

발간등록번호

11-1541000-001408-01

바이오컨버전 방법을 이용한 노지재배 목이버섯 유효성분 대량생산 및 제품화

(Mass production and marketing of functional components from
outside cultivation of ear mushroom using bioconversion methods)

가천대학교

농림수산식품자료실



0009211

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “바이오컨버전 방법을 이용한 노지재배 목이버섯 유효성분 대량생산 및 제 품화” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012년 7월 24일

주관연구기관명 : 가천대학교
주관연구책임자 : 남 명 진
세부연구책임자 : 남 명 진
연 구 원 : 김 득 애
연 구 원 : 김 선 주
연 구 원 : 유 동 훈
연 구 원 : 진 영 글
연 구 원 : 박 현 진
제1협동연구기관명 : 웰빙자연영농조합법인
협동연구책임자 : 이 영 일
연 구 원 : 최 성 진
제2협동연구기관명 : (주)에스티알바이오텍
협동연구책임자 : 이 상 중
연 구 원 : 박 선 옥
연 구 원 : 허 인 영
연 구 원 : 김 선 하
연 구 원 : 이 봉 진
연 구 원 : 정 병 석
제3협동연구기관명 : 굿셀라이프(주)
협동연구책임자 : 고 창 보
연 구 원 : 강 진 선
연 구 원 : 김 도 순
연 구 원 : 한 수 호
연 구 원 : 김 하 나

요 약 문

I. 제 목

과제명	바이오컨버전 방법을 이용한 노지재배 목이버섯 유효성분 대량생산 및 제품화
-----	---

II. 연구개발의 목표 및 필요성

<ul style="list-style-type: none">◦ 최종목표<ul style="list-style-type: none">▪ 노지재배 목이버섯의 추출물 및 바이오컨버전 산물의 유효성분 생리활성 작용기전을 규명하여 고부가가치 건강기능성 식품으로 개발 및 산업화하여 국내 농가 및 식품산업의 활성화를 도모함.◦ 세부연구목표<ul style="list-style-type: none">▪ 목이버섯의 노지 속성청정재배 방법 확립▪ 목이버섯 생리활성물질의 바이오컨버전 및 청정추출분리정제공정 개발▪ 한국인 호발암에 대한 목이버섯 추출물 및 바이오컨버전 산물의 항암효과▪ 목이버섯의 추출물 및 바이오컨버전 산물에 대한 면역활성 검색 및 시제품화
--

III. 연구개발 내용 및 범위

<ul style="list-style-type: none">▪ 목이버섯의 유효성분을 최대화하기 위한 노지 속성청정재배 방법 확립▪ 목이버섯 생리활성물질의 바이오컨버전 및 청정추출분리정제공정 개발▪ 목이버섯의 추출물 및 바이오컨버전 산물을 이용한 한국인 호발암의 항암 및 면역증진 효과 분석▪ 유효성분을 기능성 원료물질로 개발▪ 목이버섯의 추출물 및 바이오컨버전 산물의 시제품화

IV. 연구개발결과

- 제1세부과제 : 목이버섯 바이오컨버전산물의 암세포에 직접적인 항암효과 탐색 및 평가
: 항암효과를 나타내는 분자생물학적 기전 탐색
: 2D전기영동 단백질발현 분석을 통한 목이버섯 바이오컨버전산물의 항암 생리기전 규명
- 협동과제 1 : 노지재배 목이버섯의 수확량 및 유효성분을 최대화하기 위한 봉지 톱밥배지 개발 및 노지재배 방법의 확립을 통해 자연직사광을 직접 받는 자연환경에서의 목이버섯 생산 및 수확량 향상.
- 협동과제 2 : 협동과제1의 노지재배 목이버섯을 받아 면역활성을 획기적으로 향상시킨 목이버섯 자실체의 바이오컨버전산물 생산을 위해 효소처리 및 발효미생물을 이용한 바이오컨버전 발효공정 개발 및 소재화를 위한 청정추출분리 정제공정을 최적화 함.
: Pilot규모의 scale up을 위한 공정 특성화연구를 통해 500L 규모에서 목이버섯 자실체 바이오컨버전산물의 시제품 생산.
: 면역증진 효능 및 항암 효과 검증.
- 협동과제 3 : 목이버섯 바이오컨버전산물의 사람 말초혈액으로부터 분리한 면역세포인 monocyte, NK세포 및 T세포에 미치는 영향 분석을 통해 목이버섯 바이오컨버전 산물의 면역증진 기전을 밝혔으며, 또한 정상 및 종양이 유도된 실험동물에서 면역활성, 면역증진 효능 및 항암효과를 검증.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 국내 목이버섯 노지재배 관련 기술 농가 이전
- 고부가가치 건강식품의 개발로 목이버섯산업의 다각화
- 친환경 자연계 고급식품으로 경쟁력 강화
- 그린에너지 재배기술 보급으로 소득 증대
- 적은 노동력의 고부가가치 사업으로 인한 소득 증대
- 계절 및 특별한 재배시설의 제한을 받지 않아 생산비 절감
- 버섯배지의 원료인 참나무톱밥과 쌀겨의 친환경적 배지 사용에 의한 버섯배지 구입비용 절감
- 국내산 특용버섯 품종의 다양화로 신규수요 창출로 인한 소득증대
- 중국산 식품의 대체 효과로 인한 국내 농산물 소비 확대
- 목이버섯 대중화 및 산업화를 위해 목이버섯 바이오컨버전산물 소재를 함유하는 화장품 및 식품의 제품화 진행 및 매출 발생
- 향후 목이버섯 대중화, 산업화 및 수출을 통한 매출 증대와 더불어 사업성과 실적의 향상에 중점 노력

Summary

I. Title

Title	Mass production and marketing of functional components from outside cultivation of ear mushroom using bioconversion methods
-------	---

II. Goals of research and development

<ul style="list-style-type: none">○ final goal<ul style="list-style-type: none">■ Detect the bioactive mechanism of black mushroom, juda's ear for develop■ functional food development and industrialization of the domestic farm and food industry○ Detailed research objectives<ul style="list-style-type: none">■ Establish the clean cultivation method of black mushroom in open field.■ Develop the extract process of bioactive ingredient from black mushroom.■ Develop the bioactive ingredient bioconversion process of from black mushroom.■ Effect of black mushroom extract and bioconversion product in cancer which highly occurred with Korean.■ Effect of black mushroom extract and bioconversion product at human immune activity.
--

III. Contents of research and development

<ul style="list-style-type: none">■ Establish the open field cultivation method to maximize the active ingredients.■ Develop the extract process of bioactive ingredient from black mushroom.■ Assay the effect of black mushroom extract and bioconversion product at enhanced human immune activity and cancer.■ Functional food development with bioactive ingredient from black mushroom.■ Prototyping of black mushroom extract and bioconversion product.

IV. Result

- Primary research : Investigate anticancer activity of black mushroom bioconversion commodity in cancer cell line. Research molecular mechanism of anticancer activity. Investigate anticancer related protein activity of black mushroom bioconversion commodity in cancer cell line using 2DE method.
- Cooperative research 1 : Development of oak sawdust media to increasing of Black mushroom product and harvest rate at eco-friendly on field culture.
- Cooperative research 2 : Develop product process of bioconversion black mushroom to enhance immune activity. Minimize the bioconversion product process. Produce a prototype of black mushroom bioconversion commodity through pilot size scaled up. Investigate effect of immune activity and anti cancer activity.
- Cooperative research 3 : Enhanced Immune mechanism induced by black mushroom extract and bioconversion product was detected in Monocyte, NK cell and T cells. Also, Anti-cancer effect and enhanced-immune system were confirmed in black mushroom extract-treated normal group and black mushroom extract-treated cancer-induced mice group.

V. Advance of research results and achievements

- Technology Transfer of Black mushroom cultivation to domestic farm.
- Develop functional food and industrialization using Black mushroom bioactive ingredient
- Increase domestic farm's Competitiveness with eco-friendly natural Advanced Food
- increase domestic farm income with distribution of green energy production technologies.
- Increase domestic farm income with high value-added black mushroom business.
- Saving product cost due to black mushroom cultivation do not limited with seasons and facilities.
- culture cost save using eco-friendly natural material ,oak sawdust and rice bran, as a culture medium.
- Increase domestic farm income creating new demand due to diversification of special mushroom product.
- Harvest of black mushroom Substitute Chinese agricultural products.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Description for submission	2
Summary	3
Summary in English	4
Contents in English	6
Contents	7
part 1. introduction	8
part 2. present status of the techniques	13
part 3. Methods and Results	16
part 4. Evaluation	195
part 5. Practical technical information	199
part 6. Foreign technical information	205
part 7. References	207

목 차

제 출 문	2
요 약 문	3
영 문 요 약 문	4
영 문 목 차	6
목 차	7
제 1 장	연구개발과제의 개요	8
제 2 장	국내외 기술개발 현황	13
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	16
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	195
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	199
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	205
제 7 장	참고문헌	207

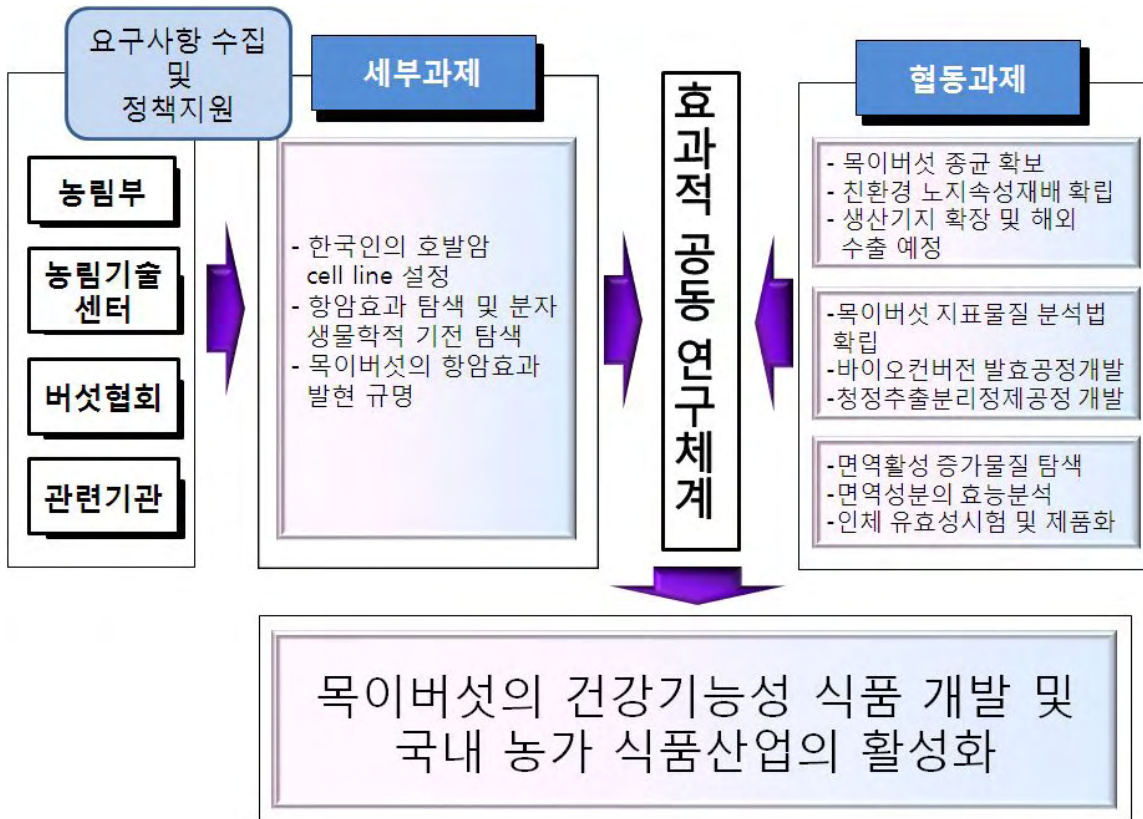
제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발 목표 및 내용

1) 연구개발의 최종목표 및 주요내용

- 최종목표 : 노지재배 목이버섯의 추출물 및 바이오컨버전 산물의 유효성분 생리활성 작용기전을 규명하여 고부가가치 건강기능성 식품으로 개발 및 산업화하여 국내 농가 및 식품산업의 활성화를 도모함.
- 최종 세부목표
 - 목이버섯의 노지 속성청정재배 방법 확립
 - 목이버섯 생리활성물질의 바이오컨버전 및 청정추출분리정제공정 개발
 - 한국인 호발암에 대한 목이버섯 추출물 및 바이오컨버전 산물의 항암효과
 - 목이버섯의 추출물 및 바이오컨버전 산물에 대한 면역 활성검색 및 시제품화

2) 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용



3) 연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분	세부과제별	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도 (2009년)	노지재배 목이버섯의 호발암 항암효과 연구 (세부과제)	한국인의 호발암 세포주 설정	<ul style="list-style-type: none"> · 한국인의 호발암 세포주 탐색 · 생리활성 연구를 위한 실험방법 확립
		목이버섯의 항암효과 탐색	<ul style="list-style-type: none"> · 목이버섯의 추출물 및 바이오컨버전 산물의 호발암에 대한 in vitro 항암효과 측정 · 목이버섯의 항암효과 최적농도 설정
	목이버섯의 노지 속성청정재배 방법 확립 (협동과제 1)	노지재배 목이버섯의 수확량 및 유효성분을 최대화하기 위한 봉지톱밥배지 확립	<ul style="list-style-type: none"> · 노지 속성재배용 목이버섯균(백두1호) 특성연구 · 노지 속성재배용 봉지톱밥배지 최적화
	생리활성 지표물질 분석법 확립과 목이버섯 자실체의 청정추출분리정 제공정 개발 (협동과제 2)	생리활성 지표물질 분석법 확립	<ul style="list-style-type: none"> · 지표물질:β-Glucan 구조의 수용성 단백다당체 등 · 정량분석법(HPLC) 확립 · 면역 활성측정 Bioassay 확립
		청정추출분리 정제공정 개발	· 목이버섯 자실체의 청정추출분리정제공정 최적화
		바이오컨버전 발효공정 개발	· 발효미생물의 평가 및 선정
	목이버섯의 추출물 및 바이오컨버전 산물의 면역활성 검색 및 유효성분의 시제품화 (협동과제 3)	목이버섯의 추출물 및 바이오컨버전 산물의 면역활성 증가 물질 탐색	<ul style="list-style-type: none"> · 바이오 컨버전 산물 및 추출물이 사람 면역계 세포에 미치는 영향을 평가 분석 연구 · 선천성, 후천성 및 중간 면역계의 주된 세포인 NK, T, 및 APC cell로 DC세포를 대상으로 면역 활성을 연구 · NK cell: 증식률 및 암세포 살상능 분석 · T세포: 증식률 및 활성화 · DC: monocyte로부터 분화 및 성숙

2차년도 (2010년)	노지재배 목이버섯의 호발암 항암효과 연구 (세부과제)	목이버섯의 항암효과에 특색을 나타내는 암세포의 분자생물학적 기전 탐색	<ul style="list-style-type: none"> · 목이버섯의 추출물 및 바이오컨버전 산물의 항암효과에 특색을 나타내는 cell line 설정 · 항암효과에 특색을 나타내는 암세포의 DNA를 이용한 프로그램화된 세포사멸확인
	목이버섯의 노지 속성청정재배 방법 확립 (협동과제 1)	노지재배 목이버섯의 봉지당 수확량 및 유효성분을 높이기 위한 톱밥배지봉지의 균사체 성장 최적화 연구	<ul style="list-style-type: none"> · 목이버섯 봉지재배용 톱밥배지 최적화 · 목이버섯 균주(백두1호)의 봉지 균사체 성장 최적화 · 국내 기후조건이 목이버섯 재배에 미치는 영향 평가
	Lab 규모에서 목이버섯의 바이오컨버전 발효공정 및 바이오컨버전 산물의 청정추출분리정 제공정 개발 (협동과제 2)	바이오컨버전 발효공정 개발	· Lab-scale에서 목이버섯 자실체의 발효미생물에 의한 바이오컨버전 발효조건 최적화
		청정추출분리 정제공정 개발	· Lab-scale에서 바이오컨버전 산물의 청정추출 분리정제 조건 최적화
		바이오컨버전 산물 제조 연구 수행	· 바이오컨버전 산물의 기능성 개선을 위한 연구수행
	목이버섯의 추출물 및 바이오컨버전 산물의 면역활성 검색 및 유효성분의 시제품화 (협동과제 3)	면역활성 증가 목이버섯의 추출물 및 바이오컨버전 산물을 포함한 formulation 제조 및 유효성분의 in vivo 효능분석	<ul style="list-style-type: none"> · 바이오 컨버전 산물의 효능을 극대화하기 위한 부형제로 면역활성 기능성 원료물질 및 다당체 물질을 포함하는 formulation 연구 및 제조 · 1차년도 결과 효능이 있는 세포를 대상으로 formulation 영향 비교분석 · 실험동물에서 효능분석 · 목이버섯의 추출물 및 바이오컨버전 산물의 유효성분이 체액성 면역활성에 미치는 영향평가 · 목이버섯의 추출물 및 바이오컨버전 산물의 유효성분이 세포성 면역활성에 미치는 영향평가 · 목이버섯의 추출물 및 바이오컨버전 산물의 유효성분이 항암 면역활성에 미치는 영향평가

3차 연도 (2011)	노지재배 목이버섯 바이오컨버전 산물의 호발암 항암효과 및 in vitro 면역 연구 (세부과제)	최적의 생리활성을 발현하는 목이버섯의 항암효과 규명	<ul style="list-style-type: none"> · 목이버섯의 바이오컨버전 산물의 항암효과를 나타내는 체장암세포에서 단백질분석방법을 이용한 표적단백질 규명 · 표적단백질의 발현을 웨스턴 블롯을 통하여 확인
		인간 PBMC를 이용한 면역효능 확인	<ul style="list-style-type: none"> · 사람 말초혈액으로부터 말초혈액단핵구세포 (PBMC) 분리 후, 면역 효능 규명 · 사이토카인 분비 측정 (interferon-γ, interleukin-1, interleukin-2, interleukin-6)
	Pilot 규모에서 목이버섯의 바이오컨버전 발효공정 및 바이오컨버전 산물의 청정추출분리정 제공정 개발 과 시제품 생산 및 면역활성 검색 (협동과제 1)	바이오컨버전 발효공정 개발	<ul style="list-style-type: none"> · Pilot-scale에서 목이버섯 자실체의 발효미생물에 의한 바이오컨버전 발효조건 scale-up. · 목이버섯 자실체의 바이오컨버전을 위한 발효미생물은 GRAS(generally recognized as safe) 미생물로 미국 FDA에서 안정성이 입증된 균주중 기능성식품 소재 개발에 적합한 미생물을 사용하여 목이버섯 자실체의 바이오컨버전 발효조건을 scale-up 함.
		생리활성물질 (유효성분)분석	<ul style="list-style-type: none"> · 크로마토그래피를 이용하여 바이오컨버전 산물의 분획을 분리하여 각각의 분획에 대한 면역활성 역가를 Bioassay를 통해 확인한 뒤 면역활성 역가가 확인된 분획에 대한 생리활성물질(유효성분)로서 β-Glucan 함량을 측정 · 면역활성 다다체를 순수 정제한 뒤 상기 면역활성 다당체의 구성당 조성비 등을 조사 · IR 및 NMR 측정을 수행하여 구조 특이성을 확인
		청정추출분리 정제공정 개발	<ul style="list-style-type: none"> · Pilot-scale에서 바이오컨버전 산물의 청정추출분리정제 scale-up · 목이버섯 자실체의 바이오컨버전 산물의 기능성식품 소재로의 개발을 위한 추출 분리정제 조건은 열수추출이 기초한 청정추출분리정제 조건을 scale-up 함.
		원료 시제품 생산	· 시제품 생산 및 사업화 준비
		바이오컨버전 산물의 in vivo 효능 검증	<ul style="list-style-type: none"> · 암세포주를 이식시킨 복수암 동물모델에서의 항암 효능 검증 동물 : ICR 마우스 암세포주 : Scarcoma 180세포주 ① 바이오컨버전산물의 수명연장 효과 : 생존기간 및 수명연장능 측정 ② 혈액학적 지표 분석

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 생산 및 시장현황

1) 국내 제품생산 및 시장 현황

- 미래 고부가가치 산업인 건강기능식품시장의 활성화 차원에서 식약청은 건강기능식품 인정 품목을 지속적으로 확대해 나갈.
- 기능성원료 인정현황을 보면 2004년 9건, 2005년 23건, 2006년 52건, 2007년 67건으로 매년 증가. 최근 5년간('04~'08) 인정받은 기능성 내용 중 면역기능으로 인정품목 10건 있음. 면역기능으로 받은 원료는 표고버섯 균사체, 당귀혼합 추출물, Enterococcus faecalis가열처리 건조분말, 금사상황버섯, L-글루타민, 게르마늄 효모가 있고 목이버섯은 장 건강에 기능성이 있다고 식품의약품안전청으로부터 기능성원료로 인정을 받음(식약청 인정현황, 2008년).
- 버섯을 이용한 건강기능식품 품목은 2008년 기준 117 품목으로 이들의 국내 판매액 및 수출액은 1,906,804(천원), 3,250달러이고 버섯제품 수입액은 1,629,000달러임(2008년도식품의약품통계연보, KFDA)
- 목이버섯을 대량 생산하거나 목이버섯을 이용한 건강기능식품이 미흡한 수준임
- 어린이용 건강식품은 면역력 증진과 원기회복에 좋은 홍삼제품 출시. 허준본가 '도담도담', 한국인삼공사 '홍이장군', 동원 F&B '키즐홍짱', 한삼인 '홍삼키즈', 한국야쿠르트 '플러스엔 홍삼튼튼' 등이 있음
- 목이버섯을 이용한 제품으로는 비타민하우스 '식이섬유 엔조이모닝'이라는 다이어트식품으로 제품 생산. 키토라이프 '키토장낙원' 제품, 미래&미 '블랙선식' 제품이 있음.
- 흰목이버섯을 이용하여 두뇌건강 제품으로 풀무원건강생활 '그린체트레이아 DHA'를 출시
- 하나바이오텍이 꽃송이버섯에서 수용성 나노크기로 추출하는 핵심기술을 가지고 초미세한 베타글루칸을 추출하여 제품화 했으며 식품, 의약품, 화장품 등에 면역활성, 황산화, 보습, 미백 관련 기능성 원료로 공급

2) 국외 제품생산 및 시장 현황

- 세계 건강식 시장은 향후 5년간 7.4%의 성장률이 예상
- BCC 컨설팅업체에 따르면 세계건강식시장은 2007년 1173억달러, 2008년 1239억달러 예상. 미국은 세계시장 점유율이 32.8%로 앞서 나가고 있음
- 버섯에 대한 연구개발 수준은 일본이 많이 앞서 있음
- 면역증강과 관련된 대부분의 버섯은 잎새버섯(maitake mushroom)으로, 버섯제품 144중 77개의 잎새버섯 제품이 있음. 제품 생산회사는 일본의 Maitake Products Inc. 임.
- 건강기능식품의 경우 외국에서는 우리나라처럼 먼저 식약청으로부터 허가를 받고 제품을 생산하는 것이 아니라 기업이 자유롭게 만들어 팔 수 있는 시스템을 추구하기 때문에 다양한 제품과 기술을 가짐
- 면역 및 항암 기능을 가진 목이버섯 건강기능식품은 없음

제 2 절 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

- 현대인은 산업화 및 공업화에 따른 각종 스트레스에 노출되어 있음. 이런 현대인의 건강을 위해서 물질 개발을 하게 되었음. 강장 등에 효과가 있다는 옛 문헌에 따라 목이버섯을 개발하게 되었으며 현재 우리나라에서는 거의 1차 농산물인 자실체의 형태인 건목이버섯 또는 생목이버섯 형태로 유통되고 있음. 특별한 시설을 하지 않고서도 짧은 시간에 대량의 생목이버섯을 생산하게 할 수 있고 목이버섯을 사용한 요리가 발달되어 있지 않기 때문에 목이버섯의 유효성분을 고역가로 생산할 수 있는 바이오컨버전 방법을 이용하여 고역가를 가진 유효성분을 추출하고 이 물질을 식약청으로부터 기능성원료로 인정을 받음.
- 이런 유효성분을 이용한 제품을 Maitake Products Inc. 처럼 건강기능식품으로 남녀노소를 대상으로 편리하고 쉽게 섭취할 수 있는 캡슐제나 정제 형태로 제품화.
- 이 제품을 생산하여 방문판매업체, 약국, 인터넷 쇼핑몰을 개설하여 제품을 판매 또는 건강기능식품으로 제조, 판매하는 국내외 기업에 기능성원료로 판매.

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1 절 세부과제

1) 한국인의 호발암 세포주 설정

- 한국인에게 발병률이 높은 호발암 세포주를 한국세포주 은행에서 분양 받았다.
- SNU-449 위암세포, SNU-484 간암세포, SNU-213 췌장암세포, SNU-1033 대장암세포, HCT-213 대장암세포
- 암세포는 10% FBS, 1% Antibiotics, 25mM HEPES가 첨가된 RPMI1640배지에서 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

2) 목이버섯의 항암효과 탐색

- 실험에 사용된 목이버섯 동결건조 시료(HD), 바이오컨버전 시료(Bio(t)), 수용성 바이오컨버전 시료(Bio(s))는 협동과제 연구기관인 (주)STR 바이오텍에서 제공받았으며, 각 세포별로 목이버섯 추출물이 미치는 영향을 세포 생존도 (MTT assay, RT-CES)를 이용하여 조사하였으며, 세포사(apoptosis)를 확인하기 위하여 COMET assay 와 TUNEL assay를 시행하였다.
- 또한 세포사가 어떤 경로를 통하여 일어나는지를 알기 위하여 잘 알려진 Bcl family protein, caspase family protein를 western blot을 통하여 그 발현량을 관찰하였다. 이 실험은 신호전달 체계를 분석하는데 사용하였다.
- 동결건조 시료(HD)는 목이버섯을 동결 건조하여 분쇄한 시료로써, 목이버섯의 수용성 부분과 불용성 부분이 모두 포함되어 있다. 모든 시료는 분말 형태이며, 1mg/ml 농도로 용매제에 녹여서 사용하였다.
- 바이오컨버전 시료(Bio(s), Bio(t))는 목이버섯을 bioconversion시켜 그 산물을 얻은 시료분말로써, 1mg/ml로 용매제에 녹여서 사용하였다. 모든 실험은 세가지 조건의 분말(HD, Bio(t), Bio(s))의 조건을 모두 사용하여 시행하였으며, 특정 분말에 효과가 있으면 그 분말을 dose-dependant하게 관찰하였다.
- RT-CES(Real-Time Cell Electronic Sensing)는 대부분의 세포가 살아있는 경우에 바닥에 adherent 형태로 자라는 특징을 이용하여 세포의 viability를 검사하는 실험기법이다. 세포가 바닥에 붙어서 성장하면, plate 바닥에 달린 전자 센서가 그 저항을 측정한다. 만약 세포가 바닥에 붙어 있다면 저항은 커지며 그것을 cell index로 표현하고 그 양에 따라 viability가 결정된다.

- RT-CES는 ACEA bioscience의 RT-CES analyzer를 사용하였으며, 16well E-plate를 사용하였다. 모든 실험결과는 4회 이상의 실험으로 통계처리를 하였다.

3) 3종 목이버섯 추출물을 사용한 암세포 증식 억제 실험(MTT assay)

- 3종 목이버섯 추출물을 10mg/ml로 PBS를 첨가하여 상온에서 1~2시간 shaker기를 이용하여 용해시킨 후, 14,000rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액을 취하여 사용하였으며, 목이버섯 추출물은 1.6ml EP tube에 분주하여 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.
- MTT assay는 살아있는 세포의 미토콘드리아 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)를 자주색을 띠는 비수용성의 MTT-formazan 결정으로 환원시키는 미토콘드리아의 활성을 측정하는 방법으로 신속하고 정확하게 많은 시료에 대한 세포 증식을 알 수 있다. 미토콘드리아 활성에 의해 생긴 자주색 결정은 DMSO에 용해되고 spectrophotometer로 570nm의 파장에서 측정하였다.
- MTT solution은 5mg/ml로 PBS를 첨가하여 0.2um filter로 여과한 후, 빛을 차단하여 4°C에 보관하면서 사용하였다.
- 배양한 암세포는 Hemocytometer을 이용하여 적정 세포수를 세어 96well plate에 분주하고 24시간을 배양한 후, 목이버섯을 농도별로 처리하고 24시간, 48시간 시간별로 배양하고 배지를 제거하여 MTT 용액 20ul와 배지 180ul를 넣은 후, incubator에서 4시간 배양한 다음 배지를 제거하고 DMSO를 200ul 넣고 30분 동안 shaking 시켜 흡광도를 측정하여 암세포의 증식률을 분석한다.
- MTT 실험의 결과는 3회 반복 수행을 통한 통계적인 결과이다.

Colon Cancer Cell Line (HCT-15)

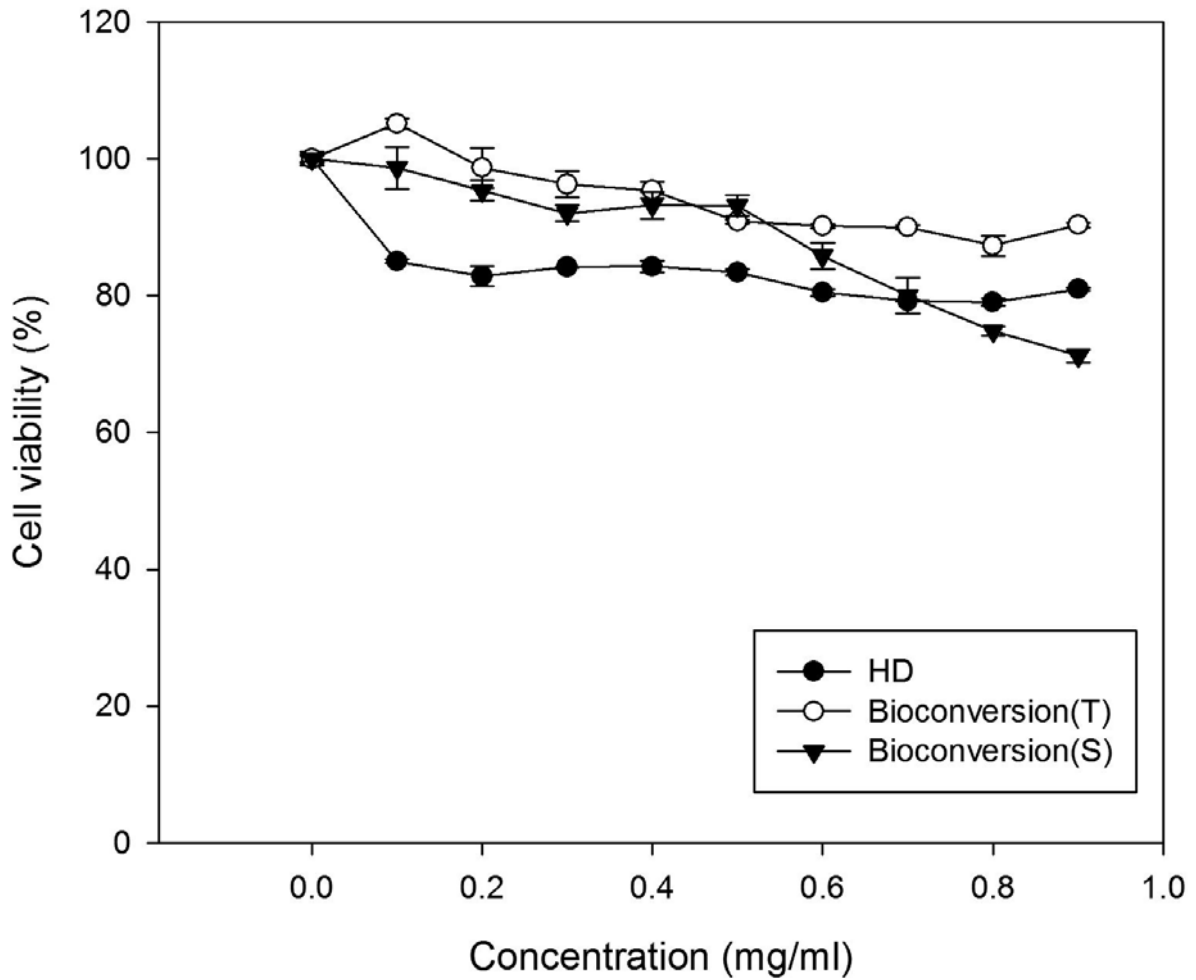


그림 1. 3종 목이버섯 시료가 시간-농도별 대장암세포 증식에 미치는 영향

- 3종 목이버섯 추출물을 0mg/ml에서 1mg/ml까지 처리한 결과, 대장암세포에서는 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말에서만 유의적인 세포독성이 있었다.
- 3종의 목이버섯 추출물을 24시간 처리 하였을 경우 전체적으로 대장암에 영향을 주었으나 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말을 처리한 대장암세포의 성장률이 약 70%까지 저해 된 것을 확인할 수 있었다.

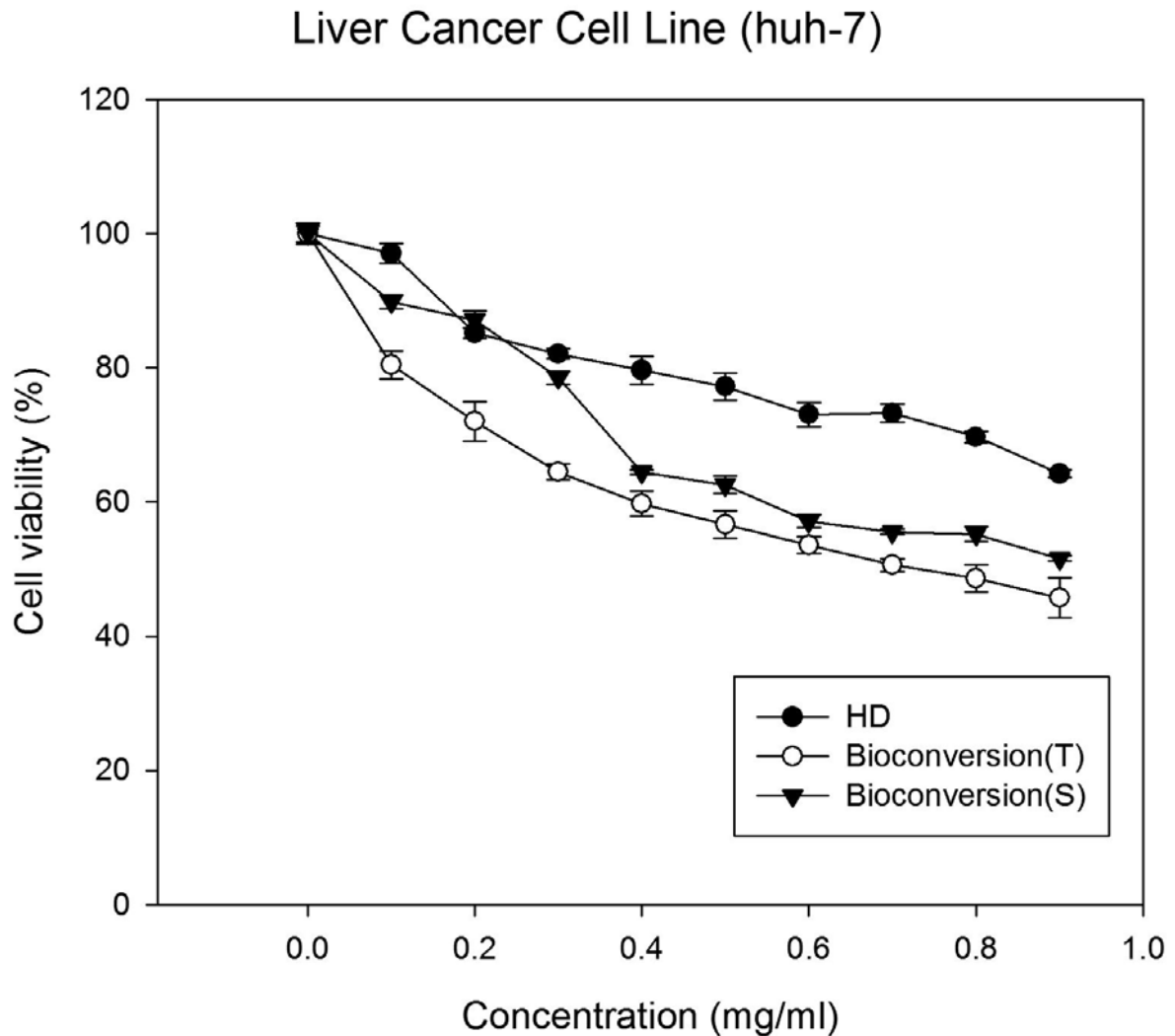


그림 2. 3종 목이버섯 시료가 시간-농도별 간암세포 증식에 미치는 영향

- 3종 목이버섯 추출물을 0mg/ml에서 1mg/ml까지 처리한 결과, 간암세포에서는 세종류의 분말에서 모두 세포독성이 있었다. 특히 그중에서도 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말에서 강한 세포독성을 나타내었다.
- PBS에 용해시킨 목이버섯 추출물을 0mg/ml에서 1mg/ml의 농도로 간암세포(huh-7)에 24시간 처리했을 때 암세포의 증식률이 다소 억제되는 경향을 보였다. 췌장암세포에 동결분말을 처리했을 때도 유의적인 변화를 보였으나, 간암세포(huh-7) 만큼 포괄적인 변화가 없었다.
- 3종의 목이버섯 추출물을 24시간 처리하였을 경우 전체적으로 간암에 영향을 주었으나 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말을 처리한 대장암세포의 성장률이 약 50%까지 저해된 것을 확인할 수 있었다.

Skin Cancer Cell Line (SK-MEL-5)

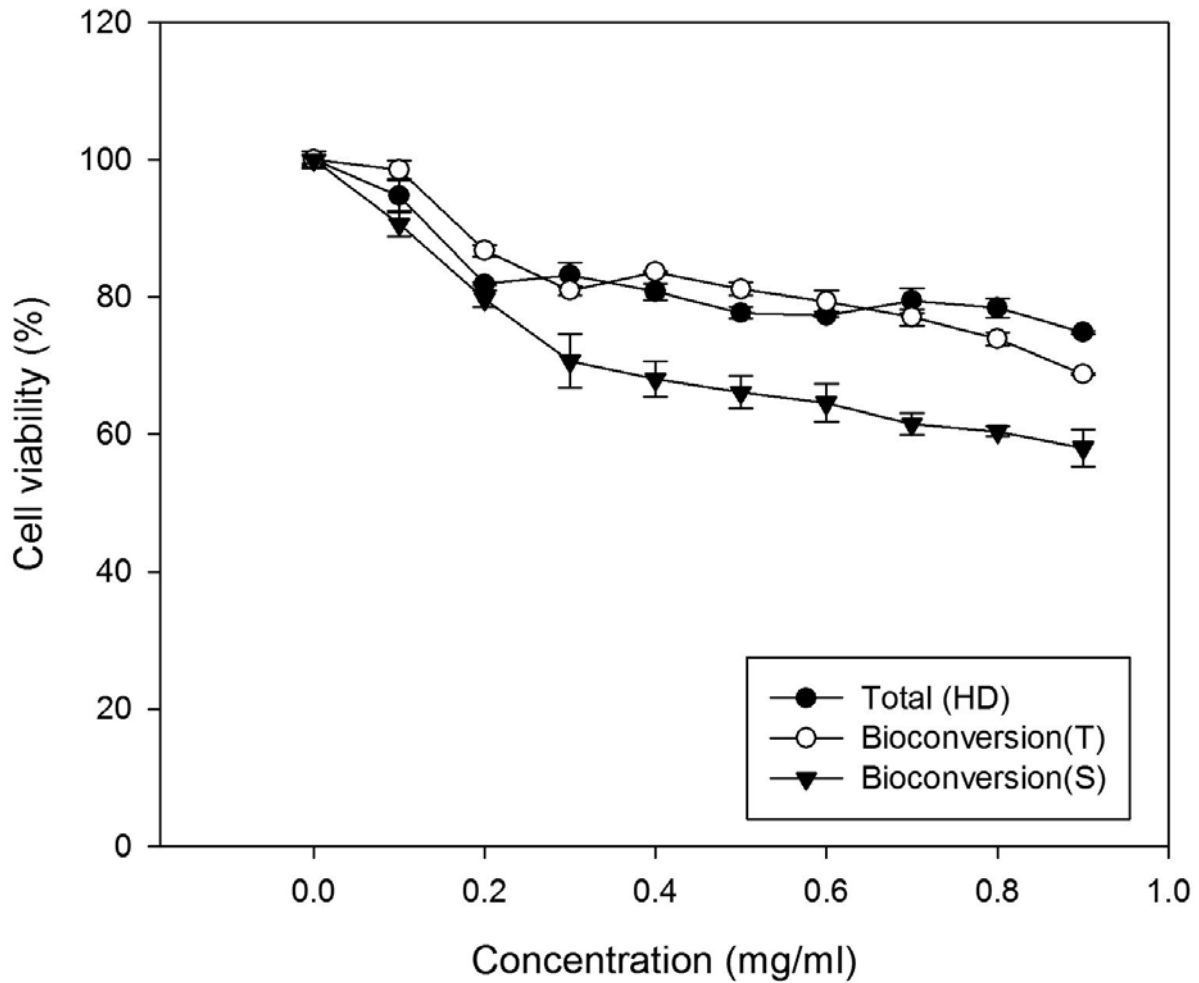


그림 3. 3종 목이버섯 시료가 시간-농도별 피부암세포 증식에 미치는 영향

- 3종 목이버섯 추출물을 0mg/ml에서 1mg/ml까지 처리한 결과, 피부세포에서는 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말에서만 유의적인 세포독성이 있었다.
- 3종의 목이버섯 추출물을 24시간 처리 하였을 경우 전체적으로 피부암에 영향을 주었으나 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말을 처리한 피부암세포의 성장률이 약 60%까지 저해 된 것을 확인할 수 있었다.

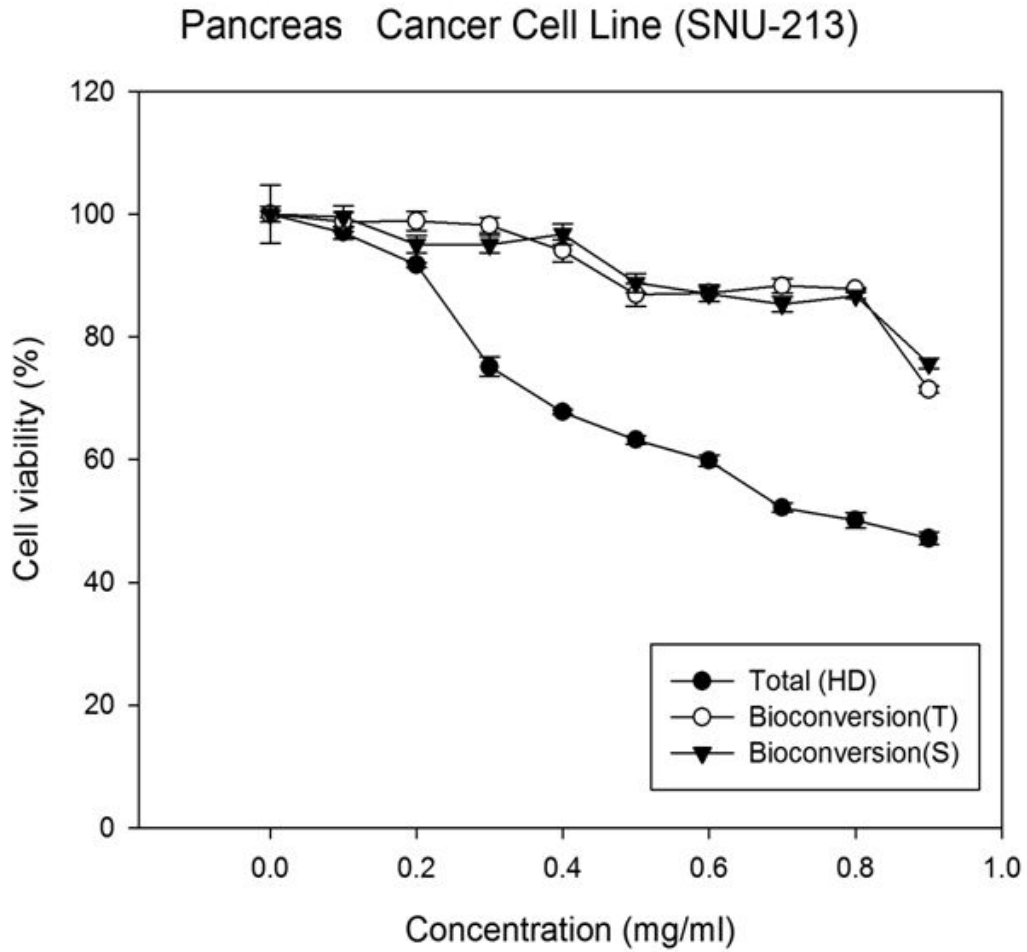


그림 4. 3종 목이버섯 시료가 시간-농도별 췌장암세포 증식에 미치는 영향

- 3종 목이버섯 추출물을 0mg/ml에서 1mg/ml까지 처리한 결과, 췌장암세포에서는 목이버섯 동결건조분말에서만 유의적인 세포독성이 있었다.
- 3종의 목이버섯 추출물을 24시간 처리하였을 경우 전체적으로 췌장암에 영향을 주었으나 목이버섯 동결건조분말을 처리한 췌장암세포의 성장률이 약 40%까지 저해 된 것을 확인할 수 있었다.

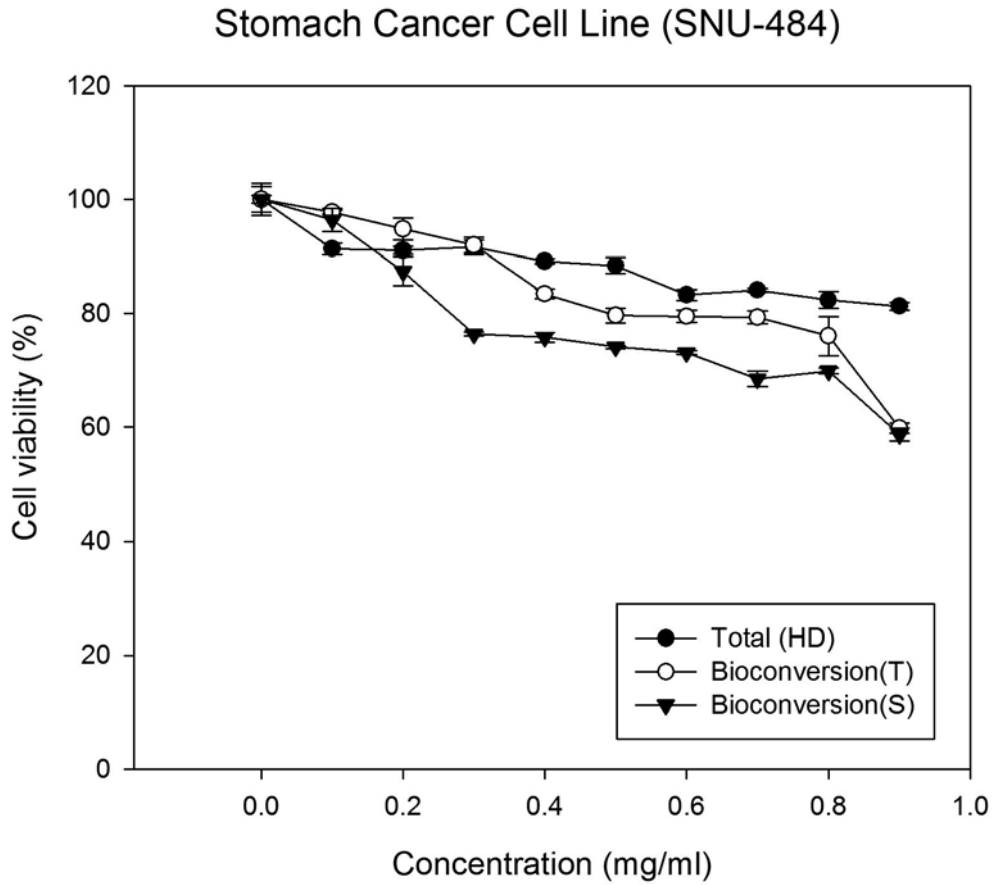


그림 5. 3종 목이버섯 시료가 시간-농도별 위암세포 증식에 미치는 영향

- 3종 목이버섯 추출물을 0mg/ml에서 1mg/ml까지 처리한 결과, 위암세포에서는 목이버섯 바이오컨버전 분말에서만 유의적인 세포독성이 있었다.

4) 3종 목이버섯 추출물을 사용한 TUNEL assay 실험

- TUNEL(Terminal deoxynucleotidyle transferase (TdT)-mediated dUTP nick-end labeling) assay는 형광을 이용하여 apoptosis를 in situ하게 검사하는 방법이다. Terminal deoxynucleotidyle transferase와 FITC-5-dUTP를 이용하면 DNA의 절단부위를 green fluorescence로 염색이 가능하다.
- 염색을 하여서 관찰할 경우, 세포의 핵 부위를 보기 위하여 propidium iodide로 염색하여 red fluorescence로 관찰하였다.
- 세포에서 apoptosis가 일어나게 될 경우 DNA가 절편화 되고, 그 절편화된 DNA는 FITC가 tagging된 dUTP와 반응한다. 이러한 과정을 거쳐서 apoptosis가 일어난 세포는 녹색으로 표시가 된다.
- 모든 세포는 slide에 seeding하여 하루 배양한 뒤, 1mg/ml의 농도를 가진 분말로 처리 하였으며, confocal현미경으로 PI, FITC, Merge이렇게 3개의 결과를 관찰하였다. Apoptosis가 일어난 경우 merge 결과에서 주황색(녹색+붉은색)으로 표시된다.

Colon Cancer Cell Line (HCT-15)

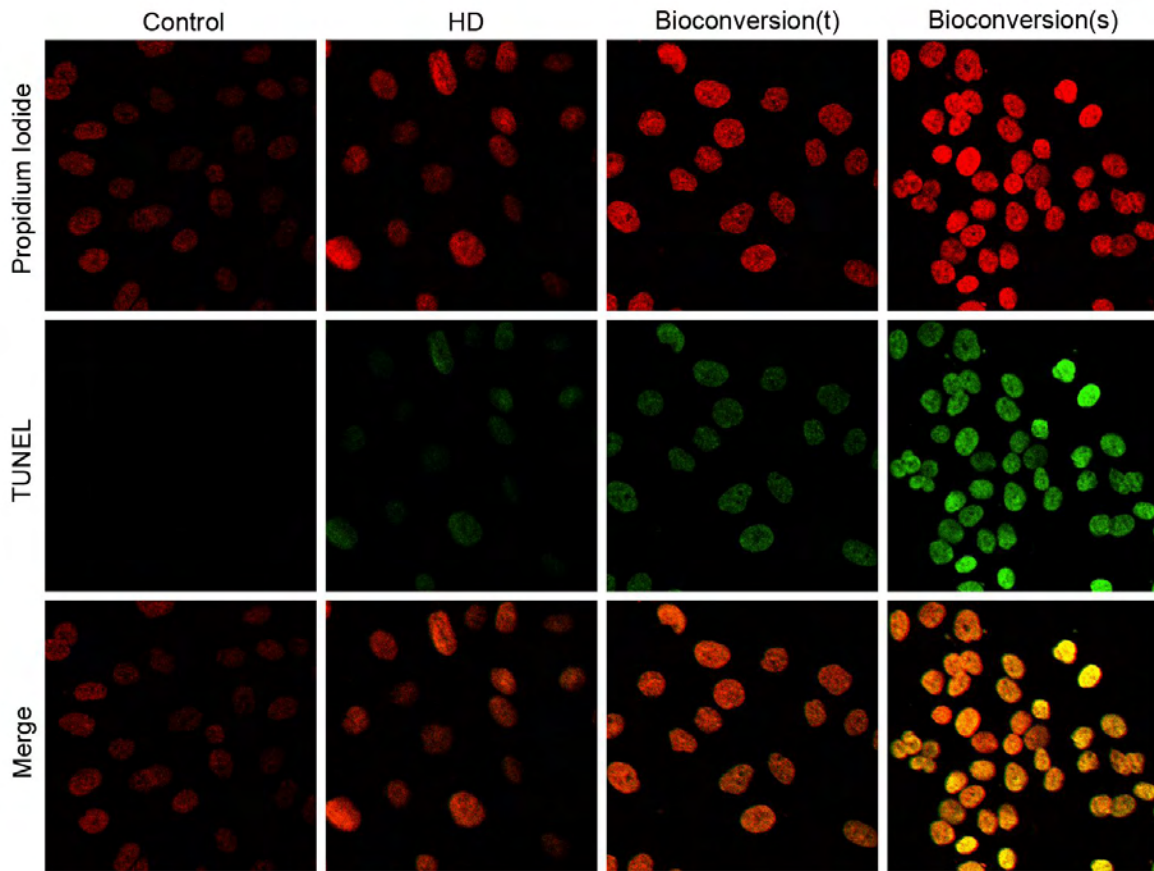


그림 6. 3종 목이버섯 시료를 1mg/ml의 농도로 대장암세포에 처리를 한 후 , 24시간 뒤 TUNEL assay를 시행한 실험

- 배양한 대장암세포에 3종 목이버섯 시료를 PBS에 녹여 1mg/ml의 농도로 처리를 한 후 TUNEL assay를 시행하였다. 그 후 PI 염색을 시행한 후 현광현미경을 사용하여 관찰한 결과 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말을 처리한 대장암세포에서 DNA leak 현상을 확인 할 수 있었다.
- DNA Leak 현상은 대표적인 세포사멸의 특성 중 하나로써 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말이 대장암세포에 대해 세포사멸 효과가 있다는 것을 보여주는 실험이고, TUNEL 염색법이 나, Propidium Iodide 염색법으로 염색이 되어 녹색이나 붉은색을 띄는 것은 대장암의 DNA Leak 현상을 보여준다.

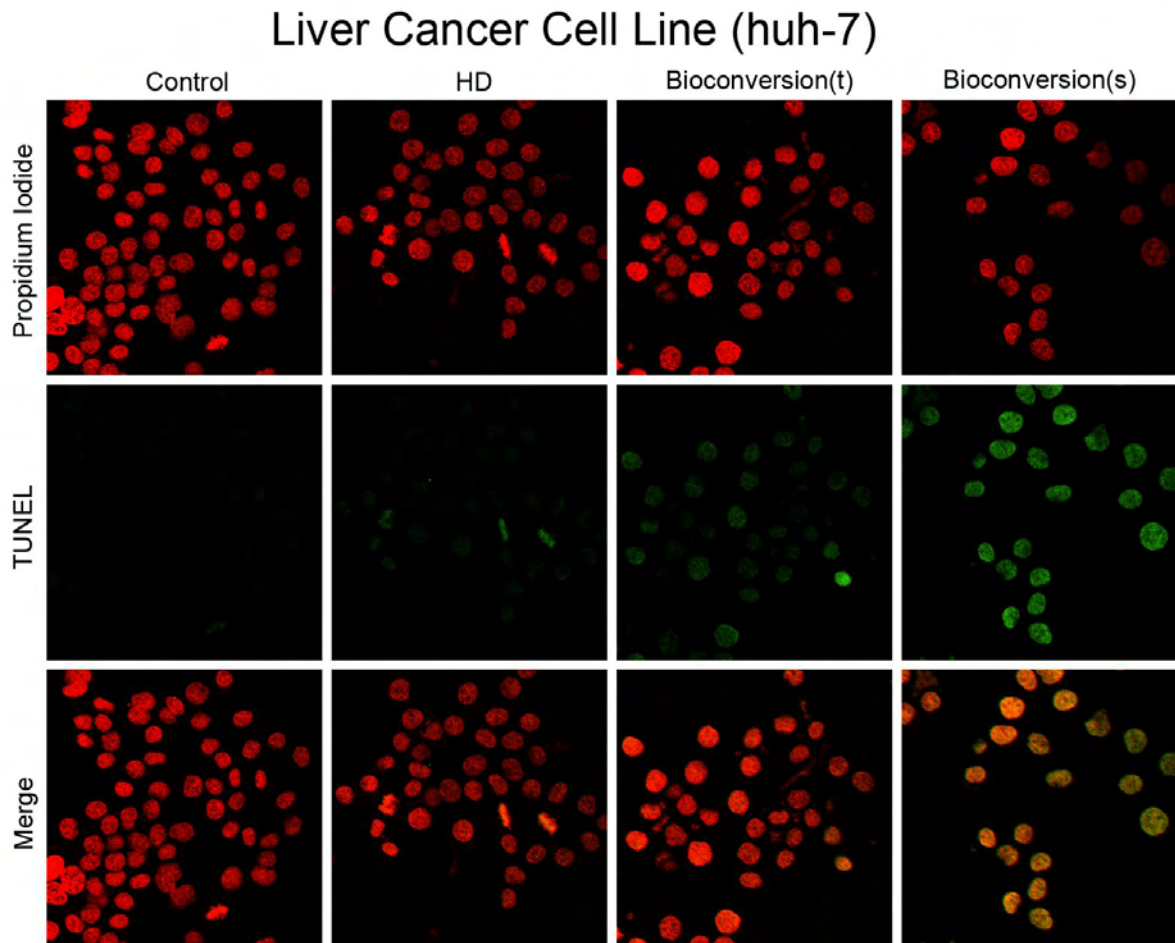


그림 7. 3종 목이버섯 시료를 1mg/ml의 농도로 간암세포에 처리를 한 후 24 시간 뒤 TUNEL assay를 시행한 실험

- 배양한 간암세포에 3종 목이버섯 시료를 PBS에 녹여 1mg/ml의 농도로 처리를 한 후 TUNEL assay를 시행하였다. 그 후 PI 염색을 시행한 후 현광현미경을 사용하여 관찰한 결과 목이버섯 바이오컨버전 수용성, 및 전체 분말을 처리한 간암세포에서 DNA leak 현상을 확인 할 수 있었다. 또한 동결분말에서도 약간의 leak현상이 관찰되었다.

Skin Cancer Cell Line (SK-MEL-5)

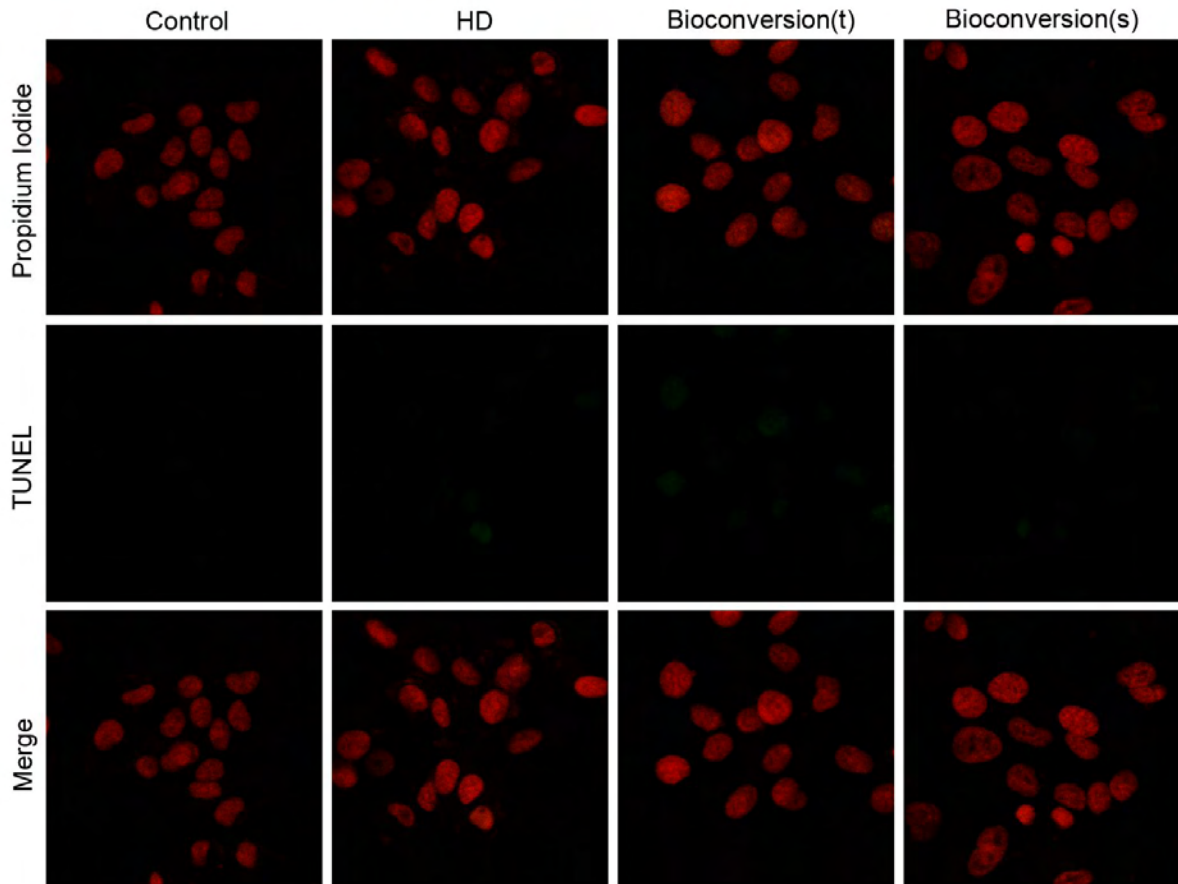


그림 8. 3종 목이버섯 시료를 1mg/ml의 농도로 피부암세포에 처리를 한 후, 2시간 뒤 TUNEL assay를 시행한 실험

- 배양한 피부암세포에 3종 목이버섯 분말을 PBS에 녹여 1mg/ml의 농도로 처리를 한 후 TUNEL assay를 시행하였다. 그 후 PI 염색을 시행한 후 현광현미경을 사용하여 관찰한 결과 DNA leak 현상을 확인 할 수 없었다.

Pancreas Cancer Cell Line (SNU-213)

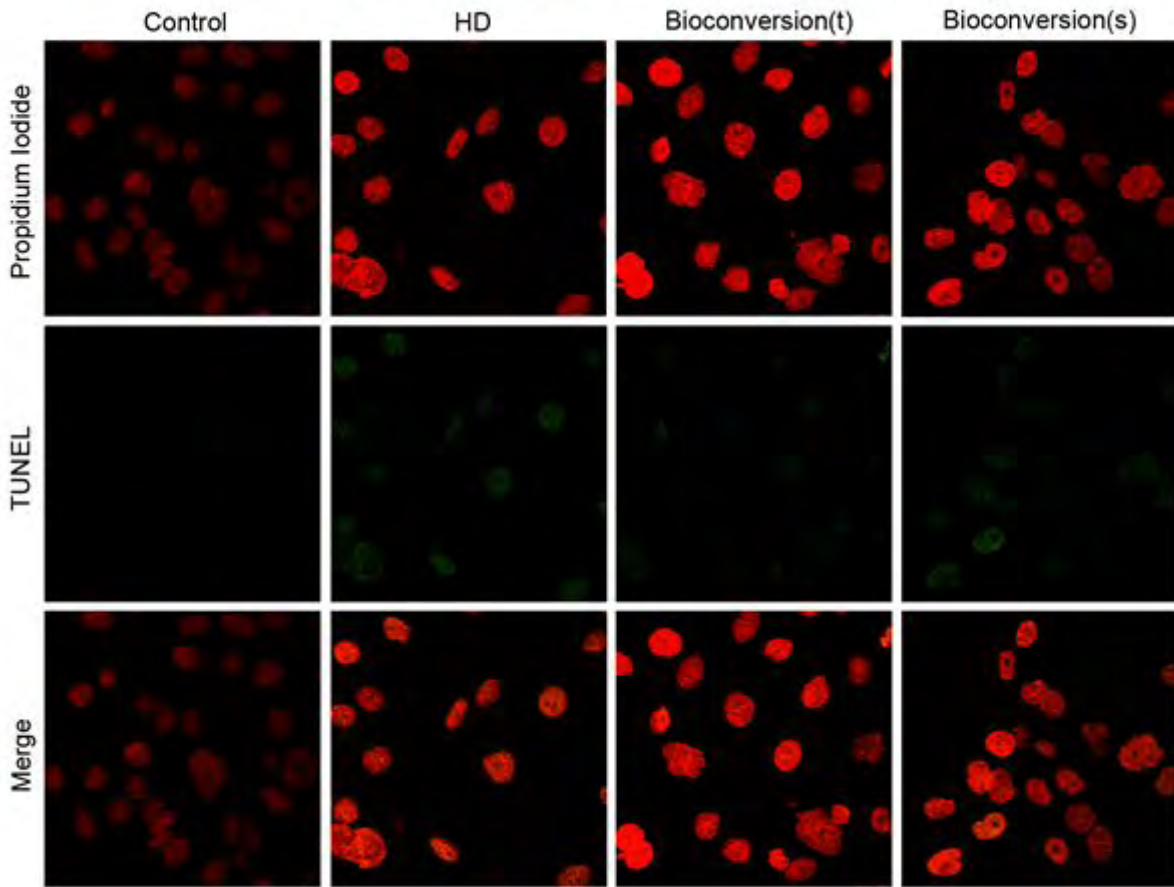


그림 9. 3종 목이버섯 시료를 1mg/ml의 농도로 췌장암세포에 처리를 한 후, 24시간 뒤 TUNEL assay를 시행한 실험

- 배양한 췌장암세포에 3종 목이버섯 시료를 PBS에 녹여 1mg/ml의 농도로 처리를 한 후 TUNEL assay를 시행하였다. 그 후 PI 염색을 시행한 후 현광현미경을 사용하여 관찰한 결과 동결건조 분말을 처리한 췌장암세포에서 DNA leak 현상을 확인하기 힘들었다.

Stomach Cancer Cell Line (SNU-484)

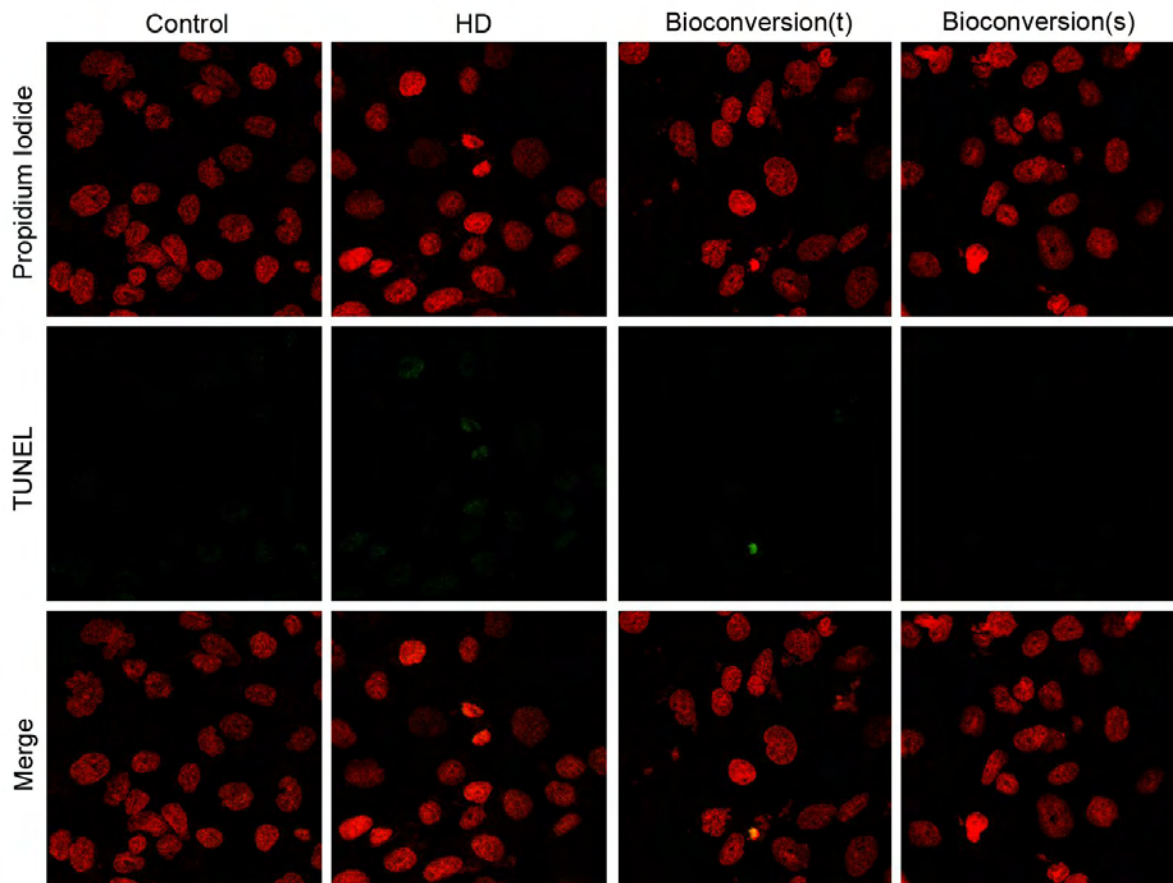


그림 10. 3종 목이버섯 시료를 1mg/ml의 농도로 위암세포에 처리를 한 후, 24시간 뒤 TUNEL assay를 시행한 실험

- 배양한 위암세포에 3종 목이버섯 시료를 PBS에 녹여 1mg/ml의 농도로 처리를 한 후 TUNEL assay를 시행하였다. 그 후 PI 염색을 시행한 후 현광현미경을 사용하여 관찰한 결과 DNA leak 현상을 확인 할 수 없었다.

	대장암세포	간암세포	피부암세포	췌장암세포	위암세포
HD	-	+	-	++	-
Bio(t)	-	++	-	-	-
Bio(s)	+++	+++	-	-	-

표 1. 5종류의 호발암세포에 3종 시료를 처리하였을 때, TUNEL assay 반응 결과 정도

- 배양한 5종의 호발암세포(대장, 간, 피부, 췌장, 위암)에 3종 목이버섯 시료를 PBS에 녹여 1mg/ml의 농도로 처리를 한 후 TUNEL assay를 시행하였다. 그 결과들은 세포와 시료에 따라 상이한 결과를 나타내었다.
- 이 중, 대장암세포는 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말에서만 활성을 보였으며, 췌장암세포는 동결건조 분말에서만 활성을 보였다. 그러나 간암세포는 모든 분말에서 TUNEL 활성이 보였다. 이러한 점을 종합해 보면, 췌장암세포와 대장암세포에서도 목이버섯의 세포사멸 기능이 있으나, 간암세포에서 가장 뚜렷하고 특징적인 반응을 나타낸다는 것이 관찰되었다. 또한 그 중에서도 바이오컨버전 2종 시료에서 특히 반응이 강하였다.

5) 3종 목이버섯 추출물을 사용한 western blot 실험

- 아래의 western blot assay는 apoptosis와 관련된 단백질의 antibody를 이용해 수행하였다.
- MTT, TUNEL assay결과를 토대로 비교적 효과를 나타내는 3종류의 세포를 선택하여 수행하였다 (간암세포, 대장암세포, 췌장암세포).
- Bcl family, PARP, caspase series, Akt와 같은 단백질의 antibody를 이용해 수행하였다.

