

최 종  
연구보고서

버섯균사체를 이용한 천연 CLA의  
생산 및 이용

연구기관

(주)HK바이오텍

농림기술관리센터

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “버섯균사체를 이용한 천연 CLA의 생산 및 이용” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003년 08월 일

주관연구기관명 : (주)HK바이오텍

총괄연구책임자 : 김 정 옥

위탁연구기관명 : 경상대학교

위탁연구책임자 : 하 영 래

# 요 약 문

## I. 제 목

버섯균사체를 이용한 천연 CLA의 생산 및 이용

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발의 목적

본 연구에스는 “버섯균액체배양법을 이용하여 t10,c12 CLA를 생산”함과 아울러 “CLA버섯균사체 및 CLA버섯균배양액을 생산”하고 이들을 “이용하는 기술을 개발”하고자 함이 목적이다.

### 2. 연구의필요성

- 가. 8개 이상의 이성체를 갖는 CLA는 다양한 생리활성을 갖는다. 이 중에서 t10,c12 CLA 이성체가 생리활성이 가장 강하다.
- 나. 화학적으로 linoleic acid로부터 합성할 경우 t10,c12 CLA와 c9,t11 CLA를 생산할 수가 있으나 소비자들이 화학적인 합성이라는 사실 때문에 기피하고 있다.
- 다. *B. fibrisolvens*나 *L. ruteri*를 이용하여 미생물적으로 linoleic acid로부터 천연 CLA를 합성할 경우 c9,t11 CLA만 생성된다.
- 라. 본 연구진이 개발한 버섯균액체배양법을 활용할 경우 c9,t11 CLA와 t10,c12를 동시에 생산할 수 있다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 1단계; 기초연구단계

##### 가. CLA생성 버섯균주 선발

- 1) 버섯균주 pool로부터 CLA생성 균주선발
  - 가) CLA 생성 기본배지 제조
  - 나) CLA 정량

##### 나. CLA생산 배양조건 구명

- 1) 선발된 버섯균주를 이용한 CLA 생산
  - 가) 최적 배양조건 구명
    - (1) 배지조성
    - (2) 통기량 및 진탕 조건
    - (3) 배양온도 및 기간
  - 나) CLA 정량
  - 다) c9,t11 CLA와 t10,c12 CLA의 분리

#### 2. 2단계; 응용연구 및 시제품제작

##### 가. CLA버섯균사체 대량생산 체계확립

- 1) CLA 대량생산 (500 L) 방법 확립
  - 가) 배지 조성
  - 나) 배양조건 확립

##### 나. CLA 생성 효소 분리

- 1) CLA 생성효소의 분리 및 정제
  - 가) 대량배양
  - 나) 효소의 분리 정제
  - 다) CLA 생성 활성 검증

### 3. 3단계; 사업화

가. CLA버섯균사체 및 배양액 (CLA 함량 10%)의 제품화

- 1) CLA버섯균사체 및 배양액의 제품화
  - 가) 버섯균사체
  - 나)정제화 및 제제화
- 2) 배양액
  - 가) 엑기스화
  - 나) 음료화

나. CLA 대량생산 및 제품화 (LA → CLA 전환율 50 ~ 70%)

- 1) CLA의 대량생산 및 제품화
  - 가) 대량생산 방법
    - (1) 분리정제된 효소 이용
      - (가) 반응조건 구명
      - (나) CLA 분리
    - (2) 버섯균사체 배양물을 이용
      - (가) CLA의 분리
      - (나) CLA 이성체 분리
  - 나) 제품화
- 2) CLA 생성효소의 제품화

## IV. 연구개발 결과

### 1. 생육정도

- 액체배양배지에서 생장이 빠른 균종은 동충하초, 먹물, 느타리버섯이었다.

## 2. CLA 생성버섯균주

- CLA생성이 우수한 균주는 신령버섯, 먹물과 느타리버섯균 이었다
- CLA는 균사체와 배양액에 존재하였다.
- 생성된 CLA 이성체는 c9,t11 CLA 약 76%, t10,c12 CLA는 약 29%였다.
- 버섯균주가 CLA를 높게 생성시키는 최적의 조건은 기본배지에 대두를 4% (40 g/l)첨가하고 pH를 5.5로 조절한 후 홍화유 가수분해물 0.4%를 가하고, 1.0 v/v/m의 공기를 주입하면서 25℃에서 8일간 배양하였을 때였다
- 최적배양조건에서 신령, 먹물, 느타리버섯균주가 생성하는 CLA 농도는 신령, 먹물, 먹물버섯 각각 14, 6.9, 1.8 mg/l 였다.

## 3. CLA 분포

- 신령버섯의 c9,t11 CLA는 균사체내에 대부분 포함되어 있고 일부가 균사체의 표면에 부착되어 있었다.
- 느타리버섯의 c9,t11 CLA는 배양여액에 대부분 존재하였다.
- 균사체내의 축적 CLA를 이용한 분말, 캡슐 및 정제의 경우 신령버섯과 먹물버섯은 균사체를 이용하고, 배양원액을 생물소재로 이용할 경우 느타리버섯이 좋았다.

## 4. CLA 생성효소 (Linoleate isomerase=Llase)

- 총단백질 함량은 신령버섯, 먹물버섯, 느타리버섯 균사체에 각각 39.2, 40.7, 35.1 mg/ml (total vol: 10 ml)이 함유되어 있었다.
- 신령버섯균사체와 먹물버섯균사체의 protein을 column chromatography를 이용하여 F1, F2, F3로 분획하였다. 이중 F1이 각각 38, 30 µg CLA/mg protein으로 Llase 활성이 가장 뛰어 났으며, F1분획에서 대략 40 Kd 이하의 protein과 Llase라고 생각되는 21 KD의 protein을 분리하였다.

## 5. 제품화

- c9,t11 CLA<sup>®</sup>: Crude Llase로 반응하고 저온침전법으로 분리한 c9,t11 CLA를 0.1~1.0 g 정도 생산할 수 있었다.
- CLA<sup>®</sup> Mushroom mycelia: 액체신령버섯균사체배양물 균사체 spray dry 시킨 분말로 CLA 함량이 4.17% (고형분) 함유되어 있다.

- CLA<sup>®</sup> Mushroom mycelial extract: 액체느타리버섯균사체배양물 배양액 농축액으로 Brix 50 (50배 농축액)액으로 고농도 농축한 액상제제로 CLA 함량이 3.17% (액상) 함유되어 있다.
- Crude Linolease Isomerase<sup>®</sup>: Crude Llase를 대량으로 collection한 다음 탈염과정을 거쳐 동결건조한 제품의 경우 35 mg CLA/g proein 정도 였다.

## V. 활용에 대한 건의

1. 본 연구과제는 세계에서 최초로 수행되는 연구로서 이 연구의 결과는 국내 특허를 출원하였다.
2. 본 연구결과의 특허권을 해외 이전하거나 생산된 소재를 원료로 수출할 것이다.
3. 본사에서 시제품을 생산하고, 본 사의 영업망을 통하여 유통할 것이다.
4. CLA버섯자실체를 생산하는 기초자료로 활용할 것이다.
5. CLA 생성 단백질을 분리 정제하고 이들의 특성을 구명하여야 할 것이다.
6. CLA를 생산하는 효소로부터 유전자를 클로닝하여 CLA 함유 버섯균사체를 생산하는 연구를 수행하여야 할 것이다.

## SUMMARY

This study was conducted to produce natural conjugated linoleic acid (CLA) by means of the submerged liquid cultures of mushroom strains in medium containing linoleic acid (LA) or raw agricultural products. In terms of mycelial growth, Dongchunghacho (*Paecilomyces japonicus*) was the best strains in the given basal medium. However, CLA could not be produced by this strain. CLA production were the best by Neutari (*Pleurotus ostreatus*) followed by Mugmul (*Coprinus comatus*), Synryeong (*Agaricus blazei*), Neutari (*Pleurotus ostreatus*), Sanghwang (*Phellinus linteus*), Pyogyo (*Lentinus edodes*), and Yeongji (*Ganoderma lucidum*). Of tested mushroom strains, Synryeong (*Agaricus blazei*), Mugmul (*Coprinus comatus*), and Neutari (*Pleurotus ostreatus*) were selected for the production of CLA in the medium developed in the HK Biotech., Co. LTD. Because small amount of LA, which is substrate for CLA synthesis is present in the basal medium, the addition of an adequate amount of LA was needed to produce maximum amount of CLA that can be produced by each mushroom strains.

Following studies were focussed on the culture conditions for the growth of mushroom mycelia and the production of CLA. Each substrate containing LA hydrolyzed form sunflower seed oil, safflower seed oil, and soybean oil (5, 10, 15 g/250 ml culture medium) were tested for the production of CLA. An adequate amount of oil substrate was 10 g/250 ml with all three kinds of oil substrates. Maximum amount of CLA (3.71%, dry base) in this study was obtained from the combination of safflower seed oil and Neutari (*Pleurotus ostreatus*). CLA isomers produced were *c9,t11* CLA and *t10,c12* with higher amount of *c9,t11* CLA. Distribution of these isomers in the part of mushroom mycelia were investigated, and *c9,t11* CLA was mainly located in the inside of mushroom mycelia while only small amount was detected on the surface of mushroom mycelia and liquid culture medium of Synryeong (*Agaricus blazei*). However, high amount of *c9,t 11*CLA was found in the supernatant from mushroom mycelial culture of Neutari (*Pleurotus ostreatus*). This suggests that Mugmul (*Coprinus comatus*) and Synryeong (*Agaricus blazei*) should be used as culture spawn



when we need to use mushroom mycelia as bioingredient, but Neutari (*Pleurotus ostreatus*) should be used as culture spawn when we need to use liquid extract as bioingredient. Culture condition for the CLA production was similar trend with the condition (pH, temperature, aeration) of the growth of mushroom mycelia.

This may be because production of LA isomerase (Llase) from mycelial culture affect on the CLA amount produced. Adequate incubation time was 8 days for the production of CLA for all three strains. Enzyme for the production of CLA was isolated from the mycelial culture and partly characterized by means of SDS-PAGE, anion exchange column chromatography, size exclusion chromatography, and then Llase activity was examined. A typical protein that has molecular weight ca. 21 Kd found from the mushroom mycelia of Synryeong (*Agaricus blazei*) and Mugmul (*Coprinus comatus*), while this protein band was not shown on the SDS-PAGE of mycelia from strains which CLA was not produced from. The fraction (fraction no 12) from gel filtration of the culture from Synryeong (*Agaricus blazei*) and Mugmul (*Coprinus comatus*) showed specific activities 51 $\mu$ g CLA/mg protein and 41  $\mu$ g CLA/mg protein, respectively. Based on the research data, HK Biotech developed two products. They are liquid extract packed in pouch made from the culture of Neutari (*Pleurotus ostreatus*) and tablet made from mycelial powder of Synryeong (*Agaricus blazei*).

# CONTENTS

<b>Chapter 1. Summary of Research</b> .....	<b>14</b>
<b>Session 1. Objectives</b> .....	<b>14</b>
1. Final Goal .....	14
2. Yearly Goal .....	14
<b>Session 2. Necessity</b> .....	<b>15</b>
<b>Session 3. Characteristics of Technologies to be developed</b> .....	<b>16</b>
<b>Session 4. Strategy of Research</b> .....	<b>19</b>
<b>Chapter 2. International and Domestic Technology Status</b> .....	<b>21</b>
<b>Session 1. Biological activity of CLA and Synthesis</b> .....	<b>21</b>
<b>Session 2. Submerged liquid culture of mushroom mycelia and usage</b>	<b>23</b>
<b>Session 3. Perspectives of CLA research</b> .....	<b>25</b>
<b>Chapter 3. Methods and Results</b> .....	<b>27</b>
<b>Session 1. Methods</b> .....	<b>27</b>
1. Analysis of CLA .....	27
2. Selection of strains for the production of CLA .....	27
3. Culture condition for the production of CLA .....	30
4. Development for the methods of CLA isolation .....	31
5. Production of enzyme (Liase) .....	33
6. Production of CLA in large scale .....	34
<b>Session 2. Results</b> .....	<b>34</b>
1. Development for the methods of CLA analysis .....	34
2. Selection of strains for the production of CLA .....	34

3. Culture condition for the production of CLA .....	41
4. Development for the methods of CLA isolation .....	58
5. Production of enzyme (Liase) .....	59
6. Development of CLA products and enzyme .....	67
7. Product .....	69
<b>Chapter 4. Achievement and Contribution to related fields .....</b>	<b>74</b>
Session 1. Yearly Achievement and Contribution to Related Fields .....	74
Session 2. Contribution to ralated area .....	77
<b>Chapter 5. Application of results .....</b>	<b>79</b>
Session 1. Effects of achivement .....	79
Session 2. CLA Production and Commercialization .....	81
<b>Chapter 6. Information collected from overseas .....</b>	<b>82</b>
Session 1. Commercialization .....	82
Session 2. Marketing .....	84
<b>Chapter 7. References .....</b>	<b>89</b>

# 목 차

제1장 연구개발의 개요 .....	14
제1절 연구개발 목표 .....	14
1. 최종목표 .....	14
2. 단계별 목표 .....	14
제2절 연구개발 필요성 .....	15
1. 기술적 측면 .....	15
2. 경제·산업적 측면 .....	17
3. 사회·문화적 측면 .....	17
제3절 연구개발 범위 .....	18
1. 연구개발 목표와 내용 .....	18
제4절 연구개발 추진체계 .....	19
1. 추진체계도 .....	19
2. 추진체계 .....	20
제2장 국내·외 기술개발 현황 .....	21
제1절 CLA 생리활성 및 합성 .....	21
제2절 버섯균액체배양 및 이의 이용 .....	23
제3절 CLA 연구에 관한 전망 .....	25

제3장 연구개발 수행내용 및 결과 .....	27
제1절 연구개발 수행내용 .....	27
1. CLA 분석 .....	27
2. CLA 생성 버섯균주의 선발 .....	27
3. CLA 생성 배양조건 구명 .....	30
4. CLA 생성 효소의 분리 정제 .....	31
5. CLA 대량생산 .....	33
6. CLA 버섯균사체 및 배양액의 제품화 .....	33
제2절 연구개발 결과 .....	34
1. CLA 분석 .....	34
2. CLA 생성 버섯균주 선발 .....	34
3. CLA 생성 배양조건 구명 .....	41
4. CLA 분리방법 확립 .....	58
5. CLA 생성 효소의 분리 정제 .....	59
6. CLA 생산 .....	67
7. 제품화 .....	69
제4장 목표달성도 및 관련 분야 기여도 .....	74
제1절 목표달성도 .....	74
제2절 관련분야 기여도 .....	77
제5장 연구개발결과의 활용계획 .....	79
제1절 연구개발 효과 .....	79
1. 기술적 측면 .....	79

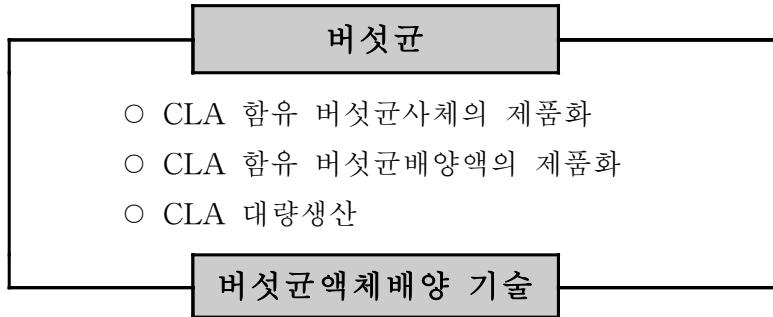
2. 경제.산업적 측면 .....	79
제2절 연구개발 활용방안효과 .....	81
제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보 .....	82
제1절 CLA의 산업화 .....	82
제2절 CLA 시장성 .....	84
제7장 참고문헌 .....	89

# 제1장 연구개발의 개요

## 제1절 연구개발 목표

### 1. 최종목표

본 연구에서는 “버섯균액체배양법을 이용하여 t10,c12 CLA를 생산”함과 아울러 “CLA버섯균사체 및 CLA 버섯균 배양액을 생산”하고 이들을 “이용하는 기술을 개발”하고자 한다.



### 2. 단계별 목표

- 가. CLA생성 버섯균주 선발
- 나. CLA생산 배양조건 구명
- 다. CLA버섯균사체 대량생산체계 확립
- 라. CLA생성 효소분리
- 마. CLA버섯균사체 및 배양액의 제품화
- 바. CLA대량생산 및 제품화

### 3. 주요개발목표와 내용

연구 개발 목표	연구 개발 내용
○ CLA생성 버섯균주 선발 및 배양조건 구명	○ 버섯균주 pool로부터 CLA생성 균주 선발 ○ 선발된 버섯균주를 이용한 CLA 생산
○ CLA 및 CLA 버섯 균사체와 배양액 대량생산 체계확립	○ CLA 생성 효소의 분리 및 정제 ○ 버섯균사체 대량배양 (500L 규모)방법 확립 ○ CLA의 대량생산 - 분리정제된 효소 및 버섯균 이용
○ CLA 및 CLA버섯 균사체와 배양물의 제품화	○ CLA 제품화 -식품, 의약품 및 다이어트 소재 ○ CLA 버섯균사체 및 배양물의 제품화 -정제, 제제화 및 엑기스화

## 제2절 연구개발 필요성

### 1. 기술적 측면

가. 생리활성이 강한 천연 t10,c12 conjugated linoleic acid (t10,c12 CLA) 생산기술개발이 필요하다.

