

발간등록번호

11-1543000-002344-01

# 유전체 기반 유용버섯 유래 산업용 바이오소재 개발 최종보고서

2016. 08. 23. ~ 2018. 08. 22.

주관연구기관 / 세포활성연구소 (주)

협동연구기관 / 가천대학교, 인천대학교

농림축산식품부

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “유전체 기반 유용버섯 유래 산업용 바이오소재 개발” (개발기간 : 2016. 08. 23. ~ 2018. 08. 22.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 08. 31.

주관연구기관명 : (주) 세포활성연구소 (박동기) (인)  
제 1 협동연구기관명 : 가천대학교 산학협력단 (황보택근) (인)  
제 2 협동연구기관명 : 인천대학교 산학협력단 (옥우석) (인)

주관연구책임자 : 박 동 기  
협동연구책임자 : 박 태 식  
참여기관책임자 : 최 재 혁

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	916008-2	해 당 단 계 연 구 기 간	2017.08.23. - 2018.08.22	단 계 구 분	2차년도 최종 /2차년도
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	포스트게놈 다부처유전체 사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세 부 과 제 명	유전체 기반 발아대두 동충하초로부터 지방간 질환 개선바이오소재 개발			
연구책임자	박 동 기	해당단계 참여연구원 수	총: 16 명 내부: 16 명 외부:    명	해당단계 연구개발비	정부:160,000천원 민간:53,400천원 계:231,400천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 20 명 내부: 20 명 외부:    명	총 연구개발비	정부:320,000천원 민간:106,800천원 계:426,800천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)세포성연구소 가천대학교 산학협력단 인천대학교 산학협력단			참여기업명:	
국제공동연구 위탁연구	상대국명: 연구기관명:			상대국 연구기관명: 연구책임자:	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유					

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	화 합 물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호		(1) 10-2017-0140177 (2) 40-2018-120381									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

<p>요약</p> <p>1. 발아대두 동충하초 유용성분의 간기능 개선 효능을 간세포, 대식세포에서 검증하였고 비알코올성 지방간, 지방간 유래 간염, 간 섬유화 예방 및 치료 가능성을 검증</p> <p>2. 유전체 정보에 기반하여 유용성분 생산 기작 및 관련 유전자를 탐색하여 고부가가치바이오 소재를 생산에 기여함.</p> <p>3. 발아대두 동충하초의 배양·생산체계 확립 및 산업용 바이오소재 대량 생산 조건 확립을 통한 산업소재 응용 제품 개발</p>	<p>보고서 면수</p> <p>총 65면</p> <p>(양면, 최종결과보고서 55면 별첨 10면)</p>
---	--

**<요약문>**

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p><b>연구의 목적</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 발아대두 동충하초의 생산 기술 개발 및 기능성 분석을 통한 균사체/자실체의 응용기술 연구</li> <li>• 발아대두 동충하초 (<i>Cordyceps militaris</i> grown on germinated soybeans)의 NGS 기반 유전체 정보에 기반하여 유용성분을 탐색하여 발아대두 동충하초의 유용성분에 대한 간질환 치료 (비알코올성 지방간, 간섬유화, 간염)에 대한 기능성을 검증하여 간질환 개선 제품을 개발</li> </ul> <p><b>연구의 내용</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 발아대두 배양 동충하초균에 대한 배양 시간대별 전사체 서열 확보</li> <li>• 전사체 서열 분석을 통한 바이오 소재 생성 관련 유전자군 발굴</li> <li>• 발아대두 동충하초 유래 생리활성 물질 발굴 및 생리활성물질의 생산공정 표준화</li> <li>• 생리활성 소재의 간세포 지방 축적 저해, 대식세포 활성화 억제, 및 정상세포 활성화 억제 <i>in vitro</i> 활성 분석</li> <li>• 발아대두 동충하초 유래 바이오소재의 기능성 검증 및 안전성 평가</li> <li>• 생리활성물질의 제형화 연구</li> <li>• 균사체/자실체의 기능성 분석을 통한 식품 신소재 및 지방간 개선 시제품 개발</li> </ul>				
<p>연구 개발성과</p>	<p><b>사업화 성과목표</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 지식재산권 출원 4건</li> <li>• 자체기술이전 1건</li> <li>• 본 연구개발과제를 통해 생산된 제품 2건, 고용창출 1건</li> </ul> <p><b>연구기반 성과목표</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 학술성과 : SCI급 3건, 학술발표 12건</li> <li>• 인력양성 7건</li> </ul>				
<p>연구개발 성과의 활용계획 (기대 효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 비만 및 지방간 질환에 도움이 되는 유용 버섯 유래 기능성 물질의 효능 연구 분야에 유전체 및 함유 생리활성 소재 핵심 정보제공</li> <li>• 대사성질환 개선 연구의 인프라 구축을 통한 응용 BT 식·의약품산업의 활성화 및 경쟁력 확보</li> <li>• 유용버섯의 생리활성 연구기술 축적에 따른 특수목적 식·의약품 개발 기술의 축적과 유용물질 특허, 제조 특허를 통한 산업재산권 확보 가능</li> <li>• 신소재인 발아대두 동충하초로부터 신규물질 발굴과 발아대두 동충하초에 대한 효능 규명을 통해 다양한 제품생산에 활용할 계획이다. 산업체와 협의 중인 제품으로는 ① 지방간 개선, 혈중중성지방개선, 혈행개선 건강 기능성식품, ② 지방간 치료제, ③ 보조식품 등으로 사업화에 기여할 것임</li> </ul>				
<p>국문 핵심어</p>	<p>발아대두 동충하초</p>	<p>지방간</p>	<p>유전체</p>	<p>생리활성</p>	<p>바이오소재</p>



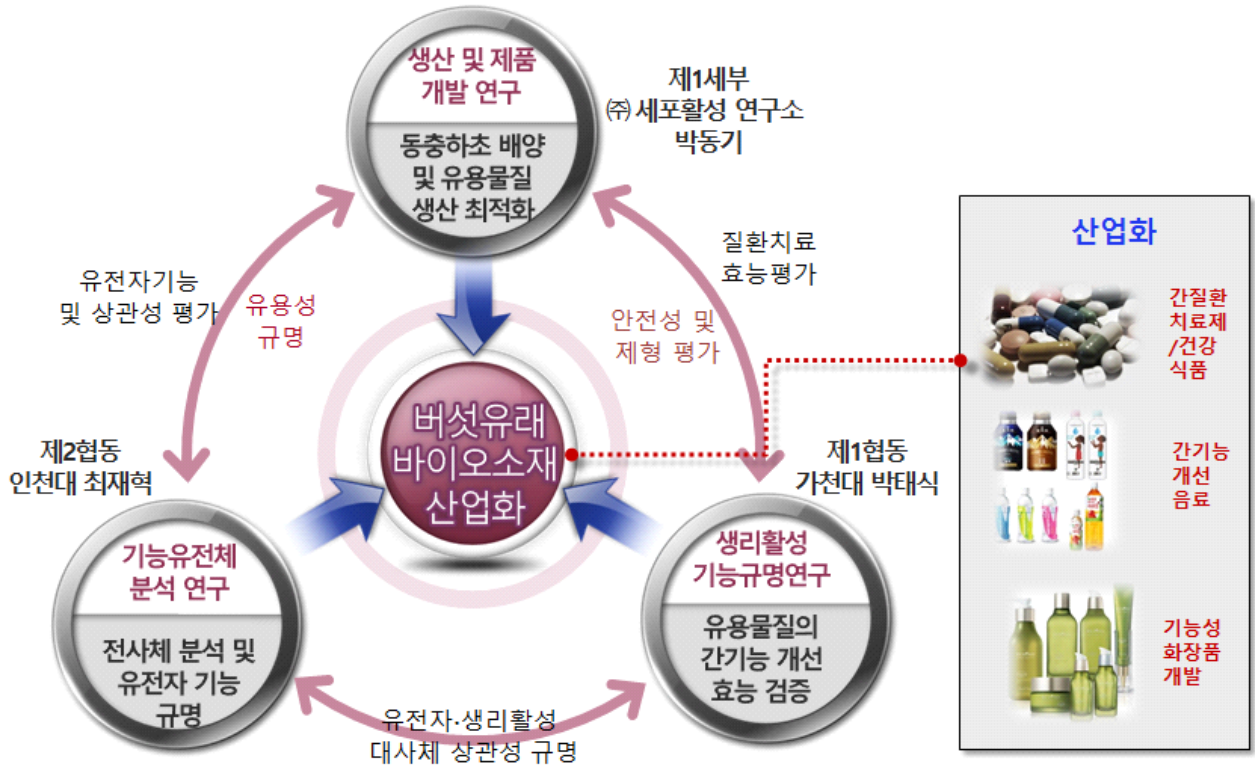
## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	5
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	16
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	45
4. 연구결과의 활용 계획 등 .....	54
붙임. 참고 문헌 .....	55
<별첨 1> 주관연구기관의 연구개발보고서 초록	
<별첨 2> 주관연구기관의 자체평가의견서	
<별첨 3> 주관연구기관의 연구결과 활용계획서	

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 개요

### 가. 개요



### 나. 버섯류의 유용성 및 유전체 연구 현황

- ✓ 버섯은 일반적으로 식용으로 대량 소비되며 국내 식용 버섯은 느타리버섯, 양송이버섯, 큰 느타리버섯 등 농산버섯과 표고버섯과 같은 임산 버섯으로 구분됨.
- ✓ 농산 버섯류는 국내 시장이 포화상태에 도달하였으며 포화물량의 해소를 위해 수출에 유리한 팽이버섯과 새송이버섯의 생산량이 늘고 있음.
- ✓ 2012년 국내 버섯 시장의 규모는 1조 2천억 원에 이르며 생산량도 20만 톤을 상회함.
- ✓ 쌀을 제외하고는 판매액이 가장 많은 주요 원예작물임.
- ✓ 2007년 이후부터는 수출량도 급격히 증가하여 400억 원 규모에 이르는 등 고도의 성장세를 이루며 국가의 중요한 수출산업으로 자리매김함.
- ✓ 국내 버섯 생산 규모가 전세계 버섯 생산량의 1%도 채 되지 않는다는 점을 고려할 때, 국가의 새로운 수출 효자 종목으로 부상할 가능성이 높음.
- ✓ 팽이버섯(*Flammulina velutipes*)의 전장 유전체 서열(whole genome sequencing)은 국립원예특작과학원을 중심으로 분석되어 공개되었으며 (Park et al. PLoS ONE 2014), 후속 비교 유전체 연구가 차세대바이오그린 사업으로 일부 진행되었음.
- ✓ 표고버섯(*Lentinula edodes*)의 전장 유전체 서열이 국립산림과학원을 중심으로 분석되어 2016년 공개되었음 (Shim et al. Journal of Biotechnology 2016).

- ✓ 느타리버섯, 새송이버섯, 동충하초, 송이버섯의 유전체도 생산균주를 대상으로 차세대바 이오그린 사업으로 진행되었으나 기능유전체, 비교유전체 연구는 아직 미비한 수준임.
- ✓ 양송이버섯(*Agaricus bisporus*)이 주로 소비되는 서구지역에서는 양송이버섯 위주로 식용버섯 유전체 서열 정보가 공개되었음 (Morin et al. Proc Natl Acad Sci USA 2012)
- ✓ 국내뿐만 아니라 국외에서도 산업적 가치에 비해 버섯 유전체 관련 기술은 아직 매우 미미하며 국외에서도 기능유전체(functional genomics) 연구는 시작 단계임.

#### 다. 버섯류의 유전체 연구 응용 가능성

- ✓ 주요 유용버섯의 전장 유전체는 해독되어 있지만, 이를 활용하기 위한 기능 유전체 및 비교 유전체(comparative genomics) 연구는 초기단계.
- ✓ 식용버섯의 경우 주로 야생종에 대한 유전체 연구가 수행되어 상업적 유통 품종과는 유전체 서열이 상이하여 이용에 한계.
- ✓ 교배, 유전지도, QTL mapping 등 전통기술과 표준 유전체(Reference genome)를 기반으로 하는 유전체 재분석(Re-sequencing)과 비교유전체 등 최신기술의 융합을 통하여, 병저항성, 수량성 등 상업적 생산 조건 관련 유전자를 효율적으로 동정하여 한 품종에서 여러 유용형질을 집적한 수퍼 품종의 개발을 목표로 하고 있음.
- ✓ 균류(Fungi)는 생태계에서 다양한 종류의 바이오매스를 효율적으로 분해하는 분해자(decomposer)의 기능하는 생물체로 이를 이용한 산업용 효소개발이 필요함.
- ✓ 전 세계적으로 30억 달러 규모, 매년 8% 성장률의 산업용 효소산업은 후방산업이 100-1,000배에 달하는 대표적인 바이오부품산업임.
- ✓ 균류의 유전체 내에는 다양한 종류의 분해합성효소(CAZyme, FOLyme 등)가 존재하므로 개발을 통한 고부가가치 생명산업 발전이 필요함.

#### 라. 국내외 경쟁사 현황

##### 라-1. 국내 경쟁사 기술 현황

- ✓ 세계 최초로 누에를 이용한 눈꽃동충하초 대량재배 성공하여 동충하초 자실체 형성기술은 국제 경쟁력에서 우위를 점하고 있으나, 동충하초의 기능성 제품의 대량 생산을 위한 약리작용, 기능성 평가, 안전성 평가 등 체계적이고 과학적인 연구가 미진함.
- ✓ 또한, 동충하초의 기능성 물질에 대한 연구가 부족하며, 문헌에 의존하고 있어 생리활성 물질 등에 관한 과학적인 판단 기준이 없어 기능성 연구에 대한 기술력 및 수준은 세계수준과 동일함.
- ✓ 동충하초의 안전성 평가와 시험방법은 비임상시험 관리기준(GLP)에 따라 국제적인 기준과 동일한 방법으로 수행하는 세계적인 수준이며 동충하초의 안전성 평가는 *Paecilomyces sinclairii*의 급성 경구독성과 13주 반복투여 독성에 관한 연구가 있음.
- ✓ 2013년 강원대학교와 한림대학교가 농림축산식품부 과제로 진행한 ‘번데기동충하초로부터 간기능 개선을 위한 기능성 소재 개발연구’에 따르면, 번데기 동충하초 균주인 EFCC 12448에서 형성된 자실체로부터 균주(CMWE)를 선발하였고, 이를 간경화를

유발한 수컷 Rat에 CMWE를 저농도와 고농도로 경구투여하여 간섬유화 억제효과를 확인하였음.

- ✓ CMWE가 thioacetamide에 의한 간손상을 억제하는 것으로 추정하였다. 또한 가장 많이 알려진 추출물 유래 항염증 치료제인 스티렌(Aa-EE)을 대조약물로 하여 간염치료 효과를 검증하였음.

## 라-2. 국외 경쟁사 기술 현황

- ✓ 중국에서는 동충하초가 인삼, 녹용과 함께 3대 한방약재로 이용되고 있으며 기술적 측면을 규명하기 위하여 동충하초에 관한 초창기 신종발표와 분류중심의 연구를 진행하고 있음.
- ✓ 이 연구를 바탕으로, 최근 박쥐나방동충하초(*Ophiocordyceps sinensis*)를 이용하여 성분분석 연구를 진행하였고 높은 항암 효과가 실증되었음.
- ✓ 성분분석은 균사체를 배양하여 이용하고 있으며, 박쥐나방동충하초는 아직 인공적으로 자실체를 형성시키는 기술이 완성되지 않은 상태이므로 자실체를 이용한 산업화는 초보 단계임.
- ✓ 중국과 브라질, 프랑스에서는 해충의 생물적 방제를 위한 동충하초가 연구 되었으며, 실제로 *Beauveria bassiana*의 포자를 대량으로 생산하여 pine caterpillar, cornborer, eriophidmites 등의 방제에 이용되고 있음.
- ✓ 스위스에서 박쥐나방동충하초(*O. sinensis*)를 이용하여 임상실험을 진행한 결과 마약중증중독자도 2주일 정도 복용하면 마약의 심각한 부작용을 완치할 뿐 아니라 유혹을 떨쳐 버리게 해 정상적인 사람으로 되돌려 줄 수 있다는 보고도 있음.
- ✓ 일본에서는 동충하초 연구가 많이 진행되어 Kobayasi(1993)에 의하여 동충하초 도감을 만들었고 생리활성에 대한 연구도 하였으며 ‘기적을 부르는 동충하초’ 라는 책이 나오기도 하였으나 동충하초를 이용한 산업적인 기술은 아직 초기단계에 있음.
- ✓ 미국의 USDA ARSEF에서는 곤충기생균에 대한 균주를 수집하고 있으며 Oregon State University에서 동충하초에 대한 연구를 본격적으로 진행하고 있다. 또한 박쥐나방동충하초(*O. sinensis*)를 이용하여 Ancient Healer로 tablet를 만들어 현재 판매하고 있음.



그림 1. 일본(기적을 부르는 동충하초 서적) 및 미국(Ancient Healer tablet)의 시판되는 동충하초 관련 제품

- ✓ 중국을 비롯한 여러 나라에서 동충하초를 채집하여 분류하여 보고하는 등의 기초적인 연구를 수행하였음.
- ✓ 산업적인 이용으로는 중국에서의 박쥐나방동충하초(*O. sinensis*)를 균사체 배양이 있으나, 자실체 형성 연구는 아직 하지 못하고 있음.
- ✓ 미국과 일본에서는 자실체 배양에는 성공하였으나 소규모 수준에서 재배하고 있으며 중국에서는 자실체를 한약제로 이용하고 있음.
- ✓ 국외의 동충하초 유전자원은 풍부하나 연구는 초보적인 수준으로 동충하초 균주의 다양성, 자실체의 형성, 대량생산 면에서는 한국이 우위에 있음.
- ✓ 동충하초 성분인 미리오신을 질환 랫트에 섭취시켰을 때 간의 지방적 축적이 감소되었음 (Kurek et al., Liver international 2014). 미리오신 유도체인 노바티스의 FTY720를 비만 마우스에 섭취하였을 때 간의 지방적 축적이 감소되었음을 발표하였음 (Rohrbach et al. FASEB Journal 2016. 온라인 게재).

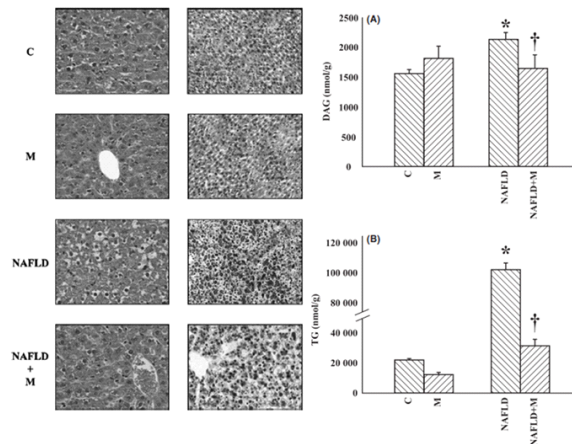


그림2. 지방간 모델 랫트에 미리오신 섭취 시 간 내 지방적의 감소

## 마. 국내외 지방간 질환 치료제 및 소재 현황

### 마-1. 국내 지방간 개선 치료제 현황

- ✓ 동아 ST의 경우 당뇨병 치료제인 DPP-4 저해제 슈가논 (에보그립틴)을 비알코올성 지방간염 치료제로 개발하기 위해 미국 토비라사와 글로벌 라이선싱 아웃 계약을 체결함.
- ✓ 휴온스는 후박추출물을 이용한 지방간 천연물 신약으로 지난해 임상2상 시험을 마쳤으며 임상 3상을 통해 오는 2017년 출시를 예정.
- ✓ 본 연구진은 유산균 발효를 이용한 새로운 식품소재인 발아대두 동충하초를 이용하여 지방간 및 면역기능개선 제품 개발 기술력은 독보적임.

### 마-2. 국외 비알코올성 지방간 개선 치료제 현황

- ✓ 비알코올성 지방간의 원인은 비만, 제2형 당뇨병, 고지혈증 등으로 알려지고 있으며 OECD의 비만 관련 통계를 참고로 했을 때 미국을 비롯한 거의 모든 나라에서 증가추세에 있으며 앞으로도 그 추세는 계속될 것으로 전망됨.
- ✓ 비알코올성지방간 치료제 시장도 지속적으로 증가하여 2017년에는 약 16억 달러 규모로 성장.

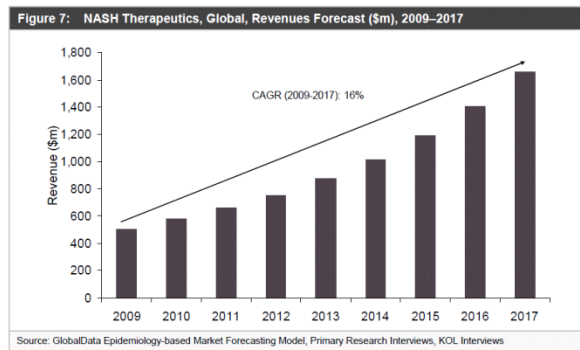


그림 3. 2009~2017년 세계 NASH 치료제 예상규모 (GlobalData)

- ✓ 따라서 동충하초 유래 소재를 활용한 간질환 예방 및 치료 식·의약품이 제품화되어 시장에 나온다면 명확한 치료제가 없는 현재 상황에서 기존 시장을 대체할 수 있을 것으로 예상됨.
- ✓ 현재까지 간질환 및 생리기능에 미치는 동충하초와 동충하초 유래 생리활성 소재의 영향과 관련된 연구들은 매우 적으며 이들의 결과도 관련 혈중 지질강하 효과 및 혈당 강하 효능을 평가한 관찰 연구결과들로서 동충하초에 의한 간질환 관련 기전연구는 아직 제시된 바 없음.

Strategy	Therapeutic Options
Gradual Weight Reduction	Balanced and healthy diet
	Increase physical activity
	Bariatric surgery (last resort)
	Avoid alcohol
	Avoid unnecessary medications
Insulin Sensitization	Metformin
	Rosiglitazone
	Proglitazone
Antioxidants	Vitamin E
	N-acetylcysteine
	Betaine
Hyperlipidemia/Dyslipidemia	Fibrates (gemfibrozil)
	Statins

Source: GlobalData, Joel Z. Stengel et. al.

그림4. 비알코올성 지방간 치료방법 및 치료제 (Global data)

- ✓ 비알코올성지방간 치료제 시장도 지속적으로 증가하여 2017년에는 약 16억 달러 규모로 성장할 것으로 전망됨.
- ✓ 길리어드 사이언스는 비알코올성 치료제인 Acetyl CoA carboxylase 저해제인 NDI-010976을 개발하고 있는 넘버스 아폴로 (Nimbus Apollo)를 최근 인수하기로 결정하였으며 이외에도 4개의 치료제를 독자 개발하고 있음.

- ✓ 머크는 비알코올성 지방간 치료신약 NGM282의 임상시험을 수행하고 있는 미국의 신생 바이오기업 NGM에 5000억원을 투자함.
- ✓ 비알코올성 지방간 치료제의 시장규모가 수십조원에 달하는 만큼 치료제가 나올 경우 상당한 파급력을 가질 것으로 예상됨.