Protein name	Function
Bak	pro-apoptotic protein mitochondria dysfunction, cytochrome c release mitochondria에 위치하며, tBid signal이 올 경우 cytosol로 이동하여 활성화
Bcl-xL	anti-apoptotic protein JNK에 의해 인산화 되며 apoptotic protein을 heterodimerization 시킨다.
Bid	pro-apoptotic protein BH3 domain only protein, induce mitochondria damage
Bik	pro-apoptotic protein BH3 domain only protein, induce mitochondria damage
PARP, cleaved-PARP	poly ADP ribose polymerase excutor of apoptosis activated in cleaved-form
Caspase family	apoptosis의 개시자, 실행단백질 activated in cleaved-form
Akt	pro-apoptotic protein Bcl family를 인산화 시켜서 apoptosis를 억제한다.
Actin	internal control

표 2. western blot에 사용된 antibody의 종류 및 기능

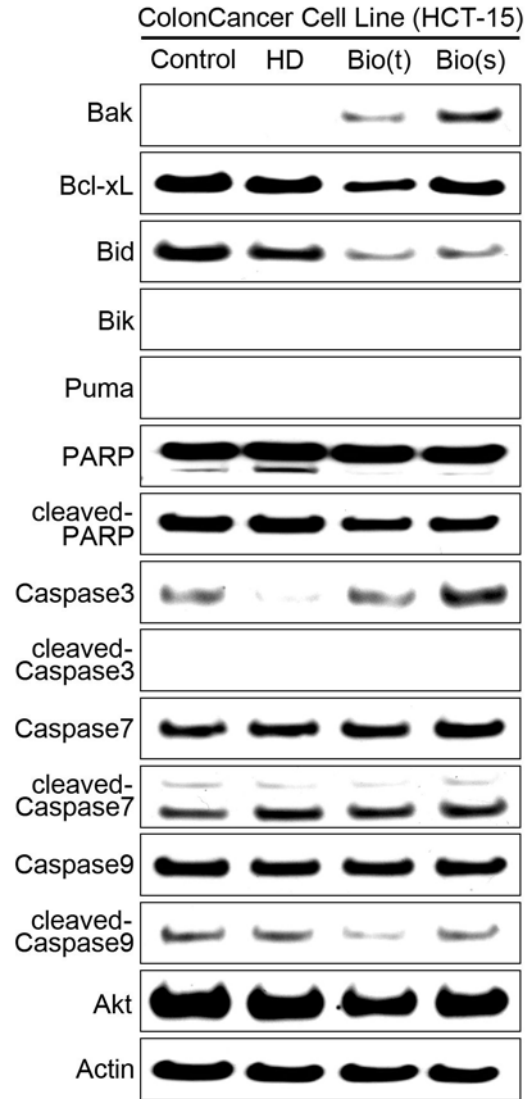


그림 11. 3종 목이버섯 시료를 1mg/ml 농도로 대장암세포에 처리를 한 후, 24시간 뒤 western blot assay를 시행한 실험

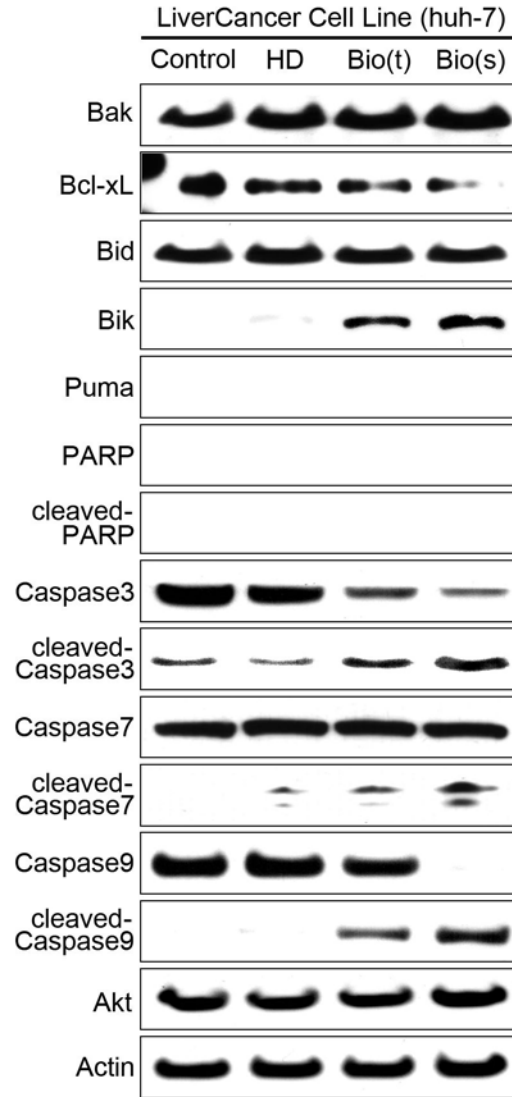


그림 12. 3종 목이버섯 시료를 1mg/ml 농도로 간세포에 처리를 한 후, 24시간 뒤 western blot assay를 시행한 실험

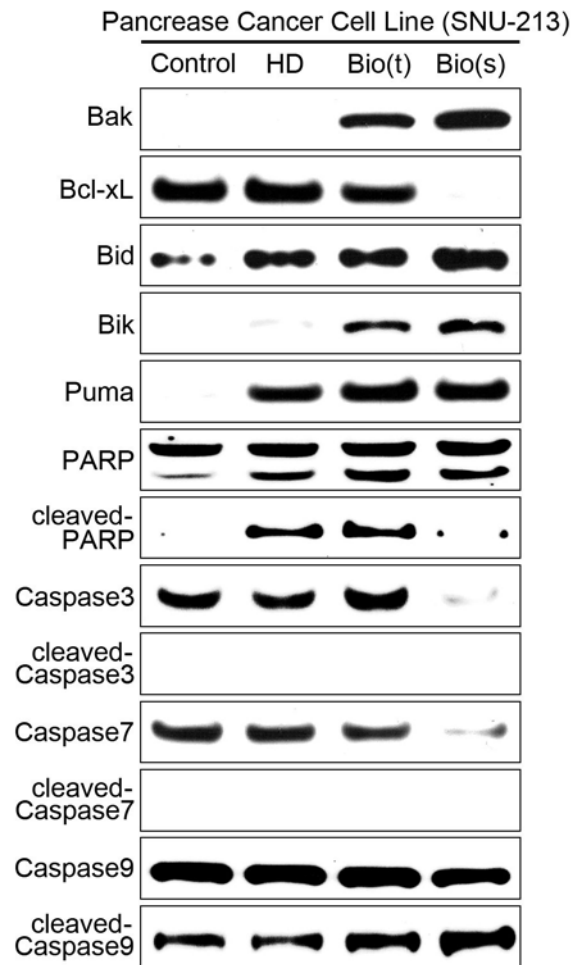


그림 13. 3종 목이버섯 시료를 1mg/ml 농도로 췌장암세포에 처리를 한 후, 24시간 뒤 western blot assay를 시행한 실험

- 상기의 apoptosis관련 단백질에 대한 western blot을 통하여 3가지 종류의 세포의 apoptosis signaling을 확인하였다.
- 3가지 세포중에서 간암세포(huh-7)에서의 효과가 가장 눈에 띄었으며, 이중에서도 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말에서 가장 큰 효과를 보였다.

6) 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말이 간암세포의 세포사멸에 미치는 영향

- MTT, TUNEL, western blot assay 결과를 토대로 5가지 세포에 3가지 시료를 처리했을 때 나타나는 반응을 살펴보았다.
- 세가지의 실험결과 간암세포인 huh-7에서 항암효과의 반응이 가장 좋았으며, 특히 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말에서의 효과가 눈에 띄었다.
- 이러한 결과를 토대로 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말이 간암세포에서 농도 특이적으로 항암효과를 갖는지 관찰하였다.

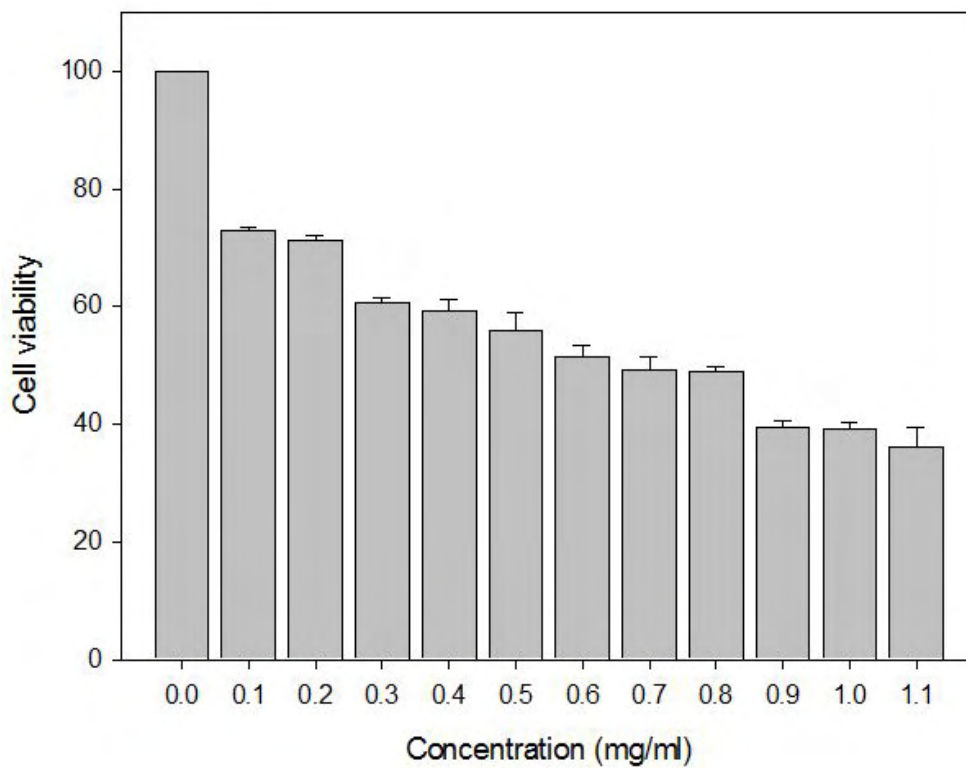


그림 14. 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말 시료를 (huh7)세포에 분말처리를 한 후, 24시간 뒤 MTT를 시행한 실험

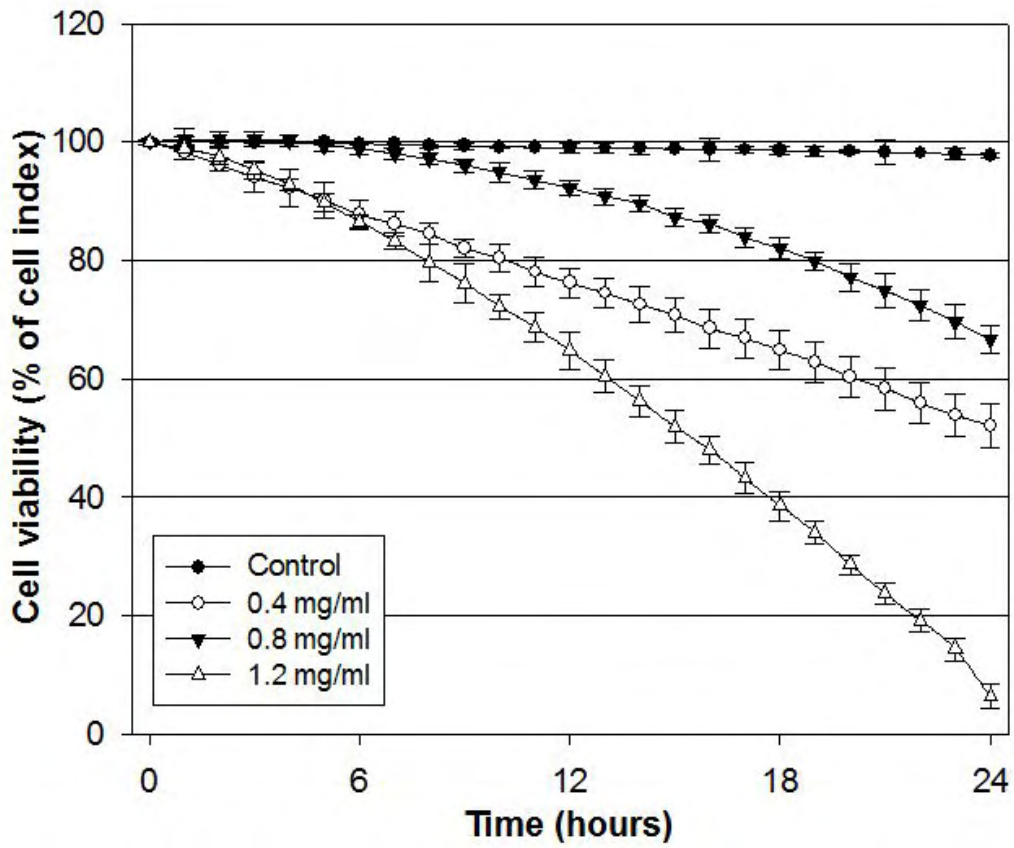


그림 15. 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말 시료를 간암(huh7)세포에 처리를 한 후, 24시간 뒤 RT-CES를 시행한 실험

Liver Cancer Cell Line (huh-7)

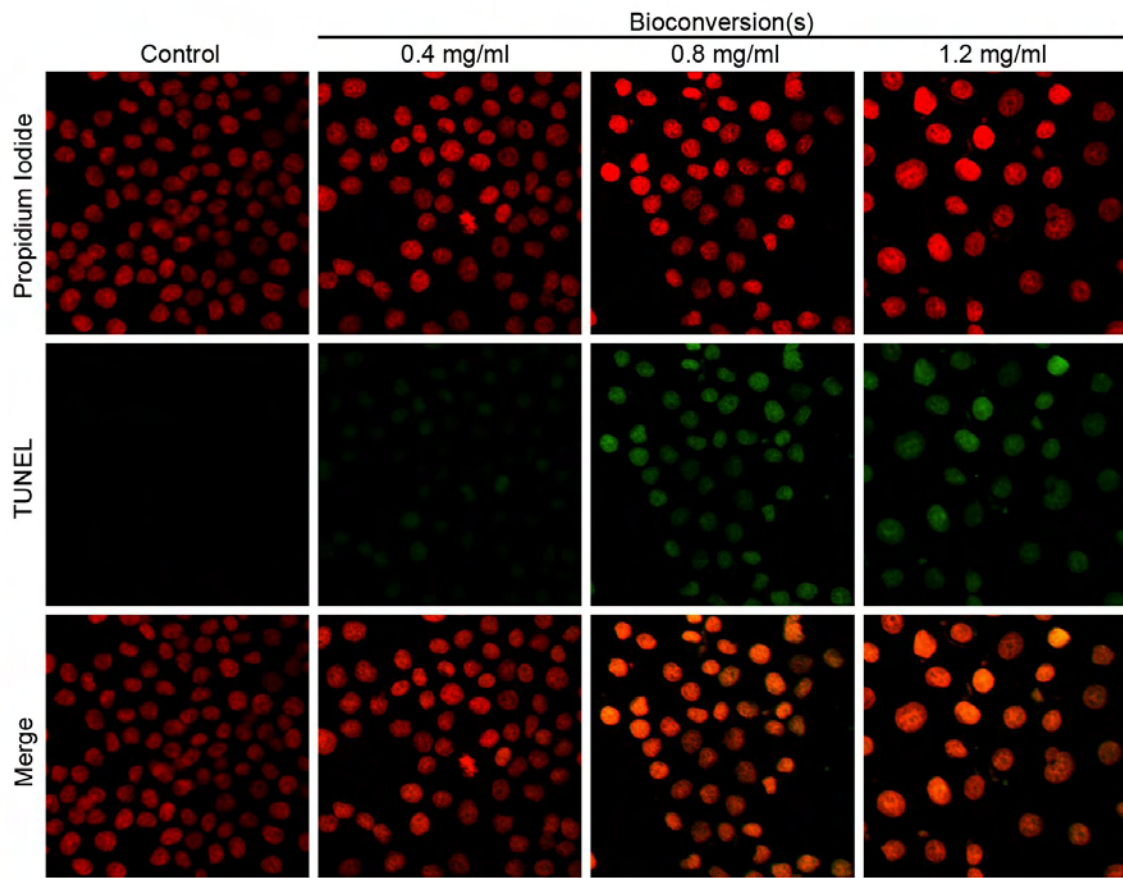


그림 16. 간암세포(huh-7)에 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말을 처리했을 때의 TUNEL assay를 시행

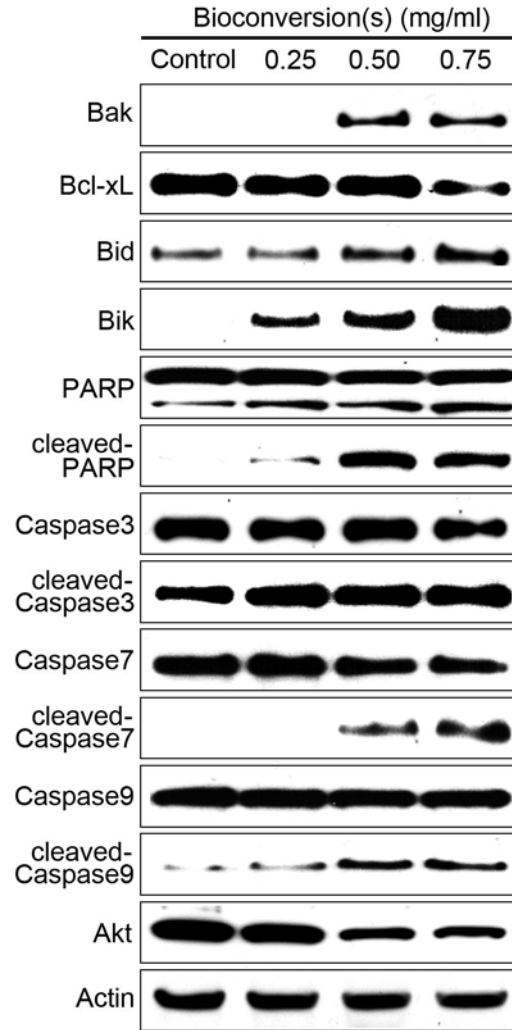


그림 17. 간암세포 (huh-7)에 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말을 처리했을 때의 western blot assay

- 상기의 실험결과를 종합했을때 간암세포에서의 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말의 항암 작용은 농도 특이적이다.
- 이와 같은 토대로 간암세포에서 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말이 세포를 사멸시키며, 그 과정은 괴사가 아닌 프로그램화 된 세포사멸(apoptosis)임을 알 수 있었다.
- 또한 함암작용을 나타낸다고 결론짓기 위해서는 일반 간암세포에서의 세포독성이 없다는 것 또한 밝혔다. (아래 실험결과)

7) 일반 간세포에서의 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말의 세포독성 실험

- 일반 간세포로서 CHANG 세포를 사용하였다

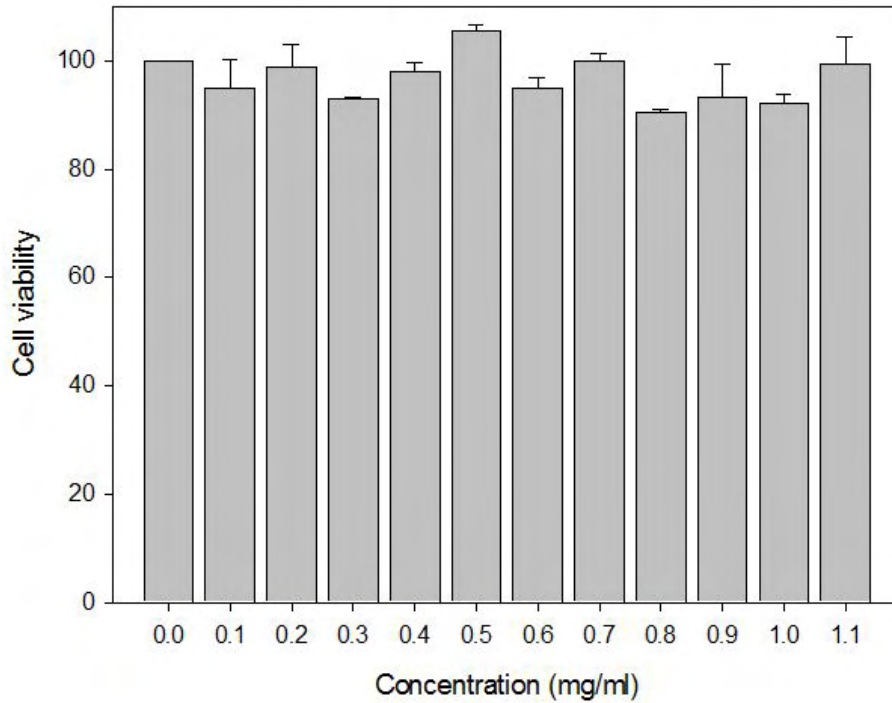


그림 18. 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말 시료를 정상 간세포(CHANG)에 처리를 한 후, 24시간 뒤 MTT를 시행한 실험

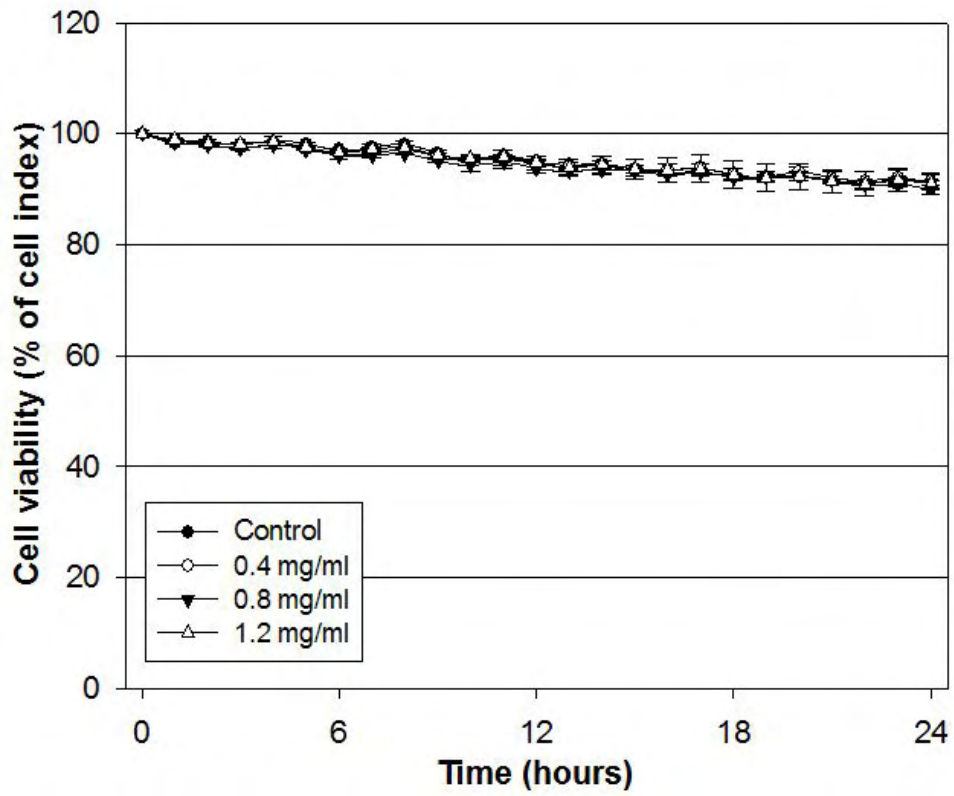


그림 19. 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말 시료를 정상 간세포(CHANG)에 처리를 한 후, 24시간 뒤 RT-CES를 시행한 실험

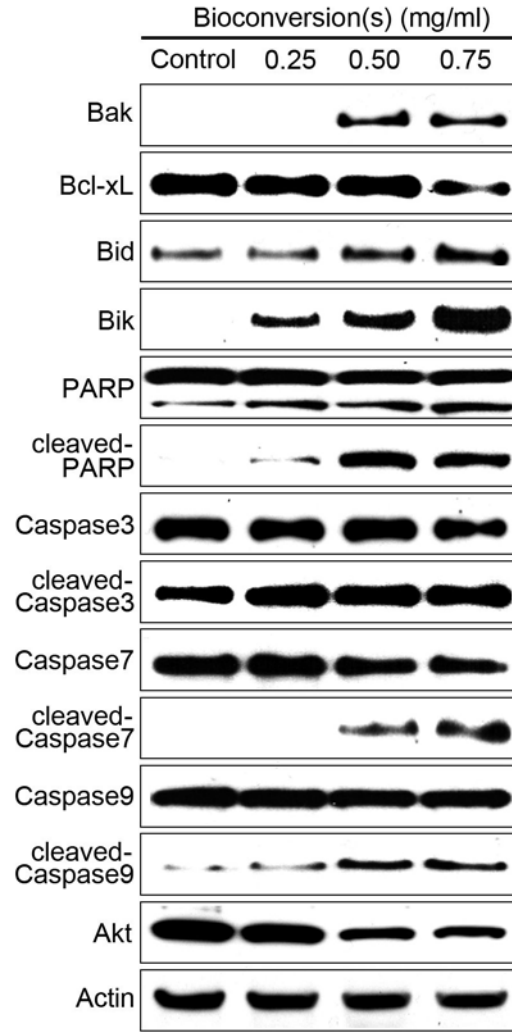


그림 20. 간세포(Chang)에 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말을 처리했을 때의 Western-Blot

8) 2차원 전기영동분석을 통한 간암세포에서의 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말의 항암효과 탐색

- 상기의 결과를 통하여 목이버섯이 한국인의 호발암 세포주 중에 간암세포에서 가장 좋은 항암효과를 보이는 것이 밝혀졌다. 이를 토대로 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말이 간암 세포를 억제하는 기작을 찾아보기 위하여 단백체학 분석(proteomic analysis)를 수행하였다.
- 2차 전기영동은 단백질을 분리하여 그 발현량의 차이를 분석하는 실험이다. 기존의 western blot이나 chromatography와 같은 단백질분석 방법은, 한번에 분리할 수 있는 단백질의 양이 제한적인 반면에 2차 전기영동은 20cm x 20cm 크기의 acrylamide gel을 사용하여 2000개 이상의 단백질을 단일점으로 표시할 수 있는 단백질분리 기법이다.
- 2차 전기영동은 두 개의 과정을 거쳐서 단백질을 분리하는데, 1차원 전기영동의 경우 단백질의 고유한 isoelectric point(등전점)을 이용하여 분리하며, 2차원 전기영동의 경우 단백질의 분자량으로 분리를 한다. 이렇게 분리한 2차원 이미지는 2000개 이상의 단일단백질로 이루어진 spot을 형성하며, 두 가지 단백질 군을 분석하여 발현량의 차이가 나는 단백질을 선택한다.
- 전기영동을 하는 gel은 SDS(sodium dodecyl sulfate)를 사용하며, denature과정을 거쳐 단백질을 분석한다. Gel을 염색할 때는 silver nitrate를 이용한 silver staining을 하여 이미지 분석을 하였으며, 이미지분석 결과로 나온 변화있는 spot은 Coomassie Brilliant Blue staining을 한 gel에서 추출하여 질량분석에 사용하였다.
- 모든 sample은 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말을 1mg/ml로 처리한 실험군과 처리하지 않은 대조군으로 나눠 단백질분석을 하였다.
- Gel image를 얻은 뒤 GE healthcare의 ImageMaster7 프로그램을 이용하여 각 spot의 세기를 측정하여 두 개의 gel의 발현량 차이를 비교한다. 일련의 과정은 10회 이상의 실험을 하여 통계적으로 유의한 차이를 보이는 spot을 선택하였다.
- 선택한 spot에 해당하는 Coomassie stained gel은 직경 5mm크기의 원모양으로 gel을 picking한 뒤, trypsin 처리하여 단백질을 gel로부터 분리해 내어 질량분석에 사용하였다. 질량분석은 Matrix-assited laser desorption/ionization-Time of flight(MALDI-TOF)기기를 사용하여 시행 하였으며, 이 결과로 나온 peptide의 질량분석은 Mascot Search database의 알고리즘을 사용하여 분석하였다.

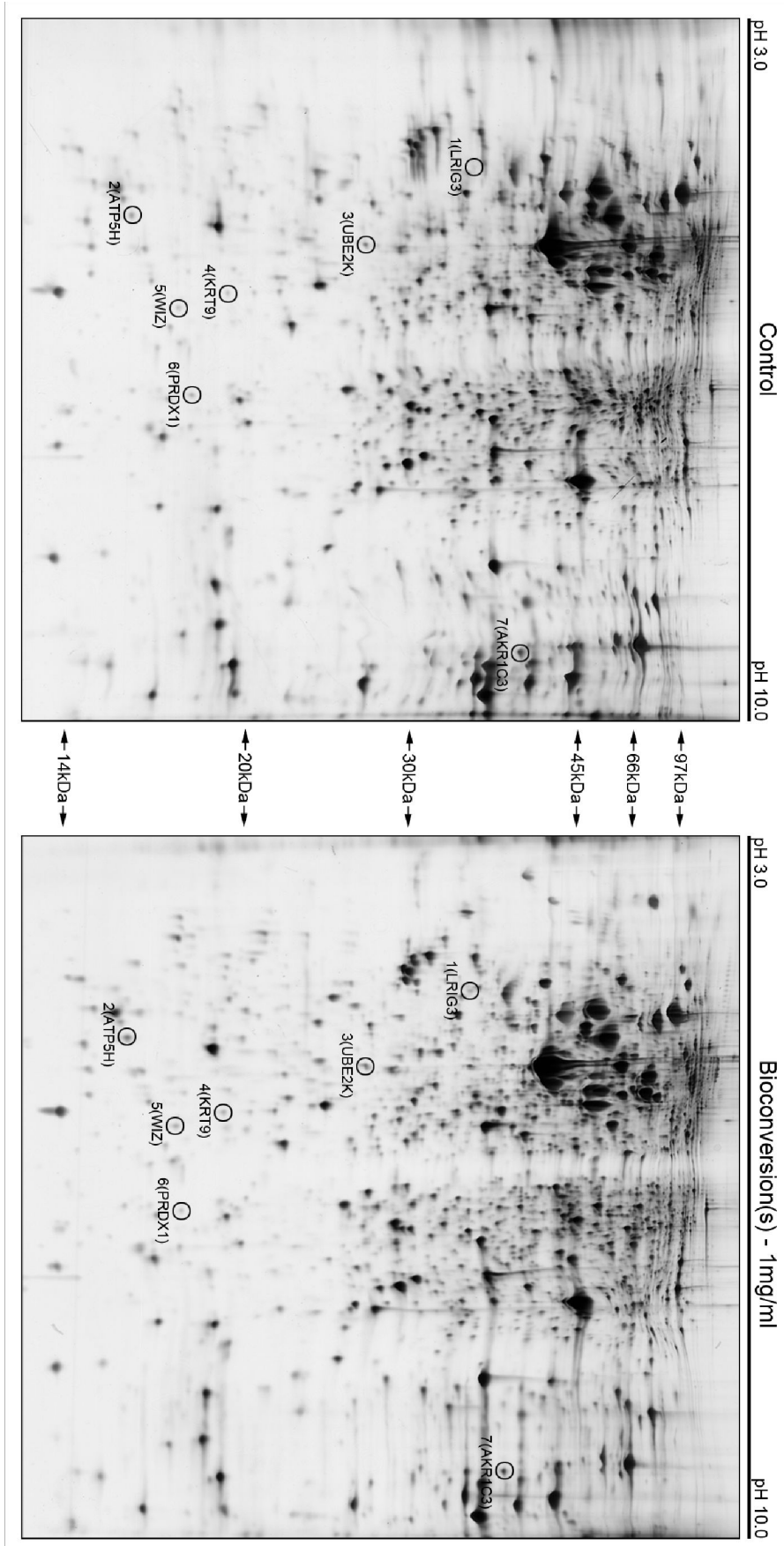


그림 21. 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말 시료 1mg/ml을 처리한 간암세포에서의 2DE 이미지 (silver)

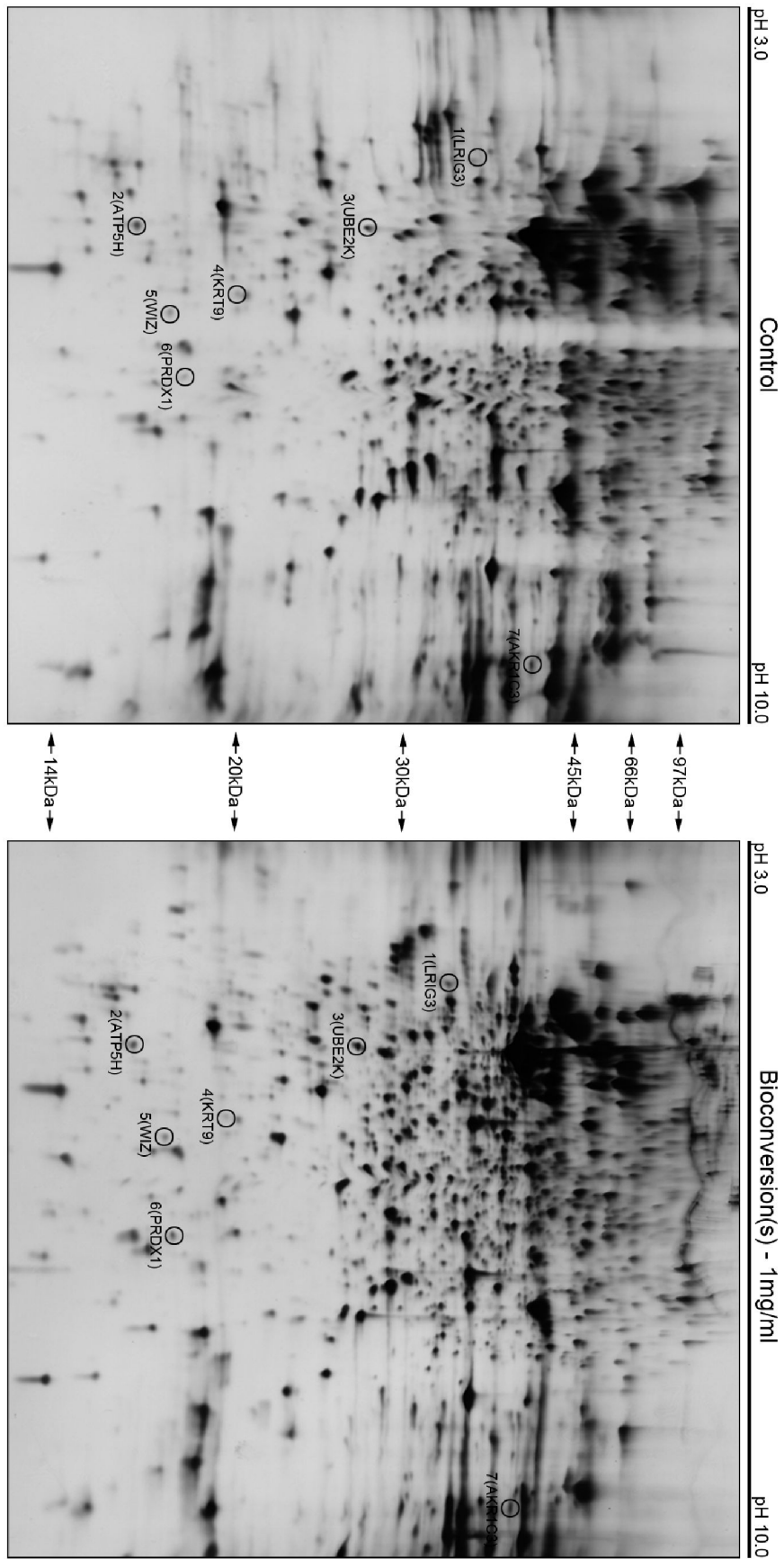


그림 22. 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말 시료 1mg/ml을 처리한 간암세포에서의 2DE 이미지 (silver)

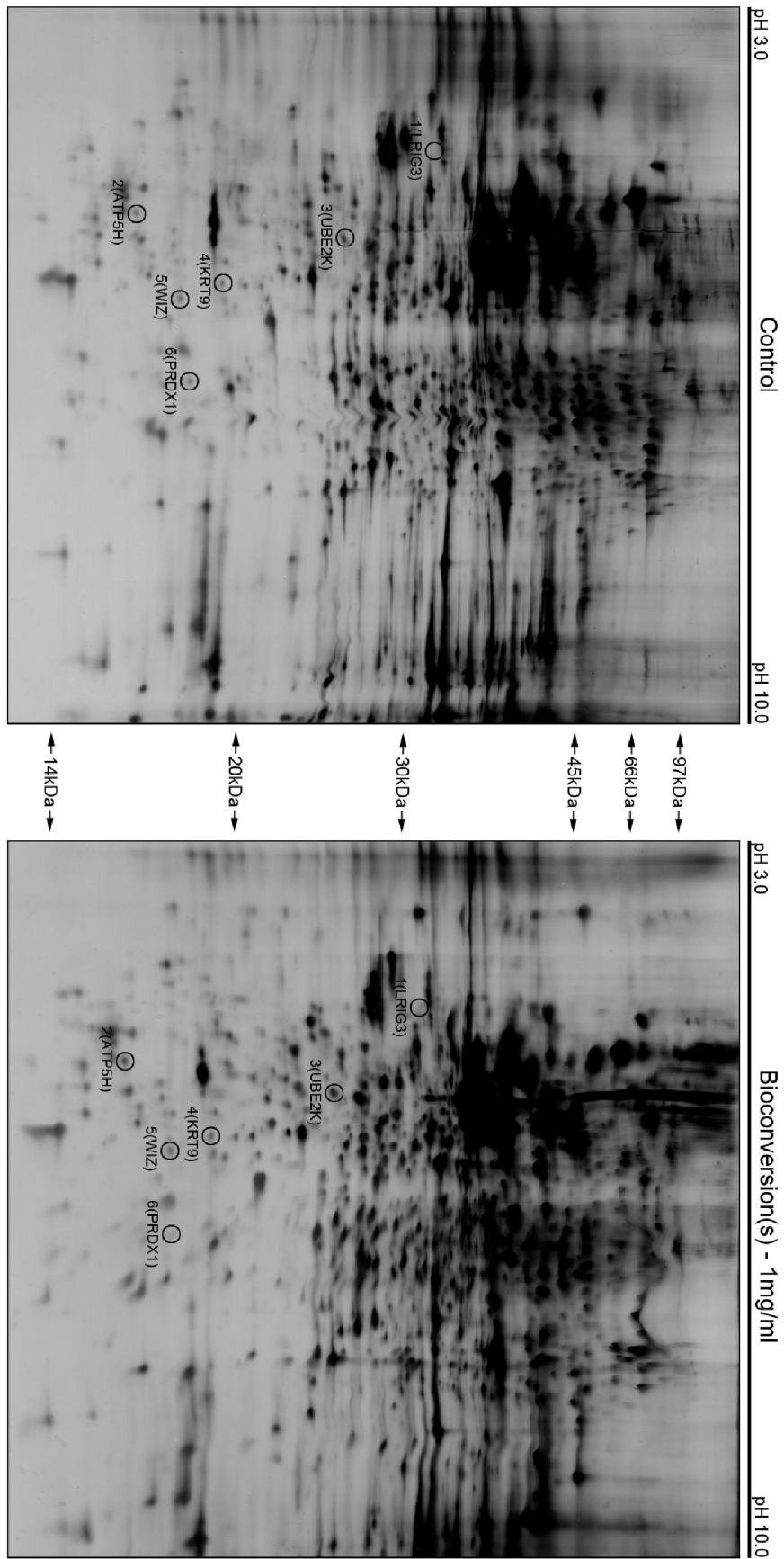


그림 23. 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말 시료 1mg/ml을 처리한 간암세포에서의 2DE 이미지 (silver)

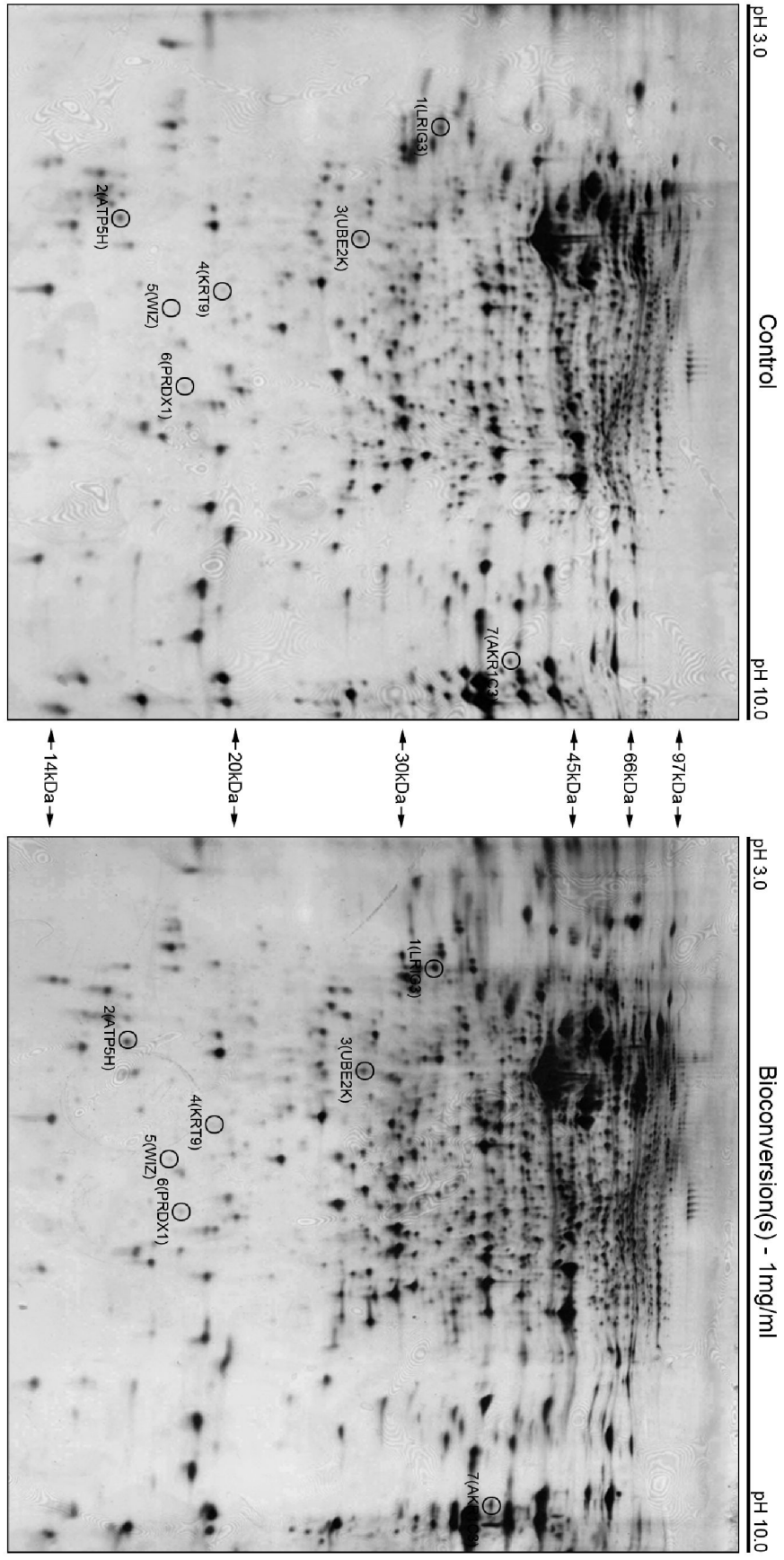


그림 24. 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말 시료 1mg/ml을 처리한 간암세포에서의 2DE 이미지 (silver)

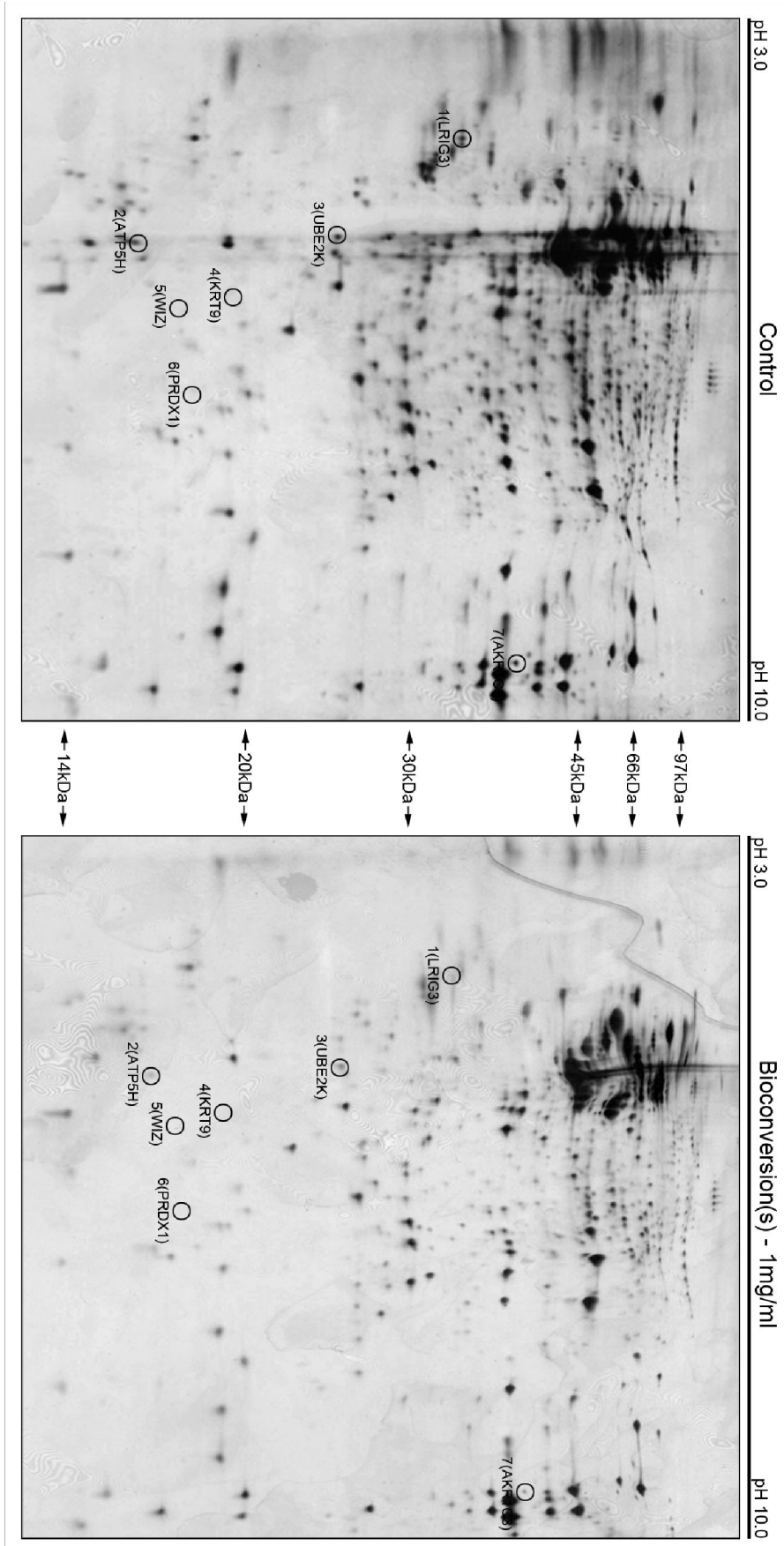


그림 25. 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말 시료 1mg/ml을 처리한 간암세포에서의 2DE 이미지 (silver)

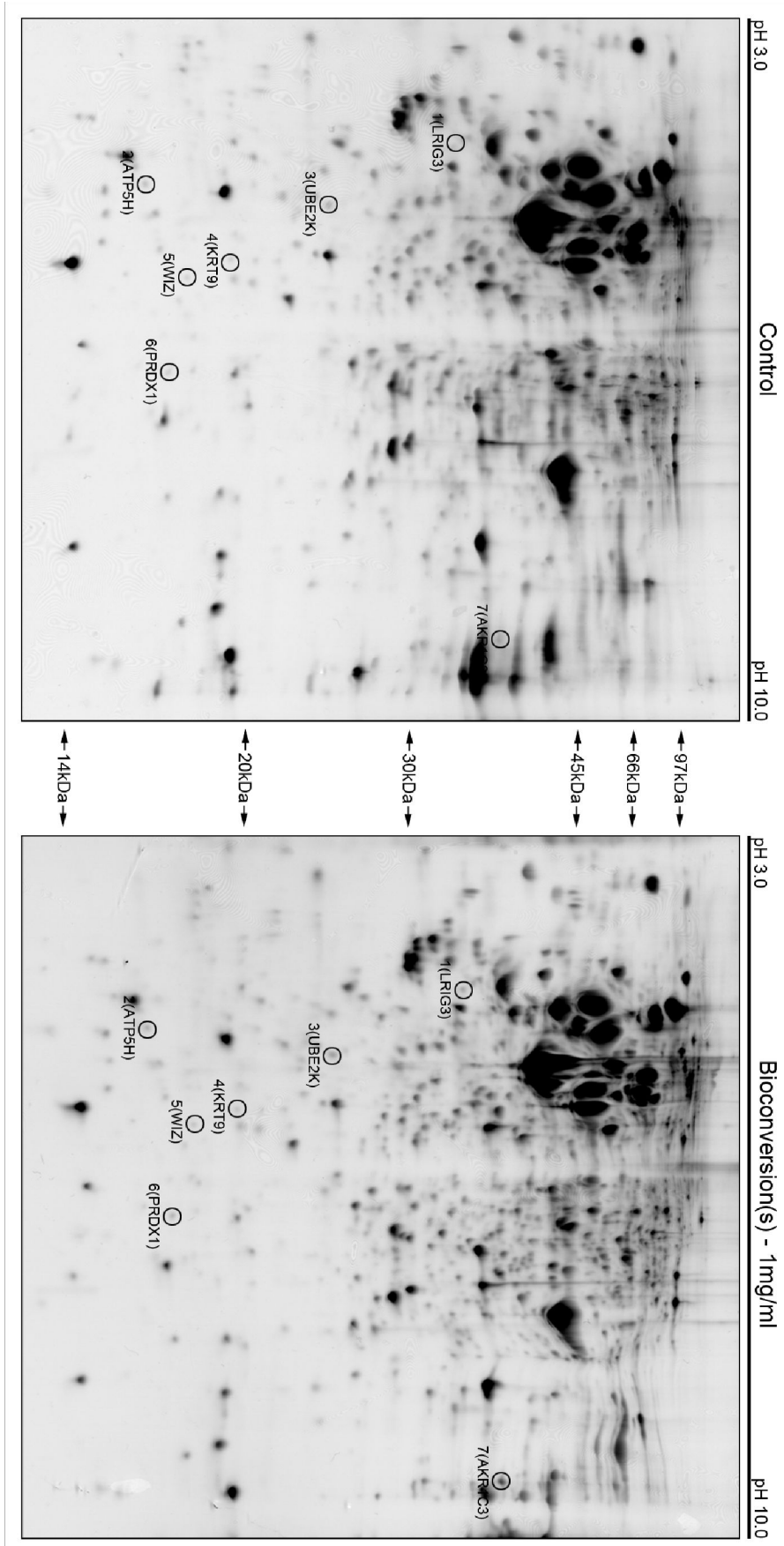


그림 26. 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말 시료 1mg/ml을 처리한 간암세포에서의 2DE 이미지 (Coomassie)

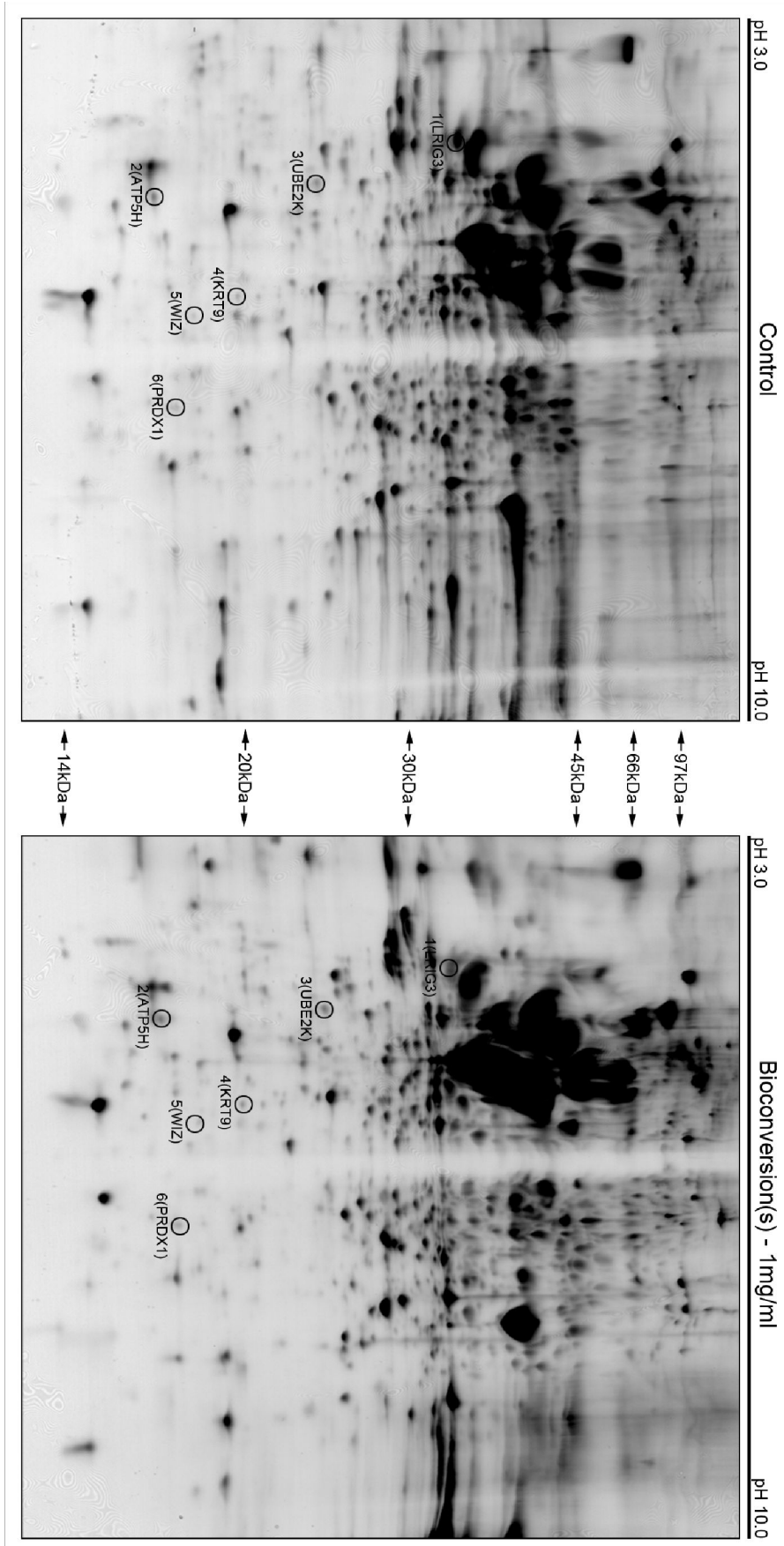


그림 27. 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말 시료 1mg/ml을 처리한 간암세포에서의 2DE 이미지 (Coomassie)

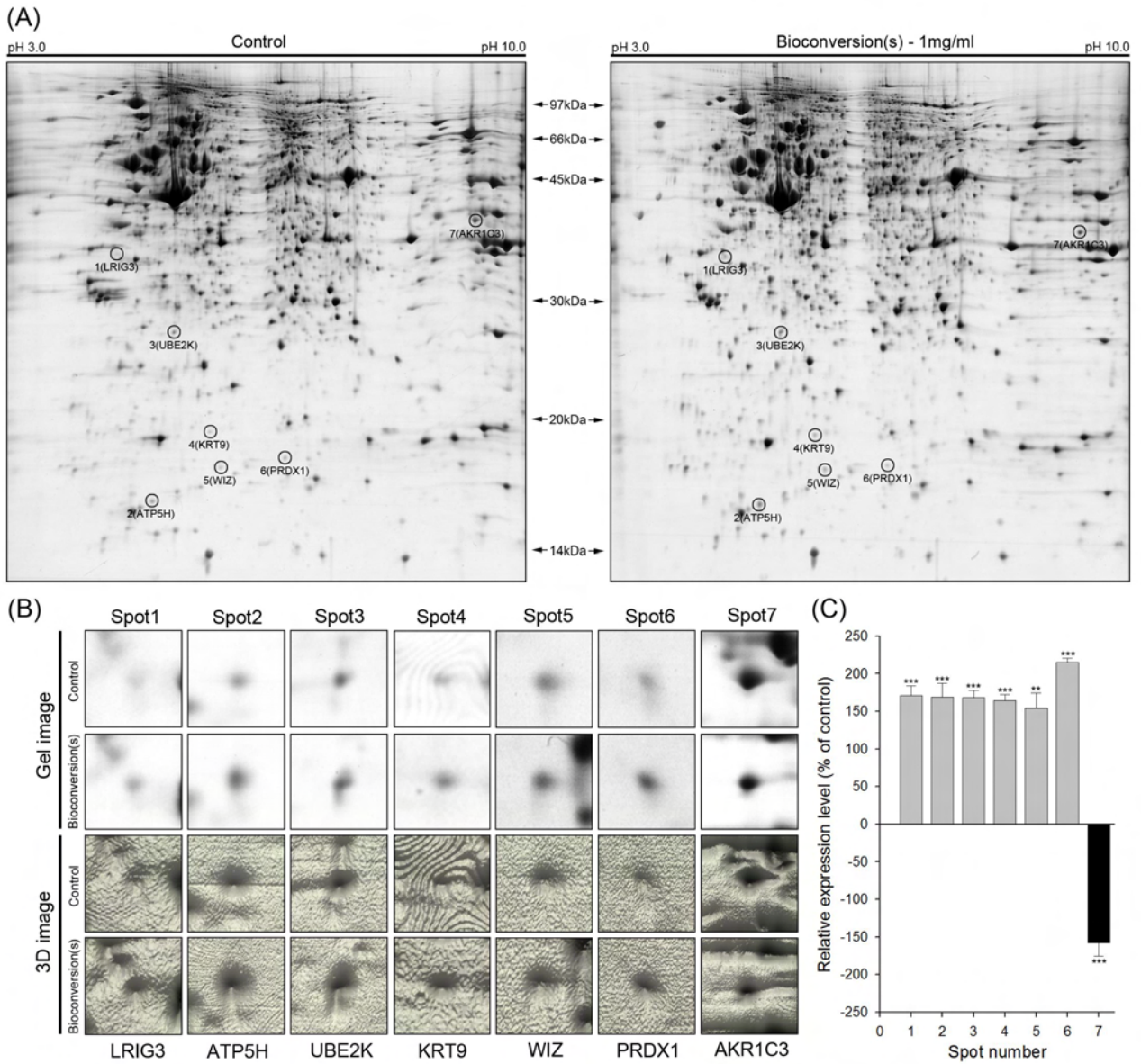


그림 28. 2차원 전기영동 최종결과

- Silver staining을 한 경우 1144-1560개의 spot이 검출 되었다. Coomassie staining을 한 경우 566-993개의 spot이 검출 되었다.
- 발현양의 차이는 GE Healthcare사의 ImageMaster7 프로그램을 사용하여 측정하였으며, 다수의 실험을 하여 발현양의 차이가 큰 것을 선택적으로 분석하였다. 최소 1.5배 이상 발현량의 차이가 나는 spot을 선택하였으며, silver staining으로 분석하였다.
- 대부분의 gel상에서 발현량 차이가 나는 7개의 spot을 선택하였으며, 질량분석을 위하여 commassie stained gel에서 spot picking을 하여 분석하였다.

9) 질량분석을 통한 간암세포에서의 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말의 항암효과 탐색

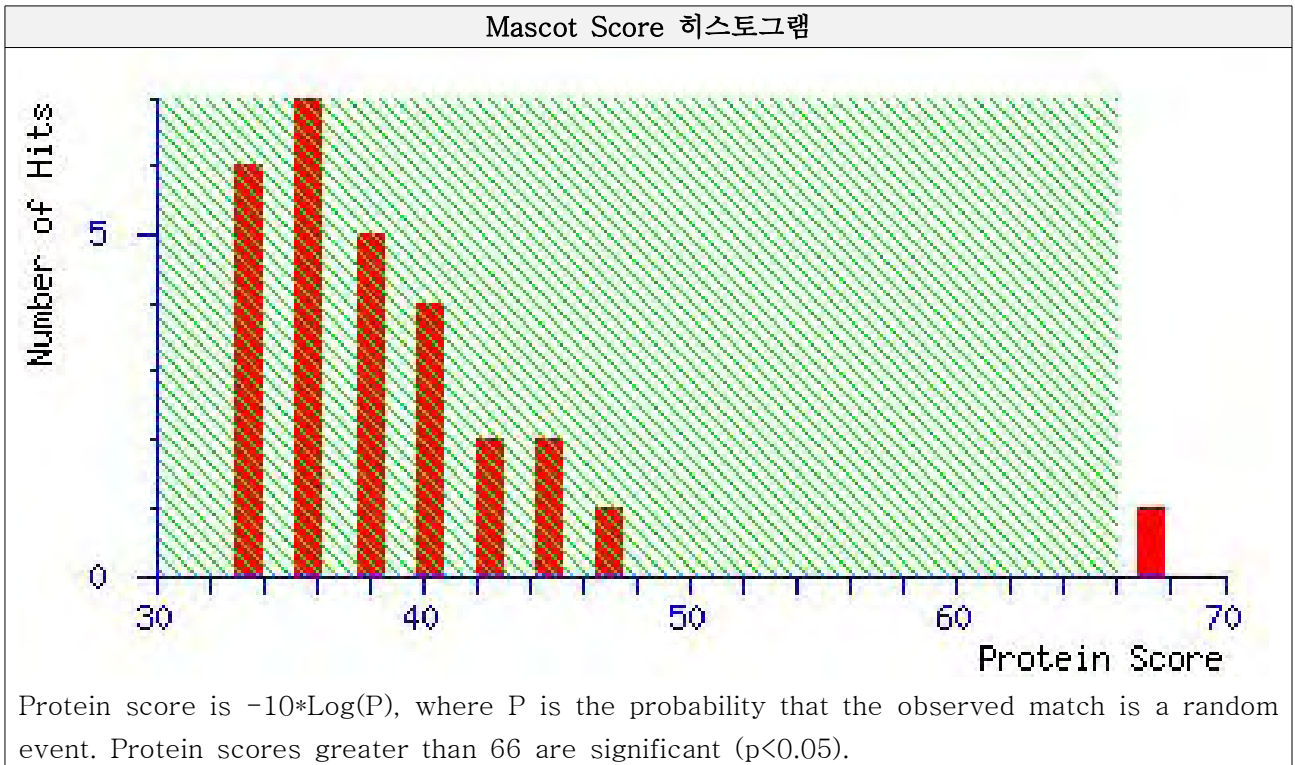
- 2DE 이미지 분석에서 선택된 spot을 질량분석 하였다.
- Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time of flight(MALDI-TOF)은 생체분자들이나 커다란 유기분자들을 분석하기 위하여 이온화 반응을 이용하는 질량분석기이다. 이온화 방법을 통하여 질량분석이 편하게 분자들을 작은 크기로 자른다.
- MALDI 과정은 두가지 단계로 이루어진다. 첫 번째 과정은 탈착을 개시하기 위하여 자외선 광선을 주사한다. 이때 기질(matrix)는 자외선을 흡수하여 기질 위에 있는 시료로 에너지를 전달한다. 이때 생성되는 수증기는 기질위의 분자들을 이온화 시킨다.
- 이온화된 분자들은 에너지를 갖고 공간상에서 움직이게 된다. 질량과 일정 거리를 이동하는 시간이 비례하는 것을 통하여 m/z값을 구하여 각 조각별로 fingerprint를 얻어낸다.
- 이 정보는 mascot 데이터 베이스에서 알고리즘을 이용하여 분석한다.

BRUKER MICROFLEX	
Mode of operation	Reflector
Polarity	Positive
Matrix	a-Cyano-4-hydroxycinnamic acid+5% TFA
Mass range	900-3500 da
Enzyme	Trypsin

표 3. 기기정보 및 실험조건

Type of Search	Peptide mass fingerprint
Enzyme	Trypsin
Variable modification	Oxidation, propionamide
Mass values	Monoisotopic
Protein mass	Unrestricted
Mass tolerance	±200 ppm
Peptide charge state	1+
Max missed cleavage	1
Number of queries	19

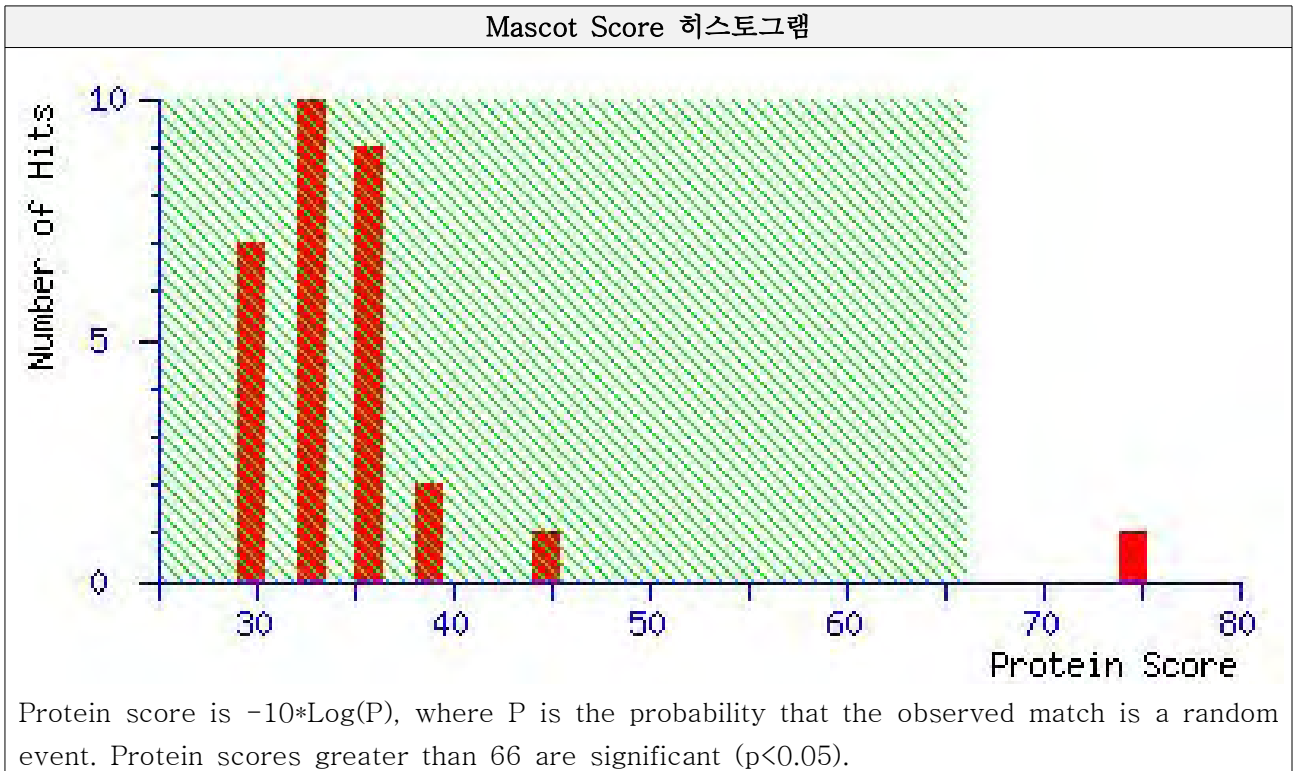
표 4. Search Parameters



Consie Protein Summary Report

Number	Protein name	Mass	Score	Expect	Matches
1	leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 3 isoform 1 precursor [Homo sapiens]	123309	67	0.046	12
2	leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 3 isoform 2 precursor [Homo sapiens]	123355	50	2.2	10
3	unnamed protein product [Homo sapiens]	117363	48	3.4	10
4	hCG1811490, isoform CRA_b [Homo sapiens]	12086	44	10	4
5	unnamed protein product [Homo sapiens]	60598	36	67	6

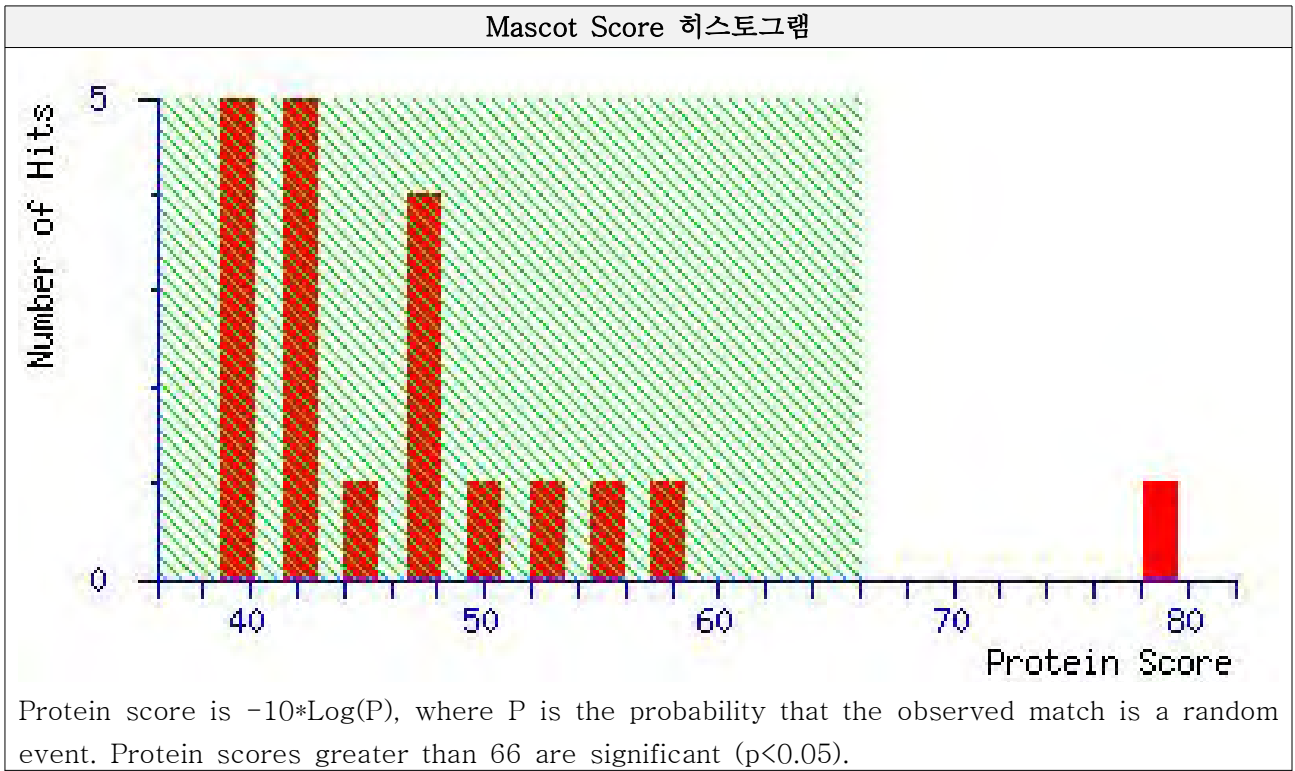
표 5. 1번 spot의 단백질 질량분석 결과



Consie Protein Summary Report

Number	Protein name	Mass	Score	Expect	Matches
1	ATP synthase subunit d, mitochondrial isoform b [Homo sapiens]	15763	75	0.0084	6
2	ATP synthase subunit d, mitochondrial isoform a [Homo sapiens]	18480	72	0.016	6
3	ATP5H protein [Homo sapiens]	11478	35	78	3
4	radial spoke head protein 9 homolog isoform 1 [Homo sapiens]	31272	44	10	5
5	unnamed protein product [Homo sapiens]	31286	44	10	5

표 6. 2번 spot의 단백질 질량분석 결과

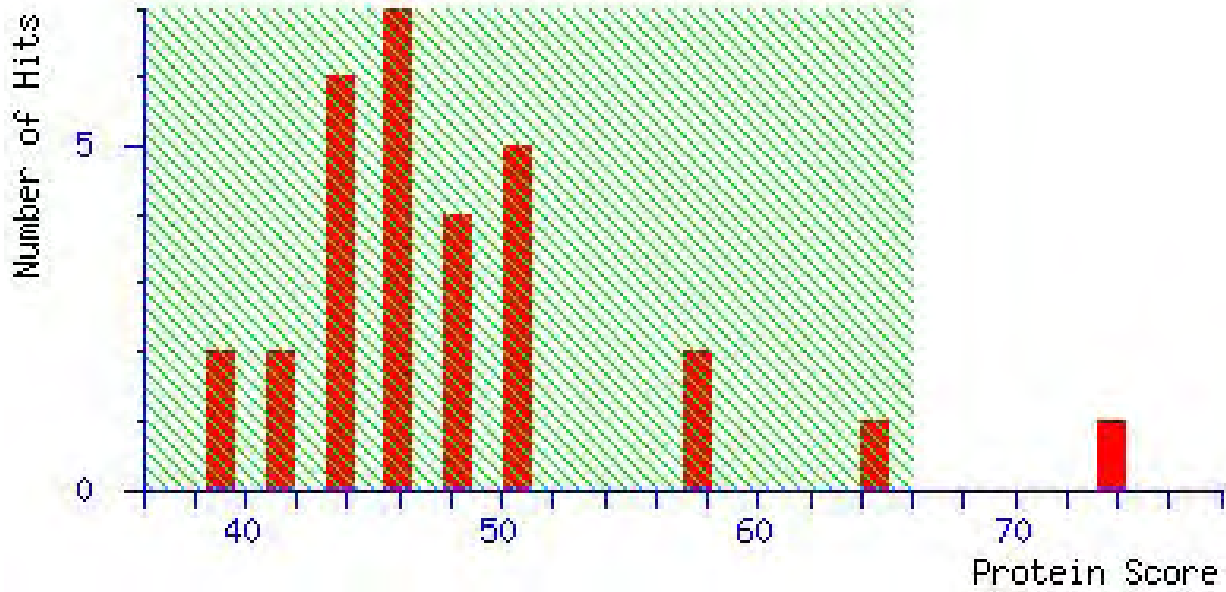


Consie Protein Summary Report

Number	Protein name	Mass	Score	Expect	Matches
1	ubiquitin-conjugating enzyme E2 K isoform 1 [Homo sapiens]	22393	79	0.0032	7
2	Chain A, The Crystal Structure Of E2-25k And Ubb+ 1 Complex	22450	79	0.0033	7
3	Chain A, Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2-25 Kda (Huntington Interacting Protein 2) ATP5H protein [Homo sapiens]	22537	78	0.0034	7
4	Chain A, The Crystal Structure Of E2-25k And Ubiquitin Complex	24053	75	0.0017	7
5	Chain A, Crystal Structure Of Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2-25kda (Huntington Interacting Protein 2) M172a Mutant	28152	72	0.0017	7

표 7. 3번 spot의 단백질 질량분석 결과

Mascot Score 히스토그램

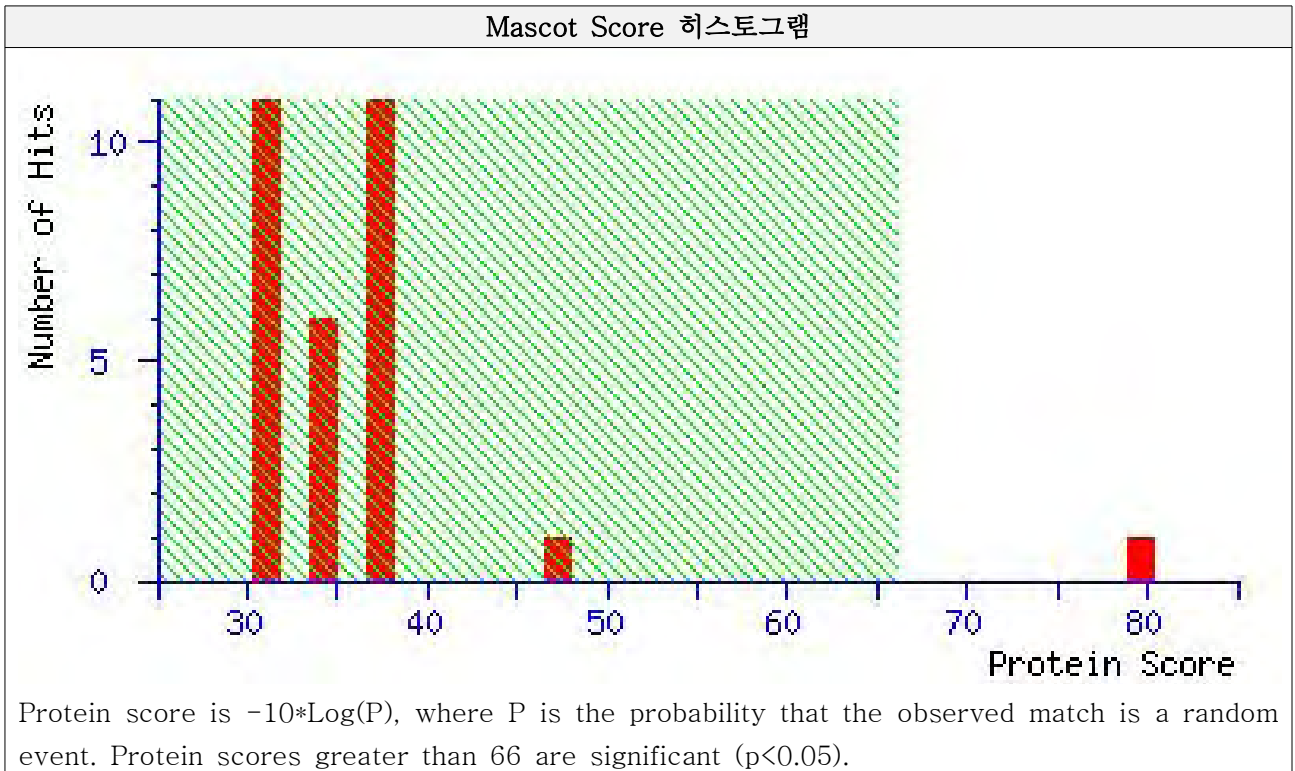


Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 66 are significant ($p < 0.05$).

