

발간등록번호

11-1541000-001435-01

한방 슬러지를 이용한 고품질
팬이버섯의 생산 및 가공식품 개발
(Development of processed foods
using functional *Flammulina velutipes*
cultivated with oriental herbal plants)

경남과학기술대학교

농림수산식품자료실



0009339

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “한방 슬러지를 이용한 고품질 팡이버섯의 생산 및 가공식품 개발에 관한 연구” 과제(세부과제 “한방 폐 슬러지를 이용한 팡이버섯 생산 및 가공식품에 대한 면역증강 기능성 차와 음료 개발에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2012 년 04 월 09 일

주관연구기관명 : 경남과학기술대학교

주관연구책임자 : 이 상 원

협동연구기관명 : 순천대학교

협동연구책임자 : 이 성 태

협동연구기관명 : S&J바이오(주)

협동연구책임자 : 박 경 옥

요 약 문

I. 제 목 : “한방 슬러지를 이용한 고품질 팡이버섯의 생산 및 가공식품 개발”

II. 연구개발의 목적 및 필요성

버섯재배 농민들의 소득증대와 지역특화품목 개발을 위해, 한약재료를 이용한 한방 팡이버섯의 생산 방법을 확립하고, 한방 팡이버섯의 안정적 생산과 소비를 촉진시키기 위하여 에스바이오푸드(주)와 공동으로 한방 팡이버섯을 이용한 면역증강 기능성 차와 음료를 개발한 후, 최종 기술 이전을 통해 상품화하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 한약재료를 이용한 한방 팡이버섯 배지 개발 및 한방 팡이버섯 생산
- 한방 팡이버섯 및 버섯 가공제품에 대한 면역증강 기능성 검증
- 한방 팡이버섯을 이용한 기능성 차와 음료 식품개발 및 상품화

IV. 연구개발결과

- 한방 슬러지를 이용하여 미강 대신 10% 첨가하여 버섯 배지로 사용 가능하며, 팡이버섯뿐만 아니라 봉지 재배된 버섯에서도 재배가 가능하였다. 또한 버섯 대량 생산 능가 보다는 일반 버섯 재배 농가에 경제성이 있는 것으로 나타났다.
- 팡이버섯 배당체를 첨가한 시제품에서 면역활성 및 항암 효과가 있는 것으로 나타났으며, 최종 시제품 과립차의 경우 11.98%가 가장 좋은 것으로 나타났다. 그리고 팡이버섯 배당체를 이용한 음료 시제품으로 일반 차음료로는 산업성이 보이지 않으며, 비타민음료로는 경제성이 있는 것으로 나타났다. 그리고 6개월에 걸쳐 다양한 부용제를 선별한 결과 최종 레시피를 선정하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

아래의 연구성과를 달성하였음

- 특허출원 : 총 3건 달성, - 논문투고 : 총 3건 달성, - 학술발표 : 총 3건 달성,
- 상 품 화 : 총 2건 달성, - 교육지도 : 총 2건 달성, - 언론홍보 : 총 2건 달성

비타민음료는 참여기업 에스앤제이바이오(주)에서 2012년 10월까지 상품화를 추진할 계획이며, 현재 용기 및 포장 디자인에 대해 사업화를 추진 중에 있다.

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 목적	1
2. 연구개발의 필요성	1
3. 과제별 연구개발의 목표 및 내용	3

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내외 관련분야에 대한 기술개발현황	5
------------------------------	---

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 이론적, 실험적 접근방법	8
가. 연차별 연구개발 수행 접근방법	8
2. 연구내용	11
가. 연차별 연구개발 목표 및 연구개발 수행내용	11
3. 연구결과	14
가. 1차년도 연구방법 및 결과	14
(1) 제 1세부과제 연구방법 및 결과	14
(2) 제 1협동과제 연구방법 및 결과	25
(3) 제 2협동과제 연구방법 및 결과	34
나. 2차년도 연구방법 및 결과	39
(1) 제 1세부과제 연구방법 및 결과	39

(2) 제 1협동과제 연구방법 및 결과	54
(3) 제 2협동과제 연구방법 및 결과	69
다. 3차년도 연구방법 및 결과	75
(1) 제 1세부과제 연구방법 및 결과	75
(2) 제 1협동과제 연구방법 및 결과	86
(3) 제 2협동과제 연구방법 및 결과	110

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연도별 연구개발목표 달성도	124
(가) 연구성과 목표	124

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 실용화·산업화 계획	125
2. 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획	125

Summary

To reduce the production cost of the *Flammulina velutipes*, discarded medicinal sludges were collected from oriental medical clinics and the development of *Flammulina velutipes* culture medium was processed. According to the analysis of proximate composition of the Korean herb medicine materials, crude ash contents of rice bran and waste cotton were 7.9% and 8.1%, respectively which were relatively higher than 2.5% of the control, a sawdust. Crude protein was detected by 2.8% from the sawdust, whereas medicinal sludges indicated 7.3%~10.4%, which were higher than the control. The pH of medicinal sludges was ranged from 5.32 to 5.68, which were similar to pH 5.70 of the corn cob and sawdust. In the case of addition concentration of medicinal sludges influencing mycelial growth of the *Flammulina velutipes*, 10% concentration was more favorable compared to that of 5% and 15%. However, addition of Korean herb medicines materials did not significantly affect on the growth of *P. tolaassi* and *Trichoderma* sp..

The objective of the current study was to determine the effects of the extracts isolated from fruit body of *Flammulina velutipes* cultivated with oriental herbal plants on mouse splenocytes, B cells and macrophages *in vitro*. The ethanol extracts B(EEB) directly induced the proliferation of spleen cells in a dose-dependent manner and increased IL-6, TNF- α and IFN- γ synthesis. The EEB also increased the proliferation of B cells in a dose-dependent manner. The production of immunoglobulin M, G1, G2a, G2b and IgG3 in the presence of the EEB increased progressively in the culture supernatant. When the EEB were used in macrophage cell line(RAW264.7) stimulation, there was a marked induction of NO synthesis in a dose-dependent manner and an increased IL-6, TNF- α and GM-CSF synthesis. Intraperitoneal injection with EEB showed life prolongation effect of 16.1% in mice previously inoculated with sarcoma-180, respectively. These results suggest that the capacity of the EEB isolated from fruit body of *Flammulina velutipes* cultivated with oriental herbal plants seem to act as a potent immunomodulator causing augmentation of immune cell activity, and with the absence of notable side-effects, *Flammulina velutipes* EEB could be used as a biological response modifier having possible therapeutic effects against immunological disorders. This study also showed that functional components of *Flammulina velutipes* were possibly improved by incorporating oriental herbal plants in growth medium.

Approximately 80 species of bacteria were isolated from the fermented mushroom first and the HJ-57 antibacterial micro-organism was selected to the final isolation bacteria. It has a high degree of CMCase, amylase and protease activity as well as high antibacterial activity against mushroom pathogenic bacteria without affecting the growth and development of *Flammulina velutipes* and *Lentinus edodes* mushrooms. The finally selected HJ-57 antibacterial micro-organism was identified to *Bacillus* sp. HJ-57. The initial pH for culture was pH 7 and its optimum culture temperature was 35°C. The antibacterial material produced by *Bacillus* sp. HJ-57 showed a little antibacterial activity even in the 12 hr of culture, but showed the highest antibacterial activity in the 36~48 hr of culture. The HJ-57 antibacterial micro-organism also showed a high antibacterial activity against mushroom pathogenic bacteria and molds in the corn cob contained culture medium is used in *Flammulina velutipes* cultivators.

In this study, we examined the possibility of the extracts isolated from fruit body of *Flammulina velutipes* cultivated with oriental herbal plants both to enhance anti-cancer effect and to act as a potent immunomodulator causing augmentation of immune cell activity in melanoma-bearing mice. The extract was prepared by adding the ethanol-soluble fraction(EFA : 14.35 %, EFB : 11.98 %) to the water with oligosaccharide, glucose and vitamin C. The mice were supplemented with EFA or EFB of the ethanol-soluble fraction for 4 weeks. Compared with the untreated control group, EFA and EFB significantly improved cytotoxicity of NK cells and Tc cells. In melanoma-bearing mice, EFA and EFB supplementation enhanced the decrease of both the tumor size ($p < 0.05$) and weight ($p < 0.05$). Also EFA and EFB administration increased the activity of NK cells ($p < 0.05$) and Tc cells ($p < 0.05$) and the IL-2, IL-6, TNF-alpha and IFN-gamma secretion from splenocytes, which seemed to contribute to the enhanced efficacy of anti-cancer. Interestingly, EFA increased the proportion of NK cells in the spleen. These results suggest that the extracts isolated from fruit body of *Flammulina velutipes* cultivated with oriental herbal plants may be a beneficial supplement for enhancing the anti-tumor efficacy.

For the bottle mushroom cultivation, 10% added concentration of medical sludges appeared to be proper. The mycelial growth of *Flammulina velutipes* was mostly vigorous when the moisture content of the culture medium was 65%, the mycelial cultivation temperature was 16°C, and the culture room humidity was 75%. According to the field cultivation results which added medical sludges by 8% and 10% into mushroom culture mediums, there was no significant differences between the two. Furthermore, an occurrence of mushroom pathogenic by mold and bacterial was not detected in both the control plot and the experimental plot. The mushroom yields were 283g, 278g, 269g for the control plot, CD-1(10%) and CD-2(8%) experimental plots respectively indicating that the control plot resulted slightly higher mushroom production. However, the occurrence ratios of deformity and the second-grade mushrooms were dominantly lower in the medical sludge-added experimental plots. In the fruit body characteristic review of *Flammulina velutipes*, the length of stipes was about 12.8cm and the diameters of stipes and pileus were 3mm and 9mm respectively. Moreover, the number of effective stipes was approximately 490 in both the control and experimental plots. The experimental plot which is medical sludge cultivated *Flammulina velutipes* had similar or slightly higher carbohydrate, protein, and saccharide compared to the control plot. Fat content was more than two times higher in the experimental plot than the control plot. Nevertheless, trans fat and cholesterol were not detect in any plots. I think, the most appropriate place for the use of medical sludges for mushroom medium was a small-scale *Flammulina velutipes* farm without an automated system. In addition, this cultivation method can be utilized for the on-bed cultured *Pleurotus ostreatus* mushroom, the bag cultured *Lentinus edodes* mushroom, the *Phellinus linteus* and the *Ganoderma lucidum* as well.

In this study, we examined the possibility of the extracts isolated from fruit body of *Flammulina velutipes* cultivated with oriental herbal plants both to enhance anti-cancer effect and to act as a potent immunomodulator causing augmentation of immune cell activity in melanoma-bearing mice. The extract was prepared by adding the ethanol-soluble fraction(EFA : 1%, EFB : 5%) to the water with other components. The mice were supplemented with EFA or EFB of the ethanol-soluble fraction for 4 weeks. Compared with the untreated control group, EFA and EFB significantly improved the activity of immune cells. In melanoma-bearing mice, EFB supplementation enhanced the decrease of both the tumor size ($p < 0.05$) and weight ($p < 0.05$) but EFA only suppressed the tumor size ($p < 0.05$) not tumor weight. But EFA and EFB administration not increased the activity of NK cells and Tc cells directly. EFA and EFB significantly increased the proliferation of spleen cells stimulated with Con A or LPS and the IL-6 secretion from splenocytes, but IL-2

secretion was only increased with EFB. The production of immunoglobulin G2a in the presence of the EFA increased progressively in the culture supernatant. These results suggest that the extracts isolated from fruit body of *Flammulina velutipes* cultivated with oriental herbal plants may be a beneficial supplement for enhancing the anti-tumor efficacy and the immune cell activity.

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 목적

버섯재배 농민들의 소득증대와 지역특화품목 개발을 위해, 한약재료를 이용한 한방 팽이버섯의 생산 방법을 확립하고, 한방 팽이버섯의 안정적 생산과 소비를 촉진시키기 위하여 에스앤제이바이오(주)와 공동으로 한방 팽이버섯을 이용한 면역증강 기능성 차와 음료를 개발한 후, 최종 기술 이전을 통해 상품화하고자 한다.

2. 연구개발의 필요성

1) 기술적 필요성

- 버섯은 독특한 향과 맛을 가진 기호성 식품으로 당질, 단백질, 비타민, 아미노산 등과 같이 인체에 중요한 각종 영양소를 골고루 함유하고, 광범위한 약리작용이 우수하여 기능성 식품 및 의약품 소재로 많이 이용되고 있다.
- 버섯의 약리작용으로는 항암작용, 혈당저하작용, 혈압조절작용, 콜레스테롤 저하작용 등 다양한 약리작용을 띠는 물질이 대부분 배당체인 것으로 보고되어 있다.
- 이와 같은 버섯 배당체는 인체에서 효율적으로 흡수·소화되지 않기 때문에 여러 종류의 발효미생물에 의해서 소화·흡수되기 쉬운 단당의 형태로 전환시키는 것이 중요한 것으로 생각한다.
- 본 연구팀이 산청지역의 특성을 고려하여 개발한 일반 팽이버섯의 차별화를 위해서 한약 재료를 이용하여 생산한 한방 팽이버섯의 기능적 특성을 명확히 규명함과 동시에, 버섯의 부가가치를 높이기 위한 2차 가공제품의 개발이 절실히 필요한 것으로 판단하여 한방 팽이버섯을 이용한 면역기능증진 차와 음료를 개발하고자 한다.
- 2007년 「산청군 신활력사업」으로 본 연구책임자와 산청 느타리버섯연합회가 「한방약재를 이용한 한방느타리버섯의 배지개발」에 이미 성공하여 각 농가에 그 기술을 보급하고 현재 산청느타리버섯연합회를 중심으로 「한방느타리버섯」을 생산하고 있다.

2) 경제 산업적 필요성

- 현재의 한국농업은 우루과이라운드(UR)에 이어 여러 나라들과의 자유무역협정(FTA)체결 등으로 농산물시장 개방이 급속히 이루어지고 있기 때문에 한국농업의 경영구조는 더욱더 어려워지고 있으며 실질 농업소득도 급격히 감소하는 추세이다.

- 버섯재배농가에서는 上品은 만족한 가격에 쉽게 출하되지만 많은 양의 中·下品은 판매 가격이 낮아 인건비도 충당하기 어려운 실정이다. 또한 이러한 中·下品の 버섯이 시장에 출하되면서 上品의 시장성도 떨어뜨려 안정적인 가격형성이 이루어지지 못하고 있기 때문에 中·下品 버섯의 이용 대책 개발이 절실히 요구된다.
- 그리고 최근 버섯산업은 다양한 버섯재배 방법의 개발, 자동화 생산라인의 보급, 버섯생산규모의 대형화 및 버섯생산농가의 증가 등으로 버섯이 과잉 생산·출하되고 있다.
- 이와 같은 여러 가지 현실을 고려해 볼 때 현재의 버섯산업을 유지시키기 위해서는 버섯생산량의 증대보다는 다양한 가공식품의 개발로 버섯소비량을 증대시켜 농가소득을 지속적으로 향상시키는 것이 더욱 시급한 것으로 생각되어 **한방 팽이버섯을 이용한 기능성식품인 면역증진 차와 음료의 개발**을 시도하고자 한다.

3) 국내외 및 지역의 현황과 문제점

- 버섯의 문화가 가장 발달한 일본은 다른 버섯 선진국들에 비해 식용으로 하는 버섯의 종류도 많고 다양한 버섯을 재배하고 있으며 1인당 이용률도 높다.
- 버섯의 가공에 있어 일본은 다양한 절임식품들이 많이 발달해 있으며 버섯의 배당체를 이용한 건강기능성식품 및 항암제까지 연구 개발하여 생산하고 있다. 근래에 들어 (주)아미노업화학에서 AHCC라는 균사체 분해 배당체 제품을 개발하여 세계적인 건강기능성식품으로 인정을 받고 있다.
- 국내 및 지역의 경우 일반적인 느타리버섯 재배는 폐면을 주배지로 미강 등의 부산물을 첨가하여 균상재배를 행하고, 팽이버섯은 톱밥 등을 이용하여 병 재배 중심으로 버섯을 생산하고 있으나 본 연구자들은 한방약재 및 한방슬러지를 이용한 한방버섯의 재배방법 및 생산기술을 개발하였다.
- 1990년도 중반 큰 느타리버섯의 인공재배 방법의 개발로 버섯농가 수익이 증대하는 현상을 보였으나, 최근 과잉생산에 따른 가격하락 등의 문제점이 발생하고 있으나 이에 대한 효과적인 대책이 없다.
- 버섯자실체는 선식, 버섯죽, 버섯김치, 스넥, 소세지 및 맛살 등의 가공제품 제조 시 부원료로 약간 이용되고 있는 실정이며, 대부분이 가공되지 않은 생버섯으로 출하되고 있다.
- 상황버섯, 아가리쿠스 및 동충하초 등과 같은 약용버섯의 경우는 곡류배지를 사용한 균사체 배양 용액을 버섯음료제품(버섯요구르트 등) 등으로 가공하여 시판하고 있으나 이는 버섯자실체를 이용하지 않기 때문에 버섯농가에 직접적인 이익을 준다고 말할 수 없다.

3. 과제별 연구개발의 목표 및 내용

연구개발 목표 :

제 1세부과제 : 한약재료를 이용한 한방 팡이버섯 배지 개발 및 버섯 생산

1차년도 : 한약재료를 이용한 팡이버섯의 배지개발

- 한약재의 전처리 방법 및 종류 선정
- 선정 한약재의 성분 및 물성 측정
- 한약재가 팡이버섯의 균사성장에 미치는 영향 검토
- 한약재 첨가 팡이버섯 최적배지조성의 확립

2차년도 : 항균미생물에 의한 팡이버섯 병원균의 생육억제

- 팡이버섯 병원성 균주의 분리
- 버섯병원성 균주에 대한 항균 미생물의 분리 및 동정
- 한약재와 팡이버섯 병원성 균주 및 분리한 항균미생물과의 생육관계 검토
- 항균미생물의 대량배양 및 처리방법 확립.

3차년도 : 한약재 첨가배지를 이용한 한방 팡이버섯의 생산

- 한약재 첨가배지에서 팡이버섯의 최적생육조건 확립
- 한방팡이버섯의 품질평가 및 생산량 비교
- 한약재 첨가배지의 경제성 분석

제 1 협동과제 : 한방 팡이버섯 및 버섯 가공제품에 대한 면역기능성 검증

1차년도 : 한방 팡이버섯의 성분 분석 및 면역증강 활성 검증

- 일반 팡이버섯과 한방 팡이버섯의 성분 및 면역활성 비교 분석
- 제품 원료인 배당체에 대한 면역증강 활성 규명

2차년도 : 시제품 원료에 대한 면역증강 및 항암 활성 검증

- 1차 시제품에 대한 면역증강 활성 분석
- 1차 시제품에 대한 항암 효과 분석

3차년도 : 완전 시제품의 안전성 및 면역증강 활성 검증

- 완전 시제품에 대한 안전성 분석
- 완전 시제품에 대한 항알레르기 효과 분석

제 2협동과제 : 한방 팽이버섯을 이용한 기능성 식품개발 및 상품화

1차년도

- : 한방 팽이버섯으로부터 면역활성물질 제조조건 확립
- 한방 팽이버섯을 이용한 다량 함유된 배당체 추출조건 확립
 - 한방 팽이버섯으로부터 수지흡착법을 이용한 배당체의 대량 분리

2차년도

- : 한방 팽이버섯을 이용한 茶의 제조조건 확립
- 고형물의 배합성분 및 비율선정
 - 배합성분에 대한 茶 제조의 제형 테스트
 - 차의 구성물에 따른 과립茶 제조공정 및 제조조건 모색
 - 한방 팽이버섯을 이용한 최종 과립茶 시제품 개발
 - 시제품에 대한 관능 및 기호도 평가
 - 최종 시제품에 대한 상품화 추진

3차년도

- : 한방 팽이버섯으로부터 면역증강 기능성 음료의 제조조건 확립
- 면역활성 관련 부용제 선별 테스트
 - 한방 팽이버섯의 배당체와 부용제의 조성배합에 따른 음료의 제형 테스트
 - 한방 팽이버섯의 배당체를 이용한 면역증강 1차 3종의 시제품 제작
 - 1차 3종의 시제품에 대한 관능 및 기호도 평가
 - 3종 시제품의 면역활성 검증 결과에 따른 최종 시제품 제작
 - 최종 시제품에 대한 상품화 추진

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황

(가) 국내 제품생산 및 시장 현황

① 주요 버섯의 생산비중과 순위

성장특성	품목	2004		
		생산량(M/T)	비중(%)	순위
성장추세	양송이	24,053	12.7	5
	(표고)	(38,123)	(19.4)	(2)
	생표고	24,397	12.4	4
	팽이	32,736	16.7	2
	새송이	32,736	16.7	3
	기타 농산버섯	11,123	5.7	7
	소계	125,105	63.8	
성장정체	느타리	52,211	26.6	1
	능이	39	0.0	12
	건표고	1,923	7.3	6
	소계	65,975	33.6	
축소추세	영지	3,680	1.8	8
	목이	6	0.0	13
	송이	386	0.2	10
	원목 느타리	833	0.4	9
	기타 임산버섯	199	0.1	11
	소계	5,104	2.6	
총계		195,184	100.0	

* ()는 건표고를 생표고로 환산한 다음 생표고와 합산한 수치임

- 성장추세에 있는 버섯의 총생산량이 63.8%이고, 성장률이 약간 정체된 버섯의 비중이 33.6%여서 전체 버섯산업은 성장기에 있다고 볼 수 있다.
- 생산량이 가장 많은 느타리의 생산은 정체되어 있지만 표고와 송이, 팽이 등 다른 버섯들이 이를 대체하고 있다.

② 국내 버섯의 수급구조

[단위: 톤, (%)]

구분	수급량	공급		수요	
		생산	수입	소비	수출
2001	190,303	164,552(86.5)	25,751(13.5)	187,499(98.5)	2,804(1.5)
2002	208,633	180,018(86.3)	28,615(13.7)	204,695(98.1)	3,938(1.9)
2003	215,439	182,167(84.6)	33,272(15.4)	210,649(97.8)	4,790(2.2)
2004	228,584	196,184(85.8)	32,400(14.2)	225,336(98.6)	3,248(1.4)

- 버섯 수요의 99.0%는 국내 수요로 2001-2004년 연평균 6.7%의 빠른 성장을 하고 있으며 수출 수요는 2,000만톤, 전체의 1% 정도에 불과함.
- 2004년 버섯시장의 규모는 8,863억원이며 이 가운데 내수 시장은 8,593억원으로 97.0%, 수출시장은 3%, 270억원임.
- 수출의 경우 송이, 팽이, 새송이는 신선 상태로 수출되고, 표고와 아가리쿠스류, 상황버섯 등은 대개 가공 상태에서 수출됨.

(나) 국외 제품생산 및 시장 현황

① 일본 팽이버섯의 연도별 생산동향

연도	생산량(톤)	생산액(억엔)	비고(주요산지)
2002	110,444	351	나가노, 니이가타, 후쿠오카, 홋카이도, 오이타
2003	110,185	315	
2004	112,997	323	
2005	114,542	306	
2006	114,630	362	

자료)임야청

- 팽이버섯은 매년 생산량이 증가되고 있으며, 생산액은 역으로 감소를 나타내고 있음.
- 도쿄도중앙도메시장의 팽이버섯의 도매수량은 매년 약간 증가경향을 나타내고 있으며, 2007년에는 전년비 2.4% 증가를 나타냈음.
- 2007년 한국산은 전체 수입량의 9.3%를 차지하고 있고 물량은 매년 감소추세를 보임.

- 현재 일본에서 고품질로 가공되어 생산되고 있는 팽이버섯 제품으로는 소주, 조림, 야생종 조림, 구운김 조림, 절임 및 음료 등이 있음.
- 미국의 버섯류 생산은 중국 다음으로 많아 세계 생산량의 16%를 차지하고 있으며, 연간 생산량은 약 38만 4000톤, 생산액은 9억 달러에 달함.
- 미국의 전체 버섯류 생산의 95% 차지하고 있는 버섯은 아가리쿠스 버섯이며, 생산액은 연간 8억 6000만달러에 이룸.

② 일본의 연도별 기타버섯류(송이버섯, 표고버섯 제외) 수입현황

(단위 : 톤, 백만엔, 엔/kg)

구 분	2004			2005			2006			2007		
	물량	금액	단가	물량	금액	단가	물량	금액	단가	물량	금액	단가
전 체	317	206	650	220	212	967	109	192	1,757	73	187	2,578
한 국	13	3	269	3	2	729	24	12	517	8	2	365
중 국	248	61	247	141	35	250	22	16	744	14	14	999
뉴질랜드	2	2	871	10	8	826	5	4	737	-	-	-
프 랑 스	28	72	2,553	27	69	2,605	22	52	2,240	30	81	2,718
이탈리아	12	42	3,457	13	43	3,368	13	50	3,773	14	61	4,452
러 시 아	3	5	2,168	6	16	2,703	5	13	2,966	1	3	3,178
캐 나 다	7	8	1,094	10	12	1,184	8	8	1,078	1	4	3,144
미 국	2	3	1,678	3	6	2,018	1	1	2,337	2	5	2,250

자료) 재무성 무역통계

- 일본에서 한국산 팽이버섯은 2007년 전체 수입량의 9.3%를 차지하고 있고 품질의 문제점으로 물량은 매년 감소세이며, 단가는 2005년을 절정으로 낮은 가격대를 나타내고 있음.

- 한국산 단가 : ('04) 269엔 → ('05) 729엔 → ('06) 517엔 → ('07) 365엔

- 중국산 단가 : ('04) 247엔 → ('05) 250엔 → ('06) 744엔 → ('07) 999엔

- 물량면에서 가장 많은 중국산은 2004년~2005년까지는 전체의 약 75%를 차지했으나 2006년부터 대폭 감소를 나타내고 있음. 단가는 250엔대가 계속되었으나 2007년의 물량감소로 약 1,000엔대를 나타냈음.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 이론적, 실험적 접근방법

가. 연차별 연구개발 수행 접근방법

(1) 1차년도(2009년) 연구개발 수행 접근방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
한약재료를 이용한 한방 팽이버섯 배지 개발	<p>이론적 접근방법 : 일반적으로 팽이버섯 배지 조성물은 콘코프, 비트펠프, 미강, 면실크, 밀기울, 톱밥등을 일정 비율로 섞어 배지를 제조함</p> <p>실험적 접근방법 : 일반 배지 조성물에 한방 슬러지의 첨가 비율에 따른 2종 조성물과 대조군의 가장 적합한 배지 조성물을 선정함</p>	<p>시내의 한의원 등에서 수거한 폐한방슬러지의 전처리조건, 첨가비율, 일반성분, 특성 및 한방 슬러지가 팽이버섯 균사생육에 미치는 영향 등을 검토하여 팽이버섯 배지로의 사용 여부를 확인한 다음 폐한방슬러지 첨가 팽이버섯의 최적배지 조성을 확립하였음</p>
한약재료를 이용한 한방 팽이버섯의 재배 및 생산	<p>이론적 접근방법 : 기존 팽이버섯 농가를 통해 한방 슬러지를 건조 파쇄하여 가장 적합한 조성물과 일반적 팽이버섯 재배방법에 대해 비교분석함</p> <p>실험적 접근방법 : 산업적 버섯 재배 농가를 통해 일반적 팽이버섯 재배방식을 control군, 시험 2군을 선정하여 생산량 및 발육상태를 통해 비교분석함</p>	<p>확립된 폐한방슬러지 첨가 팽이버섯 배지를 이용하여 경북에 위치한 팽이버섯 재배 농가에서 한방팽이버섯 생산을 위한 버섯 재배를 실시하면서 팽이버섯의 생산량, 기형버섯 발생율, 버섯의 생육부진 현상 및 팽이버섯질병(세균성 및 곰팡이 질병) 등의 발생을 검토하였음</p>
한방 팽이버섯을 이용한 다량 함유된 배당체 추출조건 확립	<p>이론적 접근방법 : 한방 팽이버섯으로부터 다량의 배당체를 분리하기위해 팽이버섯을 잘게 절편하고 80℃에서 3시간 2회 환류냉각 추출함</p> <p>실험적 접근방법 : 한방 팽이버섯의 함량을 측정하고 일반적으로 물추출과 70% ethanol 추출물을 통해 가장 어떤 추출이 가장 많은 배당체를 취할 수 있는지 환류냉각 추출하여 비교분석함</p>	<p>일반적 팽이버섯 재배방식을 control군과 한방 슬러지를 이용하여 재배한 시험군 2군에 대해 조배당체를 추출하기위해 각각의 군에 대해 환류냉각 추출한 후 오픈 칼럼을 사용하여 수지는 daion HP-20을 사용하고 용매는 주정을 사용하여 조배당체를 분리함</p>
한방 팽이버섯으로부터 수지흡착법을 이용한 배당체의 대량 분리	<p>이론적 접근방법 : 환류냉각 추출물을 감압농축하고 그 여액을 여과한 후 저온 침지법을 이용하여 배당체를 분리함</p> <p>실험적 접근방법 : 환류냉각 물추출물과 70% ethanol 추출물을 감압농축하고 그 여액을 HP-20(이온교환수지)을 사용하여 배당체 부분(수용성)과 100% ethanol 부분(지용성)으로 나누어 취하고 감압농축하여 분리함</p>	<p>산업적으로 한방 슬러지를 이용한 배당체를 대량 분리하기위해 대량 오픈 칼럼을 제작하고 이에 대한 작업의 효율성을 높일 제작도면을 제작하였음. 또한 참여기업에서 식품첨가물 제조허가를 추진 중에 있음</p>
일반 팽이버섯과 한방 팽이버섯의 면역활성 비교 분석	<p>이론적 접근방법 : 상기의 방법을 통해 분리된 배당체와 ethanol 추출물에 대한 면역세포에 대한 활성측정하여 가장 활성이 높은 소재로 시제품 생산 원료로 사용함</p> <p>실험적 접근방법 : 일반적 재배방식을 이용한 팽이버섯과 한방 슬러지를 이용한 시험2군에 따른 면역세포에 대한 활성을 측정하여 가장 활성이 좋은 군을 원료로 사용함</p>	<p>시험군 3종에 대한 항산화 및 면역활성을 실험한 결과 control군보다 한방 슬러지를 이용한 팽이버섯에서 항산화 및 면역활성이 있는 것으로 나타났으며, 그중 한방 슬러지 및 미강첨가군에서 가장 효과가 높은 것으로 나타남. 따라서 차년도 “茶” 제조시 한방 슬러지 및 미강첨가군 팽이버섯을 이용하여 차를 제조하고자함</p>
일반 팽이버섯과 한방 팽이버섯의 성분 비교 분석	<p>이론적 접근방법 : 팽이버섯으로부터 분리한 배당체와 그 여액의 농축에 대한 성분 비교 분석함</p> <p>실험적 접근방법 : 이온교환수지를 이용하여 분리된 팽이버섯 배당체와 ethanol 추출물에 대한 성분 비교 분석함</p>	<p>일반성분은 실험군의 차이점이 없었으나, 한방 슬러지 및 미강을 첨가한 실험군에서 무기성분이 가장 낮게 나타났음. 또한 시험군 3종에 대한 유해성 금속검사에서는 아무런 이상이 없음을 확인함</p>

(2) 2차년도(2010년) 연구개발 수행 접근방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
- 버섯병원성 균주에 대한 항균 미생물의 분리 및 동정	<p>이론적: carboxy methyl cellulase (CMCase), protease 및 amylase 활성이 높고 버섯질병균주에 대하여 생육억제력이 4a강하면서 버섯의 생육에는 영향을 미치지 않는 항균미생물을 순수분리하고자함</p> <p>실험적: 팽이버섯 질병균주는 팽이버섯의 오염된 배지를 수거하여 PDA 평판배지에 도말하여 성장하는 곰팡이의 콜로니 색상, 형태 및 성장속도 등을 육안으로 관찰하여 순수분리 하였다.</p>	<p>분리균주의 동정을 위한 형태학적 및 생화학적특성을 검토하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 및 Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th에 준하여 1차 동정한 다음 16S rDNA 유전자 분석을 행하여 동정하였다.</p>
- 한약재와 팽이버섯 병원성 균주 및 분리한 항균미생물과의 생육관계 검토	<p>이론적: 1차 선별한 균주를 액체배지에서 효소활성을 검토하여 2차 선별한 다음 버섯질병균주에 대한 항균활성이 높으면서 버섯의 생육의 형태학적 관찰하고자함</p> <p>실험적:corker borer No.5 (직경 7 mm)를 이용하여 평판배지 상에 구멍을 뚫은 다음 분리한 항균미생물의 배양용액을 120 μl 접종한 후 25℃에서 72시간까지 대치배양하면서 버섯질병균주의 균사성장 억제 정도(inhibition zone)를 관찰하였다.</p>	<p>최종 선정한 HJ-57항균미생물을 동정하여 <i>Bacillus</i> sp. HJ-57로 명명하고 최적 배지성분을 검토한 결과 탄소원은 3% starch, 질소원은 1% NH₄NO₃, 무기염은 0.05% CaCl₂인 것으로 밝혀졌으며, 배지의 초기 pH는 pH 7, 배양온도는 35℃, 진탕속도는 160 rpm이 최적인 것으로 나타났다</p>
- 항균미생물의 대량배양 및 처리방법 확립.	<p>이론적: 항균미생물을 대량 배양하기위해서는 배지조성과 배양조건에 대해 조사하고자함</p> <p>실험적: 배지조성의 탄소원, 질소원, 무기염, 배양조건에 대한 생육형태를 관찰하였음</p>	<p>배양 6시간까지의 유도기를 지나 배양 18시간째까지 급격하게 균체가 증식하고 배양 27시간을 전후하여 사멸기를 나타내었음. 그리고 항균물질은 12시간째의 배양용액에서도 버섯 질병균주에 대하여 약간의 항균활성을 나타내었으나 배양 24시간 이후부터는 항균활성이 급격히 증가하여 배양 72시간까지 유지되었음</p>
- 1차 시제품에 대한 면역증강 활성 분석	<p>이론적: 동물에게 식용으로 먹었을 때 비장세포를 통해 면역활성을 측정하여 가장 적합한 복용량을 알고자함</p> <p>실험적: 마우스에게 2차시제품을 경구투여하고, 그 마우스의 혈액을 통해 백혈구와 적혈구관련 관찰하고, 비장세포중식과 비장세포 cytokine 그리고 세포 표면분자 측정을 통해 면역활성을 분석하였음</p>	<p>실험시료를 4주간 매일 1회 투여한 결과, 위에서 행한 여러 가지 실험항목에서 통계학적인 유의한 변화는 없는 것으로 나타나, 면역기능을 활성화시키는 통계학적인 유의한 효과는 확인할 수 없었지만, 장기간 투여에 의한 유의한 독성효과도 나타나지 않았음</p>
- 1차 시제품에 대한 항암 효과 분석	<p>이론적: 동물에게 식용으로 먹었을 때 마우스의 피하조직에 암유발 물질을 투여 후 그 암조직의 변활을 알아보고자함</p> <p>실험적:팽이버섯의 경구투여 후 자연살해세포 및 세포독성 T세포의 세포독성을 측정하고 그 세포의 형태학적 관찰하였음</p>	<p>실험시료 A와 B를 투여한 후에 암세포를 피하주사하여 실험한 결과, 종양세포의 크기와 무게를 억제시키는 효과, 사이토카인 IL-2, IL-6, IFN-γ, TNF-α의 분비량을 증가시키는 효과, 자연살해세포(Natural killer cell, NK1.1+)의 수를 증가시키는 효과, 그리고 자연살해세포와 항원 특이적인 세포독성 T세포의 세포독성 활성을 증가시키는 효과있는 것은 나타남</p>
- 고형물의 배합성분 및 비율 선정	<p>이론적: 주원료와 잘 어울리고 관능성을 좋게 해줄 수 있는 부용제를 선별하고 그중 가장 제형테스트에 적합한 시료를 선별하고자함</p> <p>실험적: 주원료(팽이버섯 배당체)와 부용제 배합성분에 따른 점성도, Brix에 대해 측정하고 제형테스트에 적합한지 분석하였음</p>	<p>한방 슬러지를 이용한 팽이버섯으로부터 배당체를 분리하고, 그 추출물 11.98%, 탈지분유 15.3%, 포도당 72.01%, 비타민 C 0.71%로 비율 선정하였음</p>
- 배합성분에 대한 제형 테스트	<p>이론적: 주원료의 수분함량을 측정하고 동결건조하여 분말상태로 취한 후 부용제의 배합율에 따른 제형테스트를 하고자함</p> <p>실험적: 수분에 따른 당성분의 응집성으로 모든 부용제는 분말상태에서 당농축액과 정적 배합하여 과립 1차 성형하였음</p>	<p>팽이버섯의 배당체의 점성도로 인해 동결건조에 따른 과립차제조의 문제점을 확인하고, 수분 첨가 함량 30mL/100g로 과립형태로 제형을 만듦</p>
- 한방 팽이버섯을 이용한 최종 과립차 시제품 개발	<p>이론적: 영양성분, 원재료와 부재료 함량 총칼로리, 1일 복용량을 조사하고자함</p> <p>실험적: 1협동과제의 활성테스트에 의거하여 재료의 배합비 조성 후 최종 시제품 생산하고자함. 또한 최종시제품에 대한 영양학적 분석, 총칼로리, 지표물질 함량을 측정하고자함.</p>	<p>최종 4종의 시제품을 만들어 제형테스트한 결과 2종 시제품에서 과립차로서의 제형을 유지하지 못하였으며, 그중 팽이버섯 배당체의 5.0%와 11.98%의 두 개의 과립차 제조하여 알루미늄 파우치로 포장하였음. 2종의 최종 시제품에 대한 관능적 평가 결과 색도, 맛과 향에 대한 5진법에 대한 평가 수치는 3.8로 나타났음</p>

(3) 3차년도(2011년) 연구개발 수행 접근방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
- 한약재 첨가배지에서 팽이버섯의 최적생육조건 확립	<p>이론적: carboxy methyl cellulase (CMCase), protease 및 amylase 활성이 높고 버섯질병균주에 대하여 생육억제력이 4a강하면서 버섯의 생육에는 영향을 미치지 않는 항균미생물을 순수분리하고자함</p> <p>실험적: 팽이버섯 질병균주는 팽이버섯의 오염된 배지를 수거하여 PDA 평판배지에 도말하여 성장하는 곰팡이의 콜로니 색상, 형태 및 성장속도 등을 육안으로 관찰하여 순수분리하였다.</p>	<p>분리균주의 동정을 위한 형태학적 및 생화학적특성을 검토하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 및 Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th 에 준하여 1차 동정한 다음 16S rDNA 유전자 분석을 행하여 동정하였다.</p>
- 한방팽이버섯의 품질평가 및 생산량 비교	<p>이론적: 1차 선별한 균주를 액체배지에서 효소활성을 검토하여 2차 선별한 다음 버섯질병균주에 대한 항균활성이 높으면서 버섯의 생육의 형태학적 관찰하고자함</p> <p>실험적: corker borer No.5 (직경 7 mm)를 이용하여 평판배지 상에 구멍을 뚫은 다음 분리한 항균미생물의 배양용액을 120 μl 접종한 후 25℃에서 72시간까지 대치배양하면서 버섯질병균주의 균사성장 억제 정도(inhibition zone)를 관찰하였다.</p>	<p>최종 선정한 HJ-57항균미생물을 동정하여 <i>Bacillus</i> sp. HJ-57로 명명하고 최적 배지성분을 검토한 결과 탄소원은 3% starch, 질소원은 1% NH₄NO₃, 무기염은 0.05% CaCl₂인 것으로 밝혀졌으며, 배지의 초기 pH 는 pH 7, 배양온도는 35℃, 진탕속도는 160 rpm이 최적인 것으로 나타났다</p>
- 한약재 첨가배지의 경제성 분석	<p>이론적: 항균미생물을 대량 배양하기위해서는 배지조성과 배양조건에 대해 조사하고자함</p> <p>실험적: 배지조성의 탄소원, 질소원, 무기염, 배양조건에 대한 생육형태를 관찰하였음</p>	<p>배양 6시간까지의 유도기를 지나 배양 18시간째까지 급격하게 균체가 증식하고 배양 27시간을 전후하여 사멸기를 나타내었음. 그리고 항균물질은 12시간째의 배양용액에서도 버섯 질병균주에 대하여 약간의 항균활성을 나타내었으나 배양 24시간 이후부터는 항균활성이 급격히 증가하여 배양 72시간까지 유지되었음</p>
- 1차 시제품에 대한 면역증강 활성 분석	<p>이론적: 동물에게 식용으로 먹었을 때 비장세포를 통해 면역활성을 측정하여 가장 적합한 복용량을 알고자함</p> <p>실험적: 마우스에게 2차시제품을 경구투여하고, 그 마우스의 혈액을 통해 백혈구와 적혈구관련 관찰하고, 비장세포중식과 비장세포 cytokine 그리고 세포 표면분자 측정을 통해 면역활성을 분석하였음</p>	<p>실험시료를 4주간 매일 1회 투여한 결과, 위에서 행한 여러 가지 실험항목에서 통계학적인 유의한 변화는 없는 것으로 나타나, 면역기능을 활성화시키는 통계학적인 유의한 효과는 확인할 수 없었지만, 장기간 투여에 의한 유의한 독성효과도 나타나지 않았음</p>
- 1차 시제품에 대한 항암 효과 분석	<p>이론적: 동물에게 식용으로 먹었을 때 마우스의 피하조직에 암유발 물질을 투여 후 그 암조직의 변활을 알아보고자함</p> <p>실험적: 팽이버섯의 경구투여 후 자연살해세포 및 세포독성 T세포의 세포독성을 측정하고 그 세포의 형태학적 관찰하였음</p>	<p>실험시료 A와 B를 투여한 후에 암세포를 피하주사하여 실험한 결과, 종양세포의 크기와 무게를 억제시키는 효과, 사이토카인 IL-2, IL-6, IFN-γ, TNF-α의 분비량을 증가시키는 효과, 자연살해세포(Natural killer cell, NK1.1+)의 수를 증가시키는 효과, 그리고 자연살해세포와 항원 특이적인 세포독성 T세포의 세포독성 활성을 증가시키는 효과있는 것은 나타남</p>
- 한방 팽이버섯의 배당체와 부용제의 조성배합에 따른 음료의 유형 테스트	<p>이론적: 주원료와 잘 어울리고 관능성을 좋게 해줄 수 있는 부용제를 선별하고 그 중 가장 제형테스트에 적합한 시료를 선별하고자함</p> <p>실험적: 주원료(팽이버섯 배당체)와 부용제 배합성분에 따른 점성도, Brix에 대해 측정하고 제형테스트에 적합한지 분석하였음</p>	<p>일반적으로 비타민 음료에 가장 많이 사용하는 것이 비타민 B1, B12, 비타민 C가 많이 사용되지만 본 개발 시제품은 다양한 비타민류를 함유하고 있으며, 천연소재의 팽이버섯 배당체로 단맛을 함유한 음료의 조성물을 선별하였음.</p>
- 팽이버섯의 배당체를 이용한 면역증강 시제품 제작	<p>이론적: 주원료의 수분함량을 측정하고 동결건조하여 분말상태로 취한 후 부용제의 배합율에 따른 제형테스트를 하고자함</p> <p>실험적: 수분에 따른 당성분의 응집성으로 모든 부용제는 분말상태에서 당농축액과 정적 배합하여 과일 1차 성형하였음</p>	<p>팽이버섯 추출을 이용한 일반 차음료와 비타민음료를 만들어 보았으나, 관능평가 결과 좋지 못해 팽이버섯 배당체 5%를 주원료로 이용한 비타민 음료 데시퍼를 1차 시제품으로 개발하였음.</p>
- 최종 비타민음료 시제품에 대한 상품화 추진	<p>이론적: 영양성분, 원재료와 부재료 함량 총칼로리, 1일 복용량을 조사하고자함</p> <p>실험적: 1협동과제의 활성테스트에 의거하여 재료의 배합비 조성 후 최종 시제품 생산하고자함. 또한 최종시제품에 대한 영양학적 분석, 총칼로리, 지표물질 함량을 측정하고자함.</p>	<p>최종 시제품은 팽이버섯의 배당체 함유량 1-5% 모두 활성이 유의하게 있는 것으로 나타났다으며, bland test 결과 버섯의 비린맛이 없어 먹기 편하고 비타민 음료의 타우린 맛이 부드럽게 느껴진다는 의견이 많았음.</p>

2. 연구내용

가. 연차별 연구개발 목표 및 연구개발 수행내용

(1) 1차년도(2009년) 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	한약재료를 이용한 팽이버섯의 배지 개발	한약재료를 이용한 한방 팽이 버섯 배지 개발	100	팽이버섯으로부터 종균을 분리하 고, 한방 슬러지를 이용하여 팽이 버섯의 배지 조성물에 대한 비교분 석하였음.
		한약재료를 이용한 한방 팽이 버섯의 재배 및 생산	100	청도 농가를 통해 일반 팽이버섯 와 한방 슬러지를 이용한 팽이버섯 의 성장 속도 및 형태학적 비교 분 석하였음.
	한방 팽이버섯의 성분분석 및 면역 증강 활성 검증	일반 팽이버섯과 한방 팽이버 섯의 성분 및 면역활성 비교 분석	100	일반 팽이버섯과 한방 팽이버섯의 중금속 함량 비교분석과 면역활성 에 대한 검증 비교분석하였음.
		제품 원료인 배당체에 대한 면 역증강 활성 규명	100	일반 버섯의 배당체와 한방 슬러지 의 배당체 성분에 대한 면역활성에 대한 검증 및 비교분석하였음.
	한방 팽이버섯으로 부터 면역활성물질 제조조건 확립	한방 팽이버섯을 이용한 다량 함유된 배당체 추출조건 확립	100	일반 버섯과 한방 슬러지를 이용해 재배한 한방 팽이버섯으로부터 배 당체 분리조건 확립 및 수율함량을 비교 분석하였음.
		한방 팽이버섯으로부터 수지흡 착법을 이용한 배당체의 대량 분리	100	대형 오픈칼럼을 통해 한방 슬러지 를 이용한 팽이버섯

(2) 2차년도(2010년) 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 연도 (2010)	(주관기관) 항균미생물에 의한 팽이버섯 병원균의 생육 억제	- 버섯병원성 균주에 대 한 항균 미생물의 분 리 및 동정	100	- 항균미생물 및 버섯질병균주의 분리 - 항균미생물의 동정
		- 한약재와 팽이버섯 병 원성 균주 및 분리한 항균미생물과의 생육 관계 검토	100	- 항균활성 측정 - 최적 배지조성과 배양조건 확립
	(제1협동) 시제품 원료에 대한 면역증강 및 항암 활성 검증	- 1차 시제품에 대한 면 역증강 활성 분석	100	- In vivo 실험을 통한 혈액학적 분석 - 비장세포증식 측정 - 비장세포 cytokine측정법 - 세포 표면분자 분석
		- 1차 시제품에 대한 항 암 효과 분석	100	- 자연살해세포 및 세포독성 T세포의 세포독성 측정 - B16F0 종양 크기 및 무게 측정
	(제2협동) 한방 팽이버섯 을 이용한 차의 제조조건 확립	- 고형물의 배합성분 및 비율선정	100	- 부재료에 대한 성분배합 비율 선정 - 선정 배합율에 따른 점성도 검사
		- 배합성분에 대한 차 제조의 제형 테스트	100	- 배합성분에 따른 과립차 1차 제형테스트 - 관능적 평가 후 2차 제형테스트
		- 한방 팽이버섯을 이용 한 최종 과립 차 시제 품 개발	100	- 과립차 제종공정에 따른 1차 시제품 생산 - 제형 결과와 관능적 평가에 따른 2차 시제품 생산

(3) 3차년도(2011년) 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 연도 (2011)	(주관기관) 한약재 첨가배지를 이용한 한방 팥이버섯의 생산	- 한약재 첨가배지에서 팥이버섯의 최적생육조건 확립	100	- 병 재배에서 한방 슬러지 최적 첨가농도 - 버섯배지 중의 수분 - 균사 배양온도의 영향 - 배양실 습도의 영향
		- 한방팥이버섯의 품질평가 및 생산량 비교	100	- 팥이버섯의 재배 - 수확시의 자실체 특성 - 수확한 자실체의 경도 - 폐한방슬러지를 이용한 팥이버섯의 영양분석 - 팥이버섯 중의 중금속분석
		- 한약재 첨가배지의 경제성 분석		- 콘코프 대응으로 10% 폐한방슬러지 사용 될 경우 경제분석 - 폐한방슬러지 함유 배지 제조시 소요경비 - 경북지역의 한방 의료기관 분포 현황
	(제 1협동) 시제품 원료에 대한 면역증강 및 항암 활성 검증	- 1차 시제품에 대한 면역증강 효과 분석	100	- In vivo 실험을 통한 혈액학적 분석 - 비장세포증식 측정 - 비장세포 cytokine측정법 - 세포 표면분자 분석
		- 1차 시제품에 대한 항암 활성 효과 분석	100	- 자연살해세포 및 세포독성 T세포의 세포독성 측정 - B16F0 종양 크기 및 무게 측정
	(제 2협동) 한방 팥이버섯으로부터 면역증강 기능성 음료의 제조조건 확립	- 한방 팥이버섯의 배당체와 부용제의 조성배합에 따른 음료의 유형 테스트	100	- 음료 유형에 따른 부용제 성분 테스트 ① 한방 슬러지를 이용한 팥이버섯으로부터 배당체 제조 ② 음료 유형에 따른 부용제 선별 - 선별된 부용제를 이용한 레시피 조정 ① 차음료로 선별된 부용제 레시피 ② 비타민음료로 선별된 부용제 레시피
		- 팥이버섯의 배당체를 이용한 면역증강 시제품 제작	100	- 팥이버섯의 배당체를 이용한 면역증강 비타민 음료 시제품 제조 공정도 - 비타민 음료 시제품 주원료 팥이버섯으로부터 분리된 배당체의 품질 안정성
		- 1차 3종의 시제품에 대한 관능 및 기호도 평가	100	- 최종 비타민 시제품 음료에 대한 관능평가 및 기호도 조사 결과 분석
		- 최종 비타민음료 시제품에 대한 상품화 추진	100	- 최종 비타민음료 레시피 선정 - 최종 시제품에 대한 안정성 검사 - 최종 비타민음료 시제품 제작

3. 연구결과

가. 제 1세부과제 연구방법 및 결과

1. 재료

1) 공시균주 및 배지

본 실험에 사용하는 팽이버섯(*Flammulina velutipes*)은 농업진흥청에서 분양받아 사용하고, 팽이버섯의 질병균주인 세균과 곰팡이는 직접 분리하여 사용한다. 팽이버섯 및 곰팡이의 보존을 위한 배지는 PDA(potato dextrose agar), 세균의 보존배지는 NA(nutrient agar)배지를 사용한다.