## ✓ 1-2. 연구개발의 필요성

### 가. 동충하초의 생리활성

- ✓ 동충하초는 중국, 일본 등지에서 일찍이 불로장생의 비약으로 알려져 있고, 이를 이용하여 아편해독제, 병후 보양 및 강장제, 폐병 치료제, 면역증가제 등으로 가치를 인정받고 있음.
- ✓ 국외에서는 일찍부터 미래의 식량자원으로서 균류에 대한 관심이 집중되면서 특히 동충하초균과 같은 고등 진균류에 대한 연구는 기초적인 연구뿐만 아니라 이를 이용하여 식품, 향진균제 의약품 및 천연농약제제로서 상품화 연구가 진행 중에 있음.
- ✓ 국내에서는 번데기동충하초(*Cordyceps militaris*)와 눈꽃동충하초(누에동충하초, *Paecilomyces tenupis*)를 번데기나 누에에서 인공배양에 성공하여 실용화되고 있으며, 최근 암, 뇌졸중, 심장병과 같은 성인병에 대한 예방 및 개선효과가 발견되어 무한한 잠재력을 가진 소재로 주목받고 있음.
- ✓ 동충하초에서 유래된 미리오신(myriocin), 코디세핀(Cordycepin), 다당체 등의 각종 생리활성 성분이 B cell 활성화증가, 마크로파지 탐식능 활성화, 동맥경화, 당뇨병, 심근병증, 녹내장 등에 관여하여 질환치료효능이 뛰어난이 보고되고 있음.
- ✓ 번데기동충하초의 주성분이기도 한 quinicacid의 이성체인 Cordycepin은 항균,항암작용이 있는 것으로 밝혀짐.
- ✓ 자실체에서 militarin이라는 물질이 정제되어 cordycepin보다 항암효과가 더 뛰어나다고 알려져 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 최근 국내에서도 많은 관심을 가지게 됨.
- ✓ 그러나 보고된 300여종 중에서 연구에 걸림돌이 되고 있는 인공 자실체의 형성 연구와 이를 이용한 생리활성의 규명 연구는 실험실 수준에서는 시행되고 있으나, 동충하초 버섯의 대량 배양생산 및 제약 또는 신물질을 위한 생리활성 물질의 정제, 구조 확인 등이 현실적으로 필요한 분야임.







- ✓ 생리활성 물질 생산에 관련되는 세포의 대사기전을 이해 하기 위해서 유전체 정보에 기반한 방법이 효과적임.
- ✓ 최근 차세대 염기서열 해독방법 (NGS, next generation sequencing)을 이용한 유전체 분석 기술의 급속한 발전이 이루어져 각 생물체의 전장 유전체 서열 (whole genome sequence) 및 전사체 (transcriptome)에 대한 생물정보학적 분석을 통한 새로운 유전자의 발견(annotation)과 기능 규명이 빠른 속도로 이루어지고 있음.
- ✓ 여전히 다양한 생체의 유전체 서열분석이 요구되며 유전체 분석에 의한 유전자 기능 규명 및 유용성 탐색이 필요한 상황임. 특히 영양 조건과 배양 조건의 변화에 따른 유전체 수준의 반응 등에 대해서는 거의 알려진 바가 없으며 산업적 유용성을 가진 버섯 유래 균주의 심화 유전체 분석이 필요한 상황임.
- ✓ *C. militaris* 균의 경우 2011년에 중국 연구자들에 의해서 NGS 기술에 기반한 전장 유전체 서열 정보가 공개됨 (도표 1) (Zheng et al. Genome Biology 2011).

도표 1. 동충하초균 유전체의 특징

Genome features	<i>C. militaris</i>
Size (Mb)	32.2
Coverage (fold)	147×
Percentage G+C content	51.4
Percentage repeat rate	3.04
Protein-coding genes	9,684
Gene density (genes per Mb)	257
Exons per gene	3
Percentage secreted proteins	16.2
tRNA	136
Pseudogenes	102
NCBI accession	AEVU00000000

- ✓ 이 연구 및 다른 연구에서 자실체 (fruiting body)를 만드는 조건에서의 전사체 분석도 공개되어 있어(Yin et al. PLoS ONE 2012) NGS를 활용하여 실험할 수 있는 기술적 여건은 충분히 마련되어 있다고 여겨짐 (그림 6).

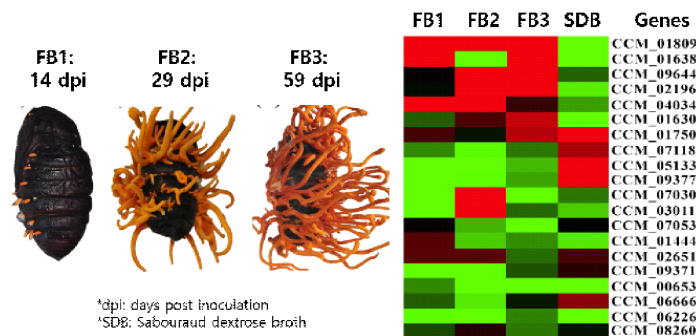


그림 6. NGS를 이용한 동충하초균의 자실체 형성에 따른 전사체 분석

- ✓ 발아대두에서 키운 동충하초균에 대한 대사체 분석이 본 연구진에 의해서 수행되었다 (Choi et al. J. Agric. Food Chem 2010). 이 연구에서 발아대두 자체와

동충하초균을 키운 발아대두에 대해서 80% 메탄올 추출물을 가지고 liquid chromatography(LC) 및 gas chromatography(GC) 기술을 이용하여 비교 분석된 바 있음 (그림 7).

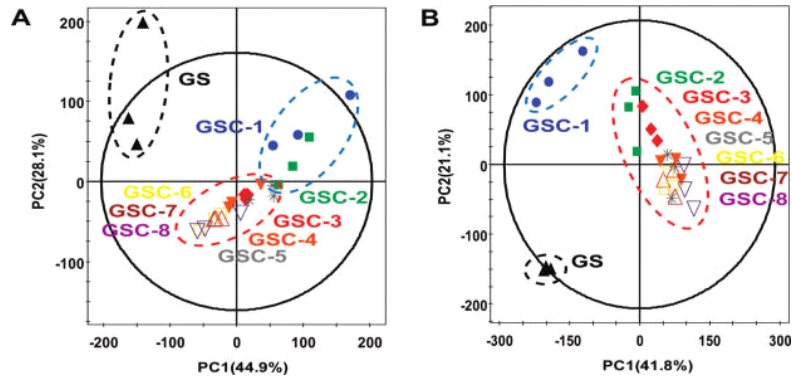


그림 7. LC-MS (A) 및 GC-MS를 이용한 대사체 분석에 대한 principle component 분석 결과

- ✓ 연구결과를 통해 대두에서 많이 발견되는 isoflavone aglycones뿐 아니라 새로운 종류의 isoflavone aglycone 유도체들이 동충하초균을 키운 발아대두에서 크게 늘어나는 것으로 나타남(그림 8). 이 새로운 유도체들은 기존의 발아대두에는 존재하지 않는 것으로 알려진 물질들임.

Table 2. Significantly Different Metabolites between GS and GSCs Identified by LC-MS

no.	$t_R$ (min)	$[M - H]^-$ ( $m/z$ )	$MS^n$ fragment ions ( $m/z$ )	tentative identification	ref
1	17.08	429	429, 252 $\gg$ 223191, 169	compound 1	
2	17.42	459	459, 283 $\gg$ 249, 175	compound 2	
3	18.92	445	445, 268 $\gg$ 240, 223, 211, 195, 179, 167	compound 3	
4	19.76	445	445, 269 $\gg$ 240, 223, 211, 195, 179, 167	compound 4	
5	20.85	253	253 $\gg$ 223, 209, 197, 167, 135	daidzein	(29) <sup>a</sup> -(32)
6	21.14	473	473, 268 $\gg$ 240, 223, 211, 195, 179	genistein O-hexoside acetylated	(29) <sup>a</sup> -(32)
7	22.82	957	957 $\gg$ 895, 795, 733, 597, 525, 457	soyasaponin Bd	standard <sup>b</sup>
8	23.78	269	269 $\gg$ 225, 213, 201, 181, 169, 133, 107	genistein	(29) <sup>a</sup> -(32)
9	28.53	912	912 $\gg$ 849, 703, 615, 525, 457	soyasaponin Bc(II)	standard

<sup>a</sup> Identified by an in-house library. <sup>b</sup> Identified by direct comparison with standard.

그림 8. 발아대두(GS)와 동충하초를 키운 발아대두(GSC)에서 큰 차이를 보이는 대표적 성분들

- ✓ 발아대두와 함께 배양할 때 발아대두에 끼치는 동충하초균의 영향이 무엇인지, 어떤 생리적인 과정들이 세포 내에서 진행되어 새로운 물질을 만들 수 있는지에 대한 구체적인 정보는 아직 밝혀지지 않았음.
- ✓ 기존의 번데기와 발아대두의 차이 같은 영양 및 배양 조건의 차이에 따라서 동충하초균의 세포 내에서 생기는 유전체 수준의 변화는 무엇인지에 대해서도 아직 곰팡이에서 조사되지 않았음.
- ✓ 이 과제에서 계획하고 있는 전사체 연구는 유용한 물질 생산에 영향을 주는 유용 유전자들을 찾아내고 그 기능을 규명하는데 있어서 결정적인 역할을 할 것으로 예상함.
- ✓ 특히 이미 분석된 바 있는 대사체 정보는 전사체의 결과를 해석하는데 중요한 기초 자료가 될 것으로 보임.
- ✓ 따라서 산업적으로 유용성을 갖는 버섯인 동충하초균에 대한 생물적 이해를 위해 심도 깊은 유전체 연구가 요청됨.

**라. 비알코올성 지방간에 대한 동충하초의 효능**

- ✓ 동충하초의 기능성과 질환 치료효과에 대한 연구결과가 B cell 활성화증가, 마크로파지 탐식능 활성화, 동맥경화, 당뇨병, 심근병증, 녹내장에 대해 제시되어 왔음.
- ✓ 생물학적 유용성이 많은 동충하초의 유효 성분은 따른 질환 개선 기능은 제시된 바 있으나 아직 비알코올성 지방간(non-alcoholic hepatosteatosis)-간염증(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)-간섬유화 (fibrosis)-간경화 (cirrhosis)-간세포암 (hepatocellular carcinoma, HCC)으로 이어지는 간질환의 경우 아직 그 유효성이 검증되지 않았음.
- ✓ 비알코올성지방간병 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)의 가장 초기 단계인 지방간의 경우 병리학적 변화는 없으나 성인의 25%가 간에 지방의 축적이 발생하고 있는 것으로 알려져 있으며, 비만한 성인의 20%와 과체중 성인의 5%가 간염증으로 발전한 것으로 알려져 있음.
- ✓ 비알코올성 지방간에 대해서는 명확히 의약품 등록절차를 밟은 약물이 없기 때문에 지방축적의 원인과 관련있다고 여겨지는 인슐린 내성 치료 약물 (글리타존 류), 콜레스테롤의 축적을 억제할 수 있는 약물 (스타틴 계열) 등이 질환, 당뇨, 또는 고지혈증, 비만에 따라 처방되고 있는 실정임.

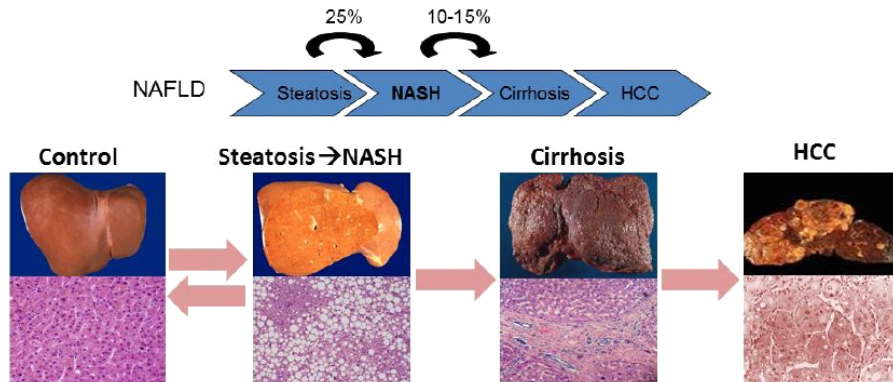


그림 9. 비알코올성 지방간 발생에 따른 간의 병리학적 변화

- ✓ 비알코올성 지방간의 원인은 비만, 제2형 당뇨병, 고지혈증 등으로 알려지고 있으며 OECD의 비만 관련 통계를 참고로 했을 때 미국을 비롯한 거의 모든 나라에서 증가추세에 있으며 앞으로도 그 추세는 계속될 것으로 전망됨. 비알코올성지방간 치료제 시장도 지속적으로 증가하여 2017년에는 약 16억 달러 규모로 성장할 것으로 전망됨(국외 비알코올성 지방간 개선 치료제 현황 그림 3).
- ✓ 따라서 동충하초 유래 소재를 활용한 간질환 예방 및 치료 식·의약품이 제품화되어 시장에 나온다면 명확한 치료제가 없는 현재 상황에서 기존 시장을 대체할 수 있을 것으로 예상됨.
- ✓ 현재까지 간질환 및 생리기능에 미치는 동충하초와 동충하초 유래 생리활성 소재의 영

향과 관련된 연구들은 매우 적으며 이들의 결과도 관련 혈중 지질강하 효과 및 혈당 강하 효능을 평가한 관찰 연구결과들로서 동충하초에 의한 간질환 관련 기전연구는 아직 제시된 바 없음.

- ✓ 따라서 본 연구는 발아대두에서 배양한 동충하초에 대한 유전체학적 비교 분석을 통한 바이오소재 발굴 및 개발을 수행하고자 하며 간질환을 대상으로 동충하초 유래 바이오소재의 생리활성 분석을 수행하여 기능성과 안전성을 평가하는 한편 산업화할 수 있는 제품개발을 수행하고자 함.

### 1-3. 연구개발 범위

- ✓ 발아대두 동충하초 생리활성 소재의 마우스 유래 간세포 독성 분석 (추출물 3종)
- ✓ 발아대두 동충하초 생리활성 소재의 간세포 지방산 산화 활성화를 통한 지방적 축적 저해능 분석
- ✓ 지방산 산화 유전자인 PPAR $\alpha$ , CPT1, ACOX1의 mRNA 발현 및 단백질 발현 분석
- ✓ 발아대두 동충하초 발효를 통한 추출물 획득
- ✓ 발아와 동충하초 배양에 따른 항산화 활성 측정
- ✓ 발아대두와 동충하초의 분리 방법 탐색
- ✓ 발아대두 고체배지에서의 배양: 발아대두의 분쇄에 따른 성장 비교 및 발아대두의 대두 표면 노출 여부 결정
- ✓ 선발된 배지에서 배양시간에 따른 균사체 확보 및 RNA 추출
- ✓ RNA-seq 수행

## 2. 연구수행 내용 및 결과

### 2-1. 주관기관 : (주) 세포활성연구소

#### ■ 간기능 개선이 있는 발아대두 동충하초 소재의 생산공정 최적화

- ✓ 지금까지 대두를 발아시킨 발아대두에 동충하초 종균을 접종하여 발아대두 동충하초를 대량으로 생산할 수 있는 대량생산 체계를 구축했음. 금번 연구 수행을 통해 지방간의 개선에 효과가 뛰어난 것으로 밝혀진 발아대두를 제시된 매뉴얼에 따라 가천대학에서 실험을 통해 대량 생산 체계를 구축하였음.
- ✓ 식품의 체내 이용율을 높이는 것이 영양학적, 생리학적으로 매우 중요하다. 이용율을 높이는 방법 중의 하나가 추출물을 이용하는 것인데, 이 방법은 체내에 필요한 유효성분을 완전히 추출할 수 없고, 추출과정 중 loss분이나 경제적 고비용이 수반된다. 반면, 일반적인 추출공법에 비해 소재의 소화 흡수율을 높이는 방법은 발효공법이다. 이는 유효성분을 최대한으로 이용할 수 있을 뿐만 아니라 매우 경제적인 방법이다.
- ✓ 즉, 발효과정은 이용효율을 높이고 비용은 낮춰줄 수 있는 방법이고, 발효과정 중 유효성분이 배가 되는 것이 확인되어 금번 연구에서는 이 방법을 선택하게 되었다.
- ✓ 소재의 다양화를 위해 유산균 고상발효와 액상발효를 실시하였음. 액상발효는 지방간 개선의 음료를 비롯한 화장품 등 다양한 용도로 활용할 수 있는 가능성이 있고, 고상발효 소재는 지방간 개선의 제품으로써 과립이나 환제를 만드는데 적합한 소재임.

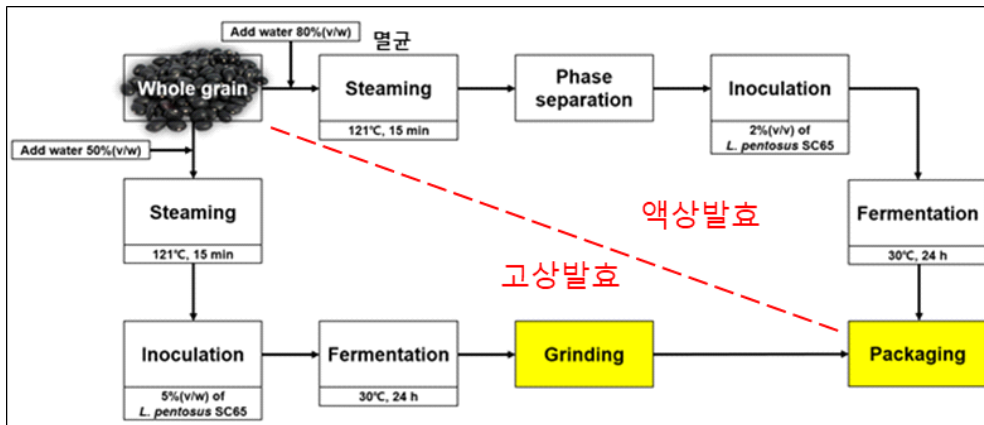


그림 10. 발아대두 발효 공정도

- ✓ 원료 생산공정 표준화 및 동충하초 엑기스(추출물) 제조 최적조건 확립: 동일한 생리 효능을 갖는 발아대두 동충하초의 생산공정 표준화를 위해 그림10와 같이 건조, 추출단계에서 유효성분이 파괴되지 않는 온도, 시간을 확립 및 자동화 프로그램을 이용하여 원료 생산공정을 표준화.
- ✓ 생산된 시제품에 대하여 소비자의 기호도, 품질의 안전성 등 시제품의 특성을 분석하고, 단위공정의 최적화 조건 설정, 생산 설비 및 방식 등을 결정하여 생산 진행 중임.



그림 11. 발효통과 대형 발효기기

- ✓ 발아대두 동충하초 유산균 발효 scale-up 구축
  - 유산균 seed culture : 유산균 균주를 37°C, 24hour incubation
  - 발아곡류 배지 제작 : 발아곡류별 최적 원물 농도에 맞춰 121°C, 15min 고압증기멸균 후 사용함.
  - Scale-up culture : scale-up을 위해 발효곡류 멸균액의 볼륨을 40-100배 높여 유산균 seed culture를 접종한 후 37°C, 24hour incubation 배양을 진행함.

- ✓ 발아대두 동충하초 발효추출물 품질관리
  - 발효추출물의 생균수 측정: 발아대두 발효추출물을 십진희석법을 이용하여 agar plate에 접종한 후 37°C, 24hour incubation 배양한 후 생균수를 측정함.
    - BCP 첨가 평판측정용 한천 배지 (plate count agar with bromocresol purple) 식품공전에서 발효유 또는 유산균 음료 중의 유산균수 측정용으로 규정하고 있는 배지로서, 평판측정용 한천 배지에 브롬크레졸퍼플(bromocresol purple, BCP)을 0.004~0.006 % 첨가한 배지임. bromocresol purple이 pH 5.2에서 노랑을, pH 6.8에서 보라색을 나타내는 원리를 이용하여, 배양 후 나타 난황색집락을 유산균집락으로 계측함.
  - 품질관리 기준 : 식품공전 프로바이오틱스 최종제품 요건에 의하면 일일섭취량 8-10 log CFU/mL 이상임. (건강기능식품공전 > II. 개별 기준 및 규격 > II..2 기능성원료 > II.2.5 발효미생물 > II.2.5.1 프로바이오틱스)

## ■ 발아대두 동충하초를 소재로 한 건강기능성식품개발 및 제품화

### 1. '간바라'

- ✓ 제품명 : 간바라
- ✓ 제품유형 : 건강기능식품
- ✓ 특허 출원 번호 : 40-2018-120381
- ✓ 고상발효 발아서목태 동충하초에 고시형 기능성 소재인 밀크씨슬을 첨가하여 간 건강에



도움을 줄 수 있는 건강기능성식품을 개발하였음.



## 2. '발아대두 동충하초 침출차'

- ✓ 제품명 : 발아대두 동충하초
- ✓ 특허 출원 번호 : 10-2017-0140177
- ✓ 간기능 개선 효능을 나타낸 발아서목대 동충하초 발효추출물을 차로 개발하여 침출차로 제조 및 판매하려함.
- ✓ 발아대두 동충하초 소재의 제품화를 위한 케이스 및 디자인 구축

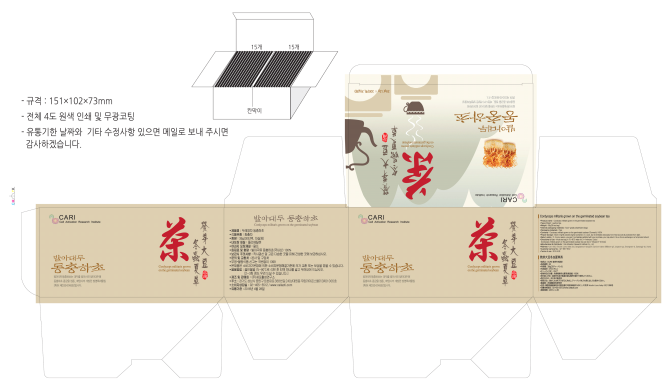


그림 12. 발아대두 동충하초 30포 단품 박스 디자인

\*제품명 : 두레명차 동충하초  
 \*식품명 : 침출차  
 \*중량 : 24g(20티백)  
 \*내용장 재질 : 폴리에틸렌  
 \*여과지 포장재질 : 펄프  
 \*원재료 및 함량 : 발아국류 동충하초(국내산) 100%  
 \*보관시 주의사항  
 \*직사광선 및 고온 다습한 곳을 피해 건강한 곳에 보관하십시오.  
 \*문어 및 교환처 : 본사 및 구입처  
 \*부정 불량식품 신고는 국번없이 1399  
 \*본 제품은 소비자 기본법에 의한 소비자 분쟁해결 기준에 의거 교환 또는 보상을 받을 수 있습니다.  
 \*음용방법  
 \*끓인 물을 75-80°C 로 식힌 후 티백 하나를 넣고 우려내어 드십시오. [2-3회 정도 우려 드실 수 있습니다]  
 \*제조 및 판매업 : (주)세포활성연구소  
 \*주소 : 경기도 성남시 중원구 둔촌대로 388번길 24 1006호  
 \*소비자상담실 : 031-720-5440/www.cellacti.com  
 \*유통기한 : 20xx년 xx월 xx일

\*Product name : Cordyceps militaris grown in the germinated soybean tea  
 \*Type of food : leached tea  
 \*Weight : 24g(20 tea bags)  
 \*Internal packaging materials : food-grade polyethylene bags  
 \*Packaging materials : Pulp  
 \*Contents : Cordyceps militaris grown on the germinated soybean (Domestic) 100%  
 \*Prepar storage  
 \*Store in tightly closed original container, in a cool, dry & ventilated area away from heat sources & protected from light.  
 \*Return policy : If, for any reason, you aren't completely satisfied with your purchase, you may return it to us for an exchange or a full product refund.  
 \*Directions to Use  
 \*Infuse tea bag in 70-80°C water for 3-4 minutes. Enjoy!  
 \*(Cordyceps militaris grown on the germinated soybean Tea can be re-infused 2-3 times)  
 \*Manufacturer & Distributor : Cell Activation Research Institute Co., Ltd  
 \*Address : (Headquarter) 24 Duncheon-daero 388beon-gil, Jungwon-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Korea  
 \*Customer service No. : (031) 720-5440  
 \*Terms of use : xx.xx. xx.xx

\*商品名 : DURE 銘茶冬虫夏草  
 \*商品類型 : 茶  
 \*内容量 : 24g(20ティーバック)  
 \*内包装材 : ポリエチレン  
 \*ティーバック材 : パルプ  
 \*原材料及び含量 : 発芽穀類冬虫夏草(韓国産) 100%  
 \*取扱い方法 : 直射日光及び高温多湿な場所を避けて保管してください。  
 \*取り合わせ : 本社及び販売所  
 \*摂取方法  
 \*沸かした水を75-80°Cに冷まし、ティーバックを入れ煎じ出してお飲みください。  
 \*製造院 : (株)細胞活性化研究所  
 \*住所 : 韓国京畿道城南市中院區道村大路388番ギル24、1006号  
 \*消費者相談室 : 82-31-720-5440/www.cellacti.com  
 \*賞味期限 : 20xx. xx. xx

그림 13. 박스 표기 사항 (한글, 영문, 중국어 버전)



그림 14. 최종 제품 사진 ‘ 발아대두 동충하초’ 및 배포용 홍보물

### 3. 현재 개발 중인 기능성 식품

- ✓ 액상발효 발아서목태 동충하초에 간 해독 기능에 뛰어난 미나리, 하수오, 추출물등을 배합하여 음료수 개발 중에 있음.
- ✓ 기타 부원료로서 발효선식을 비롯한 발모영양제 4HGF에 활용되고 있으며, 액상발효물은 화장품원료에 참가되고 있음.