Consie Protein Summary Report

Number	Protein name	Mass	Score	Expect	Matches
1	cytokeratin 9 [Homo sapiens]	62092	74	0.01	12
2	keratin 9 (epidermolytic palmoplantar keratoderma) [Homo sapiens]	57526	71	0.019	11
3	keratin 9 [Homo sapiens]	61950	64	0.09	11
4	keratin, type I cytoskeletal 9 [Homo sapiens]	62027	64	0.094	11
5	mutant keratin 9 [Homo sapiens]	25913	56	0.58	7

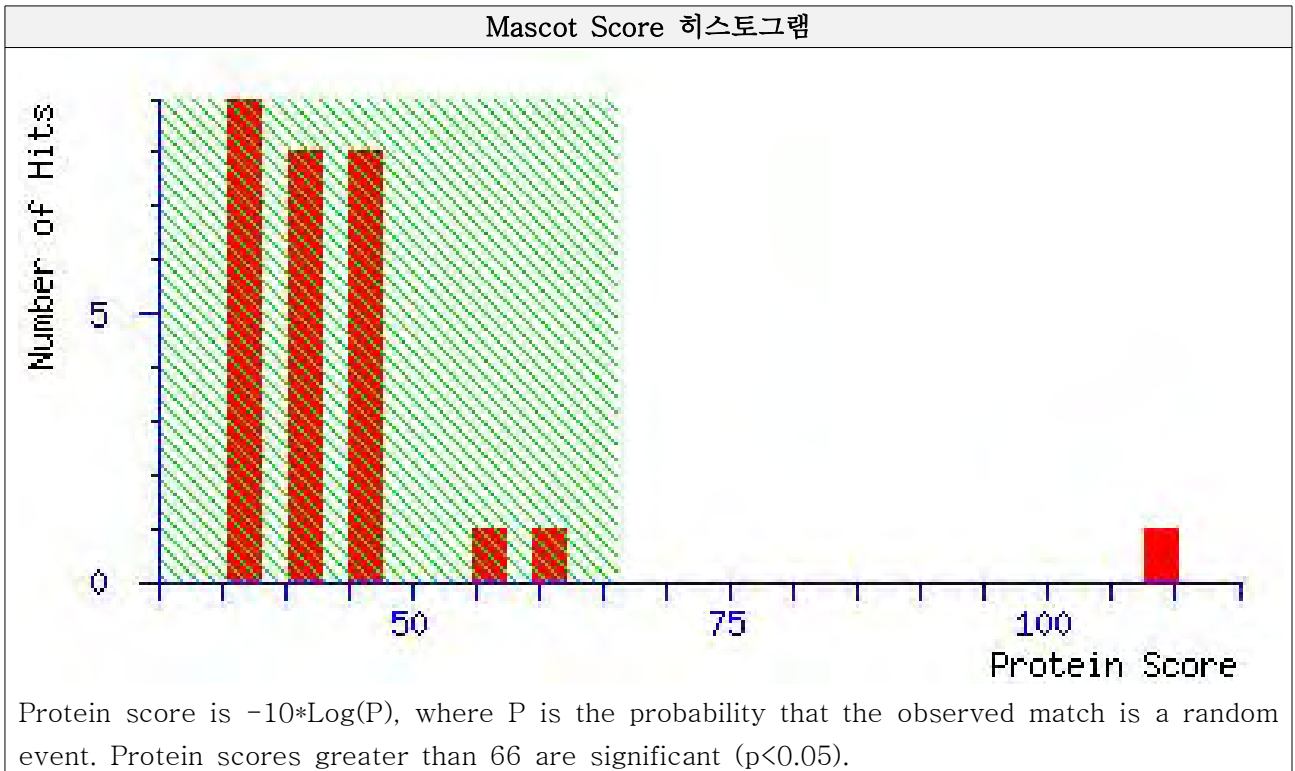
표 8. 4번 spot의 단백질 질량분석 결과



Consie Protein Summary Report

Number	Protein name	Mass	Score	Expect	Matches
1	Chain A, Crystal Structure Of The Human Y14MAGOH COMPLEX	16909	80	0.0027	6
2	protein mago nashi homolog [Homo sapiens]	17153	79	0.0029	6
3	protein mago nashi homolog 2 [Homo sapiens]	17265	79	0.0031	6
4	mago-nashi homolog, isoform CRA_b [Homo sapiens]	10781	36	54	3
5	T-cell receptor beta chain (TCRBV1J2S5 gene) [Homo sapiens]	4122	31	70	2

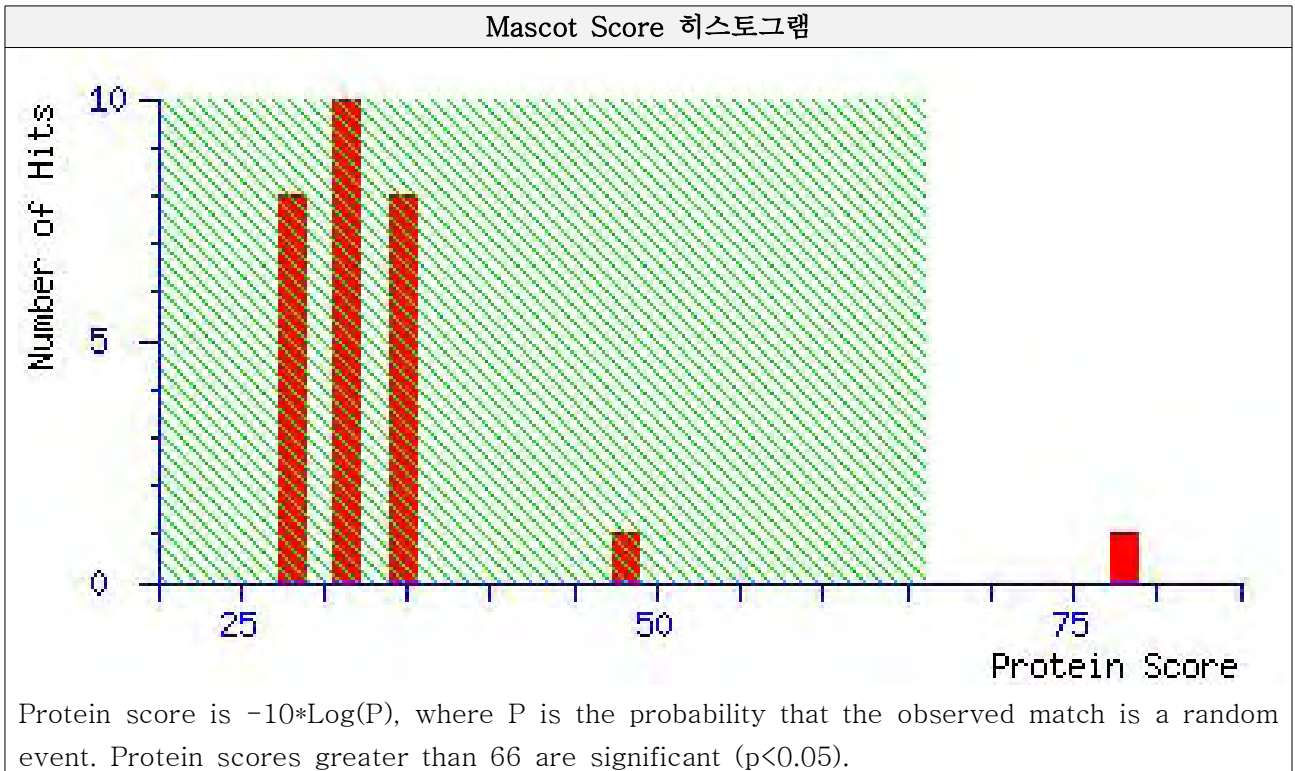
표 9. 5번 spot의 단백질 질량분석 결과



Consie Protein Summary Report

Number	Protein name	Mass	Score	Expect	Matches
1	peroxiredoxin 1 [Homo sapiens]	18964	109	3e-06	10
2	peroxiredoxin 1, isoform CRA_b [Homo sapiens]	20715	105	7e-06	10
3	peroxiredoxin-1 [Homo sapiens]	22096	102	1e-05	10
4	Chain A, Crystal Structure Of Human Peroxiredoxin I In Complex With Sulfiredoxin	22090	102	1e-05	10
5	Chain A, Crystal Structure Of Sulfiredoxin In Complex With Peroxiredoxin I And Atp:mg2+	23015	101	1e-05	10

표 10. 6번 spot의 단백질 질량분석 결과



Consie Protein Summary Report

Number	Protein name	Mass	Score	Expect	Matches
1	3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase [Homo sapiens]	36806	78	0.0038	8
2	aldo-keto reductase family 1, member C3 (3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type II), isoform CRA_c [Homo sapiens]	23349	74	0.011	7
3	chlordecone reductase homolog [Homo sapiens]	36804	65	0.08	7
4	HAKRb product/3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase [human, liver, Peptide, 323 aa]	36823	65	0.084	7
5	aldo-keto reductase family 1 member C3 isoform 1 [Homo sapiens]	36830	63	0.11	7

표 11. 7번 spot의 단백질 질량분석 결과

- Mascot database검색을 통하여 가장 가능성 높은 5개의 단백질을 번호 순서대로 기재함

Spot 번호	분류번호	단백질 이름	유전자	서열(%)	MW(DA)/pI	변화량(%)
1	NP_700356	Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 3	LRIG3	20	123,370/5.8	163.98±8.72
2	NP_001003785	ATP synthase subunit d	ATP5H	64	15,760/6.6	168.73±18.54
3	NP_001104582	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K	UBE2K	48	22,390/5.3	177.03±19.25
4	NP_000217	Keratin, type I cytoskeletal 9	KRT9	30	61,970/5.1	163.98±8.72
5	AAD19818	Human homolog of Mus musculus wizL protein	WIZ	37	16,910/6.4	163.98±28.90
6	NP_002565	Peroxiredoxin-1	PRDX1	47	20,990/6.4	175.39±35.7
7	NP_003730	Aldo-keto reductase family 1 member C3	AKR1C3	46	23,350/8.6	-156.14±13.5

표 12. 단백질분석 결과로 알아낸 가장 가능성 높은 단백질

- 7개의 단백질 spot을 분석한 결과 가장 가능성 높은 단백질(서열의 일치도)을 정하였다.
- 분류번호는 NCBI에서 산정한 accession number이다.
- 유전자는 NCBI에서 산정한 유전자 이름이다.
- 서열은 단백질 분석결과와 NCBI에 등재된 단백질 서열과의 일치도 이다.
- MW/PI는 분자량과 등전점이다.
- 변화량은 실험군과 대조군의 단백질 spot의 intensity변화량 이다.

10) Proteomic analysis로 밝혀진 단백질의 validation

- 7개의 단백질 spot에서 가장 가능성이 높은 단백질들을 선택하여 NCBI database를 이용하여 gene sequence를 알아내었다.
- 이 sequence를 바탕으로 primer를 제작하여 mRNA의 발현양을 살펴봄으로서 단백질분석 결과의 간접적인 확인(validation)을 하였다.

Name		Primer	Tm	Size
LRIG3	Forward	GGCTTTACGGCTTGCTGATG	61.7	189
	Reverse	TGTTCCCAATGTGCAGTGTATTT	60.7	
ATP5H	Forward	GCTTTTGCAGAGATCATACCCC	60	54
	Reverse	TTTCAGGGAAGTAGCAATGGC	60.3	
UBE2K	Forward	GTTCCGTCACAGGGGCTATTT	62.1	52
	Reverse	GCTGCCCATTGATCTTTCAGGA	62.6	
KRT9	Forward	GGGGCCGATTCAGCTCTTC	62.5	124
	Reverse	CTACTGGCACTAAAACCACCC	60.3	
WIZ	Forward	TCTTTGGCACCAATTCATCCAG	60.8	196
	Reverse	GGGAAACCACAGAAGACACAG	60.5	
PRDX	Forward	CCACGGAGATCATTGCTTTCA	60.4	116
	Reverse	AGGTGTATTGACCCATGCTAGAT	60.6	
PRDX1	Forward	CATTCCTTTGGTATCAGACCCG	60.4	83
	Reverse	CCCTGAACGAGATGCCTTCAT	61.9	
AKR1C3	Forward	TCTGGGATCTCAACGAGACAA	60.2	207
	Reverse	TGGAAC TCAAAAACCTGCACG	61.3	
ACTB	Forward	GTCTGCCTTGGTAGTGGATAATG	60.4	103
	Reverse	TCGAGGACGCCCTATCATGG	63	

표 13. 실험에 사용된 gene primer

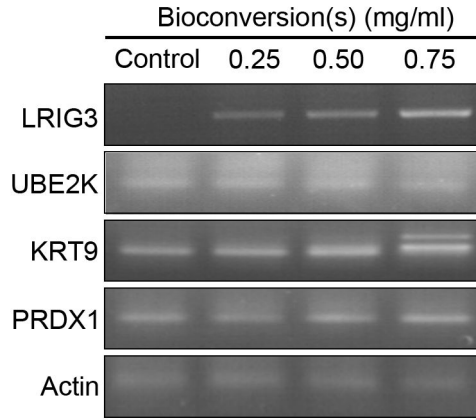


그림 29. 간암세포 (huh-7)에 bioconversion분말을 처리하였을때 각 gene의 발현 정도

- 표 13의 primer sequence대로 사용하였으며, PCR은 35cycles 을 시행하였다.
- mRNA의 농도도 단백질분석 결과와 일치하게 나온 단백질이 4가지 종류가 있었다.
- 이중 PRDX1의 생화학적 기작이 암의 발현 억제와 관련이 있어 이 단백질을 더 분석하였다.

11) PRDX1의 단백질 발현량 분석

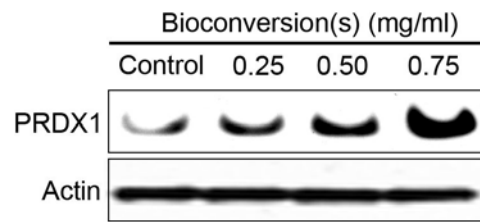


그림 30. 간암세포 (huh-7)에 목이버섯 바이오컨버전 수용성분말 시료를 처리하였을 때 PRDX1의 증가

제 2 절 협동과제 1 : 목이버섯의 노지 속성청정재배방법 확립

※ 노지재배 목이버섯의 수확량 및 유효성분을 최대화하기 위한 봉지 톱밥배지 확립

1) 목이버섯을 노지에서 재배하는 이유

- 목이버섯 재배에 있어서 노지재배 방법에 중점을 둔 것은 농가에서 손쉽게 대량으로 버섯을 생산 가능하게 하기 위해서 이며 특히, 자연직사광을 직접 받고 버섯자실체가 숙성되므로 버섯의 품질이 양호할 뿐만 아니라 영양성분 관계에서도 기능성을 높이기 위함 이다.
- 시설재배 방법으로 목이버섯을 대량으로 생산할 경우 경비 부담이 크고, 인공적으로 버섯의 생육조건을 조성하기 어렵고 광 조건을 인공적이고 강제적으로 지어 줌으로써 버섯의 색태, 모양, 기능적인 효능의 감소가 우려된다.
- 재배자들이 버섯재배에서 시설에 비용을 많이 들이면서도 고소득을 올리기 어렵고, 저소득의 재배를 할 수 밖에 없는 현실에서 생산비용과 재배시설 투자비용을 대폭 줄이면서 수익을 높일 수 있는 연구를 진행하던 중에 목이버섯 재배를 비롯한 모든 버섯류를 특별한 시설이 따로 없이도 누구든지 손쉽게 버섯 생산을 할 수 있는 새롭고 독창적인 재배방법을 내놓게 되었다.
- 목이버섯 (속성)재배 방법에 있어서 1차년도에는 자연환경 조건의 노지재배 방법에 관해 수행하였고, 2차년도에는 연중 재배가 가능하도록 계절별 특성 연구를 수행하여 춘계, 하계, 추계 및 동계 재배방법과 재배조건을 확립하였다.

2) 목이버섯의 균주 보관 및 균사 배양온도 확립

- 목이버섯 재배실험 공시균주는 북한에서부터 연구하고 보존한 목이버섯균 백두 1호 저온성 품종을 재배실험에 선정하고 균의 특성과 성질을 조사하였다.

	균주의 생장범위
균사체 발아온도	18-32℃
균사체 생장 적온	22-24℃
균사체발아 정지 온도	35℃
균사체 사멸 온도	35℃ 이상 온도에서사멸. - 40℃이하에서 사멸.

표 1. 재배실험품종의 특성과 성질



그림 1. 연구에 이용한 목이버섯 (백두 1호)

- 자연 상태에서 60일간 균주를 보관한 후 시험관 배지를 제조하여 균사생장을 조사한 결과 32°C 온도에서는 성장이 양호하였지만 35°C 이상 온도에서는 사멸되었다.
- 냉동고의 -40°C 이하 온도에서 3일간 보관하고 성장실험을 진행한 결과 균사체가 사멸되었다.
- 본 연구에 사용된 목이버섯균 (백두 1호) 품종의 국내 자연환경 재배는 35°C 이상의 고온인 7~8월을 제외한 모든 계절에서 버섯 생산이 가능하다는 결론을 얻을 수 있었다.

3) 목이버섯 (속성)배지 제조방법 개선에 따른 생산성 향상

- 목이버섯 (속성)배지 재료를 개선하기 위하여 배지성분의 선택과 배지성분 혼합비율을 기존의 조건과 차별화하여 실험을 수행하였다.

가. 균사 배양 및 재배배지 성분 설정

- 본 연구에 사용한 배지성분은 침엽수를 제외한 참나무, 미루나무를 비롯한 톱밥입자 2-3mm 되는 것을 사용하고, 쌀겨, 옥수수 속대(콘코브) 분쇄입자 3-5mm, 면실피 펠릿을 선택하였다.
- 목이버섯 생산용 혼합배지는 PP비닐봉지규격 380mmx170mmx0.4mm 봉지에 넣어 균사 성장에 적합하도록 하였으며, 입봉된 봉지배지의 높이는 220mm이고 봉지의 직경은 Ø100mm 이고, 배지중량 1.2kg의 무게로 봉지배지를 만들었다.

배지비율	참나무톱밥 (%)	미루나무톱밥 (%)	각종나무톱밥 (%)	면실피팔렛 (%)	쌀겨 (%)	옥수수 속대 (%)
배지1	74	0	0	0	20	0
배지2	0	74	0	0	20	0
배지3	0	0	47	0	0	47
배지4	0	0	47	47	0	0

표 2. 목이버섯 봉지재배용 톱밥배지의 성분 혼합비율

나. 배지 종류별 버섯 수확 관계

배지 종류	g 생산량/1.2kg 봉지배지
참나무 톱밥	680g
미루나무 톱밥	630g

표 3. 배지 종류별 버섯 수확량

- 목이버섯 (속성)재배 과정에서 동일한 규격의 봉지(380x170x0.04mm)를 사용한 참나무 톱밥과 미루나무 톱밥의 배지에서 1.2kg 당 버섯 수확량이 서로 다르게 나타났다. 즉, 버섯 배지의 성분과 혼합비율에 따라 버섯의 수확량에서 차이가 나는 것을 확인할 수 있었다.
- 버섯 생산실험 과정에 참나무톱밥 74%, 쌀겨 20%를 이용한 1.2kg 봉지배지에서는 버섯수확량은 1차 버섯수확에서 $390\pm 10g^b$ 을 수확하였고, 2차에서는 $210\pm 12g^b$ 을 수확하였으며, 3차에서는 $80\pm 8g^a$ 을 수확하여 총 버섯수확량은 $680\pm 30g^b$ 이었다.
- 미루나무톱밥 74%, 쌀겨 20%를 배지성분으로 이용한 1.2kg 봉지배지에서는 1차 버섯수확에서 $385\pm 4g^c$ 을 수확하였고, 2차에서는 $205\pm 6g^a$ 을 수확하였으며, 3차에서는 $50\pm 9g^a$ 을 수확하여, 총 버섯수확량은 $630\pm 10g^b$ 이었다.
- 각종나무톱밥 47%, 옥수수속대 47%를 배지성분으로 이용한 1.2kg 봉지배지에서는 1차 버섯수확 1차 $480\pm 11g^a$ 수확하였고, 2차에서는 $190\pm 10g^b$ 을 수확하였으며, 3차에서는 $80-3g^b$ 을 수확하여 총 버섯수확량은 $750\pm 24g^a$ 이었다.
- 각종나무톱밥 47%, 면실피팔렛 47%를 배지성분으로 이용한 1.2kg 봉지배지에서는 1차 버섯수확에서 $460\pm 10g^b$ 을 수확하였고, 2차에서는 $200\pm 4g^b$ 을 수확하였으며, 3차에서는 $60-5g^b$ 을 수확하여 총 버섯수확량은 $720\pm 19g^a$ 이었다.
- 참나무톱밥 및 미루나무톱밥 각 74%와 쌀겨 20%를 이용한 1.2kg 봉지배지에서의 버섯 생산 수확량은 $680g^a$ 및 $630g^a$ 이었고, 반면에 각종나무톱밥 47%와 농산물곡물부산물인 옥수수속대 (콘코브) 47% 또는 면실피 팔렛 47%를 이용한 배지에서는 봉당 $750g^a\sim 720g^a$ 의 버섯을 수확함으로써 농산물곡물부산물을 이용한 봉지배지(1.2kg)에서 봉당 70g~90g의 버섯 수확량을 향상시킨 결과를 얻을 수 있었다.

다. 봉지배지 대량살균방법 개선

- 배지 살균을 수행하기 위해 플라스틱박스 규격450mmx450mmx90mm인 박스에 봉지배지 16봉을 담아 살균대차에 5,000봉을 올려놓고 살균기에 넣어 배지는 상압살균을 100℃의 온도에서 4~5시간 살균한 후 배지를 1시간 방치시켜 살균기의 압력계지가 “0” 압을 가리킬 때 냉각실 방향의 살균기 문을 열어 배양대차를 감속기를 이용하여 냉각실로 끌어내어 봉지배지의 온도를 22℃까지 낮추어주는 배지식힘을 수행한다.

라. 봉지배지에 대량 접종이 가능한 종균 접종 방법 개선

- 봉지배지에 종균의 접종은 2인 접종 방식으로 1인은 봉지링을 뽑아주고 1인은 종균병 외부를 75% 알코올로 종균병 외부를 깨끗이 닦은 후 갈구리 모양 종균접종공구를 이용하여 봉지마다 고체 종균을 밤알 크기로 종균병에서 끊어 봉지배지의 매봉지마다 넣어주는 방법으로 봉지배지에 종균접종을 진행하는 방법으로 봉지 종균접종을 수행함으로써 대량 접종이 가능하게 되었다. 접종에 사용하는 종균은 준비한 종균 중 확대종균 1대균 성숙되어 양호한 종균을 선별하여 사용하였다.

마. 종균 접종된 봉지배지의 대량 군사 배양관리 방법 최적화

- 봉지배지에서의 균 배양방법은 배양실 면적 150평 보온하우스 배양시설을 이용하여 1.2kg 배지 배양단 7단 150,000봉을 균배양 하였으며, 배양실 내의 온도는 24-26℃이며, 배양실의 공기습도는 55%를 유지하면서, 배양실내의 환기조건은 시간당 10분씩 자동환풍시키는 조건을 확립함으로써 봉지배지에서의 군사배양의 대량 관리시스템을 최적화 할 수 있었다.
- 군사 배양온도는 26~28℃, 재배사 내의 공기습도는 50-55%, 조도는 400~500 lux, 이산화탄소의 농도는 1000ppm 이하의 조건에서 68-70일간 군사배양을 수행함으로써 노지재배에 사용할 수 있는 상태에 도달할 수 있었다.

바. 노지재배 전단계까지의 일련의 공정

- 봉지(380x170x0.04mm)에 1.2kg의 혼합배지를 넣은 후 공기가 통하지 않도록 밀봉한다.



그림 2. 재배 하우스 시설

- 밀봉이 완료된 배지는 100℃에서 4~5시간 동안 증기 살균 후 냉각실에서 배지의 온도를 20~22℃가 되도록 식힌다.
- 식은 배지를 무균실로 옮겨 종균 접종실에서 종균접종공구를 이용하여 봉지배지에 종균을 접종한다.
- 접종이 완료된 배지는 24~26℃의 균 배양실에서 65일간 균사 배양을 진행시킨다.



그림 3. 균사배양 하우스 시설

4) 본 과제에서 추구하는 목이버섯 노지재배의 간편한 재배방식

- 목이버섯 노지재배를 수행하기 위해 노지면을 수평으로 만들고, 그 위에 부직포를 펴 놓은 다음, 그 위에 배양봉지를 세워 놓음으로써 노지재배가 시작되며, 이후에는 일정 시간간격으로 배지가 마르지 않도록 물을 뿌려주기만 하면 노지재배가 이루어진다.

가. 봉지배지에서 자실체 발아를 시키기 위한 구멍 만들어 주기

- 배양된 봉지배지의 총 높이는 21cm이며, 봉지배지의 윗부분에 3cm V자 구멍을 만들고, 밑부분에도 3cm V자 구멍을 만들며, V자 구멍은 위면과 아랫면 및 V자 구멍 간격을 5cm로 하며, 구멍이 만들어진 지면 노지 위에 세워 놓는다.

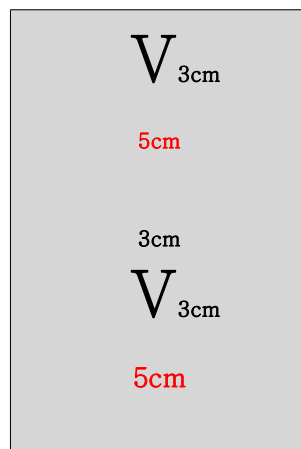


그림 4. 자실체 발아 구멍 만들기 방법

- 봉지배지에 물이 들어가면 빠질 수 있게 칼로 찢어준다.

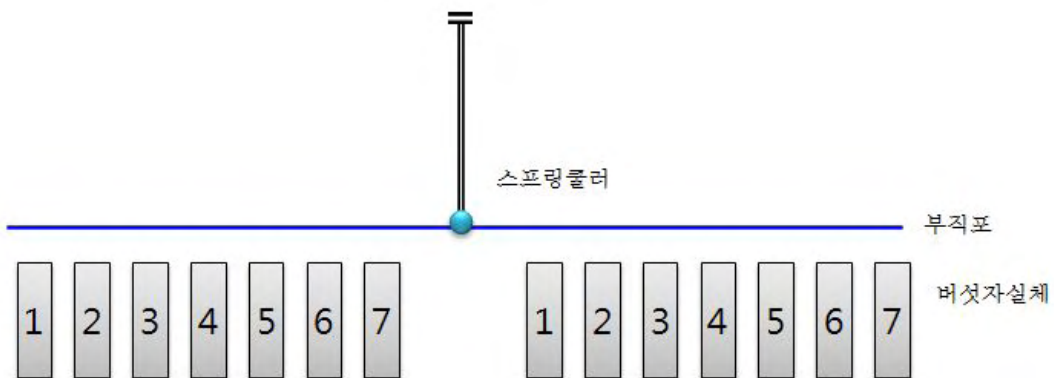


그림 5. 스프링롤러 기법의 노지재배 급수방식



그림 6. 버섯자실체 발아 되는 모습.

- 배지봉지를 V자 구멍을 낸 후, 노지 부직포 위에 세로로 세워 놓았다.



그림 7. 노지재배에 앞서 봉지배지에 V자 구멍을 만들어 주고 있는 광경.

- V자 구멍 만들기는 1인이 1일에 1,500봉 이상 작업할 수 있다.



그림 8. 노지배재 상태에서 스프링쿨러를 이용하여 물을 주어 자실체 발아를 유도.

물주기 시간	오전(시)	오후(시)	밤(시)
평소	9, 11	1, 3, 5, 7	-
흐린 날	-	-	-
비오는 날	-	-	-

표 4. 자실체 발아 유도를 위한 스프링쿨러 작동 시간



그림 9. 20~25일 후의 노지배재 봉지배지에서 발아된 목이버섯 자실체

- 20~25일 이후의 된 목이버섯의 재배 관리는 목이버섯은 높은 온도인 낮 동안은 휴면시간이 고, 온도가 낮은 밤 시간에 생장을 하기 때문에, 낮 시간의 물주기 외에도 밤 시간 잠자기 전에 한번 물을 충분히 주어야 밤사이 버섯 자실체들이 잘 자란다.



그림 10. 30~35일 후 목이버섯 자실체 수확

수확 시기	버섯 규격 갓의 크기가 3~12cm일 때
수확 방법	왼손으로 봉지를 잡고, 자실체가 큰 버섯을 오른쪽 손가락으로 감싸서 한 방향으로 돌려 뿌리가 달려 나오지 않게 봉지에서 버섯을 수확한다. 이때, 버섯을 뽑아서는 안된다.
수확시 주의점	물을 준 후 수확하지 않는다.
수확 후	2차 생산을 위해 그림 8의 방법과 동일하게 물만 주어 관리한다.

표 5. 목이버섯 수확 시기 및 방법과 2차 생산을 위한 사후 관리 요령



그림 11. 2중 비닐하우스에서 목이버섯 자실체 동절기 재배

- 재배면적으로는 130평에서 10,000봉지를 재배할 수 있다.
- 노지재배가 안되는 시기는 동계절 기간으로 11월 초~4월 말까지 이며, 이 기간동안에는 하우스 재배함으로써 4계절 연속 재배를 할 수 있다.
- 하우스재배 방법은 하우스시설에 환풍시설을 잘해 주어야 하며, 하우스 바닥에 물이 잘 빠지도록 경사를 지워 놓고 부직포를 펴 주어야 한다.
- 동절기 하우스 재배에서 물주기 관리를 하기 위해서는 하우스 면적, 노지의 토질에 따라 건조도가 서로 다르므로 재배자들이 충분히 관찰하여 배지 물주기 시간을 상황에 맞게 조절하는 것이 필요하다.



그림 12. 목이버섯 자실체 발아 13-15일



그림 13. 수확시기의 노지재배장

5) 목이버섯 봉지재배용 톱밥배지의 생산성 향상을 위한 추가 최적화

- 기 개발된 목이버섯 봉지재배용 톱밥배지의 생산성 향상을 위해 다양한 재료를 추가하여 실험을 수행하였다.
- 톱밥재료로는 기존의 참나무톱밥, 미루나무톱밥과 각종 나무톱밥이 섞여있는 재료를 사용하였으며, 그 외 첨가성분으로 쌀겨, 옥수수 속대(콘코브), 면실피 팔렛을 기존과 동일하게 사용하고, 추가로 미량성분인 게르마늄 함유 흑토를 첨가하고 수산화칼슘의 첨가량을 최적화하여 목이버섯 성장률이 우수한 혼합비율을 선정하고자 하였다.
- 톱밥배지 최적화를 위한 각종 배지성분의 혼합비율은 표 6에 제시하였으며, 각각의 배지에서 수확한 목이버섯 수확량(g/1.2kg)은 그림 14에 나타내었다.

- 톱밥배지 성분 및 배지성분 혼합비율 실험 결과, 배지3인 참나무톱밥 74%, 짚겨 20%, 게르마늄 흑토 3%, 수산화칼슘 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 3%의 배지성분을 혼합하여 목이버섯 봉지재배용 톱밥배지로 최적하여 이후 노지재배와 하우스재배를 위한 농장재배실험의 톱밥배지로 사용하였다.

배지비율	참나무 톱밥 (%)	미루나무 톱밥 (%)	각종나무 톱밥 (%)	면실피 팔렛 (%)	짚겨 (%)	옥수수 속대 (%)	게르마늄 흑토 (%)	$\text{Ca}(\text{OH})_2$ (%)
1	74	0	0	0	20	0	3	3
2	0	74	0	0	20	0	3	3
3	0	0	47	0	0	47	3	3
4	0	0	47	47	0	0	3	3

표 6. 목이버섯 군사 배양 및 재배배지의 성분 비율

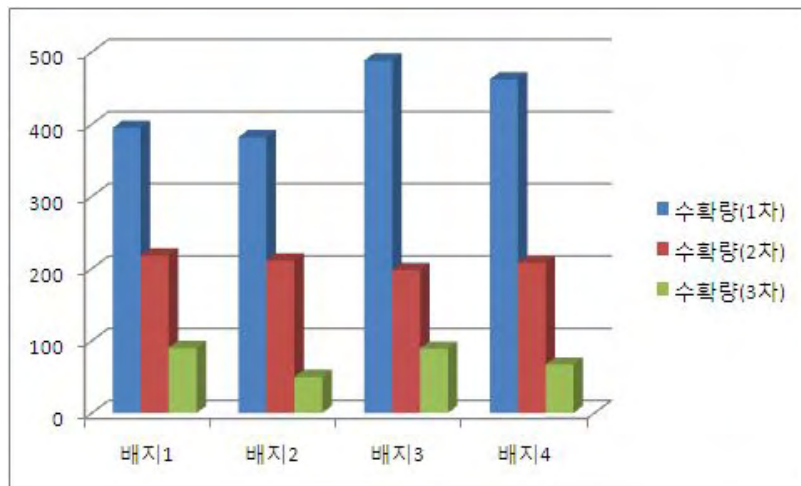


그림 14. 다양한 톱밥배지에서의 수확량 비교

6) 목이버섯 균주(백두1호)의 봉지배지 방식의 노지재배에 대한 농가에서의 실제 생산성 평가

- 농가에서의 실제 생산성 평가를 위해 9개 지역 농장에 목이버섯 총 57,000봉을 노지재배 및 하우스재배를 통해 지역별, 계절별 봉지 당 수확량을 비교 분석 하였다.
- 목이버섯의 노지재배 생산성 평가를 위해 목이버섯을 재배한 농장별 및 계절별 총 수확량은 표 7에 제시하였다.

		봄					평균 수확량 (g/봉)
		봉지수	1차	2차	3차	합계(kg)	
상위구역 (강원, 서울,경기)	강원도 철원군 갈말읍	5,000	2,535	1,025	441	4,001	800
	경기도 안성시 일죽면					0	0
							800
중위구역 (충청도,경상북도)	충남 서산시 대산읍					0	0
	경북 예천군 대심리	20,000	9,648	3,165	1,740	14,553	728
	경북 예천군 우계리	2,000	952	325	187	1,464	732
							730
하위구역 (전라도,경상남도)	전북 전주시 군산면 갈전리	10,000	4,875	2,017	519	7,411	741
	전북 완주군 소양면	10,000	4,800	1,898	802	7,500	750
	전남 여주시 봉산동					0	0
	전남 진도군 고군면 고성리	10,000	1,083	750	85	1,918	192
							561

		여름					평균 수확량 (g/봉)
		봉지수	1차	2차	3차	합계(kg)	
상위구역 (강원, 서울,경기)	강원도 철원군 갈말읍					0	0
	경기도 안성시 일죽면					0	0
							0
중위구역 (충청도,경상북도)	충남 서산시 대산읍					0	0
	경북 예천군 대심리	10,000	3,207	1,292	495	4,994	499
	경북 예천군 우계리	2,000	748	450	52	1,250	625
							562
하위구역 (전라도,경상남도)	전북 전주시 군산면 갈전리	10,000	3,840	1,568	590	5,998	600
	전북 완주군 소양면					0	0
	전남 여주시 봉산동					0	0
	전남 진도군 고군면 고성리					0	0
							600

		가을					
		농지수	1차	2차	3차	합계(kg)	평균 수확량 (g/봉)
상위구역 (강원, 서울, 경기)	강원도 철원군 갈말읍	10,000	5,085	1,948	970	8,003	800
	경기도 안성시 일죽면	10,000	5,120	2,080	801	8,001	800
							800
중위구역 (충청도, 경상북도)	충남 서산시 대산읍	10,000	4,560	2,248	690	7,498	750
	경북 예천군 대심리	10,000	4,795	2,000	713	7,508	751
	경북 예천군 우계리	2,000	1,012	315	175	1,502	751
							751
하위구역 (전라도, 경상남도)	전북 전주시 군산면 갈전리	10,000	4,725	2,125	650	7,500	750
	전북 완주군 소양면	10,000	4,752	1,925	828	7,505	751
	전남 여수시 봉산동	2,000	641	250		891	446
	전남 진도군 고군면 고성리					0	0
							649

		겨울					
		농지수	1차	2차	3차	합계(kg)	평균 수확량 (g/봉)
상위구역 (강원, 서울, 경기)	강원도 철원군 갈말읍					0	0
	경기도 안성시 일죽면	10,000	4,925	2,018	560	7,503	750
							750
중위구역 (충청도, 경상북도)	충남 서산시 대산읍	5,000	2,437	1,013	113	3,563	713
	경북 예천군 대심리					0	0
	경북 예천군 우계리					0	0
							713
하위구역 (전라도, 경상남도)	전북 전주시 군산면 갈전리					0	0
	전북 완주군 소양면					0	0
	전남 여수시 봉산동					0	0
	전남 진도군 고군면 고성리					0	0
							0

표 7. 목이버섯의 지역별, 계절별 총 수확량 및 봉지당 평균 수확량 비교표

가. 기후 특성에 따른 지역별 노지재배와 하우스재배 결과 비교

- 목이버섯 균주(백두1호)의 봉지재배에서의 목이버섯 생산성을 농가에서의 실제 생산량을 통해 평가하기 위하여 노지재배 및 하우스재배에서 계절별 수확량을 비교해 보았다(그림 15).
- 노지재배와 하우스재배를 실시한 국내 농장을 지역별로 3개 구역으로 나누었다.
- 상위, 중위, 하위 구역으로 나누어 목이버섯 생산량 데이터를 비교하였다.
- 상위구역은 강원도, 서울, 경기도로 설정하였으며, 중위구역은 충청도와 경상북도로 설정하였으며, 하위구역은 전라도와 경상남도로 설정하여 평가하였다.

- 각각의 3개 구역의 계절별 수확량 비교 결과 3개 구역 모두 춘계와 추계시기에 수확량이 가장 높은 것을 확인할 수 있었으며, 하계 시기에 생산량이 가장 낮게 나타났다.

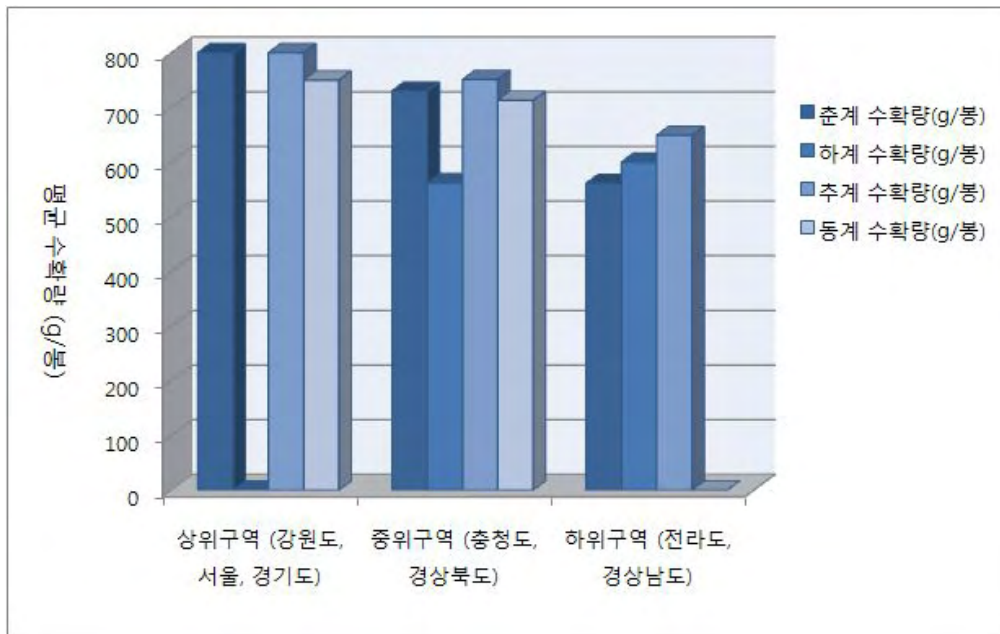


그림 15. 국내 구역별 계절에 따른 목이버섯 평균 수확량(g/봉) 비교

- 수확량이 높은 춘계와 추계 수확량을 지역별로 나눠 비교 평가해 본 결과(그림 16), 강원도, 서울, 경기도가 속한 상위구역에서 봉지당 수확량이 가장 많았다.
- 이것은 상위구역이 속한 지역의 기후 특성으로 볼 때, 본 과제의 목이버섯 공시균주가 저온성 품종임을 감안하면 목이버섯이 서늘한 기후 조건에서 자실체 성장이 우수한 것으로 평가할 수 있다.

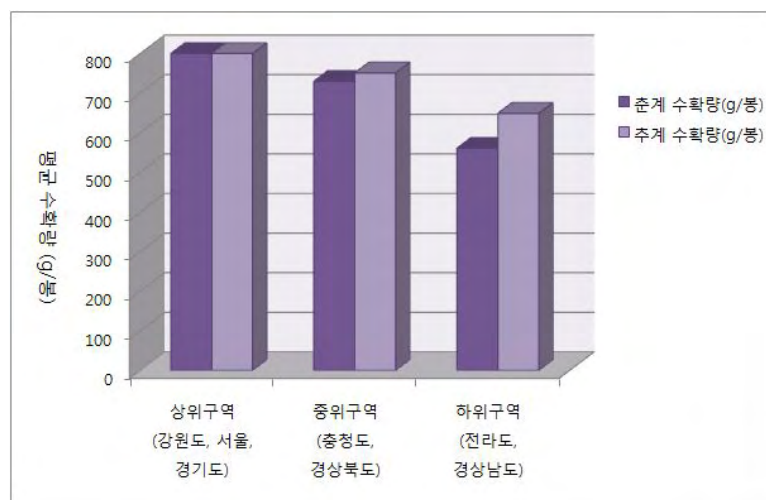


그림 16. 국내 구역별 춘계 및 추계 시기의 목이버섯 평균 수확량(g/봉) 비교

나. 하계 노지재배와 하우스재배 결과 비교

- 목이버섯 균주(백두1호)의 봉지배지에서의 목이버섯 생산에서 하계 재배의 수확량이 가장 낮아 하계의 생산성 향상 방안을 모색하기 위해 하계의 노지재배와 하우스재배에서의 수확량을 비교 평가하였다.
- 비교 실험은 경상북도 예천군 대심리(노지재배)와 우계리(하우스재배) 농장에서 여름에 노지재배 10,000봉지와 하우스재배 2,000봉지를 대상으로 봉지당 수확량을 비교하였다 (그림 17).
- 그 결과, 일반적으로 노지재배에서 목이버섯 수확이 거의 불가능하여 하우스재배가 필수적인 동절기는 물론 기온이 고온으로 올라가는 하계의 생산에 있어서도 하우스재배가 유리한 것으로 나타났다.
- 본 과제의 공시균주는 북한으로부터 연구하고 보존한 저온성 품종으로, 노지재배에 있어서 하절기(하계)의 수확량이 급격히 감소하는 바, 이를 해결하고자 하절기의 강렬한 햇빛을 차단하기 위해 차양막 역할을 할 수 있는 하우스에서 재배함으로써 하절기 수확량이 감소하는 문제점을 일부 해결할 수 있었다.
- 하절기 중위구역인 경상북도 예천군 소재의 농장에서 노지재배와 하우스재배의 수확량을 비교한 결과 노지재배의 경우 1봉지배지 당 499g의 목이버섯을 수확한 반면, 하우스재배에서는 625g을 수확할 수 있었다. 따라서 수확량이 급감하는 문제점이 있는 하계에는 하우스시설이 있거나 차양막을 설치할 경우 하절기의 생산성 향상에 기여할 수 있다고 판단된다.
- 그러나 하계 하우스재배의 수확량 보다 동계 하우스재배의 수확량이 더 높게 나타났으며, 춘계 및 추계의 노지재배 수확량에 비해서는 하계는 물론 동계의 하우스재배 수확량이 많이 떨어지는 수준이다.
- 따라서 목이버섯 재배에 있어서 온도가 중요한 것으로 판단된다.

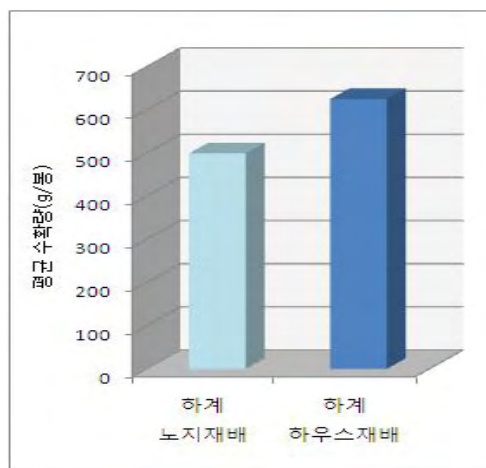


그림 17. 하절기 노지재배와 하우스재배의 수확량 비교(경상북도 예천군).

다. 시험재배 봉지당 버섯 수확 800g 달성

- 결론적으로 상위구역에 속하는 강원도 철원군과 경기도 안성시 농장의 경우에 춘·추계 노지 재배 수확에서 평균 봉지당 수확량 800g을 달성하는 좋은 성과를 얻었다(그림 18).
- 평균 봉지당 수확량 800g 달성은 3차년도와 최종목표 이기도 하다.
- 최종적으로 목이버섯 노지재배 수확이 불가능한 동계에도 겨울 하우스재배를 통해 710g~750g의 수확량을 얻을 수 있었다(표 7).
- 그러나 하계 노지재배의 경우 수확량이 가장 낮게 나타났으며, 하계 하우스재배를 통해 수확량이 향상되기는 하였으나 춘계 및 추계의 노지재배와 동계의 하우스재배 수확량에 비해 크게 낮았다. 따라서 향후 하계용 목이버섯 종균 개발이 필요할 것으로 판단된다.

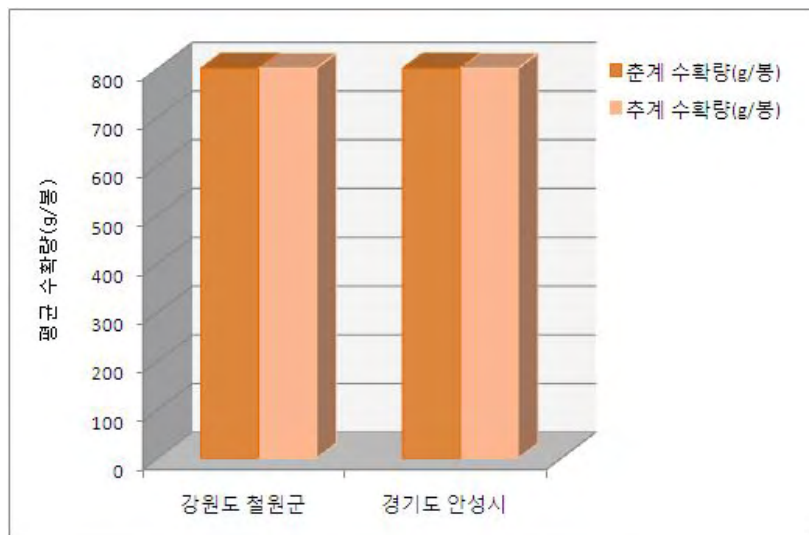


그림 18. 강원도와 경기도 재배농장의 봉지당 평균 수확량

7) 재배조건에 따른 목이버섯 자실체의 면역활성 평가

가. 재배조건에 따른 목이버섯 자실체의 면역활성 평가

(1) 목이버섯 자실체의 시료별 면역활성 역가 비교

- 다양한 목이버섯 자실체 시료(N1~N5)에 대한 면역활성 역가 비교 평가 실험을 수행하였다. 목이버섯 자실체의 유효성분 추출공정 조건을 목이버섯 자실체 시료 (N1~N5)에 적용하여 비교 실험을 수행하였다. 본 연구과제의 면역활성 역가 비교평가에 있어서 사용한 대조군으로는 대표적인 면역증강제로 Kg 당 90만원에 판매되고 있는 정제된 Fucoidan을 기준물질로 사용하여 목이버섯 자실체의 면역활성 역가를 비교평가 하였다.

(2) 연구내용 및 실험방법

- 본 과제의 연구에 사용된 목이버섯 자실체는 협동기관인 웰빙자연영농조합법인으로부터 5차례에 걸쳐 생·건목이버섯 자실체를 제공받아 실험에 사용하였다. 자연건조 목이버섯 자실체는 분쇄기로 미분쇄하여 사용하였으며, 생목이버섯 자실체는 자연 그대로의 생목이버섯 자실체를 열수추출하거나, 동결건조 후 미분쇄하여 사용하였다. 웰빙자연영농조합법인으로부터 제공받은 N1~N5 목이버섯 자실체는 목이버섯의 전형적인 특징인 검은 빛과 향이 조금씩 다른 것을 관찰할 수 있었으며, 재배장소, 수확시기, 수확차수 등의 수확조건 등이 서로 다른 것을 제공받았다. 실험결과 각각의 목이버섯 자실체 시료마다 면역활성 역가에서 차이가 나는 것을 확인하였다.

(나) 연구 결과

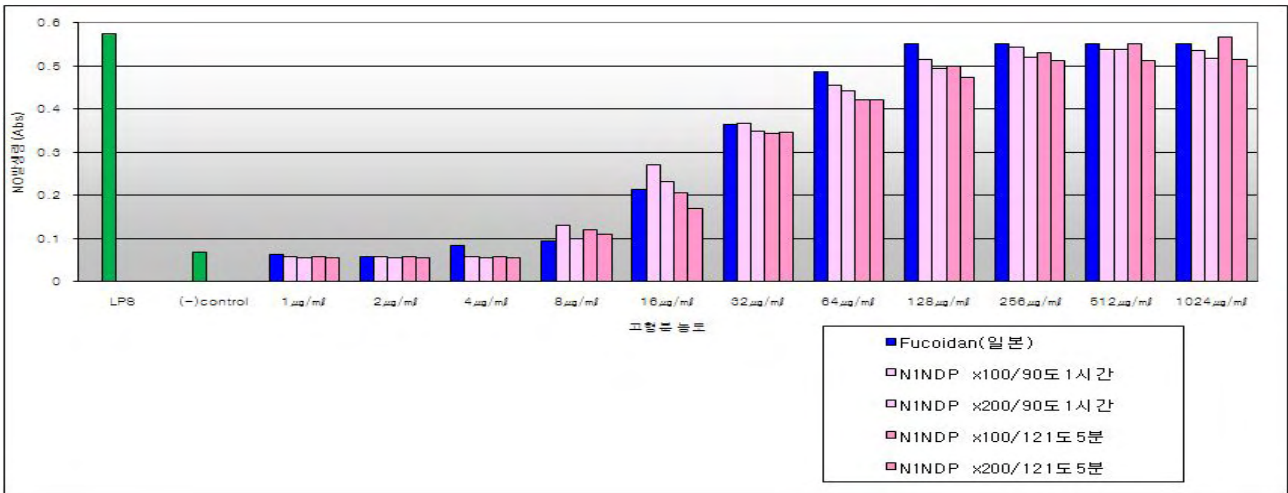


그림 19. Comparison of macrophage activity according to the water extraction conditions (supply of water, temperature, times) of N1NDP.

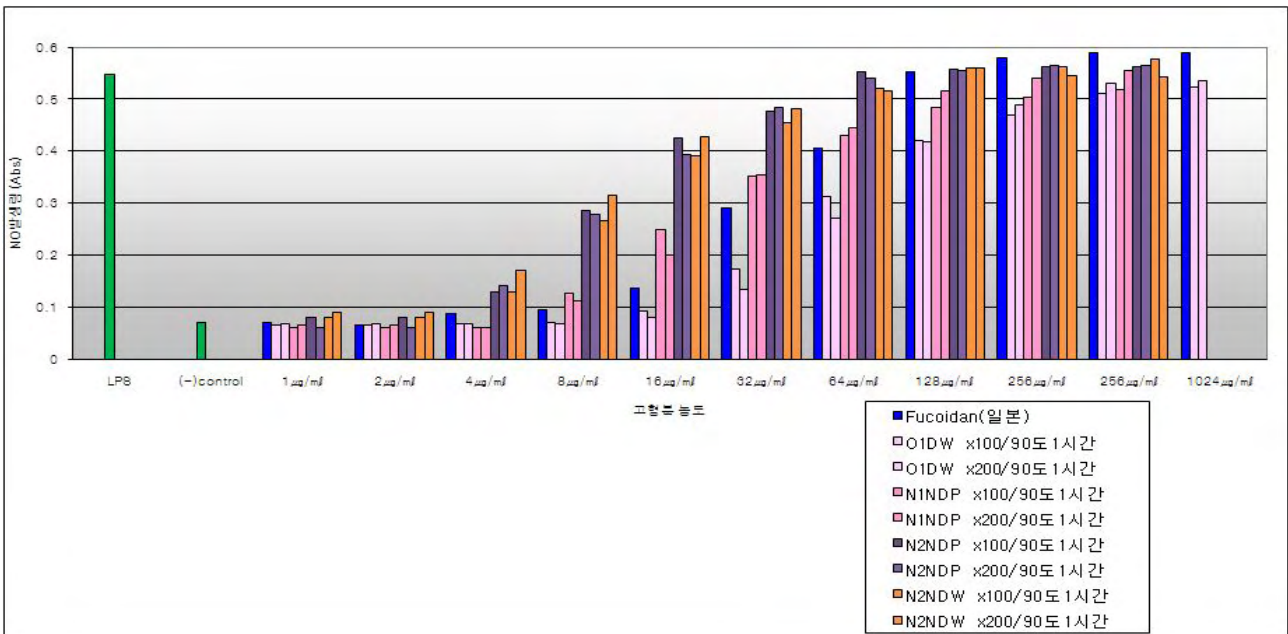


그림 20. Comparison of macrophage activity according to the water extraction conditions (supply of water, temperature, times) of O1DW, N1NDP, N2NDP and N2NDW.

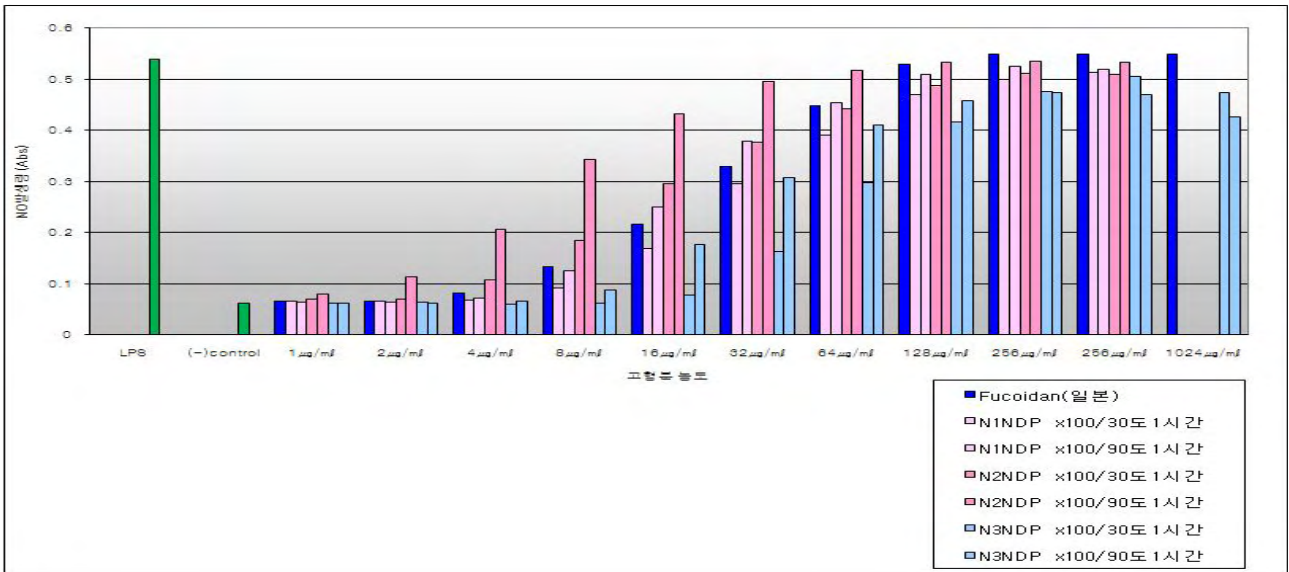


그림 21. Comparison of macrophage activity according to the water extraction conditions (supply of water, temperature, times) of N1NDP, N2NDP and N3NDP.

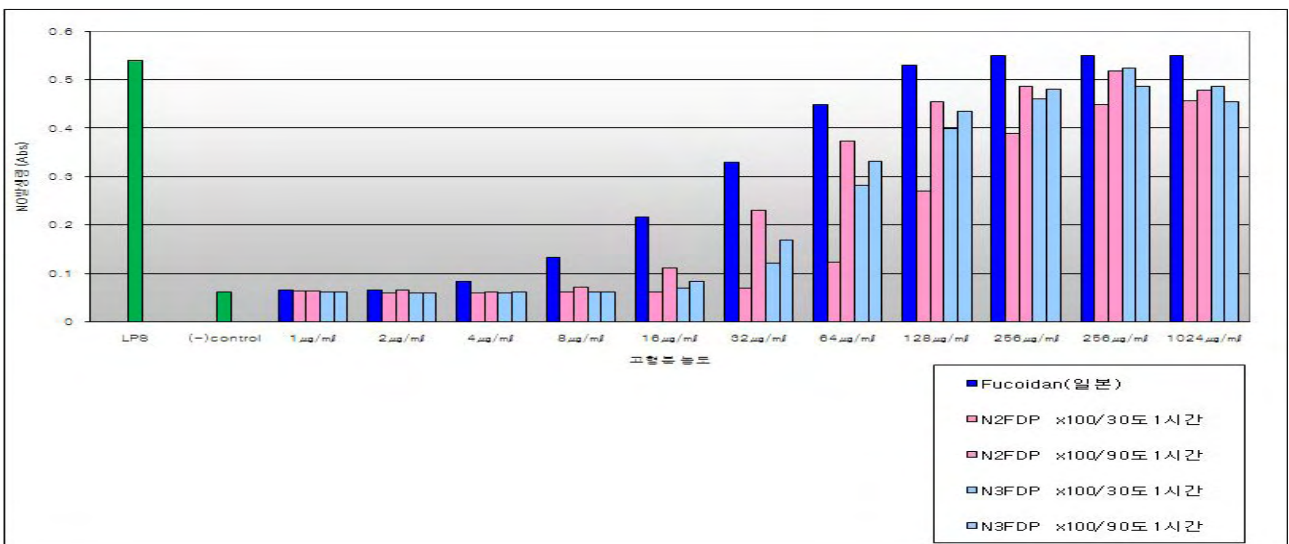


그림 22. Comparison of macrophage activity according to the water extraction conditions (supply of water, temperature, times) of N2FDP and N3FDP.

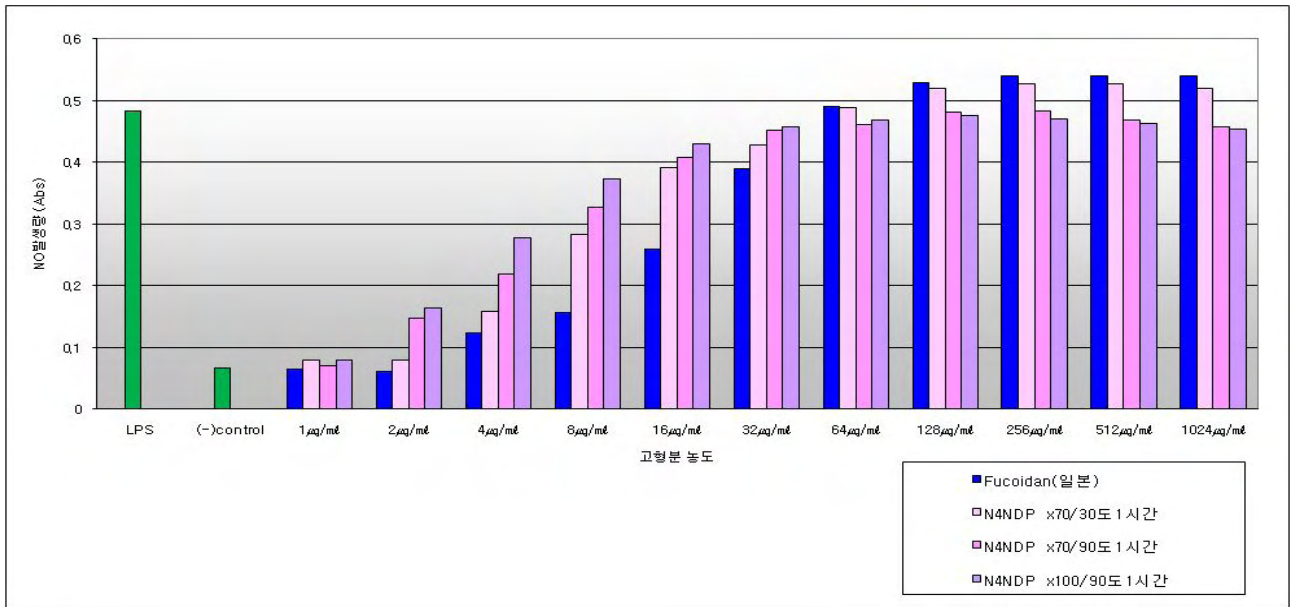


그림 23. Comparison of macrophage activity according to the water extraction conditions(supply of water, temperature, times) of N4NDP.

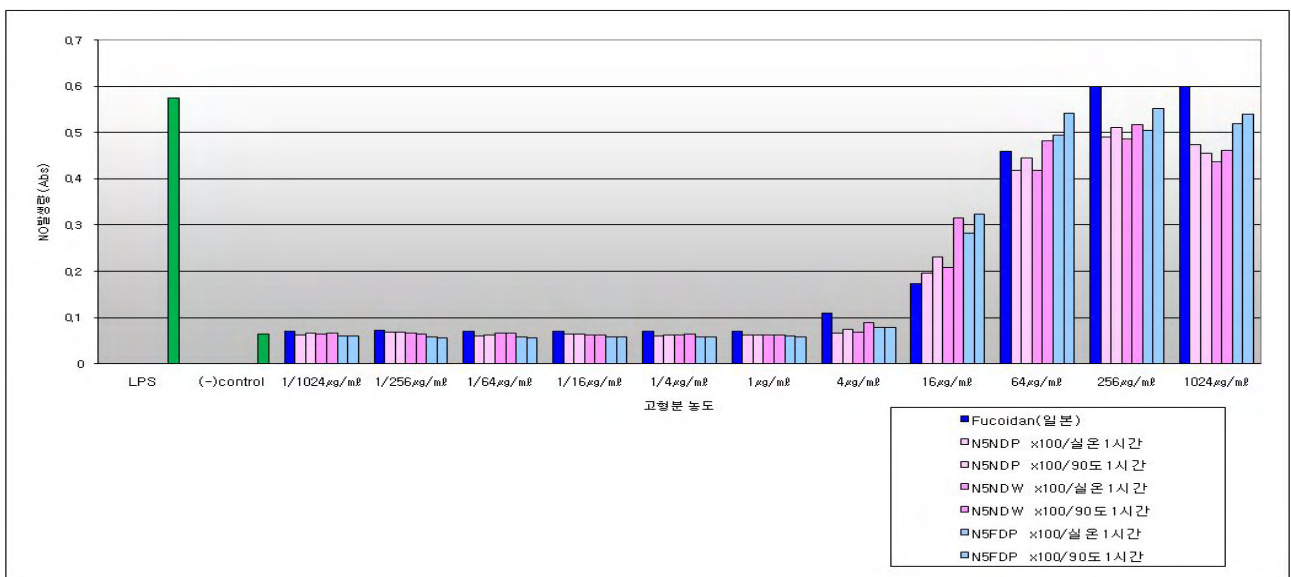


그림 24. Comparison of macrophage activity according to the water extraction conditions(supply of water, temperature, times) of N5NDP, N5NDW and N5FDP.

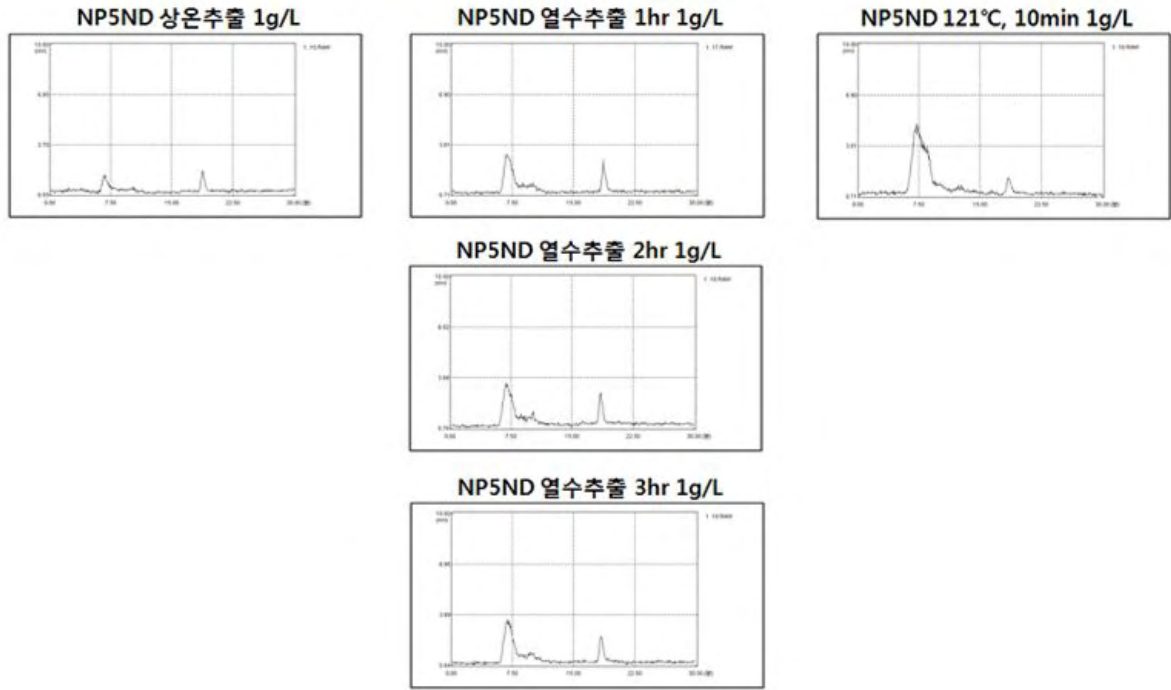


그림 25. HPLC chromatogrames of the polysaccharide according to the water extraction conditions of N5NDP.

