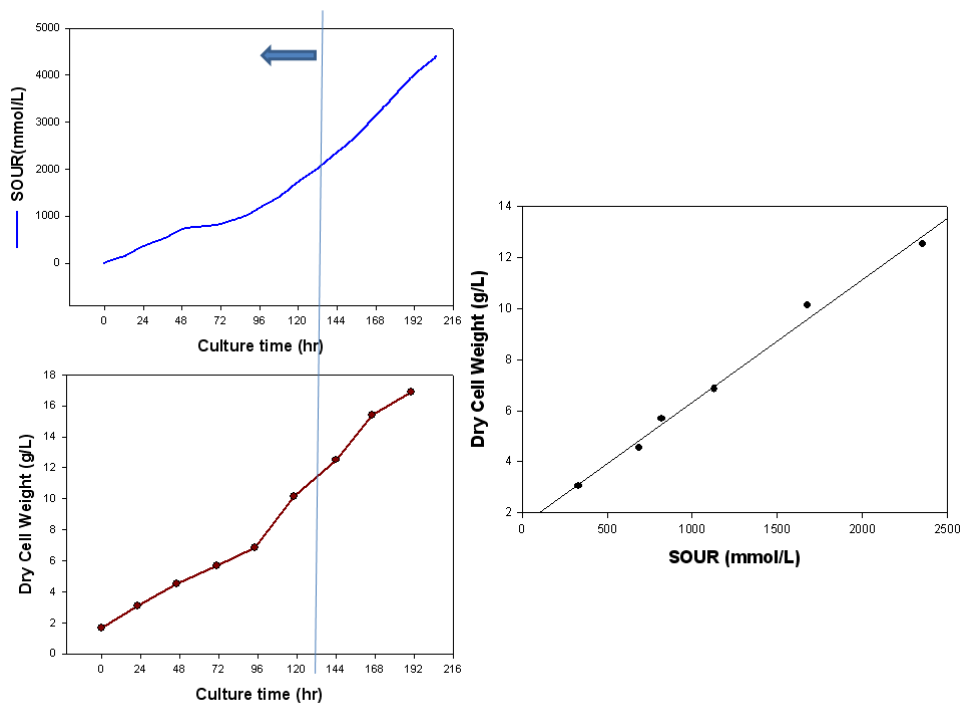


Figure 2-111. Time-course profiles of SOUR (left) in the 5 l fermentor equipped with the gas analyzer for the production of IPS, and the linear relationship between SOUR and DCW from the fermentation broth (right)

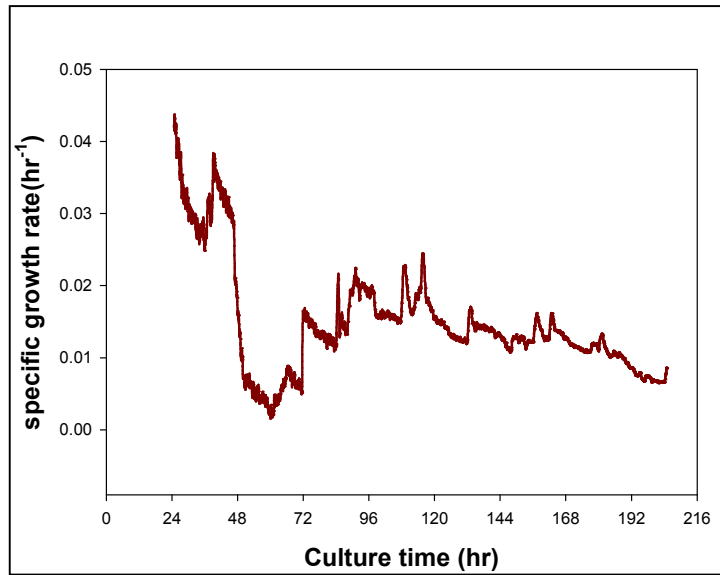


Figure 2-112. Time-course profiles of specific growth rate in the 5 l fermentor equipped with the gas analyzer for the production of IPS

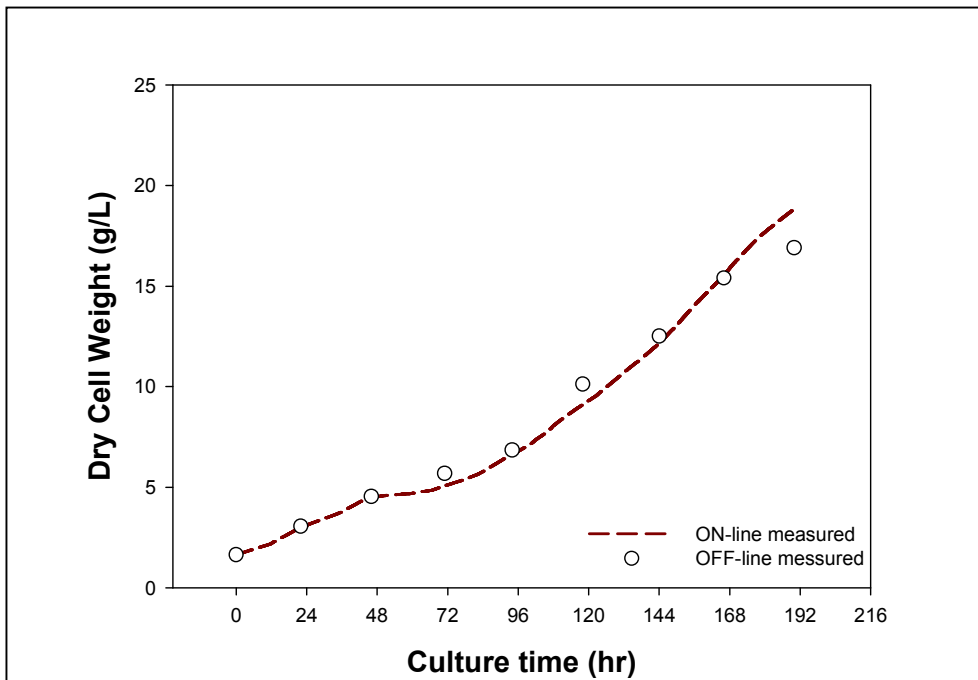


Figure 2-113. Comparison of the cell concentrations obtained from the fermentation broth, and estimated on the basis of the oxygen yield ($Y_{X/O}$)

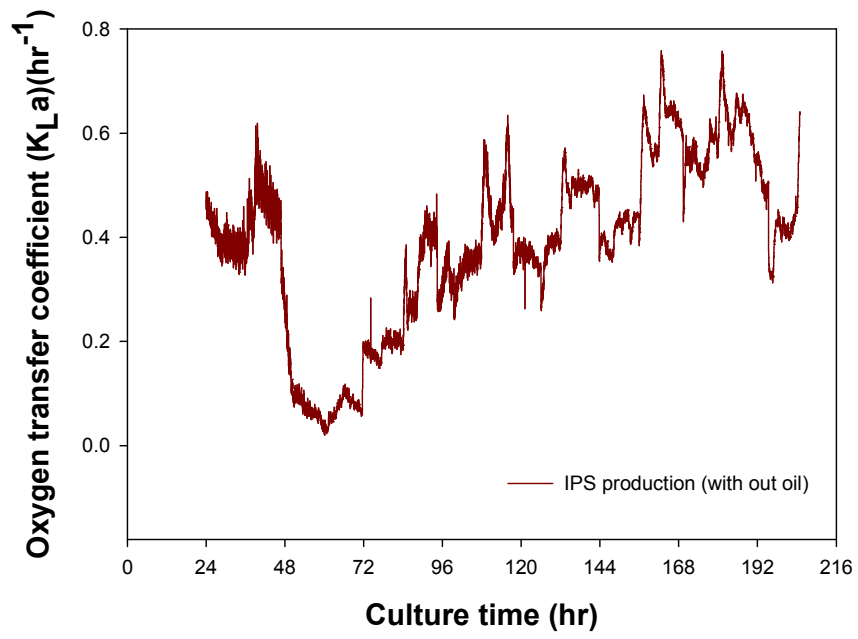
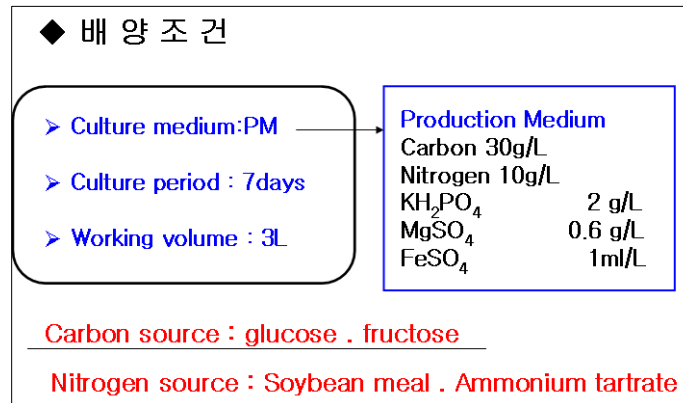


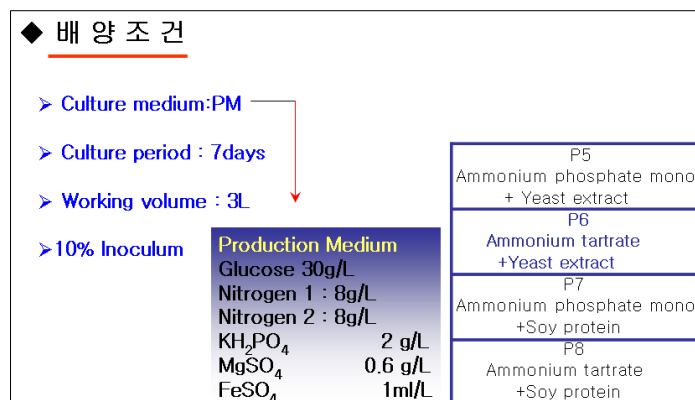
Figure 2-114. Time-course profiles of Oxygen transfer coefficient ($k_L a$) in the 5 l fermentor equipped with the gas analyzer for the production of IPS in IPS production

Table 2-1. Various kinds of production media prepared by combining carbon sources(glucose and fructose) with nitrogen sources(soybean meal and ammonium tartrate) (P1, P2, P3 and P4 media for production cultures with the final production bioreactor)



Production medium for final production fermenter	combination of C-source and N-source
P1 production medium	glucose + soybean meal
P2 production medium	glucose + ammonium tartrate
P3 production medium	fructose + soybean meal
P4 production medium	fructose + ammonium tartrate

Table 2-2. Various kinds of production media prepared by combining 2 nitrogen sources out of 3(ammonium monophosphate, ammonium tartrate and yeast extract) with glucose as a carbon source (P5, P6, P7 and P8 media for production cultures with the final production bioreactor)



Production medium for final production fermenter	combination of C-source and N-source
P5 production medium	glucose + ammonium monophosphate + yeast extract
P6 production medium	glucose + ammonium tartrate + yeast extract
P7 production medium	glucose + ammonium monophosphate + soy protein
P8 production medium	glucose + ammonium tartrate + soy protein

Table 2-3. Comparison of maximum DCW and maximum specific growth rate in the final production bioreactor cultures performed with P5, P6, P7, and P8 production media

	Initial Exponential time (hr)	Final Dry Cell Weight (g/L)	Maximum Specific growth rate (1/hr)
P5	72	17.9550	0.022
P6	72	17.5000	0.014
P7	72	21.4500	0.016
P8	72	21.1400	0.012

Table 2-4. Levels of each medium component for the 2-factor full factorial design(FFD) design in the 5L bioreactor cultures

<u>LOW : 4 g/L HIGH : 12 g/L</u>										
	-1	0	1	Std	Run	Block	Factor 1 A: Ammonium tartrate g/L	Factor 2 B: Yeast extract g/L	Response 1 D.C.W g/L	Response 2 E.P.S g/L
Ammonium tartrate	4	8	12	1	1	Block 1	4.00	4.00		
				2	2	Block 1	12.00	4.00		
Yeast extract	4	8	12	3	3	Block 1	4.00	12.00		
				4	4	Block 1	12.00	12.00		

Table 2-5. The concentrations of ammonium tartrate and yeast extract contained in each production medium(P6-5, P6-6, P6-7 and P6-8) in 5 l bioreactor cultures

	P6-5	P6-6	P6-7	P6-8
Ammonium tartrate	8 g/L	8 g/L	8 g/L	8 g/L
Yeast extract	4 g/L	4 g/L	4 g/L	4 g/L

Table 2-6. Cultivation conditions for the bioreactor growth cultures

◆ 배양 조건

- Culture medium: GM → **Growth Medium**
- Culture period : 4days
- Working volume : 3L
- Inoculum : 1L

Glucose	30g/L
Brown rice	10g/L
Yeast extract	8g/L
Soytone peptone	4g/L
KH ₂ PO ₄	2 g/L
MgSO ₄	0.6 g/L
FeSO ₄	1ml/L

Table 2-7. Cultivation conditions for the bioreactor production cultures

◆ 배양 조건

- Culture medium: PM →
- Culture period : 10days
- Working volume : 3L
- 10% Inoculum

Production Medium	
Glucose	30g/L
Nitrogen 1	
Nitrogen 2	
KH ₂ PO ₄	2 g/L
MgSO ₄	0.6 g/L
FeSO ₄	1ml/L

Table 2-8. The concentrations of ammonium tartrate and yeast extract contained in each production medium(P6-9, P6-10, P6-11 and P6-12) in bioreactor cultures

	P6-9	P6-10	P6-11	P6-12
Ammonium tartrate	8 g/L	6 g/L	4 g/L	2 g/L
Yeast extract	8 g/L	8 g/L	8 g/L	8 g/L

Table 2-9. Cultivation conditions for the bioreactor growth cultures

◆ 배양 조건

- Culture medium: GM →
- Culture period : 4days
- Working volume : 3L
- Inoculum : 1L

Growth Medium	
Glucose	30g/L
Brown rice	10g/L
Yeast extract	8g/L
Soytone peptone	4g/L
KH ₂ PO ₄	2 g/L
MgSO ₄	0.6 g/L
FeSO ₄	1ml/L

Table 2-10. Cultivation conditions for the bioreactor production cultures


◆ 배양 조건																
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Culture medium: PM ➤ Culture period : 10days ➤ Working volume : 3L ➤ 10% Inoculum 		<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Production Medium</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Glucose</td> <td>30g/L</td> </tr> <tr> <td>Nitrogen 1</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Nitrogen 2</td> <td></td> </tr> <tr> <td>KH₂PO₄</td> <td>2 g/L</td> </tr> <tr> <td>MgSO₄</td> <td>0.6 g/L</td> </tr> <tr> <td>FeSO₄</td> <td>1ml/L</td> </tr> </tbody> </table>	Production Medium		Glucose	30g/L	Nitrogen 1		Nitrogen 2		KH ₂ PO ₄	2 g/L	MgSO ₄	0.6 g/L	FeSO ₄	1ml/L
Production Medium																
Glucose	30g/L															
Nitrogen 1																
Nitrogen 2																
KH ₂ PO ₄	2 g/L															
MgSO ₄	0.6 g/L															
FeSO ₄	1ml/L															

Table 2-11. Cultivation conditions for the 5 l bioreactor (3 l working volume) growth cultures


◆ 배양 조건																		
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Culture medium: GM ➤ Culture period : 4days ➤ Working volume : 3L ➤ Inoculum : 1L 		<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Growth Medium</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Glucose</td> <td>30g/L</td> </tr> <tr> <td>Brown rice</td> <td>10g/L</td> </tr> <tr> <td>Yeast extract</td> <td>8g/L</td> </tr> <tr> <td>Soytone peptone</td> <td>4g/L</td> </tr> <tr> <td>KH₂PO₄</td> <td>2 g/L</td> </tr> <tr> <td>MgSO₄</td> <td>0.6 g/L</td> </tr> <tr> <td>FeSO₄</td> <td>1ml/L</td> </tr> </tbody> </table>	Growth Medium		Glucose	30g/L	Brown rice	10g/L	Yeast extract	8g/L	Soytone peptone	4g/L	KH ₂ PO ₄	2 g/L	MgSO ₄	0.6 g/L	FeSO ₄	1ml/L
Growth Medium																		
Glucose	30g/L																	
Brown rice	10g/L																	
Yeast extract	8g/L																	
Soytone peptone	4g/L																	
KH ₂ PO ₄	2 g/L																	
MgSO ₄	0.6 g/L																	
FeSO ₄	1ml/L																	

Table 2-12. Cultivation conditions for the 75 l bioreactor (40 l working volume) production cultures


◆ 배양 조건														
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Culture medium: PM ➤ Culture period : 7days ➤ Working volume : 40L ➤ Inoculum : 3L 		<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Production Medium</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Glucose</td> <td>30g/L</td> </tr> <tr> <td>Ammonium tartrate</td> <td>8g/L</td> </tr> <tr> <td>Yeast extract</td> <td>2g/L</td> </tr> <tr> <td>KH₂PO₄</td> <td>2g/L</td> </tr> <tr> <td>MgSO₄</td> <td>0.6 g/L</td> </tr> </tbody> </table>	Production Medium		Glucose	30g/L	Ammonium tartrate	8g/L	Yeast extract	2g/L	KH ₂ PO ₄	2g/L	MgSO ₄	0.6 g/L
Production Medium														
Glucose	30g/L													
Ammonium tartrate	8g/L													
Yeast extract	2g/L													
KH ₂ PO ₄	2g/L													
MgSO ₄	0.6 g/L													

Table 2-13. Cultivation conditions for the 5 l bioreactor (4 l working volume) growth cultures

◆ 배양 조건	
➤ Culture medium:GM	→ Growth Medium
➤ Culture period : 4days	Glucose 30g/L
➤ Working volume : 4L	Brown rice 10g/L
➤ Inoculum : 1L	Yeast extract 8g/L
	Soytone peptone 4g/L
	KH ₂ PO ₄ 2 g/L
	MgSO ₄ 0.6 g/L
	FeSO ₄ 1ml/L

Table 2-14. Cultivation conditions for the 75 l bioreactor (45 l working volume) production cultures

◆ 배양 조건	
➤ Culture medium:PM	→ Production Medium
➤ Culture period : 7days	Glucose 30g/L
➤ Working volume : 45L	Ammonium tartrate 8g/L
➤ Inoculum : 4L	Yeast extract 2g/L
	KH ₂ PO ₄ 2g/L
	MgSO ₄ 0.6 g/L

Table 2-15. Determination of a standard curve for the measurement of protein amount remaining in the fermentation broth (bovine serum albumin was used as a standard protein)

Standard

	1g	500mg	250mg	125mg	62,5mg	31,25mg
595nm	1,0245	0,6491	0,3316	0,2186	0,0930	0,0326

Coefficients:	
b[0]	-0.0507518843
b[1]	0.9676334679
r ²	0.9792126087

Table 2–16. Fermentation conditions for the production of EPS with C/N ratios of 3:1, 6:1 and 9:1 used respectively in each 5 l bioreactor culture.

MIDIA : EPS production medium Culture period : 7days Agitation speed : 100~250 RPM Inoculum : production culture 300ml Culture temperature : 28°C Culture volume : 3L	EPS production medium Glucose 30~90g/L Ammniun tartrate 8g/L Yeast extract 2g/L KH ₂ PO ₄ 2g/L MgSO ₄ 0.6g/L
--	---

Glucose	30(C)	60	90
Nitrogen	10	10	10
C/N ratio	3:1	6:1	9:1

Table 2–17. Comparison of fermentation parameters obtained in the EPS production cultures (C/N ratios of 3:1, 6:1 and 9:1 were used respectively in each 5 l bioreactor culture)

	Glucose 30	Glucose 60	Glucose 90
C/N ratio	3:1	6:1	9:1
Pf (g/L) Maximum EPS concentration	5.6700	8.2900	9.4900
Px(g/L) Maximum D.C.W concentration	11.1200	14.3920	16.8160
r _p (g/L/hr) Average production rate (ΔP/Δt)	0.0315	0.0461	0.0527
Q _p (g/g/hr) Average specific production rate (r _p /Δx)	0.0028	0.0032	0.0031
r _s (g/L/hr) Average consumption rate (-ΔS/Δt)	0.1083	0.1261	0.114594
r _x (g/L/hr) Average growth rate (Δx/Δt)	0.0617	0.0799	0.093422
μ _m (1/hr) Specific growth rate (1/X)(dt/dx)	0.01397	0.01694	0.02596
Y _{p/x} (g/g) Yield coefficient(ΔP/ΔX)	0.5105	0.5769	0.5642
Y _{p/s} (g/g) Yield coefficient(ΔP/-ΔS)	0.2908	0.3655	0.4599
Y _{p/x} (g/g) Yield coefficient(ΔX/Δ-S)	0.5697	0.6336	0.81508

Table 2–18. Fermentation conditions for the production of EPS with C/N ratios of 3:1, 13:1 and 15:1 used respectively in each 5 l bioreactor culture.

EPS production medium(control)	
Glucose	30g/L
Ammonium tatrare	8g/L
Yeast extract	2g/L
KH ₂ PO ₄	2g/L
MgSO ₄	0.6g/L

Culture condition
Working volume :3L
Agitation speed : 250 (RPM)
Culture period : 7 (days)
Temperature : 28°C

C/N ratio	3:1	13:1	15:1
Glucose	30	130	150

Table 2–19. Comparison of fermentation parameters obtained in the EPS production cultures (C/N ratios of 3:1, 13:1 and 15:1 were used respectively in each 5 l bioreactor culture)

	Glucose 30	Glucose 130	Glucose 150
C/N ratio	3:1	13:1	15:1
P _f (g/L) Maximum EPS concentration	5.6700	6.4000	7.5700
P _x (g/L) Maximum D.C.W concentration	11.1200	8.6800	11.4467
r _p (g/L/hr) Average production rate (ΔP/Δt)	0.0315	0.0335	0.0396
q _p (g/g/hr) Average specific production rate (r _p /Δx)	0.0028	0.0038	0.0034
r _s (g/L/hr) Average consumption rate (-ΔS/Δt)	0.1083	0.103534	0.154957
r _x (g/L/hr) Average growth rate (Δx/Δt)	0.0617	0.045445	0.05993
μm(1/hr) Specific growth rate (1/X)(dt/dx)	0.01397	0.01948	0.00178
Y'p/x(g/g) Yield coefficient(ΔP/ΔX)	0.5105	0.7378	0.660771
Y'p/s(g/g) Yield coefficient(ΔP/-ΔS)	0.2908	0.3235	0.2556
Y'p/x(g/g) Yield coefficient(ΔX/Δ-S)	0.5697	0.43852	0.38677

Table 2–20. Fermentation conditions for the production of IPS (5 l bioreactor cultures of IPS–1, IPS–2 and IPS–3 were carried out respectively.)

◆ **배 양 조 건**

MEDIA : IPS production medium
 Culture period : 7days
 Agitation speed : 100~250 RPM
 Inoculum : production culture 300ml
 Culture temperature : 28°C
 Culture volume : 3L

IPS production medium(control)	
Glucose	8g/L
Fructose	26g/L
Casein . h . l	3.5g/L
Soytone peptone	7.5g/L
KH ₂ PO ₄	6g/L
MgSO ₄	3g/L

IPS production medium(glucose)	
Glucose	35g/L
Casein . h . l	3.5g/L
Soytone peptone	7.5g/L
KH ₂ PO ₄	6g/L
MgSO ₄	3g/L

IPS production medium(fructose)	
Fructose	35g/L
Casein . h . l	3.5g/L
Soytone peptone	7.5g/L
KH ₂ PO ₄	6g/L
MgSO ₄	3g/L

Table 2–21. Fermentation conditions for the production of IPS in 5 l bioreactor cultures (Wheat germ oil or lard oil was used as carbon source together glucose.)

IPS production medium(control)	
Glucose	35g/L
Oil	10ml/L
Casein . h . l	3.5g/L
Soytone peptone	7.5g/L
KH ₂ PO ₄	6g/L
MgSO ₄	3g/L

OIL	
10ml/L	Wheat germ oil
10ml/L	Lard oil

Culture condition
Working volume :3L
Agitation speed : 250 (RPM)
Culture period : 7 (days)
Temperature : 28°C

Table 2–22. Comparison of fermentation parameters obtained in the IPS production cultures (Production media with glucose only, glucose plus wheat germ oil, and glucose plus lard oil as carbon source(s) were used respectively in each 5 l bioreactor culture.)

	Control	Wheat germ oil	Lard oil
$X_f(\text{g/L})$ Maximum Dry Cell Weight	15.93	20.09	16.37
$\bar{r}_s(\text{g/L/hr})$ Average consumption rate ($-\Delta S/\Delta t$)	0.1976	0.1883	0.1958
$\bar{r}_x(\text{g/L/hr})$ Average growth rate ($\Delta x/\Delta t$)	0.085057	0.094824	0.085977
$\mu(\text{1/hr})$ Specific growth rate ($1/X)(dt/dx)$	0.02127	0.02639	0.02206
$Y'_{p/x}(\text{g/g})$ Yield coefficient($\Delta X/\Delta S$)	0.43045	0.503579	0.43910623

Table 2–23. Fermentation conditions for the production of IPS in 5L bioreactor cultures (Optimum production media with the compositions of FFD run number #21 and #31 were used respectively in each 5 l bioreactor culture.)

Culture condition

Culture time : 10day
 Culture volume : 3.5L
 Agitation speed : 100~230RPM
 Temperature : 28°C

FFD run number 21

Glucose 22g/L
 Oleic acid 30g/L
 Casein enzymatic hydrolysate 6g/L
 Soytone peptone 10g/L
 KH_2PO_4 3g/L
 MgSO_4 3g/L

FFD run number 33

Glucose 22g/L
 Oleic acid 25g/L
 Casein enzymatic hydrolysate 6g/L
 Soytone peptone 6g/L
 KH_2PO_4 6g/L
 MgSO_4 3g/L

Table 2–24. The compositions of growth media with oil and without oil, and IPS production medium (Optimum production medium with both oleic acid and glucose as carbon sources were used.) (Growth culture was performed in the 5 l bioreactor, and IPS production culture in the 75 l bioreactor.)

IPS growth medium(without oil)		IPS growth medium(with oil)	
Glucose	30g/L	Glucose	12.5g/L
Brown rice	10g/L	Oleic acid	16g/L
Yeast extract	8g/L	Casein . h . l	4g/L
Soytone peptone	4g/L	Soytone peptone	4.5g/L
KH ₂ PO ₄	2g/L	KH ₂ PO ₄	3g/L
MgSO ₄	0.6g/L	MgSO ₄	1.5g/L

IPS production medium(with oil)	
Glucose	25g/L
Oleic acid	32g/L
Casein . h . l	8g/L
Soytone peptone	9g/L
KH ₂ PO ₄	6g/L
MgSO ₄	3g/L

Table 2–25. Specification for the spargers and impellers used in this experiment: (A) 6–flat–blade disc–turbine impeller and (B) paddle impeller

	impeller diameter (mm)	blade height (mm)
(A) 6–flat–blade disc turbine impeller	88	22
(B) paddle impeller	94	72

Table 2–26. Fermentation conditions for the on–line monitoring and data acquisition in the 5 l fermentor equipped with the gas analyzer

IPS production medium(glucose)		OUR 및 CER 측정
Glucose	35g/L	
Casein . h . l	3.5g/L	
Soytone peptone	7.5g/L	
KH ₂ PO ₄	6g/L	
MgSO ₄	3g/L	

Condition
 Temperature : 28 °C
 Agitation speed : 100~250
 Culture time : 8days

제3절 *Inonotus obliquus* 배양 균사체로부터 항당뇨 효능의 단백다당체 고순도 청정 분리정제 공정 개발 (제2협동과제)

1. 재료 및 실험방법

가. 재료

(1) 차가버섯 균사체(*Inonotus obliquus* mycelium)

강원대학교에서 액상 배양된 시료를 받아 8,000 rpm에서 20분 동안 원심분리 하여 상정액은 에탄올 침전과 투석 후 동결하여 성분(조다당류)을 분석하였고, 남은 균사체는 증류수로 3번 세척 후 동결건조하여 시료로 사용하였다.

(2) 차가버섯 자실체(*Inonotus obliquus* fruit body)

동의진 차가 회사에서 차가버섯 자실체를 구입하였으며 일정량을 blender로 분쇄하여 분말화 후 500 μm 체로 걸러 시료로 사용 하였다.

나. 단백다당류의 추출 및 분리방법

(1) 열수추출

냉각관이 연결되어있는 1000 mL의 둥근 플라스크에 시료 20 g과 증류수 200 mL을 넣고 일정온도가 유지되는 항온수조에서 추출하였다. 그리고 100°C 추출은 고압반응솥(autoclave)을 이용하였다. 추출 후 조단백다당체를 분리하기 위해 여과지(Whatman No. 3)로 여과하여 1차 추출액을 얻었으며, 2차 추출액은 1차 추출 후 남은 잔사에 같은 부피의 증류수를 가한 후 상기 방법과 동일한 방법으로 얻었다.

(2) 초음파 추출

100 mL 플라스크에 시료 5 g과 증류수 50 mL을 넣고, 초음파 장치를 이용하여 일정온도와 시간을 조정 후 추출하였다. 추출방법은 열수추출방법에서 언급한 것과 동일하다.

(3) 전자파 추출

전자파 추출용기에 시료 5 g과 증류수 50 mL을 넣어 전자파 장치를 이용하여 각각의 온도와 시간을 설정해 놓고 추출하였다. 추출방법은 열수추출 방법에서 언급한 것과 동일하다.

(4) 효소처리

차가버섯 균사체 배양액으로부터 분리된 균사체에 셀룰라제(Sigma, U.S.A)를 농도별로 첨가하고 온도 50°C에서 1시간 효소반응 시킨 후 열수로 단백다당체를 추출하였다.

(5) 고압파쇄기를 이용한 전처리

시료 5 g에 증류수 50 mL을 첨가한 후 blender를 이용하여 15분 동안 분쇄하고, 다시 균체파쇄기를 이용해 압력 20 Kpsi에서 10분간 균체를 파쇄하여 시료를 균일하게 처리하였다.

(6) 초미세 분쇄기를 이용한 전처리

HKP-05(한국에너지기술(주))와 KMS-200(코리아메디(주))를 이용하여 시료를 분쇄하였다(Figure 3-1). 이러한 전처리 후 위에서 언급한 열수추출과 전자파추출 방법을 통해 추출을 실시하였다.

(7) 초고압 장치를 이용한 전처리

시료 10 g에 증류수 100 mL을 첨가한 후 진공포장을 3번하여 TOYO KOATSU(Japan)사의 초고압 장치에 넣고 100 MPa(14500 psi)에서 24시간 동안 처리하였다. 위의 다양한 방법에 의해 얻어진 추출액은 각각 원심분리 하여 상징액(exopolysaccharide)은 4배의 에탄올을 가해 단백다당류를 침전시킨 후 4°C에서 24시간 방치하였다. 원심분리하여 침전된 단백다당류는 소량의 증류수로 용해하여 dialysis tube (MWCO; 12,000 Da, Sigma, U.S.A)에 넣고 4°C에서 24시간 투석 후 동결건조하여 분석용 시료로 사용하였다.

(8) NaOH 처리

NaOH 처리에 대한 과정을 Figure 3-2에 나타냈다. 차가버섯 균사체로부터 균체를 분리한 후 배양액에 에탄올(1:3 v/v)을 넣은 후 4°C에서 24 시간 동안 반응하였다. 반응 후 원심분리하여 상징액은 버리고 침전물에 1 M의 NaOH(1: 0.5 v/v)를 넣고 60°C에서 1시간 동안 반응 후 원심분리 하였다. 침전물은 버리고 상징액은 모아 다시 에탄올(1:3 v/v)을 넣은 후 4°C에서 24시간 동안 상온에 방치하였다. 원심분리하여 상징액은 버리고 침전물은 모아 투석 후 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였다.

다. 분석방법

(1) 당 함량

당 함량 분석을 위하여 glucose를 표준물질로 사용하였으며, Dubois 등의 방법을 보완한 phenol sulfuric acid 법을 사용하였다. 적당량 희석한 시료 1 mL에 5% phenol(w/v) 1 mL과 sulfuric acid 5 mL을 넣고 반응시킨 후 상온에서 2시간 정치하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값은 표준곡선식에 대입하여 당 함량을 계산하였다.

(2) 단백질 함량

단백질 함량분석을 위하여 bovin serum albumin(BSA)을 표준물질로 하여 Lowery 법으로 측정하였다. 적당량 희석된 추출액 시료 1 mL에 0.1 M NaOH 용액에 2% Na₂CO₃를 용해시킨 혼합액 2 mL, 1%의 Na-K-tartrate 용액 0.1 mL, 0.5% CuSO₄·5H₂O 용액 0.1 mL를 혼합한 혼합액 1 mL를 첨가하여 상온에서 15분 방치하였다. 그 후 50% folin-phenol reagent를 첨가하여 발색시키고, 상온에서 30분 방치한 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값은 표준곡선식에 대입하여 단백질함량을 계산하였다.

(3) 일반성분 분석

조회분, 조지방, 조단백질 및 탄수화물 분석은 AOAC법을 기초로 하여 분석하였다. 조회분 함량은 550°C의 회화로에서 직접 회화법을 사용하였고, 조단백질함량은 micro-kieldahl 법으로 총질소함

량을 구한 후 단백질 계수 6.25를 곱하여 산출하였으며, 조지방은 Soxhlet 법을 이용하여 분석하였다.

(4) β -glucan 함량

Mecleary와 Glennie-Holmes의 효소적 방법에 따라 Megazyme β -glucan kit(Megazyme Pty. Ltd., Australia)를 사용하여 측정하였다. 시료 0.1 g에 HCl(37% v/v) 1.5 mL을 넣어 혼합 후 30°C가 유지되는 배양기에 45분 동안 가수분해하여 100°C에서 2시간 반응시켰다. 상온에서 냉각 후 2 N KOH 10 mL을 넣고 여과 후 β -glucan 함량 측정을 위한 시료로 사용하였다. 분해된 시료 0.1 mL에 glucosidase 0.1 mL을 첨가한 후 40°C에서 60분 동안 반응 후 GOPOD 시약 3 mL을 넣고 40°C에서 20분 반응 후 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 표준곡선식에 대입하여 β -glucan 함량을 계산하였다.

(5) Gel permeation column chromatography 의한 단백다당체 분석

추출된 시료는 미세잔사를 제거하기 위해 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 상정액을 0.45 μ m로 여과하여 GPC 칼럼을 이용, HPLC(휴텍스)로 분석하였다. 분석조건은 Table 3-1과 같다.

(6) Gel filtration column chromatography를 이용한 단백다당체 분리

조단백다당체를 구성하고 있는 단백다당체를 분자량 크기로 분리하기 위하여 column chromatography를 이용하여 분획하였다. Column은 Sepharose CL-4B(MW; 10^4 - 10^7)의 충전물을 이용하여 만든 것과 Shodex(Japan)사의 SB 2000(20 mm \times 300 mm)을 사용하였다. 단백다당체 분획을 위한 분석조건은 Table 3-2에 나타났다. 시료는 차가버섯 균사체 배양액을 에탄올 침전 후 동결건조 하여 사용하였다. 용출된 각 fraction은 peak가 높게 측정된 부분을 모아 동결건조하였다.

(7) 단백다당체 표준물질

단백다당체 분리와 농축여부를 확인하기 위해 표준물질로써 Mesima(Hankuk Sin Yak, Korea)를 사용하였다. 모든 시료는 12,000 rpm에서 20분 동안 원심분리 후 상정액은 0.2 μ m로 여과하여 사용하였다.

(8) 막 시스템

실험에 사용한 한외여과 막 시스템(Satorius, Germany)은 Figure 3-3(a), (b)100 L 와 같다. 저장조(Feed tank)에 있는 시료 용액은 펌프에 의해 이송되며, 막을 통과한 용액은 여과조(Permeate tank)로 수집된다. 그리고 막을 통과하지 않은 거대물질은 저장조로 다시 돌아가 최종적으로 농축이 가능하도록 막 시스템이 설계되어 있다. 막 모듈을 지나 흘러나오는 retentate 관에 설치된 밸브로 막 시스템의 압력을 조정하였다. 막의 재질은 hydrosart이며, 고분자물질을 분리하기 위해 한계분자량(Molecular weight cut-off) 10, 30, 100과 300 kDa의 평판막을 사용하였다. 조단백 다당체 분리 실험 후, 0.1 N NaOH로 30분간 사용한 막을 세정하였다. 그 후 다시 사용할 계획이 없는 막은 1 N NaOH 용액에 침지하여 다시 사용할 때까지 냉장고에 보관하였다.

(9) Press filter를 이용한 여과

차가버섯 균사체 분리를 위해 사용한 여과장치는 용기 용량이 30 L이고, 판틀이 10개로 되어 있는 판틀형 가압여과기를 사용하였다. Press filter 사진과 분리를 위한 과정을 Figure 3-5에 제시하였다. 여과 판에 여과패드를 장착한 후 압착판 스위치를 작동하여 전진시킨다. 준비된 시료를 혼합 탱크에 채운 후 여과 펌프 스위치를 작동하여 여과를 진행하였다. 유입된 시료는 펌프의 압력에 의해 여과지로 이송되어 배양액은 여과지를 통과해 용기에 받아지며 균사체는 여과포에 남게 된다. 이때 사용된 여과포(ADVANTEC)의 면적은 $0.09 \text{ m}^2/\text{sheet}$ 로 10장을 장착하여 사용하였고, 적용된 펌프의 압력은 2.5 kg/cm^2 이었다.

(10) FT-IR 분석

시료 0.5 mg과 KBr 0.5 mg을 잘 혼합하여 막자사발로 파쇄 후 펠릿을 만든 다음, 적외선 흡수 스펙트로미터(Spectrum GX, USA)를 사용하여 시료의 적외선 흡수 스펙트럼을 얻었다. 표준물질로 써 상황버섯에서 추출한 Mesima를 구입하여 스펙트럼을 비교하여 보았다.

2. 결과 및 고찰

가. 차가버섯 자실체와 균사체의 성분비교

차가버섯 자실체와 균사체의 일반성분을 비교하여 Table 3-3에 나타냈다. 자실체의 경우 수분과 조지방 함량은 각각 12.41과 10.97%로 균사체보다 높은 함량을 나타냈고, 균사체의 경우 조지방과 조단백질 함량은 각각 3.1과 35.12%로 자실체보다 높은 함량을 나타냈다. 건조 정도에 따라 수분 함량의 차이가 있을 수 있으나, 전체적인 조성분의 비를 비교해보는 자료가 되었다.

나. 차가버섯 배양액에서의 균사체 분리를 위한 여과조건 확립

여과는 현탁 입자를 포함하고 있는 유체가 다공성의 여과매체를 통과하면서 액체는 통과되고 불용성 고체는 여과매체 표면에 퇴적하여 고체-액체의 현탁액으로부터 고체 입자를 분리하는 조작이다. 이때 고체-액체의 현탁액을 슬러리(slurry), 여과지를 통과한 액체는 여액(filtrate), 분리된 고체를 여과 케이크(cake)라고 한다. 여과매체는 현탁액이 고체 입자보다 작은 세공을 가지고 있어 고체 입자는 통과하지 못하고 액체만을 통과시킨다.

차가버섯 균사체 배양액(12 L)으로부터 균사체 분리를 위해 여과매체로써 여과지를 사용하였고 프레스 필터를 이용하여 분리하였다. 이때 펌프의 압력은 2.5 kg/cm^2 였다. 여과 공정의 전형적인 플럭스와 시간과의 관계는 세 단계로 진행된다. 즉, 구간 I은 초기의 급격한 투과플럭스의 증가가 일어나며, 구간 II는 오랜 기간 동안 점차적인 플럭스 감소(pseudo-steady state)가 발생하고, 구간 III는 정상상태(steady state) 플럭스로 종결된다. 효율적인 균사체 분리를 위해 여과매체로써 0.2와 0.8 μm 의 기공크기가 서로 다른 여과지를 사용하였으며, 여과 후 플럭스($\text{g/min}\cdot\text{m}^2$) 변화를 비교하여 Figure 3-6에 나타냈다. 여과지 0.2 μm 를 사용한 경우, 초기 플럭스는 4300으로 급격하게 증가하다가 감소하여 운전시간 5분경과 시부터 50을 유지하여 정상상태를 나타냈고, 균사체가 분리되기 까지 약 40분이 소요되었다. 여과지 0.8 μm 를 사용한 경우, 상대적으로 큰 기공으로 인하여 초기 플럭

스는 약 8000으로 높게 나타냈으며, 직선적으로 감소하다가 운전시간 5분경과 시부터 100으로 서서히 감소하다가 정상상태를 유지하여 균사체가 분리되기까지 15분이 소요됨을 알 수 있었다. 상기 결과로부터 0.8 μm 의 여과지 사용 시 여과 완료시간은 약 1/3 단축됨을 알 수 있었다.

각각의 기공 크기로 여과 후 여과액의 투명도와 회수율에 대한 결과를 Figure 3-7와 Table 3-4에 나타냈다. 두 여과액 모두 현미경 관찰(400배) 시 이물질들이 없어 여과가 잘된 것으로 판단되었다. 0.2 μm 를 사용한 경우 여액과 cake의 무게는 각각 8.71 L와 341.8 g으로 균체의 회수율은 75.4% 나타냈고, 0.8 μm 를 사용한 경우 여액과 cake의 무게는 각각 8.99 L와 317.9 g으로 균체의 회수율은 77.6% 나타냈다. 상기 결과로부터 차가버섯 균사체 분리 시 0.8 μm 를 갖는 여과지를 사용하는 것이 효율적이라고 판단되어진다. 또한, 프레스 필터 방법을 이용하여 균체 분리 시 배양 액 손실이 많은 단점이 있으나 cake의 저항이 없어 대량처리에는 좋은 방법이 될 것으로 판단되었다. 그리고 막이나 원심분리 방법도 좋은 대안이 될 것으로 생각되었다.

다. 단백질분리를 위한 추출조건 확립

단백질분리시 분리수율을 향상시키기 위해서는 추출방법, 추출온도, 추출 용매량, 추출시간 등이 영향을 미치므로 최적화 할 필요가 있다. 추출 방법 중 열수추출은 일반적으로 가장 많이 행해지는 방법으로 시료를 대량으로 추출할 수 있는 장점을 가지고 있다. 초음파 에너지에 의한 추출은 초음파 진동에 의한 공동현상(cavitation)에 의해 매우 큰 에너지를 발생시키며, 주위에 위치하는 반응물 입자들의 운동에너지를 크게 하기 때문에 반응에 필요한 충분한 에너지를 얻게 되고, 초음파 에너지의 충격효과로 높은 압력을 유도하여 혼합 효과를 높여주게 된다. 전자파를 이용한 추출은 물질내부까지 짧은 시간에 가열할 수 있고, 복잡한 형상의 물질도 고르게 가열 할 수 있으며, 제어와 조작이 용이하고, 그리고 깨끗한 작업 환경을 유지할 수 있는 장점이 있다. 본 연구에서는 단백질분리를 가장 효과적으로 추출할 수 있는 방법과 조건을 확립하고자 하였으며, 차가버섯 자실체 (*Inonotus obliquus* fruiting body: IF)와 균사체(*Inonotus obliquus* mycelium: IM)를 이용하여, 추출 방법, 추출온도, 추출 용매량 및 추출시간 등을 다르게 하여 실험을 수행하였다.

(1) 자실체로부터 단백질분리의 추출

먼저 자실체(IF)로 열수추출 시 최적의 추출온도를 확립하고자 추출시간과 용매 비를 각각 3시간과 1:10으로 고정한 후, 다양한 온도에서 추출을 하였다. 실험결과를 Figure 3-8에 나타냈다. 단백질 함량은 온도를 높일수록 높게 측정이 되었으며, 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 당과 단백질 함량은 각각 2.75%와 3.44%로 가장 높게 측정이 되었다. 상기 결과를 토대로 추출시간을 확립하고자 추출온도 100 $^{\circ}\text{C}$ 와 추출 용매 비를 1:10으로 고정한 후 시간에 따른 당과 단백질 함량을 비교하여 Figure 3-9에 나타냈다. 실험결과, 추출시간 3시간째 당과 단백질 함량은 각각 4.75%와 6.32%로 가장 높은 함량을 나타냈다. 확립된 추출온도와 시간을 토대로 추출용매 비를 결정하고자 실험을 수행하여 Figure 3-10에 나타냈다. 추출용매 비는 용매가 적게 들어갈수록 당과 단백질 함량은 높게 측정이 되었다. 그러나 용매 비 1:5 비율의 경우 추출 후 여과하는데 어려움이 있었으며 용매 비를 1:7.5에서 추출하여 다음 실험을 수행 하였다.

초음파 추출도 역시 최적의 추출온도와 시간을 정하고자 실험을 수행 하였다. 추출온도는 45 $^{\circ}\text{C}$, 65 $^{\circ}\text{C}$ 그리고 80 $^{\circ}\text{C}$ 로 각각 설정한 후 시간에 따른 당과 단백질 함량을 비교하여 Table 3-5에 나타냈

다. 실험결과 추출온도가 높아질수록 당과 단백질 함량은 높게 측정이 되었고, 추출은 4시간째 가장 효과적이었다. 그러나 열수추출과 비교 시 낮은 함량을 나타내 단백다당체의 경우 높은 온도에서 추출 시 효과가 좋은 것으로 판단되었다.

마지막으로 전자과를 이용하여 단백다당체 추출 시 최적의 온도와 시간을 정하고자 실험을 수행하였다. 추출온도는 100℃, 125℃, 150℃와 180℃로 설정 하였으며, 시간에 따른 당과 단백질 함량을 측정하여 Table 3-6에 나타냈다. 당과 단백질 함량은 높은 온도로 추출 시 높게 측정이 되었고, 추출시간은 다른 추출방법과 비교시 단축됨을 알 수 있었다. 최적의 추출온도와 시간은 각각 180℃와 1시간 이었다. 추출된 단백질 함량을 비교한 결과, 열수추출보다 1.6배, 초음파추출보다 2.5배 높았다.

(2) 균사체로부터 단백다당체의 추출

균사체(IM)를 사용하여 최적의 추출조건을 확립하고자 실험을 수행하였다. 열수추출의 경우 자실체 추출조건에서 확립된 온도 100℃와 용매 비 1:7.5로 정한 후 시간에 따른 당과 단백질 함량을 비교하였다. 실험결과를 Figure 3-11에 나타냈다. 추출 1시간째 당과 단백질 함량은 각각 3.5%와 3.8%를 나타냈고, 2시간째 4.5%와 4.9%로 가장 높은 값을 나타냈으며 그 후 서서히 감소하는 경향을 나타냈다.

초음파 추출역시 최적조건을 확립하기 위해 실험을 수행하였다. 추출온도는 자실체에서 추출했던 조건, 즉 45℃, 65℃ 그리고 80℃로 각각 설정 후 시간에 따른 당과 단백질 함량을 비교하였고, 결과를 Table 3-7에 나타냈다. 자실체와 마찬가지로 추출온도가 높을수록 당과 단백질 함량은 높게 측정 되었고, 4시간 추출 시 각각 5.1%와 5.22%로 가장 높은 함량을 나타냈다.

마지막으로 전자과를 이용하여 단백다당체 추출 시 최적의 온도와 시간을 정하고자 실험을 수행하였다. 추출온도는 100℃, 125℃, 150℃와 180℃로 설정 하였고, 시간에 따른 당과 단백질함량을 비교하여 Table 3-8에 나타냈다. 균사체의 경우 자실체 최적 조건과 달리 150℃, 2시간째 당과 단백질 함량이 각각 5.1과 7.1%로 높게 측정되었다. 지나치게 높은 추출온도와 시간은 시료의 pH를 변화시키거나, 다당류를 단당류로 분해하여, 단백다당체의 추출 함량을 감소시키는 것으로 판단되었다. 그러므로 1단계 한 방법으로 추출하는 것보다는 다단계를 활용하는 것이 좋을 것으로 판단되었다.

(3) 2단계 추출에 의한 단백다당체 추출

차가버섯에는 β -glucan, 트리체페놀산, 호로마도젠, 폴리페놀, 옥시페놀카르본산, 마닐라산, 스테롤, 리그닌 등의 많은 유용한 생리활성 성분이 있는 것으로 알려져 있다. 이들 성분들은 물리화학적 성질의 차이에 의해 용해성이나 휘발성이 다르기 때문에 추출 시 온도는 유효성분의 효과적인 용출을 위해서 매우 중요한 요인이라 판단되었다. 추출공정에서 고압과 고온으로 추출하는 경우, 열에 약하거나 휘발성이 강한 유효성분이 파괴되거나 반대로 유해한 성분의 용출 가능성을 배제하지 못하는 결함을 가지고 있다. 또한 저온으로 추출할 경우 고온 혹은 장시간 방치해야만 추출되는 성분 역시 효율적으로 추출되지 못하는 점과 공정 효율성을 무시 한 채 무조건 장기간 방치할 수 없는 경제적 문제 역시 극복하기 어려운 문제점이다. 이러한 관점에서, 일차적으로 고온의 조건에서 파괴되거나 휘발성 등으로 인해 소실 가능성이 높은 유효성분은 저온 추출하고, 그리고 상대적으로 높은 온도에서 2차 추출한다면 이전 실험에서 나타났던 문제점들을 해결할 수 있을 것으로 판단되어

2단계 추출 공정을 사용하여 실험을 수행하였다.

자실체의 경우 먼저 1차 추출은 온도 80°C에서 3시간 열수추출 하고, 2차 추출은 남은 잔사에 대해 전처리 후 전자파 추출을 하여 당과 단백질 함량을 비교하였다. 자실체의 경우 1차 추출 한 후에 100°C에서 열수추출을 실시하여 시간에 따른 당과 단백질함량을 Figure 3-12에 나타냈다. 당과 단백질 함량은 추출시간이 길어질수록 높게 측정되었고, 5시간째 각각 1.05%와 2.06%로 가장 높게 측정이 되었다. 1차 추출 후 2차 추출 시 전처리 후 전자파추출 조건에 따른 당과 단백질함량을 Figure 3-13(a)에 나타냈다. 당과 단백질 함량은 150°C에서 2시간 2차 추출 시 15.4%와 18.3%로 열수 추출 시 보다 약 15배 향상됨을 알 수 있었다. 균사체의 경우 자실체와 마찬가지로 1차와 2차 추출을 같은 조건으로 하여 당과 단백질 함량을 비교하여 Figure 3-13(b)에 나타냈다. 실험결과 당과 단백질 함량은 추출온도 150°C와 5시간 추출 시 5.6%과 12.4%로 가장 높게 측정이 되었다.

(4) Gel permeation column chromatography에 의한 다양한 종류의 단백다당체 분석

여러 종류(상황, 송이와 차가)의 버섯 자실체와 균사체에 대해 Ultrahydrogel 1000 column을 사용하여 단백다당체를 분석한 실험결과를 Figure 3-14에 나타냈다. 분석 결과 대략 8.3분에서 단백다당체가 분리됨을 확인할 수 있었다. 그리고 메시마(a)는 단백다당체와 단당류가 혼합되어 있으며, STR(j) 제품은 순수한 단백다당체로 구성되어 있었다. 분리와 정제의 단계가 치밀하게 수행된 것으로 판단되었다. 차가버섯의 균사체((f)와 (g))의 경우 1차 추출 보다는 2차 추출의 경우 단백다당체 함량이 높게 측정되었다. 그리고 균체를 분리한 배양여액((h)와 (i))에서도 상당한 단백다당체 함량이 측정되었다. 균사체 배양여액의 경우 EtOH을 배양여액 대비 100% 첨가하여 EtOH 침전을 하였으며, 원심분리를 12,000 rpm에서 10분간하여 상정액을 분리하였다. 그리고 기타 불순물을 제거하기 위하여 투석을 냉장 상태에서 하루 실시하여 최종적으로 단백다당체를 분석하였다. 자실체((d)와 (e))의 경우도 역시 1차 추출보다 2차 추출이 단당류의 함량이 줄어드는 것을 알 수 있었다. 상기 결과로부터 Ultrahydrogel 1000 column을 사용하여 단백다당체를 분리하기 위해 1차와 2차를 병행하는 추출방법이 유리함을 알 수 있었으며, 특히 균사체배양의 경우 배양액으로 단백다당체가 분비되는 것을 알 수 있었다.

라. 다양한 전처리 후 단백다당체 추출

균사체로부터 단백다당체를 추출하기 위한 방법으로는 화학적 방법과 기계적 방법으로 나누어진 다. 화학적 방법은 알칼리, 열수, 효소처리, 세제와 삼투압 처리 등이 있고, 기계적 방법은 liquid shear를 이용한 homogenizer나 마멸 교반 등을 이용한 bead mill 등이 있다. 현재 사용되고 있는 대부분의 단백다당체 추출 방법은 기계적 추출방법 보다는 열수추출을 한 후 과량의 극성용매를 가하여 침전 시키는 방법을 사용하고 있다. 앞선 연구에서 효과적인 단백다당체 분리를 위한 추출방법, 온도, 용매량과 추출시간 등을 알아보았으나 좀 더 나은 단백다당체 추출을 위해 효소처리와 기계적인 방법 등의 다양한 전처리를 통한 단백다당체의 추출향상을 연구하였다.

(1) 효소처리에 의한 단백다당체(IPS:세포벽단백다당체) 분리 추출 조건 확립

차가버섯 균사체에 존재하는 단백다당체는 구조다당류의 형태로써 세포벽을 구성하는 물질로 유용물질을 세포벽으로부터 얻기 위하여 효과적인 추출방법을 고려하여야 한다. 이러한 방법으로써

셀룰라제, 아밀라제, 글루키나제, 헤미셀룰라제, 글루코시다제, 키틴나제, 펙티나제, 라이소자임 등을 이용한 연구 등이 보고되고 있다. 본 연구에서는 여러 방법 중 셀룰라제를 농도별로 첨가 한 후 단백다당체를 추출하고자 하였다.

차가버섯 균사체 배양액으로부터 균체를 분리 한 후, 균사체에 셀룰라제 농도를 0.5%, 1% 그리고 5%(v/v) 로 첨가 하여 50°C에서 1시간 반응 시킨 후 열수와 전자파를 이용하여 추출하였다. 열수 온도와 시간은 80°C과 100°C에서 1시간, 3시간, 5시간과 7시간 각각 추출한 후, 실험결과를 Table 3-9에 나타냈다. 단백다당체 함량은 표준물질인 메시마(한국신약)와 비교하여 측정하였다. 추출온도와 시간은 높고 길수록 단백다당체 함량은 1.0-11.44 mg/g 범위이었으며, 증가하는 경향을 나타냈다. 셀룰라제 첨가농도가 높을수록 높은 효소농도에 의한 세포벽 파괴로 인하여 단백다당체 함량은 증가하는 경향을 나타냈다.

전자파 추출의 경우 온도 100°C, 125°C와 150°C에서 추출시간은 30분, 60분과 90분 동안 각각 추출한 후 실험결과를 Table 3-10에 나타냈다. 단백다당체 함량은 2.24-19.72 mg/g의 범위를 나타내 열수추출 시 보다 높게 측정 되었다. 이는 전자파의 경우 복잡한 형상의 물질도 고르게 가열 할 수 있기 때문이라고 판단되었다. 100°C의 경우 0.5% 효소 농도로 30분 추출 시 표준물질인 메시마의 peak와 가장 일치하여 용출되었고, 추출시간이 길어질수록 다당체가 저분자 당류로 분해되어 단백다당체 함량은 감소하는 경향을 나타냈다. 1% 효소농도에서 30분 추출 시 단백다당체 함량은 13.20 mg/g으로 메시마와 같은 시간대에 용출되어 높은 값을 나타냈으며, 역시 추출 시간이 길어질수록 단백다당체 peak는 뒤로 밀려나는 경향을 보였으며, 다당체 함량은 감소하였다. 5% 효소 농도 추출 시에는 19.72mg/g으로 단백다당체 함량은 높게 측정 되었으나, peak 모양이 완만하고 용출시간도 뒤로 밀리는 경향을 나타내 좋은 추출조건이라고 판단할 수 없었다. 125°C의 경우, 효소농도 0.5%로 30분과 60분 추출 시 단백다당체 함량은 각각 0.487mg/g과 18.48 mg/g을 나타냈으나, peak 모양이 완만하게 나타나 좋은 추출 조건이라고 판단할 수 없었고, 90분 추출 시 단백다당체 함량은 긴 추출 시간으로 인하여 9.64 mg/g으로 감소됨을 알 수 있었다. 효소농도 1%로 30분 추출 시 단백다당체 함량은 17.76 mg/g을 나타냈고, 60분과 90분 추출 시 추출 시간이 길어질수록 단백다당체 peak가 뒤로 밀리는 경향을 보였다. 5% 효소농도로 추출 시에는 높은 온도와 효소 농도로 인하여 단백다당체가 분해되어 저분자 당류 함량이 높아짐을 알 수 있었다. 150°C의 경우 각각의 효소 농도로 추출 시 단백다당체는 높은 온도와 효소의 영향으로 단백다당체가 저분자 당류로 분해되어 다당체가 검출 되지 않은 것으로 판단되어진다.

차가버섯 균사체 배양액으로부터 분리된 균사체에 다양한 농도의 셀룰라제 처리 후, 80°C와 100°C에서 여러 시간 동안 추출하여 남은 잔사를 전자파 추출한 후, 단백다당체 분리여부와 단백다당체 함량을 측정하기 위해 HPLC 분석을 하였다. 80°C에서 다양한 시간 동안 1차 추출 후, 전자파 150°C에서 30분, 60분 그리고 90분 동안 추출한 실험결과를 Table 3-11에 나타냈다. 효소농도 0.5% 처리 후 30분 동안 전자파 추출한 경우 표준물질인 메시마 peak와 같은 시간대에 용출되었으며, 단백다당체 함량은 17.08-21.04 mg/g으로 높은 값을 나타냈다. 그러나 60분과 90분으로 추출시간을 길게 할 경우, 단백다당체 peak 모양의 끝이 여러 개로 나타나 단백다당체가 분해되고 있는 것으로 생각되었다. 효소농도 1%에서 30분 동안 추출 시 역시 단백다당체 peak의 봉우리가 여러 개로 나타나 다당체가 분해되고 있음을 확인 할 수 있었고, 60분과 90분 추출 시에는 비교적 높은 효소 농도와 긴 추출 시간으로 인하여 다당체가 분해됨으로써 저분자 당류 함량이 높아짐을 알 수 있었다.

효소 농도 5% 추출 역시 높은 효소 농도와 온도로 인하여 모든 추출 시간에서 단백다당체는 검출되지 않았다.