## ■ 기술적 성과

### 1. 선진국 대비 기술수준, 국산화율

- ✓ 천연물을 이용한 지방간 개선 소재 생산은 국내외적으로 처음임.

### 2. 국내 경쟁사 기술 현황

- ✓ 세계 최초로 누에를 이용한 눈꽃동충하초 대량재배 성공하여 동충하초 자실체 형성기술은 국제 경쟁력에서 우위를 점하고 있으나, 동충하초의 기능성 제품의 대량 생산을 위한 약리작용, 기능성 평가, 안전성 평가 등 체계적이고 과학적인 연구가 미진함. 또한, 동충하초의 기능성 물질에 대한 연구가 부족하며, 문헌에 의존하고 있어 생리활성 물질 등에 관한 과학적인 판단 기준이 없어 기능성 연구에 대한 기술력 및 수준은 세계수준과 동일함.
- ✓ 국내 관련 연구 현황
  - (1) 동충하초의 안전성 평가와 시험방법은 비임상시험 관리기준(GLP)에 따라 국제적인 기준과 동일한 방법으로 수행하는 세계적인 수준이며 동충하초의 안전성 평가는 *Paecilomyces sinclairii*의 급성 경구독성과 13주 반복투여 독성에 관한 연구가 있음.
  - (2) 2013년 강원대학교와 한림대학교가 농림축산식품부 과제로 진행한 ‘번데기동충하초로부터 간기능 개선을 위한 기능성 소재 개발연구’에 따르면, 번데기 동충하초 균주인 EFCC 12448에서 형성된 자실체로부터 균주(CMWE)를 선발하였고, 이를 간경화를 유발한 수컷 Rat에 CMWE를 저농도와 고농도로 경구투여하여 간섬유화 억제효과를 확인하였음.



(3) CMWE가 thioacetamide에 의한 간손상을 억제하는 것으로 추정하였다. 또한 가장 많이 알려진 추출물 유래 항염증 치료제인 스티렌(Aa-EE)을 대조약물로 하여 간염치료 효과를 검증하였음.

### 3. 국외 경쟁사 기술 현황

- ✓ 중국에서는 동충하초가 인삼, 녹용과 함께 3대 한방약재로 이용되고 있으며 기술적 측면을 규명하기 위하여 동충하초에 관한 초창기 신종발표와 분류중심의 연구를 진행하고 있음. 이 연구를 바탕으로, 최근 박쥐나방동충하초(*Ophiocordyceps sinensis*)를 이용하여 성분분석 연구를 진행하였고 높은 항암 효과가 실증되었음.
- ✓ 성분분석은 균사체를 배양하여 이용하고 있으며, 박쥐나방동충하초는 아직 인공적으로 자실체를 형성시키는 기술이 완성되지 않은 상태이므로 자실체를 이용한 산업화는 초보 단계임.
- ✓ 중국과 브라질, 프랑스에서는 해충의 생물적 방제를 위한 동충하초가 연구 되었으며, 실제로 *Beauveria bassiana*의 포자를 대량으로 생산하여 pine caterpillar, cornborer, eriophidmites 등의 방제에 이용되고 있음.
- ✓ 스위스에서 박쥐나방동충하초(*O. sinensis*)를 이용하여 임상실험을 진행한 결과 마약중증중독자도 2주일 정도 복용하면 마약의 심각한 부작용을 완치할 뿐 아니라 유혹을 떨쳐 버리게 해 정상적인 사람으로 되돌려 줄 수 있다는 보고도 있음.
- ✓ 일본에서는 동충하초 연구가 많이 진행되어 Kobayasi(1993)에 의하여 동충하초 도감을 만들었고 생리활성에 대한 연구도 하였으며 ‘기적을 부르는 동충하초’ 라는 책이 나오기도 하였으나 동충하초를 이용한 산업적인 기술은 아직 초기단계에 있음.
- ✓ 미국의 USDA ARSEF에서는 곤충기생균에 대한 균주를 수집하고 있으며 Oregon State University에서 동충하초에 대한 연구를 본격적으로 진행하고 있다. 또한 박쥐나방동충하초(*O. sinensis*)를 이용하여 Ancient Healer로 tablet를 만들어 현재 판매하고 있음.



그림 15. 일본(기적을 부르는 동충하초 서적) 및 미국(Ancient Healer tablet)의 시판되는 동충하초 관련 제품

- ✓ 중국을 비롯한 여러 나라에서 동충하초를 채집하여 분류하여 보고하는 등의 기초적인 연구를 수행하였음.

- ✓ 산업적인 이용으로는 중국에서의 박쥐나방동충하초(*O. sinensis*)를 균사체 배양이 있으나, 자실체 형성 연구는 아직 하지 못하고 있음.
- ✓ 미국과 일본에서는 자실체 배양에는 성공하였으나 소규모 수준에서 재배하고 있으며 중국에서는 자실체를 한약제로 이용하고 있음.
- ✓ 국외의 동충하초 유전자원은 풍부하나 연구는 초보적인 수준으로 동충하초 균주의 다양성, 자실체의 형성, 대량생산 면에서는 한국이 우위에 있음.
- ✓ 동충하초 성분인 미리오신을 질환 랫트에 섭취시켰을 때 간의 지방적 축적이 감소되었음 (Kurek et al., Liver international 2014). 미리오신 유도체인 노바티스의 FTY720를 비만 마우스에 섭취하였을 때 간의 지방적 축적이 감소되었음을 발표하였음 (Rohrback et al. FASEB Journal 2016. 온라인 게재).

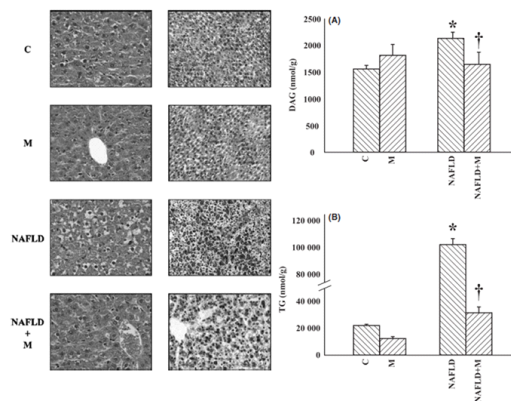


그림 16. 지방간 모델 랫트에 미리오신 섭취 시 간 내 지방적의 감소

### 3. 국내 지방간 개선 치료제 현황

- ✓ 동아 ST의 경우 당뇨병 치료제인 DPP-4 저해제 슈가는 (에보그립틴)을 비알코올성 지방간염 치료제로 개발하기 위해 미국 토비라사와 글로벌 라이선싱 아웃 계약을 체결함.
- ✓ 휴온스는 후박추출물을 이용한 지방간 천연물 신약으로 지난해 임상2상 시험을 마쳤으며 임상 3상을 통해 오는 2017년 출시를 예정.
- ✓ 본 연구진은 유산균 발효를 이용한 새로운 식품소재인 발아서목태 동충하초를 이용하여 지방간 및 면역기능개선 제품 개발 기술력은 독보적임.

### 4. 국외 지방간 개선 치료제 현황

- ✓ 비알코올성 지방간의 원인은 비만, 제2형 당뇨병, 고지혈증 등으로 알려지고 있으며 OECD의 비만 관련 통계를 참고로 했을 때 미국을 비롯한 거의 모든 나라에서 증가추세에 있으며 앞으로도 그 추세는 계속될 것으로 전망됨.
- ✓ 비알코올성지방간 치료제 시장도 지속적으로 증가하여 2017년에는 약 16억 달러 규모로 성장.

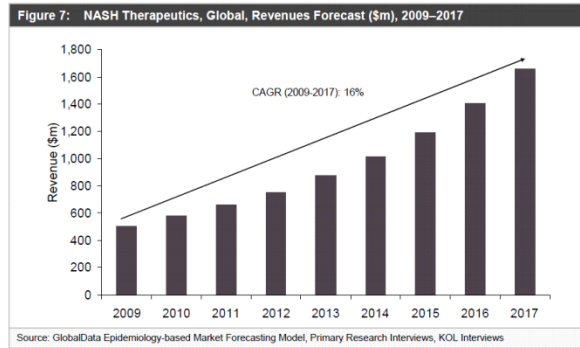


그림 17. 009~2017년 세계 NASH 치료제 예상규모 (GlobalData)

- ✓ 따라서 동충하초 유래 소재를 활용한 간질환 예방 및 치료 식·의약품이 제품화되어 시장에 나온다면 명확한 치료제가 없는 현재 상황에서 기존 시장을 대체할 수 있을 것으로 예상된다.
- ✓ 현재까지 간질환 및 생리기능에 미치는 동충하초와 동충하초 유래 생리활성 소재의 영향과 관련된 연구들은 매우 적으며 이들의 결과도 관련 혈중 지질강하 효과 및 혈당 강하 효능을 평가한 관찰 연구결과들로서 동충하초에 의한 간질환 관련 기전연구는 아직 제시된 바 없음.

Strategy	Therapeutic Options
Gradual Weight Reduction	Balanced and healthy diet Increase physical activity Bariatric surgery (last resort) Avoid alcohol Avoid unnecessary medications
Insulin Sensitization	Metformin Rosiglitazone Pioglitazone
Antioxidants	Vitamin E N-acetylcysteine Betaine
Hyperlipidemia/Dyslipidemia	Fibrates (gemfibrozil) Statins

Source: GlobalData, Joel Z. Stengel et. al.

그림 18. 비알코올성 지방간 치료방법 및 치료제 (Global data)

- ✓ 비알코올성지방간 치료제 시장도 지속적으로 증가하여 2017년에는 약 16억 달러 규모로 성장할 것으로 전망됨.
- ✓ 길리어드 사이언스는 비알코올성 치료제인 Acetyl CoA carboxylase 저해제인 NDI-010976을 개발하고 있는 님버스 아폴로 (Nimbus Apollo)를 최근 인수하기로 결정하였으며 이외에도 4개의 치료제를 독자 개발하고 있음.
- ✓ 머크는 비알코올성 지방간 치료신약 NGM282의 임상시험을 수행하고 있는 미국의 신생 바이오기업 NGM에 5000억원을 투자함.
- ✓ 비알코올성 지방간 치료제의 시장규모가 수십조원에 달하는 만큼 치료제가 나올 경우 상당한 파급력을 가질 것으로 예상된다.

■ 사업화성과 및 매출실적 (경제적 성과)

1. 사업화 성과

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2016 - 2018(2년)			
	소요예산(백만원)	426			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		-	15	35	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	-	10	25
국외		-	3	10	
향후 관련기술, 제품을 응용한 다 모델, 제품 개발계획		- 간기능개선 기능성식품 및 음료개발 - 알레르기 개선 및 화장품 개발			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	-	5	10	
	수 출	-	10	25	

2. 사업화 계획 및 매출 실적

- ✓ 사업화 방향 1) 개발된 소재를 신규 소재로서 국내외 식품 및 화장품, 의약품 소재를 공급하여 활용하는 방법. : 국내는 물론 중국과 일본에 협의를 진행함.
- ✓ 사업화 방향 2) 금번 밝혀진 지방간에 효과를 나타내어 제약화하며 신규 제품을 보급하는 방법.

항목	세부항목		성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	- 억원
			향후 3년간 매출	10 억원
		관련제품	개발후 현재까지	- 억원
			향후 3년간 매출	10 억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : - % 국외 : - %
			향후 3년간 매출	국내 : 10 % 국외 : 3 %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : - % 국외 : - %
			향후 3년간 매출	국내 : 10 % 국외 : 3 %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		10 위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		1 위

3. 발아서목태 동충하초를 이용한 제품

- ✓ 현재 발아서목태 동충하초를 이용한 제품의 경우, 차의 형태로 출시되어져 판매되어지고 있고, 발아서목태 동충하초 분말 및 과립의 형태로 해외 수출 (홍콩 수출)이 이루어지고 있음.

- ✓ 가천대학교와 협동연구를 통해서 본 소재가 지방간에 특이하게 효능을 나타내는 것이 밝혀짐으로써 지방간에 대한 천연 신약개발의 가능성을 높여줌.
- ✓ 본 신규 소재는 지방간 개선 제품뿐만 아니라 면역력증강, 항알레르기 등 다양한 효능 연구 및 제품 개발의 계기를 마련하였으며, 신규 유전체 연구결과를 통해서 발아대두 동충하초의 생산성과 품질 개선에 도움이 될 것으로 기대됨.

#### 4. 본 연구를 통해 개발된 신소재 발아서목태 동충하초

- ✓ 신규 배양 기술을 활용하여 발아서목태 동충하초를 생산하였고 금번 연구에서는 유전체 분석을 통해 유효성분인 Cordycepin의 함량이 동충하초 버섯 종균 배양을 통해 증가 되는 것을 발견하였음. 특히 발효과정에서 증가됨이 확인되어 소재 및 원료의 부가가치를 높였으며, upgrade된 신소재가 산업화에 도움을 줄 것으로 기대됨.
- ✓ 기존의 곤충을 이용한 동충하초의 경우, 풍미가 좋지 않아 제품화에 어려움이 있어 상용화에 한계가 있음. 본 발아서목태 동충하초의 경우, 풍미가 좋을 뿐만 아니라 콩에서 유래된 isoflavone 유도체를 비롯한 다양한 유효성분이 검출되어 기 곤충을 이용한 동충하초에 비해 부가가치가 높고, 활용도가 높음.
- ✓ 현미배양 동충하초에 비해 콩에 배양할 경우, 콩에서 유래된 isoflavone을 비롯해 peptide, 단쇄 지방산 (short chain fatty acid) 등의 성분이 생성되어 현미배양 동충하초보다 월등한 부가가치를 갖게 된다.
- ✓ 또한, 본 액상발효물의 특이한 향미와 효능이 입증되어 신소재로서 그 활용도가 기대되고, 액상발효물을 활용하여 음료개발 및 화장품개발 등 다양한 제품개발에도 활용할 수 있을 것을 기대됨.

#### 5. 시장점유율(%) 및 매출액증대

- ✓ 본 제품의 시장 확대를 겨냥하여 김천시에 새로운 식품 제조 공장을 가동 중에 있으며, 금년 하반기 본격적인 생산 목표로 시설 및 설비를 보완 중에 있음.
- ✓ 본 제품의 판도를 확대하기 위해 중국 ‘흑룡강성 과학기술유관공사’ 와 판매 및 현지 생산을 위한 MOU를 맺고, 계약차 2018.08.29.-2018.08.31. 까지 방문 중에 있음.
- ✓ 따라서, 앞으로 향후 5년 이내에 시장점유율이 국내외적으로 5-25%이상 성장하고, 년 매출 최소 30억 원이상으로 예상하고 있음.

## 2-2. 제 1 협동연구기관 (가천대학교 산학협력단) : 연구책임자 박태식

### ■ 생리활성 소재의 간세포 지방 축적 저해 *in vitro* 활성 분석

#### ✓ 동충하초 젖산균 발효 및 추출

- 발아대두 (GSC) 동충하초를 유산균 발효 공정도를 나타내었음. 본 연구에서는 발아서목태 동충하초 유산균 발효에 대한 최적 균주로 선정된 *Pediococcus pentosaceus* ON89A, SC11, ON188 3종을 이용하여 발효를 수행하였음. 고상발효 시 사용되는 배양액인 액상발효 원물 제조 시에는 4% (w/v)의 원물이 사용되었으며 최적 발효 시간은 24시간, 최적 발효 온도는 37°C로 설정되었음. 고상발효에 사용되는 원물의 경우 발효에 적합한 상태로 만들어주기 위하여 40% (v/w)의 수분이 요구되었고 최적 발효시간은 48시간, 최적 발효온도는 액상발효와 동일한 37°C, 최적 균주 접종량은 20% (v/w)으로 최적화할 수 있었음. 발효물은 80% 에탄올에 상온에서 24시간 동안 추출하였으며 추출물은 냉동 건조하여 추가실험에 사용하였음. 수행한 발효 공정은 그림 19와 같음

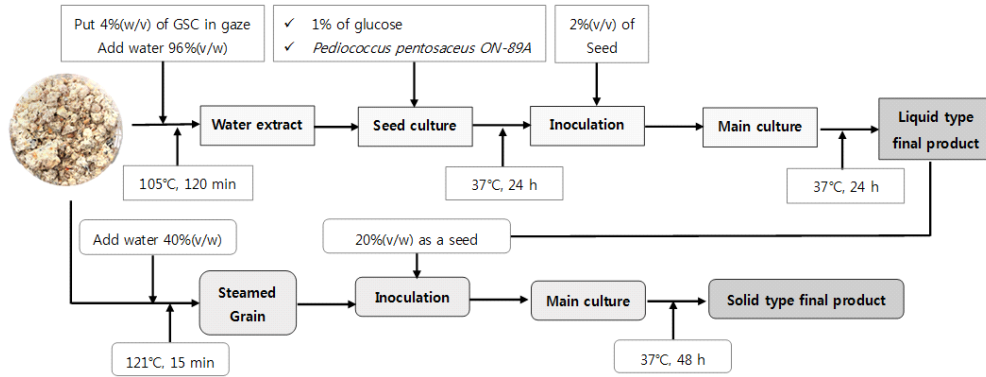


그림 19. 발아대두 동충하초 유산균 발효 공정도

#### ✓ 동충하초 발효 추출물의 세포생존률 (세포 독성) 측정

- 96 well plate의 well 하나당  $5 \times 10^3$ 개의 AML-12 간세포를 overnight 배양한 후 24시간 동안 다양한 농도의 추출물을 처리함. 세포생존률 측정을 위해서 세포에 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 처리한 후, 형성된 crystalized formazan을 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 녹이고 595 nm에서의 흡광도를 microplate reader로 측정함. 흡광도 값은 control과 비교하여 percent viability로 표시하였음.
- 발효 추출물을 각각 24시간 처리 후 세포생존율을 관찰하였을 때 *C. militaris*와 GSC에서는 세포독성이  $100 \mu\text{g/ml}$ 까지 나타나지 않았으나 ON89A, SC11, ON188 발효 추출물을 처리하였을 때  $50 \mu\text{g/ml}$ 와  $100 \mu\text{g/ml}$ 에서 약간의 생존 감소가 발견되었음. 그러나 아주 미약한 정도여서 실험에 영향을 미칠만큼의 정도는 아닌 것으로 판단되었음 (그림 20).

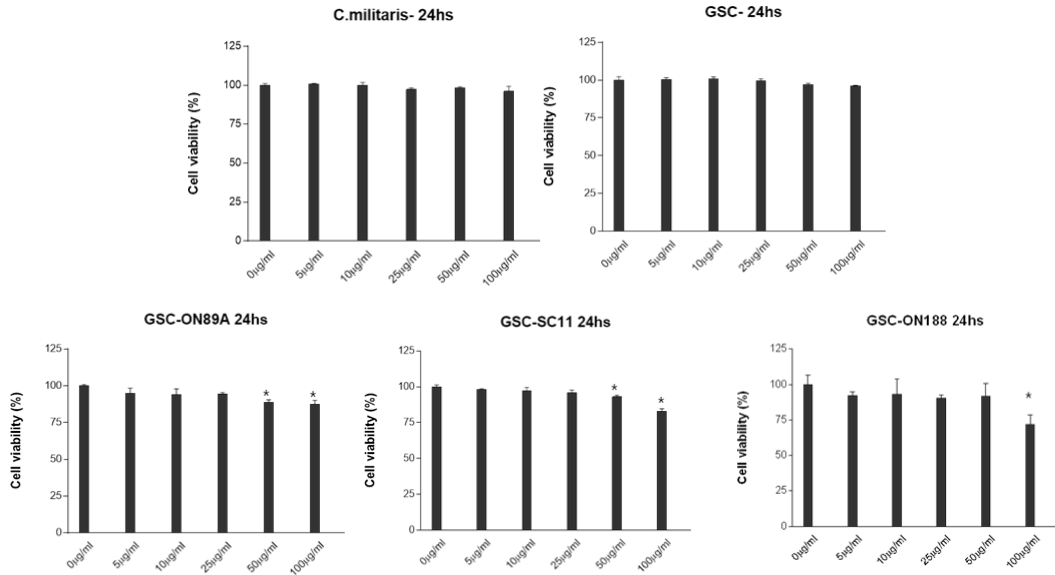
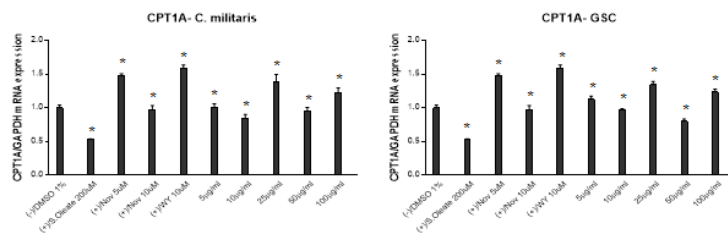


그림 20. AML-12 간세포에서 발아대두 동충하초 추출물 24시간 배양후 세포 생존율.