2) 시험재료

한약재는 지리산 권역에서 다량 재배 및 생산되는 두충, 지리오갈피, 쑥 및 홍화대 등을 구입하여 사용하고, 한방부산물은 당제원 및 인근의 한의원에서 폐기처리 되는 것을 구입하여 사용한다. 그리고 이 이외의 톱밥 등의 팽이버섯 배지재료는 함양군 지곡면 도촌리 소재의 물레방아 팽이버섯 농가에서 사용하는 재료를 기준으로 한다.

2. 실험방법

1) 한방재료의 선정

구입한 한방재료 즉, 두충, 지리오갈피, 홍화대, 쑥 및 한방부산물을 건조시켜 150mesh로 분쇄한 후 PDA 및 NA배지에 각각 3%(w/w)씩 첨가하여 120℃, 15분 가압 멸균한 다음 petri dish에 분주하여 평판배지를 제조한다. PDA 평판배지에는 팽이버섯 및 *Trichoderma* sp. 곰팡이를 코르크볼 No. 3(직경 5mm) 이용하여 접종하여 28℃에서 배양하고, NA 평판배지에는 백금을 이용하여 *Pseudomonas tolaasii*를 접종하여 35℃에서 배양하면서 그 생육정도를 관찰한다.

2) 한방재료의 물성측정

① 한방재료의 pH 측정

150mesh로 분쇄한 각각의 한방재료 10 g를 멸균 증류수 90mL에 혼합한 후 90분 동안 실온에서 강하게 진탕시킨 다음 12,000×g, 15분 동안 원심분리하여 얻은 상등액의 pH를 측정한다.

② 한약재의 보수도 측정

건건중량 10g의 한약재를 감압 하에서 증류수에 60분 동안 침지시켜 강제적으로 수분을 한

약재 조직 속으로 침투시킨 후 1G1 glass filter에 옮겨, 600×g, 1분 동안 원심탈수 시킨 다음 그 중량을 측정하여 전건중량과의 차이로부터 보수도를 계산한다.

③ 한약재의 탈수율 측정

한약재를 증류수에 침지하여 70%의 함수율이 되게 한 후 glass filter에 옮겨 원심분리 시킨 후 탈수되어지는 수분량을 측정하여 백분율로 산출한다.

3) 한방재료의 발효조건

팽이버섯의 배지인 톱밥에 미강을 첨가한 다음 한방재료인 두충, 지리오갈피, 홍화대 및 한방부산물들 각각 세절한 상태와 분쇄한 상태로 3%씩 혼합한 후 70%의 수분을 함유시킨 배지 1kg을 두부상자에 담아 60℃, 상대습도 70%의 항온 항습실에서 6일간 발효시키면서 3회 뒤집기를 행하여 배지를 제조한다. 제조된 배지 80g을 column tube(길이 : 40cm, 직경 : 2.3cm)에 충전한 후 121℃, 1시간 동안 살균한 다음 팽이버섯 균사체를 코르크볼 No. 3(직경 5mm)를 이용하여 3조각 접종한 다음 25℃에서 배양하면서 균사체의 성장 정도를 측정하여 발효도를 판정한다.

4) 한방재료와 미생물과의 생육관계

한방재료가 버섯질병균주에 미치는 영향은 500 mL 삼각플라스크에 200 mL의 PD-broth 및 LB배지를 넣고 분쇄한 각각의 한방재료 3%씩을 첨가한 후 121℃, 15분 동안 멸균하여 배지를 제조한다. 제조한 각각의 배지 중에 *Trichoderma* sp. 곰팡이와 *Pseudomonas tolaasii*를 접종하여 일정시간 배양한 다음 균체성장 정도를 측정하여 판단한다. 그리고 한방재료가 버섯균사체의 생육에 미치는 영향은 PDA 및 NA 평판배지를 사용하여 버섯질병균주가 미치는 영향을 검토한 방법과 동일하게 측정한다.

5) 발효시간에 따른 한방재료 중의 미생물 변화

상기의 “한방재료의 발효조건”을 검토하는 방법에 따라 배지를 제조하여 발효시키면서 24시간 간격으로 일정량의 배지를 채취하여 배지의 발효에 관여하는 총균수의 변화를 검토한다.

6) 한방재료가 첨가된 배지제조 조건 검토

한방재료의 최적첨가 비율 검토는 상기의 “한방재료의 발효조건”을 검토하는 방법에 따라 배지를 제조할 때 각종 한약재의 첨가비율을 1~10%범위로 조절하여 균사성장 정도, pH변화 및 내부온도변화 등을 관찰하여 판정하고, 이때 균사 성장이 가장 빠른 혼합비율의 배지를 기본으로 하여 기본배지의 탄소량과 질소량을 조사하여 느타리버섯의 최적 C/N율을 결정한다.

7) 한방재료 배지의 현장적용시험

본 연구자들이 수행한 연구결과를 토대로 함양군 지곡면 소재의 물레방아 팽이버섯재배농장에서 직접 버섯을 재배하면서 팽이버섯 균사의 생장일수 및 상태와 병충해의 감념여부 등을 검토한다. 그리고 팽이버섯의 자실체를 형성시켜 대조구의 팽이버섯과 단위면적당 생산량 및 품질 등을 비교 평가 한다.

8) 한방 팽이버섯의 품질평가 기준

생산된 팽이버섯의 품질은 버섯 갓의 크기, 버섯대의 굵기 및 색택을 기준으로 특품, 상품 및 하품으로 나누어서 평가하였다.

① 갓의 품질평가

- 특품 : 팽이버섯 갓의 직경이 2.5~2.8mm(메주콩 크기)
- 상품 : 팽이버섯 갓의 직경이 2.2~2.5mm
- 하품 : 팽이버섯 갓의 직경이 2.2mm 이하 및 2.8mm 이상

② 버섯대의 품질평가

- 특품 : 팽이버섯 대의 직경이 1.2~1.7mm, 대가 직선으로 성장한 버섯
- 상품 : 팽이버섯 대의 직경이 1.2~1.7mm, 대가 직선이 아닌 버섯
- 하품 : 팽이버섯 갓의 직경이 1.2mm 이하

③ 팽이버섯의 색택

- 특품 : 팽이버섯 대 및 갓이 흰색
- 상품 : 팽이버섯 대 및 갓이 약간 노란색을 띠는 것
- 하품 : 팽이버섯 대 및 갓이 노란색이 짙은 것

④ 팽이버섯의 생산량 비교

· 팽이버섯의 생산량 검토는 1일 입병량(34,000병)에서 생산되는 팽이버섯의 중량으로 나타낸다.

9) 경제성 분석

한약재 첨가배지를 사용하였을 때 얻어지는 경제적 효과는 1일 입병량을 기준으로 톱밥배지의 절약효과 및 버섯 생산량에서 얻어지는 경매가격 등을 종합하여 분석한다.

3. 연구 결과

(가) 한방 슬러지의 전처리

한방 슬러지를 한의원 등에서 수거하여 건조시킨 결과(Fig. 1) 한양재의 종류, 크기 및 형태 등이 다양하기 때문에 분쇄기로 분쇄한 다음 한방 슬러지의 이화학적 분석재료 및 평판배지를 제조할 때 사용하였다.

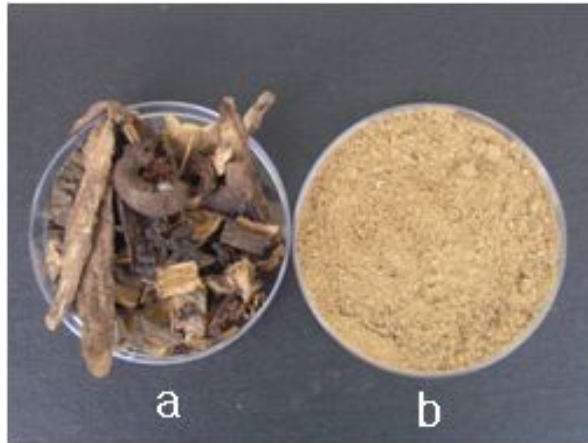


Fig. 1. 건조한 한방 슬러지 및 분쇄한 한방슬러지

a; 건조 한방 슬러지, b; 분쇄한 한방슬러지.

(나) 한방 슬러지의 산업적 활용

본 연구과제의 착안점은 외국수입에 의존하는 버섯배지의 원료를 국내에서 폐기되고 있는 폐기물에서 버섯을 배재하므로 인하여 외화의 절약 및 농가 소득증대뿐만 아니라 환경오염을 최소화시키고자 하는 것이다. 그러나 과제 수행완료 후에는 반드시 경제성 분석이 검토되어야 할 것으로 본 연구자도 생각하고 있다. 그러나 1년차 과제 수행 시에는 한방 슬러지를 사용한 버섯의 재배 가능성을 중심으로 검토하였다. 연구계획서에는 팽이버섯에 대해서만 서술하였지만 실제 연구과제 수행하는 과정에서 한방 슬러지의 수거 후 사용상의 여러 문제점을 고려해 볼 때 팽이버섯 뿐만 아니라 버섯을 재배하는 여러 배지의 형태에 대해서도 검토해 볼 필요성이 있는 것으로 판단되었다. 그렇기 때문에 자동화 시스템을 도입하여 병 재배를 수행하는 팽이버섯 뿐만 아니라 봉지재배를 행하는 표고 및 녹각버섯, 균상재배를 행하는 느타리버섯에 대해서도 기초적인 연구를 행하였다. 아직 깊이 있는 경제성분석까지는 행하지 않았지만 진주시의 음식물 쓰레기 수거를 위한 2009년 용역비용과 비교하면 다음과 같다.

① 한방 슬러지의 1일 생산량 : 진주시내 한의원 수는 대략 80여 곳으로 한 곳의 한의원에서 1일 배출되는 한방 슬러지는 습 중량으로 약 10 kg 정도이고, 당재원 및 제약회사에서 약 50 kg정도 배출되었습니다.

$$(10 \text{ kg} \times 80\text{개소}) + 50 \text{ Kg} = 850 \text{ kg}$$

② 진주시 음식물 쓰레기 수거를 위한 2009년 용역비용 : 120,000원/톤

③ 1,100CC 팡이버섯 재배 병의 순수배지무게(수분 68%)는 약 720 g이며 금액으로 환산하면 약 75원 정도 됩니다. 팡이버섯을 재배할 때 한방 슬러지의 첨가량을 10% 사용할 경우 병당 7.5원이 절약되고 한방 슬러지는 병당 72 g정도 사용됩니다.

④ 1일 수거한 한방 슬러지로 입병 가능한 병수 :

$$850,000 \text{ g} \div 72 \text{ g} = 11,805\text{병}$$

⑤ 한방 슬러지를 배지의 가격으로 환산하면

$$11,805\text{병} \times 7.5\text{원/병} = 88,537\text{원}$$

(다) 한방 슬러지의 이화학적 분석

① 수분

한방 슬러지 및 팡이버섯 배지로 사용되는 콘코프, 비트펠프 등의 수분함량을 측정하여 Fig. 2에 나타내었다. 한방 슬러지를 비롯한 콘코프, 비트펠프 등의 수분함량은 10% 미만이었으나 미송톱밥의 경우는 약 62% 정도를 나타내었다. 이와 같은 결과는 미송톱밥을 제외한 다른 시료들은 자연건조 시켜 저장한 시료를 채취하였고, 미송톱밥의 경우는 버섯재배농가의 야적장에서 수분을 공급하면서 저장해 둔 시료를 채취하였기 때문에 다른 시료에 비하여 수분함량이 높은 것으로 사료된다.

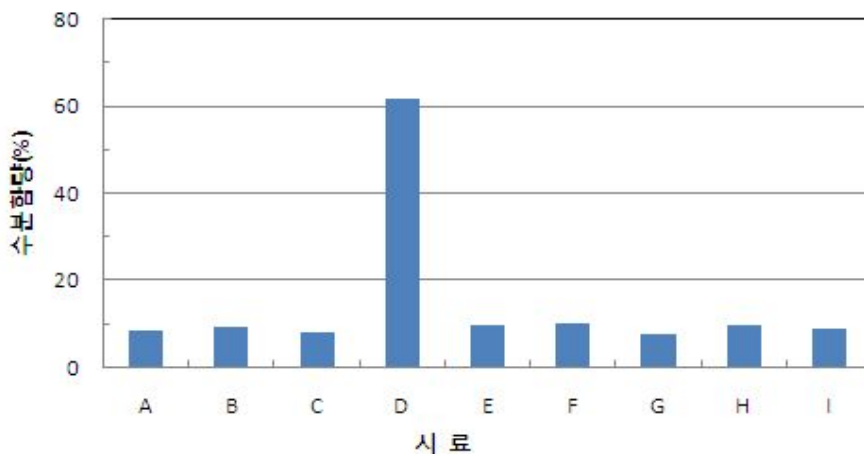


Fig. 2. 여러 종류의 한방슬러지 및 팡이버섯배지 재료의 수분함량.
 A:혼합한방슬러지, B:한방슬러지 I, C:한방슬러지 II, D:미송톱밥,
 E:콘코프, F:비트펠프, G:미강, H:면실피, I:밀기울

② pH

한방 슬러지 및 팽이버섯 배지 재료로 사용되는 콘코프, 비트펄프 등의 pH를 측정하여 Fig. 3에 나타내었다. 한방슬러지 I, 한방슬러지 II, 혼합한방슬러지, 미송톱밥, 콘코프 및 비트펄프의 pH는 4.9~5.4 정도로 약산성을 나타내었으나 미강, 면실피 및 밀기울 등의 pH는 6.59~7.1정도의 중성을 나타내었다.

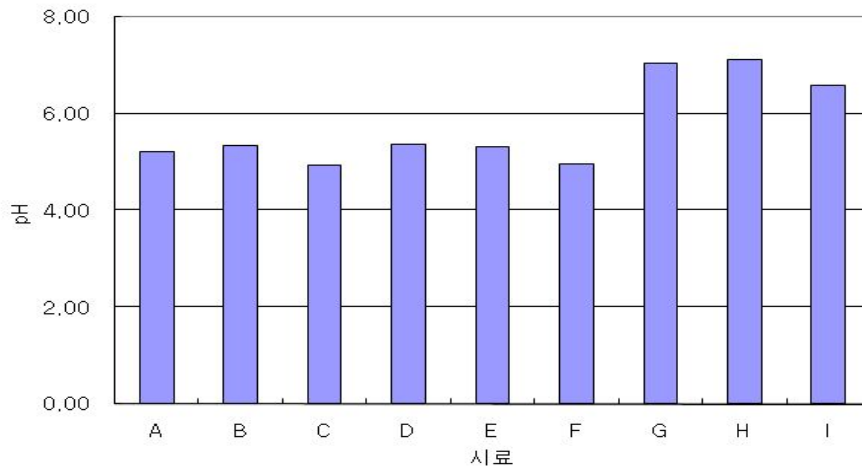


Fig. 3. 여러 종류의 한방슬러지 및 팽이버섯배지 재료의 pH.
A:혼합한방슬러지, B:한방슬러지 I, C:한방슬러지 II, D:미송톱밥,
E:콘코프, F:비트펄프, G:미강, H:면실피, I:밀기울

③ 회분

한방 슬러지 및 팽이버섯 배지 재료로 사용되는 콘코프, 비트펄프, 미강 및 밀기울 등의 회분함량을 측정하여 Fig. 4에 나타내었다. 한방 슬러지, 콘코프, 비트펄프 및 밀기울의 회분함량은 4.0~5.0%정도를 나타내었으나 미강 및 면실피의 회분함량은 약 8.0%정도를 나타내었다. 그러나 미송톱밥의 경우는 다량의 수분을 함유하고 있어 2.3%정도로 가장 낮은 회분함량을 나타내었다. 이상의 결과로 3종류의 한방슬러지 회분함량은 기존의 팽이버섯 배지로 사용하는 콘코프, 비트펄프 및 밀기울의 회분함량과 거의 유사하므로 버섯 배지의 영양 첨가제로 사용 가능성이 있는 것으로 판단된다.

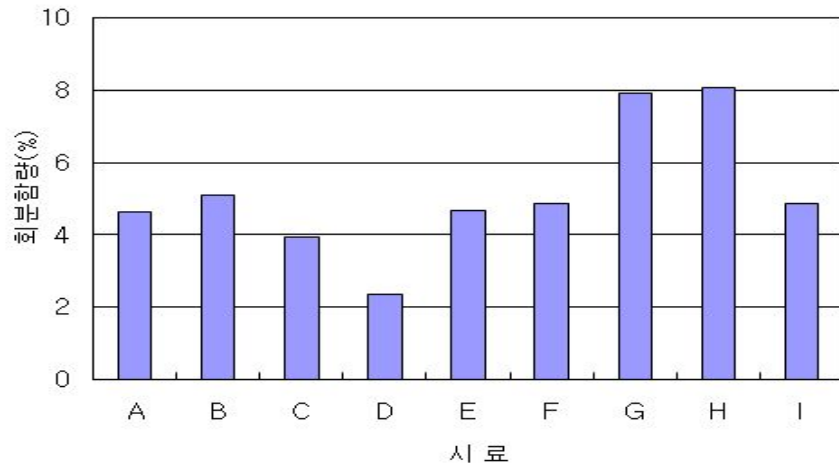


Fig. 4. 여러 종류의 한방슬러지 및 팽이버섯배지 재료의 회분함량.
 A:혼합한방슬러지, B:한방슬러지 I, C:한방슬러지 II, D:미송톱밥,
 E:콘코프, F:비트펠프, G:미강, H:면실피, I:밀기울

④ 조지방

한방 슬러지 및 팽이버섯 배지 재료로 사용되는 콘코프, 비트펠프, 미강, 면실피 및 밀기울 등의 조지방 함량을 측정하여 Fig. 5에 나타내었다. 미강의 조지방 함량은 약 19.7%를 나타내어 팽이버섯배지 재료 중에서 가장 높은 조지방 함량을 나타내었다. 한방 슬러지 시료인 A, B 및 C는 4.4~6.4%로 거의 비슷한 값을 나타내었으며, 톱밥, 비트펠프 및 콘코프는 0.5~1.1%로 가장 낮은 조지방 함량을 나타내었다. 그리고 면실피와 밀기울은 3.0~3.5%정도를 나타내었다.

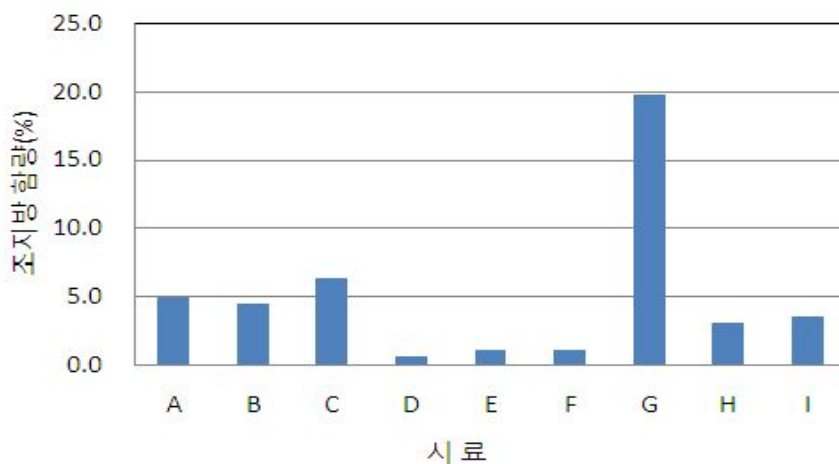


Fig. 5. 여러 종류의 한방슬러지 및 팽이버섯배지 재료의 조지방 함량.
 A:혼합한방슬러지, B:한방슬러지 I, C:한방슬러지 II, D:미송톱밥,
 E:콘코프, F:비트펠프, G:미강, H:면실피, I:밀기울

⑤ 조단백

한방 슬러지 및 팽이버섯 배지 재료로 사용되는 콘코프, 비트펄프, 미강, 면실피 및 밀기울 등의 조단백 함량을 측정하여 Fig. 6에 나타내었다. 한방 슬러지 I 및 한방슬러지 II는 각각 10.5 및 6.9%를 나타내어 한방약재의 종류에 따라서 많은 차이를 나타냄을 확인할 수 있었다. 미송톱밥, 비트펄프 및 콘코프의 조단백 함량은 각각 2.9, 3.3 및 3.6%를 나타내었으며, 밀기울, 미강 및 면실피의 조단백 함량은 각각 8.6, 5.3 및 4.2%를 나타내었다.

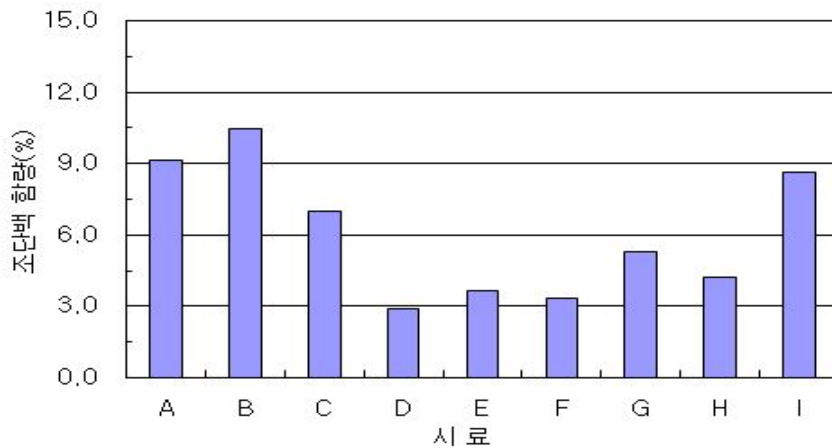


Fig. 6. 여러 종류의 한방슬러지 및 팽이버섯배지 재료의 조단백질 함량.
A:혼합한방슬러지, B:한방슬러지 I, C:한방슬러지 II, D:미송톱밥,
E:콘코프, F:비트펄프, G:미강, H:면실피, I:밀기울

⑥ 환원당

팽이버섯 배지재료로 사용되는 콘코프, 비트펄프 및 한방 슬러지 등의 환원당 함량을 측정하여 Fig. 7에 나타내었다. 환원당 함량은 면실피, 미강, 한방 슬러지, 미송톱밥, 밀기울, 콘코프 및 비트펄프의 순으로 나타났다. 면실피 및 미강은 6.1~6.4 mg/g으로 비슷한 함량을 나타내었으며, 한방 슬러지는 4.5~4.7 mg/g을 나타내었다. 그리고 미송톱밥, 밀기울, 콘코프 및 비트펄프는 0.9~2.7 mg/g의 낮은 환원당 함량을 나타내었다.

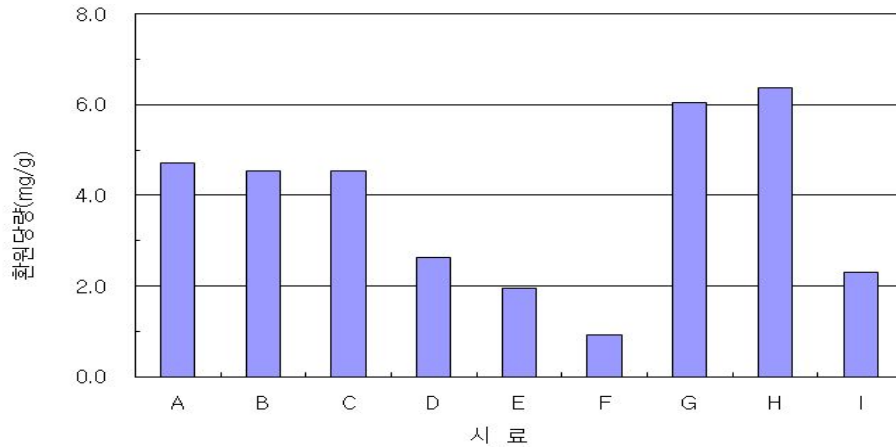


Fig. 7. 여러 종류의 한방슬러지 및 펄이버섯배지 재료의 환원당량.
 A:혼합한방슬러지, B:한방슬러지 I, C:한방슬러지 II, D:미송톱밥,
 E:콘코프, F:비트펠프, G:미강, H:면실피, I:밀기울

⑦ 조섬유

펄이버섯 배지재료로 사용되는 콘코프, 비트펠프, 미강, 밀기울 및 한방 슬러지 등의 조섬유 함량을 측정하여 Fig. 8에 나타내었다. 조섬유는 시료를 acid detergent 용액으로 60분간 끓인 후 이 용액에 용해되지 않는 성분인 acid detergent fiber를 측정하였다. 면실피는 약 62%로 가장 높은 ADF함량을 나타내었으며, 한방 슬러지는 30.7~44.7%, 미송톱밥, 콘코프 및 비트펠프는 29.5~42.5%를 나타내었으나 미강과 밀기울은 각각 9.8%와 12.4%의 낮은 ADF 함량을 나타내었다.

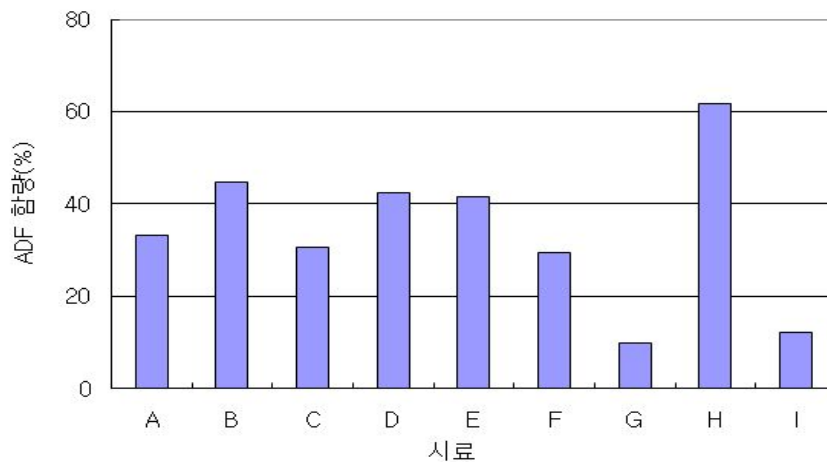


Fig. 8. 여러 종류의 한방슬러지 및 펄이버섯배지 재료의 조섬유 함량.
 A:혼합한방슬러지, B:한방슬러지 I, C:한방슬러지 II, D:미송톱밥,
 E:콘코프, F:비트펠프, G:미강, H:면실피, I:밀기울

(라) 평판배지 상에서 한방 슬러지 첨가농도

팽이버섯 재배농가에서 사용하는 콘코프 배지(A)와 미송톱밥 배지(B)에 한방 슬러지의 첨가농도를 달리하여 평판배지를 제조한 다음, 배지의 중앙에 팽이버섯 균사체를 접종한 후 25℃, 9일 동안 배양하면서 한방 슬러지의 첨가농도가 팽이버섯의 균사성장에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 9와 Fig. 10에 나타내었다. 배양일 수가 3일, 5일 및 9일로 경과됨에 따라 모든 평판배지에서 팽이버섯 균사성장은 왕성하게 이루어졌으나 PDA평판배지에서는 다른 배지에서 보다 균사성장이 낮은 것으로 나타났다. 한방 슬러지의 첨가 농도의 영향은 거의 관찰할 수 없었지만 10%첨가 시험구에서 균사성장 밀도가 약간 빠르고 조밀한 것으로 관찰되었으며(Fig. 10의 A, B-d), 첨가하지 않은 대조구(Fig. 10의 A, B-b)와 균사성장 정도를 비교하였을 때는 한방 슬러지를 첨가한 시험구의 균사성장이 약간 빠르거나 비슷한 것으로 나타났다. 이상의 결과로 시내의 한의원 등에서 배출되는 한방 슬러지를 이용한 팽이버섯 배지 개발 가능성은 충분히 있는 것으로 판단되었으며, 그 농도는 10%로 결정하였다.

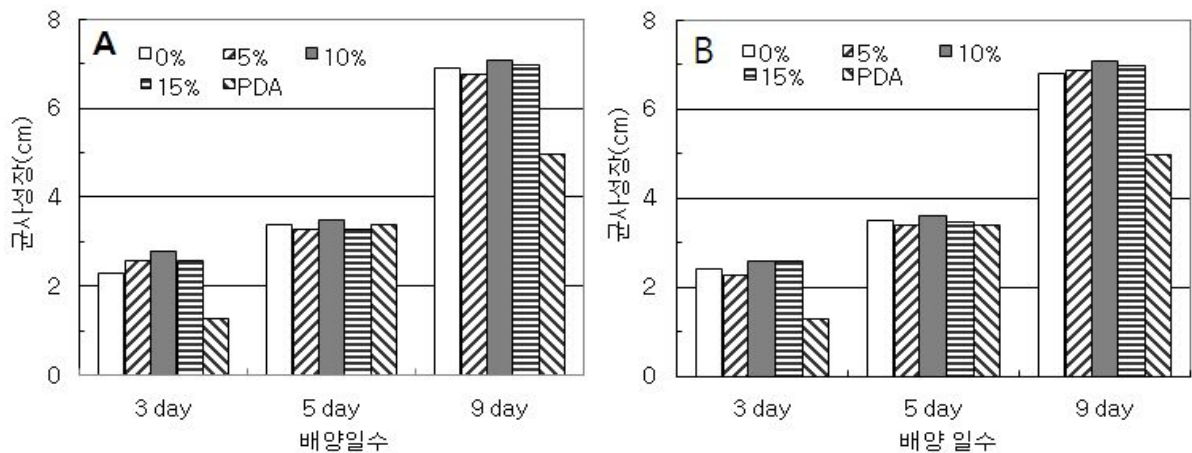


Fig. 9. 한방 슬러지 첨가농도가 팽이버섯 균사성장에 미치는 영향.

A:비트펄프 3g, 콘코프 3~3.5g, 미강 2.5~3.5g, 한방 슬러지 0~1.5g/DW 100mL

B:미송톱밥 3g, 콘코프 3~3.5g, 미강 2.5~3.5g, 한방 슬러지 0~1.5g/DW 100mL

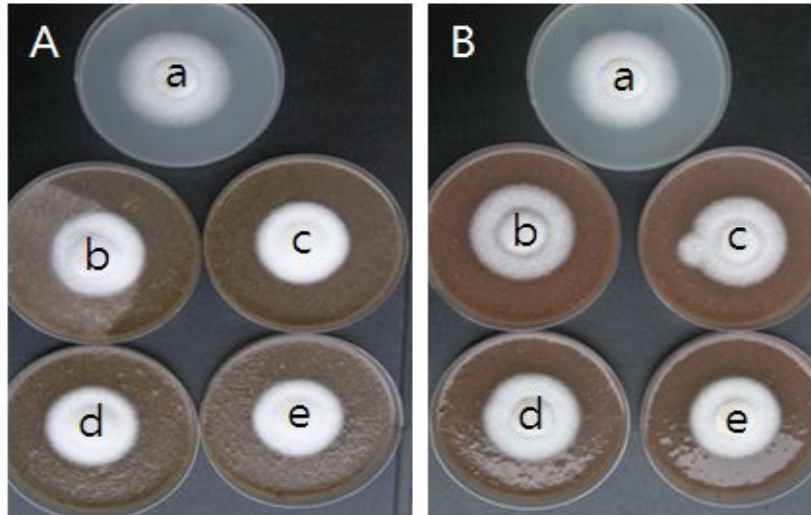


Fig. 10. 한방 슬러지 첨가 평판배지에서 5일째의 팽이버섯 균사성장 사진.
 A:비트펠프 3g, 콘코프 3~3.5g, 미강 2.5~3.5g, 한방 슬러지 0~1.5g/DW 100mL
 B:미송톱밥 7g, 미강 2.5~3.5g, 한방 슬러지 0~1.5g/DW 100mL
 a:PDA, b:0%, c:5%, d:10%, e:15%

(마) 한방 슬러지 10% 첨가배지에서 균사성장

평판배양의 실험결과에서 한방 슬러지의 첨가농도는 10%가 적당한 것으로 나타났기 때문에 실제 버섯재배농가에서 사용하는 비트펠프배지 및 미송톱밥배지에 첨가하는 한방 슬러지는 분쇄기를 사용하여 20 mesh 정도로 분쇄하여 사용하였다(Fig. 11). 분쇄한 한방 슬러지 10%를 첨가한 배지를 시험관에 충전시킨 다음 팽이버섯 뿐만 아니라 상수리나무, 떡갈나무 등 활엽수 주위에 간혹 검붉게 피어나는 영지버섯에는 편각영지와 녹각영지가 있는데 본 실험에 사용에 사용한 버섯은 녹각영지버섯(*Ganoderma lucidum*) 및 표고버섯 종균을 접종하여 25℃에서 배양하면서 각 버섯의 균사성장 정도를 관찰하여 Fig. 12에 나타내었다. 대조구는 한방 슬러지를 첨가하지 않은 배지를 사용하였다(Fig. 12의 A, B-a). Fig. 12에서 보는바와 같이 배양 6 일째에 팽이버섯의 경우는 대조구에서는 2.2~3.4 cm 정도 균사가 성장하였지만 한방 슬러지를 첨가한 시험구(Fig. 12의 A, B-b)에서는 균사성장이 아주 왕성하여 5.8~6.4 cm 정도 균사가 성장하였으며, 균사의 밀도도 아주 조밀하게 성장함을 확인할 수 있었다. 그리고 연구계획서에는 포함되지 않았지만 녹각버섯과 표고버섯의 균사성장을 관찰한 결과 녹각버섯의 균사성장은 8.8~9.7 cm, 표고버섯의 균사성장은 4~4.5 cm 정도 균사가 성장하였다. 이상의 결과로 한방 슬러지를 이용한 버섯의 배지개발은 가능한 것으로 확인되었다.



Fig. 11. 팽이버섯 균사성장 검토를 위한 한방 슬러지 상태
a; 건조 한방 슬러지, b; 분쇄한 한방슬러지.

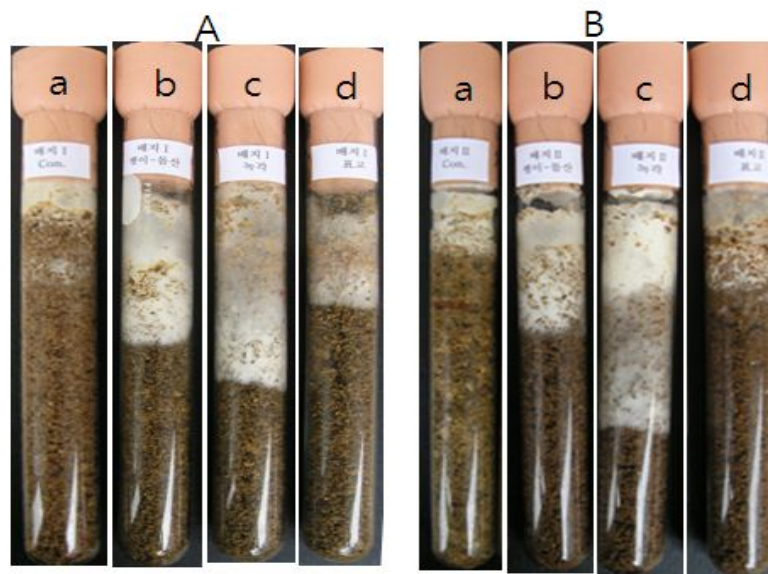


Fig. 12. 한방 슬러지 10%첨가 배지에서 팽이버섯, 녹각버섯 및 표고버섯의 균사성장.

A:비트펄프 3 g, 콘코프 3 g, 미강 3 g, 한방 슬러지 1 g/DW 100 mL

B:미송톱밥 7 g, 미강 3 g, 한방 슬러지 1 g/DW 100 mL

a; 팽이버섯 control, b; 팽이버섯, c; 녹각버섯, d; 표고버섯.

(바) 현장실험 결과

한방 슬러지를 이용한 현장실험은 경북 청도군 화양읍 소재의 그린피스농장의 도움으로 실시하였으며, 실험의 과정과 결과는 Fig. 13-14와 Table 2에 나타내었다. 팽이버섯의 생산은 1,100 mL의 버섯재배용 병을 사용하여 첨가하는 배지의 조성은 버섯배지 천체 중량에 대하여 콘코프를 45% 첨가구와 35%첨가구로 구분하였으며, 한방 슬러지는 10%정도를 첨가하였다. Fig. 15에서 보는바와 같이 한방 슬러지를 10% 첨가한 시험구에서 팽이버섯의 균사배양(Fig. 15-A) 및 자실체의 형성(Fig. 14-B, C)은 대조구와 비교하여 전혀 차이를 나타내지 않고 왕성하게 생육함을 관찰할 수 있었다. 그리고 팽이버섯의 평균수확 량, 기형버섯 발생량, 2등급버섯, 생육부진 및 버섯질병 발생을 등을 관찰하여 Table 1에 나타내었다. 대조구 및 시험구에서의 흰곰팡이 및 세균성 갈색무늬병 등의 발생은 관찰할 수없었다. 콘코프 45% 첨가구 및 35% 첨가구에서의 병당 팽이버섯의 수확량은 대조구가 시험구보다 6~10%정도 많이 생산되었다. 그러나 기형버섯 발생율과 2등급버섯의 생산량은 한방 슬러지를 첨가한 시험구에서 월등하게 적었으나 다소의 생육부진 현상이 발생하였다. 이상의 결과로 팽이버섯 재배에서 기형버섯과 2등급 버섯은 땅콩처럼 버섯의 갓이 서로 붙어있거나 갓의 크기가 1cm 이상인 등을 말하는 것으로 상품으로 출하하는데는 문제가 없을 것으로 본다. 이와 같은 버섯의 발생원인은 배지 영양분 고갈, 재배사의 환기, 산소농도, 통풍의 세기 및 빛의 강도, 수확시기 등 여러 가지 재배환경의 영향에 의해서 20-40%는 발생하고 있습니다. 이번 실험에서는 다소 발생율이 많은 것은 사실이지만 자동화 시스템을 도입한 재배사 전체를 균일하게 일정한 환경으로 조절한다는 것은 매우 어렵기 때문이다. 그러나 같은 재배사 내에서도 재배 위치에 따라 약간의 차이는 항상 일어나고 있기 때문에 대조구와 시험구는 동일한 위치에서 재배하였기 때문에 실험의 과정에서의 문제는 없는 것으로 생각되며, 팽이버섯의 생육부진 현상을 조절한다면 한방 슬러지를 이용한 팽이버섯 배지의 개발가능성은 충분히 있는 것으로 판단되었다.



Fig. 13. 한방 슬러지를 이용한 팽이버섯의 생산과정
 A and B; 한방슬러지의 혼합과정, C; 입병과정, D; 살균과정

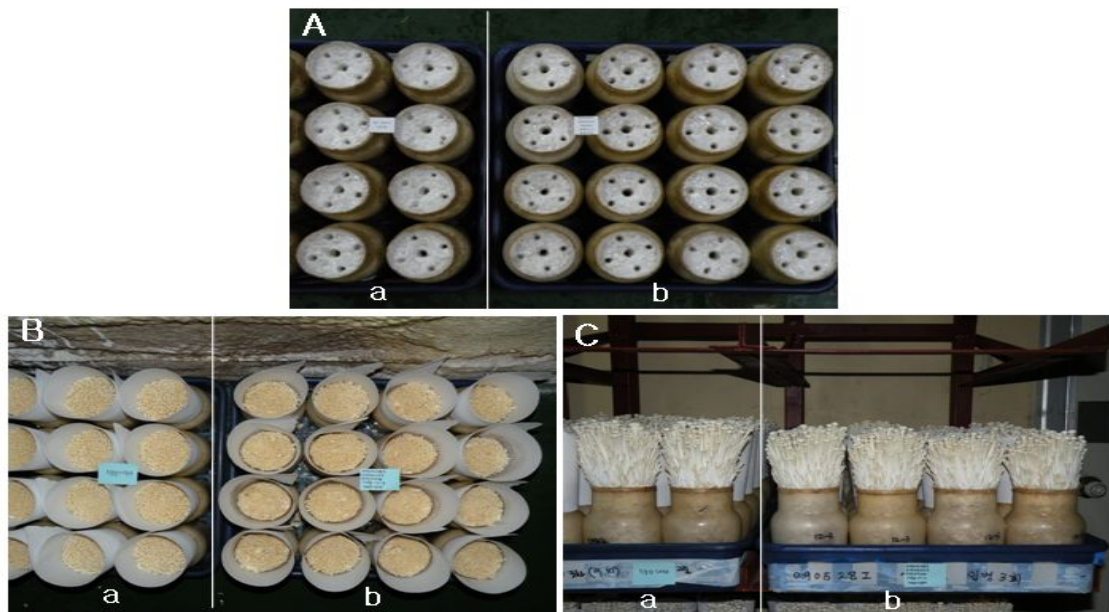


Fig. 14. 한방 슬러지를 이용한 팽이버섯의 생산과정
 A; 배양 25일, B; 재배 16일, C; 재배 28일. a; Control, b; 시험구

Table 1. 한방 슬러지 첨가배지에서 팽이버섯의 평균 수확량 및 버섯의 생육상태

항목	시험구							
	콘코프 45% 첨가				콘코프 35% 첨가			
	Con.	A	B	C	Con.	D	E	F
버섯수확량(g/병)	286	279	264	270	285	262	260	259
기형버섯 발생율(%)	88	66	3	6	75	28	9	6
2등급 버섯(%)	63	3	0	3	25	19	16	19
생육부진(%)	0	3	0	47	0	25	16	13
흰곰팡이 발생율(%)	0	0	0	0	0	0	0	0
세균성병 발생율(%)	0	0	0	0	0	0	0	0

(2) 제 2협동과제 연구방법 및 결과

(가) 비장세포의 증식반응

각 추출물이 비장세포의 증식반응을 유도하는지 알아보기 위하여, 생쥐에서 분리한 비장세포에 팽이버섯 물 추출물(H₂O-A, B, C)과 에탄올 추출물(EtOH-A, B, C)을 농도별로 첨가하여 72시간 배양한 후에 비장세포의 증식반응을 측정하였다. 그 결과 B세포의 증식을 특이적으로 유도하는 LPS(lipopolysaccharide, 10 μ g/ml)와, T세포의 증식을 특이적으로 유도하는 Con A(Concanavalin A, 1 μ g/ml)를 첨가하였을 때, 무첨가 대조군에 비해 유의하게 비장세포의 증식반응이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 그리고 세 가지 물 추출물을 첨가하였을 때 저농도에 비해 고농도로 증가할수록 비장세포의 증식반응이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 즉 세 가지 물 추출물 모두, 고농도인 300 μ g/ml에서 최대 비장세포의 증식반응이 나타나는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 또한 세 가지 에탄올 추출물을 첨가하였을 때, 고농도에서 비장세포의 증식반응이 나타났지만, 최대농도인 300 μ g/ml에서는 EtOH-A와 C는 무첨가 대조군보다 낮은 것으로 나타나 비장세포에 대한 세포독성을 나타내는 것으로 생각된다. 그러나 EtOH-B는 최대농도인 300 μ g/ml에서 최대 증식반응이 나타났고, 모든 시료 중에서도 최대 비장세포의

증식반응을 유도하는 것을 확인하였다. 즉 모든 시료 중에서 EtOH-B를 최대농도인 300 $\mu\text{g/ml}$ 을 첨가하였을 때, 비장세포의 증식반응이 최대로 나타났다.

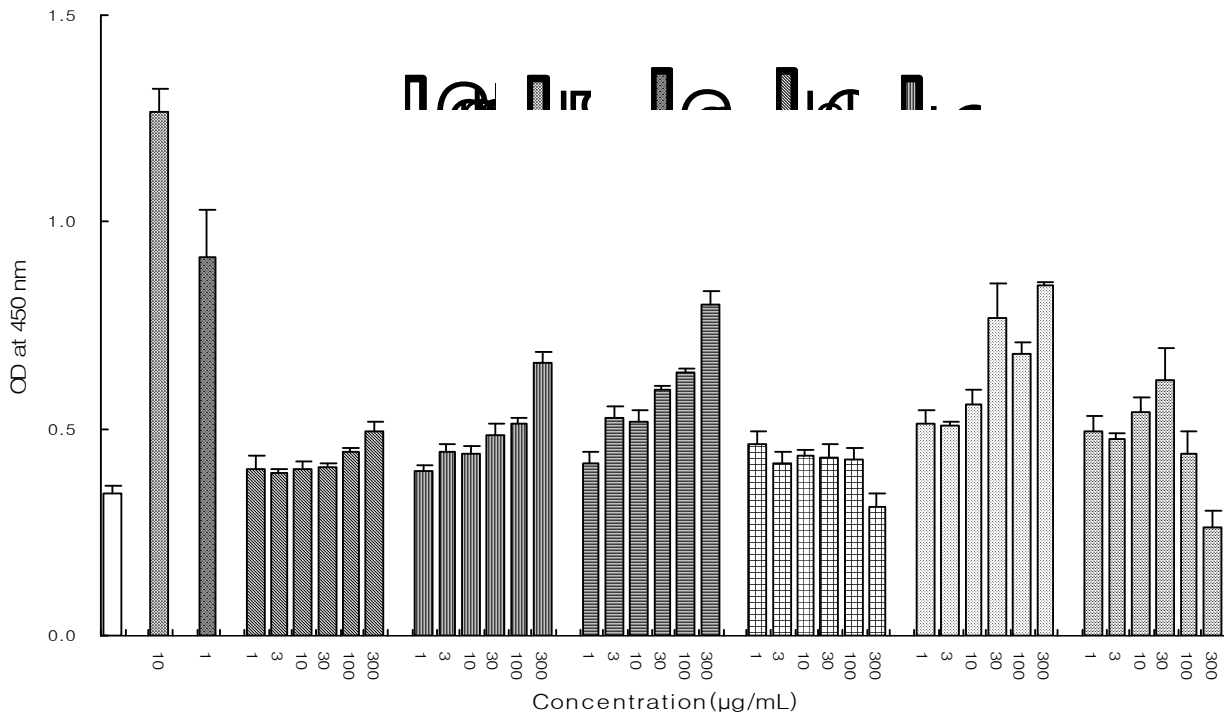


Fig. 1. The effect of crude polysaccharide isolated from *Flammulina velutipes* on the proliferation of spleen cells. The spleen cells(C57BL/6, 5×10^5 cells/well) were stimulated for 72 hours, respectively, with LPS, Con A or crude polysaccharide isolated from *Flammulina velutipes* and assayed for proliferation.

(나) 비장세포의 사이토카인 생산

비장세포의 증식반응이 나타나면, 증식하는 세포는 여러 종류의 면역반응을 매개하는 사이토카인을 분비한다. 즉, 비장세포의 증식반응이 일어날 때 분비되는 사이토카인의 종류를 알면 사이토카인이 매개하는 면역반응과 증식하는 세포의 종류를 알 수 있다. 따라서 물 추출물과 에탄올 추출물이 비장세포의 증식반응을 유도할 때 어떤 종류의 사이토카인을 분비하는지 알아보았다. 비장세포 중에서 B세포의 증식반응을 유도하는 LPS는 무첨가 대조군에 비해 다량의 IL-6와 TNF- α 분비를 유도하였고, T세포의 증식반응을 유도하는 Con A는 많은 양의 IFN- γ 분비를 유도하였다(Fig. 2). 그리고 물 추출물(H₂O-A, B, C)을 첨가하였을 때 무처리 대조군에 비해 소량의 IL-6와 TNF- α 를 분비하였지만, 에탄올 추출물(EtOH-A, B, C)을 첨가하였을 때, 특히 비장세포의 최대 증식반응을 나타내는 EtOH-B를 첨가하였을 때 IL-6와 TNF- α 분비량이 최대로 나타났다. 또한 IFN- γ 분비량도 EtOH-B를 첨가하였을 때 최대로

나타났다. 즉 모든 시료 중에서 EtOH-B를 최대농도인 100 μ g/ml을 첨가하였을 때, 비장세포가 분비하는 IL-6, TNF- α , IFN- γ 분비량이 최대로 나타났다.

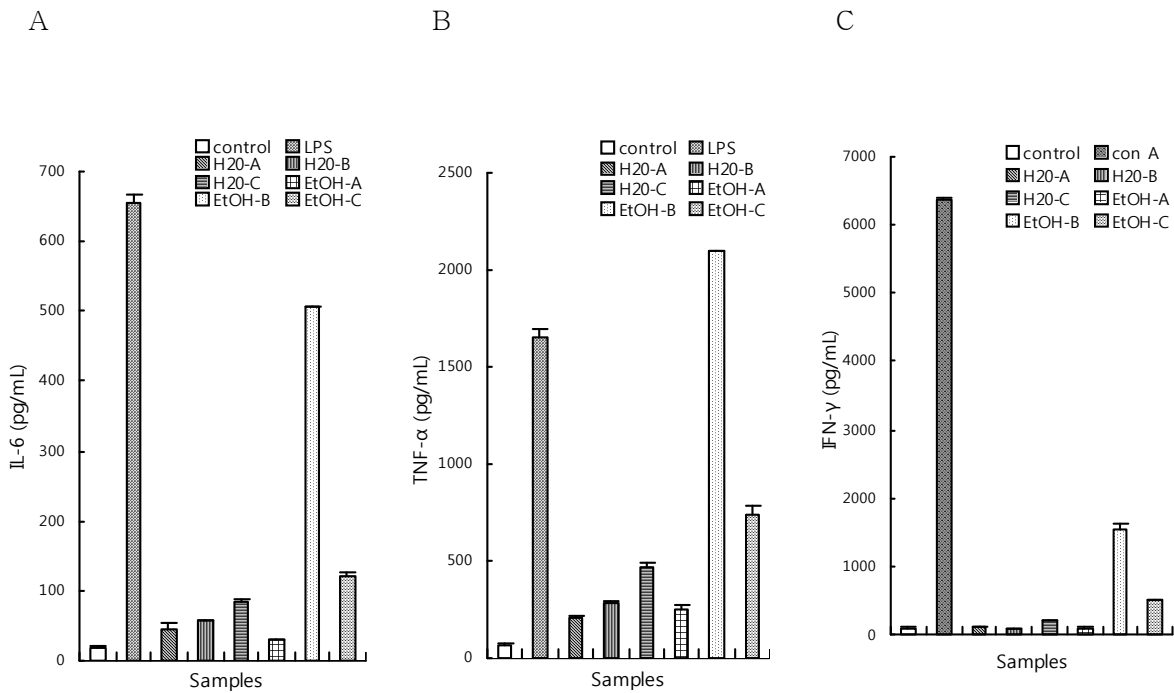


Fig. 2. Effect of crude polysaccharide isolated from *Flammulina velutipes* on the production of various cytokines in spleen cells. Spleen cells(5×10^6 cells/well) were stimulated with LPS, Con A or crude polysaccharide isolated from *Flammulina velutipes* for 24 hours and the supernatants were assayed for various cytokines. Cytokine activities in culture supernatants were determined by ELISA

(다) 일산화질소 생산

대식세포는 박테리아와 같은 항원이 침입하였을 때, 일차적인 면역반응을 담당하는 세포로서, 우선 침입한 박테리아를 잡아먹는 식세포 작용을 한다. 이때, 잡아먹힌 박테리아는 금방 죽는 것이 아니라 대식세포 내 살균작용에 의해 죽고 분해된다. 박테리아를 죽이기 위해 대식세포가 분비하는 물질은 여러 가지가 알려져 있지만, 그 중에서 최근에 밝혀진 것으로 일산화질소(nitric oxide)가 있다. 따라서 물 추출물과 에탄올 추출물이 대식세포의 일산화질소 생산에 어떠한 영향을 미치는지 검색하였다. 대식세포주(RAW264.7)에 각 추출물을 농도별로 처리하여 48시간 배양한 후 배양액 중 대식세포가 생산한 NO가 산화된 형태인 NO_2^- 농도를 측정하였다(Fig. 3). 그 결과 무처리 대조군에 비해 물 추출물과 에탄올 추출물을 처

리한 실험군에서 농도 의존적으로 대식세포의 일산화질소 생산을 유도하였다. 물 추출물 H₂O-B, C 모두 최대 고농도인 300 μ g/ml에서 최대 일산화질소 생산이 나타나는 것을 확인할 수 있었지만, H₂O-A는 모든 농도에서 일산화질소 생산이 측정되지 않았다. 또한 에탄올 추출물인 EtOH-B를 첨가하였을 때는 30 μ g/ml에서 최대 일산화질소 생산이 나타나다가 고농도에서는 오히려 감소하는 경향이 나타났다. 즉 에탄올 추출물 EtOH-B가 대식세포를 활성화하여 최대 일산화질소 생산이 나타나는 것을 확인하였다.