100℃에서 다양한 시간동안 1차 추출 후, 전자파 150℃에서 30분, 60분 그리고 90분 동안 추출한 실험결과를 Table 3-12에 나타냈다. 효소농도 0.5% 처리 후 30분 동안 전자파 추출한 경우, 표준물질과 같은 시간대에 peak가 용출됨을 확인 할 수 있었고, 단백다당체 함량은 15.6-22.72 mg/g으로 높게 나타났다. 또한 100℃에서 1단계 추출 후 2단계 추출 역시 추출시간이 길고 효소농도가 높을수록 단백다당체들은 모두 저분자량의 당류로 분해되어 저분자 당류 함량이 증가됨을 확인할 수 있었다. 따라서 상기 실험결과로부터 효소처리 후 추출시간이 길어짐에 따라 단백다당체가 분해되는 경향을 나타내 효소처리에 의한 2단계 단백다당체 추출 조건을 확립하기 위해 효소농도를 0.5%로 고정하고 2단계 추출시간을 단축하여 추출하고자 하였다.

80℃와 100℃에서 각각 다양한 시간 동안 1단계 추출 후 2단계 추출시간을 10분과 20분으로 하여 추출 후 단백다당체 함량을 측정하였다. 80℃에서 다양한 시간동안 1차 열수 추출 후 전자파 추출한 실험결과를 Table 3-13에 나타냈다. 80℃에서 1시간 추출 후 전자파 10분 추출 시 단백다당체 함량은 17.44 mg/g으로 표준물질인 메시마와 같은 peak를 나타냈고, 1차 추출 시간이 길어질수록 단백다당체 함량은 감소하는 경향을 나타냈으며, 다당체가 분해되어 peak 모양도 여러 개로 분리되는 것을 알 수 있었다. 80℃에서 다양한 시간 동안 1차 추출 후 잔사를 전자파에서 20분 동안 추출 시 표준물질과 같은 시간대에 peak가 나타나 단백다당체가 용출되었음을 확인 할 수 있었고, 80℃에서 5시간 추출 시 단백다당체 함량은 22.2 mg/g으로 10분 추출 시 보다 약 1.3배 향상됨을 알 수 있었다.

100℃에서 다양한 시간동안 1차 열수 추출 후 전자파 추출한 실험결과를 Table 3-14에 나타냈다. HPLC 분석결과 단백다당체 추출을 위한 추출시간은 10분-20분이 적절함을 알 수 있었다. 전자파 10분 추출 시 단백다당체 함량은 20.84 mg/g으로 1단계추출조건은 100℃에서 7시간 이었다. 또한 100℃에서 1단계 추출 후 전자파 20분 추출 시 가장 효과적인 1단계 추출 시간은 100℃에서 1시간 추출 이었고, 이때 단백다당체 함량은 23.16 mg/g으로 가장 높은 값을 나타냈다. 상기 실험결과로부터 효소처리에 의한 최적의 단백다당체 추출 조건은 효소농도 0.5% 처리 후 100℃에서 1시간동안 추출된 잔사를 전자파에서 20분 추출한 경우였다. 상기 결과로부터 부터 효소를 처리하지 않은 것 (조건: 1차열수추출 100℃와 1시간+2차전자파추출 150℃와 30분)보다 단백다당체 분리가 약 1.5배 향상됨을 알 수 있었다.

(2) 균체파쇄 전처리 추출효과

분쇄 방법을 이용해 세포벽을 파쇄하고 효과를 측정해 보았다. Blender와 고압파쇄기를 이용해 실험을 실시하였으며, Figure 3-15~24에 결과를 나타냈다. Blender를 이용한 분쇄 후 액의 상태는 5분까지는 걸쭉한 상태였으나 10분 후부터 다시 묽어지는 것을 볼 수 있었으며, 분쇄 전후의 균사체를 광학현미경으로 확인 결과 1분 분쇄로도 균사체가 분쇄 된 것을 볼 수 있었으나 30분 분쇄 후에도 여전히 분쇄되지 않고 남아 있는 균사체를 관찰할 수 있었다. 또한 blender를 이용한 분쇄 시에는 걸쭉한 상태였으나 고압파쇄기를 이용하여 균체 파쇄는 많이 묽어짐을 관찰할 수 있었다. Blender를 이용해 분쇄 후에 다시 고압파쇄기를 이용한 균체 파쇄 전후의 균사체를 광학현미경으로 확인한 결과, blender를 이용한 분쇄 후에는 많은 양의 균체가 파쇄가 되지않은 것을 볼 수 있었으

나 고압과쇄기를 이용한 균체 과쇄 후에는 대부분의 균체가 과쇄되었음을 확인할 수 있었다. 고압과쇄기를 이용해 균체 과쇄 후 열수추출을 실시하여 단백다당체를 추출하였다(Figure 3-25). 다양한 열수추출 조건 중 100°C, 5시간 추출 시 6.72 mg/g로 가장 높은 단백다당체 함량을 보였다.

(3) 초미세분쇄 전처리 추출효과

지금까지 식품의 가공공정에서 미세분쇄공정으로 ball 또는 pin mill 등을 이용하고 있으나, 분쇄과정에서 온도상승에 의한 품질 저하를 고려할 때 분쇄 분말의 평균 입자 직경은 200~300 micron 수준이다. 이러한 기존의 분쇄 방법들에 비하여 1/10 수준인 초미세분쇄(20~40 micron) 후의 단백다당체 추출 정도를 확인해 보았다(Figure 3-26~28).

먼저 초미세분쇄한 시료를 이용해 100°C에서 4시간 동안 1차 열수추출을 행한 것은 blender를 이용해 분쇄한 시료보다 높은 단백다당체 함량을 보였다. 균사체는 3.96 mg/g에서 초미세분쇄 후 25.6 mg/g으로 약 6.5배의 증가를 보였으며, 효소처리(11.44 mg/g) 보다도 약 2.2배 더 높은 함량을 보였다.

자실체의 경우에도 blender를 이용한 분쇄 시 2.1 mg/g에서 초미세분쇄 후 11.13 mg/g으로 약 5.3배 더 높은 함량을 보였다. 열수추출 후 남은 잔사를 이용해 150°C에서 0.5시간 동안 2차 전자과추출을 행한 것 역시 blender를 이용한 분쇄 보다 높은 단백다당체의 함량을 보였다. 균사체의 경우에는 blender를 이용한 분쇄 시 9.4 mg/g에서 초미세분쇄 후 38.16 mg/g로 약 4배 증가를 보였으며 효소처리(11.06 mg/g) 보다도 약 3.5배 더 높은 함량을 보였다. 자실체의 경우에는 blender를 이용한 분쇄 시 6.0 mg/g에서 초미세분쇄 후 20.12 mg/g로 약 3.1배 증가하였다. 1차 추출과 남은 잔사를 이용해 2차 추출을 행하여 얻은 총 단백다당체 함량은 균사체의 경우에는 blender를 이용한 분쇄 시 총 13.36 mg/g에서 초미세분쇄 후 63.76 mg/g로 약 4.8배 증가를 보였으며 효소처리(총 22.5 mg/g) 보다도 약 2.8배 더 높은 함량을 보였다. 자실체의 경우에는 blender를 이용한 분쇄 시 총 8.6 mg/g에서 초미세분쇄 후 31.25 mg/g로 약 3.6배 증가하였다.

초미세분쇄 전에는 세포막의 파괴가 쉽지 않아 열수추출로 세포막을 약하게 만든 후에 전자과추출을 통해 약해진 세포막을 파괴하여 단백다당체를 추출하였으나 초미세분말화한 후에는 열수추출만으로도 단백다당체의 추출이 용이해짐에 따라 전자과를 이용해 고온으로 단시간에 단백다당체의 추출 함량을 높일 수 있는지를 확인해 보았다(Figure 3-29~30).

균사체의 경우 150°C에서 0.25시간 추출 시 37.86 mg/g, 150°C에서 0.5시간 추출 시 60.52 mg/g과 150°C에서 1시간 추출 시 64.94 mg/g이 추출되어 시간이 길어질수록 추출함량이 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 0.5시간과 1시간 추출 시 함량은 1차, 2차 추출을 통한 63.76 mg/g과 비슷한 함량을 보였다.

자실체의 경우에는 150°C에서 0.25시간 추출 시 35.94 mg/g, 150°C에서 0.5시간 추출 시 40.37 mg/g과 150°C에서 1시간 추출 시 28.91 mg/g이 추출되어 역시 균사체와 마찬가지로 0.5 시간까지는 추출함량이 증가하나 1.0 시간에서는 크게 감소하였다. 0.5시간과 1시간 추출 시 함량은 1차, 2차 추출을 통한 31.25 mg/g보다 높은 함량을 보였다.

그리고 균사체의 경우 HPLC 분석을 통해 추출 시간이 길어질수록 고분자의 단백다당체는 줄어들고 저분자의 다당체는 증가하는 것을 볼 수 있었다. 높은 온도에 노출되는 시간이 길어질수록 세포막의 파괴도 증가하지만 이미 추출된 고분자의 단백다당체 또한 영향을 받아 분해되는 것이라 생

각되었다.

그러나 자실체의 경우에는 추출시간이 길어질수록 고분자와 저분자의 모든 다당체의 추출함량이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이는 균사체보다 상대적으로 강한 세포막을 지니고 있어 세포막의 파괴가 더디게 진행되어 추출시간이 길어질수록 고분자의 단백질다당체 함량이 증가하는 것으로 생각되었다.

서로 다른 초미세분쇄를 이용해 분쇄후 추출을 실시하였으며 결과를 나타냈다.(Figure 3-31~38). 먼저 열수추출을 통한 실험은 균사체의 경우 코리아메디(주)의 KMS-200을 이용해 분쇄한 normal 배지에서 생산한 것은 1차 추출 21.07 mg/g과 2차 전자과 추출 40.96 mg/g으로 총 62.03 mg/g이 추출되었으며, 한국에너지 기술(주)의 HKP-05를 이용해 분쇄한 시료는 1차 추출 25.6 mg/g과 2차 전자과추출 38.16 mg/g으로 총 63.76 mg/g이 추출되어 거의 비슷한 함량을 보였다. 그러나 KMS-200을 이용해 분쇄한 oleic acid가 첨가된 배지에서 생산한 균사체는 1차 추출 13.57 mg/g과 2차 전자과추출 35.00 mg/g으로 총 함량이 48.57 mg/g 추출되어 20% 정도 낮은 함량을 보였다.

자실체의 경우 코리아메디(주)의 KMS-200을 이용해 분쇄한 시료는 1차 추출 15.77 mg/g과 2차 추출 27.17 mg/g으로 총 42.94 mg/g이 추출되어 한국에너지 기술(주)의 HKP-05를 이용해 분쇄한 시료의 1차 추출 11.13 mg/g과 2차 추출 20.12 mg/g으로 총 31.25 mg/g이 추출된 것 보다 1차, 2차 추출 모두 높은 추출함량을 보였다.

전자과를 이용한 추출은 균사체의 경우 코리아메디(주)의 KMS-200을 이용해 분쇄한 것 중 normal 배지에서 생산된 것은 150°C와 0.25시간 추출에서 6.05 mg/g, 150°C와 0.5시간 추출에서 3.45 mg/g과 150°C 1시간 추출에서 4.15 mg/g이 추출되었다. 이는 한국에너지 기술(주)의 HKP-05를 이용해 분쇄한 시료의 150°C와 0.25시간 추출에서 49.19 mg/g, 150°C 0.5시간 추출에서 44.54 mg/g과 150°C 1시간 추출에서 63.76 mg/g보다 훨씬 낮은 함량이다. 그러나 KMS-200을 이용해 분쇄한 것 중 oleic acid가 첨가된 배지에서 생산된 균사체는 150°C, 0.25시간 추출에서 50.94 mg/g, 150°C와 0.5시간 추출에서 51.35 mg/g과 150°C와 1시간 추출에서 47.30 mg/g으로 HKP-05를 이용해 분쇄한 것보다 조금 높은 함량을 보였다.

자실체의 경우 코리아메디(주)의 KMS-200을 이용해 분쇄한 시료는 150°C와 0.25시간 추출에서 47.87 mg/g, 150°C와 0.5시간 추출에서 47.99 mg/g과 150°C와 1시간 추출에서 36.05 mg/g으로 한국에너지 기술(주)의 HKP-05를 이용해 분쇄한 시료의 150°C, 0.25시간 추출에서 35.94 mg/g, 150°C와 0.5시간 추출에서 40.37 mg/g과 150°C와 1시간 추출에서 28.91 mg/g보다 모든 추출 시간에서 20~30% 더 높은 함량을 보였다.

실험 결과 한국에너지 기술(주)의 HKP-05와 코리아메디(주)의 KMS-200을 이용해 분쇄하였을 때 두 시료로부터 추출된 단백질다당체의 함량은 비슷하다는 것을 알 수 있었으며, 전자과를 이용해 추출하는 과정에서 고열로 인해 시료가 타는 일이 발생하여 추출된 단백질다당체의 함량이 낮은 경우도 있었는데 이를 위해 150°C 보다 낮은 온도에서 전자과 추출을 행하여 추출 조건을 결정하는 것이 필요하다고 생각되었다.

(4) 초미세 분쇄 차가버섯의 현미경 관찰

초미세분쇄한 차가버섯을 주사전자현미경(scanning electron microscope) JSM-6360(JED

TECHNICS LTD., JAPAN)을 이용해 입자 크기와 형태를 관찰하였다(Figure 3-39~42). 대체적으로 KMS-200(코리아메디(주))를 이용해 분쇄한 시료가 HKP-05(한국에너지기술(주))를 이용해 분쇄한 것 보다 조금 큰 입자 크기를 보였다. 입자들 중에는 작은 크기의 것도 많았으나 측정할 수 있는 한계 크기가 약 5 μm 정도여서 더 작은 크기의 것들은 측정할 수가 없었다. 그러나 사진 상에 보여 지는 10 μm 막대 바를 이용해 대략의 크기는 알 수가 있었다. SEM을 이용해서는 세포벽의 외관만을 볼 수 있고 TEM(transmission electron microscope)을 이용해야 단면을 통해 세포벽의 상태를 알아볼 수가 있으나 분석 시료들의 경우 외관적인 것만 보더라도 다수가 작게 찢겨져 있거나 잘려져 있는 것을 볼 수가 있으며, 균사도 작게 잘려져 있고 찢어진 것도 볼 수가 있었다. 이를 통해 초미세분쇄했을 때 그렇지 않은 것보다 단백질의 추출효율이 더 좋은 것은 초미세분쇄 과정을 통해 세포벽이 찢겨지고 잘려져 많이 약해져 있는 상태여서 추출용매가 쉽게 침투할 수 있으며 그로 인해 단백질이 용매에 쉽게 녹아들어 더 많이 추출되는 것이라 짐작되었다.

(5) 초고압 전처리가 추출에 미치는 영향

100 Mpa에서 24시간 전처리 후 추출을 행한 것과 압력 처리를 하지 않고 추출을 행한 것을 비교해 보았을 때 차가버섯 균사체와 자실체 모두 압력처리를 하지 않았을 때 더 높은 단백질 추출량을 보였다(Figure 3-43~44). 차가버섯 균사체의 경우에는 열수추출에서 100 Mpa로 24시간 전처리 했을 때 25.36 mg/g으로 압력처리를 하지 않았을 때 35.88 mg/g보다 30% 감소하였으며 전자과추출에서 100 Mpa로 24시간 전 처리 했을 때 55.40 mg/g으로 압력처리를 하지 않았을 때 60.52 mg/g보다 8.5% 감소하였다. 또한 차가버섯 자실체의 경우에는 열수추출에서 100 Mpa로 24시간 전처리 했을 때 1.77 mg/g으로 압력처리를 하지 않았을 때 2.56 mg/g보다 30% 감소하였으며 전자과추출에서 100 Mpa로 24시간 전 처리 했을 때 6.59 mg/g으로 압력처리를 하지 않았을 때 6.90 mg/g보다 4.5% 감소하였다.

이는 초미세분쇄를 통해 세포벽이 이미 상당히 약해져 있는 상태여서 100 MPa의 초고압처리를 하여도 더 이상의 세포벽 파괴 효과를 얻을 수 없음을 보여주는 것이라 판단되었다.

마. 한외여과를 이용한 단백질(세포외단백단백: EPS) 분리와 농축

한외여과는 온화한 조건하에서 시료의 물리 화학적 처리 없이 분자의 크기에 따라 막을 이용하여 분리하는 공정이다. 한외여과 막 분리는 조작의 간편성, 막의 제조특성에 따른 막의 다양성과 규모 확대의 편리성 등 장점이 있는 분리공정으로 알려지고 있다. 특히 버섯에 함유된 단백질 분리를 위해서 한외여과가 장점이 있는 공정으로 생각된다. 한외여과공정 시 최적조건은 TMP(Transmembrane pressure)를 낮게 유지하면서 permeate 플럭스를 최대로 얻는 것이다. 즉, 막의 오염(membrane fouling)과 농도 분극(concentration polarization)현상은 TMP가 증가할수록 커지게 되고 cross flow rate(CFR)가 커질수록 감소하게 된다. 따라서 가능한 한도 내에서 TMP는 낮게 하고 CFR은 높게 하면서 플럭스를 최대로 얻는 조건을 찾아야 한다. 플럭스의 감소는 크게 feed 용액의 물성 변화와 관련된 막 침착 현상과 농도 분극현상 때문에 발생하며 막 분리 시 플럭스를 저하시키는 주요 요인이다. 용매가 다공질의 한외여과 막을 통과할 때 Hagen-Poiseuille 법칙을 따르게 된다. 즉 고형물이 농축되면 feed의 점도와 밀도가 상승하고 확산도가 감소하여 물보다 낮은 플럭스를 나타낸다.

(1) 막의 한계분자량에 따른 단백다당체(EPS) 분리

차가버섯 균사체 배양액(EPS)에 존재하는 단백다당체 분리와 농축을 위해 한외여과를 행하였다. 한외여과시 시료는 각각의 서로 다른 막(MWCO; 10 kDa, 30 kDa, 100 kDa과 300 kDa)을 사용하여 3배 농축하였고, 압력은 15 psi로 고정한 후 막 시스템을 운전하였다. 상기 조건으로 실험 후 시간에 따른 TMP 변화를 Figure 3-45에 나타냈다. 10 kDa과 30 kDa의 경우 TMP는 각각 7.6 psi와 7.2 psi를 나타냈고, 100 kDa과 300 kDa의 경우 각각 6.2 psi와 5.9 psi을 나타내어 MWCO가 클수록 큰 세공으로 인하여 TMP는 낮게 측정됨을 알 수 있었다. 플럭스($\text{g}/\text{min}\cdot\text{m}^2$) 변화에 대한 실험 결과는 Figure 3-46에 나타냈다. MWCO 10 kDa을 사용한 경우 플럭스($\text{g}/\text{min}\cdot\text{m}^2$)는 증가하기 시작하여 2.2분에 $290(\text{g}/\text{min}\cdot\text{m}^2)$ 으로 최대를 나타냈고, 서서히 감소하여 6.7분부터 $270(\text{g}/\text{min}\cdot\text{m}^2)$ 으로 정상상태를 유지하다 56.2분에 농축이 완료되었다. 30 kDa을 사용한 경우 플럭스는 여과 시작 후 1.2분에 $850(\text{g}/\text{min}\cdot\text{m}^2)$ 으로 최대값을 나타냈으며, 서서히 감소 후 22.2분에 농축이 완료되었다. 100 kDa을 사용한 경우 플럭스는 1.7분에 $2730(\text{g}/\text{min}\cdot\text{m}^2)$ 으로 최대 플럭스를 나타냈으며 5.7분부터 $2450(\text{g}/\text{min}\cdot\text{m}^2)$ 으로 서서히 감소하다가 6.2분에 농축이 완료되었다. 300 kDa을 사용한 경우 플럭스는 여과 1.7분에 $3250(\text{g}/\text{min}\cdot\text{m}^2)$ 으로 최대를 나타냈고 5.2분까지 $2820(\text{g}/\text{min}\cdot\text{m}^2)$ 으로 서서히 감소하였으며 5.7분에 이르러 농축이 완료되었다. 일반적으로 플럭스는 여과의 시간이 경과함에 따라 저하되며 일정시간을 경과하면 정상상태가 유지되는데 이러한 이유는 막 표면의 sublayer의 형성과 제거 속도가 일정하게 유지되기 때문이다. 상기 결과로부터 막의 MWCO가 커질수록 큰 세공으로 인하여 플럭스는 증가하고, 농축하는데 걸리는 시간도 단축됨을 알 수 있었다.

단백다당체 분리와 농축 여부를 확인하고자 HPLC를 이용하여 분석한 후 결과를 Table 3-15에 나타냈다. 단백다당체는 10 kDa과 30 kDa 사용 시 농축액(retentate)에서 표준물질과 같은 7.2분대에 peak가 나타났고, 여액(permeate)에서는 검출되지 않아 분리가 잘됨을 알 수 있었다. 또한 농축 전의 시료와 비교 시 각각 3배와 2.7배 농축되어 비교적 농축이 잘됨을 확인할 수 있었다. 100 kDa과 300 kDa 사용시 농축액과 여액 모두 표준물질과 같은 시간대에 peak가 나타나 단백다당체 일부가 여액으로 빠져나옴을 확인할 수 있었고, 농축 전 시료와 비교시 약 1.8과 1.7배 각각 농축되어 단백다당체 분리와 농축에는 적절하지 못한 것을 알 수 있었다.

막 분리와 농축 여부 재확인 실험을 하고자 한외여과 막을 MWCO 30 kDa과 100 kDa을 사용하여 10배 농축 후 결과를 Figure 3-47와 Table 3-16에 나타냈다. 30 kDa을 사용한 경우 플럭스($\text{g}/\text{min}\cdot\text{m}^2$)는 여과 시작 1분 후 $1120(\text{g}/\text{min}\cdot\text{m}^2)$ 으로 최대값을 나타냈고 3분에 이르러 정상상태를 유지하기 시작하여 10배 농축되는데 약 28분 걸렸다. 100 kDa을 사용한 경우 플럭스는 여과 시작 2분에 $1780(\text{g}/\text{min}\cdot\text{m}^2)$ 으로 최대값을 나타냈고 서서히 감소 후 16분에 농축이 완료되었다. 상기결과로부터 30 kDa보다 한계분자량이 큰 100 kDa에서 플럭스가 높고, 농축하는데 요구된 시간도 짧은 것을 알 수 있었다.

30 kDa의 경우 단백다당체 함량은 농축액에서 $0.667\text{ mg}/\text{mL}$ 이 측정되어 농축 전 보다 약 9.3배 농축되었고, 여액에서는 검출이 되지 않아 농축과 분리가 잘됨을 확인할 수 있었다. 100 kDa의 경우 단백다당체 함량은 농축액과 여액에서 각각 $0.369\text{ mg}/\text{mL}$ 와 $0.043\text{ mg}/\text{mL}$ 이 검출되어 단백다당체 분리와 농축에는 적절하지 않음을 재확인 할 수 있었다. 따라서 차가버섯 단백다당체 분리와 농축을 위한 적절한 한외여과막의 MWCO는 30 kDa으로 선정하였다.

(2) 압력 변화에 따른 단백다당체(EPS) 분리

막 분리 공정 중 플럭스($\text{g}/\text{min}\cdot\text{m}^2$)의 감소는 시료를 효율적으로 분리할 수 없는 제한요인 중의 하나이다. 일반적으로 플럭스는 막 횡단압력이 증가함에 따라 증가하나, 막 횡단압력이 증가해도 더 이상 플럭스가 비례적으로 증가하지 않는 것은 막 분리 공정이 진행됨에 따라 막 표면에 침착된 물질이 서서히 농축되어 용액의 점성이 증가하고, 막 표면에 농도분극 현상이 일어나기 때문이다. 즉 플럭스는 막 횡단 압력과 용액의 농도, 막 투과도와 온도 등에 영향을 받는다.

본 연구에서는 압력을 달리한 후 실제 작동되는 압력(TMP)과 플럭스 변화를 관찰한 후, 적절한 적용압력을 선정하고자 하였다. 상기 실험결과로부터 한외여과막의 MWCO는 30 kDa를 사용하였고, 시료는 부피를 기준으로 10배 농축하였으며, 실험결과를 Figure 3-48 와 Figure 3-49에 나타냈다. 압력을 5 psi와 10 psi로 적용 시 실제 작동되는 TMP는 각각 2.5 psi와 4.9 psi이었고, 15와 20 psi로 작동 시 각각 7.4 psi와 9.9 psi를 나타냈다. 플럭스 변화는 5 psi로 운전 시 여과가 시작되는 1.7분에 190 Unit으로 최대값을 나타낸 후 서서히 감소하여 148분에 110 ($\text{g}/\text{min}\cdot\text{m}^2$)을 나타내 정상상태를 유지한 후 162.7분에 농축이 완료되었다. 10 psi로 운전 시 1.7분에 300 ($\text{g}/\text{min}\cdot\text{m}^2$)으로 최대값을 나타냈고 서서히 감소하며 정상상태를 유지하다 104.7분에 농축이 완료되었다. 15 psi로 운전 시 플럭스는 1.7분에 410 ($\text{g}/\text{min}\cdot\text{m}^2$)으로 최대값을 나타냈고, 서서히 감소한 후 79.2분에 농축이 완료되었으며, 20 psi로 운전 시 1.2분에 430 ($\text{g}/\text{min}\cdot\text{m}^2$)으로 최대를 나타냈고 67.2분에 농축이 완료되었다. 상기 결과로부터 플럭스는 압력이 증가할수록 증가하고 농축시간은 단축됨을 알 수 있었다. 이러한 현상은 막 표면에 침착된 농도분극 변화로 설명할 수 있다. 낮은 막 횡단 압력에서 막 분리 공정이 진행되는 동안 막 표면에서의 용질의 침착율은 낮으며 생성된 농도분극도 그다지 높지 않다. 따라서 한외여과 공정의 주요 구동력인 막 횡단 압력이 증가함에 따라 막을 통과하는 물질의 속도가 빨라져 플럭스가 증가하게 된다. 시료를 10배 농축 시 압력 변화를 달리 한 후 단백다당체 함량을 비교하여 Table 3-17에 나타냈다. 단백다당체 함량은 농축 전 0.131 mg/mL에서 1.291 mg/mL-1.302 mg/mL로 측정되어 약 10배 농축됨을 확인할 수 있었다. 또한 압력이 높아질수록 단백다당체 함량이 미미하게 감소하는 경향을 나타냈는데, 높은 압력으로 운전 시 막 표면에 용질이 침착되었기 때문으로 판단되었다. 따라서 본 연구에 사용된 한외여과 시스템의 경우, 단백다당체 분리와 농축을 위한 적용 압력은 최대 허용압력인 20 psi 보다 낮은 15 psi로 작동하는 것이 효율적이라고 생각되었다.

(3) 단백다당체(EPS) 농축 후의 회수율 비교

차가버섯 균사체 배양액으로부터 균체를 분리한 배양액(EPS)을 농축 후 단백다당체의 회수율을 비교하고자 하였다. 시료는 배양액(EPS) 1 L를 에탄올침전 후 침전물을 다시 1 L 증류수에 녹인 것과 배양액 1 L를 30 kDa과 100 kDa의 한외여과막을 이용하여 10배 농축(100 mL)한 후 농축된 시료에 다시 에탄올 침전을 한 후 침전물을 증류수 100 mL에 녹여 준비하였고 실험결과를 Table 3-18에 나타냈다. 배양원액(EPS)의 농축 전 후의 단백다당체 함량은 각각 0.070 mg/mL과 0.067 mg/mL로 회수율은 95.7%로 높게 나타났다. 한외여과 막을 이용한 실험결과, 30 kDa을 사용한 경우 원액(배양액)과 비교 시 단백다당체 함량은 약 0.667 mg/mL로 약 9.5배 농축됨을 알 수 있었고, 에탄올 침전 후의 단백다당체 함량은 0.655 mg/mL로 회수율이 98.3%로 손실율은 매우 낮음을 알 수 있었다. 또한 chromatogram에서 농축된 용액과 에탄올 침전된 용액의 경우 단백다당체가 검출

되는 같은 시간대에 peak가 나타났고, 상징액의 경우 단백다당체는 모두 침전되어 저분자의 당류의 peak만 나타남을 확인할 수 있었다.

100 kDa을 사용한 경우 단백다당체 함량은 원액과 비교 시 0.369 mg/mL로 약 5.3배 농축되어 감소되었으나 손실된 단백다당체는 큰 세공으로 인하여 여액으로 빠져나갔음을 앞에서 서술한 바 있다. 또한 에탄올 침전 후의 단백다당체 함량은 0.346 mg/mL로 회수율이 98.66%로 손실율은 거의 없음을 알 수 있었다. Chromatogram에서 농축액과 에탄올 침전액 역시 단백다당체 시간대에 peak가 나타났으며, 에탄올 침전한 상징액의 경우 단백다당체는 침전되어 단당류의 peak가 나타남을 확인할 수 있었다. 또한 농축 전 후의 실험결과 단백다당체 수율은 농축 후 높은 경향을 나타냈는데 농축 전 시료의 경우 단백다당체 함량이 낮아 오차가 크기 때문으로 판단된다. 따라서 상기 실험결과로부터 막을 이용한 농축 후 에탄올 침전 시 단백다당체의 회수율은 98%이상으로 높음을 알 수 있었다.

바. Gel filtration column chromatography에 의한 단백다당체(EPS) 분획

막을 이용하여 분리한 단백다당체를 분자량 크기로 분획하기 위하여 Sepharose CL-4B(MWCO: 10^4-10^6)를 충전제로 한 gel filtration을 행하였다. 단백다당체의 표준물질인 메시마와 차가버섯 균사체 배양액(EPS)의 분석결과를 Figure 3-50 와 Figure 3-51에 나타냈다. 두 시료 모두 3개의 peak가 나타났다. 메시마의 경우 peak가 60-116분(No. 16-28), 176-196분(No. 45-49)과 196-204분(No. 50-51)에서 나타났고, 조단백다당체(EPS)의 경우 peak가 60분-116분(No. 16-28), 124-160분(No. 32-40)과 160-176분(No. 41-44) 분획에서 나타났으며, 이중 가장 높은 peak인 첫 번째 분획(No. 16-28)은 표준물질과 같은 시간대에 검출되어 단백다당체라고 판단되었다. 상기 결과로부터 분획된 각각의 시료들이 단백다당체임을 확인하기 위해 GPC column을 이용하여 분석 하였으며 결과를 Figure 3-52에 나타냈다. 실험결과 16-28번 분획은 표준물질의 단백다당체와 같은 시간대에 검출되어 단백다당체임을 확인할 수 있었고, 2번과 3번 분획은 시간대가 뒷부분에서 용출되어 저분자의 당류로 추측되었다.

이 컬럼으로는 많은 양의 시료를 분획할 수 없으며 처리시간이 긴 단점이 있어 이를 보완하고자 Shodex(Japan)사의 SB 2000(20 mm×300 mm)을 사용하여 gel filtration을 행하였으며 그 결과를 Figure 3-53에 나타냈다. 먼저 SB 2000 column의 분획을 위한 flow rate를 찾기 위해 2-2.5 ml/min 사이에서 실험한 결과 2.2 ml/min이 시간과 peak 분리 면에서 가장 적합하다고 생각하여 flow rate를 2.2로 하여 실험을 진행하였다(Figure 3-54). 실험 결과 44-52분, 52-97분, 97-138분과 138-150분에서 4개의 peak가 검출되어 각 peak 별로 분획하였다. 분획된 각각의 시료들이 단백다당체임을 확인하기 위해 GPC column을 이용하여 분석 하였으며 결과를 Figure 3-55에 나타냈다. 이 때 원시료와 비교하기 위해서는 증류수 1 mL에 녹여 분석해야 하지만 1 mL에 녹일 시 1 mL을 모두 회수하는 것이 어려워 2 mL에 녹여 분석하였다. 실험결과 52-97분의 분획은 표준물질의 단백다당체와 같은 시간대에 검출되어 단백다당체임을 확인할 수 있었고, 97-138분의 분획은 시간대가 뒷부분에서 용출되어 저분자의 당류로 추측되었다. 그리고 44-52분과 138-150분에서의 분획은 아무런 peak를 보이지 않았는데 이는 너무 적은 함량으로 인해 측정이 되지 않았다고 생각되었다. 또한 97-138분의 분획의 경우 앞부분대의 시간대에서도 용출이 됨에 따라 좀 더 세밀한 분획이 요구되었다. 따라서 단백다당체라고 판단되어지는 52-97분의 분획을 중심으로 좀 더 세밀한 분획을 통해 고순도의

단백다당체를 분리하고자 한다.

차가버섯 균사체 배양액으로부터 균체를 분리한 후 gel filtration을 이용한 분획과정 중 각 단계 별 단백질 수율을 비교하여 Table 3-19에 나타냈다. 수율은 lab-scale에서 규모 확대를 하는데 중요한 변수 중의 하나이다. 원액 중의 단백질 함량은 8.62 mg/L이었고, 에탄올 침전과 gel filtration 후의 단백질 함량은 각각 8.00 mg/L과 7.4 mg/L로 수율은 92.7%에서 89.8%로 비교적 높은 수치를 나타냈다. 그러므로 발효 후 단백질의 순수분리는 농축 단계에서 부피를 최대한 줄이고, 그 후 에탄올 침전의 방법이 최적으로 생각되었다. 시료는 -70°C 가 유지되는 동결건조기를 사용하여 압력 10^{-1} mbar로 48시간 동안 운전하여 건조하였다(Figure 3-4).

사. FT-IR 분석

유기분자들의 정성분석이나 구조결정에는 가시광선 보다 파장이 긴 적외선 영역($4000-400\text{ cm}^{-1}$)에서 에너지 흡수로 일어나는 분자 진동에너지를 나타낸 스펙트럼이 널리 사용된다. 즉, FT-IR 스펙트럼은 화합물 내의 결합 기능기들이 적외선 영역중의 특정파장에너지를 흡수하여 진동(Vibration), 신축(Stretching), 굽힘(Bending) 운동을 하는 성질을 이용하여 분자의 결합구조와 분광학적 성질을 측정할 수 있다. 따라서 관능기 확인 및 신물질 의약품 개발 등에 많이 이용되고 있다.

본 연구에서는 gel filtration으로부터 분획된 시료(단백다당체)가 어떤 작용기를 가지고 있는지 표준물질과 비교 관찰 하고자 하였다. 표준물질(Mesima)과 시료를 KBr과 함께 박막으로 조제하여 비교한 spectrum을 Figure 3-56에 나타냈다. 각 peak의 작용기는 $3300-3400\text{ cm}^{-1}$ 에서 당 고리의 전형적인 O-H의 stretching 진동이 일어났으며, 2900 cm^{-1} 부근에서 C-H stretching 진동이, 1650 cm^{-1} 에서 C=O stretching 진동이, $1000-1200\text{ cm}^{-1}$ 에서는 C-H와 C-O bending 진동이 일어나는 대부분의 피크가 표준물질과 일치하여 분리된 시료는 단백질임을 확인할 수 있었다. 또한 $1000-1200\text{ cm}^{-1}$ 의 영역은 다당류를 포함하는 탄수화물의 전문영역이라고 인정되고 있으며, 버섯 중에서 추출된 다당류에는 대부분 나타난다고 알려져 있다. 또한 Vlasta 등은 표고, 영지, 느타리버섯 등 약 70여 종의 버섯에 대한 FT-IR 패턴 연구에서 890 cm^{-1} 영역은 β -glycosidic linkage를 나타내며, 930 cm^{-1} 은 α -glycosidic linkage를 나타낸다고 보고하였는데, 본 연구에서 추출한 시료의 경우 표준물질(Mesima)과 달리 β -glucan을 나타내는 890 cm^{-1} 영역에서 진동이 일어남을 알 수 있었다.

아. 분리를 위한 공정 흐름도

차가버섯균사 발효 후 단백질을 분리하기 위한 전체공정의 흐름도를 작성하여 Figure 3-57에 나타냈다. 발효기 1 ton을 기준으로 각 필요한 장비들의 제원을 제시하였다. 균체에 존재하는 단백질(EPS)과 발효 배양액에 존재하는 단백질(IPS)의 흐름을 구분해서 공정 흐름도를 작성하였다.

3. 연구결과 요약

본 연구에서 자실체로부터 단백질의 추출조건인 열수추출 시 최적의 추출온도, 추출시간과 추출용매비는 각각 100°C , 3시간과 1:7.5 이었다. 초음파 추출의 경우, 최적의 추출온도는 온도가 높아질수록 당과 단백질 함량은 높게 측정이 되었고, 추출시간은 4시간이 가장 효과적이었다. 그러나 열수추출과 비교 시 상당히 낮은 추출효율을 나타내었으며, 초음파추출은 적절한 추출방법이 아닌

것으로 생각되었다. 전자파를 이용할 경우, 단백다당체추출의 최적 추출온도와 시간은 각각 180℃와 1시간이었다. 이는 열수추출과 초음파추출을 비교하여 각각 1.6배와 2.5배 향상된 결과이다.

군사체로부터 열수추출의 경우 단백다당체의 추출조건은 자실체 추출조건에서 확립된 온도 100℃와 용매비 1:7.5이었다. 그리고 추출시간 2시간경과후 당과 단백질 함량은 4.5와 4.9%로 가장 높은 값을 나타냈으며, 그 후 추출시간이 길어지면 서서히 감소하는 경향을 나타냈다. 초음파 추출에 의한 최적조건을 확립하기 위해 실험을 수행한 결과, 자실체와 마찬가지로 추출온도가 높을수록 당과 단백질 함량은 높게 측정되었다. 4시간 추출의 경우 당과 단백질 함량은 각각 5.1%와 5.22%로 가장 높은 수치를 나타냈다. 군사체의 경우 전자파를 이용한 단백다당체 추출 시 최적의 온도와 시간은 자실체와 달리 150℃와 2시간이었으며, 당과 단백질함량이 각각 5.1%와 7.1%로 높게 측정되었다.

추출공정에서 고압과 고온으로 추출하는 경우, 열에 약하거나 휘발성이 강한 유효성분이 파괴되거나 반대로 유해한 성분의 용출 가능성이 있다. 상기 문제점들을 해결하기 위해 2단계 추출 방법을 수행하였다. 자실체인 경우 1차 추출 후 2차 추출 시 전처리 후 전자파추출 조건에 따른 당과 단백질 함량은 150℃에서 2시간 2차 추출 시 15.4%와 18.3%로 열수 추출 시 보다 약 15배 향상됨을 알 수 있었다. 군사체의 경우 자실체와 마찬가지로 1차와 2차 추출을 같은 조건으로 하여 당과 단백질 함량을 비교한 결과, 150℃에서 5시간 추출 시 당과 단백질 함량은 5.6%와 12.4%로 다른 조건에 비해 가장 높게 측정되었다.

여러 종류(상황, 송이와 차가)의 버섯 자실체와 군사체에 대해 Ultrahydrogel 1000 column을 사용하여 단백다당체를 분석한 실험결과 대략 8.3분에서 단백다당체가 분리됨을 확인할 수 있었다. 그리고 표준물질로 사용한 메시마는 단백다당체와 단당류가 혼합되어 있으며, 상황버섯 단백다당체로 알려진 STR 제품은 순수한 단백다당체로 구성되어 있었다. 차가버섯의 군사체 1단계 추출 보다는 2단계 추출의 경우 단백다당체 함량이 높게 측정되었다. 그리고 균체를 분리한 배양여액에서도 상당한 단백다당체 함량이 측정되었다. 자실체의 경우는 1단계 추출보다 2단계 추출이 단당류의 함량이 줄어드는 것을 알 수 있었다. 1차 추출에서 단당류가 어느 정도 제거된 이유로 판단되었다.

또한 다양한 전처리 후 단백다당체 추출을 위해 효소처리와 기계적인 방법 등을 통한 단백다당체의 추출향상을 연구하였다. 효소처리에 의한 최적의 단백다당체 추출 조건은 셀룰라제 효소농도 0.5%로 처리 후 100℃에서 1시간동안 추출된 잔사를 전자파에서 20분 추출한 경우였다. 이러한 결과는 효소를 처리 하지 않은 것보다 단백다당체 분리가 약 1.5배 향상됨을 알 수 있었다.

기계적인 방법으로는 균체파쇄를 통한 전처리 후 초미세 분쇄기를 이용했을 때 대부분의 균체가 파쇄됨을 확인할 수 있었다. 자실체의 경우 코리아메디(주)의 KMS-200을 이용해 분쇄한 시료는 1차 추출 15.77 mg/g과 2차 추출 27.17 mg/g으로 총 42.94 mg/g이 추출되어 한국에너지 기술(주)의 HKP-05를 이용해 분쇄한 시료의 1차 추출 11.13 mg/g과 2차 추출 20.12 mg/g으로 총 31.25 mg/g이 추출된 것 보다 1차, 2차 추출 모두 높은 추출함량을 보였다. 군사체의 경우 코리아메디(주)의 KMS-200을 이용해 분쇄한 시료는 1차 추출 21.07 mg/g과 2차 전자파 추출 40.96 mg/g으로 총 62.03 mg/g이 추출되었으며, 한국에너지 기술(주)의 HKP-05를 이용해 분쇄한 시료는 1차 추출 25.6 mg/g과 2차 전자파추출 38.16 mg/g으로 총 63.76 mg/g이 추출되어 거의 비슷한 함량을 보였다. 실험 결과 한국에너지 기술(주)의 HKP-05와 코리아메디(주)의 KMS-200을 이용해 분쇄하였을 때 두 시료로부터 추출된 단백다당체의 함량은 비슷하다는 것을 알 수 있었다. 전자파를 이용해 추출하는

과정에서 고열로 인해 시료가 타는 일이 발생하여 추출된 단백다당체의 함량이 낮은 경우도 있었다. 시료가 타는 문제해결을 위해 추출온도 150°C에서 추출시간을 조절하는 것이 중요하다고 생각되었다.

막을 이용한 효율적인 단백다당체 분리를 위한 한계 분자량과 압력은 각각 30 kDa과 15 psi이었으며, gel filtration column 크로마토그래피에 의한 단백다당체(EPS)를 분획하기 위하여 Sepharose CL-4B(MWCO; 10^4 - 10^6)를 충전제로 gel filtration을 수행한 결과, 가장 높은 peak인 첫 번째 분획(No. 16-28)이 표준물질과 같은 시간대에 검출되어 단백다당체라고 판단되어졌다. 상기 결과로부터 분획된 각각의 시료들이 단백다당체임을 확인하기 위해 GPC column을 이용하여 분석하였다. 결과적으로 16-28번 분획은 표준물질의 단백다당체와 같은 시간대에 검출되어 단백다당체임을 확인할 수 있었다. 그러나 이 컬럼으로는 많은 양의 시료를 분획할 수 없으며 처리시간이 긴 단점이 있어 이를 보완하고자 Shodex(Japan)사의 SB 2000(20 mm×300 mm)을 사용하여 gel filtration을 행하였다. 먼저 SB 2000 column의 분획결과 44-52분, 52-97분, 97-138분과 138-150분에서 4개의 peak가 검출되어 각 peak 별로 분획하였다. 52-97분의 분획은 표준물질의 단백다당체와 같은 시간대에 검출되어 단백다당체임을 확인할 수 있었고, 97-138분의 분획은 시간대가 뒷부분에서 용출되어 저분자의 당류로 추측되었다.

차가버섯 균사체 배양액으로부터 균체를 분리한 후, gel filtration을 이용한 분획과정 중 각 단계별 단백다당체 수율은 lab-scale에서 규모 확대를 하는데 중요한 변수 중의 하나이다. 원액 중의 단백다당체 함량은 8.62 mg/L이었고, 에탄올 침전과 gel filtration 후의 단백다당체 함량이 각각 8.00mg/L과 7.4 mg/L로 수율은 92.7%에서 89.8%로 비교적 높은 수치를 나타냈다. 그러므로 발효 후 단백다당체의 순수분리는 농축 단계에서 부피를 최대한 줄이고, 그 후 에탄올 침전의 방법이 최적으로 생각되었다.

FT-IR 스펙트럼은 화합물 내의 결합 기능기들이 적외선 영역중의 특정파장에너지를 흡수하여 진동(Vibration), 신축(Stretching), 굽힘(Bending) 운동을 하는 성질을 이용하여 분자의 결합구조와 분광학적 성질을 측정할 수 있다. 따라서 gel filtration으로부터 분획된 시료(단백다당체)가 어떤 작용기를 가지고 있는지 알아보기 위해 FT-IR 스펙트럼을 이용하여 실험을 수행하였다. 분석 결과, O-H, C-H, C=O와 CH, C=O bending등 표준물질과 같은 작용기를 가지고 있어 단백다당체임을 확인되었다. 또한 Vlasta 등은 표고, 영지, 느타리버섯 등 약 70여 종의 버섯에 대한 FT-IR 패턴 연구에서 890 cm^{-1} 영역은 β -glycosidic linkage를 나타내며, 930 cm^{-1} 은 α -glycosidic linkage를 나타낸다고 보고하였는데, 본 연구에서 추출한 시료의 경우 표준물질(Mesima)과 달리 단백다당체를 나타내는 890 cm^{-1} 영역에서 진동이 일어남을 알 수 있었다.

최종적으로 단백다당체를 균사체로부터 분리할 수 있는 상업화 공정을 확립하여 규모확대를 위한 방안을 제시하였다. 즉 균체와 배양액분리를 위한 압착여과, 균체 동결건조를 위한 조건, 초미세분쇄를 위한 장치, 전자파추출, 한외여과, 동결 혹은 분무건조 등의 단위공정을 발효조1톤 규모로 제시하였다.

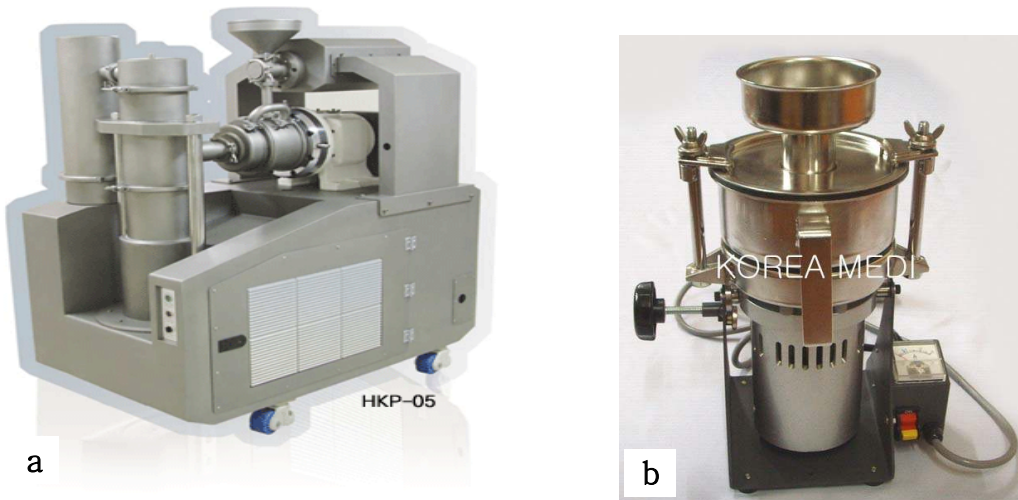


Figure 3-1. Photograph of pulverizer.

a; 한국에너지 기술(주)의 HKP-05 b; 코리아메디(주)의 KMS-200

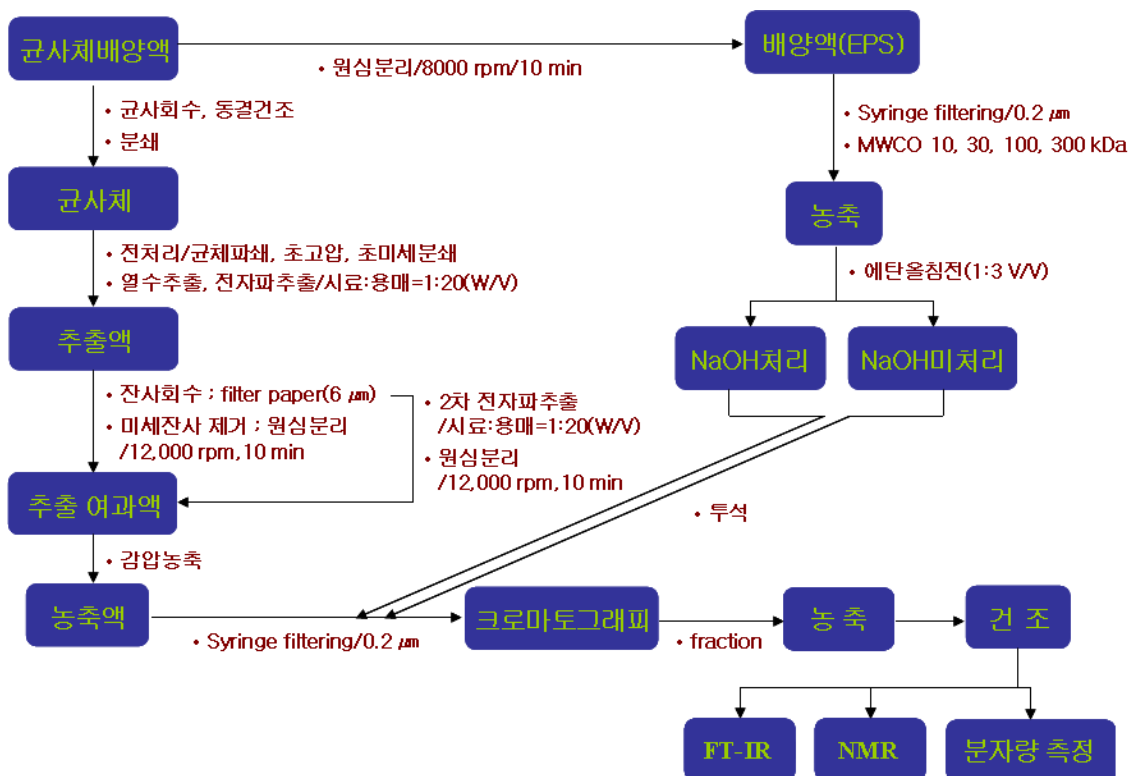


Figure 3-2. Diagram of extraction process of protein bound polysaccharides separation from *Inonotus obliquus*.

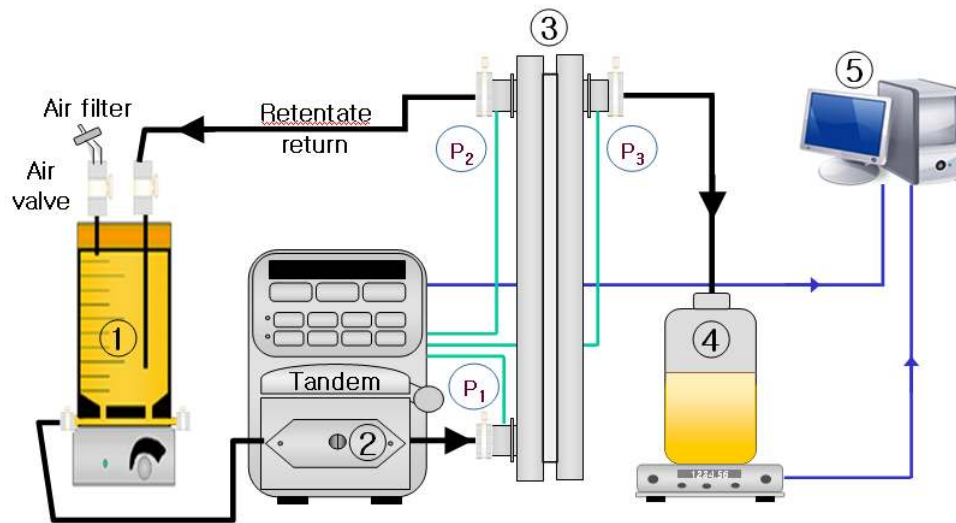


Figure 3-3. (a) Configuration of membrane system.

- 1 : Feed Tank, 2 : Peristaltic pump, 3 : Membrane module
 4 : Permeate tank, 5 : Computer, P1, P2, P3 : Pressure gage



Figure 3-3. (b) Configuration of membrane system(100 L).



Figure 3-4. Photograph of freeze dryer

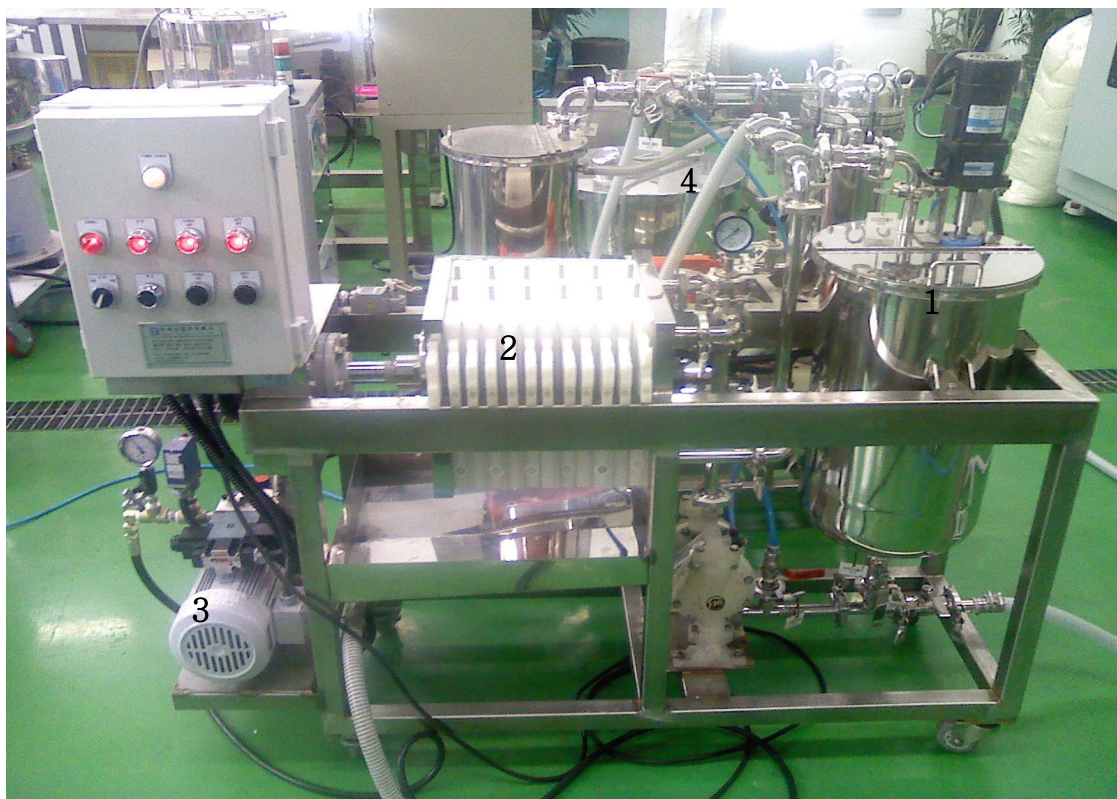


Figure 3-5. Photograph of press filter.

1 ; Feed tank 2 ; Filter 3 ; Pump 4 ; Permeate tank

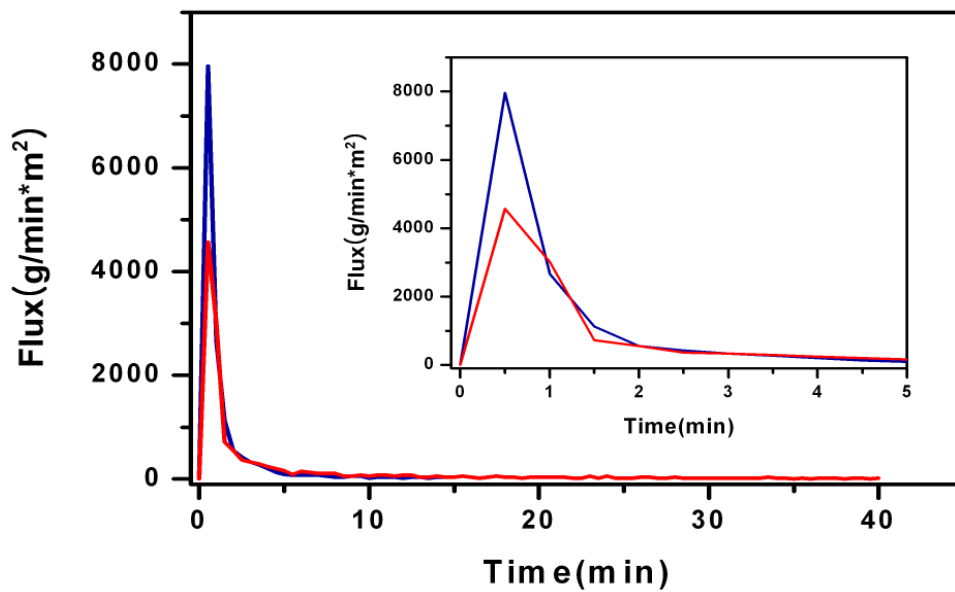


Figure 3-6. Comparison of flux with 0.2 and 0.8 μm filter paper. Filter area: 1.08 m^2
— ; 0.2 μm filter paper — ; 0.8 μm filter paper



Figure 3-7. Photograph of filtered solution after filtering with 0.2 and 0.8 μm filter paper.

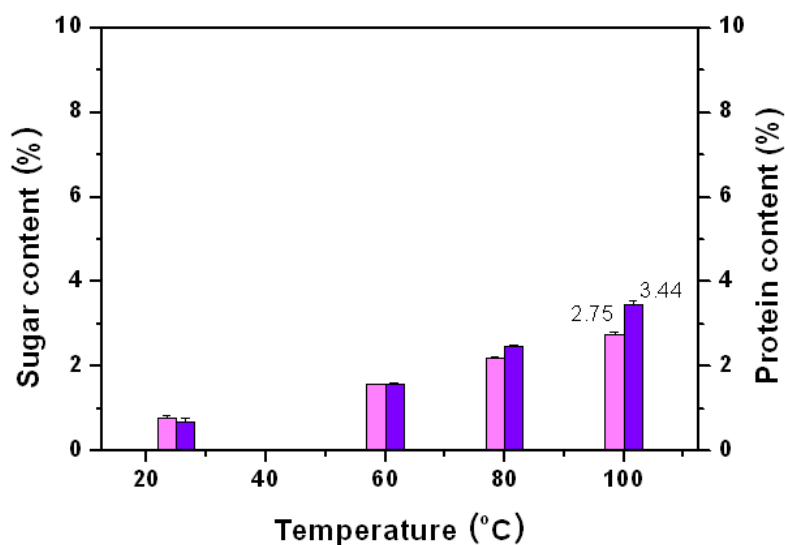


Figure 3–8. Sugar and protein content according to different temperature by hot water extraction of fruiting body of *Inonotus obliquus*. Extraction time and solvent ratios (powder : water) were 3 hours and 1:10, respectively.