✓ 지방산 처리시 지방축적 관련 유전자 발현 측정

- Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)을 이용한 mRNA 측정: 실험한 세포에서 Trizol을 이용하여 RNA를 추출하였고 total RNA는 정량 후, reverse transcription kit를 이용하여 cDNA로 합성함. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)은 SYBR green quantitative RT-PCR kit (Takara, Japan)을 이용하여 상대정량함.
- 지방간의 상태를 모사하기 위해 AML-12 간세포에 200 μM Oleic acid를 처리하고 지방산 산화 유전자 mRNA를 정량하였음. 이때 양성 대조군으로서 PPARα agonist인 WY14653 화합물을 사용하였으며 sphingosine 1-phosphate (S1P)의 영향을 조사하기 위해 S1P lyase 저해제인 Novartis 화합물을 처리하였음. 이때 C. militaris와 GSC 추출물에 의한 발현은 변화하지 않았으나 ON89A, SC11, ON188 발효추출물 처리에 의해 지방산 유전자인 carbamoyl palmityltransferase-1 (CPT-1)의 발현이 현저히 증가하였음 (그림 21). 특히 ON188에 의한 발현변화가 5배 이상 증가하여 가장 발현증가폭이 높음을 확인하였음.
- 또한 Peroxisome proliferating activator receptor alpha (PPARα)의 발현증가가 SC11과 ON188에 의해 현저히 발견되었음 (그림 22). PPARα의 경우에도 ON188에 의한 발현 증가가 가장 현저하였음. 반면 acyl CoA oxidase1 (ACOX1)의 변화는 일어나지 않았음 (그림 23).





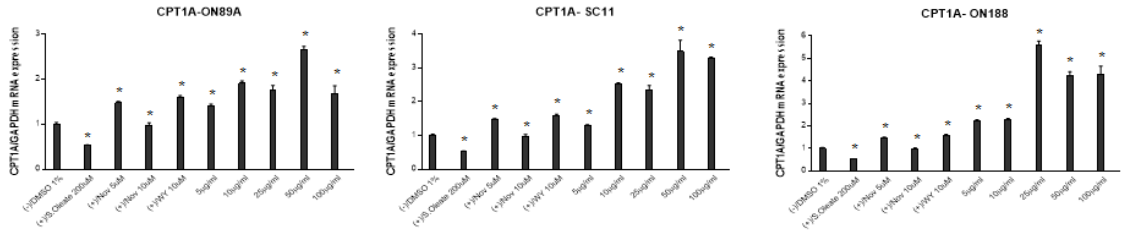


그림 21. 발아대두 동충하초 추출물에 의한 CPT1A의 발현변화.

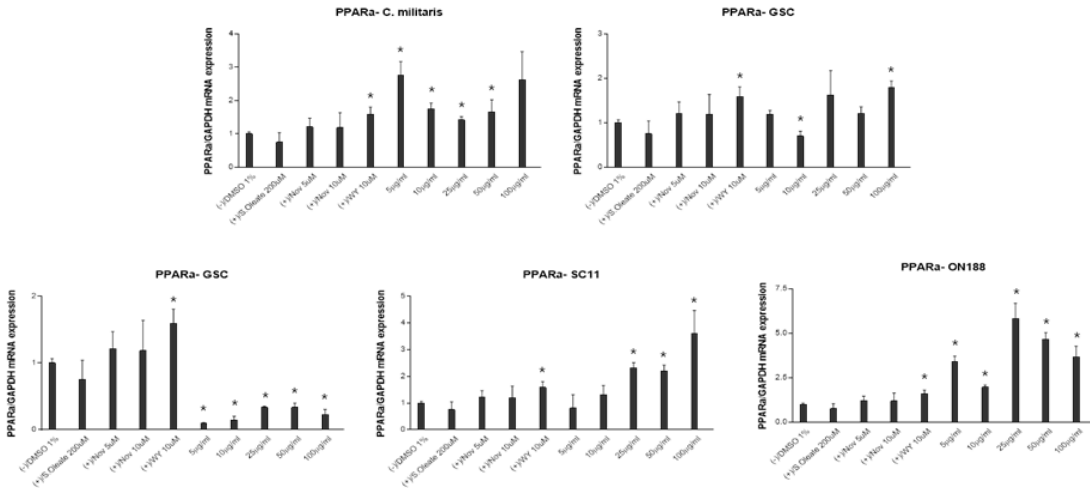


그림 22. 발아대두 동충하초 추출물에 의한 PPAR $\alpha$ 의 발현변화.

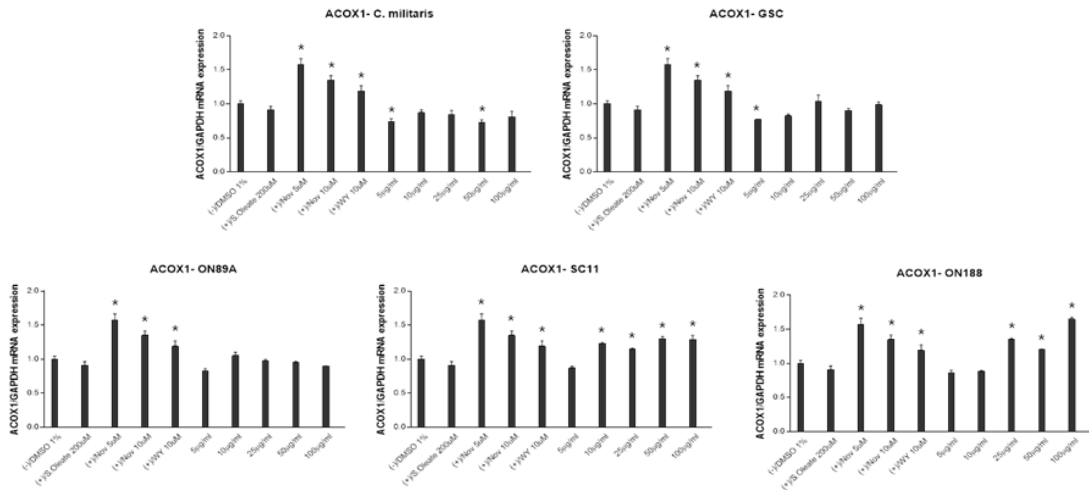


그림 23. 발아대두 동충하초 추출물에 의한 ACOX1의 발현변화.

- Western blot을 이용한 단백질 변화 측정 : AML12 간세포를 발아대두 동충하초 추출물인 SC11과 ON188으로 24 시간 처리한 후 지방산 산화단백질의 발현변화를 측정하였음. 이 두종의 추출물을 선택한 이유는 가장 유전자 변화를 많이 일으킨 부분이었기 때문임. CPT1의 경우 농도 의존적으로 단백질 발현이 증가되는 것을 발견하였음. 반면 ACOX1의 변화는 관찰되지 않았고 PPAR $\alpha$ 의 경우도 mRNA의 증가와는 달리 관찰되지 않았음 (그림 24). 따라서 mRNA의 증가 결과와 일치하게 CPT1A의 경우 단백질 발현도 증가함을 관찰하였음.



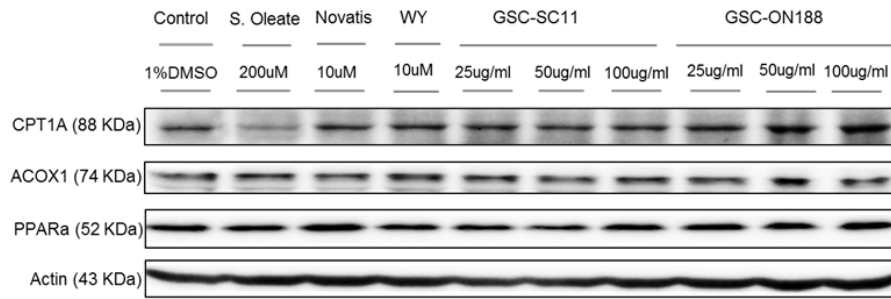


그림 24. 발아대두 동충하초 지방산 산화 단백질의 발현 변화

✓ 지방축적 억제 효과 측정으로 지방간 발병 저해 효능 검증

- Oil Red O 염색을 통한 지방축적 검증 : 지방산인 oleic acid로 간세포를 처리할 경우 중성지방 축적이 세포 내에서 유도되어 지방적 (lipid droplet)이 증가하게 됨. 200  $\mu$  M의 oleic acid를 6시간 처리한 후 각 발아대두 동충하초 추출물을 처리했을 때 SC11과 ON188에 의해 지방적이 감소하는 것을 관찰하였음 (그림 25). 양성대조군인 PPAR $\alpha$  활성화제인 WY-14653의 처리하였을 때 지방적의 감소만큼 감소하는 것으로 보아 SC11과 ON188은 유전자 변화에서 나타난 결과대로 지방산 산화가 활성화되는 것으로 판단됨. 반면 S1P lyase 저해제인 Novartis 화합물은 지방적의 감소가 일어나지 않았음.

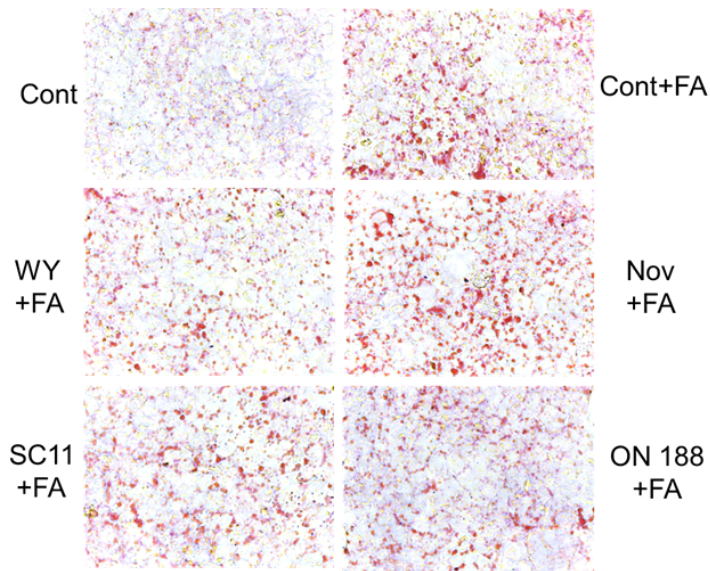


그림 25. AML12 간세포에서 발아대두 동충하초 추출물의 지방적 변화 효능 측정을 위한 oil red O 염색

✓ 지방산 무처리 시 지방산 산화 유전자 변화 측정

- PPAR $\alpha$ 의 리간드인 지방산 oleic acid 처리 시 PPAR $\alpha$ 가 활성화되어 지방산산화가 증가할 수 있음. 이상의 결과에 따라 효능이 있는 것으로 선택된 SC11과 ON188에 집중하여 지방산 처리 없이 발효 추출물에 의한 효과를 관찰하고자 하였음. 그림 26와 같이 양성 대조군인 PPAR $\alpha$  활성화제 WY-14653을 처리하였을 때 CPT1A, PPAR $\alpha$ , SPHK2의 발현이 증가되었으며 이러한 발현증가 현상은 SC11 또는 ON188을 처

리하였을 때에도 나타났음 (그림 26). 그리고 발현 증가의 정도는 ON188에서 더 높이나타남. 이 결과에서 지방산 처리에 상관없이 SC11과 ON188은 지방산 산화 유전자 mRNA의 발현을 증가시킨다는 사실을 보여주고 있음

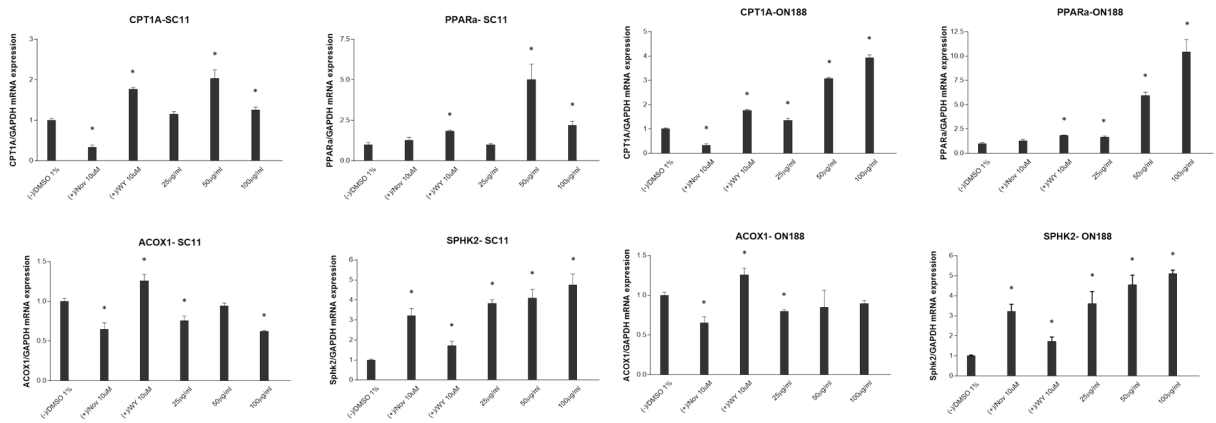


그림 26. 지방산 무처리 시 지방산 유전자의 mRNA 발현 변화

- mRNA 발현증가 결과에 기초하여 단백질 발현변화를 immunoblotting analysis로 분석하였음. 그림 10, 11에서 보여주듯이 대두발아 동충하초 추출물 SC11과 ON188을 처리하였을 때 지방산 산화 유전자인 CPT1A와 PPARα, SPHK2의 단백질 발현 증가가 관찰되었음. 이 경향은 ON188에서 더 명확한 증가가 관찰되었음 (그림 27, 28). 이러한 결과는 ON188 발효추출물이 가장 효과적으로 지방산 유전자 발현 증가에 기여하고 있음을 제시하고 있음. 이 결과에 기초하여 동물실험을 수행하고 있으며 차년도에 결과를 도출할 수 있을 것으로 예상함.

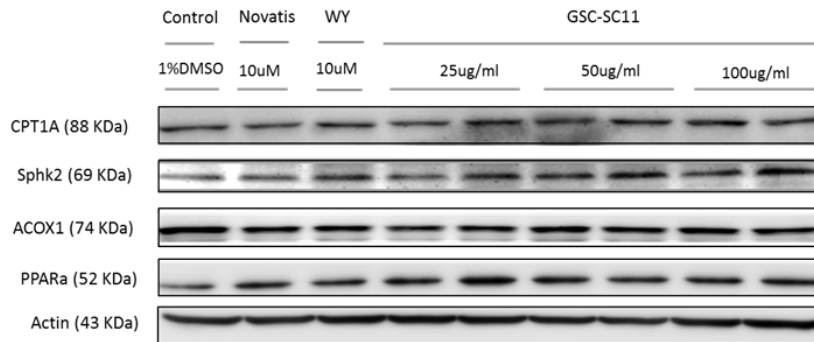


그림 27. 대두발아 동충하초 추출물 SC11에 의한 산화유전자 단백질 발현변화

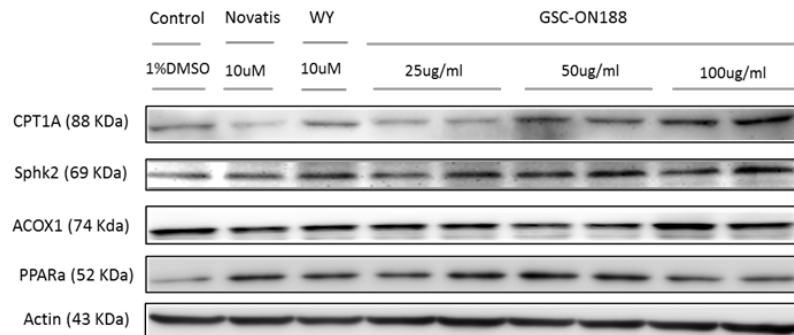





그림 28. 대두발아 동충하초 추출물 SC11에 의한 산화유전자 단백질 발현변화

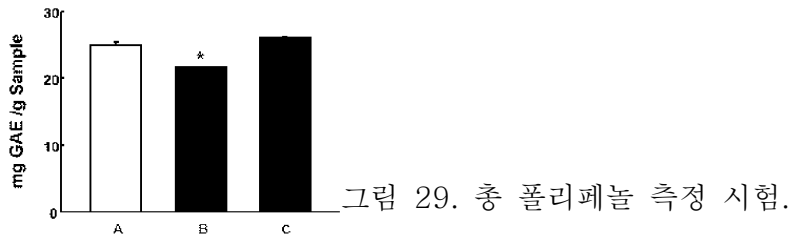
■ 발아와 동충하초 배양에 따른 항산화 활성 측정

✓ 실험재료

(A) 발아콩	(B) 발아시킨 콩	(C) 동충하초 배양 콩
		
<ul style="list-style-type: none"> <li>추출조건 : 추출용매(DW) 및 시료 비율을 9:1로 하여 95℃, 24시간 열수추출</li> <li>여과 : 감압여과를 통해 filtration</li> <li>건조 : 동결건조기를 이용하여 dried powder 형태로 제조</li> </ul>		

✓ 총 폴리페놀 함량 측정

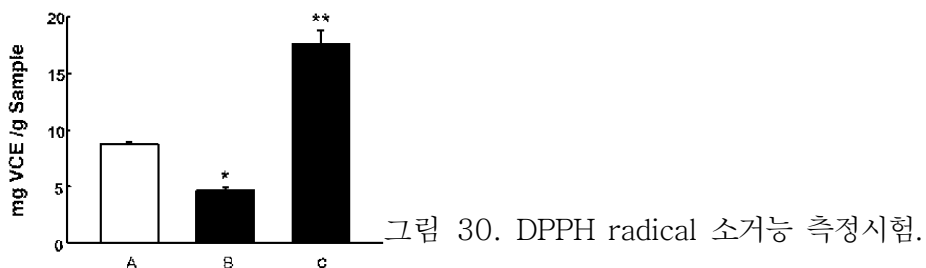
- 총 폴리페놀 함량 : 총 폴리페놀 함량은 Lachman et al. (1998)의 방법을 참고하여 측정함. 시료용액(DW) 500 μl에 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 ml를 가하여 vortexing 후 3분간 반응시킨 후 Folin-Ciocalteu phenol reagent 50 μl를 가함. 3분간 실온에 반응시켜 720 nm에서 흡광도를 측정함. 표준 검량선은 gallic acid (0, 20, 40, 60, 80, 100 ug/ml)를 사용하였고, 이로부터 시료의 총 폴리페놀함량을 gallica acid의 상대적 당량 값인 mg GAE/g로 환산하여 나타냄 (그림 29). A, B, C 모두 총 폴리페놀함량에 큰 차이를 보이지 않으나, B의 함량이 유의적인 수준으로 낮게 나타남.



(n=3, P<0.05 ;significantly different from the (A))

✓ Radical 소거능 측정

- DPPH radical 소거능 측정 시험 : DPPH radical 소거능은 Blois(1958)방법을 참고하여 측정함. 시료용액 50 μL와 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)를 EtOH에 0.05 mM 농도로 용해시킨 DPPH용액 1450 μL을 혼합한 후 vortexing 하여 25℃에서 30분간 반응시킨 후 517 nm 에서 흡광도를 측정함. radical 소거능은 시료 첨가군과 무첨가군의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었으며, ascorbic acid의 상대적 당량 값인 mg VCE/g로 환산하여 나타냄.



(n=3, \*P<0.05, \*\*P<0.01; significantly different from the (A))

- DPPH radical 소거능 측정 실험 결과 A에 비해 C가 mg VCE/g 환산값 대비 약 1.75 배 높은 radical 소거능을 나타내었으며, B의 경우 오히려 낮은 값을 나타냄.
- ABTS radical 소거능 측정 시험 : ABTS radical 소거능은 Re et al.(1999)의 방법을 참고하여 측정함. 1.0 mM의 AAPH (2,2 ‘-azobis-(2-amidinopropane)HCl)와 2.5 mM의 ABTS2-(2,2’ -azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt)를 100 mL의 100 mM PBS 버퍼(pH 7,4)에 녹여서 ABTS가 radical 활성을 띠도록 함. 이 용액을 70°C Water bath에서 30분간 heating 후 실온에서 식히고 Syringe filter를 이용하여 Filtration 함. 734 nm 에서 흡광도 값이  $0.7 \pm 0.02$ 가 되도록 PBS로 희석하고 희석된 ABTS 용액 1470 ul에 시료 추출물 30 ul를 가하여 10분 동안 반응 시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정함. ABTS radical 소거능은 시료 첨가 전후의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었으며, ascorbic acid의 상대적 당량값인 mg VCE/g로 환산하여 나타냄.

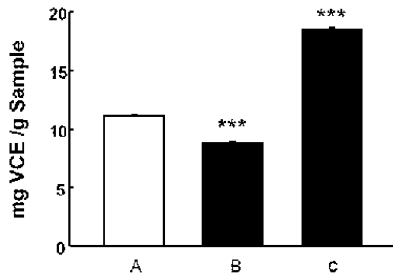


그림 31. ABTS radical 소거능 측정 시험.

(n=3, \*\*\*: P<0.001 ;significantly different from the A)

- A에 비해 C가 mg VCE/g 환산값 대비 약 1.6배 높은 radical 소거능을 나타내며, B의 경우 A에 비해 낮은 활성을 나타냄.
- 항산화 활성을 측정하는 ABTS 및 DPPH radical 소거능의 경우 그룹간의 차이는 있으나 유사한 경향을 보임. 또한 총 폴리페놀 역시 A와 C간의 유의적인 차이는 나타나지 않으나 항산화 활성실험과 유사한 경향을 보이는 것으로 미루어, 쥐눈이콩의 가공이 폴리페놀류의 성분 증가에 영향을 줄 수 있으며, 이는 절대량의 증가 뿐 아니라 보다 항산화활성이 뛰어난 형태로의 전환 가능성도 시사함.

#### ■ 동충하초 발효추출물의 지표물질 분석 및 지방산 산화능 기전 규명

##### ✓ 동충하초 지표물질인 adenosine과 cordycepin의 GC-TOF 질량분석기 분석

- 항염증, 항암 효능을 갖고 있는 것으로 알려져 있는 동충하초 내 활성물질로 알려진 adenosine과 cordycepin을 추출물에서 정량하기 위해 GC-TOF 질량분석기를 사용하였음.
- 시료- CME, Cordyceps militaris 열수 추출물; GSC, germinated soybean-grown cordyceps; GSC-ON188, GSC ON188 발효추출물
- Adenosine과 cordycepin을 정량하기 위해 동결건조 샘플을 Agilent 7890B gas chromatograph (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)를 이용해 정량함

(사용 컬럼: 30 m long, 0.25 mm id. Rtx-5Sil MS column with 0.25 m 95% dimethyl 5% diphenyl polysiloxane film). LECO Pegasus HT time-of-flight (TOF) mass spectrometer를 이용해 화합물의 분석을 수행함.

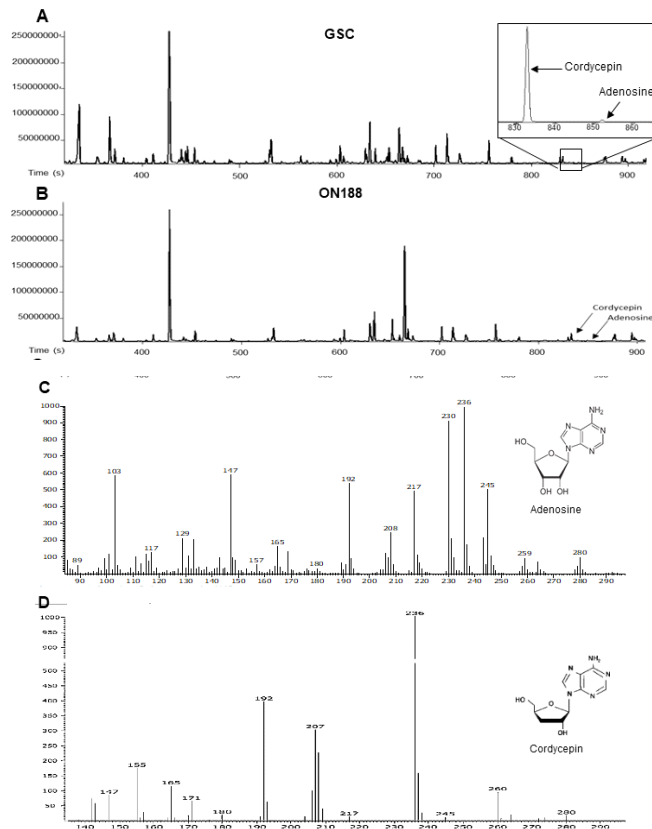


그림 32 . Adenosine과 cordycepine의 크로마토그램과 fragmentation을 통한 물질 확인

- 이를 통해 정량한 결과 발아대두 동충하초 추출물 (GSCE)와 발효추출물 (ON188E)내에서 동충하초 내 지표물질인 아데노신과 코디세핀의 함량이 천연 동충하초보다 낮았음. 이 결과는 ON188E의 지방산 산화능 증가는 지표물질인 아데노신과 코디세핀이 아니고 다른 함유 물질에 의한 것이라는 사실을 제안함.