- 그림 19.의 실험결과에서는 N1NDP 시료의 경우 열수추출 물배수의 비율(100배수, 200배수)과 온도(90°C, 1시간 및 121°C 5분)에 따른 면역활성 역가에는 큰영향을 미치지 않는 것이다.
- 그림 20.의 실험결과에서는 웰빙영농조합법인으로부터 제공받은 O1 시료와 N1, N2 시료의 면역활성 역가를 비교해 보았을 때, O1 시료 보다 N1 시료의 면역활성 역가가 높으며 특히, N2 시료가 월등히 높은 것을 확인할 수 있었으며, 목이버섯 자실체를 원형 그대로 추출한 O1DW와 N2NDW 결과를 비교해 보았을 때도 N2시료의 면역활성 역가가 월등히 높았다. 또한 N2 목이버섯 자실체를 분쇄한 N2NDP와 원형 그대로 추출한 N2NDW 시료를 비교해 보았을 때, N2목이버섯 자실체의 경우에는 분쇄정도가 면역활성 역가에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.
- 그림 21.의 실험결과에서는 N1, N2 그리고 N3 목이버섯 시료를 열수추출 물배수 100배, 90°C, 1시간 조건으로 동일하게 열수추출하였다. 상기 결과와 마찬가지로 N1 보다는 N2의 면역활성 역가가 높았으며 N3 목이버섯 시료의 경우엔 면역활성 역가가 4배 정도 낮은 것을 확인할 수 있었다. 목이버섯 자실체는 자실체가 발아한 상태의 톱밥배지에서 대략 15-20일 동안 배양하면 수확할 정도의 크기로 자라게 되어 1차 수확을 하고, 다시 15-20일이 경과되면 2차 수확 가능할 정도의 크기로 자라 2차 수확하는 방식으로, 3차까지 수확을 한다. 이때 수확차수가 높을 수록 목이버섯 자실체의 전형적인 검은색은 점점 흐려져 가는 것을 관찰할 수 있었으며, N3 시료의 경우 목이버섯 자실체의 색이 N1, N2와 비교해 보

았을 때 좀 흐리게 관찰되어 1차 수확 시료는 아닌 것으로 예상하였으며, 면역활성 역가가 수확 차수에 따라 다르게 나타나는 것을 예상할 수 있었다.

- 그림 22.의 실험결과에서는 생목이버섯 자실체를 동결건조 후 분쇄하여 면역활성 역가를 조사해 보았다. 앞서의 자연건조 목이버섯 자실체 분말과 비교해 보았을 때, 동결건조 자실체 분말의 역가가 현저하게 낮은 것으로 나타났다. 자연건조 목이버섯 자실체 분말의 면역활성 역가는 N2 시료가 N3 시료에 비해 월등히 높았으나, 동결건조 목이버섯 자실체 분말의 면역활성 역가는 반대로 N3 시료가 다소 높은 것을 관찰할 수 있었다. 또한 N3 시료의 동결건조 목이버섯 자실체 분말의 실험결과는 그림 21에서의 자연건조 목이버섯 자실체 분말 결과와 차이가 나지 않는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 자연건조 목이버섯 분말의 면역활성 역가 경향이 동결건조 면역활성 역가 경향과 정비례 관계를 가지지는 않는 것으로 판단된다.
- 그림 23.의 실험결과에서 N4 시료는 앞서의 N2 시료와 비슷한 면역활성 역가를 나타냈다.
- 그림 24.의 실험결과에서는 N5 시료는 N1 시료와 비교하였을 때 면역활성 역가가 대략 2배 정도 높게, N2 시료와 비교하였을 때 대략 4배 정도 낮게 관찰되었다. 목이버섯 자실체 원형 그대로 열수추출하거나, 분쇄하여 열수추출한 결과는 거의 동일하게 관찰되었고, 앞서의 실험결과에서 제시한 것과 달리 N5 시료의 경우 열수추출 시료에서의 면역활성 역가가 목이버섯 자실체 동결건조 분말에서 오히려 다소 높게 나타나는 실험결과를 관찰할 수 있었다.
- N5NDP 시료의 열수추출 조건에 따른 다당체 함량을 HPLC로 분석해 보았다(그림 25). 실험결과에서는 열수추출 시간이 1시간에서 3시간으로 길어질수록 목이버섯 자실체로부터 추출되는 다당체의 함량은 증가하였으며, 121도 고압력 조건에서 다당체 함량이 더욱 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 앞서의 실험결과에서도 관찰하였듯이, 열수추출 온도가 높고, 시간이 길어질수록 면역활성 역가는 낮아지는 것을 확인하였다. 따라서 HPLC에서 분석되는 다당체가 모두 동일한 면역활성 효능을 가지는 다당체가 아니며, 면역활성 역가와 HPLC에서 분석되는 다당체 함량간에 정비례 관계가 성립하지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.
- 상기 실험을 종합해 보았을 때, 목이버섯 자실체의 종류별로 비교 평가한 N1~N5 시료간 면역활성 역가 경향에 차이가 많이 나는 것으로 보아, 재배조건 및 수확시기 등의 조건에 따라 면역활성 역가에 상당한 영향을 미치는 것으로 판단할 수 있었다.

제3절 협동과제2 연구개발 결과

※ 목이버섯의 바이오컨버전 발효공정 및 바이오컨버전산물의 청정추출분리정제공정 개발

1) 목이버섯의 생리활성 지표성분 분석법 확립 : β -Glucan 구조의 면역활성 다당체

가. HPLC를 이용한 목이버섯 자실체 및 바이오컨버전산물의 면역활성 다당체 분석

(1) HPLC를 이용한 면역활성 다당체 분석]

- HPLC 분석을 위한 시료 전처리는 각 시료의 무게를 측정하여 일정 농도로 조제하여, 12,000rpm에서 원심분리 후 0.45 μ m 크기의 syringe filter로 불용성 물질들을 제거하고, 상등액 20ul를 injection하여 HPLC용 gel chromatography column과 detector를 이용하여 분석하였다.
- 다당체의 분석을 위해 대조군 시료로써 소화기암, 간암환자와 절제 수술 후, 화학요법과의 병용에 의한 면역기능 항진 등의 효과로 식품의약품안전청에서 허가된 전문의약품인 (주)한국신약의 [메시마캡셀550]과 비교 분석하였다. [메시마캡셀550]은 세포독성 항암 치료를 보조하기 위한 면역기능 증진제로 현재 처방되고 있으며, 상황버섯 균사체 추출물(*Phellinus linteus*의 다당류)을 포함하는 항암면역활성이 있는 산성다당류(153kD)를 유효성분으로 가지는 것으로 알려져 있다. [메시마캡셀550]의 HPLC분석 결과, 5~7분 지점에서 다당체 피크가 검출되었으며, 11~13분 지점에서는 단당류를 포함하는 부형제 피크가 검출되는 것을 확인하였다. 대조군과 비교하여 보았을 때, 목이버섯 자실체 추출물 및 바이오컨버전산물의 분석 결과에서도 동일 머무름 시간대인 5~7분 지점에서 다당체 피크가 검출되는 것을 확인할 수 있었다(그림 1).

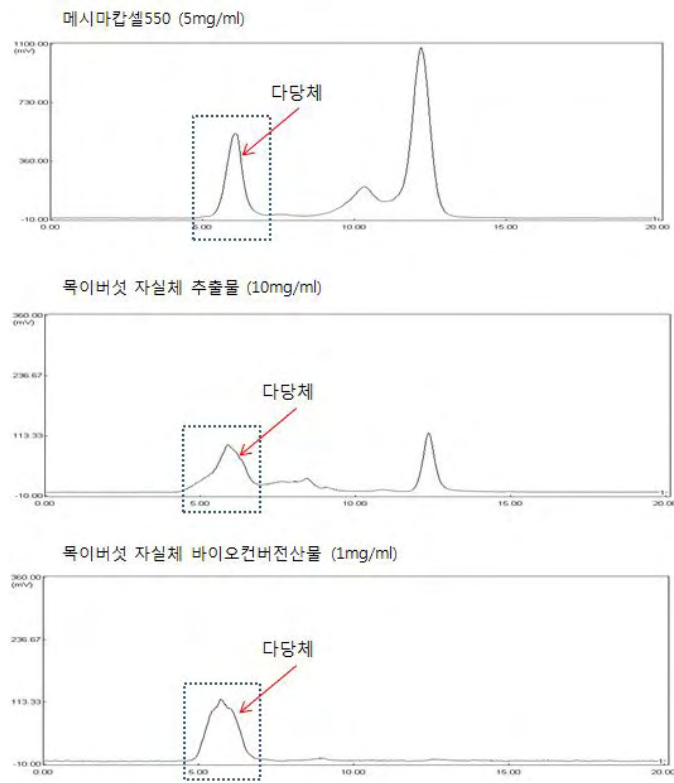


그림 1. Chromatograms of HPLC analysis.

나. Bioassay를 이용한 목이버섯 자실체 및 바이오컨버전산물의 면역활성 분석

(1) 마우스 대식세포를 이용한 면역활성 Bioassay 분석

- 5% DMEM media를 사용하여 마우스 대식세포의 배양 및 assay를 수행하였다.
- 면역활성 측정을 위한 마우스 대식세포는 24well plate의 각 well에 1×10^5 cell/ml의 농도로 세포를 계대배양하였다. 24시간 배양 후 현미경으로 cell growth 상태를 확인한 뒤, 배지를 완전히 제거한 다음 혈청이 첨가되지 않은 배지로 2~3회 washing 하여준다. 각 well에 시료가 첨가된 5% FBS DMEM 배지를 채워준다. 시료의 농도는 1,024 μ g/ml 농도를 시작으로 1/2 serial dilution을 하여 각각의 시료 농도가, 1,024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 μ g/ml 되도록 희석 하였다.. 또한, positive(+) control로 최종농도 0.1 μ g/ml의 LPS를 처리 하였다. 시료가 처리된 24well을 8~24시간 배양 후 각 well의 배양액을 400 μ l씩 취하고, 400 μ l씩 취한 배양액을 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액만을 취하여 assay에 사용 하였다.
- 96well plate에 각각의 시료와 serial dilution 된 standard를 100 μ l 분주하고, Griess reagent (① N-(1-naphtyl) ethlene diamine dihydrochloride : 0.5g/500ml ② Sulfanilamide : 5g / 85% H₃PO₄ 29.5ml/470.5ml)를 100 μ l 분한 후 1분간 반응시킨다. ELISA leader를 이용하여 540nm(또는 550nm)에서 흡광값을 측정하여 다양한 시료의 면역활성 역가를 측정하였다.

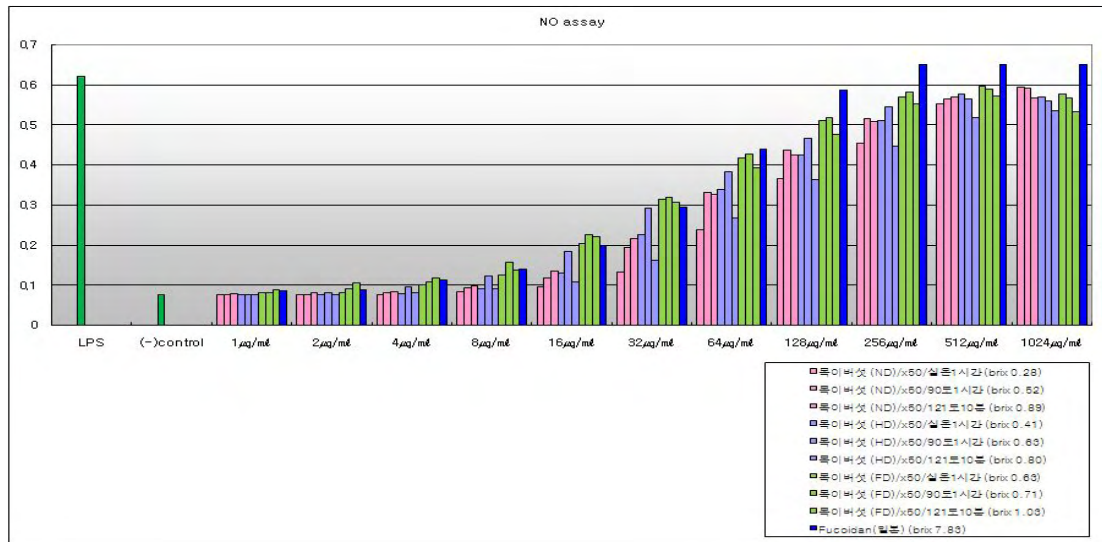


그림 2. Results of bioassay analysis on mouse macrophage cell.

2) 목이버섯 자실체의 청정추출분리정제공정 개발

- 목이버섯 자실체 유래 β -Glucan 구조의 수용성 다당체 등의 생리활성물질의 추출수율 향상에 있어서 추출방법, 추출온도, 추출용매, 추출시간 등이 영향을 미치므로 각각의 변수에 대한 최적화 실험을 수행하였다.
- 일반적으로 버섯 자실체의 추출 방법 중 열수추출 방법이 일반적으로 가장 많이 사용되고 있는 방법으로 시료를 대량으로 추출할 수 있는 장점을 가지고 있다. 산/알카리 추출 방법은 목이버섯 자실체 추출액이 갖는 고점성을 저점성화 하고 동시에 면역활성을 향상시키기 위해 조사하였다.
- 버섯 자실체 또는 균사체 세포벽 구성성분인 β -glucan 구조의 불활성 다당체를 β -glucan 구조의 수용성 면역활성 다당체로의 변환을 통해 면역활성을 향상시키기 위해서 산/알카리를 이용한 추출방법, 추출온도, 추출시간 등 영향을 미치는 변수에 대한 최적화 실험을 수행하였다.

가. 열수추출 조건 최적화

- 목이버섯 자실체의 열수추출 시 최적의 추출조건을 확립하고자 추출용매 비를 각각 50배수와 100배수로 고정한 후, 다양한 온도와 시간에서 추출을 하였다.
- 목이버섯 자실체의 건조조건에 따라서 분쇄 시 분말의 입도가 달라지는 현상이 나타나므로, 추출수율의 함량에 많은 영향을 미치는 목이버섯 자실체 건조조건도 함께 비교해 보고자 하였다.
- 목이버섯 자실체는 목이버섯 재배지인 웰빙자연영농조합의 목이버섯 농장에서 직접 자연건조 시킨 자연건조 시료, STR바이오텍에서 80℃ 하루 정도 건조시킨 열풍건조 시료와 동결건조를 하여 얻은 동결건조 시료 등 총 3가지 조건의 건조분말을 가지고 비교실험을 수행하였다(그림 3, 4, 5).
- 목이버섯 자실체의 열수추출 온도는 실온(25℃)에서의 추출보다는 90℃에서 1시간 추출 조건에서 면역활성 역가가 높게 측정 되었으며, 121℃, 10분간 고온에서 추출하는 조건에서는 추출용매 비가 높아질수록 면역활성 역가가 낮아지는 것을 관찰하였다.
- 추출용매 비의 비교에 있어서는 50배수의 추출용매 비의 추출조건에서 100배수 추출용매 비의 추출조건보다 면역활성 역가가 다소 높게 측정되었다(그림 3, 4).
- 목이버섯 자실체의 동결건조 시료의 열수추출 온도로 30℃, 60℃, 90℃에서 1시간 추출하는

조건과 121°C 고온에서 열수추출 시간을 5분으로 단축하는 실험과 30분으로 연장하는 실험을 비교해 보았다(그림 5).

- 실험결과 30°C와 60°C의 온도보다는 90°C, 1시간 조건에서 추출물에 대한 면역활성 역가가 가장 높게 측정되었으며, 121°C의 고온에서는 추출용매 비가 낮고, 추출시간이 짧을 경우 면역활성 역가가 높게 나타나나, 추출용매 비가 높고 또한 추출시간이 연장될수록 추출물에 대한 면역활성 역가가 낮아지는 현상을 관찰할 수 있었다.
- 추출용매 비의 최적조건은 50배수의 추출용매 비 추출조건에서 100배수나 200배수의 용매 비 추출조건에 비해 추출물의 면역활성 역가가 높게 측정되었다.
- 또한 목이버섯 자실체의 건조조건 비교 실험결과, 자연건조나 열풍건조의 경우 목이버섯 자실체가 딱딱하게 건조되어 분쇄하는데 어려움이 있었으며, 동결건조의 경우 입도가 작게 분쇄되어서 결과적으로 추출물에 대한 다당체 추출 수율 및 면역활성 역가가 가장 좋게 측정되었다.

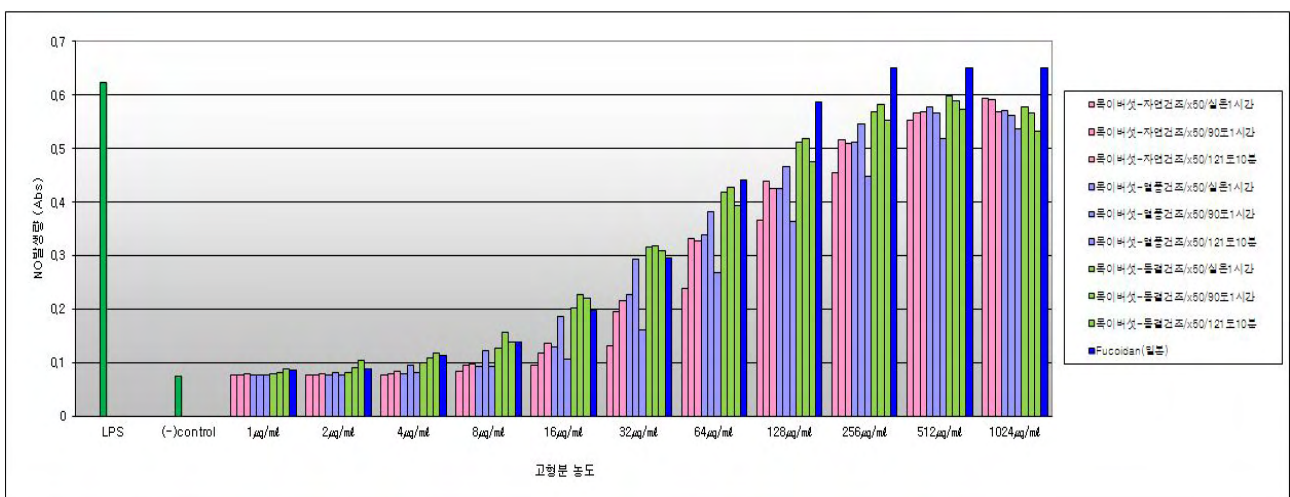


그림 3. 목이버섯 자실체 열수추출 조건 최적화 결과 ; 추출온도(실온, 90°C, 121°C), 추출시간(1시간, 10분), 추출용매 비(50배수), 건조조건(자연건조, 열풍건조, 동결건조) 비교

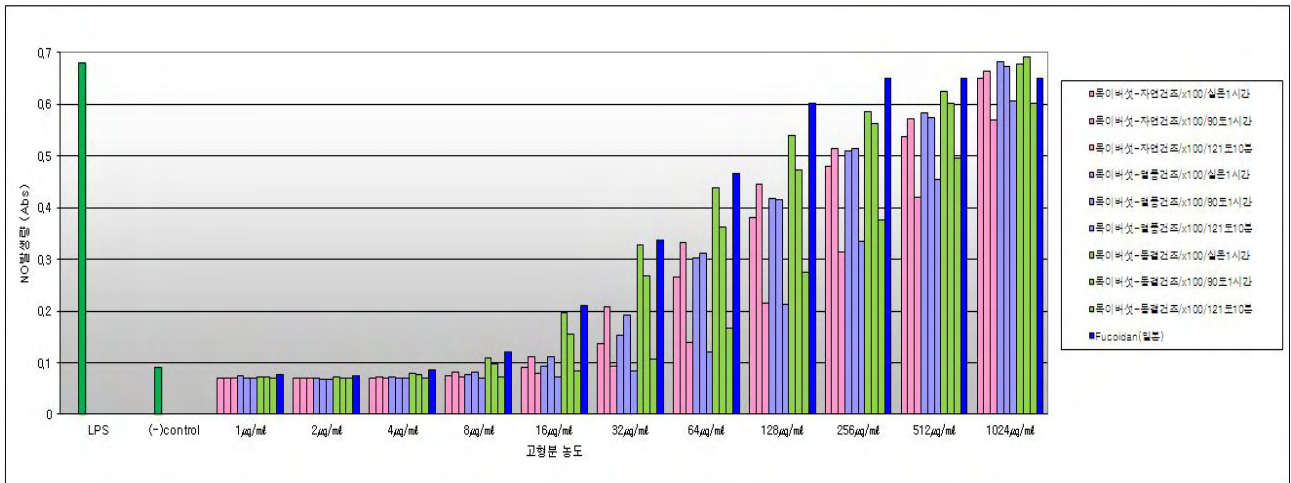


그림 4. 목이버섯 자실체 열수추출 조건 최적화 결과 ; 추출온도(실온, 90°C, 121°C), 추출시간(1시간, 10분), 추출용매 비(100배수), 건조조건(자연건조, 열풍건조, 동결건조) 비교

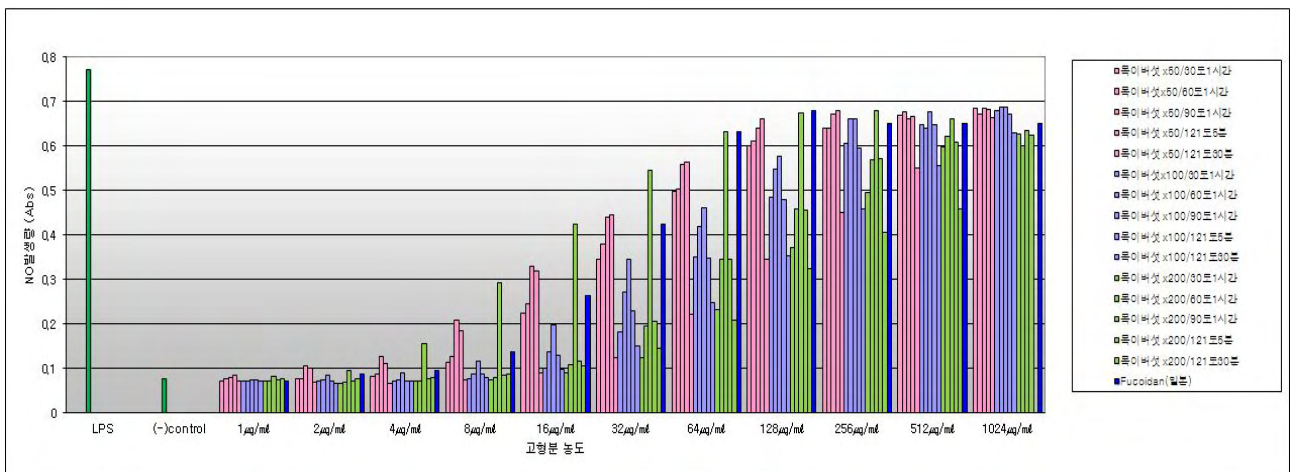


그림 5. 목이버섯 자실체 동결건조 시료의 열수추출 조건 최적화 결과 ; 추출온도(실온, 30°C, 60°C, 90°C, 121°C), 추출시간(1시간 및 5분, 30분), 추출용매 비(50배수, 100배수, 200배수) 비교.

나. 산/알카리 및 Chemical 처리의 추출조건 최적화

- 목이버섯 자실체의 산/알카리추출 시 최적의 추출조건을 확립하고자 추출용매 비를 각각 50 배수와 100배수로 고정한 후, 다양한 농도의 유기산과 chemical을 사용하여 다양한 추출온도와 추출시간에서 비교실험을 수행하였다.
- 목이버섯 자실체의 건조조건에 따른 추출수율이 면역활성 역가에 미치는 영향을 상기 실험

에서 관찰하였기 때문에 목이버섯 자실체 동결건조 분말을 사용해서 이후 실험을 진행하였다(그림 6, 7, 8).

- 먼저 앞의 실험에서와 같이 추출온도가 높아질수록 추출물에 대한 면역활성 역가가 다소 향상되며, 90°C, 1시간 또는 121°C, 5분의 조건에서 가장 높은 면역활성 역가를 측정할 수 있었다.
- 0.2% 또는 0.5% 농도의 유기산을 처리한 경우 점성 저하와 함께 면역활성 역가도 현저히 저하되는 것을 확인할 수 있었다(그림 6, 7).
- 목이버섯 자실체 열수추출액이 가지는 점액성은 낮은 농도의 산처리조건에서도 현저히 낮아짐을 확인할 수 있었으며, 이는 점액성 다당체의 저분자화가 일어나 점성이 낮아지는 것으로 해석된다.
- 점성의 저하와 함께 면역활성 역가도 현저하게 낮아지는 것으로 보아, 목이버섯 자실체의 면역활성 역가를 유지하면서 저점성화하기 위해 좀 더 최적화 실험이 진행되어야 할 것으로 사료된다.
- 다양한 농도로 chemical을 처리한 추출조건에서는 점성은 현저히 낮아지나 면역활성 역가는 어느 정도 유지됨을 관찰할 수 있었다(그림 8).

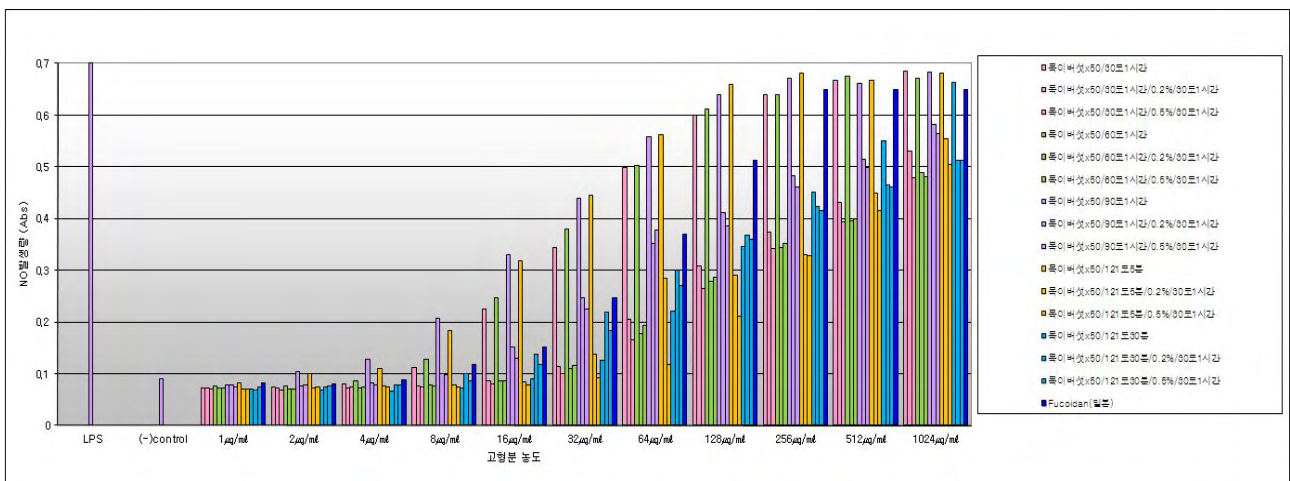


그림 6. 목이버섯 자실체 산/알카리추출 조건 최적화 결과 ; 유기산 농도(0.2%, 0.5%), 추출온도(30°C, 60°C, 90°C, 121°C), 추출시간(1시간 및 5분, 10분, 30분), 추출용매 비(50배수), 건조조건(동결건조) 비교.

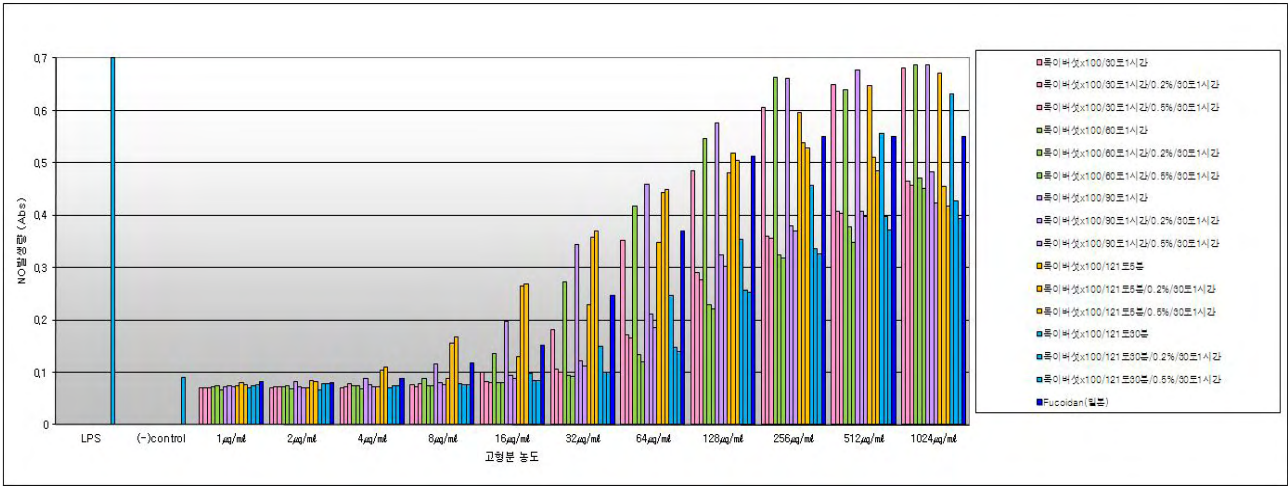


그림 7. 목이버섯 자실체 산/알카리추출 조건 최적화 결과 ; 유기산 농도(0.2%, 0.5%), 추출온도(30℃, 60℃, 90℃, 121℃), 추출시간(1시간 및 5분, 10분, 30분), 추출용매 비(100배수), 건조조건(동결건조) 비교.

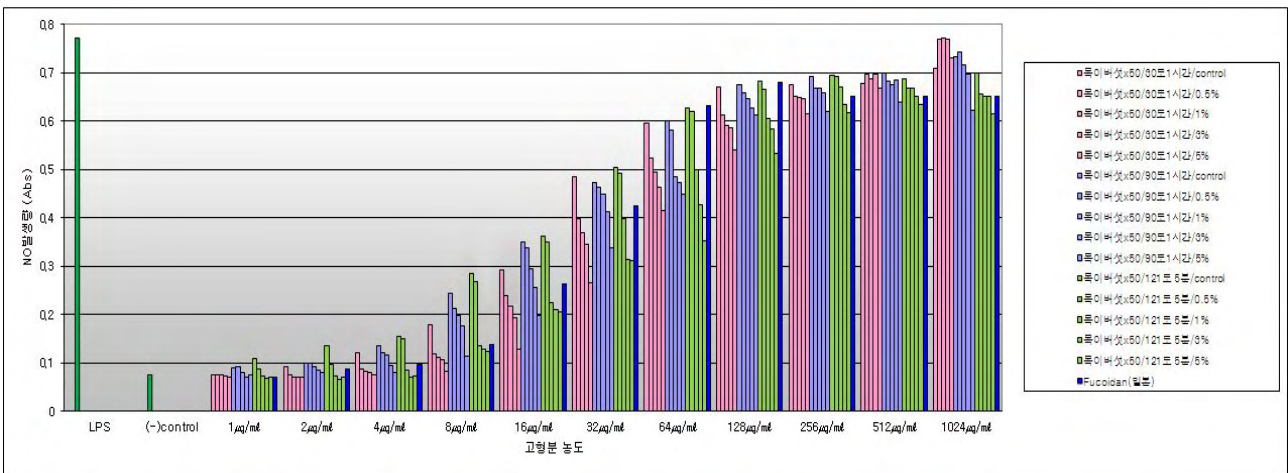


그림 8. 목이버섯 자실체 chemical 처리의 추출조건 최적화 결과 ; chemical 농도(0.5%, 1%, 3%, 5%), 추출온도(30℃, 90℃, 121℃), 추출시간(1시간, 5분), 추출용매 비(50배수), 건조조건(동결건조) 비교.

3) 목이버섯 자실체의 바이오컨버전 발효공정 개발

가. 목이버섯 자실체의 발효배지화 전처리공정 최적화

(1) 목이버섯 자실체의 발효배지화를 위한 효소처리공정 최적화

(가) 연구내용 및 실험방법

- 목이버섯 자실체의 발효미생물에 의한 바이오컨버전 발효배지화 조건 최적화를 위해 목이버섯 자실체에 대한 효소처리공정을 최적화하고자 하였다. 버섯류의 세포벽을 분해하기 위해 cellulase, hemi-cellulase, pectinase, lysozyme 외 amylase, glucosidase, protease 등 다양한 효소를 이용한 연구 등이 보고되고 있다. 본 연구에서는 이러한 다양한 효소를 사용하여 목이버섯 자실체의 발효배지화 조건을 최적화 하고자 하였다.

(나) 연구결과

- 목이버섯 자실체의 발효배지화 실험을 위해 목이버섯 자실체 분말에 F, L, CL과 KN 등 다양한 효소를 처리하여 면역활성 역할을 측정하고 다당체 함량을 HPLC로 측정하였다.

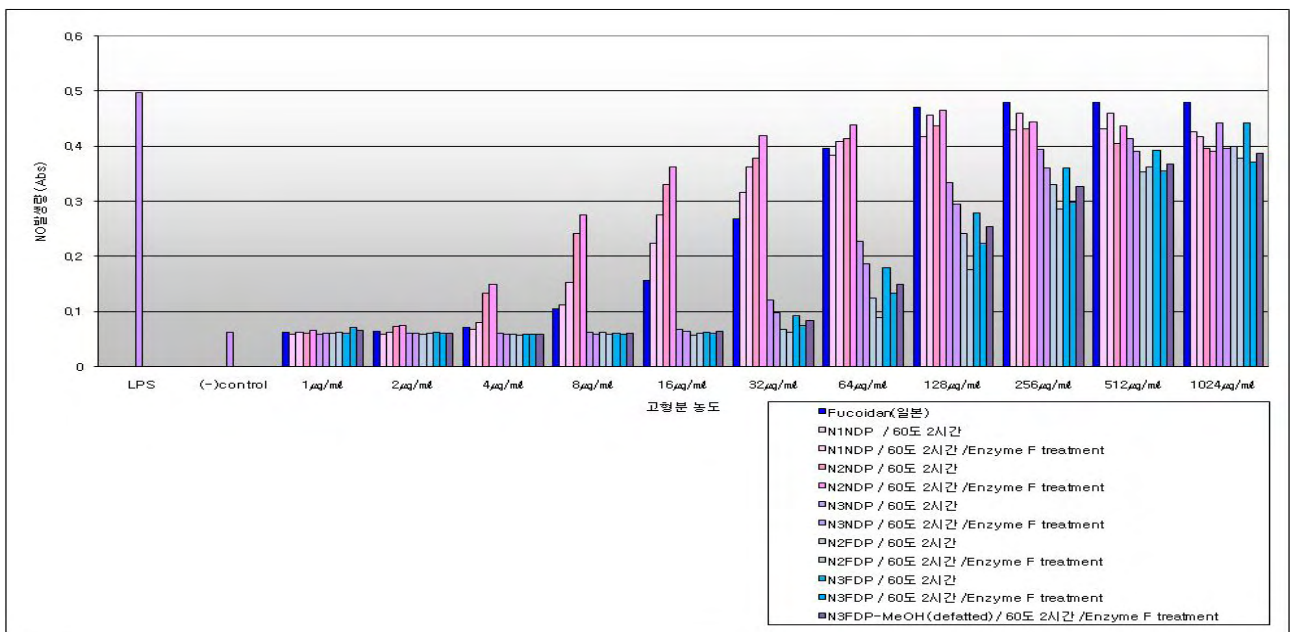


그림 9. Comparison of the macrophage activity according to the enzyme treatment conditions of N1NDP, N2NDP, N3NDP.

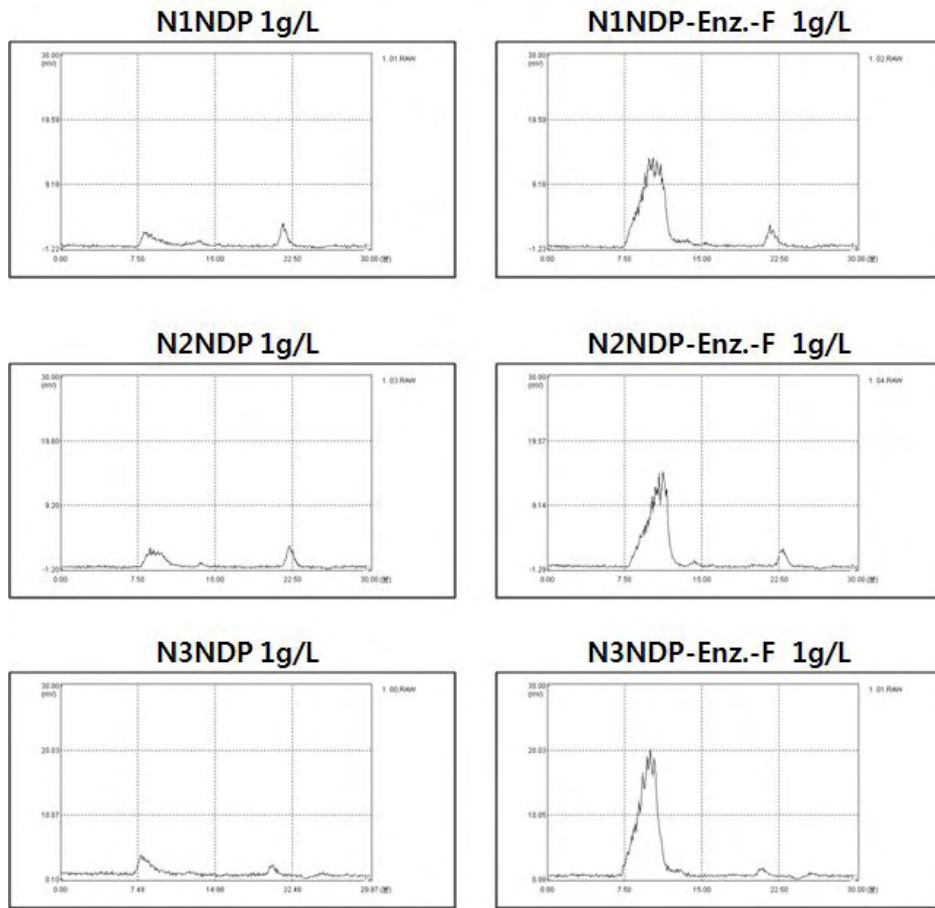


그림 10. HPLC chromatogrames of according to the enzyme treatment conditions of N1NDP, N2NDP and N3NDP.

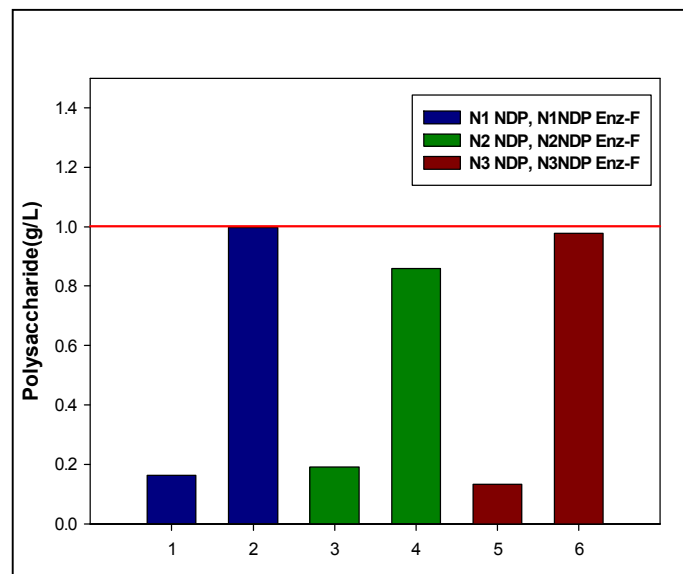


그림 11. Polysaccharide concentration of according to the enzyme treatment conditions of N1NDP, N2NDP and N3NDP.

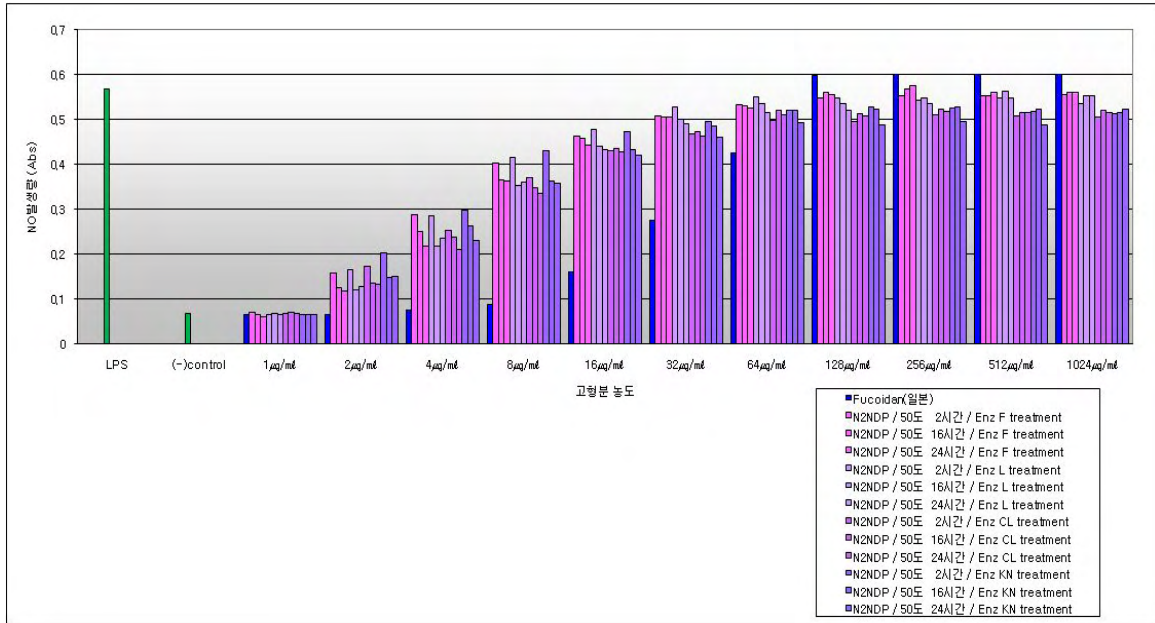


그림 12. Comparison of the macrophage activity according to the various enzyme treatment conditions of N2NDP.

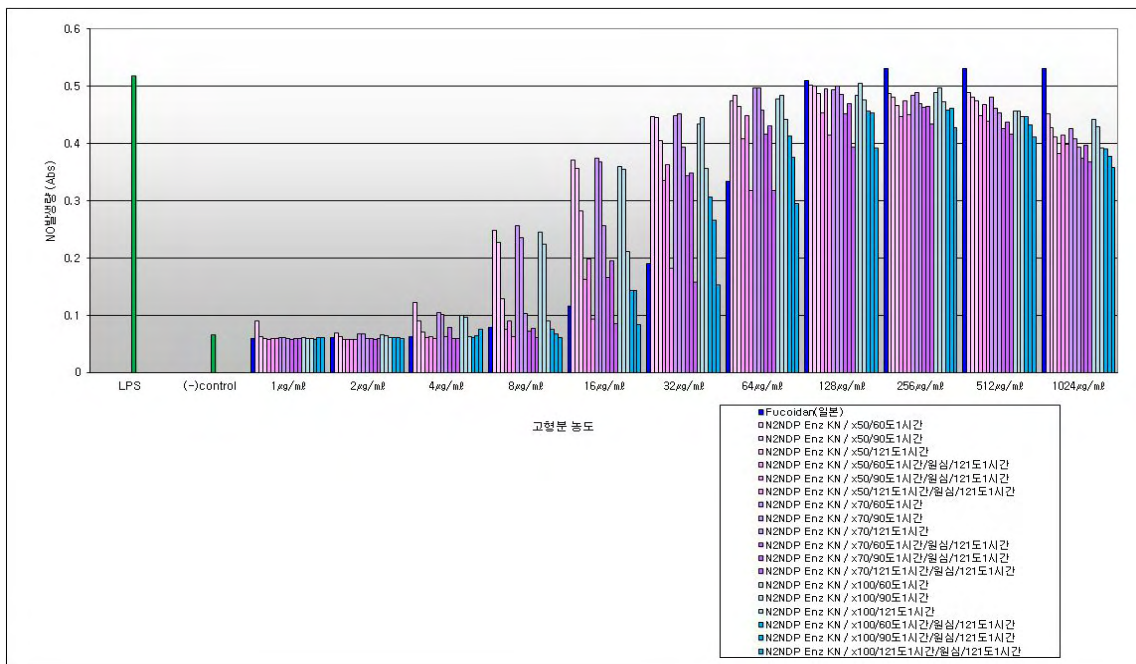


그림 13. Comparison of the macrophage activity according to the water extraction conditions of N2NDP-Enz-NK.

- 실험결과 그림 9에서는 N1~N3NDP 각각의 시료에 효소 F를 처리하여 60℃, 2시간 효소반응을 수행하여 면역활성 역가를 측정하였다. 세 종류의 자연건조 목이버섯 자실체 분말시료에 효소 F를 처리한 실험군에서 면역역가가 조금 향상되는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 동결건조 목이버섯 자실체 분말시료에서는 면역활성 역가가 오히려 다소 낮아지는 것을 관찰할 수 있었다. 각각의 효소처리 실험군의 다당체 함량 변화를 HPLC로 분석하고 그림 10, 11에서 그래프로 표기하였다. 목이버섯 자실체 분말의 다당체 함량은 효소처리공정에 의해 단순 열수추출공정 대비 5배 정도 증가하는 것을 확인할 수 있었다.
- 그림 12 실험결과에서는 N2NDP분말을 사용하여 다양한 효소의 처리시간에 따른 면역활성 역가 비교 실험을 수행하였다. 실험에 사용한 효소 L, CL, KN를 각각, 50℃ 교반항온수조에서 2시간에서 24시간까지 처리하여 비교하였다. 실험결과 효소간 면역활성 역가의 차이는 별로 관찰되지 않았으며, 효소처리 시간에서는 처리시간이 길어질수록 면역활성 역가가 다소 낮아지는 경향을 관찰할 수 있었다. 따라서 목이버섯 자실체의 발효미생물에 의한 바이오컨버전 발효배지화 조건 최적화를 위해 KN 효소를 사용하여 50℃, 2시간 처리의 효소처리공정을 확립하였다.
- 그림 13 실험결과에서는 N2NDP 시료에 효소 KN을 처리하고 다양한 물배수 조건에서 열수추출공정을 수행하였다. 열수추출공정의 물배수 조건은 50배수, 70배수, 100배수 조건으로 수행하였고, 열수추출 온도조건은 60℃ 1시간, 90℃ 1시간, 121℃ 1시간을 적용하였으며 각각의 열수추출공정 후 원심분리 10,000rpm, 30분을 수행하여 상등액을 분리한 뒤 상등액을 다시 121℃ 1시간 열처리하여 면역활성 역가를 확인하였다. 실험결과 열수추출에 있어서 물배수 조건에는 큰 차이를 나타내지 않았으며, 60℃ 1시간, 90℃ 1시간 추출조건에서 높은 면역활성 역가를 확인하였고, 121℃ 1시간 추출조건에서는 다소 낮아지는 것을 관찰하였다. 또한 각각의 열수추출공정 후 상등액을 다시 121℃ 1시간 열처리한 실험군에서는 모두 면역활성 역가가 낮아지는 것을 관찰하였다. 목이버섯 자실체의 면역활성 다당체는 열수추출에서 열처리를 가할 경우에는 일정 온도까지 열에 안정적으로 보이나, 열수추출 후 상등액만 분리한 액상시료에 대해 열처리를 가할 경우에는 열에 민감한 것을 확인할 수 있었다.

나. 목이버섯 자실체의 통계학적 방법에 의한 발효배지화 조건 탐색

- 목이버섯 자실체를 발효배지로 사용할 수 있는 조건을 탐색하고자 목이버섯 자실체를 포함하는 발효배지의 배지성분에 대한 체계적인 조사 실험설계법인 Plackett-Burman design 방법을 본 연구에 도입하여 실험을 수행하였다. 본 실험설계법은 n회 실험으로 (n-1)개 변수까지 선별할 수 있는 방법 중에서 4의 배수인 실험횟수의 경우 (4k-1) 성분까지 선별할 수 있도록 하는 실험계획법이다. 목이버섯 자실체의 바이오컨버전을 위해 발효미생물의 성장에 영향을 주는 것으로 생각되는 배지성분들에 대한 main effect를 분석함으로써 다양한 배지성분의 조합이 발효미생물의 성장에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. Plackett-Burman design 실험에 대해서는 Design-Expert software 또는 Sigma plot software를 사용하여 그 결과를 분석하였다.

- Plackett–Burman design 실험을 위해 표 1에 제시한 바와 같이 10가지의 배지 조합을 설계하였다.

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 liq	Factor 8 H:(NH ₂) ₄ SO ₄	Factor 9 J:KH ₂ PO ₄	Factor 10 K:MgSO ₄	Factor 11 L:Dummy
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

표 1. Run table of 1st Plackett–Burman design.

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

표 2. ANOVA analysis of 1st Plackett–Burman design.

- 목이버섯 자실체를 발효미생물의 배양배지로 사용하는 경우에 발효미생물의 성장에 있어서 glucose와 brown rice가 전체 배지성분 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(표 2).
- 1차 Plackett–Burman design 실험의 조합에서 일부 성분을 dummy variable로 교체하여 2차 Plackett–Burman design 실험을 수행하였다. 또한 배지성분이 미치는 기여도를 일차다항식으로 분석한 결과, 1차 Plackett–Burman design 실험 결과에서와 비슷한 경향을 보여주는 것으로 나타났다. 즉 이 경우에도 glucose(27% 기여도)와 brown rice(20% 기여도)가 목이버섯 자실체를 포함하는 배지에서 발효미생물의 성장에 주목할만한 영향을 주며 magnesium sulfate(32% 기여도)의 경우에서 가장 큰 영향을 미치고 있는 것으로 분석되었

다. 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. 따라서, 목이버섯 자실체의 바이오컨버전을 위한 발효미생물의 배지는 목이버섯 자실체 분말, 탄소원으로는 glucose와 brown rice, 질소원으로는 yeast extract, 미량원소로는 magnesium sulfate를 기본으로 하는 배지조합을 최종 선정하였다.

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														

표 3. Run table of 2nd Plackett-Burman design.

Transform	Effects	ANOVA	Diagnostics	Model Graphs
	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

표 4. Effects analysis of 2nd Plackett-Burman design experiment의 effects analysis

Design expert 6.0

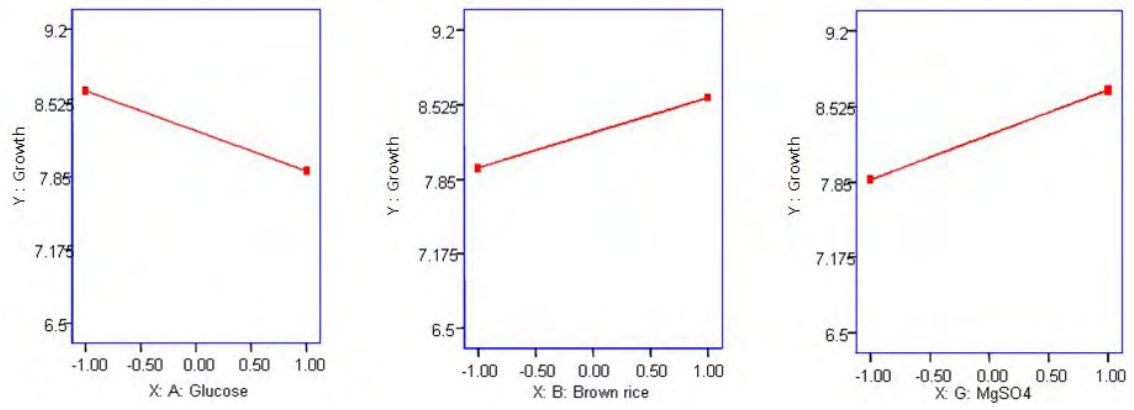


그림 14. Graphic ANOVA analysis of 2nd Plackett–Burman design experiment for glucose, brown rice and magnesium sulfate.

다. 목이버섯 자실체의 바이오컨버전산물 생성을 위한 발효미생물의 도입 및 선정

(1) 발효미생물로 목이버섯균사의 도입

- 목이버섯 자실체의 바이오컨버전산물의 생성을 위한 발효미생물로 목이버섯 자실체로부터 유도된 목이버섯균사를 발효미생물로 도입하였다. 목이버섯 자실체로부터 유도된 균사로 플라스크에서 28°C, 7일간 중균배양을 수행하여 목이버섯 자실체 바이오컨버전을 위한 발효미생물로 접종하였다. 목이버섯 자실체를 발효배지로하는 플라스크 본배양 발효공정에서 목이버섯균사에 의해 발효를 수행한 결과, 면역활성 역가가 획기적으로 향상된 목이버섯 자실체 바이오컨버전산물을 생산할 수 있었다(그림 15).

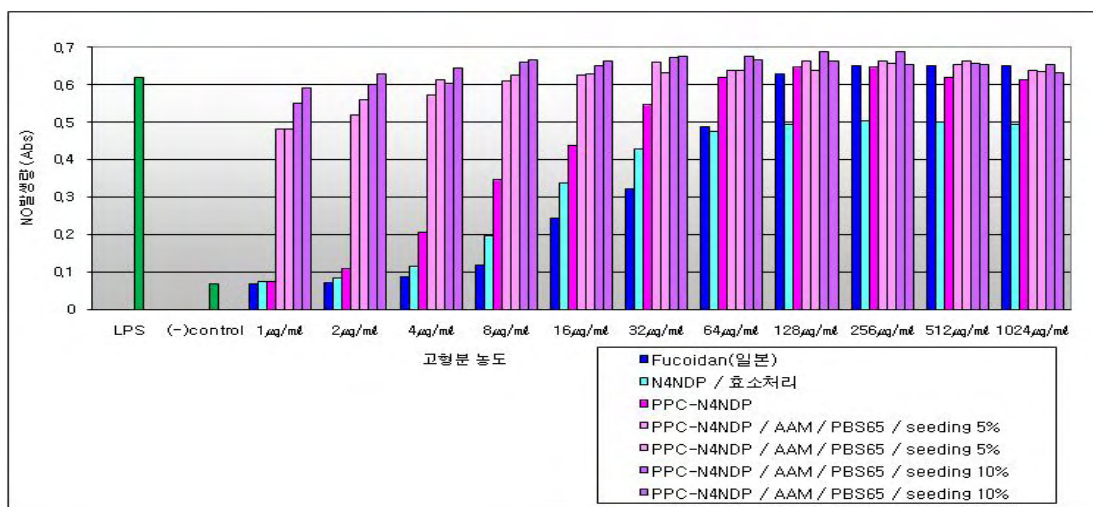


그림 15. Comparison of macrophage activity for the extract of AA(*Auricularia auricula judae*) fruit body and bioconversion products produced by AAM and PBS65.

(2) 발효미생물로서 **Probiotics** 미생물의 도입 및 평가

- 목이버섯 자실체의 균사체발효를 통한 바이오컨버전산물의 추가적인 생산성 향상을 위해 KCCM으로 부터 식품으로의 적용이 가능한 다양한 probiotics 미생물을 분양받아 바이오컨버전산물 생산성 향상이 우수한 균주를 선발하고, 평가하였다.

($\times 10^6$ cells/ml)

Media	Probiotics 1				Probiotics 2				Probiotics 3			
	MRS	MRS -1	MRS -2	MRS -3	MRS	MRS -1	MRS -2	MRS -3	MRS	MRS -1	MRS -2	MRS -3
0hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12hr	27	27	27	27	2	2	2	2	6	6	6	6
18hr	618	173	210	133	26.8	15.6	12.8	18.8	800	63.8	49.3	28.5
24hr	2380	1240	860	695	371	24.3	20.5	26.3	944	83.3	88.3	60.0

표 5. Total number of counting of Probiotics in MRS media.

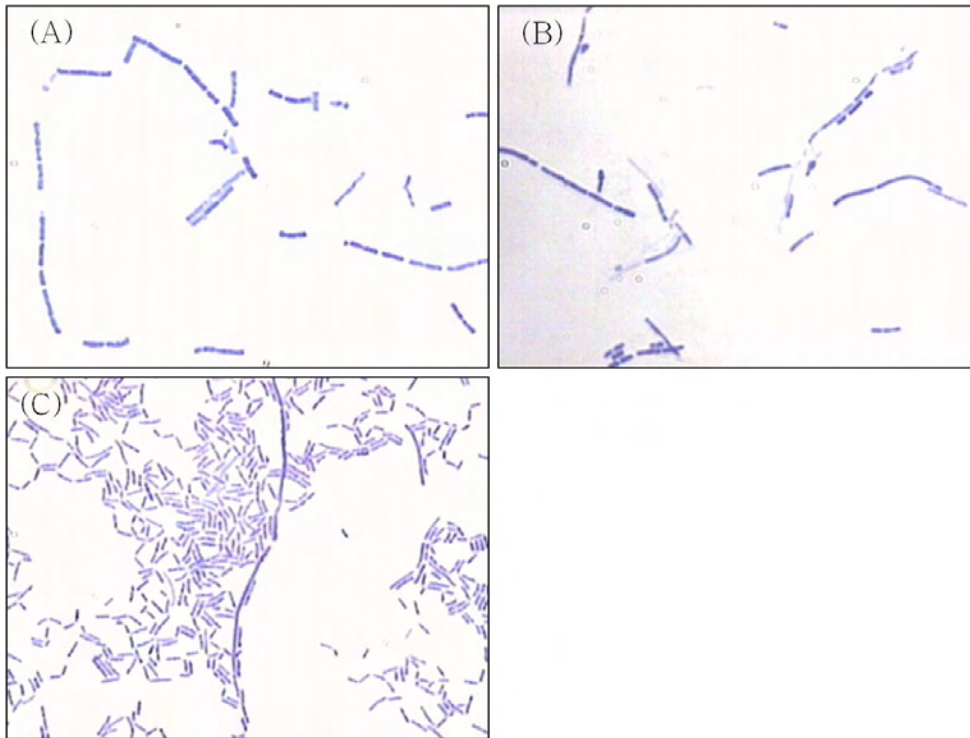


그림 16. Microscopic photographs of various Probiotics.

- 표 5의 실험결과에서 나타나듯이 Probiotics 1이 MRS배지에서 2×10^9 cells/ml 세포농도로 가장 우수한 세포활성을 나타내었으며, 현미경 관찰(그림 16)을 통한 세포의 morphology 및 활성을 확인하였을 때, Probiotics 1의 생리활성 능력이 본 연구에 적합하여 바이오컨버전산물 생산성 향상을 위한 발효미생물로서 선발하여 실험에 사용하였다.

(3) 발효미생물로 도입된 Probiotics 배양액의 잔류 glucose 농도 측정

- 발효미생물 배양액의 잔류 glucose 농도를 측정하였다.

hr	Probiotics 1				Probiotics 2				Probiotics 3			
Media	MRS	MRS-1	MRS-2	MRS-3	MRS	MRS-1	MRS-2	MRS-3	MRS	MRS-1	MRS-2	MRS-3
0	11.90	15.10	0.820	0.680	14.32	17.88	0.396	0.224	13.96	17.88	0.256	0.224
12	1.432	2.248	0.076	0.088	6.080	15.52	0.292	0.072	1.092	11.16	0.024	0.060
18	0.368	1.064	0.068	0.088	3.312	14.04	0.564	0.060	0.160	8.520	0.028	0.024
24	0.324	1.056	0.088	0.088	1.508	13.72	1.308	0.020	0.140	7.320	0.024	0.028

표 6. Residual glucose of various Probiotics according to culture times.

- 표 6의 실험 결과, Probiotics 1은 초기 0시간의 glucose 농도가 MRS, MRS-1 media에서 12, 15g/L로 상대적으로 MRS-2, MRS-3보다 높게 측정되었으며 12시간 경과 후 MRS, MRS-1 media에서는 2~3g/L 이하로 급격히 glucose 농도가 감소하는 경향을 보였다. 이 두 배지의 급격한 glucose 감소 결과는 18시간 후에도 지속되어 매우 낮은 수치를 나타내었다.
- Probiotics 2는 3가지 Probiotics 중 glucose 소모도가 가장 낮게 측정되었는데 12시간 경과 후 MRS, MRS-1에서 각각 6g/L, 15g/L, 18시간 경과 후 4g/L, 14g/L, 24시간 경과 후 2g/L, 14g/L로서 MRS-1에서는 18시간 이후에는 glucose 소모가 없는 것으로 측정되었으며 MRS에서는 시간이 경과하여도 지속적으로 소모하는 경향을 보였으나 3가지 Probiotics 중 가장 낮은 glucose 소모도를 나타내었다.
- Probiotics 3도 Probiotics 1과 유사한 glucose 감소 경향을 보였으나 차이점은 MRS-1에서 12, 18시간 경과 후 약 11g/L, 및 9g/L로서 상대적으로 높은 glucose 농도를 보임으로써 MRS-1에서는 Probiotics 1보다 당 소모도가 낮은 것을 알 수 있었다. 그러나 MRS에서는 12시간 경과 후 glucose 농도가 1g/L로서 Probiotics 1과 유사한 결과를 보였으며 18시간 후에는 zero에 가까운 수치를 보였다.

(4) 발효미생물로 도입된 Probiotics 미생물의 평가

- 앞서 발효미생물로 선발된 Probiotics 미생물과 함께 최근 추가로 확보한 Probiotics 미생물로부터 screening 기법에 의해 목이버섯 자실체에 대한 바이오컨버전 능력이 우수한 균주를 평가하고자 하였다.
- 목이버섯 자실체 배양배지에 목이버섯 균사와 다양한 Probiotics 미생물을 배양하였다(그림 17). Screening 방법에 의해 선별된 7개 Probiotics 미생물에 대한 면역활성 역가 데이터를 그림 17에 나타내었다. 실험결과 면역활성 역가가 향상된 결과를 얻을 수 있었으며, 7개의 Probiotics 미생물 중 바이오컨버전 능력이 가장 우수한 Probiotics S-6균주를 2차 선별하여, 2차 screening 실험을 수행하여 5종류의 균주를 추가로 선별하였다. Probiotics 미생물

S-6-1~5종류의 균주의 면역활성 역가를 측정해 본 결과(그림 18), 1차 Probiotics 미생물 선별 균주보다 목이버섯 자실체 추출물의 바이오컨버전 능력이 좀 더 향상된 것을 확인할 수 있었으며, 발효미생물의 균주로 Probiotics 중에서는 S-6-5(PBS65)균주를 목이버섯 자실체 바이오컨버전 균주로 선정하였다.

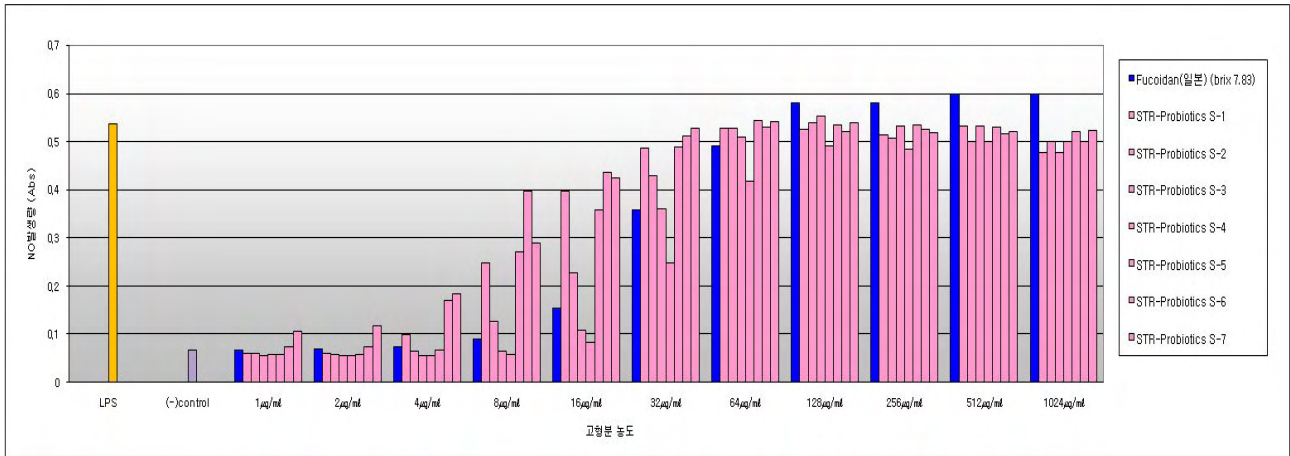


그림 17. Assessments of fermentative microbes for the creation of bioconversion products ; results of 1st screening.

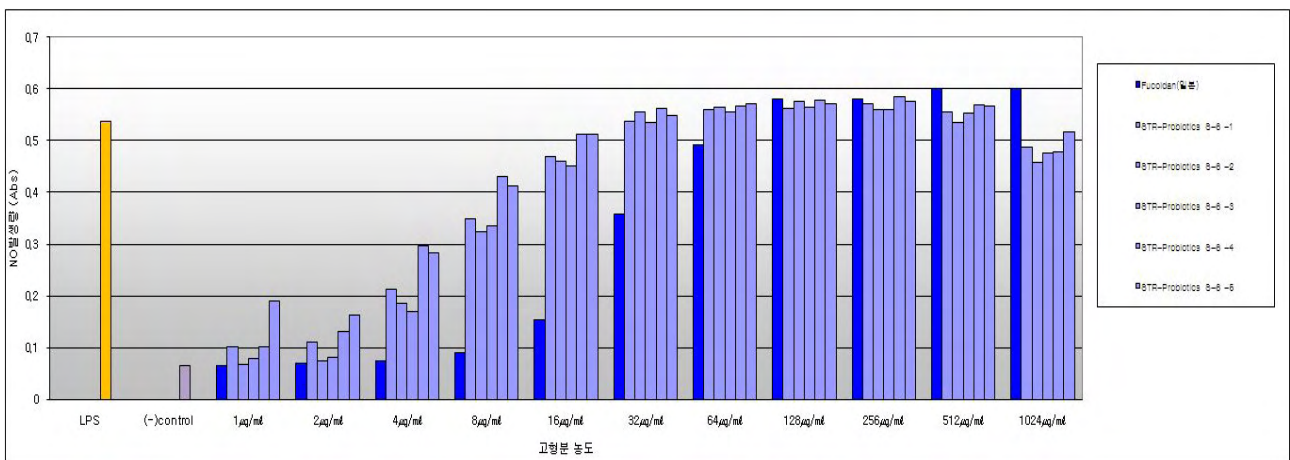


그림 18. Assessments of fermentative microbes for the creation of bioconversion products ; results of 2nd screening.

(5) 발효미생물 선정

- 목이버섯 자실체 바이오컨버전산물 생산을 위한 발효미생물로 목이버섯균사(AAM)와 Probiotics(PBS65)를 선정하였다.

라. 목이버섯 자실체의 바이오컨버전산물 생성을 위한 발효미생물의 종균배양배지 최적화

- 목이버섯 자실체의 발효배지화를 위한 첨가 배지조건 탐색 결과에서 탄소원으로 glucose와 brown rice, 질소원으로는 yeast extract, 미량원소로는 magnesium sulfate가 선정이 되었다.
- 기 개발된 발효배지화 첨가 배지성분을 기반으로 바이오컨버전 발효를 위한 발효미생물의 종균배양공정 최적화 실험을 수행하였다. 본 실험에서는 1차년도 결과를 바탕으로 brown rice 및 목이버섯 자실체 분말이 적당량 첨가된 배양배지를 기본으로 추가적인 탄소원 및 질소원 등 다양한 배지성분에 대한 최적화 실험을 통해 바이오컨버전 종균배양공정을 확립하고자 실험을 수행하였다.

(1) 반응표면분석법(RSM)을 이용한 1차 배지 최적화

- 반응표면분석법(RSM)을 이용한 종균배양공정 배지 최적화를 위해 4종류(k=4)의 배지성분으로 dextrin, glucose, yeast extract, soytone peptone 각각의 농도 변화가 바이오컨버전을 위한 발효미생물의 세포 생산성에 미치는 영향을 반응표면분석법을 이용하여 분석하였다. 반응표면분석을 위한 실험계획법으로는 중심합성계획법(central composite design)을 사용하였다. 중심합성계획법은 중심점(center points)과 축점(axial points)을 2^k 요인실험에 추가시킨 실험계획법으로 중심합성계획에서는 중심점(0, 0, 0)의 수는 제한이 없이 하나 이상이면 되며, 축점(a)의 수는 $2k$ 로 반응조건이 4개이므로 8개를 축점으로 하였다(표 7).
- 따라서 중심점의 수를 n_0 로 나타내면 중심합성계획의 횟수는 $[2^k + 2k + n_0]$ 가 되며, 본 연구에서는 27개의 선정된 조건에서 실험을 실시하였다. 실험 인자들의 농도에 대해 -2, -1, 0, +1, +2로 5단계로 부호화하여 표로 작성하였다. 각각의 실험인자 변화에 따른 반응표면이 곡선으로 나타날 것으로 예상되어 아래와 같은 2차 다항식에 적용시켰다.

$$f = y_0 + a_1 X_1 + a_{11} X_1^2 + a_2 X_2 + a_{22} X_2^2 + a_3 X_3 + a_{33} X_3^2 + a_{12} X_1 X_2 + a_{23} X_2 X_3 + a_{31} X_3 X_1 + a_4 X_4 + a_{44} X_4^2 + a_{14} X_1 X_4 + a_{24} X_2 X_4 + a_{34} X_3 X_4$$

- 여기서 f는 세포농도(g/L)이며 X_1, X_2, X_3, X_4 는 각각 주요한 생산배지성분이며 y_0 는 절편, a_n 은 회귀계수이다. 중심합성법에 의거해 얻은 실험결과는 Sigma Plot software를 이용하여 통계적으로 분석하여 회귀방정식을 얻음으로써 각각의 반응조건들에 대한 상호영향을 검토하여 최적 발효배지화 조건을 구하였다. 이때 전체 model에 대한 유의성은 Sigma Plot의 통계적 분석시 P값에 의해 결정되며, $P < 0.05$ 일 때 유의성이 있는 것으로 판단하였다. 2차 다항식의 f값이 최대로 되는 지점을 3차원 반응표면도와 contour plot을 이용하여 관찰하였다.

(A: component-1, B: component-2, C: component-3, D: component-4).