■ ; Sugar content ■ ; Protein content

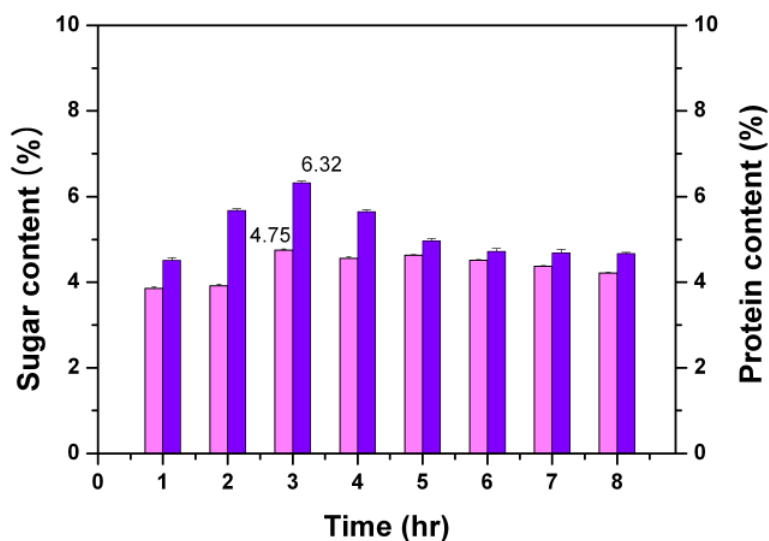


Figure 3–9. Sugar and protein content according to different time by hot water extraction of fruiting body of *Inonotus obliquus*. Extraction temperature and solvent ratios (powder : water) were 100°C and 1:10, respectively.

■ ; Sugar content ■ ; Protein content

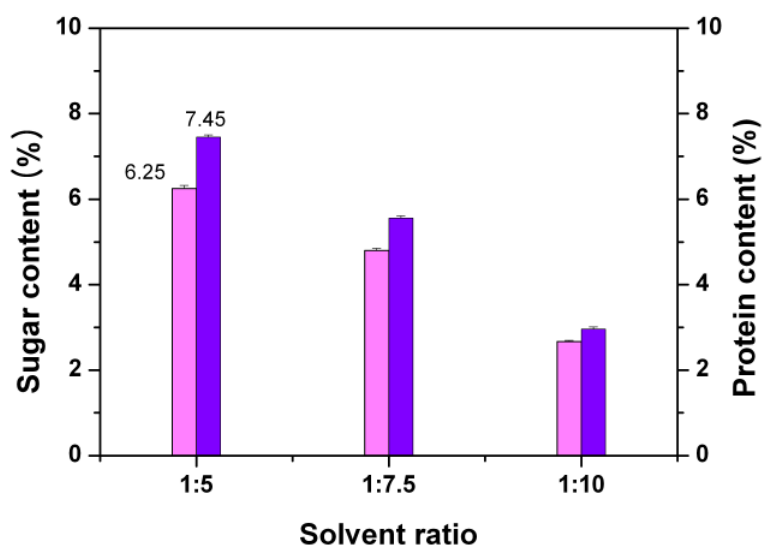


Figure 3–10. Sugar and protein content according to different solvent ratios by hot water extraction of fruiting body of *Inonotus obliquus*. Extraction temperature and time were 100°C and 3 hours, respectively.

■ ; Sugar content ■ ; Protein content

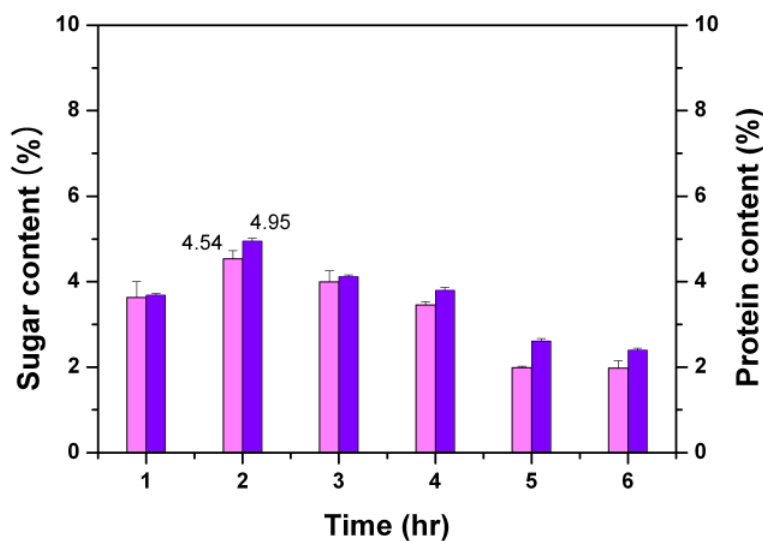


Figure 3–11. Sugar and protein content according to different time by hot water extraction of mycelium of *Inonotus obliquus*. Extraction temperature and solvent ratios (powder : water) were 100°C and 1 : 7.5, respectively.

■ ; Sugar content ■ ; Protein content

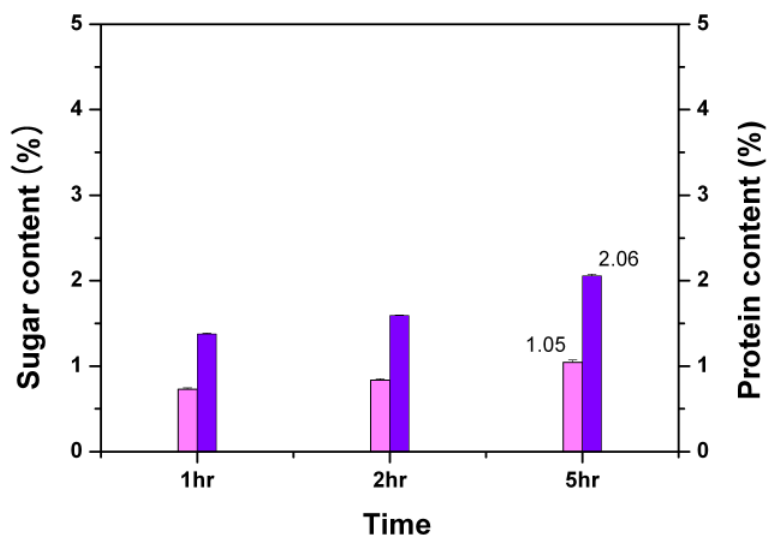


Figure 3–12. Comparison of sugar and protein content of protein bound polysaccharides of fruiting body of *Inonotus obliquus* according to hot water extraction time at 100°C. Samples are remnant after hot water extraction at 80°C for 3 hours.

; Sugar content
 ; Protein content

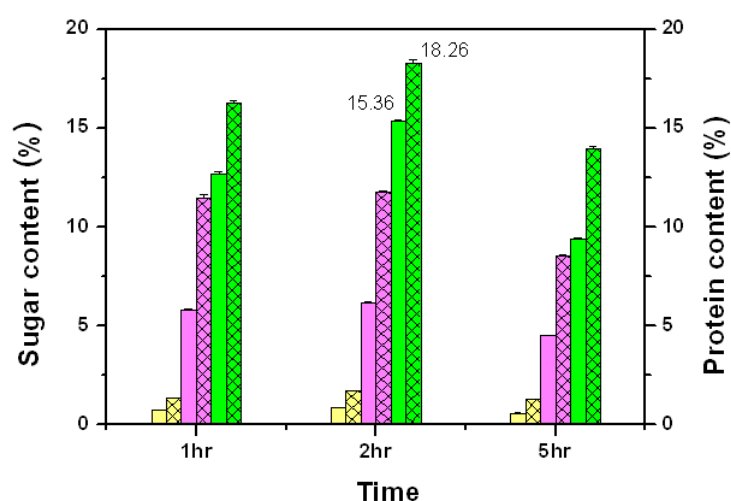


Figure 3-13(a). Comparison of sugar and protein contents of protein bound polysaccharides of fruiting body of *Inonotus obliquus* according to microwave extraction at various temperatures and times. Samples are remnant after hot water extraction at 80°C for 3 hours.

; IFR-EH-100-W
 ; IFR-EH-125-W
 ; IFR-EH-150-W
 ; Sugar content
 ; Protein content

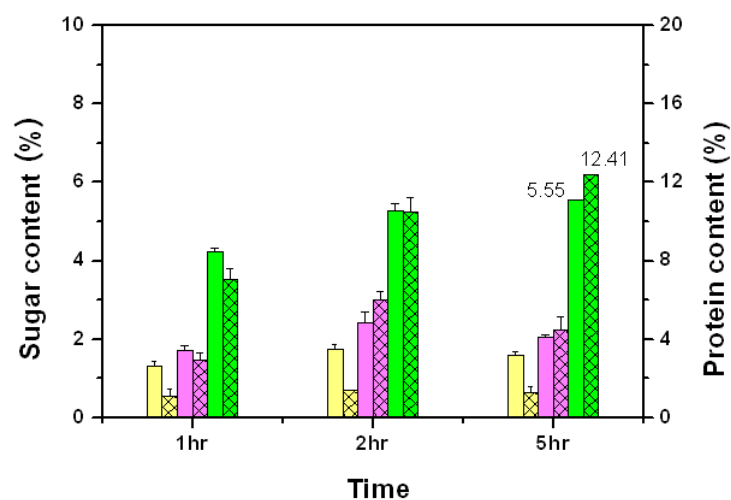


Figure 3-13(b). Comparison of sugar and protein contents of protein bound polysaccharides of mycelium of *Inonotus obliquus* according to microwave extraction at various temperatures and times. Samples are remnant after hot water extraction at 80°C for 3 hours.

; IMR-EH-100-W
 ; IMR-EH-125-W
 ; IMR-EH-150-W
 ; Sugar content
 ; Protein content

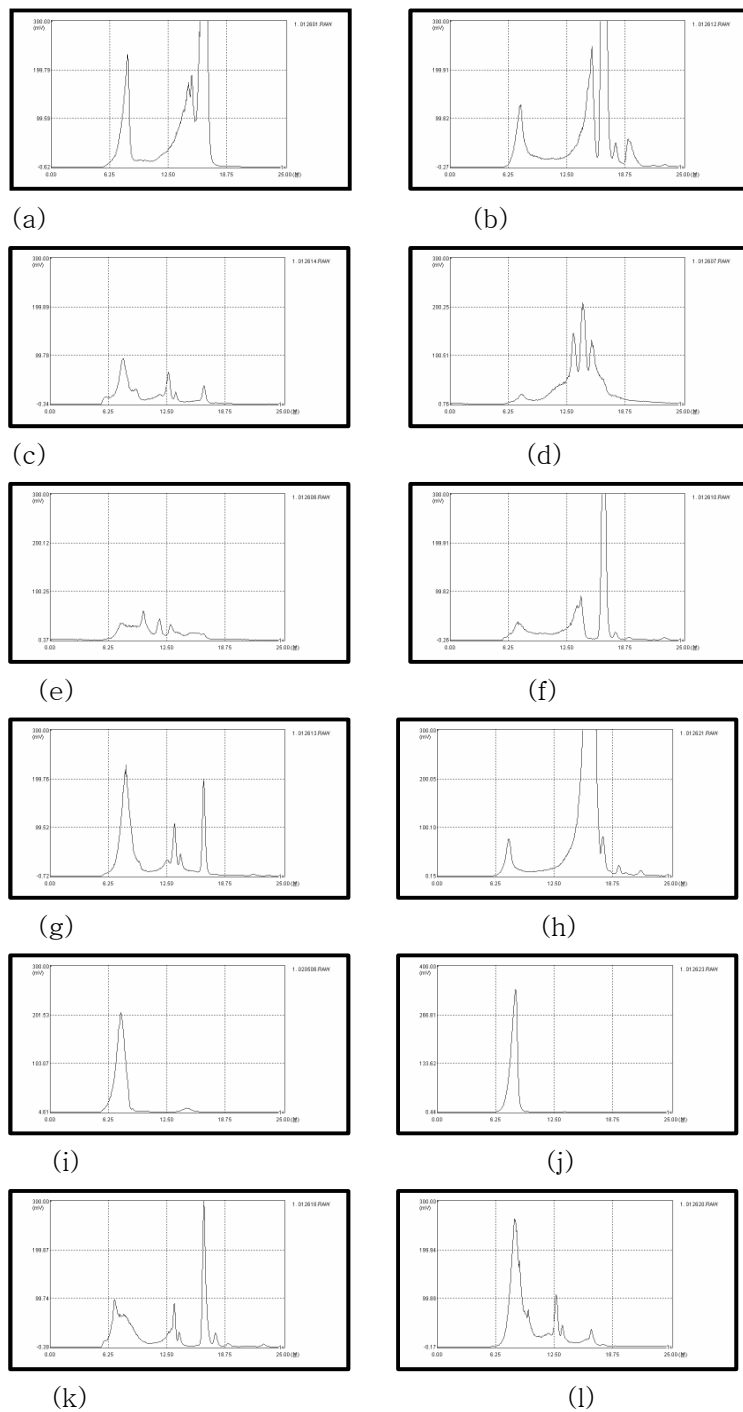


Figure 3–14. Elution of protein bound polysaccharides from various samples by using Ultrahydrogel 1000 column. Samples are: (a) Mesima(standard), (b) *Agaricus blazei Murill*; 1st extraction, (c) *Agaricus blazei Murill*; 2nd extraction, (d) Fruiting body of *Inonotus obliquus*; 1st extraction, (e) Fruiting body of *Inonotus obliquus*; 2nd extraction, (f) Mycelium of *Inonotus obliquus*; 1st extraction, (g) Mycelium of *Inonotus obliquus*; 2nd extraction, (h) Mycelium of *Inonotus obliquus*; endopolysaccharide, (i) Mycelium of *Inonotus obliquus*; endopolysaccharide (concentration), (j) STR(standard), (k) Mycelium of *phelinus linteus*; 1st extraction, (l) Mycelium

of *phelinus linteus*; 2nd extraction.

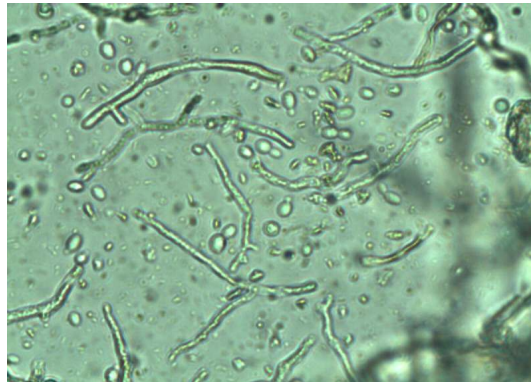


Figure 3-15. Optical microscopic($\times 400$) pictures of the *Inonotus obliquus* mycelium which was pulverized with the blender(1 min).



Figure 3-16. Optical microscopic($\times 400$) pictures of the *Inonotus obliquus* mycelium which was pulverized with the blender(2 min).



Figure 3-17. Optical microscopic($\times 400$) pictures of the *Inonotus obliquus* mycelium which was pulverized with the blender(3 min).

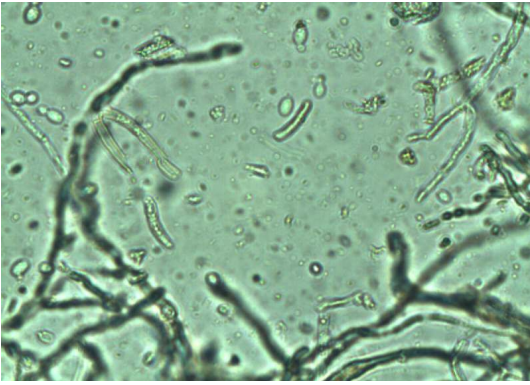


Figure 3-18. Optical microscopic($\times 400$) pictures of the *Inonotus obliquus* mycelium which was pulverized with the blender(4 min).



Figure 3-19. Optical microscopic($\times 400$) pictures of the *Inonotus obliquus* mycelium which was pulverized with the blender(5 min).



Figure 3-20. Optical microscopic($\times 400$) pictures of the *Inonotus obliquus* mycelium which was pulverized with the blender(10 min).

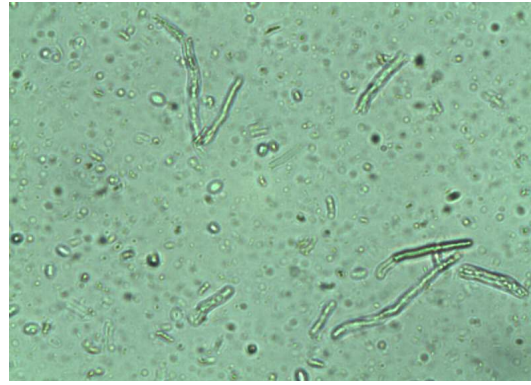


Figure 3-21. Optical microscopic($\times 400$) pictures of the *Inonotus obliquus* mycelium which was pulverized with the blender(15 min).

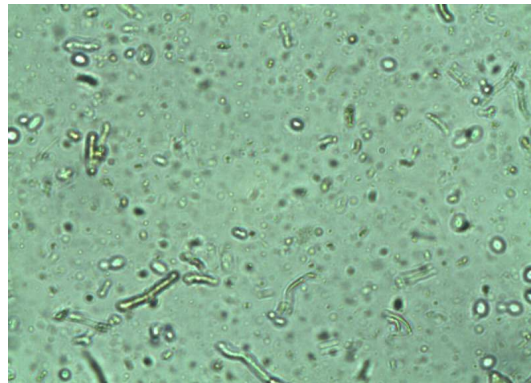
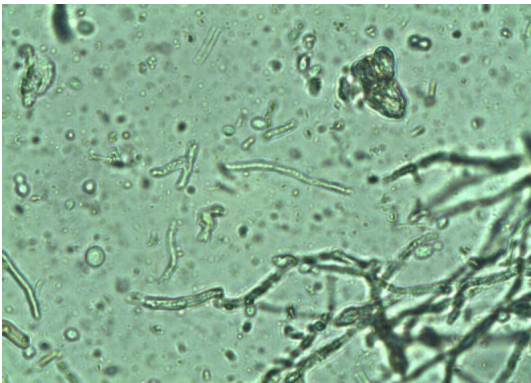


Figure 3-22. Optical microscopic($\times 400$) pictures of the *Inonotus obliquus* mycelium which was pulverized with the blender(20 min).

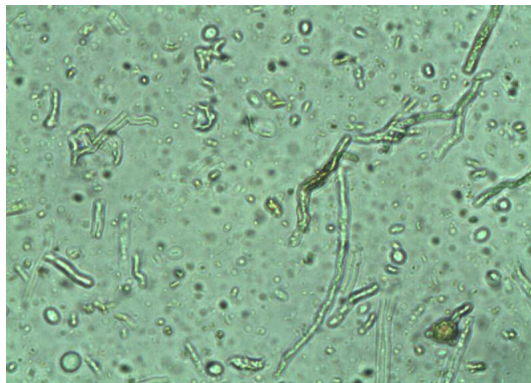


Figure 3-23. Optical microscopic($\times 400$) pictures of the *Inonotus obliquus* mycelium which was pulverized with the blender(30 min).

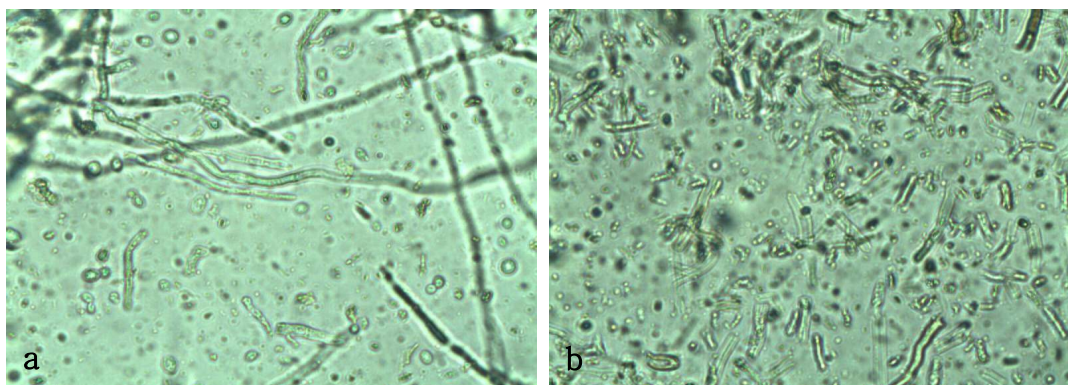


Figure 3-24. Optical microscopic($\times 400$) pictures of the *Inonotus obliquus* mycelium which was pulverized with the blender and broken with high-pressure homogenizer.

a; pulverized with the blender(15 min)

b; broken with high-pressure homogenizer after pulverized with the blender(15 min)

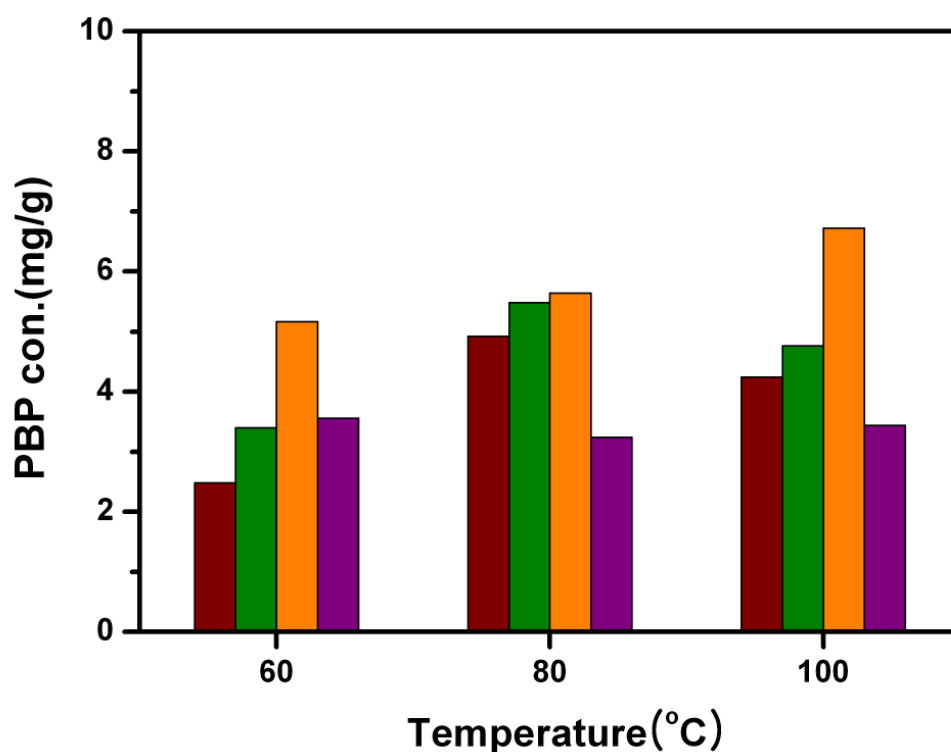


Figure 3-25. Comparison of various hot water extraction methods to extract the protein bound polysaccharides from mycelium of *Inonotus obliquus* which was broken with high-pressure homogenizer.

■ ; *IM-H-1 ■ ; IM-H-3 ■ ; IM-H-5 ■ ; IM-H-7

*Sample(IM; *Inonotus obliquus* mycelium) – Extraction condition(H; Hot Water) – Extraction time(hour).

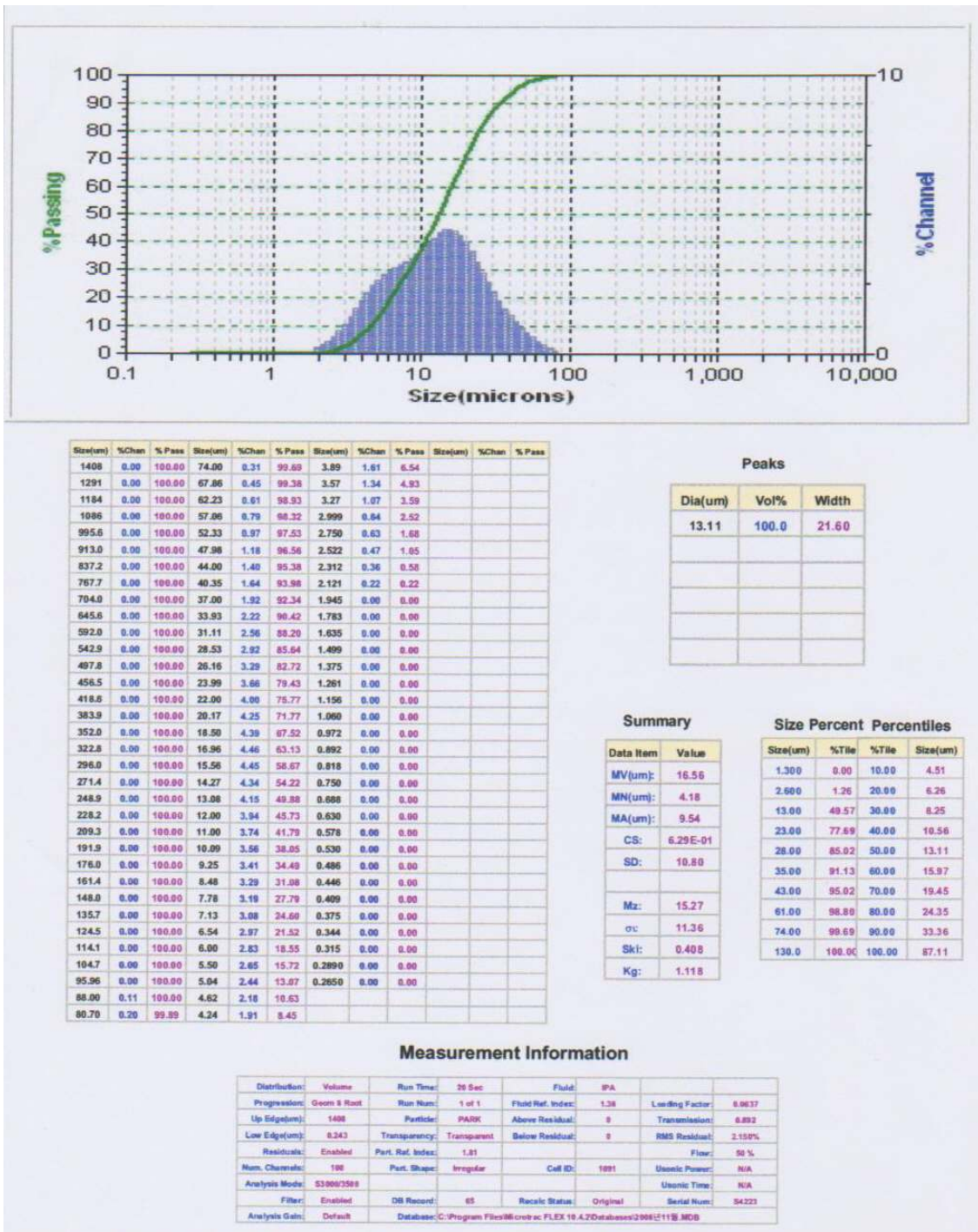


Figure 3–26. Particle size analysis of the pulverized mycelium of *Inonotus obliquus*.

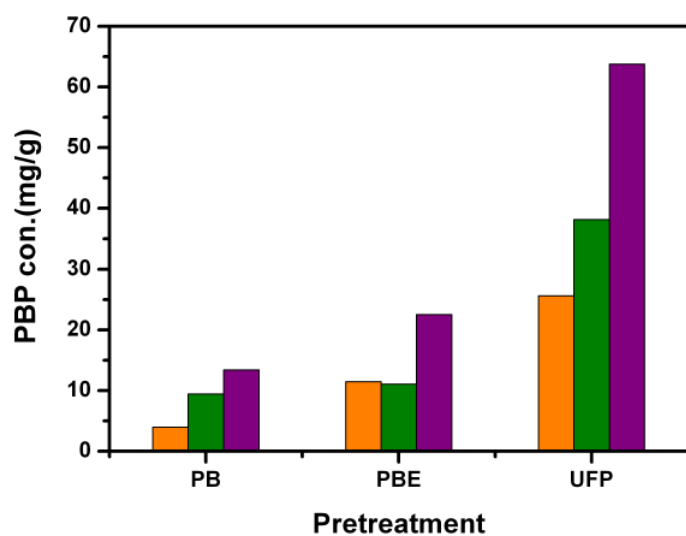


Figure 3-27. Comparison of various pretreatment methods to extract the protein bound polysaccharides from mycelium of *Inonotus obliquus*.

PB; pulverization using blender, PBE; pulverization using blender after enzyme treatment, UFP; ultra-fine pulverization

■ ; *IM-H-100-4(1st) ■ ; **IM-H-100-4-M-150-0.5(2nd) ■ ; 1st & 2nd Total

*Sample(IM; *Inonotus obliquus* mycelium) – Extraction condition(H; Hot water) – Extraction temp(°C) – Extraction time(hour).

**Sample(IM; *Inonotus obliquus* mycelium) – 1st Extraction condition(H; Hot water) – 1st Extraction temp(°C) – 1st Extraction time(hour) – 2nd Extraction condition(M; Microwave) – 2nd Extraction temp(°C) – 2nd Extraction time(hour).

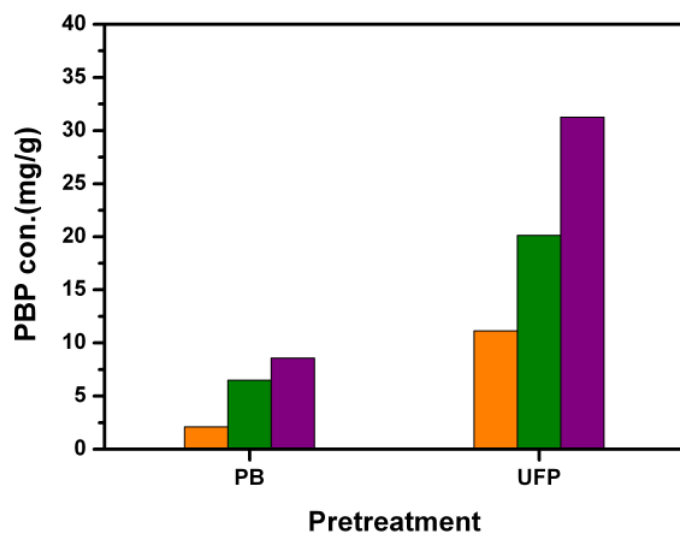


Figure 3-28. Comparison of various pretreatment methods to extract the protein bound polysaccharides from fruit body of *Inonotus obliquus*.

PB; pulverization using blender UFP; ultra-fine pulverization

■ ; *IF-H-100-4(1st) ■ ; **IF-H-100-4-M-150-0.5(2nd) ■ ; 1st & 2nd Total

*Sample(IF; *Inonotus obliquus* fruit body) – Extraction condition(H; Hot water) – Extraction temp(°C) – Extraction time(hour).

**Sample(IF; *Inonotus obliquus* fruit body) – 1st Extraction condition(H; Hot water) – 1st Extraction temp(°C) – 1st Extraction time(hour) – 2nd Extraction condition(M; Microwave) – 2nd Extraction temp(°C) – 2nd Extraction time(hour).

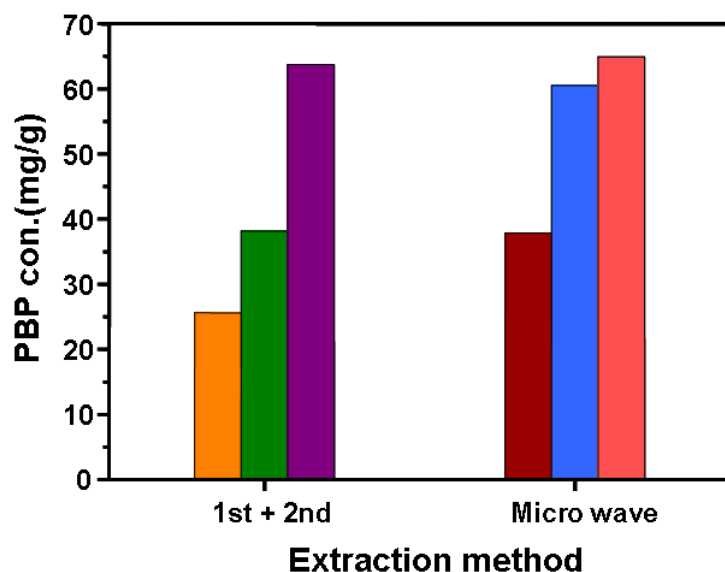


Figure 3-29. Comparison of hot water and microwave extraction method to extract the protein bound polysaccharides from mycelium of *Inonotus obliquus* which was pulverized by ultra-fine pulverizer.

■ ; *IM-U-H-100-4(1st)
 ■ ; **IM-U-H-100-4-M-150-0.5(2nd)
 ■ ; 1st & 2nd Total

■ ; *IM-U-M-150-0.25
 ■ ; *IM-U-M-150-0.5
 ■ ; *IM-U-M-150-1.0

*Sample(IM; *Inonotus obliquus* mycelium) – Sample condition(U; Ultra-fine pulverization) – Extraction condition(H; Hot water, M; Microwave) – Extraction temp(°C) – Extraction time(hour).

**Sample(IM; *Inonotus obliquus* mycelium) – Sample condition(U; Ultra-fine pulverization) – 1st Extraction condition(H; Hot water) – 1st Extraction temp(°C) – 1st Extraction time(hour) – 2nd Extraction condition(M; Microwave) – 2nd Extraction temp(°C) – 2nd Extraction time(hour).

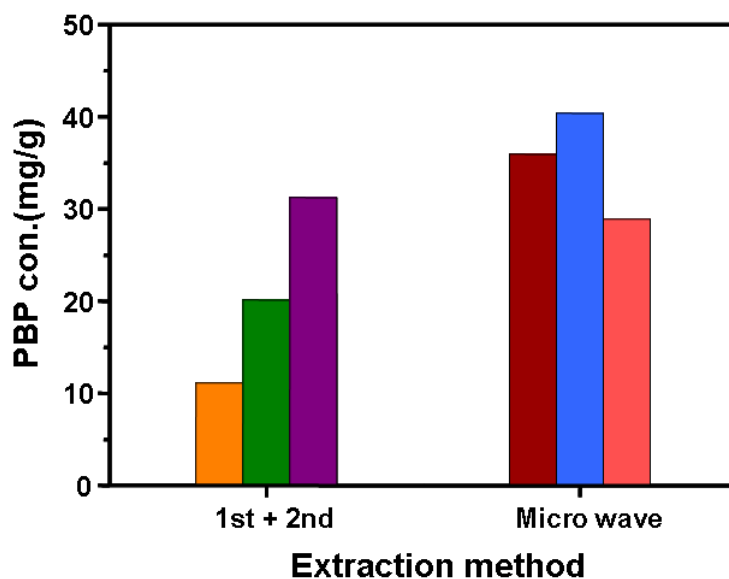


Figure 3–30. Comparison of hot water and microwave extraction method to extract the protein bound polysaccharides from fruit body of *Inonotus obliquus* which was pulverized by ultra–fine pulverizer.

■ ; *IF–U–H–100–4(1st) ■ ; **IF–U–H–100–4–M–150–0.5(2nd) ■ ; 1st & 2nd Total

■ ; *IF–U–M–150–0.25 ■ ; *IF–U–M–150–0.5 ■ ; *IF–U–M–150–1.0

*Sample(IF; *Inonotus obliquus* fruit body) – Sample condition(U; Ultra–fine pulverization) – Extraction condition(H; Hot water, M; Microwave) – Extraction temp(°C) – Extraction time(hour).

**Sample(IF; *Inonotus obliquus* fruit body) – Sample condition(U; Ultra–fine pulverization) – 1st Extraction condition(H; Hot water) – 1st Extraction temp(°C) – 1st Extraction time(hour) – 2nd Extraction condition(M; Microwave) – 2nd Extraction temp(°C) – 2nd Extraction time(hour).

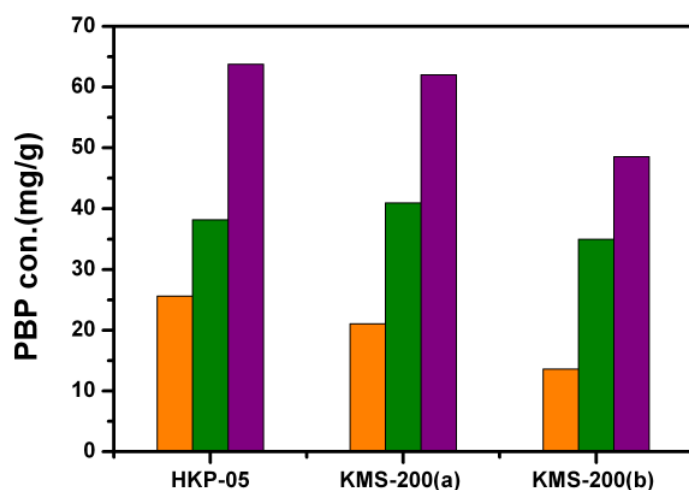


Figure 3-31. Comparison of hot water and microwave extraction method to extract the protein bound polysaccharides from mycelium of *Inonotus obliquus* which was pulverized by two types of ultra-fine pulverizer(HKP-05, KMS-200).

(a); Normal medium

(b); Oleic acid medium

■ ; *IM-U-H-100-4(1st)

■ ; **IM-U-H-100-4-M-150-0.5(2nd)

■ ; 1st & 2nd

Total

*Sample(IM; *Inonotus obliquus* mycelium) – Sample condition(U; Ultra-fine pulverization) – Extraction condition(H; Hot water) – Extraction temp(°C) – Extraction time(hour).

**Sample(IM; *Inonotus obliquus* mycelium) – Sample condition(U; Ultra-fine pulverization) – 1st Extraction condition(H; Hot water) – 1st Extraction temp(°C) – 1st Extraction time(hour) – 2nd Extraction condition(M; Microwave) – 2nd Extraction temp(°C) – 2nd Extraction time(hour).

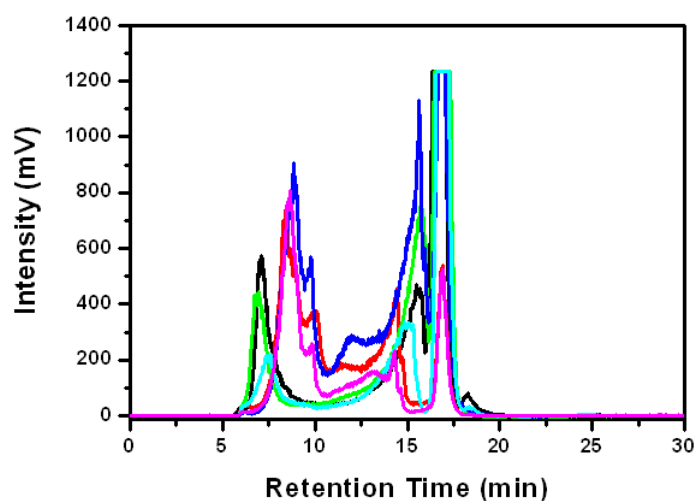


Figure 3-32. Comparison of hot water and microwave extraction method to extract the protein bound polysaccharides from mycelium of *Inonotus obliquus* which was pulverized by two types of ultra-fine pulverizer(HKP-05, KMS-200).

— ; *IM-U-H-100-4(1st, HKP-05) — ; **IM-U-H-100-4-M-150-0.5(2nd, HKP-05)

— ; *IM-U-H-100-4(1st, KMS-200(a)) — ; **IM-U-H-100-4-M-150-0.5(2nd, KMS-200(a))

— ; *IM-U-H-100-4(1st, KMS-200(b)) — ; **IM-U-H-100-4-M-150-0.5(2nd, KMS-200(b))

(a); Normal medium

(b); Oleic acid medium

*Sample(IM; *Inonotus obliquus* mycelium) – Sample condition(U; Ultra-fine pulverization) – Extraction condition(H; Hot water) – Extraction temp(°C) – Extraction time(hour).

**Sample(IM; *Inonotus obliquus* mycelium) – Sample condition(U; Ultra-fine pulverization) – 1st Extraction condition(H; Hot water) – 1st Extraction temp(°C) – 1st Extraction time(hour) – 2nd Extraction condition(M; Microwave) – 2nd Extraction temp(°C) – 2nd Extraction time(hour).

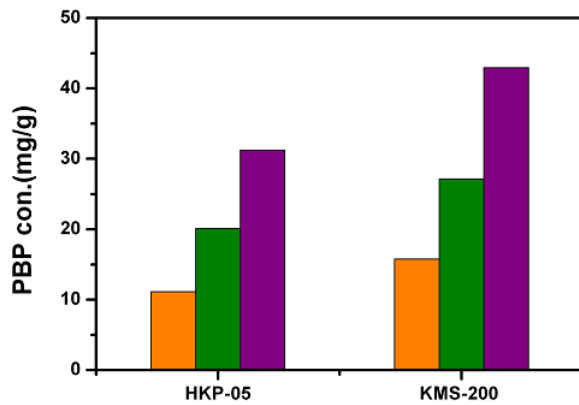


Figure 3-33. Comparison of hot water and microwave extraction method to extract the protein bound polysaccharides from fruit body of *Inonotus obliquus* which was pulverized by two types of ultra-fine pulverizer(HKP-05, KMS-200).

■ ; *IF-U-H-100-4(1st) ■ ; **IF-U-H-100-4-M-150-0.5(2nd) ■ ; 1st & 2nd Total

*Sample(IF; *Inonotus obliquus* fruit body) – Sample condition(U; Ultra-fine pulverization) – Extraction condition(H; Hot water) – Extraction temp(°C) – Extraction time(hour).

**Sample(IF; *Inonotus obliquus* fruit body) – Sample condition(U; Ultra-fine pulverization) – 1st Extraction condition(H; Hot water) – 1st Extraction temp(°C) – 1st Extraction time(hour) – 2nd Extraction condition(M; Microwave) – 2nd Extraction temp(°C) – 2nd Extraction time(hour).

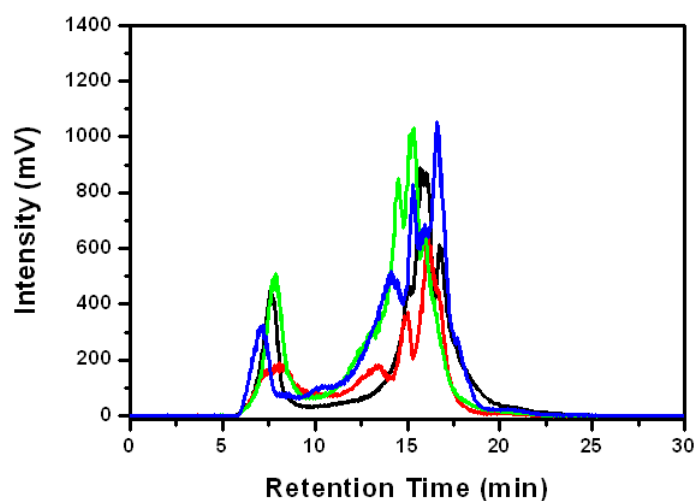


Figure 3-34. Comparison of hot water and microwave extraction method to extract the protein bound polysaccharides from fruit body of *Inonotus obliquus* which was pulverized by two types of ultra-fine pulverizer(HKP-05, KMS-200).

— ; *IF-U-H-100-4(1st, HKP-05)

— ; **IF-U-H-100-4-M-150-0.5(2nd, HKP-05)

— ; *IF-U-H-100-4(1st, KMS-200)

— ; **IF-U-H-100-4-M-150-0.5(2nd, KMS-200)

*Sample(IF; *Inonotus obliquus* fruit body) – Sample condition(U; Ultra-fine pulverization) – Extraction condition(H; Hot water) – Extraction temp(°C) – Extraction time(hour).

**Sample(IF; *Inonotus obliquus* fruit body) – Sample condition(U; Ultra-fine pulverization) – 1st Extraction condition(H; Hot water) – 1st Extraction temp(°C) – 1st Extraction time(hour) – 2nd Extraction condition(M; Microwave) – 2nd Extraction temp(°C) – 2nd Extraction time(hour).

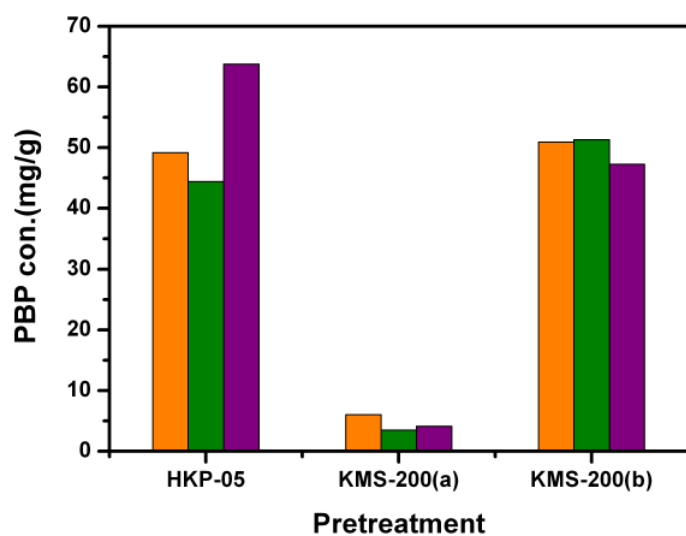


Figure 3-35. Comparison of hot water and microwave extraction method to extract the protein bound polysaccharides from mycelium of *Inonotus obliquus* which was pulverized by two types of ultra-fine pulverizer(HKP-05, KMS-200).

(a); Normal medium

(b); Oleic acid medium

■ ; *IM-U-M-150-0.25

■ ; IM-U-M-150-0.5

■ ;

IM-U-M-150-1.0

*Sample(IM; *Inonotus obliquus* mycelium) – Sample condition(U; Ultra-fine pulverization) – Extraction condition(M; Microwave) – Extraction temp(°C) – Extraction time(hour).

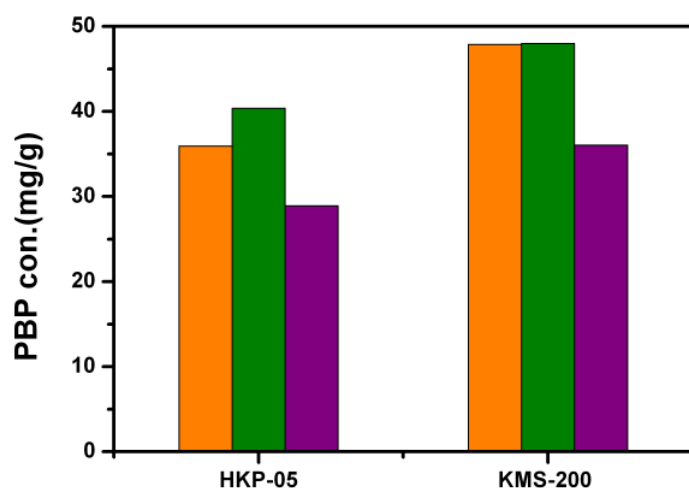


Figure 3-37. Comparison of hot water and microwave extraction method to extract the protein bound polysaccharides from fruit body of *Inonotus obliquus* which was pulverized by two types of ultra-fine pulverizer(HKP-05, KMS-200).

■ ; *IF-U-M-150-0.25 ■ ; IF-U-M-150-0.5 ■ ; IF-U-M-150-1.0
 *Sample(IF; *Inonotus obliquus* fruit body) – Sample condition(U; Ultra-fine pulverization) –
 Extraction condition(M; Microwave) – Extraction temp(°C) – Extraction time(hour).

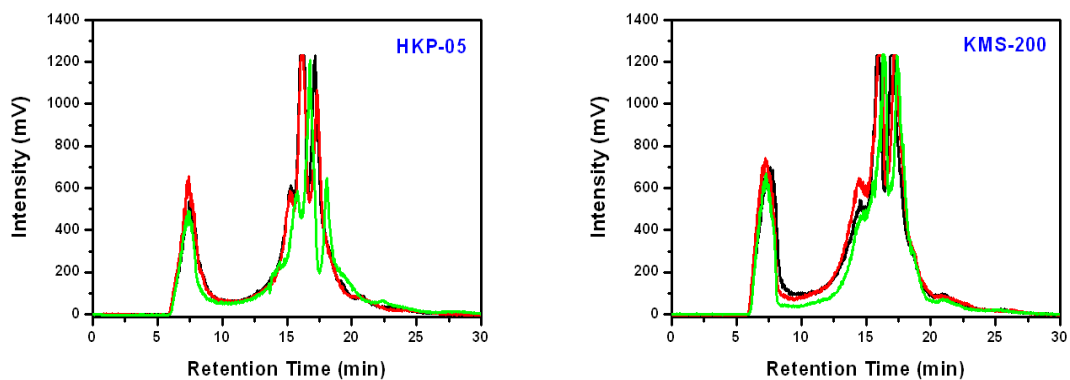


Figure 3-38. Comparison of hot water and microwave extraction method to extract the protein bound polysaccharides from fruit body of *Inonotus obliquus* which was pulverized by two types of ultra-fine pulverizer(HKP-05, KMS-200).

■ ; IF-U-M-150-0.25 ■ ; IF-U-M-150-0.5 ■ ; IF-U-M-150-1.0
 *Sample(IF; *Inonotus obliquus* fruit body) – Sample condition(U; Ultra-fine pulverization) –
 Extraction condition(M; Microwave) – Extraction temp(°C) – Extraction time(hour).

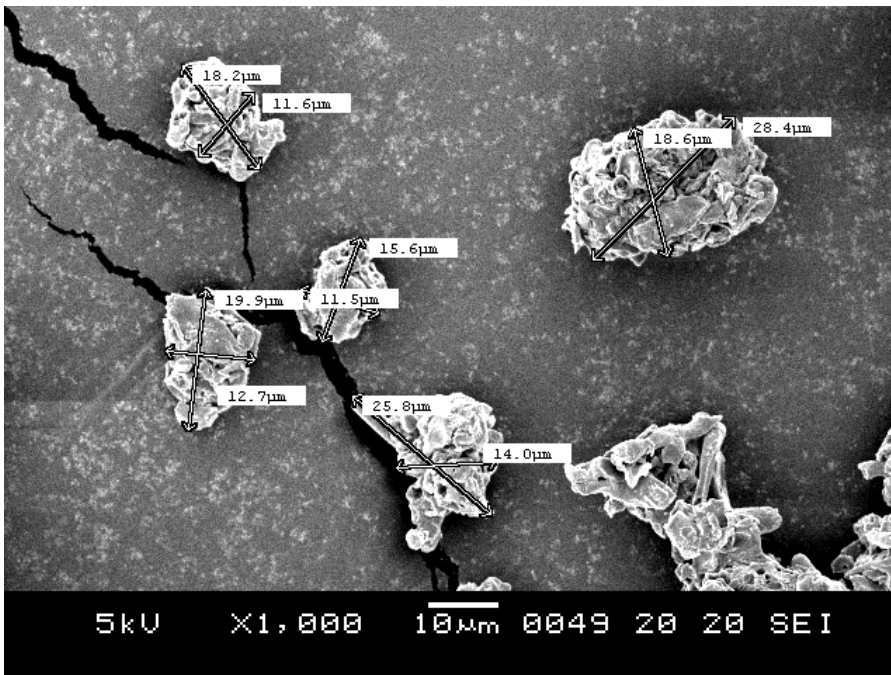
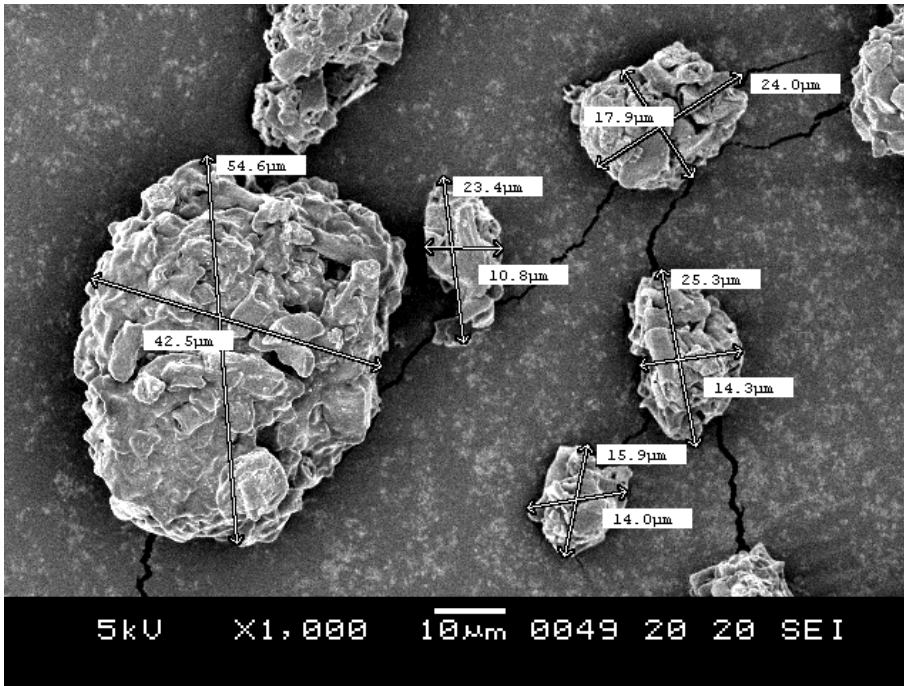


Figure 3-39. Photograph of the *Inonotus obliquus* mycelium(oleic acid medium) which was pulverized using KMS-200 by Scanning electron microscope($\times 1000$).

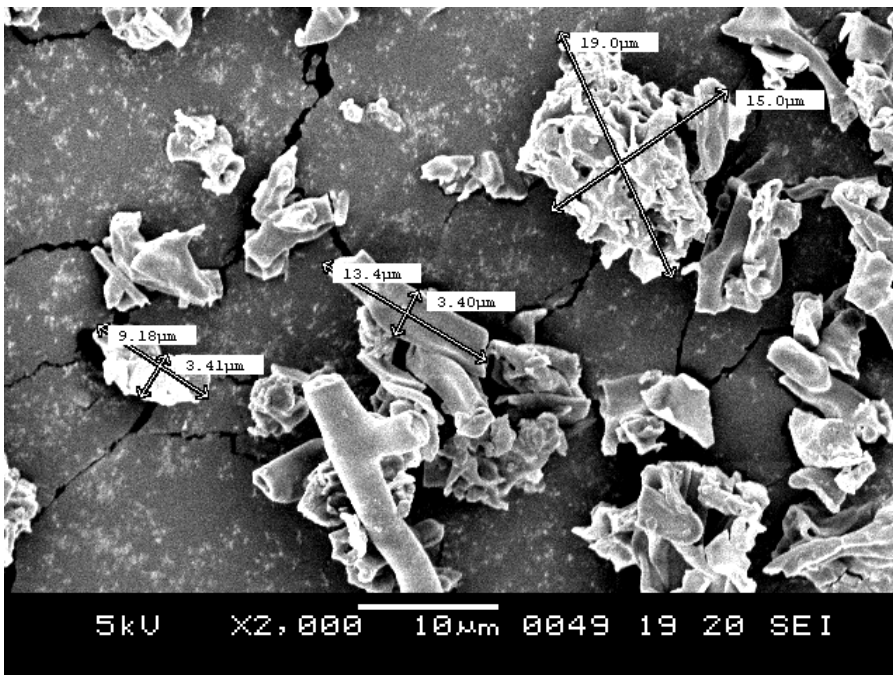
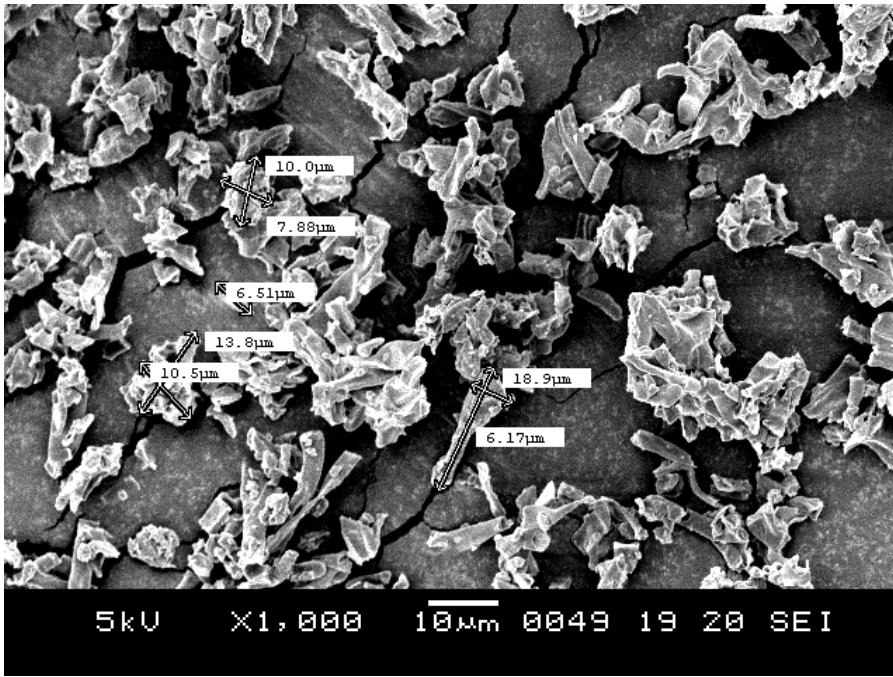


Figure 3-40. Photograph of the *Inonotus obliquus* mycelium(normal medium) which was pulverized using KMS-200 by Scanning electron microscope($\times 1000$).

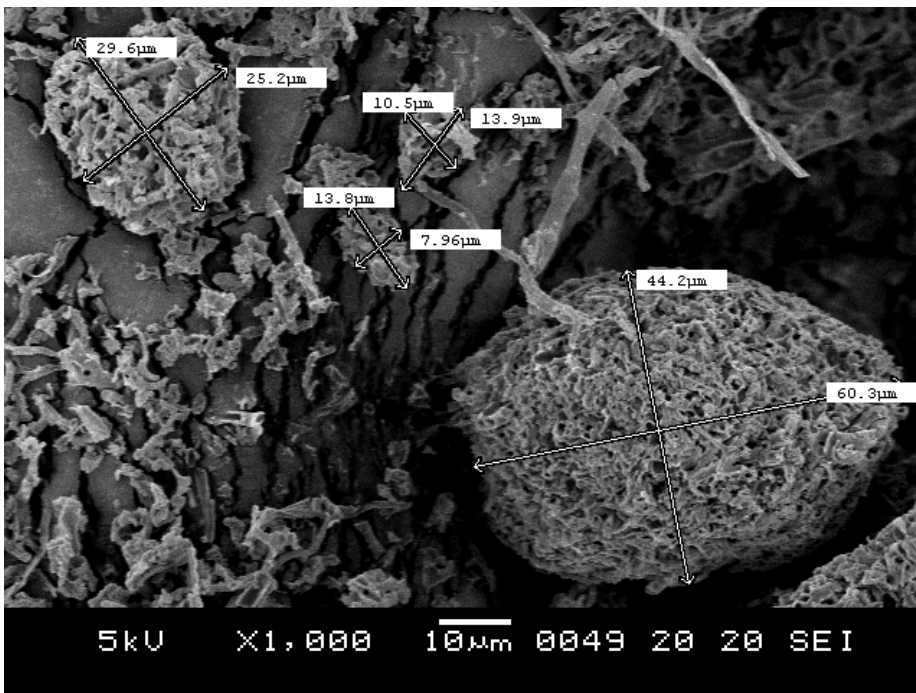
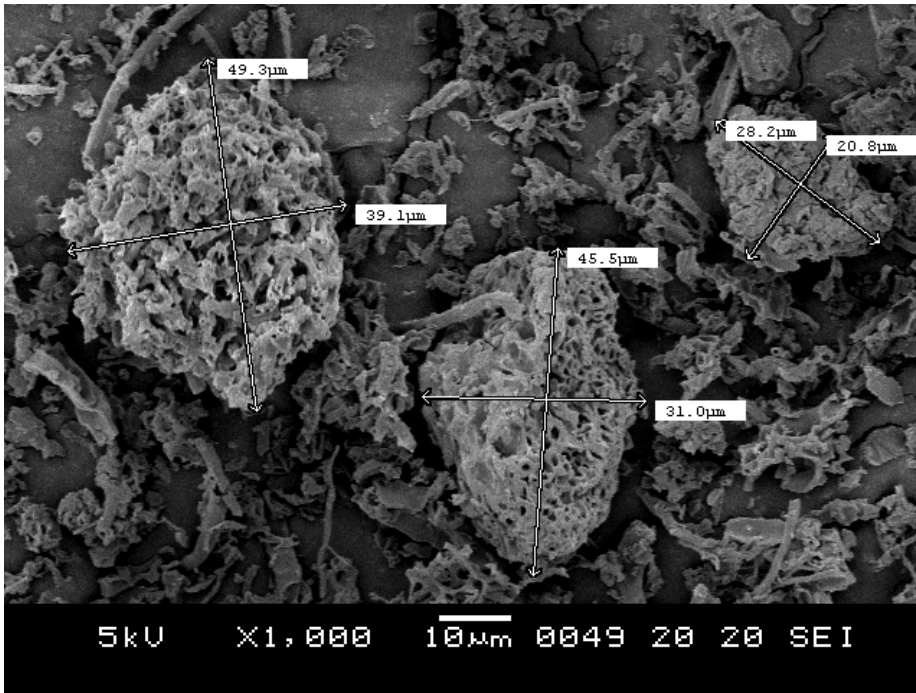


Figure 3-41. Photograph of the *Inonotus obliquus* fruit body which was pulverized using KMS-200 by Scanning electron microscope($\times 1000$).