1) CLA는 여러 가지 이성체를 갖는데 이들을 총칭하여 CLA라 한다.

주요 이성체 중에서 c9,t11 CLA는 천연에 존재하는 CLA이지만 생리활성이 다소 떨어지고, t10,c12 CLA는 강력한 생리활성 (특히 체지방감소 효과)을 갖는 이성체이다. 따라서 현재 화학적으로 합성한 CLA는 선진국인 미국, 일본, 유럽 등지에서 체지방감소를 위한 목적으로 tablet 형태로 시판되고 있으며 머지 않아 식품첨가제로 사용될 것이다.



2) CLA는 화학적으로 합성할 수 있다.

여기에는 여러 가지 이성체 (c9,t11 CLA와 t10,c12 CLA가 주 이성체)를 함유하고 있어 인체 위해물질이 포함될 수도 있으므로 소비자들은 천연으로 생산된 CLA를 요구하고 있다. 특히 t10,c12 CLA 이성체를 다량 함유한 CLA를 요구한다.

3) 박테리아를 이용하면 c9,t11 CLA를 천연으로 생산할 수 있다.

가) *B. fibrisolvens*나 *L. reuteri* 등을 이용하면 c9,t11 CLA를 생산할 수 있다.

나) 그러나 이들은 단지 c9,t11 CLA만 생성한다. 즉 생리활성이 강한 t10,c12 CLA는 생산하지 못한다.

다) 따라서 t10,c12 CLA를 생산할 수 있는 생물학적인 방법의 연구 개발이 절실히 요구된다.

4) 버섯균액배양법을 이용하면 c9,t11 CLA와 t10,c12 CLA를 동시에 생산할 수 있다.

가) 최근 본 연구진은 특이한 버섯균이 c9,t11 CLA와 t10,c12 CLA를 동시에 생산한다는 사실을 밝혔다.

나) 생산된 이들 두 이성체를 순수분리 하여 사용하거나 두 이성체의 혼합물을 그대로 사용할 수 있다.

나. 생리활성이 보장된 버섯균사체 및 균사체배양액의 개발이 필요하다.

1) 버섯균사체는 균사체의 특유한  $\beta$ -D-glucan 및 다양한 생리활성물질을 함유하고 있어 기능이 높다.

2) 버섯균배양액 역시 버섯균사체로부터 분비된 다양한 생리활성물질을 함유하고 있다.

3) 그러나 이들의 기능성에 다양한 생리활성을 갖는 CLA (특히 t10,c12 CLA 이성체)가 보장된 버섯균사체 및 버섯균배양액의 생산기술 개발이 요구된다.

## 2. 경제·산업적 측면

- 가. 미생물적인 방법으로 천연 t10,c12 CLA의 생산이 필요하다.
- 나. 고부가가치를 갖는 고기능성 버섯균사체의 생산이 필요하다.
- 다. 고부가가치를 갖는 버섯배양액의 생산이 필요하다
- 라. 버섯균을 이용한 기능성 소재개발로 버섯에 관한 인식 제고로 버섯소비촉진을 증대시킬 필요가 있다.

## 3. 사회·문화적 측면

- 가. 건강증진을 위한 고 기능성 소재의 개발이 필요하다.
- 나. 버섯자실체보다 버섯균사체 또는 버섯균사체배양액의 이용방법 기술개발이 필요하다.
- 다. 소득을 증대시킬 수 있는 고기능성 소재 및 제품의 개발이 필요하다.
- 라. 버섯소비를 촉진시킬 수 있는 방법의 연구가 필요하다.

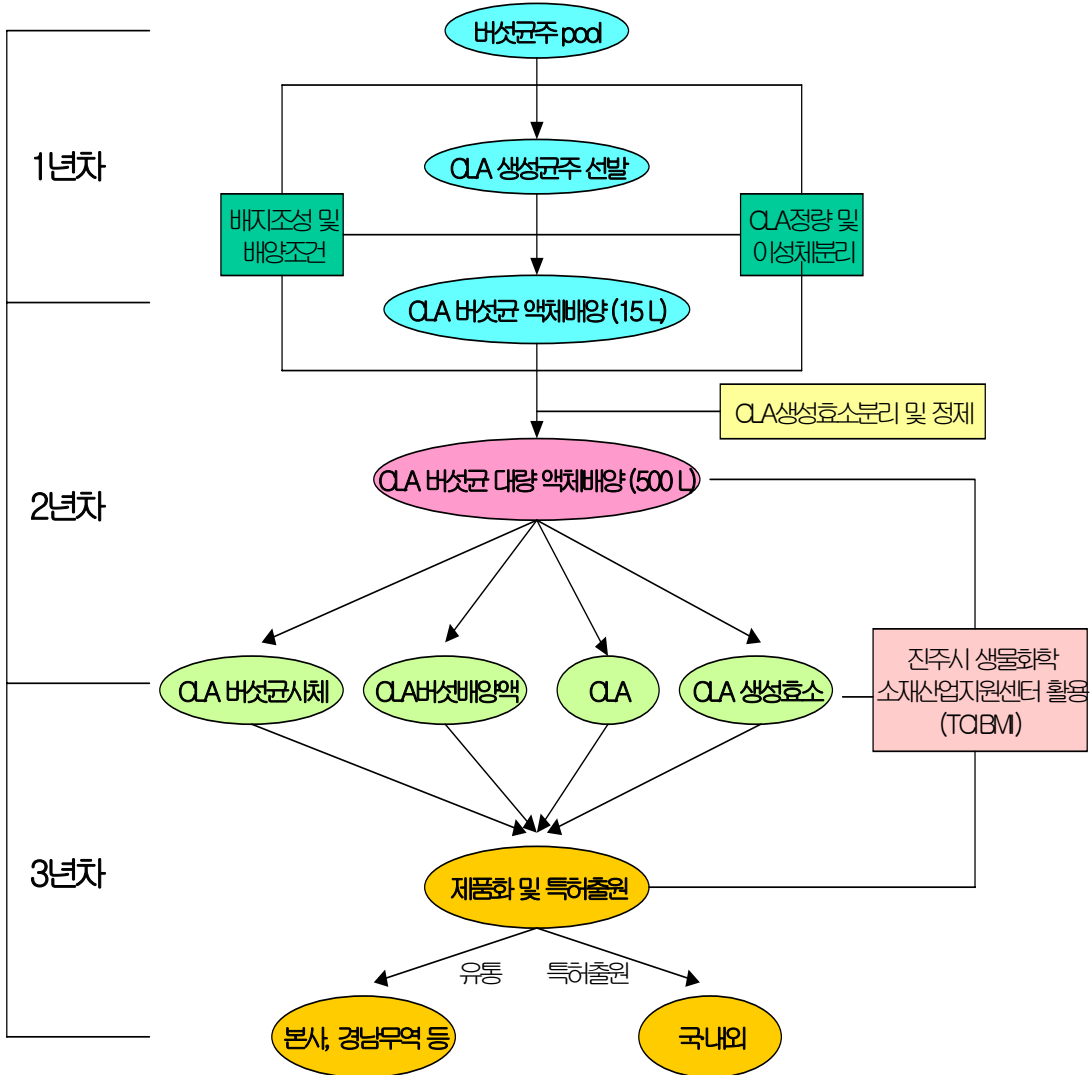
### 제3절 연구개발 범위

#### 1. 연구개발 목표와 내용

연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ CLA 생성 버섯균주 선발</li>   <li>○ CLA 생산 배양조건 구명</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 버섯균주 pool로부터 CLA 생성 균주 선발               <ul style="list-style-type: none"> <li>-CLA 생성 기본배지 제조</li> <li>-CLA 정량</li> </ul> </li>   <li>○ 선발된 버섯균주를 이용한 CLA 생산               <ul style="list-style-type: none"> <li>-최적 배양조건 구명                   <ul style="list-style-type: none"> <li>· 배지 조성</li> <li>· 통기량 및 진탕 조건</li> <li>· 배양온도 및 기간</li> </ul> </li> <li>-CLA 정량</li> <li>-c9,t11 CLA와 t10,c12 CLA의 분리</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ CLA 버섯균사체 대량생산 체계 확립</li>   <li>○ CLA 생성 효소 분리</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ CLA 대량생산 (500L) 방법 확립               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 배지 조성</li> <li>- 배양조건 확립</li> </ul> </li>   <li>○ CLA 생성효소의 분리 및 정제               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 대량배양</li> <li>- 효소의 분리 정제</li> <li>- CLA 생성 활성 검증</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ CLA 버섯균사체 및 배양액의 제품화</li>   <li>○ CLA 대량생산 및 제품화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ CLA 버섯균사체 및 배양액의 제품화               <ul style="list-style-type: none"> <li>-버섯균사체                   <ul style="list-style-type: none"> <li>· 정제화 및 제제화</li> </ul> </li> <li>-배양액                   <ul style="list-style-type: none"> <li>· 엑기스화</li> <li>· 음료화</li> </ul> </li> </ul> </li>   <li>○ CLA의 대량생산 및 제품화               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 대량생산 방법                   <ul style="list-style-type: none"> <li>· 분리정제된 효소 이용                       <ul style="list-style-type: none"> <li>: 반응조건 구명</li> <li>: CLA 분리</li> </ul> </li> <li>· 버섯균사체 배양물을 이용                       <ul style="list-style-type: none"> <li>: CLA의 분리</li> <li>: CLA 이성체 분리</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>- 제품화</li> </ul> </li>   <li>○ CLA 생성효소의 제품화</li> </ul>

# 제4절 연구개발 추진체계

## 1. 추진체계도



## 2. 추진 체계

### 가. 1차년도

- 1) 버섯균주 pool에서 각 버섯 균주를 활성화시킨다. 특히 [표1]에 나열된 균주를 집중적으로 활성화시킨다.
- 2) 특수한 배지와 배양조건하에서 활성화된 균주의 t10,c12 CLA 생성능을 검증하여 t10,c12 CLA 생성균주를 선발한다.
- 3) CLA의 검증에 관한 연구는 위탁과제에서 수행한다.
- 4) 선발된 균주에 대해 CLA 균사체 생성을 위한 배양조건을 확립한다.  
→ CLA 검증에 관한 연구는 위탁과제에서 수행한다.

### 나. 2년차 추진 체계

- 1) 선발된 각 균주의 CLA 생산 배양 조건을 up-scale화 시켜 대량배양 체계를 확립한다.
- 2) 동시에 CLA 생성효소를 분리·정제한다.  
→ CLA 생성효소의 분리·정제는 위탁과제에서 수행한다.

### 다. 3년차 추진 계획

- 1) 2년차의 배양조건을 활용하여 pilot scale (500L)로 대량 배양한다.  
→ 진주시 생물화학소재 산업지원센터 (TICBMI)의 발효조를 활용한다.
- 2) 산업화를 위한 시제품을 생산한다.
  - 가) CLA버섯균사체를 분말화하여 정제 또는 capsule화한다.
  - 나) CLA버섯균사체배양액을 농축하여 엑기스화 하거나 음료원료로 개발한다.  
→ TCIBMI의 장비를 활용한다.
- 3) CLA 생성효소를 제제화하여 제품화한다.  
→ CLA 생성효소 제제화는 위탁과제에서 수행한다
- 4) CLA의 제품화
  - 가) 배양액으로부터 추출하여 제품화한다.
  - 나) 효소와 기질을 반응시켜 CLA를 합성하여 제품화한다.  
→ 위탁과제에서 연구한다.

## 제2장 국내·외 기술개발 현황

### 제1절 CLA 생리활성 및 합성

#### 1. c9,t11 CLA와 t10,c12 CLA가 주 CLA 이성체이다.

CLA는 두 개의 이중결합의 위치 및 수소원소의 cis, trans 위치에 따라 아주 많은 이성체를 갖지만 c9,t11 CLA와 t10,c12 CLA 이성체가 생리활성에 관여하는 주 이성체이다.

#### 2. CLA 이성체의 혼합물은 다양한 생리활성을 갖는다.

##### 가. 동물실험 결과

여러 가지 이성체가 함유된 CLA (화학적으로 합성된 CLA)는 동물실험을 통하여 항암성, 체지방감소성, 면역증강성, 항동맥경화, 콜레스테롤감소성, 생장촉진성, 당뇨치료성 및 골대사 (bone metabolism) 촉진성 등의 생리활성을 갖는다.

##### 나. 임상실험 결과

CLA에 관하여 현재까지 유일하게 수행된 임상실험 결과 CLA (화학적으로 합성됨)는 인체의 구성분 중 체지방 분해를 촉진함으로써 체지방을 감소시키는 효과가 있음이 검증되었다.

##### 다. t10,c12 CLA가 가장 활성이 강한 CLA 이성체 이다.

최근 동물실험에서 CLA의 이성체 중에서 t10,c12 CLA가 체지방을 감소시키는 강한 효과를 갖고, c9,t11 CLA는 그 효과가 미약한 것으로 보고되었다. 따라서 특이한 이성체 (예 t10,c12 CLA)의 중요성이 부각되고 있다.

##### 라. 화학적으로 합성한 CLA에는 여러 가지 이성체가 혼합되어있다.

1) CLA를 linoleic acid (필수지방산)로부터 알카리로 고온에서 이성화하여 합성하고 있다. 이 경우 많은 이성체가 생성되며 그 중 c9,t11 CLA와 t10,c12 CLA가 각각 약 45% 정도로 생성된다.

2) 현재까지 생리활성의 검증은 화학적으로 합성된 CLA (8개 이상의 많은 이성체를 함유한 CLA 이성체의 혼합물)를 사용하였고, 실제 선진국에서 다이어트용으로 시판되고 있는 CLA도 화학적으로 합성한 것이다.

마. 그러나 소비자들은 천연 CLA, 특히 생리활성이 강한 t10,c12 CLA가 다량 함유된 CLA를 선호하고 있다.

바. 현재까지의 미생물적인 CLA 합성방법으로는 c9,t11 CLA만 합성할 수 있다.

1) Rumen 박테리아인 *B. fibrisolvens* 등이 c9,t11 CLA를 합성할 수 있지만, 이 미생물은 혐기성이어서 산업화가 어렵고, CLA reductase를 포함하고 있어 CLA의 생산량은 아주 미량이다.

2) *L. reuteri*가 linoleic acid로부터 c9,t11 CLA를 합성할 수 있다. 이 미생물은 낮은 pH에서 c9,t11 CLA를 생산할 수 있는 장점도 있지만, 생리활성이 강한 t10,c12 CLA는 생산할 수 없다.

사. 따라서 미생물적인 방법으로 t10,c12 CLA를 생산할 수 있는 방법이 모색되어야 할 것이다.

아. 본 연구진에 의한 연구 결과 ([www.nongae.gsnu.ac.kr/~ylha](http://www.nongae.gsnu.ac.kr/~ylha) 참조)

1) 특허 등록 및 출원

현재까지 CLA에 관련되는 9건의 특허 신청(국내)과 3건의 국제특허 및 1건의 국내 특허를 등록하였다.

2) CLA에 관련되는 논문

17편의 국외 논문과 21편의 국내논문을 유명학술지에 게재하였다.

## 제2절 버섯균액체배양 및 이의 이용

### 1. 버섯균액체배양기술이 개발되고 있다.

- 가. 국내에서는 최근 버섯자실체 생산용 배지제조를 위한 느타리, 팽이버섯균 등의 액체배양기술이 개발되어있다. 본 업체는 버섯종균생산업체로서 느타리, 팽이, 표고, 신령을 비롯한 여러 가지 품종의 버섯균사체를 종균생산용으로 액체배양 할 수 있는 기술을 보유하고 있다.
- 나. 일부 식품, 의약품 및 화장품에 적용할 수 있는 생리활성물질이 영지, 상황, 신령버섯의 액체배양법으로 생산되고 있다.
- 다. 일본의 경우 표고버섯균을 액체배양하여 생리활성 물질을 생산하는 기술로 활용되고있다.

### 2. 버섯균사체는 고기능성을 갖고 있다.

#### 가. 항암성

- 1) 일반적으로 조개느타리, 표고버섯 등에 존재하는 단백질 다당체는 면역체계와 연결되어 간접적으로 종양 증식을 억제시키고 암세포나 유해 병원균을 사멸시키는 macrophage의 수를 증가시키는 것으로 알려져 있다.
- 2)  $\beta$ -1,3 glucan인 Lentinan은 mouse를 이용한 동물실험에서 5-FU 치료로 인한 체중감소를 억제시키고 종양에 의한 독성을 선택적으로 감소시키는 효과를 보였다고 발표되었다. 또한 위암환자를 대상으로 한 임상실험에서 생존기간을 연장하고 식욕부진, 권태감, 오심, 동통 등의 자각증상을 개선시켜준다고 확인되었다.
- 3) 상황버섯, 동충하초, 아가리쿠스 버섯은 최근 이들의 항암성에 대해 많은 주목을 받고 있다.

#### 나. 면역 증강성



- 1) 표고버섯에 존재하는  $\beta$ -1,3 glucan인 lentinan은 면역계의 host mediated immune response에 관여하여 손상된 면역기능을 회복시켜준다고 보고되었다. 또한 생체내에서 감염방어 등의 면역기능을 나타내는 보체계 (complement system)를 활성화시킨다고 알려져 있다.
- 2) 느타리, 표고버섯 등에 존재하는 단백질 다당체는 인터페론생성을 촉진시키는 물질의 증양에 대한 생체 고유의 방어력을 높여줌으로써 인터페론의 유도를 활성화시킨다고 보고되었다.