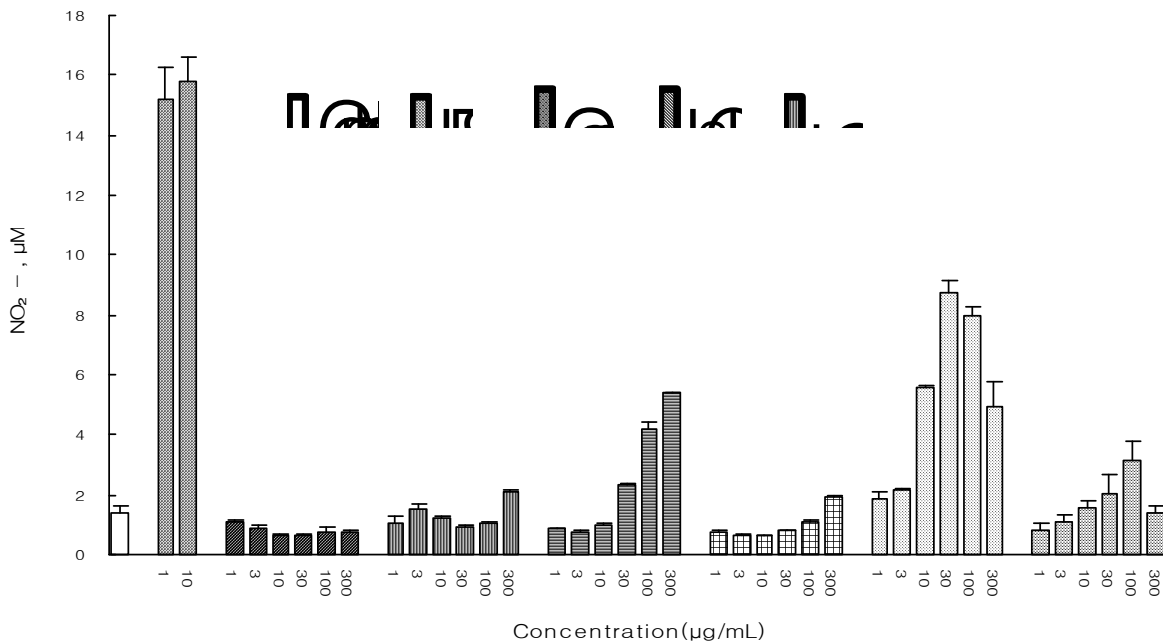


Fig. 3. Effect of crude polysaccharide isolated from *Flammulina velutipes* on the production of nitric oxide in a macrophage cell line. RAW 264.7(5×10^4 cells/well) were cultured either in medium alone or in medium that contained LPS or crude polysaccharide isolated from *Flammulina velutipes* for the production of nitric oxide. After 48 hours of culture, the amounts of NO production were measured by the Griess method

(라) 대식세포의 사이토카인 생산

대식세포는 항원의 자극을 받아 활성화되면 IL-6, TNF- α , GM-CSF 등을 분비하여 면역반응을 조절한다. 특히 TNF- α 는 종양괴사인자(tumor necrosis factor)로 알려진 물질로 종양세포를 파괴하는 사이토카인이고, IL-6는 간세포가 피브리노겐과 같은 몇 가지 혈장단백질을 합성하도록 유도하며 B세포 분화를 유도하는 B세포 성장인자로 작용한다. 그리고 GM-CSF(granulocyte-macrophage colony stimulating factor)는 골수전구세포의 분화와 증식을 유도하여 과립구와 대식세포를 만드는 작용을 한다. 따라서 물 추출물과 에탄올 추출

물이 대식세포가 생산하는 이들 사이토카인의 분비에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다. 분비되는 사이토카인의 종류를 알아보기 위하여 대식세포주에 각각의 추출물을 첨가하여 24 시간 배양한 후 상층액을 회수하여 상층액에 포함된 사이토카인의 분비량을 측정하였다 (Fig. 4). 대식세포를 활성화시키는 물질인 LPS에 의해서 많은 양의 IL-6, TNF- α , GM-CSF 생산이 유도되는 것으로 나타났다. 그리고 물과 에탄올 추출물을 처리하였을 때 무처리 대조군에 비해 IL-6, TNF- α , GM-CSF의 분비량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 에탄올 추출물 EtOH-B를 첨가하였을 때는 가장 많은 양의 IL-6, TNF- α , GM-CSF의 분비가 유도되는 것으로 나타났다. 즉 에탄올 추출물 EtOH-B가 대식세포를 활성화시켜 다양한 사이토카인을 분비하여 항종양 및 면역 활성을 유도하는 것을 확인할 수 있었다.

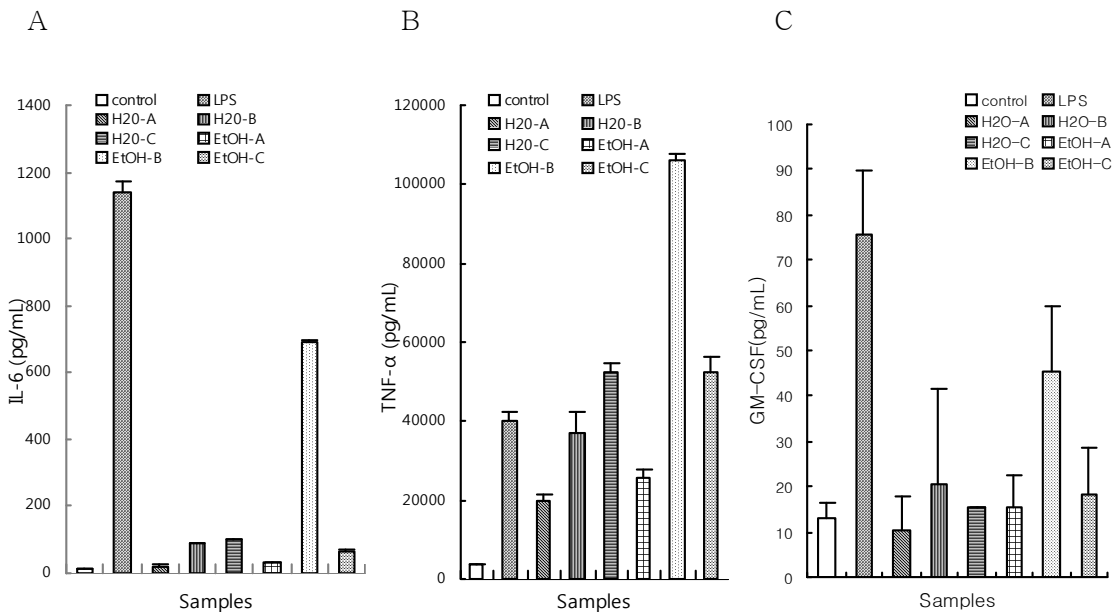


Fig. 4. Effect of crude polysaccharide isolated from *Flammulina velutipes* on the secretion of various cytokines in a macrophage cell line. RAW264.7 cells(5×10^5 cells/well) were stimulated with LPS or crude polysaccharide isolated from *Flammulina velutipes* for 24 hours and the supernatants were assayed for various cytokines. Cytokine activities in culture supernatants were determined as described under materials and methods. The results are expressed as mean \pm SD of triplicate assays.

(마) B세포의 증식반응

앞 실험에서 물과 에탄올 추출물의 비장세포 증식반응 유도 효과를 알아본 결과 고농도에서 비장세포의 증식을 유도하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 이때 증식하는 비장세포가 분비하

는 사이토카인의 종류를 알아본 결과, 비장세포 중에서 증식하는 세포는 B세포일 가능성이 높기 때문에 비장세포에 포함되어 있는 B세포만을 분리하여 물과 에탄올 추출물이 B세포 증식 반응을 유도하는 효과를 측정하였다. B세포는 비장세포 부유액을 T세포 특이적 항원인 Thy 1.2에 대한 항체와 토끼 보체로 처리하여 T 세포를 제거하고 sephadex G-10 column을 이용하여 대식세포와 같은 부착세포를 제거하여 순수하게 분리하였다. 분리한 B세포에 추출물을 농도별로 첨가하여 72시간 배양한 후 B세포의 증식정도를 측정하였다(Fig. 5). 실험 결과 T세포의 증식반응을 유도하는 Con A에 대해서는 반응하지 않고, B세포의 증식반응을 유도하는 LPS에 대해서만 증식반응이 유도되는 것으로 나타나 B세포가 순수하게 분리된 것을 알 수 있었다. 그리고 무처리 대조군에 비해 물 추출물 H₂O-C와 에탄올 추출물 EtOH-B를 첨가한 실험군에서 B세포의 증식반응이 나타나는 것으로 나타났으며, 특히 EtOH-B 100 μ g/ml에서 최대 증식반응 유도 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다. 즉 EtOH-B가 비장세포 중에서 특히 B세포의 증식반응을 직접적으로 유도하는 것을 알 수 있었다.

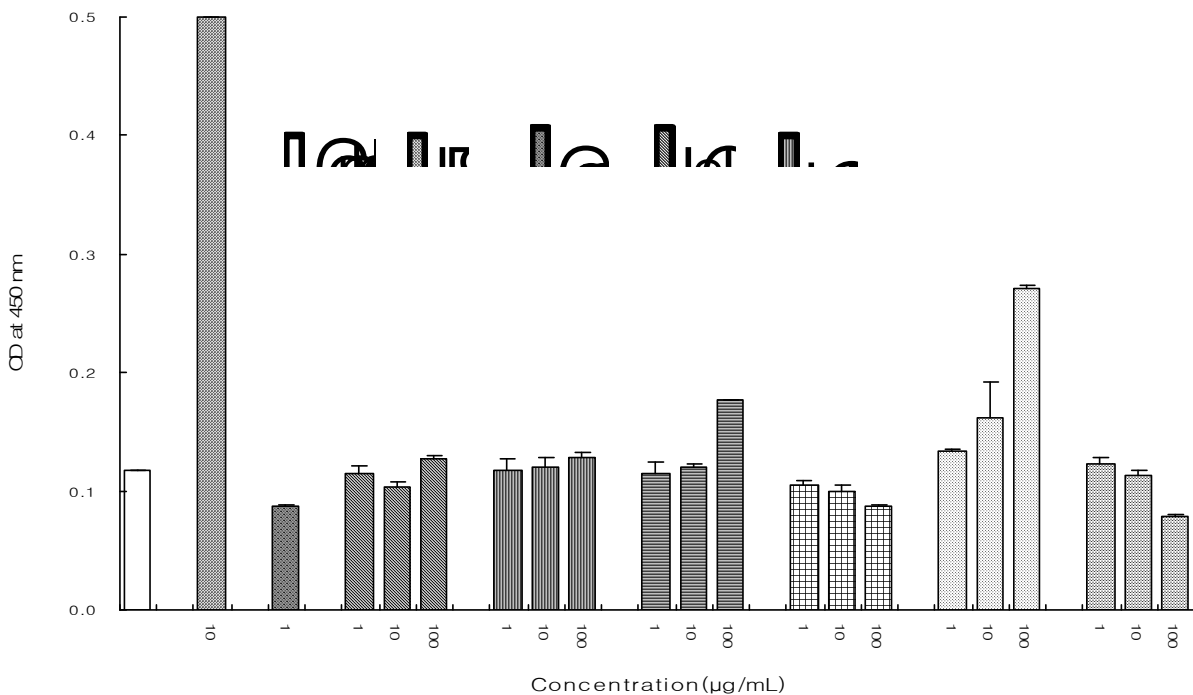


Fig. 5. The effect of crude polysaccharide isolated from *Flammulina velutipes* on the proliferation of B cells. Purified B cells (3×10^5 cells/well) were stimulated for 72 hours, respectively, with various doses of LPS, Con A or crude polysaccharide isolated from *Flammulina velutipes* and assayed for proliferation

(바) B세포의 면역글로불린 생산

앞 실험에서 B세포의 증식반응 측정된 결과 각 추출물이 B세포 증식반응을 강력하게 유도하는 것으로 나타났다. 분열 증식하는 B세포는 면역글로불린을 생산 분비하는데, 물과 에탄올 추출물이 B세포의 면역글로불린 생산을 유도하는 효과가 있는지 알아보았다. 먼저 B세포가 생산하는 IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3의 양을 측정하기 위해 비장세포에서 분리한 B세포에 물과 에탄올 추출물을 첨가하여 48시간 배양한 후 상층액을 회수하여 상층액에 포함된 각각의 면역글로불린 양을 측정하였다(Fig. 6). 그 결과 무처리 대조군에 비해 B세포의 증식반응을 유도하는 LPS를 첨가하였을 때, IgG2a를 제외한 모든 종류의 면역글로불린의 분비량이 증가하는 것으로 나타났다. B세포에 물 추출물 H₂O-B, C를 첨가하였을 때, 많은 양의 IgG1을 분비하였지만, 대부분의 경우에 EtOH-B를 첨가하였을 때 모든 종류의 면역글로불린 생산이 증가하는 것으로 나타났다. 즉 EtOH-B는 IgM, G1, G2a, G2b, G3 생산량을 증가시켜 체액성 면역반응을 유도하는 효과가 있는 것을 알 수 있었다.

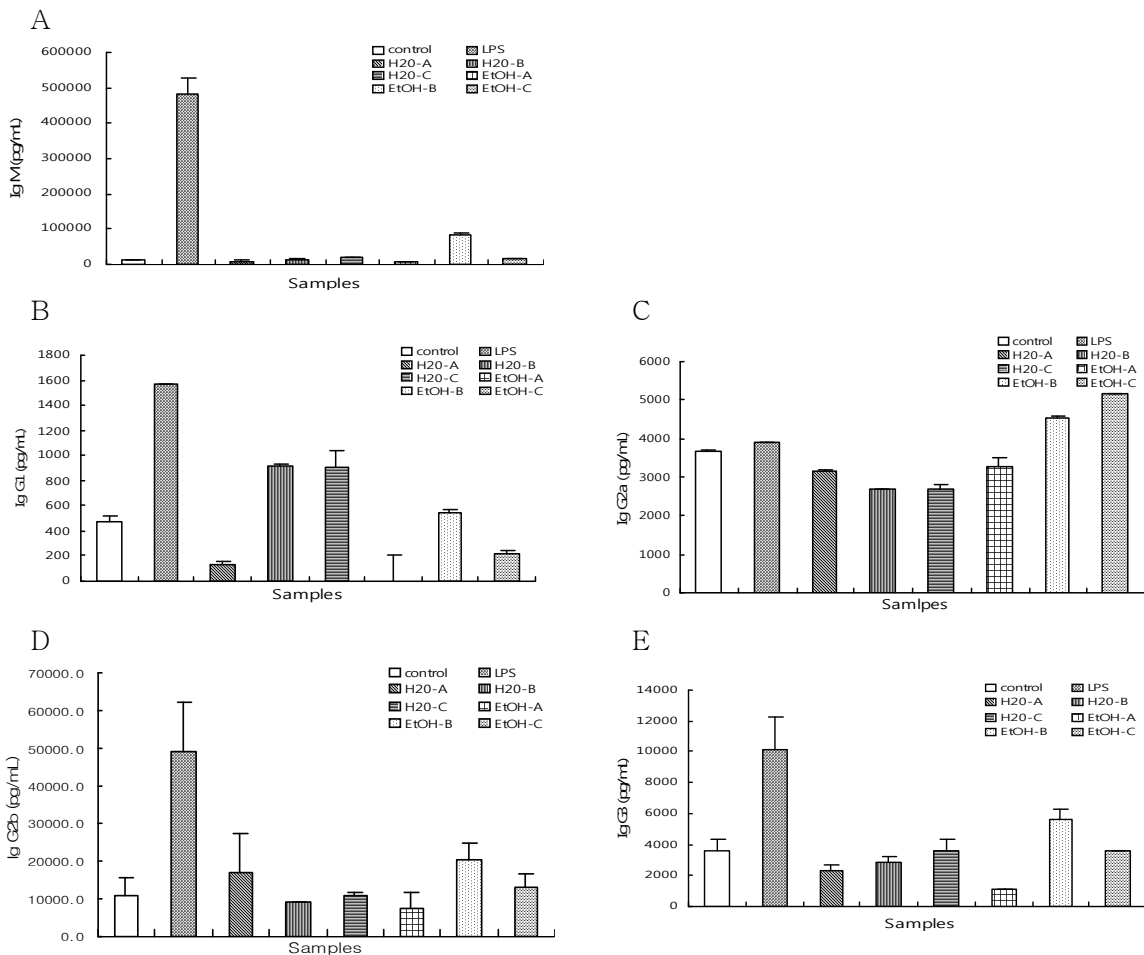


Fig. 6. Effect of crude polysaccharide isolated from *Flammulina velutipes* on the production of immunoglobulin isotypes in B cells. Purified B cells(3×10^6 cells/well) were stimulated with LPS or crude polysacchahride isolated from *Flammulina velutipes* for 48 hours and the supernatants were assayed for immunoglobulin isotypes. Concentrations of immunoglobulins in culture supernatants were determined by ELISA. The results are expressed as means \pm SD of triplicate assays.

(사) B세포의 사이토카인 생산

앞 실험에서 각 추출물이 B세포의 증식반응과 면역글로블린 생산을 유도하는 효과가 있는 것을 확인하였다. B세포 역시 자극을 받아 활성화되면 IL-6, TNF- α 등을 분비하여 면역반응을 조절한다. 따라서 물 추출물과 에탄올 추출물이 B세포가 생산하는 이들 사이토카인의 분비에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다. 분비되는 사이토카인의 종류를 알아보기 위하여 B세포에 각각의 추출물을 첨가하여 24시간 배양한 후 상층액을 회수하여 상층액에 포함된 사이토카인의 분비량을 측정하였다(Fig. 7). B세포를 활성화시키는 물질인 LPS에 의해서 많은 양의 IL-6, TNF- α 생산이 유도되는 것으로 나타났다. 그리고 무처리 대조군에 비해 특히 에탄올 추출물 EtOH-B를 첨가하였을 때는 가장 많은 양의 IL-6, TNF- α 의 분비가 유도되는 것으로 나타났다. 즉 에탄올 추출물 EtOH-B가 B세포를 활성화시켜 다양한 사이토카인을 분비하여 항종양 및 면역 활성을 유도하는 것을 확인할 수 있었다.

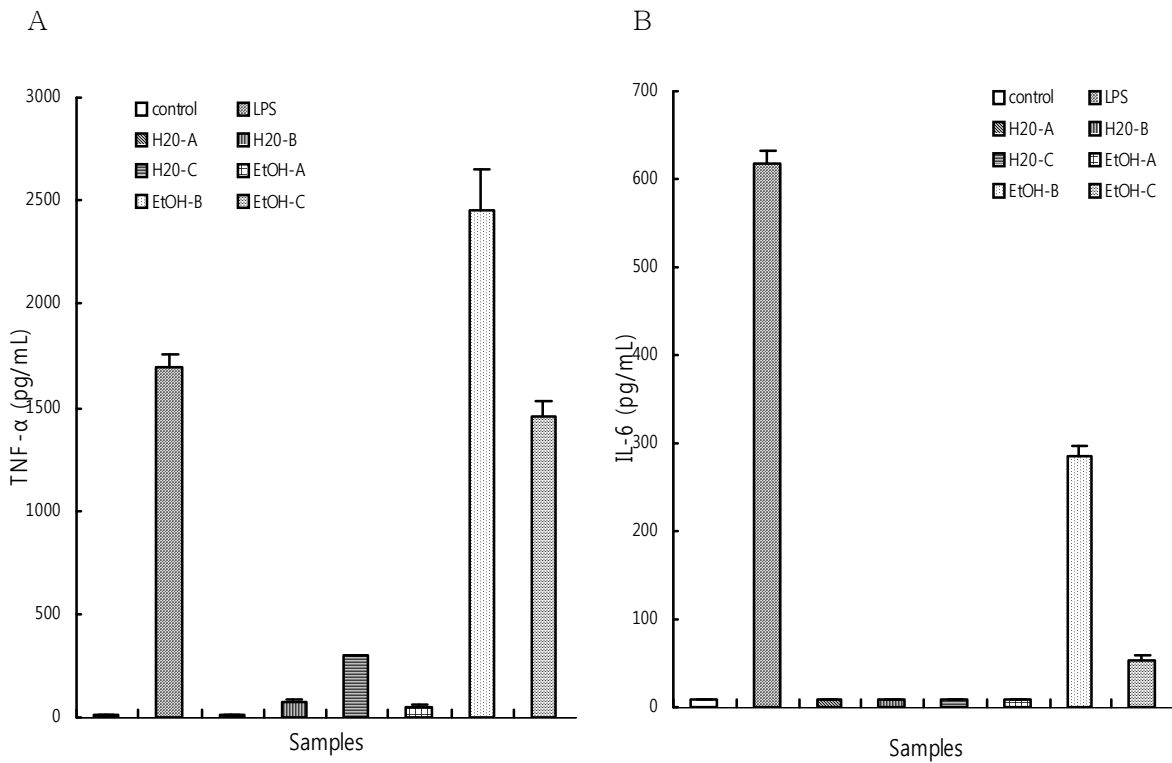


Fig. 7. Effect of crude polysaccharide isolated from *Flammulina velutipes* on the secretion of various cytokines in B cells

B cells(3×10^6 cells/well) were stimulated with LPS or crude polysaccharide isolated from *Flammulina velutipes* for 24 hours and the supernatants were assayed for various cytokines. Cytokine activities in culture supernatants were determined by ELISA. The results are expressed as mean \pm SD of triplicate assays.

(아) 복수암세포 이식 생쥐에 대한 항종양 효과

앞에서 확인한 모든 실험에서 물 추출물보다는 에탄올 추출물이 유의한 활성을 나타내었기 때문에, 복수암세포주인 sarcoma-180을 복강에 주사한 생쥐에 대한 항종양 효과에 대한 실험은 에탄올 추출물에 대해서만 행하였다. 즉 sarcoma-180을 모든 생쥐에 주사하고 24시간이 경과한 후에, 매일 한 번씩 에탄올 추출물(EtOH-A, B, C)을 100mg/ml씩 7일간 복강에 투여하고 46일간 사망여부를 관찰하였다(Fig. 8). 그 결과 생존일수중앙치(MST: mean survival time)는 생리식염수를 투여한 대조군에 비해 EtOH-A와 C는 더 짧은 것으로 나타나, 고농도 투여에 따른 독성으로 생각된다. 그러나 EtOH-B는 생리식염수를 투여한 대조군에 비해 더 긴 것으로 나타났다. 그리고 연명률(ILS: increase in MST)도 EtOH-A와 C는 생리식염수를 투여한 대조군에 비해 더 낮은 것으로 나타났지만, EtOH-B는 생리식염수를 투여한 대조군에 비해 더 증가한 것으로 나타났다. 즉 EtOH-B는 고농도 투여하여도 복수암세포 이식 생쥐에 대한 항종양 효과를 나타내는 것으로 나타났다.

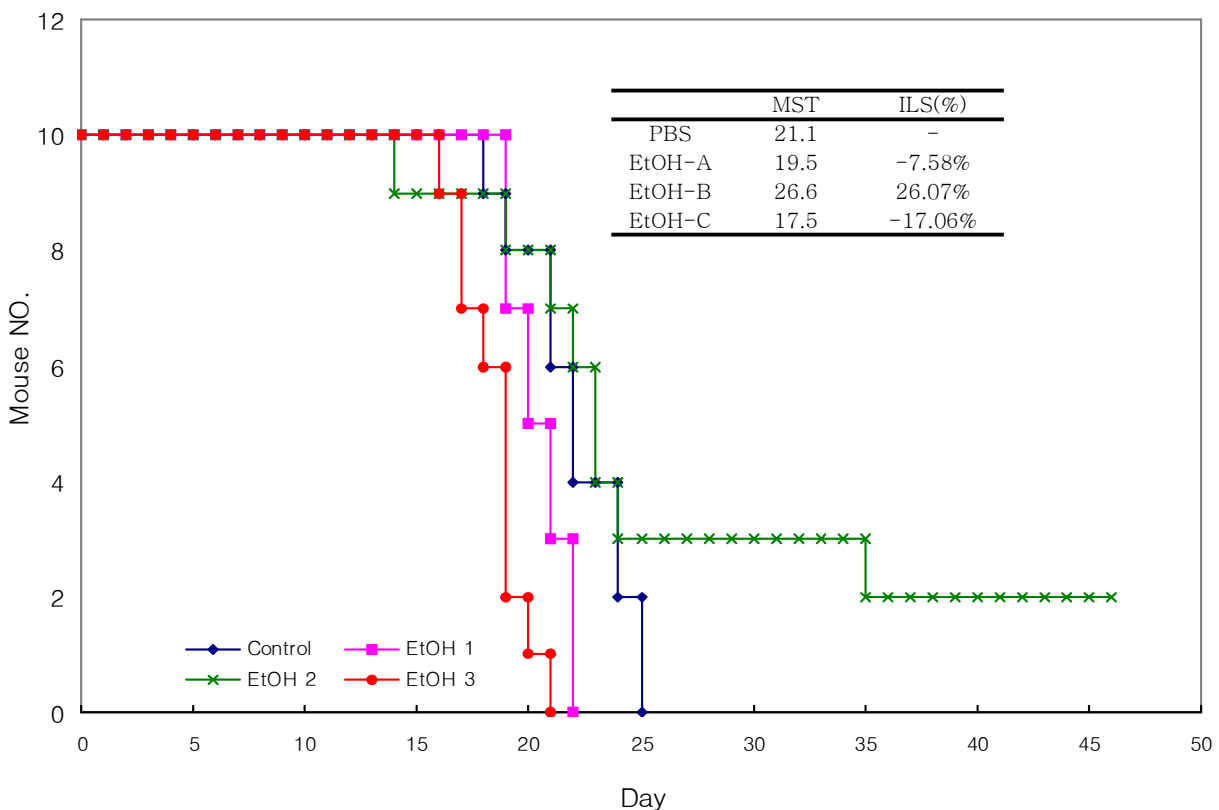


Fig. 8. Effect of Crude polysaccharide isolated from *Flammulina velutipes* on S-180 tumor bearing mice. Mice were injected S-180($3 \times 10^6/300 \mu\ell$) tumor cells and injected 100mg/kg of EtOH-A, EtOH-B, EtOH-C or its vehicle for 1 week after 1 day.

(3) 제 3협동과제 연구방법 및 결과

(가) 일반 재배 방식과 한방 슬러지 첨가 2군에 대한 배당체 추출물 결과

3종의 팽이버섯(3kg)을 추출하기 위해 70% 에탄올 18L를 사용하여 80℃에서 환류냉각장치로 3시간 동안 2회 추출하였다. 이 때 최종 추출물을 다시 감압 농축하여 그 고형분 함량 측정 결과는 Table 1.과 같다. 그 결과 한방 슬러지를 첨가 팽이버섯 2군에서 고형분 함량이 24.7 %g으로 가장 높게 나타났다.

Table. 1 일반 재배 방식과 한방 슬러지 첨가 2군에 대한 고형분 함량 비교 분석
(단위 : %g)

시험항목	시험군		
	Control군	CD-1군	CD-2군
한방 슬러지를 이용한 팽이버섯 추출물의 고형분 함량	21.84±4.5	24.3±5.1	24.7±4.2

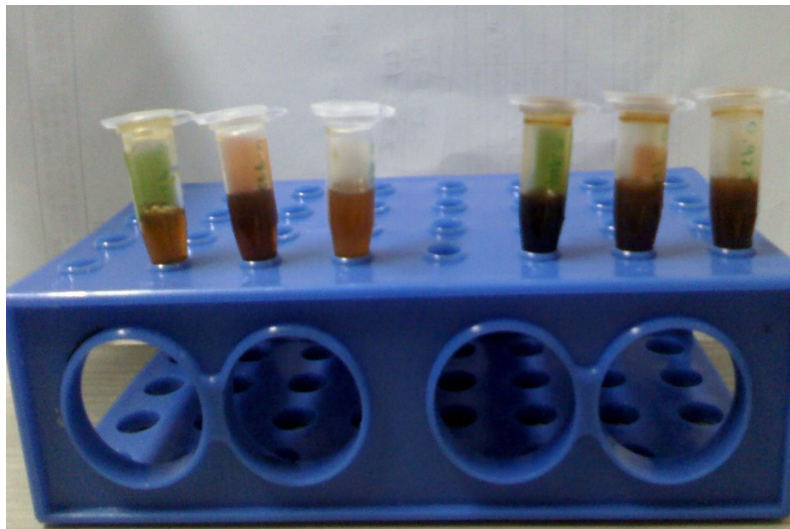


Fig. 1. 한방 슬러지를 이용한 팽이버섯 추출물의 고형분 함량 측정 사진

1. Control군 : 일반 농가 재배방법(기본배지+미강10%)
2. CD-1군 : 폐 슬러지 이용한 재배방법(기본배지+한약재10%)
3. CD-2군 : 폐 슬러지와 일반 농가 재배방법(기본배지+미강10%+한약재10%)

(나) 일반 재배 방식과 한방 슬러지 첨가 2군의 추출물에 대한 배당체 분리조건

본 실험에 사용한 배당체는 한방 슬러지를 이용한 팽이버섯을 환류냉각 추출물을 제조하고 그 추출물을 아래와 같은 방법으로 정제하여 팽이버섯의 배당체 추출물을 감압농축하여 실험에 사용하였다. 상기 추출물에 대해 일반 재배 방식(control)과 한방 슬러지 첨가 2군에 대해 오픈 칼럼(HP-20; 이온교환수지)을 이용하여 1차로 물추출물을 통해 배당체 물질을 분리하였으며, 2차로 에탄올 95%를 사용하여 나머지 여액을 추출하였다. 이때 추출물로부터 분리된 각 군의 함량은 table. 2과 같다.

1차 물추출물(배당체)의 함량은 일반적 재배 방식인 control군은 1차 물추출물 54.6g, 2차 에탄올 추출물 12.5g이었으며, 한방 폐 슬러지를 첨가한 팽이버섯 CD-1군은 1차 물추출물 56.2g, 2차 에탄올 추출물 12.7g이고 CD-2군은 1차 물추출물 57.0g, 2차 에탄올 추출물 13.1g으로 수율상으로 한방 폐 슬러지를 첨가한 팽이버섯 2군이 가장 높게 나타났다.

Table. 2 일반 재배 방식과 한방 슬러지 첨가 2군에 대한 수율 함량 비교 분석

(단위 : %g)

시험항목	시험군		
	Control군	CD-1군	CD-2군
1차 추출물(배당체)	1.82±1.3	1.87±1.5	1.9±1.2
2차 추출물(ethanol)	0.42±0.3	0.42±0.2	0.44±0.4

(다) 한방 슬러지로부터 배당체의 대량 분리용 제작 공정도

현재 실험실용 오픈칼럼을 제작하여 한방 슬러지를 이용하여 재배된 팽이버섯으로부터 배당체를 분리하여 1차년도 실험 및 분석용으로 사용하였으나, 2차년도에는 1차년도의 예비결과를 토대로 참여기업은 기타식품첨가물 제조업(10749) 허가 등록 후 시제품 생산을 위한 대량 생산 라인을 제작하여 산업적으로 이용하려고 한다. 공정도는 추출탱크와 혼합(배합)탱크 사이에 배당체 분리 오픈칼럼 탱크를 설치하고, 그 탱크에서 분리된 배당체를 배합탱크에서 바로 혼합하고 분리 정제하는 시스템으로 사용하려고 한다.

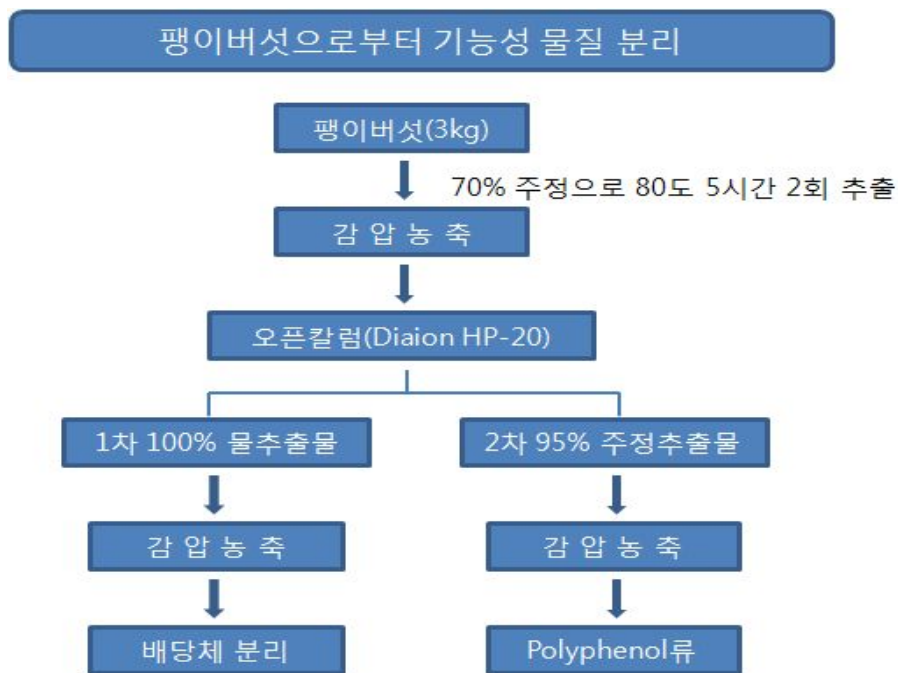


Fig. 2. 팽이버섯으로부터 배당체 분리와 polyphenol류 분리 방법

본 내용은 팽이버섯으로부터 대량의 배당체를 분리하기위해 제조 공정 개선 방안으로 주원료 생산 시 공장측과 협의하여 설비투자 비용은 3,000만원 정도 소요 될 것이며, 제품 생산 경비에서 1년간 생산수량으로 나누어 지급하기로 구두 약정하였다.

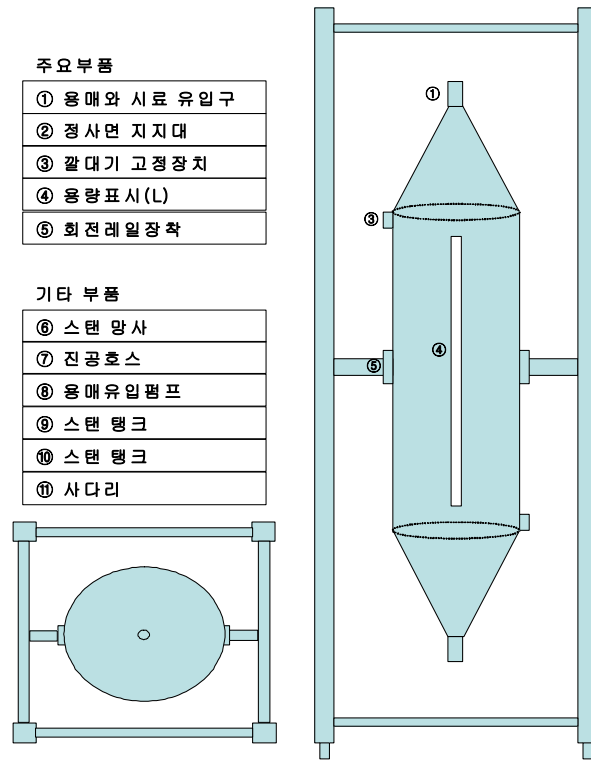


Fig. 3. 팽이버섯 배당체의 대량 분리를 위한 자동 분리 시스템.
 총용량 : 500kg, 고정상 충전용량 : 100kg, 이동상 : 용매 유입펌프 1톤

(라) 한방 슬러지로부터 분리한 배당체의 일반성분 분석 결과

한방 슬러지를 이용하여 재배한 팽이버섯 2종과 일반 팽이버섯 재배방식으로 키운 대조군에 대한 일반성분 분석결과는 table. 3와 같다. 일반 팽이버섯과 미강첨가균 한방 슬러지로부터 분리한 배당체는 지방이 검출되지 않았으나, 미강미첨가균에서는 지방함량이 검출되었다. 이는 한방 슬러지로부터 유입되었을 것으로 생각된다. 또한 조단백 및 회분은 일반 팽이버섯 대조군에서 가장 높게 나타났으나, 그 차이는 유의적인 결과를 보였다. 따라서 일반성분은 한방 슬러지를 이용한 팽이버섯과 일반 재배 방식으로 키운 팽이버섯과는 차이가 없는 것으로 나타났다.

Table. 3 한방 슬러지로부터 분리한 조배당체 2군과 대조군에 대한 일반성분 분석 결과

항목	한방 팽이버섯 조배당체 추출물			단위	시험방법
	A	B	C		
지방	불검출	0.1	불검출	g/100g	Chloroform-methanol 추출법
단백질	0.7	0.5	0.5	g/100g	Kjeldahl법
회분	0.8	0.7	0.5	g/100g	식품공전(2009) 회분시험법

(마) 한방 슬러지로부터 분리한 조배당체의 중금속 분석 결과

현재 전국 한의원 및 한약 약업사를 통해 한방 슬러지가 많이 나오고 있는데 서부경남의 진주시내에 80 여곳의 한의원 등에서만 1일 약 800 kg 정도 배출되는데, 이들의 대부분은 폐기 처분되고 있으며 일부는 농사용 퇴비로 사용되고 있기 때문에 한방 슬러지의 활용 문제는 수거비용과 전처리 비용으로 사용된다고 할 수 있다. 본 결과는 한방 슬러지의 안정성 검사를 위해 한방 슬러지를 이용하여 재배한 팽이버섯의 중금속 검사를 실시하였다. 한방 슬러지를 이용하여 재배한 팽이버섯 2종과 일반 팽이버섯 재배방식으로 키운 대조군에 대한 중금속에 대한 무기성분과 유해성 시험분석 결과는 table. 6와 같다. 한방 슬러지를 이용한 미강첨가군(C군)은 무기성분 Ca과 Na의 함량이 각각 100g 중 2.2와 9.4mg으로 가장 낮게 나타났으며, 일반 성분은 한방 슬러지를 이용한 팽이버섯과 일반 재배 방식으로 키운 팽이버섯의 유해성 중금속 검사에서 유해성 중금속 성분이 나타나지 않았다. 따라서 한방 슬러지를 이용하여 팽이버섯을 재배하여도 한방 슬러지의 문제점이 없을 것으로 생각된다.

Table. 6 한방 슬러지로부터 분리한 조배당체 2군와 대조군에 대한 중금속 분석 결과

항목	한방 팽이버섯 조배당체 추출물			단위	시험방법
	A	B	C		
Ca	2.5	3.4	2.2	mg/100g	식품공전(2009)무기성분시험법
Na	16.0	18.1	9.4	mg/100g	식품공전(2009)무기성분시험법
As	0.02	0.02	0.02	mg/100g	식품공전(2009)유해성금속시험법
Pb	불검출	불검출	불검출	mg/100g	식품공전(2009)유해성금속시험법
Cd	불검출	불검출	불검출	mg/100g	식품공전(2009)유해성금속시험법

나. 2차년도 연구방법 및 결과

(1) 제 1세부과제 연구방법 및 결과

(가) 연구방법

① 공시균주

임의로 채취한 약 300여 점의 버섯발효배지 및 부엽토 등으로부터 carboxy methyl cellulase (CMCase), protease 및 amylase활성이 높고 버섯질병균주에 대하여 생육억제력이 4a강하면서 버섯의 생육에는 영향을 미치지 않는 항균미생물을 순수분리하여 공시균주로 사용하였다. 버섯질병균주로서 푸른곰팡이병을 유발하는 질병균주는 팽이버섯 및 느타리버섯 등의 재배현장에서 오염된 배지를 수거하여 직접 순수분리하여 사용하였으며 세균성 갈반병을 유발하는 세균은 본 연구실에 보관중인 *Pseudomonas tolaasii* ATCC 33618을 사용하였다. 그리고 버섯종균은 전라남도 여수 및 경상북도 청도지역의 버섯재배농가에서 재배하고 있는 팽이버섯 및 표고버섯 종균을 분양받아 사용하였다.v이에 대하여 매우 높은 항균활성을 나타내었다.

② 사용배지

항균미생물의 분리용 배지는 sodium chloride 1%, yeast extract 0.5%, peptone 1%, skim milk 2%로 구성된 SM배지와 SM배지에서 skim milk 대신 2% soluble starch가 함유된 AM배지 및 1% carboxy methyl cellulose(CMC)가 함유된 CM배지를 사용하였다. 버섯종균 및 버섯질병균주의 생육 및 보존을 위한 배지는 PDA(Difco) 평판배지를 사용하였다. 분리한 항균미생물의 최적배지 검토를 위한 최소배지는 M9 minimal medium (glucose 2%, MgSO₄ · 7H₂O 0.2% Na₂HPO₄ · 7H₂O 0.4%, KH₂PO₄ 1.5%, NH₄Cl 0.5% 및 NaCl 0.02%)를 사용하였다.

③ 항균미생물 및 버섯질병균주의 분리

항균미생물의 분리는 발효시킨 느타리버섯 및 팽이버섯 배지를 채취하여 채취한 각 균원시료 1 g씩을 멸균된 생리식염수 9 ml에 잘 희석하였다. 희석한 시료용액 1 ml를 9ml의 멸균증류수로 적당히 10단계 희석한 후 SM, AM 및 CM평판배지에 각각 도말하여 생육속도가 빠르고 clear zone이 뚜렷한 균주를 1차 선별하였다. 1차 선별한 균주를 액체배지에서 효소활성을 검토하여 2차 선별한 다음 버섯질병균주에 대한 항균활성이 높으면서 버섯의 생육에는 전혀 영향을 미치지 않는 항균미생물을 최종 분리균주로 선정하였다. 팽이버섯 질병균주는 팽이버섯의 오염된 배지를 수거하여 PDA 평판배지에 도말하여 성장하는 곰팡이의 콜로니 색상, 형태 및 성장속도 등을 육안으로 관찰하여 순수분리 하였다.

④ 항균미생물의 동정

분리균주의 동정을 위한 형태학적 및 생화학적특성을 검토하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 및 Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th에 준하여 1차 동정한 다음 16S rDNA 유전자 분석을 행하여 동정하였다.

⑤ 항균활성 측정

미생물의 항균활성은 agar diffusion법에 준하여 측정하였다. 즉, 500 ml의 삼각플라스크에 200 ml의 액체배지를 넣고 살균한 후, 항균미생물의 전배양액을 1% 접종하여 35℃, 180 rpm, 24시간 배양하였다. 그 배양액을 8,000×g에서 원심분리한 후 얻은 상정액을 0.2 μm membrane filter로 여과하여 항균활성 측정시료로 사용하였다. 항균활성 측정은 PDA평판배지 중앙에 corker borer No.5(직경 7 mm)를 이용하여 버섯질병균주를 블록형태로 접종한 다음 25℃의 항온기에서 접종한 버섯질병균주의 균사가 평판배지의 1/3정도를 덮을 때까지 배양하였다. 이때 성장하는 버섯질병균주의 끝으로부터 1 cm 정도 떨어진 지점에 분리한 항균미생물을 획선으로 접종하여 항균활성을 측정하기도하고, 또는 corker borer No.5 (직경 7 mm)를 이용하여 평판배지 상에 구멍을 뚫은 다음 분리한 항균미생물의 배양용액을 120 μl 접종한 후 25℃에서 72시간까지 대치배양하면서 버섯질병균주의 균사성장 억제정도(inhibition zone)를 관찰하였다.

⑥ 최적 배지조성

분리한 항균미생물의 최적배지는 M9 minimal medium에 탄소원으로 glucose, sorbitol, mannitol, soluble starch, xylose, maltose, lactose, fructose, arabinose, cellobiose, raffinose, rhamnose, mannose, sucrose 및 galactose 등을 각각 1%씩 첨가하여 35℃, 180 rpm으로 24시간 배양 한 후 배양액의 탁도를 660 nm에서 측정하였다. 질소원은 NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃, NaNO₃, (NH₄)₂C₂O₄, malt extract, yeast extract, asparagine 및 peptone을 각각 0.5%씩 첨가하고, 무기염은 CoCl₂·6H₂O, CaCl₂, NaCl, ZnCl₂, FeSO₄·7H₂O, AgNO₃, HgCl₂, MgCl₂·6H₂O, K₂HPO₄, ZnSO₄·7H₂O, MgSO₄·7H₂O 등을 각각 0.05%씩 첨가하여 탄소원의 영향과 동일 방법으로 검토하였다.

⑦ 최적 배양조건

분리한 항균미생물의 최적 배양조건은 500 ml 삼각플라스크에 200 ml의 액체배지를 넣고 0.1 N HCl과 0.1 N NaOH 용액으로 배지의 초기 pH를 4.0~11의 범위로 조절하여 121℃, 15분 동안 멸균한 다음 제조한 액체배지에 최종 선정균주의 전배양액을 1%씩 접종하고 35℃, 180 rpm에서 24시간 배양한 후 660 nm에서 흡광도를 검토하였다. 그리고 최적 배양온도의 영향은 15~50℃의 온도범위에서, 진탕속도의 영향은 80~240 rpm의 범위에서 pH 영향의 검토방법과 동일하게 검토하였다.

(나) 연구결과 및 고찰

① 항균미생물의 순수분리

버섯 생육배지의 성분은 섬유성물질을 비롯한 전분질 및 단백질 등을 다량 함유하고 있기 때문에 이들 성분을 효율적으로 분해할 수 있는 CMCase, amylase 및 protease 활성이 높으면서 버섯질병균주에 대하여 항균활성이 우수한 균주를 중심으로 순수분리를 행하였다. 채취한 버섯의 발효배지의 시료로부터 약 80여종의 균주를 1차 선별하여 SM, AM 및 CM의 3종류 평판배지 상에서 동시에 clear zone이 크고 뚜렷하며 성장속도가 빠른 13균주를 2차 분리하여 Table 1과 Fig. 1에 나타내었다. 대부분의 분리균주들은 성장속도가 빠르고 뚜렷한 단일 콜로니를 형성하였으나 SM, AM 및 CM배지 상에 나타나는 clear zone의 크기는 균주에 따라 많은 차이를 보였다. CM배지 상에서는 HJ-50, HS-54, HJ-57 및 HJ-62, AM배지 상에서는 HJ-57, HJ-59 및 HJ-62, SM배지 상에서는 HJ-60 분리균주를 제외한 다른 균에서 clear zone이 비교적 크고 뚜렷하게 나타났다. 2차 분리한 미생물을 액체배지에서 24시간 진탕 배양한 다음 효소활성을 측정된 결과 protease와 amylase 효소활성은 HJ-57, HJ-59 및 HJ-62균주가 높은 활성을 보였으며, cellulase 효소활성은 HJ-50, HJ-57 및 HJ-62균주가 높은 활성을 나타내었다.

Table 1. 3종류의 배지 상에서 순수분리 균주의 성장속도 및 clear zone 크기 비교

분리균주	성장속도 ¹⁾	Clear zone ²⁾		
		CM ³⁾	AM ⁴⁾	SM ⁵⁾
HJ-50	+++	+++	++	+++
HJ-51	+++	++	++	+++
HJ-52	++	++	++	+++
HJ-53	+++	++	++	+++
HJ-54	+++	+++	++	+++
HJ-55	+++	+++	++	+++
HJ-56	++	++	++	+++
HJ-57	+++	+++	+++	+++
HJ-58	+++	++	++	+++
HJ-59	+++	++	+++	+++
HJ-60	+++	++	++	++
HJ-61	+++	++	++	+++
HJ-62	+++	+++	+++	+++

¹⁾ +;느림, ++;중간, +++;빠름. ²⁾ +; 4 mm이하, ++; 4-9mm, +++; 9mm 이상

³⁾CMC함유 평판배지, ⁴⁾Starch함유 평판배지, ⁵⁾Skim milk함유 평판배지.