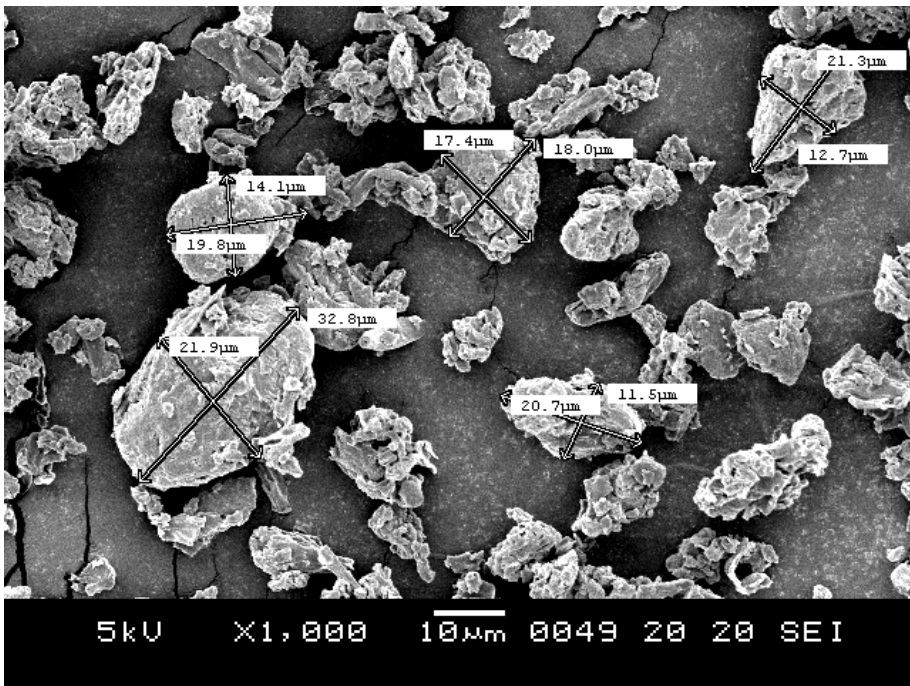
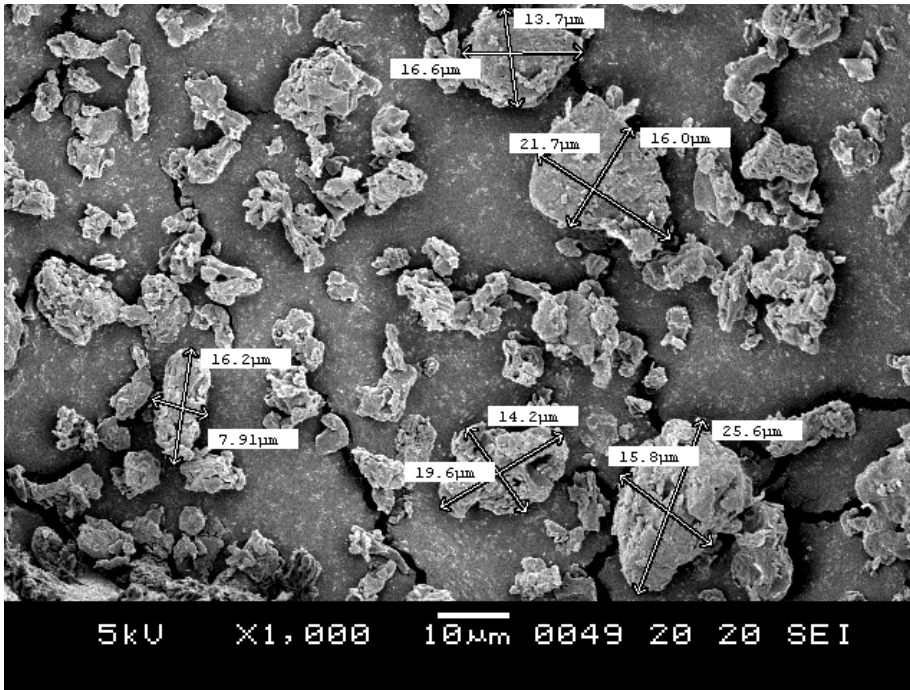


Figure 3-42. Photograph of the *Inonotus obliquus* mycelium which was pulverized using HKP-05 by Scanning electron microscope($\times 1000$).

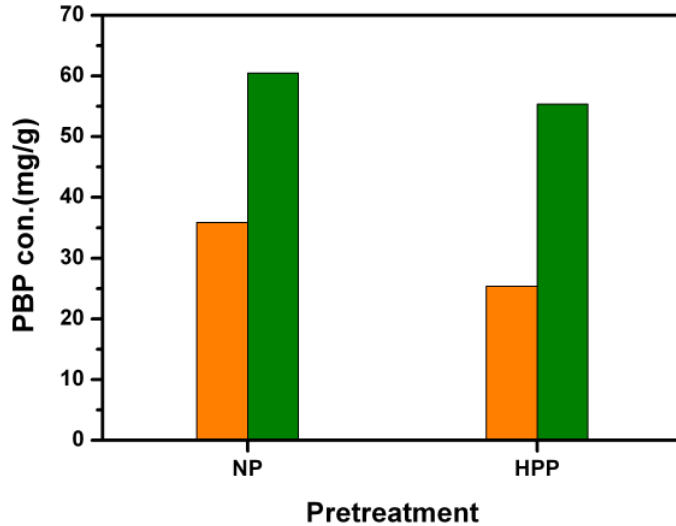


Figure 3-43. Comparison of pretreatment methods to extract the protein bound polysaccharides from mycelium of *Inonotus obliquus*.

■ ; *IM-U-H-100-4 ■ ; IM-U-M-150-0.5

NP; Non-pretreatment, HPP; High pressure pretreatment
 *Sample(IM; *Inonotus obliquus* mycelium) – Sample condition(U; Ultra-fine pulverization) – Extraction condition(H; Hot water, M; Microwave) – Extraction temp(°C) – Extraction time(hour).

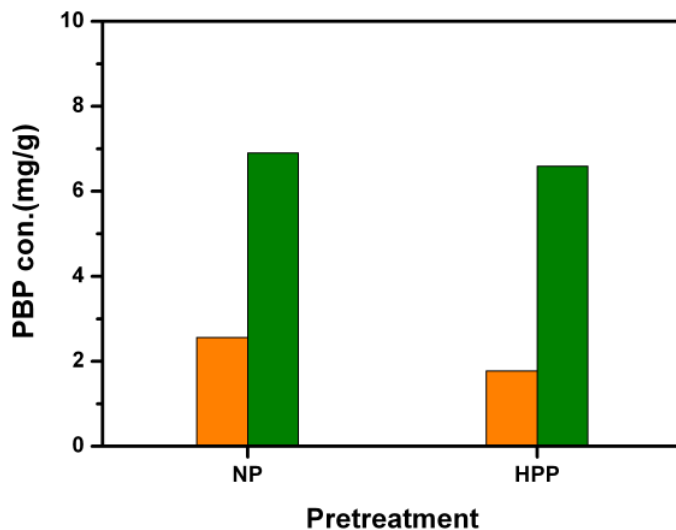


Figure 3-44. Comparison of pretreatment methods to extract the protein bound polysaccharides from fruit body of *Inonotus obliquus*.

■ ; *IM-U-H-100-4 ■ ; IM-U-M-150-0.5

NP; Non-pretreatment, HPP; High pressure pretreatment
 *Sample(IF; *Inonotus obliquus* fruit body) – Sample condition(U; Ultra-fine pulverization) – Extraction condition(H; Hot water, M; Microwave) – Extraction temp(°C) – Extraction time(hour).

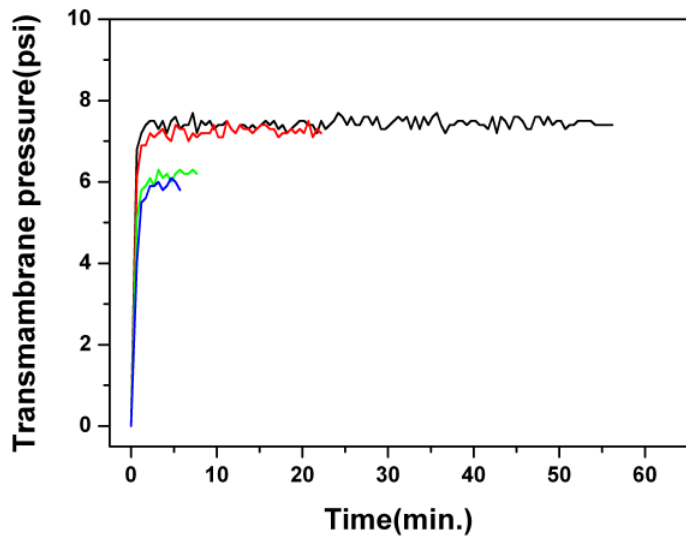


Figure 3-45. Change of transmembrane pressure with time by using various MWCO membranes. Operation pressure was 15 psi.

— ; 10 kDa — ; 30 kDa — ; 100 kDa — ; 300 kDa

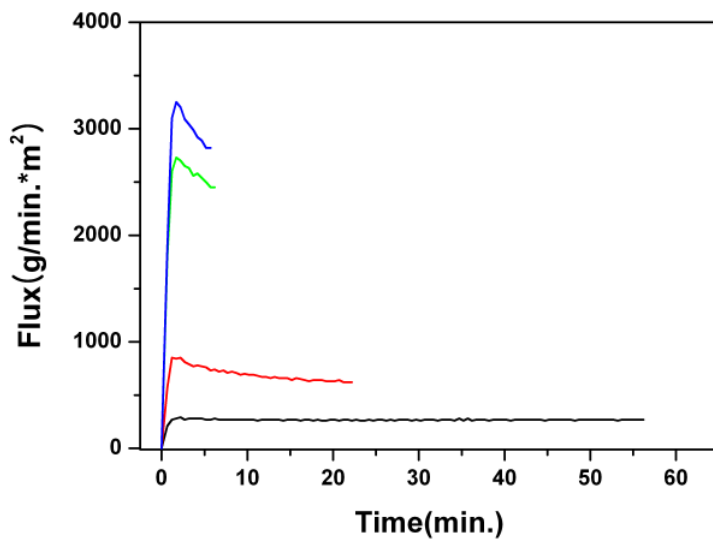


Figure 3-46. Comparison of flux with time by using various MWCO membranes. Operation pressure was 15 psi.

— ; 10 kDa — ; 30 kDa — ; 100 kDa — ; 300 kDa

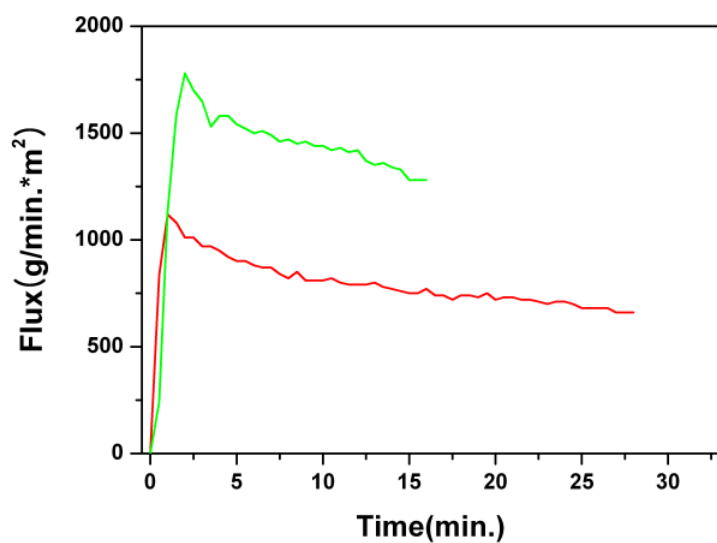


Figure 3-47. Comparison of flux with time by using ultrafiltration membranes. Operation pressure was 15 psi.

— ; 30 kDa — ; 100 kDa

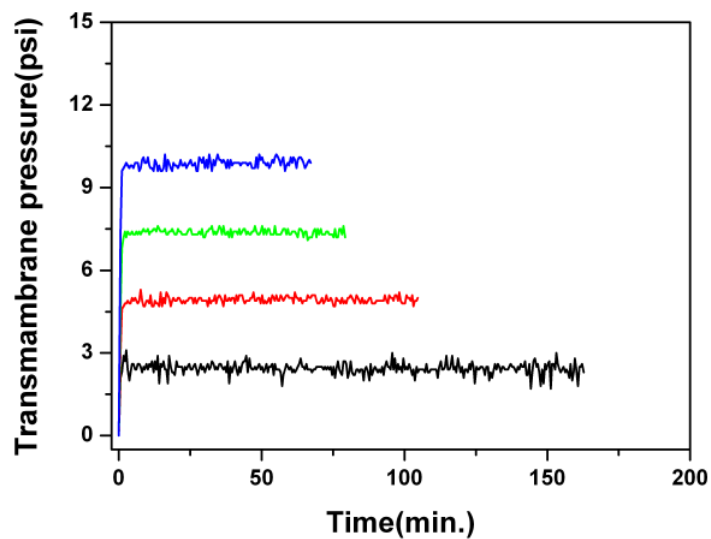


Figure 3-48. Change of transmembrane pressure according to various operating pressures with time. Sample was concentrated 10 times. Membrane; 30 kDa.

— ; 5 psi — ; 10 psi — ; 15 psi — ; 20 psi

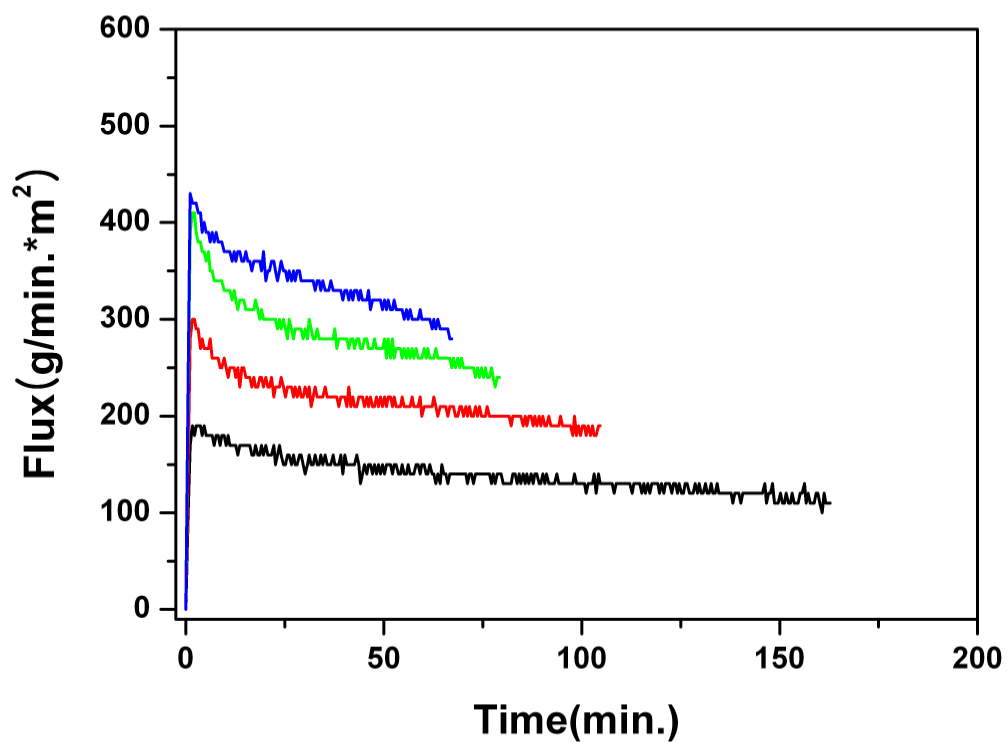


Figure 3-49. Change of flux according to various applying pressures with time. Sample was concentrated 10 times. Membrane; 30 kDa.

— ; 5 psi — ; 10 psi — ; 15 psi — ; 20 psi

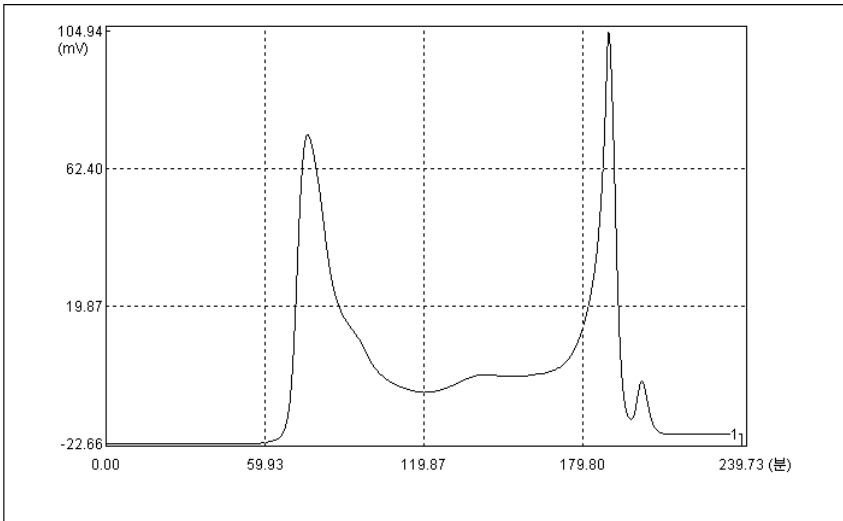


Figure 3-50. Chromatogram of protein bound polysaccharides separated from *Mesima* after gel filtration.

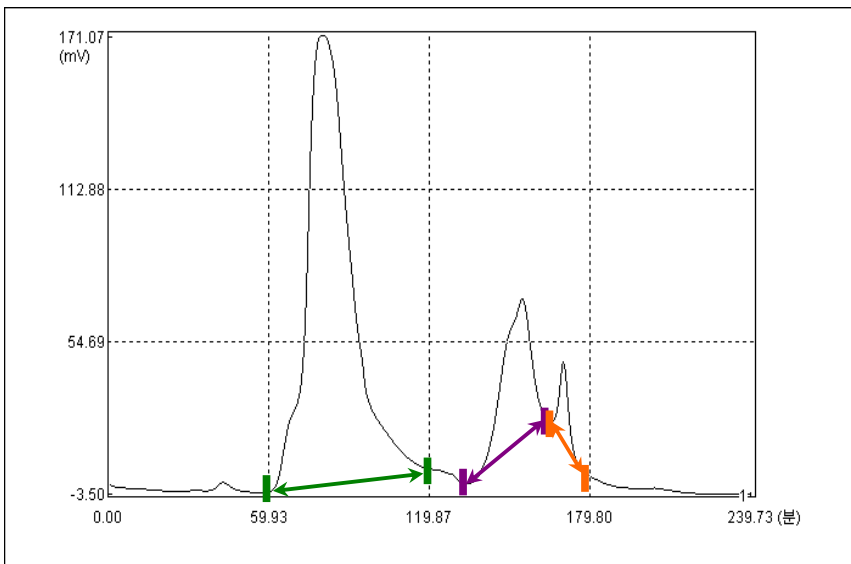


Figure 3-51. Chromatogram of protein bound polysaccharides separated from culture broth of *Inonotus obliquus* after gel filtration.

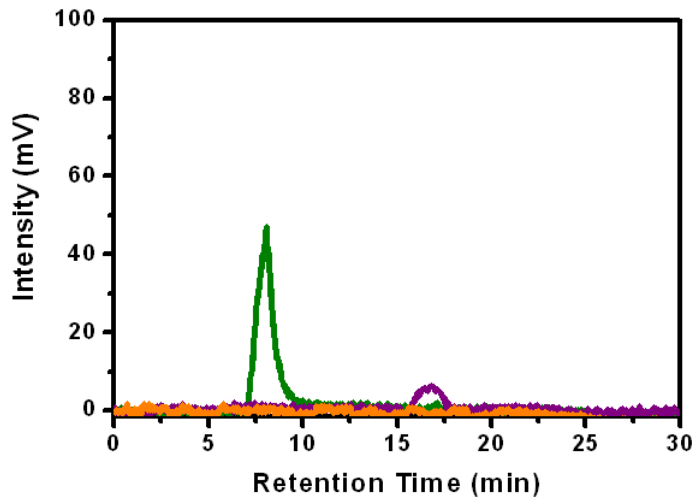


Figure 3-52. Chromatogram of fraction obtained from gel filtration(Fig. 3-51).

— ; 60-116 min — ; 124-160 min — ; 160-176 min

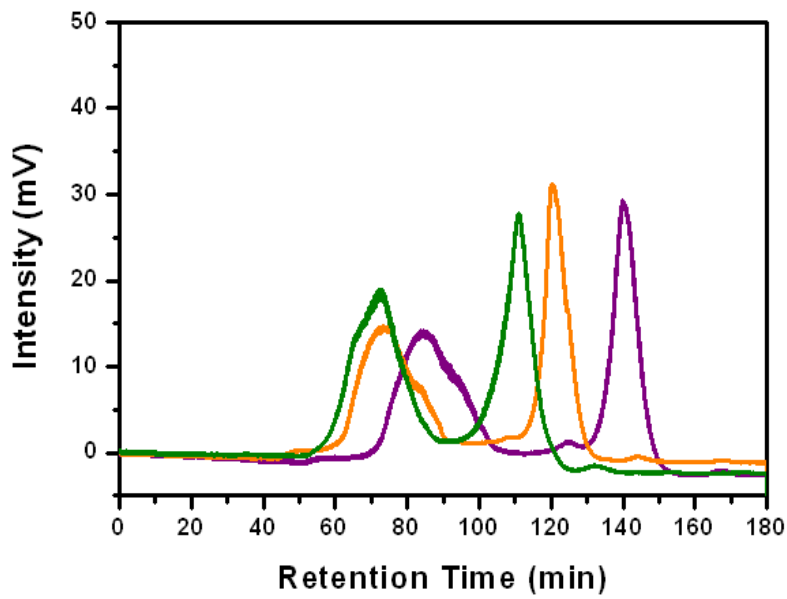


Figure 3-53. Chromatogram of protein bound polysaccharides separated from culture broth of *Inonotus obliquus* after gel filtration.

— ; Flow rate(2 mL/min) — ; Flow rate(2.2 mL/min) — ; Flow rate(2.5 mL/min)

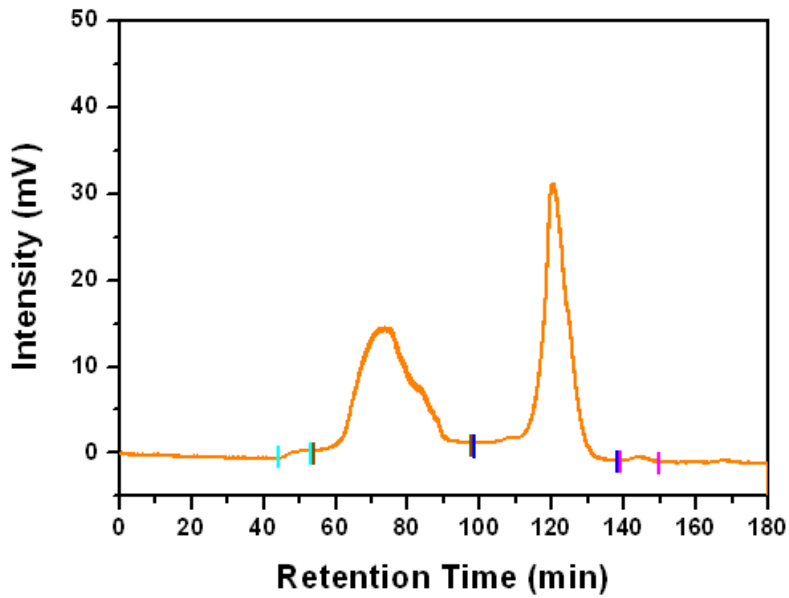


Figure 3-54. Chromatogram of protein bound polysaccharide separated from culture broth of *Inonotus obliquus* after gel filtration(Flow rate; 2.2 mL/min).

— ; 44-52 min — ; 52-97 min — ; 97-138 min — ; 138-150 min

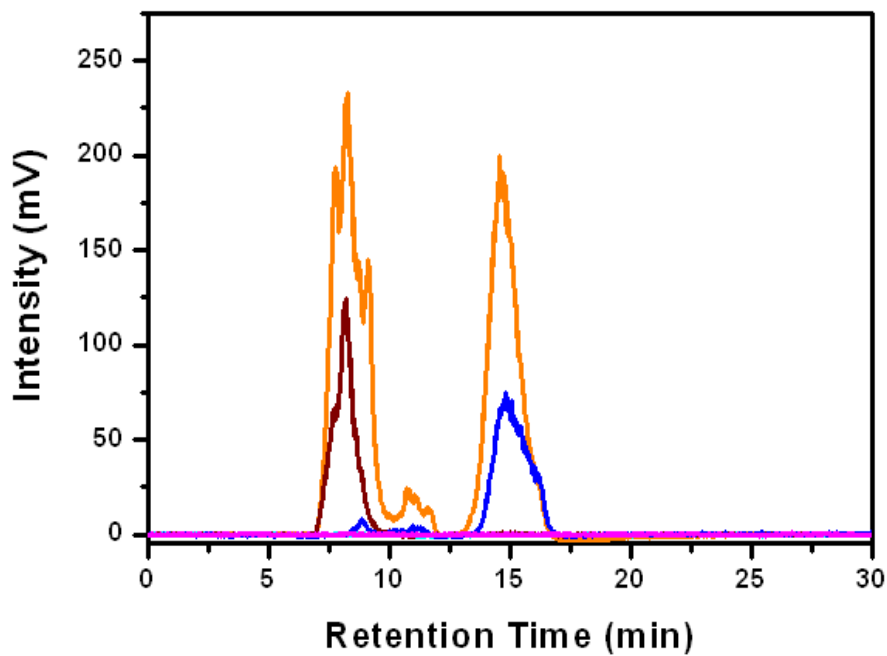


Figure 3-55. Chromatogram of fraction obtained from gel filtration.

— ; EPS — ; 44-52 min — ; 52-97 min — ; 97-138 min — ; 138-150 min

*EPS is protein bound polysaccharide separated from culture broth of *Inonotus obliquus*

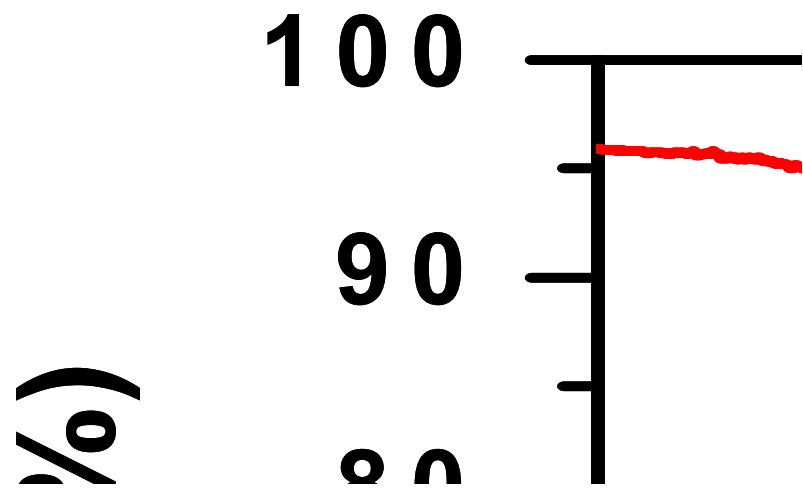


Figure 3-56. FT-IR spectrum of Mesima and extracted(purified) exopolysaccharides.

— ; Mesima

— ; exopolysaccharides

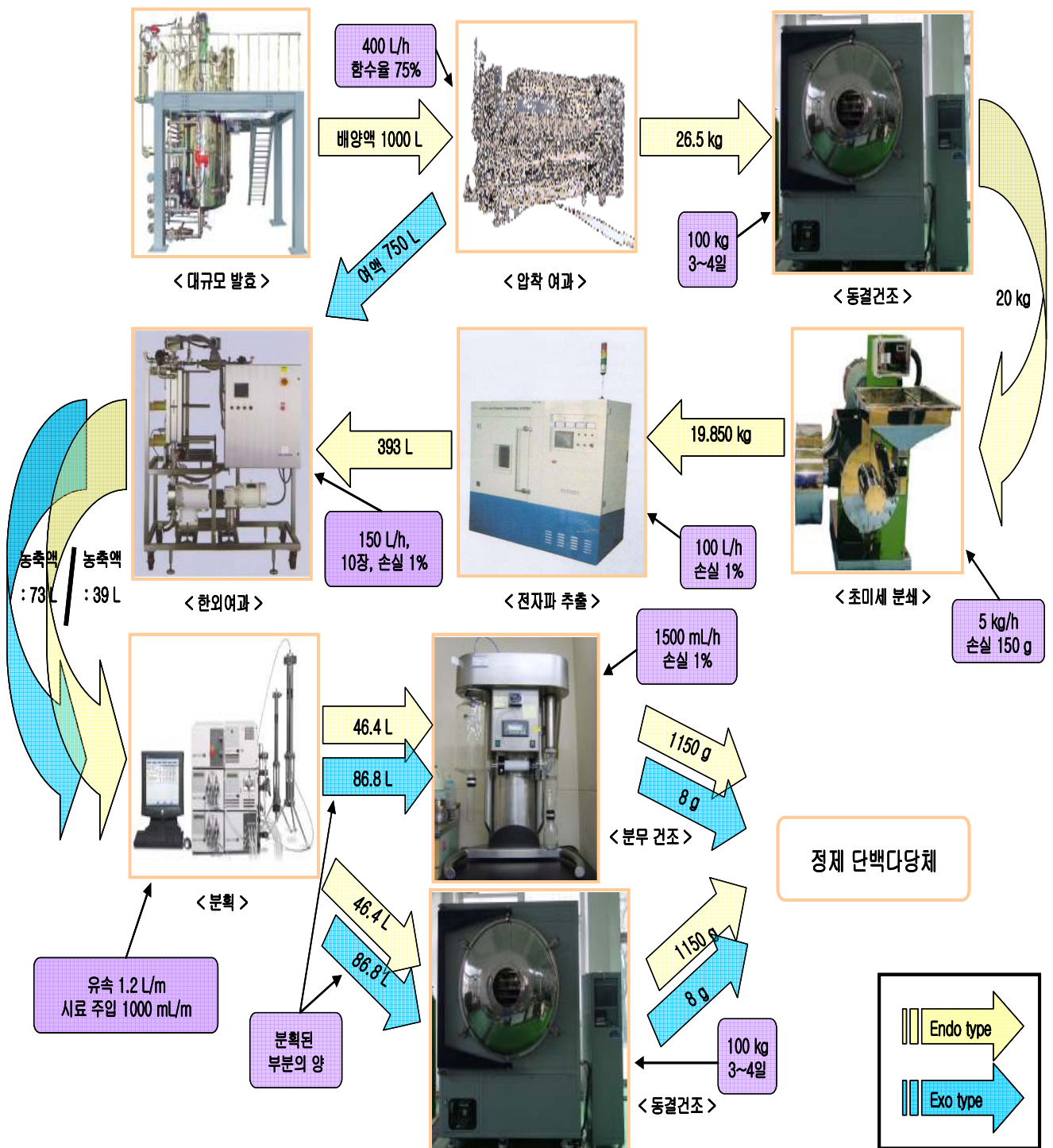


Figure 3-57. A flow sheet for the separation of protein-bound polysaccharides from *Inonotus obliquus* culture.

Table 3-1. HPLC conditions for protein bound polysaccharides analysis by using gel permeation chromatography

HPLC	휴텍스(한국)
Detector	ELSD
Column	Ultrahydrogel GPC 1000 (7.8×300 mm)
Mobile phase	H ₂ O
Flow rate	0.6 mL/min
Injection volume	20 μ l

Table 3-2. HPLC conditions for protein bound polysaccharide separation by using gel filtration

HPLC	GILSON(U.S.A)
Detector	UV/VIS
Column	Sepharose 400(60×2.0 cm)
Fraction collector	BIORAD(U.S.A)
Mobile phase	H ₂ O
Flow rate	0.25 mL/min
Injection volume	200 μ l

HPLC	휴텍스(한국)
Detector	RI
Column	SB 2000(20 x 300 mm)
Fraction collector	A.P.M-1(휴텍스)
Mobile phase	H ₂ O
Flow rate	2.2 mL/min
Injection volume	1 mL

Table 3-3. General chemical compositions of fruiting body and mycelium of *Inonotus obliquus*

Component	Fruiting body	Mycelium
Moisture	12.41	3.26
Crude Ash	10.79	2.23
Crude Fat	0.49	3.10
Crude Protein	1.98	35.12
Carbohydrate	74.33	56.29

(Unit: %)

Table 3-4. Comparison of recovery rate by using filter paper

Filter paper	Filtered solution(L)	Cakes(g)	Solution Recovery(%)
0.2 μm	8.71	341.8	75.4
0.8 μm	8.99	317.9	77.6

* Initial Vol. was 12 L

Table 3-5. Sugar and protein content according to various temperatures and times by ultrasonic of fruiting body of *Inonotus obliquus*

Extraction conditions	Sugar content(%)	Protein content(%)
*IF-U-45-0.5	0.42	0.98
IF-U-45-1	0.45	1.21
IF-U-45-2	0.50	1.29
IF-U-45-3	0.59	1.82
IF-U-45-4	0.67	1.94
IF-U-45-5	0.53	1.72
IF-U-45-6	0.51	1.50
IF-U-65-0.5	1.58	1.63
IF-U-65-1	1.64	1.69
IF-U-65-2	1.75	1.81
IF-U-65-3	2.09	2.02
IF-U-65-4	2.61	2.59
IF-U-65-5	2.43	2.87
IF-U-65-6	2.27	2.45
IF-U-80-0.5	1.78	1.42
IF-U-80-1	2.47	2.29
IF-U-80-2	2.62	3.02
IF-U-80-3	2.77	2.65
IF-U-80-4	3.14	3.34
IF-U-80-5	2.92	3.08
IF-U-80-6	2.69	2.75

* Sample(IM; *Inonotus obliquus* fruiting body) - Extraction condition(U; Ultrasonic)
 - Extraction Temp(°C) - Extraction time(hour)

Table 3-6. Sugar and protein content according to various temperatures and times by microwave of fruiting body of *Inonotus obliquus*

Extraction conditions	Sugar content(%)	Protein content(%)
*IF-M-100-1	2.2	2.52
IF-M-100-2	2.28	2.29
IF-M-100-3	2.43	2.44
IF-M-100-4	2.25	2.27
IF-M-100-5	2.17	3.05
IF-M-100-6	1.97	2.25
IF-M-125-1	3.25	4.22
IF-M-125-2	3.29	4.28
IF-M-125-3	4.12	5.23
IF-M-125-4	4.48	5.94
IF-M-125-5	4.29	5.14
IF-M-125-6	4.05	4.81
IF-M-150-0.5	4.09	9.08
IF-M-150-1	4.18	9.11
IF-M-150-2	5.85	10.62
IF-M-150-3	7.83	10.53
IF-M-150-4	7.9	12.54
IF-M-150-5	6.64	11.21
IF-M-150-6	6.12	12.62
IF-M-180-0.5	7.88	14.89
IF-M-180-1	7.95	15.06
IF-M-180-2	7.32	12.14
IF-M-180-3	2.92	4.89
IF-M-180-4	2.34	1.98
IF-M-180-5	2.29	1.97
IF-M-180-6	1.92	1.98

* Sample(IM; *Inonotus obliquus* fruiting body) - Extraction condition(M; Microwave)
 - Extraction Temp(°C) - Extraction time(hour)

Table 3-7. Sugar and protein content according to various temperatures and times by ultrasonic of mycelium of *Inonotus obliquus*

Extraction conditions	Sugar content(%)	Protein content(%)
*IM-U-45-0.5	2.72	1.65
IM-U-45-1	3.09	2.21
IM-U-45-2	4.02	2.3
IM-U-45-3	4.42	2.39
IM-U-45-4	4.67	2.57
IM-U-45-5	4.28	2.42
IM-U-45-6	4.21	2.38
IM-U-65-0.5	3.24	1.82
IM-U-65-1	4.21	2.29
IM-U-65-2	4.72	2.34
IM-U-65-3	4.84	3.01
IM-U-65-4	4.96	3.07
IM-U-65-5	3.87	2.94
IM-U-65-6	3.26	2.38
IM-U-80-0.5	3.19	2.01
IM-U-80-1	3.67	2.95
IM-U-80-2	4.22	3.02
IM-U-80-3	4.84	4.91
IM-U-80-4	5.09	5.22
IM-U-80-5	4.35	4.99
IM-U-80-6	2.92	4.75

* Sample(IM; *Inonotus obliquus* mycelium) – Extraction condition(U; Ultrasonic)
 – Extraction Temp(°C) – Extraction time(hour)

Table 3-8. Sugar and protein content according to various temperatures and times by microwave of mycelium of *Inonotus obliquus*

Extraction conditions	Sugar content(%)	Protein content(%)
*IM-M-100-0.5	1.47	3.25
IM-M-100-1	3.62	4.22
IM-M-100-2	4.04	5.58
IM-M-100-3	2.74	4.05
IM-M-100-4	2.65	3.87
IM-M-100-5	2.63	3.07
IM-M-100-6	2.49	2.75
IM-M-125-0.5	2.82	3.47
IM-M-125-1	3.18	3.88
IM-M-125-2	3.39	4.21
IM-M-125-3	3.52	5.03
IM-M-125-4	4.76	7.14
IM-M-125-5	3.31	5.56
IM-M-125-6	2.62	4.38
IM-M-150-0.5	3.92	4.28
IM-M-150-1	3.90	5.02
IM-M-150-2	5.06	7.13
IM-M-150-3	4.68	6.52
IM-M-150-4	3.31	6.14
IM-M-150-5	3.19	5.09
IM-M-150-6	3.14	4.37
IM-M-180-0.5	2.42	4.69
IM-M-180-1	3.65	6.59
IM-M-180-2	1.29	6.42
IM-M-180-3	0.75	5.32
IM-M-180-4	0.86	4.28
IM-M-180-5	0.72	3.89
IM-M-180-6	0.74	3.77

* Sample(IM: *Inonotus obliquus* mycelium) - Extraction condition(M: Microwave)
 - Extraction Temp(°C) - Extraction time(hour)

Table 3-9. Separation of protein bound polysaccharides from mycelium of *Inonotus obliquus* by various enzyme concentrations and different extraction conditions

Extraction conditions	Cellulase concentration(%)		
	0.5	1.0	5.0
*IM-H-80-1	**1.00	1.32	7.84
IM-H-80-3	1.40	1.72	9.16
IM-H-80-5	1.92	1.88	11.28
IM-H-80-7	1.80	1.80	10.20
IM-H-100-1	2.32	2.72	7.84
IM-H-100-3	2.48	2.56	7.92
IM-H-100-5	2.48	1.92	11.44
IM-H-100-7	2.08	2.20	10.92

* Sample(IM; *Inonotus obliquus* mycelium) - Extraction condition(H; Hot Water)
- Extraction Temp(°C) - Extraction time(hour).

** Protein bound polysaccharides concentration(mg/g).

Table 3-10. Separation of protein bound polysaccharides from mycelium of *Inonotus obliquus* by various enzyme concentrations and different extraction conditions

Extraction conditions	Cellulase concentration(%)		
	0.5	1.0	5.0
*IM-M-100-0.5	**8.92	13.2	19.72
IM-M-100-1.0	2.76	10.24	6.08
IM-M-100-1.5	2.24	5.36	17.76
IM-M-125-0.5	19.48	17.76	-
IM-M-125-1.0	18.48	-	-
IM-M-125-1.0	9.64	-	-
IM-M-150-0.5	-	-	-
IM-M-150-1.0	-	-	-
IM-M-150-1.5	-	-	-

* Sample(IM; *Inonotus obliquus* mycelium) - Extraction condition(M; Microwave)
- Extraction Temp(°C) - Extraction time(hour).

** Protein bound polysaccharides concentration(mg/g).

Table 3-11. Separation of protein bound polysaccharides from mycelium of *Inonotus obliquus* by various enzyme concentrations and different extraction conditions

Extraction conditions	Cellulase concentration(%)		
	0.5	1.0	5.0
*IMR(80-1)-M-150-0.5	**21.04	-	-
IMR(80-3)-M-150-0.5	21.72	-	-
IMR(80-5)-M-150-0.5	17.08	-	-
IMR(80-7)-M-150-0.5	20.64	-	-
IMR(80-1)-M-150-1.0	-	-	-
IMR(80-3)-M-150-1.0	-	-	-
IMR(80-5)-M-150-1.0	-	-	-
IMR(80-7)-M-150-1.0	-	-	-
IMR(80-1)-M-150-1.5	-	-	-
IMR(80-3)-M-150-1.5	-	-	-
IMR(80-5)-M-150-1.5	-	-	-
IMR(80-7)-M-150-1.5	-	-	-

* Sample(IMR; *Inonotus obliquus* mycelium residue) - Extraction condition(M; Microwave)
- Extraction Temp(°C) - Extraction time(hour).

** Protein bound polysaccharides concentration(mg/g).

Table 3-12. Separation of protein bound polysaccharides from mycelium of *Inonotus obliquus* by various enzyme concentrations and different extraction conditions

Extraction conditions	Cellulase concentration(%)		
	0.5	1.0	5.0
*IMR(100-1)-M-150-0.5	**17.44	-	-
IMR(100-3)-M-150-0.5	22.72	-	-
IMR(100-5)-M-150-0.5	22.12	-	-
IMR(100-7)-M-150-0.5	15.6	-	-
IMR(100-1)-M-150-1.0	13.12	-	-
IMR(100-3)-M-150-1.0	17.52	-	-
IMR(100-5)-M-150-1.0	-	-	-
IMR(100-7)-M-150-1.0	-	-	-
IMR(100-1)-M-150-1.5	-	-	-
IMR(100-3)-M-150-1.5	-	-	-
IMR(100-5)-M-150-1.5	-	-	-
IMR(100-7)-M-150-1.5	-	-	-

* Sample(IMR; *Inonotus obliquus* mycelium residue) - Extraction condition(M; Microwave)
 - Extraction Temp(°C) - Extraction time(hour).

** Protein bound polysaccharides concentration(mg/g).

Table 3–13. Separation of protein bound polysaccharides from mycelium of *Inonotus obliquus* by various enzyme concentrations and different extraction conditions

Extraction conditions	Cellulase concentration(%)
	0.5
*IMR(80-1)-M-150-0.17	**17.44
IMR(80-3)-M-150-0.17	10.56
IMR(80-5)-M-150-0.17	19.16
IMR(80-7)-M-150-0.17	16.04
IMR(80-1)-M-150-0.33	-
IMR(80-3)-M-150-0.33	10.16
IMR(80-5)-M-150-0.33	22.2
IMR(80-7)-M-150-0.33	20.28

* Sample(IMR; *Inonotus obliquus* mycelium residue) - Extraction condition(M; Microwave)
- Extraction Temp(°C) - Extraction time(hour).

** Protein bound polysaccharides concentration(mg/g).

Table 3–14. Separation of protein bound polysaccharides from mycelium of *Inonotus obliquus* by various enzyme concentrations and different extraction conditions

Extraction conditions	Cellulase concentration(%)
	0.5
*IMR(100-1)-M-150-0.17	**17.48
IMR(100-3)-M-150-0.17	13.44
IMR(100-5)-M-150-0.17	9.84
IMR(100-7)-M-150-0.17	20.84
IMR(100-1)-M-150-0.33	23.16
IMR(100-3)-M-150-0.33	18.68
IMR(100-5)-M-150-0.33	9.40
IMR(100-7)-M-150-0.33	18.28

* Sample(IMR; *Inonotus obliquus* mycelium residue) – Extraction condition(M; Microwave) – Extraction Temp(°C) – Extraction time(hour).

** Protein bound polysaccharides concentration(mg/g).

Table 3–15. Data of protein bound polysaccharides separation by using ultrafiltration membranes

UF(kDa)	PBP conc.(mg/mL)	
	Retentate	Permeate
10	0.170	–
30	0.156	–
100	0.103	0.068
300	0.095	0.069

Crude solution : 0.057(mg/mL), Operating conditions : 15 psi & 25°C,
 Effective membrane area; 0.02 m².
 Samples were concentrated 3 times.

Table 3–16. Data of protein bound polysaccharides separation by using ultrafiltration membranes

UF(kDa)	PBP conc.(mg/mL)	
	Retentate	Permeate
30	0.667	-
100	0.369	0.043

Crude solution : 0.072(mg/mL), Operation conditions : 15 psi & 25°C,

Effective membrane area; 0.02 m².

Samples were concentrated 10 times.

Table 3–17. Data of protein bound polysaccharides separation by using ultrafiltration membranes

Pressure (psi)	PBP conc.(mg/mL)	
	Retentate	Permeate
5	1.302	-
10	1.299	-
15	1.295	-
20	1.291	-

Crude solution : 0.131(mg/mL), Operating conditions : 25°C, Membrane; 30 kDa,

Effective membrane area; 0.02 m².

Samples were concentrated 10 times.

Table 3–18. Comparison of effect of ethanol on precipitation of protein bound polysaccharides within 10 times concentrated solution by ultrafiltration

UF(kDa)	PBP conc.(mg/mL)		Yield(%)
	*Before	**After	
Crude solution	0.070	0.067	95.71
30	0.667	0.655	98.30
100	0.369	0.346	98.66

*PBP conc. of the step before the ethanol which was used as a solvent for the PBP precipitation.

**PBP conc. of the step after applying the ethanol which was used as a solvent for the PBP precipitation.

Table 3–19. Comparison of yield of protein bound polysaccharides during the purification steps

Steps	PBP con.(mg/L)	PBP yield(%)
Ethanol precipitation	8.00	92.71
Gel filtration	7.40	89.79

*PBP conc. of original solution was 8.62(mg/mL).

제4절 순수 정제된 *Inonotus obliquus* 추출물질의 생리활성 평가를 통한 고안정성의 항당뇨/비만 효능의 기능성 식품 개발(제2세부과제)

1. 재료 및 실험방법

가. 3T3-L1 세포 배양 및 시료 처리

3T3-L1 세포를 Figure 4-1과 같이 control군, 추출물 처리군(다수)으로 구별하여 실험을 설계하였다.

(1) 세포 샘플 준비

배양이 끝난 세포는 trypsin 처리를 하여 dish에서 분리한 후 4°C에서 1,200×g, 5분간 원심 분리하여 수집하고 분석 전까지 -80°C에서 보관하였다. 수집한 세포는 Lysis buffer (50mM Tris, 1mM EDTA, 1mM β-mercaptoethanol, 10mM MgCl₂, 0.15mM NaCl and 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, pH 7.5) 200ul로 재부유한 후 -70°C에서 얼리고 실온에서 녹이기를 3회 반복한 뒤 sonicator를 이용하여 30초간 초음파 마쇄하였음. 4°C에서 2,400×g, 10분 간 원심 분리하여 상등액을 취한 뒤, 지질 및 단백질 함량 분석에 이용하였다.

나. 지질 성분 및 단백질 분석

세포 내 중성지방은 효소법을 이용한 시판 kit(아산제약)로 분석하였다. 단백질 측정은 Biuret 법 (Sigma)을 이용하여 분석하였다.

다. RNA 추출

세포 조직을 Trizol-Reagent(Invitrogen, USA) 1ml에서 균질화한 후 잘게 분쇄된 세포를 상온 (15-30°C)에서 5분간 방치 후, chloroform을 200ul 첨가한 후 15초 동안 강하게 섞고 다시 상온에서 2-3분간 둔 뒤 4°C에서 12,000×g로 15분간 원심분리를 하였다. 상등액을 조심스럽게 떠서 새로운 tube로 옮겨 Isopropyl alcohol을 500ul 첨가한 뒤 상온에서 10분간 두었다. 다시 4°C에서 12,000×g로 10분간 원심분리를 하였다. 상등액을 제거하고 RNA(ribonucleotide acid) pellet을 획득하였다. 획득한 RNA pellet을 75% ethanol 1ml을 넣고 vortex한 후 4°C에서 7,500×g로 5분간 원심분리를 하였다. RNA pellet을 vacuum에서 10분간 건조시키고 RNA pellet을 RNase-free water로 희석하여 -80°C에 보관하였다.

(1) 지질 관련 효소의 mRNA 발현 수준 측정

추출한 RNA는 분광광도계를 이용하여 농도를 확인하였다. cDNA 합성을 위하여 one-step RT-PCR kit (ABgene, USA)를 이용하여 RT-PCR를 하였다. 대조군으로 β-actin을 사용하였고 RT-PCR (MWG-BIOTECH, PRIMUS) 기기에 넣어 RT-PCR 반응을 실시하였다. RT-PCR 반응이 끝난 후 1% agarose gel에 전기 영동하여 cDNA 생성물을 확인하였다.

라. 췌장세포 생존능 측정

HIT-T15세포에서 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide)법을 이용하여 세포 생존능을 측정. 96well-plate에 2×10^4 cell/well(96well-final volume:200 μ l)의 HIT-T15세포를 분주 한 후 RPMI배지에서 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂조건으로 2일간 배양했다. 농도별 시료를 배지에 첨가한 후 다시 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂조건에서 2일간 배양함. 배지에 세포 독성을 나타내는 Alloxan(Sigma사)을 각 well에 2.5mM/ml농도로 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 50분간 방치했다. 배지 제거 후 MTT stock solution(Sigma사)을 20 μ l씩 첨가한 후 RPMI배지로 최종 부피 200 μ l를 맞춘 후 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 방치했다. 배지 제거 후 DMSO(dimethyl suldozide, Sigma사) 200 μ l첨가하여 발색 시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

마. 실험동물모델을 통한 차가버섯 자실체의 항비만/당뇨 효능 검증 실험 설계

Figure 4-23과 같이 negative control군, 추출물 투여군, positive control군으로 구별하여 실험을 설계하였다.

바. 동물 사육, 시료 투여 및 희생

실험에 사용된 동물은 생후 4주된 수컷 생쥐로써, 일정기간의 고지방식이에 의해 자동적으로 비만/당뇨가 유발되는 C57BL/6J 종 mice를 사용했다. 1주일 동안 AIN-93 diet를 급여하여 환경에 적응 시킨 후 Figure 4-23과 같이 정상식이 대조군(N-C group), 고지방식이 대조군(H-C group)을 negative control군으로 나눈 뒤, 고지방식이+80 $^{\circ}$ C추출한 자실체 추출물 투여군(H-F80), 고지방식이+150 $^{\circ}$ C에서 추출한 자실체 추출물을 2배 희석한 저농도 투여군(H-F150L), 고지방식이+150 $^{\circ}$ C에서 추출한 자실체 추출물 투여군(H-F150)을 treatment group으로 하였으며, 고지방식이+균사체 배양액 투여군(H-MC), 고지방식이+고순도 단백다당체 추출물 투여군(H-PP), 고지방식이+메시마 투여군(H-M)을 positive control군으로 나누었다. 각 투여물은 하루 한번 2ml/kg bw(2Brix), 0.2g/kg bw씩 경구투여 하였고 물과 실험 식이는 자유롭게 섭취하도록 하였다(Figure 4-23). 실험 식이는 정상식이 AIN-93 diet 10% fat calorie, 고지방식이 AIN-93 diet 60% fat calorie로 Research DietTM사(USA) 제품을 구입하여 공급하였으며 그 조성은 Table 4-2과 같다. 식이섭취량은 2일 간격으로, 체중은 1주일에 한 번씩 기록했다. 실험 기간 동안 실내 온도는 $23 \pm 1^{\circ}$ C, 습도는 $53 \pm 2\%$ 를 유지하고, 명암은 12시간(8:00~20:00) 주기로 조명했다. 실험 사육 12주 후 12시간 절식 후 희생 시켰다. 안구적출법으로 혈액을 수집한 후 회복하여 기관(간, 근육, 심장, 등지방, 부고환주변지방 등)을 적출하고 생리 식염수로 잔여 혈액을 제거한 후 무게를 측정함. 전혈은 실온에 30분 방치 후 1,100 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 15분간 원심분리하여 혈청을 수집했다. 혈청과 적출한 기관은 분석전까지 -80 $^{\circ}$ C에 보관했다.

(1) 지질 성분 분석

혈중 및 간조직중의 총 콜레스테롤 및 중성지질은 효소법(Asan Phamaceutical Co., Seoul, Korea), HDL-콜레스테롤은 phosphotungstic acid-Mg⁺⁺ 침전효소법(Asan Phamaceutical Co., Seoul, Korea)으로 분석했다.

(2) 조직 중의 카르니틴 추출

간조직중의 카르니틴은 일정량의 0.3M perchloric acid(PCA)을 가하고 homogenizer를 이용하여 균질화 시킨 후, 1,500×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 카르니틴 분석에 사용했다.

(3) 카르니틴 분석

혈중 및 간조직중의 카르니틴 분석은 동위원소를 이용한 Cederblad와 Lindstedt의 카르니틴 분석 방법에 기준하여 약간 변형시킨 Sachan 등의 방법을 사용했다. 100-200 μ l 정도의 시료를 200 μ l의 6% PCA에 가하여 1,500×g에서 10분간 원심분리하여 상등액과 침전물을 분리함. ㄱ). 상등액중 150 μ l를 중화시켜 다시 원심분리하여 직접 free carnitine(NEC)의 분석에 사용했다. ㄴ). PCA 상등액 100 μ l는 1N KOH로 37°C에서 30분간 가수분해 하고, 다시 중화시킨 후 원심분리하여 Short- and medium-chain carnitine(ASAC)분석에 사용했다. ㄷ). PCA침전물은 6% PCA로 3~4번 씻어 존재하는 NEC 또는 ASAC를 완전히 제거한 후 0.5N KOH 200 μ l를 넣고 65°C에서 60분간 열탕분해 하고, 중화 원심분리하여 상등액 100 μ l를 long-chain acylcarnitine(AIAC)을 분석하는데 사용했다. ㄷ). 위 ㄱ)ㄴ)ㄷ) 세 분획들의 상등액 100 μ l를 400 μ l 반응시약 중에 첨가하고 1unit의 carnitine acetyltransferase를 가한 다음 37°C에서 30분간 반응시켰다. ㄹ). 200 μ l의 반응상등액을 ion exchange resin(AG 1×8, 200~400 mesh)를 통과시켜 column으로부터 [1-14C] acetyl carnitine을 회수한 후 liquid scintillation counter(Beckman Instruments, Palo Alto, CA)로 14C 동위원소를 측정하여 각각의 카르니틴 분획들을 계산했다. ㅁ). 총 카르니틴은 이들 3가지 형태의 카르니틴 값을 합하여 산출했다.

(4) cDNA

조직을 Trizol-Reagent(Invitrogen, USA) 1 ml에서 균질화한 후 잘게 분쇄된 세포를 상온(15-30°C)에서 5분간 방치 후, chloroform을 200ul 첨가한 후 15초 동안 강하게 섞음. 다시 상온에서 2-3분간 둔 뒤 4°C에서 12,000×g로 15분간 원심분리를 하였다. 상등액을 조심스럽게 떠서 새로운 tube로 옮겨 Isopropyl alcohol을 500ul 첨가한 뒤 상온에서 10분간 둠. 다시 4°C에서 12,000×g로 10분간 원심분리를 하였다. 상등액을 제거하고 RNA(ribonucleotide acid) pellet을 획득하였다. 획득한 RNA pellet을 75% ethanol 1ml을 넣고 vortex한 후 4°C에서 7,500×g로 5분간 원심분리를 하였다. RNA pellet을 vacuum에서 10분간 건조시키고 RNA pellet을 RNase-free water로 적정 농도로 희석하여 RT 효소를 이용하여 cDNA로 합성하였다.

(5) Lypolysis, lipogenesis 및 adipogenesis 관련 효소 mRNA 수준 측정

조직내의 Acetyl-CoA carboxylase(ACC), carnitine palmitoyl transferase-1(CPT-1), Peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α), Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ), Fatty acid synthase(FAS), Lipoprotein lipase(Lipo), Tumor necrosis factor- α (TNF- α), sterol regulatory element binding protein(SREBP), uncoupled protein2(UCP2), Acyl-CoA oxidase 및 Adiponectin의 발현 정도를 PCR를 실시했다. 각 효소들의 reverse 및 forward primer, DNA polymerase, dNTPs를 첨가하여 PCR kit(SYBR Green)(ABgene, USA)를 이용한 Real-time PCR을 실시한 후 증폭된 PCR product를 확인했다.

(6) 공복시 혈당 변화

경구투여 5, 7, 9, 11주에 8시간 공복 후 꼬리정맥으로부터 채혈하여 정맥혈의 혈당을 Commercial kit (Dongbang International Co.)를 사용하여 분석했다.

(7) 글루코스 내당능 테스트(경구당부하검사)

실험식이 급여 12주째 실험동물을 12시간 절식시킨 후 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여 공복시 당 수준을 측정하여 initial data로 한 후 50% glucose 용액(0.1g glucose/100g bw)을 stainless steel feeding canula를 사용하여 경구 투여 하고 30분, 60분, 120분 및 180분에 꼬리정맥으로부터 채혈하여 정맥혈의 혈당 농도 변화를 Commercial kit (Dongbang International Co.)를 사용하여 측정했다.