다. 혈중 콜레스테롤 강하 및 체지방 감소 작용

- 1) 쥐를 이용한 실험에서 표고의 엘리타데닌이 혈중 콜레스테롤과 혈압을 강하시키는 작용이 있음이 보고되었다.
- 2) 느타리 버섯의 열수 추출물은 mouse의 체지방을 감소시키는 효과가 있었다

라. 항바이러스작용

표고의 포자추출물에 인플루엔자 바이러스 저지효과가 있음이 알려져 있다

**3. 버섯균사체와 그 배양액은 다양하게 이용되고 있다.**

버섯균사체를 이용한 발효음료 및 건강보조식품의 개발은 차츰 활성화되고 있으며, 영지 (영지균사체 음료), 상황 (상황균사체 엑기스), 표고균사체(일본의 LAM), 아가리쿠스 균사체 혼합 음료 (일본에서 상품화)는 이미 활발한 기술개발이 이루어져 상품화되어 국내시판 및 외국수출이 되고 있다.

**4. 본 연구진에 의한 연구결과**

가. (주)HK바이오텍은 균사체의 액체배양기술과 시설을 갖추고있는 중견생산업체이면서 느타리, 아가리쿠스, 동충하초 외 70여종의 버섯균을 대량으로 액체배양하는 기술을 보유하고 있다.

나. 최근에는, 이러한 액체배양기술을 이용하여 대량으로 생산한 버섯균사체 배양물로부터 숙취해소, 당뇨 등에 효능이 있는 기능성소재의 개발에 성공하여, 특허출원을 하는 등 연구가 활발하다.

다. 특수한 버섯균을 특수배지에서 액체배양법으로 c9,t11 CLA와 t10,c12 CLA를 동시에 생산하는 방법을 개발하였다. 이를 대량생산할 수 있는 버섯균의 선발과 그 균을 이용하여 대량생산할 수 있는 기술개발이 필요하다.

### 제3절 CLA 연구에 관한 전망

#### 1. 생리활성이 강한 천연 t10,c12 CLA의 생산체계를 확립할 것이다.

가. t10,c12 CLA는 화학적으로 합성된 CLA로부터 분리·정제할 수가 있다. 그러나 소비자들은 이러한 합성 CLA보다 천연 CLA를 선호하고, 특히 현재로서는 한국에서 합성 CLA를 식품에 첨가하여 사용할 수가 없기 때문에 CLA버섯균사체 및 CLA버섯균배양액을 이용함으로써 CLA를 기능성 물질로 활용할 수 있을 것이다.

나. 현재, 개발된 미생물적인 방법으로는 c9,t11 CLA는 합성할 수 있으나 t10,c12 CLA는 합성할 수가 없다.

다. 본 연구에서 t10,c12 CLA를 버섯균을 이용하여 합성하는 방법을 확립하고, 나아가 버섯균사체배양액으로부터 분리·정제된 효소를 이용하여 t10,c12 CLA를 대량생산할 수 있는 방법을 확립할 수 있을 것이다.

#### 2. 고부가가치를 갖는 CLA버섯균사체 (버섯) 및 배양액이 제품화될 것이다.

가. 현재 버섯균사체나 버섯균사체배양액은 다양한 형태 (엑기스, 건조분말 등)로 제품화되고 있지만 부가가치가 더 높은 CLA버섯균사체 및 엑기스 등이 제품화될 것이다.

나. 그러나 CLA버섯균사체 및 배양액은 기존의 제품에 비해 부가가치가 높을 뿐더러 버섯균사체 자체의 기능과 CLA의 기능을 보강한 시너지효과를 갖는 기능성 소재로 활용함으로써 국민의 건강유지에 이바지 할 것이다.

다. CLA의 기능성은 외국에서 이미 인정받고 있으며, 특히 미국인의 주요관심사인 비만치료에 효능이 뛰어난 t10,c12 CLA를 천연으로 생산하여 기능성 소재로 수출이 가능할 것이다 (본 소재가 성공적으로 개발될 경우 미국의 대표적인 CLA 제품 생산 및 판매회사인 Pharmanutrient사나 EAS에 원료납품관계를 논의 중).

### 3. CLA가 함유된 버섯자실체생산 가능성이 제시될 것이다.

가. 버섯균사체로부터 t10,c12 CLA를 생성하는 유전자를 클로닝여 t10,c12 CLA를 다량 함유하는 버섯자실체를 생산할 수 있는 새로운 버섯균주의 개발이 가능하다.

나. CLA가 함유된 버섯자실체가 갖는 여러 가지 유익한 특성에 관한 연구가 수행될 것이다. 즉, CLA의 산화억제효과에 의한 버섯자실체의 저장성 증진효과와 CLA의 항균성에 의한 버섯의 내병성의 증진도 기대된다.

## 제3장 연구개발 수행내용 및 결과

### 제1절 연구개발 수행내용

#### 1. 버섯균사체 유래 CLA 시료 조제 및 CLA 분석

##### 가. 버섯균사체 액체배양물로부터 CLA 함유시료의 조제

버섯균사체액체배양물로부터 버섯균사체와 배양물로부터 CLA함유 시료의 조제는 Figure 1과 동일한 방법으로 조제하였다.

##### 나. Methylation

버섯균사체로부터 얻은 총지질과 배양액으로부터 얻은 총지질 (50 mg)은 20% tetramethylguanidine/methanol (3 ml)로 100℃에서 5분간 가열한 다음, 1.0N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3 ml)로 55℃에서 5분간 가열하여 methyl화 하였다.

##### 다. GC 분석

FID 와 column (Supelcowax-10: 60 m × 0.32 mm, i.d., 25 μm film thickness)이 장착된 GC (HEWLETT PACKARD 5890)를 이용하여 분석하였다. 이때 oven temperature는 50℃에서 200℃ (10℃/min)이며, injection와 detector temperature는 260℃로 program하였다.

#### 2. CLA 생성 버섯균주의 선발

##### 가. PDA 배지에서의 버섯균주의 활성화 및 균사생장속도조사

(주)HK바이오텍이 보관중인 약 70가지의 버섯균주 중 [Table 1]에 표시된 버섯균주를 포함하는 다수의 균주를 PDA배지상에 접종하여 (접종량: 8 mm i.d. 원형) 24℃의 항온기에서 배양하면서 균사생장 속도를 조사하여 균주를 선발하였다.

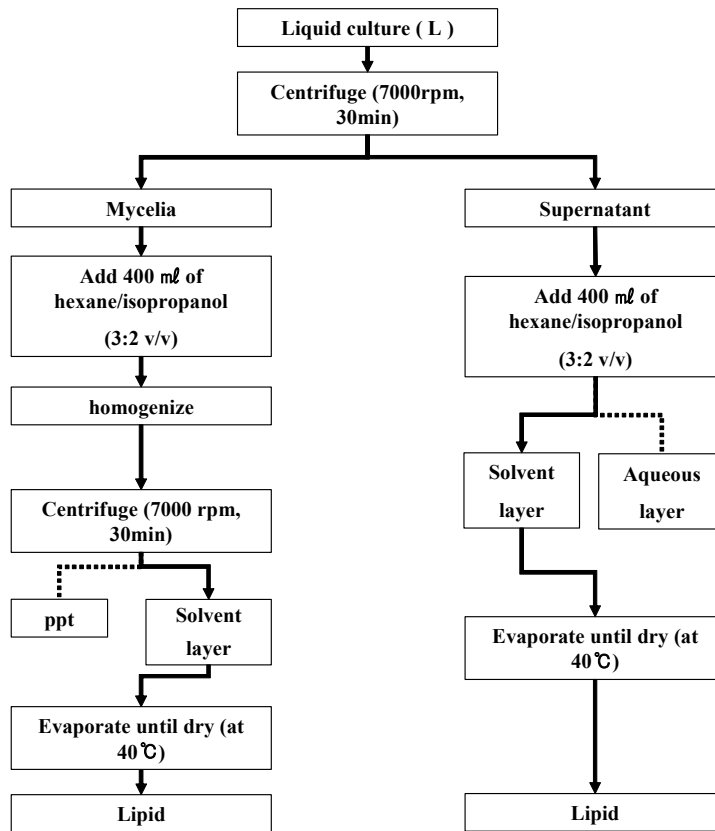


Figure 1. Extraction of lipids form mushroom mycelia in submerged liquid culture for CLA analysis.

나. PDA배지 조성

감자 200 g을 잘게 썰어 100°C에서 15분간 삶은 후 실온에서 충분히 식히고 homogenizer로 5분간 완전히 분쇄시켰다. 여기에 황백당 30 g, Bacto-agar 15 g을 각각 첨가하고, 증류수로 1 L 용량으로 보정하여 121°C에서 15분간 살균 한 후 지름 8.9 cm의 petri dish에 분주하여 배지로 사용하였다.

다. 균주의 선발

PDA배지상에서 균사생장이 빠른 균주를 선발한 다음, 기본액체배지 에서 액체배양하여 CLA를 다량으로 생성하는 균주를 선발하였다.

**Table 1.** 본 연구에 사용한 버섯균주

Number	Trivial Name	Scientific Name
1	아가리쿠스	<i>Agaricus Blazei</i>
2	목이버섯	<i>Auricularia auricula-judae</i>
3	먹물버섯	<i>Coprinus comatus</i>
4	번데기동충하초	<i>Cordyceps militaris</i>
5	팽이버섯	<i>Flammulina velutipes</i>
6	영지버섯	<i>Ganoderma lucidum</i>
7	표고버섯	<i>Lentinus edodes</i>
8	눈꽃동충하초	<i>Paecilomyces japonicus</i>
9	상황 HK1호	<i>Phellinus linteus</i>
10	느타리 (원형)	<i>Pleurotus ostreatus</i>
11	느타리 (여름)	<i>Pleurotus ostreatus</i>
12	느타리 (춘추)	<i>Pleurotus ostreatus</i>
13	느타리 (수한)	<i>Pleurotus ostreatus</i>
14	느타리 (삼복)	<i>Pleurotus ostreatus</i>
15	느타리 (HK1호)	<i>Pleurotus ostreatus</i>
16	송이버섯	<i>Tricholoma matsutake</i>

### 3. CLA 생성 배양조건 구명

#### 가. 최적의 CLA 생성조건 구명

##### 1) 기본액체배지 제조

대두박 4 g을 30분간 물에 불린 후 mixer로 3분정도 충분히 마쇄시키고, 여기에 황백당 20 g, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g과 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g을 첨가하여 증류수 1 L로 보정하였다. 액체배지를 500 ml 용량의 삼각플라스크에 300 ml 씩 분주하고 121 °C에서 30분간 고압멸균하여 액체 배지로 사용하였다.

##### 2) 기질의첨가

본사가 보유한 여러 가지 기질을 첨가하였다.

##### 3) 배양 온도

가) 항온 (20, 24, 30 °C)

나) 변온 (20, 24, 30 °C → 2, 4, 10 °C)

각 항온배양 완료 후 2, 4, 10 °C에서 배양하며, 이때 배양기간은 3~9일로 하였다. 예비실험으로부터 얻은 결과를 기준으로 하여 설정하였으나, 버섯균종에 따라 배지조성에 따라 수정될 수 있었다.

4) 통기량: 0.5, 1, 2 v/v/m

5) 배양기간: 항온 (3, 6, 9, 12, 15, 20, 30일) → 변온 (3, 6, 9일)

#### 나. 실험실 규모

##### 1) 삼각플라스크 배양

“3. 가.”의 방법에 준하여 기본배지와 서로 다른 기질과 배양조건하에서 500ml 분량의 삼각플라스크에서 5일 동안 배양하였다.

##### 2) 5 l 규모 액체배양

“3. 가.”의 방법에 준하여 기본배지와 서로 다른 기질과 배양조건하에서 본사 보유 5 l J-fermenter를 사용하여 5일간 배양하였다.

#### 다. 대량생산 규모 (5 kl 규모)

“3. 가.”의 방법에 준하여 최적배양조건으로 구명된 방법에 준하여 50 l, 500 l 액체배양조와 500 kl 발효조 [진주시 생물화학소재산업지원센터 (Bio21센터)의 장비]를 이용하여 대량 배양하였다.

#### 4. CLA 생성 효소의 분리 정제

##### 가. 배양

앞선 “3”에서 확립된 최적배양조건에 준하여 배양하였다.

##### 나. 단백질 회수 및 정량

###### 1) 단백질 회수

버섯균사체 액체배양액을 원심분리 (7,000 g, 30 min, 4℃)하여 상등액만을 취한다. 상등액은 0.45  $\mu\text{m}$  pore size의 membrane filter로 여과한 무균상등액을 얻었다. 분리된 단백질은 냉동고 (-20℃) 에서 보관하면서 사용하였다.

###### 2) 단백질 정량

단백질 농도측정은 Bradford방법에 준하여 실시하였다. Bio-Rad사의 protein assay kit를 사용하여 bovine serum albumin을 표준시료로 사용하여 595 nm에서 나타나는 흡광값으로 함량을 측정하였다.

##### 다. 단백질 분리 및 정제

###### 1) Ammonium sulfate 분획

버섯균사체 배양액의 상등액 일정량에 각각 ammonium sulfate를 10%간격으로 20~90%의 포화도가 되도록 첨가시킨 4℃에서 12시간 이상 방치한 후 원심분리 (7,000 rpm , 30 min, 4℃)하여 침전물과 상등액으로 분리하였다. 각 시료의 침전물과 상등액의 효소활성을 측정하여 활성분획을 얻기 위한 ammonium sulfate의 최적 포화농도를 측정하였다.

###### 2) Size exclusion chromatography

Ammonium sulfate 농도별 분획 중 가장 활성이 뛰어난 활성분획을 centrifugal filter로 탈염하여 농축시킨 후 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)으로 평형화시킨 Sephacryl S-200 (16/60) gel filtration column에 주입한 후 동일 buffer로 용출하면서 단백질의 크기에 따라 분리하였다. 용출속도는 0.5 ml/min으로 각 tube에 2 ml씩 분획한 다음, 효소의 활성을 측정하였다.



### 3) Ion exchange chromatography

Size exclusion chromatography로부터 얻어진 활성분획을 centrifugal filter로 농축하였다. 농축액 1 g을 0.15M NaCl 1 ml에 용해시킨 다음, 0.15M NaCl이 첨가된 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.8) buffer로 평형화시킨 ion exchange chromatography에 loading 시켰다. NaCl의 농도를 0.15M~1.0M 까지 증가되도록 한 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.8) buffer를 이용하여 5 ml/min의 용출속도로 각각의 tube에 10 ml씩 용출액을 수집하였다. 분획된 각각의 tube에 대하여 효소활성을 측정하였다.

### 4) Hydrophobic column chromatography

Ion exchange chromatography로부터 얻어진 활성분획 pool은 centrifugal filter로 농축한 후 1 g/1M ammonium sulfate가 되도록 용해하였다. 각각의 시료들은 1M ammonium sulfate가 첨가된 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.8)로 평형화시킨 phenyl-sepharose column에 주입하고 동일 buffer로 column을 세척한 다음 1.0~0M ammonium sulfate gradient 농도로 조절된 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.8)로 단백질을 용출하였다. 이때 얻어진 각각의 분획에 대한 효소활성을 측정하였다.

### 5) Hydroxyapatite column chromatography

Phenyl-sepharose column으로부터 분리한 활성분획을 Desalting column을 통과시켜 탈염시킨 후 10 mM phosphate buffer로 시료의 완충액을 교환하였다. 준비된 시료는 10 mM phosphate buffer로 평형화시킨 hydroxyapatite column에 주입한 후 500 mM phosphate buffer를 이용하여 완충액의 농도를 증가시키면서 1 ml/min의 용출속도로 단백질을 분리한다. 이때 얻어진 각각의 단백질 분획의 효소활성을 측정하였다.

### 6) 단백질의 분자량

단백질의 정제 과정을 확인하기 위해 Laemmli의 방법에 따라 12% SDS-polyacrylamide gel에 각 단계에서 얻어진 활성분획을 loading한 후 전기영동하였다. 분자량표준단백질로는 phosphorylase b (94 kDa), bovine serum albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa) 및  $\alpha$ -lactalbumin (14.4 kDa)이었다.

#### 라. 효소활성 검증

균사체 배양액 및 단백질 분리단계의 각 분획들의 CLA 생성 효소의 활성을 측정하기 위해 각각의 시료에 1,3-propanediol에 녹인 linoleic acid (2 mg/ml)를 첨가 한 후 shaking water bath (37°C, 140 rpm, 2hr)에서 반응시켰다. 반응액에서 생성된 CLA은 hexane으로 추출하여 Kim 등의 방법에 따라 GC로 분석한다. CLA 생성효소의 활성은 각각의 분획에 함유된 total protein을 정량하여 protein g당 CLA의 양으로 환산하였다.

### 5. CLA 대량생산

#### 가. 대량생산

##### 1) 정제된 효소 이용

CLA를 생성하는 균사체로부터 분리·정제된 효소와 linoleic acid를 최적 반응조건에서 반응시킨 다음 hexane으로 생성된 CLA를 추출하였다.

##### 2) 버섯균 이용

버섯균주 pool로부터 선발된 CLA 생성균주에 linoleic acid를 배양액에 1.0, 1.5, 2.0% 첨가하여 1 v/v/m의 공기를 주입하면서 24°C에서 5일간 배양하였다.