	A	B	C	D		A	B	C	D
1	+1	+1	+1	+1	14	-1	-1	+1	-1
2	+1	+1	+1	-1	15	-1	-1	-1	+1
3	+1	+1	-1	+1	16	-1	-1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1	17	-α	0	0	0
5	+1	-1	+1	+1	18	+α	0	0	0
6	+1	-1	+1	-1	19	0	-α	0	0
7	+1	-1	-1	+1	20	0	+α	0	0
8	+1	-1	-1	-1	21	0	0	-α	0
9	-1	+1	+1	+1	22	0	0	+α	0
10	-1	+1	+1	-1	23	0	0	0	-α
11	-1	+1	-1	+1	24	0	0	0	+α
12	-1	+1	-1	-1	25	0	0	0	0
13	-1	-1	+1	+1	26	0	0	0	0
					27	0	0	0	0

표 7. Experimental design of central composite design

- 본 연구에서는 배지의 주요 배지성분인 dextrin, glucose, yeast extract, soytone peptone 등 4종류의 배지성분에 다양한 농도 변화가 발효미생물의 성장에 미치는 영향을 통계적 방법인 반응표면분석법(Response Surface Method)(RSM)을 이용하여 분석하였다. 각각의 실험인자들의 농도에 대해 -2, -1, 0, +1, +2의 5 단계로 부호화하여 표로 작성하였다(표 8).

	-2	-1	0	1	2
Dextrin	10	20	30	40	50
Glucose	20	30	40	50	60
Yeast extract	20	40	6	8	10
Soytone peptone	1	2	3	4	5

표 8. Levels of production medium in experimental design (g/L).

- 실험 결과에 대해 Sigma Plot software을 이용하여 회귀계수와 P값을 결정하였다. 본 실험 결과에 대한 반응표면 2차 회귀모형식을 아래와 같이 구할 수 있었다.

$$Y=10.8899-0.5216*X2^2+0.8194*X3-0.4791*X3+0.5209*X1*X2+0.8194*X4-0.5828*X3*X4$$

- 각 실험인자들의 농도 변화에 따른 결과를 3차원 반응표면 및 contour plot을 이용하여 도식화하였다. 분석 결과로부터 얻어진 P값에 의해 dextrin을 제외하고, $P < 0.05$ 인 dextrin과 glucose, yeast extract 및 soytone peptone, 또한 glucose와 yeast extract 및 soytone peptone, 그리고 yeast extract와 soytone peptone간의 교호작용을 확인하였다. Glucose, yeast extract, soytone peptone의 dextrin과의 상관 관계를 살펴보면, dextrin의 농도가 증가할수록, glucose, yeast extract, soytone peptone 3종류의 배지는 중심점보다 높은 농도에서 세포성장이 최고점에 도달하는 반응표면 경향을 보여주었다(그림 19, 20, 21). Glucose와 질소원 성분인 yeast extract, soytone peptone의 경우 glucose의 농도가 중심점에 위치하고 질소원의 농도가 높을 때 높은 세포성장을 보여주었다(그림 22, 23). 그리고 yeast extract, soytone peptone의 경우에는 서로 상반된 경향성이 나타나는 것을 확인할 수 있었다(그림 24). 위의 결과를 종합적으로 살펴볼 때, 탄소원의 농도와는 교호작용을 보이지 않으면서 질소원의 비율이 낮으면 세포 성장이 급격히 떨어지는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 탄소원의 농도는 일정양으로 고정한 뒤 질소원 농도를 변화시켜 최적화 실험을 수행하였다.

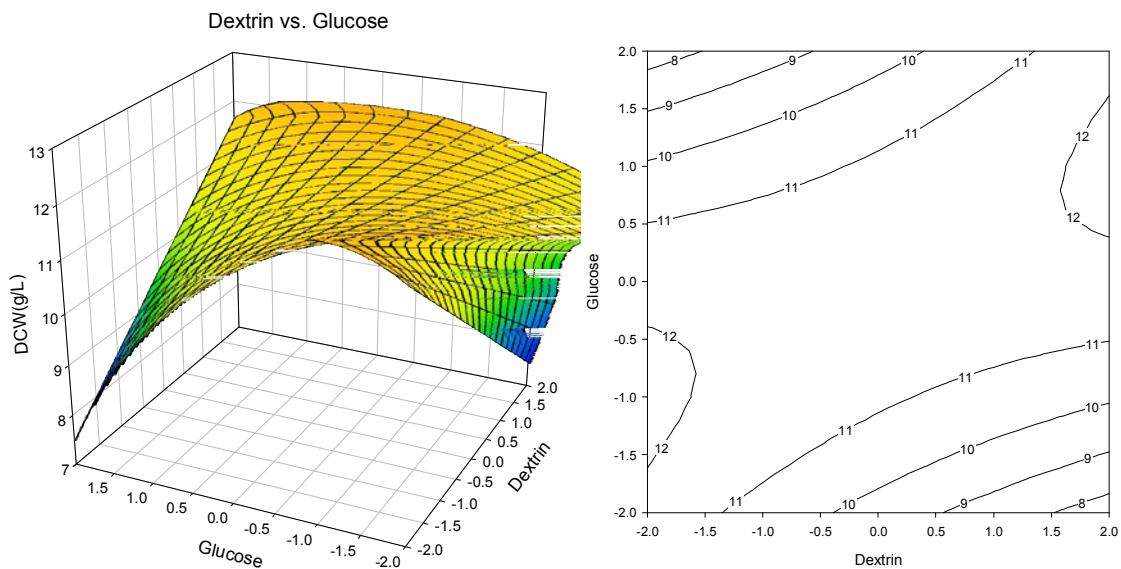


그림 19. 3-D response surface and contour plot of cell mass as a function of dextrin and glucose (1st RSM experiment).

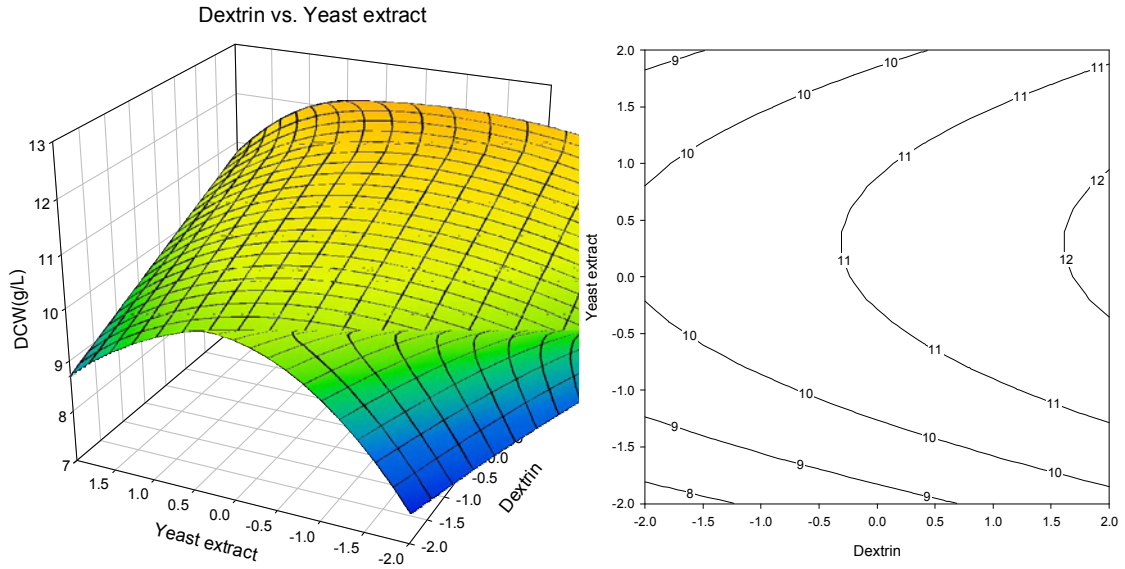


그림 20. 3-D response surface and contour plot of cell mass as a function of dextrin and yeast extract (1st RSM experiment).

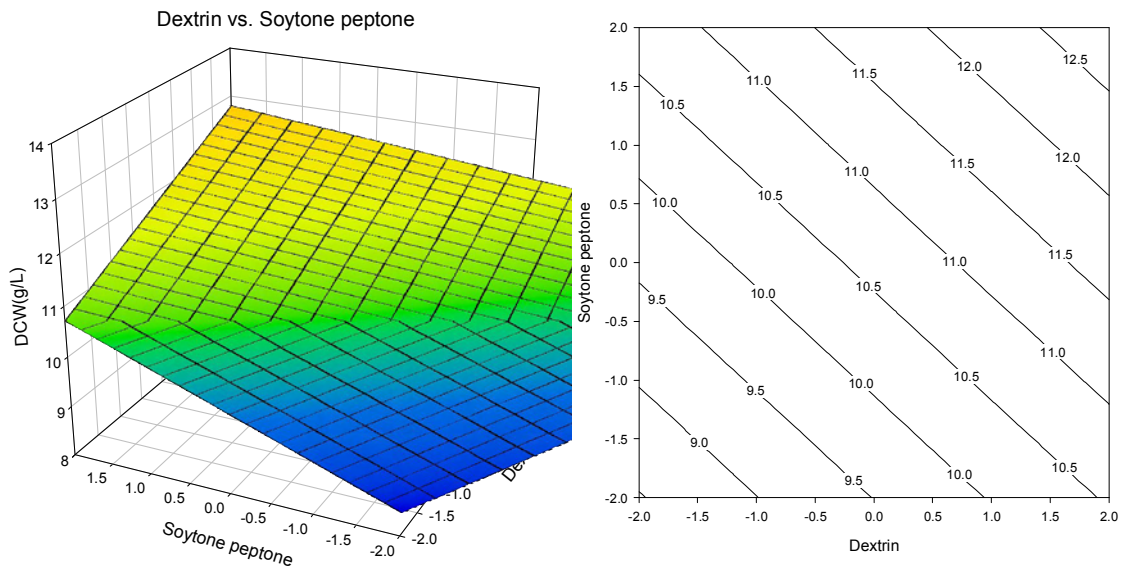


그림 21. 3-D response surface and contour plot of cell mass as a function of dextrin and soytone peptone (1st RSM experiment).

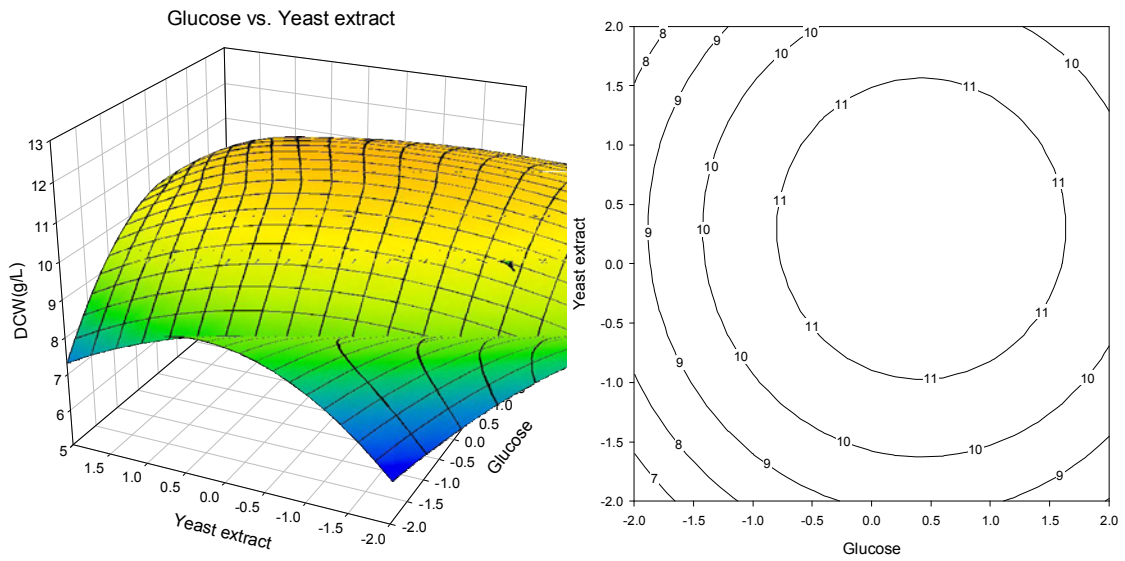


그림 22. 3-D response surface and contour plot of cell mass as a function of glucose and yeast extract (1st RSM experiment).

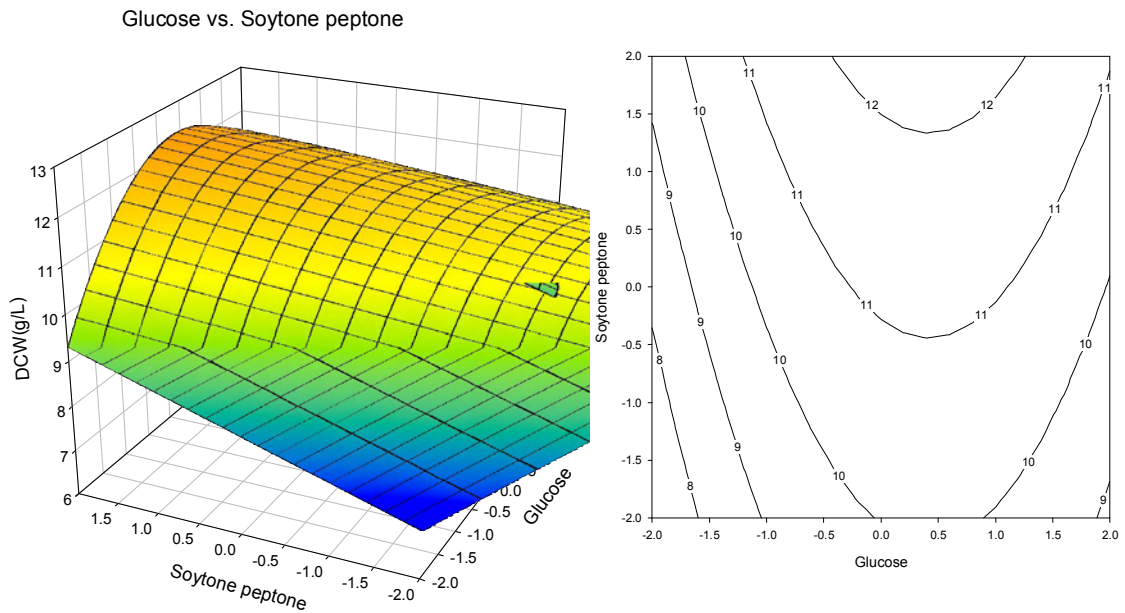


그림 23. 3-D response surface and contour plot of cell mass as a function of glucose and soytone peptone (1st RSM experiment).

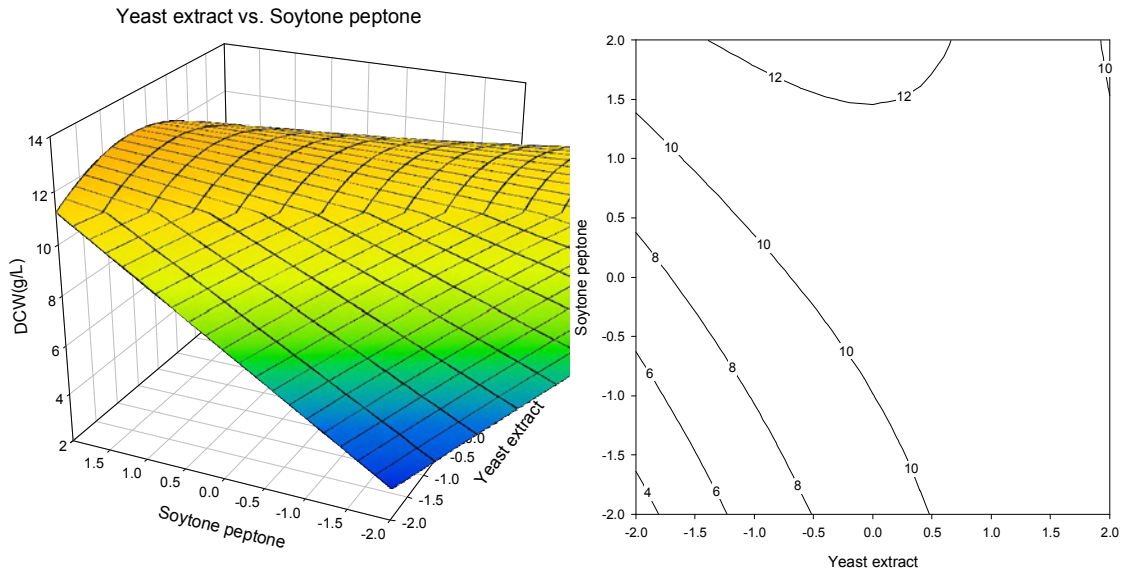


그림 24. 3-D response surface and contour plot of cell mass as a function of yeast extract and soytone peptone (1st RSM experiment).

(2) 반응표면분석법(RSM)을 이용한 2차 배지 최적화

- 1차 실험결과를 토대로, 새로운 중심점에 의해 반응표면분석법을 수행하였다. 이때 탄소원의 농도는 1차 결과에서 얻은 농도로 고정하고 질소원과 나머지 배지성분인 MgSO₄, KH₂PO₄를 변수로 포함시켜 수행하였다(표 9, 10). 실험계획에 의한 각각의 농도와 회귀계수 및 P값으로 반응표면 2차 회귀모형식을 구한 결과는 다음과 같다.

$$Y = 11.9347 - 0.4509 * X1 * X2$$

	-2	-1	0	1	2
Yeast extract	4	6	8	10	12
Soytone peptone	1	3	5	7	9
KH ₂ PO ₄	4	2.5	4	5.5	7
MgSO ₄	0.2	0.6	1	1.4	1.8

표 9. Levels of medium in experimental design (g/L).

	Yeast extract	Soytone peptone	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄
1	10	7	5.5	1.4
2	10	7	5.5	0.6
3	10	7	2.6	1.4
4	10	7	2.6	0.6
5	10	3	5.5	1.4
6	10	3	5.5	0.6
7	10	3	2.6	1.4
8	10	3	2.6	0.6
9	6	7	5.5	1.4
10	6	7	5.5	0.6
11	6	7	2.6	1.4
12	6	3	2.6	0.6
13	6	3	5.5	1.4
14	6	3	5.5	0.6
15	4	6	4	1
16	12	6	4	1
17	8	1	4	1

표 10. Run table for RSM.

- 3차원 반응표면과 contour plot을 통해 분석해 본 결과, 1차 실험과 동일하게 yeast extract와 soytone peptone의 상반된 경향성이 관찰되어 질소원 2종류간 교호작용이 없음을 확인하였고, 질소원의 농도도 1차 실험결과와 거의 동일하게 나타났다(그림 25). 또한 요인점 9, 10, 11, 12의 경우에는 더욱 안정된 세포성장 결과를 보였다.

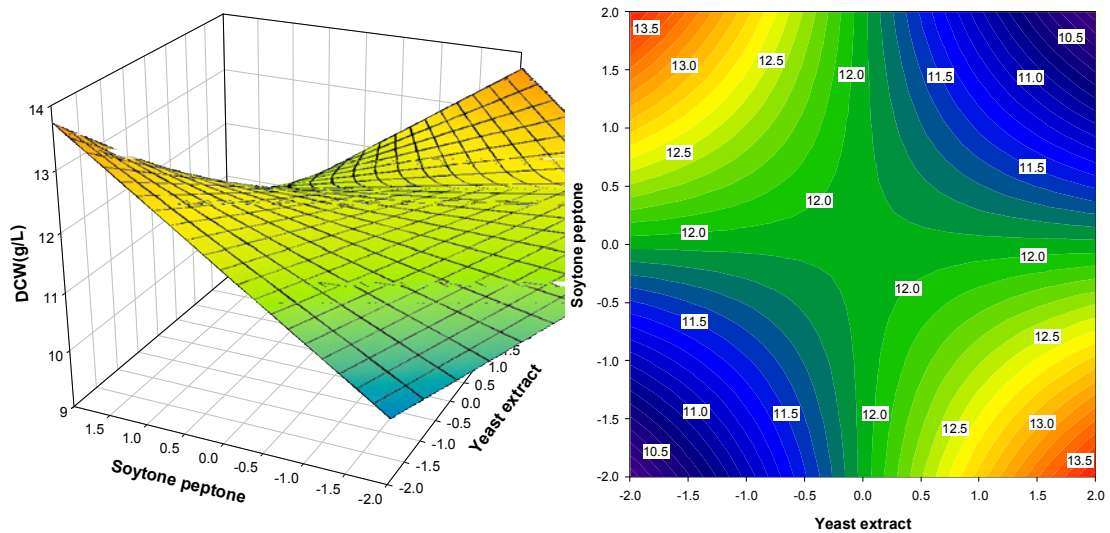


그림 25. 3-D response surface and contour plot of cell mass as a function of yeast extract and soytone peptone (2nd RSM experiment).

(3) Plackett-Burman design에 의한 배지 최적화

- 상기 실험결과를 분석해 볼 때, 반응표면분석법을 통해 현재 사용 배지의 구성만으로도 향상된 세포농도를 얻은 것을 확인할 수 있었다. 따라서 Plackett-Burman design 방법을 본 실험에 도입하였다. 이 방법은 n 회 실험으로 $(n-1)$ 개 변수까지 선별할 수 있는 방법 중에서 4의 배수인 실험횟수의 경우 $(4k-1)$ 성분까지 선별할 수 있도록 하는 실험계획법이다. 세포 성장에 영향을 주는 것으로 생각되는 배지성분, 즉 11개의 배지성분을 사용하여 각 배지성분의 어떤 조합이 발효미생물 배양배지로 적합한지 조사하였다(표 11). Plackett-Burman design 실험에 대해서는 Design-Expert software를 사용하여 그 결과를 분석하였으며, 그에 따른 세포농도를 조사하였다. 그 결과 세포 성장에 영향을 주는 4개의 배지성분 (SP, YE, CaCl_2 , FeSO_4)을 선별할 수 있었다. 즉 기존 배지성분으로는 세포농도가 10g/L 정도를 보였지만, 새로이 선별된 배지성분이 배지구성성분으로 포함됨으로써 약 50% 정도 향상된 세포농도를 얻을 수 있었다.

Std	Run	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	Response
		SS	Dextrin	glycerol	Glc	SP	YE	AS	NaNO ₃	CaCl ₂	KCl	FeSO ₄	DCW
7	1	0	40	20	2	0	5	5	0	0.5	0	0	12.8
5	2	20	40	0	2	5	0	5	0	0	0	0.5	12.8
9	3	0	20	0	2	5	5	0	3	0.5	0	0.5	15.6
2	4	20	40	0	2	0	0	0	3	0.5	0.5	0	13.2
6	5	20	40	20	0	5	5	0	3	0	0	0	9.6
3	6	0	40	20	0	5	0	0	0	0.5	0.5	0.5	13.2
4	7	20	20	20	2	0	5	0	0	0	0.5	0.5	12.4
12	8	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8.8
8	9	0	20	20	2	5	0	5	3	0	0.5	0	11.2
1	10	20	20	20	0	0	0	5	3	0.5	0	0.5	9.2
11	11	0	40	0	0	0	5	5	3	0	0.5	0.5	7.6
10	12	20	20	0	0	5	5	5	0	0.5	0.5	0	8.4

표 11. Comparison of cell mass obtained in various kinds of media designed for Plackett-Burman design.

(4) Plackett-Burman design에 의해 선별된 배지성분을 이용한 1차 RSM 배지 최적화

- Plackett-Burman design으로 결정된 결과를 참고해서 중심점을 설정한 후, 반응표면분석법(RSM)을 이용한 평균배지농도 최적화 실험을 수행하였다. RSM을 적용할 기본 배양배지를 Rich Media 1과 Minimal Media 2로 나눠서 실험을 진행하였으며, 회귀 계수를 산출하여 반응표면 2차 회귀모형식을 구한 결과는 다음과 같다.

$$\text{Rich Media 1 : } Y=15.6693-0.5417*X1-0.6713*X1^2+0.9585*X3+1.5142*X4$$

$$\text{Minimal Media 2 : } Y=20.3288+0.9583*X1+0.8742*X3+1.1525*X4$$

- 기존에 사용하던 Rich Media 1 배지를 이용한 경우, dextrin이 중심점보다 낮고 yeast extract가 중심점보다 높은 농도 지점에 위치할 때 최고의 세포성장을 얻었고, dextrin과 soytone peptone의 경우 역시 동일한 결과를 보였다(그림 26, 27, 28). 상기 배지 최적화 실험에서도 마찬가지로 질소원으로 작용하는 yeast extract와 soytone peptone의 농도가 더 많이 요구됨을 알 수 있었다. 즉, 질소원이 높은 농도로 존재했을 때 모두 세포성장이 높은 것을 반응표면과 contour plot을 통해 확인할 수 있었다. 한편 Minimal Media 2 배지를 이용한 경우, Rich Media 1의 경우와 동일하게 현재 농도보다 더 많은 질소원이 존재해야 더욱 높은 세포성장을 유도할 수 있음을 확인하였다(그림 29, 30, 31). 주목할 만하게도 Minimal Media 2 배지를 이용했을 때, 기존의 Rich Media 1 종균배양에 비해 본배양에서 세포농도가 약 30% 정도 더 향상되었으며, 잔류당농도 또한 더 낮게 존재하는 것으로 나타났다. 따라서 배지 최적화 지점을 찾기 위해 세포농도가 가장 높았던 요인점인 24번(표 12)의 주요 변수들에 대해 그 농도를 고정하고, 또 다른 주요 변수들의 농도를 변화시켜 배양배지 최적화 실험을 수행하였다.

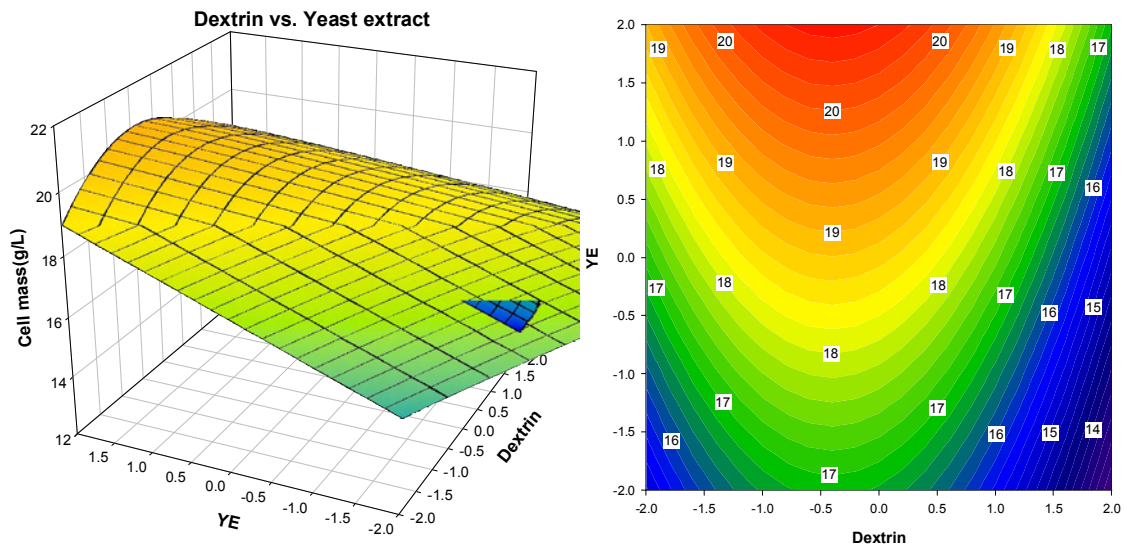


그림 26. 3-D response surface and contour plot of cell mass as a function of dextrin and yeast extract (1st RSM experiment after Plackett–Burman design experiment) (Rich Media 1).

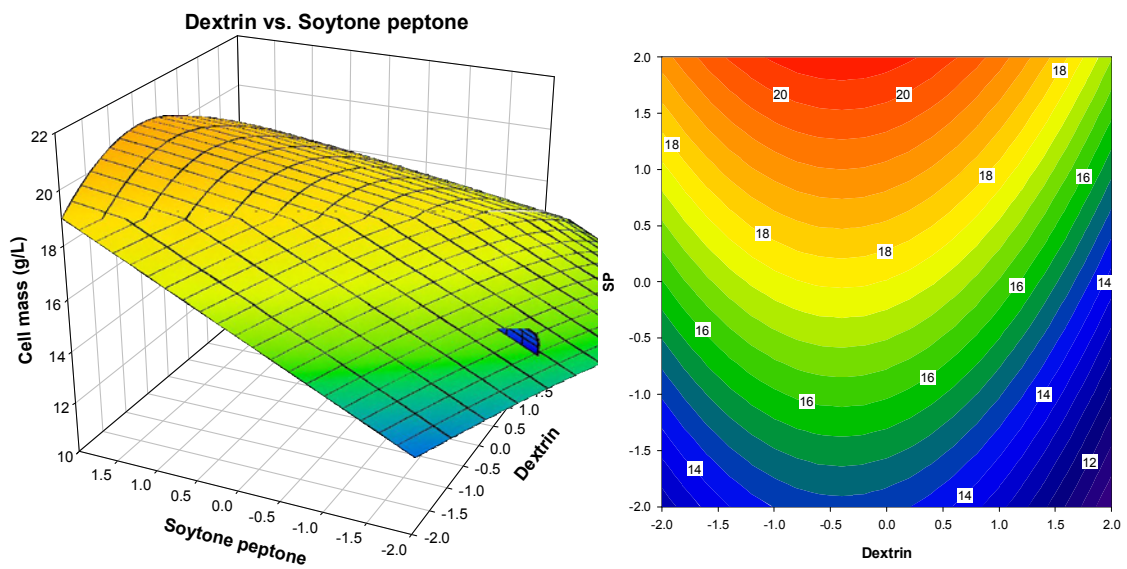


그림 27. 3-D response surface and contour plot of cell mass as a function of dextrin and soytone peptone (1st RSM experiment after Plackett–Burman design experiment) (Rich Media 1).

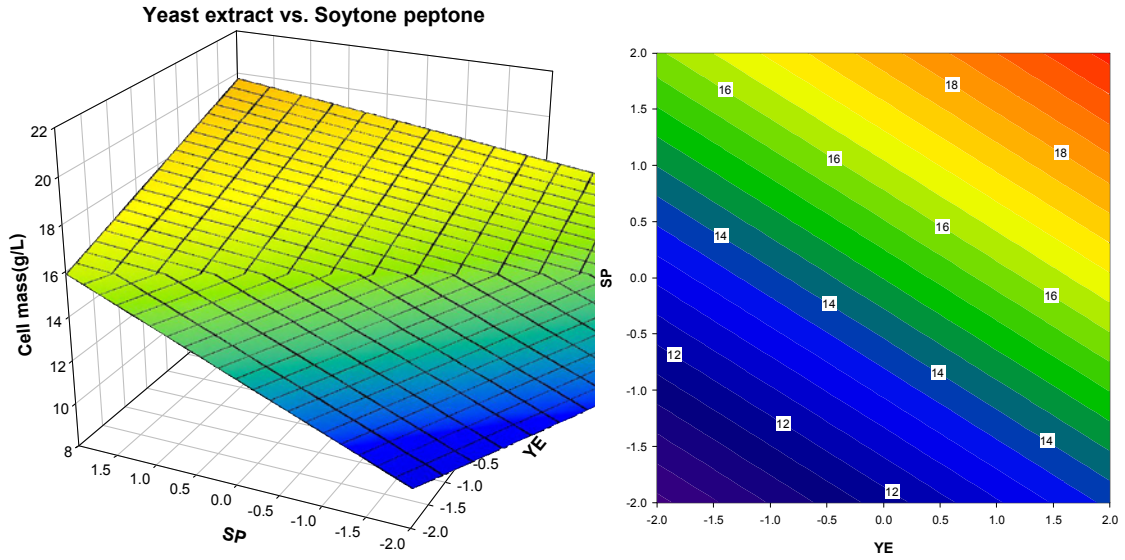


그림 28. 3-D response surface and contour plot of cell mass as a function of soytone peptone and yeast extract (1st RSM experiment after Plackett–Burman design experiment) (Rich Media 1).

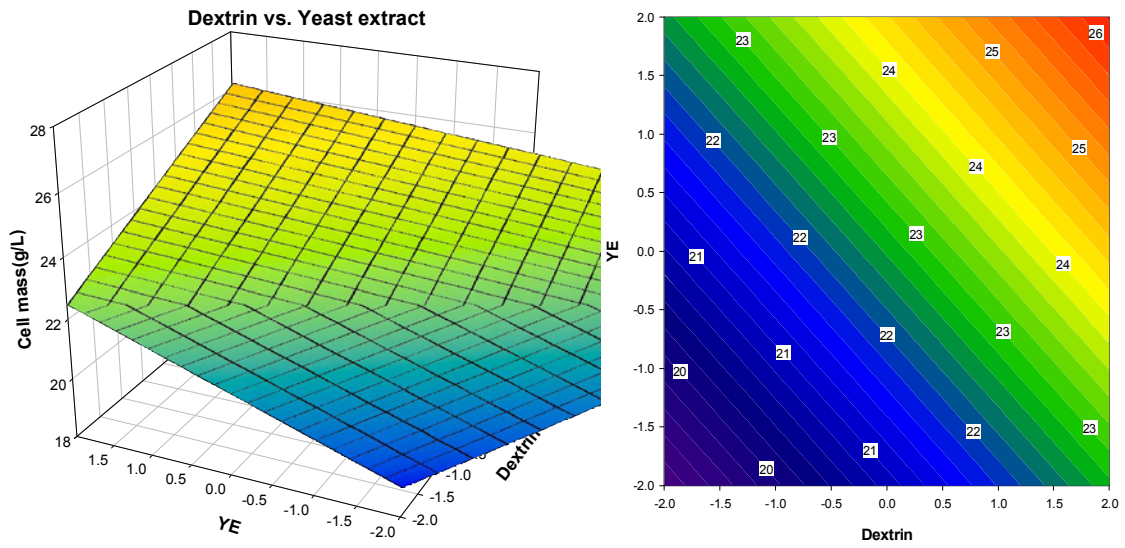


그림 29. 3-D response surface and contour plot of cell mass as a function of dextrin and yeast extract (1st RSM experiment after Plackett–Burman design experiment) (Minimal Media 2).

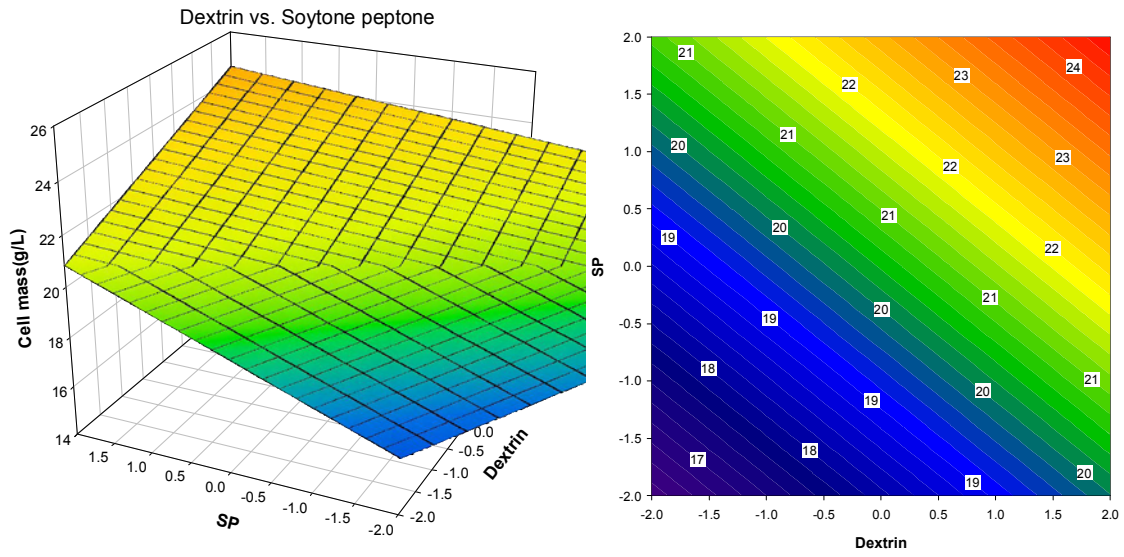


그림 30. 3-D response surface and contour plot of cell mass as a function of dextrin and soytone peptone (1st RSM experiment after Plackett-Burman design experiment) (Minimal Media 2).

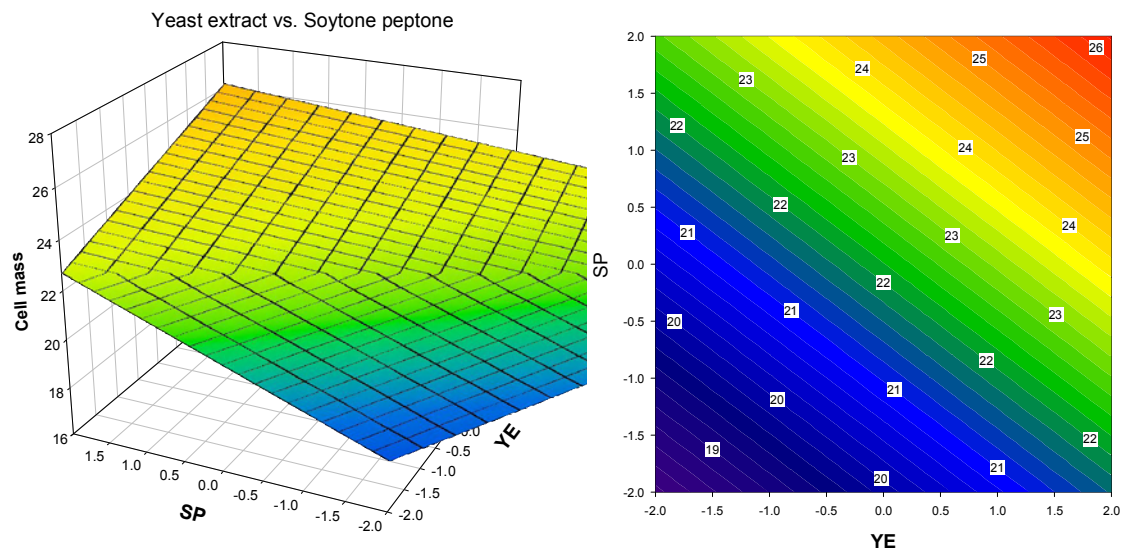


그림 31. 3-D response surface and contour plot of cell mass as a function of soytone peptone and yeast extract (1st RSM experiment after Plackett-Burman design experiment) (Minimal Media 2).

	C1	C2	N1	N2	Rich Media 1	Minimal Media 2
1	25	50	8	9	20	15.67
2	25	50	8	5	22	14.33
3	25	50	4	9	20.67	14.33
4	25	50	4	5	19.67	12.33
5	25	30	8	9	22.33	17
6	25	30	8	5	21.33	12.67
7	25	30	4	9	22	16.33
8	25	30	4	5	19.67	13
9	15	50	8	9	22.33	18
10	15	50	8	5	17.67	15
11	15	50	4	9	18.67	16.67
12	15	50	4	5	18	12.33
13	15	30	8	9	20	17.33
14	15	30	8	5	20.67	13.67
15	15	30	4	9	18.33	14.67
16	15	30	4	5	17	12.33
17	10	40	6	7	19.67	15.33
18	30	40	6	7	23.67	11
19	20	20	6	7	18.67	14.67
20	20	60	6	7	19.33	16
21	20	40	2	7	16.67	13.67
22	20	40	10	7	21	19.33
23	20	40	6	3	15	12
24	20	40	6	11	24.67	18
25	20	40	6	7	20.33	15.67
26	40	50	6	7	17.33	11.33

표 12. Cell mass obtained in various medium concentrations designed for RSM.

(5) Plackett–Burman design에 의해 선별된 배지성분을 이용한 2차 RSM 배지 최적화

- 상기의 반응표면 분석 결과를 통해 얻어진 새로운 중심점에 의해 2차 반응표면분석법을 수행하였다. 본 최적화 실험에서 배양배지는 Rich Media 1과 Minimal Media 2 두가지로 수행하였으며 상기의 결과와 마찬가지로 Minimal Media 2에서 배양했을 때 세포농도가 30% 정도 향상되는 것을 확인할 수 있었다(표 13). 그림 32의 반응표면도와 contour plot은 KH_2PO_4 , FeSO_4 의 농도에 따른 세포농도를 나타낸 것이며 최대치를 주는 stationary point가 존재하는 것을 확인하였다.

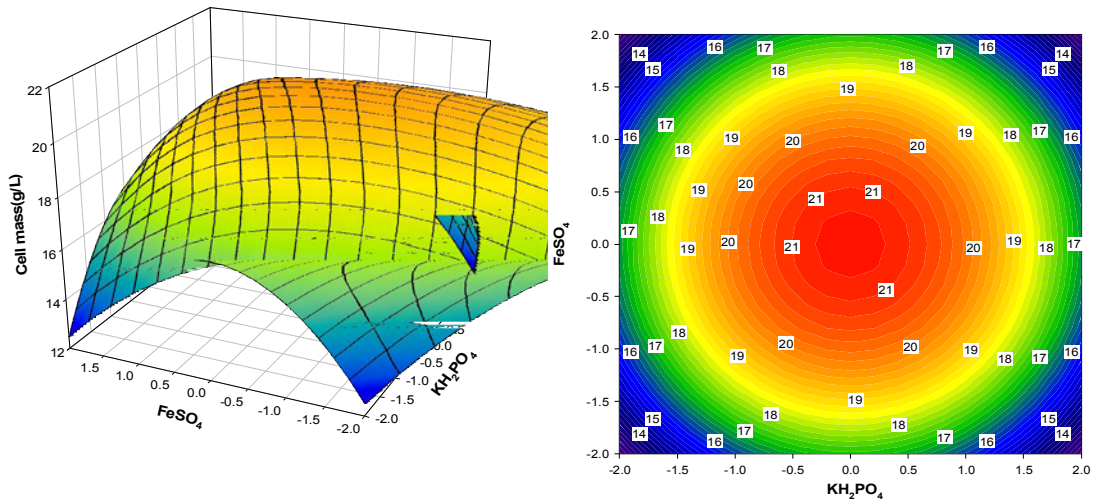


그림 32. 3-D response surface and contour plot of cell mass as a function of KH_2PO_4 , and FeSO_4 (2^{nd} RSM experiment after Plackett–Burman design experiment) (FC1 seed).

	KH_2PO_4	N1	MgSO_4	FeSO_4	Rich Media 1	Minimal Media 2
1	6	6	1.5	0.15	13.75	17.5
2	6	6	1.5	0.05	16.71	16.54
3	6	6	0.5	0.15	15.71	16.39
4	6	6	0.5	0.05	22.13	17.18
5	6	4	1.5	0.15	15	16.39
6	6	4	1.5	0.05	15.25	16.36
7	6	4	0.5	0.15	13.5	17.86
8	6	4	0.5	0.05	17.61	17.64
9	4	6	1.5	0.15	17.79	17.79
10	4	6	1.5	0.05	15.54	16.75
11	4	6	0.5	0.15	16.82	18.57
12	4	6	0.5	0.05	16.79	16.75
13	4	4	1.5	0.15	15.61	17.5
14	4	4	1.5	0.05	16.75	16.18
15	4	4	0.5	0.15	15	17.86
16	4	4	0.5	0.05	20.5	18.54
17	3	5	1	0.1	13.79	18.68
18	7	5	1	0.1	16	17
19	5	3	1	0.1	14.46	21.21
20	5	7	1	0.1	18.07	18.29
21	5	5	0	0.1	14.39	19.21
22	5	5	2	0.1	15.43	20.54
23	5	5	1	0	17.68	17
24	5	5	1	0.2	17.82	19.54
25	5	5	1	0.1	14.96	21.32
26	5	5	2	0.5	17.64	19.43

표 13. Cell mass obtained in various medium concentrations designed for RSM

- 통계학적인 배지 최적화 실험을 토대로 발효미생물의 배양배지로 사용하기 위한 배지 최적화를 확립할 수 있었으며, 상기 통계학적인 배지 최적화 실험 결과 확립된 최적의 배지농도 조건은 표 14에 제시하였다.

Components	Weights or Volume
C1	20g/L
C2	40g/L
C5	3g/L
N1	6g/L
N2	11g/L
KH ₂ PO ₄	5g/L
FeSO ₄	0.1g/L
MgSO ₄	1g/L
CaCl ₂	0.5g/L

표 14. Optimized concentration of production medium determined by use of Plackett–Burman design and RSM experiment.

마. 목이버섯 자실체의 발효미생물에 의한 바이오컨버전 발효공정 최적화

- 상기 실험에서 최적화된 효소처리공정을 통해 목이버섯 자실체의 배양배지화공정을 수행하였으며, 배지 최적화 연구를 통해 발효미생물의 종균배양공정을 최적화 하였고, 선발된 발효미생물로 상기의 발효배지화 시킨 목이버섯 자실체에 목이버섯균사 및 PBS65 균주를 접종하여 바이오컨버전 발효를 수행하였다.
- 바이오컨버전 발효조건을 최적화하기 위해 목이버섯균사 및 PBS65 균주를 이용한 최적발효조건을 개발하고자 하였으며, 목이버섯균사 및 PBS65 균주로부터 바이오컨버전산물을 고생산 할 수 있는 균주의 screening을 계속적으로 수행하여 면역활성 역가를 향상시킬 수 있는 균주를 추가로 선발하여 바이오컨버전 발효에 적용하는 연구를 수행하였다.
- 발효미생물의 접종량 및 본배양배지에 추가 배양배지의 첨가 등의 발효변수를 적용하여 바이오컨버전 발효조건을 최적화 하고자 하였다.

(1) 발효미생물의 접종량 비교

- 목이버섯 자실체 N4NDP 시료에 전처리공정(PPC : Pre-Processing) 후 면역활성 역가가 향상되는 것을 관찰할 수 있었으며, 특히 목이버섯균사와 발효미생물 PBS65 균주에 의한 바이오컨버전산물의 면역활성 역가가 dramatic하게 향상되는 것을 확인할 수 있었다.

- 목이버섯균사와 PBS65 균주의 접종량을 각각 5%, 10%로 비교해 보았다.
- 실험결과(그림 33) 10% 접종하였을 때 면역활성 역가가 좀 더 높은 것을 확인할 수 있었다. 발효미생물에 의한 바이오컨버전산물의 대식세포 면역활성 역가가 매우 높기 때문에 면역활성을 보기 위한 실험의 샘플 희석을 기존에 1/2 serial 희석방법 대신 1/4 serial 희석을 하여 면역활성 역가를 확인하였다.
- 그림 34에서는 균사의 접종량을 10%에서 20%로 두 배 높게 접종한 결과 오히려 면역활성 역가가 낮아지는 것으로 보아 적당한 접종량은 10% 수준으로 확인하였다.

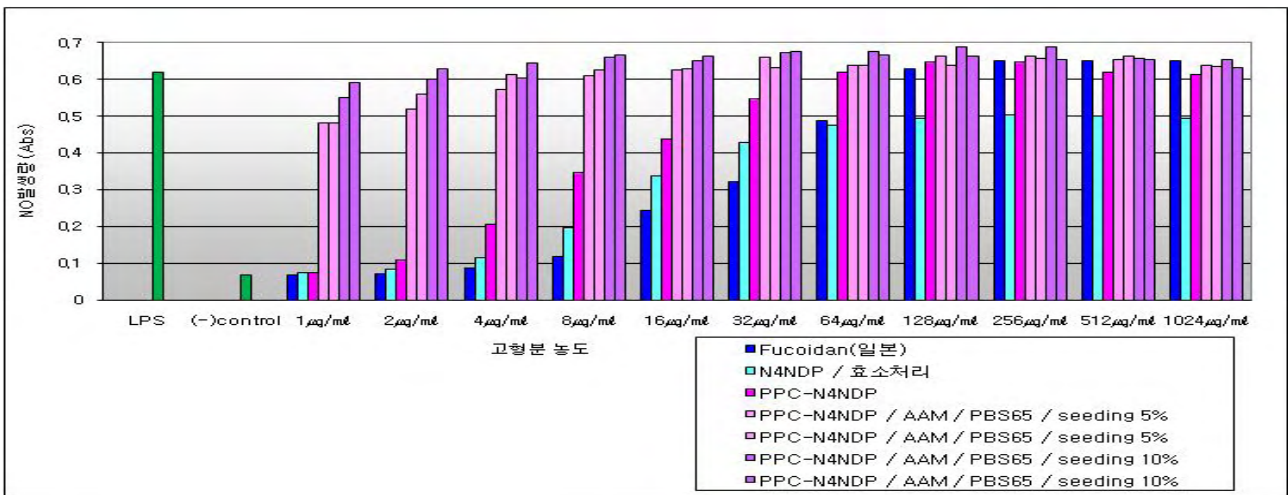


그림 33. Comparison of macrophage activity according to volume of seed inoculum.

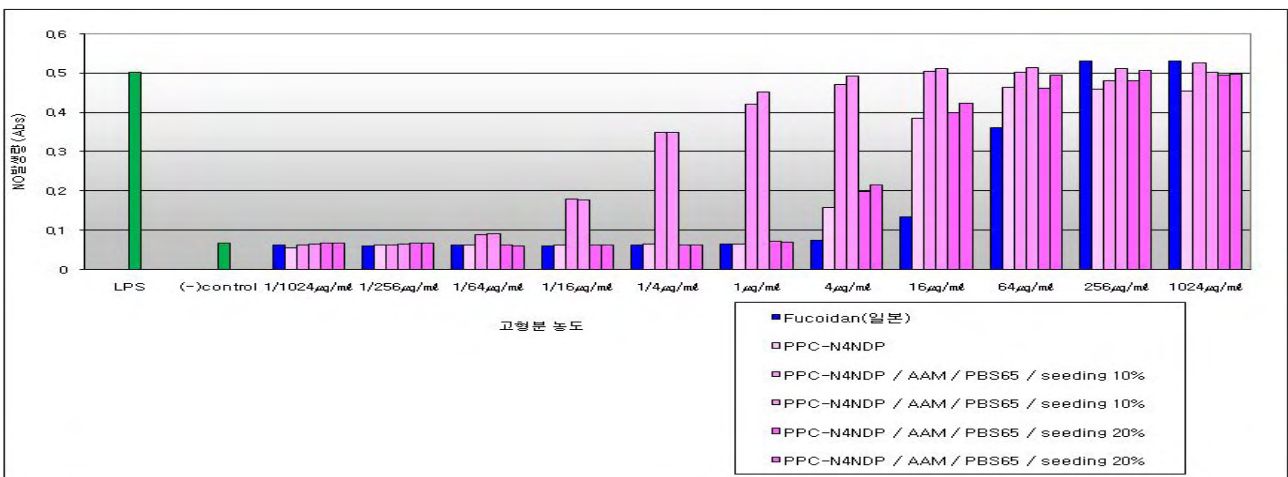
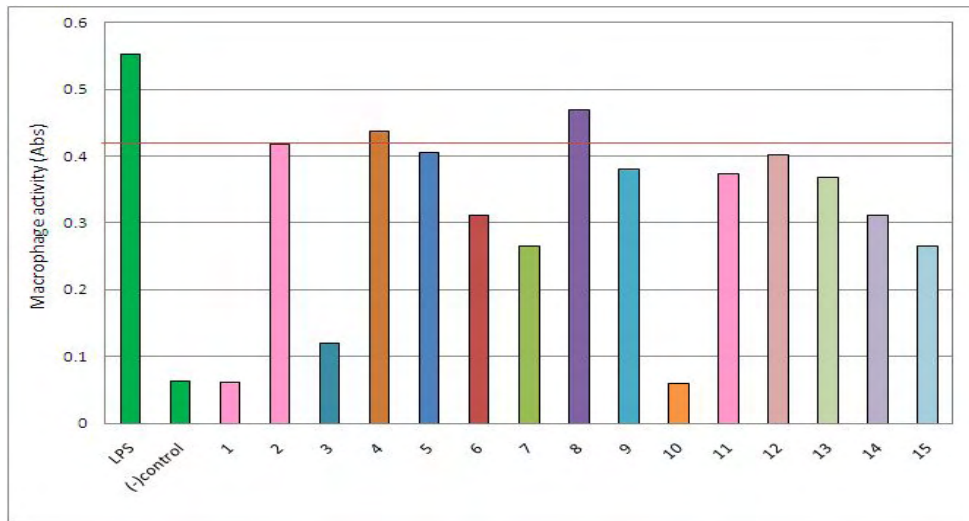


그림 34. Comparison of macrophage activity according to volume of seed inoculum.

(2) 발효미생물의 균주 screening 및 선별된 균주의 적용

- 1차년도에 선별된 발효미생물 중 PBS65 균주에 의한 발효를 통해 바이오컨버전산물의 면역활성 역가를 좀 더 향상시키기 위해 PBS65 균주로부터 screening 작업을 통해 면역활성 역가를 향상시킨 균주를 선별하고자 하였다.
- 발효미생물의 성장이 우수한 균주를 기준으로 선별하였고, 최종적으로 바이오컨버전 발효를 통해 면역활성 역가를 측정하여 PBS65 모균주보다 역가가 높아진 균주를 선별하고자 하였다(그림 35, 36, 37, 38).



Name of PBS65 screened strains	Activity (1/4 μ g/ml)	
1	PPC-N4NDP	0.0609
2	PPC-N4NDP / AAM / PBS65	0.4174
3	PPC-N4NDP / AAM / PBS65-PC15	0.1193
4	PPC-N4NDP / AAM / PBS65-BC20	0.4368
5	PPC-N4NDP / AAM / PBS65-BC30	0.4048
6	PPC-N4NDP / AAM / PBS65-BCP22	0.3118
7	PPC-N4NDP / AAM / PBS65-BCP33	0.2654
8	PPC-N4NDP / AAM / PBS65-LBP26	0.4701
9	PPC-N4NDP / AAM / PBS65-PC101	0.3805
10	PPC-N4NDP / AAM / PBS65-PC145	0.0597
11	PPC-N4NDP / AAM / PBS65-BC114	0.3737
12	PPC-N4NDP / AAM / PBS65-BC132	0.4024
13	PPC-N4NDP / AAM / PBS65-BCP115	0.3681
14	PPC-N4NDP / AAM / PBS65-BCP101	0.3114
15	PPC-N4NDP / AAM / PBS65-LBP122	0.2649

그림 35. Comparison of macrophage activity of various PBS65 screened strains in N4NDP

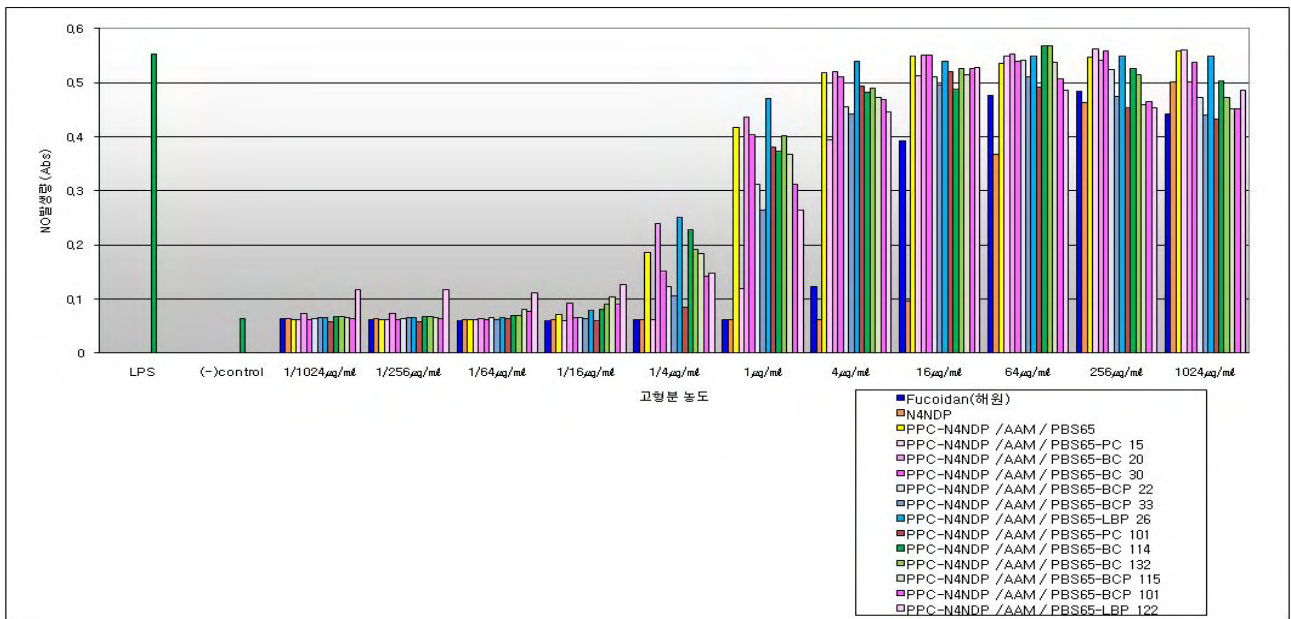


그림 36. Comparison of macrophage activity of various PBS65 screened strains in N4NDP

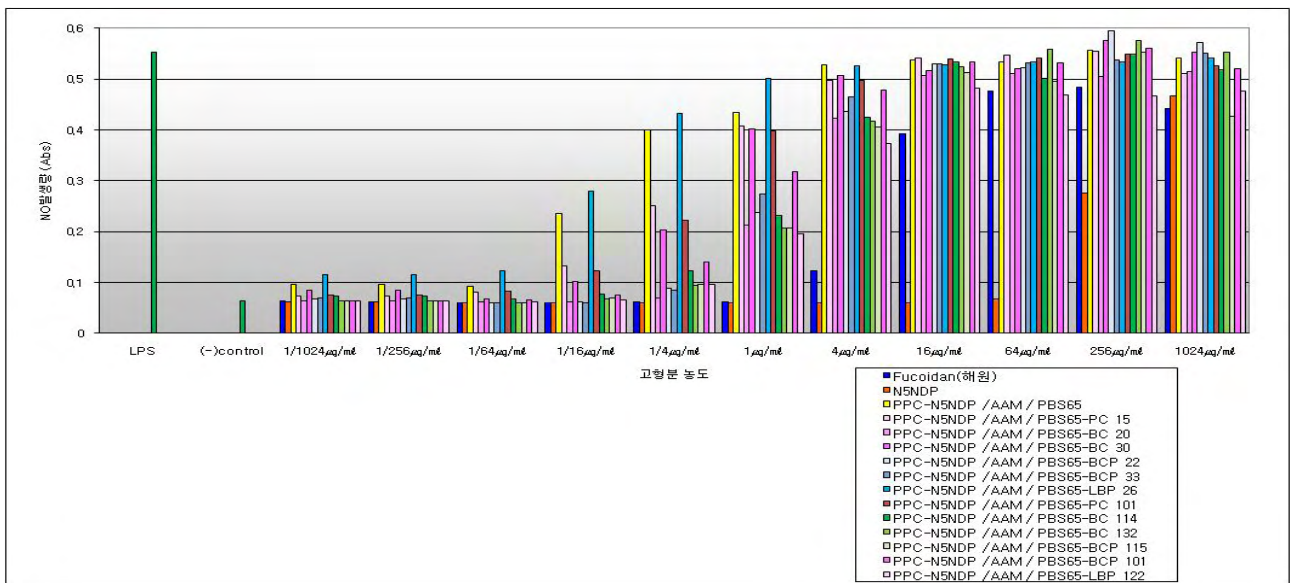
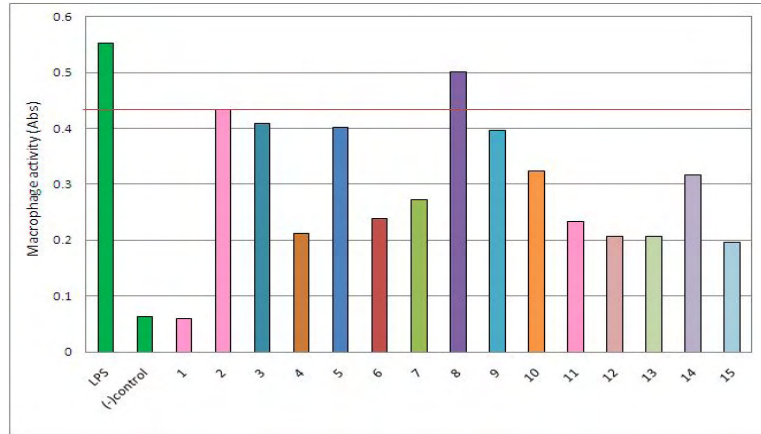


그림 37. Comparison of macrophage activity of various PBS65 screened strains in N5NDP



Name of PBS65 screened strains		Activity (1/4 μ g/ml)
1	PPC-N4NDP	0.0609
2	PPC-N4NDP / AAM / PBS65	0.4174
3	PPC-N4NDP / AAM / PBS65-PC15	0.1193
4	PPC-N4NDP / AAM / PBS65-BC20	0.4368
5	PPC-N4NDP / AAM / PBS65-BC30	0.4048
6	PPC-N4NDP / AAM / PBS65-BCP22	0.3118
7	PPC-N4NDP / AAM / PBS65-BCP33	0.2654
8	PPC-N4NDP / AAM / PBS65-LBP26	0.4701
9	PPC-N4NDP / AAM / PBS65-PC101	0.3805
10	PPC-N4NDP / AAM / PBS65-PC145	0.0597
11	PPC-N4NDP / AAM / PBS65-BC114	0.3737
12	PPC-N4NDP / AAM / PBS65-BC132	0.4024
13	PPC-N4NDP / AAM / PBS65-BCP115	0.3681
14	PPC-N4NDP / AAM / PBS65-BCP101	0.3114
15	PPC-N4NDP / AAM / PBS65-LBP122	0.2649

그림 38. Comparison of macrophage activity of various PBS65 screened strains in N5NDP

- N4NDP와 N5NDP 시료에서 발효미생물 PBS65 균주로부터 screening 작업을 통해 선별된 23개 균주로 발효하여 얻어진 바이오컨버전산물의 면역활성 역가 측정(그림 35, 36, 37, 38) HPLC분석 결과(그림 39), PBS65-LBP26과 PBS65-BC20 균주에서 모균주 PBS65 보다 면역활성 역가를 향상시킨 균주를 선발할 수 있었다. 특히 PBS65-LBP26 균주가 N4와 N5시료 모두에서 높은 면역활성 역가를 보였다.
- 목이버섯 균사와 선발된 PBS65-LBP26 균주에 대한 본배양 배지성분 중 탄소원 2종류와 질소원 2종류를 첨가해 본배양 배지성분에 대한 배지 최적화 실험을 수행하였다.
- 본배양 배지성분으로 탄소원을 추가로 첨가해 주었을 때에는 종류에 상관없이 오히려 면역활성 역가가 낮아지는 것을 확인할 수 있었으며, 질소원을 첨가해 주었을 때에는 N2 질소원 성분의 경우 4배 정도 면역활성 역가가 향상된 것을 확인하였다(그림 40).
- 질소원 첨가로 미생물 효소활성이 더욱 활발해진 결과로 판단된다.

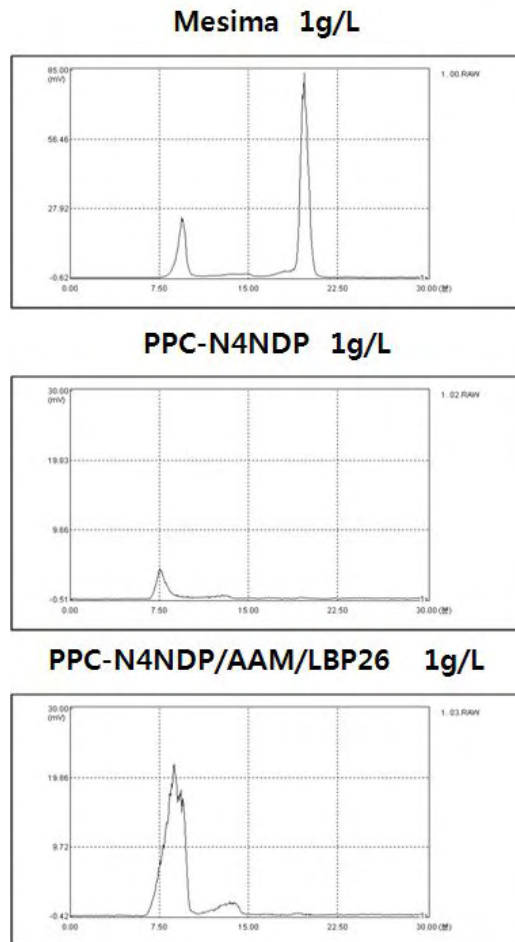


그림 39. HPLC chromatograms of polysaccharide concentration for mesima, PPC-N4NDP and PPC-N4NDP-AAM-PBS65-LBP26 1g/L samples

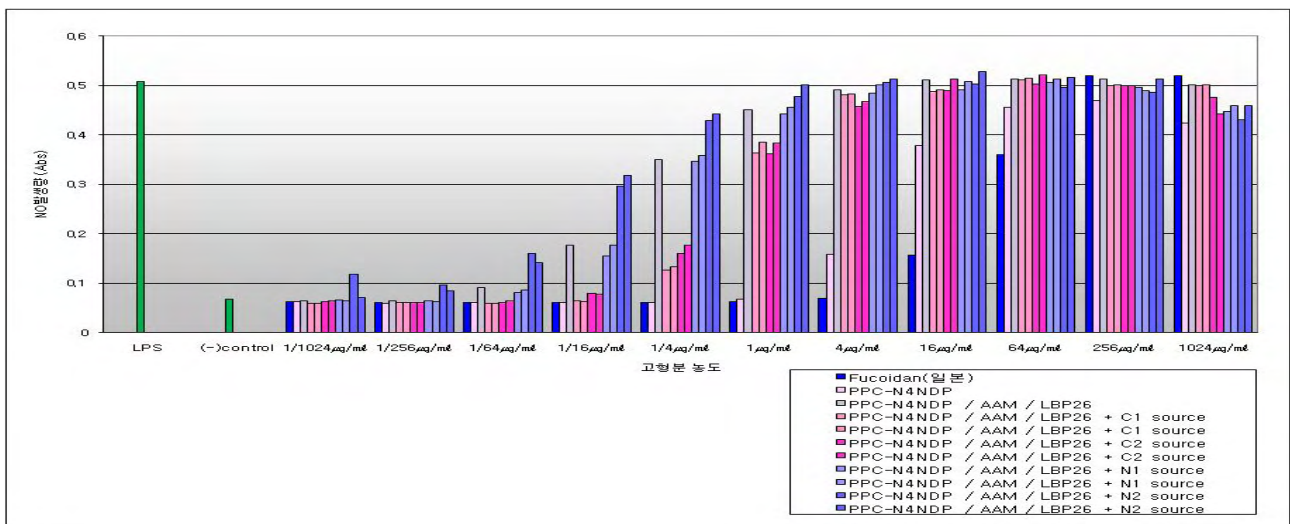


그림 40. Comparison of macrophage activity according to various C and N source in AAM and LBP26 culture

- N5NDP 시료를 2차년도에 최적화된 효소처리공정으로 전처리 배양배지화 공정을 수행하고, 최적화된 종균배양배지에 발효미생물로는 목이버섯균사와 PBS65 및 PBS65 균주로부터 선발된 BC20, LBP26 균주를 접종하여 N2가 첨가된 본배양배지에 접종하여 발효를 수행하였다.
- 먼저, N2가 첨가된 N5NDP 시료의 본배양배지에서 바이오컨버전산물의 면역활성 역가가 N4NDP 실험결과와 마찬가지로 향상되는 것을 확인하였다(그림 41, 42). 본배양에서 Probiotics의 접종은 각각의 선발된 균주를 단독으로 접종하는 실험과, 서로 다른 각각의 종균배양액을 동시에 접종하는 실험을 수행한 결과(그림 41, 42, 43) LBP26 균주의 단독 접종이 면역활성 역가가 가장 우수하였으며, Probiotics 2종 이상을 동시에 접종할 경우 면역활성 역가는 향상되지 않았고, 오히려 역가가 낮아지는 결과도 관찰할 수 있었다.
- 또한 발효시간을 Time 1과 Time 2로 배양하였을 경우에 배양시간이 일정시간 보다 길어질수록 역가가 다소 낮아지는 것을 확인할 수 있었다.