사. 혈중 글루코스 농도 측정

Glucose Assay Kit(Cayman)를 사용하여 혈청 2.5 μ l에 250 μ l의 1X enzyme mixture를 섞고 37 $^{\circ}$ C incubator에서 10분간 방치한 다음, 각 샘플을 96 well plate에 100 μ l씩 분주하고 plate reader로 520nm에서 흡광도를 측정, 혈중 글루코스 농도를 산출했다.

아. 혈중 인슐린 농도 측정

Mouse Insulin Elisa Kit(SHIBAYAGI, Co., Japan)의 프로토콜에 따라 Anti-insulin 처리된 plate를 washing buffer로 4번 헹구어 내고 각 well에 Biotin-conjugated anti-insulin 100 μ l과 혈청 10 μ l을 넣은 다음 2시간 실온(20~25 $^{\circ}$ C)에서 방치했다. 다시 washing buffer로 4번 헹구어 내고 각 well에 HRP-conjugated streptavidin 100 μ l씩 넣어 30분간 실온에 방치하고 washing buffer로 4번 헹구어 낸 다음 각 well에 Chromogenic substrate reagent 100 μ l를 넣고 30분간 실온 방치하고 각 well에 Reaction stopper 100 μ l씩 분주하고 450nm에서 흡광도를 측정하여 인슐린 농도를 산출했다.

자. 실험동물모델을 통한 차가버섯 균사체의 항비만/당뇨 효능 검증 실험 설계

Figure 4-40과 같이 negative control군, 추출물 투여군, positive control군으로 구별하여 실험을 설계하였다.

(1) 동물 사육 및 식이 조성

사용된 동물은 생후 4주된 수컷 생쥐로써, 일정기간의 고지방식이에 의해 자동적으로 비만/당뇨가 유발되는 C57BL/6J 종 mice를 사용했다. 1주일 동안 AIN-93 diet를 급여하여 환경에 적응 시킨 후 Figure 4-40과 같이 정상식이 대조군(N-C group), 고지방식이 대조군(H-C group)을 negative control군으로 나눈 뒤, 고지방식이+80 $^{\circ}$ C추출한 균사체 추출물(2Brix) 투여군(M80), 고지방식이+150 $^{\circ}$ C에서 추출한 균사체 추출물을 2배 희석한 저농도(1Brix) 투여군(M150L), 고지방식이+150 $^{\circ}$ C에서 추출한 균사체 추출물(2Brix) 투여군(M150)을 treatment group으로 하였으며, 고지방식이+균사체 배양액(2Brix) 투여군(MC), 고지방식이+고순도 단백다당체 추출물 투여군(PP), 고지방식이+메시마 투여군(M)을 positive control군으로 나누었다. 각 투여물은 하루 한번 1~2ml/kg bw, 200mg/kg bw 씩 경구투여 하였고 물과 실험 식이는 자유롭게 섭취하도록 함(Figure 4-40). 실험 식이는 정상식이 AIN-93 diet 10% fat calorie, 고지방식이 AIN-93 diet 60% fat calorie로 Research DietTM사

(USA) 제품을 구입하여 공급하였으며 그 조성은 Table 4-2과 같다. 식이섭취량은 2일 간격으로, 체중은 1주일에 한 번씩 기록했다. 실험 기간 동안 실내 온도는 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, 습도는 $53\pm 2\%$ 를 유지하고, 명암은 12시간 (8:00~20:00) 주기로 조명했다.

차. 간 조직 중 글리코겐 함량 분석

Glucose oxidase method에 근거하여 간 조직 0.05g에 30% KOH 1ml을 가하고 100°C water bath에서 30분간 포화시킨 다음 포화용액 500 μl 를 20% Na_2SO_4 , ethanol과 섞어 -20°C 에서 12시간 동안 침전시켰다. 침전 후 5,000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 제거하고 남은 pellet을 70% ethanol로 washing하고 1시간 동안 건조시켜 4N H_2SO_4 을 섞고 100°C water bath에서 10분간 처리 후 4N NaOH 200 μl 를 가하여 중화하고 500nm에서 흡광도를 측정하여 글리코겐 함량 분석했다.

카. 차가버섯 균사체 음료 개발

차가버섯 균사체 추출물 음료의 제조 배합비율은 선행연구를 참고하여 실시한 예비 실험 및 예비 관능평가를 바탕으로 Table 4-10와 같이 A, B, C, D, E 다섯 군의 기본 배합을 설정하였다. 150°C 에서 추출한 차가버섯 균사체 추출물은 Filter unit 0.45 μm 의 syringe driven filter(Millipore corporation bedford MA 01730 USA)로 여과하였고, 차가버섯 균사체 추출물의 베타 글루칸 함량, 사과, 대추, 영지 농축액 첨가량을 달리하여 제조한 후 compact Dry(Nissui, Pharma, Japan)를 이용, $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하여 Total Count(48시간 배양), Coliform(24시간), E. coli(24시간) 검사하였다. 관능평가는 식품영양학전공 대학원생 12명을 관능평가요원으로 선정하여, 실험목적과 관능적 품질 요소를 잘 인식하도록 사전 교육을 시킨 후 각 시료의 향미, 색, 단맛, 쓴맛, 신맛, 종합적 기호도 등에 대하여 5점 평점법(5점; 가장 좋다, 4점; 좋다, 3점; 보통, 2점; 나쁘다, 1점; 매우 나쁘다)으로 평가, 실시했다.

타. 통계 처리

모든 실험 결과는 SPSS 12.0.1를 이용하여 평균(mean) \pm 표준편차(SD)로 표시하였음. 각 군 간의 통계적 유의성 검증은 $p < 0.05$ 수준에서 t-test 및 Duncan test를 통하여 검증하였고, 그룹간의 유의성 검증은 ANOVA분석을 하였다. 집단 간 유의정도를 살펴보기 위해 Duncan's Multiple Range test를 실시하였고, $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증했다.

2. 결과 및 고찰

가. 차가버섯 추출 시료 준비 및 세포 독성 농도 확인

실험에 이용된 차가 버섯 자실체 및 균사체 추출 시료는 Table 4-1과 같으며 전북대학교 생물응용공학과(주관연구책임자)에서 공여 받아 사용하였다. 3T3-L1세포에서 분화억제 및 지질 축적 억제 효과를 나타내는 유효 농도와 독성농도를 정하기 위해 Table 4-1와 같이 다양한 농도의 추출시료를 처리하였다. crude extract의 경우 세포 독성을 나타내는 농도는 배지 ml당 0.1 μl ~50 μl 의 추출물 시료를 첨가했을 때 차가버섯 자실체 추출물의 경우 모든 추출조건에서 5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 부터 독성을 나타내

었다. 군사체 추출물의 경우 50 μ l/ml에서도 독성을 보이지 않았음. 단백다당체 추출 조건을 달리한 detail extract의 경우 배지 ml당 20 μ g~1000 μ g의 추출물 시료를 첨가했을 때 차가버섯 자실체 및 군사체 추출물의 모든 추출조건에서 독성을 보이지 않았다.

(1) 3T3-L1세포에서 차가버섯 자실체 추출물(crude extract)의 분화 억제 및 지질 축적 억제 효과

3T3-L1 세포에서 차가버섯 자실체 추출물의 지방세포로의 분화 억제 및 세포 내 지질 축적 억제 효과를 살펴보기 위해 분화 전 3T3-L1 세포에 분화유도 물질과 추출조건을 달리한 각 추출물을 농도별로 배지에 첨가하여 4일간 배양하였다.

3T3-L1 세포의 지방세포로의 분화 유도를 위해 10% FBS를 함유한 DMEM배지에 insulin, IBMX 및 Dexamethasone을 첨가하였음. 군사체 추출물(crude extract)은 0.1~3 μ l/ml의 농도로 배지에 각각 첨가하였음. 각 추출물 처리 후 3T3-L1 세포내 중성 지질 함량은 control과 비교시 열수 추출물 및 100 $^{\circ}$ C 열수 추출물은 0.1 μ l/ml, 초음파 추출물, 전자과단계별 추출물 및 70 $^{\circ}$ C 열수 추출물은 1 μ l/ml농도부터 유의적으로 낮아졌음(Figure 4-2 & Figure 4-3). 전자과 추출물 및 열수 후 전자과 추출물은 1 μ l/ml농도부터 세포내 중성 지질 함량이 낮아졌으나 유의적 차이는 보이지 않았다(Figure 4-2).

(2) 3T3-L1세포에서 차가버섯 자실체 및 군사체 추출물(crude extract) 동일량 처리시 분화 억제 및 지질 축적 억제 효과

동일량의 차가버섯 자실체 및 군사체 추출물 처리시의 3T3-L1 세포내 중성지질 함량 변화를 비교하기 위해 독성 없이 유효 효과를 나타낸 1 μ l/ml농도로 모든 추출 조건 시료를 배지에 첨가하여 배양하였다. 자실체 추출물 중 열수 추출물, 70 $^{\circ}$ C 열수 추출물, 100 $^{\circ}$ C 열수 추출물 및 초음파 추출물은 control과 비교 시 3T3-L1 세포내 중성지질 함량이 유의적으로 감소하였음(Figure 4-4). 70 $^{\circ}$ C 열수 추출물 및 100 $^{\circ}$ C 열수 추출물의 경우 control보다 40%이상 중성지질 함량이 감소하여 모든 추출 조건 중 가장 낮은 지질 축적 억제 효과를 나타내었다(Figure 4-4).

(3) 3T3-L1세포에서 차가버섯 자실체 추출물(detail extract)의 분화 억제 및 지질 축적 억제 효과

단백다당체 추출 조건을 달리한 자실체 추출물 처리 시 3T3-L1 세포내 중성지질 함량 변화를 비교하기 위해 20 μ g~100 μ g/ml농도로 모든 추출 조건의 추출물을 배지에 첨가하여 배양하였다. 효소 처리 후 추출 온도 100 $^{\circ}$ C 조건에서 추출한 IFR(80-3)-EH-100-1hr, IFR(80-3)-EH-100-2hr 및 IFR(80-3)-EH-100-5hr 추출물은 50 μ g/ml농도부터 독성 없이 3T3-L1 세포내 중성지질 함량이 control과 비교시 유의적으로 감소하였다(Figure 4-5). 효소 처리 후 추출 온도 125 $^{\circ}$ C 조건에서 추출한 IFR(80-3)-EH-125-1hr, IFR(80-3)-EH-125-2hr 및 IFR(80-3)-EH-125-5hr 추출물은 100 μ g/ml 농도부터 독성 없이 3T3-L1 세포내 중성지질 함량이 control과 비교 시 유의적으로 감소하였다(Figure 4-6). 효소 처리 후 추출 온도 150 $^{\circ}$ C 조건에서 추출한 IFR(80-3)-EH-150-1hr, IFR(80-3)-EH-150-2hr 및 IFR(80-3)-EH-150-5hr 추출물 중 IFR(80-3)-EH-150-2hr 및 IFR(80-3)-EH-150-5hr 추출물만이 100 μ g/ml농도에서 독성 없이 3T3-L1 세포내 중성지질 함량이

control과 비교시 유의적으로 감소하였다(Figure 4-7). 비효소 처리 추출 온도 100°C 조건에서 추출한 IFR(80-3)-H-100-1hr 및 IFR(80-3)-H-100-2hr 추출물은 50µg/ml농도부터 IFR(80-3)-H-100-5hr 추출물은 20µg/ml농도부터 독성 없이 3T3-L1 세포내 중성지방 함량이 control과 비교시 유의적으로 감소하였다(Figure 4-8). 비효소 처리 추출 온도 80°C 조건에서 추출한 IF(80-3)-H 추출물은 20µg/ml농도부터 독성 없이 3T3-L1 세포내 중성지방 함량이 control과 비교시 유의적으로 감소하였다(Figure 4-9).

(4) 3T3-L1세포에서 차가버섯 균사체 배양액 및 균사체 1차 추출물의 분화 억제 및 지질 축적 억제 효과

균사체 배양액 및 균사체 1차 추출물 처리 시 3T3-L1 세포내 중성지방 함량 변화를 비교하기 위해 100µg~1000µg/ml농도로 모든 추출 조건 추출물을 배지에 첨가하여 배양하였다. 균사체 배양액 및 균사체 1차 추출물은 100µg/ml부터 독성 없이 3T3-L1 세포내 중성지방 함량이 control과 비교시 유의적으로 감소하였다(Figure 4-10).

나. 3T3-L1세포에서 분화 및 지질대사 관련 단백질 및 효소의 mRNA 발현 변화

3T3-L1 세포에서 지방 축적 억제 효과를 나타낸 차가버섯 자실체 추출물(열수 추출물, 70°C열수 추출물, 100°C열수 추출물 및 초음파 추출물)을 1 µl/ml농도로 배지에 처리하여 4일간 배양한 후 3T3-L1 세포 분화 및 지질대사 관련 단백질 및 효소의 mRNA 발현 변화를 조사하였다. 제2형 당뇨병 관련 지표 단백질인 PAI-1 및 TNFα의 mRNA 발현은 열수 추출물에서 control과 비교시 유의적으로 감소하였다(Figure 4-11 & Figure 4-12). PAI-1의 경우 열수 추출물뿐만 아니라 70°C열수 추출물, 100°C열수 추출물 및 초음파 추출물에서도 control과 비교시 유의적으로 감소하였다(Figure 4-12). 지방세포 분화 지표 단백질 중 하나인 PPARα의 mRNA 발현(발현 감소시 분화 유도)은 control과 비교시 모든 추출물 시료 처리시 유의적으로 증가하였고 열수 추출물 및 100°C열수 추출물의 경우 가장 높은 발현 증가를 나타내었다(Figure 4-13). 역시 지방세포 분화 지표 단백질 중 하나인 PPARγ의 mRNA 발현(발현 증가시 분화 유도)은 control과 비교시 100°C열수 추출물에서 control과 비교시 유의적으로 감소하였다(Figure 4-14).

다. 차가버섯 자실체 추출물(detail extract)의 HIT-T15세포 생존능 측정

차가버섯 자실체의 단백다당체 추출 조건을 달리한 추출물의 췌장 세포 생존능에 대한 농도별 효과는 Figure 4-15, Figure 4-16, Figure 4-17 및 Figure 4-18과 같았다. IFR(80-3)-EH-125-2hr 추출물은 시료 농도 160ug/ml에서 Alloxan 처리군보다 시료 처리군에서 생존능이 증가하는 경향을 보였으나 유의적 차이는 나타나지 않았다(Figure 4-16). IFR(80-3)-EH-125-5hr 추출물은 시료 농도 360ug/ml에서 Alloxan 처리군보다 시료 처리군에서 생존능이 증가하는 경향을 보였으나 유의적 차이는 나타나지 않았다(Figure 4-17). IFR(80-3)-EH-150-1hr 추출물은 처리 농도 200ug/ml에서 Alloxan 처리군보다 생존능이 유의적으로 증가하여 췌장세포 보호 효과를 나타내었다(Figure 4-18).

(1) 차가버섯 균사체 추출물(detail extract)의 HIT-T15세포 생존능 측정

차가버섯 균사체의 단백다당체 추출 조건을 달리한 추출물의 췌장 세포 생존능에 대한 농도별 효

과는 Figure 4-19 ~ Figure 4-21과 같았다. 차가버섯 균사체 IMR(80-3)-EH-125-2hr 추출물은 처리 농도 160ug/ml에서 Alloxan 처리군보다 생존능이 유의적으로 증가하여 췌장세포 보호 효과를 나타냈다(Figure 4-19).

IMR(80-3)-EH-125-5hr 추출물은 120ug/ml에서 Alloxan 처리군보다 생존능이 유의적으로 증가하여 췌장세포 보호 효과를 나타냄(Figure 4-20.) IMR(80-3)-EH-150-1hr 추출물은 처리 농도 80ug/ml에서 Alloxan 처리군보다 생존능이 유의적으로 증가하여 췌장세포 보호효과를 나타냈다(Figure 4-21).

(2) 차가버섯 균사체 배양액 및 균사체&자실체 1차 추출물의 HIT-T15세포 생존능 측정

차가버섯 균사체 배양액 및 균사체&자실체 1차 추출물의 췌장 보호 효과는 Figure 4-22과 같았다. 균사체 배양액 P0 추출물은 처리 농도 62.5ug/ml에서 Alloxan 처리군보다 생존능이 유의적으로 증가함으로써 췌장 세포 보호 효과를 나타냈다(Figure 4-22).

(3) 차가버섯 자실체에 대한 식이섭취량 및 체중조절, 체지방 축적조절 검증

N-C군과 비교시 H-C군의 식이섭취량이 낮은 경향을 보였고 메시마를 투여한 M군이 유의적으로 증가하였다(Table 4-3). 총 칼로리 섭취에서는 N-C군과 비교시 H-C군에서 유의적으로 증가하였으며, H-C군에 비해 메시마를 투여한 M군에서 유의적으로 증가하는 결과를 나타냈고 그 외 투여군에서는 증가하는 경향을 보였다(Table 4-3). 고지방 식이군은 정상 식이 N-C군과 비교시 유의적으로 높은 체중 증가량을 보였다. 고지방 식이군에서 H-C군과 비교시 차가버섯 자실체 추출물을 투여한 F80 및 F150L군과 PP군에서 증가량이 낮은 경향을 보였다(Table 4-4). 체중 당 부고환 주변 지방 증가량은 고지방 식이로 비만이 유도된 H-C군이 N-C군과 비교시 유의적으로 높은 지방량을 보였다. 고지방 식이와 차가버섯 자실체 추출물을 투여한 F80, F150L, F150군은 H-C군에 비해 지방량이 유의적으로 낮았으며 고지방식이와 메시마를 투여한 M군도 유의적으로 낮은 결과를 보였다. 반면 MC 및 PP군은 H-C군과 비교시 지방량이 낮은 경향을 나타냈다(Fig 4-24). 체중 당 등 지방 증가량은 고지방 식이로 비만이 유도된 H-C군이 N-C군과 비교시 유의적으로 높은 지방량을 보였음. F80군은 H-C군에 비해 유의적으로 낮은 지방량을 보였다(Fig 4-25).

(4) 차가버섯 자실체에 대한 혈중 및 간조직 중의 지질 및 지단백질의 농도 조사

혈중 중성지질(TG), Total cholesterol은 고지방 식이로 비만이 유도된 H-C군에서 N-C군 및 투여군과 비교시 유의적으로 높은 수치를 보였고, HDL-cholesterol은 N-C군을 제외한 모든 투여군이 H-C군과 비교시 유의적으로 높았다(Table 4-5). 간조직의 지질 중 TG는 각 군간의 유의적 차이를 보이지 않았으며, TC의 경우 고지방식이로 비만이 유도된 H-C군과 비교시 F80군을 제외한 모든 투여군에서 유의적으로 낮은 수준을 보였고 F80군은 H-C군에 비해 낮은 경향을 나타냈다(Table 4-6).

(5) 차가버섯 자실체에 대한 혈중 및 간조직 중의 카르니틴 함량

혈중 카르니틴 함량에서 NEC분획의 농도는 M군이 N-C, H-C 및 기타 투여군에 비해 유의적으로 높았다. ASAC분획 농도는 N-C군과 비교시 H-C군에서 낮은 경향을 나타냈고, M80군은 유의적으로 낮았음. total carnitine(TCNE)는 M군이 유의적으로 높은 값을 나타냈다. Acyl/free ratio는

N-C군에 비해 M80 및 M150L군에서 유의적으로 낮아졌음(Table 4-7). 간조직 중의 카르니틴 함량에서 NEC분획의 농도는 N-C군에 비해 H-C군이 낮아지는 경향을 보였으며, M80, M150, MC, M군의 농도가 유의적으로 낮았음. ASAC 및 AIAC 분획 농도는 N-C에 비해 고지방 식이군 농도가 낮았다. TCNE는 고지방 식이군에 비해 N-C군에서 유의적으로 높았으며 Acyl/free ratio는 군간 유의적 차이가 없었다.(Table 4-8).

(6) 차가버섯 자실체에 대한 간 조직 중의 지질대사 관련 효소 mRNA 발현 조사

간 조직중 지질 대사, 당대사 및 에너지 대사에 관여하는 효소 및 단백질의 mRNA 발현 정도를 real-time PCR을 통하여 살펴보았다. Acetyl-Co A carboxylase, PPAR α , uncoupling protein 2, acyl CoA oxidase 및 adiponetic 등의 발현은 N-C에 비해 고지방 식이군에서 증가하였음. 그러나 F80과 F150군은 유의적으로 N-C 군의 수준으로 감소하였다(Figure 4-26~4-36).

(7) 차가버섯 자실체에 대한 주별 공복시 혈당 조절 검증

공복시 혈당 수준 변화는 N-C군에 비해 고지방 식이군이 유의적으로 높은 수준을 나타냈고, 고지방 식이군간 비교시 7주째 측정된 혈당에서 H-D군에 비해 차가버섯 자실체 추출물을 투여한 F80 및 F150L군이 유의적으로 낮아졌으며 11주에는 F80 및 M군의 혈당이 감소하는 경향을 보였다(Table 4-9).

(8) 차가버섯 자실체에 대한 글루코스 내당능 테스트(경구당부하검사)

고지방 식이 섭취로 인하여 자동적으로 비만/제 2형 당뇨병이 유발된 C57BL/6J mice에서 차가버섯 자실체 추출물이 내당능에 미치는 영향을 살펴보기 위해 경구투여 12주째에 경구 당부하검사를 실시한 결과는 Figure 4-37 과 같음. H-C군이 경구투여 30분에서 211mg/dl로 최고 혈당 수치를 나타냈고, 180분에서 F150L군이 H-C군에 비해 낮아지는 경향을 보였다(Figure 4-37).

(9) 차가버섯 자실체에 대한 혈중 글루코스 농도

혈액에서 분리한 혈청의 글루코스 분석결과 N-C군에 비해 고지방 식이군에서 유의적으로 증가하였으며, H-D군과 비교시 F150L 및 F150에서 낮은 경향을 나타냈고 M군은 유의적으로 낮은 수준을 보였다(Figure 4-38).

(10) 차가버섯 자실체에 대한 혈중 인슐린 농도

고지방 식이를 섭취한 C57BL/6J mice 중 H-C군이 N-C군에 비해 유의적으로 높은 인슐린 수준을 보였고 고지방 식이 섭취 군간 비교시 차가버섯 자실체 추출물을 투여한 F80, F150L, F150군은 H-C군에 비해 인슐린 수준이 낮은 경향을 보였으며 PP 및 M군은 유의적으로 낮은 수준을 나타냈다(Figure 4-39).

라. 차가버섯 균사체에 대한 식이섭취량 및 체중조절, 체지방 축적조절 검증

정상식이 대조군(N-C)에 비해 고지방 식이군들의 하루 섭취 칼로리는 유의적으로 증가하였으며, 고지방식이 대조군(H-C)에 비해 메시마 투여군(M)에서 유의적으로 증가하는 결과를 나타냈다(Table 4-11). 고지방 식이군은 정상 식이군(N-C)에 비해 유의적으로 높은 체중 증가량을 보였음.

고지방 식이군 중 차가버섯 균사체 80°C(M80), 150°C 저농도(M150L) 추출물 투여군과 고순도 단백질 다당체 투여군(PP)이 고지방식이 대조군(H-C)보다 체중 증가량이 유의적으로 낮았으며, 차가버섯 균사체 150°C 추출물 투여군(M150), 배양액(MC), 메시마(M) 투여군은 증가량이 낮은 경향을 보였다(Table 4-12). 체중 당 부고환 주변 지방 증가량은 고지방 식이로 비만이 유도된 H-C군이 N-C군과 비교시 유의적으로 높은 지방량을 보였다. 고지방식이 대조군(H-C)에 비해 차가버섯 균사체 추출물을 투여한 M150군, 메시마 투여군(M)에서 지방량이 유의적으로 낮았다(Fig 4-41). 체중 당 등 지방 증가량은 고지방식이로 비만이 유도된 H-C군이 N-C군과 비교시 유의적으로 높은 지방량을 보였음. M80군은 H-C군에 비해 유의적으로 낮은 지방량을 보였다(Fig 4-42).

(1) 차가버섯 균사체에 대한 혈중 및 간조직 중의 지질 및 지단백질의 농도 조사

혈중 중성지질(TG) 수준은 고지방식이로 비만이 유도된 H-C군에서 유의적으로 가장 높은 수치를 보였고, H-C군 보다 차가버섯 균사체 추출물 투여군과 MC, PP, M군이 유의적으로 낮은 결과를 나타냈다. 총 콜레스테롤(TC) 수준은 N-C군보다 고지방 식이군이 유의적으로 높은 수치를 나타냈으며 고지방식이 대조군(H-C)과 비교시 M80, PP, M군에서 유의적으로 낮았다. HDL-cholesterol은 군간의 유의적 차이가 없었다(Table 4-13). 간조직의 지질 중 TG는 고지방식이 대조군(H-C)보다 M80, M150,군에서 유의적으로 낮은 수준을 보였으며, TC의 경우 H-C군과 비교시 모든 투여군에서 유의적으로 낮은 수준을 보였다(Table 4-14).

(2) 차가버섯 균사체에 대한 혈중 및 간조직 중의 carnitine 함량

혈중 카르니틴 함량 중 NEC분획의 농도는 군 간의 유의적 차이가 없었음. ASAC, total carnitine(TCNE)분획 농도는 M80군에서 유의적으로 가장 높았고, AIAC분획은 N-C군에 비해 고지방 식이군들이 유의적으로 낮았으며 고지방식이 군 간의 유의 차이는 없었다. Acyl/free ratio는 N-C군과 차가버섯 균사체 추출물 투여군이 유사한 수준으로 나타났다(Table 4-15). 간조직 중의 카르니틴에서 NEC 분획은 MC와 M군에서 유의적으로 높았으며, ASAC 분획과Acyl/NEC 분획은 M80에서 유의적으로 높았다. 총카르니틴 함량은 모든 투여군에서 유의적으로 높았다(Table 4-16).

(3) 차가버섯 균사체에 대한 간 조직 중의 지질대사 관련 효소 mRNA 발현 조사

간 조직 중 지질 대사, 당대사 및 에너지 대사에 관여하는 효소 및 단백질의 mRNA 발현 정도를 real-time PCR을 통하여 살펴보았다. 지방합성과 관련된 ACC는 M150L, M150 및 MC군에서 감소하였다. β -oxidation과 관련된 CPT-1은 M150L과 M150군에서 정상군과 비슷한 수준을 보였다. 지방세포 분화 지표 단백질 중 하나인 PPAR α 의 mRNA 발현(발현 감소시 분화 유도)은 M80와 MC군에서 증가하였다(Figure 4-43~4-53).

(4) 차가버섯 균사체에 대한 주별 공복시 혈당 조절 검증

공복시 혈당 수준 변화는 N-C군에 비해 고지방 식이군이 유의적으로 높은 수준을 나타냈고, 고지방 식이군간 비교시 7주째 측정된 혈당에서 H-D군에 비해 M150L군이 낮은 경향을 나타냈으며 11주에는 차가버섯 균사체 추출물을 투여한 M80, M150L, M150 및 M군의 혈당이 감소하는 경향을 보였다(Table 4-17).

(5) 차가버섯 균사체에 대한 글루코스 내당능 테스트(경구당부하검사)

고지방 식이 섭취로 인하여 자동적으로 비만/제 2형 당뇨병이 유발된 C57BL/6J mice에서 차가버섯 자실체 추출물이 내당능에 미치는 영향을 살펴보기 위해 경구투여 12주째에 경구 당부하검사를 실시한 결과는 Table 4-18 과 같음. H-C군이 경구투여 30분에서 211mg/dl로 최고 혈당 수치를 나타냈고, 180분에서 메시마 투여군(M)이 H-C군에 비해 유의적으로 낮아졌다(Table 4-18).

(6) 차가버섯 균사체에 대한 혈중 글루코스 농도

혈액에서 분리한 혈청의 글루코스 분석결과 N-C군에 비해 고지방 식이군에서 유의적으로 증가하였으며, H-D군과 비교시 M80, M150L, M150군 및 PP군에서 낮은 경향을 나타냈고 M군은 유의적으로 낮은 수준을 보였다(Figure 4-54).

(7) 차가버섯 균사체에 대한 혈중 인슐린 농도

고지방 식이를 섭취한 C57BL/6J mice 중 H-C군이 N-C군에 비해 유의적으로 높은 인슐린 수준을 보였고, 고지방 식이 섭취 군간 비교시 차가버섯 균사체 추출물을 투여한 M80, M150L군 및 PP, M군은 H-C군에 비해 유의적으로 낮은 인슐린 수준을 나타냈다(Figure 4-55).

(8) 차가버섯 균사체에 대한 간 조직 중 글리코겐 함량

정상식이 대조군(N-C)은 고지방식이 대조군(H-C) 보다 간 중 글리코겐 함량이 높은 경향을 보였고, 고지방식이 대조군(H-C)과 비교시 차가버섯 균사체 추출물 M150L, M150군에서 유의적으로 증가하였으며, MC 및 M군은 H-C군보다 글리코겐 함량이 높은 경향을 나타냈다(Figure 4-56).

(9) 차가버섯 균사체 음료 개발을 위한 미생물 검사

음료 개발을 위한 5가지 시료 모두에서 일반세균, 총대장균군 및 대장균은 검출되지 않았다(Figure 4-57).

(10) 차가버섯 균사체 음료 개발을 위한 관능평가

차가버섯 균사체 추출물의 β -glucan 함량, 사과, 대추 및 영지 농축액의 함량을 달리하여 제조한 차가버섯 드링크의 전체적 향미, 차가버섯의 향미, 색, 단맛, 쓴맛, 신맛, 전체적 기호도를 5점 평점법으로 평가한 결과는 Table 4-19, Figure 4-58과 같았다.

전체적인 향미와 색, 단맛은 유의적인 차이가 없었고, 차가버섯 고유의 향미는 β -glucan 함량이 많은 C가 가장 높았으며, D, E도 유의적으로 높은 결과를 보임. 쓴맛에서는 E의 기호도가 가장 높았고 쓴맛이 강한 C의 기호도는 낮은 것으로 나타났다. 신맛의 경우 사과 농축액 함량이 많은 B에서 가장 낮은 기호도의 경향을 보였으며 A와 E의 기호도가 좋은 것으로 보였다. 전체적으로 E가 유의적으로 가장 높은 선호도를 보여, 차가버섯 드링크 제조 배합비율로써 적합한 것으로 사료된다.

3. 연구결과 요약

3T3-L1세포에서 차가버섯 자실체 추출물(crude extract)의 분화 억제 및 지질 축적 억제 효과를 관찰한 결과, 각 추출물 처리 후 3T3-L1 세포내 중성 지질 함량은 control과 비교시 열수 추출물 및 100°C열수 추출물은 0.1µl/ml, 초음파 추출물, 전자과단계별 추출물 및 70°C열수 추출물은 1µl/ml농도부터 유의적으로 낮아졌다. 3T3-L1세포에서 차가버섯 자실체 및 균사체 추출물(crude extract) 동일량 처리시 분화 억제 및 지질 축적 억제 효과를 살펴본 결과, 자실체 추출물 중 열수 추출물, 70°C열수 추출물, 100°C열수 추출물 및 초음파 추출물은 control과 비교 시 3T3-L1 세포내 중성지질 함량이 유의적으로 감소하였다. 70°C열수 추출물 및 100°C열수 추출물의 경우 control보다 40%이상 중성지질 함량이 감소하여 모든 추출 조건 중 가장 낮은 지질 축적 억제 효과를 나타내었다. 3T3-L1세포에서 차가버섯 균사체 배양액 및 균사체 1차 추출물의 분화 억제 및 지질 축적 억제 효과는 균사체 배양액 및 균사체 1차 추출물은 100µg/ml부터 독성 없이 3T3-L1 세포내 중성지질 함량이 control과 비교시 유의적으로 감소하였다. 3T3-L1 세포에서 지방 축적 억제 효과를 나타낸 차가버섯 자실체 추출물(열수 추출물, 70°C열수 추출물, 100°C열수 추출물 및 초음파 추출물)을 1µl/ml농도로 배지에 처리하여 4일간 배양한 후 3T3-L1 세포 분화 및 지질대사 관련 단백질 및 효소의 mRNA 발현 변화를 조사하였다. 지방세포 분화 지표 단백질 중 하나인 PPARα의 mRNA 발현(발현 감소시 분화 유도)은 control과 비교 시 모든 추출물 시료 처리 시 유의적으로 증가하였고 열수 추출물 및 100°C열수 추출물의 경우 가장 높은 발현 증가를 나타내었다. 역시 지방세포 분화 지표 단백질중 하나인 PPARγ의 mRNA 발현(발현 증가 시 분화 유도)은 control과 비교 시 100°C열수 추출물에서 control과 비교 시 유의적으로 감소하였다.

차가버섯 균사체 배양액 및 균사체&자실체 1차 추출물의 췌장 보호 효과를 살펴보면, 균사체 배양액 추출물은 처리 농도 62.5ug/ml에서 Alloxan 처리군보다 생존능이 유의적으로 증가함으로써 췌장 세포 보호 효과를 나타내었다. 또한, 고지방식이로 비만 유도 후 2형 당뇨 특성을 나타내는 C57BL/6J mice에서 차가버섯 균사체 유래 다당체 보강이 간 중 지질 및 글리코겐, 혈중 포도당, 인슐린, 아디포넥틴 수준에 미치는 영향을 검토 하였다. 실험동물은 정상 대조군(N-C group), 고지방 대조군(H-C group), 고지방식이 + 저농도 균사체 추출물 투여군(M150L, 1ml/kg bw, β-glucan 1.303 mg), 고지방식이 + 균사체 추출물 투여군(M150, 2ml/kg bw, β-glucan 2.606 mg), 고지방식이 + 고순도 단백다당체 투여군(PP, 200mg/kg bw), 고지방식이 + 메시마 투여군(M, 200mg/kg bw) 6군으로 나누어 사육하였으며 연구결과는 다음과 같다.

부고환 지방은 차가버섯 균사체 추출물 투여 농도 의존적으로 유의적인 감소를 나타냈다. 혈중 중성지방 및 VLDL에서 차가버섯 균사체 투여군(M150)은 고지방 대조군(H-C)과 비교했을 때 각각 유의적으로 감소하였고, 혈중 총 콜레스테롤은 유의적 차이가 없었으며 HDL 콜레스테롤 농도는 높은 경향을 보였다. 간 조직의 중성지방 농도는 고지방 대조군(H-C)보다 차가버섯 균사체 투여 실험군(M150L, M150)이 각각 26.8%, 30.9% 감소되었고, 총 콜레스테롤은 각각 65.5%, 61.9% 낮아져 유의적인 감소효과를 확인하였다. 경구당부하 검사 결과 포도당 투여 3시간 후의 혈당이 고지방 대조군(H-C)보다 저농도 차가버섯 균사체 투여군(M150L) 4.9%, 차가버섯 균사체 투여군(M150) 9.5%, 고순도 단백다당체 및 메시마군(PP, M) 각각 8.7, 13.4%

감소하였다. 혈당반응면적 또한 차가버섯 균사체 투여군(M150)과 고순도 단백다당체 및 메시마군(PP, M)이 유의한 수준으로 낮았다. 혈중 인슐린 및 HOMA-IR 수준은 차가버섯 균사체 투여 실험군(M150L, M150)에서 고지방 대조군(H-C)보다 유의적으로 감소되었다. 간 중 글리코겐은 고지방 대조군(H-C)에서 글리코겐 합성이 저하된 반면 차가버섯 균사체 투여 실험군(M150L, M150)에서는 유의적으로 증가함을 확인하였다. 혈중 아디포넥틴은 고지방 대조군(H-C)보다 저농도 차가버섯 균사체 투여군(M150L)에서 높아지는 경향이 있었고, 차가버섯 균사체 투여군(M150)은 유의적으로 높아졌다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 단백다당체 함유 차가버섯 균사체 추출물이 식이유도 비만/당뇨 모델인 C57BL/6J mice의 지질수준 개선 및 혈당조절에 긍정적인 영향을 미치고 있어 이를 이용한 기능성 식품으로의 개발 가능성이 높다고 사료된다.

또한, 식이유도 비만 mice를 이용하여 단백다당체 함유 차가버섯 자실체 추출물의 항비만 효능을 보기 위해 정상식이군, 고지방식이군, 고지방식이+차가버섯자실체 저용량 투여군, 고지방식이+차가버섯자실체 고용량 투여군, 고순도 다당체 투여군, 메시마 투여군으로 14주간 경구투여 하였다.

실험결과는 다음과 같다. 체중은 차가버섯 자실체 추출물을 저용량 투여한 군이 고지방식이군과 비교시 유의적으로 감소하였다. 부고환 지방 비율은 고지방 식이와 자실체 고용량 및 저용량 투여한 군이 고지방식이군에 비해 유의적으로 낮아졌다. 혈중 중성지방 및 총 콜레스테롤은 고용량 및 저용량 투여군이 유의적으로 낮은 값을 나타내었다. 본 실험을 통해 단백다당체를 함유한 차가버섯 자실체 추출물의 투여는 식이로 비만이 유도된 생쥐에서 체중 및 부고환 지방울을 감소시키고 혈청 및 간중 지질을 개선하여 항비만에 긍정적인 효과가 있음을 알 수 있었다.

최종적으로, 차가버섯 균사체 추출물의 β -glucan 함량을 측정후, 사과, 대추 및 영지 농축액의 함량을 달리하여 제조한 차가버섯 드링크의 관능평가를 실시하여 맛과 기능성을 갖춘 차가버섯 음료를 개발하였다.

3T3-L1 세포배양

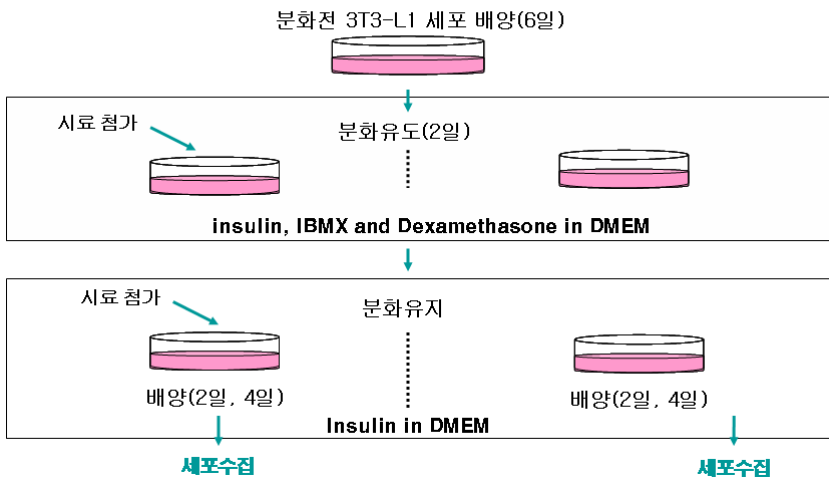


Figure 4-1. 3T3-L1 adipocyte culture.

DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium (non-differentiation medium); IBMX, Isobutylmethylxanthine;

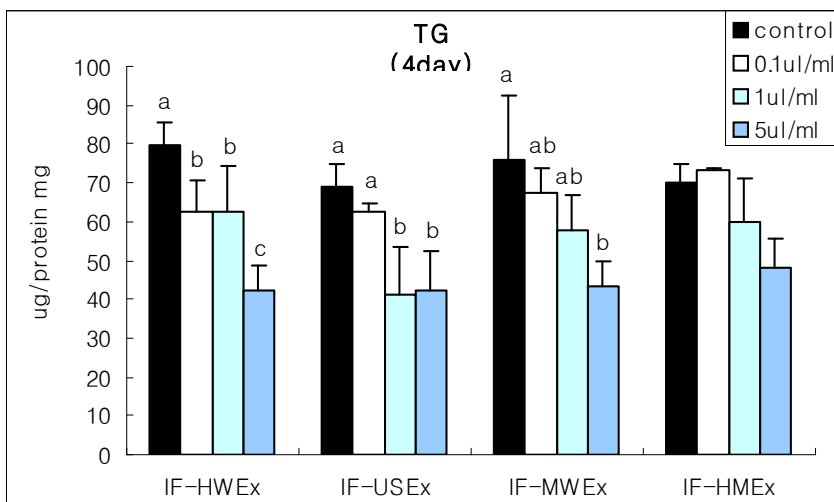


Figure 4-2. Triglyceride concentration in 3T3-L1 cell(1).

Data are expressed as mean±SD. Values with different alphabets on the bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

IF; Fruiting body, HWEx; hot water extract, USEx; ultrasonic extract, MWEx; microwave extract, HMEx; hot water & microwave extract.

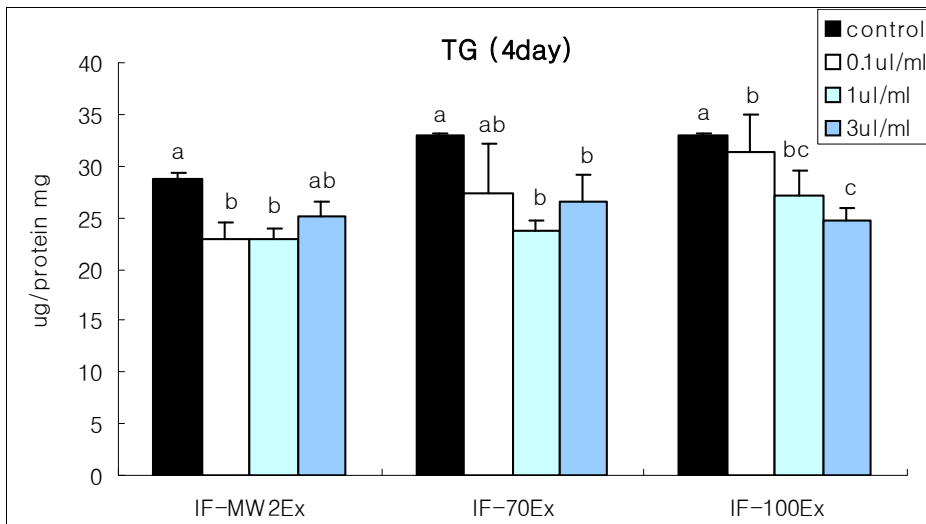


Figure 4-3. Triglyceride concentration in 3T3-L1 cell(2).

Data are expressed as mean±SD. Values with different alphabets on the bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

IF; Fruiting body, MW2Ex; microwave 2nd extract, 70Ex; 70°C hot water extract, 100Ex; 100°C hot water extract.

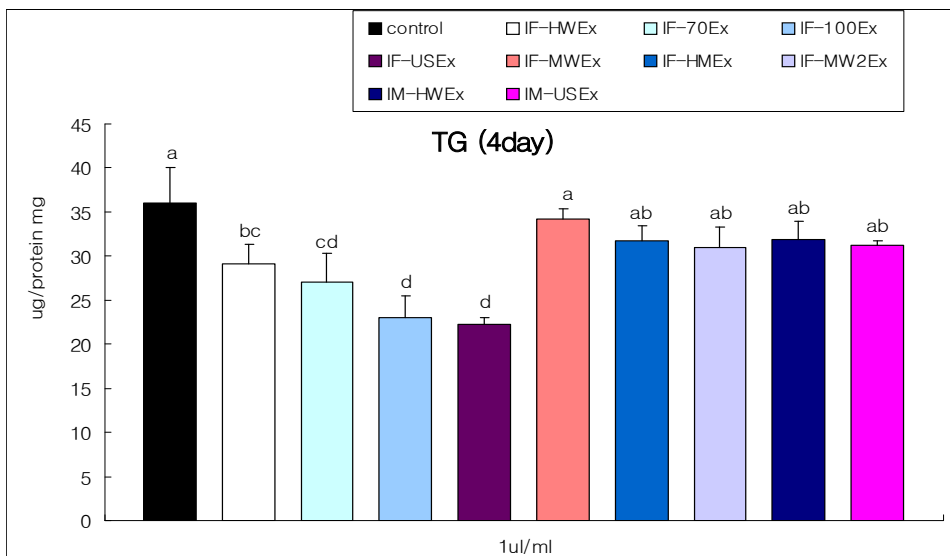


Figure 4-4. Triglyceride concentration in 3T3-L1 cell(5).

Data are expressed as mean±SD. Values with different alphabets on the bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

IF; Fruiting body, HWEx; hot water extract, USEx; ultrasonic extract, MWEx; microwave extract, HMEx; hot water & microwave extract, MW2Ex; microwave 2nd extract, 70Ex; 70°C hot water extract, 100Ex; 100°C hot water extract, IM; Mycelium.

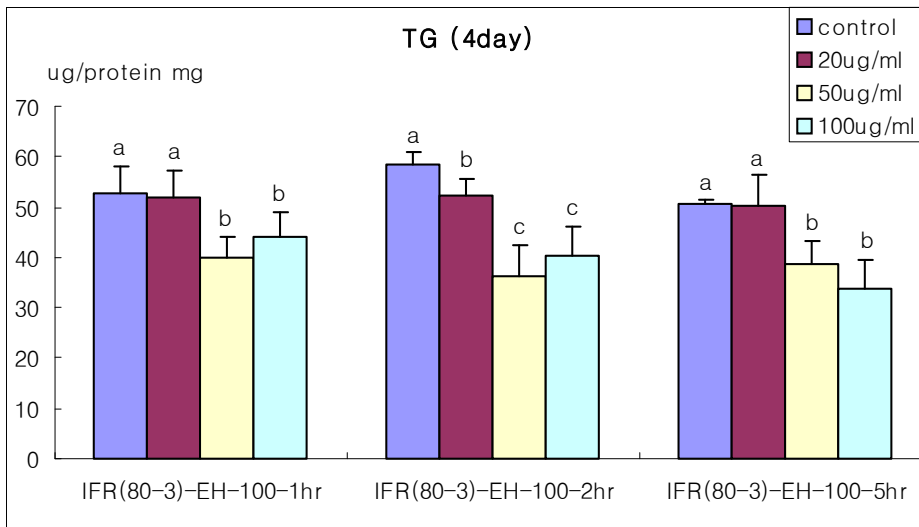


Figure 4-5. Triglyceride concentration in 3T3-L1 cell(6).
 Data are expressed as mean±SD. Values with different alphabets on the bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.
 IFR; Fruiting body 2nd extract.

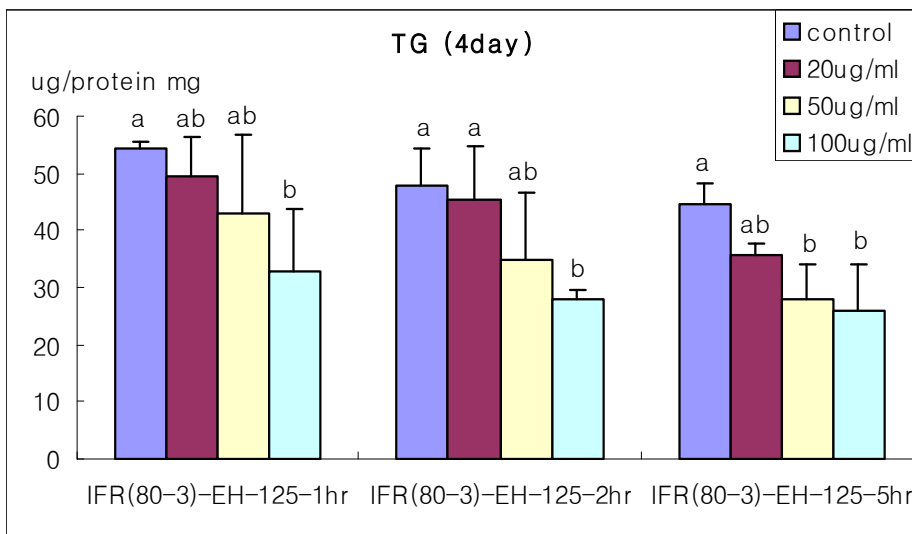


Figure 4-6. Triglyceride concentration in 3T3-L1 cell(7).
 Data are expressed as mean±SD. Values with different alphabets on the bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.
 IFR; Fruiting body 2nd extract.

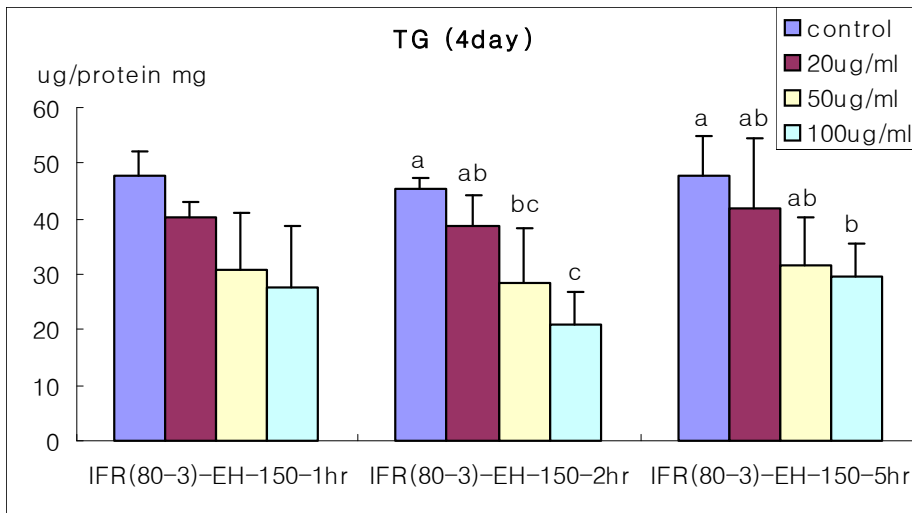


Figure 4-7. Triglyceride concentration in 3T3-L1 cell(8).

Data are expressed as mean±SD. Values with different alphabets on the bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

IFR; Fruiting body 2nd extract.

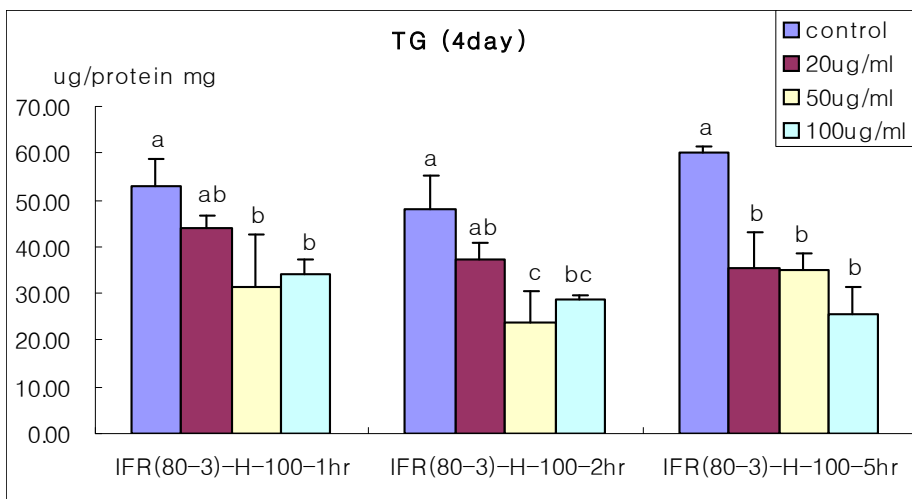


Figure 4-8. Triglyceride concentration in 3T3-L1 cell(9).

Data are expressed as mean±SD. Values with different alphabets on the bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

IFR; Fruiting body 2nd extract.

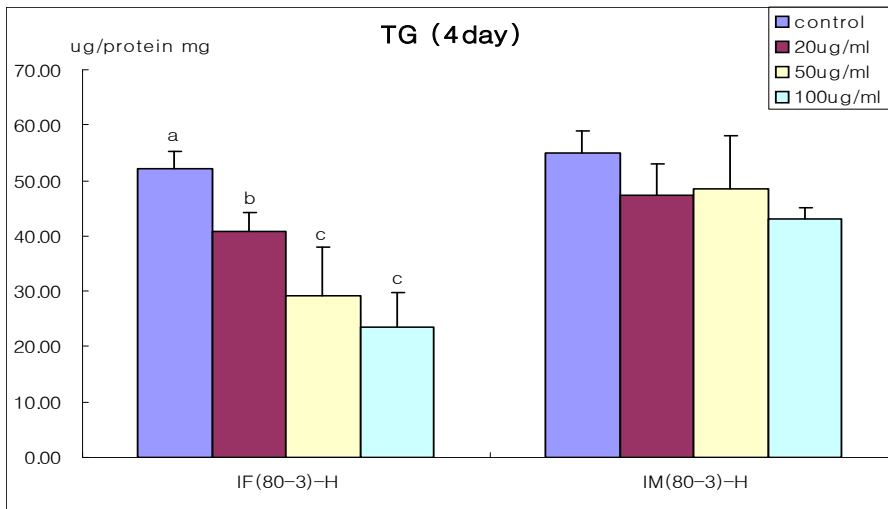


Figure 4-9. Triglyceride concentration in 3T3-L1 cell(10).

Data are expressed as mean±SD. Values with different alphabets on the bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

IF; Fruiting body, IM; Mycelium.

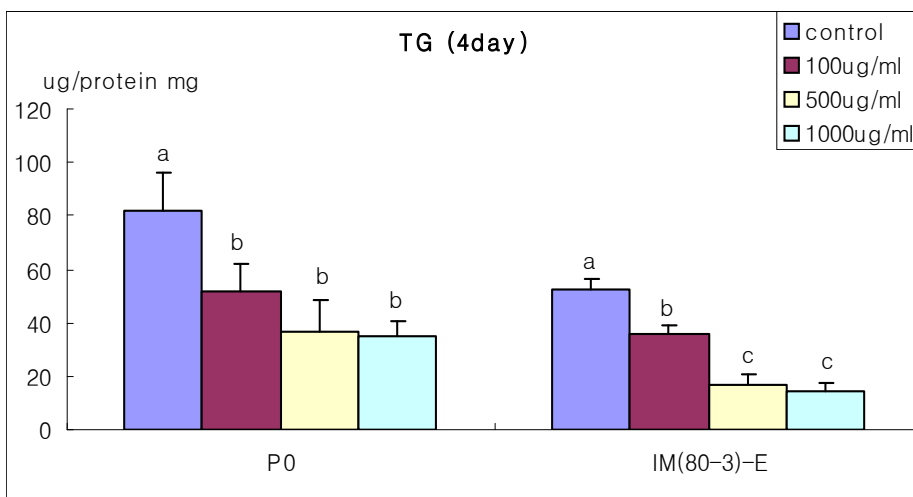


Figure 4-10. Triglyceride concentration in 3T3-L1 cell(14).

Data are expressed as mean±SD. Values with different alphabets on the bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Po ; Mycelium culture fluid, IM; Mycelium.

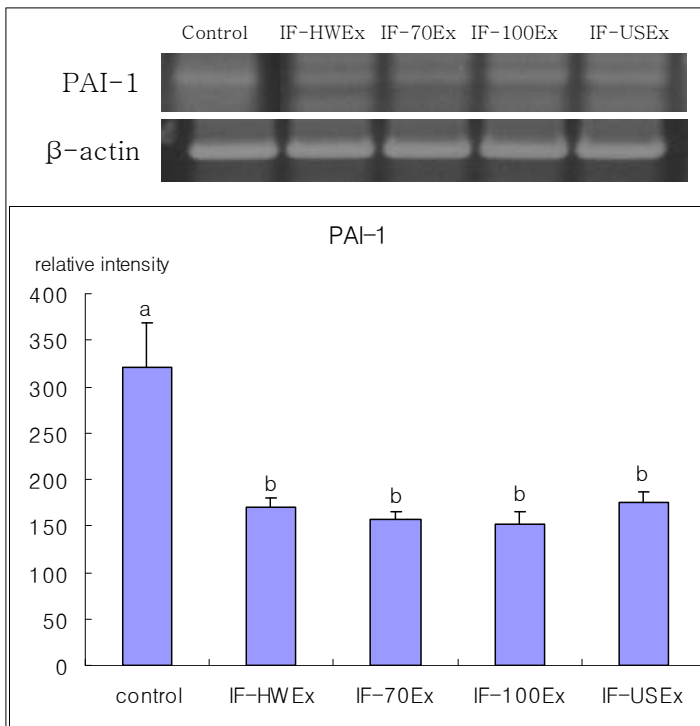


Figure 4-11. PAI-1 mRNA expression in 3T3-L1 cell.

Data are expressed as mean \pm SD. Values with different alphabets on the bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

IF; Fruiting body, HWEx; hot water extract, 70Ex; 70°C hot water extract, 100Ex; 100°C hot water extract, USEx; ultrasonic extract.

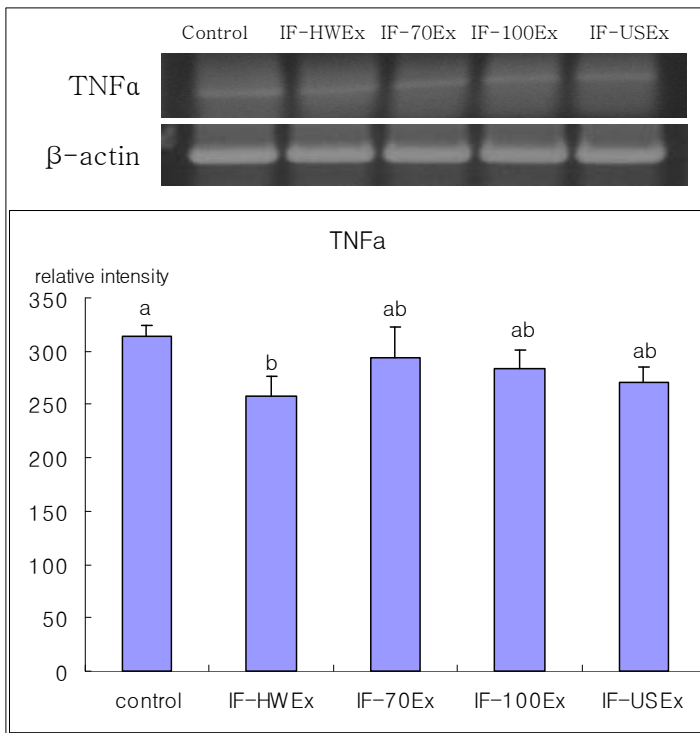


Figure 4-12. TNF α mRNA expression in 3T3-L1 cell.

Data are expressed as mean \pm SD. Values with different alphabets on the bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

IF; Fruiting body, HWEx; hot water extract, 70Ex; 70 $^{\circ}$ C hot water extract, 100Ex; 100 $^{\circ}$ C hot water extract, USEx; ultrasonic extract.