CLA를 생산하는 균의 활력이 좋을 경우 3일 이내에도 배양이 가능하였다.

### 6. CLA 버섯균사체 및 배양액의 제품화

#### 가. CLA의 제품

##### 1) c9,t11 CLA

##### 2) CLA mushroom mycelia

CLA함유 신령버섯균사체는 분말화하여 제품화하였다. 이는 직접 상품화하거나 정제 제조의 원료로 사용 될 수 있다.

##### 3) CLA mushroom mucelial extract

CLA함유 느타리버섯균사체배양액은 농축하여 엑기스로 제품화하거나 농축없이 음료원료로 사용하였다.

#### 나. 효소

버섯균사체배양물로부터 crude protein을 분획하여 동결건조한 다음, 분말화한 것을 제품화 하였다.

## 제2절 연구개발 결과

### 1. CLA 분석

버섯균사체 및 배양물로부터 유래한 총지질을 20% tetramethylguanidine/methanol (3 ml)로 100C에서 5분간 가열한 다음, 1,0N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3 ml)로 55C에서 5분간 가열하여 methyl화 하고, FID 와 column (Supelcowax-10: 60 m × 0.32 mm, i.d., 25 μm film thickness)이 장착된 GC (HEWLETT PACKARD 5890)를 이용하여 분석한 결과는 Figure 2와 같다. 버섯균사체나 배양액 중에는 총지질의 함량이 아주 낮고, 총지질 중에는 phospholipid 형 CLA와 유리형 CLA가 존재하기 때문 phospholipid 형 CLA를 methylation하는 방법에 준하여 methylation 한 다음 GC로 분석하였다. Figure 2에서 보는바와 총 CLA 중에서 c9,t11 CLA (RT: 16.18)가 major 였고 t10,c12 CLA (RT:16.92)는 minor였다.

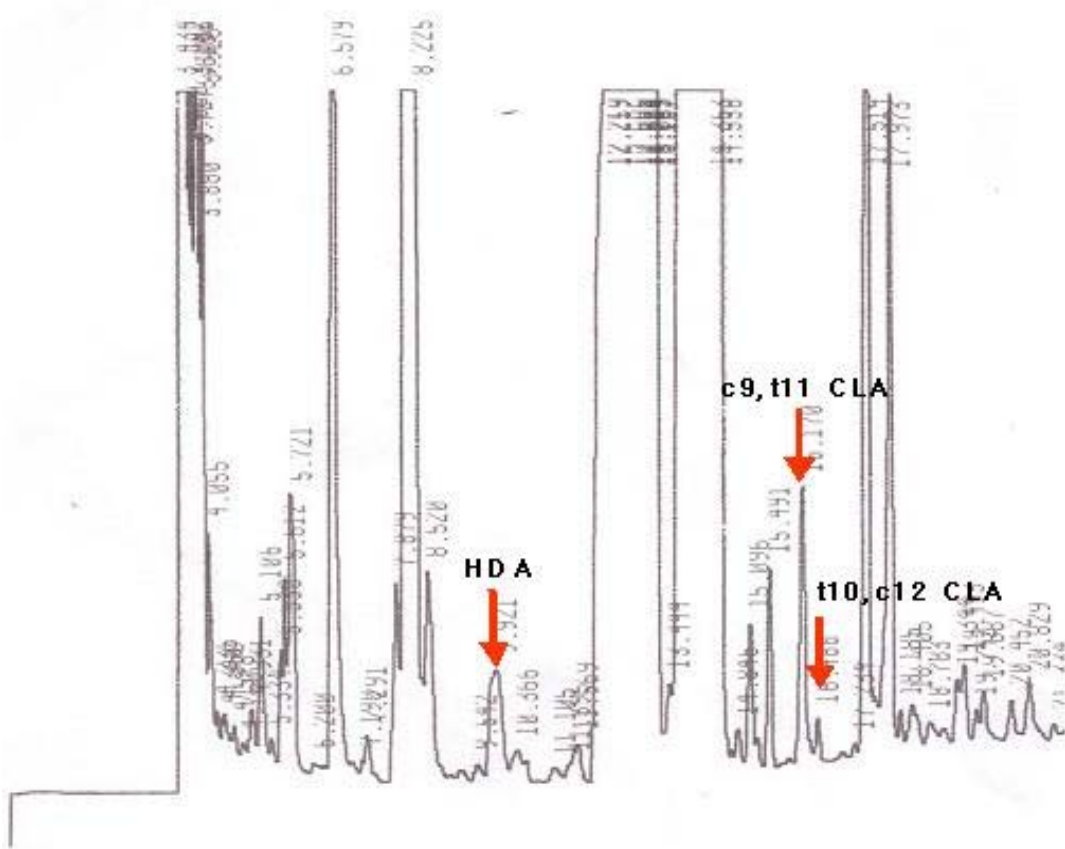
### 2. CLA 생성 버섯균주 선발

#### 요약

- PDA배지에서 균사 생장이 비교적 빠른 버섯은 영지, 느타리, 신령버섯이었고, 액체배양배지에서 생장이 빠른 균종은 동충하초, 먹물, 느타리버섯이었다.
- 대부분의 버섯균에서 CLA를 생산하였다.
- CLA생성이 우수한 균주는 먹물과 느타리버섯균 이었다

#### 가. PDA배지에서의 균주의 활성화조사

“제1절. 2. 나”의 방법으로 조제된 PDA배지에 버섯균사체 (지름 7 mm) 조각을 접종한 후 14일동안의 버섯균사체의 성장정도를 Table 2에 나타내었다. 균사의 생장이 가장 우수한 균주는 영지, 느타리 (춘추), 먹물, 느타리버섯 (수한)였다. 영지버섯의 경우 7일이내에 petri dish (85mm i.d.) 전역에 성장하였고, 느타리버섯 (춘추)은 10일, 먹물과 느타리버섯 (수한)은 14일 이내에 성장하였다. 신령버섯과 표고버섯은 14일까지 완전하게 성장하지는 않았지만 일반적인 성장속도였다. 동충하초, 상황버섯은 생장이 매우 느렸다.



#### 나. 액체배지에서 버섯균주의 성장

“1. 가.”의 방법으로 PDA배지에서 배양된 각각의 버섯균사체 (1/4 petri dish/△flask)를 지름 7 mm이하로 잘게 조각을 낸 다음 “제1절. 3. 가.”의 방법에 의해 조제된 액체배지가 담긴 삼각플라스크 접종하고 shaking incubator (130 rpm, 25℃, 8일)에서 배양하였다. 배양된 액체버섯균사체배양물 100 ml을 원심분리 (7,000 rpm, 30min, 4℃)하여 균사체를 회수한 다음 무게 (wet weight)를 측정하여 균사체 성장량을 측정하였다 (Table 3). 균사체생장이 가장 양호한 것은 동충하초 (57.8 g/l)였다. 느타리 (춘추), 먹물, 느타리버섯 (수한)은 각각 44.2, 42.1, 41.9 g/l로 균사체량이 많이 생성되었다. 신령, 영지, 표고버섯의 균사체량은 각각 18.6, 26.7, 19.6 g/l로 균사체 함량이 다소 적었다.

#### 다. CLA 생성확인

액체버섯균사체배양물을 원심분리 (7,000 rpm, 30min, 4℃)하여 배양액과 균사체를 분리하여 지방산 조성을 분석한 결과를 Table 4, 5에 나타내었다. 모든 버섯균사체들의 배양여액에는 CLA가 존재하지 않았다 (Table 4). 그러나 버섯균사체의 경우에는 동충하초를 제외한 대부분의 버섯균주에서 CLA가 생성되어졌다 (Table 5). CLA를 많이 생성한 균주는 느타리버섯으로 수한과 춘추가 각각 1.25, 1.20%를 생성하였다. 다음으로 먹물, 신령, 상황, 표고, 영지버섯균사체의 순으로 각각 1.16, 1.05, 0.5, 0.5, 0.3%의 CLA를 생성하였다. 균사체에서 CLA함량을 높게 나타낸 느타리 먹물, 신령버섯의 경우 다른 버섯균종에 비해 linoleic acid 함량이 43.51~66.90%로 높게 나타났다. 이것은 이들 버섯균들이 액체 배양과정에서 분비된 효소들에 의해 일부의 linoleic acid를 CLA로 바꾸는 것으로 생각된다.

Table 2. Growth of some mushroom mycelia (mm) on PDA media<sup>1)</sup>

No.	Mushroom strains <sup>2)</sup>	Incubation period (day)			
		3	7	10	14
1	AB	10.3	32.0	51.2	78.3
2	PJ	6.0	22.2	36.1	52.2
3	GL	50.5	85.0 <sup>3)</sup>		
4	LE	8.1	24.3	42.2	64.0
5	PL	6.3	14.0	22.0	34.1
6	CC	8.3	52.6	73.1	85.0 <sup>2)</sup>
7	PO-CH	16.6	56.7	85.0 <sup>2)</sup>	
8	PO-SH	14.0	40.5	62.0	85.0 <sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> PDA media included potato 200 g, brown-sugar 30 g and Bacto-agar 15 g per liter. This media sterilized by autoclave at 121 °C for 30 min. Mushroom mycelia was separated by centrifuge (7,000 rpm, 30min).

<sup>2)</sup> AB; *Agaricus blazei*, PJ; *Paecilomyces japonicus*, GL; *Ganoderma lucidum*, LE; *Lentinus edodes*, PL; *Phellinus linteus*, CC; *Coprinus comatus*, PO-CH; *Pleurotus ostreatus*(Chunchu), PO-SH; *Pleurotus ostreatus*(Suhan).

<sup>3)</sup> Fully-covered the plate.

Table 3. Growth of mushroom mycelia in submerged liquid culture<sup>1)</sup>

Mushroom strains <sup>2)</sup>	Mycelial weight (g/ℓ)
AB	18.6
PJ	57.8
GL	26.7
LE	19.6
PL	33.9
CC	42.1
PO-CH	44.2
PO-SH	41.9

<sup>1)</sup> Liquid media included soybean powder 4 g, brown-sugar 20 g, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g per liter. This media sterilized by autoclave at 121°C for 90 min. Mushroom mycelia was separated by centrifuge (7,000 rpm, 30min).

<sup>2)</sup> AB; *Agaricus blazei*, PJ; *Paecilomyces japonicus*, GL; *Ganoderma lucidum*, LE; *Lentinus edodes*, PL; *Phellinus linteus*, CC; *Coprinus comatus*, PO-CH; *Pleurotus ostreatus* (Chunchu), PO-SH; *Pleurotus ostreatus* (Suhan).

Table 4. Composition of fatty acids in the total lipid of supernatant (%)

Fatty acid	Mushroom strains <sup>1)</sup>							
	AB	PJ	GL	LE	PL	CC	PO-(CH)	PO-(SH)
12:0	- <sup>2)</sup>	-	-	-	-	-	-	-
14:0	0.30	-	-	-	-	-	5.62	1.63
14:1	-	-	-	-	-	-	-	-
16:0	6.74	5.93	18.96	3.92	40.08	35.86	30.21	18.15
16:1	5.21	-	-	-	-	-	-	-
18:0	1.01	1.81	1.02	-	-	5.25	18.39	6.91
18:1	1.77	23.61	50.29	55.82	15.11	20.26	17.15	19.32
18:2	84.97	68.65	29.73	40.26	44.81	38.63	28.63	53.99
LN	-	-	-	-	-	-	-	-
CLA	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	100	100	100	100	100	100	100	100

<sup>1)</sup> Gaschromatograph (Hewlett Packard 5890) condition. Column, Supelcowax-10 (60 m×0.32 mm); Detector, FID; Carrier gas, N<sub>2</sub> gas (2 ml/min); initial oven temperature, 180°C (5 min); final temperature, 220°C (20 min); Rate, 5°C/min.

<sup>2)</sup> AB; *Agaricus blazei*, PJ; *Paecilomyces japonicus*, GL; *Ganoderma lucidum*, LE; *Lentinus edodes*, PL; *Phellinus linteus*, CC; *Coprinus comatus*, PO-CH; *Pleurotus ostreatus* (Chunchu), PO-SH; *Pleurotus ostreatus* (Suhan).

<sup>2)</sup> Not detected.



Table 5. Composition of fatty acids in the total lipid of mushroom mycelia (%)<sup>1)</sup>

Fatty acid	Mushroom strains <sup>2)</sup>							
	AB	PJ	GL	LE	PL	CC	PO-(CH)	PO-(SH)
12:0	0.30	- <sup>3)</sup>	-	0.21	0.43	-	0.85	1.56
14:0	1.16	0.35	0.64	0.69	0.47	0.65	2.79	2.08
14:1	0.32	-	-	-	-	-	-	-
16:0	16.73	16.73	24.23	24.78	33.88	23.63	24.92	21.95
16:1	15.28	1.68	-	-	1.42	-	0.78	0.86
18:0	4.39	4.99	6.57	5.92	11.28	6.87	11.27	9.83
18:1	6.23	53.33	36.48	23.90	11.33	18.71	13.53	9.60
18:2	66.69	19.37	29.25	28.58	39.35	46.70	43.51	51.33
LN	1.65	3.56	0.79	14.47	1.35	2.28	1.15	1.54
CLA	1.05	-	0.30	0.50	0.50	1.16	1.20	1.25
Total	100	100	100	100	100	100	100	100

<sup>1)</sup> Gaschromatograph (Hewlett Packard 5890) condition. Column, Supelcowax-10 (60 m×0.32 mm); Detector, FID; Carrier gas, N<sub>2</sub> gas (2 ml/min); initial oven temperature, 180°C (5 min); final temperature, 220°C (20 min); Rate, 5°C/min. Mushroom mycelia was separated by centrifuge (7,000 rpm, 30min).

<sup>2)</sup> AB; *Agaricus blazei*, PJ; *Paecilomyces japonicus*, GL; *Ganoderma lucidum*, LE; *Lentinus edodes*, PL; *Phellinus linteus*, CC; *Coprinus comatus*, PO-CH; *Pleurotus ostreatus* (Chunchu), PO-SH; *Pleurotus ostreatus* (Suhan).

<sup>3)</sup> Not detected.

### 3. CLA 생성 배양조건 구명

#### 요약

- 삼각플라스크배양에서 버섯균주가 CLA를 높게 생성시키는 최적의 조건은 다음과 같다. 기본배지에 대두를 4% (40 g/l)첨가한 후 pH를 5.5로 조절한 후, 130 rpm에서 8일간 배양 하였을 때 CLA의 생성이 가장 우수하였다.
- 5 l 규모의 액체배양에서는 삼각플라스크에서 배양된 접종원을 접종한 다음, 1.0 v/v/m의 공기를 주입하면서 25℃에서 8일간 배양하였을 때 CLA의 생성이 가장 우수하였다.

#### 가. 대량배양

##### 1) 삼각플라스크 배양

대두박분해물 0.4%, 황백당 2%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05%,  $KH_2PO_4$  0.05%가 첨가된 액체배지 (300 ml)를 삼각플라스크 (500 ml)에 첨가하고 고압멸균 (121℃, 30분)한 다음, 실온에서 충분히 식힌 후 PDA배지에서 생육한 버섯균주 (1/4 petri dish/ $\Delta$ flask)를 지름 7 mm이하로 잘게 잘라 접종하고 shaking incubator (130 rpm, 25℃, 8일)에서 배양하였다 (Figure 3). 삼각플라스크배양물은 대량배양의 seed로 사용되거나 그 자체를 CLA 생성 최적배양조건의 시험물로 사용하였다.



Figure 3. Submerged culture of mushrooms.

2) 5 ℓ 규모 액체배양

삼각플라스크 배양에서 가장 우수한 CLA 생성 배지배양조건으로 조제된 액체배지를 5 ℓ 용량의 J-fermenter에 3 ℓ 첨가한 후 고압멸균 (121℃, 20 min)한 후 삼각플라스크 (300 ml) 배양체 한병을 접종하여 배양 (130 rpm, 25℃, 8일) 하였다. 배양이 완료된 액체버섯균사체는 CLA의 분석시료로 사용하였다 (Figure 4).

3) 50 ℓ 배양

삼각플라스크 배양에서 가장 우수한 CLA 생성 배지배양조건으로 조제된 액체배지를 50 ℓ 용량의 배양기에 30 ℓ 첨가한 후 고압멸균 (121℃, 60 min)한 후 삼각플라스크 (300 ml) 배양체 10병을 접종하여 배양 (130 rpm, 25℃, 3일, 1 v/v/m) 하였다 (Figure 5).

#### 4) 500 ℓ 배양

삼각플라스크 배양에서 가장 우수한 CLA 생성 배지배양조건으로 조제된 액체배지를 500 ℓ 용량의 배양기에 350 ℓ 첨가한 후 고압멸균 (121℃, 60 min)한 후 50 ℓ 배양조에서 배양한 균주를 배양 (130 rpm, 25℃, 3일, 1 v/v/m) 하였다 (Figure 6).



Figure 4. The submerged liquid culture in the 5 ℓ J-fermenter.



Figure 5. The submerged liquid culture in the 50 ℓ fermenter.



Figure 6. The submerged liquid culture in the 500 ℓ fermenter.