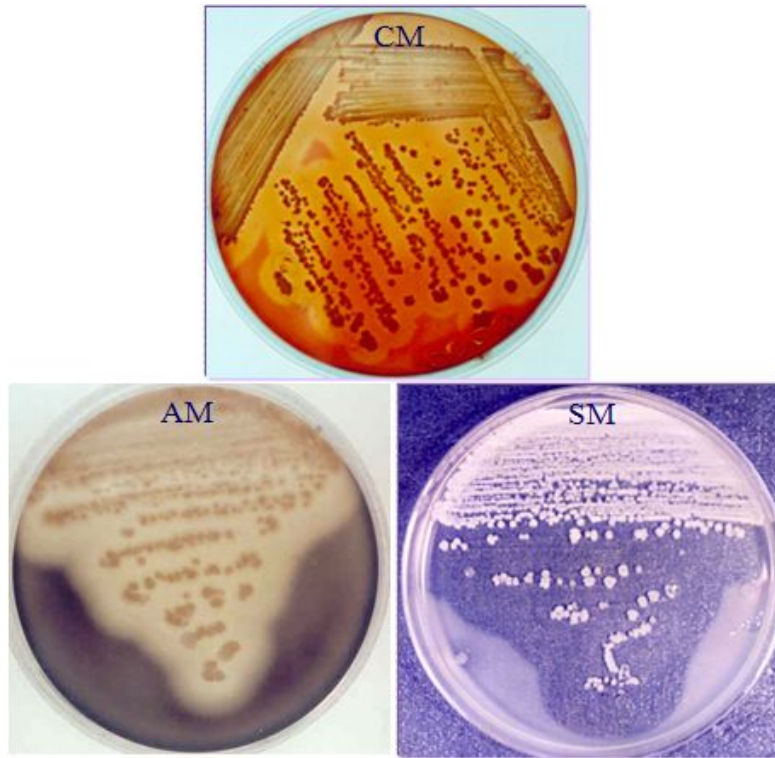


Fig. 1. 3종류의 평판배지에서 순수분리한 HJ-57 균주의 clear zone 사진.

② 버섯질병균주에 대한 항균활성

오염된 버섯의 배지로부터 8종의 오염원인 미생물을 순수분리하여 PDA평판배지에 배양하였을 때 성장속도, 콜로니의 형태 및 색상 등을 육안으로 관찰하여 서로 다른 균주로 판단되는 3종류의 오염 곰팡이를 분리·선별하였다. 이 곰팡이와 세균성 갈반병을 유발하는 *P. tolaasii*의 버섯질병균주에 대하여 2차 순수분리하여 보존 중인 항균미생물의 활성을 검토하여 Table 2 및 Fig. 2에 나타내었다. 순수분리한 13종류의 항균미생물 중에서 3종류의 곰팡이성 버섯질병균주에 대한 항균활성은 대부분의 분리균주에서 비교적 높은 것으로 나타났으나 HJ-60과 HJ-61균주는 낮게 나타내었다. 그리고 세균성 갈반병을 유발하는 *P. tolaasii*에 대해서는 HJ-52 및 HJ-57균주에서 비교적 높은 항균활성을 나타내었다. 이상의 결과로 버섯에서 푸른 곰팡이병을 유발하는 병원성균주로 분리된 M-23, M-24 및 M-25균주와 세균성 갈반병을 유발하는 *P. tolaasii*에 대하여 동시에 비교적 높은 항균활성을 나타내는 항균미생물로는 HJ-52, HJ-57 및 HJ-62분리균주인 것으로 나타났다.

Table. 2. 버섯질병균주에 대한 각종 분리균주의 항균활성

분리균주	버섯질병균주에 대한 항균활성 ¹⁾			
	M-23	M-24	M-25	<i>P. tolaasii</i>
HJ-50	++	++	++	++
HJ-51	++	++	++	-
HJ-52	++	+++	++	+++
HJ-53	++	++	++	++
HJ-54	++	++	++	++
HJ-55	+++	++	++	++
HJ-56	++	++	++	++
HJ-57	+++	+++	+++	+++
HJ-58	+	+++	++	-
HJ-59	+	+++	++	+
HJ-60	-	-	-	++
HJ-61	+	+	+	-
HJ-62	+++	++	+++	++

¹⁾ +; 4 mm이하, ++; 4-9mm, +++; 9mm 이상

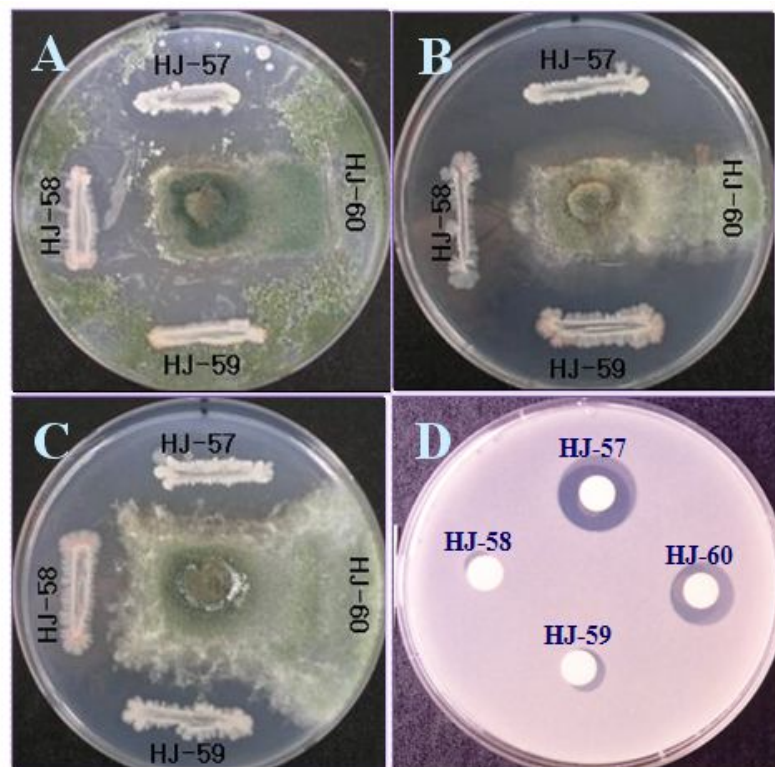


Fig. 2. 버섯질병균에 대하여 분리한 항균미생물이 나타낸 항균활성 사진.

A; M-23질병균주, B; M-24질병균주, C; M-25질병균주, D; *Pseudomonas tolaasii*.

HJ-57, HJ-58, HJ-59, HJ-60은 분리한 항균미생물.

③ 분리균주가 버섯의 생육에 미치는 영향

분리한 13종류의 항균미생물들은 대부분 3종류의 평판배지 상에서 clear zone의 크기가 크고 뚜렷하며 액체배지에서 효소활성이 비교적 높고 또한 버섯질병미생물에 대한 항균활성이 우수한 것으로 나타났으나 이들 항균미생물이 버섯의 생육에는 어떤 영향을 미치는지를 검토하여 Fig. 3에 나타내었다. 여수농가의 표고버섯 생육에는 분리한 항균미생물 중에서 HJ-53, HJ-54 및 HJ-55균주가 약간의 생육저해를 일으키는 것으로 나타났고, 여수농가의 팽이버섯에서는 HJ-54, HJ-55 및 HJ-56균주가 약간의 버섯생육저해를 일으켰으나 다른 항균미생물들은 버섯의 생육에 전혀 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그리고 청도농가의 팽이버섯에는 분리한 모든 항균미생물이 버섯의 생육에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 본 연구에서는 SM배지, AM배지 및 CM평판배지 상에서 clear zone의 크기가 크고 뚜렷하며 액체배지에서 효소활성이 비교적 높고, 곰팡이 및 세균성의 버섯질병미생물에 대한 항균활성이 우수하면서 팽이버섯 및 표고버섯 등의 생육에 전혀 영향을 미치지 않는 HJ-57균주를 최종 분리균주로 선정하여 이하의 실험을 행하였다.

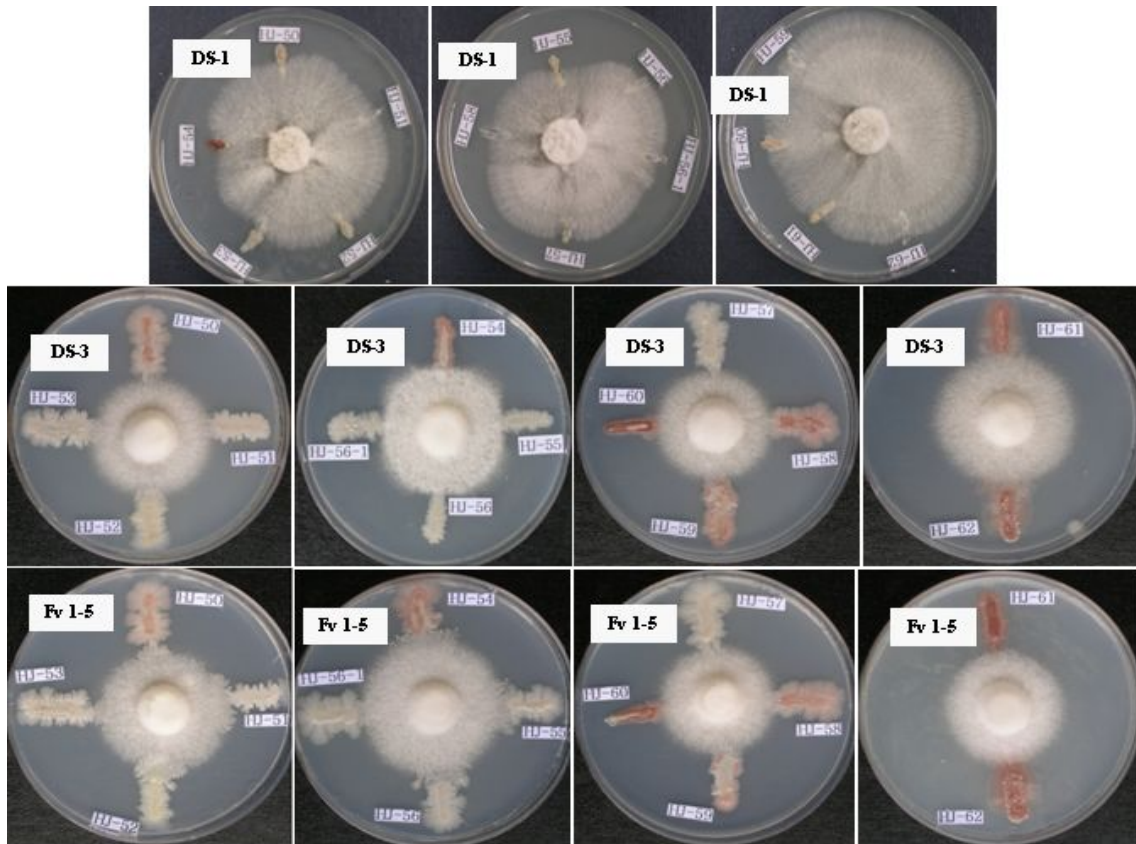


Fig. 3. 분리한 항균미생물이 버섯균주의 생육에 미치는 영향.

DS-1; 여수농가 표고버섯, DS-3; 여수농가 팽이버섯, Fv1-5; 청도농가 팽이버섯.

④ 분리균주의 동정

최종 선정된 항균미생물인 HJ-57의 형태학적 및 생태학적 특성을 검토하여 Fig. 4, Fig. 5 및 Table 3에 나타내었다. 분리한 HJ-57균주는 Gram 양성이며 편모 및 내생포자를 가지는 간균으로 크기는 0.7-0.9×2.1-3.2 μm로 나타났다. 생화학적 특성은 oxidase, catalase 및 urease반응은 양성이었으나, indol 생성은 음성이었다. 이러한 결과를 토대로 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[23] 및 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[7]에 준하여 동정한 결과 *Bacillus* 속(genus)인 것으로 추정되었으며 16s rDNA 분석(그림. 5)을 행한 결과 분리한 HJ-57균주는 98%정도 *Bacillus* sp.과 유사한 것으로 판명되어 최종분리 선정된 균주를 *Bacillus* sp. HJ-57로 명명하였다.

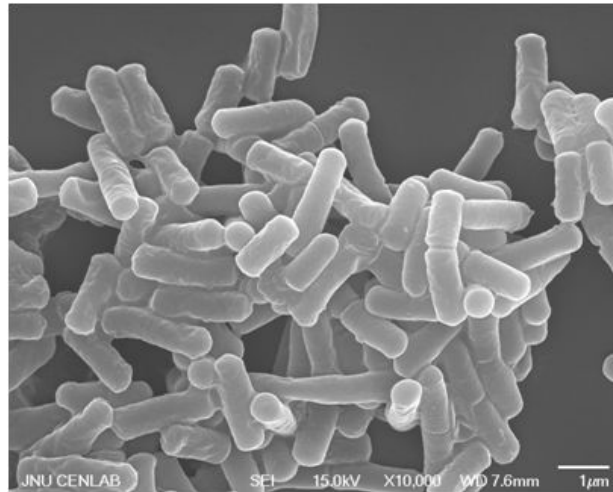


Fig. 4. 분리한 HJ-57항균미생물의 전자현미경 사진.

Table 3. 분리한 HJ-57항균미생물의 생화학적 특성

분석 항목	HJ-57	분석 항목	HJ-57
Gram stain	+	Spore formation	+
Cell type	Rod	Oxidase reaction	+
Size(μm)	0.7-0.9×2.1-3.2	Catalase reaction	+
Motility	+	Urease reaction	+
Colony color	Ivory	Voges-Prostauer test	+
Fluorescence	-	Citrate utilization	+
Flagellum	+	Indol production	-

5'-CTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCT
 CAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAG
 AAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
 AGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTG
 TAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATT
 AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTG
 TTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAG
 CACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGG
 AATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT
 TCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG
 ACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACA
 GGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGG
 TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGC
 ATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGA
 GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCT
 GGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAA
 ACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGG
 ATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGT
 AATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT
 GTACACACCGCCCGTCCACACCACGAGAGTTTGTACACCCGAA-3'

Fig. 5. 분리균인 HJ-57항균미생물의 16S rDNA 염기서열.

⑤ 탄소원의 영향

분리한 HJ-57 항균미생물의 생육 및 항균물질 생산은 배지조성에 크게 영향을 받을 것으로 생각되어 최적배지 조성을 검토하였다. 먼저 탄소원의 종류 및 농도가 HJ-57균주의 생육에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 6과 7에 나타내었다. 대조구는 탄소원을 첨가하지 않은 M9 minimal medium을 배지를 사용하였다. 그림. 4에서 보는바와 같이 HJ-57균주의 생육은 탄소원의 종류에 따라 크게 영향을 받는 것으로 나타났다. 기본 배지에 xylose, sorbose, arabinose, fructose 및 galactose 등의 첨가는 HJ-57균주의 생육에 전혀 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으나 starch, CMC 및 maltose 등의 첨가는 분리균주의 생육을 크게 증가시키는 것으로 나타났다. 그 중에서도 starch의 첨가가 가장 효과적인 것으로 밝혀져 그 첨가 농도를 0~4.0% 범위로 달리하면서 검토한 결과 3.0%까지는 첨가농도에 비례하여 직선적으로 균의

생육이 증가하였으나 그 이상의 첨가는 영향이 없는 것으로 나타났다(Fig. 5). 이상의 결과로 탄소원의 종류는 starch, 그 첨가농도는 3.0%가 최적인 것으로 결정하였다.

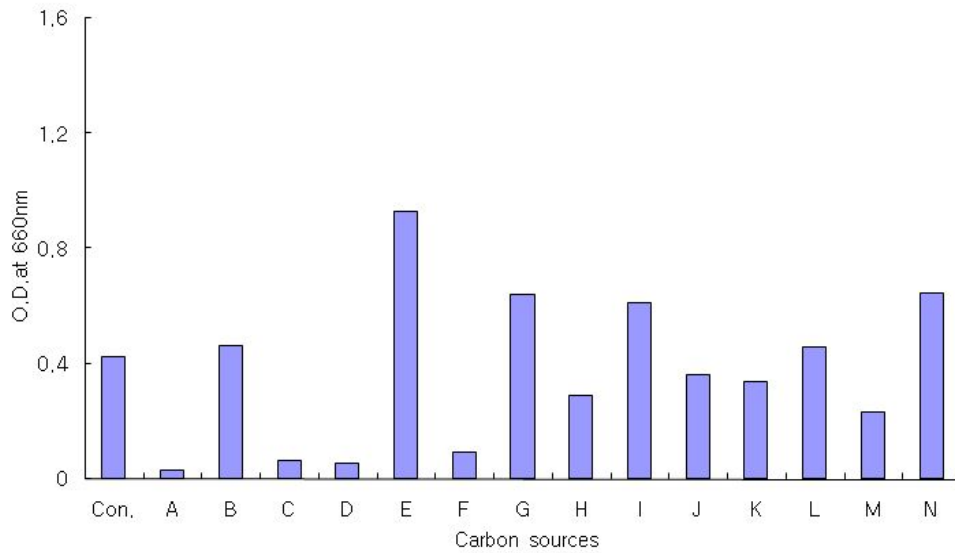


Fig. 6. 탄소원의 종류가 HJ-57균주의 생육에 미치는 영향.

A;Xylose, B;Sorbitol, C;Sorbose, D;Arabinose, E;Starch, F;Fructose, G;Maltose, H;Glucose, I;Mannitol, J;Lactose, K;Raffinose, L;Cellobiose, M;Galactose, N;CMC

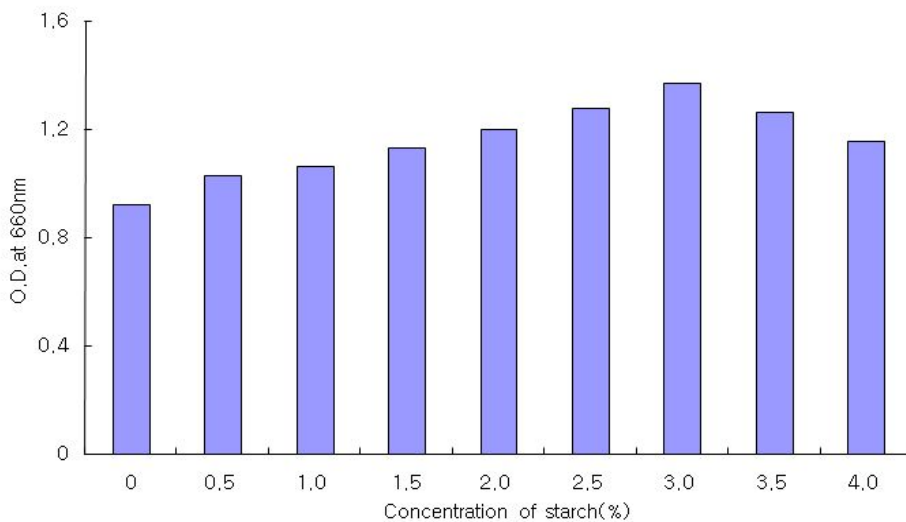


Fig. 7. Starch 농도가 HJ-57균주의 생육에 미치는 영향.

⑥ 질소원의 영향

HJ-57 항균미생물의 생육에 미치는 질소원의 영향을 검토하여 Fig. 8과 9에 나타내었다. 대조구는 M9 minimal medium에 3.0%의 starch를 첨가한 배지를 사용하였다. 질소원 중에서 yeast extract, malt extract 및 beef extract 등의 유기질소원 보다도 NaNO_3 , NH_4NO_3 , 및 NH_4Cl 등의 무기질소원 첨가가 효과적인 것으로 나타났다. 그 중에서도 NH_4NO_3 의 첨가가 HJ-57균주의 생육에 가장 효과적이었다(Fig. 8). 그리고 NH_4NO_3 의 첨가농도를 검토한 결과 1.0%가 최적농도인 것으로 나타났다(Fig. 9).

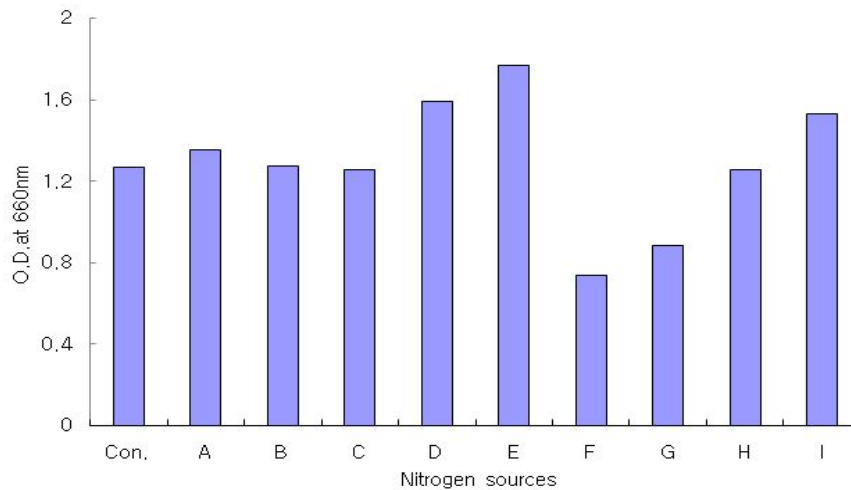


Fig. 8. 질소원의 종류가 HJ-57균주의 생육에 미치는 영향.

Con.;Control, A;Yeast extract, B;Malt extract, C;Beef extract, D; NaNO_3 , E; NH_4NO_3 , F;L-Asparagine, G;Peptone, H; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, I; NH_4Cl

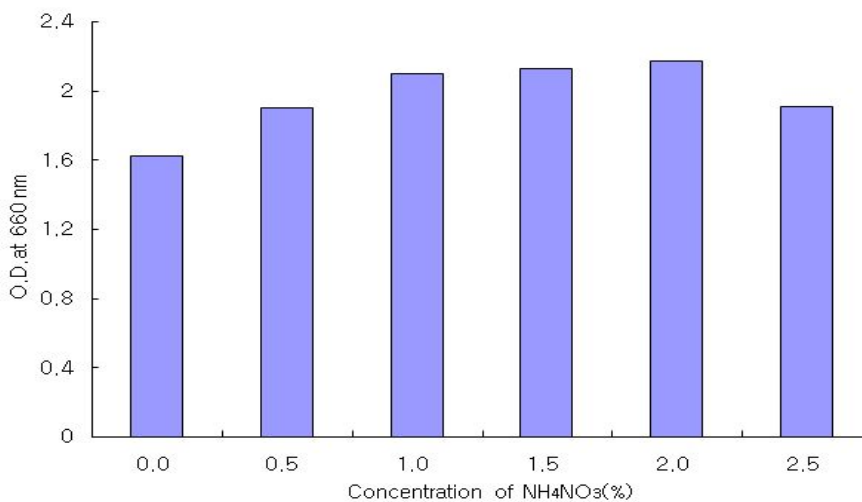


Fig. 9. NH_4NO_3 농도가 HJ-57균주의 생육에 미치는 영향.

⑦ 무기염의 영향.

분리한 HJ-57균주의 생육에 미치는 무기염의 영향을 검토하여 Fig. 10에 나타내었다. 대조구는 M9 minimal medium에 3.0% starch와 1% NH_4NO_3 를 첨가하였다. 그 결과 CoCl_2 , ZnCl_2 , FeSO_4 , AgNO_3 , 및 HgCl_2 등의 첨가는 오히려 생육을 저해하였으나 CaCl_2 , NaCl 및 MgSO_4 등의 첨가는 HJ-57의 생육을 약간 촉진하였다. 그 중에서도 CaCl_2 가 가장 효과적이었으며 그 농도는 0.05%로 나타났다(Fig. 11).

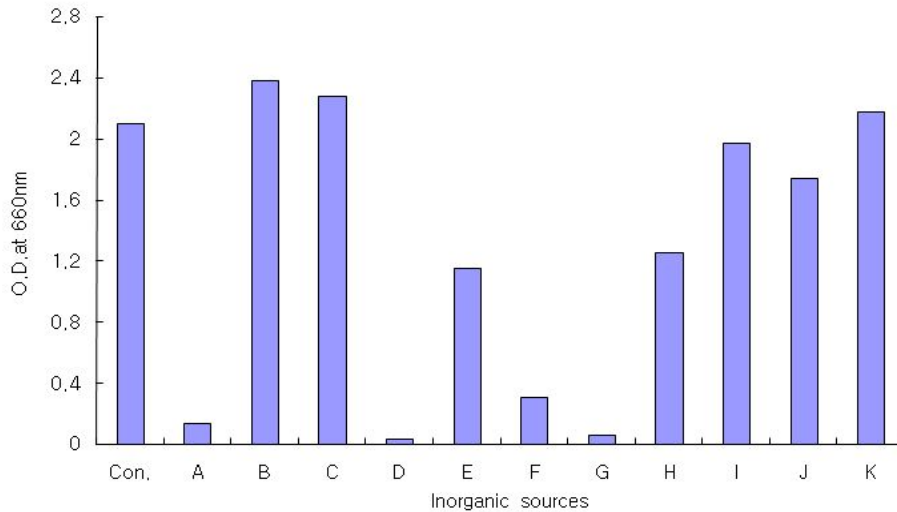


Fig. 10. 무기염의 종류가 HJ-57균주의 생육에 미치는 영향.

Con.:Control, A; CoCl_2 , B; CaCl_2 , C; NaCl , D; ZnCl_2 , E; FeSO_4 , F; AgNO_3 , G; HgCl_2 , H; MgCl_2 , I; K_2HPO_4 , J; ZnSO_4 , K; MgSO_4 .

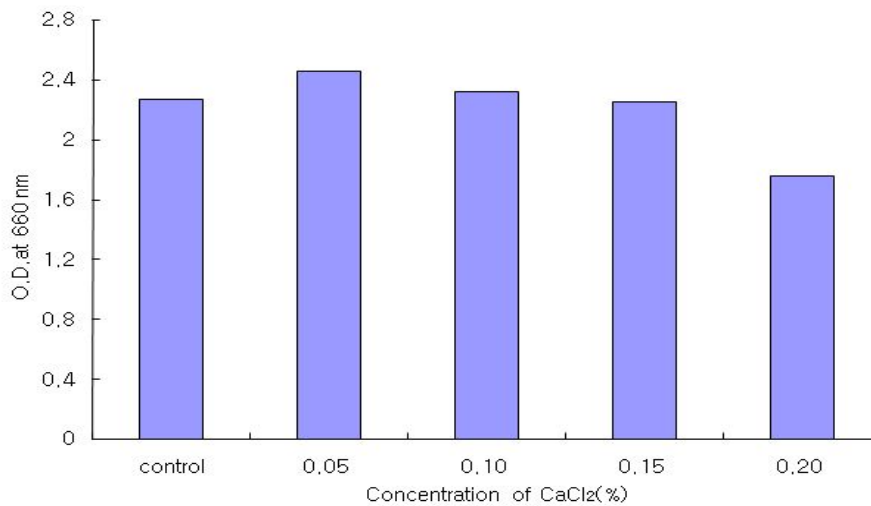


Fig. 11. CaCl_2 농도가 HJ-57균주의 생육에 미치는 영향.

⑧ 배양온도의 영향.

배양온도가 분리한 HJ-57항균미생물의 생육에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 12에 나타내었다. 배양온도를 15℃~50℃의 범위로 변화시키면서 검토한 결과 HJ-57 항균미생물의 생육은 15℃~35℃까지는 균체가 직선적으로 증가하였으나 35℃이상의 온도에서는 급격하게 생육이 저하하는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 HJ-57 항균미생물의 최적생육 온도는 35℃ 부근인 것을 확인되었다.

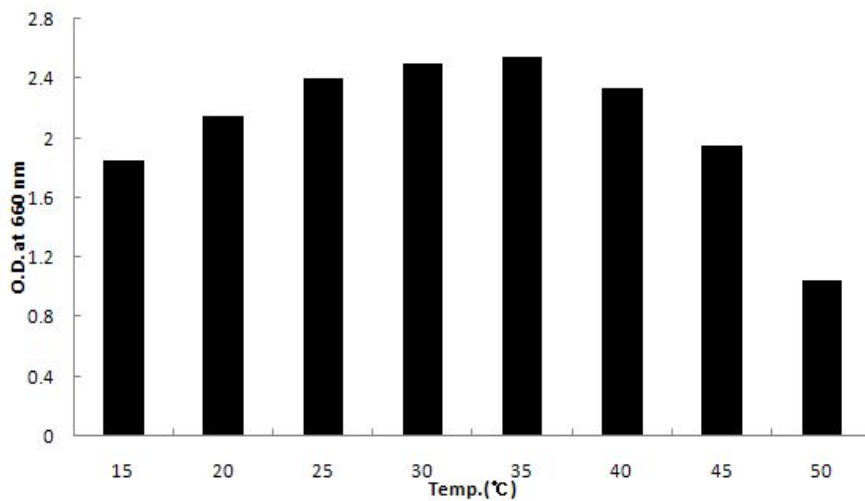


Fig. 12. 배양온도가 HJ-57 분리균주의 생육에 미치는 영향.

⑨ 초기 pH의 영향.

HJ-57 항균미생물의 생육에 미치는 배지의 초기 pH 영향을 조사하여 Fig. 13에 나타내었다. 배지의 초기 pH를 pH 4~11범위로 조절하여 35℃의 최적 배양온도에서 배양한 결과 초기 pH 4에서 5까지는 생육이 급격하게 증가하였으나 pH 6~8까지는 거의 대등한 생육상태를 나타내었다. 그리고 초기 pH 8이상에서는 생육이 급격하게 저하하는 현상을 나타내었다. 이상의 결과로 HJ-57 항균미생물 배지의 초기 pH는 배지를 제조하였을 때 pH를 조절하지 않은 pH 7.0을 최적 pH로 결정하였다.

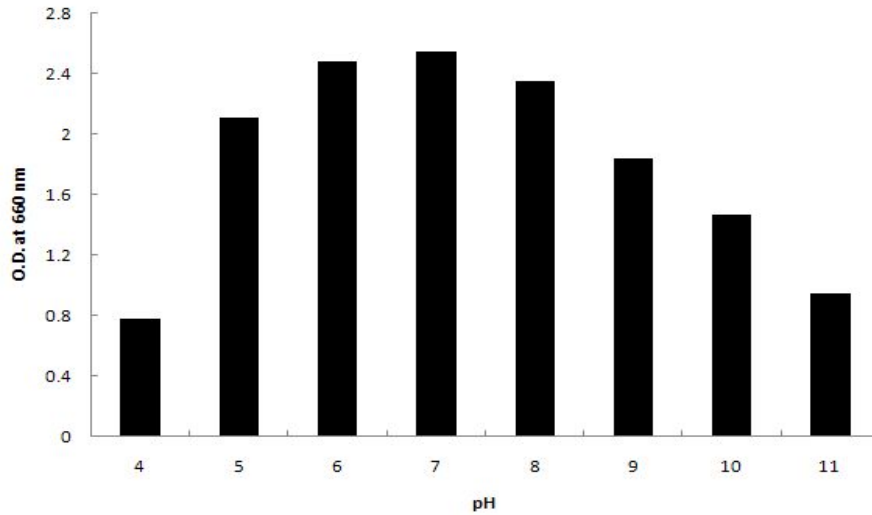


Fig. 13. 배지의 초기 pH가 HJ-57 분리균주의 생육에 미치는 영향.

⑩ 진탕속도

진탕 속도가 HJ-57 항균미생물의 생육에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 14에 나타내었다. 배지의 초기 pH는 배지를 제조하여 조절하지 않은 pH 7.0으로 하고 35°C의 배양온도에서 진탕 속도를 80, 120, 160, 200 및 240 rpm으로 변화시키면서 배양한 결과 진탕 속도를 증가 시킬수록 미생물의 증식은 왕성하였다. 특히 80 rpm에서 160 rpm까지는 거의 직선적으로 O.D.값이 증가하였으며 그 이상의 진탕속도에서는 일정한 값을 나타내었다. 이상의 결과로 분리한 HJ-57 항균미생물의 배양을 위한 최적 진탕속도는 160 rpm으로 결정하였다.

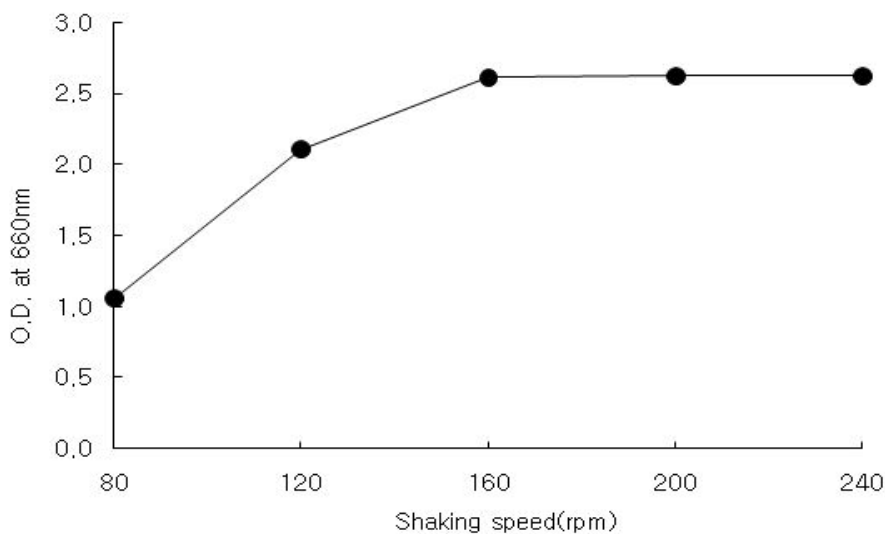


Fig. 14. 진탕속도가 HJ-57 분리균주의 생육에 미치는 영향.

⑪ HJ-57항균미생물의 생육곡선

본 연구에서 얻어진 배지조성 및 배양조건으로 HJ-57 항균미생물을 배양할 때 배양시간이 미생물의 생육에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 15에 나타내었다. HJ-57 항균미생물은 배양 6 hr까지의 유도기를 지나 그 이후부터 대수증식기로 접어들면서 배양 18 hr째까지 급격하게 균체가 증식하고, 배양 27 hr을 전후하여 정상기 및 사멸기로 접어드는 전형적인 S자형의 생육곡선을 나타내었다(Fig. 15).

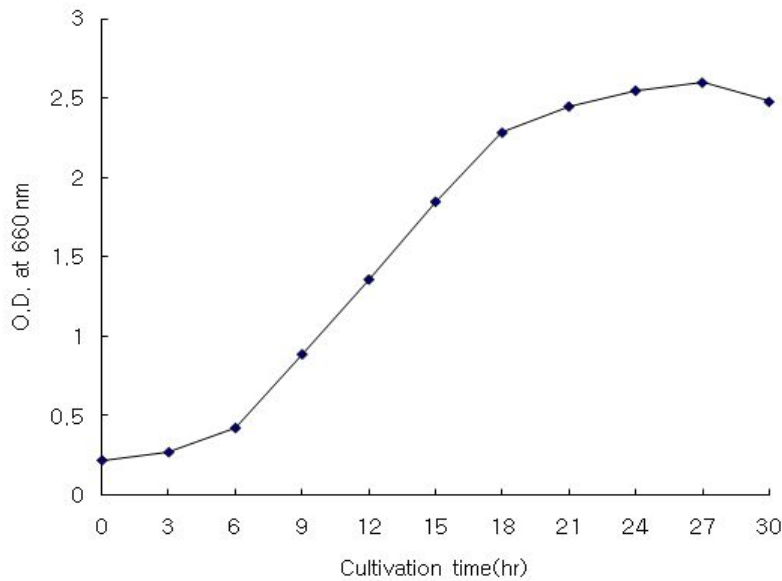


Fig. 15. 배양시간이 HJ-57 항균미생물의 생육에 미치는 영향.

⑫ 배양시간에 따른 항균활성

최적의 배지조성 및 배양조건으로 HJ-57 항균미생물을 배양할 때 배양시간이 항균물질의 생산에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 16에 나타내었다. HJ-57 항균미생물의 배양용액은 M-23질병균주, M-24질병균주 및 M-25질병균주 모두에 대하여 높은 항균활성을 나타내었지만 M-24질병균주 보다는 M-23질병균주와 M-25질병균주에 대하여 더 높은 항균활성을 나타내었다. 그리고 배양 12시간째의 배양용액에서도 버섯 질병균주인 M-23, M-24 및 M-25에 대하여 약간의 항균활성을 나타내었으나 배양 24시간 이후부터는 항균활성이 더욱더 뚜렷하게 나타나 배양 72시간까지 유지됨을 확인할 수 있었다. 이상의 결과로 HJ-57 항균미생물의 항균활성은 배양 36시간~60시간 배양하였을 때 가장 높은 항균활성을 갖는 것으로 판단되었다.

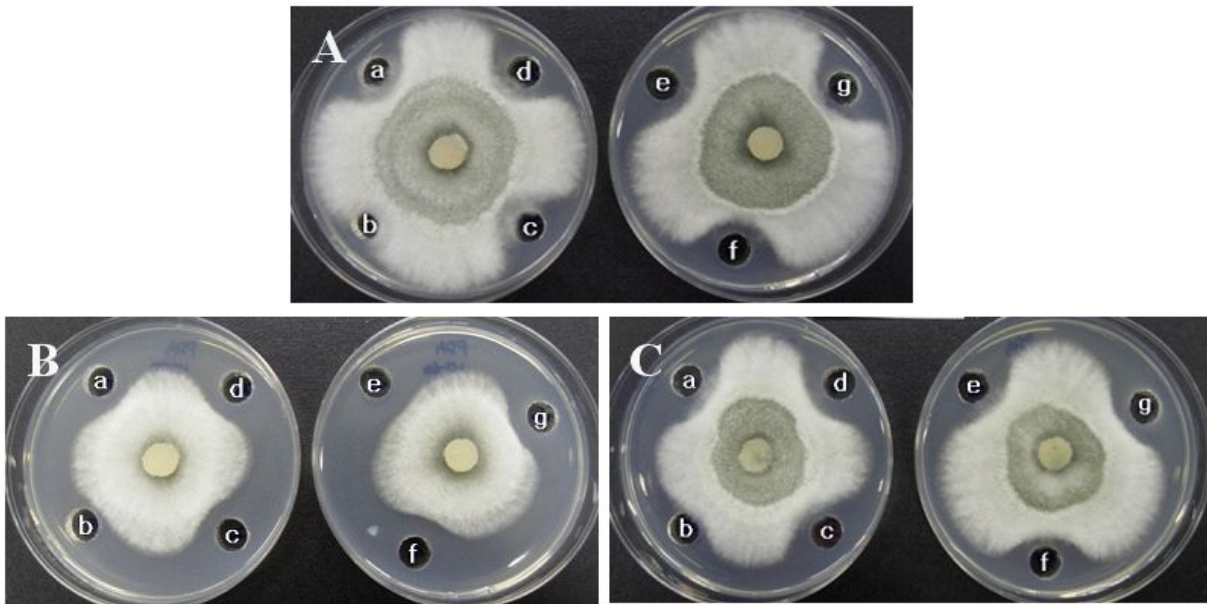


Fig. 16. HJ-57 항균미생물의 배양시간이 버섯질병균주에 미치는 영향

A; M-23질병균주, B; M-24질병균주, C; M-25질병균주
HJ-57 배양시간 : a;12hr, b;18hr, c;24hr, d;36hr, e;48hr, f;60hr, g;72hr

⑬ 버섯배지 상에서 항균활성

실제 버섯을 재배하는 배지 상에서 HJ-57 항균미생물이 버섯질병균주의 생육에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 15에 나타내었다. 버섯배지를 시험관에 충전하여 멸균시킨 다음 전배양한 버섯질병균주인 M-23, M-24 및 M-25의 배양용액을 배지의 상층부에 각각 2 mL씩 접종한 후 48시간 배양한 HJ-57항균미생물의 배양용액을 동량씩 접종하여 25°C에서 7일 동안 배양한 결과 대조구(a)에서는 전혀 버섯질병균주인 세균과 곰팡이의 생육이 전혀 관찰되지 않았다. 그러나 각 버섯질병균주만을 접종한 (b) 시험구에서는 버섯질병균주의 왕성한 생육이 관찰되었으나 버섯질병균주와 항균미생물을 동시에 접종한 (c) 시험구에서는 버섯질병균주 생육이 현저하게 감소함을 관찰할 수 있었다. 그리고 배양 7일째에 버섯질병균주가 약간 성장하고 있는 시험구의 상층부에 분리한 HJ-57 항균미생물 배양용액 2 mL를 중첩 접종하여 2주일 동안 방치하여도 버섯질병균주인 곰팡이의 성장은 더 이상 이루어지지 않음을 확인하였다 (Fig. 17). 이상의 결과로 본 연구에서 분리한 HJ-57 항균미생물은 버섯 질병균주인 세균 및 곰팡이의 생육억제에 효과적인 것으로 나타나 버섯재배에 매우 유용한 항균미생물인 것으로 판단되었다.

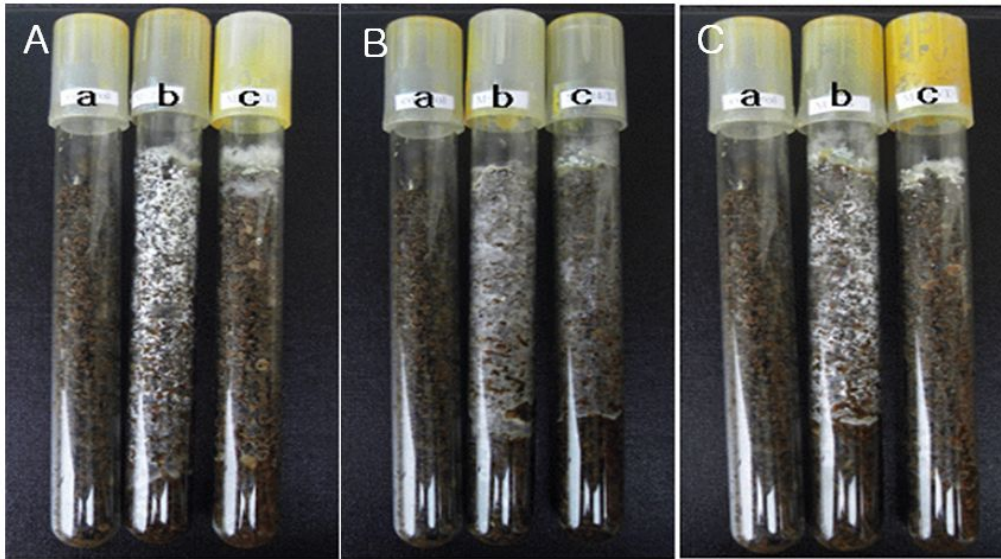


Fig. 17. 배지상에서 버섯 질병균에 대한 HJ-57의 항균활성.

A:M-23질병균주, B:M-24질병균주, C:M-25질병균주
a: 대조구, b:질병균주만 접종, c:질병균주와 HJ-57항균미생물 동시접종(1:1)

(2) 제 1협동과제 연구방법 및 결과

(가) 연구방법

① 실험동물

실험동물은 (주)오리엔트 바이오에서 특정병원체부재(specific pathogen free) C57BL/6 생쥐를 공급받아 실험동물 사육실에서 polysulfone cage (365×207×130mm)당 5개체의 밀도를 유지하며 사육하였다. 이들 생쥐는 2주일간 실온에서 물과 사료를 충분히 공급하고, 낮과 밤의 주기를 12시간씩 조절하면서 가능한 스트레스를 받지 않도록 사육하면서, 8-10주령 생쥐를 실험에 사용하였다.

② 실험시료 투여

팽이버섯 시료 경구 투여하여 면역학적 변화를 관찰한 실험에서는 시료를 150mg/kg/day로 PBS 200 μ l에 희석한 후 매일 1회씩 4주간 경구 투여한 다음 생쥐를 희생하였으며, 종양 억제력을 관찰한 실험은 시료를 150mg/kg/day로 PBS 200 μ l에 희석한 후 매일 1회씩 4주간 경구 투여한 다음 B16F0세포 3×10⁵ cell/mouse를 피하주사하고, 그 후 3주간 시료를 150mg/kg/day로 계속 투여하였다.

③ 사용시약

세포 배양에 필요한 RPMI-1640과 항생제(antibiotic-antimycotic), Fetal Bovine Serum(FBS)은 Hyclone 제품을, 2-mecaptoethanol(2ME), sodium bicarbonate(NaHCO_3), 세포 증식반응에 사용한 Lipopolysaccharide(LPS)와 Concanavalin A(Con A)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA)제품을 사용하였다.

④ 혈액학적 분석

생쥐를 희생하기 전에 안와채혈로 혈액을 채혈한 후에 EDTA(Ethylene diaminetetraacetic acid) Tube에 넣어 항응고 처리한 후, 5시간 이내에 혈구분석기(HemaVet, Drew, USA)로 아래의 항목을 측정하였다. 백혈구 수(White Blood cell, WBC) 및 백혈구 조성[호중구(Neutrophil, NE), 임파구(Lymphocyte, LY), 단핵구(Monocyte, MO), 호산구(Eosinophil, EO), 호염구(Basophil, BA)], 적혈구 수(Red Blood Cell, RBC), 혈색소량(Hemoglobin, Hb), 적혈구 용적(Hematocrit, Hct), 평균 적혈구 용적(Mean Corpuscular Volume, MCV) 평균 적혈구 색소량(Mean Corpuscular Hemoglobin, MCH), 평균 적혈구 색소농도(Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration, MCHC), 혈소판(Platelet, PLT), 평균 혈소판 용적(Mean Platelet Volume, MPV)을 측정 하였다.

⑤ 비장세포증식 측정

생쥐(C57BL/6)의 비장을 분리한 다음, 핀셋을 이용하여 단일세포 부유액을 만들었다. 단일세포 부유액을 RPMI 1640 배양액으로 3회 세척한 다음, 5×10^6 cell/ml 농도가 되게 희석한 후, 96 well당 $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가하였다. 이때, LPS는 1, 3, $10 \mu\text{g/ml}$ 또는 Con A는 0.1, 0.3, $1.0 \mu\text{g/ml}$ 로 첨가하여 37°C , 5% CO_2 배양기에서 48시간 배양하였다. 세포증식 측정은 분리한 비장세포 및 B세포를 96well plate에 넣고 여기에 배양액 추출물을 농도별로 넣어 배양한 다음 증식정도를 측정하였다. 즉 세포배양 well에 Cell Counting Kit-8(DOJINDO, Japan)을 $10 \mu\text{l}$ 첨가하여 37°C , 5% CO_2 incubator에 4~8시간 동안 배양한 다음, Microplate reader (Titertek Multiscan Plus, Finland)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

⑥ 비장세포 cytokine 측정법

비장세포 (5×10^6 개)에 LPS($10 \mu\text{g/ml}$), Con A($1 \mu\text{g/ml}$)를 처리 한 후, 24시간 동안 37°C , 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 배양 후 상층액을 수거하여 상층액에 포함된 IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α 의 양은 효소면역항체법(enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA)을 이용하여 측정하였다. 즉, plate-bottom micro-well에 1차 항체($2 \mu\text{g/ml}$)를 coating buffer(0.1 M

NaHCO₃, pH8.2)에 희석하여 50 μ l/well로 분주하고 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 둔 다음, washing 용액 (0.05% Tween 20/PBS)으로 세척하였다. 세척된 micro-well은 10% FBS가 첨가된 PBS로 blocking하였으며, 실험에서 채취한 배양 상층액을 적당한 비율로 희석한 후 각 well에 분주하여 상온에서 반응시켰다. 그 다음, biotin이 부착된 2차 항체(1 μ g/ml) 100 μ l/well와 일정시간 상온에서 반응시킨 후, avidin-peroxidase(2.5 μ g/ml) 100 μ l/well을 첨가하였다. 마지막으로 기질(2, 2'-azino-bis, 0.1 M citric acid, H₂O₂)을 첨가하여 발색시킨 다음, micro-plate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α 의 농도는 표준곡선을 이용하여 환산하였고 측정 농도의 한계치는 10 pg/ml이었다.

⑦ 세포 표면분자 분석

생쥐의 흉선세포 및 비장세포(5 \times 10⁵개)를 수거하여 anti-CD16/CD32(Fc γ III/II Receptor) mAb로 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 blocking하고 washing 용액(1% FBS · 0.1% NaN₃/PBS)으로 세척하였다. 그리고 PE-conjugated anti-CD8 mAb, FITC-conjugated anti-CD4, CD-19 mAb로 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 염색하였다. 염색된 세포는 다시 washing 용액으로 세척한 후, 인산완충용액에 현탁하여 유세포분석기로 분석하였다.

⑧ 자연살해세포 및 세포독성 T세포의 세포독성

배양한 YAC-1 세포와 B16F0 세포를 수거하여 washing 배지로 두 번 세척하였다. 세척된 두 세포를 5% FBS RPMI 배지에 4 \times 10⁵ cell/ml 현탁하여 96-well U bottom plate에 50 μ l/well로 분주하였다. 세포가 분주된 well에 RBC가 제거된 비장세포를 5% FBS RPMI 배지에 현탁하여 효과세포와 표적세포의 비율이 50:1 또는 100:1이 되도록 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 배양 후, 250g, 25 $^{\circ}$ C, 4min간 spin down하여 상층액 50 μ l를 수거하였다. 수거된 상층액은 CytoTox96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit(promega, USA)를 이용하여 LDH를 측정함으로써 비장세포내의 자연살해세포 및 세포독성 T세포의 암세포에 대한 세포독성능력을 측정하였다.

$$\text{Cytotoxicity} = \frac{(\text{Target : Effector} - \text{Medium}) - (\text{Target} - \text{Medium}) - (\text{Effector} - \text{Medium})}{(\text{Target lysis} - \text{Medium lysis}) - (\text{Target} - \text{Medium})} \times 100$$

⑨ B16F0 종양 크기 및 무게 측정

종양 크기는 B16F0세포 투여 후 종양이 생성된 11일째부터 Digimatic caliper(Mitutoyo, Japan)를 이용하여 매일 1회 측정하였으며, 21일째 생쥐를 희생한 후 종양 조직을 적출하여 크기 및 무게를 측정하고 사진을 촬영하였다.

(나) 연구결과

① 과립茶 시제품에 대한 경구투여 후 면역학적 변화에 대한 연구 결과

실험시료를 4주간 매일 1회 투여한 결과, 위에서 행한 여러 가지 실험항목에서 통계학적인 유의한 변화는 없는 것으로 나타나, 면역기능을 활성화시키는 통계학적인 유의한 효과는 확인할 수 없었지만, 장기간 투여에 의한 유의한 독성효과도 나타나지 않았다.