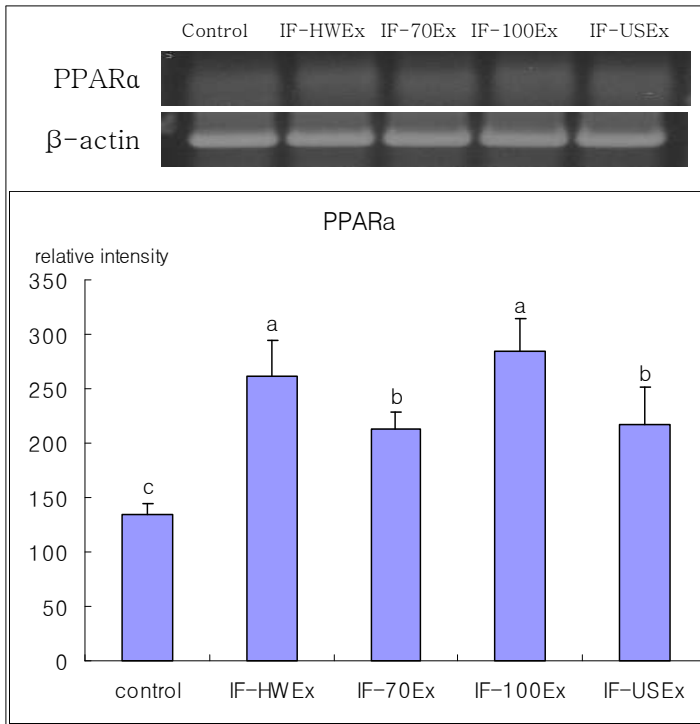


Figure 4-13. PPARα mRNA expression in 3T3-L1 cell.

Data are expressed as mean±SD. Values with different alphabets on the bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

IF; Fruiting body, HWEx; hot water extract, 70Ex; 70°C hot water extract, 100Ex; 100°C hot water extract, USEx; ultrasonic extract.

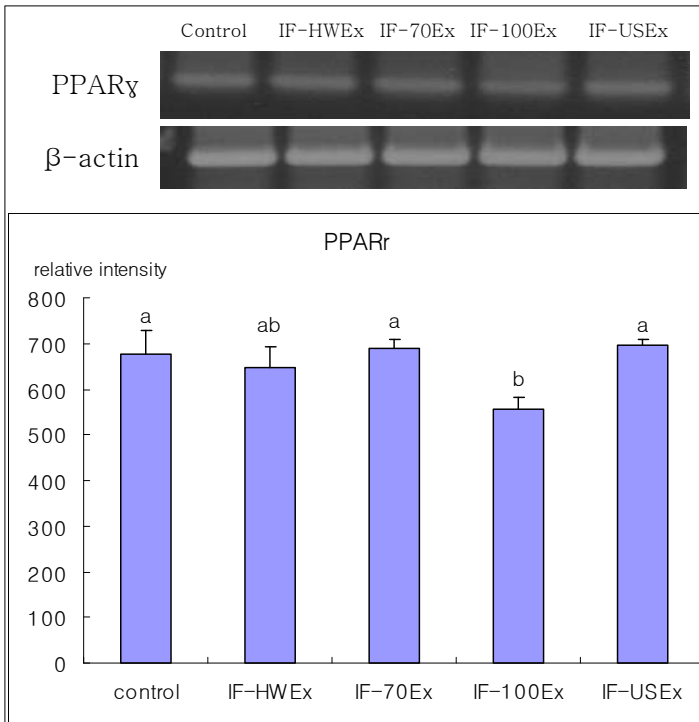


Figure 4-14. PPAR γ mRNA expression in 3T3-L1 cell.

Data are expressed as mean \pm SD. Values with different alphabets on the bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

IF; Fruiting body, HWEx; hot water extract, 70Ex; 70 $^{\circ}$ C hot water extract, 100Ex; 100 $^{\circ}$ C hot water extract, USEx; ultrasonic extract.

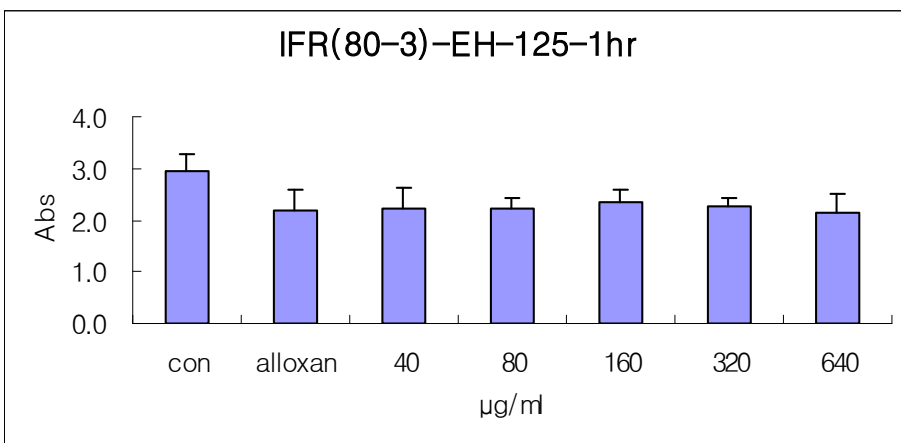


Figure 4-15. Cell viability in HIT-T15(4).

Cell viability was determined by MTT assay. Data are expressed as mean \pm SD.

IFR; Fruiting body 2nd extract.

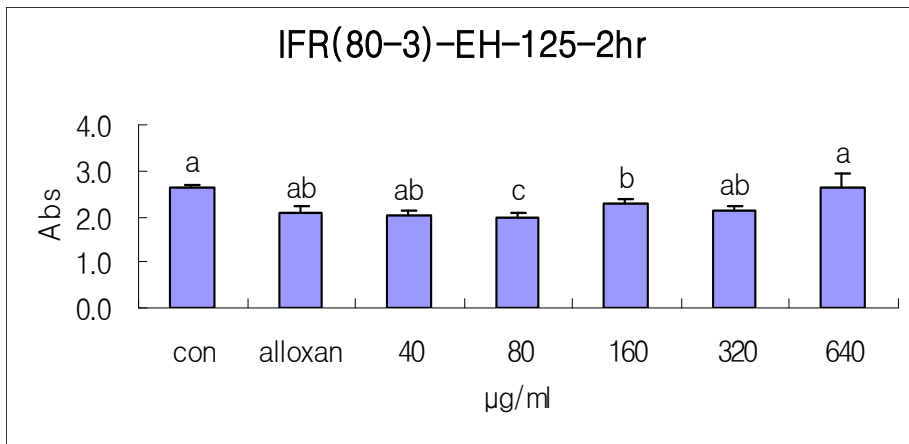


Figure 4-16. Cell viability in HIT-T15(5).

Cell viability was determined by MTT assay. Data are expressed as mean±SD. Values with different alphabets on the bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

IFR; Fruiting body 2nd extract.

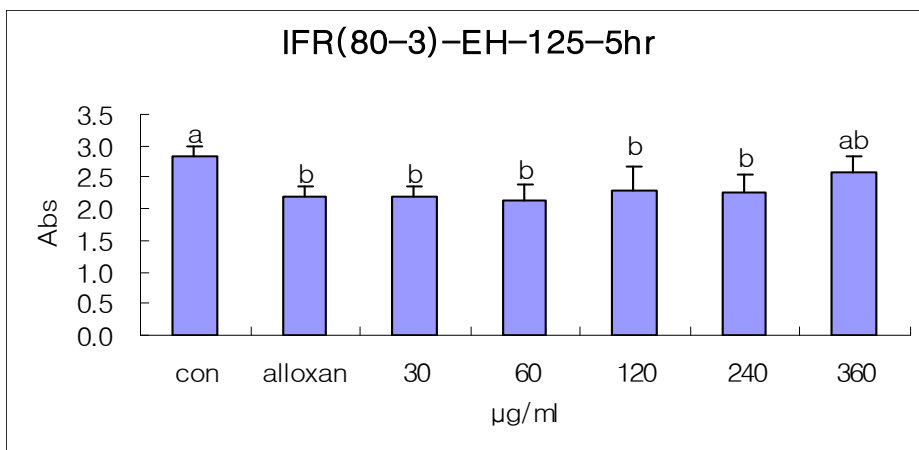


Figure 4-17. Cell viability in HIT-T15(6).

Cell viability was determined by MTT assay. Data are expressed as mean±SD. Values with different alphabets on the bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

IFR; Fruiting body 2nd extract.

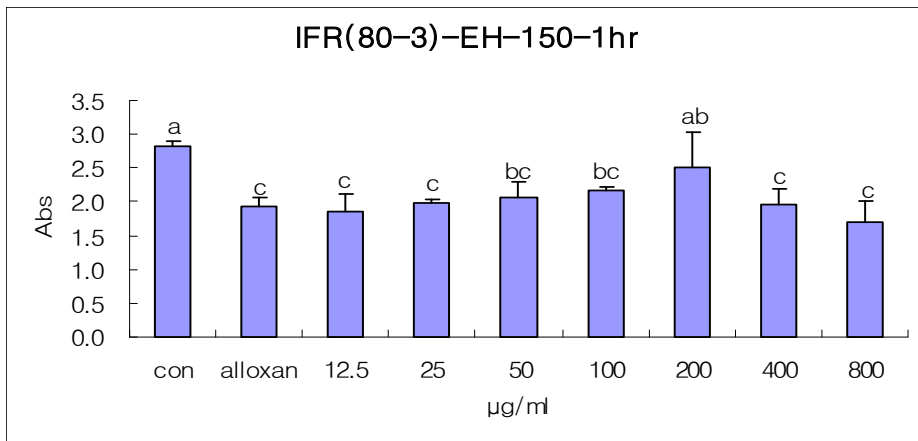


Figure 4-18. Cell viability in HIT-T15(7).

Cell viability was determined by MTT assay. Data are expressed as mean±SD. Values with different alphabets on the bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

IFR; Fruiting body 2nd extract.

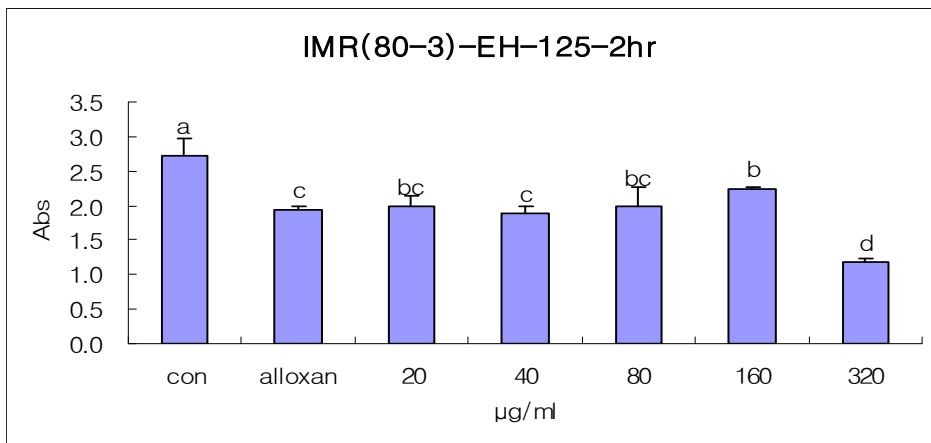


Figure 4-19. Cell viability in HIT-T15(12).

Cell viability was determined by MTT assay. Data are expressed as mean±SD. Values with different alphabets on the bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

IMR; Mycelium 2nd extract.

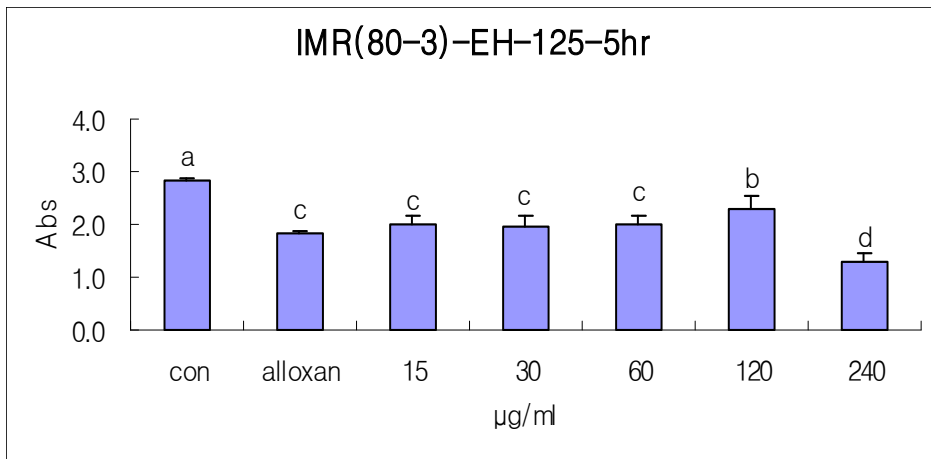


Figure 4-20. Cell viability in HIT-T15(13).

Cell viability was determined by MTT assay. Data are expressed as mean±SD. Values with different alphabets on the bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

IMR; Mycelium 2nd extract.

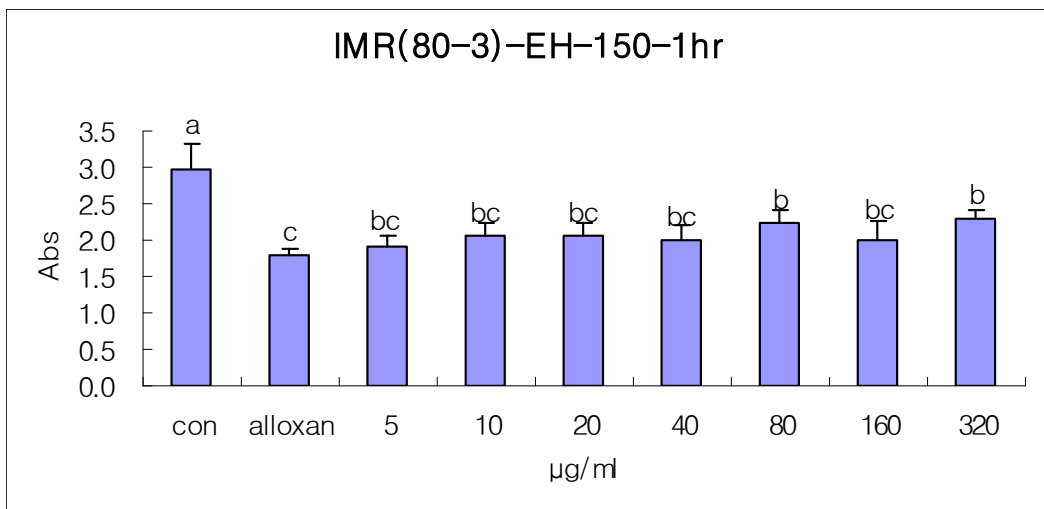


Figure 4-21. Cell viability in HIT-T15(14).

Cell viability was determined by MTT assay. Data are expressed as mean±SD. Values with different alphabets on the bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

IMR; Mycelium 2nd extract.

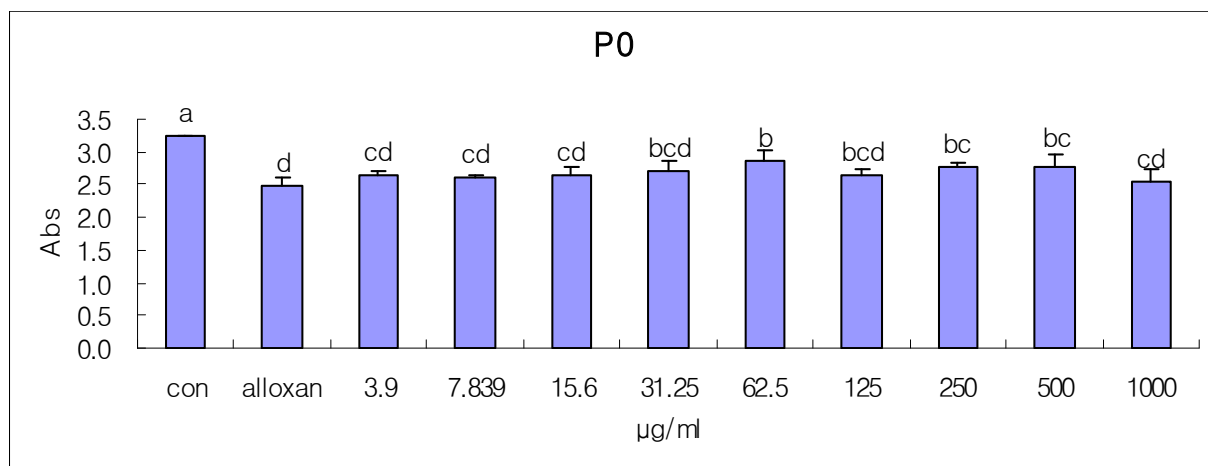


Figure 4-22. Cell viability in HIT-T15(20).

Cell viability was determined by MTT assay. Data are expressed as mean±SD. Values with different alphabets on the bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

P0 ; Mycelium culture fluid step 0 extract.

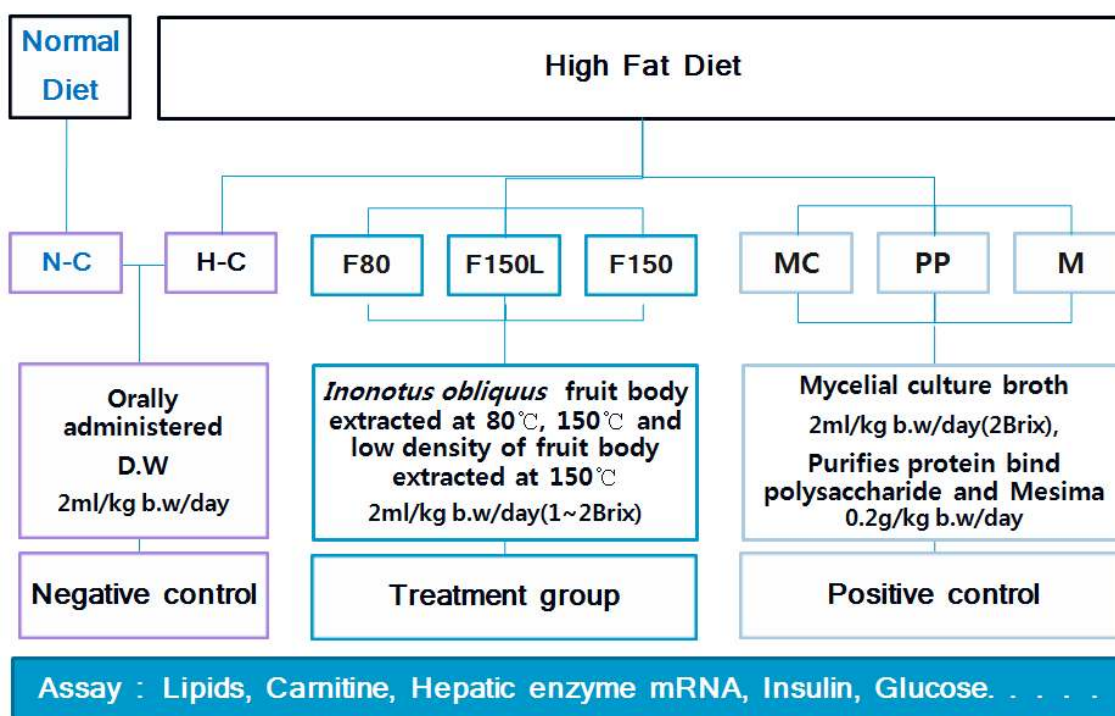


Figure 4-23. Experimental design.

N-C; Normal diet control, H-C; High fat diet control, F80; High fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* Fruit body(2Brix), F150L; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Fruit body(1Brix), F150; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Fruit body(2Brix), MC; High fat diet plus Mycelial culture broth(2Brix), PP; High fat diet plus Purified protein bind polysaccharide, M; High fat diet plus Mesima.

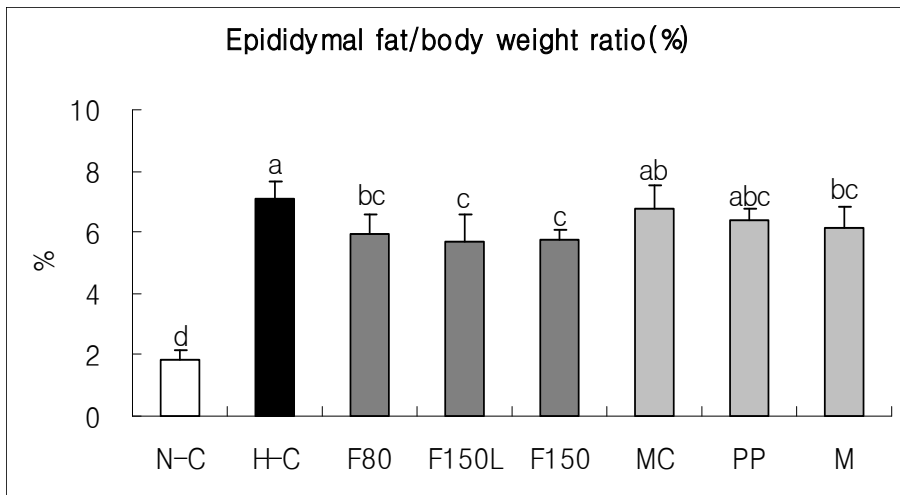


Figure 4-24. Epididymal fat weight ratio.

All values are the mean±S.D(n=7).

^{a,b,c}Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

N-C; normal diet control, H-C; high fat diet control, F80; high fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), F150L; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(1Brix), F150; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), MC; high fat diet plus mycelial culture broth(2Brix), PP; high fat diet plus purified protein bind polysaccharide, M; high fat diet plus Mesima.

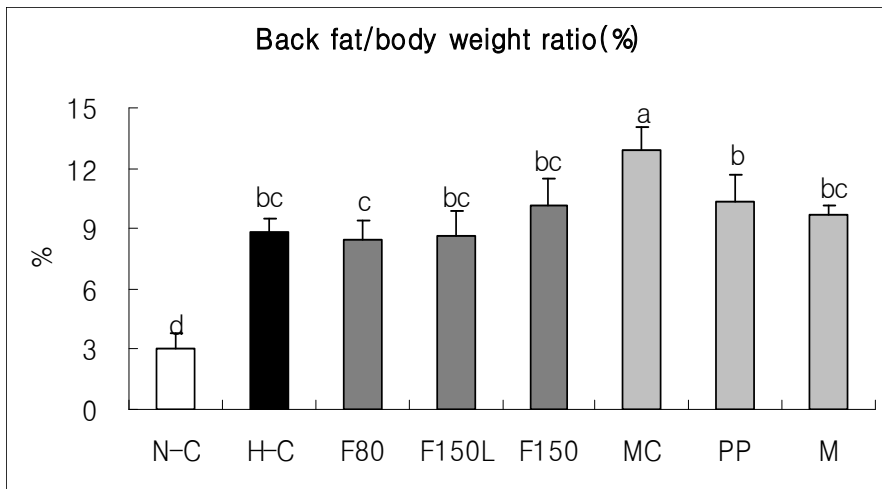


Figure 4-25. Back fat weight ratio.

All values are the mean±S.D(n=7).

^{a,b,c}Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

N-C; normal diet control, H-C; high fat diet control, F80; high fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), F150L; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(1Brix), F150; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), MC; high fat diet plus mycelial culture broth(2Brix), PP; high fat diet plus purified protein bind polysaccharide, M; high fat diet plus Mesima.

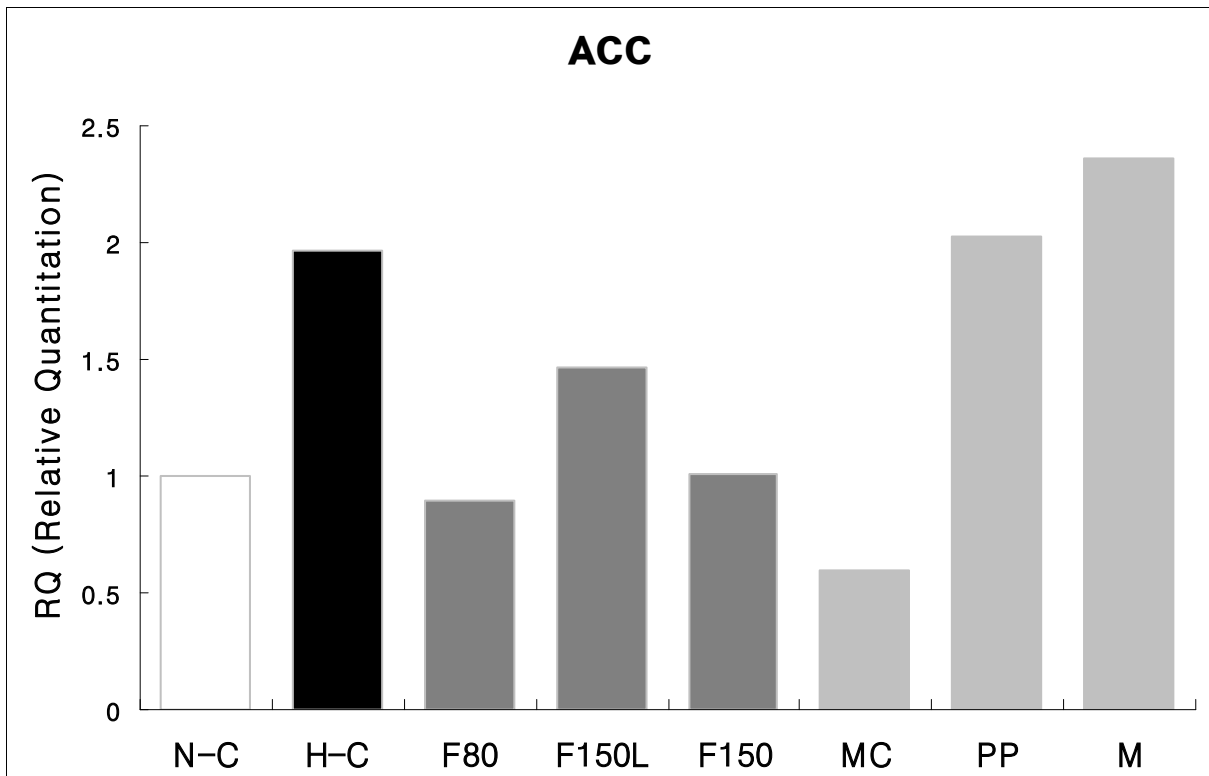


Figure 4–26. Hepatic ACC mRNA expression.

ACC; acetyl–CoA carboxylase, N–C; normal diet control, H–C; high fat diet control, F80; high fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), F150L; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(1Brix), F150; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), MC; high fat diet plus mycelial culture broth(2Brix), PP; high fat diet plus purified protein bind polysaccharide, M; high fat diet plus Mesima.

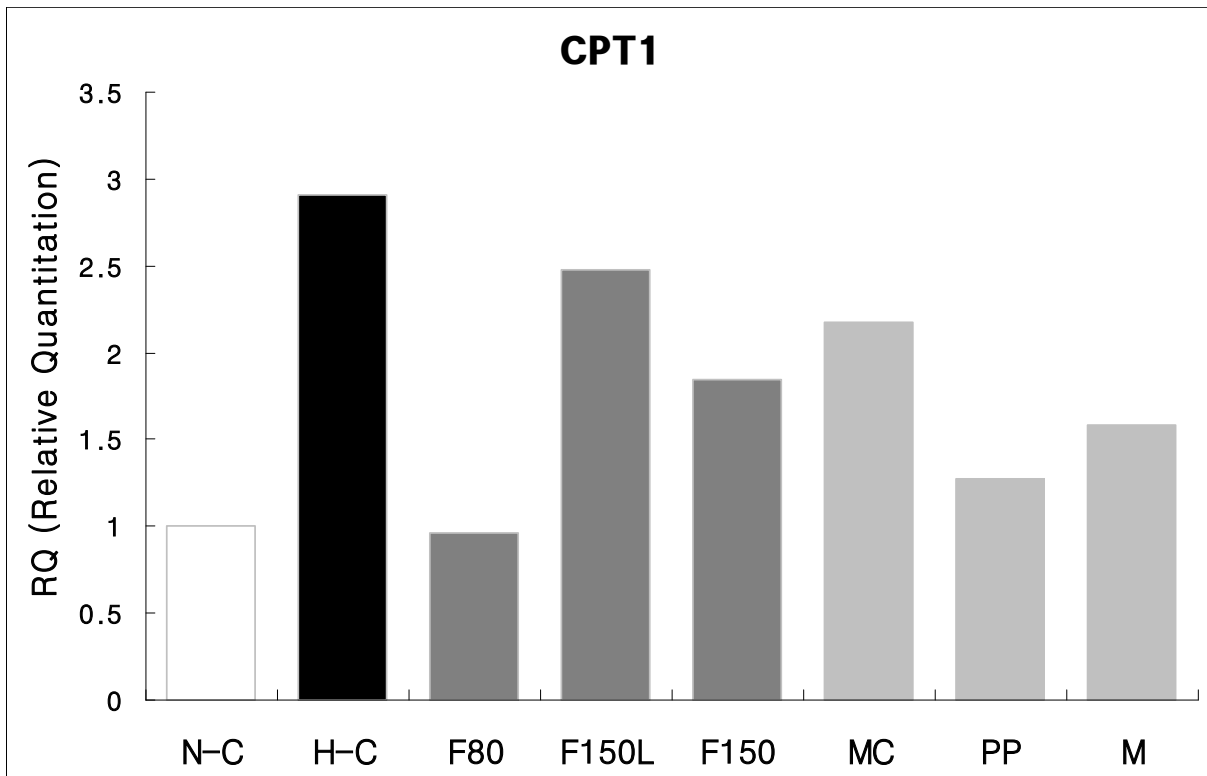


Figure 4-27. Hepatic CPT-1 mRNA expression.

CPT-1; carnitine palmitoyl transferase, N-C; normal diet control, H-C; high fat diet control, F80; high fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), F150L; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(1Brix), F150; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), MC; high fat diet plus mycelial culture broth(2Brix), PP; high fat diet plus purified protein bind polysaccharide, M; high fat diet plus Mesima.

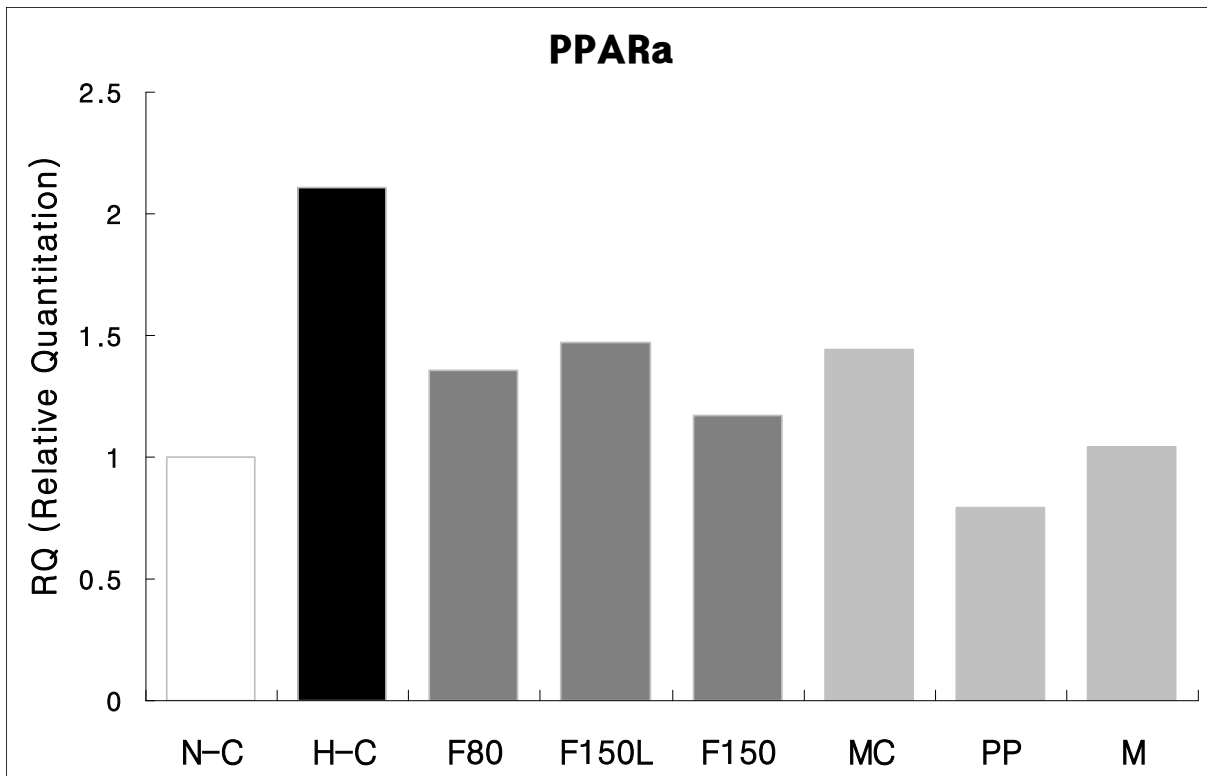


Figure 4–28. Hepatic PPARα mRNA expression.

PPARα; peroxisome proliferator–activated receptor α, N–C; normal diet control, H–C; high fat diet control, F80; high fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), F150L; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(1Brix), F150; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), MC; high fat diet plus mycelial culture broth(2Brix), PP; high fat diet plus purified protein bind polysaccharide, M; high fat diet plus Mesima.

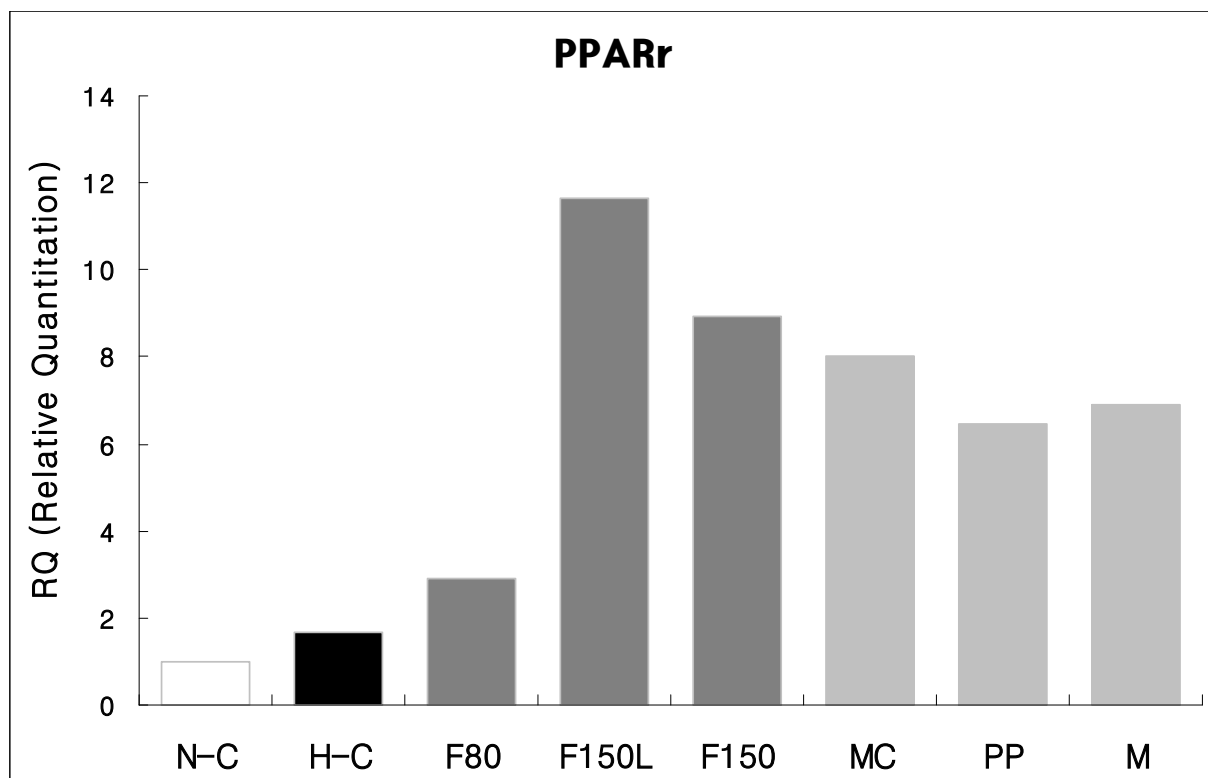


Figure 4–29. Hepatic PPAR γ mRNA expression.

PPAR γ ; peroxisome proliferator–activated receptor γ , N–C; normal diet control, H–C; high fat diet control, F80; high fat diet plus 80 $^{\circ}$ C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), F150L; high fat diet plus 150 $^{\circ}$ C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(1Brix), F150; high fat diet plus 150 $^{\circ}$ C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), MC; high fat diet plus mycelial culture broth(2Brix), PP; high fat diet plus purified protein bind polysaccharide, M; high fat diet plus Mesima.

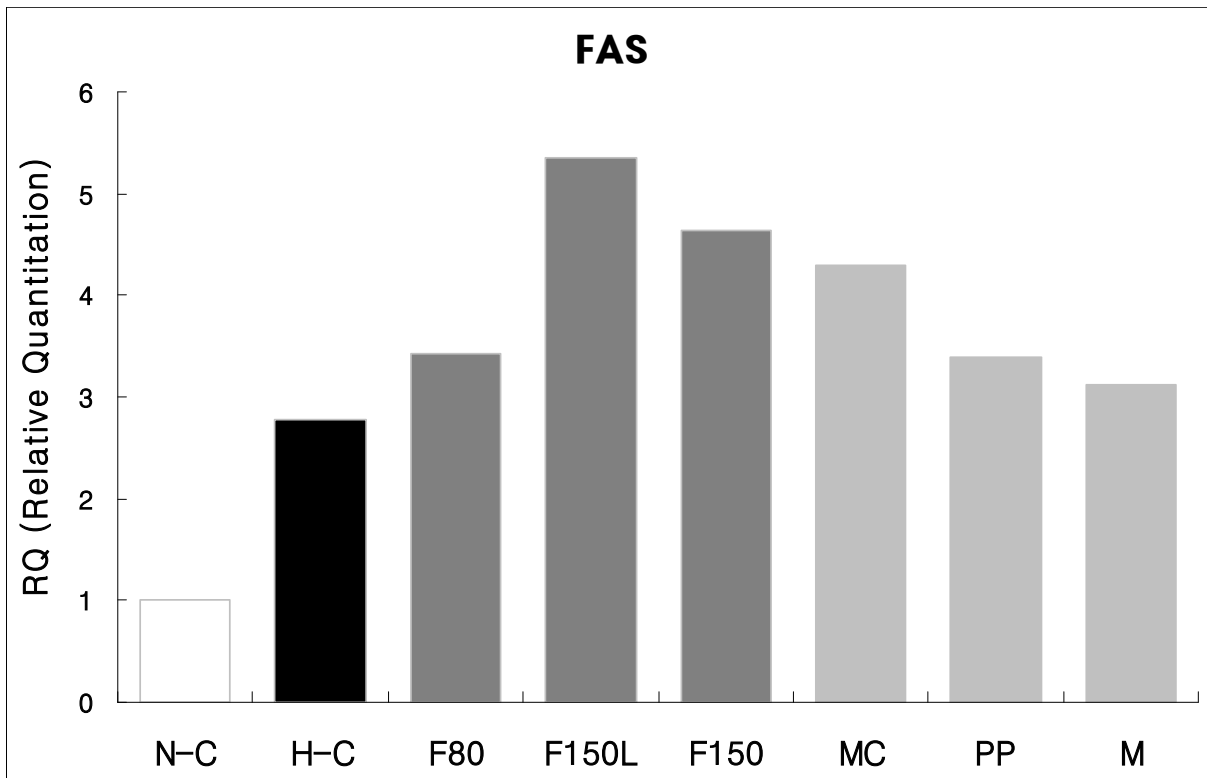


Figure 4-30. Hepatic FAS mRNA expression.

FAS; fatty acid synthase, N-C; normal diet control, H-C; high fat diet control, F80; high fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), F150L; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(1Brix), F150; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), MC; high fat diet plus mycelial culture broth(2Brix), PP; high fat diet plus purified protein bind polysaccharide, M; high fat diet plus Mesima.

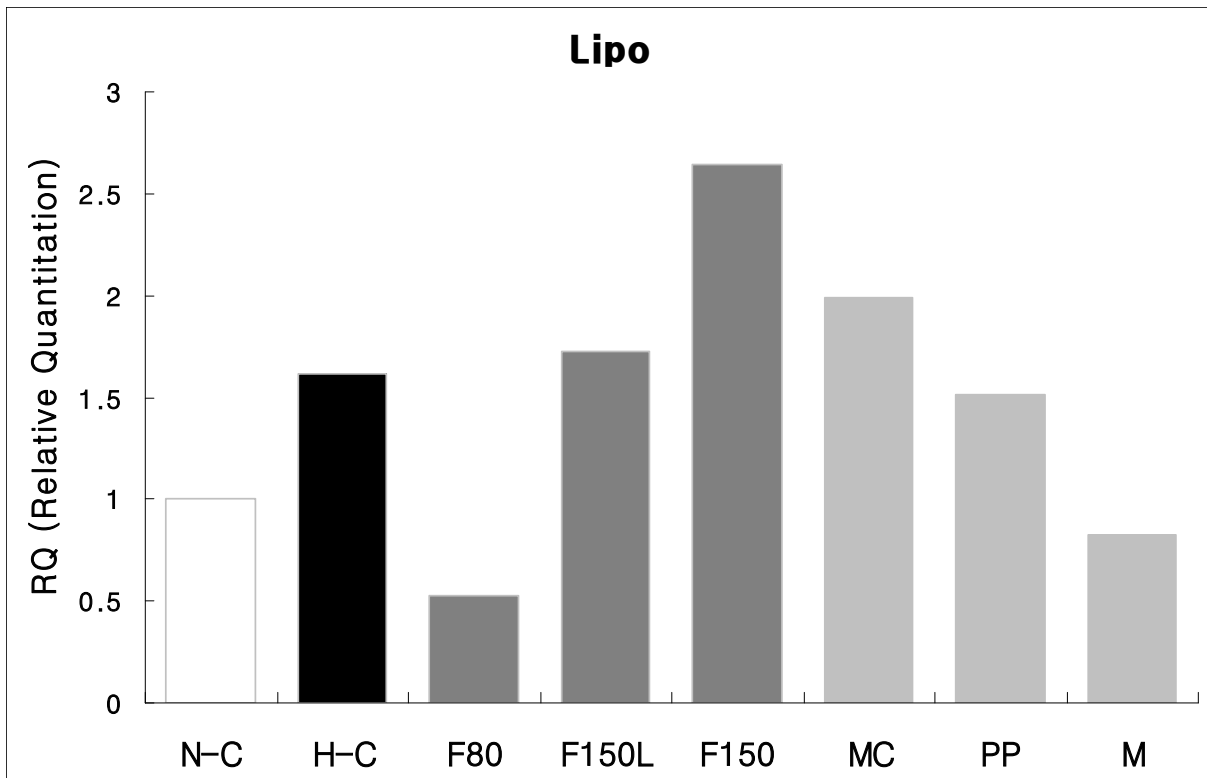


Figure 4-31. Hepatic Lipo mRNA expression.

Lipo; Lipoprotein lipase, N-C; normal diet control, H-C; high fat diet control, F80; high fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), F150L; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(1Brix), F150; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), MC; high fat diet plus mycelial culture broth(2Brix), PP; high fat diet plus purified protein bind polysaccharide, M; high fat diet plus Mesima.

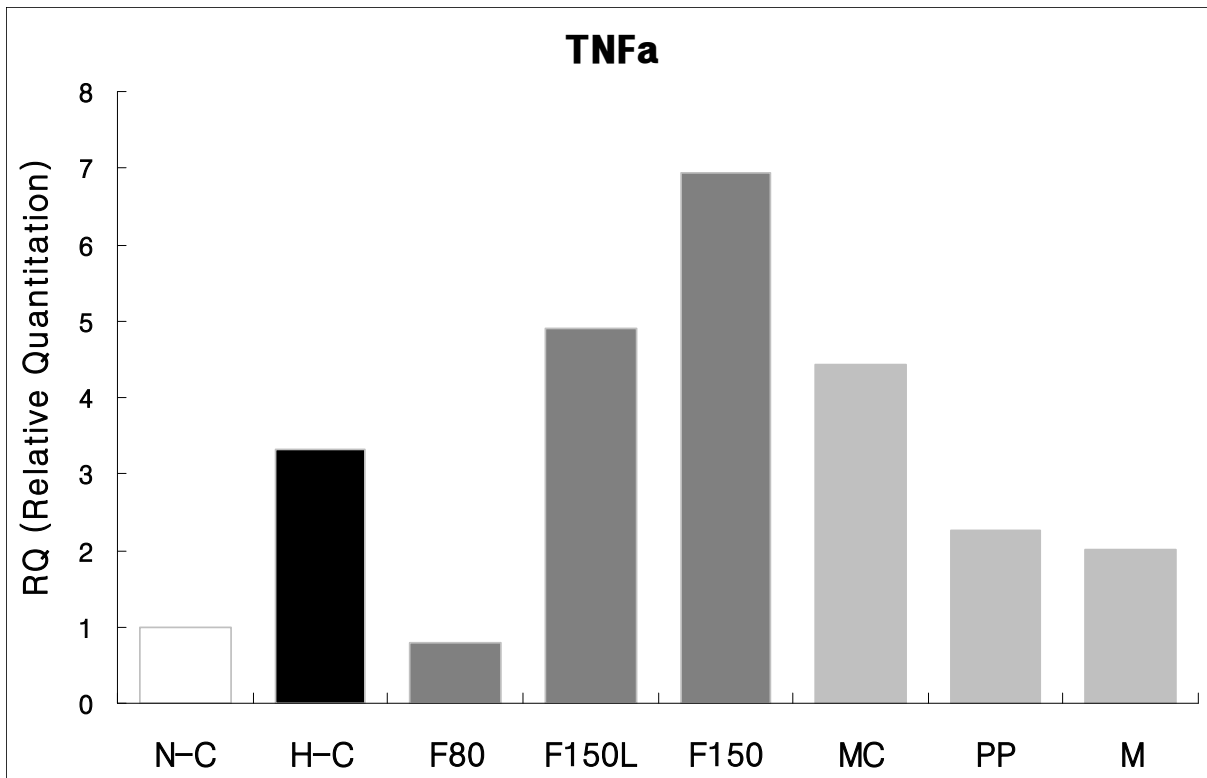


Figure 4-32. TNFa mRNA expression.

TNF α ; tumor necrosis factor α , N-C; normal diet control, H-C; high fat diet control, F80; high fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), F150L; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(1Brix), F150; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), MC; high fat diet plus mycelial culture broth(2Brix), PP; high fat diet plus purified protein bind polysaccharide, M; high fat diet plus Mesima.

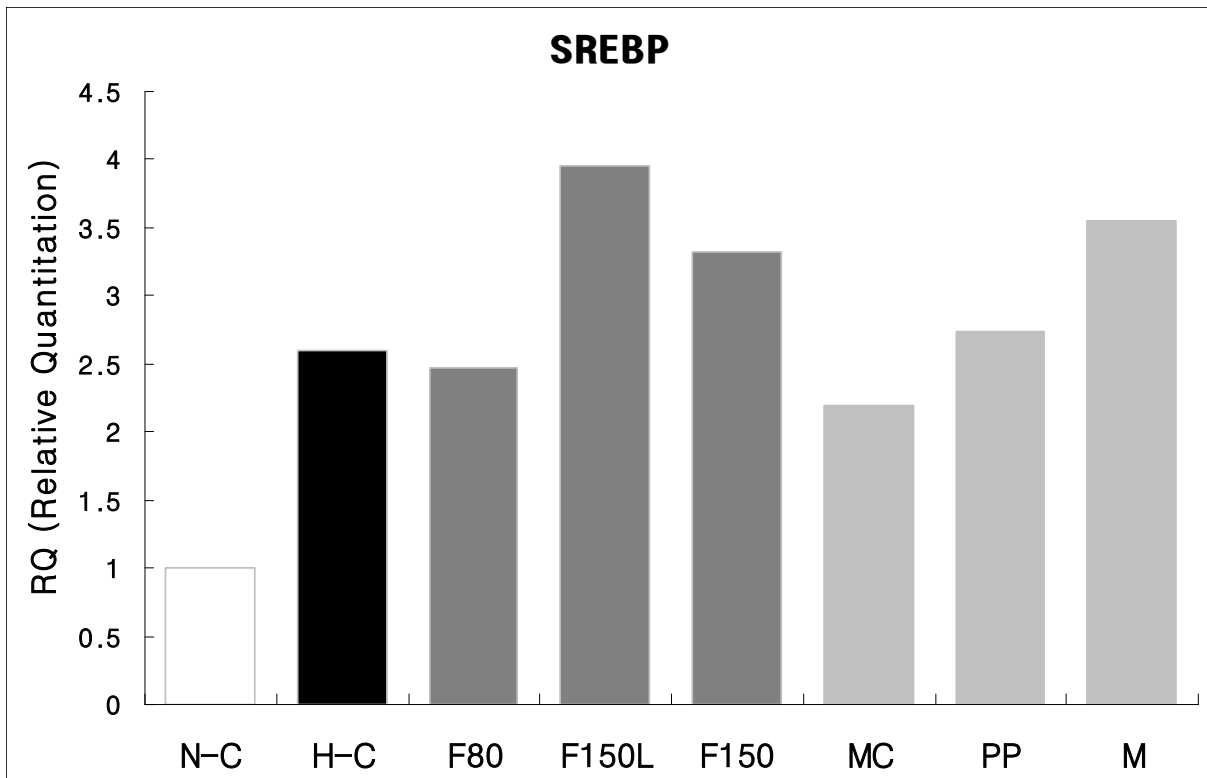


Figure 4-33. SREBP mRNA expression.

SREBP; sterol regulatory element binding protein, N-C; normal diet control, H-C; high fat diet control, F80; high fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), F150L; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(1Brix), F150; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), MC; high fat diet plus mycelial culture broth(2Brix), PP; high fat diet plus purified protein bind polysaccharide, M; high fat diet plus Mesima.

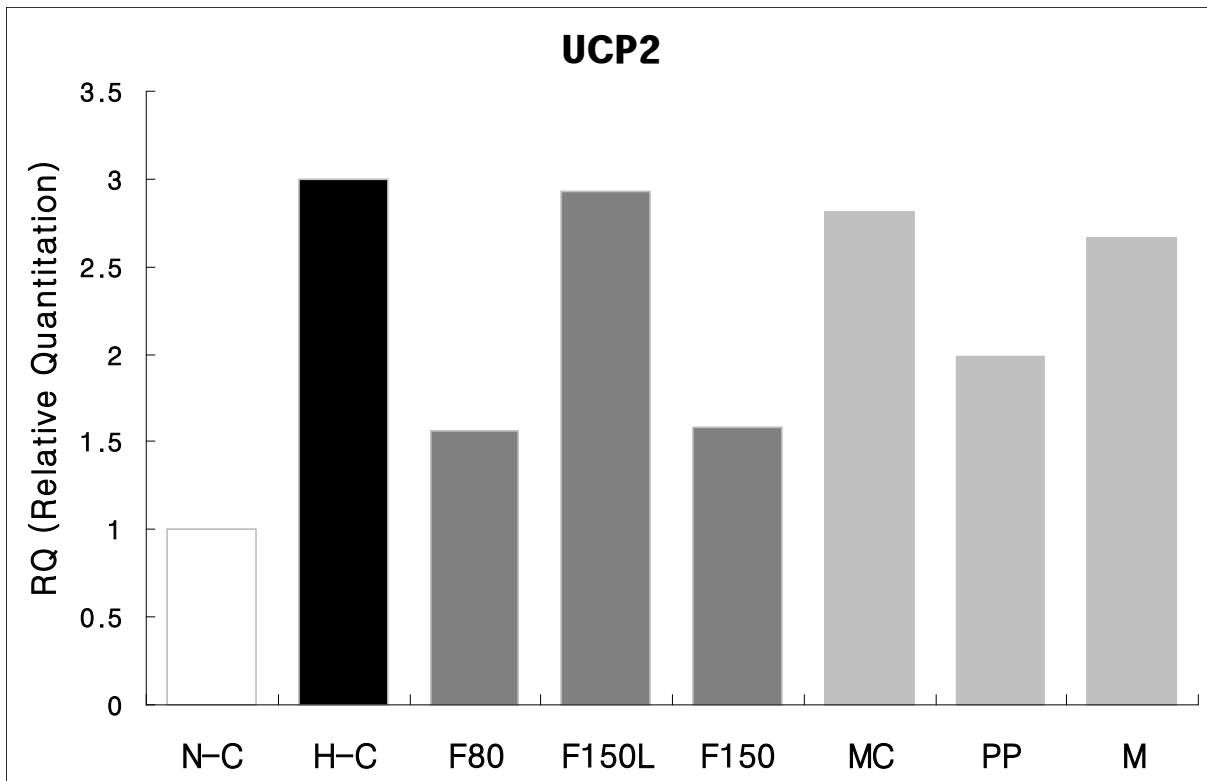


Figure 4-34. UCP2 mRNA expression.

UCP2; uncoupling protein 2, N-C; normal diet control, H-C; high fat diet control, F80; high fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), F150L; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(1Brix), F150; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), MC; high fat diet plus mycelial culture broth(2Brix), PP; high fat diet plus purified protein bind polysaccharide, M; high fat diet plus Mesima.

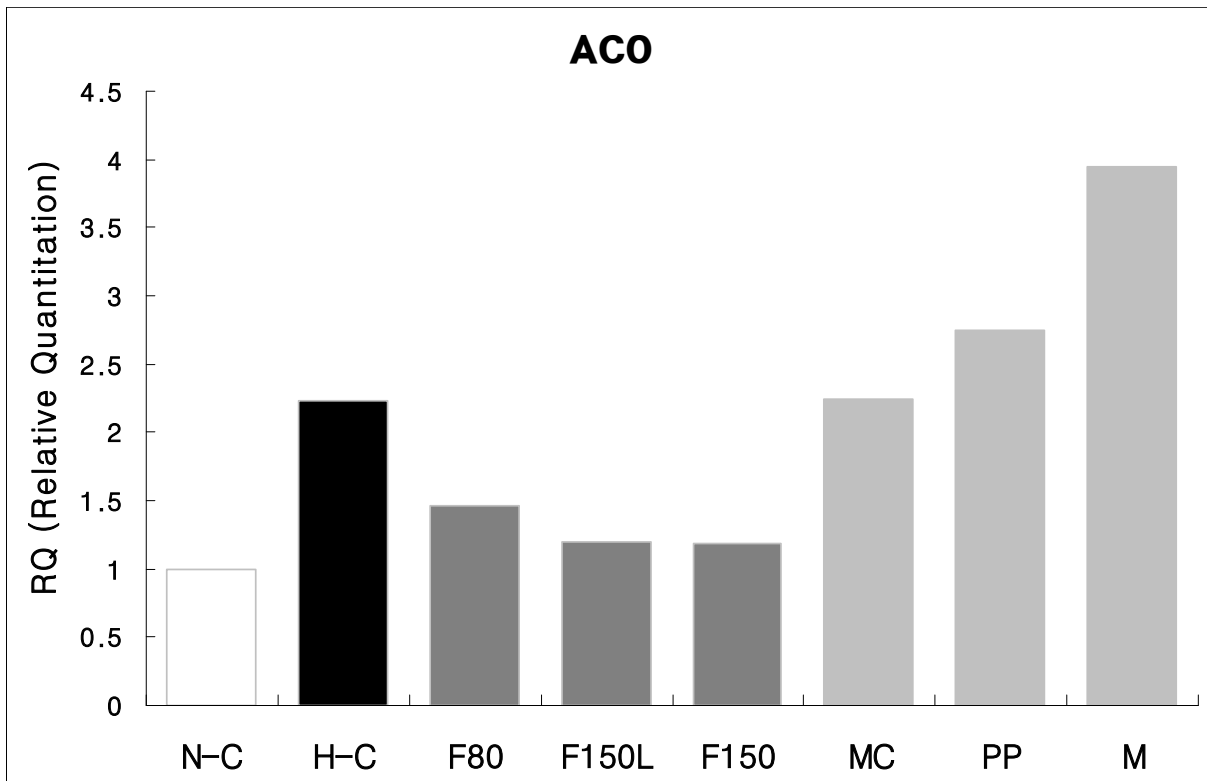


Figure 4-35. ACO mRNA expression.

ACO; acyl-CoA oxidase, N-C; normal diet control, H-C; high fat diet control, F80; high fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), F150L; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(1Brix), F150; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), MC; high fat diet plus mycelial culture broth(2Brix), PP; high fat diet plus purified protein bind polysaccharide, M; high fat diet plus Mesima.

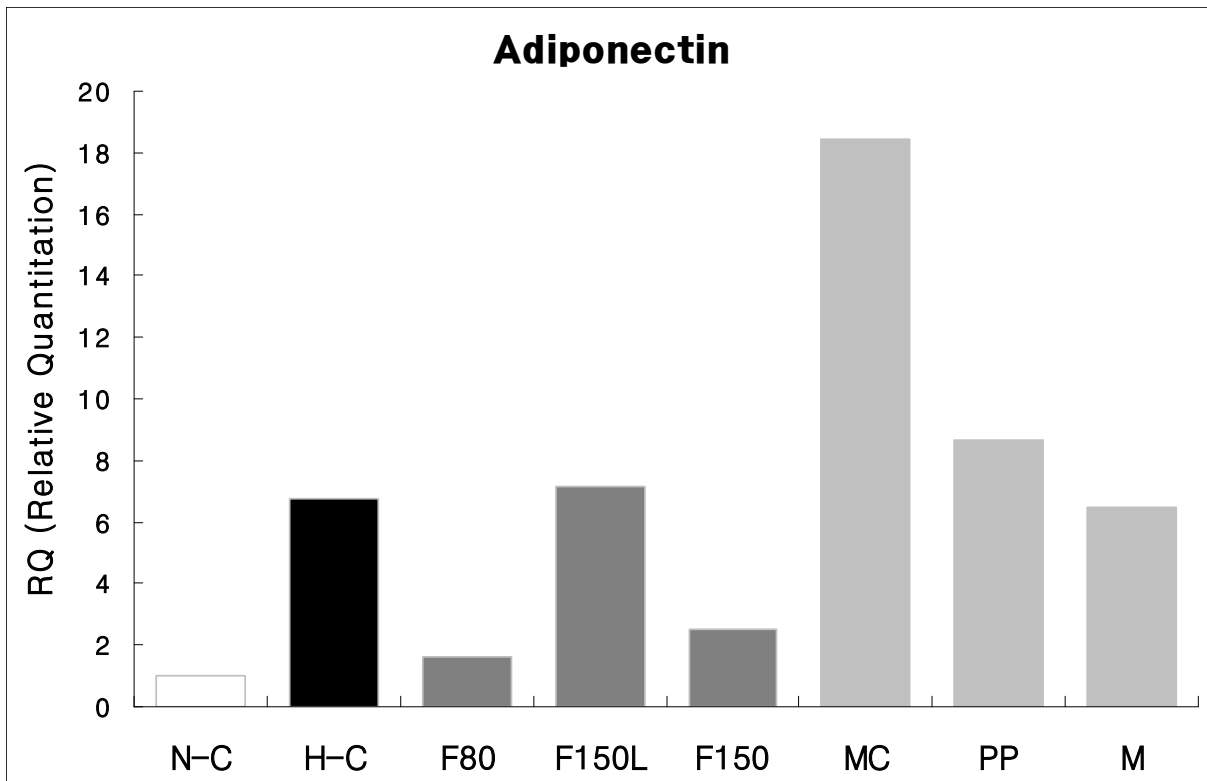


Figure 4-36. Adiponectin mRNA expression.