도표 2. CME, GSCE, ON188E 내의 adenosine과 cordycepin함량

Target bioactive components	Adenosine ( $\mu\text{g/g}$ )	Cordycepin (mg/g)
CME	$143.5 \pm 1.64$	$2.64 \pm 0.02$
GSCE	$58.2 \pm 1.27$	$1.26 \pm 0.01$
ON188E	$68.9 \pm 0.57$	$1.36 \pm 0.01$

- ON188E의 지방산 산화 유전자 발현 증가효능이 실제 세포내에서 지방산산화 증가를 유발하는지 여부를 증명하기 위해 AML-12 간 세포에 ON188E를 다양한 농도에서 24시간 동안 처리하고 지방산 산화 정도를 대변하는 산소호흡율을 측정하였음.
- 이때 양성대조군인 WY14643처리 세포는 가장 높은 산소호흡율을 나타내었으며 ON188E도 농도의존적인 산소호흡율의 증가를 나타내었음. 이러한 결과를 통해 ON188E가 지방산 산화능을 증가시킴을 확인하였음.

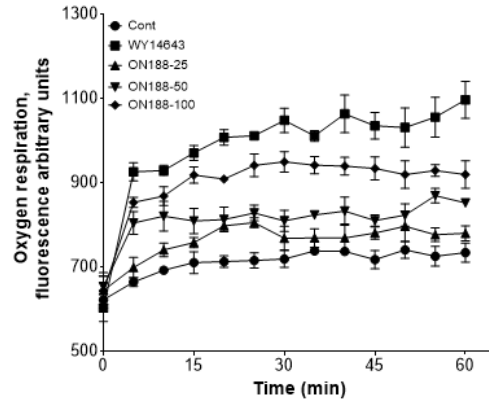


그림 33. ON188E에 의한 AML-12 간세포의 지방산 산화 활성화

- 지방산 산화능의 활성화를 유도하는 유전자인 SPHK2와 그 산물인 sphingosine 1-phosphate (S1P)의 관련성을 증명하기 위해 다양한 농도의 ON188E와 올레익산 동시 처리 또는 무처리 후에 SPHK2의 발현을 측정된 결과 두 조건 모두에서 mRNA와 protein의 발현이 모두 증가하였음. 올레익산 무처리시 SPHK2의 발현정도가 더 높게 나타나는 것이 관찰되었음. 이 결과는 S1P와 SPHK2의 발현증가가 간세포에서 ON188E의 지방산 산화 증가를 유발함을 제시함.
- S1P의 증가가 실제 SPHK2의 발현증가를 통해 일어나는지 관찰하기 위해 sphingosine, sphinganine, S1P, sphinganine 1-phosphate (Sa1P)를 질량분석기로 정량한 결과 이 4종의 스펅고지질 대사체가 모두 ON188E에 의해 증가하였음.
- 따라서 ON188E에 의한 SPHK2의 발현증가를 통해 S1P가 증가하여 간세포내의 지방산 산화가 증가하였음을 증명하였음.
- 이러한 결과에 기초하여 다음과 같은 기전을 제시하였음(그림35).

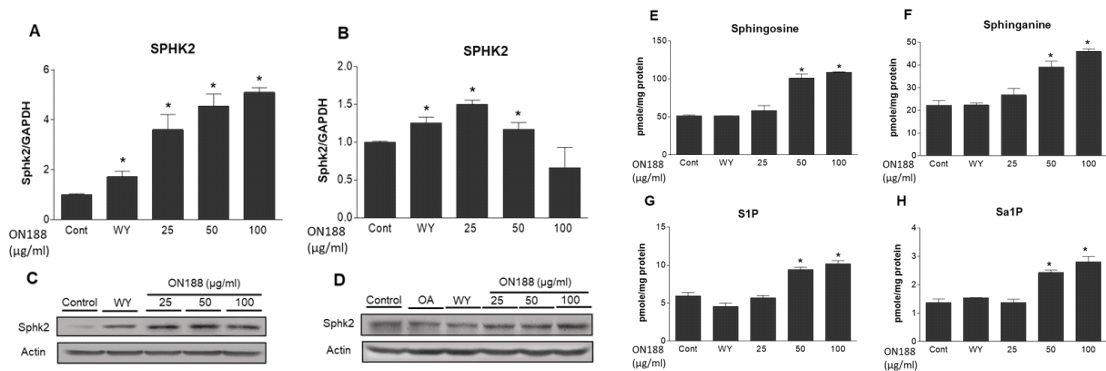


그림 34. ON188E에 의한 SPHK2의 발현증가와 스펅고지질대사체의 세포내 증가

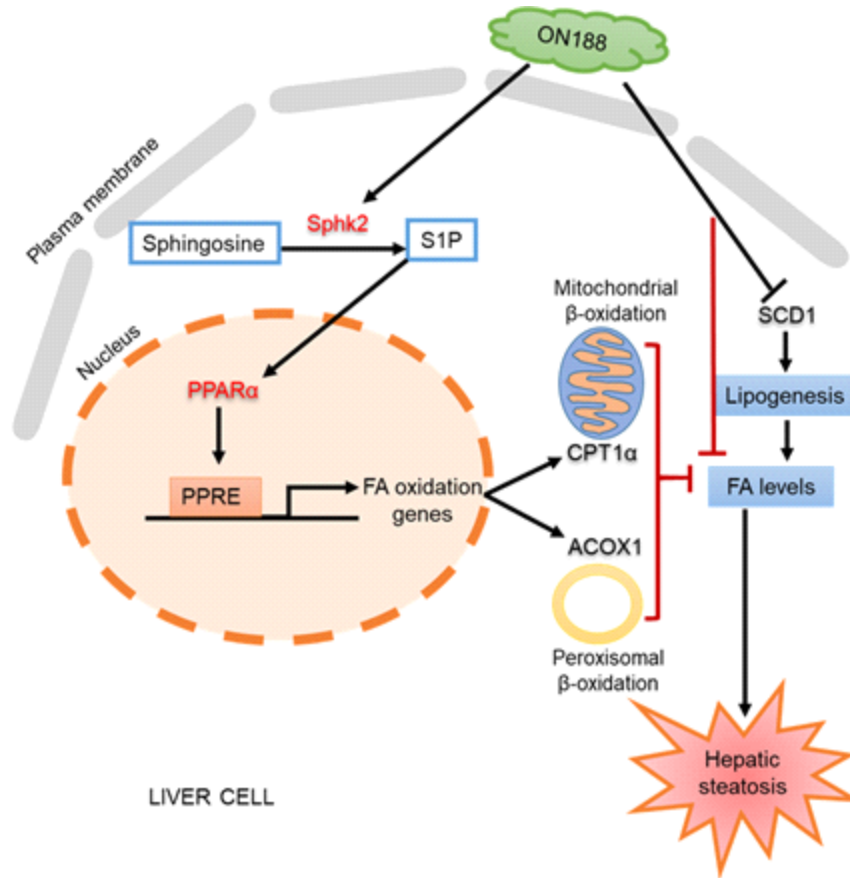


그림 35. ON188E에 의한 지방산 산화능 활성화의 작용 기전

■ 동충하초 발효추출물에 의한 in vivo 지방간 감소 효능 분석

- ON188에 의한 지방간 치료 효능을 분석하기 위해 8주령 C57Bl6 마우스에 1주간 60% kcal 고지방식이를 섭취시켜 적응시킨후 4주간 ON188E 추출물을 먹이에 섞어 섭취시킴. 이때 혈중 파라미터는 다음과 같음.

도표 4. 동충하초 발효추출물에 의한 혈중 파라미터

	NCD	HFD	Feno	ON188-50	ON188-100	ON188-200
Plasma glucose (mg/dL)	132.43 ± 4.34	136.14 ± 7.71	109.14 ± 6.97*	136.14 ± 6.98	143.75 ± 5.55	126.50 ± 9.79
Cholesterol (mg/dL)	116.26 ± 3.92	187.96 ± 10.68#	138.24 ± 13.24#*	178.54 ± 10.56#	186.54 ± 6.79#	173.22 ± 5.99#
Triglyceride (mg/dL)	80.88 ± 3.74	104.92 ± 1.78#	74.74 ± 3.66#*	105.70 ± 2.96#	131.44 ± 7.87#*	125.38 ± 6.64#*
HDL (mg/dL)	69.10 ± 3.92	106.50 ± 6.92#	86.56 ± 7.64	120.42 ± 6.19#	118.18 ± 3.99#	114.24 ± 3.35#
LDL (mg/dL)	27.50 ± 13.04	39.98 ± 15.60	36.94 ± 6.34*	43.28 ± 16.15	44.46 ± 21.48	41.32 ± 19.40
LDH (U/L)	744.36 ± 94.35	820.20 ± 102.75	704.76 ± 104.20	487.56 ± 93.29#*	302.92 ± 48.53#*	163.26 ± 15.23#*
ALT (U/L)	82.96 ± 17.36	159.02 ± 25.78#	105.94 ± 38.65	82.96 ± 29.27#*	83.76 ± 41.75#*	43.46 ± 9.21#*
AST (U/L)	100.78 ± 18.79	180.10 ± 28.82#	91.20 ± 21.91*	60.82 ± 15.69#*	71.94 ± 10.39*	59 ± 8.28#*

Data are means ± SEM. Student's *t*-test with #  $p \leq 0.05$  vs NCD, \*  $p \leq 0.05$  vs HFD. NCD: normal chow diet 일반식이, HFD: high fat diet, 고지방식이

- 이때 양성대조군으로 지방간 치료에 대체제로 사용되는 PPAR $\alpha$  agonist인 fenofibrate를 섭취시켰음. fenofibrate 처리군의 경우 고지방식이군에 비해 혈당, 콜레



스테롤, 중성지방, LDL의 감소가 일어났으며 AST의 감소가 일어나 간기능이 현저히 개선되었음을 관찰할 수 있었음.

- ON188E 처리군의 경우 고지방식이군에 비해 LDH 의 현저한 감소가 일어났으며 ALT와 AST의 현저한 감소가 일어나 신장과 간 기능의 향상이 일어났음을 관찰할 수 있었음. 그러나 혈당과 콜레스테롤의 변화는 관찰되지 않았으며 중성지방의 혈중 농도는 오히려 증가하였음을 관찰하였음.
- 실험기간동안 섭취율을 측정된 결과 ON188E에 의한 변화는 관찰되지 않았으나 양성대조군인 fenofibrate 처리군의 경우 섭취율이 감소하였음을 관찰하였음. 그리고 체중 변화는 ON188 200mg/kg/day 용량에서 약간 감소하였음을 관찰하였음. fenofibrate 처리군의 경우 현저한 체중증가 둔화를 관찰할 수 있었음.

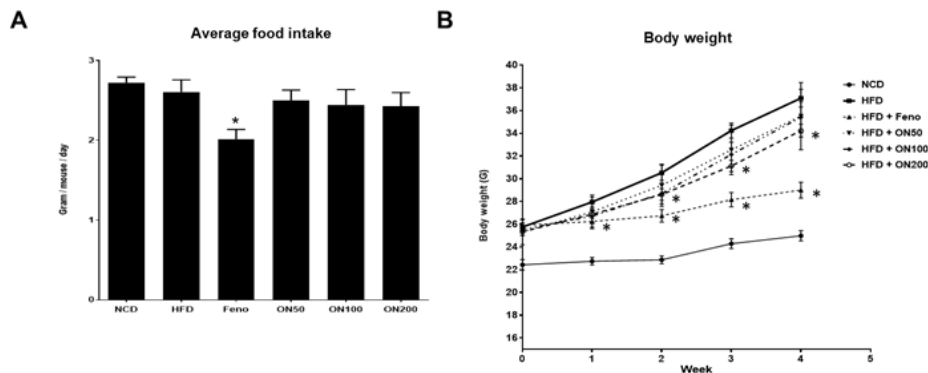


그림 36. ON188E 섭취에 의한 고지방식이 섭취마우스의 섭취율과 체중변화

- ON188E는 혈중 지질에 대해 변화를 가져 오지는 않았으나 간기능을 대변하는 AST와 ALT의 농도의존적 감소를 가져오는데 기초하여 간조직의 변화를 H&E 염색을 통해 병리적으로 관찰하였음. 고지방식이를 먹인 마우스 간의 경우 현저한 지방적 (lipid droplet)의 증가를 유발하였고 세포가 커지면서 흰색으로 변색되는 ballooning 현상을 관찰할 수 있었음.
- 양성대조군인 fenofibrate 처리군의 경우 지방적이 거의 관찰되지 않았으며 일반식이군의 간조직과 유사한 조직 형태를 보였음. ON188E-50 mg/kg/day의 경우에 일부 지방적이 관찰되었고 약간의 ballooning 현상을 보였으나 고지방식이군에 비해 현저히 작아진 지방적을 관찰할 수 있었음. 고농도 ON188E 처리군의 간에서는 거의 지방적이 관찰되지 않았으며 일반식이군과 유사한 세포형태를 보였음.
- 이러한 병리학적 조직 변화를 증명하기 위해 간조직 내 중성지방을 측정된 결과 ON188E 100, 200 mg/kg/day 용량에서 현저한 감소를 나타내었음. 또한 중성지방생합성 유전자 mRNA를 측정해 본 결과 다른 유전자는 변화하지 않았으나 diacylglycerol acyltransferase 2의 현저한 감소가 관찰되었음.
- 이러한 결과는 ON188E에 의해 간에서 현저한 중성지방의 감소가 유발되어 간에서 지방적이 감소되었으며 이는 지방산/중성지방 생합성을 저해하여 발생하는 것을 제시하고 있음.
- 간에서 ON188E에 의한 지방적 감소가 지방산 산화능 증가에 의해 일어나는지 증명하기 위해 지방산 산화 유전자를 측정하였음. 이때 S1P 관련효소인 SPHK2의 mRNA 발



현증가와 지방산 산화 유전자인 *CPT1 $\alpha$* , *PPAR $\alpha$* 의 mRNA 발현증가가 일어났으나 *ACOX1*의 발현증가는 발견되지 않았음. Protein 발현을 관찰했을 때 양성대조군 fenofibrate군에서는 현저한 *CPT1 $\alpha$* , *ACOX1*의 증가가 일어났으며 ON188E의 경우 *SPHK2*와 *PPAR $\alpha$* 의 발현 증가가 관찰되었음.

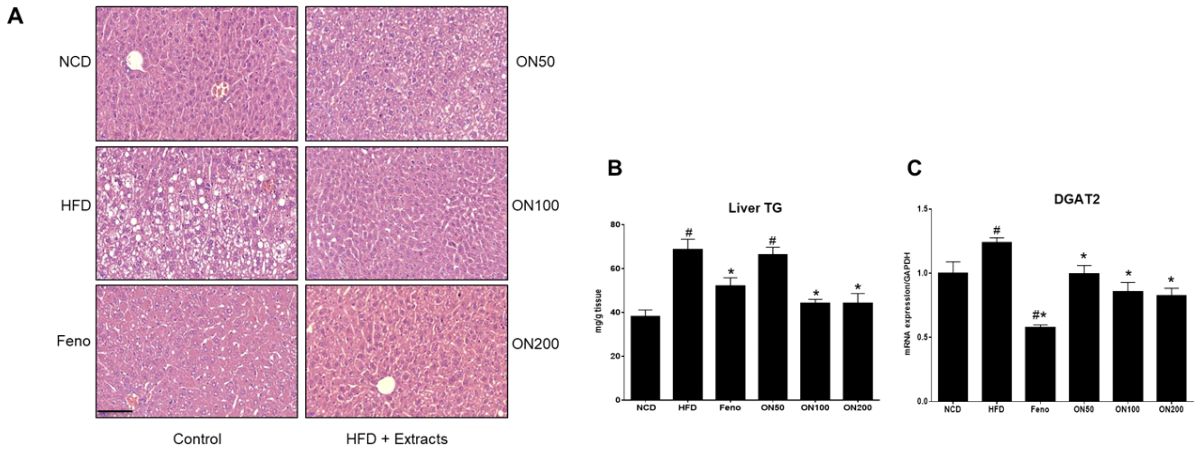


그림 37. ON188E에 의한 고지방 섭식 마우스 간의 조직 검사 및 지방적의 감소 (A). ON188E에 의한 고지방 섭식 마우스 간의 중성지방 감소 (B) 및 중성지방 생합성 유전자 DGAT2의 감소 (C)

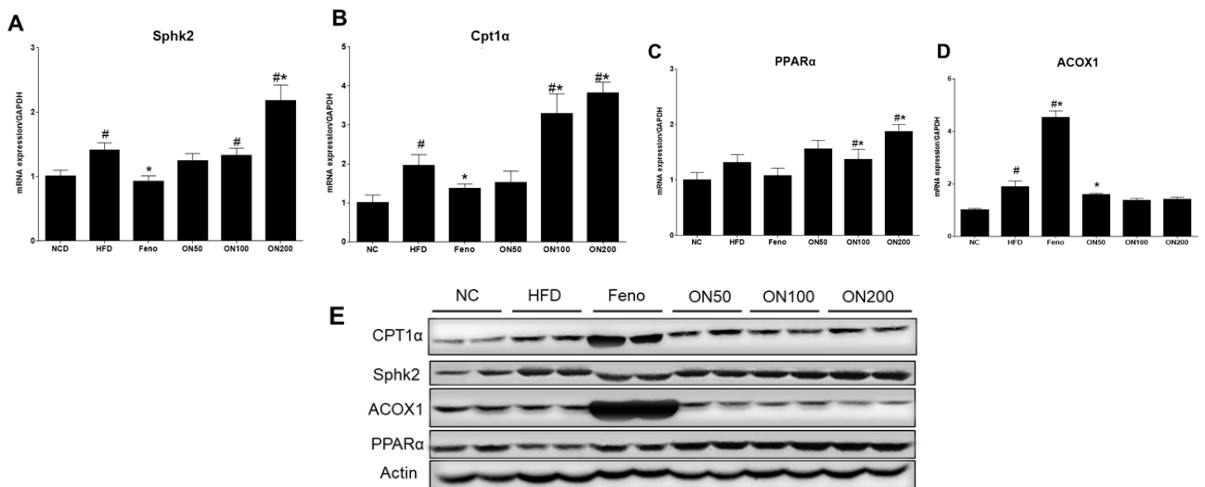


그림 38. ON188E를 섭식한 마우스 간에서 지방산 산화 유전자의 mRNA 및 protein 발현

- 이 결과는 fenofibrate 만큼 효과적이지는 않으나 ON188E는 *SPHK2*, *CPT1 $\alpha$* , *PPAR $\alpha$* 의 mRNA 발현 증가 및 *SPHK2*와 *PPAR $\alpha$* 의 protein 발현증가를 통해 지방산 산화를 활성화시키는 것으로 사료됨.
- ON188E의 섭식에 따라 고농도에서 체중의 감소가 일어난 결과에 기초하여 복부지방 조직에서 지방세포의 크기를 H&E 병리 염색으로 확인하였음. 이때 고지방식이군은 일반식이군보다 현저히 큰 지방세포의 크기를 보였으며 양성대조군의 경우 현저히 작아진 지방세포 크기를 관찰할 수 있었음. 그러나 일반식이군의 세포크기보다는 큰 형태를 관

찰하였음.

- ON188E에 의한 지방세포 크기의 변화를 정량하기 위해 다양한 크기의 지방세포 수를 정량하였음. 이때 고지방식이군의 경우 큰 크기의 지방세포 분포가 높았으나 양성대조군의 경우 작은 크기의 지방세포 분포도가 높았음. ON188E 군의 경우 처리용량이 높아질수록 작은 크기의 지방세포 분포도가 높아짐을 관찰할수 있었음.
- 따라서 ON188E는 지방조직 내 지방 분해를 증가시켜 세포 크기의 감소를 유발한다는 것을 관찰하였음.

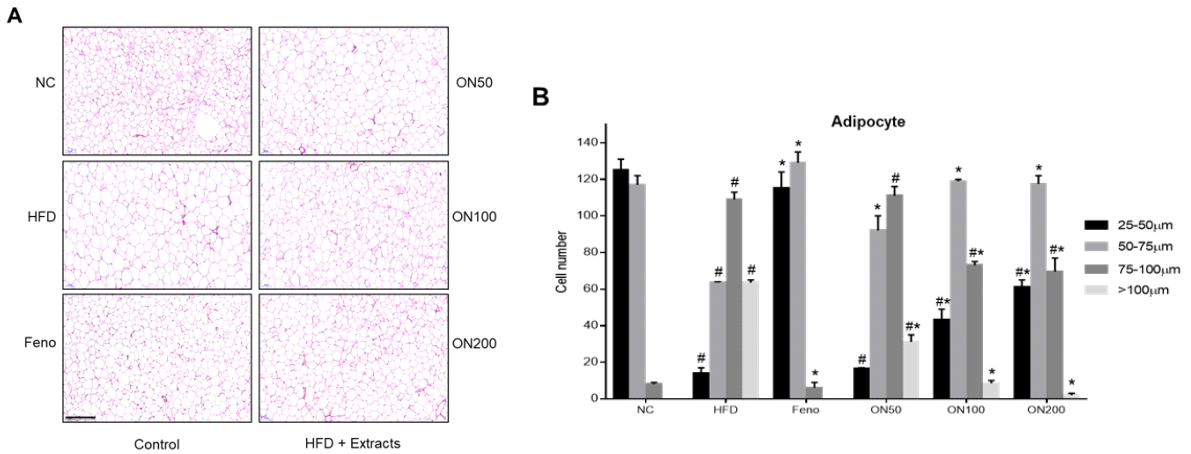


그림 39. ON188E 처리 마우스 지방조직의 지방세포 크기 감소 및 세포 크기에 따른 분포도

- 지방세포 크기 감소의 원인이 지방세포 갈색화 (browning)에 의한 것인지 확인하기 위해 지방조직에서 갈색화 유전자 발현을 측정해 본 결과 양성대조군과 ON188E 고농도 처리군에서 UCP1과 Sirt1의 현저한 발현증가가 일어났으며 PRDM의 변화는 일어나지 않았음. 그리고 지방산/중성지방 생합성 전사인자인 SREBP-1c의 발현이 같은 형태로 감소하였음. 따라서 지방조직 내 지방세포의 크기 감소는 갈색화 유전자의 발현증가와 지방산/중성지방 생합성 전사인자의 감소로 인해 발생한 것으로 사료됨.