Table 1. Effect of sample administration on hematology change in C57BL/6 mice

	Control	A	B
WBC (K/ μ l)	6.66±0.55	7.71±0.79	6.54±1.06
NE (K/ μ l)	0.96±0.30	1.24±0.09	0.89±0.08
LY (K/ μ l)	4.50±0.28	5.88±0.81	5.23±0.86
MO (K/ μ l)	0.49±0.04	0.55±0.08	0.40±0.16
EO (K/ μ l)	0.07±0.10	0.03±0.02	0.02±0.01
BA (K/ μ l)	0.02±0.03	0.01±0.01	0.00±0.00
RBC (K/ μ l)	11.02±0.20	10.78±0.30	10.73±0.21
Hb (g/ μ l)	12.67±0.47	12.20±0.35	12.50±0.30
HCT (%)	48.73±2.70	46.17±1.31	46.20±0.69
MCV (fL)	44.17±1.65	42.80±0.20	43.03±0.40
MCH (pg)	11.50±0.20	11.30±0.00	11.63±0.25
MCHC (g/dl)	26.00±0.44	26.43±0.15	27.07±0.38
RDW (%)	18.20±0.56	17.71±0.20	18.67±0.70
PLT (K/ μ l)	543.0±40.1	611.0±47.5	564.3±9.9
MPV (fl)	4.5±0.1	4.7±0.1	4.6±0.1

WBC: White blood cell, NE: Nutrophil, LY: Lymphocyte, MO: Monocyte, EO: Eosinophil, BA: Basophil, RBC: Red blood cell, Hb: Hemoglobin, HCT: Hematocits, MCV: Mean Corpuscular Volume, MCH: Mean Corpuscular Hemoglobin MCHC: Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration, RDW: Red blood cell distribution width, PLT: Platelet, MPV: Mean Platelet Volume

4주간 매일 1회 경구투여한 후 혈액학적 분석을 한 결과, 대부분의 항목에서 큰 변화는 없었지만 호중구(neutrophil)와 림프구(lymphocyte) 수가 대조군에 비해서 실험시료 A와 B를 투여한 실험군에서 약간씩 증가한 것으로 나타났으나 통계학적 유의성은 없었다.

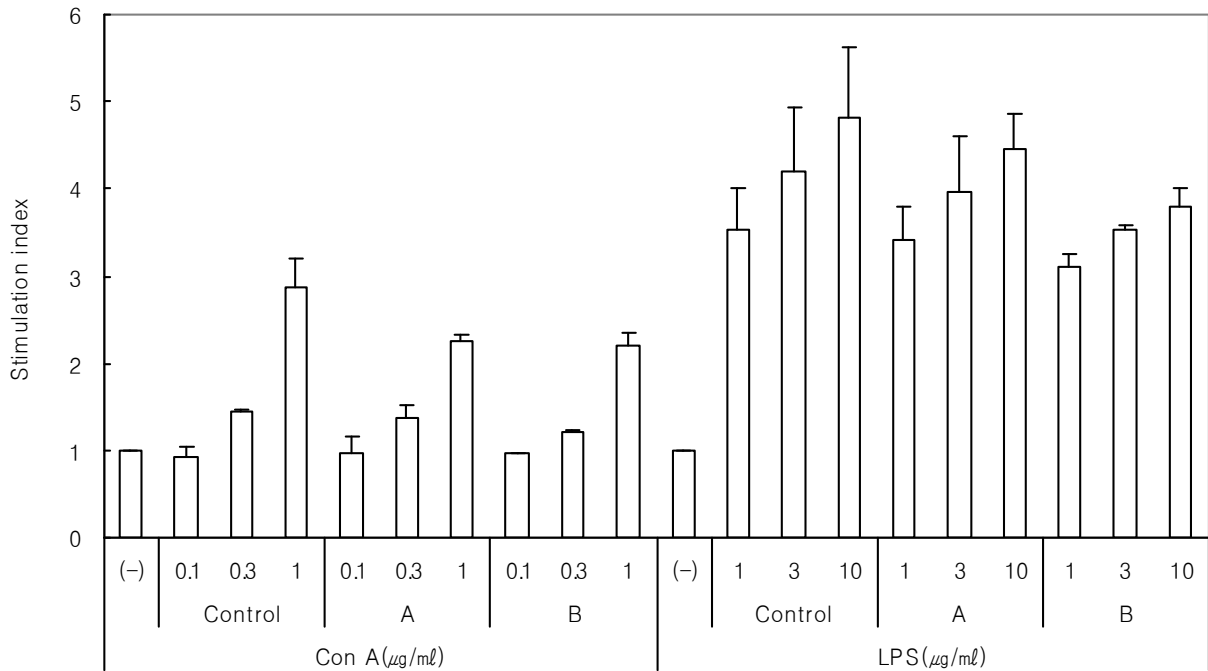


Fig. 1 The effect of LPS or Con A on the proliferation of female mice spleen cells. The spleen cells(C57BL/6, 5×10^5 cells/well) of control and sample administration mice were stimulated with LPS or Con A at various concentrations for 48 hours. Data are represented as mean \pm SD for triplicates.

Table 2. The effect of LPS or Con A on the proliferation of mice spleen cells

	(-)	Con A(µg/ml)			LPS(µg/ml)		
		0.1	0.3	1.0	1	3	10
Control	1.000±0.000	0.936±0.107	1.453±0.019	2.866±0.326	3.534±0.473	4.206±0.731	4.804±0.807
A	1.000±0.000	0.973±0.180	1.368±0.151	2.244±0.076	3.420±0.374	3.971±0.620	4.455±0.415
B	1.000±0.000	0.970±0.006	1.205±0.018	2.215±0.135	3.110±0.143	3.533±0.058	3.803±0.194

The spleen cells(C57BL/6, 5×10^5 cells/well) of control and sample administration mice were stimulated with LPS or Con A at various concentrations for 48 hours. Data are represented as mean \pm SD for triplicates.

4주간 매일 1회 경구투여한 후, 비장세포를 분리하여 T세포 증식 유도물질인 Con A와 B세포 증식 유도물질인 LPS로 자극하여 48시간 배양한 다음에 증식반응을 관찰한 결과, 대조군에 비해서 실험시료 A와 B를 투여한 실험군에서 증식반응이 약간 낮은 것으로 나타났으나 통계학적 유의성은 없었다.

Table 3. The effect of LPS and Con A on the cytokine production of control and sample administration mice spleen cells

	IL-2(pg/ml)		IFN- γ (pg/ml)		IL-6(pg/ml)		TNF- α (pg/ml)	
	(-)	Con A	(-)	Con A	(-)	LPS	(-)	LPS
Control	<10	554.8 ±0.64	30.2 ±27.4	905.3 ±403.8	103.5 ±68.7	608.5 ±228.1	271.0 ±161.8	254.5 ±65.2
A	<10	535.8 ±1.940	11.0 ±15.6	437.1 ±255.0	65.8 ±46.7	561.9 ±201.3	204.7 ±94.3	271.1 ±66.0
B	<10	506.8 ±87.0	14.5 ±9.1	463.0 ±141.8	48.2 ±27.1	547.5 ±100.9	157.5 ±36.6	284.3 ±50.1

The spleen cells(C57BL/6, 5×10^5 cells/well) of control and sample administration mice were activated with LPS or Con A for 24 hours. Culture supernatants were harvested, various cytokine levels were determined by ELISA. Data are representes as mean \pm SD for triplicates.

4주간 매일 1회 경구투여한 후, 비장세포를 분리하여 T세포 증식 유도물질인 Con A와 B세포 증식 유도물질인 LPS로 자극하여 24시간 배양한 다음에 배양 상층액을 수거하여 IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α 의 농도를 측정 한 결과, 대조군에 비해서 실험시료 A와 B를 투여한 실험군에서 IFN- γ 의 농도가 약간 낮은 것으로 나타났으나 통계학적 유의성은 없었다.

Table 4. Expression percentage of various surface markers on the spleen cells

	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD19 ⁺	NK1.1 ⁺
Control	23.12 \pm 2.71	17.07 \pm 2.70	54.73 \pm 2.75	4.73 \pm 0.57
A	21.27 \pm 0.45	14.07 \pm 0.32	59.10 \pm 1.04	4.83 \pm 0.57
B	22.73 \pm 1.79	15.87 \pm 1.48	57.07 \pm 2.53	5.10 \pm 0.36

Surface expression of CD4, CD8, CD19, and NK1.1 were analyzed by two colour flow cytometry. Numbers represent the percentage of single positive cells.

4주간 매일 1회 경구투여한 후, 비장세포를 분리하여 보조 T세포(helper T cell, CD4⁺), 세포독성 T세포(cytotoxic T cell, CD8⁺), B세포(B cell, CD19⁺), 자연살해세포(Natural killer cell, NK1.1⁺)의 수를 알아보기 위하여, 각 세포의 특이적인 단백질자에 대한 항체로 염색하여 측정된 결과, 대조군에 비해서 실험시료 A와 B를 투여한 실험군에서 각 세포 수에는 유의한 통계학적 차이는 없었다.

Table 5. Total cell number Thymus cells

Number of Thymus cell	
Control	14.33±4.78×10 ⁷
A	21.90±1.91×10 ⁷
B	21.93±4.94×10 ⁷

Thymus cells werw isolated from control and sample administration mice.

4주간 매일 1회 경구투여한 후, 흉선을 분리하여 흉선세포의 수를 알아본 결과, 대조군에 비해서 실험시료 A와 B를 투여한 실험군에서 흉선세포 수가 통계학적으로 유의하게 증가한 것으로 나타났다.

Table 6. Expression percentage of various surface markers on the Thymus cells

	CD4 ⁻ CD8 ⁻	CD4 ⁺ CD8 ⁻	CD4 ⁻ CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁺
Control	1.97 ± 0.23	3.47 ± 0.31	3.07 ± 0.42	91.53 ± 0.81
A	1.83 ± 0.31	3.57 ± 0.12	2.77 ± 0.25	81.80 ± 0.35
B	1.80 ± 0.20	3.90 ± 0.26	2.80 ± 0.44	91.53 ± 0.83

Surface expression of CD4⁺CD8⁻, CD4⁻CD8⁺ and CD4⁺CD8⁺ were analyzed by two colour flow cytometry. Numbers represent the percentage of double positive cells.

4주간 매일 1회 경구투여한 후, 흉선에서 흉선세포를 분리하여 미분화한 T세포인 이중음성(CD4⁻CD8⁻) 또는 이중양성(CD4⁺CD8⁺) T세포와, 분화가 끝난 보조 T세포(helper T cell, CD4⁺CD8⁻) 또는 세포독성 T세포(cytotoxic T cell, CD4⁻CD8⁺)의 비율을 알아보기 위하여, 각 세포의 특이적인 단백질에 대한 항체로 염색하여 측정된 결과, 대조군에 비해서 실험시료 A와 B를 투여한 실험군에서 각 세포의 비율에는 유의한 통계학적 차이는 없었다.

Table 7. Effect of sample on YAC-1 cell killing activity of NKcells

E:T ratio	Cytotoxicity (%)		
	Control	A	B
50 : 1	6.941±1.015	5.151±0.163	5.206±1.224
100 : 1	5.131±1.546	3.635±0.699	6.051±4.134

The YAC-1 cell killing activity of NK cells were determined by CytoTox96[®] non-radioactive cytotoxicity assay as described in materials and methods. E:T(effector cell : target cell) ratio.

4주간 매일 1회 경구투여한 후, 비장세포를 분리하여 비장세포에 포함되어 있는 자연살해세포(Natural killer cell, NK1.1+)의 암세포에 대한 세포독성 활성을 알아보기 위하여, 암세포주인 YAC-1에 대한 세포독성을 측정된 결과, 대조군에 비해서 실험시료 A와 B를 투여한 실험군에서 자연살해세포의 세포독성 활성에는 유의한 통계학적 차이는 없었다.

Table 8. The effect of IL-4 and GM-CSF on the colony formation

	Bone Marrow cell numbers		
	1×10 ⁵	3×10 ⁴	1×10 ⁴
Control	206.9±17.7	74.1±10.2	17.6±4.5
A	222.2±18.2	70.9±6.2	16.4±3.9
B	235.3±11.0	81.3±4.5	22.2±2.1

Bone marrow cells isolated from C57BL/6 mice were cultured for 5 days in the presence of IL-4 and GM-CSF. Data are represented as mean ± SD for triplicates.

4주간 매일 1회 경구투여한 후, 골수세포를 분리하여 수지상세포로의 분화능을 알아보기 위하여, 분리한 골수세포에 IL-4와 GM-CSF를 첨가하여 수지상세포로의 분화를 유도하여 분화하는 세포의 콜로니 수를 측정된 결과, 대조군에 비해서 실험시료 A와 B를 투여한 실험군에서 수지상세포의 세포로의 분화능에는 유의한 통계학적 차이는 없었다.

② 과립茶 시제품에 대한 항암 효과 연구 결과

실험시료 A와 B를 투여한 후에 암세포를 피하주사하여 실험한 결과, 종양세포의 크기와 무게를 억제시키는 효과, 사이토카인 IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α 의 분비량을 증가시키는 효과, 자연살해세포(Natural killer cell, NK1.1+)의 수를 증가시키는 효과, 그리고 자연살해세포와 항원 특이적인 세포독성 T세포의 세포독성 활성을 증가시키는 효과가 통계학적으로 유의하게 나타나는 것을 관찰하였다.

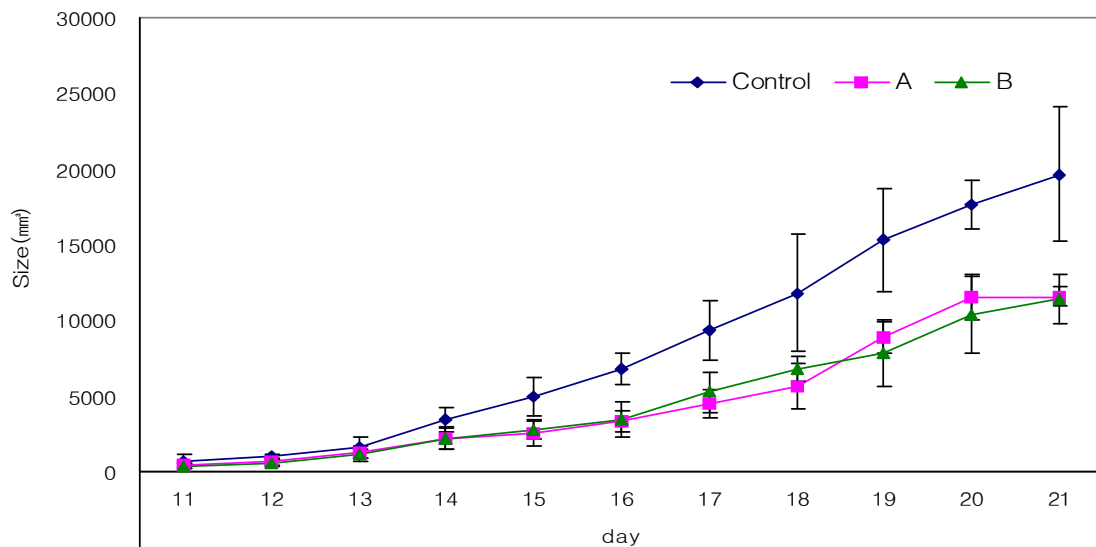


Fig. 2. Effect of sample administration on B16F0 tumor bearing mice.

Mice were administrated 4 weeks for 150mg/kg of sample or its vehicle and subcutaneous injected B16F0($3 \times 10^5/100\mu\text{l}$) tumor cells. Tumor size was measured at 11day after injection of B16F0 tumor cells.

Table 9. Effect of sample administration on B16F0 tumor bearing mice

Day	Tumor sizes(mm ³)		
	Control	A	B
11	691.1 ± 481.7	441.9 ± 137.1	395.1 ± 164.1
12	985.6 ± 198.6	665.3 ± 201.9	574.1 ± 212.9
13	1621.3 ± 655.5	1219.3 ± 291.4	1185.9 ± 543.8
14	3467.1 ± 839.8	2242.8 ± 756.9	2202.2 ± 708.2
15	4928.5 ± 1251.1	2523.5 ± 816.5	2802.4 ± 608.9
16	6782.5 ± 1025.0	3326.7 ± 703.8	3490.0 ± 1176.7
17	9393.5 ± 1953.5	4526.0 ± 934.3	5269.3 ± 1348.7
18	11820.2 ± 3908.7	5675.9 ± 1491.1	6804.1 ± 846.5
19	15293.5 ± 3364.4	8863.3 ± 1060.0	7838.4 ± 2176.0
20	17605.6 ± 1616.2	11559.4 ± 1480.3	10386.7 ± 2489.4
21	19641.7 ± 4417.4	11591.0 ± 683.0	11437.1 ± 1587.9

Mice were administrated 4 weeks for 150mg/kg of sample or its vehicle and subcutaneous injected B16F0($3 \times 10^5/100\mu l$) tumor cells. Tumor size was measured at 11day after injection of B16F0 tumor cells.

암세포주인 B16F0(melanoma)를 피하에 주사한 후 시간에 따른 암세포의 크기를 매일 측정하여 비교한 결과, 대조군은 시간이 지날수록 암세포의 크기가 크게 증가하였지만, 실험시료 A와 B를 투여한 실험군에서는 대조군에 비해 암세포의 크기 증가율이 통계학적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다.

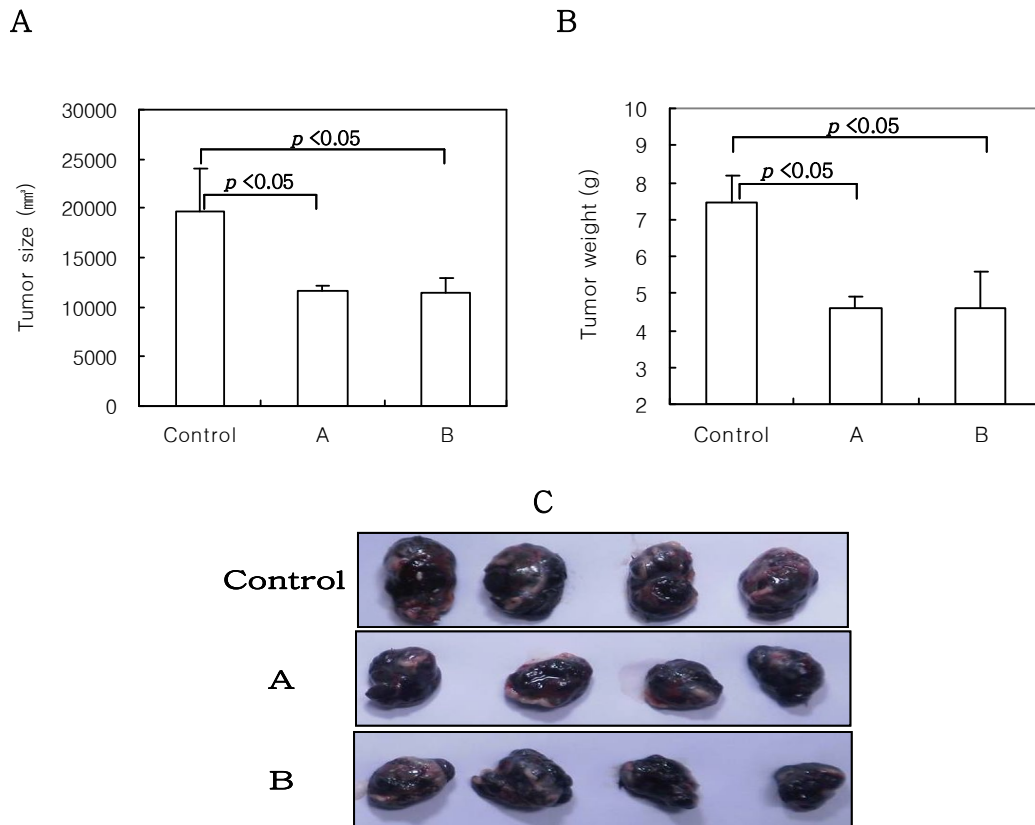


Fig. 3. Effect of sample on the inhibition of tumor growth.

All mice performed as sacrificed at 21 days after injection of B16F0 tumor cells. Tumor size (A) and weight (B) were measured. (C) Photographs of melanoma solid tumor taken from all mice of each group.

Table 10. Effect of sample on the inhibition of tumor growth

	Tumor size (mm ³)	Tumor weight (g)
Control	19641.7 ± 4417.4	7.439 ± 0.743
A	11591.0 ± 683.0*	4.604 ± 0.315*
B	11437.1 ± 1587.9*	4.587 ± 0.991*

All mice performed as sacrificed at 21 days after injection of B16F0 tumor cells. Tumor size and weight were measured. * $p < 0.05$ compared with control

암세포주인 B16F0(melanoma)를 피하에 주사한 21일 후에 생쥐를 희생하고 암세포를 분리하여 크기와 무게를 측정하여 비교한 결과, 대조군에 비해 실험시료 A와 B를 투여한 실험군에서는 암세포의 크기와 무게가 통계학적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다.

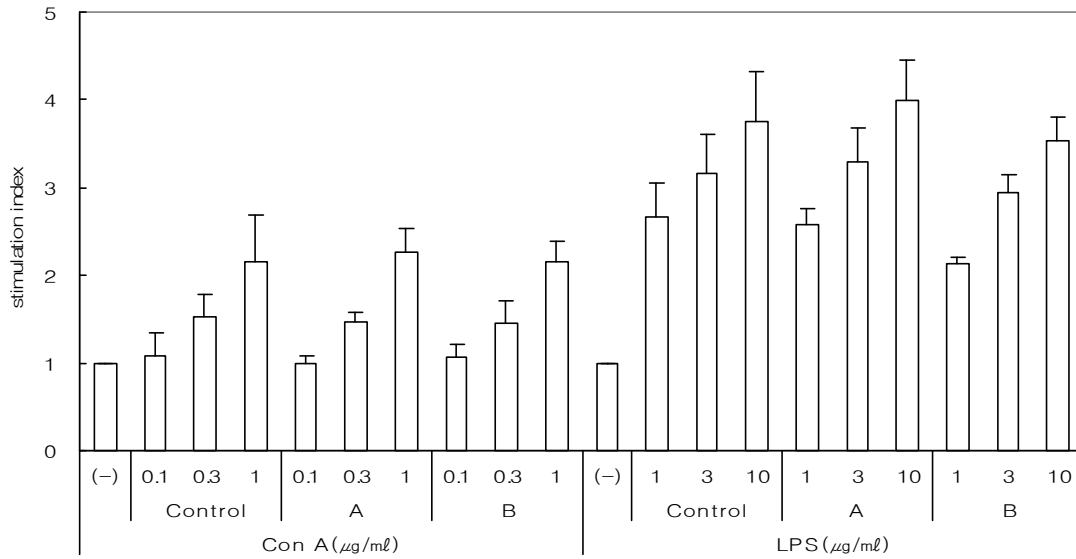


Fig. 4. The effect of LPS and Con A on the proliferation of mice spleen cells.

All mice performed as sacrificed at 21 days after injection of B16F0 tumor cells and isolated spleen cells. The spleen cells(C57BL/6, 5×10^5 cells/well) of control and sample administration mice were stimulated with LPS , Con A at various concentrations for 48 hours. Data are represented as mean \pm SD for triplicate.

Table 11. The effect of LPS and Con A on the proliferation of mice spleen cells

	(-)	Con A ($\mu\text{g/ml}$)			LPS ($\mu\text{g/ml}$)		
		0.1	0.3	1.0	1	3	10
Control	1.000 \pm 0.000	1.094 \pm 0.256	1.518 \pm 0.268	2.153 \pm 0.536	2.669 \pm 0.386	3.154 \pm 0.446	3.759 \pm 0.552
A	1.000 \pm 0.000	0.885 \pm 0.086	1.469 \pm 0.116	2.264 \pm 0.282	2.569 \pm 0.195	3.284 \pm 0.385	3.989 \pm 0.450
B	1.000 \pm 0.000	1.058 \pm 0.163	1.456 \pm 0.249	2.154 \pm 0.240	2.128 \pm 0.082	2.938 \pm 0.202	3.521 \pm 0.291

All mice performed as sacrificed at 21 days after injection of B16F0 tumor cells and isolated spleen cells. The spleen cells(C57BL/6, 5×10^5 cells/well) were stimulated with LPS , Con A at various concentrations for 48 hours. Data are represented as mean \pm SD for triplicate.

비장세포를 분리하여 T세포 증식 유도물질인 Con A와 B세포 증식 유도물질인 LPS로 자극하여 48시간 배양한 다음에 증식반응을 관찰한 결과, 대조군에 비해서 실험시료 A와 B를 투여한 실험군에서 증식반응은 유의한 통계학적 차이는 없었다.

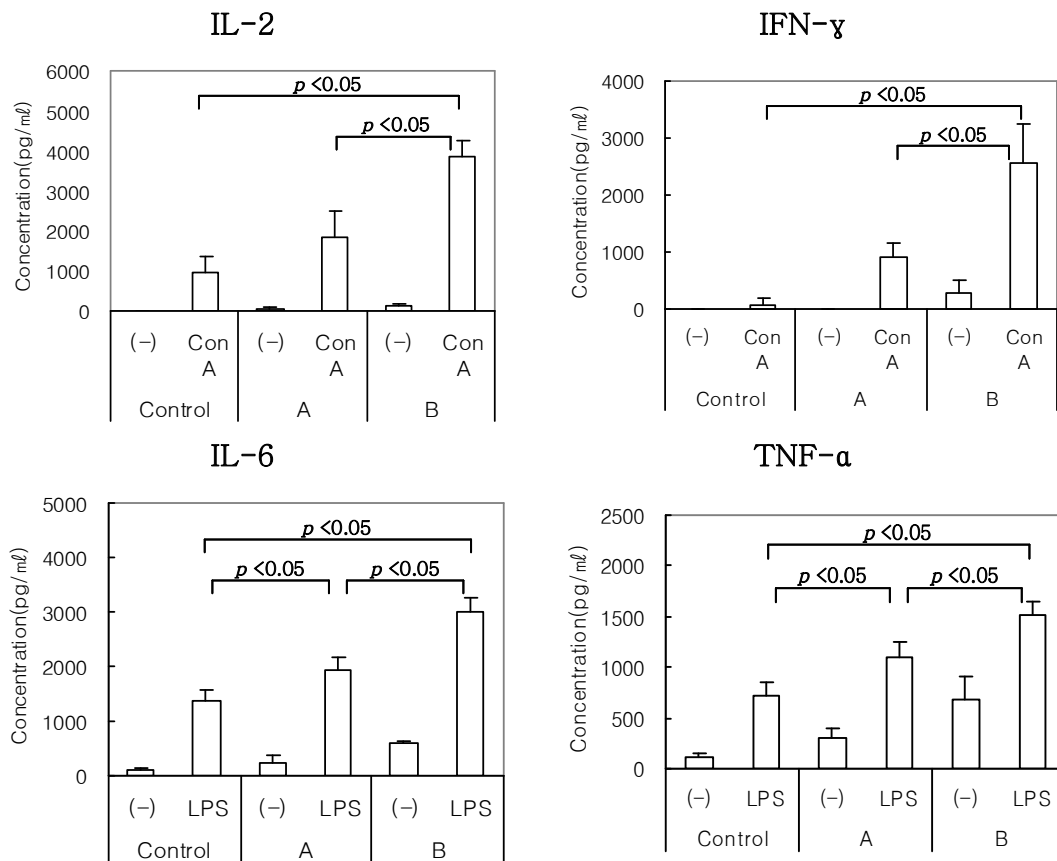


Fig 5. The effect of LPS and Con A on the cytokine production of control and sample administration mice spleen cells.

All mice performed as sacrificed at 21 days after injection of B16F0 tumor cells and isolated spleen cells. The spleen cells(C57BL/6, 5×10^5 cells/well) of control and sample administration mice were activated with LPS or Con A for 24 hours. Culture supernatants were harvested, various cytokine levels were determined by ELISA. Data are representes as mean \pm SD for triplicates.

비장세포를 분리하여 T세포 증식 유도물질인 Con A와 B세포 증식 유도물질인 LPS로 자극하여 24시간 배양한 다음에 배양 상층액을 수거하여 IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α 의 농도를 측정된 결과, IL-2와 IFN- γ 는 대조군에 비해서 실험시료 A를 투여한 실험군이 통계학적으로 유의하게 증가하였고, IL-6, TNF- α 의 농도는 실험시료 A와 B를 투여한 실험군에서 통계학적 유의성하게 증가하였으며 또한 실험시료 A를 투여한 실험군보다 실험시료 B를 투여한 실험군이 통계학적 유의성하게 증가하였다.

Table 12. The effect of LPS and Con A on the cytokine production of control and sample administration mice spleen cells

	IL-2(pg/ml)		IFN- γ (pg/ml)		IL-6(pg/ml)		TNF- α (pg/ml)	
	(-)	Con A	(-)	Con A	(-)	LPS	(-)	LPS
Control	<10	982.2 \pm 374.2	<10	75.5 \pm 122.5	93.3 \pm 55.1	1375.5 \pm 206.5	115.0 \pm 39.5	717.1 \pm 131.7
A	42.8 \pm 24.1	1849.8 \pm 626.1	<10	901.0 \pm 268.0	239.4 \pm 113.4	1942.8 \pm 233.4*	297.6 \pm 97.2	1106.9 \pm 142.1*
B	125.3 \pm 54.7	3871.4 \pm 381.3*	283.9 \pm 230.2	2566.3 \pm 669.3*	587.7 \pm 35.4	30054.0 \pm 256.8*†	688.2 \pm 221.3	1523.1 \pm 115.4*†

All mice performed as sacrificed at 21 days after injection of B16F0 tumor cells and isolated spleen cells. The spleen cells(C57BL/6, 5×10^5 cells/well) of control and sample administration mice were activated with LPS or Con A for 24 hours. Culture supernatants were harvested, various cytokine levels were determined by ELISA. Data are representes as mean \pm SD for triplicates. * $p < 0.05$ compared with control, † $p < 0.05$ compared with group A.

Table 13. Expression percentage of various surface markers on the spleen cells

	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD19 ⁺	NK1.1 ⁺
Control	14.20 \pm 4.10	9.78 \pm 3.13	31.53 \pm 7.51	6.35 \pm 1.70
A	14.53 \pm 1.75	10.90 \pm 0.96	40.40 \pm 4.91	9.20 \pm 1.02*
B	15.40 \pm 1.01	12.38 \pm 1.50	40.65 \pm 1.80	8.05 \pm 0.57

All mice performed as sacrificed at 21 days after injection of B16F0 tumor cells and isolated spleen cells. Surface expression of CD4, CD8, CD19, and NK1.1 were analyzed by two colour flow cytometry. Numbers represent the percentage of double positive cells. * $p < 0.05$ compared with control.

비장세포를 분리하여 보조 T세포(helper T cell, CD4⁺), 세포독성 T세포(cytotoxic T cell, CD8⁺), B세포(B cell, CD19⁺), 자연살해세포(Natural killer cell, NK1.1+)의 수를 알아보기 위하여, 각 세포의 특이적인 단백질자에 대한 항체로 염색하여 측정된 결과, 대조군에 비해서 실험시료 B를 투여한 실험군에서 자연살해세포(Natural killer cell, NK1.1+)의 수가 통계학적으로 유의하게 증가하였다.

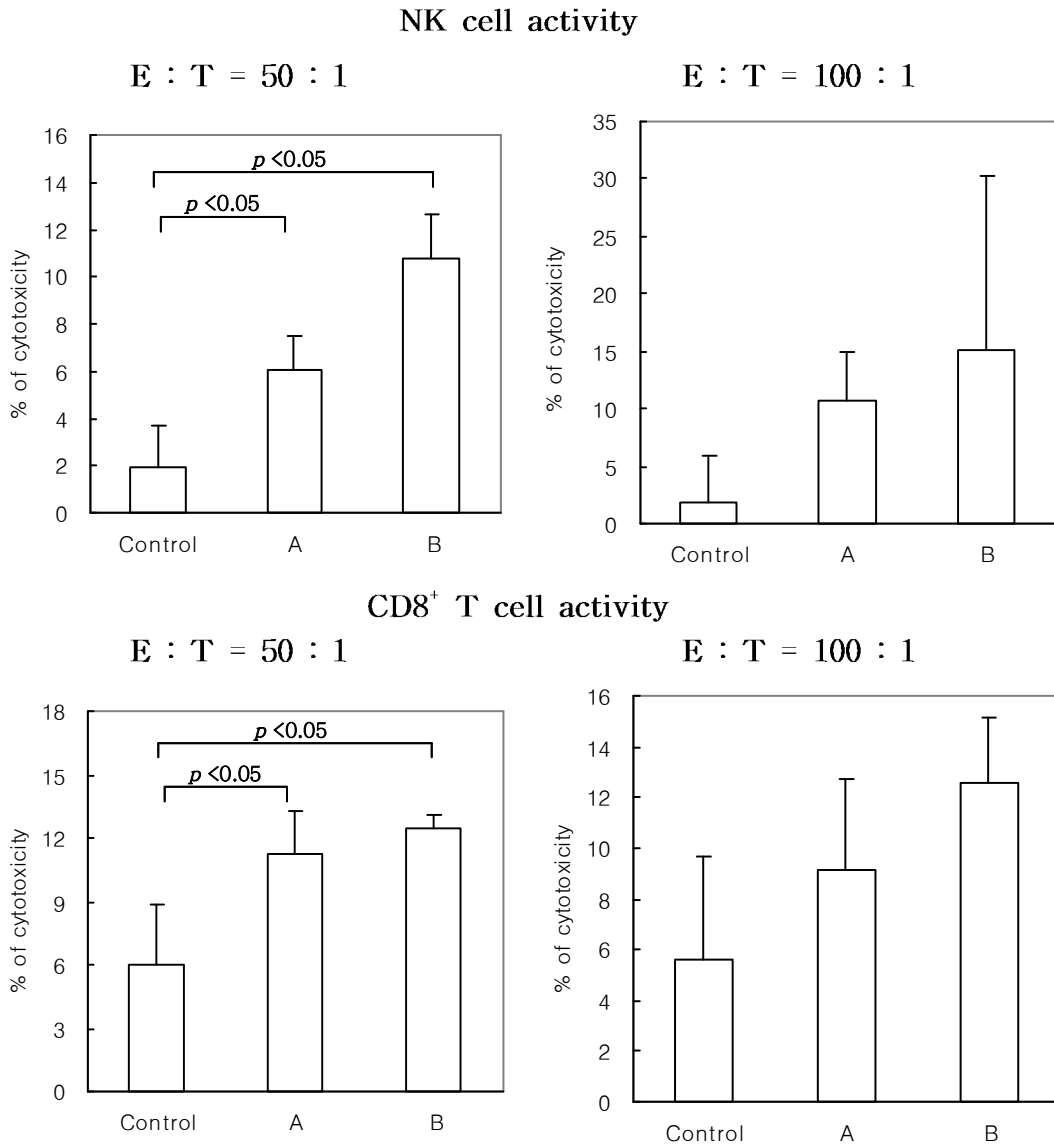


Fig. 6. Effect of sample on cancer cell killing activity of NK cells or CD8⁺ T cells. The cancer cell killing activity of NK cells or CD8⁺ T cell was determined by CytoTox96[®] non-radioactive cytotoxicity assay as described in materials and methods. E:T(effector cell : target cell) ratio.

비장세포를 분리하여 비장세포에 포함되어 있는 자연살해세포(Natural killer cell, NK1.1+)와 항원 특이적인 세포독성 T세포(CD8⁺ T cell)의 암세포에 대한 세포독성 활성을 알아보기 위하여, 암세포주인 YAC-1 또는 B16F0에 대한 세포독성을 측정된 결과, 효과세포와 표적세포의 비율(E:T ratio)이 50:1인 경우에 대조군에 비해서 실험시료 A와 B를 투여한 실험군에서 자연살해세포와 항원 특이적인 세포독성 T세포의 세포독성 활성은 통계학적으로 유의하게 증가하였다.

Table 14. Effect of sample on cancer cell killing activity of NK cells and CD8⁺ T cells

E:T ratio	Cytotoxicity (%)			
	Control	A	B	
NK : YAC-1	50 : 1	2.77±2.47	5.75±1.44*	10.23±2.06*
	100 : 1	0.98±4.08	9.13±5.16	12.53±14.27
CD8 ⁺ T : B16F0	50 : 1	6.20±2.51	10.44±2.58*	12.09±1.04*
	100 : 1	6.44±3.99	8.17±3.79	11.15±3.87

The cancer cell killing activity of NK cells or CD8⁺ T cell was determined by CytoTox96[®] non-radioactive cytotoxicity assay as described in materials and methods. E:T(effector cell : target cell) ratio, **p*<0.05 compared with control.

(3) 제 2협동과제 연구방법 및 결과

(가) 연구방법

① 팥이버섯 배당체 주원료 추출 방법

한방 슬러지를 이용하여 재배한 팥이버섯의 고유한 맛을 보전시키기 위하여, 팥이버섯에 70%(10v/v) 에탄올을 3회 반복하여 80℃에서 5시간 환류냉각 추출한 다음 원심분리(8,000rpm, 20분)하고 총용량의 2배 농축 이 후 open Column을 사용하여 고정상으로 이온교환수지(Daion HP-20), 이동상으로 물과 주정만을 사용하여 팥이버섯으로부터 배당체를 분리하고 그 추출액을 농축하여 주원료로 사용하였다.

② 과립차 조성물 배합비 및 적성 조사 방법

팥이버섯 배당체 농축액과 부재료인 탈지분유, 포도당, 비타민C를 사용하여 혼합한 다음 역회전과립기로 과립을 성형한 다음 수분이 5%이하 되도록 건조시킨 후(60℃, 5일간) 15~20mesh 크기로 사별한 후 포장하였다. 팥이버섯 배당체 농축액과 부재료의 배합성분 및 비율 결정은 혼합적성, 역회전과립기 사출 적성, 관능평가등을 통하여 최종 적적농도를 결정하였다.

③ 팥이버섯 70% 에탄올 엑기스 제조 방법

팥이버섯에 70%(10v/v) 에탄올을 3회 반복하여 80℃에서 5시간 환류냉각 추출한 다음 원심분리(8,000rpm, 20분)하고 총용량의 2배 농축 이 후 open Column을 사용하여 고정상으로 이온교환수지

(Daion HP-20)로 배당체 분리과정은 Fig 1.과 같다.

과립차 제조에 사용한 팽이버섯은 고유의 향취미를 유지 발현시키기 위하여 70% 에탄올을 10배 첨가하여 80℃에서 3회 추출하여 여과(Whatman 41)한 다음 농축하여 엑기스를 제조하였다. 이때 엑기스 표준지표로 고형분, 수분, brix로 설정하였다.

(나) 연구결과

① 팽이버섯 배당체를 주원료로 한 과립차 1차 시제품 배합성분 및 비율 결과

팽이버섯을 이용한 과립차의 배합성분 및 함량은 Table 1과 같다. Sample A는 팽이버섯으로부터 분리한 배당체의 주원료 함유량을 14.35%로 가장 많이 사용하였으나, 점도성이 좋지 못해 과립 제형을 유지하기가 어려웠으며, Sample B는 팽이버섯 배당체 함유량 11.98%로 과립차 제형으로 만드는데 아무런 문제가 없었으며, 일반적으로 부용제로 텍스트린을 많이 사용하지만 기능성에 도움을 주기 위해 폴리텍스트로스 식이섬유로 전화하여 과립차 1차 시제품을 제조하였다. 관능평가 결과는 Fig. 1과 같다. 평가 항목은 색상, 향, 버섯의 비린맛, 단맛, 전체적인 맛으로 최종 5점을 기준으로 평가를 실시하였으며, sample A는 전체적으로 관능평가 결과가 3.1로 좋지 못했으며, 보존 테스트에서도 제형의 변화를 주어 적합하지 않는 것으로 나타났다. 그리고 sample B는 전체적인 색과 맛이 보통인 결과 3.6로 나타났으며, 최종 시제품 평가 시 팽이버섯 배당체 12%이하의 sample로 측정하는 것이 좋을 것 같다.

Table 1. 팽이버섯 배당체와 부재료 당성분에 대한 1차 제형테스트

Sample A			Sample B		
배합성분	함량(%)	비고	배합성분	함량(%)	비고
팽이버섯 배당체	14.35		팽이버섯 배당체	11.98	
올리고당	56.71		폴리텍스트로스	30.6	
포도당	28.23		포도당	56.71	
비타민C	0.71		비타민C	0.71	
합 계	100		합 계	100	

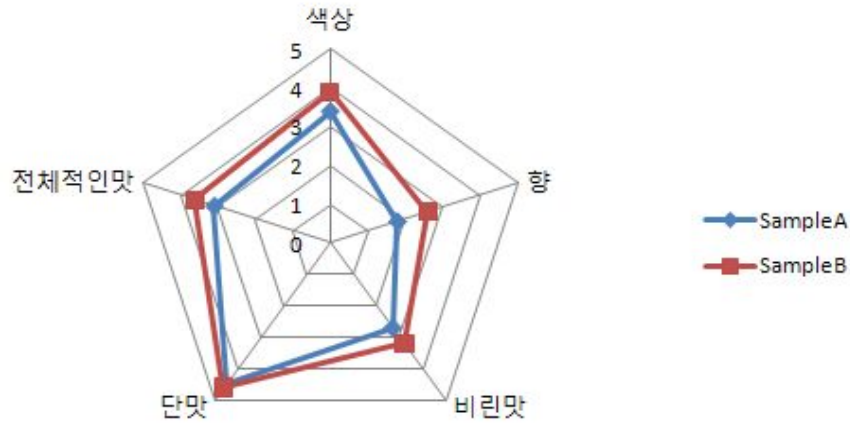


Fig. 1. 과립차 1차 시제품에 대한 관능적 평가 결과.
 대상 : 대학교 학생 및 임직원 총 2회 실시(100명/1회)

② 과립차의 제조공정

팽이버섯으로부터 분리한 배당체의 과립茶 제조공정은 Fig 2과 같다. 과립차 제형을 유지 하기위해서는 무엇보다도 당도와 점성도를 유지하는 것이 중요하며, 부용제의 응고 가능한 것을 선택하는 것도 중요하다. 또한 건조 시 60°C에서 5시간 정도 건조한 후 다시 한번더 사별하여 크기를 맞추어 포장하여야 한다.

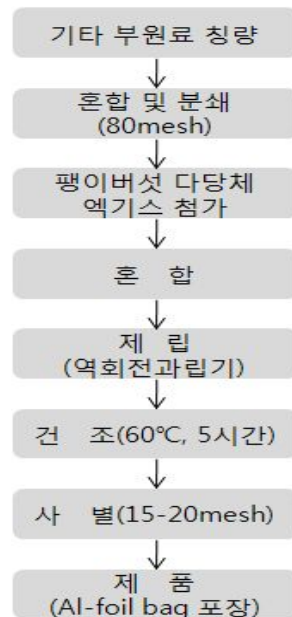


Fig 2. 팽이버섯으로부터 분리한 배당체의 과립茶의 제조 공정도.

③ 과립차의 품질특성

팽이버섯 과립차의 품질특성은 Table 2와 같다. 본 시제품의 제형에 따른 팽이버섯 배당체 함량을 정하고 60-80℃에서 10초간 용해도를 본 결과 조금의 건체 없이 용해되었으며, 복용방법은 1차 시제품에 대한 in vivo 실험 결과를 토대로 하루에 2포 즉 6 g까지 섭취하도록 하였고, 포장 단위는 한포에 3.0 g으로 정하였다.

Table 2. 팽이버섯으로부터 분리한 배당체의 과립차의 제품 특성

구 분	특 성	비 고
향취미	팽이버섯의 고유한 조맛과 단맛의 조화미	
팽이버섯함량	Sample A : 11.98%, Sample B : 14.35%	
용해성	60℃ 10초이내	
복용방법	3g/1일	
포장단위	3.0g/포	

④ 시제품의 품질안정성

열접착한 Al foil tea bag 포장상태로 40℃, 75% 학대조건에서 흡습현상, 색상변화등의 변화 없이 안정하였다.

⑤ 팽이버섯 과립차의 제형테스트

팽이버섯으로부터 추출한 배당체와 부재료의 1차 배합에 따른 과립차 제형테스트 결과는 Fig. 3와 같다. 팽이버섯으로부터 분리한 배당체와 부재료의 선별 후 과립 형태의 적합성을 조사하고 1차 시제품의 제형테스트를 실시하였다.

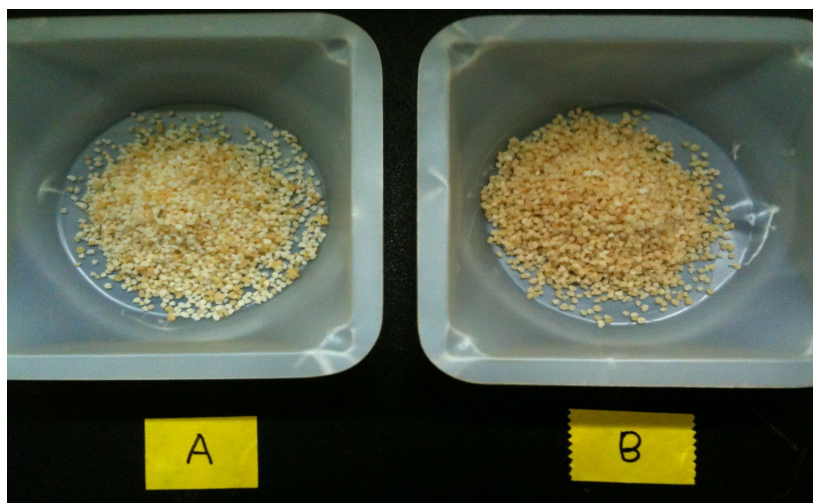


Fig 3. 팽이버섯으로부터 분리한 배당체와 부재료 혼합 후 1차 과립차 제형테스트.

⑥ 팽이버섯 과립차의 제조

팽이버섯으로부터 분리한 배당체와 부재료의 1차 시제품에 대한 문제점을 보완하고 관능적 평가에 따른 2차 시제품을 제조하여 Al foil tea bag 포장한 결과는 Fig. 5와 같다.

팽이버섯으로부터 분리한 배당체와 부재료의 1차 시제품은 제형과정 중 점성도가 높고, 관능적 평가 결과가 좋지 못해 배합을 조정을 통해 60℃에서 그레놀 형태로 바로 마실 수 있도록 2차 시제품을 제조하였으며, 저장성 및 면역활성 결과를 토대로 최종 시제품을 제작할 계획이다.

Table 3. 팽이버섯 배당체와 부재료 당성분에 대한 2차 제형테스트

Sample A			Sample B		
배합성분	합량(%)	비고	배합성분	합량(%)	비고
팽이버섯 배당체	5.0		팽이버섯 배당체	11.98	
탈지분유	15.3		폴리텍스트로스	15.3	
포도당	78.99		포도당	72.01	
비타민C	0.71		비타민C	0.71	
합 계	100		합 계	100	

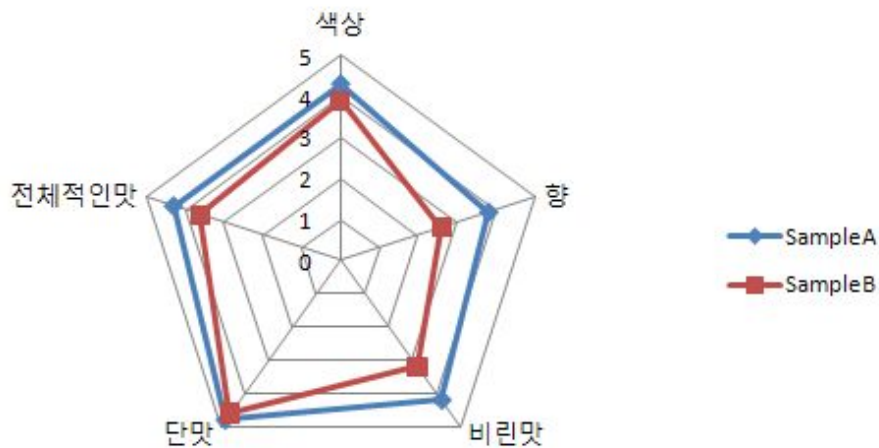


Fig. 4. 과립차 최종 시제품에 대한 관능적 평가 결과.

대상 : 대학교 학생 및 임직원 총 2회 실시(100명/1회)

또한 관능평가 결과는 Fig. 4와 같다. Sample A는 팽이버섯 배당체 5% 첨가하였을 때 관능평가 결과 전체적인 맛에서 4.3으로 좋다는 평가 결과가 나왔으며, 팽이버섯의 비린 맛이 거의 느끼지 못하는 것으로 나타났다. 따라서 최종 시제품에 대한 산업화를 추진하고자 할 때 팽이버섯의 배당체 함유량은 5-10%사이가 가장 적합한 것으로 나타났다. 그리고 포장 용기 테스트 결과 40℃에서 7일간 보관하여 과립 제형을 유지하고 있었으며, 관능적으로도 아무런 변화가 없음을 확인하였다.



Fig. 5. 팽이버섯으로부터 배당체와 부재료를 이용한 2차 시제품

다. 3차년도 연구방법 및 결과

(1) 제 1세부과제 연구방법 및 결과

(가) 연구방법

① 한방 슬러지의 첨가농도

한방 슬러지의 첨가농도가 팽이버섯의 균사생장에 미치는 영향은 경북 청도군 화양읍 소재의 그린피스 팽이버섯농장에서 사용하는 콘코프 함유배지의 주성분인 콘코프 대신에 한방 슬러지를 0, 5, 10 및 15%범위로 첨가하여 잘 혼합한 배지를 1,100 mL 버섯재배용병에 충전시켜 멸균한 다음 액체종균을 15 mL씩 접종한 후 팽이버섯 재배사에서 버섯의 균사생장 길이를 측정하였다.

② 수분의 영향

콘코프 70 g, 한방슬러지 32 g 및 기타성분 218 g을 혼합하여 건물 중량에 대하여 수분을 55~70%(w/v)범위로 함유시킨 배지를 1,100 mL 버섯재배용병에 충전하여 한방 슬러지의 첨가농도의 영향과 동일하게 측정하였다.

③ 배양온도 및 습도의 영향

콘코프 70 g, 한방슬러지 32 g 및 기타성분 218 g을 혼합하여 건물 중량에 대하여 수분을 65%(w/v) 함유시킨 배지를 사용하여 배양실온도는 11°C~26°C범위, 습도는 65~85%범위로 변화시키면서 한방 슬러지의 첨가농도의 영향과 동일하게 측정하였다.

④ 팽이버섯의 재배

팽이버섯 재배는 배지의 구성성분인 콘코프, 한방슬러지 및 5종의 성분을 혼합한 기타성분을 각각 22%, 10%, 68% 첨가한 CD-1시험구와 29%, 8%, 63%를 첨가한 CD-2시험구로 나누어 행하였다(총 건물 중량 320 g). 2종류의 배지성분을 각각 다른 교반기에 투입하여 잘 혼합한 후 배지의 수분함량을 65%로 조절하고, 교반된 배지를 1,100 mL용량의 polypropylene bottle에 충전한 다음 배지의 중앙에 15 mm 1개, 가장자리에 12mm의 구멍 4개의 타공 구멍을 뚫은 후 뚜껑을 닫아 상압살균(99°C도달 후 6 hr) 하였다. 상압살균된 배지를 방냉한 후 액체종균을 25 mL씩 접종하여 16°C, 75% 습도에서 24일 동안 배양한 후 균굽기를 실시하여 버섯의 발생을 유도하였다. 균굽기 후 10일 동안, 온도 16°C, 습도 95%로 조절된 발이실에서 발이를 유도하였다. 버섯이 5~7 mm정도 자랐을 때 3~4°C에서 3일 정도 생육을 억제시키면서 버섯의 고른 발생을 유도시킨 후 생육실(온도 5°C, 습도 85%, CO2농도 5000 ppm)로 옮겨 버섯의 생육을 유도하였다. 버섯이 병위로 2~3cm정도

자랐을 때 버섯이 방사형으로 생육되어 주위의 버섯과 접촉되면서 생육이 저하되는 것을 방지하고 팽이버섯의 끝은 생육을 유도하기 위해 권지 씌우기를 행한 다음 5 ℃에서 수확기까지 재배하였다.