N-C; normal diet control, H-C; high fat diet control, F80; high fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), F150L; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(1Brix), F150; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), MC; high fat diet plus mycelial culture broth(2Brix), PP; high fat diet plus purified protein bind polysaccharide, M; high fat diet plus Mesima.

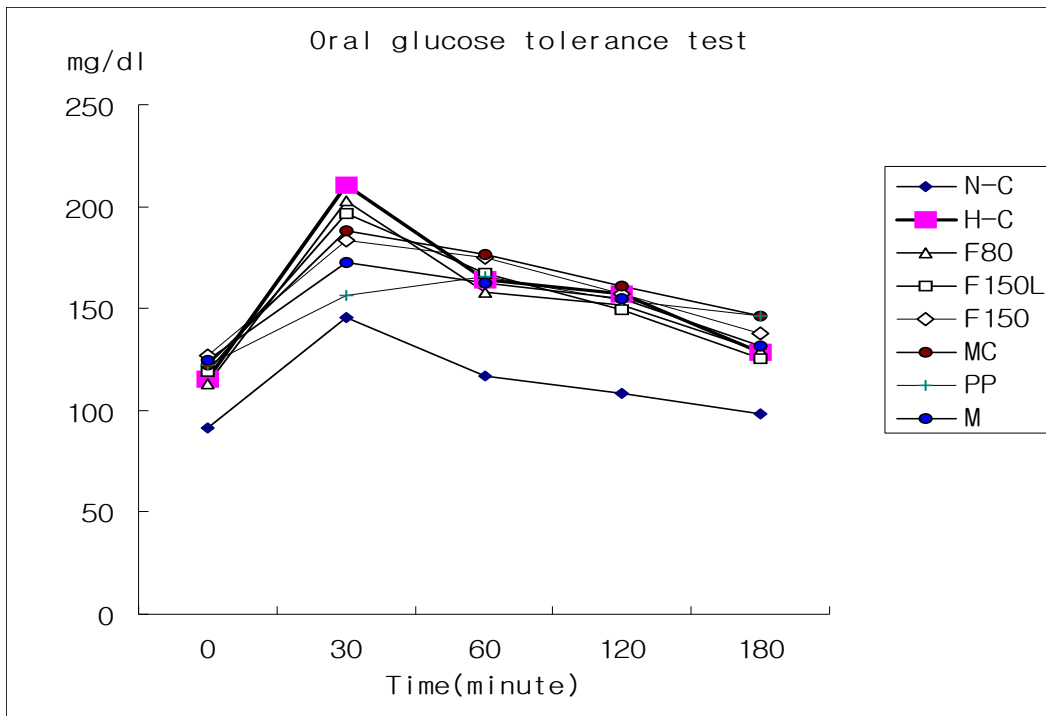


Figure 4-37. Oral glucose tolerance test.

All values are the mean \pm S.D (n=7).

^{a,b,c} Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

N-C; normal diet control, H-C; high fat diet control, F80; high fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body (2Brix), F150L; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body (1Brix), F150; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body (2Brix), MC; high fat diet plus mycelial culture broth (2Brix), PP; high fat diet plus purified protein bind polysaccharide, M; high fat diet plus Mesima.

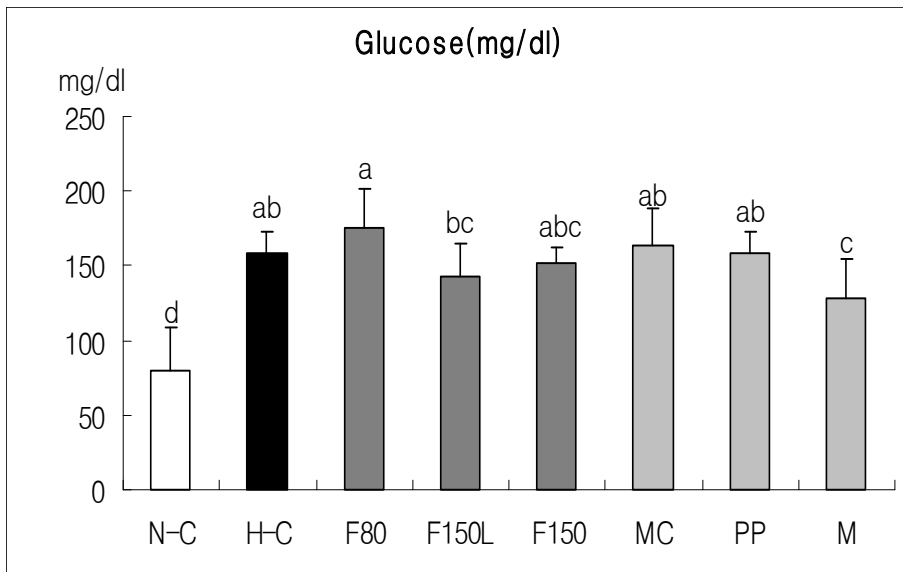


Figure 4-38. Serum glucose concentration.

All values are the mean±S.D(n=7).

^{a,b,c}Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

N-C; normal diet control, H-C; high fat diet control, F80; high fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), F150L; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(1Brix), F150; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), MC; high fat diet plus mycelial culture broth(2Brix), PP; high fat diet plus purified protein bind polysaccharide, M; high fat diet plus Mesima.

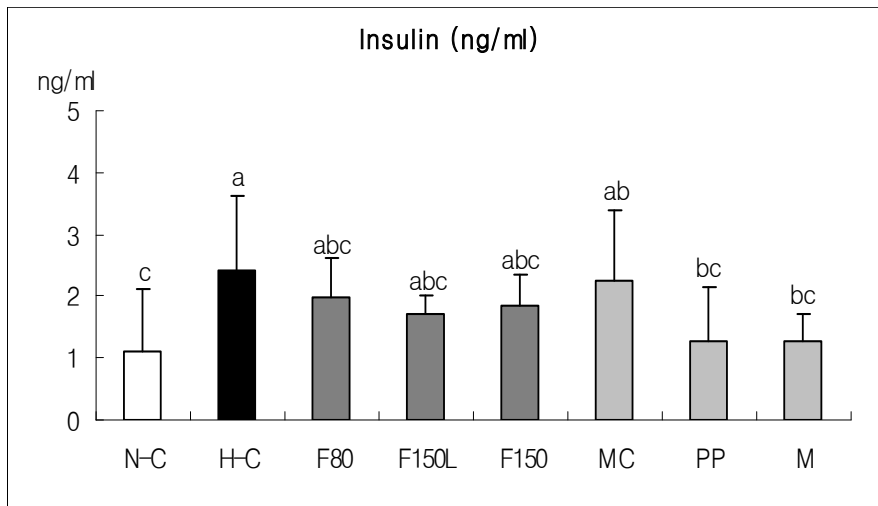


Figure 4-39. Serum insulin concentration.

All values are the mean±S.D(n=7).

^{a,b,c}Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

N-C; normal diet control, H-C; high fat diet control, F80; high fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), F150L; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(1Brix), F150; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), MC; high fat diet plus mycelial culture broth(2Brix), PP; high fat diet plus purified protein bind polysaccharide, M; high fat diet plus Mesima.

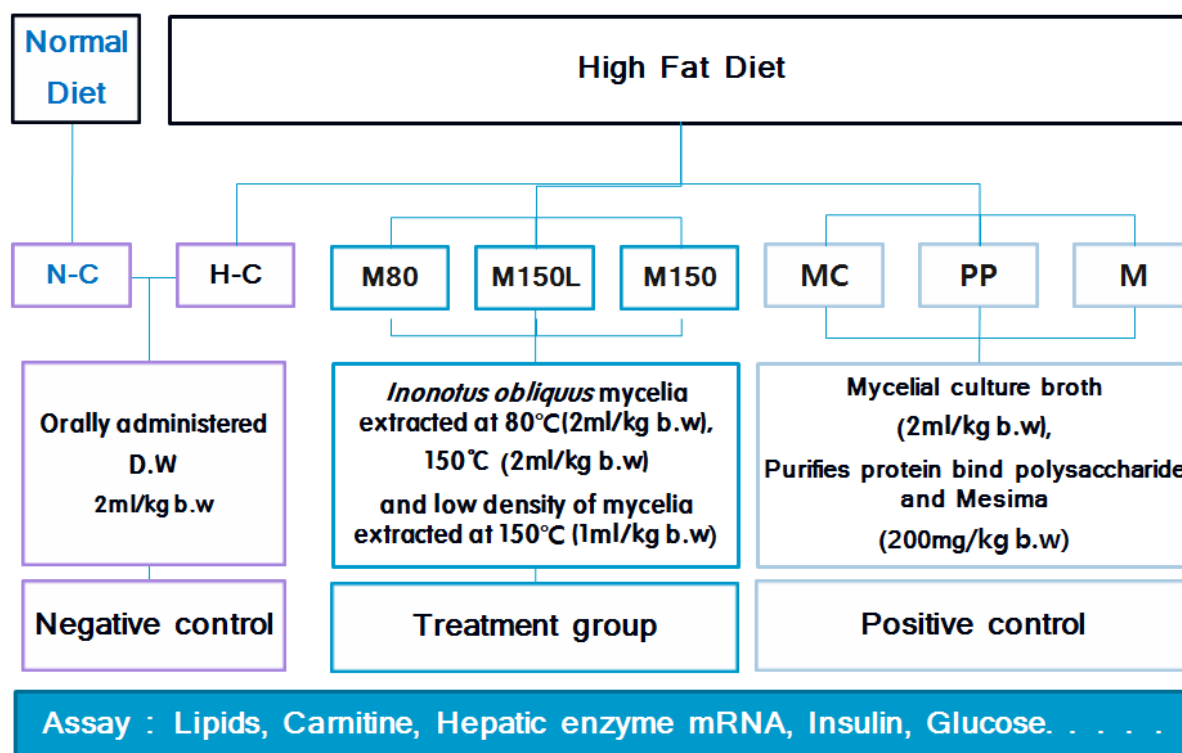


Figure 4–40. Experimental design.

N–C; Normal diet control, H–C; High fat diet control, H–M80; High fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H–M150L; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(1Brix), H–M150; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H–MC; High fat diet plus Mycelial culture broth(2Brix), H–PP; High fat diet plus Purified protein bind polysaccharide, H–M; High fat diet plus Mesima.

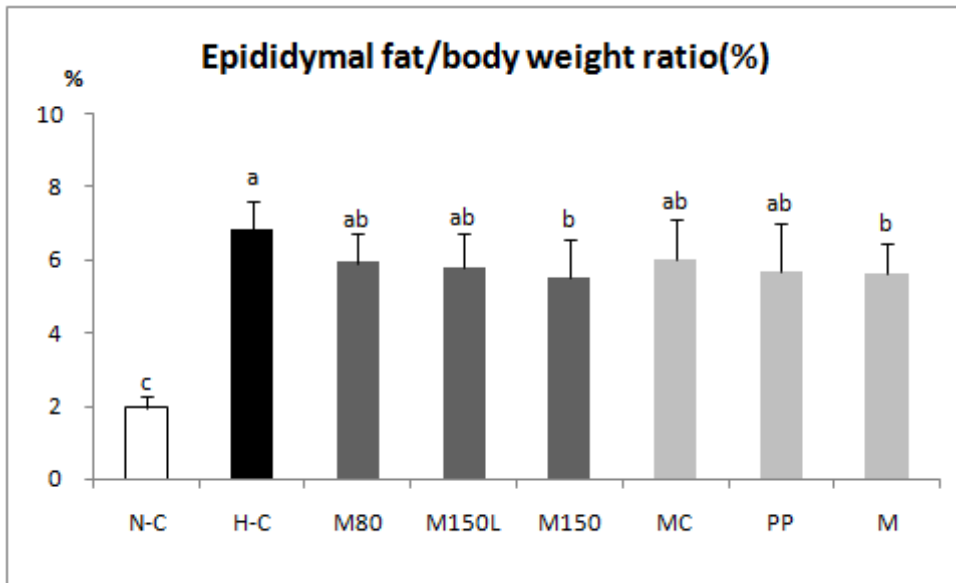


Figure 4-41. Epididymal fat weight ratio.

All values are the mean±S.D(n=7).

^{a,b,c}Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

N-C; Normal diet control, H-C; High fat diet control, H-M80; High fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-M150L; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(1Brix), H-M150; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-MC; High fat diet plus Mycelial culture broth(2Brix), H-PP; High fat diet plus Purified protein bind polysaccharide, H-M; High fat diet plus Mesima.

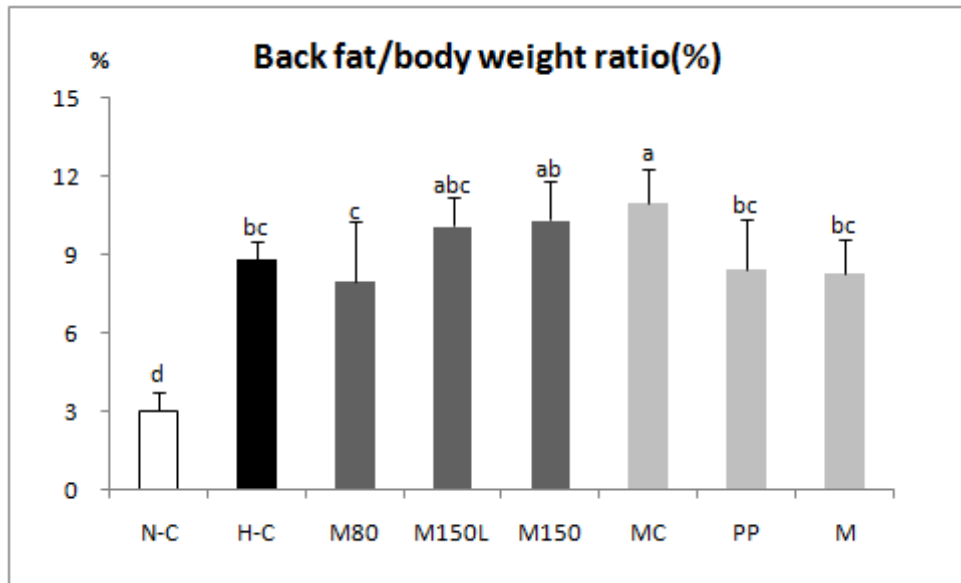


Figure 4-42. Back fat weight ratio.

All values are the mean±S.D(n=7).

^{a,b,c}Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

N-C; Normal diet control, H-C; High fat diet control, H-M80; High fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-M150L; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(1Brix), H-M150; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-MC; High fat diet plus Mycelial culture broth(2Brix), H-PP; High fat diet plus Purified protein bind polysaccharide, H-M; High fat diet plus Mesima.

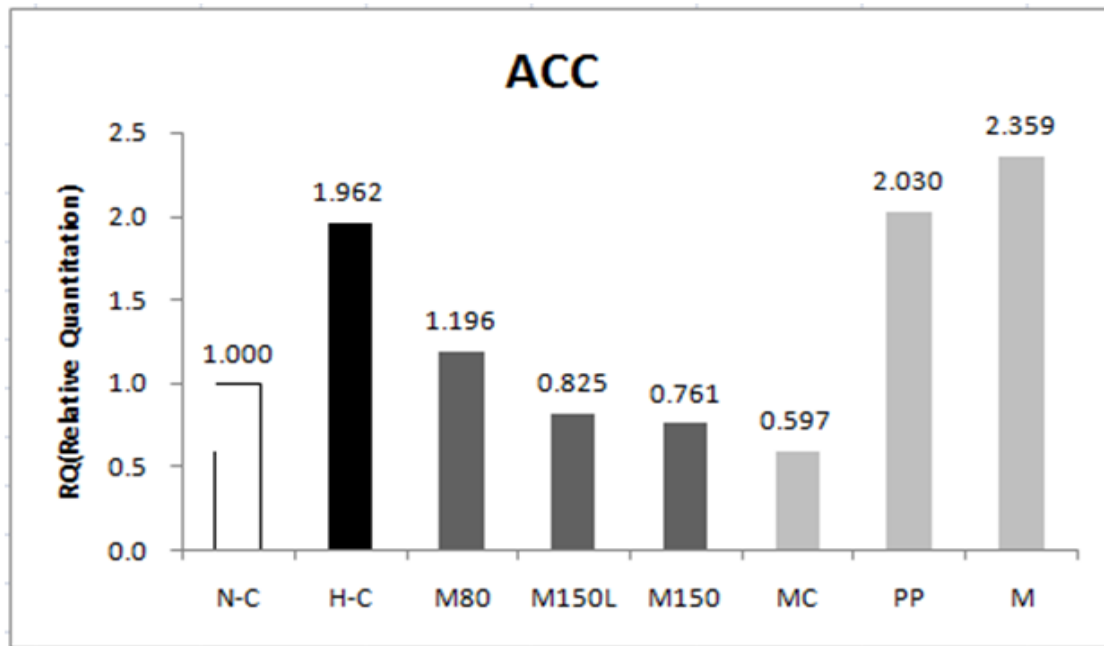


Figure 4-43. Hepatic ACC mRNA expression.

ACC; acetyl-CoA carboxylase, N-C; Normal diet control, H-C; High fat diet control, H-M80; High fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-M150L; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(1Brix), H-M150; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-MC; High fat diet plus Mycelial culture broth(2Brix), H-PP; High fat diet plus Purified protein bind polysaccharide, H-M; High fat diet plus Mesima.

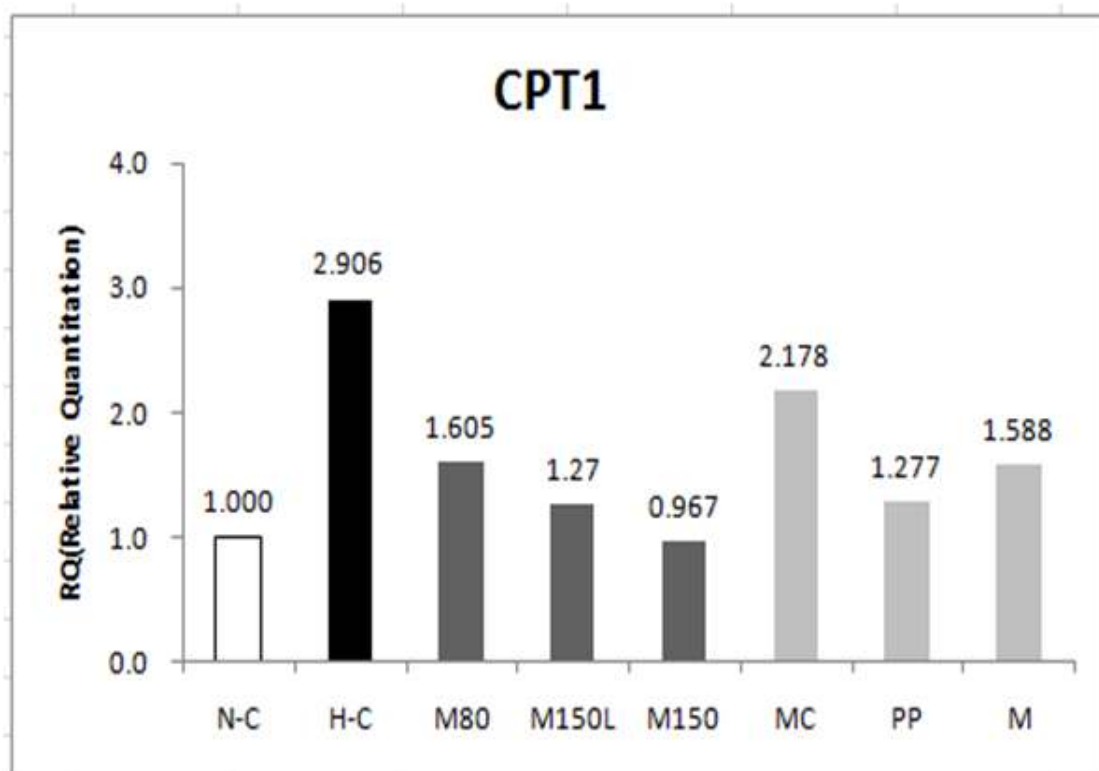


Figure 4-44. Hepatic CPT-1 mRNA expression.

CPT-1; carnitine palmitoyl transferase, N-C; Normal diet control, H-C; High fat diet control, H-M80; High fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-M150L; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(1Brix), H-M150; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-MC; High fat diet plus Mycelial culture broth(2Brix), H-PP; High fat diet plus Purified protein bind polysaccharide, H-M; High fat diet plus Mesima.

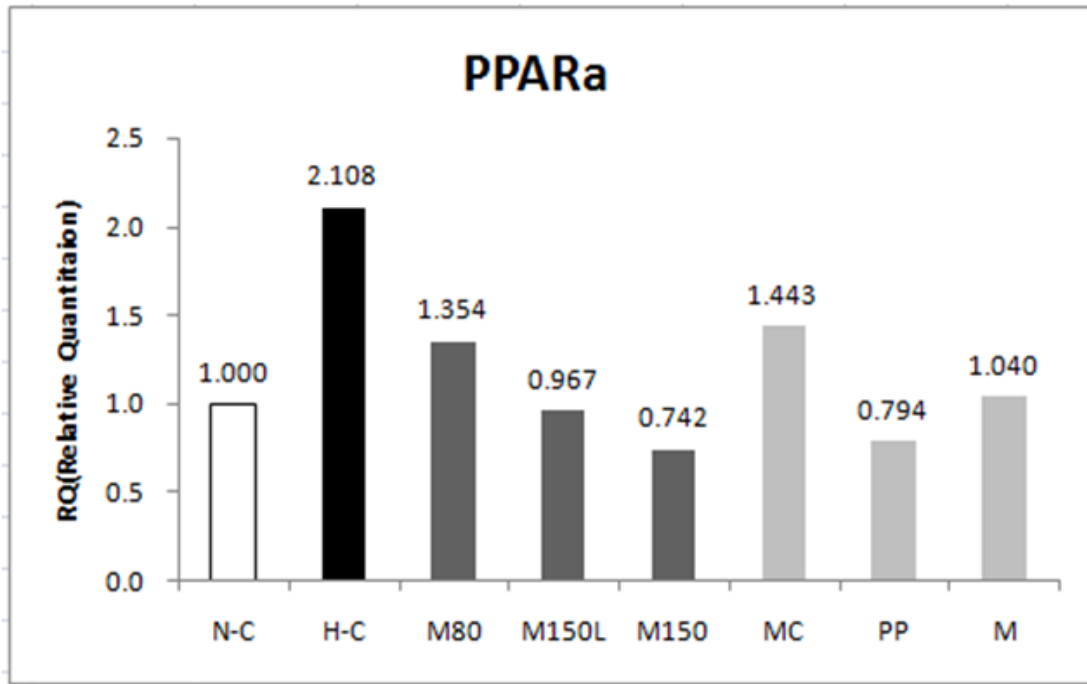


Figure 4-45. Hepatic PPAR α mRNA expression.

PPAR α ; peroxisome proliferator-activated receptor α , N-C; Normal diet control, H-C; High fat diet control, H-M80; High fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-M150L; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(1Brix), H-M150; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-MC; High fat diet plus Mycelial culture broth(2Brix), H-PP; High fat diet plus Purified protein bind polysaccharide, H-M; High fat diet plus Mesima.

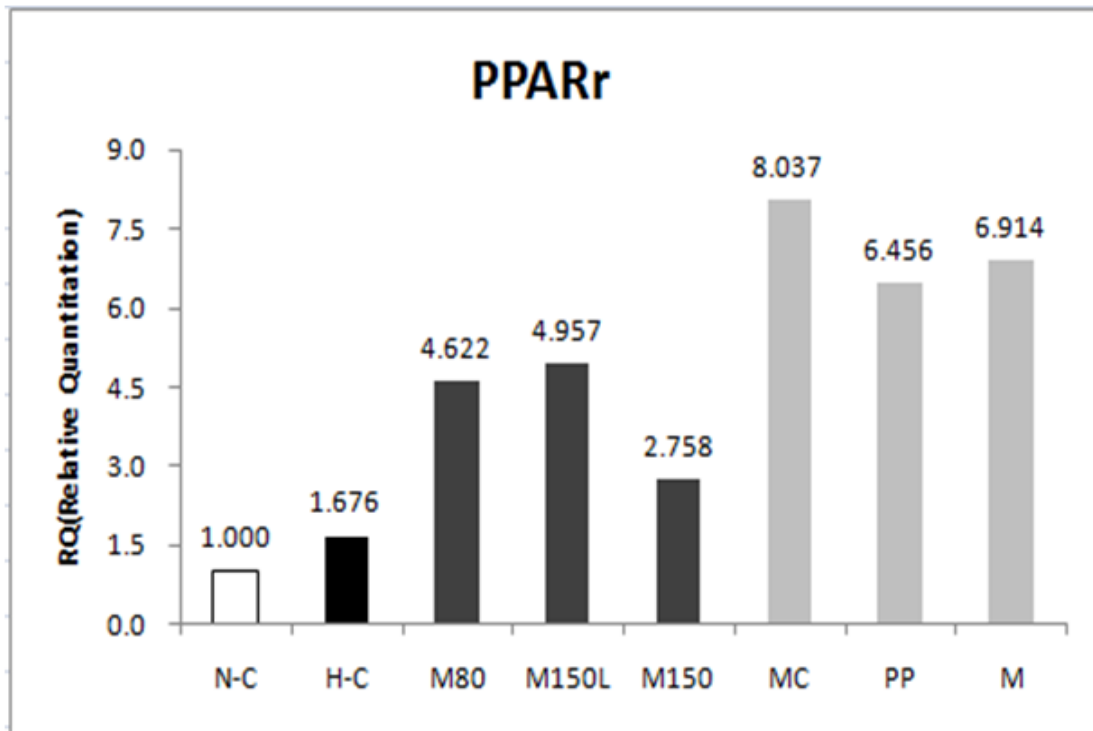


Figure 4-46. Hepatic PPAR γ mRNA expression.

PPAR γ ; peroxisome proliferator-activated receptor γ , N-C; Normal diet control, H-C; High fat diet control, H-M80; High fat diet plus 80 $^{\circ}$ C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-M150L; High fat diet plus 150 $^{\circ}$ C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(1Brix), H-M150; High fat diet plus 150 $^{\circ}$ C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-MC; High fat diet plus Mycelial culture broth(2Brix), H-PP; High fat diet plus Purified protein bind polysaccharide, H-M; High fat diet plus Mesima.

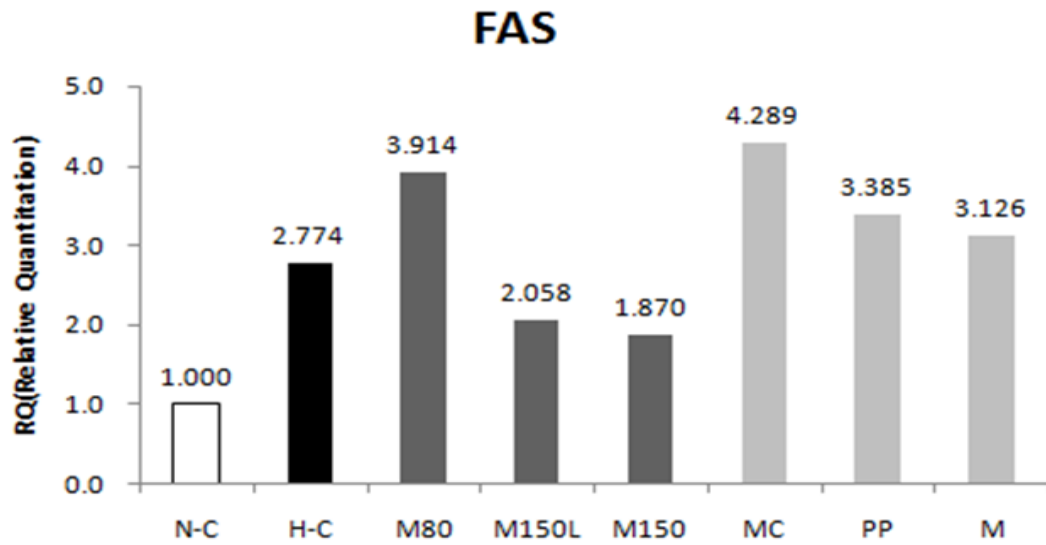


Figure 4–47. Hepatic FAS mRNA expression.

FAS; fatty acid synthase, N–C; Normal diet control, H–C; High fat diet control, H–M80; High fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H–M150L; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(1Brix), H–M150; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H–MC; High fat diet plus Mycelial culture broth(2Brix), H–PP; High fat diet plus Purified protein bind polysaccharide, H–M; High fat diet plus Mesima.

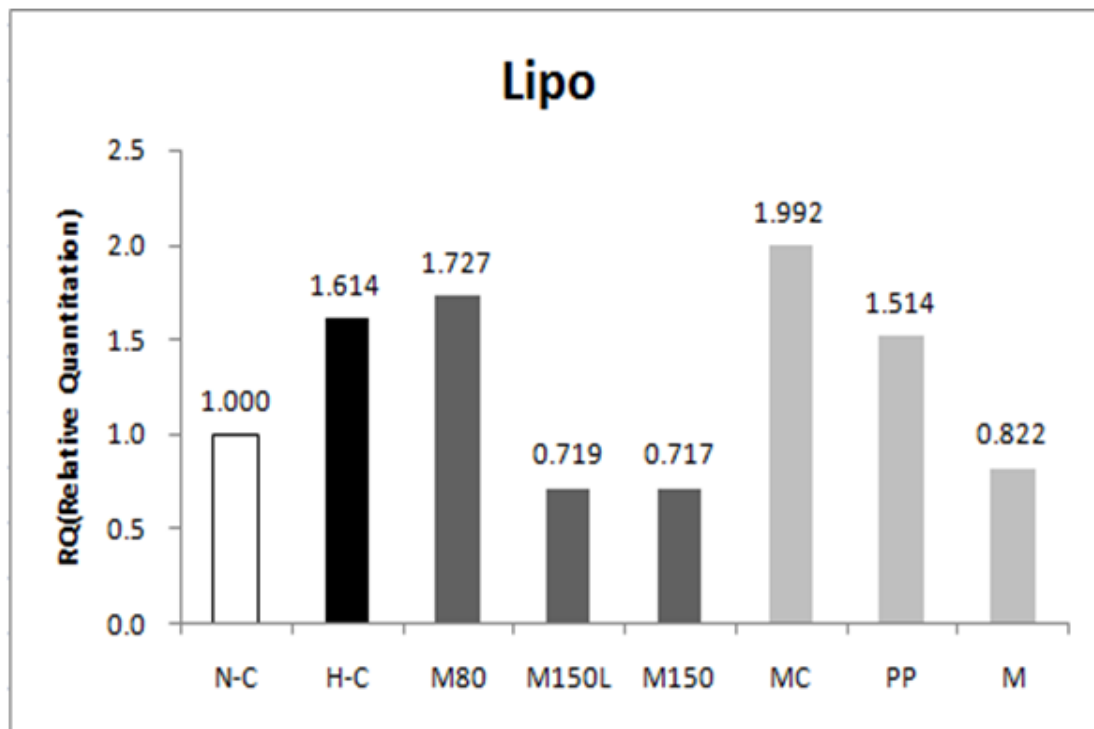


Figure 4-48. Hepatic Lipo mRNA expression.

Lipo; Lipoprotein lipase, N-C; Normal diet control, H-C; High fat diet control, H-M80; High fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-M150L; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(1Brix), H-M150; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-MC; High fat diet plus Mycelial culture broth(2Brix), H-PP; High fat diet plus Purified protein bind polysaccharide, H-M; High fat diet plus Mesima.

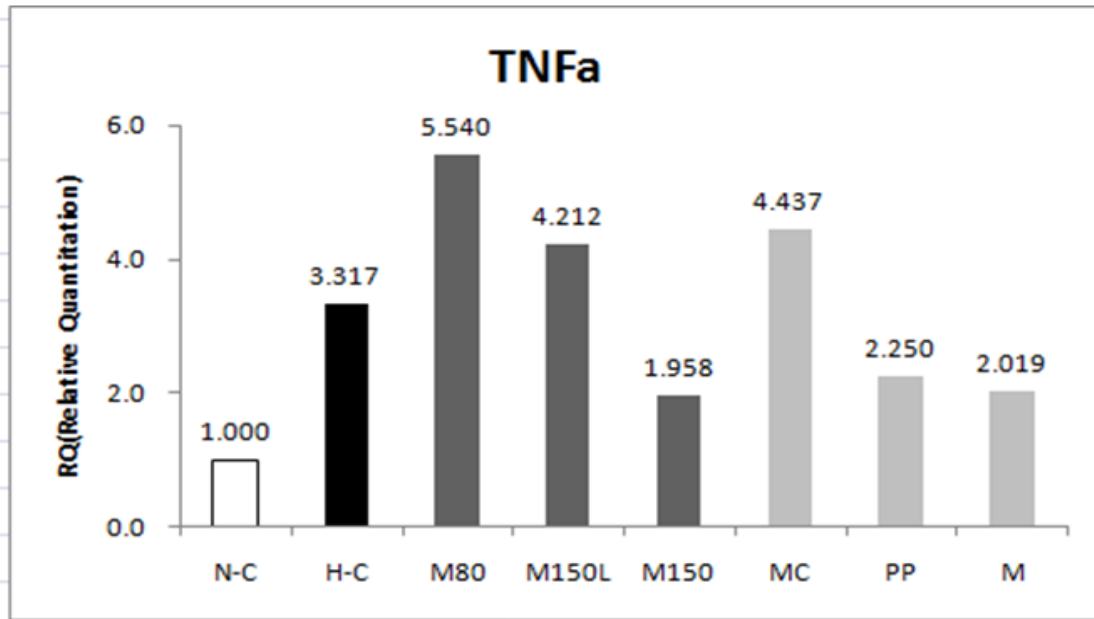


Figure 4-49. TNF α mRNA expression.

TNF α ; tumor necrosis factor α , N-C; Normal diet control, H-C; High fat diet control, H-M80; High fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-M150L; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(1Brix), H-M150; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-MC; High fat diet plus Mycelial culture broth(2Brix), H-PP; High fat diet plus Purified protein bind polysaccharide, H-M; High fat diet plus Mesima.

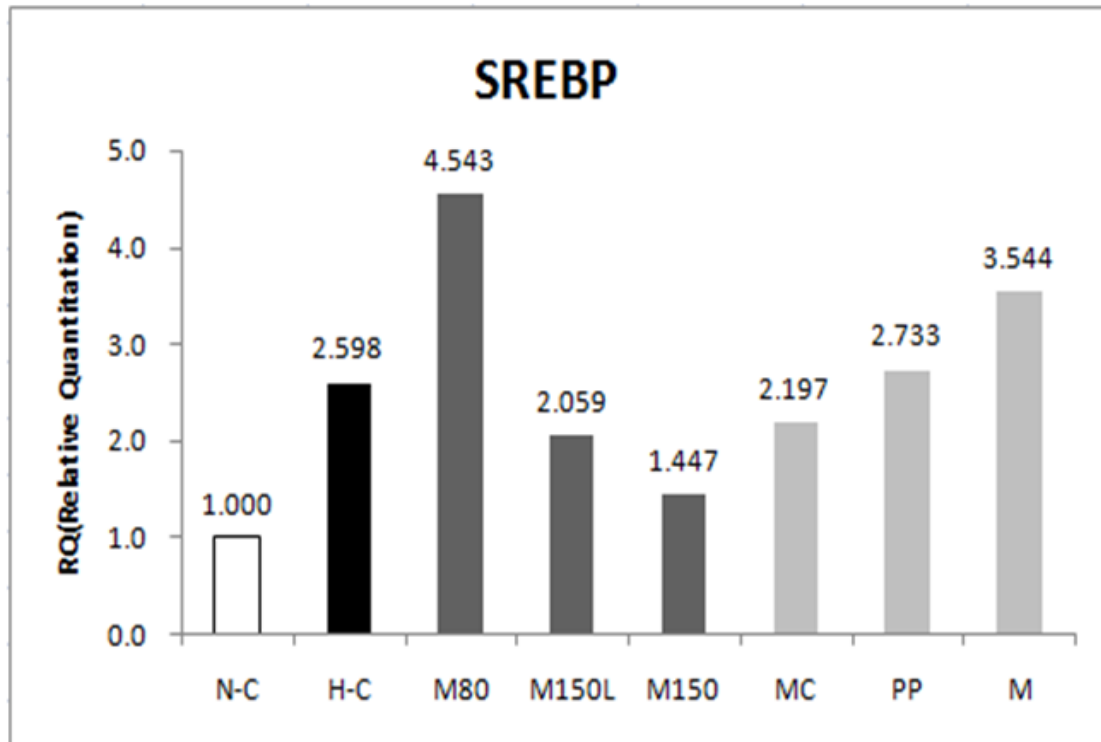


Figure 4-50. SREBP mRNA expression.

SREBP; sterol regulatory element binding protein, N-C; Normal diet control, H-C; High fat diet control, H-M80; High fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-M150L; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(1Brix), H-M150; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-MC; High fat diet plus Mycelial culture broth(2Brix), H-PP; High fat diet plus Purified protein bind polysaccharide, H-M; High fat diet plus Mesima.

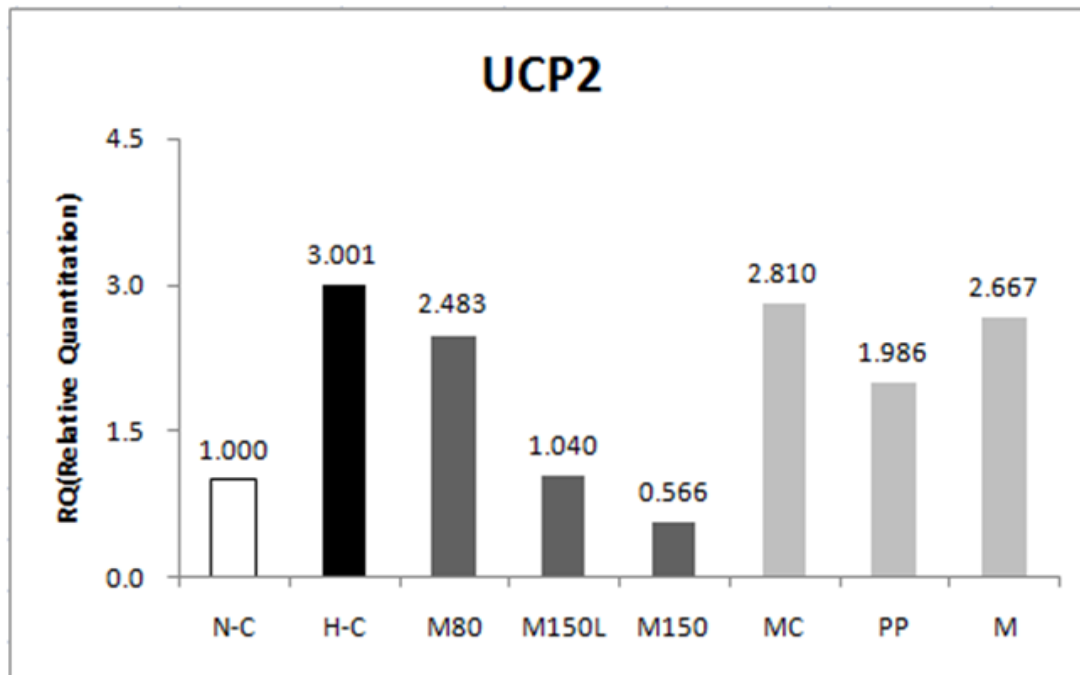


Figure 4-51. UCP2 mRNA expression.

UCP2; uncoupling protein 2, N-C; Normal diet control, H-C; High fat diet control, H-M80; High fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-M150L; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(1Brix), H-M150; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-MC; High fat diet plus Mycelial culture broth(2Brix), H-PP; High fat diet plus Purified protein bind polysaccharide, H-M; High fat diet plus Mesima.

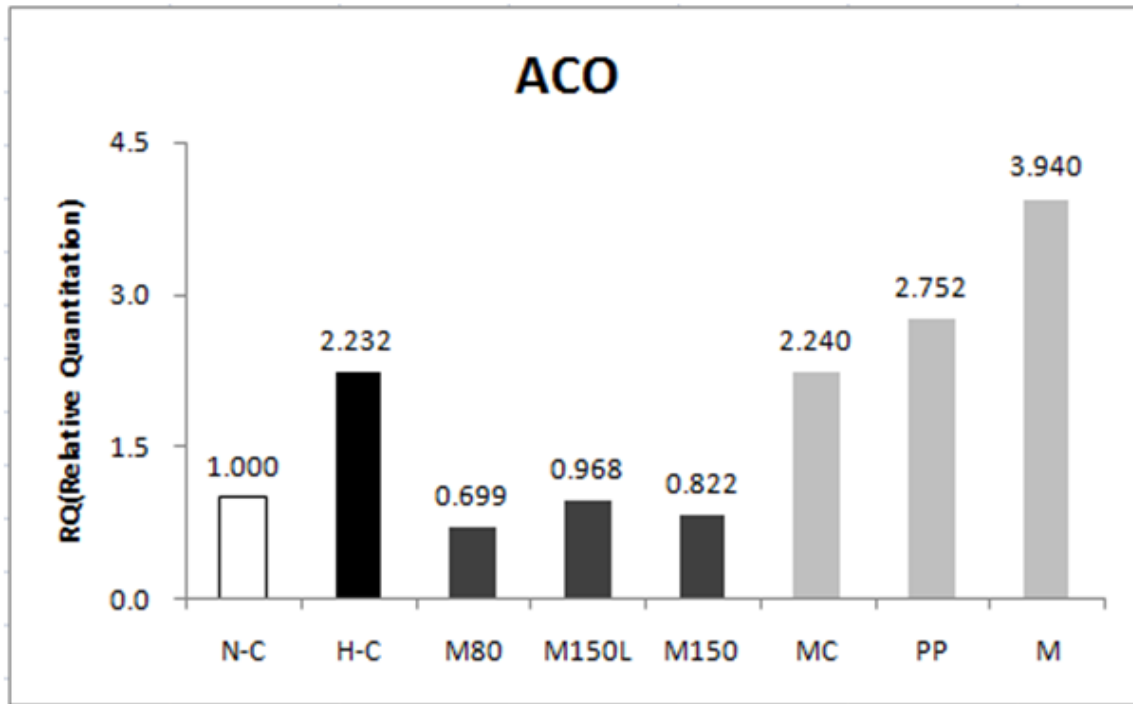


Figure 4-52. ACO mRNA expression.

ACO; acyl-CoA oxidase, N-C; Normal diet control, H-C; High fat diet control, H-M80; High fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-M150L; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(1Brix), H-M150; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-MC; High fat diet plus Mycelial culture broth(2Brix), H-PP; High fat diet plus Purified protein bind polysaccharide, H-M; High fat diet plus Mesima.

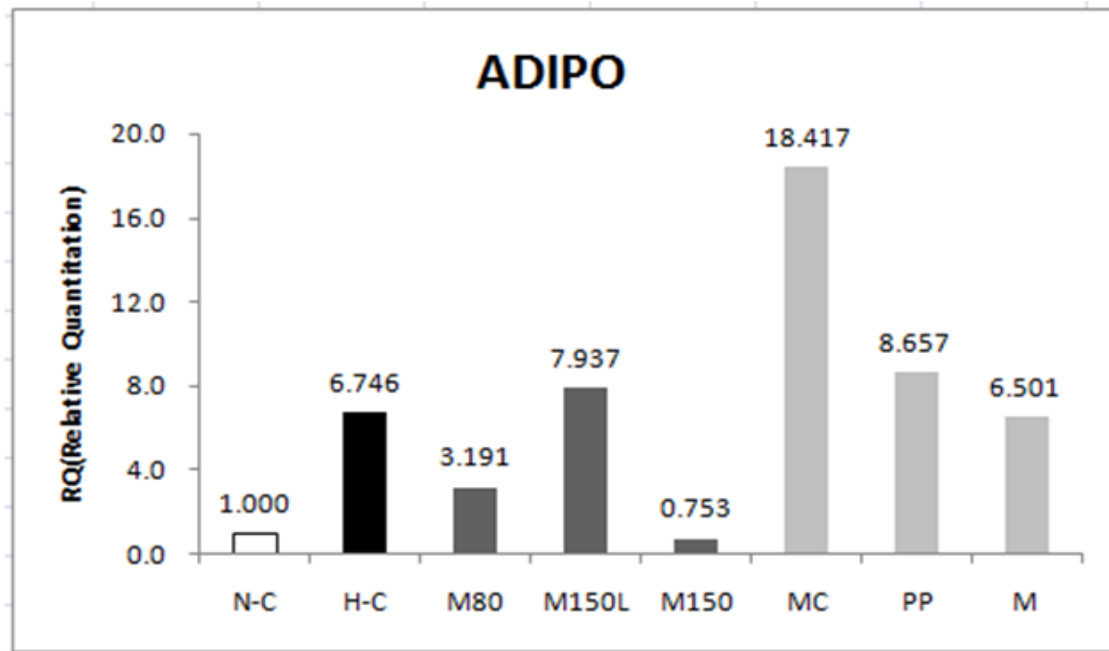


Figure 4-53. Adiponectin mRNA expression.

N-C; Normal diet control, H-C; High fat diet control, H-M80; High fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-M150L; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(1Brix), H-M150; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-MC; High fat diet plus Mycelial culture broth(2Brix), H-PP; High fat diet plus Purified protein bind polysaccharide, H-M; High fat diet plus Mesima.

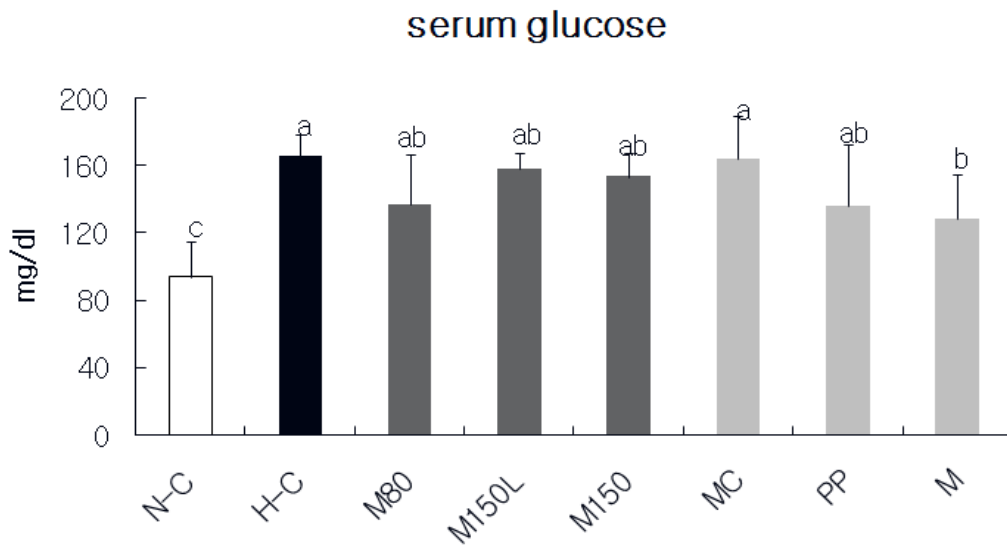


Figure 4-54. Serum glucose concentration.

All values are the mean±S.D(n=7).

^{a,b,c}Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

N-C; Normal diet control, H-C; High fat diet control, H-M80; High fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-M150L; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(1Brix), H-M150; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-MC; High fat diet plus Mycelial culture broth(2Brix), H-PP; High fat diet plus Purified protein bind polysaccharide, H-M; High fat diet plus Mesima.

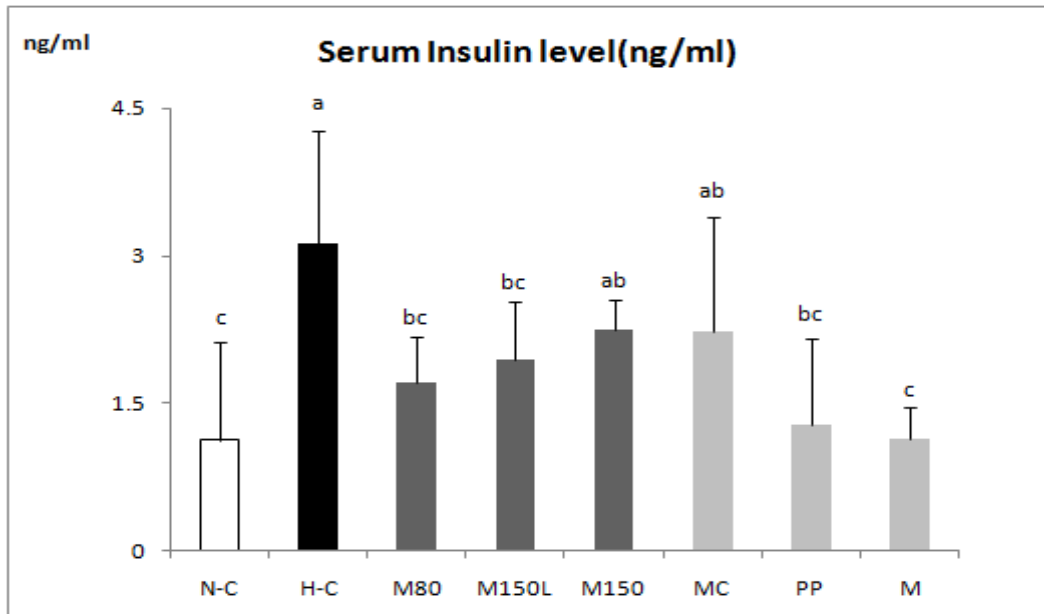


Figure 4–55. Serum insulin concentration.

All values are the mean±S.D(n=7).

^{a,b,c}Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

N–C; Normal diet control, H–C; High fat diet control, H–M80; High fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H–M150L; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(1Brix), H–M150; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H–MC; High fat diet plus Mycelial culture broth(2Brix), H–PP; High fat diet plus Purified protein bind polysaccharide, H–M; High fat diet plus Mesima.

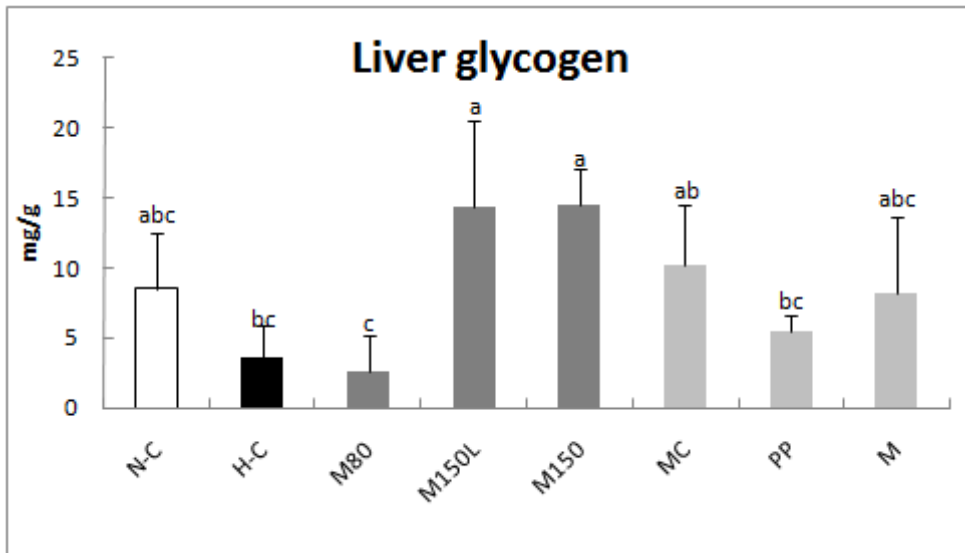


Figure 4-56. Liver glycogen.

All values are the mean±S.D(n=7).

^{a,b,c}Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

N-C; Normal diet control, H-C; High fat diet control, H-M80; High fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-M150L; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(1Brix), H-M150; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-MC; High fat diet plus Mycelial culture broth(2Brix), H-PP; High fat diet plus Purified protein bind polysaccharide, H-M; High fat diet plus Mesima.

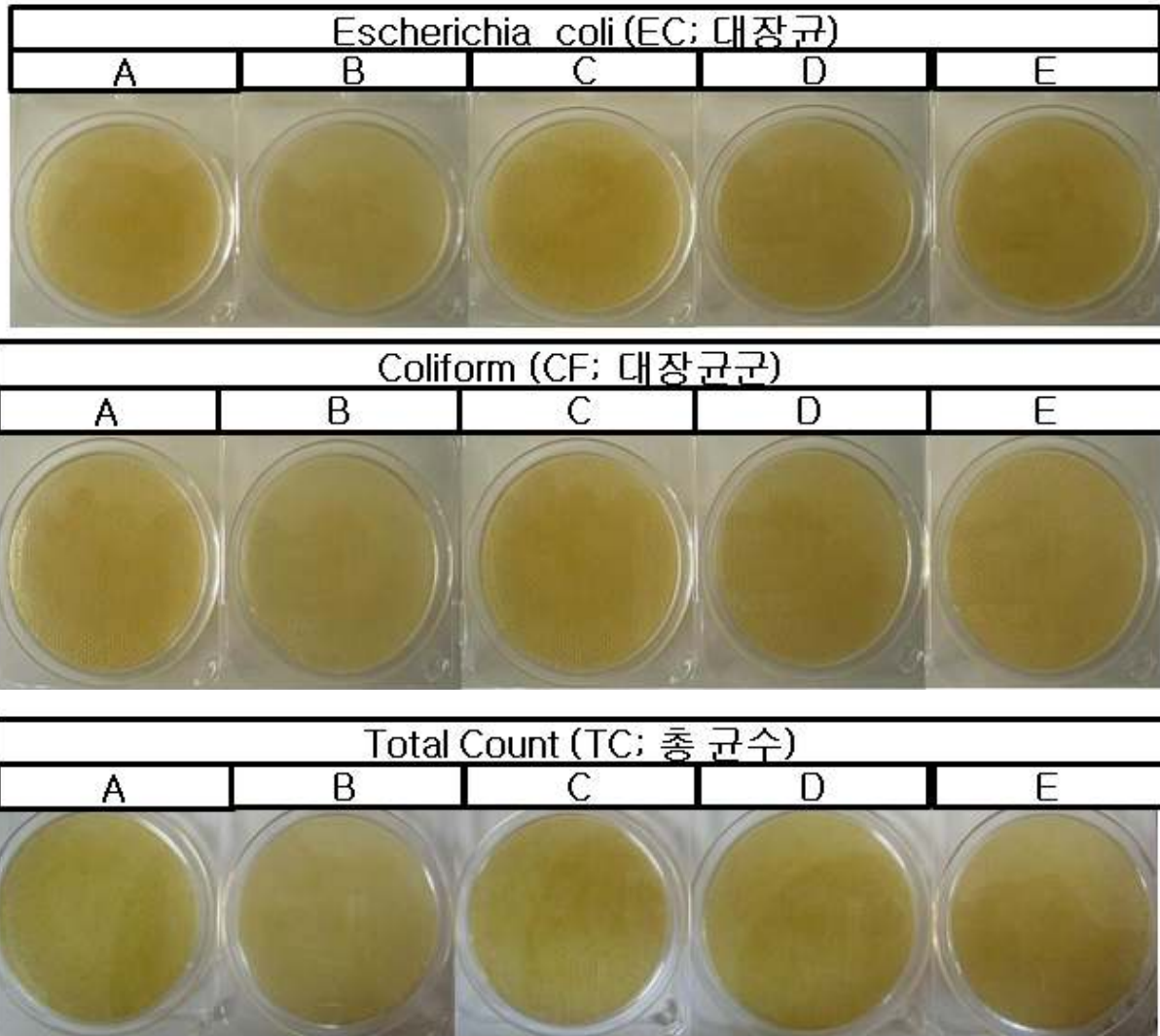


Figure 4-57. Coliform and E. coli of Chaga drink.

A, B, C, D, E are the same as shown in Table 4-19.

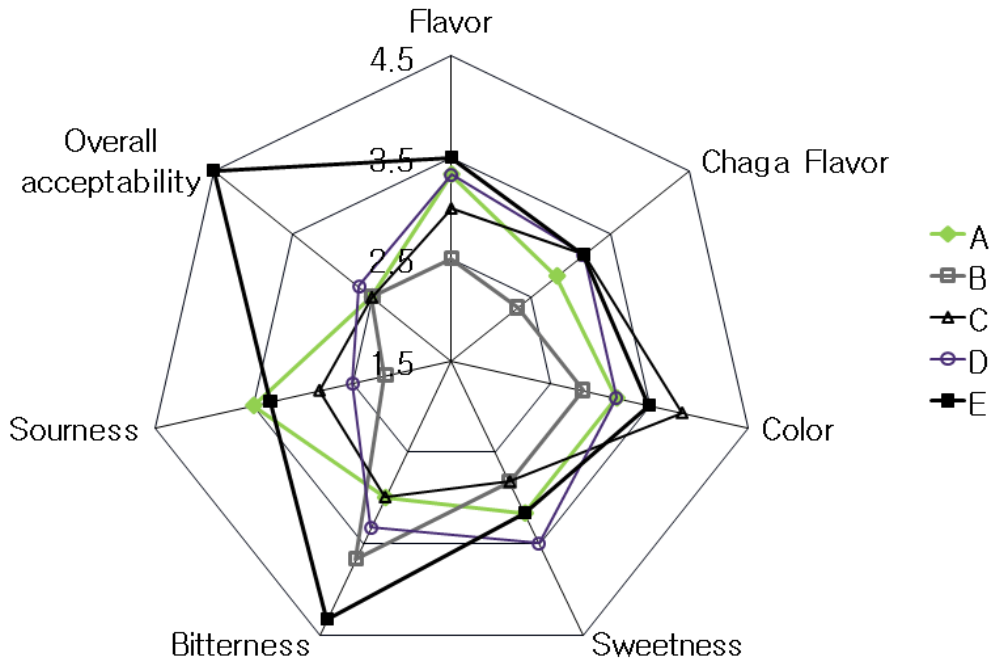


Figure 4-58. Scores by sensory evaluation of Chaga drink.



Figure 4-59. Label design of Chaga drink.

Table 4-1(a). Extract of *Inonotus obliquus* and sample treatment (crude extract)

Extract sample (Fluid)		μl/ml					
		0.1	1	3	5	10	50
Fruiting body (IF)	Hot water extract (HWE _x)	–	–	–	T	T	T
	70°C hot water extract (70E _x)	–	–	–	T	T	T
	100°C hot water extract (100E _x)	–	–	–	T	T	T
	Ultrasonic extract (USE _x)	–	–	–	T	T	T
	Microwave extract (MWE _x)	–	–	–	T	T	T
	Hot water & microwave extract (HME _x)	–	–	–	T	T	T
	Microwave 2nd extract (MW2E _x)	–	–	–	T	T	T
Mycelium (IM)	Hot water extract (HWE _x)	–	–	–	–	–	–
	Ultrasonic extract (USE _x)	–	–	–	–	–	–

T; toxic.