#### 나. 5 kl 배양

대두박분해물 0.4%, 황백당 2%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%가 첨가된 액체배지 (3,500 ℓ)를 대량배양조 (5,000 ℓ)에 첨가하고 고압멸균 (121℃, 60분)한 다음, 냉각조를 이용하여 충분히 식힌 후 500 ℓ 배양조에서 배양된 균사체 액체배양물을 접종한 후 5 kl 배양조 (75 rpm, 25℃, 3일) 배양하여 3.5 kl의 배양물을 얻었다 (Figure 7).



Figure 7. The submerged liquid culture in the 5 kL fermenter.

다. 최적의 CLA 생성조건 구명

1) 기본액체배지에서 CLA 생성 (5 l J-fermenter 사용)

가) 배지

대두박 4 g을 30분간 물에 불린 후 mixer로 3분 정도 충분히 마쇄 시키고, 여기에 황백당 20 g,  $MgSO_4$  0.5 g과  $KH_2PO_4$  0.5 g을 첨가하여 증류수 1 l로 보정하였다. 액체배지를 500 ml 용량의 삼각플라스크에 300 ml 씩 분주하고 121°C에서 30분간 고압멸균하여 액체 배지로 사용하였다.

나) CLA 함량

신령, 먹물, 느타리버섯을 각각 50 l fermenter에서 배양한 다음 CLA 함량의 분포 (배양액, 균사표면, 균사체 내)를 조사하였다. 이 배양물의 주요 성분은 Table 6에서 보는 바와 같이 버섯균주에 따라 차이가 있었지만 신령버섯균사체배양물, 느타리버섯균사체배양물, 먹물버섯균사체배양물의 균사체의 함량은 1 l 당 wet weight로 약 23.9 g, 39.8 g, 27.8 g/l 이었다. 또한 protein의 함량은 서로 비슷하여 약 1.06 g/l 수준이었다. 그리고 지방함량은

각각 180, 210, 160 mg/ℓ 으로 그 함량이 낮았다. 특히 지방중의 CLA의 전구물질인 LA의 함량은 전체 지방산의 약 1% 정도로 아주 낮아 다량의 CLA를 합성할 시에는 linoleic acid를 첨가할 필요가 있었다.

액체버섯균주체배양물 (배양액+균사체)에 함유되어 있는 CLA를 분석하여 Figure 13에 나타내었다. 액체버섯균사체배양물에 함유되어 있는 CLA는 c9,t11 CLA 이성체가 주를 이루었다. 이는 미생물 (*L. reuteri* 등)에 의하여 생성되는 CLA이성체와 동일한 것이다. 하지만, 액체버섯균사체배양액 중에 함유된 총지방의 함량 (160~210 mg/ℓ)은 매우 낮고 이것은 LA의 함량 또한 매우 낮게 (1.6 mg/ℓ 이하) 나타났다. 그 결과로 생성된 c9,t11 CLA의 함량도 높지 않았다. 따라서 CLA의 함량을 높이기 위해서는 인위적으로 배지에 홍화유와 같은 LA함량이 높은 기질을 첨가하여 LA를 CLA로 바꾸는 효소의 활성을 높여주는 기질로 이용할 필요가 있었다. 따라서 차기 시험에서 고순도의 LA를 함유하는 기질의 첨가에 따른 CLA 생성량을 조사하였다.

Table 6. Some chemical constituents of submerged liquid culture of mushroom strains

Fraction	<i>Agaricus blazei</i>	<i>Pleuroteus ostreatus</i>	<i>Coprinus comatus</i>
	(mg/ℓ)	(mg/ℓ)	(mg/ℓ)
Total Sugar <sup>1)</sup>	13,250	13,000	12,500
Glycoproteins	750	750	580
Glycolipids	210	210	160
Protein <sup>2)</sup>	1,060	1,060	1,010
Lipids <sup>3)</sup>	180	210	160
Mycelia <sup>4)</sup>	23,880	39,811	27,835
<b>Total Solid</b>	<b>39,330</b>	<b>55,041</b>	<b>42,245</b>

1) Total sugar was mainly consisted of β-glucan.

2) Protein included some of peptides.

3) Linoleic acid content was less than 1% of total fatty acid contents.

4) Wet weight basis.

## 2) LA의 첨가영향

### 가) 식물성유

고농도의 CLA생성을 위하여 CLA생성의 전구체가되는 고농도의 LA를 함유하는 기질을 첨가하여 배양중의 액체버섯균사체배양물의 CLA함량변화를 조사하였다 (Table 7). 해바라기씨, 홍화씨, 대두를 검화한 다음 각각 5, 10, 15 g씩 mixer로 충분히 마쇄한 후 250 ml의 기본배지가 함유된 배양기에 첨가하여 121℃에서 15분간 고압 멸균하여 기질첨가 배지로 사용하여 shaking incubator에서 배양 (130 rpm, 24℃, 8일) 하였다.

홍화씨를 기질로 사용한 배지의 경우 먹물과 느타리버섯 모두 10 g 첨가 배지에서 CLA함량이 각각 3.67, 3.71%로 다른 함량의 배지보다 높게 나타났다. 해바라기씨와 대두를 기질로 사용하였을 경우 해바라기씨 10 g 첨가배지에는 3.51, 3.16%, 대두 10 g 첨가배지에는 3.59, 3.32%로 다른 함량보다 높게 나타났다 (Table 7).

기질의 첨가량에 따른 실험결과 각 기질들은 5 g을 첨가한 것 보다 10 g을 첨가한 배지에서 CLA 함량이 높게 나타났다. 그러나 서로 다른 기질의 사용에서 생성되는 CLA의 생성량에는 큰 차이를 보이지 않았다. 반면 종류가 서로다른 기질을 15 g씩 첨가된 배지에서는 CLA의 생성이 매우 낮게 나타났다. 이상의 결과로 볼 때 이것은 균사체가 분비하는 효소가 수용하는 기질의 농도가 10 g이었을 때 최대의 활성을 가진다는 것을 의미한다. 또한 기질의 농도가 과다할 경우 CLA의 생성이 제대로 이루어지지 않는 것으로 보아 기질 그 자체가 최종산물의 생성을 억제하는 억제제가 되는 feedback inhibition이 이루어지는 것을 알 수가 있었다. 이처럼 기질의 종류에 따른 CLA 함량이 비슷하다면 가격이 저렴하면서 CLA함량은 비교적 높게 나타나는 대두를 기질첨가 재료로 하여 재료비 절감과 대량생산 체계를 갖출 수 있는 조건으로 차기 실험에 임하였다.



Table 7. Production of CLA (%) by mushroom mycelia cultured with different substrates in the submerged liquid culture

Substrates	Mycelia (CLA %)		
	CC <sup>1)</sup>	PO-SH <sup>2)</sup>	
Sunflower seed	5 g	1.65	1.38
	10 g	3.51	3.16
	15 g	1.01	0.96
Safflower seed	5 g	1.34	1.62
	10 g	3.67	3.71
	15 g	1.18	1.33
Soybean	5 g	1.71	1.50
	10 g	3.59	3.32
	15 g	0.86	1.16

<sup>1)</sup> CC; *Coprinus comatus*.

<sup>2)</sup> PO-SH; *Pleurotus ostreatus* (Suhan).

#### 나) 홍화유첨가 농도

버섯균사체에 존재하는 LIase는 배지에 함유된 LA를 이용하여 *c9,t11* CLA를 생합성한다. 본 연구에서 사용한 배지에는 지방산, 특히 LA의 함량이 매우 낮기 때문에 CLA의 함량을 높이기 위하여 LA의 함량이 높은 홍화유와 같은 유지기질을 첨가할 필요성이 있다. 따라서 홍화유 (LA 함량이 약 70%)를 배양액에 0.4%되게 첨가하여 액체신령버섯균사체를 배양하였다. 홍화유를 첨가함으로써 인하여 *c9,t11* CLA와 *t10,c12* CLA가 상당량 생성되는 것을 확인 하였다 (Mass spectrum에 의해 확인됨).

따라서 CLA의 생성 능력이 높은 신령버섯, 먹물버섯, 느타리버섯 균사체를 배양할 때 기본배지에 0.4% 홍화유를 추가로 첨가한 후 배양 (5 l)하여 *c9,t11* CLA의 함량을 조사하였다. 액체버섯균사체를 배양한 후, 배양액, 균사체표면, 균사체내에 함유되어있는 CLA의 함량을 조사하기 위해 균사체를 제거한 배양액을 hexane으로 추출하였고, 균사체표면에 부착되어있는 CLA도 hexane으로 추출하였고, 균사체를 파쇄하여 hexane으로 추출하여 CLA의 함량을 GC로 분석하였다 (Table 8). 세 버섯균주 공히 균사체내에 가장 많은

c9,t11 CLA가 함유되어 있었다. 그리고 버섯균사체에 부착되었거나 배양액에 함유되어 있는 CLA함량은 버섯균에 따라 다소 차이가 있었지만 버섯균사체내에 함유되어 있었던 CLA 함량보다 낮았다. 그리고 c9,t11 CLA가 t10,c12 CLA의 함량은 버섯균주에 따라 다소 차이가 있었지만, c9,t11 CLA가 약 5배정도 높았다. Llase는 LA를 c9,t11 CLA로만 전환을 하는데, 이 경우에 t10,c12 CLA가 검출된 것은 배양과정 중 LA가 자동산화될 거치는 중 일부 생성된 것이 아닌가 생각된다. 신령버섯균사체배양액의 경우에는 총 CLA는 약 13,953  $\mu\text{g}/\ell$  이었고, 그 중 버섯균사체내에 10,508  $\mu\text{g}/\ell$ , 버섯균사체에 흡착된 CLA가 약 3,281  $\mu\text{g}/\ell$  이었다. 먹물버섯균사체배양액은 총 CLA는 약 6,885  $\mu\text{g}/\ell$  이었고, 그 중 버섯균사체내에 5,648  $\mu\text{g}/\ell$ , 버섯균사체에 흡착된 CLA가 약 1,020  $\mu\text{g}/\ell$  으로 신령버섯균사체배양액의 약 절반수준의 CLA 생성을 나타내었다. 그러나 느타리버섯균사체 배양물의 경우는 총 CLA의 함량이 1,826  $\mu\text{g}/\ell$  로 그 생성량이 매우 낮았다. 버섯균사체배양액 용액중의 CLA함량은 느타리, 먹물, 신령버섯순으로 623, 217, 164  $\mu\text{g}/\ell$  으로 버섯균사체 내의 결과와는 반대의 결과가 나타났다. 이것으로 보아 버섯균의 종류에 따라 CLA를 합성하여 체내에 축적하는 종과 체외로 배출하는 종이 서로 다르게 존재하는 사실을 발견하였다.

이상의 결과로 볼 때, 균사체내의 축적 CLA를 이용한 캡슐이나 정제의 생산에는 신령버섯균사체를 활용하는 것이 바람직하고, 드링크류나 배양 배양액 그자체를 활용할 경우는 느타리버섯균을 이용하는 것이 바람직 할것으로 생각된다. 세 가지 버섯균주 공히 균사체내에 CLA가 많이 분포되어 있었는데 이는 배지 중의 LA가 CLA로 전환된 다음, 균사체내로 흡수되는 것인지, Llase가 균사체내에서 작용하여 세포막에 incorporation하는 것인지 하는 기작에 관한 연구는 계속되어야 할 것이다.

Table 8. Concentration of *c9,t11* CLA and *t10,c12* CLA in the mushroom mycelia cultured with safflower seed oil (0.4%)<sup>1)</sup>

CLA isomer	AB ( $\mu\text{g}/\ell$ )				PO ( $\mu\text{g}/\ell$ )				CC ( $\mu\text{g}/\ell$ )			
	SM <sup>2)</sup>	AM <sup>3)</sup>	IM <sup>4)</sup>	Total	SM <sup>2)</sup>	AM <sup>3)</sup>	IM <sup>4)</sup>	Total	SM <sup>2)</sup>	AM <sup>3)</sup>	IM <sup>4)</sup>	Total
<i>c9,t11</i> CLA	164	2,294	7,697	10,155	527	321	613	1,461	89	663	5,489	6,241
<i>t10,c12</i> CLA	-	987	2,811	3,798	96	86	183	365	128	357	159	644
	164	3,281	10,508	13,953	623	407	796	1,826	217	1,020	5,648	6,885

<sup>1)</sup> Gaschromatograph (Hewlett Packard 5890) condition. Column, Supelcowax-10 (60 m $\times$ 0.32 mm); Detector, FID; Carrier gas, N<sub>2</sub> gas (2 ml/min); initial oven temperature, 180 $^{\circ}$ C (5 min); final temperature, 220 $^{\circ}$ C (20 min); Rate, 5 $^{\circ}$ C/min.

<sup>2)</sup> CLA in the supernatant from mushroom mycelia culture by centrifugation (7,000 rpm, 30 min).

<sup>3)</sup> CLA adsorbed on the surface of mushroom mycelia.

<sup>4)</sup> CLA in the cell membrane and/or cytosol of mushroom mycelia.

LA를 많이 함유 (약 70%)하고 있는 홍화유의 첨가에 의하여 균사체의 CLA의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과 0.4%의 홍화유의 첨가로 CLA의 생성량이 증가됨을 알 수 있었다 (Table 8). 따라서 홍화유의 농도를 조절하였을 때의 버섯균들의 CLA의 생성량 정도를 측정하였다 (Table 9).

홍화유를 기본배지에 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8% 첨가하고 신령버섯균사체를 배양 (low temperature incubator, 130 rpm, 24 $^{\circ}$ C, 8일) 한 후의 CLA 생성량을 조사하였다. 홍화유를 기본배지에 0.6%와 0.8% 첨가하였을 배양하였을 경우, 과량의 지질함량으로 균사체의 생육을 저하시켜 균사의 생장이 불가능하였다 (data not shown). 그러나 0.2%와 0.4% 첨가구에서는 균사체의 생육이 양호하였다. 이는 고농도의 홍화유가 균사체표면을 감싸고 있어서 균사체의 호흡장애가 일어나 생육이 저조한 것으로 생각된다.

홍화유를 첨가하지 않은 대조구의 경우에는 총 CLA 함량 2,471  $\mu\text{g}/\ell$  중 약

66%에 해당하는 1,268  $\mu\text{g}/\ell$  가 군사체배양액 용액상에 존재하였다. 반면 0.2% 홍화유를 첨가할 경우 총 CLA 함량 6,885  $\mu\text{g}/\ell$  중 0.4%에 해당하는 217  $\mu\text{g}/\ell$  만이 군사체배양액 용액에 존재하였다. 0.4% 홍화유 첨가에 의해서는 총 CLA 함량 13,593  $\mu\text{g}/\ell$  중 164  $\mu\text{g}/\ell$  만이 군사체배양액 용액에 존재하는 사실을 알았다. 홍화유를 첨가하지 않은 대조구의 경우 배양물자체에 존재하는 LA를 군사체가 흡수하여 체내에서 CLA하였다가 용액과 체내에 균일한 농도로 조절하여 배출하는 것으로 보인다. 그러나 반하여 홍화유를 첨가하고 그농도가 높아짐에 따라 용액상에 CLA의 함량이 적은 것으로 보아 홍화유의 첨가에 의해 급격히 늘어난 LA를 버섯군사체가 흡수하고 CLA를 합성을 하였으나 기질내에 다른 지방산과의 농도 조절에 의하여 CLA만을 체내에 축적하고 다른 지방산을 체외로 배출함으로써 지방산의 균형을 이루는 것으로 생각된다.

0.4%의 홍화유를 첨가한 처리구는 대조구에 비하여 약 22%의 군사체 무게가 증가하였다. 홍화유 0.4%를 첨가한 다음, 24시간이 경과하였을 때, 육안으로 관찰된 군사체의 배양 상태는 매우 양호한 것으로 관찰되었다. 이것은 홍화유의 다량유입으로 이를 중에 포함된 LA를 이용하여 CLA로 변화시키는 과정에서 많은 생리적 활성에 의하여 군사체의 생육이 증가된 것으로 생각된다. 또한 홍화유 첨가 농도에 따라서 c9,t11 CLA와 t10,c12 CLA의 함량비가 달랐다. 이들 CLA의 함량은 홍화유첨가 농도에 따라 차이가 있었지만, 0.2% 홍화유를 첨가하였을 경우, c9,t11 CLA가 군사체내에 선택적으로 분포되었다. 홍화유를 첨가하지 않은 경우의 총 CLA 함량은 배양액 2,471  $\mu\text{g}/\ell$  함유되어 있었고, 0.2% 홍화유를 첨가한 경우에는 약 6,885  $\mu\text{g}/\ell$  이었고, 0.4% 첨가한 경우에는 약 13,953  $\mu\text{g}/\ell$  이었다.

이상의 결과로 볼 때, LA함량이 높은 홍화유를 과량으로 첨가하지 않은 0.4% 수준의 농도에서 농도가 증가함으로 군사체의 생성량이 증가함을 알 수 있었다. 이렇게 군사체내의 CLA의 생성량이 많은 신령버섯군사체를 이용하여 배양액 속에도 다량의 CLA를 생성하게 하기 위해서는 저농도 (0.2% 미만)의 홍화유첨가에 의해서도 충분히 용액에서도 많은 CLA를 생성시킬수 있을 것으로 생각된다. 이 경우 배양액을 농축하여 엑기스로 사용할 수 있기 때문에 고농도의 CLA를 생산하기 위해서는 배양액을 농축 (40배까지는 쉽게 농축이 됨) 하여 52 mg/ $\ell$ 의 CLA를 함유하는 농축액을 생산할 수 있다. 이 이상의 농축 (40배 이상

농축)은 점도 때문에 농축액기스로 사용할 수 없었다. 또한 버섯균사체를 사용할 경우에는 0.4% 홍화유를 첨가하는 것이 바람직하다고 생각된다. 또한, 균사체배양을 충분히 하여 균사체량을 늘리면 균사체내에 축적되는 CLA의 함량을 높일 수 있을 것으로 생각된다.