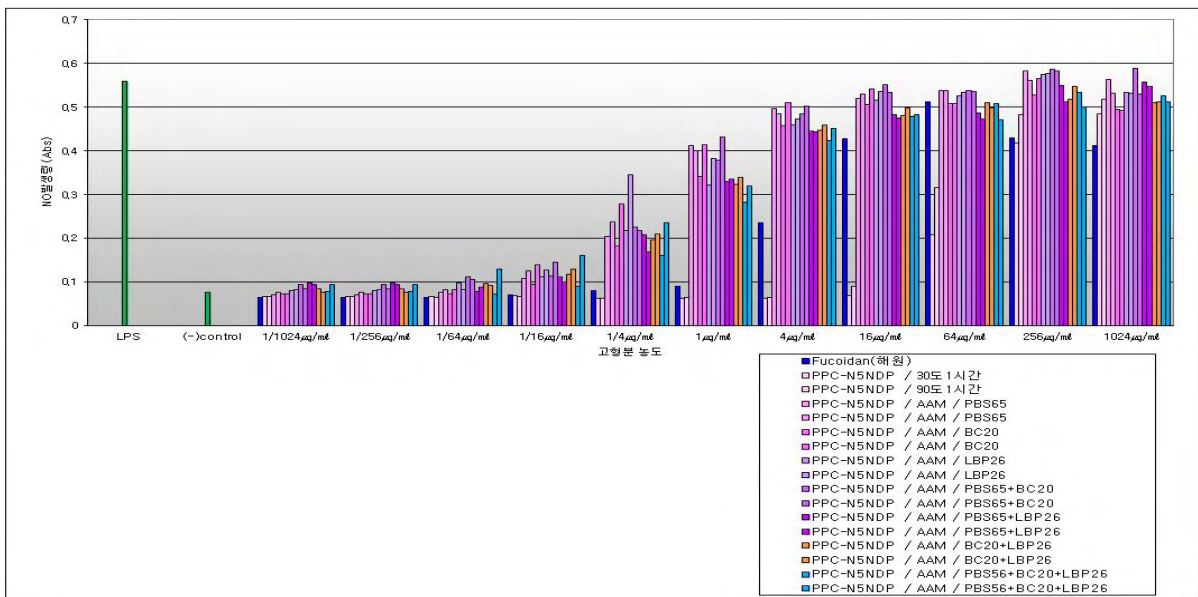


그림 41. Comparison of macrophage activity of various inoculation of PBS65 screened strains and AAM in N5NDP

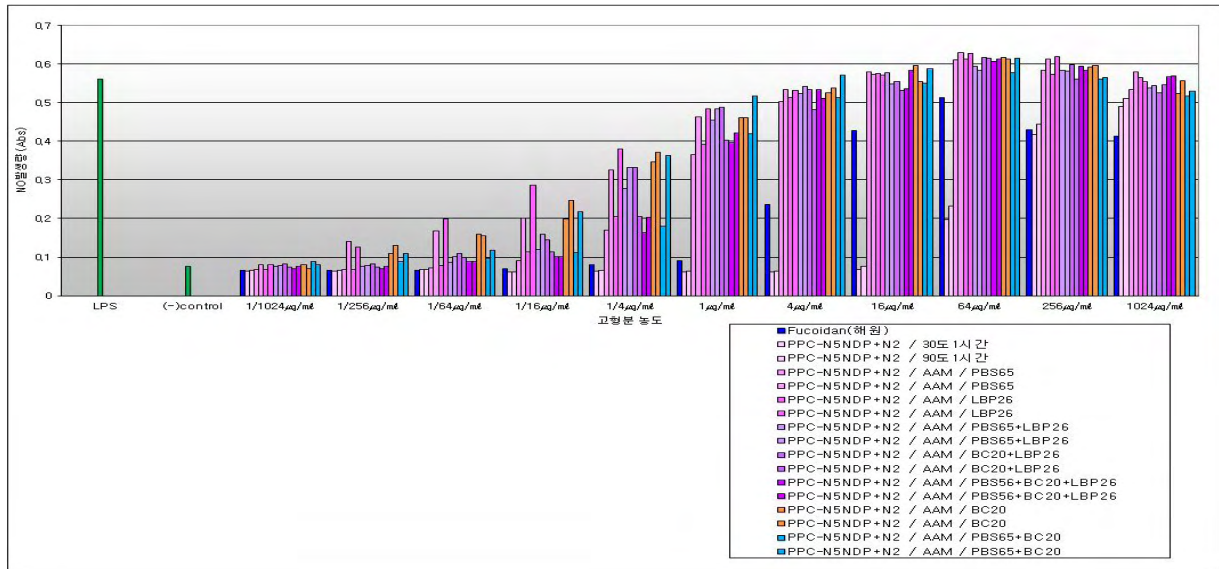


그림 42. Comparison of macrophage activity of various inoculation of PBS65 screened strains and AAM in N2 added N5NDP

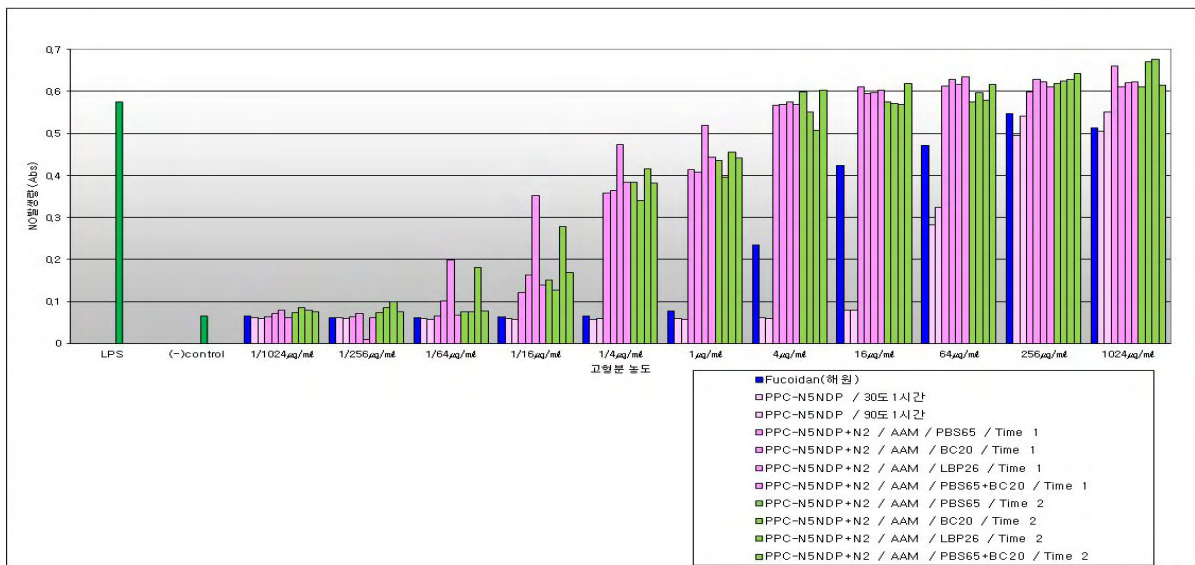


그림 43. Comparison of macrophage activity of various culture times and inoculation of PBS65 screened strains and AAM in N2 added N5NDP

(3) 50L 규모에서 바이오컨버전 발효공정 수행

- 상기 연구에서 바이오컨버전 발효의 최적화된 조건을 이용하여 50L 규모에서 바이오컨버전 산물을 제조하였다.



그림 44. Production institution of 50L Fermenter.

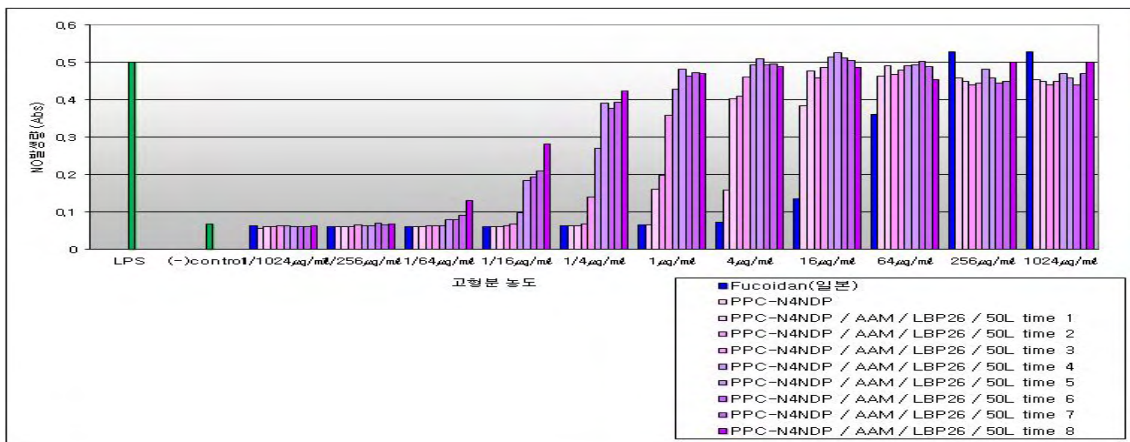


그림 45. Time profiles of macrophage activity for bioconversion fermentation by AAM and LBP26

- AAM과 LBP26 균주를 이용하여 lab-scale의 최적화된 조건으로 50L 규모에서 바이오컨버전 발효공정을 수행한 결과(그림 44, 45) 배양시간이 경과함에 따라 면역활성 역가가 높아지는 것을 확인하였으나, lab-scale 규모의 실험결과에 비해 면역활성 역가는 4배 정도 낮았다.
- 따라서 면역활성 역가를 향상시키고자 pilot 규모에서의 scale-up 최적화 실험을 수행하였으며, 그 결과는 뒷부분에 서술될 pilot-scale에서의 최적화 실험결과 부분에 기술되어 있다.

4) Pilot-scale에서 목이버섯 자실체의 발효미생물에 의한 바이오컨버전 발효조건 최적화

- Pilot-scale에서 바이오컨버전 발효공정 최적화를 통한 생산성 향상을 위해 50L 배양기에서 공정 특성연구를 수행하였다.
- 50L 배양기에서 공정 특성화연구를 위한 배양변수는 먼저 교반속도를 조절하여 배양시간에 따른 생산성 향상에 미치는 영향을 평가해 보았다.
- 실험에서 교반속도 140rpm, 공기유입량 0.5vvm으로 배양을 수행하였으며 본 배양에서는 교반속도를 차츰 200rpm으로 상승시켜 보았다(그림 46).
- 시간별 샘플링을 하여 면역활성 역가를 측정한 결과(그림 47), 배양 2일(44시간) 이후부터 4일(100시간)에 걸쳐 면역활성 역가가 상승하였으며, 배양 5일(120시간) 시점에서는 면역활성 역가가 낮아지는 것을 관찰하였다.
- 배양 종료 후 유기산 1% 처리 및 열처리 조건에서 면역활성 역가의 변화가 없었으며, 목이버섯 자실체의 바이오컨버전 발효물 전체를 건조하여 분말화한 바이오컨버전산물의 역가도 후처리공정에 의한 역가 변화가 없는 것을 확인하였다.
- 발효기 교반속도를 배양초반 140rpm에서 160rpm 으로 상승시킨 40시간 이후 시점부터 면역활성 역가가 상승하는 것을 알 수 있었으며, 교반속도 200rpm으로 높여 배양한 65시간 시점부터 면역활성 역가가 현저하게 상승하는 것을 관찰할 수 있었다.

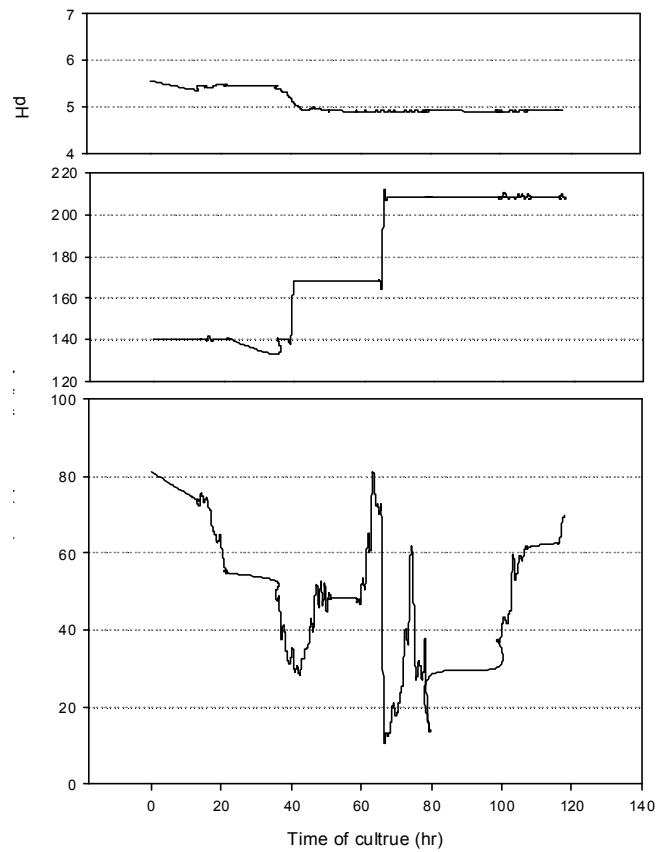


그림 46. Time profiles of DO, pH and agitation speed on 50L fermentation.

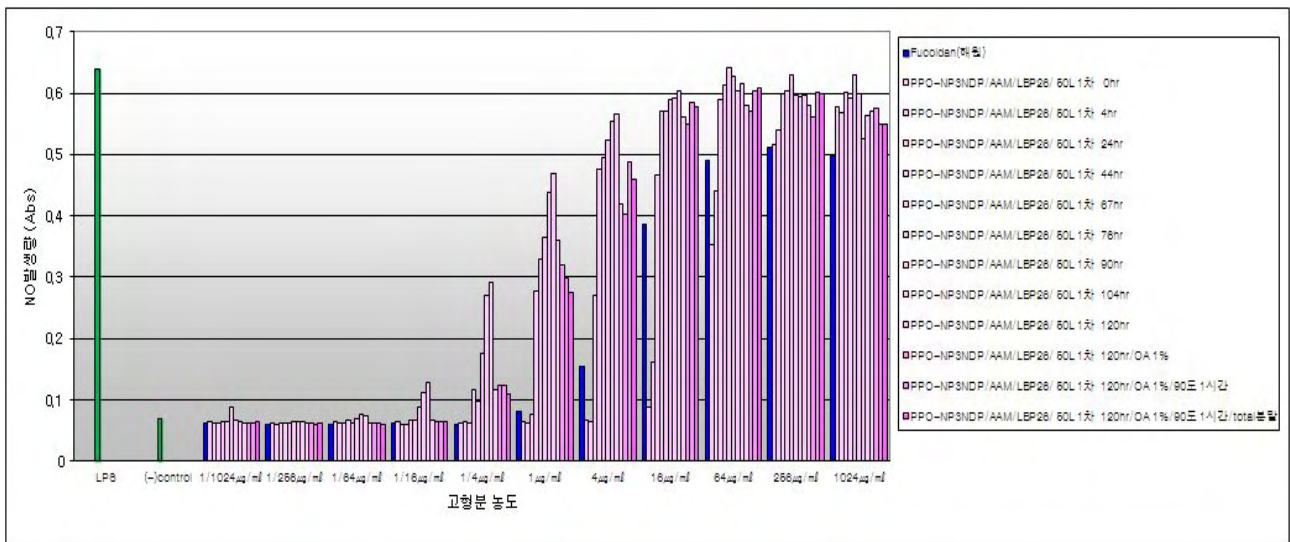


그림 47. Time profiles of macrophage activity on 50L fermentation (140 →200rpm, 0.5vvm).

- 상기 결과를 바탕으로 50L 발효공정에서 배양교반속도 200rpm, 공기유입량 0.5vvm 조건과 교반속도 250rpm, 공기유입량 0.8vvm 두 조건을 비교 배양하였다(그림 48).
- 발효 초반부터 교반속도를 200rpm과 250rpm으로 상승시킨 결과, 배양초반에 150rpm으로 시작하여 배양중반에 200rpm으로 상승시킨 결과와 비교해 볼 때 바이오컨버전산물의 생산성이 교반속도 140→200rpm 조건에서는 90~100시간에서 최대 면역활성 역가를 나타내었으나, 교반속도를 상승시켜 배양초반부터 200rpm으로 배양하였을 때에는 대략 80시간으로 단축된 시점에서도 면역활성 역가가 매우 높게 나타난 결과를 얻을 수 있었다.
- 발효 초반부터 교반속도 250rpm 발효를 수행한 결과에서는 바이오컨버전산물의 면역활성 역가가 전체적으로 다소 낮아지는 결과를 얻었는데, 이 결과는 50L 배양기에서 250rpm으로 배양할 경우에 높은 shear stress에 의한 목이버섯 균사의 성장이 저하된 결과에서 기인한 것으로 사료된다.
- 교반속도는 200rpm으로 하면서 공기유입량을 0.5vvm에서 0.8vvm으로 공기유입량을 증가시켜 발효를 수행하여 보았다(그림 49).
- 실험결과, 교반속도 200rpm에서 공기유입량을 0.5vvm에서 0.8vvm으로 증가시켜 준 결과 면역활성 역가가 좀 더 향상된 결과를 얻을 수 있었다.
- 공기유입량 증가에 의한 목이버섯 균사체 및 발효미생물의 생산성 향상에 의한 결과로 사료된다.

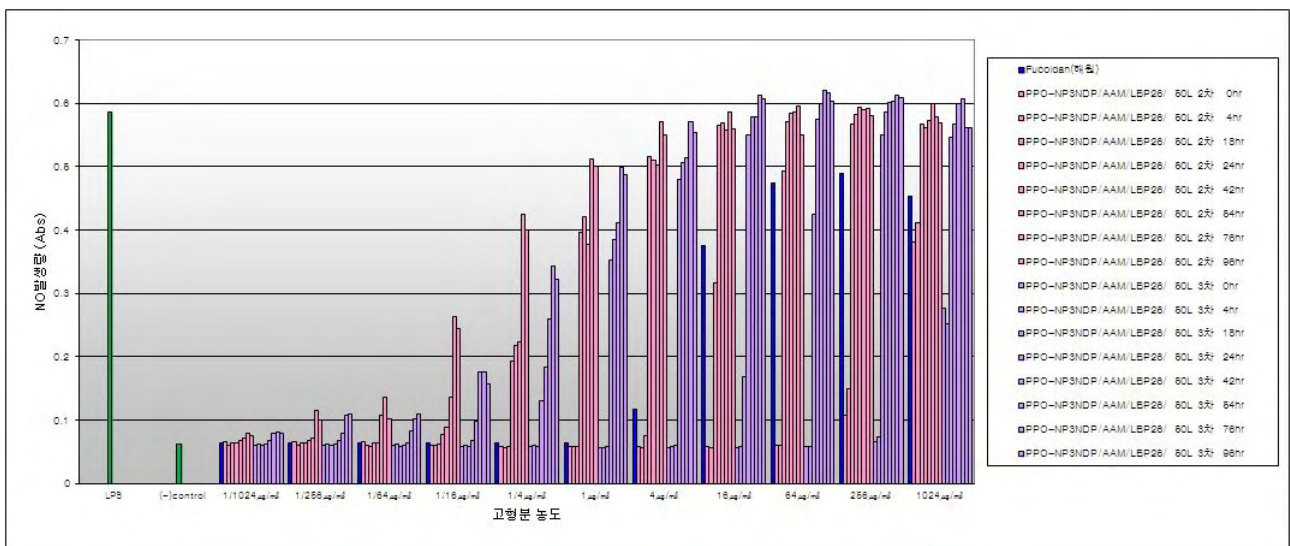


그림 48. Time profiles of macrophage activity on 50L fermentation (50L 2nd : 200rpm, 0.5vvm / 50L 3rd : 250rpm, 0.8vvm).

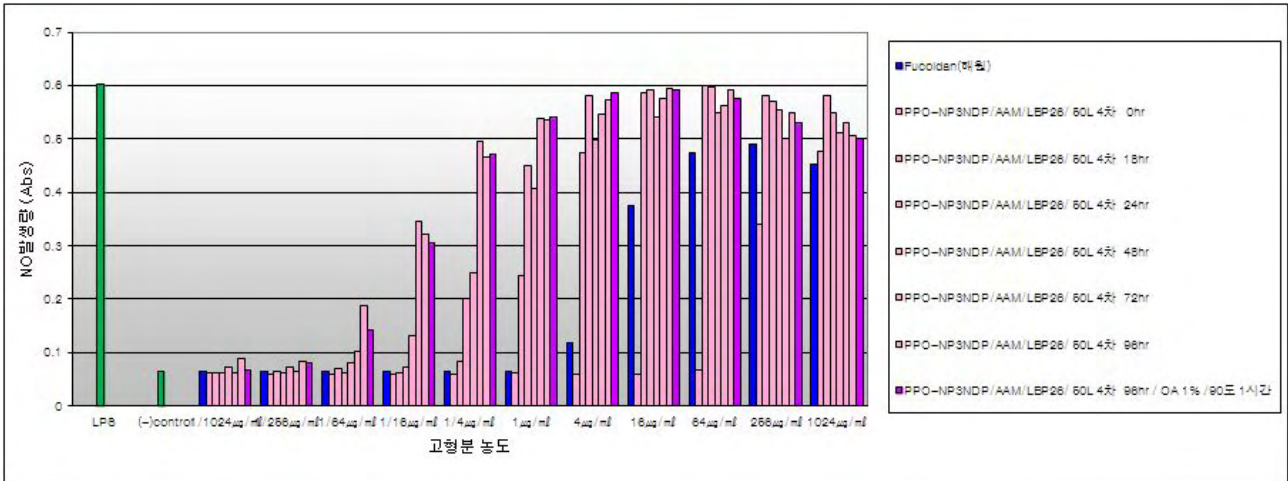


그림 49. Time profiles of macrophage activity on 4th 50L fermentation (agitation speed : 200rpm, airtation volume : 0.5vvm).

- 상기 50L 발효공정의 발효변수를 기반으로 500L 발효기에서 350L 용량의 본배양 발효공정을 수행하였다.
- 500L 발효기에서는 scale-up에 의한 전단응력을 고려하여 50L 발효기에서 교반속도 200rpm을 130, 150, 170rpm으로 운전하여 비교해 보았다.
- 50L 발효기에서 교반속도를 200rpm으로 운전하였을 때의 전단응력이 pilot 규모의 500L 발효기에서는 150rpm의 전단응력과 동일하게 평가하고 있다.
- 공기유입량 0.8vvm을 유지하여 발효하였다. 실험결과, 각각의 발효변수에 따른 발효에서 교반속도 130~170rpm 범위에서 비슷한 면역활성 역할을 나타내는 것을 확인하였다.
- 면역활성 역가도 50L와 비교해 보았을 때 500L 발효기 결과에서도 거의 동등한 면역활성 역할을 확인하였다(그림 50).

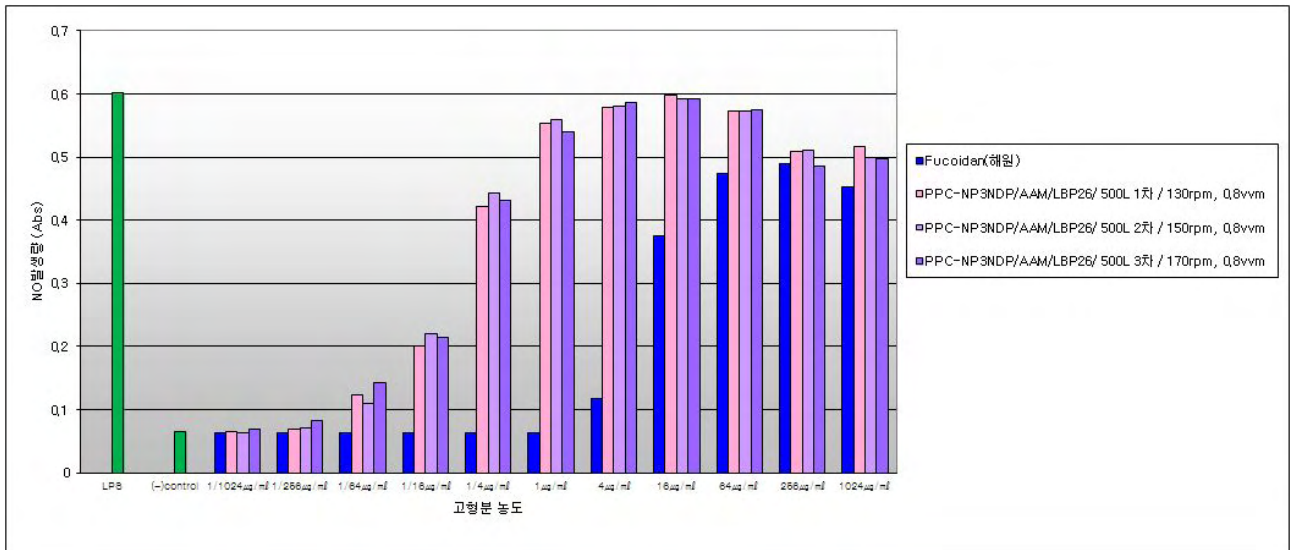


그림 50. Comparison of macrophage activity at 1st ~ 3rd 500L fermentation various agitation speed(130, 150, 170rpm, airtation volume : 0.8vvm).



그림 51. Pilot scale 300L and 500L Bioreactor in Chuncheon Bioindustry Foundation.

5) 목이버섯 바이오컨버전산물의 청정추출분리정제과정 최적화

가. 추출과정/원심,여과과정/미세여과과정/한외여과과정/농축과정/건조과정 최적화

- 바이오컨버전산물의 청정추출분리정제공정을 개발하기 위해 열수추출 조건은 1차년도에서 기확립된 조건을 기반으로 용매량 50배수, 70배수, 100배수 와 200배수 실험을 수행한 결과 유효성분의 추출수율 및 면역활성 역가는 100배수 또는 200배수의 용매량 조건에서 최대 수율을 나타냈으나, 사업화를 위해서는 100배수, 200배수의 경우에 용매량 소비가 너무 많아 생산단가가 상승되는 단점을 가지고 있기 때문에 수율이 다소 낮더라도 50배수 정도가 적당한 추출용매량으로 확정하였다.
- 상기 조건은 1차년도에 기확립된 조건과 동일한 추출용매량 조건이다. 1차년도에 유기산 처리에 의해 목이버섯 자실체가 가지는 고유의 수용성 고점성 다당체를 저점화하기 위해 실험을 수행하였으나 면역활성 역가가 동시에 낮아지는 문제점이 있었다.
- 2차년도에서는 바이오컨버전산물의 면역활성 역가가 월등히 향상된 시점에서 다시 유기산 처리에 의한 저점도화를 시도해 보았다.

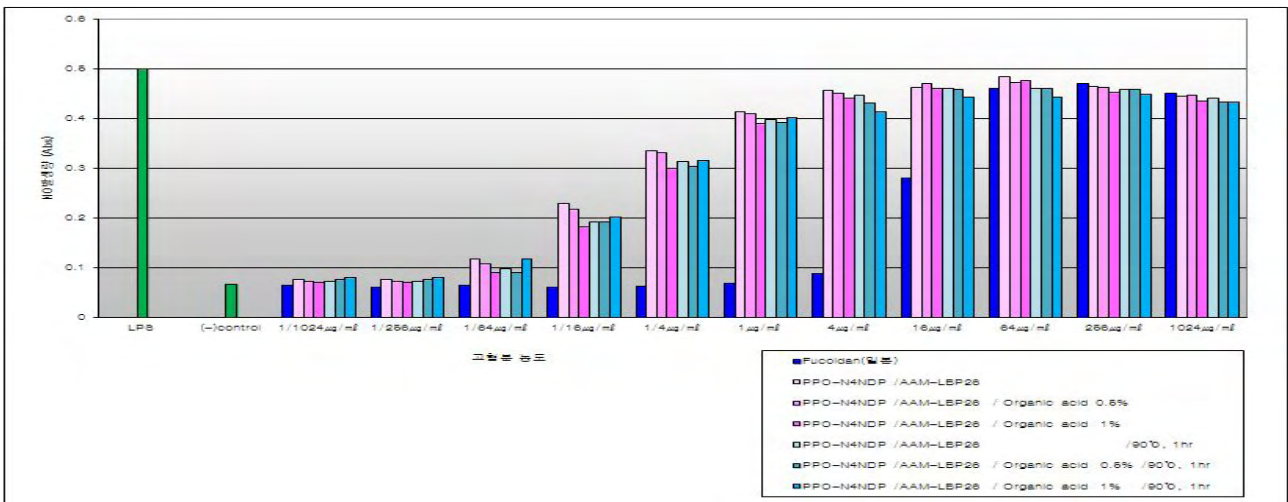


그림 52. Comparison of macrophage activity for treatment of 유기산 0.5%, 1% in PPC-N4NDP-AAM-LBP26 bioconversion product.

- 실험결과 목이버섯 자실체에 유기산을 처리했을 경우, 1차년도 결과에서는 목이버섯 자실체가 가지고 있는 고유의 면역활성 역가가 낮아지는 경향을 보였으나, 목이버섯 자실체의 전처리후 목이버섯 균사 및 LBP26에 의한 바이오컨버전산물에 유기산을 처리하여 저점화를 시도했을 때, 면역활성 역가에는 영향을 미치지 않고 점도만 낮아지는 것을 확인할 수 있었다 (그림 52).

- 바이오컨버전산물의 발효미생물을 제거하기 위한 목적으로 후처리공정에서 90℃, 1시간 열처리 하여도 면역활성 역가에는 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.
- 바이오컨버전산물에 유기산 1%를 처리하고 원심·여과공정, 미세여과공정, 한외여과공정을 수행하였다. 목이버섯 자실체의 바이오컨버전산물은 각각의 여과공정 별 회수율에서 70~80% 수준으로 별다른 차이를 보이지는 않았다.
- Lab 규모에서 작업성이 가장 용이한 원심분리에 의한 여과공정을 분리정제공정으로 최종 선택하였다.
- 원심분리공정을 거친 상등액은 rotary evaporator로 온도 45℃, 110rpm 조건에서 농축공정을 수행하였다.
- 농축액은 동결건조기로 건조하여 바이오컨버전산물의 분말을 획득함으로써 최종 바이오컨버전산물을 제조하기 위한 청정추출분리정제공정을 확립하였다.

6) Pilot-scale에서 바이오컨버전산물의 청정추출분리정제 조건 최적화

- Lab 규모에서는 작업성이 가장 용이한 원심분리에 의한 여과공정을 분리정제공정으로 최종 선택하였으며, pilot-scale에서의 분리정제공정은 (재)춘천바이오산업진흥원의 생산설비 시설로 필터프레스를 이용하여 잔사를 1차 제거하고, 진동막여과기를 이용하여 미세잔사를 제거하였다. 수득한 수용성분획은 동결건조기로 건조하였다(그림 53, 54).
- 바이오컨버전산물의 PPC-N2NDP-AAM-LBP26-T-D인 Total분말은 500L 발효공정 후 발효물 전체를 300L 동결건조기에서 건조하여 하여 제조하였고, PPC-N2NDP-AAM-LBP26-S-D 수용성분획분말은 500L 발효물을 추출한 후 필터프레스와 진동막여과기를 이용하여 잔사를 제거 한 뒤, 수용성분획을 동결건조하여 제조하였다.
- PPC-N2NDP-AAM-LBP26-S-ET-P-D 다당체분획분말은 발효추출액을 원심분리하여 잔사를 제거한 뒤, 수용성분획에 에탄올을 첨가하여 다당체분획을 침전시키고, 원심분리하여 침전된 다당체분획을 회수한 뒤 증류수에 녹여 동결건조함으로써 다당체분획분말을 수득하였다(그림 55).



그림 53. Filterpress and Vibrating menbrane filtering system



그림 54. 300L Freeze Drying System.



그림 55. Manufacturing process scheme of bioconversion products.

7) 시제품 개발 및 생산

가. 바이오컨버전산물 제조

- 아래 바이오컨버전산물 제조공정에 따라(그림 56) 발효미생물에 의한 바이오컨버전 발효배양액을 원심분리(10,000rpm, 30min) 후 상등액을 동결건조하여 PPC-N2NDP-AAM-LBP26-S-D를 얻고, 원심분리한 상등액을 다시 30%, 70% 에탄올로 추출하여 상등액을 농축 건조하여 PPC-N2NDP-AAM-LBP26-S-70ET-P-D와 PPC-N2NDP-AAM-LBP26-C-30ET-P-D분말을 제조하여 면역활성 역가를 측정하였다(그림 57).

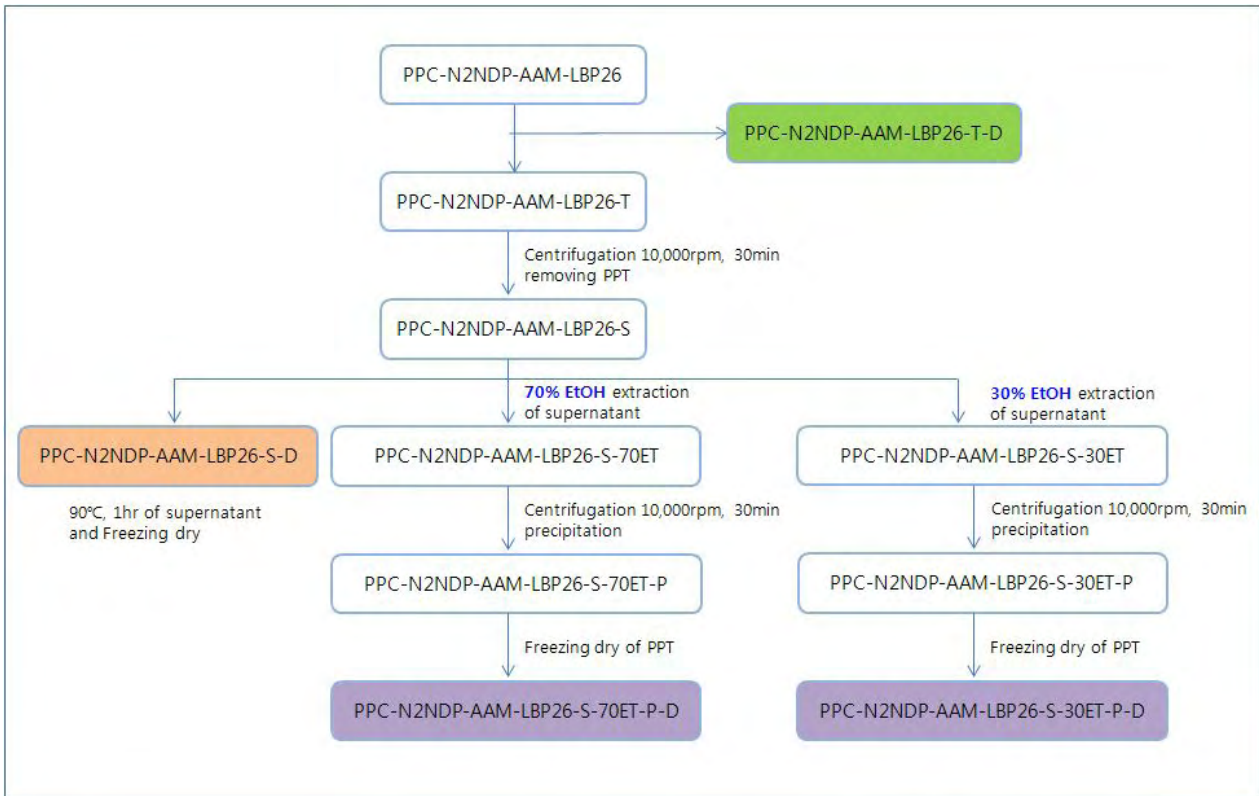


그림 56. Manufacturing process scheme of bioconversion products.

- 발효배지화 전처리공정을 거치지 않은 N2NDP의 바이오컨버전산물의 면역활성 역가가 가장 낮고, 발효배지화 전처리공정을 거친 N2NDP의 바이오컨버전산물에서는 면역활성 역가가 2 배 정도 향상된 것으로 나타났으며, 원심분리공정을 통해 바이오컨버전산물의 불용성 잔사를 제거한 바이오컨버전산물의 수용성분획분말에서는 불활성물질인 잔사의 제거에 따라 면역활성이 높아졌다.

- 수용성분획(상등액)에서 고분자성 다당체를 기타 성분과 분리할 목적으로 EtOH처리공정을 실시하였다. 고분자성 다당체 수용액에 EtOH를 처리할 경우 EtOH 농도가 높아짐에 따라 일반적으로 고분자성 다당체는 침전으로 분리되는 특성이 있다.
- 본 실험에서는 30% EtOH 처리 시 침전으로 회수된 물질의 면역활성 역가에 변화가 없는 것으로 보아 면역활성 다당체의 일부만 침전으로 분리되는 것으로 판단되며, 70% EtOH 처리 시 면역활성 역가가 크게 높아진 것으로 보아 고분자성 다당체가 침전되는 과정에서 면역활성을 나타내는 다당체가 대부분 침전되어 면역활성 역가가 크게 높아진 것으로 보인다.

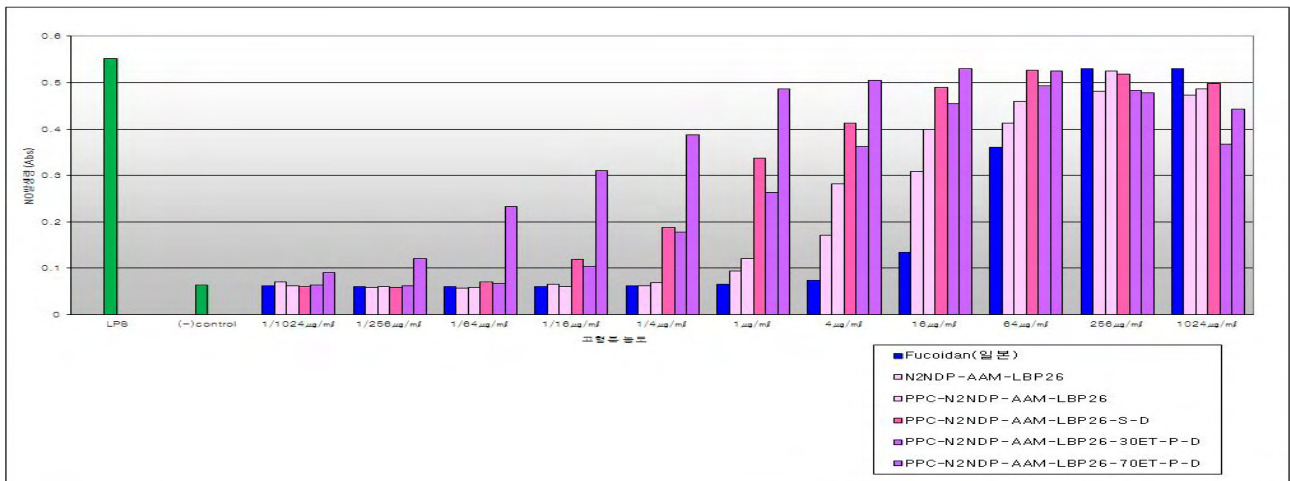


그림 57. Comparison of macrophage activity for bioconversion products according to the manufacturing process steps.

- 상기실험을 토대로 목이버섯 자실체 시료로는 발효배지화 전처리공정을 거친 N4NDP 시료를 사용하고, 발효미생물로는 AAM과 LBP26 균주를 접종하여 PPC-N4NDP-AAM-LBP26-S 수용성분획분말을 제조한 후 면역활성 역가를 측정하였다 (그림 58).
- 주관기관인 가천대학교와 협동기관인 (주)굿셀라이프에 제공하였다. 또한 70% EtOH 용액을 사용하여 추출한 추출시료인 PPC-N2NDP-AAM-LBP26-70ET 농축액은 목이버섯의 열수 추출 시 물에 녹지 않는 성분중에서 유효성을 나타내는 물질을 검토히기 위한 검증시료로 제작하여 가천대학교에 제공하였다.

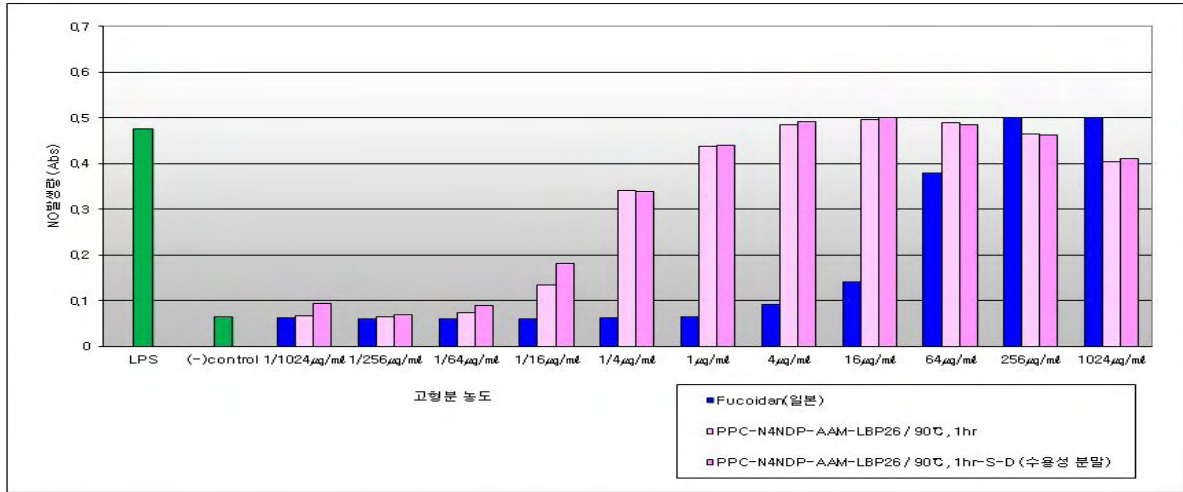


그림 58. Macrophage activity of bioconversion product PPC-N4NDP-AAM-LBP26-S-D.

나. 시제품 생산

- Pilot 규모의 500L 발효기에서 목이버섯의 바이오컨버전 발효공정을 수행하여 바이오컨버전 산물의 소재 시제품을 생산하였다.
- 바이오컨버전산물 발효물 전체를 건조하여 PPC-N4NDP-AAM-LBP26-T-D를 생산하였으며(그림 59), 발효 상등액을 분말화하여 PPC-N4NDP-AAM-LBP26-S-D 수용성분획분말을 수득하였다.
- 발효 상등액을 에탄올에서 O/N 추출하여 다당체분획을 침전물로 수득하였으며, 동결건조를 하여 PPC-N2NDP-AAM-LBP26-S-ET-P-D 다당체분획분말을 수득하였다(그림 60).
- 바이오컨버전 발효액에서 목이버섯 자실체 추출잔사를 제거한 상등액은 음료 및 화장품 소재로 적용하기 위해 90°C에서 1시간 동안 멸균처리하여 액상소재로 개발하였다(그림 61).



그림 59. Bioconversion product, PPC-N4NDP-AAM-LBP26-T-D (Total powder).

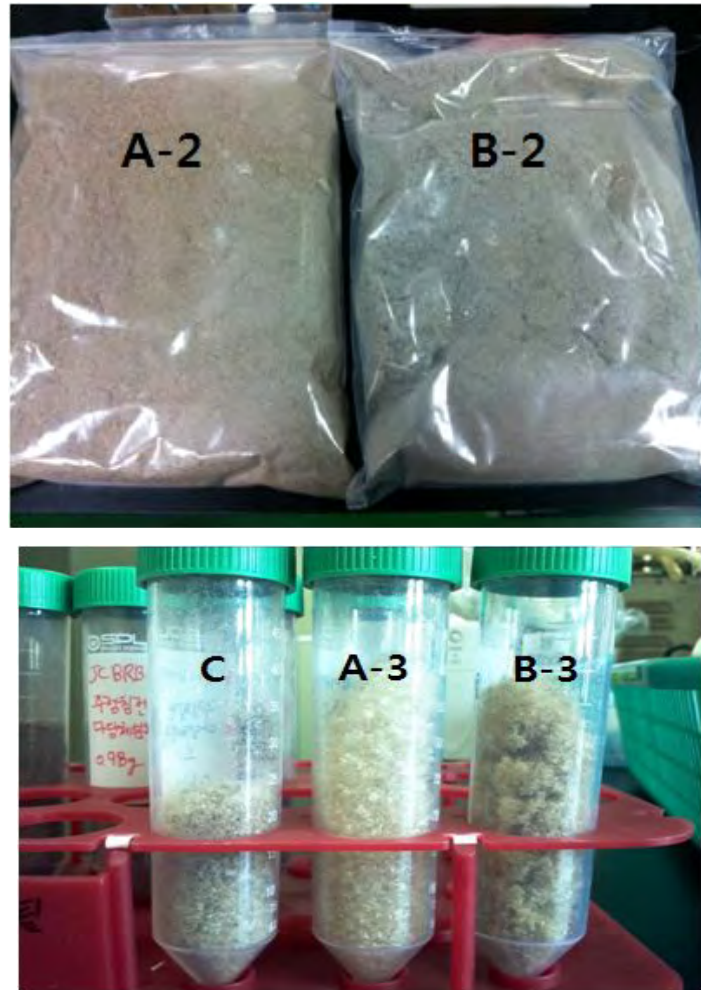


그림 60. Bioconversion products, PPC-N4NDP-AAM-LBP26-S-D(soluble powder ; A-2, B-2) and PPC-N2NDP-AAM-LBP26-S-ET-P-D(β -Glucan powder ; A-3, B-3, C).



그림 61. Bioconversion product, PPC-N4NDP-AAM-LBP26-S.

8) 목이버섯 바이오컨버전산물의 생리활성물질(유효성분) 분석

가. 바이오컨버전산물 분획별 면역활성 역가 분석

- 바이오컨버전산물의 분획별 면역활성 역가 분석을 위하여 HPLC를 수행하여 2분간격으로 elution되는 분획을 수집하였다. 수집된 분획은 Bioassay를 통해 면역활성 역가를 분석하였다. 그림 62의 바이오컨버전산물의 분획별 면역활성 역가 분석 결과, HPLC의 다당체 peak와 면역활성 역가 분석의 결과가 일치하는 것을 확인할 수 있었다.

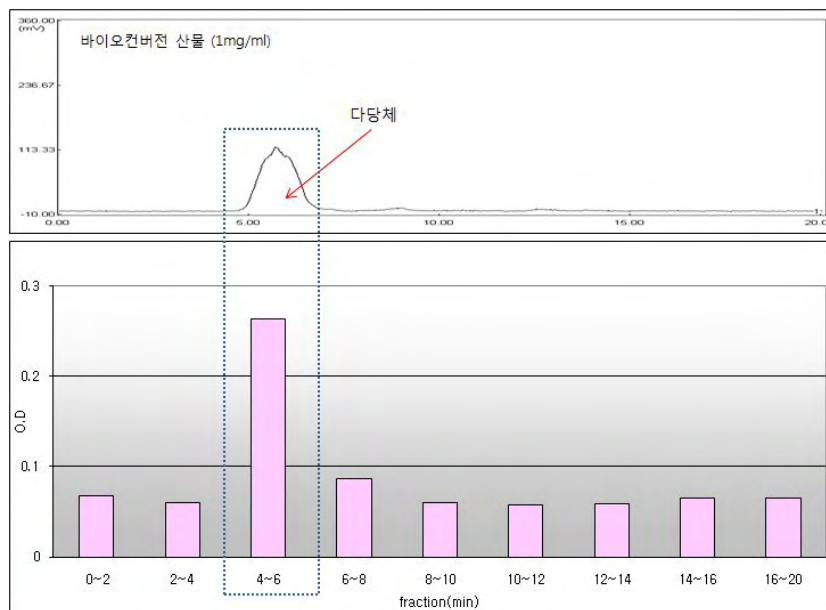


그림 62. HPLC 분석 결과 및 elution 시간별 분획의 면역활성 역가 비교

나. 바이오컨버전산물의 β -Glucan 함량 측정

- 베타글루칸 함량은 BETA-GLUCAN kit(Megazyme, Wicklow, Ireland)를 사용하여 측정하였다.
- Total glucan의 당 함량을 먼저 구한 다음에 α -glucan의 함량을 계산하여 그 값을 뺀 결과를 β -glucan 함량으로 나타내었다. 즉, 시료 100 mg에 37% 염산 1.5 ml을 첨가하여 vortex한 후 30°C water bath에서 45분 동안 반응을 시키고, 10 ml의 3차증류수를 첨가하고 vortex한다. 100°C의 water bath에서 2시간 동안 가수분해 시킨 후 10 ml의 2N KOH를 첨가하고, 200 mM의 sodium acetate buffer(pH 5.0)로 100 ml로 맞춰 희석하였다. 1500g에서 10분간 원심분리하고 상층액 100 μ l을 취하여 exo 1,3- β -glucanase와 β -glucosidase를 첨가한 후 40°C에서 60분간 incubation하고 GOPOD reagent(Megazyme) 3 mL을 첨가하고, 40°C에서 20분간 incubation하고 510nm에서 흡광도를 측정하여 total glucan의 당 함량을 분석하였다.

- α-glucan의 당함량은 시료 100 mg에 2M KOH 2 ml을 넣고 20분간 ice water bath에서 반응 후 1.2M sodium acetate buufer(pH 3.8) 8 ml을 첨가하고 amyloglucosidase와 invertase를 넣고, 40°C에서 30분간 반응시킨 후 1500g에서 10분간 원심분리한다. 이후 상층액 100 μl을 취하고 200 mM의 sodium acetate buffer(pH 5.0) 100 μl, GOPOD reagent 3 mL을 넣어 40°C에서 20분간 반응시킨 후 510nm에서 흡광도를 측정하였다.

CALCULATIONS: Total Glucan (% w/w) = $\Delta E \times F \times \frac{100}{0.1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180}$ (+ oligomers etc.) = $\Delta E \times F/W \times 90$. α-Glucan (% w/w) = $\Delta E \times F \times 1000 \times \frac{1}{(or\ 103)} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180}$ (+ oligomers etc.) = $\Delta E \times F/W \times 90$ (final volume 100 ml) = $\Delta E \times F/W \times 9.27$ (final volume 10.3 ml) β-Glucan = Total Glucan - α-Glucan (+ oligomers etc.) (+ oligomers etc.)	ΔE = reaction absorbance – blank absorbance. F = a factor to convert absorbance to μg of D-glucose. = $\frac{100 (\mu\text{g of the D-glucose standard})}{\text{GOPOD absorbance for } 100\mu\text{g of D-glucose standard.}}$ 100/0.1 = volume correction factor; for total glucan (yeast), (0.1 mL out of 100 mL was analysed). 103 = volume correction factor; for α-glucan (0.1 mL out of 10.3 mL was analysed). or 1000 = volume correction factor; for α-glucan (0.1 mL out of 100 mL was analysed). 1/1000 = conversion from μg to milligrams. 100/W = conversion back to 100 mg of sample (i.e. as % w/w). W = weight of sample analysed. 162/180 = a factor to convert from free D-glucose, as determined, to anhydroglucose, as occurs in β-glucan.
--	---

그림 63. Calculations of β-Glucan (%)

Control (53% β-glucan)		목이버섯 자실체		목이버섯 바이오컨버전산물	
total glucan	56.105±1.227	total glucan	23.412±0.336	total glucan	16.246±0.267
α-glucan	2.952±0.126	α-glucan	0.816±0.052	α-glucan	0.986±0.028
β-glucan	53.167±1.052	β-glucan	22.596±0.327	β-glucan	15.261±0.240

표 15. Analysis of β-Glucan (%)

- β-Glucan 함량 분석 결과, 목이버섯 자실체에 22.6%, 목이버섯 바이오컨버전산물에는 15% β-Glucan 함량의 결과를 얻었다(표 15).

다. 바이오컨버전산물의 면역활성 다당체 정제분말의 주요 구성당 분석 1

- 바이오컨버전산물의 다당체분획물을 열처리 및 산가수분해 처리하여 다당체의 주요 구성당을 분석하였다. 열처리 및 산가수분해는 시료 5 mg에 2N TFA 5 ml를 첨가한 후 121°C, 2hr 동안 가수분해하였으며, 산을 제거하기 위해 농축한 후 다시 3차증류수를 첨가하여 첨가된 산을 세척한 뒤 다시 농축하였다.
- 농축액은 3차증류수 1ml을 첨가하여 용해한 후 12000rpm, 10분간 원심분리한 상등액을 분석하였다. 단당 HPLC 분석에 사용한 컬럼은 Rezex RCM-Monosaccharide, 7.8x300 mm (Phenomenex, 00H-0130-K0), 컬럼 oven 온도는 60°C로 설정하여 분석을 수행하였다.
- 분석용매는 HPLC용 water 100%를 isocratic으로 분석하였으며 유속은 0.6 ml/min으로 설정하였다.
- 바이오컨버전산물의 면역활성 다당체의 주요구성당은 mannose로 분석되었다.

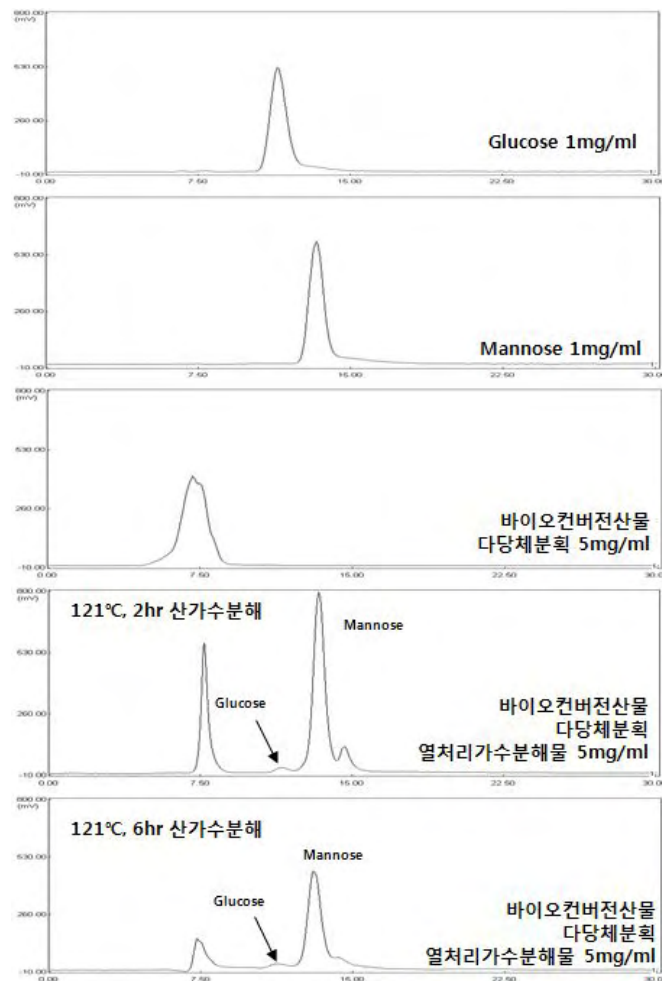


그림 64. Sugars composition of treated heat and acidic-hydrolysis bioconversion product by polysaccharide fraction .

라. 바이오컨버전산물의 면역활성 다당체 정제분말의 주요 구성당 분석 2

- 바이오컨버전산물의 다당체분획물을 열처리 및 산가수분해 처리하여 다당체의 주요 구성당을 분석하였다. 열처리 및 산가수분해는 시료 2mg에 2M TFA 1ml을 첨가하여 heating block 121도에서 2시간 동안 반응시킨다. 반응이 끝난 후 heating block의 온도를 50도로 낮추고 질소로 TFA를 날려준다. 물 1ml에 용해하고 12,000rpm, 10분간 원심분리 후 상등액을 분석에 사용하였다.
- 분석에 사용한 컬럼은 Dionex PA1(4x250mm)를 사용하였고, 시료는 50ul를 주입하였다. 분석용매 A는 18mM NaOH(Fisher scientific, SS254-1), B는 150mM NaOH/600mM NaOAc를 사용하였다. 유속을 1ml/min으로 설정하여 용매 B를 0%로 25분간 흘려준 후 25.1분에서 용매 B를 100%로 올리고 35분까지 %B를 100%로 한 후 35.1분에 %B를 0%로 내려 55분까지 안정화를 시켰다. 구성당은 Bio-LC(Dionex ED50)으로 검출하여 확인하였다.

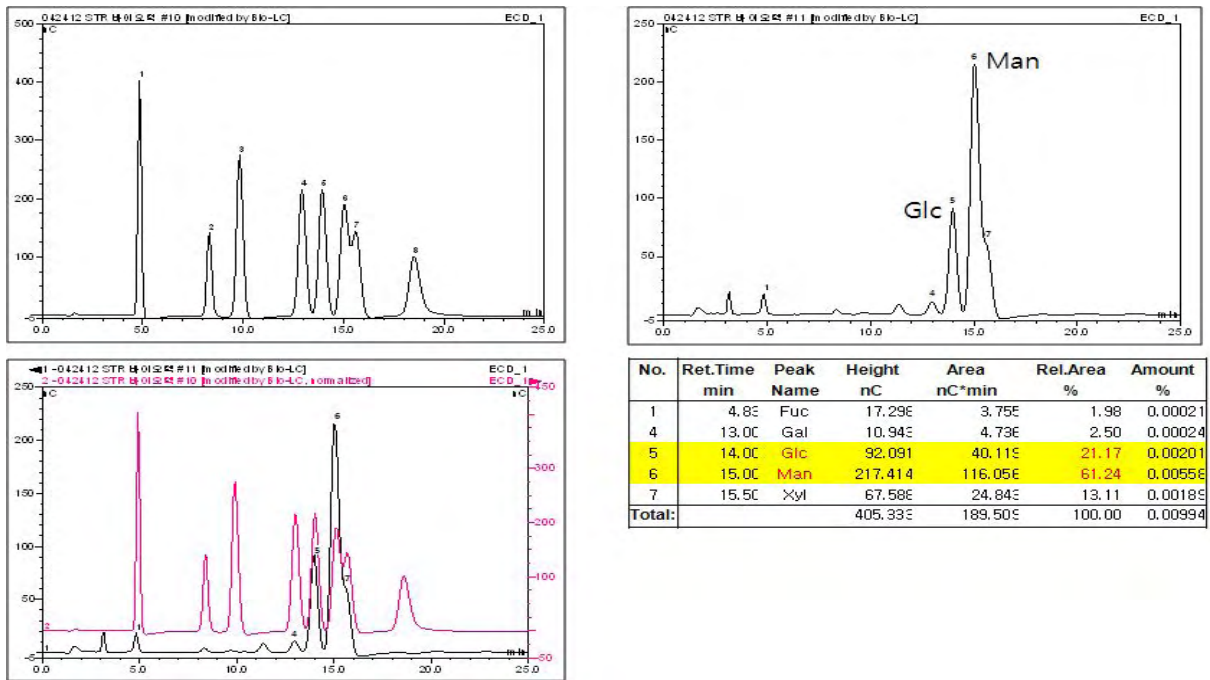
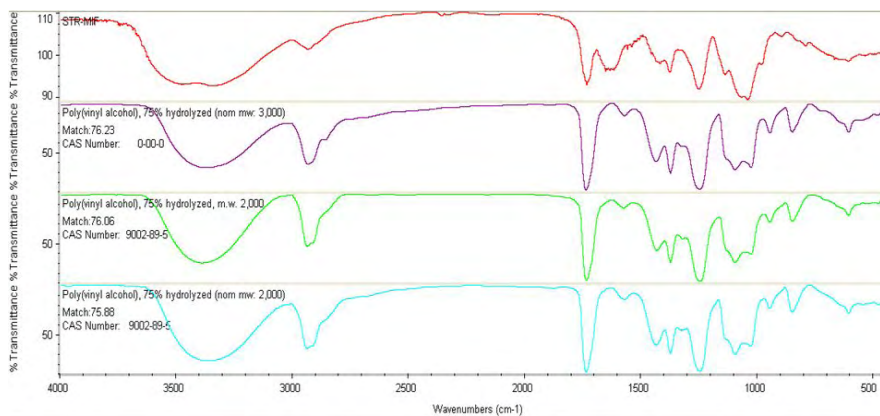
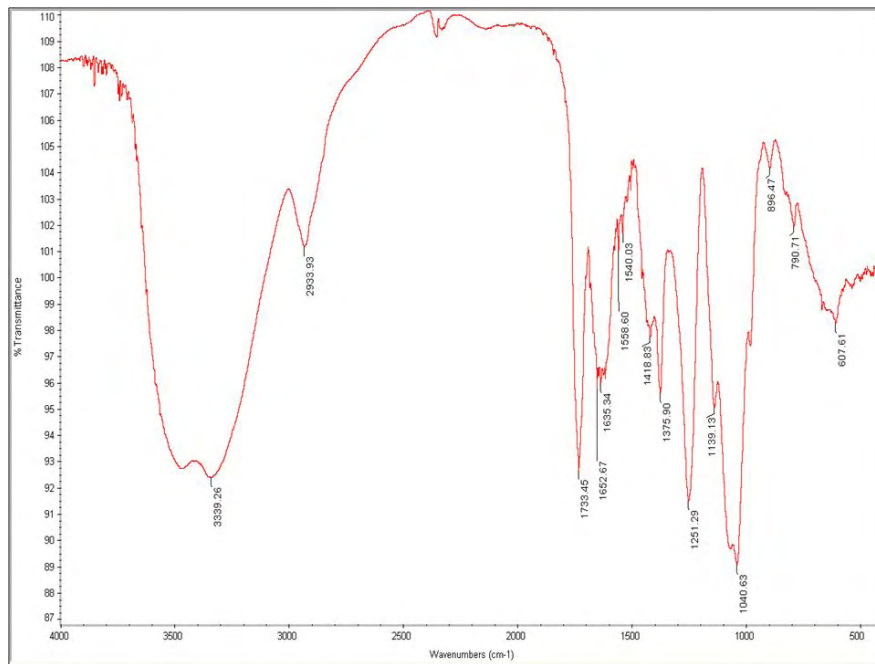


그림 65. Sugars composition of treated heat and acidic-hydrolysis bioconversion product by polysaccharide fraction .

- 바이오컨버전산물의 다당체의 구성당 분석에서 mannose, glucose, xylose와 함께 galactose, fucose 등이 검출되었으며, 구성당의 비를 알아보기 위해 chromatogram상의 각 당의 peak 면적을 구하여 구성당의 비율을 구한 결과 mannose : glucose : xylose = 61.24 : 21.17 : 13.11로 나타났으며, galactose와 fucose가 각각 2.5%, 1.98%로 나타났다. 이것은 목이버섯 다당이 β-1,3(4)-mannan을 기본구조로 하여 xylose와 glucuronic acid를 포함하는 잔기로 구성되어 있다는 보고와 잘 일치한다.

마. 바이오컨버전산물의 면역활성 다당체 정제분말의 FT-IR 및 ¹H NMR 측정을 통한 구조 특이성 확인

- 바이오컨버전산물의 다당체분획분말의 구조 특이성 확인을 위해 FT-IR 및 ¹H NMR 분석을 수행하였다. 강원대학교 공실관에 의뢰하여 분석을 수행하였다.
- 분석기기는 FT-IR(FT-3000 MX, BIO-RAD), Resolution은 4cm⁻¹, Scan range는 400~4000cm⁻¹, KBr 방법으로 측정하였으며, ¹H NMR 측정은 실온에서 Bruker Model Avance 600 (Germany) spectrometer를 사용하여 측정하였다.



Index	Match	Compound Name	Library Name
1	310	Poly(vinyl alcohol), 75% hydrolyzed (nom mw 3,000)	Sprouse Polymers by Transmission
2	2491	Poly(vinyl alcohol), 75% hydrolyzed, m.w. 2.1	Aldrich Linked IR
3	309	Poly(vinyl alcohol), 75% hydrolyzed (nom mw 3,000)	Sprouse Polymers by Transmission
4	2492	Poly(vinyl alcohol), 75% hydrolyzed, m.w. 3.1	Aldrich Linked IR
5	235	Poly(vinyl alcohol-vinyl acetate) (52% vinyl ac)	Sprouse Polymers by Transmission
6	2486	Poly(vinyl alcohol), 88% hydrolyzed, m.w. 10	Aldrich Linked IR
7	18070	POLY(VINYL ALCOHOL), 75% HYDROLYZE	Aldrich FT-IR Collection Edition II
8	18071	POLY(VINYL ALCOHOL), 75% HYDROLYZE	Aldrich FT-IR Collection Edition II
9	599	UCAR Latex 383	Coatings Technology
10	269	Poly(vinyl acetate ethylene) 9.1	Hummel Polymer and Additives

그림 66. IR of bioconversion product by polysaccharide fraction.

- 그림 66에서 나타난 바와 같이, 전반적으로 IR 흡수 특성은 β -glucan, β -mannan 등과 같은 전형적인 다당류의 특성과 일치하는 것을 알 수 있었다. 당 고리의 전형적인 O-H의 stretching 흡수피크가 수소결합에 의해 이동되어 나타나는 당류의 특이적인 $3300 \sim 3400\text{cm}^{-1}$ 에서의 강한 흡수, C-H stretching 진동이 일어나는 2900cm^{-1} 부근에서의 흡수가 관찰되었고, carboxyl 기가 염의 상태로 존재할 때 관찰되는 1630cm^{-1} 에서의 흡수를 나타내었다. Carboxyl기 유래의 1730cm^{-1} 부근에서의 흡수와 C-H와 C-O bending 진동이 일어나는 $1000\sim 1100\text{cm}^{-1}$ 부근에서의 강한 흡수도 관찰되었다.
- 그림 67에는 ^1H NMR 스펙트럼을 나타내었다. 바이오컨버전산물의 다당체 스펙트럼에서 아세틸그룹의 특성적 signal(2ppm 내외)을 나타내었다. 이는 알로에 베라겔 제조에서 동질성과 품질을 평가하는 필수도구로서 사용되고 있는 acetyl기에 의한 특성적 signal과 잘 일치하는 것으로 사료되어, mannose가 주성분인 본 과제의 바이오컨버전산물도 acetyl기를 가지는 것으로 사료된다. 알로에의 glucomannan은 2, 3 혹은 6위치에서 부분적으로 아세틸화된 β -1,4 결합 mannan으로 알려져 있는데, 목이버섯의 바이오컨버전산물도 알로에의 acetylated glucomannan과 유사한 특성을 보이는 것으로 나타났다. 따라서 목이버섯 바이오컨버전산물 유래의 면역활성 다당체는 알로에 다당체와 유사하게 β -1,4-mannan의 기본 구조를 갖는 acetylated glucomannan인 것으로 해석할 수 있다.

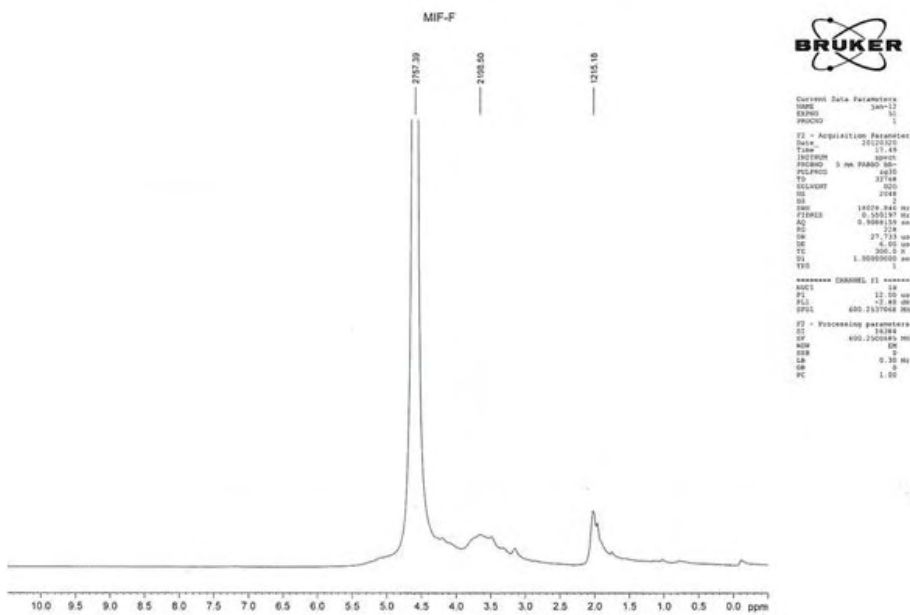


그림 67. NMR Chromatogram of bioconversion product by polysaccharide fraction.

9) 목이버섯 자실체 바이오컨버전산물의 면역활성 역가 비교 평가

가. 천연물 유래 발효 소재

- 본 연구를 통해 비교 검토하고자 하는 시료는 표 16과 같으며, 본 과제의 바이오컨버전산물과 (주)에스티알바이오텍에서 기 보유하고 있는 즉, 바이오컨버전 발효공정을 통해 면역활성을 향상시킨 다른 소재와 비교 평가하였다.
- 시료는 목이버섯 자실체 바이오컨버전산물, 표고복합발효분말, 상황균사체발효분말로 3종이며, 각각의 시료에서 Total분말, 수용성분획분말, EtOH침전분말을 제조하여 총 9종의 시료를 이용하여 시험에 사용하였다.

시료명	분 획
목이버섯자실체바이오컨버전산물 (AAFP)	Total분말(Total)
	수용성분획분말(H ₂ O)
	에탄올침전분말(EtOH)
표고복합발효분말 (LEFP)	Total분말(Total)
	수용성분획분말(H ₂ O)
	에탄올침전분말(EtOH)
상황균사체발효분말 (PLFP)	Total분말(Total)
	수용성분획분말(H ₂ O)
	에탄올침전분말(EtOH)

표 16. 천연물 유래 추출 및 발효 소재

나. 천연물 유래 발효 소재의 면역증진능 검증 실험

(1) in vitro 상에서 대식세포의 lysosomal enzyme 활성 측정 실험

- 마우스에 3% Thiglycollate 1ml 을 복강주사한 후, 72시간후에 경추탈골 방법으로 마우스를 희생시킴. RPMI-1640 배지 3 ml을 마우스의 복강에 주입한 후 잘 세척하여 회수하였다.
- 회수액을 원심분리(1,000 rpm, 5분)한 후 RPMI-1640 5ml로 2번 세척 한 후, 96well에 1×10^5 cells/well이 되도록 분주하고 전체 배양액은 180ul로 조절함.
- 37°C에서 2시간 동안 5%, CO₂ incubator에서 배양한 후, 시료를 처리하며, 시료는 농도별로 처리하되 20ul 처리하여 전체 배양액이 200ul가 되도록 하고, 양성대조군에는 LPS 10ug/ml 을 20ul 처리하여 최종농도가 1ug/ml 되게 하였다.
- 24시간 배양 후, 배양된 세포의 상층액을 제거하고, 0.1% Triton X-100(25 μ l), 10mM

p-Nitrophenyl phosphate 150 μ l, 0.1M citrate buffer(pH 6.0) 50 μ l를 순서대로 첨가한 후, 37°C, 5% CO₂incubator에서 1시간 반응시키고, 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) in vitro 상에서 비장세포의 증식능 측정 실험

- 마우스의 비장을 적출한 후, 70 μ m strainer을 통과시켜 비장조직을 분쇄하여 비장세포를 분리하였다. RPMI 1640 배지로 세 번 세척한 후, 96well에 5×10^5 cells/well이 되도록 분주하고 전체 배양액은 180 μ l로 조절하였다.
- 37°C에서 2시간 동안 5%, CO₂incubator에서 배양한 후, 샘플을 처리함. 샘플은 농도별로 처리하되 20 μ l 처리하여 전체 배양액이 200 μ l가 되도록 하며, 양성대조군에는 LPS 1 μ g/ml 또는 ConA 1 μ g/ml을 20 μ l 처리하여 최종농도가 1 μ g/ml 되게 하고, 72시간 배양함. 배양 상층액을 제거하고, RPMI-1640 180 μ l, MTS sol'n 20 μ l를 첨가한 후, 4시간 후에 492nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) in vivo 상에서 면역세포 활성능 측정 실험

- C57BL/6 mouse(4주령, 웅성)는 1주일간의 적응기간을 거친 후, 각 군별로 분류하여 4주간 1일 1회 경구투여 방법을 통해 선별된 시료를 공급받았다. 시험 종료 후, 실험동물을 희생시켜 대식세포를 분리하여 상기에서 언급한 대식세포의 lysosomal enzyme 활성을 측정하였다.

다. 천연물 유래 발효 소재의 면역증진능 검증 결과

- 목이버섯 자실체 바이오컨버전산물 외에 (주)에스티알바이오텍에서 기보유하고 있는 천연물 유래 발효 소재인 표고복합발효분말, 상황균사체발효분말과 각 소재의 분획 총 9종의 in vitro 모델에서의 면역세포 증진능을 검증하여, 우수한 기능성을 보유한 분획을 평가하고, 평가 선별된 각 시료의 분획을 이용하여 사이토카인 분비량을 측정하였다.

(1) in vitro 상에서 천연물 유래 발효 소재의 분획별 대식세포의 lysosomal enzyme 활성 측정 결과

- 대식세포는 생체내 이물질 등이 침입하였을 때 항원을 제거하기 위해 즉시 반응을 할 수 있는 선천성 면역세포로서, 식균작용을 통해 이물질을 제거하며, T세포와 같은 후천적 면역계가 항원을 인식할 수 있도록 전달해 주는 역할을 한다. 이와 같은 기능을 담당하고 있는 대식세포에 목이버섯 유래 추출소재가 미치는 영향을 알아보려고 하였다.
- 비교 평가를 위하여 목이버섯자실체바이오컨버전산물 외에 표고복합발효분말, 상황균사체발효분말의 Total분말, 수용성분획분말, 에탄올침전분말을 이용하여 mouse 대식세포의 lysosomal enzyme 활성을 측정한 결과를 그림 68에 나타내었다.

- 목이버섯자실체 바이오컨버전산물에서 수용성분획분말 및 에탄올침전분말은 모든 농도에서 대조군보다 2배 이상 높은 활성을 나타내고 있으며, Total분말도 10, 100ug/ml 농도에서 대조군 대비 2배 이상 높은 활성을 나타내었고, 1ug/ml의 농도에서는 낮아져 농도 의존적 효과를 나타내고 있다.
- 표고복합발효분말은 10, 100ug/ml 농도에서 모든 분획 분말이 대조군 대비 약 2배의 높은 활성을 나타내었으며, 고농도에서 모든 분말이 유사한 활성을 나타내었다.
- 상황균사체발효분말은 Total 분말, 수용성분획분말 및 에탄올침전분말의 모든 농도에서 대조군 대비 2배의 높은 활성을 나타내고 있다.