Table 4-1(b). Extract of *Inonotus obliquus* and sample treatment (detail extract)

		$\mu\text{g/ml}$		
Extract sample (Fluid)		20	50	100
Fruiting body (IF)	IFR(80-3)-EH-100-1hr	-	-	-
	IFR(80-3)-EH-100-2hr	-	-	-
	IFR(80-3)-EH-100-5hr	-	-	-
	IFR(80-3)-EH-125-1hr	-	-	-
	IFR(80-3)-EH-125-2hr	-	-	-
	IFR(80-3)-EH-125-5hr	-	-	-
	IFR(80-3)-EH-150-1hr	-	-	-
	IFR(80-3)-EH-150-2hr	-	-	-
	IFR(80-3)-EH-150-5hr	-	-	-
	IFR(80-3)-H-100-1hr	-	-	-
	IFR(80-3)-H-100-2hr	-	-	-
	IFR(80-3)-H-100-5hr	-	-	-
	IFR(100-4)-EH-150-60min	-	-	-
	IF(80-3)-H	-	-	-
Mycelium (IM)	IM(80-3)-H	-	-	-
	IMR(80-3)-H-100-5hr	-	-	-
	IMR(80-3)-H-100-5hr	-	-	-
	IMR(80-3)-EH-100-1hr	-	-	-
	IMR(80-3)-EH-100-2hr	-	-	-
	IMR(80-3)-EH-100-5hr	-	-	-
	IMR(80-3)-EH-125-1hr	-	-	-
	IMR(80-3)-EH-125-2hr	-	-	-
	IMR(80-3)-EH-125-5hr	-	-	-
	IMR(80-3)-EH-150-1hr	-	-	-
	IMR(80-3)-EH-150-2hr	-	-	-
	IMR(80-3)-EH-150-5hr	-	-	-
	IMR(80-2)-EH-150-30min	-	-	-
Extract sample (powder)		100	500	1000
Mycelium culture fluid	P0	-	-	-
	P6	-	-	-
Mycelium	IM(80-3)-E	-	-	-

Table 4-2. Composition of experimental diet and sample treatment

Ingredient(g)	Normal Diet ¹⁾		Hight fat Diet ²⁾					
	N-C	H-C	F80	F150L	F150	MC	PP	M
Casein	200				200			
L-cystine	3				3			
Corn Starch	315				-			
Maltodextrin	35				125			
Sucrose	350				68.8			
Cellulose	50				50			
Soybean Oil	25				25			
Lard	20				245			
Mineral Mix	10				10			
Dicalcium Phosphate	13				13			
Calcium Carbonate	5.5				5.5			
Potassium Citrate	16.5				16.5			
Vitamin Mix	10				10			
Choline Bitartrate	2				2			
FD&C Yellow Dye #5	0.05				-			
FD&C Blue Dye #1	-				0.05			
Total	1055.05				773.85			
Kcal	4057				4057			
Kcal/g	3.85				5.2			

¹⁾Normal diet; AIN-93 diet with 4% fat (10% fat calories) content

²⁾High fat diet; AIN-93 diet with 35% fat (60% fat calories) content

N-C; normal diet control, H-C; high fat diet control, F80; high fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), F150L; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(1Brix), F150; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), MC; high fat diet plus mycelial culture broth(2Brix), PP; high fat diet plus purified protein bind polysaccharide, M; high fat diet plus Mesima.

Table 4-3. Feed consumption, energy intake and feed efficiency ratio in mice

Group		Parameter		
		Feed consumption (g/day)	Energy intake (kcal/day)	Feed efficiency ratio
Normal Diet	N-C	1.96±0.10 ^{ab}	7.47±0.37 ^c	0.016±0.0023 ^b
	H-C	1.76±0.04 ^b	9.14±0.23 ^b	0.080±0.036 ^a
Hight fat Diet	F80	1.87±0.09 ^{ab}	9.69±0.49 ^{ab}	0.086±0.015 ^a
	F150L	1.86±0.16 ^{ab}	9.64±0.86 ^{ab}	0.091±0.033 ^a
	F150	1.88±0.08 ^{ab}	9.76±0.43 ^{ab}	0.102±0.022 ^a
	MC	1.96±0.15 ^{ab}	10.15±0.76 ^{ab}	0.104±0.004 ^a
	PP	1.95±0.06 ^{ab}	10.11±0.30 ^{ab}	0.061±0.0015 ^a
	M	2.07±0.08 ^a	10.77±0.41 ^a	0.077±0.008 ^a

All values are the mean±S.D(n=7).

^{a,b,c}Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

Feed efficiency ratio; weight gain(day)/dietary intake(day)

N-C; normal diet control, H-C; high fat diet control, F80; high fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), F150L; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(1Brix), F150; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), MC; high fat diet plus mycelial culture broth(2Brix), PP; high fat diet plus purified protein bind polysaccharide, M; high fat diet plus Mesima.

Table 4-4. Body weight gain of mice

Group		Parameter		
		Initial weight(g)	Final weight(g)	Weight gain(g/day)
Normal Diet	N-C	22.60±0.86	25.63±0.93 ^d	0.07±0.01 ^c
	H-C	23.12±1.21	38.35±1.84 ^{ab}	0.21±0.03 ^{ab}
Hight fat Diet	F80	23.18±0.58	34.50±0.85 ^c	0.18±0.01 ^b
	F150L	22.69±0.86	33.93±2.92 ^c	0.18±0.04 ^b
	F150	23.20±0.90	38.48±2.37 ^{ab}	0.22±0.03 ^{ab}
	MC	22.51±0.90	39.90±1.58 ^a	0.26±0.01 ^a
	PP	22.25±0.97	35.40±3.79 ^{bc}	0.19±0.05 ^b
	M	22.47±1.09	38.66±2.08 ^{ab}	0.24±0.02 ^a

All values are the mean±S.D(n=7).

^{a,b,c}Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

N-C; normal diet control, H-C; high fat diet control, F80; high fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), F150L; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(1Brix), F150; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), MC; high fat diet plus mycelial culture broth(2Brix), PP; high fat diet plus purified protein bind polysaccharide, M; high fat diet plus Mesima.

Table 4-5. Serum lipid concentrations in mice

Group		Serum(mg/dl)		
		TG	TC	HDL-c
Normal Diet	N-C	84.98±24.75 ^c	155.28±2.43 ^e	53.54±5.92 ^d
	H-C	164.36±32.51 ^a	237.12±7.35 ^a	72.24±15.96 ^c
Hight fat Diet	F80	111.17±21.03 ^{bc}	216.46±4.90 ^{bc}	111.81±15.23 ^{ab}
	F150L	105.85±6.57 ^{bc}	212.22±8.86 ^c	112.76±9.93 ^{ab}
	F150	102.74±12.32 ^{bc}	224.72±6.35 ^b	119.94±6.27 ^a
	MC	98.66±15.16 ^{bc}	235.19±7.74 ^a	111.74±5.07 ^{ab}
	PP	124.95±22.55 ^b	219.10±8.70 ^{bc}	109.32±5.64 ^{ab}
	M	110.02±18.51 ^{bc}	184.23±2.71 ^d	101.86±5.28 ^b

All values are the mean±S.D(n=7).

^{a,b,c}Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

N-C; normal diet control, H-C; high fat diet control, F80; high fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), F150L; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(1Brix), F150; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), MC; high fat diet plus mycelial culture broth(2Brix), PP; high fat diet plus purified protein bind polysaccharide, M; high fat diet plus Mesima.

Table 4-6. Liver lipid concentrations in mice

Group		Liver(mg/g)	
		TG	TC
Normal Diet	N-C	18.56±2.96	1.03±0.59 ^b
	H-C	30.55±12.22	3.55±1.12 ^a
Hight fat Diet	F80	26.90±12.50	2.48±0.60 ^{ab}
	F150L	27.04±10.97	2.20±1.17 ^b
	F150	24.94±7.62	1.95±0.65 ^b
	MC	28.78±7.04	2.28±0.59 ^b
	PP	27.13±6.92	2.31±1.77 ^b
	M	25.58±5.61	2.19±0.49 ^b

All values are the mean±S.D(n=7).

^{a,b,c}Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

N-C; normal diet control, H-C; high fat diet control, F80; high fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), F150L; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(1Brix), F150; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), MC; high fat diet plus mycelial culture broth(2Brix), PP; high fat diet plus purified protein bind polysaccharide, M; high fat diet plus Mesima.

Table 4-7. Carnitine levels in serum

Group		Serum($\mu\text{mol/dl}$)				
		NEC	ASAC	AIAC	TCNE	Acyl/NEC
Normal Diet	N-C	0.36 \pm 0.26 ^c	1.37 \pm 0.31 ^{ab}	0.22 \pm 0.13	1.98 \pm 0.12 ^C	4.27 \pm 3.40 ^a
	H-C	0.68 \pm 0.14 ^b	1.22 \pm 0.1 ^{bc}	0.24 \pm 0.04	2.01 \pm 0.24 ^C	2.91 \pm 0.83 ^{ab}
Hight fat Diet	F80	0.63 \pm 0.09 ^b	1.08 \pm 0.08 ^c	0.20 \pm 0.08	1.95 \pm 0.10 ^C	1.98 \pm 0.38 ^b
	F150L	0.76 \pm 0.08 ^b	1.22 \pm 0.15 ^{bc}	0.17 \pm 0.02	2.07 \pm 0.13 ^C	1.98 \pm 0.42 ^b
	F150	0.61 \pm 0.06 ^b	1.34 \pm 0.17 ^{abc}	0.20 \pm 0.01	2.18 \pm 0.16 ^{bc}	2.73 \pm 0.58 ^{ab}
	MC	0.82 \pm 0.15 ^b	1.58 \pm 0.20 ^a	0.25 \pm 0.02	2.50 \pm 0.35 ^{ab}	2.24 \pm 0.30 ^b
	PP	0.83 \pm 0.05 ^b	1.44 \pm 0.18 ^{ab}	0.16 \pm 0.03	2.28 \pm 0.17 ^{abc}	1.81 \pm 0.33 ^b
	M	1.27 \pm 0.37 ^a	1.27 \pm 0.13 ^{bc}	0.18 \pm 0.05	2.54 \pm 0.32 ^a	1.43 \pm 0.60 ^b

All values are the mean \pm S.D(n=7).

^{a,b,c}Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

N-C; normal diet control, H-C; high fat diet control, F80; high fat diet plus 80 $^{\circ}\text{C}$ water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), F150L; high fat diet plus 150 $^{\circ}\text{C}$ water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(1Brix), F150; high fat diet plus 150 $^{\circ}\text{C}$ water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), MC; high fat diet plus mycelial culture broth(2Brix), PP; high fat diet plus purified protein bind polysaccharide, M; high fat diet plus Mesima.

Table 4–8. Carnitine levels in liver

Group		Liver(nmol/100mg)				
		NEC	ASAC	AIAC	TCNE	Acyl/NEC
Normal Diet	N–C	9.51±4.34 ^a	9.23±1.45 ^a	6.41±0.69 ^a	24.47±4.34 ^a	3.26±3.08
	H–C	8.06±0.25 ^{ab}	5.81±0.65 ^b	5.18±0.56 ^b	18.36±0.33 ^{bc}	1.40±0.17
	F80	5.15±1.88 ^b	6.03±2.06 ^b	5.39±0.54 ^b	17.23±1.85 ^{bc}	2.35±1.02
Hight fat Diet	F150L	7.45±1.73 ^{ab}	6.80±1.15 ^b	5.62±0.35 ^b	19.92±1.03 ^{bc}	1.88±0.58
	F150	5.67±1.36 ^b	7.74±3.08 ^{ab}	5.39±0.70 ^b	19.18±2.95 ^{bc}	2.40±1.13
	MC	5.85±1.82 ^b	6.05±0.66 ^b	5.06±0.84 ^b	16.70±0.70 ^c	1.91±0.41
	PP	7.50±2.29 ^{ab}	7.04±0.64 ^b	5.16±0.61 ^b	20.18±2.18 ^b	1.54±0.51
	M	6.66±1.15 ^b	7.81±0.74 ^{ab}	4.83±0.50 ^b	18.97±0.83 ^{bc}	1.76±0.40

All values are the mean±S.D(n=7).

^{a,b,c}Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

N–C; normal diet control, H–C; high fat diet control, F80; high fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), F150L; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(1Brix), F150; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), MC; high fat diet plus mycelial culture broth(2Brix), PP; high fat diet plus purified protein bind polysaccharide, M; high fat diet plus Mesima.

Table 4–9. Blood glucose concentration

Groups		Blood glucose concentration(mg/dl)			
		5weeks	7weeks	9weeks	11weeks
Normal Diet	N–C	118.57±8.68 ^c	113.80±7.82 ^c	105.80±12.79 ^b	113.00±0.71 ^c
	H–C	161.33±16.11 ^{ab}	148.75±6.45 ^a	154.00±18.02 ^a	131.75±2.63 ^b
Hight fat Diet	F80	164.43±12.12 ^a	132.25±9.95 ^b	136.40±11.63 ^a	124.33±14.63 ^{bc}
	F150L	154.11±19.87 ^{ab}	133.40±4.77 ^a	144.80±6.34 ^a	129.25±7.93 ^b
	F150	155.89±15.66 ^{ab}	145.43±8.44 ^a	149.50±7.05 ^a	146.50±8.65 ^a
	MC	159.44±13.96 ^{ab}	156.50±4.65 ^a	149.00±19.04 ^a	147.25±4.57 ^a
	PP	145.50±10.18 ^b	151.75±15.15 ^a	151.00±12.78 ^a	150.00±6.48 ^a
	M	156.38±25.05 ^{ab}	157.00±7.07 ^a	151.00±5.15 ^a	121.75±5.62 ^{bc}

All values are the mean±S.D(n=7).

^{a,b,c}Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

N–C; normal diet control, H–C; high fat diet control, F80; high fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), F150L; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(1Brix), F150; high fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* fruit body(2Brix), MC; high fat diet plus mycelial culture broth(2Brix), PP; high fat diet plus purified protein bind polysaccharide, M; high fat diet plus Mesima.

Table 4-10. Recipes of Chaga(*Inonotus obliquus* Mycelia) drink

(unit : %)

	A	B	C	D	E
추출액	30	30	30	30	30
β -glucan 함량	0.4983mg/ml	0.4983mg/ml	0.9007mg/ml	0.6995mg/ml	0.4983mg/ml
정제수	60.5	60.5	60.5	60.5	60.5
사과농축액	0	9	4	4	4
대추농축액	4.5	0	2.5	2.5	2.5
영지농축액	4.5	0	2.5	2.5	2.5
스테비아	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
액상과당	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24
말토덱스트린	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
구연산	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

Table 4–11. Feed consumption, energy intake and feed efficiency ratio in mice

Group		Parameter		
		Feed consumption (g/day)	Energy intake (Kcal/day)	Feed efficiency ratio
Normal Diet	N–C	1.96±0.10	7.45±0.37 ^c	0.03±0.00 ^b
	H–C	1.76±0.04	9.16±0.22 ^b	0.10±0.04 ^a
High fat Diet	M80	1.91±0.11	9.94±0.59 ^{ab}	0.11±0.00 ^a
	M150L	1.86±0.01	9.67±0.07 ^{ab}	0.13±0.02 ^a
	M150	1.96±0.15	10.17±0.77 ^{ab}	0.13±0.01 ^a
	MC	1.96±0.15	10.17±0.77 ^{ab}	0.13±0.00 ^a
	PP	1.95±0.06	10.12±0.33 ^{ab}	0.10±0.00 ^a
	M	2.07±0.08	10.77±0.45 ^a	0.11±0.01 ^a

All values are the mean±S.D(n=7).

^{a,b,c}Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

Feed efficiency ratio; weight gain(day)/dietary intake(day)

N–C; Normal diet control, H–C; High fat diet control, H–M80; High fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H–M150L; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(1Brix), H–M150; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H–MC; High fat diet plus Mycelial culture broth(2Brix), H–PP; High fat diet plus Purified protein bind polysaccharide, H–M; High fat diet plus Mesima.

Table 4-12. Body weight gain of mice

Group		Parameter		
		Initial weight(g)	Final weight(g)	Weight gain(g/day)
Normal Diet	N-C	19.48±0.80	25.63±0.93 ^d	0.06±0.01 ^e
	H-C	20.14±0.74	38.35±1.84 ^{ab}	0.23±0.02 ^a
	M80	19.92±0.77	37.45±1.42 ^{ab}	0.19±0.01 ^c
High fat Diet	M150L	19.55±0.82	37.30±1.44 ^b	0.20±0.02 ^{bc}
	M150	19.70±0.73	38.85±3.17 ^{ab}	0.21±0.04 ^{abc}
	MC	19.33±0.96	39.90±1.58 ^a	0.23±0.02 ^{ab}
	PP	19.18±0.75	34.13±1.94 ^c	0.16±0.02 ^d
	M	19.97±0.68	38.66±2.08 ^{ab}	0.21±0.02 ^{abc}

All values are the mean±S.D(n=7).

^{a,b,c}Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

N-C; Normal diet control, H-C; High fat diet control, H-M80; High fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-M150L; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(1Brix), H-M150; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-MC; High fat diet plus Mycelial culture broth(2Brix), H-PP; High fat diet plus Purified protein bind polysaccharide, H-M; High fat diet plus Mesima.

Table 4-13. Serum lipid concentrations in mice

Group		Serum(mg/dl)		
		TG	TC	HDL-c
Normal Diet	N-C	87.65±15.31 ^b	196.00±12.68 ^d	74.04±30.62
	H-C	124.15±23.70 ^a	302.17±25.44 ^{ab}	91.73±30.86
	M80	85.06±19.38 ^{bc}	253.27±23.68 ^c	85.59±23.04
	M150L	88.31±11.71 ^b	313.27±17.80 ^a	88.47±32.34
High fat Diet	M150	66.58±11.07 ^c	309.87±6.78 ^{ab}	78.57±17.28
	MC	73.68±7.98 ^{bc}	260.18±60.12 ^a	76.94±18.19
	PP	77.79±12.73 ^{bc}	260.18±60.12 ^c	100.58±18.97
	M	74.02±14.79 ^{bc}	277.06±8.95 ^{bc}	62.28±17.89

All values are the mean±S.D(n=7).

^{a,b,c}Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

N-C; Normal diet control, H-C; High fat diet control, H-M80; High fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-M150L; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(1Brix), H-M150; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-MC; High fat diet plus Mycelial culture broth(2Brix), H-PP; High fat diet plus Purified protein bind polysaccharide, H-M; High fat diet plus Mesima.

Table 4-14. Liver lipid concentrations in mice

Group	Liver(mg/g)	
	TG	TC
N-C	18.56±2.96 ^{bc}	1.03±0.59 ^d
H-C	26.03±12.16 ^{ab}	3.55±1.12 ^a
M80	15.85±4.34 ^c	1.50±0.29 ^{cd}
M150L	18.06±5.64 ^{bc}	1.06±0.23 ^d
M150	16.54±2.47 ^c	1.35±0.39 ^d
MC	27.97±10.04 ^a	2.28±0.59 ^b
PP	28.90±7.55 ^a	1.60±0.42 ^{bcd}
M	23.84±6.58 ^{abc}	2.19±0.49 ^{bc}

All values are the mean±S.D(n=7).

^{a,b,c}Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

N-C; Normal diet control, H-C; High fat diet control, H-M80; High fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-M150L; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(1Brix), H-M150; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-MC; High fat diet plus Mycelial culture broth(2Brix), H-PP; High fat diet plus Purified protein bind polysaccharide, H-M; High fat diet plus Mesima.

Table 4–15. Carnitine levels in serum

Group	Serum($\mu\text{mol/dl}$)					
	NEC	ASAC	AIAC	TCNE	Acyl/NEC	
Normal Diet	N-C	0.12 \pm 0.04	0.05 \pm 0.02 ^{bc}	0.07 \pm 0.01 ^a	0.24 \pm 0.04 ^{ab}	1.10 \pm 0.49 ^a
	H-C	0.12 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01 ^d	0.05 \pm 0.01 ^b	0.18 \pm 0.01 ^{de}	0.58 \pm 0.09 ^c
	M80	0.13 \pm 0.02	0.08 \pm 0.02 ^a	0.06 \pm 0.01 ^b	0.27 \pm 0.02 ^a	1.12 \pm 0.30 ^a
High fat Diet	M150L	0.11 \pm 0.01	0.05 \pm 0.04 ^{bc}	0.05 \pm 0.01 ^b	0.21 \pm 0.04 ^{bcd}	0.95 \pm 0.39 ^{ab}
	M150	0.11 \pm 0.02	0.06 \pm 0.04 ^{ab}	0.06 \pm 0.01 ^b	0.23 \pm 0.04 ^{abc}	1.10 \pm 0.33 ^a
	MC	0.11 \pm 0.02	0.01 \pm 0.00 ^d	0.05 \pm 0.01 ^b	0.17 \pm 0.02 ^e	0.58 \pm 0.21 ^c
	PP	0.13 \pm 0.03	0.03 \pm 0.01 ^{cd}	0.05 \pm 0.01 ^b	0.21 \pm 0.04 ^{cde}	0.64 \pm 0.11 ^{bc}
	M	0.11 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01 ^{cd}	0.05 \pm 0.01 ^b	0.19 \pm 0.01 ^{de}	0.71 \pm 0.13 ^{bc}

All values are the mean \pm S.D(n=7).

^{a,b,c}Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

N-C; Normal diet control, H-C; High fat diet control, H-M80; High fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-M150L; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(1Brix), H-M150; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-MC; High fat diet plus Mycelial culture broth(2Brix), H-PP; High fat diet plus Purified protein bind polysaccharide, H-M; High fat diet plus Mesima.

Table 4–16. Carnitine levels in liver

Group		Liver(nmol/100mg)				
		NEC	ASAC	AIAC	TCNE	Acyl/NEC
Normal Diet	N-C	4.23±2.86 ^c	11.17±5.15 ^{cd}	2.86±1.85	18.26±5.37 ^b	3.54±3.37 ^{abc}
	H-C	6.22±1.79 ^{bc}	10.39±3.30 ^d	2.31±0.46	18.93±2.67 ^b	2.30±1.14 ^{abcd}
	M80	6.22±1.73 ^{bc}	18.40±7.78 ^a	2.02±0.81	26.64±7.64 ^a	4.13±0.88 ^a
	M150L	5.75±2.04 ^{bc}	16.32±2.27 ^{abc}	2.81±0.49	24.88±2.72 ^a	3.71±1.48 ^{ab}
High fat Diet	M150	6.69±0.54 ^{bc}	16.10±2.07 ^{abc}	2.83±0.86	25.62±1.24 ^a	2.86±0.43 ^{abcd}
	MC	10.91±5.48 ^a	16.99±3.24 ^{ab}	2.41±0.56	26.83±5.38 ^a	2.24±0.30 ^{bcd}
	PP	8.81±1.35 ^{ab}	13.82±2.21 ^{abcd}	2.01±0.73	24.64±3.27 ^a	1.82±0.33 ^{cd}
	M	11.73±4.12 ^a	12.88±1.96 ^{bcd}	1.96±0.66	26.56±4.00 ^a	1.43±0.60 ^d

All values are the mean±S.D(n=7).

^{a,b,c}Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

N-C; Normal diet control, H-C; High fat diet control, H-M80; High fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-M150L; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(1Brix), H-M150; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-MC; High fat diet plus Mycelial culture broth(2Brix), H-PP; High fat diet plus Purified protein bind polysaccharide, H-M; High fat diet plus Mesima.

Table 4-17 . Blood glucose concentration

Groups		Blood glucose concentration(mg/dl)			
		5 week	7 week	9 week	11 week
Normal Diet	N-C	120.50±15.35 ^b	113.80±7.82 ^c	109.50±11.27 ^b	112.33±1.75 ^d
	H-C	158.75±8.26 ^a	148.75±6.45 ^{ab}	154.00±18.02 ^a	131.75±2.63 ^{abc}
Hight fat Diet	M80	152.25±12.71 ^a	141.75±5.74 ^{ab}	137.25±11.44 ^a	125.80±20.61 ^{bcd}
	M150L	143.00±4.90 ^a	139.33±4.76 ^b	132.33±7.51 ^a	126.75±6.80 ^{bcd}
	M150	143.14±20.81 ^a	144.25±16.52 ^{ab}	141.33±11.02 ^a	128.00±7.57 ^{bcd}
	MC	152.33±11.13 ^a	151.75±7.41 ^{ab}	149.00±19.04 ^a	144.00±4.69 ^a
	PP	145.50±10.18 ^a	146.00±18.37 ^{ab}	141.25±10.08 ^a	140.25±15.50 ^{ab}
	M	152.78±25.80 ^a	157.00±7.07 ^a	149.00±2.94 ^a	121.75±5.62 ^{cd}

All values are the mean±S.D(n=7).

^{a,b,c}Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

N-C; Normal diet control, H-C; High fat diet control, H-M80; High fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-M150L; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(1Brix), H-M150; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-MC; High fat diet plus Mycelial culture broth(2Brix), H-PP; High fat diet plus Purified protein bind polysaccharide, H-M; High fat diet plus Mesima.

Table 4-18 . Oral glucose tolerance test

Time (minute)	0	30	60	120	180
N-C	90.33±10.21 ^b	145.67±32.15 ^c	122±5.33 ^b	107.33±16.28 ^b	93.5±7.68 ^c
H-C	115.14±11.57 ^a	210.86±30.83 ^a	170±5.80 ^a	161.25±2.99 ^a	134.50±8.35 ^{ab}
M80	128±29.13 ^a	197.57±31.30 ^{abc}	176.63±27.00 ^a	156.63±23.76 ^a	132.86±21.74 ^{ab}
M150L	130.25±24.73 ^a	204.71±9.86 ^{ab}	171.67±12.36 ^a	164.80±15.07 ^a	138.80±6.72 ^{ab}
M150	117.43±13.45 ^a	172.29±21.32 ^{cde}	167.50±18.04 ^a	153.14±12.20 ^a	131.14±6.02 ^{ab}
MC	125.5±25.03 ^a	183.29±16.15 ^{bcd}	176.13±15.13 ^a	160.88±18.58 ^a	146.5±15.04 ^a
PP	121.71±17.15 ^a	156.57±21.90 ^{de}	159.17±29.29 ^a	154.14±29.15 ^a	143.57±18.56 ^{ab}
M	121.29±21.68 ^a	172.43±11.83 ^{cde}	162.29±22.70 ^a	155.14±27.22 ^a	126.40±11.28 ^b

All values are the mean±S.D(n=7).

^{a,b,c}Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

N-C; Normal diet control, H-C; High fat diet control, H-M80; High fat diet plus 80°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-M150L; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(1Brix), H-M150; High fat diet plus 150°C water extract of *Inonotus obliquus* Mycelia(2Brix), H-MC; High fat diet plus Mycelial culture broth(2Brix), H-PP; High fat diet plus Purified protein bind polysaccharide, H-M; High fat diet plus Mesima.

Table 4-19 . Scores by sensory evaluation of Chaga drink

sensory evaluation	A	B	C	D	E
Flavor	3.33±0.98	2.50±0.80	3.00±0.60	3.33±1.15	3.50±0.80
Chaga Flavor	2.83±0.94 ^{ab}	2.33±0.49 ^b	3.17±0.94 ^a	3.17±0.72 ^a	3.17±0.72 ^a
Color	3.17±1.27	2.83±0.94	3.83±0.94	3.17±0.94	3.50±1.31
Sweetness	3.17±0.94	2.83±1.11	2.83±0.72	3.50±0.52	3.17±0.72
Bitterness	3.00±0.85 ^c	3.67±0.49 ^b	3.00±0.85 ^c	3.33±0.49 ^{bc}	4.33±0.78 ^a
Sourness	3.50±1.00 ^a	2.17±0.39 ^b	2.83±0.39 ^{ab}	2.50±0.80 ^b	3.33±1.15 ^a
Overall acceptability	2.50±1.17 ^b	2.50±1.17 ^b	2.50±0.80 ^b	2.67±0.49 ^b	4.50±0.80 ^a

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절. 연구 개발 목표 달성도

세부과제명	추진목표	달성내용
[제 1 협동과제] 원형질체 형성과 돌연변이 유발을 통한 단백다당체 고생산성 <i>Inonotus obliquus</i> 변이주 개발 및 배양특성 연구	liquid stock 및 solid stock 안정성	- 약 100일 동안 장기 보관법 개발 (100%초과 달성)
	고생산성 균주의 원형질체 형성을 통한 단백다당체 고생산성 균주 개발	- 효율적인 세포벽 분해효소 사용으로 원형질체 형성빈도가 큰 폭으로 증가하여 유전자형이 동일한 대량의 단일균주 선별 가능. - 원형질체 유래 고생산성 균주의 생산 안정성이 약 6개월 이상으로 확인 (100% 달성)
	단백다당체 고생산성 및 고성장성 우량 변이주 개발	- Filtration 또는 trapping 방법에 의한 원형질체 회수 방법의 개발로 대량의 단일 균주 선별이 가능해 짐. - 균사체의 UV 처리후 재생된 원형질체의 회수 방법 확립으로 우량 돌연변이주 선별이 용이해 짐. - 특히 rational screening 방법에 근거해서 세포벽다당체(IPS) 및 세포외다당체 (EPS)의 고생산성 균주를 별도로 개발 - 원형질체 융합(genome shuffling) 방법에 의한 단백다당체 고생산성 변이주 개발 (100% 달성)
	발효조 액상 배양공정과 연계된 형질전환 우량 변이주 개발 시도	- 생산균주에 산소전달단백질에 대한 유전자(vhb)의 도입에 의해 산소가 결핍된 배양환경에서도 고생산성 능력을 갖는 형질전환 변이주 개발 및 배양 중 pH가 낮게 유지될 때 산소전달단백질이 발현하는 expression vector 제작 성공 (80% 달성)
	고생산성 원형질체 유래 우량 변이주의 신속 선별을 위한 일련의 다단계 배양공정 확립	- 계대배양(고체성장배양), 정치배양, 성장배양, 생산배양에 이르는 일련의 배양방법 확립. - 특히 장시간을 용하는 계대배양 기간의 획기적 단축으로, 선별된 우량변이주의 신속 배양이 가능해지는 high throughput system(HTS) 확립 (100% 달성)
	고생산성 균주의 대량배양에 적합한 저가의 산업용 복합생산배지 개발	- 통계적 방법에 의한 경제적인 산업용 복합배지 개발: OFAT, Plackett-Burman design, FFD, SAM, Response surface method(RSM)에 의한 생산배지 조성 최적화 (100% 달성)
	고생산성 균주의 배양생리적 특성 조사를 통한 배양형태 최적화	- 액상 성장배양과 생산배양 시 각각의 배양에 최적인 배양형태로 유도하는 배양기술 개발(성장배양 시에는 균사모양, 생산배양 시에는 0.5~1 mm 직경의 pellet 모양의 morphology)로 인해 최종 액상 플라스크 생산배양에서 생산균주의 배양 생리적 특성에 대한 정밀 조사가 가능해짐 (100% 달성)
	Scale-up 배양공정과 연계된 균주 개발 및 배지조성 최적화	- 단위 질량당 생산된 균사체의 균체량($Y_{x/s}$) (생산수율)이 다른 탄소원보다 훌륭한 oil 또는 oleic acid가 첨가된 IPS 생산배지 개발(통계적 방법 적용) 및 이들을 탄소원으로 효율적으로 이용하는 고생산성 균주 선별 - oil 또는 oleic acid가 antiform의 역할을 동시에 수행하므로 배양공정 scale-up이 매우 용이한 것으로 확인됨(100% 달성)

세부과제명	추진목표	달성내용
[제 1 세부과제] 단백다당체의 고농도 대량 생산을 위한 담자균류 균사체의 발효조 액상 배양공정 개발	<i>I. obliquus</i> 균사체의 액상배양을 위한 최적 발효조 설계	- 고생산성 <i>I. obliquus</i> 균사체의 전단응력 민감성, 산소제한 배양조건에 대한 민감성 등의 배양 생리적 특성을 감안한 발효기의 impeller, baffle 및 sparger 설계 (100% 달성)
	발효조 배양에서의 배지 최적화를 통한 세포외다당체(EPS)의 생산성 향상	- OFAT, FFD 등의 통계적 방법을 적용해서 발효조 액상배양을 위한 세포외다당체(EPS)의 산업용 생산배지 최적화: C/N ratio가 9:1인 최적 생산배지 조성에서 EPS의 최종 생산성 9.49g/L, 기질수율인 $Y_{p/s}$ 수치(glucose 1g이 소모될 때 생산되는 EPS 양(g)) 0.46인 생산배지 조성 확립 (100% 달성)
	발효조 배양에서 oil 또는 oleic acid의 첨가를 통한 세포벽다당체(IPS)의 생산성 향상	- 균체량($Y_{x/s}$) (생산수율)이 높고, 배양안정성과 배양 재현성이 우수한 oleic acid가 첨가된 IPS 산업용 생산배지 개발 (균체 생산량: 25g/L이상) - 첨가된 oleic acid성분이 항거품제의 역할을 동시에 수행하므로 75L 발효기를 이용한 배양공정 scale-up이 수월하게 진행됨 (100% 달성)
	최종 생산발효조 배양에 이르는 다단계 배양공정에서 <i>I. obliquus</i> 균사체의 최적 배양형태 유도	- 고체성장배양, 정치배양, 플라스크 액상성장배양, 발효조 액상성장배양, 발효조 액상생산배양의 전 과정에서 다단계 고생산을 위한 생산균주의 최적 배양형태 유도 기술 개발. - 특별히 플라스크 및 발효조 성장배양에서는 반드시 균사모양의 배양형태를, 최종 발효조 생산배양에서는 0.5 mm 정도의 펠렛모양의 배양형태를 유도하는 배양기술 개발 (100% 달성)
	고생산성 변이주의 발효조 배양에서의 배양 특성 조사를 통한 단백다당체 생산성 및 scale-up 발효조 배양 공정 운전조건 확립	- 종균배양에서 최종 생산배양에 이르는 전체 공정이 “process F 공정” 으로 구성된 다단계 배양공정을 적용해서 75리터 pilot-scale 생산 발효조에서 고농도의 EPS 및 IPS 생산 성공. - Pilot-scale 발효조 배양에서 최적의 배양형태인 compact한 pellet 형태(pellet 직경: 0.5~1.0 mm)의 morphology를 띄는 75리터 발효조 액상배양 기술 확립 (100% 달성)
	발효조의 용존산소 농도 자동제어 배양기술 개발	- 교반속도와 통기량의 동시 자동조절을 통해 생산균주의 발효조 배양 시 용존산소농도를 적정 수준으로 조절하기 위한 용존산소 농도 자동제어 시스템 구축 (100% 달성)
	온라인 컴퓨터를 이용한 배양공정의 조업변수 예측 및 자동제어 기술 개발	- 탄소원과 질소원의 유가식 공급을 통해, 일정기간 pH가 자동 조절되는 pH-stat 유가식 배양공정 개발. - 가스분석기를 이용하여 생산균주의 산소흡수율을 정확하게 측정하는 배양시스템 확립을 통해 실시간 배양공정 조업변수 예측 및 자동제어를 위한 배양공정 자동화시스템 구축 (100% 달성)
	<i>I. obliquus</i> 균사체의 액상배양 공정 scale-up 전략 확립	- 발효조 액상 배양공정의 scale-up시 가장 중요한 배양변수인 산소물질전달계수(k_La)의 정확한 측정방법 확립 - 교반기의 종류에 따른 산소전달계수 비교를 통해 배양공정 scale-up을 위한 기반 자료 구축 (100% 달성)

<p>[제 2 협동과제] 균사체 유래 β-glucan 구조의 수용성 단백다당체의 분석법 확립 및 Lab. 규모의 분리정제 공정 개발</p>	기능성을 개선시킨 β-glucan 구조의 수용성 단백다당체 제조 연구 지속적 수행	- gel filtration에 의해 단백다당체를 분획하여 FT-IR 분석한 결과, O-H, C-H, C=O와 C-H, C=O bending 등의 작용기를 가진 β-glucan임을 확인하였음(100%달성)
	청정 분리 정제 공정의 규모 확대(scale-up) 연구	- 효소처리에 의한 단백다당체 추출조건을 확립하였고 여과를 위한 규모 확대 조건 확립과 한외여과 막을 이용한 농축과 분리의규모 확대 조건을 확립하였음 (100%달성)
	Pilot 규모의 여과 공정 개발	- Filtrate 점성 연구, cake의 specific resistance연구, scale-up에 필요한 Ruth equation 상수 결정, cake의 compressibility 연구, 최적 여과막 및 filter aid의 최종 선정 - 압축여과의 경우 균사체분리를 위한 조건확립했음(90%달성)
	Pilot 규모의 미세/한외여과공정 개발	- 한외여과막을 이용한 막횡단압력, 분리액의 온도, 분리액의 pH, 운전시간, 분리액의 예비농축에 따른 분리액의 volume concentration ratio 등을 고려한 막분리 공정 pilot 규모의 설계 및 운전 전략 확립(100%달성)
	Pilot 규모의 단백다당체 건조공정 설계	- Lab-scale의 건조와 polishing (finishing)공정 개발 과정에서 축적된 기초 자료를 바탕으로 pilot 규모에서 유효성분의 건조공정 설계(100%달성)
	분리정제공정 scale-up 전략 확립	- Lab-scale의 기초 연구자료와 pilot 규모의 운전 자료들의 비교 분석 - 설계식의 개발 및 설계인자 도출 - scale-up 기준과 scale-up 인자 최종 결정 - 상업화 공정을 개발을 위한 종합적인 scale-up 전략 확립 - 단백다당체분리를 위한 전체적인 공정 확립했음(95%달성)
<p>[제 2 세부과제] 식이유도 비만/당뇨 실험동물모델에서 추출방법을 달리한 Inonotus obliquus 추출물 투여의 항비만/당뇨 효능 평가 및 생체 내 작용기전</p>	3T3-L1 preadipocyte의 분화 진행 정도 검증	- 세포 배양과 분화가 안정적으로 이루어짐(100% 달성)
	분화유도물질 첨가에 따른 지 방 축적 정도 검증	- 분화유도물질을 통한 3T3-L1 세포의 지방세포 로의 분화 재현성 안정적임(100% 달성) - 소량의 세포 추출물(0.1μg~100μg)에서 지방 축 적 정도 검증 방법 확립(100% 달성)
	비만/당뇨 지표 개선 효과 검 증	- RT-PCR을 이용하여 3T3-L1세포내 비만/당뇨 관련 지표 물질의 mRNA 발현 정도 검증 방법 확 립(100% 달성)
	비만/당뇨 모델 구축	- 고지방 식이로 비만 및 고혈당이 안정적으로 유 도됨(100% 달성)
	동물모델에서의 균사체 및 자 실체의 체내 지질 개선 효과 검증	- 고지방 식이로 비만 유도 군에서 체내 지질과 체지방 양이 유의적으로 증가하였으며 시료 처리 군에서 체내 지질개선과 체지방 감소 효과를 확인 하였음(100% 달성)
	동물모델에서 균사체 및 자실 체의 혈당 조절 기능 검증	- 고지방 식이로 고혈당이 유도되었으며 시료 처 리군에서 혈당 조절 기능 효과가 있었음(100% 달 성)

[본 연구 결과 pilot-scale 발효조에서 생산된 *Inonotus obliquus* 조다당체 시제품]



(*Inonotus obliquus* 조다당체 농축액)



(*Inonotus obliquus* 초미세분쇄후 군사체분말)

[본 연구 결과로 개발된 차가버섯음료에 붙일 라벨 디자인]



제 2 절. 대외 기여도

- 균사형성 고등균류인 *Inonotus obliquus* 균사체의 액상배양을 통한 수용성 단백다당체 생산공정의 산업화 기술은 생물 산업 관련 전 범위의 순수 및 응용기술을 포함하고 있다. 즉 원형질체 융합기술을 이용한 고생산성 균주의 개발, 통계적 방법을 도입한 저가의 산업용 복합배지 개발 기술, 고생산성 균주의 효율적 배양을 위한 대형 발효조 설계 및 운전기술, 회수되는 단백다당체의 친환경적인 고 순도 분리정제 기술, 산업적 대량생산을 위한 **scale-up** 기술 및 배양공정 자동화 기술까지도 포함되는 첨단 기술들이 서로 유기적으로 연관되어 있다. 본 연구과제 추진과 관련하여 약용 버섯 균사체 유래 유용물질의 대량생산에 필요한 대부분의 핵심요소기술들을 확보하였고, 유용물질을 경제적으로 대량생산하여 산업화할 수 있는 혁신적인 공정의 개발을 이루었다. 특히 돌연변이된 원형질체를 이용한 균주개발 연구는 버섯의 세포학적 특이성 때문에 연구가 미미한 상태이므로 유용 대사산물을 많이 생산하는 고등균류 연구개발에 크게 기여할 것이다. 따라서 본 연구를 통해 생물 산업의 다양한 관련 기술이 진일보한 매우 중요한 계기가 된 것으로 판단된다.
- 본 연구진에서 개발한 약용 담자균류인 *Inonotus obliquus* 균사체 유래 단백다당체 대량 생산 기술은 경제적 실익을 거둘 수 있는 공정으로 평가되어 버섯 유래 유용물질 생산의 모델이 될 것으로 판단되므로, 단지 고부가가치 기능성식품의 경제적 대량생산 기술의 확보 측면뿐만 아니라 첨단 생명공학 기술의 확립이라는 측면에서도 이정표가 되었다고 판단한다.
- 고등균류인 담자균류 유래 단백다당체의 국내 총 의약품시장은 년 150억원 규모이며 음료를 제외한 버섯 가공 기능성식품의 시장은 300억원 규모로, 본 연구를 통해 항 당뇨 효과가 탁월한 *Inonotus obliquus* 추출물인 수용성 단백다당체의 약리적 효능에 기초한 새로운 용도의 제품 개발은 기존제품에 비해 효능과 안전성이 뛰어난 신제품의 개발로 이어질 것이며, 이 제품에 대한 적정가격의 공급을 통하여 새로운 시장의 창출은 물론 기존시장의 확대도 가능할 것으로 판단된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- 산·학의 긴밀한 연구를 통해 *Inonotus obliquus* 고생산성 균주의 개발과 함께, 다단계 발효조 배양공정의 최종 단계인 pilot-scale 발효조에서 산업용 균주의 액상 배양 및 청정 분리정제 공정의 개발을 통해 세포외다당체 및 세포벽 단백질다당체의 시제품 생산이 성공적으로 수행되었다. 현재 개발된 여러 기술 중 5건에 대하여 한국특허를 출원 중에 있으며 나머지 기술 내용들도 국내·외에 특허출원할 예정이다.
- 앞으로도 산·학의 지속적인 공동연구를 통해 공장규모에서의 기술적인 know-how를 더욱 축적하고, 공장규모에서의 문제점을 산·학간의 유기적인 연구를 통해 효율적으로 해결함으로써, 보다 경제적인 조단백다당체 생산공정을 구축하여야 세계 시장에서 경쟁적 우위를 확보할 수 있을 것으로 판단된다.
- 본 연구과제 추진과 관련하여 약용 버섯 균사체 유래 유용물질의 대량생산에 필요한 대부분의 핵심요소기술들을 확보하였고, 유용물질을 경제적으로 대량생산하여 산업화할 수 있는 혁신적인 공정의 개발을 이루었다. 즉 본 연구과제의 성공으로 유용물질 함량이 증대된 버섯 균주의 개발과 유효성분의 생체이용을 등이 개선된 기능성식품의 생산이 본격적으로 이루어질 수 있을 것으로 판단되며, 이 경우 고부가가치의 고기능성식품의 개발을 통해 효능은 물론 충분한 가격경쟁력으로 수입대체효과를 가져올 수 있을 것이며, 수출품목으로도 성장할 수 있을 것으로 사료된다.
- 약용 담자균류인 *Inonotus obliquus* 배양균사체에서 추출한 다당체 함유 추출물은 당뇨치료 관련 건강보조식품의 개발 이외에도 면역증강, 만성퇴행성질환의 예방과 치료에 도움을 줄 수 있는 노인용 기능성식품의 개발이 기대되며, 항생제 대체 가축사료첨가제로의 개발도 기대되는 등 커다란 개발 가능성을 가지고 있다.

제 6 장 참고문헌

- Burczyk, J., A. Gawron., M. Slotwinska., B. Smietana, and K. Terminska 1996. Antimitotic activity of aqueous extract of *Inonotus obliquus*, *Bolle. Chim. Farm.* 135(5): 306–309.
- Chang, S.T. and Miles, P.G. 1996. Recent trends in world production of cultivated mushrooms. *The Mushroom Journal.* 503: 15–18.
- Cha, J. Y., B. S. Jeon, J. C. Moon, J. H. Yoo and Y. S. Cho. 2004. Cytotoxic effect of *Inonotus obliquus* composition in HCT-15 human colon cancer cells and AGS gastric cancer cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 33: 633–638.
- Cha, J. Y., B. S. Jeon, J. W. Park, J. C. Moon and Y. S. Cho. 2004. Effect of fermented compositions containing *Inonotus obliquus* with *Houttuynia cordata* on growth of human AGS gastric and HCT-15 colon cancer cells. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 47: 20.
- Cha, J. Y., B. S. Jeon, C. H. Lee, K. S. Yoo, J. S. Moon and Y. S. Cho. 2005. Hypoglycemic and antioxidative effects of fermented Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) on streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Life Sci.* 15: 809–818.
- Cha, J. Y., B. S. Jun, K. S. Yoo, J. R. Hahm and Y.S. Cho. 2006. Fermented Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) effects on hypolipidemia and hepatoprotection in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Food Sci. Biotechnol.* 15: 122–127.
- Cha, J. Y., B. S. Jun, J. W. Kim, S. H. Park, C. H. Lee and Y. S. Cho. 2006. Hypoglycemic effects of fermented Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) in the diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Food Sci. Biotechnol.* 15: 739–745.
- Cheong, J.Y., and Park, W.B. 1996. Conversion of water-insoluble components of the Basidiocarps of *Ganoderma lucidum* to water-soluble components by hydrolyzing with chitinase. *Arch. Pharm. Res.* 19(4): 326–334.
- Chi, J.H., Ha, T.M., Kim, Y.H. and Rho, Y.D. 1996. Studies on the main factors affecting the mycelial growth of *Phellinus linteus*. *Kor. J. Mycol.* 24(3): 214–222.
- Chi, J.H., Ha, T.M. and Kim, Y.H. 1998. Mycelial growth of *Phellinus linteus* with various sawdusts. *Kor. J. Mycol.* 26(1): 56–59.
- Chihara, G., Y. Maeda, Hamuro, T. Sasaki, and F. Fukuika. 1969. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes*(Berk.) Sing. *Nature* 222: 687–688.
- Chihara, G. and Maeda, Y.Y. 1971. Lentinan, a new immuno-accelerator of cell-mediated responses. *Nature.* 226: 634.
- Cho, S.M., Lee, J.H., Han, S.B., Kim, H.M., Yu, S.H., and Yoo, I.D. 1995. Immuno-stimulating polysaccharide from the fruiting bodies of *Fomitella fraxinea*(II). *Kor. J. Mycol.* 23(4): 340–347.

- Cui, Y.Q., J.M. van der Lans, K. Ch., and A.M. Luyben, 1998. Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 57(4): 309–419.
- Dnizot, F. D, and L. Rita. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 22: 271–277.
- Eyer. K., A. Oeggerli and E. Heinzle. 1995. On–line gas analysis in animal cell cultivation: II. Methods for oxygen uptake rate estimation and its application to controlled feeding of glutamine. *Biotechnology and Bioengineering*, 45: 54–62.
- Galasinski, W., J. Chlabicz., A. Paszkiewicz–Gadek., C. Marcinkiewicz, and A. Gindzienski 1996. The substances of plant origin that inhibit protein biosynthesis, *Acta Pol. Pharm.* 53(5): 311–318.
- Gbewonyo K., D. Dimasi, and B. C., Buckland, 1989. Characterization of oxygen transfer and power absorption of hydrofoil impellers in viscous mycelial fermentations. *Biotechnology process* 34: 128–133.
- Goh, E. L. K., R. J. Pircher and P. E. Lobie. 1998. Growth hormone promotion of tubulin polymerization stabilized the microtubule network and protects against colchicin–induced apoptosis. *Endocrinology* 139, 4364–4372.
- Ha, H.C., Park, S., Park, K.S., Lee, C.W., Jung, I.C., Kim, S.H., Kwon, Y.I., and Lee, J.S. 1995. Isolation and purification of protein–bound polysaccharides from the sawdust mycelia of *Agrocybe cylindracea*. *Kor. J. Mycol.* 23(2): 121–128.
- Ham, S. S., S. W. Oh, Y. K. Kim, K. S. Shin, K. Y. Chang and G. H. Chung. 2003. Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extract from the *Inonotus obliquus*. *J. Korean Soc.. Food Sci. Nutr.* 32, 1088–1094.
- Hwang, Y. J., G. W. Noh, and S. H. Kim 2003. Effect of *Inonotus obliquus* extracts on proliferation and caspase–3 activity in human gastro–intestinal cancer cell lines, *J. Korean Nutr. Soc.* 36(1): 18–30.
- Hwang, Y. J., H. K. Nam, M. J. Chang, G. W. Noh and S. H. Kim. 2003. Effect of *Lentinus edodes* and *Pleurotus eryngii* extracts on proliferation and apoptosis in human colon cancer cell lines, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32, 217–222.
- Ichimura, T., T. Otake., H. Mori, and S. Maruyama 1999. HIV–1 protease inhibition and anti–HIV effect of natural and synthetic water–soluble lignin–like substance, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63(12): 2202–2204.
- Ioannis, G.S., and M.N. Karim. 1998. Adaptive pole placement control algorithm for DO–control in β –lactamase production. *Biotechnology and Bioengineering*, 60(1) : 1–9.
- Jarosz, A., M. Skorska., J. Rzymowska., J. Kochmanska–Rdest, and E. Malarczyk 1990. Effect of the extracts from fungus *Inonotus obliquus* on catalase level on HeLa and

- nocardia cells, *Acta Biochim. Pol.* 37 (1): 149–151.
- Jung, H. 1998. Development of the medicines from mushrooms. *J. of Microbiol. and Technol.* 24(1): 30–41.
- Jung, I.C., Kim, S.H., Kwon, Y.I., Kim, S.Y., Lee, J.S., Park, S., Park, K.S. and Lee, J.S. 1997. Cultural condition for the Mycelial growth of *Phellinus igniarius* on chemically defined medium and grains. *Kor. J. Mycol.* 25(2): 133–142.
- Kahlos, K. 1994. Antifungal activity of cysteine, its effect on C-21 oxygenated lanosterol derivatives and other lipid in *Inonotus obliquus*, in vitro, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 3: 339–385.
- Kahlos, K. 1996. Preliminary test of antiviral activity of two *Inonotus obliquus* strains, *Fitoterapia* LXVII 4: 344–347.
- Kahlos, K., L. Kangas, and R. Hiltunen 1987. Antitumor activity of some compounds and fractions from an n-hexane extract of *Inonotus obliquus*, *Acta Pharm. Fen.* 96: 33–40.
- Kang, T.S., Lee, D.G. and Lee, S.Y. 1997. Isolation and mycelial cultivation submerged of *Phellinus* sp. *Kor. J. Mycol.* 25(4): 257–267.
- Kim, S. W. 1998. Studies on anti-microbial and anti-cancer function of polysaccharide extracted *Ganoderma lucidum*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27: 1183–1188.
- Kim, Y. O., S. B. Han, H. W. Lee., H. J. Ahn., Y. D. Yoon., J. K. Jung., H. M. Kim, and C. S. Shin 2005. Immuno-stimulating effect of the endo-polysaccharide produced by submerged culture of *Inonotus obliquus*, *Life Sci.* 77: 2438–2456.
- Kinoshita, G., Nakamura, F., and Maruyama, T. 1986. Immunological studies on polysaccharide fractions from crude drugs.
- Komatsu, N., S. Okubo, S. Kikumoto, K. Kimura, G. Saito, and S. Sasaki 1969. Host mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*, *Gann*, 60: 137–144.
- Kong, W.S., Kim, D.H., You, C.H., Kim, Y.H., Kim, K.S. and Kim, K.H. 1998. Identification of *Phellinus linteus* by comparison of colony shapes and using PCR techniques. *Kor. J. Mycol.* 26(4): 466–477.
- Lee, C.Y., Hong, O.P., Jung, M.J. and Han, Y.H. 1997. Effect of carbon sources and vitamins on mycelial growth of *Tricholoma matsutake* DGUM 26001. *Kor. J. Mycol.* 25(3): 226–232.
- Lee, J.H., Cho, S.M., Ko, K.S. and Yoo, I.D. 1995. Effect of cultural conditions on polysaccharide production and its monosaccharide composition in *Phellinus linteus* L13202. *Kor. J. Mycol.* 23(4): 325–331.
- Lee, J. H., S. M. Cho, K. S. Song, S. B. Han, H. M. Kim, N. D. Hong and I. D. Yoo. 1996. Immunostimulating activity and characterization of polysaccharides from mycelium of

- Phellius linteus*. *J. of Microbiol. Biotechnol.* 6 : 213–218.
- Lee, J. H. 1994. Anti-tumor and immuno-stimulating activity of fungal polysaccharides. *J. of Microbiol. Biotechnol.* 20(3) : 14–21.
- Lee, I. S. and A. Nishikawa. 2003. Polyzellus multiplex, a Korean wild mushroom, as a potent chemopreventive agent against stomach cancer. *Life Sci.* 73: 3225–3234.
- Li, X., J. Rong, M. Wu and X. Zeng. 2003. Anti-tumor effect of polysaccharide from *Grifola frondosa* and its influence on immunological function. *Zhong Yao Cai* 26: 31–32.
- Min, E.G., Chung, K.K. and Han, Y.H. 1998. Effect of complex nitrogen source on mycelial growth of *Tricholoma matsutake* DGUM 26001. *Kor. J. Mycol.* 26(3): 361–364.
- Misuno, T. 1990. Antitumor activity and some properties of water soluble polysaccharide from fruiting body of *Agaricus blazei* Murill, *Agric. Biol. Chem.* 54(11): 2889–2896.
- Mizuno, T., C. Zhuang, K. Abe, H. Okamoto, T. Kiho, S. Ukai, S. Leclerc and L. Meijer. 1999. Antitumor and hypohlycemic activities of polysaccharides from the Sclerotia and Mycelia of *Inonotus obliquus* (Pers.. Fe.) PII. (Aphyllorphomycetidae). *Int. J. Me*
- Mizuno, T., K. Minato, H. Ito, M. Kawade, H. Terai and H. Tsuchida. 1999. Antitumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* Murrill. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 47: 707–714.
- Ng, M. L. and A. T. Yap. 2002. Inhibition of human colon carcinoma development by lentinan from shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *J. Altern Complement Med.* 8: 581–589.
- Pamela, M. and P. Laura 2000 Beta-glucans in edible mushrooms, *Food Chem.* 68: 315–318.
- Park, K.S., and Lee, J.S. 1991. Optimization of media composition and culture conditions for the mycelial growth of *Coriolus versicolor* and *Lentinus edodes*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 6(1): 91–98.
- Park, K.S., Lee, J.Y., Lee, S.J., Kim, S.H., and Lee, J.S. 1992. Extraction and separation of protein-bound polysaccharide produced by *Coriolus versicolor* (Fr) Quel. *Kor. J. Mycol.* 20: 72–76.
- Park, K.S., Park, S., Jung, I. C., Ha, H.C., Kim, S.H., and Lee, J.S. 1994. Production of protein-bound polysaccharides by solid-state fermentation of *Coriolus versicolor*. *Kor. J. Mycol.* 22(2): 184–189.
- Park, W. M., KIM, G. H. and Hyeon, J. W. 1995. New synthetic medium for growth of mycelium of *Pleurotus* species. *Kor. J. Mycol.* 23(3): 275–283.
- Park, Y.D., Hong, Y.K., Whang, W.K., Huh, J.D., and Park, S. 1989. Comparisons of protein-bound polysaccharide contents obtained from mycelial cultured broth and fruit body of *Coriolus versicolor*. *Kor. J. Mycol.* 17(4): 223–228.
- Shin, Y. S., Y. Tamai, and M. Terazawa 2000. Chemical constituents of *Inonotus obliquus*.

- A new triterpene; 3 α -hydroxy-8, 24-dienlanosta-21, 23-lactone from sclerotium, *Eurasian J. Fore. Res.* 1: 43–50.
- Shivrina, A. N. 1967. Chemical characteristics of compounds extracted from *Inonotus obliquus*. *Chem. Abstr.* 66: 17271–17279.
- Song, C.H., Moon, H.Y. and Ryu, C.H. 1997. Artificial cultivation of *Phellinus linteus*. *Kor. J. Mycol.* 25(2): 130–132.
- Song, C.H., Ra, K.S., Yang, B.K. and Jeon, Y.J. 1998. Immuno-stimulating activity of *Phellinus linteus*. *Kor. J. Mycol.* 26(1): 86–90.
- Takashi, M., Z. Cun., A. Kuniaki., O. Hidehumi., K. Tadash., U. Shigeo., L. Sophie, and M. Laurent 1999. Antitumor and hypoglycemic activities of polysaccharides from the sclerotia and mycelia of *Inonotus obliquus* (Pers.:Fr.) Pil. (Aphyllorphomycetidae), *Int. J. Med. Mush.* 1: 301–316.
- Tshkagoshi, S. and F. Ohashi. 1974. Protein bound polysaccharide preparation, PSK, effective against mouse sarcoma-180 and ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann.* 65 : 557–558.
- Tucker, K. G. and Thomas, C. R. 1992. Mycelial Morphology: The effect of spore inoculum level. *Biotechnol. Letters.* 14(11): 1071–1074.
- Vardar, F. 1983. Problems of mass and momentum transfer in large fermentors. *Process Biochem.* 18: 21–23.
- Vlasta, M. G., B. Romano, and J. P. Gerwin 2001. Vibrational spectroscopic characterisation of wild growing mushrooms and toadstools. *Spectrochimica Acta Part A*, 57:2815–2829.
- Wasser, S. P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 258–274.
- Wecker, A. and U. Onken. 1991. Influence of dissolved oxygen concentration and shear rate on production of pullulan by *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol. Lett.* 13 : 155–160.
- Yang, B. K., Y. J. Jeon, S. C. Jeong, D. H. Kim, J. Y. Ha, J. W. Yun, D. H. Shon, G. I. Go, and C. H. Song. 1999. Hepatoprotective effect of exo-polysaccharide Produced from submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum* WK-003 by using industrial grade medium. *Kor. J. Mycol.* 27(1): 82–86.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.