Table 9. Concentrations of *c,t* CLA and *t,c* CLA in the *Agaricus blazei* mushroom mycelia cultured with safflower seed oil at different concentrations

CLA isomer	0% Safflower oil ( $\mu\text{g}/\ell$ )				0.2% Safflower oil ( $\mu\text{g}/\ell$ )				0.4% Safflower oil ( $\mu\text{g}/\ell$ )			
	SM <sup>2)</sup>	AM <sup>3)</sup>	IM <sup>4)</sup>	Total	SM <sup>2)</sup>	AM <sup>3)</sup>	IM <sup>4)</sup>	Total	SM <sup>2)</sup>	AM <sup>3)</sup>	IM <sup>4)</sup>	Total
<i>c9,t11</i> CLA	972	321	613	1,906	89	663	5,489	6,241	164	2,294	7,697	10,155
<i>t10,c12</i> CLA	296	86	183	565	128	357	159	644	-	987	2,811	3,798
Total	1,268	407	796	2,471	217	1,020	5,648	6,885	164	3,281	10,508	13,953

<sup>1)</sup> Gaschromatograph (Hewlett Packard 5890) condition. Column, Supelcowax-10 (60 m×0.32 mm); Detector, FID; Carrier gas, N<sub>2</sub> gas (2 ml/min); initial oven temperature, 180°C (5 min); final temperature, 220°C (20 min); Rate, 5°C/min.

<sup>2)</sup> CLA in the supernatant from mushroom mycelia culture by centrifugation (7,000 rpm, 30 min).

<sup>3)</sup> CLA adsorbed on the surface of mushroom mycelia.

<sup>4)</sup> CLA in the cell membrane and/or cytosol of mushroom mycelia.

### 3) 배지의 pH

0.1 N-HCl 또는 0.1 N-NaOH를 사용하여 pH를 조절 (4.5, 5.0, 5.5, 6.5)한 대두첨가배지 (40 g/ℓ)기본배지에서 먹물버섯과 느타리버섯 (수환)을 배양 (low temperature, 130 rpm, 24°C, 8일) 하여 CLA생성량을 관찰하였다 (Table 10). 두 균주 모두 pH 5.5에서 4.13, 3.98%로 가장 높은 CLA를 생성하였다. 버섯균사체의 성장 역시 pH 5.5에서 가장 활발하였음을 육안으로도 확인 가능하였다. 따라서 pH 5.5를 최적 pH로 결정하고 차기 실험에 임하였다.

Table 10. Effect of pH on the production of CLA (%) by mushroom mycelia in the submerged liquid culture containing soybean (40 g/ℓ)

pH	Mycelia (CLA %)	
	CC <sup>2)</sup>	PO-SH <sup>3)</sup>
4.5	0.95	0.53
5.0	3.65	2.73
5.5	4.13	3.91
6.5	3.31	3.10

<sup>1)</sup> Gaschromatograph (Hewlett Packard 5890) condition. Column, Supelcowax-10 (60 m×0.32 mm); Detector, FID; Carrier gas, N<sub>2</sub> gas (2 ml/min); initial oven temperature, 180°C (5 min); final temperature, 220°C (20 min); Rate, 5°C/min.

<sup>2)</sup> CC; *Coprinus comatus*...

<sup>3)</sup> PO-SH; *Pleurotus ostreatus* (Suhan).

#### 4) 배양 온도

##### 가) 항온

먹물버섯과 느타리버섯 (수한)을 대두 (40 g/ℓ) 첨가배지에 접종하여 각각 다른 배양온도 (20, 25 30°C)에서 배양하여 CLA 생성량을 관찰하였다 (Table 11). CLA 생성량은 25°C에서 각각 3.52 %, 3.71%로 가장 높게 나타났다. 따라서 최적 배양온도를 25°C로 하여 차기실험에 임하였다.

Table 11. Effect of temperature on the production of CLA (%) from mushroom mycelia in the submerged liquid culture prepared with soybean<sup>1)</sup>

Temperature (°C)	Mycelia (CLA %)	
	CC <sup>2)</sup>	PO-SH <sup>3)</sup>
20	0.91	1.05
25	3.52	3.71
30	2.35	2.56

<sup>1)</sup> Gaschromatograph (Hewlett Packard 5890) condition. Column, Supelcowax-10 (60 m×0.32 mm); Detector, FID; Carrier gas, N<sub>2</sub> gas (2 ml/min); initial oven temperature, 180°C (5 min); final temperature, 220°C (20 min); Rate, 5°C/min.

<sup>2)</sup> CC; *Coprinus comatus*...

<sup>3)</sup> PO-SH; *Pleurotus ostreatus* (Suhan).

나) 변온;

먹물버섯과 느타리버섯 (수한)을 대두 (40 g/ℓ) 첨가배지에 접종하여 각각 다른 배양온도 (20, 25 30℃)에서 배양한 뒤 변환온도 (2, 4, 10℃)로 전환시켜 변온배양을 실시한 후 CLA생성량을 관찰하였다 (Table 12, Table 13 Table 14). CLA생성량은 항온배양에서의 생성량보다 많이 감소하였다. 변온환경에서 CLA의 생성보다는 항온환경에서의 CLA생성능이 높으므로 항온에서의 최대 생산량을 가지는 25℃를 설정한 뒤 차기실험에 임하였다.

Table 12. Effect of temperature on the production of CLA (%) from mushroom mycelia in the submerged liquid culture prepared with soybean

Temperature (°C)	Mycelia (CLA %)	
	CC <sup>1)</sup>	PO-SH <sup>2)</sup>
20 → 2	0.18	0.26
20 → 4	1.58	1.67
20 → 10	1.29	1.40

<sup>1)</sup> Gaschromatograph (Hewlett Packard 5890) condition. Column, Supelcowax-10 (60 m×0.32 mm); Detector, FID; Carrier gas, N<sub>2</sub> gas (2 ml/min); initial oven temperature, 180℃ (5 min); final temperature, 220℃ (20 min); Rate, 5℃/min.

<sup>2)</sup> CC; *Coprinus comatus*...

<sup>3)</sup> PO-SH; *Pleurotus ostreatus* (Suhan).

Table 13. Effect of temperature on the production of CLA (%) from mushroom mycelia in the submerged liquid culture prepared with soybean

Temperature (°C)	Mycelia (CLA %)	
	CC <sup>1)</sup>	PO-SH <sup>2)</sup>
25 → 2	0.27	0.31
25 → 4	1.76	1.11
25 → 10	1.18	1.28

<sup>1)</sup> Gaschromatograph (Hewlett Packard 5890) condition. Column, Supelcowax-10 (60 m×0.32 mm); Detector, FID; Carrier gas, N<sub>2</sub> gas (2 ml/min); initial oven temperature, 180℃ (5 min); final temperature, 220℃ (20 min); Rate, 5℃/min.

<sup>2)</sup> CC; *Coprinus comatus*...

<sup>3)</sup> PO-SH; *Pleurotus ostreatus* (Suhan).

Table 14. Effect of temperature on the production of CLA (%) from mushroom mycelia in the submerged liquid culture prepared with soybean

Temperature (°C)	Mycelia (CLA %)	
	CC <sup>1)</sup>	PO-SH <sup>2)</sup>
30 → 2	0.24	0.28
30 → 4	1.65	1.74
30 → 10	1.11	1.22

<sup>1)</sup> Gaschromatograph (Hewlett Packard 5890) condition. Column, Supelcowax-10 (60 m×0.32 mm); Detector, FID; Carrier gas, N<sub>2</sub> gas (2 ml/min); initial oven temperature, 180°C (5 min); final temperature, 220°C (20 min); Rate, 5°C/min.

<sup>2)</sup> CC; *Coprinus comatus*...

<sup>3)</sup> PO-SH; *Pleurotus ostreatus* (Suhan).

#### 5) 진탕속도

먹물버섯, 느타리버섯 (수한)을 pH가 5.5로 조절된 대두배지 (40 g/ℓ) 배지에 접종하여 25°C에서 각각 60, 130, 220 rpm의 속도로 배양하였다 (Table 15). 60 rpm 에서는 균사체가 큰 덩어리로 뭉쳐서 자라면서 생장이 느리고, 220 rpm에서는 균사체가 지나치게 잘게 부서짐으로써 생장이 약해짐을 관찰하였다. 따라서 공기와의 접촉이 적합하고 물리적으로 자극을 적게 받는 130 rpm을 최적의 진탕속도로 정하고 차기 실험에 임하였다.

Table 15. Effect of shaking speed on the production of CLA (%) by mushroom mycelia in the submerged liquid culture containing soybean (4 g/ℓ)<sup>1)</sup>

Shaking speed (rpm)	Mycelia (CLA %)	
	CC <sup>2)</sup>	PO-SH <sup>3)</sup>
60	1.13	1.52
130	3.55	3.38
220	2.17	1.99

<sup>1)</sup> Gaschromatograph (Hewlett Packard 5890) condition. Column, Supelcowax-10 (60 m×0.32 mm); Detector, FID; Carrier gas, N<sub>2</sub> gas (2 ml/min); initial oven temperature, 180°C (5 min); final temperature, 220°C (20 min); Rate, 5°C/min.

<sup>2)</sup> CC; *Coprinus comatus*...

<sup>3)</sup> PO-SH; *Pleurotus ostreatus* (Suhan).



6) 통기량

대두 (40 g/ℓ)를 첨가한 배지 조건 (25℃, pH 5.5)에서 대량생산을 위한 최적의 통기량을 조사하였다 (Table 16). 0.5 v/v/m의 공기를 주입하였을 때에는 (1.93, 2.20%) 1.0 v/v/m으로 배양했을 때보다 (3.24, 3.62%) 공기 주입량이 적어 균사가 활발히 성장하지 못하였고, 2.0 v/v/m으로 배양하였을 때에는 (0.68, 0.97%) 과량의 폭기로 인하여 균사체의 생육에 저해를 입었다. 따라서 대량배양 체제에서의 통기량은 1.0 v/v/m 이었고, 배양기간 설정은 24℃에서 1.0 v/v/m로 배양하면서 성장정도를 확인하여 8일간 배양하였을 때에 CLA생성량이 가장 많았다.

Table 16. Effect of aeration on the production of CLA by mushroom mycelia in the submerged liquid culture containing soybean (40 g/ℓ)<sup>1)</sup>

Airation (v/v/m)	Mycelia (CLA %)	
	CC <sup>2)</sup>	PO-SH <sup>3)</sup>
0.5	1.93	2.20
1.0	3.24	3.62
2.0	0.68	0.97

<sup>1)</sup> Gaschromatograph (Hewlett Packard 5890) condition. Column, Supelcowax-10 (60 m×0.32 mm); Detector, FID; Carrier gas, N<sub>2</sub> gas (2 ml/min); initial oven temperature, 180℃ (5 min); final temperature, 220℃ (20 min); Rate, 5℃/min.

<sup>2)</sup> CC; *Coprinus comatus*...

<sup>3)</sup> PO-SH; *Pleurotus ostreatus* (Suhan).

7) 배양기간

먹물버섯, 느타리버섯 (수한)을 pH가 5.5로 조절된 대두를 기질로 한 배지에 접종하여 130 rpm에서 배양하는 동안 성장속도를 관찰해본 결과 접종 후 3일까지는 균사의 성장속도가 저조하였다 (Table 17). 이는 기질로 사용된 마쇄된 콩이 고압멸균에 의해 덩어리짐에 따라 균사체의 성장에 물리적인 자극을 가하였기 때문이라고 사료되며, 지속적인 교반에 의해 뭉쳐진 콩이 풀려짐에 따라 3일 이후부터는 균사의 생장이 눈에 띄게 증가하는 것을 관찰 할 수 있었으며 배양 8일째에는 균사밀도가 매우 높아졌다. 8일째 되는 날 높은 성장상태에 도달해 있는 것을 관찰 할 수 있었다.

Table 17. Effect of incubation time on the production of CLA by mushroom mycelia in the submerged liquid culture containing soybean (10 g/250 ml)<sup>1)</sup>

Time (day)	Mycelia (CLA %)	
	CC <sup>2)</sup>	PO-SH <sup>3)</sup>
3	0.75	1.16
8	4.83	3.92
12	4.17	3.15

<sup>1)</sup> Gaschromatograph (Hewlett Packard 5890) condition. Column, Supelcowax-10 (60 m×0.32 mm); Detector, FID; Carrier gas, N<sub>2</sub> gas (2 ml/min); initial oven temperature, 180°C (5 min); final temperature, 220°C (20 min); Rate, 5°C/min.

<sup>2)</sup> CC; *Coprinus comatus*...

<sup>3)</sup> PO-SH; *Pleurotus ostreatus* (Suhan).

#### 4. CLA 분리방법 확립

##### 요약

- 추출된 지방을 140℃에서 분별증류 하여 4.35%까지 CLA를 분리하였다.
- 버섯균사체추출물로부터 추출된 지방을 methylation 시킨 다음 아세톤에 용해하여서 저온침전하여 *t10,c12* CLA와 *c9,t11* CLA 이성질체를 분리하였다.

가. 균사체 배양물로부터 지방추출: CLA 분석방법에서와 동일

나. 추출된 지방으로부터 CLA의 분리 (분별증류)

추출된 지방을 140, 160, 180℃에서 박막 증류기로 분별증류한 결과는 Table 18에서 보는 바와 같다. 세 가지 분별증류 온도 중에서 140℃가 CLA분리에 가장 효율적이었으며, 4.35%까지 분리가 가능하였다. 그 이상의 순도를 높이기 위해서는 동일 온도에서 분별증류 횟수를 늘려서 현재 시험 중에 있다. 용매를 사용한 codistillation 방법과 병행함으로써 순도를 높이는데 보다 효율적인 방법을 찾고 있다.

Table 18. Composition of fatty acids separated from thin film evaporator (TFE)

Free fatty acids	CLA-Me	140℃, 0.5torr		160℃, 0.5torr		180℃, 0.5torr	
		기화(○)	기화(×)	기화(○)	기화(×)	기화(○)	기화(×)
Others	0.21	0.38	0.88	0.91	0.32	0.22	0.03
Palmitic acid	12.03	6.10	9.12	3.89	5.80	10.03	9.83
Stearic acid	5.51	3.28	5.34	8.04	8.06	2.03	2.45
Oleic acid	26.33	25.63	28.36	26.93	28.21	29.32	30.11
Linoleic acid	52.40	61.23	51.95	56.22	53.36	55.19	53.31
CLA	3.52	3.38	4.35	4.01	4.25	3.27	4.27

다. *t10,c12*CLA 이성체 분리 (저온분별법)

버섯균사체 추출물로부터 추출된 지방을 methylation 시킨 다음 아세톤에 용해하여서 -68, -71, -75, -80℃에서 분별 침전시킨 결과 합성 CLA로부터 *t10,c12* CLA와 *c9,t11* CLA 이성질체를 분리하였을 때와 유사한 결과를 얻었다 (Table 19).

Table 19. Distribution of the *t10,c12* CLA-Me and *c9,t11* CLA-Me in the precipitate and supernatant

Temperature (°C)	<i>t10,c12</i> (%)	<i>c9,t11</i> (%)	Total (%)
-68	19.76	77.81	97.57
-71	20.42	76.24	96.66
-75	28.82	66.35	95.11
-80	36.15	61.13	97.28

## 5. CLA 생성 효소의 분리 정제

### 요약

- 총단백질 함량은 신령버섯 (AB), 먹물버섯 (CC), 느타리버섯 (PO) 균사체에 각각 39.2, 40.7, 35.1 mg/ml (total vol: 10 ml)이 함유되어 있어 버섯균주에 따라서는 유의성이 없었다.
- 신령버섯균사체와 먹물버섯균사체로부터 약 20 Kd의 분자량의 단백질을 분리하였다.
- 신령버섯균사체와 먹물버섯균사체를 column chromatography를 이용하여 F1, F2, F3의 LIase를 분리하였다. 이중 F1이 LIase의 활성이 각각 38, 30  $\mu$ g CLA/mg protein으로 활성이 가장 뛰어 났으며, F1분획에서 대략 40 Kd 이하의 protein과 LIase라고 생각되는 21 KD의 protein을 분리하였다.
- F1 fraction을 TSK gel filtration column으로 다시 3개의 fraction으로 분리한 후 세분하여 8 개의 세부 fraction을 받은 후 LIase 활성을 조사한 결과 첫 번째 fraction에서 높은 활성을 나타냈다.
- CLA의 생성능은 신령버섯, 먹물버섯, 느타리버섯가 각각 56, 45, 27  $\mu$ g으로 신령버섯균, 먹물버섯, 느타리버섯균의 의 순으로 신령버섯균사체가 CLA 생성능이 가장 강하였다.

### 가. 배양

*Agaricus blazei* (신령), *Coprinus comatus* (먹물), *Pleurotus ostreatus* (느타리) 균사체를 대량배양 (0.5, 5, 50, 500, 5,000 ℓ)하기 위하여 황백당 4%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.12%,  $KH_2PO_4$  0.12%, 대두분 4%를 각각의 용량에 맞도록 배지를 조성하였다. 조성된 배지를 기본배지로 사용하기 위해서 121℃, 1시간 동안 멸균 후 30℃ 이하로 냉각시켰다.