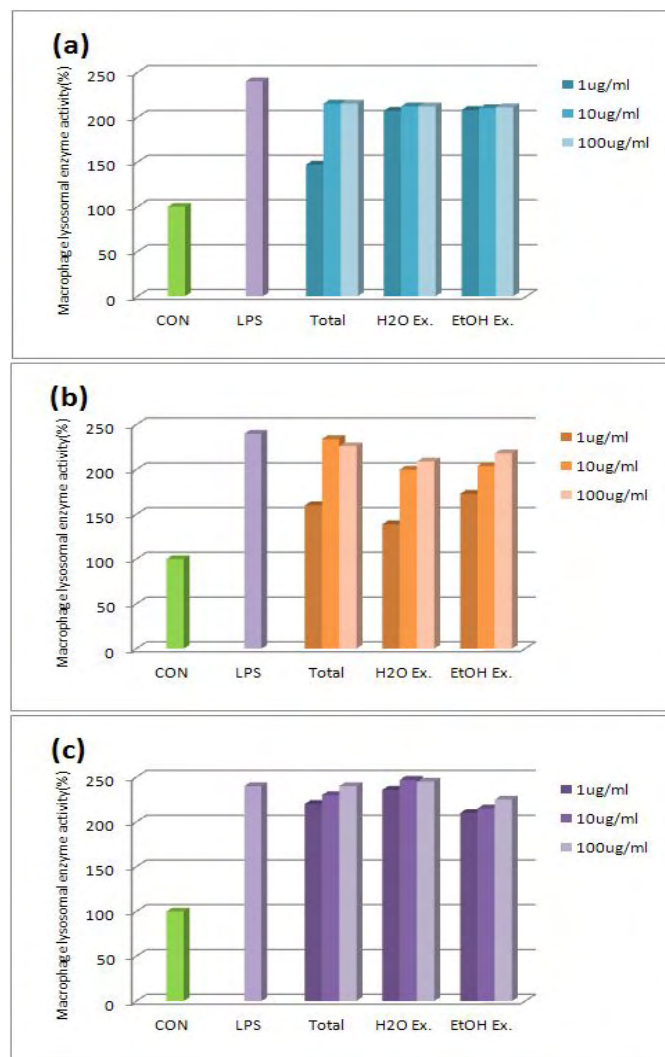


그림 68. 천연물 유래 발효 소재의 분획별 대식세포 lysosomal enzyme 활성;
 (a) 목이버섯자실체바이오컨버전산물, (b) 표고복합발효분말, (c) 상황균사체발효분말

(2) in vitro 상에서 천연물 유래 발효 소재의 분획별 비장세포의 증식능 측정 결과

- 비장은 주로 T세포, B세포, 대식세포 등으로 구성되어 있는 주요 면역기관으로, 이들 세포들은 세포성 면역반응과 체액성 면역반응을 통해 외부 항원을 제거해 주는 역할을 하며, 모든 면역반응은 면역세포의 증식으로부터 시작된다. 따라서, 본 연구에서는 생체 내 주요 면역기관인 비장으로부터 세포를 분리하여 각 시료가 비장세포 증식에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.
- 시험 시료로서 목이버섯자실체바이오킨버전산물, 표고복합발효분말, 상황균사체발효분말의 Total분말, 수용성분획분말, 에탄올침전분말을, 양성대조군으로 LPS(B세포 자극물질)를 이용하여 비장세포의 증식능을 측정한 결과(그림 69), 목이버섯자실체바이오킨버전산물에서 Total분말은 모든 농도에서 대조군 대비 70% 이상의 증가 효과를 나타내었으며, 수용성분획분말은 1, 10ug/ml 농도에서 각각 대조군 대비 64%, 73%, 100ug/ml 농도에서 약 50%의 증가 효과를 나타내었다. 그리고, 에탄올침전분말은 37% 이하의 활성을 나타내어 가장 낮은 효과를 보였다.
- 표고복합발효분말에서 Total분말은 대조군 대비 76%~97%, 수용성분획분말은 52~77%, 에탄올침전분말은 27~31%의 활성을 나타내었다.
- 상황균사체발효분말에서 Total분말은 대조군 대비 82~116%, 수용성분획분말은 82~95%, 에탄올침전분말은 59~88% 의 활성을 나타내었다.
- 결국, 세가지 시료에서 Total분말이 가장 높은 활성을 나타내었으며, 수용성분획분말, 에탄올침전분말 순이었다.

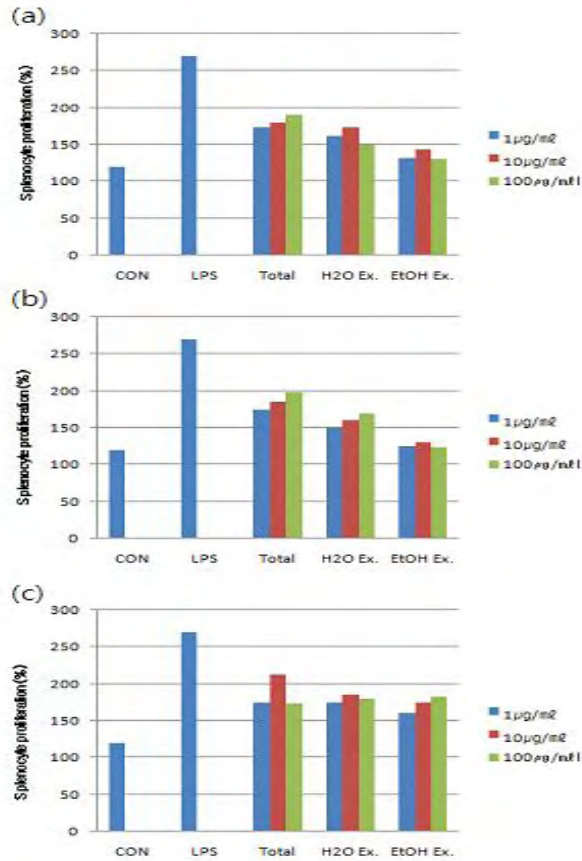


그림 69. 천연물 유래 발효 소재의 분획별 비장세포 증식능;

(a) 목이버섯자실체바이오컨버전산물, (b) 표고복합발효분말, (c) 상황균사체발효분말

- 상기 실험에서 각 시료의 면역세포 증진능을 종합하여 볼 때, 대식세포 활성화에서는 시료에 따라 다른 경향을 나타내었으나, 분획에 따른 큰 차이는 없었으며, 대조군 대비 높은 활성을 나타내었다.
- 비장세포 증식능에서는 Total분말이 가장 높은 활성을 나타내었으며, 수용성분획분말, 에탄올침전분말 순으로 나타났다.
- 본 연구의 최종목표는 목이버섯 유래 발효 소재를 이용한 기능성 소재 및 식품 개발로서, 음료 제품의 경우에, 특성상 수용성분획성분이 소재 개발 시 용이하나, 각 시료의 수용성분획분말은 Total분말과 비슷하거나, 다소 낮은 경향을 나타내었다.
- 대조군 대비 높은 활성을 나타내어 기능성 음료의 소재 개발에 있어서도 충분할 것으로 판단된다. 또한, Total분말 및 에탄올침전분말은 기능성 소재 개발시 이용 가능하다.

(3) in vivo 상에서 천연물 유래 발효 소재의 생체내 면역세포 활성화 측정 결과

- C57BL/6 mouse(4주령, 음성)를 10마리씩 총 6군으로 분류하여, 목이버섯자실체바이오컨버전산물, 표고복합발효분말의 수용성 분말을 5, 25mg/kg b.w. 농도로, 상황균사체발효분말의 수용성분말은 25mg/kg b.w. 농도로 1일 1회씩 총 4주간 경구투여 하였고, 대조군(CON)은 증류수를 1일 1회씩 경구투여하였음. 실험 종료 후, 마우스를 희생시켜, 대식세포 활성을 측정하였다.
- 대식세포의 lysosomal enzyme 활성 측정 결과(그림 70), 목이버섯자실체바이오컨버전산물의 수용성분말의 섭취는 대조군 대비 25, 30%(5, 25mg/kg b.w.)의 증가를 보였고, 표고복합발효분말의 수용성분말의 섭취는 대조군 대비 37, 9%(5, 25mg/kg b.w.)의 증가를 나타내어, 섭취농도가 증가할 때, 활성이 다소 감소하는 경향을 나타내었다.
- 상황균사체발효분말의 수용성분말의 섭취는 대조군 대비 26%의 활성증가를 나타내었다.
- 천연물 유래 다당체의 기능성 검증을 위한 in vivo 시험에서는 일반적으로 50mg/kg b.w.~250mg/kg b.w. 범위의 농도를 처리한다.
- 그러나 본 연구에서는 각 소재의 제품에의 적용을 감안하여 실험동물에게의 섭취농도를 낮게 설정하여 면역증진활성을 검증하였다.
- 검증 결과, 대조군 대비 25~37%의 활성증가를 나타내어 낮은 농도에서 면역증진능을 보유한 것을 확인하였다.

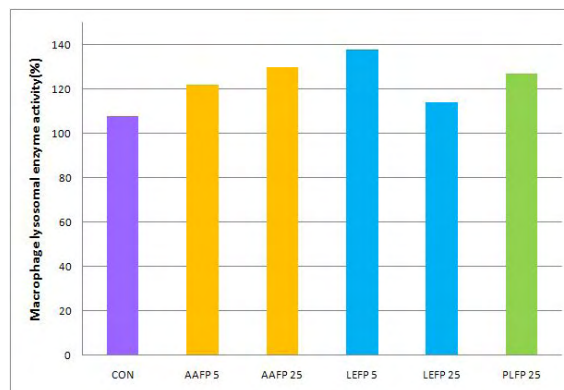


그림 70. 천연물 유래 발효 소재의 수용성분말의 대식세포 활성화 효과.
 목이버섯자실체 바이오컨버전산물(AAFP), 표고복합발효분말(LEFP),
 상황균사체발효분말(PLFP)

10) 목이버섯 바이오컨버전산물의 항암 및 면역증진 효능 검증(in vivo)

- 본 과제에서 개발한 목이버섯 바이오컨버전산물의 항암 및 면역증진 효능을 추가로 검증하기 위하여 『한림대학교 식의약품의 효능평가 및 기능성소재개발센터』에 의뢰하여 제3협동과제의 3차년도 연구개발 계획이었던 암세포를 이식시킨 복수암 동물모델에서의 수명연장 효과에 대한 평가를 수행하였다.

가. 암세포를 이식시킨 복수암 동물모델에서의 항암 효능 검증

(1) 바이오컨버전산물의 수명연장 효과

(㉠) 시험물질

- 시험물질은 목이버섯 바이오컨버전산물(Total분말)로 시료명을 [AAF-0065]로 명명하였다. 시험물질은 증류수에 녹여 경구투여와 복강 내 투여 하였다. 양성대조물질인 정관장 홍삼엑기스는 증류수에 녹여 경구투여하였다.

(㉡) 세포 배양

- Sarcoma-180 세포는 한국세포주은행 (서울, 한국)에서 구입하여 사용하였다. Sarcoma-180 세포는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/mL penicillin과 100 μ g/mL streptomycin을 첨가한 세포 배양액을 사용하여 37°C 습윤한 CO₂ 배양기 (5% CO₂, /95% air)에서 배양하였다. 세포가 배양 접시의 80% 정도 차면 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 세포의 단층을 씻어낸 후 세포를 떼어내고 배양액을 모아 원심분리하여 계대 배양하였고 배지는 2일마다 교환하였다.

(㉢) 실험동물 및 식이

- 특정병원체(specific pathogen free)가 없는 5주령, 스킷 ICR mouse를 (주)오리엔트바이오 (성남, 한국)에서 구입하여 사용하였다. 1주일간의 검역 및 적응과정을 거친 뒤 체중 감소 없는 건강한 동물을 선별하여 실험에 사용하였다. 실험동물은 온도 23 ± 3°C, 상대습도 50 ± 10%, 환기회수 10-15 회/시간, 조명시간 12시간(08:00 - 20:00), 조도 150 - 300 Lux로 설정된 사육환경에서 사육하였다. 1주간의 적응 기간 동안 실험동물은 실험동물용 고형사료 ((주) 카길애그리퓨리나, 군산, 한국)와 음수를 자유 섭취하도록 하였다.
- 1주간의 적응 기간을 거친 후 건강한 동물을 선별하여 난괴법에 의거하여 7개의 군으로 분류하였다. 정상대조군, 모든 실험군의 복강에 Sarcoma-180 세포 (1×10^6 cells/mouse)를 이식하여 복수암을 유발시키고 시험물질을 투여하지 않은 대조군, 홍삼엑기스 268mg/kg body weight/day 경구투여군, AAF-0065 1mg/kg body weight/day 경구투여군, AAF-0065 10mg/kg body weight/day 경구투여군, AAF-0065 100mg/kg body

weight/day 경구투여군, AAF-0065 10mg/kg body weight/day 복강 내 투여군으로 분류하여 실험을 진행하였다.

- 암세포를 주사하고 24시간 후부터 시험물질을 각 농도별로 증류수에 용해시켜 매일 1회 14일간 경구 또는 복강 내에 0.2ml씩 투여하였다. 대조군에는 같은 기간, 동량의 증류수를 투여하였으며, 시료 최종투여 후 30일까지 관찰하여 평균수명일수를 계산하고 다음 식으로 increase of life span (ILS)을 계산하여 수명연장 효과를 평가하였다.
- 본 연구에서의 모든 동물실험은 한림대학교 동물실험윤리위원회의 승인 하에 수행되었다 (Hallym 2011-86).

$$ILS = [(\text{실험군의 평균 수명} - \text{대조군의 평균 수명}) / \text{대조군의 평균 수명}] \times 100$$

(㉔) 통계처리

- 모든 분석 수치는 mean \pm SEM으로 나타내었다. 수집된 결과는 SAS 9.1 프로그램(SAS Institute, Cary, NC, USA)을 이용하여 통계 분석하였으며, 각 실험군들의 평균치간의 유의성은 $\alpha = 0.05$ 수준에서 analysis of various와 Duncan's multiple range test에 의해 분석하였다.

(㉕) In vivo 실험 결과 - 수명연장 효과 (Increase of life span, ILS)

- 수명연장 효과를 알아보기 위하여 정상대조군, 모든 실험군의 복강에 Sarcoma-180 세포를 이식하여 복수암을 유발시키고 시험물질을 투여하지 않은 대조군, 홍삼엑기스 268mg/kg body weight/day 경구투여군, AAF-0065 1mg/kg body weight/day 경구투여군, AAF-0065 10mg/kg body weight/day 경구투여군, AAF-0065 100mg/kg body weight/day 경구투여군, AAF-0065 10mg/kg body weight/day 복강 내 투여군으로 분류하여 실험을 진행하였다.
- 암세포를 주사하고 시험물질을 각 농도별로 매일 1회 14일간 경구 또는 복강 내에 투여하고 시료 최종투여 후 30일까지 관찰하여 수명연장 효과를 평가한 결과를 표 17, 18 및 그림 71에 나타내었으며, 실험동물의 상태를 그림 72에 나타내었고, 암이 유발된 부위를 그림 73에 나타내었다.
- 홍삼엑기스 268mg/kg body weight/day 경구투여군, AAF-0065 1mg/kg body weight/day 경구투여군, AAF-0065 10mg/kg body weight/day 복강 내 투여군이 각각 마우스의 수명을 연장시키는 효과가 있었다.
- 대조군의 평균생존일수는 10.7일이었으며, 홍삼엑기스 268mg/kg body weight/day 경구투여

한 실험군의 평균생존일수는 11.2일로 수명연장 효과가 4.7%로 나타났으며, AAF-0065 1mg/kg body weight/day 경구투여한 실험군의 평균생존일수는 12.7일로 수명연장 효과가 18.7%로 나타났다.

- AAF-0065 10mg/kg body weight/day 복강 내 투여한 실험군의 평균생존일수는 28.5일로 수명연장 효과가 166.4%로 탁월한 수명연장 효과가 있는 것으로 나타났다.

Sarcoma-1 80 cells	Treatment	투여방법	ILS (%)
-	-	경구투여	
+	-	경구투여	
+	홍삼엑기스 (268 mg/kg body weight/day)	경구투여	4.7
+	AAF-0065 (1 mg/kg body weight/day)	경구투여	18.7
+	AAF-0065 (10 mg/kg body weight/day)	복강투여	166.4

표 17. Increase of life span (ILS)

Control (n=10)	sarcoma 180 cells (n=10)	홍삼엑기스 (268mg/kg) (n=10)	AAF-0065 (1mg/kg) (n=10)	AAF-0065 (10mg/kg) (n=10)	AAF-0065 (100mg/kg) (n=8)	AAF-0065 (10mg/kg) (n=10)	Days
							0
							1
							2
							3
							4
							5
							6
	1						7
		1					8
	1	1					9
		2					10
	3	1					11
	1	1					12
	1	1					13
	2						14
	1						15
		2					16
		1					17
							18
							19
							20
							21
							22
							23
							24
							25
							26
							27
							28
							29
							30

표 18. Death number of experimental groups.

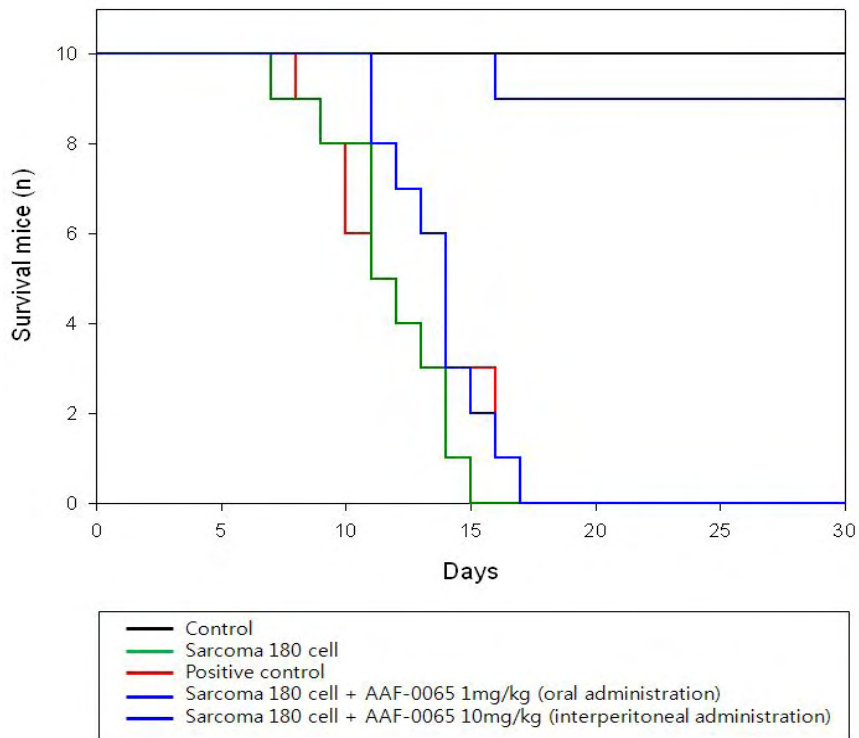


그림 71. Numbers of survival mice

[추가 견해]

- ① 시료 100mg 경구투여군은 시료투여기간 중에 2 마리가 사망하였습니다.
사실상 동물실험은 여러 영향을 미칠 수 있고 동물간의 개체 차이가 있다고 생각합니다.
그리고 시료의 점도가 너무 강해서 섭취 과정에 문제가 있지 않았을까 생각합니다.

- ② 시료 10mg 경구투여군에서 먼저 사망한 것 역시 동물간의 차이에 대한 영향이라 생각되고, 10mg 및 100mg 군의 경우 점도가 영향을 미쳤을 것이라 생각합니다. 점도가 강해서 섭취가 원활치 못했고 섭취가 어렵기 때문에 혹시라도 역류를 하게 된다면 기도로 넘어가게 되어서 사망에 더 큰 영향을 미칠 수 있었을 것이라 생각합니다.

- ③ 암세포를 찌르는 부위는 복강부분이고, 암이 유발되는 부위 역시 복강 전체 즉, 배 주위 (장, 간, 비장 주위)입니다.

- ④ 복강투여군에 대한 해부사진이 없는 것은 보통 이번에 사용한 Sarcoma 180 세포는 복수(복강)암 세포로 복강에 주입하면 복수가 차게 되는데 시료 투여기간 동안과 해부 전까지 복수도 차있지 않았고 해부 당시 암 덩어리를 발견하지 못하였습니다. 보통 암세포를 주입하고 그 세포들이 정착해서 자라는 기간이 적어도 일주일 이상은 걸릴 것으로 생각되는데 다른 경구투여군들을 보면 그 이후 복수가 차기 시작하는 것이 보였고 변화를 보였기 때문에 실험적으로 문제(암이 전혀 생기지 않은 것에 대해)가 있었다고 생각되지 않습니다. 암세포 주입 후 바로 시료를 투여했고 정상과 비슷하게 살아있는 것으로 보아 시료의 탁월한 효과로 판단됩니다.

그림 72. Photographs of comparison appearance for control, sarcoma 180 cell treated group and sample treated groups.

Control (A) vs Sarcoma 180 cell (B)

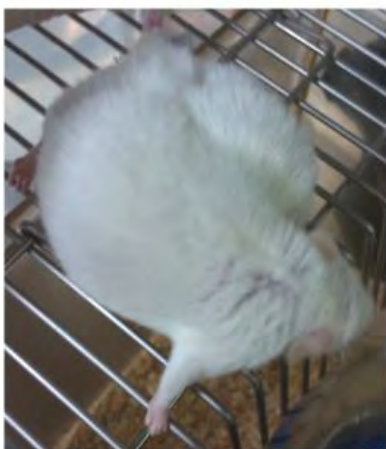


Control (A)

Sarcoma 180 cell (B)



Sarcoma 180 cell + 홍삼 268 mg/kg 양성대조군 (C)



Sarcoma 180 cell + 1 mg/kg (D) - 경구투여



Sarcoma 180 cell + 10 mg/kg (E) - 경구투여



Sarcoma 180 cell + 100 mg/kg (F) - 경구투여



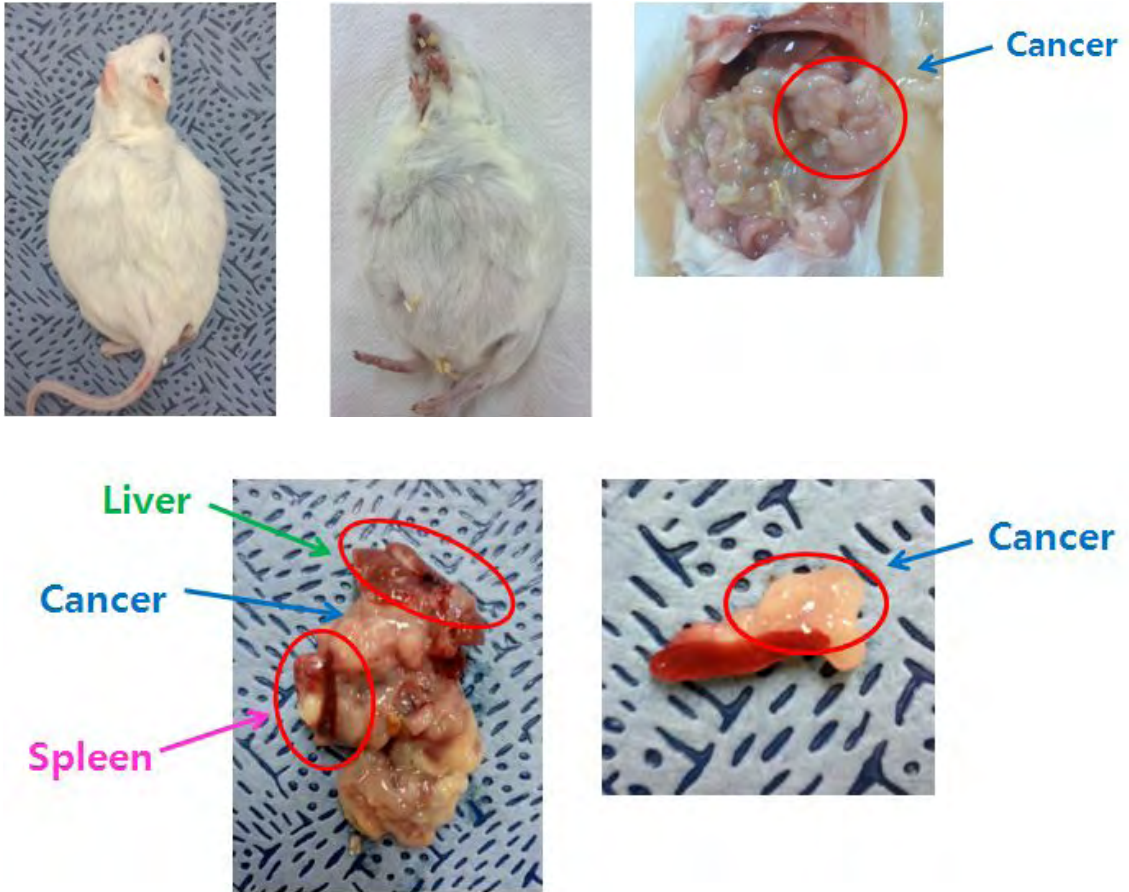
Sarcoma 180 cell + 10 mg/kg (G) - 복강투여



Control (A) vs Sarcoma 180 cell + 10 mg/kg (G) - 복강투여



그림 73. Photographs of intra-peritoneal cavity of sarcoma 180 cell treated group.



나. 정상 동물모델에서의 면역학적 지표 분석

(1) 바이오컨버전산물의 면역학적 지표 분석

- 비장세포와 복강 내 대식세포 증식능을 위한 실험을 위하여 정상대조군과 AAF-0065 10 mg/kg body weight/day 경구투여군 2개의 군으로 분리하여 매일 1회 14일간 0.2 ml씩 경구투여하였다. 14일간의 시료 최종 투여 후 비장세포와 복강 내 대식세포를 분리하여 정상대조군과 AAF-0065 10 mg/kg body weight/day 경구투여군에 concanavalin A 또는 lipopolysaccharide를 처리하지 않은 control 군(무처리군), concanavalin A 또는 lipopolysaccharide를 처리한 군으로 나누어 증식능 및 cytokine (IL-1 β , IL-6)을 측정하였다.

(2) 비장 림프구 분리 및 증식능 측정 실험

- 비장 림프구 분리방법은 쥐에서 비장을 분리하여 petridish에 40 mm stainless steel mesh (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)을 얹고 그 위에 장기를 놓은 다음 e-tube 뚜껑을 이용하여 분쇄하고 PBS 5 ml을 넣어 단일세포용액을 얻었다. 분쇄된 단일세포용액을 15 ml tube에 옮겨 4°C에서 1400 rpm으로 5분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액은 버리고 1 ml의 RBC lysis buffer (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) 첨가 후 ice 상에서 5분간 incubation하였다. Incubation 후 위와 같은 조건으로 원심분리 하였다. 상층액은 버리고 남아있는 pellet에 5 ml의 PBS를 넣어 1회 wash하였다.
- Wash 후 4°C에서 1400 rpm으로 5분 동안 원심분리 후 10% FBS, 100 units/mL penicillin 과 100 μ g/mL streptomycin이 첨가된 RPMI 1640 배양액 (Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA)을 3 ml 넣어주었다. Suspension한 배양액을 polystyrene round bottom tube with cell strainer cap에 통과시켜 통과한 배양액을 다음 실험에 사용하였다.
- 비장 림프구의 증식능은 CellTiter 96[®] AQueous ONE Solution Assay Kit (Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 측정하였다. 비장에서 분리한 림프구를 1×10^5 cells/well 로 96 well plate에 분주하였고, complete RPMI 1640 배양액 혹은 2.5 mg/mL concanavalin A (Con A, Sigma-Aldrich, Inc.)를 첨가한 complete RPMI 1640 배양액을 첨가하여 48시간 동안 37°C 습윤한 CO₂ 배양기 (5% CO₂, /95% air)에서 배양하였다.
- 48시간 배양 후 각 well에 ONE solution 용액을 20 μ l씩 첨가하여 2시간 동안 추가배양한 후 SpectraMaxM2 Microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여 림프구의 증식능을 측정하였다.

(나) 복강 내 대식세포 분리 및 증식능 측정 실험

- 복강 내 대식세포 분리방법은 5 ml syringe에 기포가 들어가지 않게 3ml thioglycolate(BD Bioscience®, Sparks, MD, USA) 용액을 mouse 복강에 주입하였다. 주입한 날을 0 day로 하여 4 day 때 peritoneal macrophage를 회수하였다.
- Minimun Essential Medium(MEM, Gibco®, Grand Island, NY, USA) 배양액을 1ml을 복강에 주입하고 복강을 마사지 해주었다. 외피를 잘라내고 MEM 배양액 7ml을 복강에 주입하였다. 8 ml을 넣었으므로 주입과 동시에 비슷한 양을 회수하여 1 ml tube에 담았다. 회수한 배양액은 1500rpm에서 5분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 버리고 MEM에 10% FBS가 첨가된 배양액으로 2회 wash한 후 다음 실험에 사용하였다.
- 복강 내 대식세포의 증식능은 CellTiter 96® AQueous ONE Solution Assay Kit (Promega)을 사용하여 측정하였다. 복강에서 분리한 대식세포를 3×10^4 cells/well로 96 well plate에 분주하였고, MEM 배양액 혹은 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ lipopolysaccharides (LPS, Sigma-Aldrich, Inc.)를 첨가한 MEM 배양액을 첨가하여 48시간 동안 37°C 습윤한 CO_2 배양기 (5% CO_2 , /95% air)에서 배양하였다. 48시간 배양 후 각 well에 ONE solution 용액을 20ul씩 첨가하여 2시간 동안 추가배양한 후 SpectraMaxM2 Microplate reader(Molecular Devices)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여 림프구의 증식능을 측정하였다.

(다) 복강 내 대식세포가 생성 분비한 cytokine(IL-1 β , IL-6) 측정 실험

- 복강 내 대식세포가 생성 분비한 IL-1 β 와 IL-6 측정은 IL-1 β , IL-6 ELISA Kit(eBioscience, San Diego, CA, USA)을 사용하여 제조사에서 제시한 방법에 의하여 측정하였다. 복강에서 분리한 대식세포를 1×10^5 cells/well로 48 well plate에 분주하였고, MEM 배양액 혹은 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ lipopolysaccharides(LPS, Sigma-Aldrich, Inc.)를 첨가한 MEM 배양액을 첨가하여 24시간 동안 37°C 습윤한 CO_2 배양기(5% CO_2 , /95% air)에서 배양하였다. 24시간 배양 후 세포배양액을 회수하여 ELISA Kit을 사용하여 측정하였다.

(라) 통계처리

- 모든 분석 수치는 mean \pm SEM으로 나타내었다. 수집된 결과는 SAS 9.1 프로그램(SAS Institute, Cary, NC, USA)을 이용하여 통계 분석하였으며, 각 실험군들의 평균치간의 유의성은 $\alpha = 0.05$ 수준에서 analysis of various와 Duncan's multiple range test에 의해 분석하였다.

(마) 실험결과 - 비장세포 증식능

- 비장에서 분리한 림프구를 이용하여 증식능을 측정한 결과를 표 19에 나타내었다. 정상 대조군과 비교시 AAF-0065 10mg/kg body weight/day 경구투여한 군에서 증식에 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다. Con A로 유도한 경우 Con A로 유도하지 않은 경우에 비해 증

식능이 올라가는 경향을 보였고 AAF-0065 10mg/kg body weight/day 경구투여한 군에서 ConA로 유도한 경우 더 증가하는 경향을 나타냈다.

Group	AAF-0065 (10 mg/kg body weight/day)	Concanavalin A (2.5 mg/mL)	Proliferation (Absorbance at 490 nm)
A	-	-	0.436 ± 0.012
B	+	-	0.428 ± 0.024
C	-	+	0.447 ± 0.025
D	+	+	0.478 ± 0.014

Values are expressed as mean ± SEM. * $p < 0.05$ compared with control group (A). † $p < 0.05$ compared with control group (A).

표 19. Proliferation of splenocytes for various groups.

(배) 실험결과 - 복강 내 대식세포 증식능

- 복강에서 분리한 대식세포의 배양액을 이용하여 증식능을 측정한 결과를 표 20에 나타내었다. 정상 대조군에 비해 AAF-0065 10mg/kg body weight/day 경구투여한 군에서 복강 대식세포의 증식능이 증가하는 경향을 보였다.
- 정상대조군에서 복강 대식세포에 LPS를 처리한 경우 LPS를 처리하지 않은 경우에 비해 증식능이 증가하는 경향을 보였고, AAF-0065 10mg/kg body weight/day 경구투여한 군에서 LPS를 처리한 경우 더 증가하는 경향을 나타냈다(표 20).

Group	AAF-0065 (10 mg/kg body weight/day)	Lipopolysaccharide s (1 µg/mL)	Proliferation (Absorbance at 490 nm)
A	-	-	0.885 ± 0.092
B	+	-	1.033 ± 0.085
C	-	+	1.067 ± 0.073
D	+	+	1.137 ± 0.098

Values are expressed as mean ± SEM. * $p < 0.05$ compared with control group (A). † $p < 0.05$ compared with control group (A).

표 20. Proliferation of mouse peritoneal macrophages.

(사) 실험 결과 - 복강 내 대식세포가 생성 분비한 cytokine(IL-1 β , IL-6) 측정 실험

- 복강에서 분리한 대식세포의 배양액을 이용하여 대식세포가 생성 분비한 IL-1 β , IL-6를 측정
한 결과를 표 21, 22에 나타내었다.
- 정상대조군에 비해 AAF-0065 10mg/kg body weight/day 경구투여한 군에서 IL-1 β 양이
현저히 증가하였다. 정상대조군에서 대식세포에 LPS를 처리한 경우 LPS를 처리하지 않은
경우에 비해 IL-1 β 양이 대폭 현저히 증가하였다.
- AAF-0065 10mg/kg body weight/day 경구투여한 군에서 대식세포에 LPS를 처리한 경우
LSP를 처리하지 않은 경우에 비해 IL-1 β 양이 현저히 증가하였으나, 정상대조군의 대식세
포에 LPS를 처리한 경우에 비해서는 유의적으로 감소한 경향을 나타냈다(표 21).
- IL-6 양 역시 정상대조군에 비해 AAF-0065 10mg/kg body weight/day 경구투여한 군에
서 현저히 증가하였다. 정상대조군의 대식세포에 LPS를 처리한 경우 처리하지 않은 경우에
비해 양이 대폭 현저히 증가하였다.
- AAF-0065 10mg/kg body weight/day 경구투여한 군에서 대식세포에 LPS를 처리한 경우
LPS를 처리하지 않은 경우에 비해 IL-6 양이 대폭 상승하였으며, 정상대조군의 대식세포에
LPS를 처리한 경우에 비해서는 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았
다(표 22).

Group	AAF-0065 (10 mg/kg body weight/day)	Lipopolysaccharides (1 μ g/mL)	IL-1 β (pg/mL)
A	-	-	5.52 \pm 0.25
B	+	-	127.18 \pm 7.04 ***
C	-	+	281.13 \pm 49.53 +++
D	+	+	239.77 \pm 24.86

Values are expressed as mean \pm SEM

*** $p < 0.001$ compared with control group. +++ $p < 0.001$ compared with control group.

표 21. 복강 대식세포의 cytokine 분비능 측정(IL-1 β)

Group	AAF-0065 (10 mg/kg body weight/day)	Lipopolysaccharides (1 µg/mL)	IL-6 (pg/mL)
A	-	-	3.03 ± 0.51
B	+	-	1197.83 ± 392.93 ***
C	-	+	6667.33 ± 785.80 ***
D	+	+	6333.70 ± 559.09

Values are expressed as mean ± SEM

*** $p < 0.001$ compared with control group. *** $p < 0.001$ compared with control group.

표 22. 복강 대식세포의 cytokine 분비능 측정 (IL-6)

제 4절 협동과제 3 : 목이버섯 추출물의 면역활성 검색 및 유효성분의 시제품화

1) 목이버섯 추출물의 활성 분석

- 본 실험에 사용한 목이버섯 추출물은 협동과제 연구기관인 (주)STR 바이오텍에서 제공받았음.
- 목이버섯 추출물의 유효성분은 생쥐 대식세포에 처리하여 생성되는 Nitrite 양을 비교분석한 결과(그림 1)를 참고로 하였음.

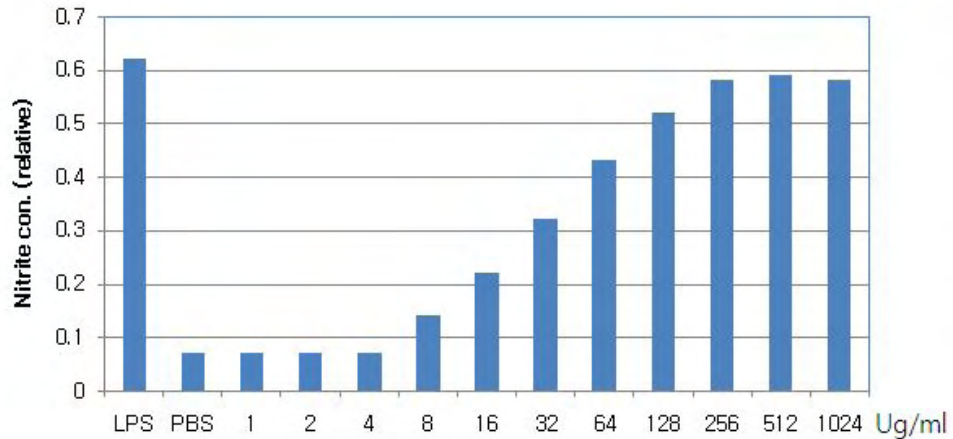


그림 1. 목이버섯 추출물이 대식세포의 nitrite 생성에 미치는 영향

- 목이버섯 추출물이 대식세포의 nitrite 생성에 미치는 농도는 약 256ug/ml 이상에서 LPS와 유사한 활성을 나타내었음. 따라서 목이버섯 추출물은 256ug/ml 농도에서 과립구 세포계인 대식세포의 활성화 기능이 최고치에 달했음을 보여주고 있음.
- 동결건조 상태로 제공받은 목이버섯 추출물을 500mg/ml (w/v)로 PBS를 첨가하여 상온에서 30분간 교반기에서 용해시킨 후, 3,000rpm으로 30분간 원심분리하고 상층액을 취하여 0.22 um filter로 여과 멸균하였음. 멸균된 목이버섯 추출물은 소분하여 -20℃에 보관하고 실험에 사용하였음.
- 결과: 목이버섯 추출물(256ug/ml)에 포함된 유효성분이 대식세포주 RAW264.7의 활성화 대조군인 LPS와 동등한 활성이 있음을 확인함.

2) 목이버섯 추출물이 T세포 증식 및 활성화에 미치는 영향

가. 목이버섯 추출물이 T세포 증식에 미치는 영향

- 중앙혈액원으로부터 공급받은 말초혈액에 동량의 PBS를 첨가하여 잘 섞어준 후, 20ml Ficoll-paque plus (GE healthcare)가 첨가된 50ml tube에 혈액 30ml을 Ficoll 층이 유지되도록 첨가하고 2700rpm에서 30분간 원심분리하여 말초혈액 단핵구 세포층을 분리하였음. 분리된 단핵구층을 PBS로 3회 세척 후, CD3 항체(BD Sciences)를 이용하여 제조사에서 제공하는 방법에 따라 T세포를 분리하였음.
- 분리된 T세포를 20% FBS가 첨가된 α -MEM에 부유하여 24 well plate에 분주하고 목이버섯 추출물을 0 ~ 500ug/ml 농도로 처리하고 4일간 배양하여 생존 세포를 계수하여 세포의 증식률을 분석하였으나, T세포의 증식에는 영향이 없었음 (그림 2).
- 그림 2의 결과에서 사람 말초혈액 T세포를 배양액에서 4일간 배양한 세포보다 IL-15 (20 ng/ml 혹은 10ng/ml)를 처리한 실험군에서 T세포 증식이 약 1.45배 증가하였으나, 10 ng/ml IL-15에 목이버섯 추출물을 500 ug/ml까지 처리하였을 때는 T세포 증식은 목이버섯 추출물 농도에 따라 더 이상 증가하지 않았음.
- 또한 목이버섯을 500ug/ml까지 단독으로 처리한 실험군에서 T세포는 대조군에 비하여 감소되는 결과를 나타내었음. 즉 목이버섯 추출물을 IL-15와 병용 처리하였을 때 T세포 증식에는 영향이 없었으나, 목이버섯 추출물 단독은 T세포의 증식을 억제하는 결과를 나타냄.

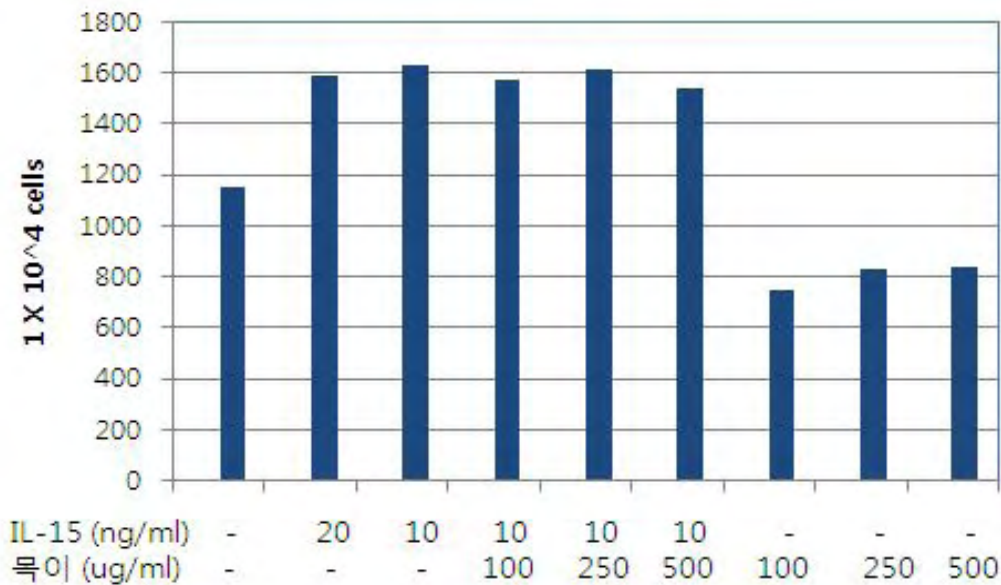


그림 2. 목이버섯 추출물이 사람 말초혈액 T세포 증식에 미치는 영향
- 3회 수행한 결과들의 대표적 결과

나. 목이버섯 추출물이 말초혈액 T세포의 표현형에 미치는 영향

- 목이버섯 추출물이 사람 말초혈액 T세포 증식에 미치는 영향을 분석한 그림 2의 결과를 세포 표현형 분석 결과를 표 1에 나타냄. 중앙혈액원으로부터 공급받은 혈액에서 분리한 T세포의 비중은 각 개인간 편차를 보이고 있었으며, T세포의 sub population에도 개인간 편차를 나타내었음.

배양	배양 전	배양 4일 (%)								
		0	20	10	10	10	10	0	0	0
IL-15 (ng/ml)	0	0	20	10	10	10	10	0	0	0
목이 (ug/ml)	0	0-	0	0	100	250	500	100	250	500
CD3+ CD4+	46.2	50.4	41.4	37.6	39.5	39.8	40.4	40.4	42.7	39.7
CD3+ CD8+	34.8	28.8	29.9	28.2	29.5	28.4	27.2	29.7	27.8	28.5
CD14+	0.5	0.4	1.1	1.5	1.1	1.5	1.4	0.2	0.5	0.5
CD56+	3.3	5.8	6.5	4.8	5.2	4.1	3.8	2.9	1.7	1.9

표 1. 목이버섯 추출물이 사람 말초혈액 T세포의 표현형에 미치는 영향 분석

- 사람 말초혈액 T세포는 배양배지에서 배양 4일 후, CD4 T세포는 46.2%에서 50.4%로 약간 증가한 반면, CD8 T세포 (CTL; Cytotoxic T lymphocytes)는 34.8%에서 28.8%로 감소되었음.
- CD8 T세포는 IL-15나 목이버섯에 의한 영향은 없었으나, CD4 T세포는 IL-15에 의한 감소 효능을 목이버섯 추출물이 증가시키는 반면, 목이버섯 추출물을 단독으로 처리하였을 때는 목이버섯 추출물 농도에 따라 감소되는 효능이 있는 것으로 나타났으나, 그 효능은 약 10% 미만의 수준이었음.

다. 목이버섯 추출물이 말초혈액 T세포의 활성화에 미치는 영향

- 목이버섯 추출물이 사람 말초혈액 T세포 활성화에 미치는 영향을 평가하기 위하여 T세포 증식 평가와 동일한 방법으로 분리하여 배양한 T세포 배양액으로 CD4 T cell인 helper T (Th)세포의 대표적인 cytokine에 대한 ELISA를 수행하여 목이버섯 추출물 단독 혹은 IL-15와 동시 처리에 의한 영향을 평가하였으나, IL-4와 기타 cytokine에는 영향이 없었음. 그러나 인터페론 감마 (IFN- γ)는 IL-15에 의하여 증가되었으나, 목이버섯 추출물에 의한 영향은 나타나지 않음(그림 3).

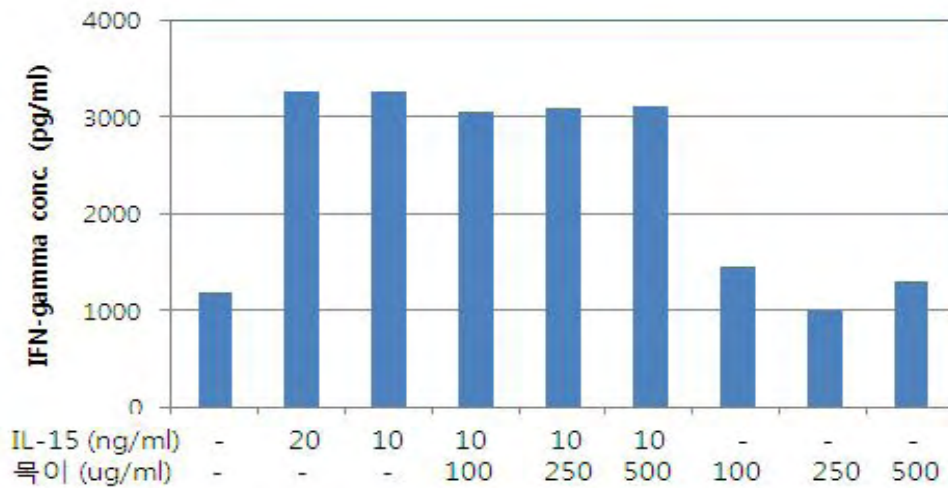


그림 3. 목이버섯 추출물이 T세포의 활성화에 미치는 영향

라. 목이버섯 추출물이 CD14⁺ 세포에 의한 T세포의 증식 및 활성화에 미치는 영향

- 사람 말초혈액으로부터 CD3 T세포의 분리시에 CD14⁺ 단핵구세포/수지상세포 오염 (0.5% 미만에서 3.6% 일 때)이 목이버섯 추출물에 의한 CD3 T세포의 증식 및 활성화에 미치는 영향을 분석함.
- CD14⁺ 세포가 목이버섯 추출물에 의한 CD3 T세포의 증식에 대한 영향을 그림 2와 동일한 방법으로 분석한 결과를 그림 4에 나타냄. 그림 4의 결과에서는 목이버섯 추출물 단독처리에 의하여 CD3 T세포의 증식을 현저히 증가시키는 결과를 나타냄. 본 결과를 그림 2 (CD14: 0.5%)와 비교 시 목이버섯 추출물의 영향을 받은 CD14⁺ 세포가 T세포의 증식을 조절하는 것으로 추정됨.

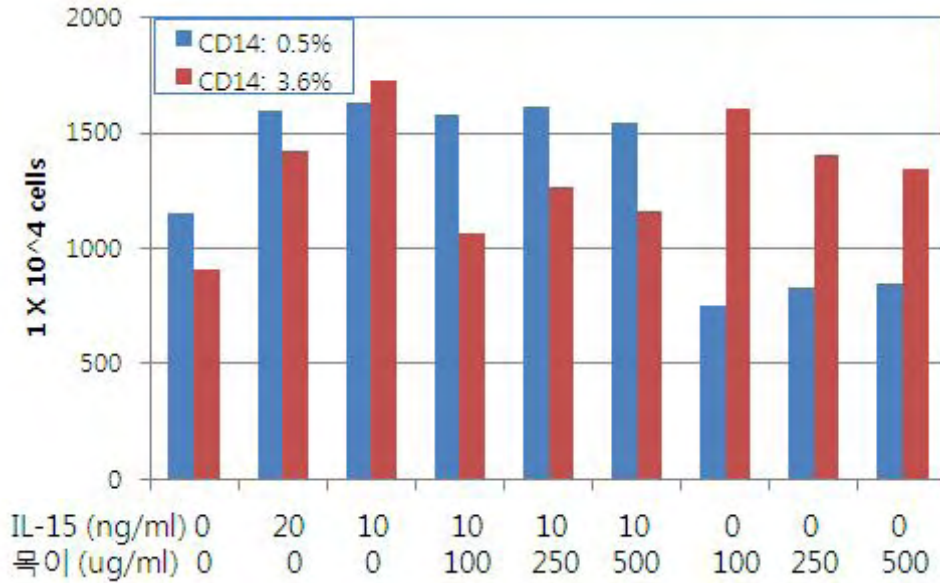


그림 4. CD14⁺ 세포가 CD3⁺ T세포의 증식에 미치는 영향

- 결과: 목이버섯 추출물 단독으로는 T세포의 증식 및 활성화에 영향이 없었으나, T세포 분리 시에 포함된 CD14⁺ 세포의 활성화에 영향을 미치고 이것이 T세포의 활성화에 영향을 미치는 것으로 추정되는 결과를 확인함.
- 그림 4의 결과 시험에 사용된 세포에서 CD14⁺ 세포에 의한 CD3 T세포의 표현형 분석 결과 (표 2)는 표 1과 대조적으로 CD3 T세포의 표현형에 큰 변화 없이 T세포의 표현형 비율이 유지되고 있음을 나타냄. 표 2의 결과에서 CD14⁺ 세포가 목이버섯 추출물에 의하여 감소되는 결과를 나타내고 있는데, 이는 CD14⁺ 단핵구세포가 수지상세포로 분화되는 과정에서 비율이 감소되는 것으로 추정됨.

(%)

배양	배양전	4일 배양 후								
IL-15 (ng/ml)	0	0	20	10				0)		
목이 (ug/ml)	0	0	0	0	100	250	500	100	250	500
CD3+ CD4+	71.5	78.7	78.9	77.7	79.5	79.0	79.9	80.1	80.2	80.7
CD3+ CD8+	22.9	21.0	24.3	24.1	23.7	23.6	23.7	22.2	21.6	21.3
CD14+	3.6	21.3	17.2	23.5	21.2	22.1	6.9	26.7	11.2	8.4
CD56+	4.5	2.4	3.0	2.7	2.9	2.7	2.0	2.6	2.2	1.8

표 2. CD14 세포에 의한 T세포의 표현형 변화

- 그림 3의 결과와 동일한 실험으로 CD14⁺ 세포에 의한 CD3 T세포의 활성화 유무를 배양액에 존재하는 cytokine의 생합성량으로 분석한 결과(그림 5)는 목이버섯 추출물이 CD14⁺ 세포의 활성화 및 분화에 영향을 미치고 이것이 T세포의 활성화에 영향을 주는 것으로 추정되는 결과를 나타내었음. 상세하게 DC가 CD4 T세포 중에서 Th1 세포에 작용하여 IFN- γ 의 생합성을 상당히 증가시키는 효능이 있는 것으로 추정됨.

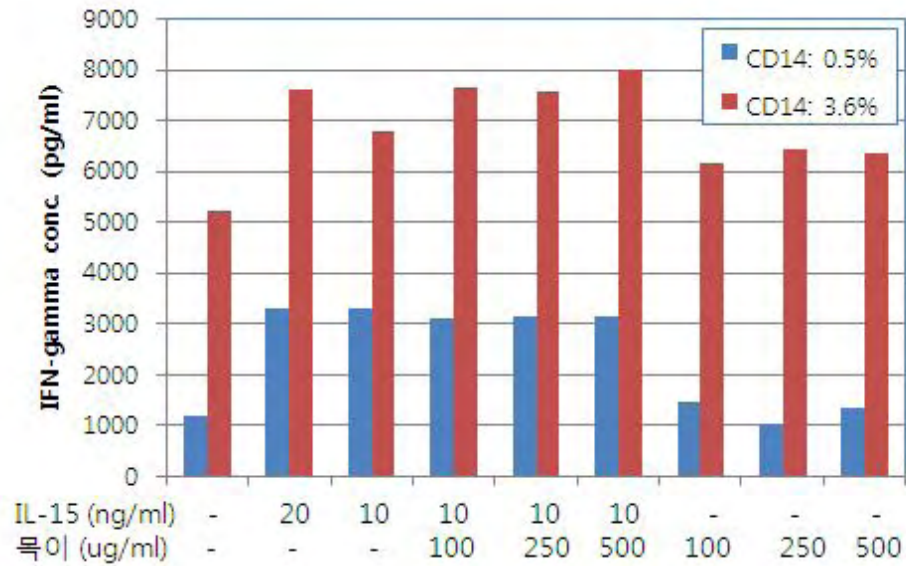


그림 5. 목이버섯 추출물이 CD14 세포를 통한 CD3 T세포의 활성화 영향

3) 목이버섯 추출물이 monocyte로부터 DC로 분화 및 성숙에 미치는 영향

가. 사람 말초혈액 monocyte 분리 및 DC로 분화

- 사람 말초혈액으로부터 monocyte 분리는 CD14 항체를 이용하여 CD3 T세포 분리와 유사한 방법으로 제조회사의 사용설명서에 따라 분리하였고 분리된 monocyte 순도는 CD14⁺CD83⁻인 세포들로서 FACS로 분석하여 95% 이상인 세포를 본 실험에 사용하였음 (그림 6).

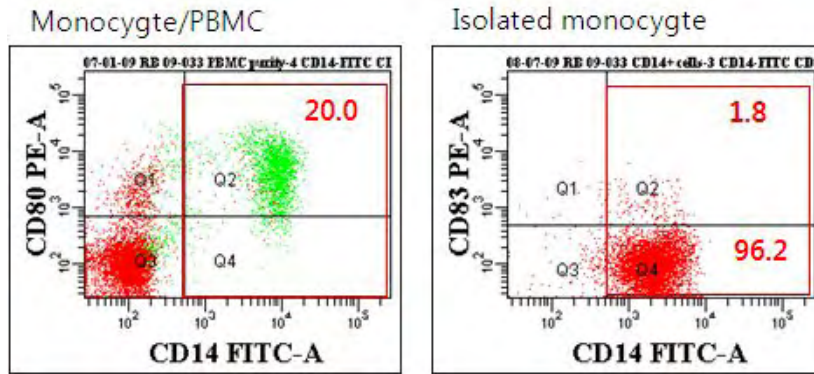


그림 6. PBMC내 monocyte 비율과 분리된 monocyte 순도

- 분리된 monocyte에 GM-CSF와 IL-4가 첨가된 배양액에서 미성숙 수지상세포 (iDC)로 분화 배양 6일 후, LPS를 첨가하여 성숙 수지상세포로 분화 유도하여 그 표현형을 FACS분석 하였음 (그림 7).

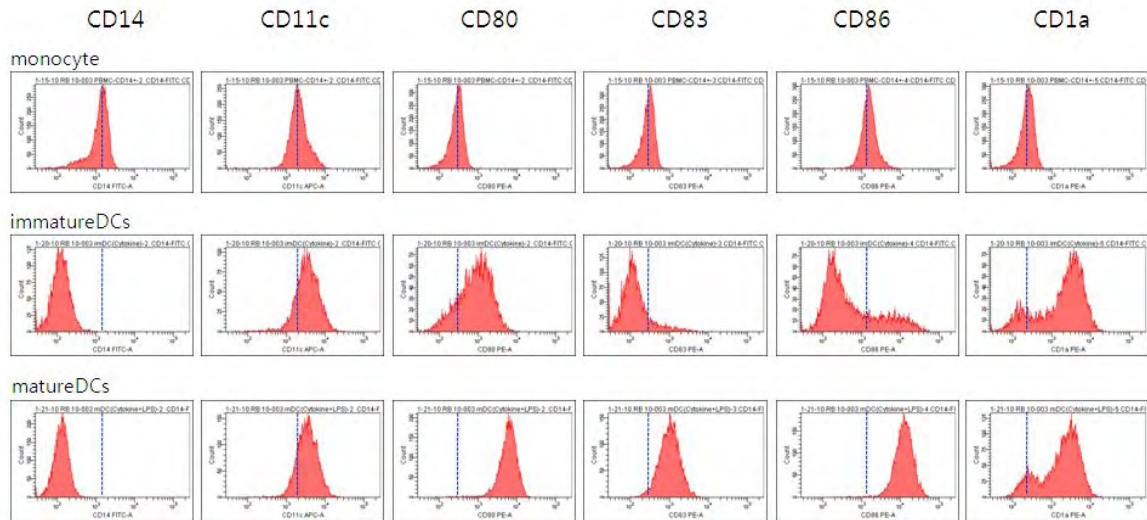


그림 7. monocyte로부터 분화 성숙시킨 DC의 표현형 분석

- Monocyte로부터 CD80과 CD83과 CD86 및 CD1a 발현 증가로 monocytes가 iDC로 분화 및 mDC로 성숙이 진행된 결과를 확인 할 수 있었음.
- CD80은 DC가 T cell과 상호작용으로 T세포의 활성화에 관여하는 DC의 co-stimulatory molecules이고, CD1a는 iDC가 T세포에 항원제시에 관련된 molecules로 잘 알려져 있음.

나. 목이버섯 추출물이 monocyte로부터 DC로 분화 및 성숙에 미치는 영향

- GM-CSF와 IL-4를 처리한 monocyte가 DC로 분화하는데 목이버섯 추출물이 미치는 영향을 알아보기 위하여 GM-CSF와 IL-4를 처리한 대조군과 대조군에 목이버섯 추출물을 첨가한 실험군에서 분화과정의 세포 형태를 관찰한 결과(그림 8), 목이버섯 추출물이 DC로 분화를 더욱 촉진하는 것으로 나타남. 비교군으로 사용한 인삼 특가공추출물 (STR 바이오텍 제공) 보다 목이버섯 추출물이 형태적 및 부착성 DC로 분화를 촉진하는 것으로 나타남.

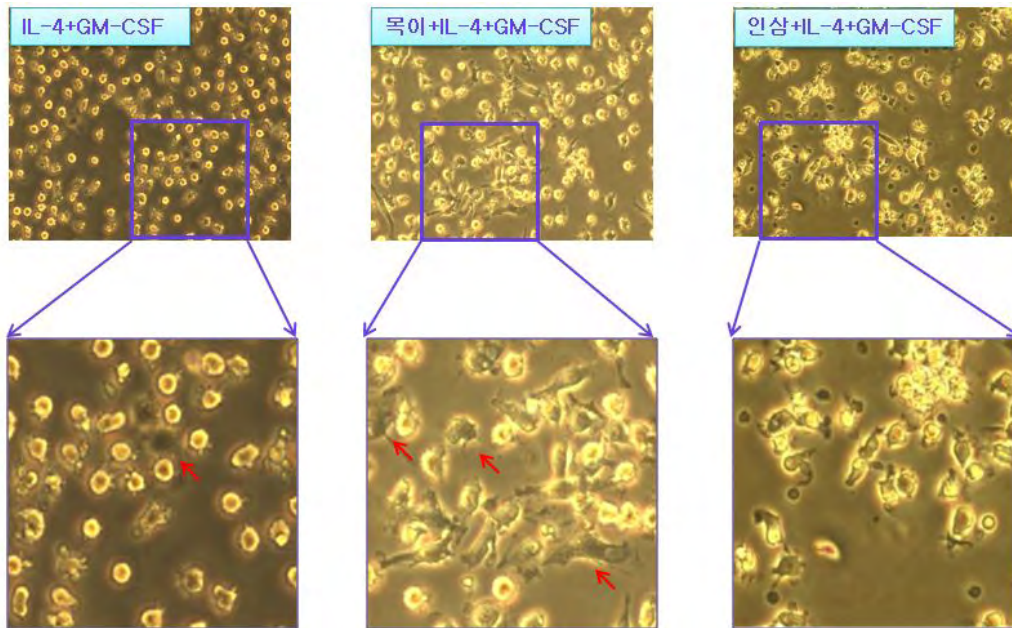


그림 8. 목이버섯 추출물과 인삼특가공추출물이 DC로 분화에 미치는 영향

- 목이버섯 추출물이 DC로 분화 관련 cytokine의 signal pathway를 알아보기 위하여 cytokine에 목이버섯 추출물을 조합하여 처리하고 현미경에서 그 형태적 관찰을 수행한 결과 목이버섯 추출물과 인삼 추출물은 IL-4 signal pathway를 경유하여 DC로 분화를 촉진하는 것으로 추정되는 결과가 관찰되었음(그림 9).

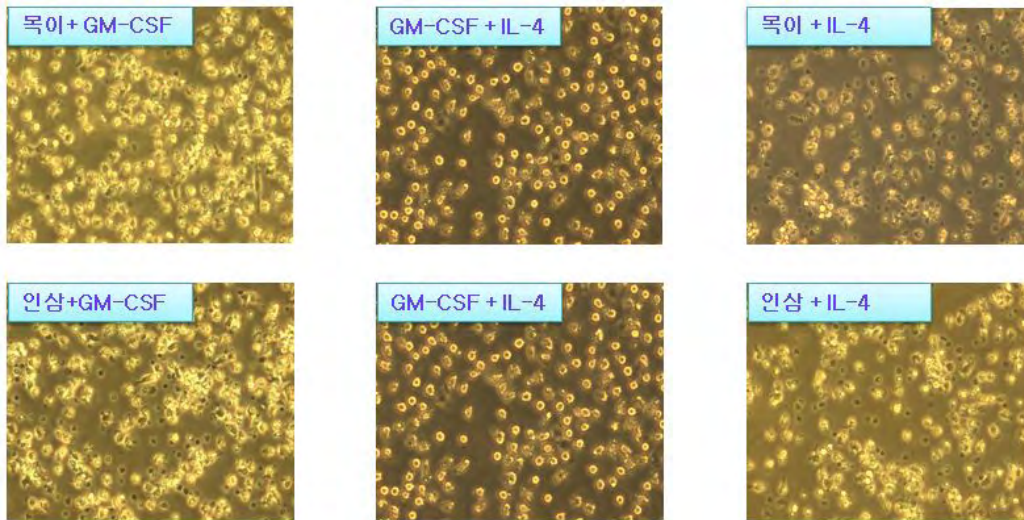


그림 9. DC로의 분화에 따른 목이버섯 추출물의 signal pathway

- 목이버섯 추출물이 imDC로 분화에 미치는 영향 분석을 위하여 monocyte에 GM-CSF와 IL-4를 처리한 대조군과 대조군에 목이버섯 추출물을 농도별로 처리한 후, imDC의 표현형을 FACS로 분석한 결과(그림 10)에서 목이버섯 추출물은 T cell co-stimulatory molecule인 CD80의 발현을 증가시키고 있는 것으로 나타났음. 따라서 이 결과는 목이버섯 추출물이 DC의 활성화와 DC를 통한 T세포의 활성화를 증가시킬 것으로 추정됨.

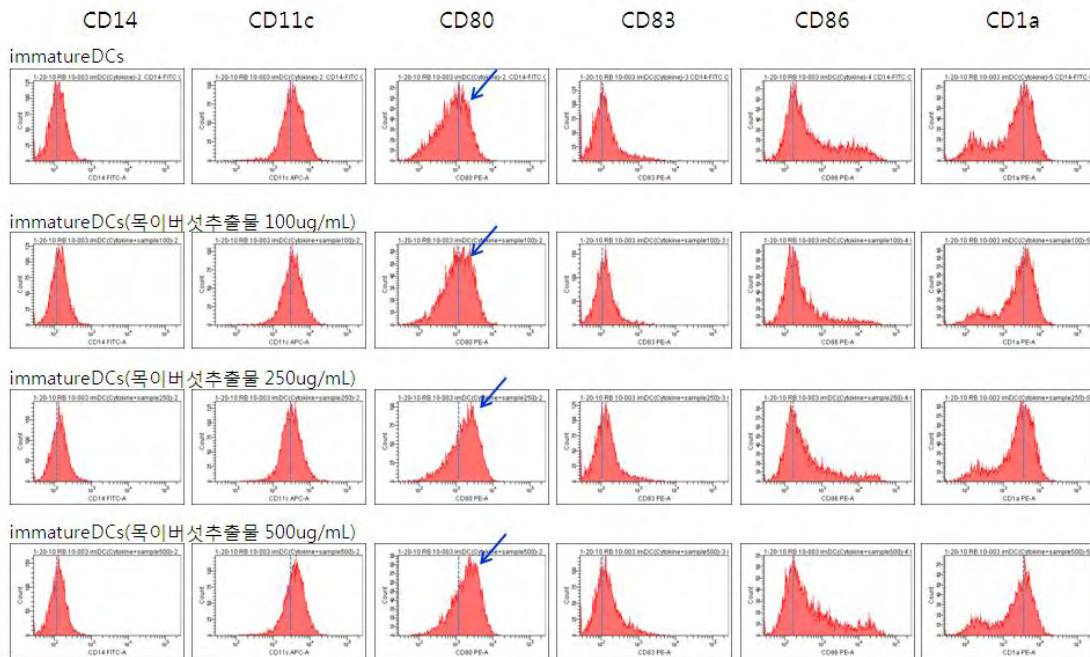


그림 10. 목이버섯 추출물에 의한 imDC의 CD80 발현 증가

- 목이버섯 추출물이 mDC로 성숙에 미치는 영향 분석을 위하여 imDC에 LPS를 처리한 대조군과 대조군에 목이버섯 추출물을 처리한 실험군의 DC 표현형을 FACS로 비교 분석한 결과(그림 11), 100ug/ml 목이버섯 추출물 농도 처리부터 항원 제시능과 관련된 CD1a의 발현을 증가시켰으며, 이는 생체에서 항원 제시능을 향상시켜 CTL 세포의 활성을 증가시킬 것으로

추정됨.

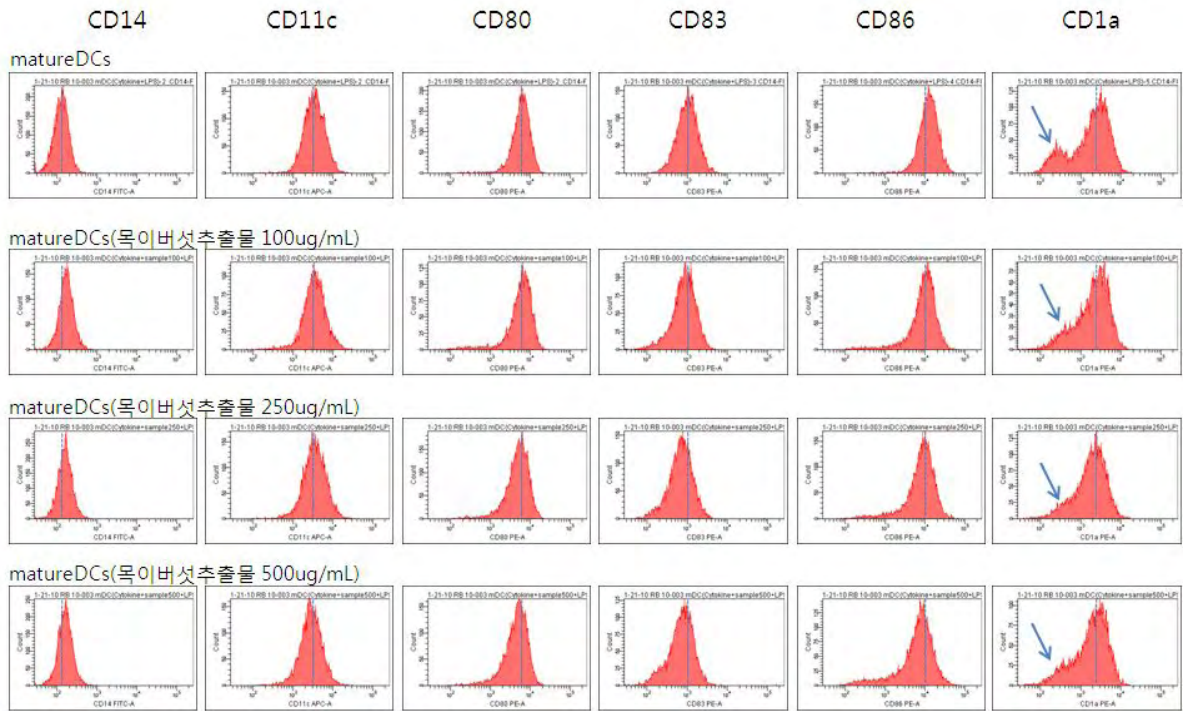


그림 11. 목이버섯 추출물에 의한 mDC의 CD1a 발현 증가

- 결과: 목이버섯 추출물은 imDC의 성숙단계에 영향을 미치는 효능이 있는 것으로 분석됨. 따라서 목이버섯 추출물은 DC로의 성숙을 증진시킴으로 항원 제시능의 증대 등으로 T세포의 분화 및 활성화에 영향을 미침으로 면역계를 조절할 수 있는 가능성을 제시함.

4) 목이버섯 추출물 유도 DC가 말초혈액 림프구 (PBL)에 미치는 영향 분석

가. 목이버섯 추출물 유도 DC에 의한 PBL 증식률 비교분석

- 목이버섯 추출물 처리로 분화된 DC를 γ -irradiation 시킨 후, PBL을 분리하여 각각의 조건에 대한 세포를 4일간 공동배양한 다음 PBL의 세포수를 계수하여 증식률을 분석한 결과 (표 3), 아무것도 처리하지 않은 PBL은 monocyte와 공동배양시보다 imDC 혹은 mDC와 공동배양한 그룹에서 각각 1.86배와 2.22배 증가되었으며, imDC에 목이버섯 추출물을 처리한 목이 DC와 공동배양한 그룹에서는 mDC와 유사한 수준으로 PBL이 증가되었음. 이 결과는 목이버섯 추출물이 DC 성숙을 유도하고 성숙된 DC가 PBL 증식을 촉진하는 것으로 나타남.

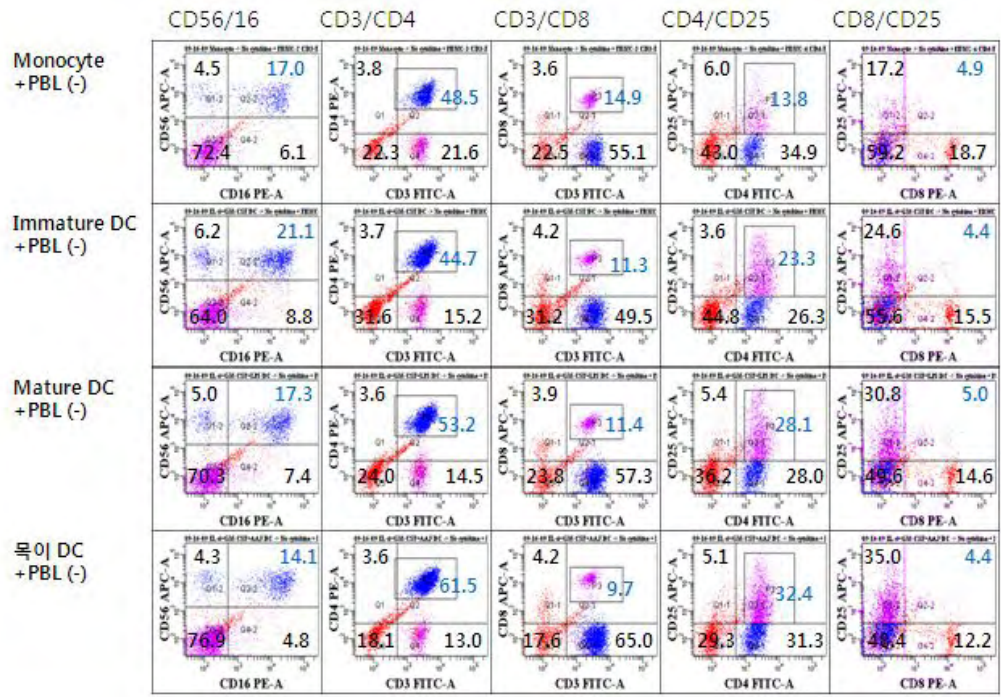
구분	PBL(peripheral blood lymphocytes)		
	-	+	+
IL-2 (2 ng/ml)	-	+	+
목이버섯 추출물 (250 ug/ml)	-	-	+
Monocyte	1.26 x 10 ⁶	2.38 x 10 ⁶	2.04 x 10 ⁶
Immature DC (DC/IL-4+GM-CSF)	2.34 x 10 ⁶	1.96 x 10 ⁶	1.8 x 10 ⁶
Mature DC (DC/IL-4+GM-CSF+LPS)	2.8 x 10 ⁶	3.22 x 10 ⁶	3.7 x 10 ⁶
목이버섯 DC (DC/IL-4+GM-CSF+목이버섯)	2.72 x 10 ⁶	3.4 x 10 ⁶	3.12 x 10 ⁶

표 3. 목이버섯 추출물 유도 DC가 PBL 증식에 미치는 영향

- 표 3의 결과에서 IL-2로 활성화시킨 PBL과 monocyte, mDC 혹은 목이버섯 DC와 공동배양시 활성화 시키지 않은 PBL과 공동배양한 조건보다 증식률이 증가되었으며, IL-2와 목이버섯 추출물을 처리한 PBL의 경우는 IL-2 단독처리와 큰 차이를 보이지 않았음.