⑤ 버섯의 품질 평가

생산된 팽이버섯의 품질은 수확한 팽이버섯 중에서 버섯 갓의 크기, 버섯대의 굵기 및 갓의 크기 등을 측정하고 또한 색택 등을 육안으로 관찰하여 특품, 상품(2등급), 기형버섯 및 하품(파지버섯)으로 나누어 평가하였다. 즉, 특품은 갓의 직경이 10 mm(테주콩 크기) 이하이면서 크기가 고른 것. 또한 물 버섯이 없으면서 대의 길이가 12 Cm 이상인 버섯으로 하였다. 상품(2등급)은 버섯 갓의 직경이 10 mm 이상이거나 직경이 10 mm 이하라도 30%이상 편 것으로 하였다. 그리고 기형버섯은 대가 2개 붙어있거나 갓이 연결되어 땅콩 모양의 버섯, 하품(파지)은 갓의 직경이 10 mm 이하라도 갓이 피어 상품 가치가 없는 버섯으로 하였다.

⑥ 버섯의 경도 측정

팽이버섯의 경도측정은 버섯의 자실체를 1 cm내외로 절단하여 자루부분을 Texture analyzer(XT-RA Dimension V3.7A, Stable Micro System)로 측정하였으며 P2 probe(2 mm DIA, Cylinder Stainless)를 장착하여 침투속도 2.0 mm/sec, 50% strain 조건하에서 측정하였다.

(나) 연구결과

① 병 재배에서 한방 슬러지 첨가농도

한방 슬러지의 첨가농도가 팽이버섯 균사생장에 미치는 영향을 실험실 규모의 petri dish상에서 검토한 결과 10%첨가 시험구에서 균사성장 밀도가 약간 빠르고 조밀한 것으로 관찰되었다(1차년도 결과). 이와 같은 결과가 실제 팽이버섯을 재배하고 있는 환경에서는 어떤 결과를 나타내는지 팽이버섯 재배조건에서 검토하여 Fig. 1에 나타내었다. 한방 슬러지를 첨가하지 않은 대조구에 비하여 한방 슬러지를 5% 및 10%를 첨가한 시험구는 팽이버섯의 균사생장이 전혀 차이를 나타내지 않았지만 15%를 첨가한 시험구에서는 약간 균사생장이 느린 것을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과로 한방 슬러지의 첨가농도는 10%로 결정하고 이하의 실험을 행하였다.

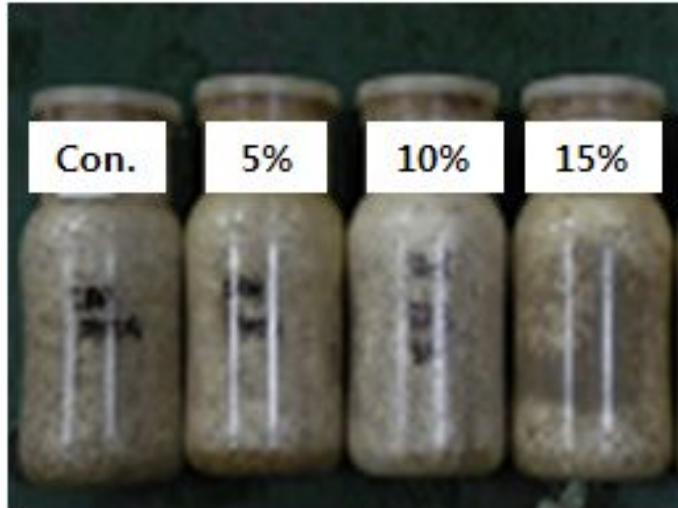


Fig. 1. 한방 슬러지 첨가농도가 팽이버섯 균사생장에 미치는 영향.

② 버섯배지 중의 수분

한방 슬러지를 10% 첨가한 버섯배지 중의 수분함량이 팽이버섯 균사생장에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 2에 나타내었다. 그림에서 보는바와 같이 팽이버섯의 균사생장은 60~65%가 적당한 것으로 나타났다. 배지 중의 수분함량이 55% 이하에서는 균사의 활력이 약간 떨어지고 배지표면의 건조현상이 발생하였다. 그리고 70% 이상에서는 균사의 생장이 고르지 못하고 세균에 의한 오염현상이 약간 나타나기도 하였다.

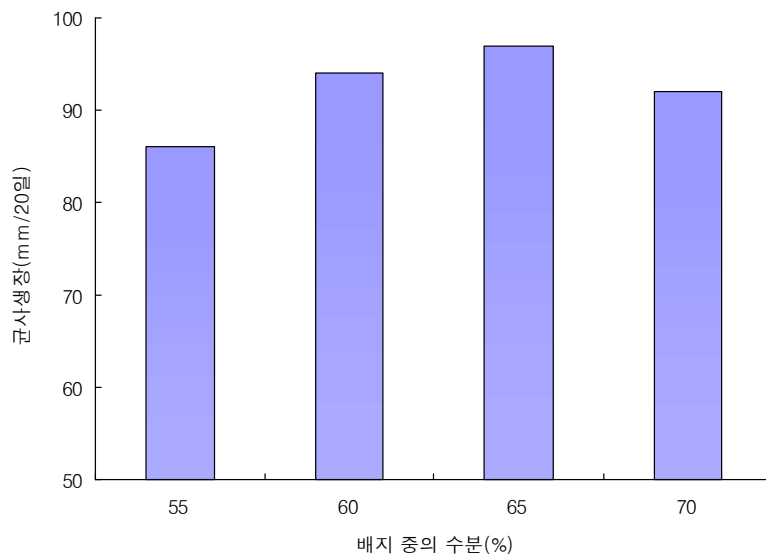


Fig. 2. 배지의 수분함량이 팽이버섯 균사생장에 미치는 영향.

③ 군사 배양온도의 영향

살균한 배지를 예냉실에서 냉각시킨 후 무균적으로 펄이버섯 종균을 접종한 다음 배양실로 옮겨 배양실의 온도가 펄이버섯 군사생장에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 3에 나타내었다. 펄이버섯의 군사배양실 온도는 버섯군사의 호흡열에 의해서 설정온도보다 3~5℃정도 높게 나타났으며 배양실의 온도를 16℃로 설정한 시험구에서 가장 왕성한 군사생장이 이루어졌다. 배양실의 온도가 11℃ 및 26℃로 설정한 시험구에서는 군사생장이 매우 지연되었으며 특히 26℃ 설정 시험구의 경우 배지의 표면이 건조하여 발이가 균일하지 못하였다.

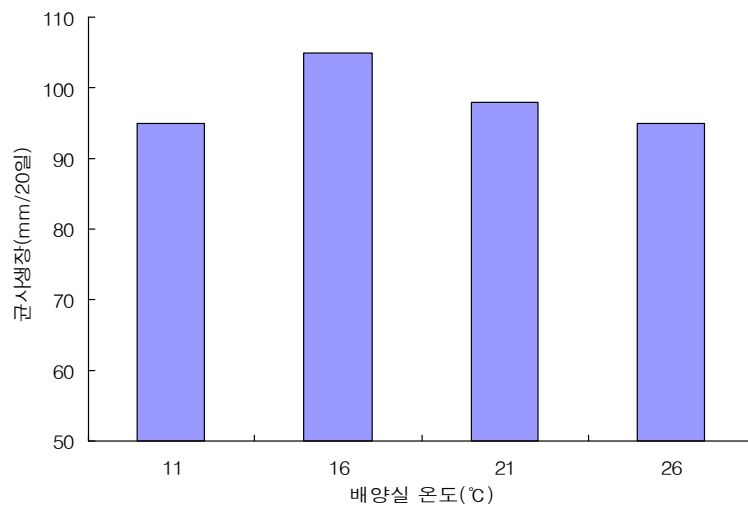


Fig. 3. 배양실의 실내온도가 펄이버섯 군사생장에 미치는 영향.

④ 배양실 습도의 영향

펄이버섯군사 배양실 내의 습도가 군사생장에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 4에 나타내었다. 배양실 내의 습도를 70% 및 80%로 유지한 시험구에서는 펄이버섯의 군사생장이 왕성하게 일어났지만 65%와 85%로 유지한 시험구에서는 군사생장이 지연되는 것으로 나타났다. 습도가 낮은 경우는 배지의 수분이 증발하여 배지표면의 건조가 일어나 발이가 불량하였으며 85% 이상에서는 유해균에 의한 오염된 병이 관찰되기도 하였다. 또한 습도를 85%로 조정한 배양실에서는 뿌연 연무가 끼어 작업에도 어려움이 있었다.

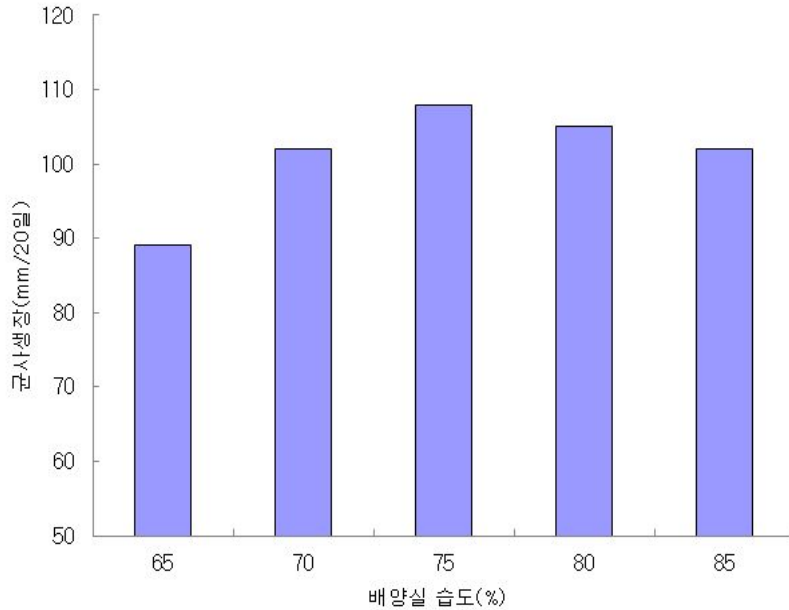


Fig. 4. 배양실의 습도가 팽이버섯 균사생장에 미치는 영향.

⑤ 팽이버섯의 재배

경북 청도군 학산리 소재의 그린피스 농장에서 한방 슬러지를 8% 및 10% 첨가한 버섯배지를 이용하여 팽이버섯의 균사생장 및 균굽기를 행한 다음 자실체의 발생을 유도하였다. 자실체 발생조건은 온도 $16\pm 1^{\circ}\text{C}$, 습도 95%로 조절하여 균굽기한 배지의 표면에 균사가 부상하여 완전히 배지를 덮을 때까지 행하였다(4~5일 소요). 지나친 균사부상은 자실체 발생이 늦고 균일하지 못하므로 적당한 균사부상 시기에 발이실의 CO_2 농도를 1,000~1,500 ppm이하로 조절하여 배지의 표면에 어린버섯을 발생시켰다. 버섯이 5~7 mm정도 자랐을 때 $3\sim 4^{\circ}\text{C}$ 에서 생육을 억제시켜 버섯의 고른 발생을 유도하였다. 버섯의 발생 및 억제단계가 끝나고 어린버섯이 병 윗부분으로 약 2~3 cm정도 올라오면 팽이버섯의 대가 꺾여 상품성을 잃지 않도록 권지 썬우기 작업을 행하고 재배사내의 온도는 약 5°C , 습도는 75~80%, CO_2 농도는 1,500~2,000 ppm 정도로 조절하여 팽이버섯의 재배를 행하였다(Fig. 5).

팽이버섯 생산을 위한 배지의 조성은 버섯배지 건물 천체 중량에 대하여 한방 슬러지를 10% 첨가한 CD-1 시험구(Fig. 5의 I~IV의 A)와 8% 첨가한 CD-2 시험구((Fig. 5의 I~IV의 B)로 나누고 각 시험구 당 16병씩 3반복 실험을 행하였다. A 및 B의 두 시험구 간에서 버섯의 생육은 큰 차이를 나타내지 않았지만 버섯의 품질을 검토한 결과 한방 슬러지를 10% 첨가한 시험구의 품질이 약간 양호한 것으로 나타났다(Table 2). Fig. 5는 한방 슬러지를 10% 및 8%첨가한 시험구 각각의 팽이버섯 균사배양(Fig. 5-I) 및 자실체의 형성단계를(Fig. 5-II, III 및 IV) 사진으로 나타낸 것이

다. 두 시험구의 결과를 비교해 보면 균사배양 및 재배단계에 있어서 전혀 차이를 나타내지 않고 왕성하게 생육함을 관찰할 수 있었다. 그리고 팽이버섯의 평균수확량, 기형버섯 발생량, 2등급 버섯, 생육부진 및 버섯질병 발생을 등을 관찰하여 Table 1에 나타내었다. 대조구 및 CD-1, CD-2 시험구에서는 흰곰팡이 및 세균성 갈색무늬병 등의 발생은 전혀 관찰할 수 없었다. 수확량은 대조구, CD-1 및 CD-2 시험구에서 각각 283 g, 278 g 및 269 g이 생산되어 대조구에서 버섯의 생산량이 약간 많은 것으로 나타났다. 그러나 기형버섯 발생율과 2등급 버섯의 생산량은 1차년도와 동일하게 한방 슬러지를 첨가한 시험구에서 월등하게 적게 나타났으나 CD-2 시험구에서 다소의 생육부진 현상이 여전히 발생하였다. 이상의 CD-1 연구결과는 1차년도와 같은 결과에서 나타난 생육부진 현상을 상당히 개선한 결과이며, 한방 슬러지를 첨가한 배지로 팽이버섯을 재배할 때 그 첨가량은 10%가 적당한 것으로 판단되었다.

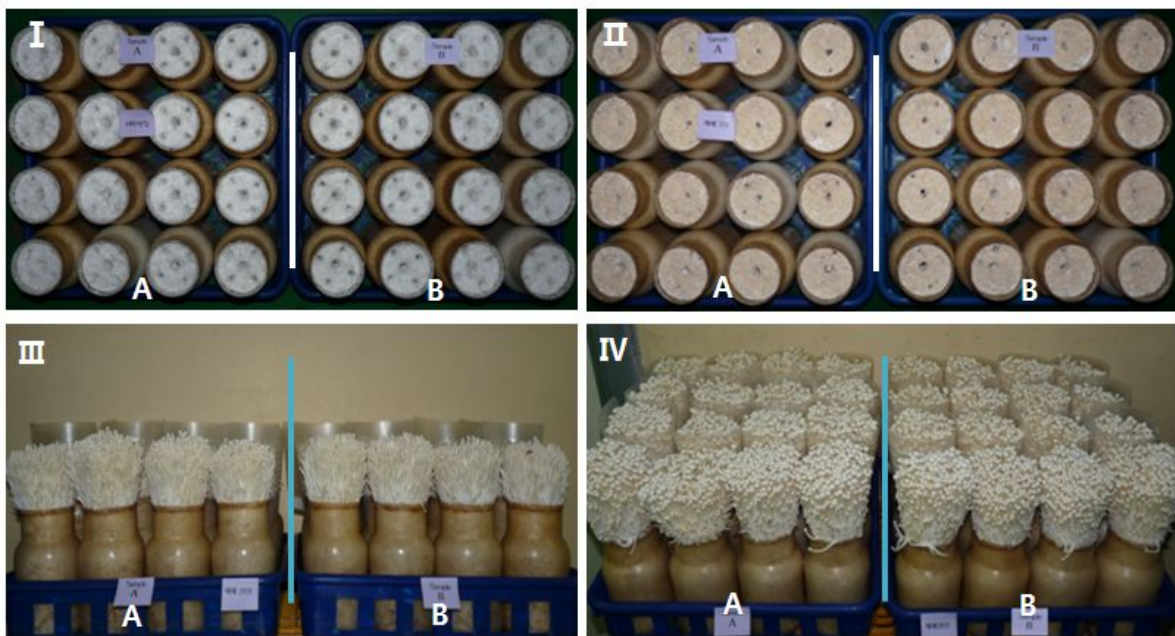


Fig. 5. 한방 슬러지를 첨가한 배지에서의 팽이버섯 재배. I; 배양 25일, II; 재배 7일, III; 재배 21일, IV; 재배 28일. A(CD-1); 콘코프 22%, 한방슬러지 10%, 기타 혼합성분 68%. B(CD-2); 콘코프 29%, 한방슬러지 8%, 기타 혼합성분 63%.

Table 1. 한방 슬러지 첨가배지에서 팽이버섯의 평균 수확량 및 버섯의 생육상태

항 목	시험구							
	CD-1 ¹⁾				CD-2 ²⁾			
	Con.	A	B	C	Con.	D	E	F
버섯수확량(g/병)	283	280	275	281	286	272	271	266
기형버섯 발생율(%)	83	64	4	6	74	31	9	10
2등급 버섯(%)	61	4	1	3	27	19	21	18
생육부진(%)	0	3	0	8	0	24	11	12
흰곰팡이 발생율(%)	0	0	0	0	0	0	0	0
세균성병 발생율(%)	0	0	0	0	0	0	0	0
갈만병 발생율(%)	0	0	0	0	0	0	0	0

¹⁾콘코프 22%, 한방슬러지 10%, 기타 혼합성분 68%, Total dry media 320 g

²⁾콘코프 29%, 한방슬러지 8%, 기타 혼합성분 63%, Total dry media 320 g

⑥ 수확시의 자실체 특성

한방 슬러지 배지에서 재배한 팽이버섯 자실체의 특성을 검토하여 Table 2에 나타내었다. 팽이버섯 대의 길이는 12.8 cm내외이었으며 대 및 갓의 직경은 각각 3 mm 및 9 mm 정도로 대조구와 비슷하게 나타났다. 그리고 병당 유효경수는 대조구와 시험구 모두 490개 내외를 나타내었다.

Table 2. 한방 슬러지 배지에서 재배한 팽이버섯 자실체의 특성

자실체 특성 ¹⁾	대조구	CD-1 ²⁾	CD-2 ³⁾
Length of stipes(cm)	12.8±1.82	12.8±1.79	12.6±1.83
Diameter of stipes(mm)	3.3±0.52	3.4±0.53	3.3±0.53
Diameter of pileus(mm)	9.2±1.21	9.3±1.25	9.3±1.31
High of pileus(mm)	4.2±0.32	4.2±0.31	4.1±0.33
Number of effective stipes(ea)	492±12	488±16	486±14

¹⁾자실체 특성은 생육완료 시점에 대길이 7 cm 이상인 것을 측정하였다.

²⁾콘코프 22%, 한방슬러지 10%, 기타 혼합성분 68%, Total dry media 320 g

³⁾콘코프 29%, 한방슬러지 8%, 기타 혼합성분 63%, Total dry media 320 g

⑦ 수확한 자실체의 경도

10%의 한방 슬러지 첨가배지에서 재배한 팽이버섯의 자루부분을 1 cm 정도로 절단하여 경도를 측정하여 Fig. 6에 나타내었다. 그 결과 대조구보다 시험구의 경도가 약간 향상되는 경향을 보여 팽이버섯의 가식기간이 약간 연장될 수 있을 것으로 판단되었다.

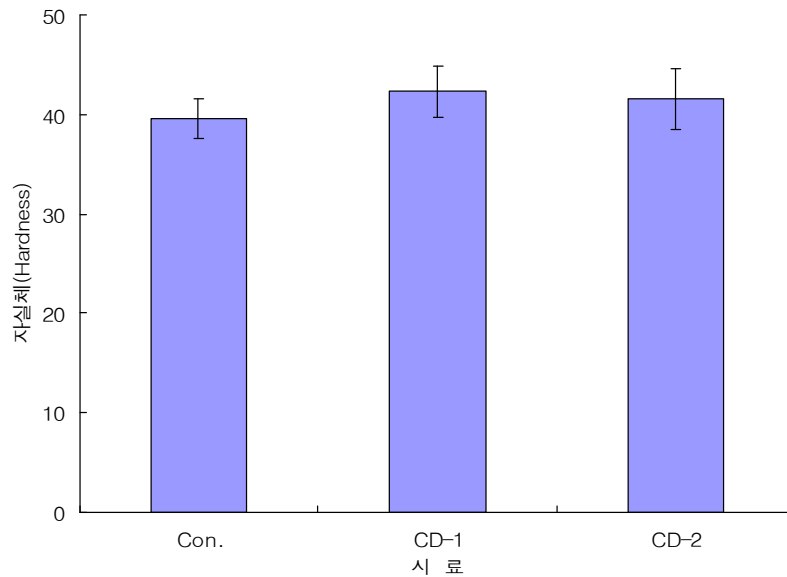


Fig. 6. 한방 슬러지 배지에서 재배한 팽이버섯의 경도.

CD-1; 콘코프 22%, 한방슬러지 10%, 기타 혼합성분 68%. CD-2; 콘코프 29%, 한방슬러지 8%, 기타 혼합성분 63%. Total dry media 320 g

⑧ 폐한방슬러지를 이용한 팽이버섯의 영양분석

한방 슬러지 배지에서 재배한 팽이버섯의 영양성분을 분석하여 Table 3에 나타내었다. 탄수화물, 단백질 및 당류 등의 함량은 대조구의 버섯에 비하여 한방 슬러지 배지에서 재배한 CD-1 및 CD-2의 시료에서는 거의 같거나 약간 높게 나타났지만, 지방의 함량은 대조구에서는 0.19 g/100 g, CD-1 및 CD-2의 시료에서는 0.4~0.52 g/100 g을 나타내어 2배 이상 높은 함량을 나타내었다. 그러나 트랜스지방 및 콜레스테롤은 대조구를 비롯한 모든 시료에서 나타나지 않았다. 그리고 총열량은 대조구가 약 44 Kcal/100 g, CD-1 및 CD-2의 시료는 약 48 Kcal/100 g을 나타내어 한방 슬러지 배지에서 재배한 팽이버섯에서 약간 높게 나타났다.

Table 3. 한방 슬러지 배지에서 재배한 팽이버섯의 열량 및 영양성분 분석

분석 항목	Control	CD-1 ¹⁾	CD-2 ²⁾
열량(Kcal/100g)	44.00	48.03	48.50
탄수화물(g/100g)	8.81	10.44	9.78
단백질(g/100g)	1.70	2.00	1.98
수분(g/100g)	88.55	86.26	87.68
회분(g/100g)	0.75	0.90	0.84
지방(g/100g)	0.19	0.40	0.52
나트륨(mg/100g)	5.98	5.38	4.83
당류(g/100g)	2.98	3.97	4.00
포화지방(g/100g)	0.01	0.02	0.02
트랜스지방(g/100g)	ND	ND	ND
콜레스테롤(mg/100g)	ND	ND	ND

¹⁾콘코프 22%, 한방슬러지 10%, 기타 혼합성분 68%, Total dry media 320 g

²⁾콘코프 29%, 한방슬러지 8%, 기타 혼합성분 63%, Total dry media 320 g

⑨ 팽이버섯 중의 중금속분석

최근 한약재는 대부분 중국 등으로부터 수입에 의존하고 있기 때문에 수확한 버섯 중의 중금속 함량을 분석하여 Table 4에 나타내었다. 생산된 팽이버섯에서는 셀레늄, 카드뮴 및 수은 등은 전혀 검출되지 않았으며 대조구에서는 철, 아연 및 알루미늄이 각각 9.41, 4.32 및 2.26 mg/Kg으로 높게 함량을 나타내었다. 그러나 시험구인 CD-1과 CD-2에서는 철, 아연 및 붕소의 함량이 다소 높은 것으로 나타났다.

Table 4. 한방 슬러지 배지에서 재배한 팽이버섯의 중금속 분석

항목(mg/Kg)	Control	CD-1 ¹⁾	CD-2 ²⁾
붕소	0.53	2.36	1.55
알루미늄	2.26	1.49	0.83
철	9.41	10.65	9.46
망간	0.56	0.71	0.52
구리	0.65	0.66	0.67
아연	4.32	4.21	3.78
비소	0.02	0.01	0.04
셀레늄	ND	ND	ND
카드뮴	ND	ND	ND
수은	ND	ND	ND
납	0.08	0.03	0.04
크롬	1.02	1.30	1.07

¹⁾콘코프 22%, 한방슬러지 10%, 기타 혼합성분 68%, Total dry media 320 g

²⁾콘코프 29%, 한방슬러지 8%, 기타 혼합성분 63%, Total dry media 320 g

⑩ 경제성 분석

팽이버섯을 재배하는 농가에서는 대부분 버섯의 배지성분으로 콘코프 및 미강 등 5~7종의 성분을 혼합하여 사용하고 있다. 그 중에서 배지의 주원료로 예전에는 톱밥을 많이 사용하여 왔지만 최근에는 콘코프로 전환하고 있는 실정이기 때문에 한방 슬러지의 경제성 분석은 콘코프 함유배지를 중심으로 분석을 행하였다. Table 4에 나타낸바와 같이 경북 청도에 소재한 그린피스 농장의 경우 1일 팽이버섯 생산량이 16만병에 이르고 콘코프의 구입비는 320원/kg이며 병당 콘코프의 사용량은 102 g정도이다. 이것을 근거로 콘코프 대신에 한방 슬러지를 10% 사용할 경우 1일 콘코프의 절약량은 1,632 kg이며 이를 금액으로 계산하면 연간 약 1억 9천만원이 절약된다. 그러나 한방 슬러지는 입자의 크기가 불규칙하고 단단하여 입병 및 타공 시 기계의 고장 등을 유발하였다. 이 문제를 해결하기 위해서는 수분이 함유된 한방 슬러지를 수거하여 건조 및 분쇄하는 과정이 필요한 것으로 생각되었다. 이를 위한 초기 기기설치비를 비롯한 자본적 경비, 인건비 및 소요경비를 계산하면 연간 약 1억 4천만원 정도 소요되는 것으로 나타났다. 이상의 계산 근거에 의하면 당해년부터 약 5천만원의 버섯생산 단가절약이 예상되고 그

다음해부터는 인건비와 운영비를 제외한 약 1억 3천만원의 단가절약이 예상된다. 그러나 Table 6에 나타낸바와 같이 경북지역에 분포한 한방 의료기관이 도시를 중심으로 분포되어 있어 군단위의 농촌지역에서 배출되는 한방 슬러지의 절대량이 부족하기 때문에 그린피스와 같은 대형의 버섯재배 농장에서 한방 슬러지를 버섯재배의 배지로 사용하기에는 무리가 있는 것으로 판단된다. 또한 자동화 시스템을 도입하여 버섯을 생산하고 있는 큰느타리버섯 및 팽이버섯 농장에서는 대부분 병재배를 행하고 있기 때문에 한방 슬러지를 병에 충전하는 입병과정과 타공의 과정에서 자동화기계에 무리가 있을 것으로 사료된다. 그렇기 때문에 한방 슬러지를 버섯배지로 사용하기 적당한 곳은 자동화 시스템을 갖추지 않은 소규모의 팽이버섯 재배사인 것으로 판단되었다. 이 이외의 버섯재배에 적용 가능한 버섯은 균상으로 버섯을 재배하는 느타리버섯과 봉지재배를 행하는 표고, 상황 및 영지버섯 등의 재배에 적당한 것으로 판단되었다.

Table 4. 콘코프 대응으로 10% 한방 슬러지를 사용할 경우 단가절약 금액(년)

항 목	경제성 분석	비고
공장규모	160,000병/일	병 재배/자동화
콘코프 가격	320원/kg	
콘코프 사용량/일	160,000병/일 × 102g/병=16,320kg	1100mL/병
콘코프 절약 량/일 (한방 슬러지 10%사용)	16,320kg×10%=1,632kg	
1일 절약단가(원)	1,632kg×320원/kg=522,240원	
절약단가(년)	522,240원×360일=188,006,400원	

Table 5. 한방 슬러지 함유배지를 사용하기 위한 소요경비

항 목	경비 산출근거	금액(원)	비고
건조기 설치비	30,000,000원×1기	30,000,000원	자본적 경비
분쇄기 설치비	30,000,000원×1기	30,000,000원	"
트럭(1.4톤)	20,000,000원×1대	20,000,000원	"
인건비	1,800,000원/월×12개월×2명	43,200,000원	인건비
기타 유지비	123,200,000원×10%	12,320,000원	운영비
합 계(원)		123,200,000원	

Table 6. 경북지역에 분포한 한방 의료기관의 현황

지역	한방 의료기관					합계	비고
	한의원	한방병원	요양병원	공공기관	한의대		
경산시	52	-	6	-	-	58	
경주시	63	2	4	-	-	69	
구미시	85	1	-	-	-	86	
김천시	24	-	-	-	-	24	
문경시	15	-	1	-	-	16	
상주시	20	-	-	-	-	20	
성주군	9	-	-	-	-	9	
고령군	5	-	-	-	-	5	
안동시	40	-	2	-	-	42	
영덕군	10	-	-	-	-	10	
영주·봉화	25	5	-	-	-	30	
영천시	27	3	1	-	-	31	
예천군	9	-	-	-	-	9	
울진·울릉	15	-	-	-	-	15	
의성·군위	13	-	1	-	-	14	
청도군	11	-	-	1	-	12	
청송·영양	9	-	-	-	-	9	
칠곡군	18	-	1	-	-	19	
포항시	114	24	8	-	-	146	
동국대	2	-	-	-	10	12	

(2) 제 1협동과제 연구방법 및 결과

(가) 연구방법

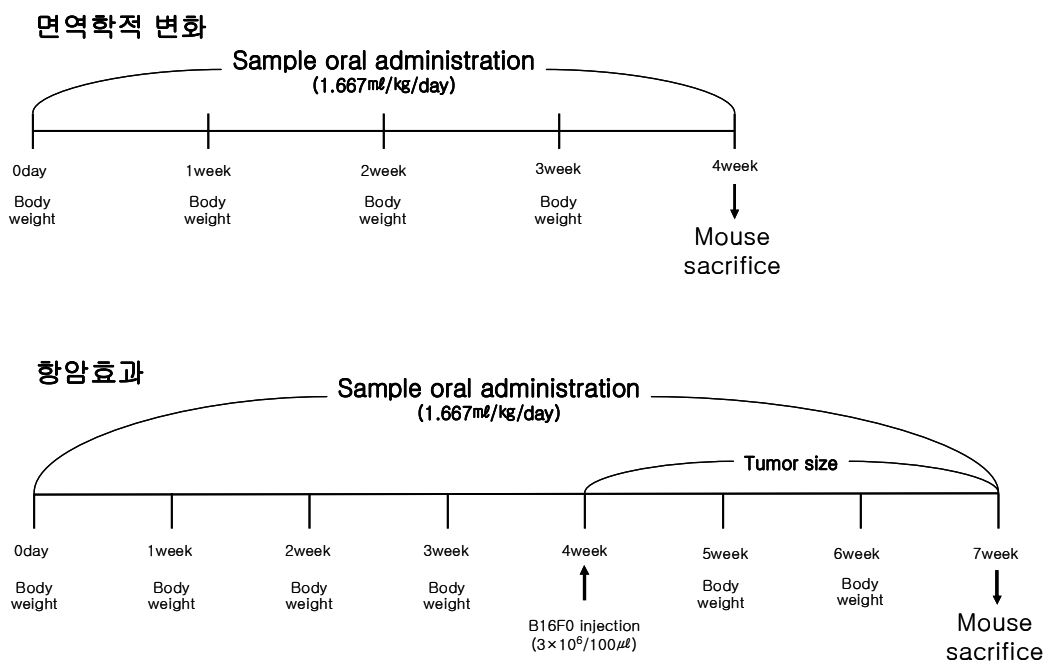
① 실험동물

실험동물은 (주)대한바이오링크에서 특정병원체부재(specific pathogen free) C57BL/6 생쥐를 공급받아 실험동물 사육실에서 polysulfone cage (365×207×130mm)당 5개체의 밀도를 유지하며 사육하였다. 이들 생쥐는 2주일간 실온에서 물과 사료를 충분히 공급하고, 낮과 밤의 주기를 12시간씩 조절하면서 가능한 스트레스를 받지 않도록 사육하면서, 8-10주령 생쥐를 실험에 사용하였다.

② 시험시료 투여 및 종양 유도

시료 경구투여 후 면역학적 변화를 관찰한 실험에서는 5% 시료인 경우 100ml(5g)/60kg/day 또는 1% 시료인 경우 100ml(1g)/60kg/day 기준으로 매일 1회씩 4주간 경구 투여한 다음 생쥐를 희생하였으며, 종양 억제 실험은 동일한 양으로 매일 1회씩 4주간 경구투여 한 다음 B16F0 세포를 3×10^5 cell/mouse로 피하주사하고 그 후 추가적으로 3주간 시료를 동일한 양으로 투여하였다.

Experiment schedule



③ 사용시약

세포 배양에 필요한 RPMI-1640과 항생제(antibiotic-antimycotic), FBS(Fetal Bovine Serum)은 Hyclone 제품을, 2ME(2-mecaptoethanol), sodium bicarbonate(NaHCO_3), 세포 증식반응에 사용한 LPS(Lipopolysaccharide)와 Con A는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA)제품을 사용하였다.

④ 혈액학적 분석

희생 전 혈액을 생쥐에서 안와채혈 후 EDTA(Etylene diamineteraacetic acid) Tube에 넣어 항응고 처리한 후 1시간 이내에 혈구분석기(HemaVet(Drew, USA))로 아래의 항목을 측정하였다. 백혈구 수(White Blood cell, WBC) 및 백혈구 조성(호중구(Neutrophil, NE), 림파구(Lymphocyte, LY), 단핵구(Monocyte, MO), 호산구(Eosinophil, EO), 호염구(Basophil, BA)),

적혈구 수(Red Blood Cell, RBC), 혈색소량(Hemoglobin, Hb), 적혈구 용적(Hematocrits, Hct), 평균 적혈구 용적(Mean Corpuscular Volume, MCV) 평균 적혈구 색소량(Mean Corpuscular Hemoglobin, MCH), 평균 적혈구 색소농도(Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration, MCHC), 혈소판(Platelet, PLT), 평균 혈소판 용적(Mean Plasma Volume, MPV)을 측정 하였다,

⑤ 비장세포증식 측정

생쥐(C57BL/6)의 비장을 분리한 다음, 핀셋을 이용하여 단일세포 부유액을 만들었다. 단일세포 부유액을 RPMI 1640 배양액으로 3회 세척한 다음, 5×10^6 cell/ml 농도가 되게 희석한 후 96 well 당 $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가하였다. 이때, LPS는 1, $10 \mu\text{g/ml}$ Con A는 0.1, $1.0 \mu\text{g/ml}$ 로 첨가하여 37°C , 5% CO_2 배양기에서 48시간 배양하였다. 세포증식 측정은 분리한 비장세포를 96well plate에 넣고 시료를 농도별로 넣어 2일 동안 배양한 다음 생장률은 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection KitⅢ(Roche, IN, USA)를 이용하여 Micro-Plate reader로 세포증식 정도를 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

⑥ Cytokine 및 immunoglobulin 측정

비장세포의 cytokine은 세포(5×10^6 개)에 LPS($10 \mu\text{g/ml}$), Con A($1 \mu\text{g/ml}$)로 처리 한 후, 24시간 동안 37°C , 5% CO_2 incubator에서 배양 후 상층액을 수거하였으며, immunoglobulin은 생쥐 희생 전 안와채혈로 혈액을 수거 후 원심분리(3000rpm, 5min)하여 serum을 수거하여 측정하였다. 비장세포 상층액에 포함된 IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α 와 serum의 IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3는 효소항체법(enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA)을 이용하여 측정하였다. 즉, plate-bottom micro-well에 1차 항체($2 \mu\text{g/ml}$)를 coating buffer(0.1 M NaHCO_3 , pH8.2)에 희석하여 $50 \mu\text{l/well}$ 로 분주하고 4°C 에서 하룻밤 둔 다음, washing 용액(0.05% Tween 20/PBS)으로 세척하였다. 세척된 micro-well은 10% FBS가 첨가된 PBS로 blocking 하였으며, 실험에서 채취한 배양 상층액을 적당한 비율로 희석한 후 각 well에 분주하여 상온에서 반응시켰다. 그 다음, biotin이 부착된 2차 항체($1 \mu\text{g/ml}$) $100 \mu\text{l/well}$ 와 일정시간 상온에서 반응시킨 후, avidin-peroxidase($2.5 \mu\text{g/ml}$) $100 \mu\text{l/well}$ 을 첨가하였다. 마지막으로 기질(2,2'-azino-bis, 0.1 M citric acid, H_2O_2)을 첨가하여 발색시킨 다음 micro-plate reader를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 O.D.의 농도는 표준곡선을 이용하여 환산하였고 측정 농도의 한계치는 10pg/ml 이었다.

⑦ 세포 표면분자 분석

생쥐의 흉선세포 및 비장세포(5×10^5 개)를 수거하여 anti-CD16/CD32(Fc γ Ⅲ/Ⅱ Receptor)mAb로 4°C 에서 30분 동안 blocking하고 washing 용액(1% FBS · 0.1% NaN_3 /PBS)으로 세척하였다. 그리고 PE-conjugated anti-CD8 mAb, FITC-conjugated anti-CD4, CD11c, CD19, NK1.1 mAb

로 4°C에서 30분동안 염색하였다. 염색된 세포는 다시 washing 용액으로 세척한 후, 인산완충용액에 현탁하여 유세포분석기로 분석하였다.

⑧ 자연살해세포 세포독성 측정

배양된 YAC-1세포를 수거하여 washing 배지로 두 번 세척하였다. 세척된 세포를 5% FBS RPMI 배지에 $4 \times 10^5/ml$ 현탁하여 96-well U bottom plate에 $50\mu l/well$ 로 분주하였다. 세포가 분주된 well에 RBC가 제거된 비장세포를 5% FBS RPMI 배지에 현탁하여 표적세포와 효과세포의 비율이 50:1 또는 100:1이 되도록 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 배양 후, 250g, 25°C, 4min로 spin down하여 상층액 50 μl 를 수거하였다. 수거된 상층액은 CytoTox96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit(promega, USA)를 이용하여 LDH를 측정함으로써 비장세포내의 자연살해세포의 암세포에 대한 세포독성능력을 측정하였다.

$$\text{Cytotoxicity} = \frac{(\text{Target : Effector} - \text{Medium}) - (\text{Target} - \text{Medium}) - (\text{Effector} - \text{Medium})}{(\text{Target lysis} - \text{Medium lysis}) - (\text{Target} - \text{Medium})} \times 100$$

⑨ B16F0 종양 크기 및 무게 측정

종양 크기는 B16F0세포 투여 후 종양이 생성된 8일째부터 Digimatic caliper(Mitutoyo, Japan)를 이용하여 매일 1회 측정하였으며, 21일째 마우스를 희생 후 종양 조직을 적출하여 크기 및 무게를 측정하였다.

(나) 연구결과

① 시제품에 대한 경구투여 후 면역학적 변화에 대한 연구 결과

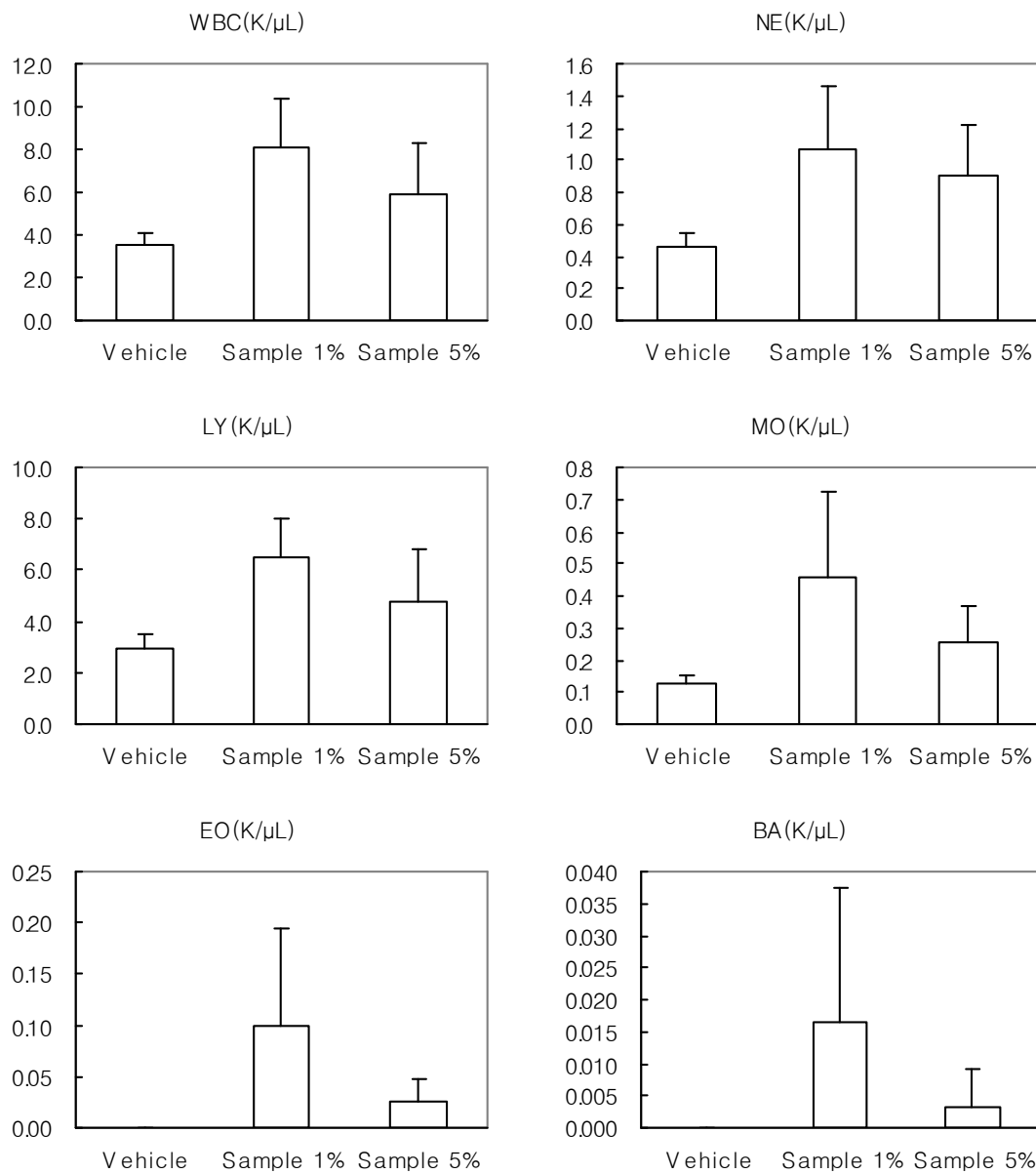


Fig. 1. Effect of sample administration on hematology change in mice.

WBC: White blood cell, NE: Nutrophil, LY: Lymphocyte, MO: Monocyte, EO: Eosinophil, BA: Basophil. * $p < 0.05$ compared with Vehicle.

실험시료를 4주간 매일 1회 경구투여한 후 혈액학적 분석을 한 결과, 시료를 처리한 실험군에서 다양한 백혈구들의 수가 증가 되었으며, 시료 5%에 비하여 시료 1%를 투여하였을 때, 혈구세포를 증가하였지만 통계학적으로 유의하지 않았으나, 림프구(Lymphocyte)는 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 증가하였다.

Table 1. Effect of sample administration on hematology change in mice

	Vehicle	Sample 1%	Sample 5%
WBC (K/ μ l)	3.540 \pm 0.594	8.140 \pm 2.243	5.947 \pm 2.361
NE (K/ μ l)	0.463 \pm 0.084	1.070 \pm 0.359	0.897 \pm 0.325
LY (K/ μ l)	2.947 \pm 0.534	6.500 \pm 1.506*	4.464 \pm 2.038
MO (K/ μ l)	0.127 \pm 0.027	0.457 \pm 0.265	0.253 \pm 0.115
EO (K/ μ l)	0.000 \pm 0.000	0.100 \pm 0.095	0.027 \pm 0.021
BA (K/ μ l)	0.000 \pm 0.000	0.017 \pm 0.021	0.003 \pm 0.006

WBC: White blood cell, NE: Nutrophil, LY: Lymphocyte, MO: Monocyte, EO: Eosinophil, BA: Basophil, * p <0.05 compared with Vehicle.

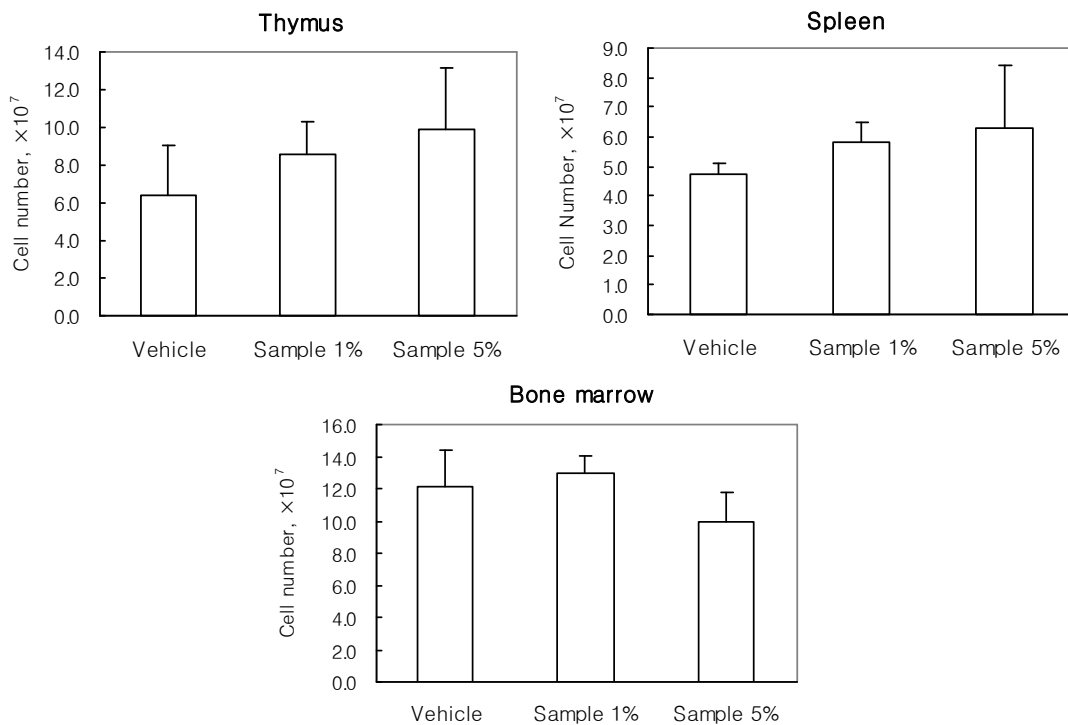


Fig. 2. Total cell number immune-organ cells isolated from mice. Isolated immune-organ cells from vehicle and sample administration mice.

Table 2. Total cell number immune-organ cells isolated from mice

	Number of cell		
	Thymus	Spleen	Bone marrow
Vehicle	$6.35 \pm 2.74 \times 10^7$	$4.74 \pm 0.34 \times 10^7$	$1.21 \pm 0.23 \times 10^7$
Sample 1%	$8.57 \pm 1.70 \times 10^7$	$5.80 \pm 0.70 \times 10^7$	$1.29 \pm 0.12 \times 10^7$
Sample 5%	$9.88 \pm 3.24 \times 10^7$	$6.30 \pm 2.08 \times 10^7$	$1.00 \pm 0.17 \times 10^7$

Isolated immune-organ cells from vehicle and sample administration mice.

4주간 매일 1회 경구투여한 후 흉선, 비장 및 골수를 분리하여 단일세포의 수를 확인한 결과, 흉선, 비장 및 골수세포의 수는 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

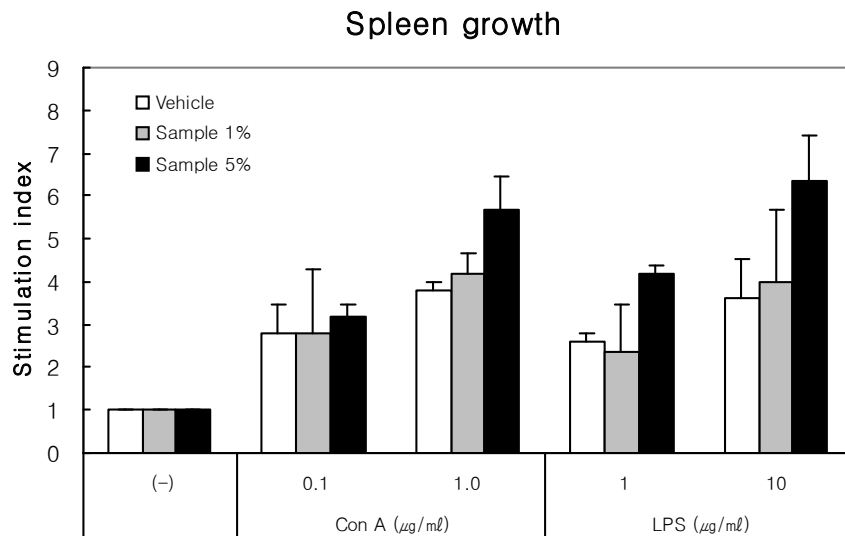


Fig. 3. The effect of LPS and Con A on the proliferation of vehicle or sample administrated mice spleen cells. The spleen cells(C57BL/6, 5×10^5 cells/well) of vehicle and sample administrated mice were stimulated with LPS , Con A at various concentrations for 48 hours. Data are represented as mean \pm SD for triplicates. * $p < 0.05$ compared with Vehicle.