이 기본배지에 통기량을 1.0 v/v/m으로 하고 배양온도를 25℃로하여 CLA의 생성량을 최대화 하면서 버섯균사체의 생육에 장애를 받지 않는 linoleic acid를 함유하는 유지 (홍화유) 첨가량을 조사하기 위해 홍화유를 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8%의 농도로 첨가하여 3일간 배양하였다.

### 나. 단백질 함량 정량

상기 실험에서 신령버섯, 먹물버섯, 느타리버섯 균사체배양물에 CLA가 함유되어 있었다. 이 CLA는 버섯균주가 가지고 있는 Llase에 의해 생성된 것이다. Llase는 미생물의 membrane에 함유되어 있기 때문에 버섯균사체를 회수하여 균사체에 함유된 총 단백질 함량을 조사하였다 (Table 20). 총단백질 함량은 신령버섯, 먹물버섯, 느타리버섯 균사체에 각각 39.2, 40.7, 35.1 mg/ml (total vol: 10 ml)이 함유되어 있어 버섯균주에 따라서는 유의성이 없었다.

Table 20. Protein concentration in mushroom mycelia strains

Mushroom strain	Mycelia weight (g/ℓ wet base)	Protein Concentration (mg/ml) <sup>1)</sup>
AB	23.9	39.2 ± 3.5 <sup>2)</sup>
CC	27.8	40.7 ± 5.6
PO	39.8	35.1 ± 2.9

<sup>1)</sup> Total volume was 10 ml, which was used to grind the total mycelia from given mushroom strain.

<sup>2)</sup> Protein concentration was not significantly different from mushroom strains by Duncan's multiple range test at p<0.05.

## 다. 단백질 분리 및 정제

### 1) SDS-PAGE에 의한 분리

CLA 생성능이 강한 신령버섯균사체와 먹물버섯균사체로부터 분리된 총단백질을 SDS-PAGE로 분리한 결과를 Figure 8에 나타내었다. 두 균사체는 대부분 80 Kd 이하의 분자량을 갖는 단백질을 함유하고 있었다. 현재까지 미생물로부터 LIase를 분리 및 정제한 보고는 문헌상에 없다. 그러나 본 연구진이 강한 LIase의 활성을 갖는 *L. reuteri*에서 LIase를 분리하였는데 그 분자량이 대략 21 Kd 이었다. 본 연구에서도 신령버섯균사체와 먹물버섯균사체로부터 약 20 Kd의 분자량의 단백질을 분리하였는데 이 단백질이 LIase를 갖는 단백질로 생각이 된다.

### 2) Ion exchange chromatography 의한 분리

신령버섯균사체와 먹물버섯균사체에 함유된 LIase의 활성과 LIase를 분리하기 위해 여러 가지 column chromatography를 이용하여 LIase를 분리하였다. Figure 9에서는 신령버섯 및 먹물버섯균사체로부터 분리된 protein을 anion exchange column chromatography로 분리하였다. 이 방법에 의해 두 균사체로부터 공히 F1, F2, F3의 fraction으로 분리하였다.

분리된 각 fraction의 LIase 활성을 측정하였다 (Table 21). 두 버섯균주 공히 F1 fraction에서 LIase의 활성이 각각 38, 30  $\mu\text{g}$  CLA/mg protein였고, F2에는 약간의 활성이 나타났다. 따라서 F1 fraction에 관하여 연구를 하였다. 이 분획은 분획을 하지 않았던 crude protein의 활성 (Table 20)에 비해 신령버섯의 경우 약 3배정도의 활성이 증가되었다. 또한 분리된 각 fractions (F1, 2, 3)를 SDS-PAGE로 분리하였다 (Figure 10). 이 실험에서는 protein의 농도가 낮아 coomassie brilliant blue 염색법 보다 감도가 높은 silver stain 염색법을 사용하여 분리된 protein을 확인하였다. F1 fraction은 crude protein (Figure 11)에 비해 많은 protein이 없어서 정제가 되었지만, 그래도 이 fraction에는 많은 서로 다른 protein이 함유되어 있었다. 대략 40 Kd 이하의 protein이 대부분이었고, LIase라고 생각되는 21 KD의 protein도 분리되었다.

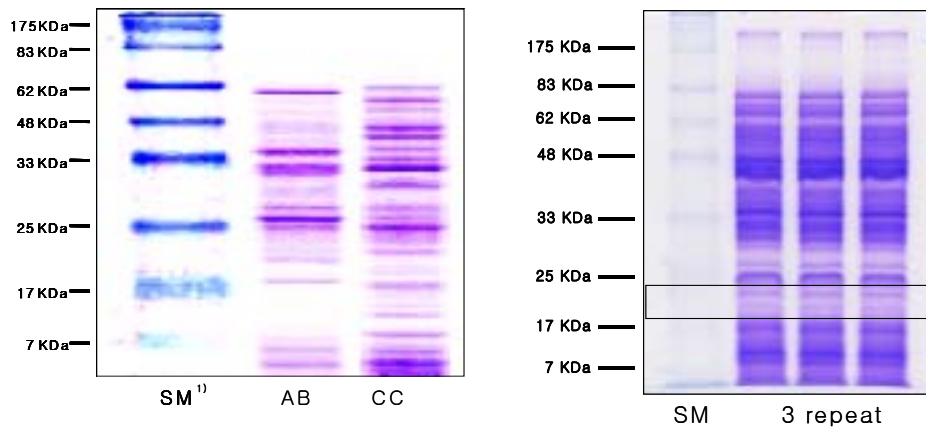


Figure 8. SDS-PAGE patterns of proteins from mushroom mycelia (*Agaricus blazei* and *Coprinus comatus*). Right panel was highlighted by marking with a rectangle of triplication of proteins from AB.

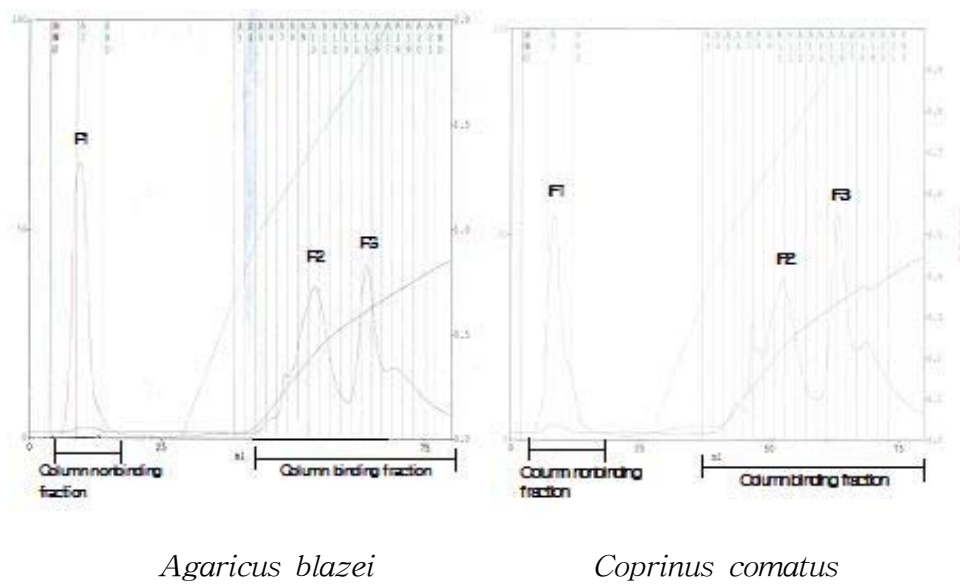


Figure 9. Fractionation of mycelial proteins by anion exchange column chromatography.

Table 21. CLA concentration ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein) produced by fractions from anion exchange column chromatography shown in Figure 16<sup>1)</sup>

Mushroom strains	Fraction <sup>2)</sup>		
	F1	F2	F3
AB	$38.2 \pm 2.3^a$	$2.1 \pm 0.5^{a,3)}$	-
CC	$30.7 \pm 1.5^b$	$2.5 \pm 1.1^a$	-

<sup>1)</sup> Reaction condition: 1mg linoleic acid + 4 mg proteins (37°C for 40 min).

<sup>2)</sup> Fractions were from Figure 16.

<sup>3)</sup> Means with same superscript letters in same row represent significantly at  $p < 0.05$  Duncan's multiple range test.

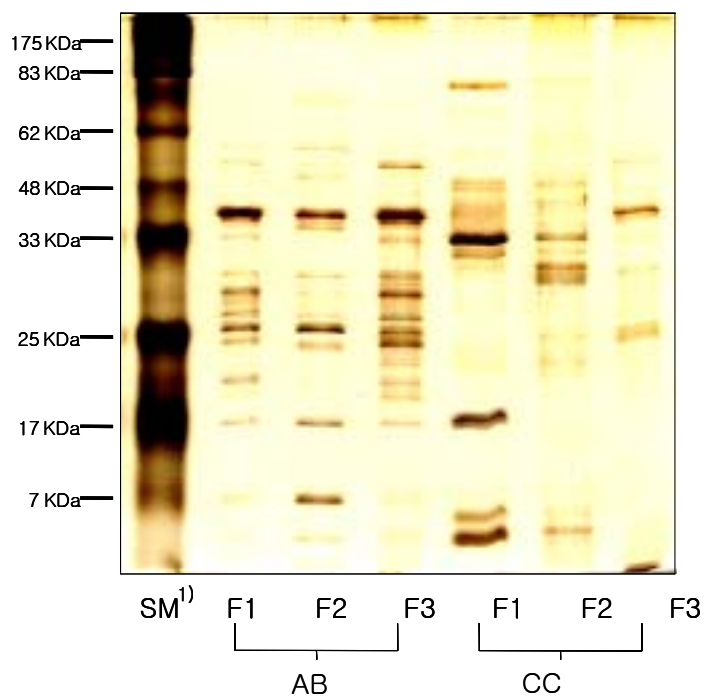


Figure 10. Separation of proteins of fractions (F1, F2, and F3) by SDS-PAGE.



Total membrane protein을 2-DE로 분리하였다 (Figure 11). 2-DE로 분리한 결과 많은 spot이 나타났다. 그러나 *L. reuteri*에서 나타난 spot이 나타났다 (Figure 20에서 사각형으로 표시된 protein spot). 그러나 이 spot이 정확히 Llase라는 보고는 없어 앞으로 많은 연구를 수행하여야 할 것이다.

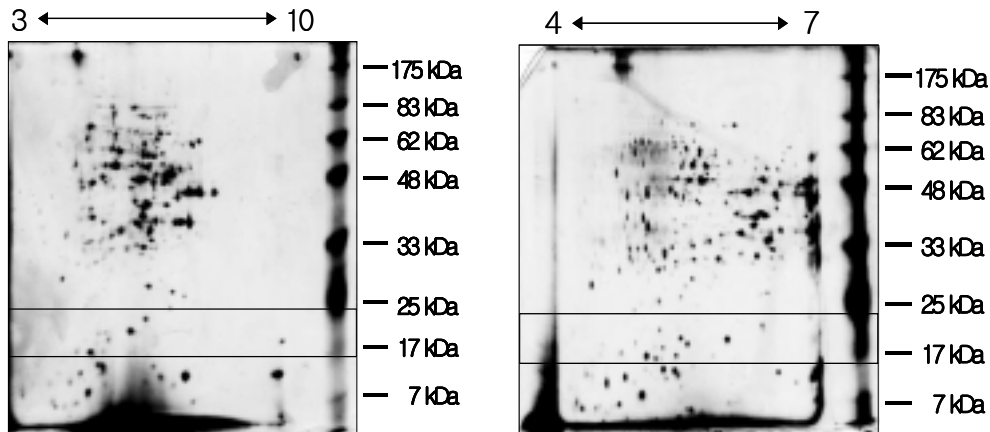
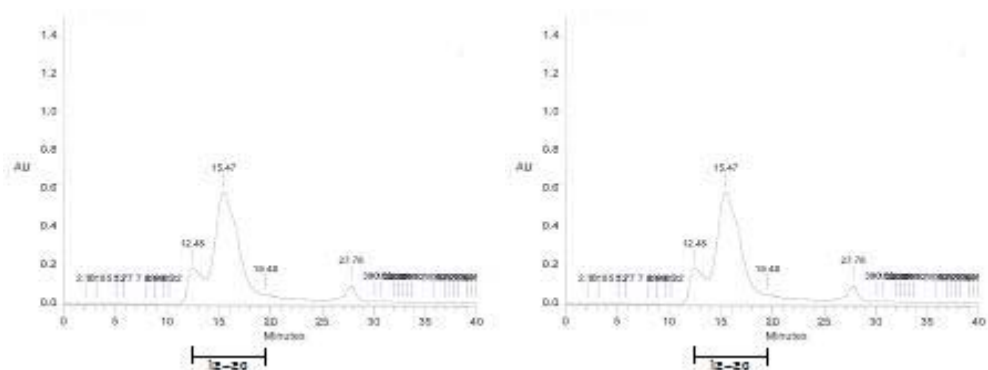


Figure 11. 2-Dimensional electrophoresis of total proteins from mycelium of *Agaricus blazei*.

### 3) Size exclusion chromatography

Anion exchange column chromatography로 분리하여 Llase의 활성을 갖는 F1을 TSK gel filtration column (fraction range가 1,000 KDa~20 KDa)을 이용하여 다시 fraction하였다 (이 때 chromatography의 용출속도를 0.5 ml/min로 하였다). Figure 12에서 보는 바와 같이 F1 fraction은 다시 3개의 fraction으로 분리하였다.

각 Fraction을 다시 세분하여 12분부터 20분까지 8 개의 세부 fraction을 받은 후 Llase 활성을 조사한 결과 첫 번째 fraction에서 높은 활성을 나타냈다 (Table 22).



*Agaricus blazei*

*Coprinus comatus*

Figure 12. Fractionation of F1 fraction from Figure 6 by gel filtration HPLC.

Table 22. Specific activity of proteins separated by gel filtration column chromatography

Mycelia strains	Fraction number <sup>1)</sup>	Specific Activity ( $\mu\text{g CLA/ mg Protein}$ )
AB	12	<b>51</b>
	13	47
	14	16
	15	18
	16	19
	17	7
	18	14
	19	2
	12	<b>41</b>
CC	13	39
	14	14
	15	15
	16	18
	17	6
	18	19
	19	16

<sup>1)</sup>Obtained from Figure 12.

<sup>2)</sup>Reaction was carried out with 4 mg protein and represented to 1 mg protein.

**라. 효소활성 검증 (LIase activity)**

버섯균사체 자체를 활용하기 위하여 버섯균사체를 분리한 다음 0.1M Tris buffer에를 이용하여 linoleic acid와 25℃에서 60분간 반응시켰다. 그 결과 버섯균사체 g 당 신령버섯균이 15 µg 먹물버섯균이 8 µg, 느타리버섯균이 5 µg CLA를 생성하였다.

신령버섯, 먹물버섯균사체로부터 얻은 protein 4 mg과 1 mg linoleic acid를 반응용액 (0.1M Tris-HCl, pH 8.8, 3 ml)에 반응시켜 c9,t11 CLA의 생성을 확인하였다 (Figure 13). c9,t11 CLA가 13분 (RT 13)에서 분리되었다.

신령버섯의 protein이 먹물버섯의 protein보다 c9,t11 CLA의 생성능이 강하였다. Table 23에서는 신령버섯, 먹물버섯, 느타리버섯균사체로부터 얻은 protein의 c9,t11 CLA의 생성능을 나타내고 있다. CLA의 생성능은 버섯균사에 따라 상당한 차이가 있었다. 신령버섯, 먹물버섯, 느타리버섯가 각각 56. 45, 27 µg으로 신령버섯균, 먹물버섯, 느타리버섯균의 의 순으로 신령버섯균사체가 CLA 생성능이 가장 강하였다.

이 결과는 정도에는 차이가 있지만 대부분의 버섯균사체가 c9,t11 CLA를 생성하는 LIase의 활성이 있다는 것을 의미한다.

Table 23. Production of c9,t11 CLA by the reaction of linoleic acid with proteins extracted from mushroom mycelia strains

Mushroom mycelia strains	c9,t11 CLA (µg/4 mg protein) <sup>1)</sup>
AB	56.1 ± 5.4 <sup>a,2)</sup>
CC	44.9 ± 6.7 <sup>a</sup>
PO	27.1 ± 2.1 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup> Reaction condition: 1mg linoleic acid + 4 mg proteins (37℃ for 40 min).

<sup>2)</sup> Means with same superscript letters in same row represent significantly at p<0.05 Duncan's multiple range test.