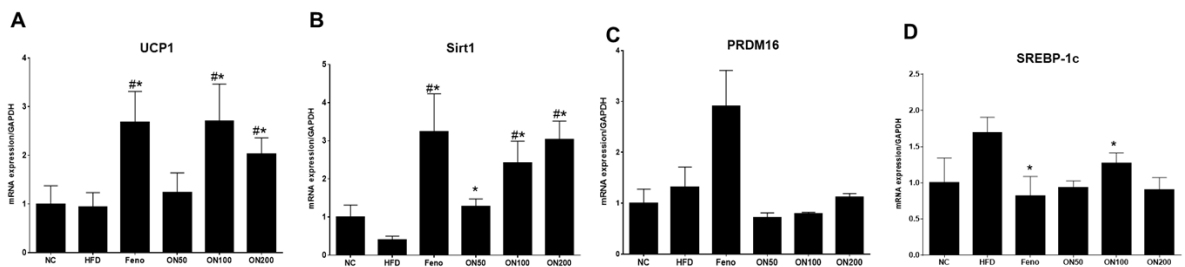


그림 40. ON188E 처리 마우스 지방조직의 갈색화 유전자 발현 증가 및 SREBP-1c의 발현억제

- 지방세포 분화 유전자의 mRNA 발현을 측정해 본 결과 ON188E 처리군의 경우 PPAR $\gamma$ 와 aP2의 발현이 현저하게 증가하였으며 C/EBP $\alpha$ 의 경우 변화가 관찰되지 않음.

- 이러한 결과는 지방세포의 크기 감소와 모순되는 결과이나 지방조직 분화와 갈색화 중 갈색화에 대한 영향이 더 강한 결과로 나타나는 것으로 나타남. 추가로 지방조직 내 지방 분해능을 측정할 계획임.

- 발아대두 동충하초 생리활성 소재의 대식세포 활성화 억제를 통한 염증 반응 억제능 분석
  - ✓ Lipopolysaccharide (LPS)로 자극된 RAW264.7 대식세포에서 염증성 사이토카인 mRNA 발현 분석
  - LPS(1  $\mu$ g/mL)로 염증 반응이 유도된 RAW264.7 대식세포에서 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$  mRNA 발현은 유의적으로 감소하는 것을 발견하였으나, IL-1 $\beta$  mRNA 발현은 변화가 관찰되지 않음. 통계분석은 일원배치 분산분석(Duncan t-test)을 이용하여 진행함( $p < 0.05$ ).

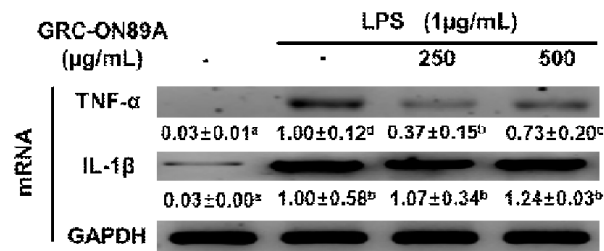


그림 41. LPS로 염증반응이 유도된 RAW264.7 대식세포에서 발아대두 동충하초 발효추출물의 염증성 사이토카인 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$  mRNA 발현 억제 효능 평가 결과

- Raw264.7 대식세포에서 MAP Kinase 신호전달 영향 분석을 통한 항염증 효능 검증
  - ✓ LPS로 자극된 RAW264.7 대식세포에서 NF- $\kappa$ B signaling pathway 조절 효능 평가
  - 항염증 작용과 관련된 MAPK pathway에서 발아대두 동충하초 발효추출물(ON89A)이 signaling 조절 기전을 나타내는 것이 확인되었음. MAPK pathway의 주요 신호전달물질인 p-JNK, p-p38을 western blot을 이용하여 단백질 발현 조절을 확인한 결과 유의적으로 억제됨을 확인함(그림42). 또한, p-p65와 p-I $\kappa$ B $\alpha$ 의 활성화를 유의적으로 억제하여 transcription factor인 NF- $\kappa$ B pathway을 조절함을 발견함. 통계분석은 일원배치 분산분석(Duncan t-test)을 이용하여 진행함( $p < 0.05$ ).

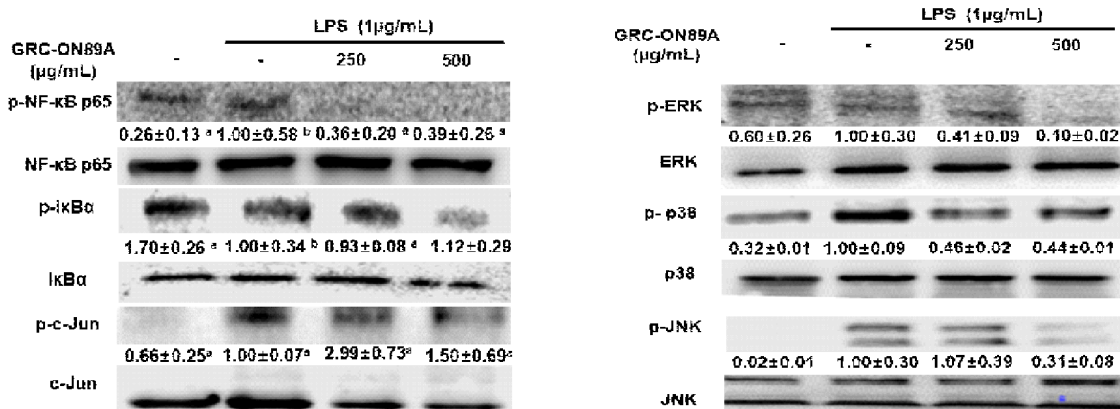


그림 42. LPS로 염증반응이 유도된 RAW264.7 대식세포에서 발아대두 동충하초 발효추출물의 MAPK 활성화 및 NF- $\kappa$ B signaling pathway 효능 평가 결과

## 2-3. 제 2 협동연구기관 (인천대학교 산학협력단) : 연구책임자 최재혁

### ■ 발아대두 동충하초에 대한 시간대별 전사체 서열 확보

- ✓ 발아대두에서 배양 중인 동충하초균 샘플링
- 두 종류의 발아대두한천배지에서 동충하초균을 키워 균사체를 확보하고 RNA를 추출
- 대조군으로는 대두가 포함되지 않은 한천배지를 사용
- NGS 기반 RNA-seq을 수행하고 sequencing data (3개 샘플, 총 15.5 Gb)를 확보
- 중간평가를 통해서 한천없이 발아대두만을 이용하여 배양하도록 권고받음
- 한천없이 키운 발아대두동충하초로부터 시간대별로 RNA를 추출하여 서열분석 의뢰(그림 43)

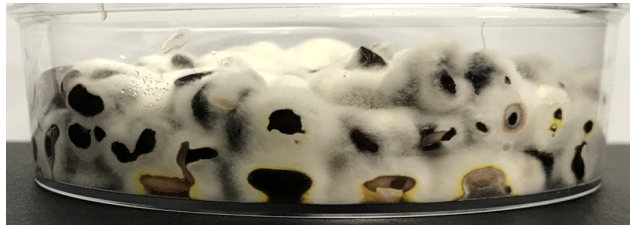


그림 43. 발아대두 동충하초 배양 사진 (7일차)

- 단기 샘플로 0일, 2일, 4일차 샘플과 장기로 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주의 균사체 확보
- 그중 0일, 2일, 4일, 1주, 2주, 3주, 5주, 7주 샘플에 대해서 RNA 추출 및 염기서열 분석 의뢰
- 샘플링 과정에서 포함되는 발아대두의 RNA는 autoclave과정에서 분해되는 것을 확인 (그림 44)

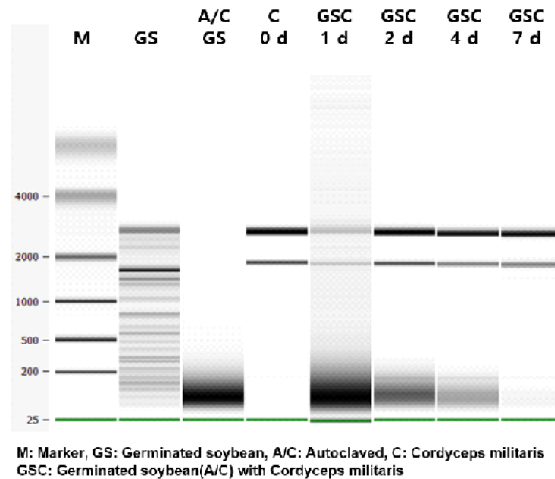


그림 44. RNA QC 분석 결과.

Autoclave(A/C, lane 3)할 경우 식물(lane 2)의 RNA가 분해되는 것을 알 수 있음

- 동충하초균의 RNA는 단독으로 넣을 경우나 발아대두와 섞어준 경우나 동일하게 나타나는 것을 볼 수 있음.
- 시간별 샘플은 총 9개로 '2주'가 2번 포함됨 (55.8 Gb).

- 초기 자료와 합할 경우, 총 12개 전사체 데이터(paired end로 읽었기 때문에 정확히는 12쌍)에 71.3 Gb의 자료가 생성 됨.

### ■ 발아대두 동충하초 전사체의 비교 분석

- ✓ 전사체 서열 filtering 및 mapping
- 확보한 전사체 데이터에 대해서 flexbar 명령어를 통해 adapter를 trimming하고 HISAT2를 사용하여 동충하초균의 유전체 정보에 alignment함. 약 80%의 overall alignment rate을 보임
- 유전체 버전은 Cordyceps\_militaris\_cm01의 버전 1.38을 사용.
- Samtools를 이용하여 bam 파일을 형성하고 IGV genome browser에 load하여 전사체의 visualization을 가능하게 함 (그림 45).
- Htseq-count를 이용해 유전자 수준의 counts를 계산하고 R의 tximport package를 이용하여 샘플별 count 정보를 전환시켜 분석에 이용
- R의 DESeq2 package를 이용하여 샘플에 대한 기본 분석들을 수행.
- 샘플 간 거리비교 분석을 통해 유사한 결과를 보이는 샘플들을 찾음 (그림 46)

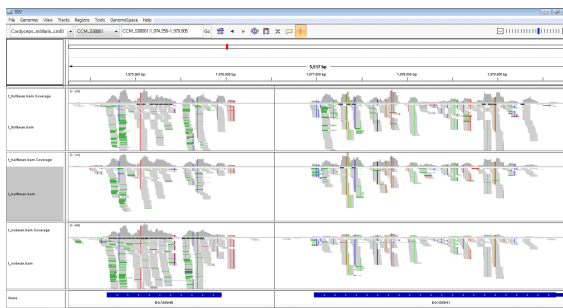


그림 45. IGV genome browser에서 유전자별 전사체 발현을 볼 수 있음

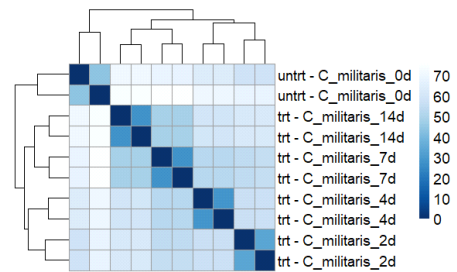


그림 46. 샘플 간 거리에 대한 heatmap. 2일과 4일차가 서로 유사하고 7일과 14일차가 서로 유사함을 알 수 있음

- Principle component 분석을 통해서 2차원적인 분포 상에서 샘플간의 거리를 확인할 수 있음 (그림 48)
- 2일와 4일 샘플들은 1주(7d) 또는 2주(14d) 샘플보다 서로 가까운 것을 알 수 있음.
- 보여지는 두 성분이 전체 변동성의 71%를 설명하고 있음.
- X, Y축 모두 시간에 따른 경향성을 어느 정도 보여주고 있음.

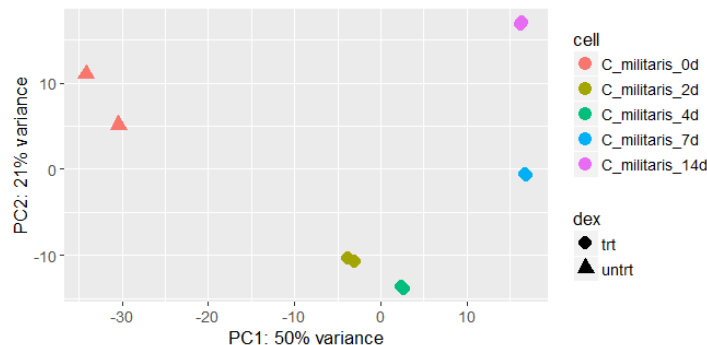


그림 48. 샘플에 대한 주성분분석

- 이후 '0일' 과 각 시간대를 비교하여 유의한 차이를 보이는 유전자들(differentially expressed genes, DEGs)을 선별하고 2배 기준으로 발현이 증가 또는 감소하는 유전자들을 선별 (그림 49).
- 각 시간대별로 유전자 선별 후, 증가하는 유전자들의 합집합을 구하고 반대로 감소하는 유전자들의 합집합을 구하여 유의한 차이를 보이는 유전자들을 확보

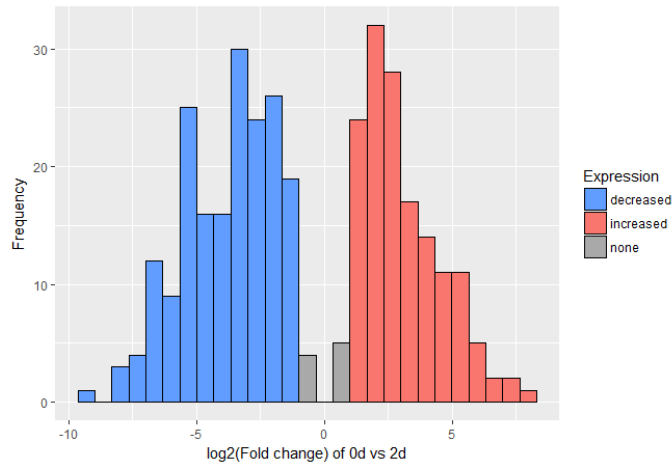


그림 49. Differentially expressed genes에 대한 빈도히스토그램. 0일과 2일의 비교시, 발현이 증가한 유전자는 147개, 줄어든 유전자는 185개임

- 적어도 한번 2배 이상 발현이 증가한 유전자는 총 503개이며 2배 이상 줄어든 집단은 434개임.
- 이들에 대해서 gene ontology 분석을 수행하면, 도표5과 같은 term들이 두드러지는 것으로 나타남 (그림 50, 51).

도표 5. Enrichment analysis

Up-regulation

GO.ID	Term	Annot ated	Signi ficant	Expe cted	Rank in classic	classic	KS	weight
GO:0006357	regulation of transcription from RNA polymerase	253	23	14.68	11	0.018	0.885	<b>0.018</b>
GO:0070588	calcium ion transmembrane transport	11	3	0.64	12	0.0224	0.9362	<b>0.022</b>
GO:0006570	tyrosine metabolic process	5	2	0.29	19	0.0298	0.9996	<b>0.03</b>
GO:0008643	carbohydrate transport	21	4	1.22	20	0.0301	0.9667	<b>0.03</b>
GO:0009074	aromatic amino acid family catabolic process	6	2	0.35	30	0.043	0.2666	<b>0.043</b>

Down-regulation

GO.ID	Term	Annot ated	Signi ficant	Expe cted	Rank in classic	classic	KS	weight
-------	------	------------	--------------	-----------	-----------------	---------	----	--------



GO:0006457	protein folding	38	7	1.83	2	0.0019	0.9898	<b>0.0019</b>
GO:0072330	monocarboxylic acid biosynthetic process	39	7	1.88	3	0.0022	0.9758	<b>0.0022</b>
GO:0000770	peptide pheromone export	22	5	1.06	6	0.0033	0.8413	<b>0.0033</b>
GO:0009423	chorismate biosynthetic process	3	2	0.14	13	0.0067	0.9993	<b>0.0067</b>
GO:0006979	response to oxidative stress	25	5	1.2	11	0.0059	1	<b>0.0134</b>
GO:0009073	aromatic amino acid family biosynthetic process	11	3	0.53	20	0.0136	0.9988	<b>0.0136</b>
GO:0006754	ATP biosynthetic process	14	3	0.67	28	0.027	0.9461	<b>0.027</b>
GO:0005977	glycogen metabolic process	7	2	0.34	41	0.0413	0.8618	<b>0.0413</b>
GO:0006696	ergosterol biosynthetic process	7	2	0.34	42	0.0413	0.8416	<b>0.0413</b>
GO:0009231	riboflavin biosynthetic process	7	2	0.34	43	0.0413	1	<b>0.0413</b>
GO:0006075	(1->3)-beta-D-glucan biosynthetic process	1	1	0.05	57	0.0482	0.9965	<b>0.0482</b>
GO:0006836	neurotransmitter transport	1	1	0.05	58	0.0482	0.9978	<b>0.0482</b>
GO:0009090	homoserine biosynthetic process	1	1	0.05	59	0.0482	0.9958	<b>0.0482</b>
GO:0010821	regulation of mitochondrion organization	1	1	0.05	60	0.0482	0.9987	<b>0.0482</b>
GO:0019280	L-methionine biosynthetic process from homoserine via O-acetyl-L-homoserine and cystathionine	1	1	0.05	61	0.0482	0.9999	<b>0.0482</b>
GO:0043335	protein unfolding	1	1	0.05	62	0.0482	0.9998	<b>0.0482</b>
GO:0043981	histone H4-K5 acetylation	1	1	0.05	63	0.0482	0.9991	<b>0.0482</b>
GO:0043982	histone H4-K8 acetylation	1	1	0.05	64	0.0482	0.9991	<b>0.0482</b>
GO:0055091	phospholipid homeostasis	1	1	0.05	65	0.0482	0.9987	<b>0.0482</b>
GO:0070370	cellular heat acclimation	1	1	0.05	66	0.0482	0.9998	<b>0.0482</b>
GO:0070407	oxidation-dependent protein catabolic process	1	1	0.05	67	0.0482	1	<b>0.0482</b>

- Up-regulation되는 유전자들의 GO 중에 tyrosine metabolic process는 aromatic amino acid family catabolic process와 대사경로 상에서 모두 Carboxylic acid 대사와 관련이 있음.

- 이와 대조적으로 down-regulation되는 유전자들의 GO 중에는 monocarboxylic acid 생합성 경로와 aromatic amino acid family biosynthetic process, chorismate biosynthetic process가 있으며, 이 셋 모두 carboxylic acid 대사와 관련됨. 특히 이들 모두에서 aromatic amino acid의 분해가 촉진되고 생합성은 억제된다는 일관적인 특징을 보임. 이는 phenol 구조가 여러 개 연결된 isoflavonoid의 합성과 관여될 수 있음.

- 유전자 수준에서는 up-regulation 된 유전자는 3개로 CCM\_02834(kynureninase)와 04397(homogentisate 1,2-dioxygenase), 09155(fatty aldehyde dehydrogenase)이며,



down-regulation된 유전자는 3개로 CCM\_04368(Fatty acid hydroxylase)와 01839(lathosterol oxidase), 04265(C-4 methylsterol oxidase), 02998(fatty acid synthase subunit alpha), 06062(pyruvate kinase), 05313(phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase), 07445(pentafunctional AROM polypeptide), 08274(salicylate hydroxylase)임.

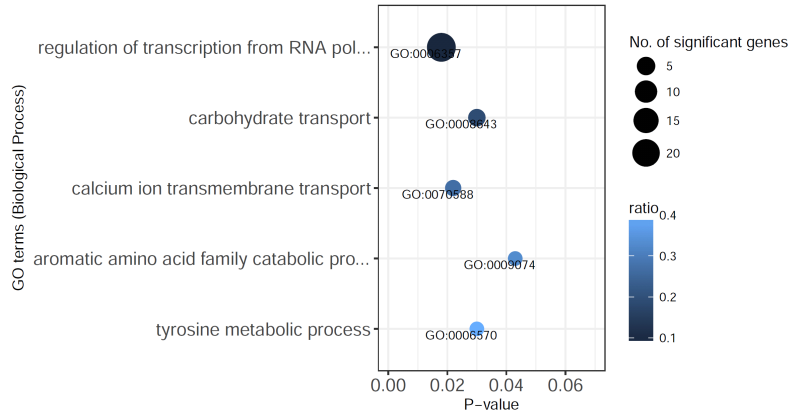


그림 50. 발현이 증가한 그룹의 Gene ontology (BP) 분석

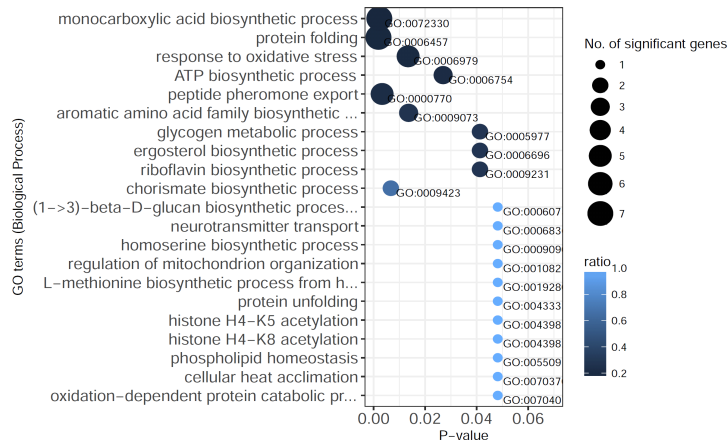


그림 51. 발현이 감소한 그룹의 Gene ontology (BP) 분석

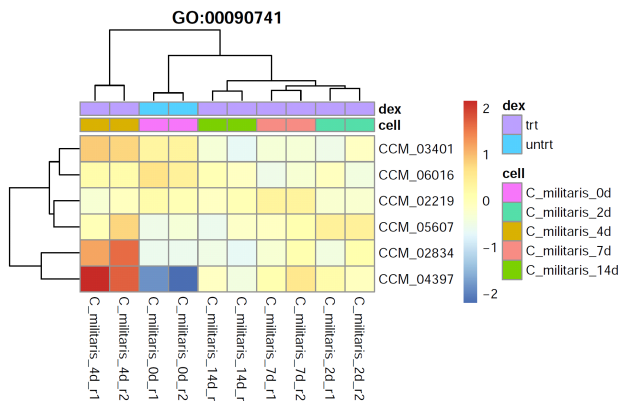


그림 52. GO:00090741에 속하는 유전자의 발현양상[UP]. 두 유전자 CCM\_02834와 04397의 발현이 4d에 유의하게 올라감

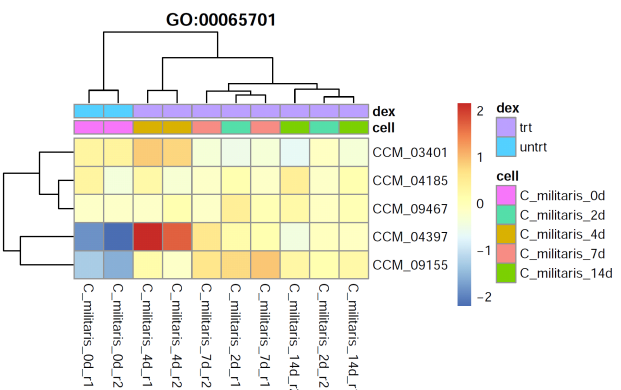


그림 53. GO:0006570에 속하는 유전자의 발현양상[UP]. 두 유전자 CCM\_04397와 09155의 발현이 4d 또는 7d에 유의하게 올라감