나. 목이버섯 추출물 유도 DC에 의한 PBL 세포의 표현형 분석

- Monocyte와 monocyte로부터 GM-CSF, IL-4 및 목이버섯 추출물 처리로 분화된 DC를 PBL과 공동배양 시, PBL의 증식률이 monocyte보다 증가된 결과 (그림 12, 하단)에서 증가된 세포의 표현형을 비교 분석한 결과 (그림 12, 상단), CD3⁺/CD4⁺ T 세포의 비율이 48.5%에서 61.5%로 약 1.27배 증가하였음.
- 증가된 CD4⁺ 세포의 표현형을 확인하기 위하여 CD25 (IL-2R α)의 발현을 FACS로 분석한 결과, 목이버섯 추출물 유도 DC와 공동배양한 PBL에서 CD25 발현이 monocyte (13.8%)와 배양시보다 약 2.45배 증가된 32.4%인 것으로 나타남.
- 본 실험 결과와 목이버섯 추출물 유도 DC의 표현형에 관한 결과 (그림 10)를 종합하면 목이버섯 추출물이 monocyte로부터 imDC로 분화를 촉진하며 imDC의 CD80 발현을 증가시키고 이것이 CD4⁺ T 세포와의 상호작용으로 CD4⁺ T 세포의 활성화 (CD25 발현 증가)를 증가시킨 결과임을 보여줌.



	CD56	CD56/CD16	CD3	CD3/CD4	CD3/CD8	CD4/CD25	CD8/CD25
Monocyte + PBL (-)	21.5%	17.0%	70.1%	48.5%	14.9%	13.8%	4.9%
Immature DC + PBL (-)	27.3%	21.1%	59.9%	44.7%	11.3%	23.3%	4.4%
Mature DC + PBL (-)	22.3%	17.3%	67.7%	53.2%	11.4%	28.1%	5.0%
목이버섯 DC + PBL (-)	18.4%	14.1%	74.5%	61.5%	9.7%	32.4%	4.4%

그림 12. 목이버섯 추출물 유도 DC에 의한 CD4⁺ T 세포의 활성화

다. 목이버섯 추출물 유도 DC에 의한 PBL 세포의 활성 분석

- 성숙, 활성화된 DC는 CD4 T세포(Th0)와 상호작용을 통하여 Th1 혹은 Th2 세포로 polarization을 유도하는 것으로 알려짐. 따라서 목이버섯 추출물 유도 DC에 의한 CD4 T세포의 활성을 분석하기 위하여 공동배양된 배양액에 존재하는 Th1과 Th2 cytokine인 IFN- γ 와 IL-4 및 DC 활성화 cytokine인 IL-12의 활성을 ELISA kit (R&D System)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 분석한 결과, IL-4 (약 20 pg/ml)와 IL-12 (dir 20 pg/ml)의 농도는 변화가 없었음.
- 그러나 IFN- γ 는 monocyte 혹은 imDC와 공동배양시 각각 797.6과 739.5pg/ml로 나타났으나, mDC와 공동배양에서는 1009.4pg/ml이었고, 목이버섯 추출물 유도 DC와 공동배양시 1515.5pg/ml로 monocyte와 공동배양시 보다 약 1.9배가 증가되었음(그림 13).

- 이상의 in vitro 결과로부터 목이버섯 추출물은 DC로 분화 및 성숙을 증가시키고, 성숙된 DC는 PBL의 CD4⁺ T세포(Th1)의 세포 활성을 증가시킴으로 생체 면역력을 증강시키는 효능이 있을 것으로 사료됨.

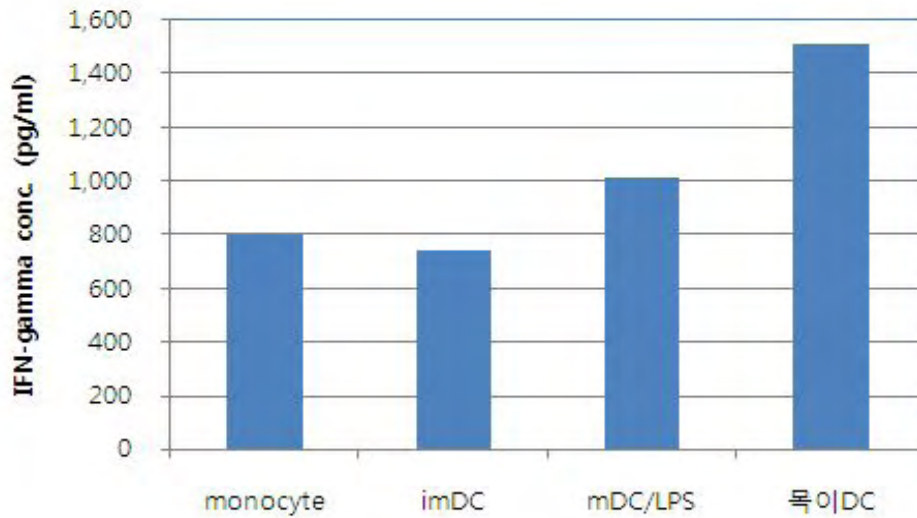


그림13. 목이버섯 추출물 유도 DC에 의한 CD4⁺ T세포 활성화 및 IFN- γ 발현

- 결과: 목이버섯 추출물이 DC의 성숙에 영향을 미치고 이것이 CD4⁺ T세포의 증식 및 활성화에 영향을 미치는 면역조절 효능이 있는 것으로 분석됨.

5) 목이버섯 추출물에 의한 NK세포 증식 및 활성화에 대한 영향

가. 목이버섯 추출물에 의한 NK세포 증식 분석

- 사람 말초혈액으로부터 T세포의 분리와 유사한 방법으로 NK isolation kit (BD Sciences)의 사용방법에 따라 NK세포를 분리하여 IL-15가 첨가된 배양액에 각각의 시료를 농도별로 처리 혹은 시료를 농도별로 단독 처리 배양 7일 후, MTS kit (Promega)을 사용하여 NK 증식을 분석하였음.
- 협동과제 주관기관인 STR 바이오텍으로부터 공급받은 미강(표고)발효분말, 복합미생물발효(다당체)대사산물, 상황균사체 추출물, 한약제 추출 발효분말, 인삼 특가공추출물 및 목이버섯 추출물이 사람 말초혈액 NK세포의 증식에 미치는 영향을 분석한 결과 다당체를 주성분으로 하는 상기 추출물 모두 NK세포 증식에는 영향이 없는 것으로 나타남(결과 미제시).

나. 목이버섯 추출물에 의한 NK세포 활성화 분석

- NK세포 배양액에서 12일간 배양된 NK세포에 본사의 활성화 물질과 목이버섯 추출물을 포함한 여러 가지 추출물 시료를 병용 혹은 단독처리하여 NK세포 활성화 (암세포에 대한 cytolytic activity)을 LDH assay로 분석 함.
- 각각의 시료는 nitrite 생성 활성이 최고점에 도달하는 농도로 NK세포 배양액에 처리하고 NK세포의 cytolytic activity를 K562 암세포주에서 분석한 결과, 목이버섯 추출물과 여타의 추출물은 유의한 NK세포 활성화 기능이 없는 반면 미강(표고)발효추출물은 NK세포 활성을 약 4.8 ~ 8.1%까지 증가시키는 활성을 보임(그림 14).

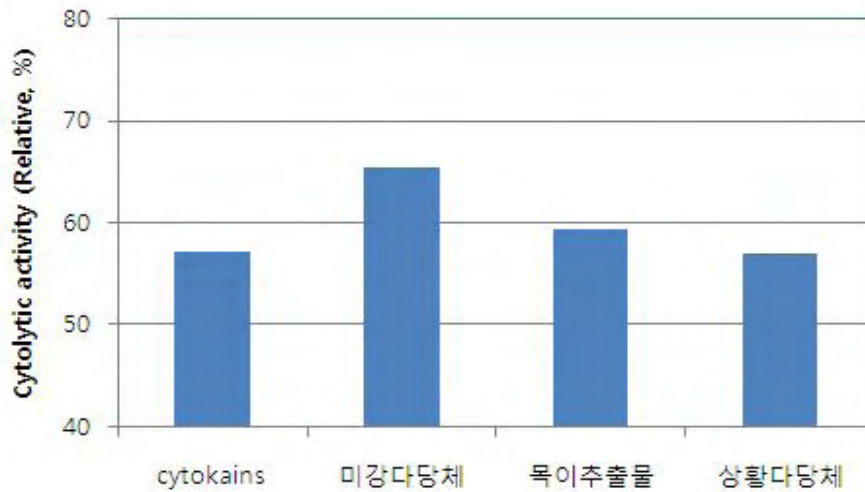


그림 14. 목이버섯 추출물이 NK세포 활성화에 미치는 영향

- 결과: 목이버섯 추출물은 사람 NK세포의 증식 및 활성화에 영향이 없는 것으로 분석됨.

6) 목이버섯 자실체 Bioconversion산물의 유효활성 분석

- 본 실험에 사용한 목이버섯 Bioconversion산물은 협동과제 연구기관인 (주)STR 바이오텍에서 제공한 물질을 사용함
- 목이버섯 Bioconversion산물의 유효활성 농도는 사람 유래-monocyte로부터 분화시킨 수지상세포(DC)에 시료를 농도별로 처리한 다음, 그 표현형을 분석한 결과를 참고함(그림 15)

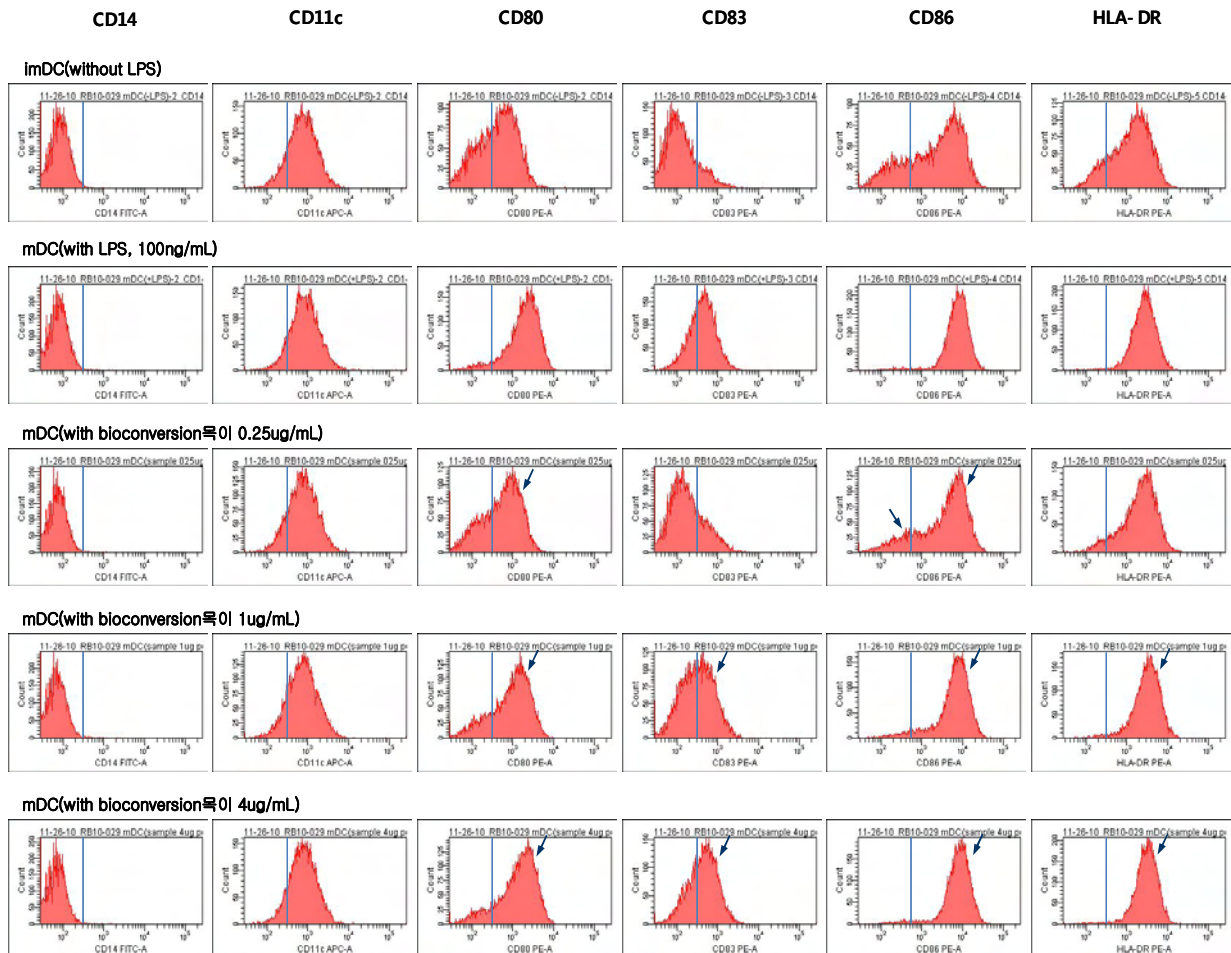


그림 15. 목이버섯 Bioconversion산물이 사람-monocyte 유래 mDC의 표현형에 미치는 영향

- 중앙혈액원으로부터 공급받은 말초혈액에 동량의 PBS를 첨가하여 잘 섞어 준 후, Ficol-Paque plus(GE Healthcare) 15mL이 들어 있는 50mL conical-tube에 희석된 혈액 35mL을 Ficol 층이 유지되도록 첨가하고 2,500rpm에서 20분 동안 원심분리하여 말초혈액 단핵구를 분리함
- 분리된 단핵구는 PBS로 3회 세척 후, CD14 항체(BD Sciences)를 이용하여 제조사의 사용설명서에 따라 monocyte를 분리함
- 분리된 monocyte는 형광 항체로 염색한 후, FACS(BD Sciences) 기기로 분석하여 CD14⁺CD83⁻인 세포의 비율이 95% 이상임을 확인함

- CD14⁺CD83⁻ monocyte는 GM-CSF와 IL-4가 포함된 RPMI-1640 배지에 현탁하여 37°C·5% CO₂ 배양기에서 6일 동안 배양하며 미성숙 수지상세포(imDC)로의 분화를 유도함. 이때, 배양 4째에 동량의 GM-CSF와 IL-4가 포함된 배지 2mL을 첨가함
- 분화 6일 후, 미성숙 수지상세포(imDC)에 LPS 또는 목이버섯 Bioconversion산물을 농도별로 처리하여 성숙 수지상세포로 분화를 유도한 다음, 그 표현형을 FACS 기기로 분석함 (그림 15)

7) 목이버섯 Bioconversion산물의 생체 내 면역활성 분석

가. 목이버섯 Bioconversion산물이 생쥐 몸무게 변화에 미치는 영향

- 시험관 내에서 면역세포의 활성을 유도한 목이버섯 Bioconversion산물이 생체 내에서도 유효한 면역활성을 유도하는지 검증하기 위하여 본 실험을 실시함
- 목이버섯 Bioconversion산물의 생체 내 면역활성을 확인하기 위하여 실험동물인 BALB/c 생쥐를 이용함
- 각 그룹의 개체를 5마리로 정한 후, 습도 50%, 온도 25°C의 조건을 갖춘 무균사육실에서 멸균된 사육상자와 물, 사료, 깔짚 등을 제공하여 최적의 조건에서 사육함
- 목이버섯 Bioconversion산물의 실험 농도는 사람 monocyte 유래 수지상세포 표현형 분석에서 확인된 유효활성 농도인 1 μ g/mL을 기준으로 정한 다음, 생체 내 흡수율을 고려하여 0, 1, 10, 100mg/kg B.W.로 정함
- 물질의 투여는 зонде(zonde)를 이용하여 위에 직접 투여하는 경구투여(Oral administration)법을 사용하였으며 투여 주기는 2일에 한번 씩 총 4주 동안 투여함.
- 1회 투여량은 200 μ L/mice로 하였으며, 각 그룹 투여마다 зонде(zonde)를 교체하여 그룹 간 오차를 최소화함.
- 총 4주 동안의 투여 후, 각 그룹 개체의 몸무게를 확인하고 희생시킨 다음 복강 내 대식세포(peritoneal macrophage)와 비장(spleen)을 분리하여 실험에 사용함.
- 목이버섯 Bioconversion산물을 각 농도에 따라 4주 동안 투여한 다음 몸무게 변화를 확인한 결과, 음성대조군으로 목이버섯 Bioconversion산물 대신 PBS를 투여한 실험군의 평균 몸무게 21.3g와 비교하였을 때 목이버섯 Bioconversion산물을 1mg/kg B.W.와 10mg/kg B.W., 100mg/kg B.W.의 농도로 투여한 실험군에서 각각 22.2g과 22.2g, 22.7g으로 몸무게가 증가하는 것으로 확인되었으나 결과의 유효성은 나타나지 않았음(표 4).

	mean, g	s.d., g
0mg/kg B.W.	21.3	0.6
1mg/kg B.W.	22.2	0.5
10mg/kg B.W.	22.2	0.9
100mg/kg B.W.	22.7	0.4

표 4. 목이버섯 Bioconversion산물을 경구 투여한 생쥐의 몸무게 변화

나. 목이버섯 Bioconversion산물이 복강 내 대식세포 활성화에 미치는 영향

- 활성화 된 복강 내 대식세포(peritoneal macrophage)가 분비하는 사이토카인인 IL- β , IL-6, TNF- α 의 농도를 측정하여 목이버섯 Bioconversion산물에 의한 면역활성을 확인함.
- 복강 내 대식세포(peritoneal macrophage)를 이용한 실험은 다음과 같은 방법으로 진행함.
- 복강 내 대식세포(peritoneal macrophage)를 회수하기 위하여 희생된 개체의 복부 외피를 절단한 다음, 20G needle이 장착된 주사기를 이용하여 복강 내에 10%FBS·RPMI1640 배지 10mL을 주입함.
- 복강 내에 주입된 배지를 주사기를 이용하여 다시 회수(약 8mL)하여 15mL 튜브에 옮겨 담은 후, 혈구계산판(hemocytometer)을 이용하여 세포 수를 확인하고 10%FBS·RPMI1640 배지를 이용하여 세포를 2회 세척함.
- 세척된 세포는 10%FBS·RPMI1640 배지에 약 1×10^6 cells/mL이 되도록 현탁하여 실험용 plate에 1×10^6 cells/mL의 농도로 분주함.
- 이 때, 세포는 아무것도 처리하지 않은 음성대조군과 대식세포의 활성을 확인하기 위한 양성대조군(Lipopolysaccharides, LPS 1 μ g/mL)으로 처리하여 37 $^{\circ}$ C·5% CO₂ 배양기에서 24시간(사이토카인 측정) 또는 48시간(세포 증식 측정) 배양함.
- 활성화된 대식세포가 분비하는 사이토카인 측정을 위하여 배양 24시간 후, 세포의 배양액을 회수하여 -20 $^{\circ}$ C 냉동고에 보관함.
- 각 그룹에서 대식세포의 증식 정도를 측정하기 위하여 배양 48시간 후, CCK-8 시약을 처리하여 micro-plate reader로 흡광도를 측정하여 각 조건에서의 세포 성장을 확인함.
- 복강 내 대식세포(peritoneal macrophage)가 생산하는 사이토카인은 ELISA법으로 확인함.

- 사이토카인에 대한 단클론항체를 1ug/mL이 되도록 0.5M 소듐 카보네이트 용액(sodium carbonate, pH9.6)에 희석하여 ELISA plate에 100uL 분주한 다음, 4°C에서 밤새 반응시킴.
- 단클론항체가 코팅된 plate는 세척액(0.05%Tween20·PBS)을 이용하여 3회 세척한 후, plate에 남아 있는 세척액을 타올을 이용하여 제거함.
- 비특이적 반응을 예방하기 위해 1%BSA·PBS를 각 well에 200uL 씩 분주한 후 실온에서 2시간 반응시킴.
- 2시간 후, 세척액을 이용하여 3회 세척한 다음 타올을 이용하여 잔여액을 제거함.
- 표준곡선을 그리기 위해 희석된 표준용액과 적정 농도로 희석된 배양액을 각 well에 100uL 씩 첨가한 후 실온에서 2시간 동안 반응시킴.
- 2시간 후, 세척액을 이용하여 3회 세척한 다음 타올을 이용하여 잔여액을 제거함.
- 단클론항체와 결합된 사이토카인을 확인하기 위하여 Biotin이 결합된 2차 항체를 제품 설명서에 명시된 농도로 희석하여 각 well에 100uL 씩 분주한 후 실온에서 2시간 동안 반응시킴.
- 2시간 후, 세척액을 이용하여 3회 세척한 다음 타올을 이용하여 잔여액을 제거함.
- Biotin과 결합력이 좋은 효소인 streptavidin-HRP를 200배 희석하여 각 well에 100uL 씩 분주하여 암실에서 약 20분 반응시킴.
- 20분 후, 세척액을 이용하여 3회 세척한 다음 타올을 이용하여 잔여액을 제거함.
- streptavidin-HRP의 기질인 TMB를 각 well에 100uL 씩 분주한 후, 암실에서 약 20분 동안 반응시킴.
- 20분 후, 2N 황산(S₂SO₄) 용액을 각 well에 50uL 씩 첨가한 다음 450nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 그리고 사이토카인의 농도를 확인함.
- 그 결과 사이토카인 IL-1β의 경우 음성대조군에서의 분비능이 약 74.8pg/mL로 나타났지만 목이버섯 Bioconversion산물을 1mg/kg B.W.와 10mg/kg B.W.의 농도로 투여한 그룹에서는 각각 83.6pg/mL, 95.6pg/mL로 분비능이 증가하는 것으로 나타남. 특히 산물을 100mg/kg B.W.로 투여한 실험군에서는 106.6pg/mL의 IL-1β가 측정 되었으며 이것은 음성대조군과 비교하였을 때 약 1.4배 이상 증가한 수치임(그림 16).

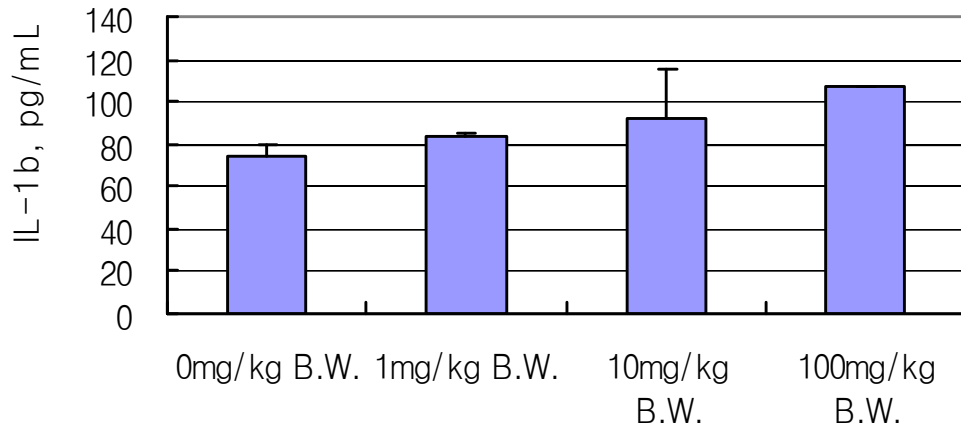


그림 16. 활성화된 복강 내 대식세포가 분비하는 IL-1 β 분비능

- 대식세포가 분비하는 사이토카인인 IL-6은 음성대조군 그룹에서 32.8ng/mL이 측정되었지만 목이버섯 Bioconversion산물을 1mg/kg B.W., 10mg/kg B.W. 농도로 투여한 그룹에서는 각각 40.7ng/mL, 43.6ng/mL로 나타났으며, 특히 물질을 100mg/kg B.W.의 농도로 투여한 그룹에서는 48.1ng/mL로 음성대조군 그룹과 비교하여 약 1.45배 이상 그 분비능이 증가하는 것으로 나타남(그림 17).

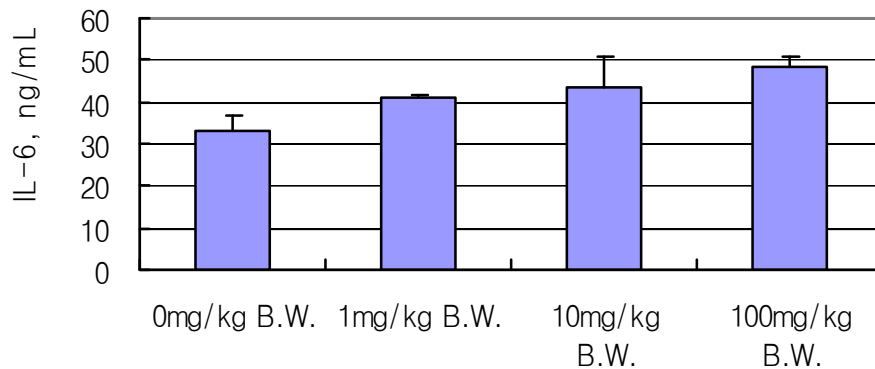


그림 17. 활성화된 복강 내 대식세포의 IL-6 분비능

- 또한 활성화된 대식세포가 분비하는 TNF- α 의 경우, 목이버섯 Bioconversion산물을 1mg/kg B.W.와 100mg/kg B.W.로 투여한 그룹에서 각각 1759pg/mL과 1772pg/mL의 분비능을 보였으며 특히 물질을 10mg/kg B.W.로 투여하였을 때 TNF- α 의 분비능이 2088pg/mL로 물질을 투여하지 않은 음성대조군의 1374pg/mL보다 약 1.5배 이상 증가하는 것으로 나타남(그림 18).

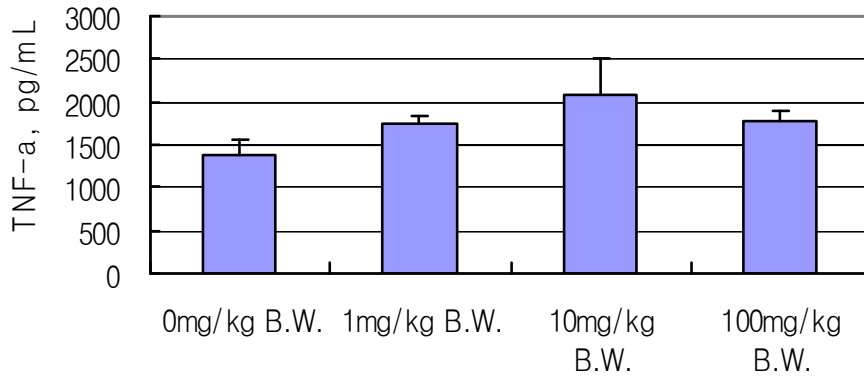


그림 18. 활성화된 복강 내 대식세포가 분비하는 TNF-α 분비능

- 복강 내 대식세포(peritoneal macrophage)가 활성화 될 때 분비되는 사이토카인인 IL-1β와 IL-6, TNF-α의 분비를 각 그룹별로 비교하여 측정된 결과, IL-1β와 IL-6의 경우 목이버섯 Bioconversion산물을 100mg/kg B.W.로 투여한 그룹을 물질을 투여하지 않은 음성대조군과 비교하였을 때 약 1.4배 이상 분비능이 증가하였으며, TNF-α의 경우 목이버섯 Bioconversion산물을 10mg/kg B.W.로 투여한 그룹에서는 음성대조군과 비교하여 약 1.5배 이상 분비능이 증가하는 것으로 나타남.

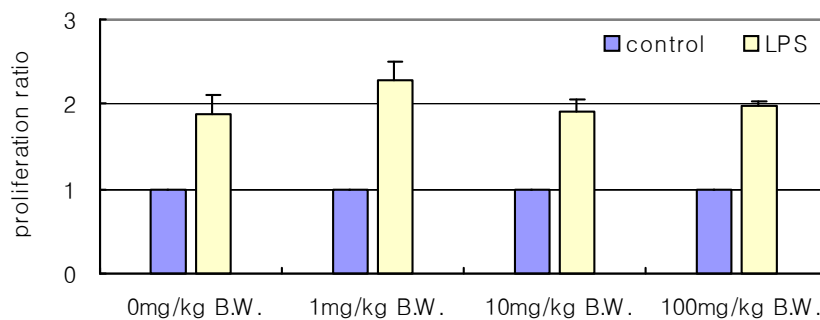


그림 19. 활성화된 복강 내 대식세포의 증식률

- 목이버섯 Bioconversion산물을 농도별로 투여하였을 때, 복강 내 대식세포(peritoneal macrophage)의 증식률의 차이를 확인한 결과, 목이버섯 Bioconversion산물을 투여하지 않은 음성대조군과 비교하였을 때 물질을 1mg/kg B.W.로 투여한 실험군에서 세포의 증식이 증가하는 것으로 확인됨(그림 19).
- 하지만 물질을 10mg/kg B.W.로 투여한 실험군과 100mg/kg B.W.로 투여한 실험군에서의 세포 증식은 음성대조군과 비교하였을 때 증가하지 않는 것으로 나타남.

다. 목이버섯 Bioconversion산물이 비장세포 증식에 미치는 영향

- 생체 내 주요 면역기관인 비장을 분리하여 T세포 자극인자인 ConA(Concanavalin A)와 B세포 자극인자인 LPS(Lipopolysaccharides)를 각각 처리하여 세포의 증식률 차이를 확인함.

- 분리된 비장(spleen)을 이용한 면역세포 활성화는 다음과 같은 방법으로 진행함.
 - 분리된 비장은 40um nylon cell strainer(BD Falcon)를 이용하여 단일세포로 만든 후, 10%FBS·RPMI1640 배지를 이용하여 2회 세척함.
 - 2회 세척한 비장세포(splenocytes) 덩어리에 적혈구를 용해액인 ACK(ammonium chloride potassium buffer) 용액을 2mL 첨가한 후, 2분 동안 실온에서 반응시켜 적혈구를 제거함.
 - 적혈구 용해액을 처리한 세포는 10%FBS·RPMI1640 배지를 이용하여 2회 세척함.
 - 세척한 비장세포(splenocytes)는 혈구계산판(hemocytometer)을 이용하여 백혈구의 수를 확인한 다음, 10%FBS·RPMI1640 배지를 이용하여 5×10^6 /mL이 되도록 현탁한 후 실험용 plate에 5×10^6 /mL의 농도로 분주함.
 - 이 때, 세포는 아무것도 처리하지 않은 음성대조군과 T세포 활성을 확인하기 위한 양성대조군(Concanavalin A, Con A 5ug/mL)과 B세포의 활성을 확인하기 위한 양성대조군(Lipopolysaccharides, LPS 1ug/mL)으로 처리한 다음 37°C·5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양함.
 - 각 그룹의 비장 면역세포 활성화 차이를 확인하기 위하여 48시간 배양한 비장세포(splenocytes)에 CCK-8 시약을 처리한 후, micro-plate reader로 흡광도를 측정하여 각 조건에서의 세포 성장을 확인함.
- 비장세포 증식능의 차이를 확인한 결과, T세포 자극인자인 ConA를 처리하였을 때 목이버섯 Bioconversion산물을 투여하지 않은 음성대조군과 비교하여 물질을 투여한 실험군에서 세포의 증식이 농도별로 유의하게 증가하는 것을 확인함(그림 20).
- 즉, 목이버섯 Bioconversion산물을 1mg/kg B.W., 10mg/kg B.W., 100mg/kg B.W.로 처리하였을 때, 그 증식률이 4.8, 6.2, 7.85로 나타났으며 이것은 음성대조군의 증식률인 3.9와 비교할 경우, 면역세포인 T세포의 증식이 유의하게 증가하였음을 나타냄. 특히 목이버섯 Bioconversion산물을 100mg/kg B.W.로 투여한 그룹(증식률 약 7.85)을 음성대조군(증식률 약 3.9)과 비교하였을 때 약 2배의 세포 증식률 증가가 나타남.

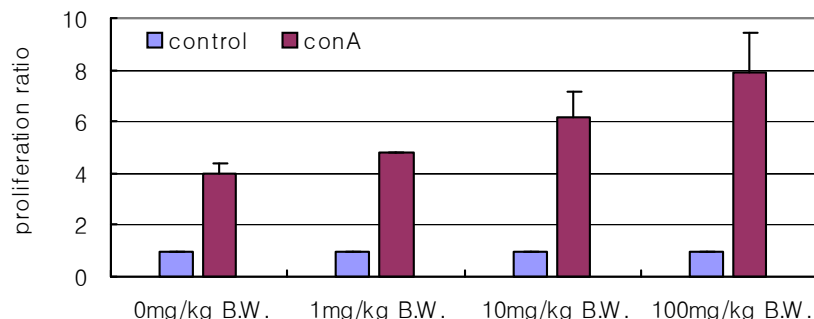


그림 20. 활성화된 비장세포의 증식률

- 비장세포에 B세포 자극인자인 LPS를 처리한 경우, 목이버섯 Bioconversion산물을 투여하지 않은 음성대조군과 비교하여 물질을 투여한 실험군에서 세포의 증식이 증가함(그림 21).

- 목이버섯 Bioconversion산물을 처리하지 않은 음성대조군(증식률 약 2.4)과 물질을 1mg/kg B.W., 10mg/kg B.W., 100mg/kg B.W.로 처리한 실험군을 비교하였을 때, 물질 투여에 따른 세포 증식률이 각각 약 2.8, 2.92, 3.1로 증가하는 것으로 나타남.
- 하지만 T세포 자극인자인 ConA를 처리하였을 때와 비교하였을 때, 음성대조군과 실험군의 차이가 크게 나타나지 않음.

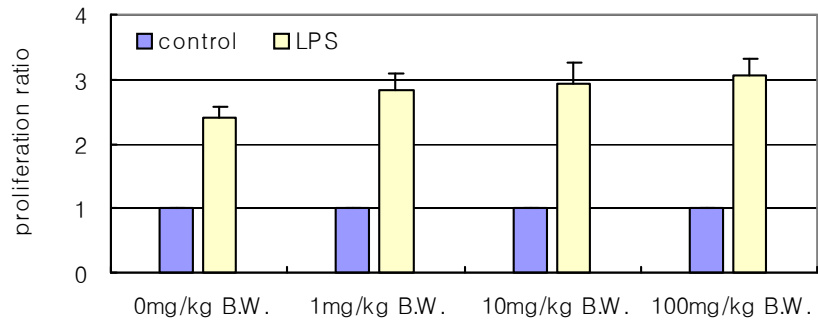


그림 21. 활성화된 비장세포의 증식률

8) 목이버섯 Bioconversion산물의 생체 내 항암활성 분석

가. 목이버섯 Bioconversion산물이 종양이 유도된 생쥐의 몸무게와 종양 크기에 미치는 영향

- 목이버섯 Bioconversion산물이 생체 내에서 면역활성을 증가시킴에 따라 증강된 면역활성이 종양의 증식에 어떠한 영향을 미치는지 검증하기 위하여 본 실험을 실시함.
- 본 실험을 위하여 실험동물인 BALB/c 생쥐 왼쪽 서혜부에 Sarcoma180 종양세포를 주입하여 고형암을 유도한 후, 실험에 사용함.
- 각 그룹의 개체는 5마리로 정한 후, 습도 50%, 온도 25°C의 조건을 갖춘 무균사육실에서 멸균된 사육 상자와 물, 사료, 깔짚 등을 제공하며 최적의 조건에서 사육함.
- 목이버섯 Bioconversion산물의 실험 농도는 사람 monocyte 유래 수지상세포 표현형 분석에서 확인된 유효활성 농도인 1 μ g/mL을 기준 정한 다음, 생체 내 흡수율을 고려하여 0, 1, 10, 100mg/kg B.W.로 정함.
- 물질의 투여는 1cc 주사기를 이용하여 복강에 직접 투여하는 복강 투여(Peritoneal Injection) 방법을 사용하였으며 투여 주기는 2일에 한번 씩 총 3주 동안 투여함.
- 1회 투여량은 200 μ L/mice로 하였으며, 각 그룹 투여마다 주사기를 교체하여 그룹 간 오차를 최소화함.
- 총 3주 동안의 투여 후, 약 2주 동안 각 그룹 개체의 상태 변화를 확인함.
- 2주 관찰 후, 각 개체의 몸무게를 확인하고 희생시킨 다음 비장(spleen)을 분리하여 실험에 사용하였고 종양 조직은 적출하여 조직 염색(hematoxylin & eosin stain)을 실시하여 각 그룹간의 차이를 관찰함.
- 종양을 형성시킨 생쥐에 목이버섯 Bioconversion산물을 각 농도에 따라 3주 동안 복강 투여한 다음 2주 동안 관찰한 생쥐의 몸무게 변화를 확인한 결과, 음성대조군으로 목이버섯 Bioconversion산물 대신 PBS를 투여한 실험군의 평균 몸무게는 22.5g으로 나타났으며 목이버섯 Bioconversion산물을 1mg/kg B.W.와 10mg/kg B.W., 100mg/kg B.W.의 농도로 투여한 실험군에서는 각각 22.8g과 23.2g, 23.3g으로 몸무게가 증가하는 경향으로 나타났으나 결과의 유효성은 나타나지 않음(표 5).

	mean, g	s.d., g
0mg/kg B.W.	22.5	0.1
1mg/kg B.W.	22.8	0.7
10mg/kg B.W.	23.2	0.2
100mg/kg B.W.	23.3	0.2

표 5. 목이버섯 Bioconversion산물을 복강 투여한 종양-형성-생쥐의 몸무게 변화

- 반면, 목이버섯 Bioconversion산물을 각 농도로 투여한 다음 2주 관찰한 생쥐의 종양 무게를 비교한 결과, 물질 투여농도에 따른 경향성을 나타내지 못함(표 6).

	mg
0mg/kg B.W.	492
1mg/kg B.W.	319
10mg/kg B.W.	490
100mg/kg B.W.	438

표 6. 목이버섯 Bioconversion산물을 복강 투여한 종양-형성-생쥐의 종양 무게 변화

나. 목이버섯 Bioconversion산물이 종양이 유도된 생쥐의 비장 무게와 비장세포 증식에 미치는 영향

- 종양이 형성된 생체 내에서는 종양세포를 항원으로 인지하여 다양한 면역세포가 활성화 되고, 활성화된 세포는 생체 내의 여러 면역기관에서 종양세포를 제거하기 위한 다양한 물질 생성과 증식을 나타냄. 특히 생체 내 주요 면역기관인 비장은 항원을 인지한 다양한 면역세포(대식세포, 수지상세포, B세포 등)가 2차면역 활성화를 위해 이동하는 주요 통로이자 T세포 면역을 매개하는 기관으로 알려짐.
- 또한 항원에 한번 노출된 T세포와 B세포는 2차 자극이 주어지게 되면 활발한 클론 확장을 통하여 빠르게 증식함.
- 따라서 생체 내 주요 면역기관인 비장을 분리하여 T세포 자극인자인 ConA(Concanavalin A)와 B세포자극인자인 LPS(Lipopolysaccharides)를 각각 처리한 다음, 면역세포의 증식을 차이를 확인하여 목이버섯 Bioconversion산물의 면역활성에 의한 항암 효과를 확인하고자 함.
- 분리된 비장(spleen)을 이용한 면역세포 활성화는 다음과 같은 방법으로 진행함.
 - 분리된 비장은 무균 상태에서 그 무게를 측정된 다음, 40um nylon cell strainer(BD Falcon)를 이용하여 단일세포로 만든 후, 10%FBS·RPMI1640 배지를 이용하여 2회 세척함.

- 2회 세척한 비장세포(splenocytes) 덩어리에 적혈구를 용해액인 ACK(ammonium chloride potassium buffer) 용액을 2mL 첨가한 후, 2분 동안 실온에서 반응시켜 적혈구를 제거함.
- 적혈구 용해액을 처리한 세포는 10%FBS·RPMI1640 배지를 이용하여 2회 세척함.
- 세척한 비장세포(splenocytes)는 혈구계산판(hemocytometer)을 이용하여 백혈구의 수를 확인한 다음, 10%FBS·RPMI1640 배지를 이용하여 5×10^6 /mL이 되도록 현탁한 후 실험용 plate에 5×10^6 /mL의 농도로 분주함.
- 이 때, 세포는 아무것도 처리하지 않은 음성대조군과 T세포 활성을 확인하기 위한 양성대조군(Concanavalin A, Con A 5ug/mL)과 B세포의 활성을 확인하기 위한 양성대조군(Lipopolysaccharides, LPS 1ug/mL)으로 처리한 다음 37°C·5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양함.
- 48시간 배양한 비장세포(splenocytes)는 CCK-8 시약을 처리한 후, micro-plate reader로 흡광도를 측정하여 각 조건에서의 세포 성장을 확인함.

- 종양을 유도한 생쥐에 목이버섯 Bioconversion산물을 투여한 후, 희생시킨 생쥐의 비장 무게를 측정한 결과, 음성대조군의 비장 무게인 108.7mg보다 목이버섯 Bioconversion산물을 1mg/kg B.W.,와 10mg/kg B.W., 100mg/kg B.W.로 투여하였을 때, 그 무게가 각각 119.0mg와 140.3mg, 150.0mg으로 증가하였으며, 특히 100mg/kg B.W. 실험군의 경우 그 증가율이 약 1.4배로 나타남(표 7).
- 비장 무게의 증가는 형성된 종양을 항원으로 인지한 면역세포가 활발히 분열하고 있다는 것을 나타내는 지표로 음성대조군보다 목이버섯 Bioconversion산물을 투여한 실험군에서 비장 무게 증가가 나타난 것은 물질에 의해 면역세포의 활성이 유도되었음을 추측할 수 있음.

	mean, mg	s.d., mg
0mg/kg B.W.	108.7	3.8
1mg/kg B.W.	119.0	8.2
10mg/kg B.W.	140.3	15.0
100mg/kg B.W.	150.0	5.6

표 7. 목이버섯 Bioconversion산물을 복강 투여한 종양-형성-생쥐의 비장 무게 변화

- 비장에 존재하는 면역세포인 T세포의 활성 정도를 확인하기 위하여 T세포 자극인자인 ConA를 비장세포에 처리한 결과, 목이버섯 Bioconversion산물을 투여하지 않은 음성대조군과 비교하여 물질을 투여한 실험군에서 세포의 증식이 농도에 따라 유의하게 증가하는 것을 확인함(그림 22).
- 즉, 목이버섯 Bioconversion산물을 1mg/kg B.W.,와 10mg/kg B.W., 100mg/kg B.W.로 투여하였을 때 ConA에 의해 증식한 세포의 비율은 각각 9.9와 11.0, 12.6로 나타난 반면, 물질을 투여하지 않은 음성 대조군의 세포 증식률은 6.8로 물질을 100mg/kg B.W.로 처리한 실험과

비교하였을 때 약 1.8배의 세포 증식률에 차이가 나타남.

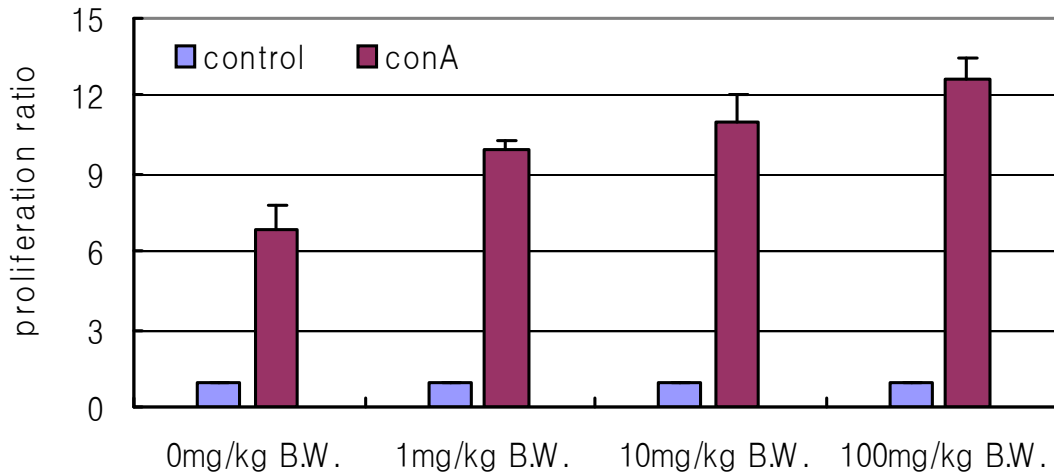


그림 22. 활성화된 비장세포의 증식률

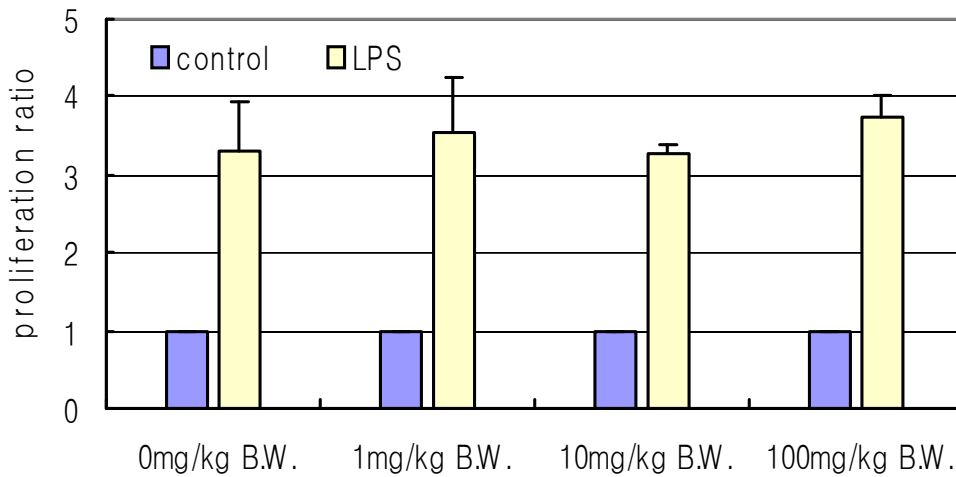


그림 23. 활성화된 비장세포의 증식률

- 반면 비장에 존재하는 또 다른 면역세포인 B세포의 활성을 확인하기 위하여 B세포 자극인자인 LPS를 처리한 경우, ConA를 처리한 경우와 달리 세포 증식에 차이를 나타내지 않음 (그림 23).

다. 목이버섯 Bioconversion산물이 생쥐의 암세포 조직에 미치는 영향

- 종양을 유도한 후 목이버섯 Bioconversion산물을 농도별로 처리한 각 그룹의 암조직을 적출하여 조직 염색(hematoxylin & eosin stain)을 실시하여 각 그룹간의 차이를 관찰함.
- 그 결과, 목이버섯 Bioconversion산물을 투여하지 않은 무처리 대조군과 물질을 1mg/kg B.W.와 10mg/kg B.W., 100mg/kg B.W.의 농도로 투여한 실험군간의 조직학적 차이는 나타나지 않음(그림 24).

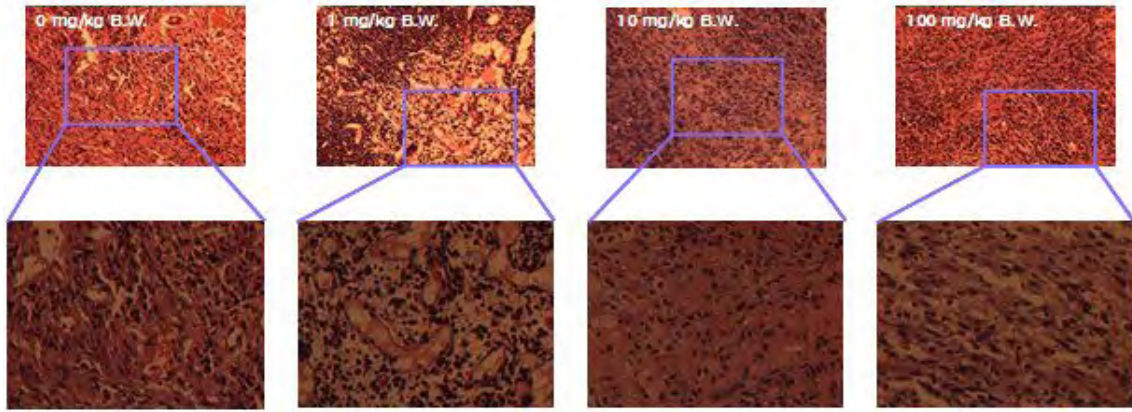


그림 24. 목이버섯 Bioconversion산물을 투여한 생쥐 암세포의 조직학적 차이(H&E stain)

- 위와 같은 결과를 종합하여 분석한 결과, 목이버섯 Bioconversion산물을 투여하였을 때 종양 무게와 암조직의 조직학적 차이는 나타나지 않았지만, 비장의 무게 변화 및 비장세포의 유의적인 증식능 향상을 나타낸 것으로 보아 목이버섯 Bioconversion산물이 종양-유도-생쥐의 면역계를 활성화 시키는 것으로 사료됨.
- 하지만 이와 같은 항암활성 실험 결과의 신빙성과 재현성을 확인하기 위하여 본 실험을 다시 한번 실시하여 목이버섯 Bioconversion산물의 항암활성을 재확인하고 결과의 유의성을 확인할 필요가 있다고 사료됨.
- 따라서 현재 위의 종양-유도-생쥐 모델을 제작하여 목이버섯 Bioconversion산물의 항암활성을 확인하기 위한 재실험을 진행하고 있음.
- 현재 진행되고 있는 재실험에서는 기존에 실시하였던 실험은 물론 비장세포에서 증식된 T 세포의 subset을 확인하기 위한 Th1과 Th2 타입의 사이토카인 측정을 준비하고 있음.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성 도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	노지재배 목이버섯의 호발암 항암효과 연구 (세부과제)	한국인의 호발암 세포주 설정	100%	· 한국인의 호발암 세포주 탐색 · 생리활성 연구를 위한 실험방법 확립
		목이버섯의 항암효과 탐색	100%	· 목이버섯의 추출물 및 바이오컨버전산 물의 호발암 in vitro 항암효과 측정 · 목이버섯의 항암효과 최적농도 설정
	목이버섯의 유효성분을 최대화하기 위한 재배 방법 확립 (협동과제 1)	노지재배 목이버섯의 수확량 및 유효성분을 최대화하기 위한 봉지톱밥배지 확립	100%	· 속성 목이버섯 재배균의 품종 연구 · 목이버섯균의 특성 규명 · 노지재배 목이버섯의 배지제조 방법연구
	생리활성 지표물질 분석법 확립과 목이버섯 자실체의 청정추출분리 정제과정 개발 (협동과제 2)	생리활성 지표물질 분석법 확립	100%	· 지표물질:β-Glucan 구조의 수용성 다당체 등 · 정량분석법(HPLC) 확립 · 면역활성 측정 Bioassay 확립
		청정추출분리정제과정 개발	100%	· 목이버섯 자실체의 청정추출분리정제 과정 최적화
	목이버섯 추출물의 면역활성 검색 및 유효성분의 시제품화 (협동과제 3)	목이버섯의 추출물 및 바이오컨버전산물의 면역활성 증가 물질 탐색	100%	· 바이오컨버전산물 및 추출물이 사람 면역계 세포에 미치는 영향의 평가 및 분석 연구 · 선천성, 후천성 및 중간 면역계의 주된 세포인 NK, T, 및 APC cell로 DC세포를 대상으로 면역활성을 연구 · NK cell:증식률 및 암세포 살상능 분석 · T세포:증식률 및 활성화 · DC:monocyte로부터 분화 및 성숙

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 연도 (2010)	노지재배 목이버섯의 호발암 항암효과 연구 (세부과제)	목이버섯의 항암효과에 특색을 나타내는 암세포의 분자생물학적 기전 탐색	100%	<ul style="list-style-type: none"> · 목이버섯의 추출물 및 바이오컨버전산물의 항암효과에 특색을 나타내는 cell line 설정 · 항암효과에 특색을 나타내는 암세포의 DNA를 이용한 프로그램화된 세포사멸 확인 · 웨장암세포에 목이버섯 동결건조분말과 바이오컨버전 수용성분말을 처리하여 각각 시간과 농도의 변화에 따라 LDH assay를 시행하여 cell cytotoxicity를 확인 · 웨장암세포의 apoptosis를 확인하기 위하여 TUNEL assay와 Comet assay를 시행
	노지재배 목이버섯의 봉지당 수확량 및 유효성분을 높이기 위한 톱밥배지봉지에서 의 균사체 성장 최적화 연구 (협동과제 1)	-목이버섯 봉지재배용 톱 밥배지 최적화	100%	· 버섯 수확량 비교
		-목이버섯 균주(백두1호) 의 봉지 균사체 성장 최적화	100%	<ul style="list-style-type: none"> · 춘추 노지재배와 하우스재배 결과 비교 · 하계 노지재배와 하우스재배 결과 비교 · 동계 노지재배와 하우스재배 결과 비교 · 계절별 노지재배와 하우스재배 목이버섯의 품질 맛, 향, 유효성분 비교
		- 국내 기후조건이 목이 버섯 재배에 미치는 영향평가	100%	<ul style="list-style-type: none"> · 기후 특성에 따른 재배방법 연구 · 목이버섯의 계절별 재배방법 연구
		- 시험재배 봉지당 버섯 수확 800g 달성	100%	· 시험재배 봉지당 버섯 수확 800g 달성
	Lab 규모에서 목이버섯의 바이오컨버전 발효공정 및 바이오컨버전산물의 청정추출분리 정제공정 개발 (협동과제 2)	바이오컨버전 발효공정 개발	100%	<ul style="list-style-type: none"> · Lab-scale에서 목이버섯 자실체의 발효배지화 조건 최적화 · Lab-scale에서 목이버섯 자실체의 발효미생물에 의한 바이오컨버전 발효조건 최적
		청정추출분리정제공정 개발	100%	· Lab-scale에서 바이오컨버전산물의 청정추출분리정제 조건 최적화
		바이오컨버전산물 제조 연구 수행	100%	<ul style="list-style-type: none"> · 크로마토그래피를 이용한 바이오컨버전산물의 분획 분리조건 확립 · 바이오컨버전산물의 기능성 개선을

목이버섯 추출물의 면역활성 검색 및 유효성분의 시제품화 (협동과제 3)	목이버섯 바이오컨버전산물의 생체 내(in vivo) 면역활성 및 항암 효과 분석	100%	위한 연구 수행 · [실험관에서의 유효활성농도 분석] · 목이버섯 바이오컨버전산물의 유효활성농도 분석 : in vitro · 사람 monocyte 유래 수지상세포의 표현형 분석
		100%	[실험동물에서의 효능 분석] · 목이버섯 바이오컨버전산물의 생체 내 면역활성 분석 : in vivo · 면역세포의 활성 분석 · 목이버섯 바이오컨버전산물의 생체 내 항암활성 분석 : in vivo · 종양 모델 제작

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 연도 (2011)	노지재배 목이버섯 바이오컨버전 산물의 호발암 항암효과 및 in vitro 면역 연구 (세부과제)	최적의 생리활성을 발현하는 목이버섯의 항암효과 규명	100%	· 목이버섯 바이오컨버전산물의 항암효과를 나타내는 췌장암세포에서 단백질분석방법을 이용한 표적단백질 규명 · 표적단백질의 발현을 웨스턴 블롯을 통하여 확인
		인간 PBMC를 이용한 면역효능 확인	100%	· 사람 말초혈액으로부터 말초혈액단핵구세포(PBMC) 분리 후, 면역 효능 규명 · 사이토카인 분비 측정 (interferon- γ , interleukin-1, interleukin-2, interleukin-6)
	Pilot 규모에서	바이오컨버전 발효공정 개발	100%	· Pilot-scale에서 목이버섯 자실체의 발효미생물에 의한 바이오컨버전 발효 조건 scale-up. · 목이버섯 자실체의 바이오컨버전을 위한 발효미생물은 GRAS(generally recognized as safe) 미생물로 미국 FDA에서 안정성이 입증된 균주중 기능성 식품 소재 개발에 적합한 미생물을 사용하여 목이버섯 자실체의 바이오컨버전 발효조건을 scale-up 함.
		생리활성물질(유효성	100%	· 크로마토그래피를 이용하여 바이오컨

<p>목이버섯의 바이오컨버전 발효공정 및 바이오컨버전 산물의 청정추출분리 정제공정 개발과 시제품 생산 및 면역활성 검색 (협동과제 1)</p>	<p>분) 분석</p>		<p>버전산물의 분획을 분리하여 각각의 분획에 대한 면역활성 역가를 Bioassay를 통해 확인한 뒤 면역활성 역가가 확인된 분획에 대한 생리활성물질(유효 성분)로서 β-Glucan 함량을 측정</p> <ul style="list-style-type: none"> 면역활성 다당체를 순수 정제한 뒤 상기 면역활성 다당체의 구성당 조성비 등을 조사 IR 및 NMR 측정을 수행하여 구조 특이성을 확인
	<p>청정추출분리정제공정 개발</p>	<p>100%</p>	<ul style="list-style-type: none"> Pilot-scale에서 바이오컨버전산물의 청정추출분리정제 scale-up 목이버섯 자실체의 바이오컨버전산물의 기능성식품 소재로의 개발을 위한 추출분리정제공정은 열수추출에 기초한 청정추출분리정제공정으로 scale-up 함.
	<p>원료 시제품 생산</p>	<p>100%</p>	<ul style="list-style-type: none"> 시제품 생산 및 사업화 준비
	<p>바이오컨버전산물의 in vivo 효능 검증</p>	<p>100%</p>	<ul style="list-style-type: none"> 암세포주를 이식시킨 복수암 동물모델에서의 항암 효능 검증 동물 : ICR 마우스 암세포주 : Scarcoma 180세포주 ①생존기간 및 수명연장능 측정 ②혈액학적 지표 분석

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

가. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

(1) 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종생 수입관 매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
연구성과	목표	1						1		
	달성	출원 예정						5		

(2) 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이 전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	1	1			
	달성	1	1			

나. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2010	Fisetin induces apoptosis in Huh-7 cells via downregulation of BIRC8 and Bcl2L2	김주연	남명진	전영글, 전원	Food and Chemical Toxicology	48	국외	SCI
2011	A mechanism of apigenin-induced apoptosis is potentially related to anti-angiogenesis	김보라	남명진	전영글	Food and Chemical Toxicology	49	국외	SCI

	and anti-migration in human hepatocellular carcinoma cells							
2011	Sulforaphane induces apoptosis in human hepatic cancer cells through inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase4, mediated by hypoxia inducible factor-1-dependent pathway	전영글	남명진	유동렬, 장윤호	Biochimica et Biophysica Acta	1814	국외	SCI
2012	Galangin induces apoptosis in gastric cancer cells via regulation of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase isozyme L1 and glutathione S-transferase P.	김득애	남명진	전영글	Food and Chemical Toxicology	50	국외	SCI
2012	Apoptosis by aloe-emodin is mediated through downregulation of calpain-2 and ubiquitin-protein ligase E3A in human hepatoma Huh-7 cells.	전원	남명진	전영글	Cell biology international	36	국외	SCI

다. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호

라. 기술료 징수 현황

기 징수액	당해연도 징수액	향후 징수액	합계

마. 사업화 현황

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기매출액	당해연도 매출액	매출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태			
면역증강소재	액상					22,800천원		22,800천원
면역증강소재	분말					6,000천원	3,000천원	9,000천원

바. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
3		1	2		1	2	3		

(2) 장·단기 연수지원 성과

장기 (2월 이상)		단기 (2월 미만)	
국내	국외	국내	국외

(3) 산업기술인력 양성 성과

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원

사. 경제사회 파급효과

산업지원 성과 (단위 : 건)				고용창출 성과 (단위 : 명)		
기술지도	기술이전	기술평가	합계	창업	사업체 확장	합계
1	0	0	1	0	14	14

5. 구매금액이 3천만원 이상인 기자재 구매현황

기자재명	구매금액(원)	구매일자	기자재 활용용도	보관장소

제 2 절 분석결과 향후 연구계획

가. 특허분석 측면

- 기존 특허는 목이버섯 하우스재배 분야에만 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서 얻어낸 결과로 국내 최초로 그린에너지를 이용한 목이버섯 노지재배 대량생산 방향으로 목이버섯 노지재배법 특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획임.
- 기존 특허는 목이버섯 추출물에 다른 식품첨가물을 혼합하여 제조하는 분야에만 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서 얻어낸 성과로 노지재배법으로 생산된 친환경 자연계 고부가가치 건강식품을 개발하여 국내 및 국외에 특허를 출원할 계획임.

나. 논문분석 측면

- 기존 논문은 목이버섯의 배지 개발 분야에 치중되어 있으나, 본 연구과제에서는 목이버섯의 균사배양, 자실체 발아 및 재배용 배지 개발과 노지재배법, 바이오컨버전을 이용한 연구 방향으로 연구를 추진하였으며 연구 결과를 국제학술지(SCI) 및 한국학술진흥재단 학술지에 추가로 게재할 계획임.
- 목이버섯의 영양학적 측면 분석에 관한 연구는 몇몇 연구자들에 의하여 시도되어 왔으나, 생리활성 측면과 기능성 소재로의 적용을 위한 구체적인 생리활성 연구 분야에서의 보완이 요구되므로, 본 연구의 수행을 통하여 고기능성 목이버섯 추출물의 항암효과 및 면역의 분자생물학적 연구를 통한 실용성 확보 연구를 하여 최소 1편 이상의 논문을 국제 학술지(SCI) 및 한국학술진흥재단 학술지에 추가로 투고할 계획임.

다. 제품 및 시장분석 측면

- 국내 및 국외시장 분석결과 주로 생목이버섯이나 건목이버섯의 1차 농산물의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 본 연구과제에서는 2차 가공산물의 방향으로 연구를 추진하였고, 목이버섯의 고역가 및 고순도 유효성분이 들어 있는 바이오컨버전 분말을 개발하였으며 이를 이용하여 향후, 건강기능식품 및 기능성원료물질 등을 개발하여 국내 및 국외에 판매할 계획임.
- 2008년 식품의약품통계연보에 의하면 버섯제품인 건강기능식품 수입량 및 수입액은 연간 1,629,000달러가 쓰여지고 있는 상황임. 국내 인구의 노령화가 급속도로 진행되고 있

는 상황에서 건강에 대한 관심이 높고 수요가 증대될 것으로 판단됨.

■ 경제, 산업적인 측면

- 전량 수입에 의존하는 건목이버섯의 수입 대체 효과
- 국내산 농산물 소비증대로 인한 농민의 수익 증대
- 일본, 미국 등에서 중국산 식재료에 대한 불신감 고조로 이들 나라에 1차 농산물로 수출하거나 2차 가공식품인 건강기능식품으로 제조하여 20억원 이상(1\$=1300원)의 수입 대체 효과를 얻을 수 있음
- 식품관련산업 연구인력 확보 및 인프라 구축에 이바지
- 고령화 사회 추세는 건강하게 삶을 영위하기를 바라는 고령인구의 희망에 의해 웰빙 식품에 대한 관심의 고조로 시장성 전망 높음

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 과학기술정보

- 식용버섯의 다양한 효능으로 인하여 기능성식품 혹은 식품원료로 개발이 일본에서 활발히 이루어지고 있음.
- 대표적인 식용버섯으로 표고버섯, 느타리버섯, 팽이버섯, 송이버섯, 양송이버섯, 목이버섯, 노루궁뎅이버섯 등이 있으며, 버섯에는 섬유질이 많아 콜레스테롤의 체내 흡수를 억제하고, 성인병 예방에도 효과적이며, 비타민과 칼륨이 풍부하여 골격 형성에 좋으며, 면역기능, 항암효능이 뛰어난 것으로 알려져 있음..
- 버섯류의 다당체(베타글루칸)가 면역증강 및 항암 효능이 탁월하여 면역 및 항암 기능성 식품 및 원료 개발이 활발히 이루어지고 있음.
- 또한 다당체의 생리활성 기능으로 인하여 버섯을 포함한 해조류 등 다양한 식품에서 다당체의 효능에 대한 연구개발이 활발히 이루어지고 있음.
- 균사체는 자실체에 영양분을 공급하는 기능을 함. 대구한의대 한방식품약리학과 김수민 교수팀은 균사체의 항암효과가 크다는 연구 결과를 얻음. 복강암을 유발시킨 쥐에 표고버섯 균사체 섭취군·표고버섯 자실체 섭취군·대조군으로 나눠 각각의 항암 효과를 분석한 결과, 표고버섯 균사체를 섭취한 군의 평균생존기간은 23일이었고 자실체군과 대조군은 각각 22일과 18일이었음. 단순생존기간 보다는 평균기대수명에 비해 얼마나 오래 살았는지 알려주는 수명연장률이 중요한데, 균사체군의 수명연장률이 28%로 자실체군(22%)보다 높았음.
- 균사체에는 자실체보다 글루칸 성분이 풍부함, 글루칸이 면역력 증강 물질인 사이토카인을 분비하여 면역효과의 증강을 통해 암세포를 제거함.
- 글루칸은 간기능 개선이나 혈당조절의 효과도 갖고 있기 때문에, 간질환을 앓고 있거나 당뇨병이 있는 사람이 이 성분이 풍부한 버섯 균사체를 섭취하면 질병이 완화 됨.
- 버섯 균사체는 일반인이 조리해서 먹는 부분이 아니기 때문에, 표고버섯 균사체의 건강 효과를 보려면, 균사체에서 추출해 만든 면역증강 물질인 AHCC(다당류관련화합물) 건강기능식품을 복용하여야 한다고 마케팅을 하고 있음..
- AHCC는 미국·일본·유럽 등에서 이미 암환자를 위한 기능성 물질로 사용하고 있으며 일본에서는 암환자가 항암제와 함께 AHCC를 복용했을 때, 신장 손상 및 골수 억제 등의 항암치료 부작용이 개선됐다는 연구 결과가 나와 있음.
- AHCC는 일본 도쿄대 연구팀과 바이오 기업이 개발한 면역증강 건강기능식품으로, 버섯 균사체를 대형 탱크에서 30~40일 정도 배양한 후 효소반응을 거쳐 만들어진 물질(바이오컴버

전)을 이용했음.

- 우리나라 식품의약품안전청도 표고버섯 균사체를 기능성 원료로 인정함.
- 우리나라에서는 분자량이 낮은 알파글루칸을 주성분으로 한, AHCC 관련상품이 나와 있음.

제 7 장 참고문헌

Branching Structure and Chain Conformation of Water-Soluble Glucan Extracted from *Auricularia Auricula-Judae*. Xu S, Xu X, Zhang L. J Agric Food Chem. 2012 Mar 10.

The molecular structure and solution conformation of an acidic heteropolysaccharide from *Auricularia auricula-judae*

Ganoderma Lucidum(Reishi) in Cancer Treatment. Daniel Sliva, PhD. Integr Cancer Ther December 2003 2: 358-364.

Growth Inhibitors Against Tumor Cells in *Cordyceps sinensis* Other than Cordycepin and Polysaccharides. Yuh-Chi Kuo¹, Ching-Yuang Lin, Wei-Jern Tsai, Chia-Ling Wu, Chieh-Fu Chen and Ming-Shi Shiao Cancer Investigation. 1994, Vol. 12, No. 6 , Pages 611-615.

Hypoglycemic Effect of Water-soluble Polysaccharide from *Auricularia auricula-judae* Quel. on Genetically Diabetic KK-Ay Mice. Zuomin YUAN, Puming HE, Jianhui CUI, Hisanao TAKEUCHI Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, Vol. 62 (1998) , No. 10 pp.1898-1903

Effect of Polysaccharide from *Auricularia auricula* on Blood Lipid Metabolism and Lipoprotein Lipase Activity of ICR Mice Fed a Cholesterol-Enriched Diet. G. Chen, Y.-C. Luo, B.-P. Ji, B. Li, Y. Guo, Y. Li, W. Su, Z.-L. Xiao. Journal of Food Science Volume 73, Issue 6, pages H103-H108, August 2008

Evaluation of antioxidative and hypolipidemic properties of a novel functional diet formulation of *Auricularia auricula* and Hawthorn. Yangchao Luo, Gang Chen, Bo Li, Baoping Ji, Yi Guo, Fang Tian. Innovative Food Science & Emerging Technologies, Volume 10, Issue 2, April 2009, Pages 215-221.

Improvement of exopolysaccharide production by macro-fungus *Auricularia auricula* in submerged culture Enzyme and Microbial Technology, Jing Wu, Zhong-Yang Ding, Ke-Chang Zhang. Volume 39, Issue 4, 2 August 2006, Pages 743-749

Evaluation of antioxidant property and quality of breads containing *Auricularia auricula* polysaccharide flour Food Chemistry, Lisheng Fan, Shenghua Zhang, Lin Yu, Li Ma. Volume 101, Issue 3, 2007, Pages 1158-1163

Optimization of ultrasound–assisted extraction of melanin from *Auricularia auricula* fruit bodies
Innovative Food Science & Emerging Technologies, Yu Zou, Chunyan Xie, Gongjian Fan,
Zhenxin Gu, Yongbin Han. Volume 11, Issue 4, October 2010, Pages 611–615

Chemical characterization of *Auricularia auricula* polysaccharides and its pharmacological
effect on heart antioxidant enzyme activities and left ventricular function in aged mice
International Journal of Biological Macromolecules, Qin Wu, Zhiping Tan, Haidan Liu, Lei Gao,
Sijie Wu, Jinwen Luo, Weizhi Zhang, Tianli Zhao, Jiefeng Yu, Xinhua Xu. Volume 46, Issue 3,
1 April 2010, Pages 284–288

Conidiobolus osmodes isolated from *Auricularia auricula–judae*. C.T. Ingold. Mycological
Research, Volume 93, Issue 3, October 1989, Pages 335–339

Carboxymethylation of polysaccharides from *Auricularia auricula* and their antioxidant activities
in vitro International Journal of Biological Macromolecules, Liuqing Yang, Ting Zhao, Hong
Wei, Min Zhang, Ye Zou, Guanghua Mao, Xiangyang Wu. Volume 49, Issue 5, 1 December
2011, Pages 1124–1130

Studies on molecular weights of polysaccharides of *Auricularia auricula–judae*. Lina Zhang,
Liqun Yang, Qiong Ding, Xianfeng Chen. Carbohydrate Research, Volume 270, Issue 1, 18
April 1995, Pages 1–10

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.