Table 3. The effect of LPS and Con A on the proliferation of vehicle or sample administrated mice spleen cells

	(-)	Con A($\mu\text{g/ml}$)		LPS($\mu\text{g/ml}$)	
		0.1	1.0	1	10
Vehicle	1.000 \pm 0.000	2.811 \pm 0.671	3.781 \pm 0.203	2.587 \pm 0.202	3.589 \pm 0.913
Sample 1%	1.000 \pm 0.000	2.810 \pm 1.484	4.197 \pm 0.486	2.339 \pm 1.119	4.015 \pm 1.645
Sample 5%	1.000 \pm 0.000	3.165 \pm 0.321	5.662 \pm 0.803*	4.197 \pm 0.185*	6.352 \pm 1.069*

The spleen cells(C57BL/6, 5×10^5 cells/well) of vehicle and sample administrated mice were stimulated with LPS, Con A at various concentrations for 48 hours. Data are represented as mean \pm SD for triplicates. * $p < 0.05$ compared with Vehicle.

4주간 매일 1회 경구 투여한 후, 비장세포를 분리하여 T세포 증식 유도물질인 Con A와, B세포 증식 유도물질인 LPS로 자극하여 48시간 배양한 다음에 증식반응을 관찰한 결과, 대조군에 비하여 시료 5% 투여군에서 T세포 및 B세포의 증식반응이 통계학적으로 유의하게 증가하였다.

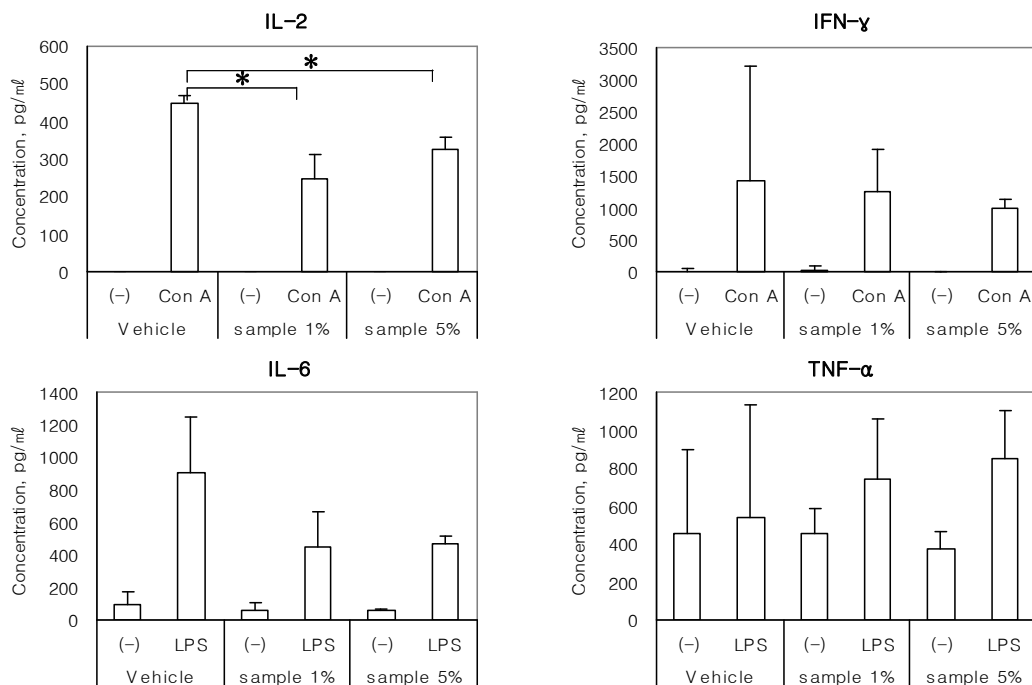


Fig. 4. The effect of LPS and Con A on the cytokine production of vehicle and sample administration mice spleen cells. The spleen cells(C57BL/6, 5×10^5 cells/well) of vehicle and sample administrated mice were activated with LPS or Con A for 24 hours. Culture supernatants

were harvested, various cytokine levels were determined by ELISA. Data are represented as mean \pm SD for triplicates. * p <0.05 compared with Vehicle.

4주간 매일 1회 경구투여한 후, 비장세포를 분리하여 T세포 증식 유도물질인 Con A와 B세포 증식 유도물질인 LPS로 자극하여 24시간 배양한 다음에 배양 상층액을 수거하여 IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α 의 농도를 측정된 결과, 대조군에 비해서 시료 1%, 5%를 투여한 실험군에서 IL-2와 IL-6의 농도가 낮은 것으로 나타났으며, 특히 IL-2는 통계학적 유의하게 감소하였다.

Table 4. The effect of LPS and Con A on the cytokine production of vehicle and sample administration mice spleen cells

	IL-2(pg/ml)		IFN- γ (pg/ml)		IL-6(pg/ml)		TNF- α (pg/ml)	
	(-)	Con A	(-)	Con A	(-)	LPS	(-)	LPS
Vehicle	<10	449.2 \pm 19.5	10.1 \pm 48.0	1429.3 \pm 1792.2	92.1 \pm 79.7	903.2 \pm 344.3	457.1 \pm 437.6	538.1 \pm 599.5
Sample 1%	<10	427.8 \pm 62.7*	33.9 \pm 51.7	1266.1 \pm 649.2	56.7 \pm 43.85	466.1 \pm 217.8	455.6 \pm 132.6	739.0 \pm 326.2
Sample 5%	<10	326.0 \pm 30.7*	<10	991.0 \pm 143.2	54.5 \pm 16.1	467.1 \pm 45.7	846.3 \pm 254.8	846.3 \pm 254.8

The spleen cells(C57BL/6, 5×10^5 cells/well) of vehicle and sample administrated mice were activated with LPS or Con A for 24 hours. Culture supernatants were harvested, various cytokine levels were determined by ELISA. Data are represented as mean \pm SD for triplicates. * p <0.05 compared with Vehicle.

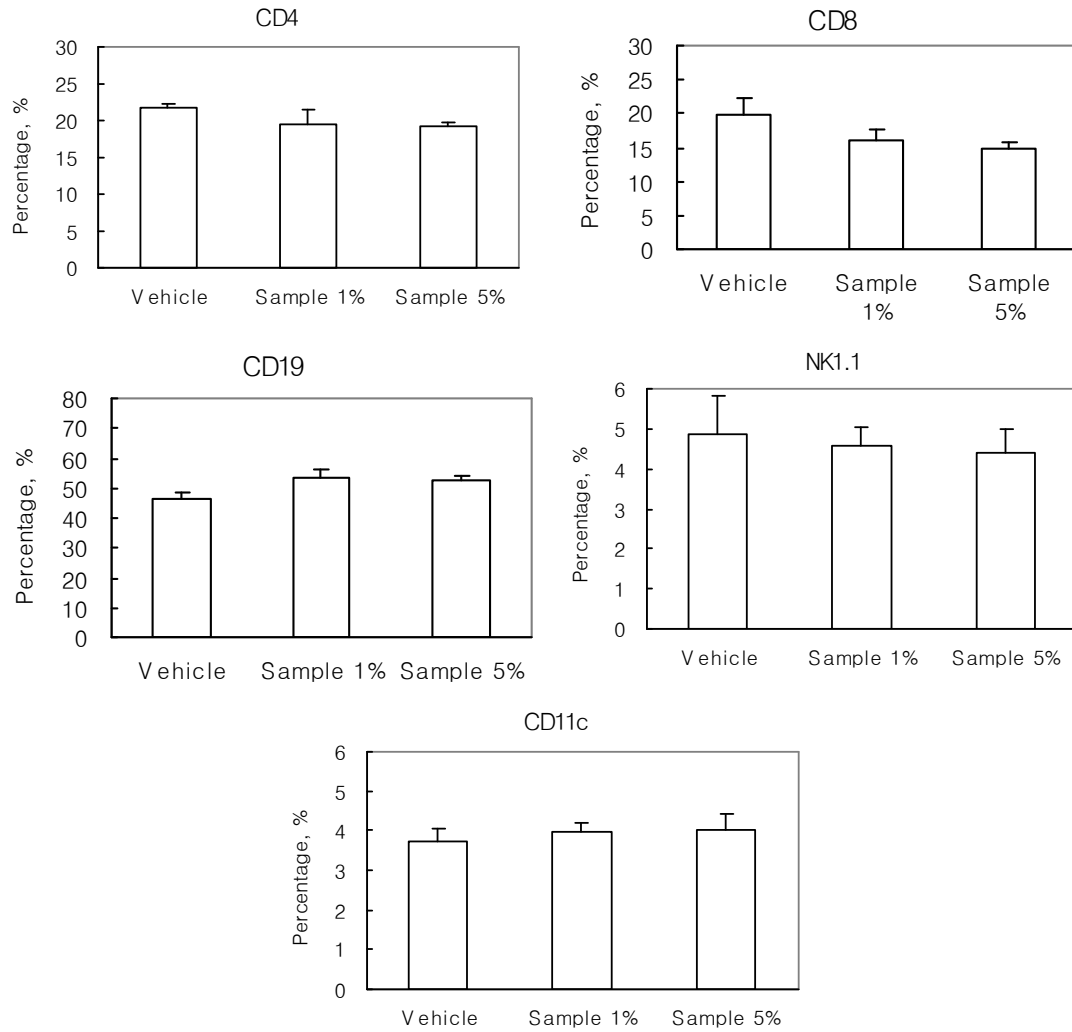


Fig. 5. Expression percentage of various surface markers on the spleen cells. Surface expression of CD4, CD8, CD19, NK1.1 and CD11c were analyzed by two colour flow cytometry. Numbers represent the percentage of double positive cells. * $p < 0.05$ compared with Vehicle.

4주간 매일 1회 경구투여한 후, 비장세포를 분리하여 보조 T세포(helper T cell, CD4⁺), 세포독성 T세포(cytotoxic T cell, CD8⁺), B세포(B cell, CD19⁺), 자연살해세포(Natural killer cell, NK1.1⁺), 수지상세포(Dendritic cell, CD11c⁺)의 수를 알아보기 위하여, 각 세포의 특이적인 단백질자에 대한 항체로 염색하여 측정된 결과, 대조군에 비해서 시료 5%를 투여한 실험군에서 보조 T세포가 감소하였으며, 세포독성 T세포는 시료 1%, 5% 군에서 모두 통계학적으로 유의하게 감소하였다. 하지만 B세포는 시료 1%, 5% 군에서 유의하게 증가하였다.

Table 5. Expression percentage of various surface markers on the spleen cells

	CD4	CD8	CD19	NK1.1	CD11c
Vehicle	21.80 ± 0.50	19.87 ± 2.27	46.03 ± 2.48	4.83 ± 0.99	3.73 ± 0.31
Sample 1%	18.57 ± 1.85	16.17 ± 1.38*	53.07 ± 3.35*	4.57 ± 0.49	3.97 ± 0.23
Sample 5%	19.33 ± 0.38*	14.90 ± 0.95*	52.40 ± 1.65*	4.40 ± 0.61	4.03 ± 0.38

Surface expression of CD4, CD8, CD19, NK1.1 and CD11c were analyzed by two colour flow cytometry. Numbers represent the percentage of double positive cells. * $p < 0.05$ compared with Vehicle.

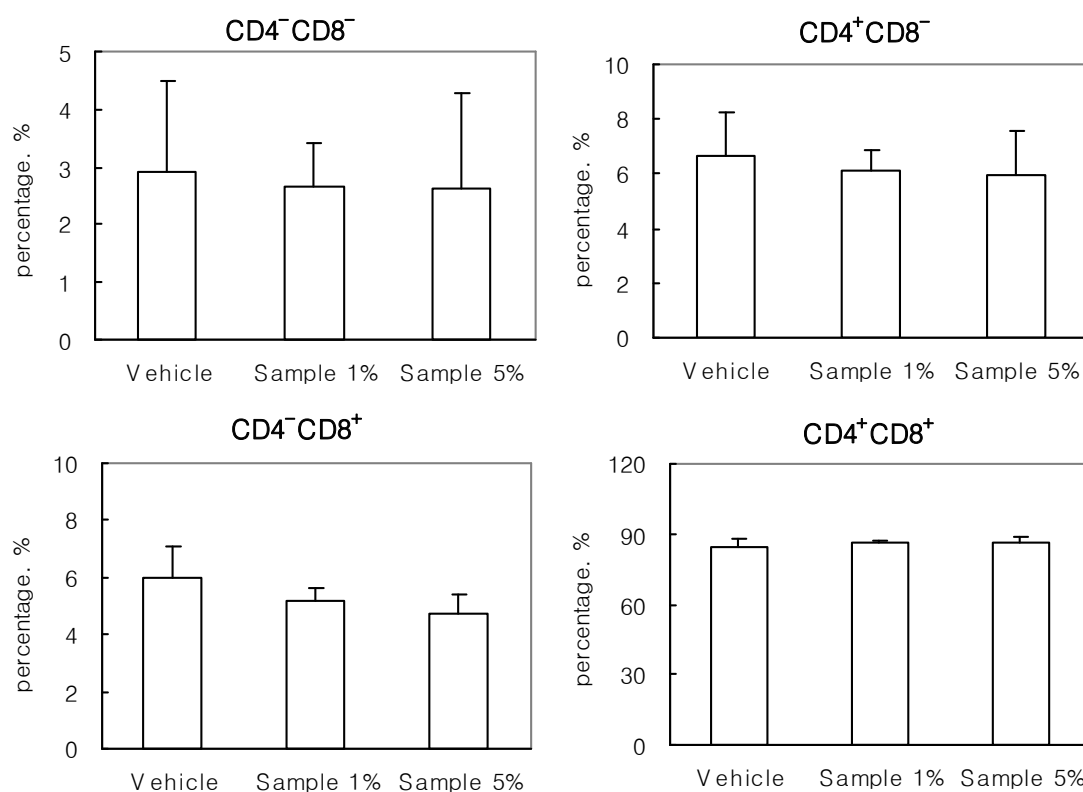


Fig. 6. Expression percentage of various surface markers on the Thymus cells. Surface expression of CD4⁻CD8⁻, CD4⁺CD8⁻, CD4⁻CD8⁺ and CD4⁺CD8⁺ were analyzed by two colour flow cytometry. Numbers represent the percentage of double positive cells.

Table 6. Expression percentage of various surface markers on the Thymus cells

	CD4 ⁻ CD8 ⁻	CD4 ⁺ CD8 ⁻	CD4 ⁻ CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁺
Vehicle	2.90 ± 0.66	6.63 ± 1.60	6.00 ± 1.11	84.50 ± 3.16
Sample 1%	2.67 ± 0.21	6.10 ± 0.75	5.17 ± 0.47	86.13 ± 1.15
Sample 5%	2.63 ± 0.38	5.93 ± 1.64	4.73 ± 0.64	86.57 ± 2.37

Surface expression of CD4⁻CD8⁻, CD4⁺CD8⁻, CD4⁻CD8⁺ and CD4⁺CD8⁺ were analyzed by two colour flow cytometry. Numbers represent the percentage of double positive cells.

4주간 매일 1회 경구투여한 후, 흉선에서 흉선세포를 분리하여 미분화한 T세포인 이중음성 (CD4⁻CD8⁻) 또는 이중양성(CD4⁺CD8⁺) T세포와, 분화가 끝난 보조 T세포(helper T cell, CD4⁺CD8⁻) 또는 세포독성 T세포(cytotoxic T cell, CD4⁻CD8⁺)의 비율을 알아보기 위하여, 각 세포의 특이적인 단백질자에 대한 항체로 염색하여 측정된 결과, 대조군에 비해서 실험시료 A와 B를 투여한 실험군에서 각 세포의 비율에는 유의한 통계학적 차이는 없었다.

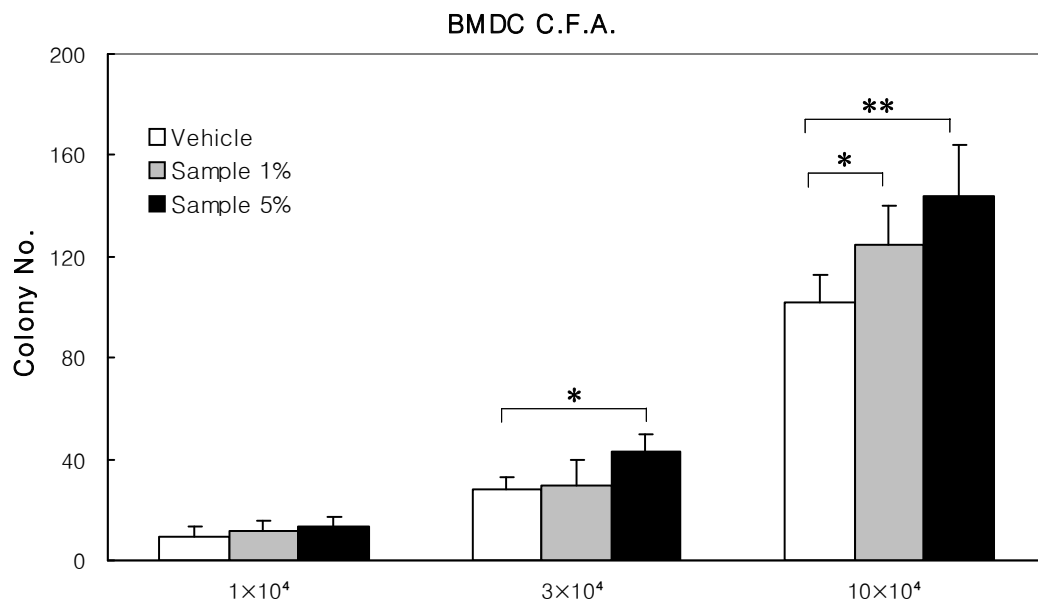


Fig. 7. The effect of IL-4 and GM-CSF on the colony formation. Bone marrow cells isolated from vehicle and sample administrated mice were cultured for 5 days in the presence of IL-4 and GM-CSF. Data are represented as mean ± SD for triplicates. ***p*<0.05 or **p*<0.05 compared with Vehicle.

Table 7. The effect of IL-4 and GM-CSF on the colony formation

	1×10^5	3×10^4	1×10^4
Vehicle	9.7±3.8	28.0±4.9	101.7±11.5
Sample 1%	11.4±4.4	29.8±10.2	124.6±15.7*
Sample 5%	12.9±4.5	42.6±7.6*	143.7±20.8**

Bone marrow cells isolated from vehicle and sample administrated mice were cultured for 5 days in the presence of IL-4 and GM-CSF. Data are represented as mean ± SD for triplicates. ** $p < 0.05$ or * $p < 0.05$ compared with Vehicle.

4주간 매일 1회 경구투여한 후, 골수세포를 분리하여 수지상세포로의 분화능을 알아보기 위하여, 분리한 골수세포에 IL-4와 GM-CSF를 첨가하여 수지상세포로의 분화를 유도하여 분화하는 세포의 콜로니 수를 측정된 결과, 대조군에 비해서 시료 1%, 5% 군에서 통계학적으로 유의하게 콜로니 수가 증가하였으며, 특히 시료 5%에서 효과적이었다.

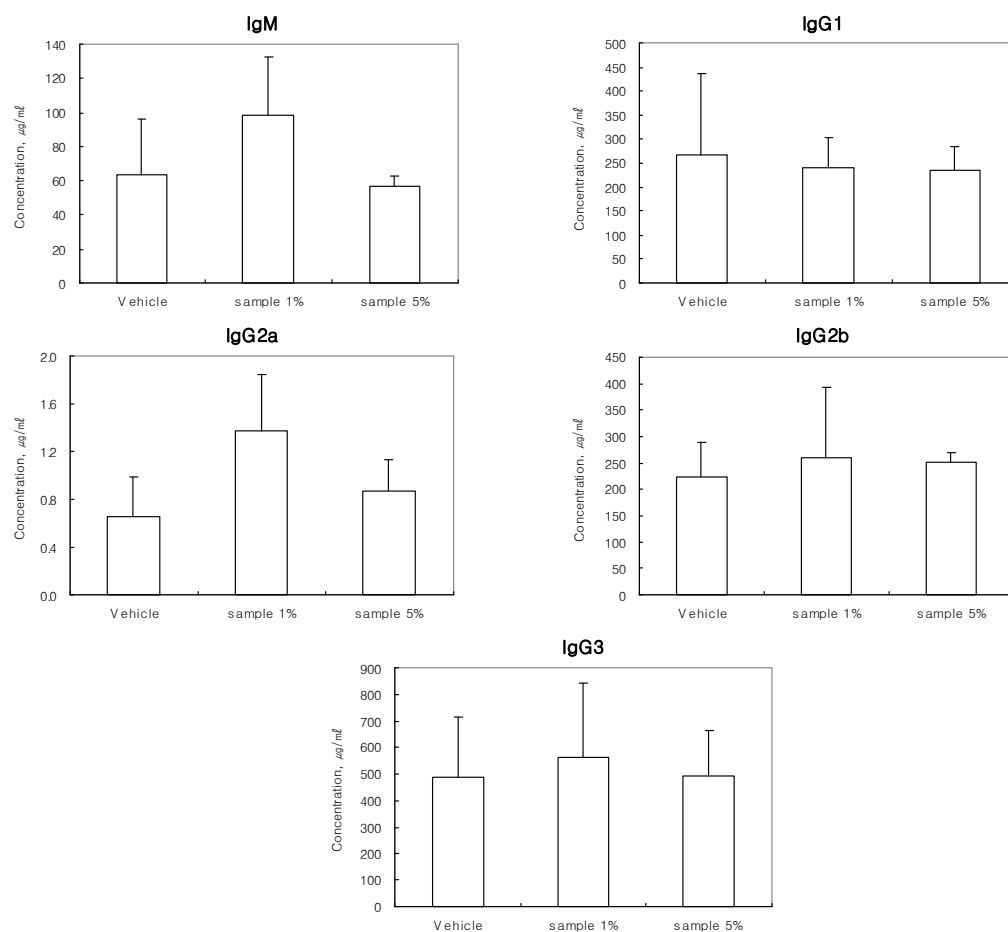


Fig. 8. The effect of sample on the various immunoglobulin of vehicle and sample administration mice serum. C57BL/6 mice were oral administrated vehicle or samples. After 4 weeks, serum sample were assayed of total immunoglobulins by ELISA.

Table 8. The effect of sample on the various immunoglobulin of vehicle and sample administration mice serum

	Concentration, $\mu\text{g/ml}$				
	IgM	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
Vehicle	63.84 \pm 32.25	265.85 \pm 171.77	0.65 \pm 0.33	222.43 \pm 66.53	489.17 \pm 224.40
Sample 1%	98.62 \pm 33.82	240.26 \pm 63.84	1.37 \pm 0.47	259.93 \pm 133.66	562.37 \pm 280.97
Sample 5%	56.96 \pm 5.92	235.72 \pm 48.84	0.86 \pm 0.27	252.27 \pm 16.21	492.47 \pm 171.46

C57BL/6 mice oral administrated vehicle or samples. After 4 weeks, serum sample were assayed of total immunoglobulins by ELISA.

4주간 매일 1회 경구투여한 후, 혈장에 존재하는 항체의 역가를 알아보기 위하여, 안와채혈로 혈액을 분리 후 혈장을 수거하여 ELISA법으로 다양한 항체의 농도를 측정된 결과, 대조군에 비해서 시료 1%, 5% 군에서 유의한 항체농도의 차이는 나타나지 않으나, IgM 과 IgG2a가 시료 1% 처리시 증가하였으나 유의한 차이는 없었다.

② 시제품에 대한 항암 효과 분석 연구 결과

시료 1%와 5%를 투여한 후에 암세포를 피하주사하여 실험한 결과, 종양세포의 크기와 무게를 억제시키는 효과, 사이토카인 IL-2, IL-6의 분비 및 항체생산을 증가시키는 효과, 비장세포의 증식 증가효과가 통계학적으로 유의하게 나타나는 것을 관찰하였다. 또한 자연살해세포(Natural killer cell, NK1.1+)의 세포독성 활성을 증가시키는 효과가 나타나는 것을 관찰하였다.

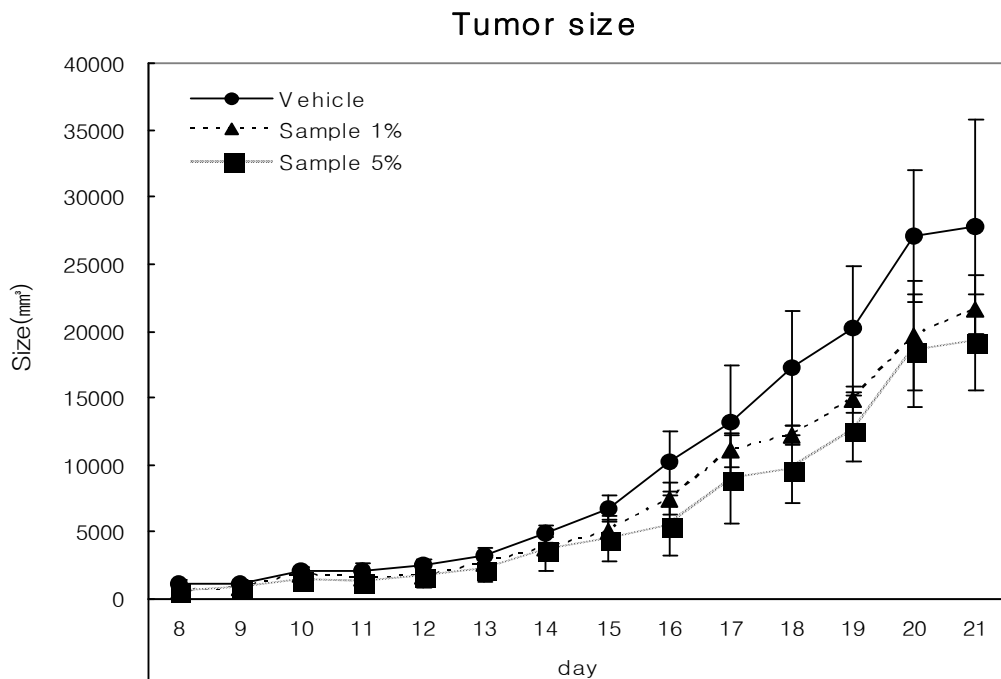


Fig. 9. Effect of sample administration on B16F0 tumor induced mice. Mice were administrated 4 weeks for 1.667ml/kg of sample or vehicle and subcutaneous injected B16F0($3 \times 10^5/100 \mu\ell$) tumor cells. Tumor size was measured at 8 days after injection of B16F0 tumor cells.

암세포주인 B16F0(melanoma)를 피하에 주사한 후 시간에 따른 암세포의 크기를 매일 측정하여 비교한 결과, 대조군은 시간이 지날수록 암세포의 크기가 크게 증가하였지만, 실험시료 1%, 5%를 투여한 실험군에서는 대조군에 비해 암세포의 크기 증가율이 통계학적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다.

Table 9. Effect of sample administration on B16F0 tumor induced mice

Day	Tumor sizs(mm ³)		
	Vehicle	Sample 1%	Sample 5%
8	1137.2 ± 274.5	570.1 ± 139.8*	502.5 ± 185.8*
9	1173.2 ± 225.7	790.1 ± 199.5	667.3 ± 443.8
10	2172.3 ± 273.0	1744.1 ± 61.9	1246.5 ± 461.6*
11	2224.7 ± 596.4	1403.4 ± 388.3	1131.6 ± 556.6*
12	2563.5 ± 492.0	1612.9 ± 104.0	1476.8 ± 711.2*
13	3345.6 ± 563.7	2503.0 ± 167.3*	2014.9 ± 851.0*
14	5095.0 ± 489.1	3616.5 ± 724.9	3281.3 ± 1499.8*
15	6941.4 ± 976.1	4734.0 ± 702.3	4195.9 ± 1735.7*
16	10723.8 ± 2205.3	7105.6 ± 928.3*	4831.5 ± 2042.0*
17	14078.3 ± 4331.8	10515.8 ± 639.8	8291.2 ± 3503.4*
18	18179.8 ± 4163.2	12038.9 ± 586.6*	8722.4 ± 1531.4*
19	21195.0 ± 4781.7	14531.4 ± 751.7*	12171.0 ± 2467.6*
20	27095.4 ± 4920.4	18579.3 ± 3769.7*	17061.7 ± 3151.3*
21	30019.4 ± 7196.3	21012.8 ± 2645.6*	18078.8 ± 2940.5*

Mice were administrated 4 weeks for 1.667ml/kg of sample or vehicle and subcutaneous injected B16F0($3 \times 10^5/100\mu\text{l}$) tumor cells. Tumor size was measured at 8 days after injection of B16F0 tumor cells. * $p < 0.05$ compared with Vehicle.

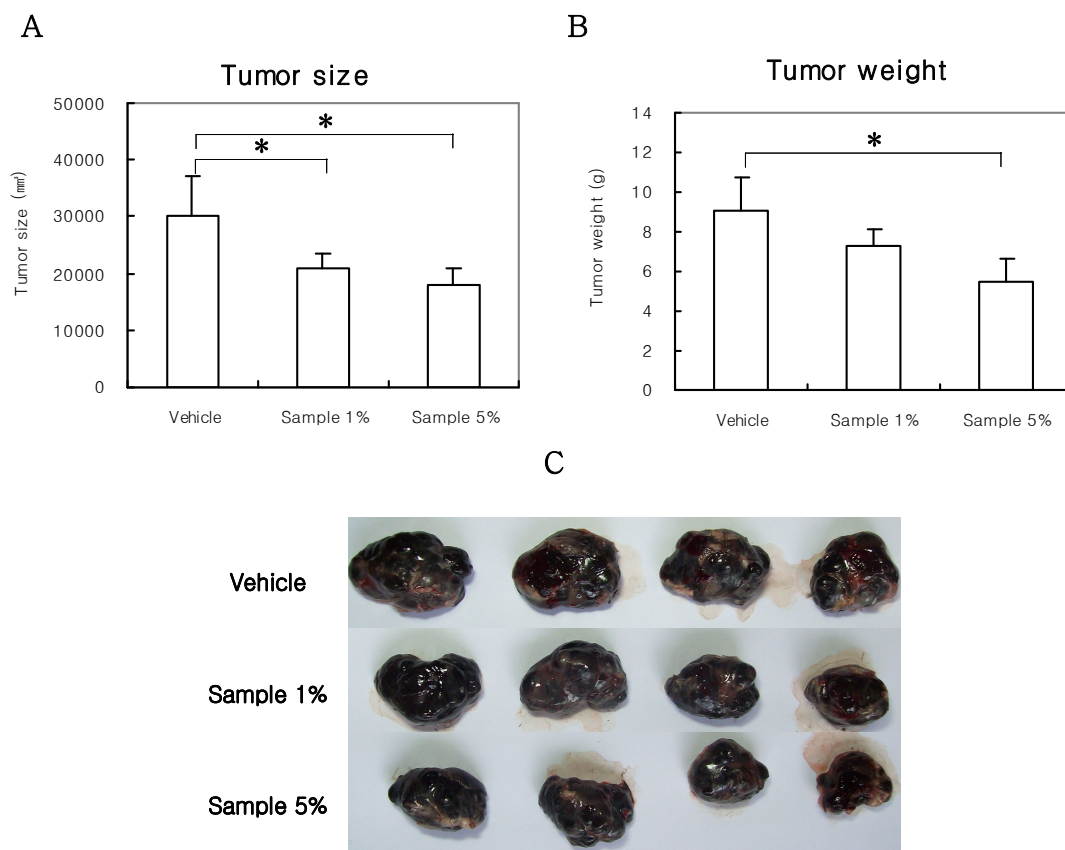


Fig. 10. The inhibition of tumor growth on the sample administrated mice. All mice performed as sacrificed at 21 days after injection of B16F0 tumor cells. Tumor size (A) and weight (B) were measured. (C) Photographs of melanoma solid tumor taken from all mice of each group. * $p < 0.05$ compared with Vehicle.

Table 10. The inhibition of tumor growth on the sample administrated mice

	Tumor size (mm ³)	Tumor weight (g)
Vehicle	30019.4 ± 7196.3	9.058 ± 1.686
Sample 1%	21012.8 ± 2645.6*	7.240 ± 0.913
Sample 5%	18078.8 ± 2940.5*	5.445 ± 1.233*

All mice performed as sacrificed at 21 days after injection of B16F0 tumor cells. Tumor size and weight were measured. * $p < 0.05$ compared with Vehicle.

암세포주인 B16F0(melanoma)를 피하에 주사한 21일 후에 생쥐를 희생하고 암세포를 분리하여 크기와 무게를 측정하여 비교한 결과, 대조군에 비해 시료 1%, 5%를 투여한 실험군에서는 암세포의 크기와 무게가 통계학적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다.

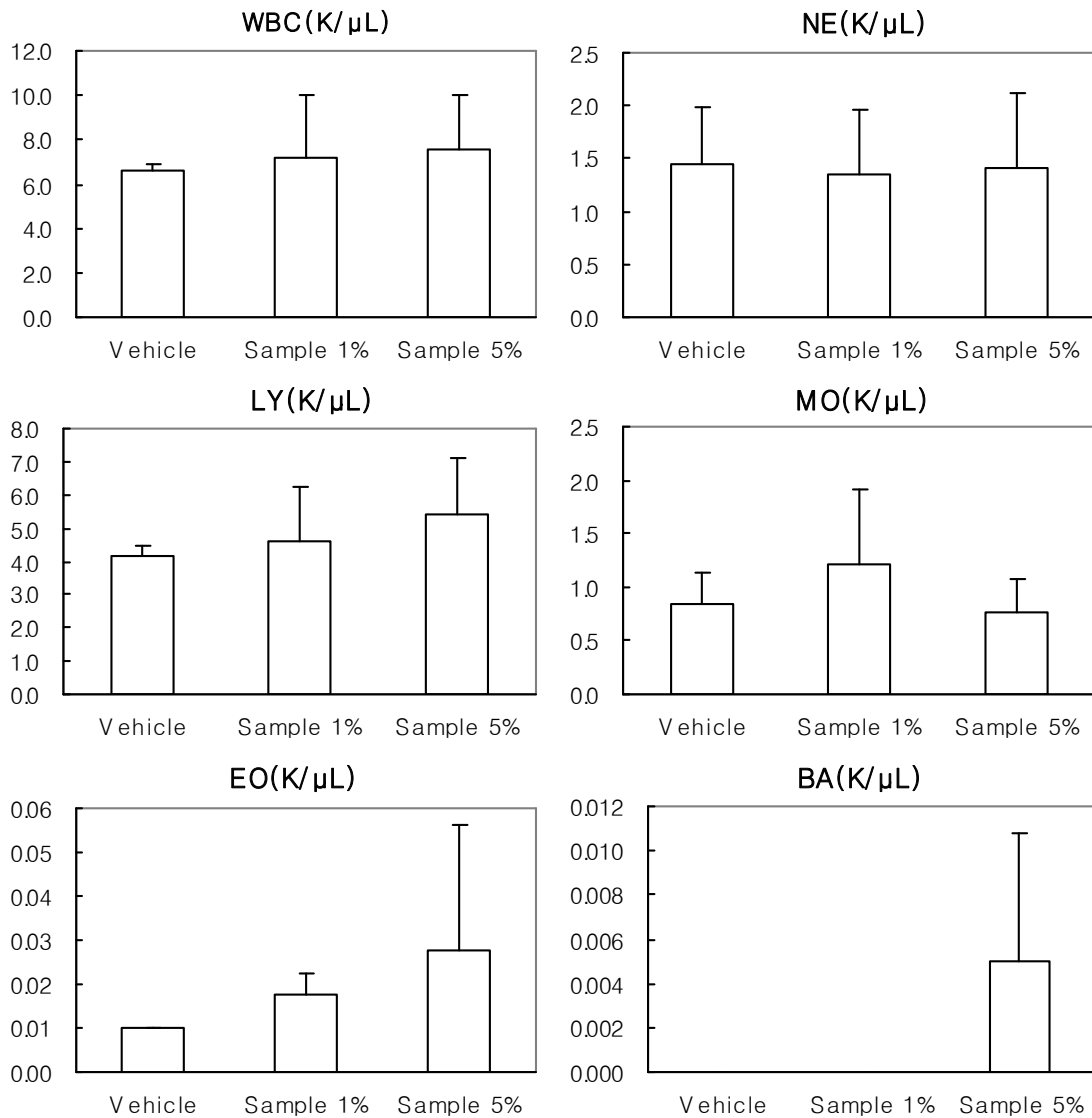


Fig. 11. Effect of sample administration on hematology change in tumor induced C57BL/6 mice. WBC: White blood cell, NE: Nutrophil, LY: Lymphocyte, MO: Monocyte, EO: Eosinophil, BA: Basophil

암세포주인 B16F0(melanoma)를 피하에 주사한 21일 후 혈액학적 분석을 한 결과, 대조군에 비하여 시료 1%, 5%를 투여한 실험군에서 유의한 차이가 나타나지 않았다.

Table 11. Effect of sample administration on hematology change in tumor induced mice

	Vehicle	Sample 1%	Sample 5%
WBC (K/ μ l)	6.60 \pm 0.31	7.16 \pm 2.83	7.60 \pm 2.40
NE (K/ μ l)	1.44 \pm 0.53	1.35 \pm 0.61	1.41 \pm 0.72
LY (K/ μ l)	4.15 \pm 0.34	4.58 \pm 1.63	5.44 \pm 1.69
MO (K/ μ l)	0.84 \pm 0.29	1.21 \pm 0.71	0.75 \pm 0.32
EO (K/ μ l)	0.01 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00	0.03 \pm 0.03
BA (K/ μ l)	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.01 \pm 0.01

WBC: White blood cell, NE: Nutrophil, LY: Lymphocyte, MO: Monocyte, EO: Eosinophil, BA: Basophil

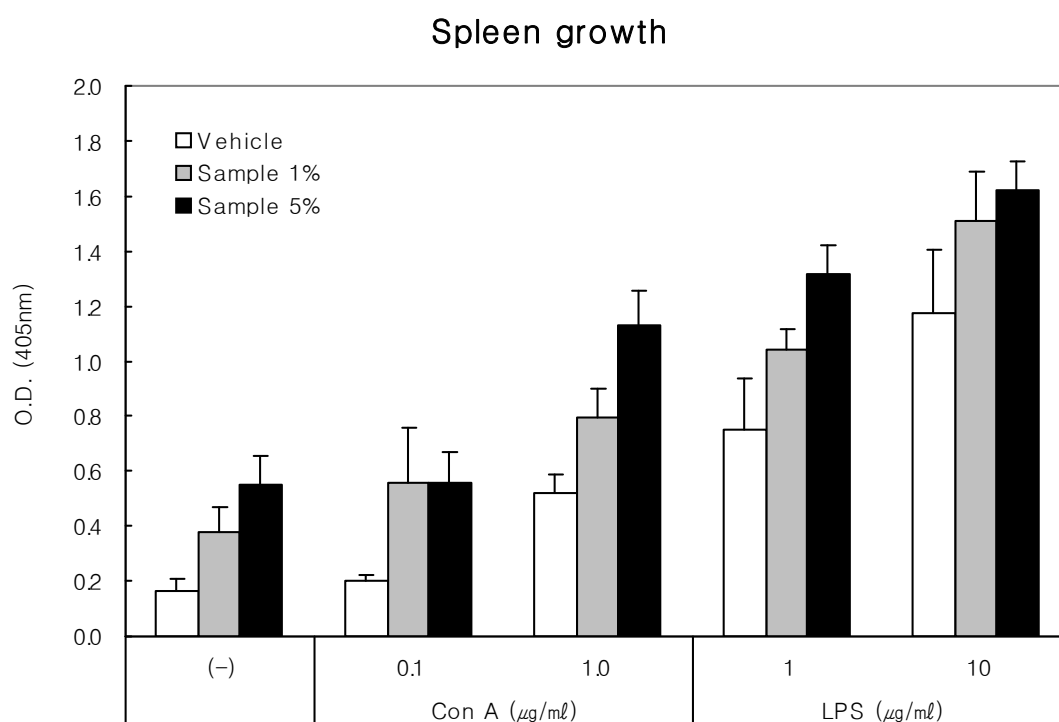


Fig. 12. The effect of LPS and Con A on the proliferation of tumor induced mice spleen cells. All mice performed as sacrificed at 21 days after injection of B16F0 tumor cells and isolated spleen cells. ** $p < 0.05$ or * $p < 0.05$ compared with Vehicle.

Table 12. The effect of LPS and Con A on the proliferation of tumor induced mice spleen cells

	(-)	Con A($\mu\text{g}/\text{ml}$)		LPS($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
		0.1	1.0	1	10
Vehicle	0.165 \pm 0.043	0.198 \pm 0.025	0.519 \pm 0.071	0.752 \pm 0.182	1.175 \pm 0.232
Sample 1%	0.380 \pm 0.085**	0.561 \pm 0.194**	0.792 \pm 0.107**	1.042 \pm 0.076*	1.512 \pm 0.175*
Sample 5%	0.553 \pm 0.105**	0.557 \pm 0.113**	1.128 \pm 0.131**	1.313 \pm 0.106**	1.624 \pm 0.099**

All mice performed as sacrificed at 21 days after injection of B16F0 tumor cells and isolated spleen cells. ** $p < 0.05$ or * $p < 0.05$ compared with Vehicle.

비장세포를 분리하여 T세포 증식 유도물질인 Con A와 B세포 증식 유도물질인 LPS로 자극하여 48시간 배양한 다음에 증식반응을 관찰한 결과, 대조군에 비해서 시료 1%, 5%를 투여한 실험군의 비장세포 증식이 통계학적으로 유의하게 증가하였다.

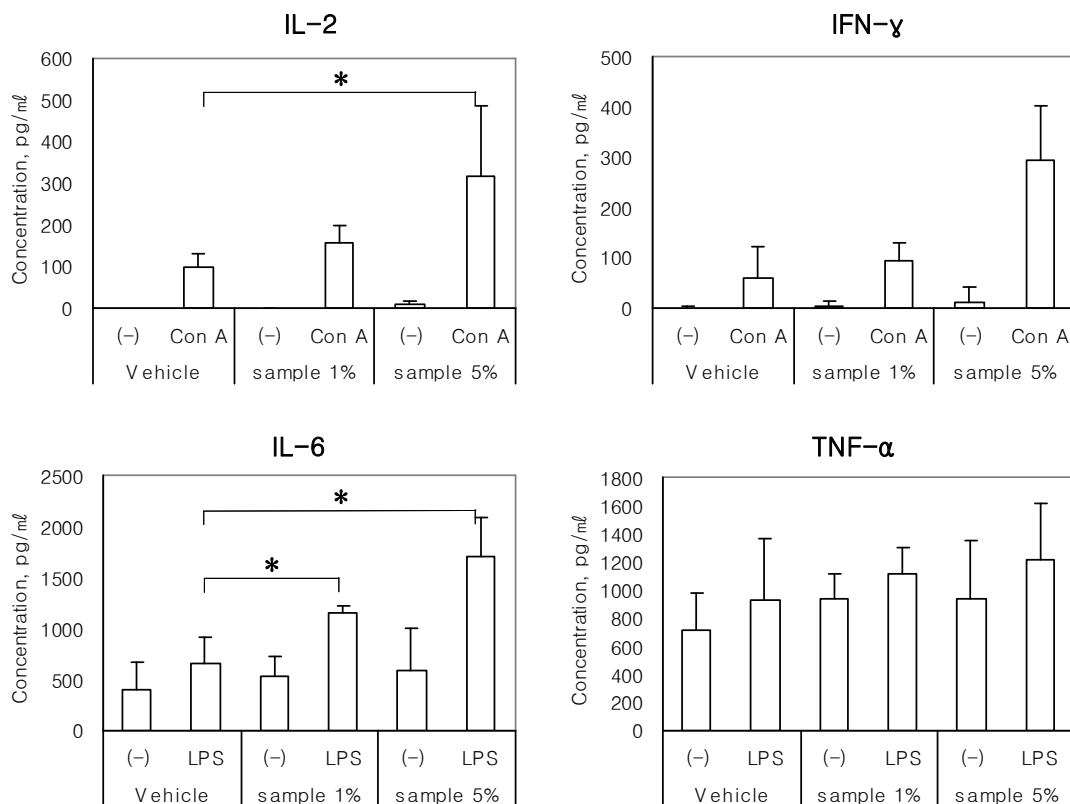


Table 13. The effect of LPS and Con A on the cytokine production of vehicle and sample administration tumor induced mice spleen cells. All mice performed as sacrificed at 21 days

after injection of B16F0 tumor cells and isolated spleen cells. The spleen cells(C57BL/6, 5×10^5 cells/well) of control and sample administration mice were activated with LPS or Con A for 24 hours. Culture supernatants were harvested, various cytokine levels were determined by ELISA. Data are representes as mean \pm SD for triplicates. * $p < 0.05$ compared with Vehicle.

비장세포를 분리하여 T세포 증식 유도물질인 Con A와 B세포 증식 유도물질인 LPS로 자극하여 24시간 배양한 다음에 배양 상층액을 수거하여 IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α 의 농도를 측정 한 결과, IL-2와 IL-6는 대조군에 비해서 시료 5%를 투여한 실험군이 통계학적으로 유의하게 증가하였고, IFN- γ 의 농도는 시료 5%를 투여한 처리군에서 통계학적 유의성은 없으나 증가하였다.

Table 13. The effect of LPS and Con A on the cytokine production of vehicle and sample administration tumor induced mice spleen cells

	IL-2(pg/ml)		IFN- γ (pg/ml)		IL-6(pg/ml)		TNF- α (pg/ml)	
	(-)	Con A	(-)	Con A	(-)	LPS	(-)	LPS
Vehicle	<10	99.0 ± 31.3	<10	57.8 ± 66.2	403.1 ± 275.2	657.6 ± 249.1	707.6 ± 262.6	921.5 ± 442.3
Sample 1%	<10	154.8 ± 42.4	<10	96.1 ± 34.7	536.0 ± 181.7	1153.9 $\pm 75.4^*$	941.5 ± 177.1	1114.6 ± 182.8
Sample 5%	<10	318.2 $\pm 169.4^*$	10.0 ± 32.4	293.1 ± 109.8	587.7 ± 418.4	1706.1 $\pm 378.8^*$	941.2 ± 407.8	1208.9 ± 405.3

All mice performed as sacrificed at 21 days after injection of B16F0 tumor cells and isolated spleen cells. The spleen cells(C57BL/6, 5×10^5 cells/well) of control and sample administration mice were activated with LPS or Con A for 24 hours. Culture supernatants were harvested, various cytokine levels were determined by ELISA. Data are representes as mean \pm SD for triplicates. * $p < 0.05$ compared with Vehicle.

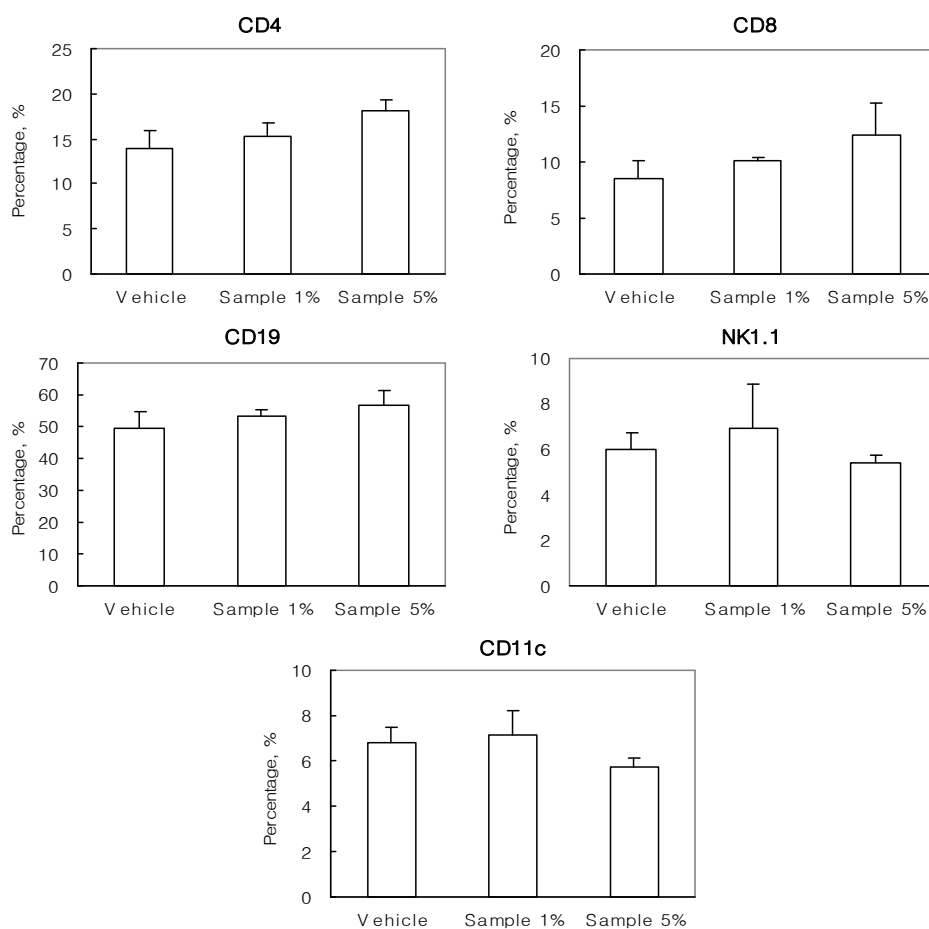


Fig. 14. Expression percentage of various surface markers on the spleen cells. All mice performed as sacrificed at 21 days after injection of B16F0 tumor cells and isolated spleen cells. Surface expression of CD4, CD8, CD19, and NK1.1 were analyzed by two colour flow cytometry. Numbers represent the percentage of double positive cells.

Table 14. Expression percentage of various surface markers on the spleen cells

	CD4	CD8	CD19	NK1.1	CD11c
Vehicle	14.00 ± 1.94	8.58 ± 1.51	49.55 ± 5.08	5.98 ± 0.73	6.78 ± 0.69
Sample 1%	15.28 ± 1.58	10.20 ± 0.24	53.18 ± 1.98	6.95 ± 1.94	7.15 ± 1.02
Sample 5%	18.10 ± 1.27	12.45 ± 2.77	56.55 ± 4.79	5.38 ± 0.38	5.75 ± 0.39

All mice performed as sacrificed at 21 days after injection of B16F0 tumor cells and isolated spleen cells. Surface expression of CD4, CD8, CD19, and NK1.1 were analyzed by two colour flow cytometry. Numbers represent the percentage of double positive cells.

비장세포를 분리하여 보조 T세포(helper T cell, CD4⁺), 세포독성 T세포(cytotoxic T cell, CD8⁺), B세포(B cell, CD19⁺), 자연살해세포(Natural killer cell, NK1.1⁺)의 수를 알아보기 위하여, 각 세포의 특이적인 단백질자에 대한 항체로 염색하여 측정된 결과, 대조군에 비해서 시료 1%, 5% 처리군에서 유의한 차이가 나타나지 않았다.