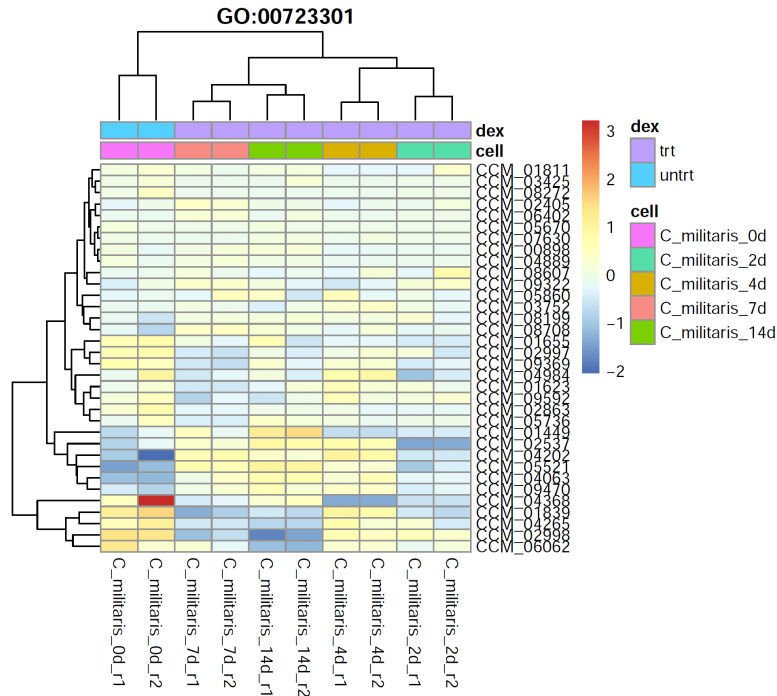


그림 54. GO:0072330에 속하는 유전자의 발현양상[DOWN]. 가장 아래 클러스터의 네 유전자 CCM\_04368와 01839, 04265, 02998, 06062의 발현이 7d 또는 14d에 유의하게 줄어듦

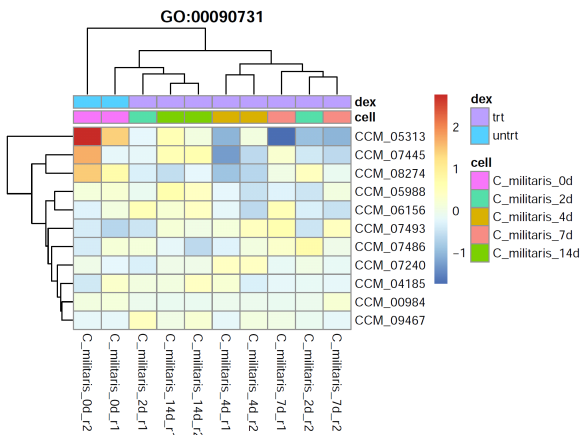


그림 55. GO:0009073에 속하는 유전자의 발현양상[DOWN]. 가장 위 클러스터의 세 유전자 CCM\_05313와 07445, 08274의 발현이 4d에 유의하게 줄어듦

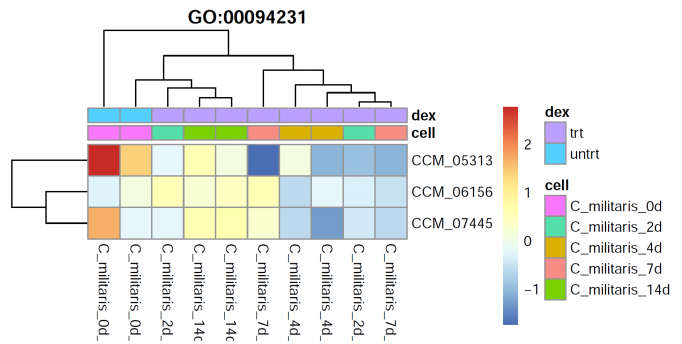


그림 56. GO:0009423에 속하는 유전자의 발현양상[DOWN]. 두 유전자 CCM\_05313와 07445의 발현이 4d에 유의하게 줄어듦. 두 유전자는 GO:0009073과 중복됨

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 3-1. 목표

##### 가. 최종목표

구분	내용	코드번호
최종목표	발아대두 동충하초의 NGS 유전체기반 정보를 활용한 유용 성분 생산기술 개발 및 기능성 분석과 간질환 개선 제품 개발	
세부목표	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 발아대두 동충하초의 배양·생산체계 확립 및 산업용 바이오소재 대량 생산 조건 확립을 통한 지방간 개선 시제품 개발</li> <li>✓ 발아대두 동충하초 유용성분의 간기능 개선 효능을 간세포, 대식세포, 정상세포에서 검증하여 비알코올성 지방간, 지방간 유래 간염, 간 섬유화 예방 및 치료 기능성을 검증</li> <li>✓ 발아대두 동충하초의 전사체에 기반한 바이오 소재 생성 관련 유전자군 발굴</li> </ul>	

##### 나. 연차별 연구개발 목표 및 결과

1차년도 (2016.08.23.-2017.08.22)				
세부 과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	달성도 (%)
생산 및 제품개발 연구 : 동충하초 배양조건 및 유용 바이오소재 생산을 최적화	간기능 개선 효능이 있는 발아대두 동충하초 소재의 생산 공정 최적화	✓ 발아대두 동충하초 배양조건 최적화	✓ 배양조건 확립	100
		✓ 생리활성 소재 발굴 및 대량 생산공정 표준화	✓ 발아대두 동충하초 발효배양 생산공정 확립	100
		✓ 전사체 분석을 위한 균사체/자실체의 제공 및 기능성 분석을 위한 추출물 및 단일 물질 정제 제공	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 동충하초 배양의 영양원인 콩을 발아시키고 동충하초를 접봉하여 각각을 열수 추출함.</li> <li>✓ 발아대두 배양조건에서 동충하초균의 균사체 · 자실체 확보 방법 탐색</li> </ul>	100
기능성 연구 : 간 기능을 대상으로 생리활성 기능 규명	발아대두 동충하초의 비알코올성 지방간 개선 소재의 선별 및 효능 검증	✓ 발아대두 동충하초 발효를 통한 추출물 획득 및 배양에 따른 항산화활성 측정	수행완료	100
		✓ 발아대두 동충하초 생리활성 소재의 마우스 유래 간세포 독성 분석 (추출물 3종) 및 간세포 지방산 산화 활성화를 통한 지방적 축적 저해능 분석	수행완료	100
		<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 발아대두 동충하초 생리활성 소재의 간세포 지방산 산화 활성화를 통한 지방적 축적 저해능 분석</li> <li>✓ 지방산 산화 유전자인 PPAR α, CPT1, ACOX1의 mRNA</li> </ul>		

		발현 및 단백질 발현 분석		
	발아대두 동충하초 생리활성 소재의 대식세포 활성화 억제를 통한 염증 반응 억제능 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ LPS로 염증반응이 유도된 RAW264.7 대식세포에서 발아대두 동충하초 발효추출물의 염증성 사이토카인 mRNA 발현 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ LPS로 염증반응이 유도된 RAW264.7 대식세포에서 발아대두 동충하초 발효추출물의 염증성 사이토카인 TNF-<math>\alpha</math> mRNA 발현 억제 효능을 확인함.</li> </ul>	100
NGS 기반 유전체분석 : 발아대두 동충하초에 대한 배양 시간대별 전사체 서열 확보	발아대두 배양 조건에서 동충하초균의 균사체·자실체 확보 방법 탐색	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 기존 배양에서 균사체를 분리 방법 탐색</li> <li>✓ 발아대두를 활용한 다양한 배지에서 동충하초균 성장 및 균사체 분리 비교</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 발아대두를 포함한 액체 배양발아대두 한천배지에 대해서 한천의 양을 조절하여 배지 표면 위로 돌출되는 발아대두의 면적을 넓은 배지로 결정</li> <li>✓ 중간평가 결과 한천없는 배지에서 샘플링하도록 권고 받아서 새롭게 샘플링함</li> </ul>	100
		<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 배양 시간 별 균사체 확보 및 RNA 추출</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 선발된 배지에서 배양시간에 따른 균사체 확보 및 RNA 추출</li> <li>✓ 총 12개 중 4개 조건에 대해서 우선적으로 균사체 확보 및 RNA 추출</li> </ul>	100
		<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ NGS 기술 기반 RNA-seq 수행</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ RNA-seq 결과 분석을 위한 유전체 정보 확보</li> <li>✓ Genome 및 gene ontology 정보 확보 (4개 조건 RNA-seq 수행)</li> </ul>	100

2차년도 (2017.08.23.-2018.08.22.)				
세부 과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	달성도 (%)
신규 소재 대량생산의 통한 제품화 및 상용화 연구	간기능 개선 효능이 입증된 신규 개발 식품소재의 제품화 및 상용화	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 개발 신규 식품 소재에 대한 활용도 방안 모색</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 신규 개발된 발아대두 동충하초 액상발효 소재는 음료나 화장품원료로 이용하기 적합함.</li> <li>✓ 발아대두 동충하초 고상발효 소재는 과립이나 환제를 만드는데 적합한 소재임.</li> </ul>	100
		<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 신규 식품 소재의 가공특성, 제형, 경제성 등을 고려하여, 시제품을 생산하여 상용화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 신규 식품소재를 이용한 음료 및 제품화 진행함.</li> <li>✓ 소재를 활용하기 위해 중국 업체와 협업을 진행하는 중임.</li> </ul>	95
	Raw264.7 대식	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ LPS로 염증반응이 유도된 R</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ LPS로 염증반응이 유도된</li> </ul>	100

	세포에서 MAP Kinase 신호전달 영향 분석을 통한 항염증 효능 검증	AW264.7 대식세포에서 western blot을 이용한 기전연구	RAW264.7 대식세포에서 MAPK 와 NF- $\kappa$ B pathway 신호전달경로를 억제하여 항염증효능을 나타냄.	
NGS 기반 유전체 분석 : 전사체 서열 분석을 통한 바이오소재생성 관련 유전자군 발굴	발아대두 동충하초에 대한 배양 시간대별 전사체 서열 확보	✓ 배양 시간 별 군사체 확보 및 RNA 추출	✓ 선발된 배지에서 배양시간에 따른 군사체 확보 및 RNA 추출 ✓ 총 15개의 조건에서 군사체 확보 및 RNA 추출	100
		✓ NGS 기술 기반 RNA-seq 수행	✓ 총 15개 조건 중 12개 조건의 RNA에 대해서 RNA-seq 수행 ✓ Paired end로 수행했기 때문에 12쌍의 전사체 서열 확보 (71,3 Gb)	100
	전사체 서열 분석 및 mapping	✓ 서열의 read수 분석 및 mapping rate	✓ 713 million 개 reads ✓ 평균 85%의 alignment rate을 보임	100
		✓ 전체 전사체 샘플간 유사도 분석 ✓ Clustering 또는 PCA에 의한 샘플의 유사도 분석	✓ full bean과 half bean 샘플은 서로 유사함 ✓ 2,4일은 서로 유사함 ✓ 7, 14일은 서로 유사함	100
	조건 또는 시간 특이적으로 발현되는 유전자군 분석	✓ 조건별 유의한 차이를 보이는 유전자군 탐색 ✓ 시간별 유의한 유전자군 탐색	✓ full/half 조건에서 발현이 증가하는 유전자 830개 확보 ✓ 유의하게 발현이 증가하는 유전자 503개와 감소하는 유전자 433개 확보	100
Gene ontology 및 pathway 분석을 통한 조건별 주요 대사 경로 결정	✓ 조건에 따른 유사 유전자군 분석 ✓ 시간에 따른 유사 유전자군 분석	✓ 코르디세핀 또는 스테롤 생합성 경로 관련 유전자군이 활성화 됨 ✓ Aromatic amino acid의 이화작용이 활발해지고 동화작용은 억제됨	100	

### 3-2. 목표 달성여부

#### - 사업성과

(단위 : 건수)

성과목표	전략 미생물 해독	유용 유전자 원 확보	사업화 · 실용 화	표준 유전체 해독	메타지 놈 분석	유전체 분석기 술개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마 커개발	병원성 미생물 정보완 성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표	1	2	1			1	2			
1차 년도	목표									
	실적									
2차 년도	목표	1	2	1		1	2			
	실적	1	2	1		1	12			
소 계	목표	1	2	1		1	2			
	실적	1	2	1		1	12			
종료 1차년도										
종료 2차년도	1	2	1			1	12			
소 계	1	2	1			1	12			
합 계	1	2	1			1	12			

#### - 사업성과 상세내역

##### 가. 전략미생물 해독

No	유전체, 유전자원 명칭 (건별 각각 기재)	분석내용	비고
1	Cordyceps militaris IUM5721	전사체 분석 (총 71.3Gb)	

##### 나. 유용 유전자원 확보

No	유전체, 유전자원 명칭 (건별 각각 기재)	분석내용	비고
1	발아대두에서 동충하초균 배양시 발현이 증가하는 carboxylic acid 대사 관련 유전자	CCM_02834(kynureninase), 04397(homogentisate 1,2-dioxygenase), 09155(fatty aldehyde dehydrogenase)	
2	발아대두에서 동충하초균 배양시 발현이 감소하는 carboxylic acid 대사 관련 유전자	CCM_04368(Fatty acid hydroxylase), 01839(lathosterol oxidase), 04265(C-4 methylsterol oxidase), 02998(fatty acid synthase subunit alpha), 06062(pyruvate kinase), 05313(phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase), 07445(pentafunctional AROM polypeptide), 08274(salicylate hydroxylase)	

다. 유전체 분석기술 개발

No	유전체, 유전자원 명칭 (건별 각각 기재)	분석내용	비 고
1	동충하초균 전사체 분석 파이프라인 개발	동충하초균 전사체 분석 파이프라인 개발 (raw data부터 유전자 탐색까지의 과정에 대한 분석 파이프 라인)	

라. NABIC 등록

No	유전체, 유전자원 명칭 (건별 각각 기재)	분석내용	비 고
1	Cordyceps militaris 전사체	nobean	
2	Cordyceps militaris 전사체	0d	
3	Cordyceps militaris 전사체	2d	
4	Cordyceps militaris 전사체	4d	
5	Cordyceps militaris 전사체	7d	
6	Cordyceps militaris 전사체	14d	
7	Cordyceps militaris 전사체	2w	
8	Cordyceps militaris 전사체	3w	
9	Cordyceps militaris 전사체	5w	
10	Cordyceps militaris 전사체	7w	
11	Cordyceps militaris 전사체	fullbean	
12	Cordyceps militaris 전사체	halfbean	



- 기타성과

(단위 : 건수)

성과목표	사업화지표										연구기반지표3								
	지식재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용 홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비SCI						
최종목표	2	1		1	1	2	160/6건		1			3	1	4		6			
1차년도	목표	1							1			1		2		2			
	실적						50/2건					1		4		3			
2차년도	목표	1	1		1	1	10/2건					2	1	2		4			
	실적	4			1	1	100/2건		1			2+1*		6		4			
소계	목표	2	1		1	1	10/2건		1			3	1	4		6			
	실적	4			1	1	2		1			3+1*		10		7			
종료 1차년도						1	50/2건					1		4		3			
종료 2차년도	4			1	1	2	100/2건		1			2+1*		6		4			
소계	4			1	1	2	150/4건		1			3+1*		10		7			
합계	4			1	1	2	150/6건		1			3+1*		10		7			

\* 가천대학교 박태식 교수님 2차년도 논문제출 건 (과제 종료 이후 논문 2건 예상)

(1) 저널명 : Journal of Medicinal Food

현재 상태 : 논문 게재 accept 완료 / 논문유사성 평가 중으로 10월 현재 검색은 안 됨.

(2) 추가 논문은 2018년 내에 완성하여 제출 예정.

- 기타성과 상세내역

가. 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	코드번호		SCI여부 (SCI/비SCI)	게재 일	등록 번호
					국명	발행 기관			
1	Metabolite profiling of peppers of various colors reveals relationships between tocopherol, carotenoid, and phytosterol content	Journal of Food Science	최재혁	82(12): 2885-2893	국외	미국	SCI	2017.11	https://doi.org/10.1111/1750-41.13968
2	Wheat Blast: A New Fungal Inhabitant to Bangladesh Threatening World Wheat Production	Plant Pathology Journal	최재혁	33(2) : 103-108	국내	대한민국	SCIE	2017.04	doi:10.5423/PJ.RW.09.2016.0179
3	Fermented Cordyceps militaris extract ameliorates hepatosteatosis via activation of fatty acid oxidation	Journal of Medicinal Food	박태식	논문 게재 accet 완료	국내	대한민국	SCIE	2018.11	

나. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	코드번호		국명
			발표일시	장소	
1	The 37th Annual meeting of Japan Society for the study of Obesity	박태식	Regulation of hepatosteatosis and obesity by sphingolipids. (2016.10.15.)	일본, 도쿄	일본
2	Asian Pacific Diabetes and Obesity Study group Symposium	박태식	Sphingolipid metabolism in fatty liver and obesity. (2016.10.29.)	대만, 타이페이	대만
3	한국분자세포생물학회	박태식	2017.09.13	광주	대한민국
4	대한당뇨병학회	박태식	Regulation of sphingolipid metabolism in hepatosteatosis and obesity (2018.05.05)	서울 KOEX	대한민국
5	한국미생물학회	박동기	2016.04.26	부산 BEXCO	대한민국

6	International Conference on Nutritional Science and Food Technology (NSFT 2018)	박동기	2018.07.02-03	Rome, Italy	Rome, Italy
7	한국미생물학회	최재혁	2016.04.26	부산 BEXCO	대한민국
8	2017 Asian Conference on Plant Pathology	최재혁	2017.11.2-3	일산	대한민국
9	International meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies	최재혁	2017.9.12-15	제주	대한민국
10	한국균학회 춘계학술대회	최재혁	2018.5.9	양양	대한민국

**다. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)**

- 특허 출원 4건 모두 특허 등록 진행 중에 있음. 과제종료 후 3년 이내 특허 등록 완료 진행예정.

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	코드번호						기여율
			출원			등록			
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	특허 출원	서목태 동충하초 발효 추출물의 제조방법 및 이를 포함하는 지방간 억제용 약학조성물	박동기, 박태식	2017.10.26.	10-2017-0140177				100
2	특허 출원	간바라	(주)세포 활성연 구소	2018.08.29	40-2018-120381				100
3	특허 출원	죽선생	(주)세포 활성연 구소	2018.01.30.	40-2018-0013747				90
4	특허 출원	크리니펠리스 라이조마티콜라 IUM00035 균주, 상기 균주의 배양액, 상기 배양액의 분획물 또는 상기 배양액으로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 식물병 방제용 조성물 및 상기 조성물을 사용한 식물병 방제 방법	최재혁	2017.11.3	10-2017-0146192				10%
5	특허 출원 예정	발아서목태 동충하초 발효물을 유효성분으로 포함하는 항염증 및 항알레르기 효능을 지니는 조성물							50

라. 전문연구 인력양성

No	분류	기준 년도	현 황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	학위취득 (인천대 산학협력단)	1차년도			1		1		1				
		2차년도			1			1					
2	학위취득 (가천대 산학협력단)	1차년도		2			1	1	2				
		2차년도	1	2			1	2	2				1
총			1	4	2		3	4	6				1

마. 기술거래(이전) 등

No	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	코드번호		
				기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황
1	유상 이전	서목태 동충하초 발효 추출물의 제 조방법 및 이를 포함하는 지방간 역제용 약학조성물	(주)세 포활성 연구소	과제종료 2년 이내	2,000 천원	

바. 사업화 현황

No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생년도	기술 수명
							국내	국외		
							1	기술 개발		
2	홍보 및 판매	식품전시회 를 통한 홍보 판매	국내 국외	바이어 및 소비자 판매		코비즈 코리아	-	-	종료 3년이내	20년
				글로벌 쇼핑몰 구축	온라인 쇼핑몰을 이용한 판매루트 활성화	(주)세 포활성 연구소	-	-	종료 3년이내	20년
3	기술이전 자기실시	신제품개발 기존제품개선 신공정개발 기존공정개선 기타	국내 국외							

사. 기타

고용창출 1건 (주관기관 (주)세포활성연구소):

- 2017.02 석사연구원 1명 고용창출 목표 1건에 대한 실적 달성하였음.

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등) - 해당없음

#### 4. 연구결과의 활용 계획 등

- ✓ 발아대두 동충하초를 이용한 제품의 경우, 차의 형태로 출시되어져 판매되어지고 있고, 발아대두 동충하초 분말 및 과립의 형태로 해외 수출 (홍콩 수출)이 이루어지고 있음.
- ✓ 신규 배양 기술을 활용하여 발아서목태 동충하초를 생산하였고 금번 발효기술 연구사업을 통해 효능과 유효성분이 upgrade된 신소재를 개발함. 본 배양 기술은 소재의 부가가치를 한층 향상시켰으며, 가천대학과 협동연구를 통해서 본 소재가 지방간에 특이하게 효능을 나타내는 것이 밝혀짐으로써 지방간에 대한 천연 신약개발의 가능성을 높여줌.
- ✓ 본 액상발효물의 특이한 향미와 효능이 입증되어 신소재로서 그 활용도가 기대되고, 액상발효물을 활용하여 음료개발 및 화장품개발 등 다양한 제품개발에도 활용할 수 있을 것을 기대됨.
- ✓ 본 제품의 시장 확대를 겨냥하여 김천시에 새로운 식품 제조 공장을 가동 중에 있으며, 금년 하반기 본격적인 생산 목표로 시설 및 설비를 보완 중에 있음.
- ✓ 본 제품의 판도를 확대하기 위해 중국 ‘흑룡강성 과학기술유관공사’ 와 판매 및 현지 생산을 위한 MOU를 맺고, 계약차 2018.08.29.-2018.08.31. 까지 방문 중에 있음.
- ✓ 따라서, 앞으로 향후 5년 이내에 시장점유율이 국내외적으로 5-25%이상 성장하고, 년 매출 최소 30억 원이상으로 예상하고 있음.

## 붙임. 참고문헌

국립원예특작과학원. 2015. 동충하초의 유전체 및 오믹스 연구, 농촌진흥청

Choi, J.N., Kim, J., Lee, M.Y., Park, D.K., Hong, Y., and Lee, C.H. 2010. Metabolomics revealed novel isoflavones and optimal cultivation time of *Cordyceps militaris* fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 58, 4258-4267.

Li, Y., Hu, X., Yang, R., Hsiang, T., Wang, K., Liang, D., Liang, F., Cao, D., Zhou, F., and Wen, G. 2015. Complete mitochondrial genome of the medicinal fungus *Ophiocordyceps sinensis*. *Scientific Reports.* 5, 13892.

Park, D.K., Choi, W.S., and Park, H. 2012. Antiallergic activity of novel isoflavone methyl-glycosides from *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans in antigen-stimulated mast cells. *J. Agric. Food Chem.* 60, 2309-2315.

Shim, D., Park, S., Kim, K., Bae, W., Lee, G.W., Ha, B., Ro, H., Kim, M., Ryoo, R., and Rhee, S. 2016. Whole genome de novo sequencing and genome annotation of the world popular cultivated edible mushroom, *Lentinula edodes*. *J. Biotechnol.* 223, 24-25.

Xiao, G., Ying, S., Zheng, P., Wang, Z., Zhang, S., Xie, X., Shang, Y., Leger, R.J.S., Zhao, G., and Wang, C. 2012a. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Scientific Reports.* 2, 483.

Xiong, C., Xia, Y., Zheng, P., and Wang, C. 2013. Increasing oxidative stress tolerance and subculturing stability of *Cordyceps militaris* by overexpression of a glutathione peroxidase gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 2009-2015.