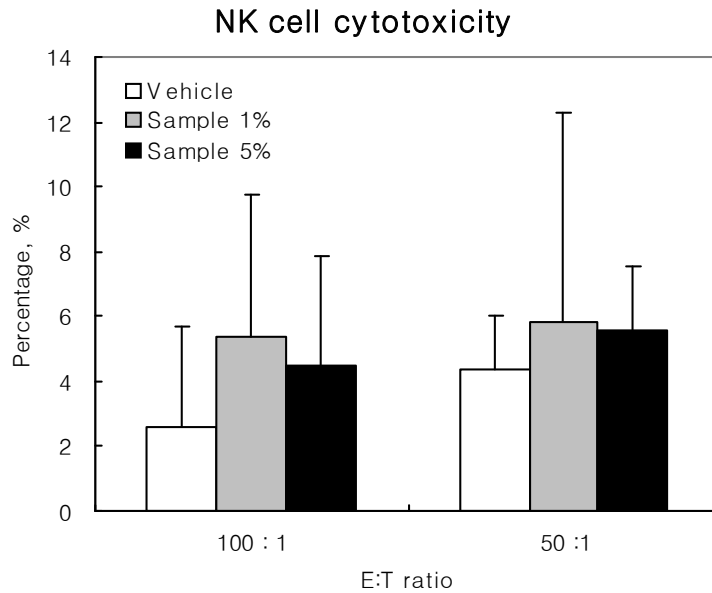


Fig. 15. Effect of sample on cancer cell killing activity of NK cells. The cancer cell killing activity of NK cell was determined by cytoTox96[®] non-radioactive cytotoxicity assay as described in materials and methods. E:T(effector cell : target cell) ratio

Table 15. Effect of sample on cancer cell killing activity of NK cells

E:T ratio	Cytotoxicity (%)			
	Vehicle	Sample 1%	Sample 5%	
NK cell : YAC-1 cell	50 : 1	2.62 ± 3.11	5.39 ± 4.36	4.48 ± 3.38
	100 : 1	4.38 ± 1.64	5.85 ± 6.43	5.60 ± 1.93

The cancer cell killing activity of NK cell was determined by cytoTox96[®] non-radioactive cytotoxicity assay as described in materials and methods. E:T(effector cell : target cell) ratio.

비장세포를 분리하여 비장세포에 포함되어 있는 자연살해세포(Natural killer cell, NK1.1⁺)의

암세포에 대한 세포독성 활성을 알아보기 위하여, 암세포주인 YAC-1 에 대한 세포독성을 측정 한 결과, 효과세포와 표적세포의 비율(E:T ratio)이 100:1 또는 50:1인 경우에 대조군에 비해서 sample 1%, 5%를 투여한 실험군에서 자연살해세포의 세포독성 활성은 증가하였으나 통계학적인 유의성은 나타나지 않았다.

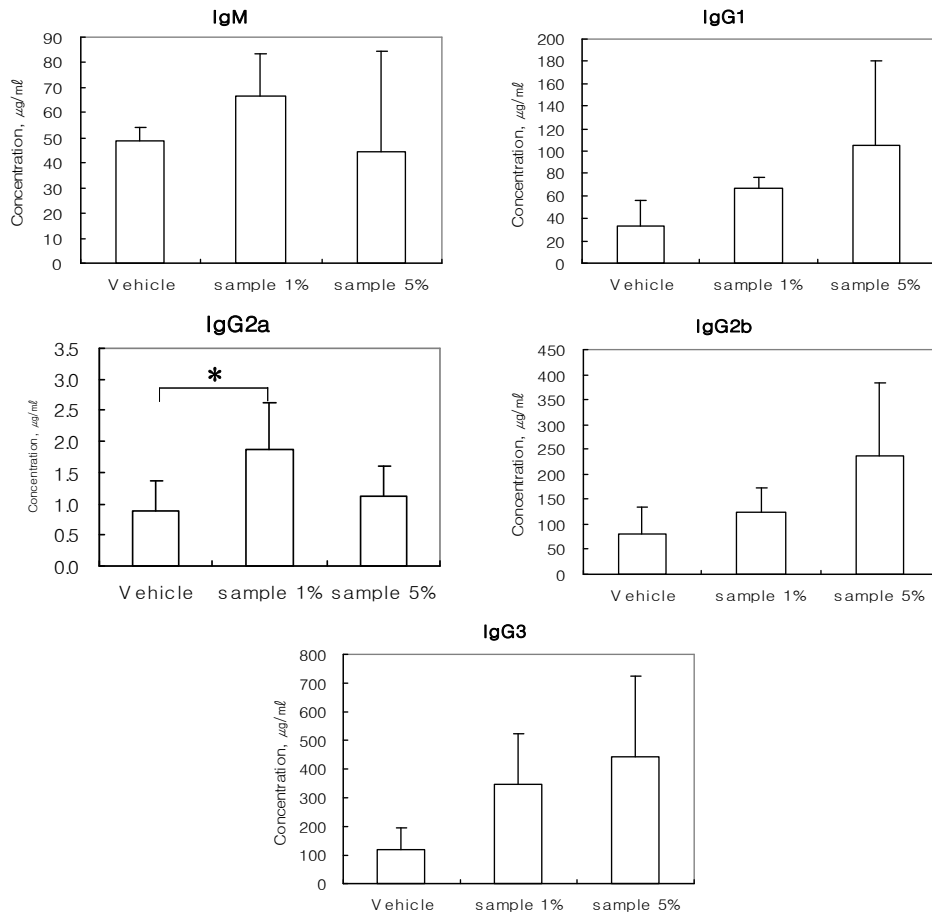


Fig. 16. The effect of sample on the various immunoglobulins of vehicle and sample administration tumor induced mice serum. C57BL/6 mice oral administrated vehicle or samples. After 4 weeks, serum sample were assayed of total immunoglobulins by ELISA. * $p < 0.05$ compared with Vehicle.

Table 16. The effect of sample on the various immunoglobulins of vehicle and sample administration tumor induced mice serum

	Concentration, $\mu\text{g}/\text{ml}$				
	IgM	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
Vehicle	48.6 \pm 5.7	32.8 \pm 23.0	0.89 \pm 0.46	82.1 \pm 52.5	119.9 \pm 76.4
Sample 1%	66.5 \pm 17.2	66.5 \pm 10.9	1.88 \pm 0.74*	124.7 \pm 48.0	348.5 \pm 177.2
Sample 5%	44.6 \pm 39.8	104.8 \pm 75.9	1.11 \pm 0.48	236.9 \pm 146.2	445.0 \pm 278.0

C57BL/6 mice oral administrated vehicle or samples. After 4 weeks, serum sample were assayed of total immunoglobulins by ELISA. * $p < 0.05$ compared with Vehicle.

B16F0 암 유도 21일 후 생쥐의 혈액을 채취하여 형장에 포함된 항체를 측정 한 결과, IgM과 IgG2a 대조군에 비하여 sample 1% 투여 시 항체가 증가하였으며, 특히 IgG2a는 통계학적으로 유의한 차이가 나타났다. 또한 IgG1, IgG2b와 IgG3는 시료 1%, 5% 투여 시 증가하였으나 통계학적인 유의성은 나타나지 않았다.

(3) 제 2협동과제 연구방법 및 결과

(가) 연구방법

한방 슬러지를 이용하여 재배한 팽이버섯의 고유한 맛을 보전시키기 위하여, 팽이버섯에 70%(10v/v) 에탄올을 2회 반복하여 80°C에서 3시간 환류냉각 추출한 다음 원심분리(8,000rpm, 20분)하고 총용량의 2배 농축 이 후 open Column을 사용하여 고정상으로 이온교환수지(Daion HP-20), 이동상으로 물과 주정만을 사용하여 팽이버섯으로부터 배당체를 분리하고 그 추출액을 농축하여 주원료로 사용하였다. 팽이버섯 배당체 농축액과 부재료인 탈지분유, 포도당, 비타민C를 사용하여 혼합한 다음 역회전과립기로 과립을 성형한 다음 수분이 5%이하 되도록 건조시킨 후(60°C, 5일간) 15~20mesh 크기로 사별한 후 포장하였다. 팽이버섯 배당체 농축액과 부재료의 배합성분 및 비율 결정은 혼합적성, 역회전과립기 사출 적성, 관능평가등을 통하여 최종 적적농도를 결정하였다. 팽이버섯에 70%(10v/v) 에탄올을 3회 반복하여 80°C에서 5시간 환류냉각 추출한 다음 원심분리(8,000rpm, 20분)하고 총용량의 2배 농축 이 후 open Column을 사용하여 고정상으로 이온교환수지(Daion HP-20)로 배당체 분리과정은 Fig 1.과 같다. 과립차 제조에 사용한 팽이버섯은 고유의 향취미를 유지 발현시키기 위하여 70% 에탄올을 10배 첨가하여 80°C에서 3회 추출하여 여과

(Whatman 41)한 다음 농축하여 엑기스를 제조하였다. 이때 엑기스 표준지표로 고형분, 수분, brix로 설정하였다.

(나) 연구결과

① 한방 슬러지를 이용한 팥이버섯으로부터 배당체 제조

한방 슬러지를 이용하여 재배된 팥이버섯으로부터 음료 주원료로 사용될 배당체를 분리하기 위해 70% 주정을 사용하여 수율을 측정한 결과 10 kg 추출시 50 L 볼륨으로 2회 추출하였을 때 1.2%, 3회 추출하였을 때 1.4%로 차이는 0.2% 정도의 차이를 보이는 바 생산경비와 산업 효율성을 생각할 때 2회 추출로 최종 결정하여 진행하였다. 또한 팥이버섯의 지용성 추출물에 대한 사용 방향으로 식품으로는 환과 같은 성분으로 사용이 가능하며, 화장품 원료로 계속 연구되어야 할 부분이다.

② 차음료에 따른 부용제 선별

국내 대표적인 차음료로는 옥수수수염차, 보리차, 17차 등이 있으며, 그 중 옥수수수염차의 부용제로 식물혼합추출액, 옥수수수염추출액, 현미농축액, 비타민C, 현미향 등이 사용되었고, 17차는 주원료로 현미, 영지, 뽕잎, 구기자, 차가, 상황, 치커리, 울무, 대맥, 둥글레, 옥수수, 결명자, 꿀피, 홍화씨, 산수유, 메밀, 녹차의 혼합 추출액(고형분0.2%)99.9% 와 부용제로 L-카르니틴, 차카테킨, 비타민C, 식물혼합추출액, 탄산수소나트륨 총 0.1%를 사용하여 제조 되었다. 상기 내용으로 볼 때 기존 차음료는 부용제의 비율을 0.1-0.2%만 사용하고 나머지는 주원료 성분이 99.9%를 차지하고 있으나, 고형분이 0.2%라고 하는 것은 영양성분이 거의 포함되어 있지 않는 물과 같은 형태로 제조 되었음을 확인할 수 있다. 본 연구에서는 팥이버섯의 열수 추출물(고형분 12.4%)로 1%, 5%, 10%를 사용하고, 부용제로는 L-카르니틴, 탄산수소나트륨, 비타민 B1, 비타민B2, 비타민C, 버섯향을 사용하여 시제품을 제작하였으나, 버섯의 특유의 비린향과 먹었을 때 느끼하고 부드럽지 못하여 차음료의 유형으로 제조하기에는 적합하지 않다고 생각 된다.

③ 비타민음료에 따른 부용제 선별

국내 비타민음료로는 비타500과 비타민워터 등이 있으며, 그 중 판매 1위인 제품 비타500은 농축사과과즙, 비타민C, 액상과당, 비타민B2, 히알루로산 등이 사용되었으며, 프리미엄 비타500은 토코페롤 성분 추가로 사용된 제품이다.

하지만 최근 비타민음료의 주성분으로 사용되고 있는 비타민C 함유량의 허위 표시사항으로 많은 비타민 제품의 소비자 신뢰도가 낮아졌으며, 이에 본 연구팀은 면역활성 효과를 도울 수 있는 버섯 비타민음료를 제조하고자 한다. 또한 팽이버섯의 추출물의 느끼한 맛과 비린향을 소비자가 느끼지 못하게 다양한 부용제 선별 작업을 진행하여 다음과 같은 부용제를 사용하고자 한다.

주원료로는 팽이버섯 배당체 추출물 1-5%로 사용하였으며, 부용제로는 액상과당, 사과농축액, 비타민C, 비타민B1, 비타민B2, 비타민D3, 비타민A, 무수구연산, 타우린, DL-사과산, 니코틴산 아마이드, 판토텐산칼슘, 천연오렌지향과 버섯향 총 5-9%를 선택 제작하여 사용하였다.

④ 차음료로 선별된 부용제 레시피

본 연구에서 차음료 시제품으로 선별된 부용제 레시피는 Table 1과 같다. 주원료인 팽이버섯의 함량은 5.0%로 타사 차음료와 차별화된 함량이며, 현재 버섯배당체를 주원료로 사용하고 있는 제품은 전무한 실정이다. 또한 기존 과립차 주요성분 14.8% 와 차음료의 부용제 0.1% 이하로 사용하여 기능성 성분 중점적으로 제작하였다. 하지만 차음료의 관능적 평가 결과는 20-30대 연령층에서는 선호도가 좋지 못했으며, 그 중 버섯의 향에 대한 좋지 못한 생각을 가지고 있었다. 그리고 단맛이 조금 있었으면 좋겠다는 의견이 많았으며, 기존 판매 차음료 판매 가격에 비해 본 연구 개발 시제품의 제조 단가가 30%정도 높아 상품으로 산업화하기가 어려운 실정이다.

Table 1. 팽이버섯 배당체와 선별된 부용제를 이용한 차음료 레시피

배합성분	시제품		비고
	함량(%)	용량 500 mL 기준	
팽이버섯 배당체	5.0	28g	비중 1.12
폴리텍스트로스	1.5	8.4g	비중 1.12
포도당	7.8	43.7g	비중 1.12
비타민C	0.5	2.8g	비중 1.12
L-카르니틴	0.05	0.28g	비중 1.12
탄산수소나트륨	0.01	0.056g	비중 1.12
구연산나트륨	0.03	0.168g	비중 1.12
버섯향	0.003	0.0168g	비중 1.12
정제수	85.107	425.535g	비중 1.00
합계	100	508.9558g	

⑤ 비타민음료로 선별된 부용제 리시피

차음료는 산업화 어려워 본 연구 개발 음료로는 비타민음료로 선정하였으며, 이에 면역활성 테스트에 따른 시제품 선별을 하고자 총 3종의 비타민음료 시제품을 제작하였다. 시제품A는 대조군으로 팥이버섯 배당체를 첨가 하지 않고 선별된 부용제를 사용하여 비타민 음료를 만들었으며, 시제품B는 팥이버섯 배당체 5%를 첨가하여 만들었으며, 마지막 시제품C는 산업화 용도로 가장 적합한 농도 팥이버섯 배당체 1%를 사용하여 시제품을 제작하였다.

Table 2. 팥이버섯 배당체 첨가하지 않고 선별된 부용제를 이용한 비타민음료 레시피

원료명	시제품A		비고
	함량(%)	배합기준 총 2500g	
1 액상과당	15	420	비중 1.12
2 사과농축액(경북능금)	0.7	19.6	비중 1.12
3 비타민C	0.75	20.44	비중 1.12
4 비타민B2(리보플라빈)	0.0012	0.0336	비중 1.12
5 드링크향(C110964)	0.15	4.2	비중 1.12
6 무수구연산	0.13	3.64	비중 1.12
7 타우린	0.5	14.0	비중 1.12
8 DL-사과산	0.05	1.4	비중 1.12
9 니코틴산아미드	0.0013	0.0364	비중 1.12
10 판토텐산칼슘	0.005	0.14	비중 1.12
11 비타민B1염산염	0.0013	0.0364	비중 1.12
12 비타민D3(함량0.25%) 야쿠르트사용원료	0.0020	0.056	비중 1.12
13 비타민A(DSM)함량100%	0.0010	0.028	비중 1.12
14 천연오렌지향(Y050248)	0.0080	0.224	비중 1.12
15 정제수	91	2,275	비중 1.00
합계	100	2,758.8344	

Table 3. 팡이버섯 배당체 5% 첨가된 선별된 부용제를 이용한 비타민음료 레시피

원료명	시제품A		비고
	함량(%)	배합기준 총 2500g	
1 팡이버섯 배당체	5	140	비중 1.12
2 액상과당	2.5	70.0	비중 1.12
3 비타민C	0.75	21.0	비중 1.12
4 비타민B2(리보플라빈)	0.0012	0.0336	비중 1.12
5 드링크향(S080381)	0.15	4.2	비중 1.12
6 무수구연산	0.13	3.64	비중 1.12
7 타우린	0.5	14.0	비중 1.12
8 DL-사과산	0.05	1.4	비중 1.12
9 니코틴산아미드	0.0013	0.0364	비중 1.12
10 판토텐산칼슘	0.005	0.14	비중 1.12
11 비타민B1염산염	0.0013	0.0364	비중 1.12
12 비타민D3(함량0.25%) 야쿠르트사용원료	0.0020	0.056	비중 1.12
13 비타민A(DSM)함량100%	0.0010	0.028	비중 1.12
14 천연오렌지향(Y050248)	0.0080	0.224	비중 1.12
15 정제수	90.9	2,272.5	비중 1.00
합계	100	2,527.2944	

Table 4. 팽이버섯 배당체 1% 첨가된 선별된 부용제를 이용한 비타민음료 레시피

원료명	시제품A		비고
	함량(%)	배합기준 총 2500g	
1 팽이버섯 배당체	1	28	비중 1.12
2 액상과당	5	140	비중 1.12
3 사과농축액(경북농금)	1.4	39.2	비중 1.12
4 비타민C	0.75	21	비중 1.12
5 비타민B2(리보플라빈)	0.0012	0.0336	비중 1.12
6 드링크향(S080381)	0.15	4.2	비중 1.12
7 무수구연산	0.13	3.64	비중 1.12
8 타우린	0.5	14.0	비중 1.12
9 DL-사과산	0.05	1.4	비중 1.12
10 니코틴산아미드	0.0013	0.0364	비중 1.12
11 판토텐산칼슘	0.005	0.14	비중 1.12
12 비타민B1염산염	0.0013	0.364	비중 1.12
13 비타민D3(함량0.25%) 야쿠르트사용원료	0.0020	0.056	비중 1.12
14 비타민A(DSM)함량100%	0.0010	0.028	비중 1.12
15 천연오렌지향(Y050248)	0.0080	0.224	비중 1.12
16 정제수	91.0002	2,275.005	비중 1.00
합계	100	2,527.327	

⑥ 팽이버섯의 배당체를 이용한 면역증강 비타민 음료 시제품 제조 공정도

한방 폐 슬러지를 이용하여 재배된 팽이버섯으로부터 배당체를 분리하고 그 분리된 주원료를 이용하여 Fig. 1과 같은 제작 공정도를 통해 시제품을 제조하고자 한다. 팽이버섯으로부터 배당체를 분리하고 여과한 후 농축하여 분말화된 재형을 원재료로 한다. 그리고 원재료에 대한

입고 및 검수 후 부용제와 혼합 배합하고 정제수 65℃에서 30분간 주원료와 부용제를 녹인다. 이때 비타민 첨가제는 30초 전에 혼합하여야 한다. 그리고 배합액을 측량해서 관능적 배합 검사를 실시하고 95℃에서 30초간 고온순간살균을 실시한 후 1마이크로 여과 필터 한다. 살균과 여과된 음료 원액을 주입관을 통해 세척 후 검사된 개별 용기에 주입하고 밀봉캡을 닫아 시제품을 제작한다.

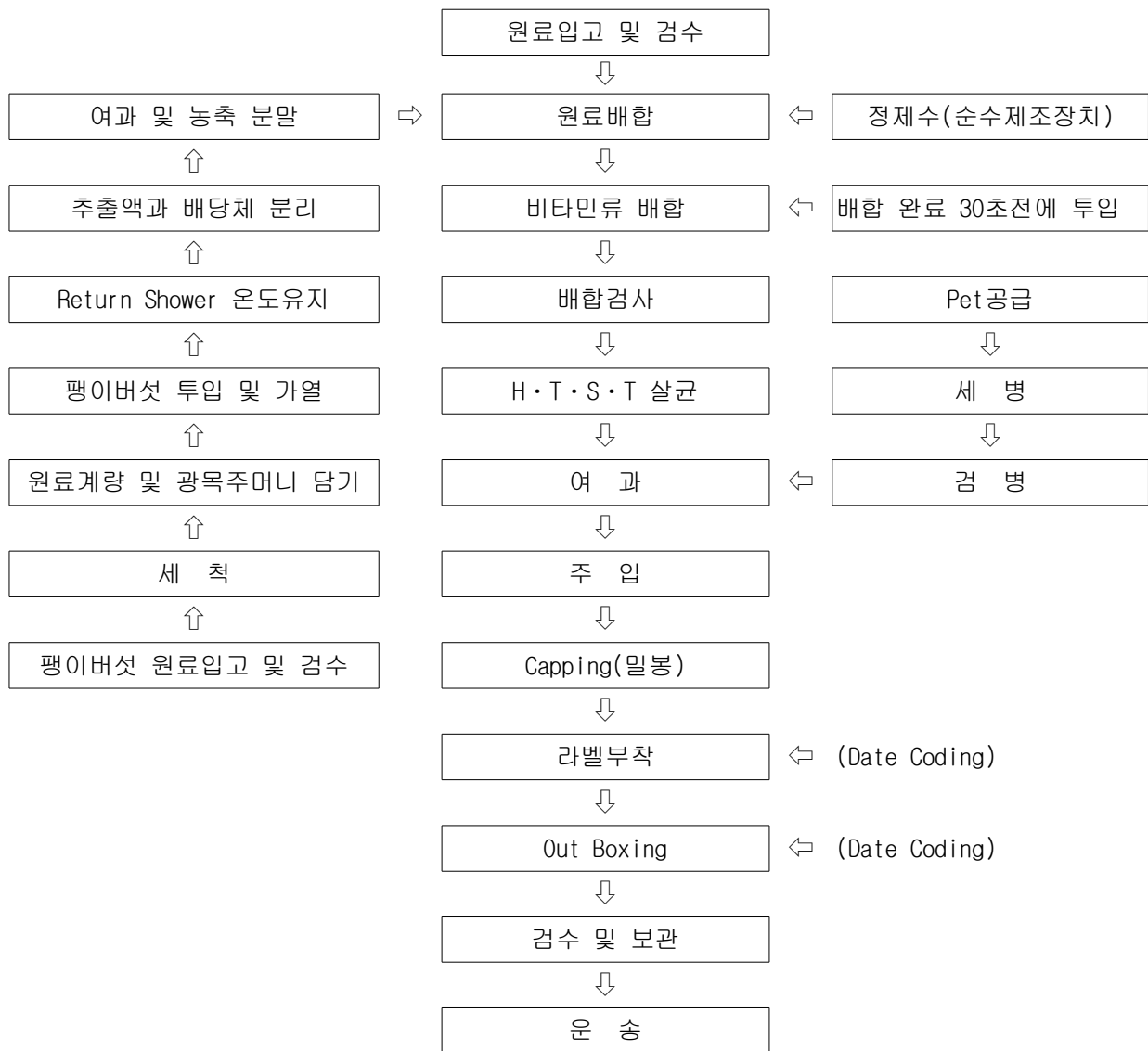


Fig 1. 팽이버섯으로부터 분리된 배당체를 주원료로 한 비타민음료 시제품 제작 공정도.

⑦ 비타민 음료 시제품 주원료 팥이버섯으로부터 분리된 배당체의 품질 안정성

팥이버섯으로부터 분리된 배당체 주원료는 유기용매를 사용하지 않고 정제수와 주정만을 이 동상으로 사용하고 고정상은 Daion HP-20 천연 이온교환수지를 사용하여 제조하였다. 이렇게 제조된 배당체는 색상, 외관, 맛, 냄새, 조직감, 이물 성상 검사를 거쳐 1차 품질 안정 검사를 실시한 결과 색상은 불투명 백색이며 버섯의 특유의 맛과 향을 가지고 있다.

그리고 2차 안정성 검사는 식품공전 규격에 따라 보존료 파라옥시안식향산계 6종과 타르 색소 검출이 되는지 확인 검사를 실시하였다. 마지막 3차 안정성 검사는 시험관에 lactose broth(LB배지) 안에 튜람관을 넣고 인큐베이터 35℃에서 3시간 동안 가스 생성 유무로 대장균의 추정시험을 실시한 결과, 팥이버섯으로부터 분리된 배당체 주원료에서는 가스가 발생하지 않았다.

Table 5. 비타민 음료의 주원료인 팥이버섯으로부터 분리된 배당체의 품질 안정성 검사

원산지	공급업체	관리항목	위해요소구분	세부항목	법적규격항목		자가규격	자가관리규격 내용
					개별규격	공통규격		
한국 에스앤제이바이오(주)		성상	P	색상	-	-	색상	버섯의 배당체는 불투명 백색이며 버섯의 자체의 향미가 있음
			P	외관	-	-	외관	
			P	맛	-	-	맛	
			P	냄새	-	-	냄새	
			P	조직감	-	-	조직감	
		P	이물	-	-	이물	없음	
	보존료	C	파라옥시안식향산계6종(식품공전규격)	불검출	-	파라옥시안식향산6종(식품공전규격)	불검출	
	타르색소	C	식품공전	불검출	-	식품공전	불검출	
	대장균	C	추정검사	불검출	-	LB배지	불검출	
			확정검사	불검출	-	BGLB배지		
완전검사			-	-	사면한천배지	-		

⑧ 1차 3종의 시제품에 대한 관능 및 기호도 평가

비타민음료 3종 시제품에 대한 연령별에 따른 관능적 평가 기호도를 순천대학교와 동아대학교 학생 및 임직원 대상으로 조사한 결과는 표 .와 같은 결과로 핑이버섯 배당체 함유량이 5%가 가장 선호도가 높았으며, 20대 중후반 여성이 선호도가 높게 나타났고, 남성은 30대 후반에서 기호도가 높게 나타났다. 또한 용량 선호도에서는 200 mL이 가장 좋았으며, 120 mL과 340 mL이 다음으로 선호도가 높게 나타났다.

Table 6. 연령별 다른 비타민음료 3종 시제품에 대한 관능 및 기호도 평가 결과

구분		23여	31남	26남	29남	30여	24남	28여	39남	평균	
순천 대	A	맛	3	3	3	4	4	3	3	4	3.4
		색상	1	5	1	4	4	4	3	4	3.3
	B	맛	4	4	3	4	4	5	4	5	4.1
		색상	5	5	2	4	4	4	4	4	4.0
	C	맛	3	4	3	3	3	4	3	4	3.4
		색상	3	5	4	3	2	3	3	3	3.3
동아 대	A	맛	5	3	3	3	4	4	3	4	3.6
		색상	3	5	3	3	4	3	4	5	3.8
	B	맛	5	4	3	4	3	5	4	5	4.1
		색상	5	5	3	3	4	4	4	5	4.1
	C	맛	3	5	4	4	3	3	3	3	3.5
		색상	3	5	4	4	2	4	2	4	3.5

⑨ 3종 시제품의 면역활성 검증 결과에 따른 최종 비타민음료 시제품 제작
 제품명은 팽이버섯의 배당체를 첨가 고 기능성 비타민음료를 강조하기 위해 버섯의 MU와
 면역IMMU를 소비자가 이해하기 쉽고 부르기 편한한 류류비타 시제품 제품명으로 정하였다.

식품(식품첨가물)품목제조보고서			
보 고 인	① 성 명		② 생 년 월 일
	③ 주 소	경북 칠곡군 기산면 봉산리 673-1	
	④ 명칭 (상호)	경북과학대학 식품공장	
	⑤ 소 재 지	경북 칠곡군 기산면 봉산리 673-1	
⑥ 식 품 의 유 형		음료베이스	⑦ 영 업 허 가 (신 고) 번 호
⑧ 제 품 명		류류비타 5프로	⑨ 유 통 기 한
⑩ 원 재 료 명 또는 성분명 및 배합비율		별 첨	
⑪ 용 도 용 법		별 첨	
⑫ 보 관 방 법 및 포 장 재 질		별 첨	
⑬ 포 장 방 법 및 포 장 단 위		별 첨	
⑭ 성 상		별 첨	
⑮ 기 타		O E M 생산(유통전문판매원:에스엔제이바이오(주) /전라남도 순천시 덕월동 순천제일대학 창업보육센터 511호)	
<p>식품위생법 제37조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품 (식 품 첨 가 물) 품 목 제 조 사 항 을 보고합니다.</p> <p style="text-align: right;">2012 년 04 월 일</p> <p style="text-align: right;">보고인 최 대 해 (서명 또는 인)</p> <p style="text-align: center; font-weight: bold; font-size: 1.2em;">칠 곡 군 청 귀 하</p>			
<p>※ 구비서류</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 제조방법설명서 1부 2. 식품위생검사가 기간이 발급한 식품 등의 한시적 기준 및 규격 검토서 1부 (화학적 합성품이 아닌 식품첨가물과 식품 및 식품첨가물에 사용되는 기구 또는 용기·포장에 한합니다.) 3. 식품의약품안전청장이 정하여 고시한 방법에 따라 설정한 유통기한의 설정사유서 1부 			
<p>※ 유의사항</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 품목제조보고서는 제품생산의 개시 전이나 개시 후 7일 이내에 제출하여야 합니다. 2. 배합비율 표시는 식품공전 및 식품첨가물공전에 사용기준이 정하여져 있는 원재료 또는 성분에 한한다. 			

제 조 방 법 설 명 서

1. 제 품 명 : 류류비타 5프로

2. 제품유형 : 음료베이스

3. 원재료명 또는 성분명 및 배합비율 (%)

팽이버섯 배당체 5%, 액상과당, 비타민C 0.75%, 비타민B2 0.0012%, 버섯향, 무수구연산, 타우린, DL-사과산, 니코틴산아미드, 판토텐산칼슘, 비타민B1 0.0013%, 비타민D3(함량0.25%) 0.002%, 비타민A(DSM)함량100% 0.001%, 천연오렌지향, 정제수

4. 제조방법

- 1) 원료 검수 : 모든 사용원료는 식품 및 식품첨가물공전 규격에 적합한 원료만을 검수해서 사용한다.
- 2) 정 수 : 지하수를 순수 제조장치로 정수 처리하여 정제수로 사용한다.
- 3) 배 합 : 주원료와 부원료를 정제수와 같이 배합비율에 따라 첨가한다.
- 4) 교 반 : 배합된 액을 50℃에서 30분간 교반하여 용해시킨다.
- 5) 살균·여과 : 완전히 용해시킨 배합액을 열교환기로 93℃에서 10초간 순간살균 시킨 후 1 마이크로 여과기를 통과시켜 깨끗이 여과한다.
- 6) 충 진 : 살균·여과된 액을 자동 충전기로 일정량씩 병에 충전한다.
- 7) 밀 봉 : 캡으로 자동 밀봉 한다.
- 8) 냉 각 : 냉각수를 이용하여 50℃이하로 냉각한다.
- 9) 포장 및 제품검사 : 유통기한을 날인하고 일정수량씩 상자에 넣어 포장한 후 제품은 항목별 검사하여 제품규격의 사양과 같이 적합한 제품에 한하여 완제품으로 출하한다.

5. 성상 : 음료베이스로서 고유의 색상과 향미를 가지며, 이미·이취가 없어야 함.

6. 용도용법 : 음용수로 1:1~1:5 의 비율로 희석하여 취향에 맞도록 음용

7. 보관방법 및 포장재질 : 직사광선을 피하여 실온에서 보관 유통한다.

포장재질:용기(PET,BOTTLE),캡내면(PE),캡외면(PP)

8. 포장방법 및 포장단위 : 밀봉포장, 100 ml,120 ml, 340 ml, 500 ml 선택 사용

9. 유통기한 : 제조일로 부터 24개월까지

유통기한 설정 사유서

제 품 명	유유비타 5프로
식 품 의 유 형	음료베이스
보존 및 유통 방법	실온(<input checked="" type="checkbox"/>) / 상온(<input type="checkbox"/>) / 냉장(<input type="checkbox"/>) / 냉동(<input type="checkbox"/>) / 기타(<input type="checkbox"/>)
유통 기 한	24개월
실험수행기관종류	자사(<input type="checkbox"/>) / 의뢰(<input type="checkbox"/>) / 생략(<input checked="" type="checkbox"/>)
실험수행기관명	

유통기한 설정 근거

1.제품의 특성

- 제조공정에 따른 보존성의 검토

- ① 본 제품의 제조공정은 각 공정마다 미생물 등의 오염이 없도록 철저히 관리되고 있어 제품의 부패·변질에 영향을 주는 미생물이 최종제품에 존재하지 않는 상태임.
- ② 또한, 제품에 함유된 영양소성분들의 각 제조공정에 따른 물리적 또는 화학적 변화가 최소화 되어 당해규격에 적합하도록 중간 품질관리를 실시하고 있어 최종제품의 품질보존에도 문제가 없음.

2. 제조공정 및 포장형태의 검토

- ① 원료구입 -->검사 -->혼합 -->여과 --> 살균 --> 충전 -->포장(검사)
- ② 본 제품의 포장형태는 PET 밀봉 포장으로 포장완료 상태에서의 외부로부터의 공기유입이나 수분 흡수가 방지되고 미생물 등의 오염이 없고 완제품 저장 시에도 안정한 상태를 유지할 수 있음.

3.유사제품비교

구 분	신규제품	기존 유통제품	
제품명	유유비타 5프로	비타500	
제조사	경북과학대학식품공장		
식품유형	음료베이스	음료베이스	음료베이스
성 상	액상제품	액상제품	액상제품
포장재질및포장방법	PET, 밀봉	PET, 밀봉	PET, 밀봉
보존 유통온도	실온	실온	실온
보존료 사용여부	미사용	미사용	미사용
유당유처리	-	-	-
살균또는 멸균방법	살균	살균	살균
유통기한	24개월	24개월	24개월

4. 종합판단

본 제품에 대한 유통기간을 24개월로 예측하고 이를 설정하였을 경우 위1에서 4까지의 내용으로 볼 때 제품의 원료조건 및 제조공정과 보관방법으로 인하여 제품의 보존성은 확보될 수 있으며 유통기한이 긴 유사제품과 비교해도 품질관리에 문제점이 없으며 더불어 유통과정중의 품질변화나 규격 부적합사유가 발생되지 않을 것으로 판단되어 동 제품의 유통기간을 24개월로 설정하는데 따른 제품의 안전성과 품질에 별다른 문제점이 없을 것으로 판단되어 **유통기한을 24개월**로 설정합니다.

상기와 같이 유통기한 설정 사유서를 제출합니다.

2012년 04월 일

제출인 : 경북과학대학 식품공장

최 대 해 (인)

⑩ 최종 비타민음료의 시제품에 대한 관능적 평가 결과

1차 시제품 테스트 시에 팽이버섯 추출물 10-20%까지 테스트를 하였으나, 자체 평가 결과 음료로서 사업성이 없어, 팽이버섯 배당체를 주원료로 전환하였다. 최종 면역활성 비타민음료에 대한 소비자의 기호도를 알기 위해 타사 유사 제품과 비교한 결과 비타민음료의 끝맛이 강한 타우린 성분이 약하고 비린 맛이 거의 없어 먹기 편하다는 평의 많았다. 그리고 비타민 시제품 중 팽이버섯 배당체 함유량 1-5% 전체 적인 맛이 좋다는 결과로 보아 일반적인 바로마시는 음료 형태는 1-3%이하로 하였을 때 가장 선호도가 높게 나타났다.



Fig. 2. 팽이버섯 배당체를 사용한 최종 비타민 음료 시제품 사진
왼쪽 : Control(팽이버섯 배당체 무첨가), 가운데 : Sample A(팽이버섯 배당체 5%),
오른쪽 : Sample B(팽이버섯 배당체 1%)

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연도별 연구개발목표 달성도

(가) 연구성과 목표

특허출원 3차년도에 2건을 모두 달성하였으며, 한방 슬러지를 함유하는 버섯재배용 배지 및 이를 이용한 항종양활성 및 면역증강 활성이 강화된 기능성 버섯(10-2011-0015264)와 기능성 한방 팽이버섯 음료 및 이의 제조 방법(10-2012-0036324) 및 기능성 한방 팽이버섯 과립차 및 이의 제조 방법(10-2012-0036305), 출원인은 순천대학교 산학협력단 제1협동과제에서 3건을 출원하였다. 그리고 논문투고는 경남과학기술대학교 제1세부 총괄책임자가 “*Bacillus* sp. HJ 57에 의한 버섯 병원균주의 생육억제”와 “한방재료를 이용한 느타리버섯의 배지개발”에 관련하여 2편을 투고하였으며, 제1협동 협동책임자가 “한방 슬러지로 배양한 팽이버섯(*Flammulina velutipes*) 추출물의 면역세포 활성화 효과” 2편 학술발표는 목표에서는 없었으나, 3편을 발표하였다.

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	목표									
	달성									학회발표 1건
2차년도	목표							2		
	달성	1						0		
3차년도	목표	2						2		학회발표 2건
	달성	2						3		
4차년도	목표									
	달성									
5차년도	목표									
	달성									
계	목표	2						4		학회발표 4건
	달성	2						4		학회발표 1건

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 실용화 · 산업화 계획

본 연구결과의 산업화를 추진하기 위해서는 2013년 8월에 상품으로 출시가 가능할 것으로 보이며, 앞으로 준비해야할 많은 단계가 있다. 먼저 용기선별에 따른 디자인 작업을 진행되어야 하며, 라벨 표시사항을 작성하기 위해 최종 시제품에 대한 9대 영양성분분석 및 기능성 함량 분석이 진행되어야 할 것이다. 그리고 저장성 실험 및 수출사업을 위해 비타민 표시사항 분석과 FDA 승인 작업이 진행되어야 한다. 또한 국내외 시장으로 유통시키기 위해서는 신제품 제안서를 작성하고 사전에 본사 미팅을 통해 시장 진입 가능성을 확인하여야 한다.

산업화 계획서			
제품명	뮤뮤비타5%	담당자	박경옥
시험종류	일반허가		
STEP	업무구분	업무내용	완료일
STEP-1	용기선별및라벨 디자인	비타민음료로적합한용기선별및라벨과포장디자인진행	12-10-31
STEP-2	성분분석	최종시제품에대한9대영양성분분석과저장성실험	12-12-31
STEP-3	허가자료작성	품목제조신고,식약청표기사항심의	13-03-31
STEP-4	유통납품허가	신제품제안서작성및대형유통업체납품허가	13-06-31
STEP-5	최종허가서류취득	FDA인증및수출관련비타민성분분석	13-08-30

제품진행단계계획서																	
업무내용	2012						2013										
	07	08	09	10	11	12	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	
STEP-1	→																
STEP-2	→																
STEP-3							→										
STEP-4							→										
STEP-5									→								

2. 교육 · 지도 · 홍보 등 기술확산 계획 등

연구성과 활용 목표는 기술실시(이전) 2건, 상품화 2건, 교육지도 1건, 언론홍보 2건으로 정하였으나, 기술이전은 아직 진행하지 않고 있으며, 상품화 단계는 시제품 제작 2건을 제작하였으

며, 2012년 3차년도에 청도 그린피스 연구원에게 교육지도를 실시하였으며, 장흥군 버섯연구소에서 교육지도를 실시하였다. 또한 2009년 1차년도에 진주에서 개최한 버섯 재배 세미나에서 2건의 신문기사가 보도되었다.

Table 1. 연구개발 사업에 대한 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	2	2		1	2	

[별첨 1]

연구개발보고서초록

과 제 명	(국문) 한방 슬러지를 이용한 고품질 팡이버섯의 생산 및 가공식품 개발				
	(영문) Development of processed foods using functional <i>Flammulina velutipes</i> cultivated with oriental herbal plants				
주관연구기관	경남과학기술대학교		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 산학협력단	
참 여 기 업	농업회사법인 에스엔제이바이오(주)			(성명) 이 상 원	
총연구개발비 (412,500천원)	계	412,500	총 연구 기간	2009. 4. 10~ 2012. 4. 9	
	정부출연 연구개발비	330,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인원	12
	기업부담금	82,500		내부인원	4
	연구기관부담금	-		외부인원	8
<p>○ 연구개발 목표 및 내용</p> <ul style="list-style-type: none"> - 한약재료를 이용한 한방 팡이버섯 배지 개발 및 한방 팡이버섯 생산 - 한방 팡이버섯 및 버섯 가공제품에 대한 면역증강 기능성 검증 - 한방 팡이버섯을 이용한 기능성 차와 음료 식품개발 및 상품화 <p>○ 연구결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 한방 슬러지를 이용하여 미강 대신 10% 첨가하여 버섯 배지로 사용 가능하며, 팡이버섯뿐만 아니라 봉지 재배된 버섯에서도 재배가 가능하였다. 또한 버섯 대량 생산 농가 보다는 일반 버섯 재배 농가에 경제성이 있는 것으로 나타났다. - 팡이버섯 배당체를 첨가한 시제품에서 면역활성 및 항암 효과가 있는 것으로 나타났으며, 최종 시제품 과립차의 경우 11.98%가 가장 좋은 것으로 나타났다. 그리고 팡이버섯 배당체를 이용한 음료 시제품으로 일반 차음료로는 산업성이 보이지 않으며, 비타민음료로는 경제성이 있는 것으로 나타났다. 그리고 6개월에 걸쳐 다양한 부용제를 선별한 결과 최종 레시피를 선정하였다. <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <p style="padding-left: 20px;">아래의 연구성과를 달성하였음</p> <ul style="list-style-type: none"> - 특허출원 : 총 3건 달성, - 논문투고 : 총 3건 달성, - 학술발표 : 총 3건 달성, - 상품화 : 총 2건 달성, - 교육지도 : 총 2건 달성, - 언론홍보 : 총 2건 달성 <p>비타민음료는 참여기업 에스엔제이바이오(주)에서 2012년 10월까지 상품화를 추진할 계획이며, 현재 용기 및 포장 디자인에 대해 사업화를 추진 중에 있다.</p>					

[별첨 2]

자체평가 의견서

연구개발분야		과제구분	<input type="checkbox"/> 지정공모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제	관리번호	
연구과제명	한방 슬러지를 이용한 고품질 팡이버섯의 생산 및 가공식품 개발				
주관연구기관	경남과학기술대학교 산학협력단				
연구담당자	주관연구책임자	이 상 원			
	협동/위탁/세부 연구책임자	기관(부서)	순천대학교 생물학과	성 명	이 성 태
		기관(부서)	순천대학교 식품영양학과	성 명	서 권 일
		기관(부서)	에스앤제이바이오 개발부	성 명	박 경 욱
		기관(부서)		성 명	
연구기간	총 기 간	2009. 4. 10 - 2012. 4. 9	당해년도기간	2011.4.10-2012. 4.09	
연구비(천원)	총 규 모		당해년도규모	137,500	

1. 연구는 당초계획대로 진행되었는가?

당초계획 이상으로 진행 계획대로 진행 계획대로 진행되지 못함

○ 계획대로 수행되지 않은 원인은?

2. 당초 예상했던 성과는 얻었는가?

예상외 성과 얻음 어느 정도 얻음 얻지 못함

3. 연구과정 및 성과가 농림어업기술의 발전·진보에 공헌했다고 보는가?

공헌했음 현재로서 불투명함 그렇지 않음

4. 경제적인 측면에서 농림어가의 소득증대에 공헌했다고 보는가?

- 공헌했음 현재로서 불투명함 그렇지 않음

5. 얻어진 성과와 발표상황

5-1 경제적 효과

- 기술료 등 수익 수 익 :
 기업 등예의 기술이전 기업명 :
 기술지도 등 기업명 : 그린피스, 장흥버섯연구소

5-2 산업·지식재산권 등

- 국내출원/등록 출원 3 건, 등록 건
 해외출원/등록 출원 건, 등록 건

5-3 논문게재·발표 등

- 국내 학술지 게재 3 건
 해외 학술지 게재 건
 국내 학·협회 발표 3 건
 국내 세미나 발표 건
 기 타 건

5-4 인력양성효과

- 석 사 1 명
 박 사 명
 기 타 명

5-5 수상 등

- 있 다 상 명칭 및 일시 :
 없 다

5-6 매스컴 등의 PR

- 있 다 2 건
 없 다

6. 연구개발착수 이후 국내 다른 기관에서 유사한 기술이 개발되거나 또는 기술 도입함으로 연구의 필요성을 감소시킨 경우가 있습니까?

- 없다 약간 감소되었다 크게 감소되었다

○ 감소되었을 경우 구체적인 원인을 기술하여 주십시오?

7. 관련된 기술의 발전속도나 추세를 감안할 때 연구계획을 조정할 필요가 있다고 생각하십니까?

- 없다 약간 조정필요 전반적인 조정필요

8. 연구과정에서의 애로 및 건의사항은?

생산농가와 연구기관의 상호 기밀한 협조가 있어야 농가 기술보급이 잘 이루어질 수 있으나, 현재 생산하고 있는 상품 출하로 인해 본 연구 수행에 협조가 미흡한 것이 문제이며, 산학 협력과제인 경우 학교에서 기술관련 특허를 보유하려함으로 참여 기업체가 기술료를 지불해야 하는 경우가 발생함

(※ 아래사항은 기업참여시 기업대표가 기록하십시오)

1. 연구개발 목표의 달성도는?

- 만족 보통 미흡

(근거 : 2012년 3차년도 연구개발 시제품 비타민음료 출시 예정)

2. 참여기업 입장에서 본 본과제의 기술성, 시장성, 경제성에 대한 의견

가. 연구성과가 참여기업의 기술력 향상에 도움이 되었는가?

- 충분 보통 불충분

나. 연구성과가 기업의 시장성 및 경제성에 도움이 되었는가?

- 충분 보통 불충분

3. 연구개발 계속참여여부 및 향후 추진계획은?

가. 연구수행과정은 기업의 요청을 충분히 반영하였는가?

- 충분 보통 불충분

나. 향후 계속 참여 의사는?

- 충분 고려 중 중단

다. 계속 참여 혹은 고려중인 경우 연구개발비의 투자규모(전년도 대비)는?

- 확대 동일 축소

4. 연구개발결과의 상품화(기업화) 여부는?

- 즉시 기업화 가능 수년 내 기업화 가능 기업화 불가능

5. 기업화가 불가능한 경우 그 이유는?

구 분	소 속 기 관	직 위	성 명
주관연구책임자	경남과학기술대학교	교수	이 상 원 (인)
참여기업 대표	에스앤제이바이오(주)	대표이사	박 경 욱 (인)

연구결과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	가공식품개발	
연구과제명	한방 슬러지를 이용한 고품질 팥이버섯의 생산 및 가공식품 개발			
주관연구기관	경남과학기술대학교		주관연구책임자	이 상 원
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	330,000천원	82,500천원	-	412,500천원
연구개발기간	2009년 4월 10일 - 2012년 4월 9일(3년간)			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input checked="" type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 한약재료를 이용한 한방 팥이버섯 배지 개발 및 버섯 생산	한방 슬러지를 이용하여 미강 대신 10%첨가하여 버섯 배지로 사용 가능하며, 팥이버섯뿐만 아니라 봉지 재배된 버섯에서도 재배가 가능하였다. 또한 버섯 대량 생산 농가 보다는 일반 버섯 재배 농가에 경제성이 있는 것으로 나타났다.
② 한방 팥이버섯 및 버섯 가공제품에 대한 면역기능성 검증	팥이버섯 배당체를 이용한 시제품에 대한 면역활성과 항암효과 측정 결과 과립차 시제품은 12%이하로 제조하였을 때 유의적인 효과가 있었으며, 비타민음료는 팥이버섯 배당체 1-5% 첨가시 면역증강 효과가 있는 것으로 나타났다.
③ 한방 팥이버섯을 이용한 기능성 식품개발 및 상품화	팥이버섯 배당체를 첨가한 시제품에서 면역활성 및 항암 효과가 있는 것으로 나타났으며, 최종 시제품 과립차의 경우 11.98%가 가장 좋은 것으로 나타났다. 그리고 팥이버섯 배당체를 이용한 음료 시제품으로 일반 차음료로는 산업성이 보이지 않으며, 비타민음료로는 경제성이 있는 것으로 나타났다. 그리고 6개월에 걸쳐 다양한 부용제를 선별한 결과 최종 레시피를 선정하였다.

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	한방 폐 슬러지를 이용한 팽이버섯 배지 조성물 제조 방법
②	팽이버섯 배당체 분리 방법
③	팽이버섯 배당체를 이용한 면역활성 과립차 제조 방법
④	팽이버섯 배당체를 이용한 면역활성 비타민 음료 제조 방법

4. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장으로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술		v						v		
②의 기술		v					v			
③의 기술		v					v			
④의 기술		v					v			

5. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	한방 폐 슬러지를 이용한 팽이버섯 배지 조성물 제조 방법 - 자동화 시스템이 구축된 대량 버섯 재배 농가보다는 소농인에게 경제와 산업적으로 큰도움을 줄 것으로 기대함. - 팽이버섯 이외의 버섯재배에도 한방 슬러지로 배지 사용이 가능하며, 특히 봉지 재배 농가에서 활용 높을 것으로 기대함.
②의 기술	팽이버섯 배당체 분리 방법 - 팽이버섯으로부터 유기용매를 사용하지 않고 주정만을 사용하여 분리 가능 - 대량 생산 설비 라인 개선 방안으로 추출탱크와 배합탱크 사이의 오픈칼럼 설비 공정을 구축 가능함
③의 기술	팽이버섯 배당체를 이용한 면역활성 과립차 제조 방법 - 관능적 평가에 따른 버섯차는 산업적 가치가 높지 않았으나, 버섯의 배당체만을 이용한 과립차로 제조 가능하면 버섯재배 농가 수입 상승효과와 버섯차 상품화 가능
④의 기술	팽이버섯 배당체를 이용한 면역활성 비타민 음료 제조 방법 - 버섯 자체의 비린맛으로 인해 음료로 제조하는 것은 어려움이 있었으나, 팽이버섯 배당체만을 첨가 할 경우 버섯의 비린맛이 없고 일반 당첨가 제조보다 기호성이 높은 것으로 평가 되었음. - 국내 판매되고 있는 비타민음료와는 차별화된 버섯의 배당체가 비타민 기능성을 높여 주는 효과 있는 것으로 나타남.

6. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명	팽이버섯 배당체를 이용한 과립차 제조 및 비타민음료 제조 방법		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	20,000천원
이전방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	6개월	실용화예상시기	2013년 6월 예상
기술이전시 선행조건	기술이전 시 설비 조건은 추출탱크와 배합탱크를 따로 운영하는 곳이어야 하며, 후살균 처리가 설비된 곳이어야 함.		

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 2009년 상반기 농림수산식품 연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 2009년 상반기 농림수산식품 연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.