Zheng, P., Xia, Y., Xiao, G., Xiong, C., Hu, X., Zhang, S., Zheng, H., Huang, Y., Zhou, Y., and Wang, S. 2012. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine. *Genome Biol.* 12, R116.

Zheng, Z., Huang, C., Cao, L., Xie, C., and Han, R. 2011. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in medicinal fungus *Cordyceps militaris*. *Fungal Biology.* 115, 265-274.

[별첨 1]

## 연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 유전체기반 발아대두 동충하초(Cordyceps militaris)로부터 지방간 질환 개선 바이오 소재 개발 (영문)				
주관연구기관	(주)세포활성연구소		주 관 연 구	(소속) (주)세포활성연구소	
참 여 기 업			책 임 자	(성명) 박 동 기	
총연구개발비	계	426,800	총 연 구 기 간	2016. 08. 23. ~ 2018. 08. 22. ( 2년 월)	
	정부출연 연구개발비	320,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	16
	기업부담금	106,800		내부인원	8
	연구기관부담금			외부인원	8

- 연구개발 목표 및 성과
- ✓ 발아대두 동충하초 유용성분의 간기능 개선 효능을 간세포, 대식세포에서 검증하였고 비알코올성 지방간, 지방간 유래 간염, 간 섬유화 예방 및 치료 가능성을 검증
- ✓ 유전체 정보에 기반하여 유용성분 생산 기작 및 관련 유전자를 탐색하여 고부가가치바이오 소재를 생산에 기여함.
- ✓ 발아대두 동충하초의 배양·생산체계 확립 및 산업용 바이오소재 대량 생산 조건 확립을 통한 산업소재 응용 제품 개발
- 연구내용 및 결과
- ✓ 발아대두 동충하초 유용성분의 간기능 개선 효능을 간세포, 대식세포, 정상세포에서 입증함.
- ✓ NGS 기반 유전체 정보에 기반하여 유용성분 생산 기작 및 관련 유전자를 탐색하여 고부가가치를 지닌 바이오 소재를 선별함.
- ✓ 발아대두 동충하초의 배양·생산체계 확립 및 산업용 바이오소재 대량 생산 조건 확립을 통한 산업소재 응용 제품 개발
- ✓ 본 연구를 통해 지식재산권 출원 4건, 자체기술이전 1건, 고용창출 1건, SCI급 논문 3건, 학술발표 12건, 전문인력양성 7건 등의 성과를 이룸.



○ 연구성과 활용실적 및 계획

- ✓ 발아대두 동충하초를 이용한 제품의 경우, 차의 형태로 출시되어져 판매되어지고 있고, 발아대두 동충하초 분말 및 과립의 형태로 해외 수출 (홍콩 수출)이 이루어지고 있음.
- ✓ 신규 배양 기술을 활용하여 발아대두 동충하초를 생산하였고 금번 발효기술 연구사업을 통해 효능과 유효성분이 upgrade된 신소재를 개발함. 본 배양 기술은 소재의 부가가치를 한층 향상시켰으며, 가천대학과 협동연구를 통해서 본 소재가 지방간에 특이하게 효능을 나타내는 것이 밝혀짐으로써 지방간에 대한 천연 신약개발의 가능성을 높여줌.
- ✓ 본 액상발효물의 특이한 향미와 효능이 입증되어 신소재로서 그 활용도가 기대되고, 액상 발효물을 활용하여 음료개발 및 화장품개발 등 다양한 제품개발에도 활용할 수 있을 것을 기대됨.
- ✓ 본 제품의 시장 확대를 겨냥하여 김천시에 새로운 식품 제조 공장을 가동 중에 있으며, 금년 하반기 본격적인 생산 목표로 시설 및 설비를 보완 중에 있음.
- ✓ 본 제품의 판도를 확대하기 위해 중국 ‘흑룡강성 과학기술유관공사’ 와 판매 및 현지 생산을 위한 MOU를 맺고, 계약차 2018.08.29.-2018.08.31. 까지 방문 중에 있음.
- ✓ 따라서, 앞으로 향후 5년 이내에 시장점유율이 국내외적으로 5-25%이상 성장하고, 년 매출 최소 30억 원이상으로 예상하고 있음.

[별첨 2]

## 자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	916008-2		
사업구분	농림축산식품 미생물유전체사업 (포스트게놈다부처유전체사업)				
연구분야	[농림식품 융복합] [농생명 신소재·시스템] [기능성 소재]		과제구분	단위	
사업명	포스트게놈다부처유전체사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	유전체기반 발아대두 동충하초로부터 지방간질환 개선 바이오소재 개발		과제유형	기초	
연구기관	(주)세포활성연구소		연구책임자	박 동 기	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	16.08.23 -2017.08.22	160,000	53,400	213,400
	2차년도	2017.08.23. -2018.08.22	160,000	53,400	231,400
	계		320,000	106,800	426,800
참여기업					
상대국		상대국연구기관			

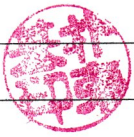
2. 평가일 : 2018.08.30

3. 평가자(연구책임자) : 박 동 기

소속	직위	성명
(주)세포활성연구소	대표	박 동 기

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	
-----	---

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 과제외의 우수성 및 창의성

- 발아대두 동충하초 소재는 본 연구진이 세계최초로 보유한 식품소재로서 본 소재에 유량 유산균으로 발효시킨 신소개 개발.
- 유전체기반 유산균 발효 발아대두 동충하초 소재의 간질환 개선 효능을 입증함.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 간질환을 개선할 수 있는 기능성 발아대두 동충하초 발효추출물 소재를 개발함으로써 이를 식품, 화장품 및 의생명공학분야에서 다양하게 이용하여 의료비 절감 및 국민 건강 향상에 기여할 수 있음.
- 국내 농산물의 부가가치가 높아지고, 기존의 기능성 곡류, 기능성 버섯의 생리활성을 높이고 시장에서의 상용범위가 넓은 바이오 식품 소재로 활용될 수 있음

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 유전체 기반의 생물전환기술로 생산된 천연 건강기능 소재 발굴
  - 간질환 개선 기능이 향상된 건강지향식품(LOHAS 식품) 소재 개발 및 사업화
- 생물전환공정을 통해 흡수가 용이한 형태의 제품 생산이 가능함.
  - 기존 발아곡류보다 유용 생리기능성 성분의 흡수율이 증가된 고효율 제품 개발이 가능함.
- 생물전환 및 발효 공정 표준화로 대량생산이 가능하고, 일정한 효과를 유지할 수 있는 안정적 수준의 제품 생산이 가능하도록 함
- 발아곡류 가공 기술, 생물전환 공정 기법 및 전환물질 분석 기법을 제시함으로써 국내외 산업현장 및 관련 연구 분야에 생리기능성물질 연구의 기본 자료로 이용할 수 있음.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 발아대두 동충하초 발효 추출물을 이용하여 간질환 개선 효능평가/기전연구를 성공적으로 수행함.
- 발아대두 동충하초 발효 추출물 소재의 특허 출원 및 관련 제품을 성공적으로 제조함.
- 발아대두 동충하초 발효 추출물 소재를 이용한 '간바라' 제품을 개발하였고 상표출원을 성공적으로 수행함.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 지식재산권 4건 출원 및 등록
  1. 소재 특허 출원 1건 : 서목태 동충하초 발효 추출물의 제조방법 및 이를 포함하는 지방간 억제용 약학조성물/ 2017.10.26./ 출원번호 10-2017-0140177
  2. 제품 특허 출원 2건: 자바라 및 죽선생
  3. 소재 기능성 특허 출원등록 진행중 1건 : 발아서목태 동충하초 발효물을 유효성분으로 포함하는 항염증 및 항알레르기 효능을 지니는 조성물/2018.08
- SCI급 논문 3건
- 논문 submit 1건
- 학회참석 포스터 12건

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
발아대두 동충하초 유용성분의 간기능 개선 효능을 간세포, 대식세포, 정상세포에서 검증하여 비알코올성 지방간, 지방간 유래 간염, 간 섬유화 예방 및 치료 가능성을 검증	40	100	지방간 효능에 대한 검증이 확립.
유전체 정보에 기반하여 유용성분 생산 기작 및 관련 유전자를 탐색하여 고부가가치바이오 소재를 생산할 수 있는 산업적 기반을 구축하고자 함.	40	100	유전체 기반 연구가 완료됨.
발아대두 동충하초 (C. militaris)의 NGS 기반 유전체 정보에 기반하여 탐색한 유효성분에 대한 비알코올성 지방간 치료에 대한 가능성을 검증하여 만성질환 개선 식·의약품 개발하고자 함.	10	95	효능이 입증되어 제약사와 협의 중.
발아대두 동충하초의 배양·생산체계 확립 및 산업용 바이오소재 대량 생산 조건 확립을 통한 산업소재 응용 제품 개발	10	90	소재의 대량 생산체계는 확립되었고, 제품생산이 진행 중에 있음.
합계	100	평균 96.25	우수함.

## III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견



2년 연구기간 동안 유전체 기반 연구를 비롯한 발굴 소재에 대한 효능평가, 특히 지방간에 탁월한 효능이 입증되어, 대웅제약회사에서 특허가 등록되는 시점에 제약화 하겠다는 제의가 들어 왔음. 본 연구 결과의 활용도가 식품뿐만 아니라 화장품, 제약 등의 분야에 다양하게 활용할 수 있는 우수한 연구결과를 도출되었음.

## 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

짧은 연구기간(2년) 유전체 기반 연구 및 발굴 소재의 효능평가에 시간에 할애되었고, 그 결과를 응용하여 제품으로 생산되기까지는 촉박한 시간이었음. 본격적인 제품생산은 과제 종료시점부터로 본 기초 연구 결과를 응용하여 앞으로 다양한 제품이 생산될 것을 확신함.

## 3. 연구결과 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 지방간 개선에 대한 식품 혹은 천연 의약품으로 개발
- 액상발효물을 음용수 혹은 핫아품 소재로 이용 가능
- 식품첨가물로서 다양한 분야에 응용 가능
- 대웅제약에서 특허등록시점에 제약화하기를 희망함.
- 연구 종료시점으로부터 3년 이내에 2개 이상의 제품생산이 가능함.

## IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

### 1. 연구책임자의 의견

### 2. 연구기관 자체의 검토결과



최종목표	1	2	1			1	2			
연구기간 내 달성실적	1	2	1			1	12			
달성율(% )	100	100	95			100	100			

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인 력 양 성	정책 활용 홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문		논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
											SC I	비 SC I								
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	2	1		1	1	2	16 0/6 건		1			3	1	4		6				
연구기간내 달성실적	4			1	1	2	15 0/5 건		1			3		12		7				
달성율 (%)	10 0			10 0	10 0	95	95		10 0			95		10 0		10 0				

#### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	발아대두 동충하초에 대한 시간대별 전사체 서열확보
②	발효 발아대두 동충하초의 대량 생산 기술 확보 (발효 및 배양조건 확립)
③	발효 발아대두 동충하초에 대한 효능, 특허 및 지방간에 대한 효능이 입증됨.
④	C. militaris 전사체 분석 기술

#### 5. 연구결과별 기술적 수준 (\* 각 해당란에 v 표시)

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소 화 흡 수	외국기술 개 선 개 량	특허 출 원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술		v						v		
②의 기술	v	v					v			
③의 기술	v	v				v	v			
④의 기술					v					

#### 6. 각 연구결과별 구체적 활용계획



핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	우량 균주 선발에 활용
②의 기술	식품, 화장품, 의약품 등 다양한 분야의 신소재를 활용
③의 기술	지방간 개선에 식품 및 의약품 개발
④의 기술	전사체 기반 unigene , splicing 탐색 기술 등으로 확장시키는 기반으로 활용

### 7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	전략 미생물 해독	유용 유전자 원 확보	사업화 · 실용화	표준 유전체 해독	메타지 놈 분석	유전체 분석기 술개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마 커개발	병원성 미생물 정보완 성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표			식품, 의약품 판매 및 매출증대							
연구기간 내 달성실적			1							
연구종료 후 성과창출 계획			2							

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실 시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구 활용등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I						
단위	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표																			
연구기간내 달성실적	4			1	1	1	15 0/ 4 건		1										
연구종료후 성과창출 계획		4				2	3 건		1		2								



#### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈 다부처유전체 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈 다부처유전체 사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

<첨부1>

평가의견에 대한 조치 및 개인정보 삭제 확인서

□ 평가의견에 대한 조치

평가의견	조치내용	비고
<p>○ 대두 발아 동충하초 추출물에 대한 연구, 개발에서 서목태 발아 동충하초로 특히, 발효과정까지 추가된 배경설명</p>	<p>○ (주) 세포활성연구소 : 서목태 발아 동충하초의 발효과정 및 배경설명 추가 (최종보고서p.17에 제시함.)                      - 식품의 체내 이용율을 높이는 것이 영양학적, 생리학적으로 매우 중요하다. 이용률을 높이는 방법 중의 하나가 추출물을 이용하는 것인데, 이 방법은 체내에 필요한 유효성분을 완전히 추출할 수 없고, 추출과정 중 loss분이나 경제적 고비용이 수반된다. 반면, 일반적인 추출공법에 비해 소재의 소화 흡수율을 높이는 방법은 발효공법이다. 이는 유효성분을 최대로 이용할 수 있을 뿐만 아니라 매우 경제적인 방법이다.                      - 즉, 발효과정은 이용효율을 높이고 비용은 낮춰줄 수 있는 방법이고, 발효과정 중 유효성분이 배가 되는 것이 확인되어 금번 연구에서는 이 방법을 선택하게 되었다.                      - 또한 발효물이 지방간 억제효능에 뛰어난 것이 확인되어 발효공정이 추가됨</p>	
<p>○ 발아대두 추출물 혹은 서목태 발아 동충하초발효 추출물에 대한 안정성평가 실시 유무.</p>	<p>○ (주) 세포활성연구소 : 추출물 및 발효물에 대한 산화 안정성 및 미생물 오염 안정성을 확인하였다.                      ○ 가천대학교 : 세포실험을 통해 가 추출물 및 발효물의 세포독성 평가를 진행하였다. 세포생존율에 큰 영향을 미치지 않았다. (최종보고서 p.26-27에 제시함.)</p>	
<p>○ 유전체 분석과 산업화 시킬려고하는 소재의 특징화를 좀더 결부시켜 보고서를 보완 작성할 필요가 있다고 생각됨.</p>	<p>○ (주) 세포활성연구소 : 유전체 분석을 통해 유효성분인 Cordycepin의 함량이 동충하초 버섯 평균 배양을 통해 증가되고, 특히 발효과정에 증가됨이 확인되어, 동충하초의 지표물질인 Cordycepin함량을 높여 소재 및 원료의 부가가치를 높였으며, 산업화에 적극적인 도움이 기대된다. (최종보고서 p.25에 제시함.)                      ○ 가천대학교 : 효능평가 측면에서 추출물 및 발효물의 지방간 개선 효능이 나타남을 발견하였음                      ○ 인천대학교 : 실제 활성이 있는 단일 물질에 대한 유전체 분석은 본 과제의 범위에 해당되지 않으나 추후 연구를 통해 규명 할 필요가 있다.</p>	

<p>○ SCI 논문이 과제가 거리가 있기 때문에 조정할 필요가 있음.</p>	<p>○ 가천대학교 : 논문 1건은 Journal of Medicinal Food (IF=1.954)의 저널에서 현재 accept 완료됨. 아직 발간은 되지 않았고 논문유사성 평가 중임. 두번째 논문은 작성 중으로 이어서 올해 내 제출할 예정입니다. 후속 조사로 내년에 성과입력예정. (최종보고서 p.51에 제시함.)</p>
<p>○ 서목태라는 식물을 기주체로 이용한 연구결과는 사업화가 가능한 것으로 생각되나, 기존의 곤충을 이용한 동충하초의 연구결과와의 비교에 의한 결과 도출이 이루어졌으면 함.</p>	<p>○ (주) 세포활성연구소 : 기존의 곤충을 이용한 동충하초의 경우, 풍미가 좋지 않아 제품화에 어려움이 있어 상용화에 한계가 있었다. 본 발아서목태 동충하초의 경우, 풍미가 좋을 뿐만 아니라 콩에서 유래된 isoflavone 유도체를 비롯한 다양한 유효성분이 검출되어 기 곤충을 이용한 동충하초에 비해 부가가치가 높고, 활용도가 높다. (최종보고서 p.25에 제시함.)</p> <p>○ 가천대학교 : 최종결과보고서 p.26-39에 제시된 결과는 ‘동충하초 vs 발아서목태 동충하초 vs 유산균 발효한 발아서목태 동충하초’ 를 비교한 연구결과입니다. 그러나, 곤충으로 배양한 동충하초는 본 과제의 범위를 넘어서는 것으로 비교결과는 없습니다.</p>
<p>○ 또한 기존의 현미를 이용한 동충하초와의 비교, 분석이 필요할 것으로 생각됨</p>	<p>○ (주) 세포활성연구소 : 현미배양 동충하초에 비해 콩에 배양할 경우, 콩에서 유래된 isoflavone을 비롯해 peptide, 단쇄 지방산 (short chain fatty acid) 등의 성분이 생성되어 현미배양 동충하초보다 월등한 부가가치를 갖게 된다. (최종보고서p.25에 제시함.)</p>
<p>○ 연구결과를 이용한 산업화의 로드맵을 자세히 서술할 필요가 있음</p>	<p>○ (주) 세포활성연구소 : 사업화 방향은 크게 2가지다. 신규 소재로서 활용하는 방안과 금번 밝혀진 지방간에 효과를 나타내어 신규 제품 간바라를 생산 및 보급하는 방법이 있다. 금번 연구 결과를 활용하여 국내외 식품 및 화장품, 의약품 소재를 공급하기로 국내는 물론 중국과 일본에 협의함. (최종보고서 p.24에 제시함.)</p>

□ 개인정보 삭제 확인

본인은 연구과제 최종보고서의 개인정보(주민등록번호 등)를 삭제하여 제출함을 확인합니다.

2018. 08. 31.

주관연구책임자 : 박 동 기





<첨부4>

최종보고서 관련제출 문서(첨부 제출 양식)

과제정보	문서 제출 내역										
	우편 발송					PDF파일 탑재					
과제명	연구 책임자	최종 보고서 1부	연구 개발 보고서 초록 1부	자체 평가 의견서 1부	연구 결과 활용 계획서 1부	평가의견에 대한 조치 및 확인서 1부	최종보고서 배포결과보고 1부	최종 보고서	연구 개발 보고서 초록	자체 평가 의견서	연구 결과 활용 계획서
유전체 기반 유용머섯 유래 산업용 바이오소재 개발	박동기	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
:	:										
:	:										

<첨부5>

**최종보고서 배포결과**

대상기관	제출 내역
농림축산식품부 자료실	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 최종보고서 1부</li> <li>• 전자매체 1점</li> </ul>
국가기록원	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 최종보고서 3부</li> </ul>
국립중앙도서관	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 최종보고서 3부</li> <li>• 전자매체 1점</li> </ul>
국회도서관	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 최종보고서 2부</li> <li>• 전자매체 1점</li> </ul>
사업단 사무국	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 최종보고서 1부</li> <li>• 전자매체 1점</li> </ul>
기타 기관 (연구책임자 제량)	<p>농림식품기술기획평가원</p> <p>1)공문, 최종보고서, 초록, 자체평가의견서, 연구결과 활용계획서 각 1부,                  2)최종보고서,초록,자체평가의견서,연구결과활용계획서 각 전자문서                  3)평가의견에 대한 조치 및 개인정보 삭제 확인서, 관련문서 제출양식,                  배포결과서, 배포결과 증빙자료 (영수증 자료) 각 1부</p>

\* 증빙자료(등기 영수증 사본) 별도첨부

\* 정확한 배포 내역은 발간등록번호와 함께 연구책임자 이메일로 안내



## 최종보고서 배포결과 증빙자료 (영수증)

1. 농림축산식품부 자료실 (30110) 세종특별자치시 다솜2로 94 정부세종청사 농림축산식품부 자료실
2. 국가기록원 (13448) 경기도 성남시 수정구 대왕판교로 851번길 30번 (시흥동231) 국가기록원 서울 기록관 수집공개과
3. 국립중앙도서관 (06579) 서울시 서초구 반포4동 국립중앙도서관 자료수집과
4. 국회도서관 (07233) 서울시 영등포구 여의도동 1번지 국회도서관 정보봉사국 자료수집과
5. 농림식품기술기획평가원 (431-810) 경기도 안양시 동안구 부림로 166 후양빌딩 6층 수출사업화팀
6. 사업단 사무국 (03722) 서울시 서대문구 연세로50 첨단과학기술연구원 310호 미생물유전체사업단

성남기전대학교우편취급국  
 101-83-02925 ☎031-751-0004  
 경기도 성남시 수정구 성남대로 1342 (복정동)  
 고객센터 전화 및 문자상담 : 1588-1300  
 평일(09~18시), 토요일(09~13시), 공휴일(ARS만가)  
 우체국 영업시간: 평일(09~18시), 토요일 휴무  
 접수번호 : 10286978  
 접수일자 : 2018-11-08 15:44, 창구 02 강명균

<국내등기(통상/소포)우편물>  
 발송인 : 13403 세포활성연구소  
 경기도 성남시 중원구 둔촌대로388번길 24 (심

등기번호	요금	우편번호	수취인
14930-0209-4355 익일특급 통상	5,120	13449	국가기록원 서울
14930-0209-4356 익일특급 통상	3,680	03722	미생물유전체사업
14930-0209-4357 익일특급 통상	4,520	07233	국회도서관 정보
14930-0209-4358 익일특급 통상	3,680	30110	농림축산식품부
14930-0209-4359 익일특급 통상	5,120	06579	국립중앙도서관
<b>합계</b>	<b>5통</b>		<b>22,120원</b>
<b>총요금 :</b>			<b>(즉납) 22,120원</b>
<b>수납요금 :</b>			<b>22,120원</b>
<b>신용카드</b>			<b>22,120원</b>

카드번호 : 4499-14\*\*-\*\*\*\*-2501  
 카드사명 : 신한체크카드, 매입사명 : 신한  
 할부개월 : 일시불, 승인금액 : 22,120  
 승인번호 : 34044396, 가맹점번호 : 19945468  
 기프트카드잔액 :



성남기전대학교우편취급국  
 101-83-02925 ☎031-751-0004  
 경기도 성남시 수정구 성남대로 1342 (복정동)  
 고객센터 전화 및 문자상담 : 1588-1300  
 평일(09~18시), 토요일(09~13시), 공휴일(ARS만가)  
 우체국 영업시간: 평일(09~18시), 토요일 휴무  
 접수번호 : 10286983  
 접수일자 : 2018-11-08 16:02  
 접수자 : 창구 02 강명균

<국내등기(통상/소포)우편물>  
 발송인 : 13403 세포활성연구소  
 경기도 성남시 중원구 둔촌대로388번길 24 (심

등기번호	요금	우편번호	수취인
14930-0209-4371 익일특급 통상	3,800	14055	농림식품기술기획
<b>합계</b>	<b>1통</b>		<b>3,800원</b>
<b>총요금 :</b>			<b>(즉납) 3,800원</b>
<b>수납요금 :</b>			<b>3,800원</b>
<b>신용카드</b>			<b>3,800원</b>

카드번호 : 4499-14\*\*-\*\*\*\*-2501  
 카드사명 : 신한체크카드, 매입사명 : 신한  
 할부개월 : 일시불, 승인금액 : 3,800  
 승인번호 : 34208707, 가맹점번호 : 19945468  
 기프트카드잔액 :