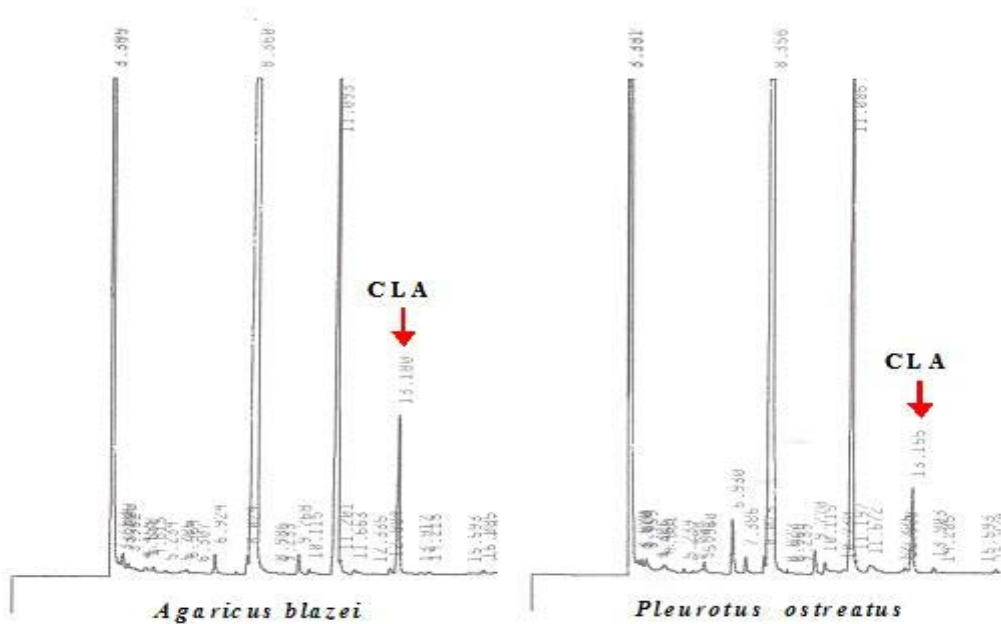


Figure 13. GC chromatograms of *c9,t11* CLA in the samples of linoleic acid reacted with crude proteins from mushroom strains. Reaction condition: 1mg linoleic acid + 4 mg proteins (37°C for 40 min).

## 6. CLA 생산

### 가. 버섯균배양에 의한 CLA의 생산

버섯균사체액체배양에 검화 된 홍화유를 0.4% 홍화유되게 첨가하고 신령버섯 균사체를 2, 4, 6, 8, 10, 12일 배양한 다음 버섯균사체와 배양액으로부터 총 지질을 Figure 1과 같이 추출하고 CLA를 분석하였고 그 결과를 **Figure 14**에 나타내었다. 배양기간은 CLA의 함량에 크게 영향을 미쳤다. CLA는 배양 8일에 최대치에 도달하였는데 그 함량은 버섯균사체 및 버섯균사체배양물의 지방 g 당 각각 13.6 mg과 4.2 mg이었다. 배양 2일에는 각각 5.6 mg과 1.8 mg였고, 배양 12일에는 각각 7.4 mg과 2.4 mg이었다. 버섯균사체의 양은 배양기간에 따라 2일째 14.132 g, 4일째 10.943 g, 6일째 11.741 g, 8일째 17.581 g, 10일째 13.327 g, 12일째는

11.814 g으로 직선적은 아니었다. 따라서 CLA의 함량은 버섯균사체의 양에는 크게 관련성이 없었고, 배양시 배양액에 첨가한 linoleic acid의 함량과 관계가 있음을 시사한다.

버섯균사체액체배양을 이용하여 순수한 c9,t11 CLA의 생산은 산업적으로 큰 의미가 없었다. CLA를 배양할 때에 0.4%의 검화된 홍화유를 첨가하였기 때문에 버섯균사체배양물이나 배양물에는 CLA 이외의 지방산이 많이 존재하였다 (Table 18). 따라서 이들로부터 소량인 CLA를 순수분리 할 수는 있지만, 그 비용면에서 큰 경제적 가치를 찾아 볼 수 없다.

그러나 버섯균사체나 그 배양물을 이용할 경우 천연 CLA가 함유된 버섯균사체 또는 CLA가 함유된 버섯균사체 배양물은 이 들이 가지고 있는 기능성 외에 천연 CLA가 함유되어 있기 때문에 큰 의미를 가질 수 있을 것이다.

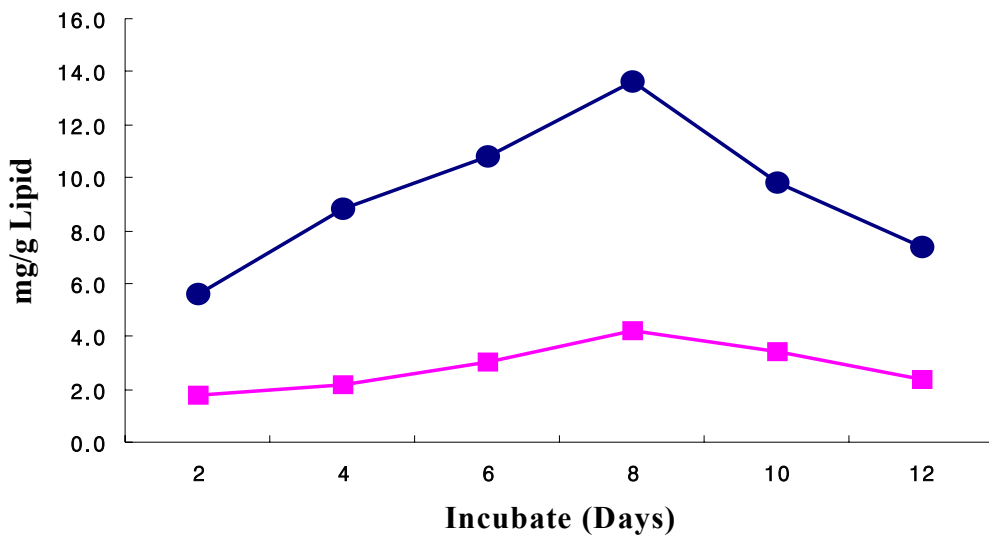


Figure. 14. Concentration of c9,t11 CLA in mycelia (●) and media (■), incubated for the various time of days.

나. 버섯균사체로부터 유래한 Llase를 이용한 CLA의 생산 및 제품화

본 연구에서 Agaricus blazei로부터 Llase를 순수하게 분리 및 정제할 수는 없었다 (그 함량도 적고, 아직까지 순수한 Llase를 분리한 연구실이 없음). 그러나 Crude한 효소나 효소 분획 (Figure 9의 F1)을 활용할 경우 상당한 의미가 있다고 생각된다. Crude한 효소를 이용할 경우 반응 최적조건(Tris-HCl<sub>[pH 7.0]</sub>, 37°C, 40 min)하에서 사용한 linoleic acid의 60%가 CLA로 전환되었다. 이 경우 4mg protein으로 56.1 ± 5.4 mg의 c9,t11 CLA를 생성할 수 있었다. 그러나 이 경우에도 반응물로부터 총 지방을 회수한 다음 c9,t11 CLA를 순수 분리 및 정제 (저온침전법)하여 약 94%의 CLA를 얻을 수 있었다. 이를 scale-up하여 1g 정도의 c9,t11 CLA를 얻을 수 있을 있었다. 그렇지만 이 경우도 산업적으로 순수한 c9,t11 CLA를 생산하는 데는 상당한 비용이 들어 경제적이지 못하였다. Linoleic acid를 이성화 시켜 생긴 CLA로부터 c9,t11 CLA (전체 CLA 중 50%가 c9,t11 CLA임)를 정제하는 것이 훨씬 경제적인 것이다.

7. 제품화

요약

- Crude Llase로 반응하고 저온침전법으로 분리한 c9,t11 CLA를 0.1~1.0g 정도 생산할 수 있었다.
- 액체버섯균사체배양물 균사체로 CLA Mushroom mycelia를 생산하고, 분리여액으로 CLA Mushroom mycelial extract를 생산하였다.
- Crude Llase를 대량으로 collection한 다음 탈염과정을 거쳐 동결건조한 제품의 경우 35 mg CLA/g proein 정도 였다.

가. CLA의 제품

Crude Llase (F1, Figure 9)로 반응하고 methylation 한 다음 저온침전법으로 분리한 c9,t11 CLA를 0.1~1.0g 정도 생산할 수 있었다.

## HK Biotech Co., LTD.

When you think CLA, think HK Biotech.

### SPECIFICATION SHEET



#### **c9,t11 CLA<sup>®</sup>**

**Description:** A liquid type of product produced from reaction of linoleate isomerase from submerged liquid culture of *Agaricus blazei* with linoleic acid such as safflower seed oil and sunflower seed oil

**Ingredients:** 85% c9,t11 CLA, 9% t10,c12 CLA, 5% linoleic acid and % others

**Typical Properties:**

Color	Light yellow
Solubility in water	Bad

**Recommended daily consumption :**

Depends on purpose: need to be determined

**Packaging:** Available in 100 mg, 500 mg and 1 g containers

**Price based upon quantity ordered:** Not decided

#### **HK Biotech, CO. LTD.**

c/o BIO21 CENTER, Moonsan-Eub, Jinju-Si, Gyeongnam-Do 660-881  
Korea

Tel: +82-55-762-9307 Fax:

Website: [www.hkbitech.co.kr](http://www.hkbitech.co.kr)

## HK Biotech Co., LTD.

When you think CLA, think HK Biotech.

### SPECIFICATION SHEET

#### **CLA<sup>®</sup> Mushroom mycelia**

**Description:** A powder type of product produced from submerged liquid culture of *Agaricus blazei* strain in the culture medium containing linoleic acid such as safflower seed oil and sunflower seed oil and then freeze dried

**Ingredients:** CLA (mixture of two major isomers) and other ingredients such as beta-glucan produced from mycelial culture

**Typical Properties:**

Color	Light yellow
Solubility in water	Partly soluble in water

**Recommended daily consumption :**

Depends on purpose: need to be determined

**Packaging:** Available in 5 gallon containers, 55 gallon drums, 275 gallon totes and ISO tankers

**\* Price based upon quantity ordered**

Not decided

#### **HK Biotech, CO. LTD.**

c/o BIO21 CENTER, Moonsan-Eub, Jinju-Si, Gyeongnam-Do 660-881  
Korea

Tel: +82-55-762-9307 Fax:

Website: [www.hkbitech.co.kr](http://www.hkbitech.co.kr)



## HK Biotech Co., LTD.

When you think CLA, think HK Biotech.

### SPECIFICATION SHEET

#### **CLA<sup>®</sup> Mushroom mycelial extract**

**Description:** A liquid type of product produced from submerged liquid culture of Neutari strain in the culture medium containing linoleic acid such as safflower seed oil and sunflower seed oil

**Ingredients:** CLA (mixture of two major isomers) and other ingredients such as beta-glucan produced from mycelial culture

#### **Typical Properties:**

Color	Light yellow
Viscosity@ 25C	15
Specific gravity, 20o/20C	0.952
Solubility in water	Good

#### **Recommended daily consumption :**

Depends on purpose: need to be determined

**Packaging:** Available in 5 gallon containers, 55 gallon drums, 275 gallon totes and ISO tankers

#### **\* Price based upon quantity ordered**

Not decided

### **HK Biotech, CO. LTD.**

c/o BIO21 CENTER, Moonsan-Eub, Jinju-Si, Gyeongnam-Do 660-881  
Korea

Tel: +82-55-762-9307 Fax:

Website: [www.hkbitech.co.kr](http://www.hkbitech.co.kr)

#### 나. LIase의 제품화

Crude LIase (F1, Figure 12)를 대량으로 collection한 다음 탈염과정을 거쳐 동결 건조하여 제품화 하였다. 이 제품의 경우 35 mg CLA/g proein 정도 였다.

### HK Biotech Co., LTD.

When you think CLA, think HK Biotech.



## SPECIFICATION SHEET

### **Crude Linolease Isomerase<sup>®</sup>**

**Description:** Lyophilized powder product produced from submerged liquid culture of Agaricus blazei containing linoleic acid such as safflower seed oil and sunflower seed oil

**Ingredients:** Pale white powder lyophilized.

#### **Typical Properties:**

Color	Pale white
Specific activity	35 mg CLA/g protein
Solubility in Tris buffer (0.1M, pH 7-9)	Good

**Packaging:** Available in 100 mg and 100 mg bottles

**Price based upon quantity ordered:** Not decided

### **HK Biotech, CO. LTD.**

c/o BIO21 CENTER, Moonsan-Eub, Jinju-Si, Gyeongnam-Do 660-881  
Korea

Tel: +82-55-762-9307 Fax:

Website: [www.hkbitech.co.kr](http://www.hkbitech.co.kr)

# 제4장 목표달성도 및 관련 분야 기여도

## 제1절 목표달성도

### 1. 1차년도

( \_\_\_ : 계획 ..... : 달성도 )

연구개발 목표	연구 책임자	추진 일정												결과 (%)	
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7		
<b>CLA버섯균사체 및 배양액생산</b> ○ CLA 생성 균주 선발 - 배지조성 - CLA 생성확인 ○ CLA 버섯균사체 생산 조건 확립 (18 L용) - 배지조성 - 배양조건 · 통기 · 진탕 · 온도 · 기간	김정옥													100	
															100
															100
															100
															100
															100
															100
<b>CLA 생산 및 분리</b> ○ CLA 생성 확인 (정량) ○ CLA 분리 방법 확립 (분별 증류법) ○ t10,c12 CLA 이성체분리 (저온 분별법) - 온도조건 - 용매조건	하영래													100	
															100
															100
															100
총진도율															

2. 2차년도

( \_\_\_ : 계획 ..... : 달성도 )

개발내용	구분	연구 개발 기간											진도(%)	
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6		7
CLA 대량생산 법 확립 (500 L) ○ 배지조성 ○ 배양조건 ○ 대량배양														100
														100
														100
CLA 생산 및 분리 ○ CLA 분리 및 정량 ○ CLA 생성효소 분리 및 정제 - 버섯균배양 - 효소활성측정 - 효소 분리														100
														100
														100
														100
														100
총진도율													100	

3. 3차년도

〈주관기관〉

( \_\_\_ : 계획 ..... : 달성도 )

연구내용	연구 책임자	연구 개발 기간											진 도 (% )		
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6		7	
○ CLA버섯균사체 및 배양액의 제품화 - 버섯균사체 · 정제화 및 제제화 - 배양액 · 액기스화 · 음료화	김정옥														100
															100
○ CLA의 대량생산 및 제품화 - 대량생산 방법 · 분리정제된 효소 이용 : 반응조건 구명 : CLA 분리 · 버섯균사체 배양물을 이용 : CLA의 분리 : CLA 이성체 분리 - 제품화	하영래														100
															100
○ CLA 생성효소의 제품화															100
사업진도															100

## 제2절 관련분야 기여도

### 1. 기술적 측면

가. 생리활성이 강한 천연 t10,c12 conjugated linoleic acid (t10,c12 CLA) 생산기술이 개발되었다.

1) CLA는 여러 가지 이성체를 갖는데 이들을 총칭하여 CLA라 한다.

주요 이성체 중에서 c9,t11 CLA는 천연에 존재하는 CLA이지만 생리활성이 다소 떨어지고, t10,c12 CLA는 강력한 생리활성 (특히 체지방감소 효과)을 갖는 이성체이다. 따라서 현재 화학적으로 합성한 CLA는 선진국인 미국, 일본, 유럽 등지에서 체지방감소를 위한 목적으로 tablet 형태로 시판되었다.

2) CLA는 화학적으로 합성할 수 있게 되었다.

여기에는 여러 가지 이성체 (c9,t11 CLA와 t10,c12 CLA가 주 이성체)를 함유하고 있어 인체 위해물질이 포함될 수도 있으므로 소비자들은 천연으로 생산된 CLA를 요구하였다. 특히 t10,c12 CLA 이성체를 다량 함유한 CLA를 요구하였다.

3) 박테리아를 이용하면 c9,t11 CLA를 천연으로 생산하게 되었다.

가) *B. fibrisolvens*나 *L. reuteri* 등을 이용하면 c9,t11 CLA를 생산할 수 있게 되었다.

나) 그러나 이들은 단지 c9,t11 CLA만 생성하였다. 즉 생리활성이 강한 t10,c12 CLA는 생산하지 못하였다.

다) 따라서 t10,c12 CLA를 생산할 수 있는 생물학적인 방법이 연구 개발되었다.

4) 버섯균액체배양법을 이용하여 c9,t11 CLA와 t10,c12 CLA를 동시에 생산하게 되었다.

가) 최근 본 연구진은 특이한 버섯균이 c9,t11 CLA와 t10,c12 CLA를 동시에 생산한다는 사실을 밝히게 되었다.

나) 생산된 이들 두 이성체를 순수분리 하여 사용하거나 두 이성체의 혼합물을 그대로 사용하게 되었다.

나. 생리활성이 보장된 버섯균사체 및 균사체배양액의 개발 되었다.

- 1) 버섯균사체는 균사체의 특유한  $\beta$ -D-glucan 및 다양한 생리활성물질을 함유하고 있어 그 기능성이 높게 되었다.
- 2) 버섯균배양액 역시 버섯균사체로부터 분리된 다양한 생리활성물질을 함유하게 되었다.
- 3) 기능성에 다양한 생리활성을 갖는 CLA (특히 t10,c12 CLA 이성체)가 보장된 버섯균사체 및 버섯균배양액의 생산기술이 개발되었다.

## 2. 경제 · 산업적 측면

가. 미생물적인 방법으로 천연 t10,c12 CLA의 생산하였다.

나. 고부가가치를 갖는 고기능성 버섯균사체의 생산하였다.

다. 고부가가치를 갖는 버섯배양액의을 생산하였다.

라. 버섯균을 이용한 기능성 소재개발로 버섯에 관한 인식 제고로 버섯소비촉진을 증대시켰다.

## 3. 사회 · 문화적 측면

가. 건강증진을 위한 고 기능성 소재가 개발되었다.

나. 버섯자실체보다 버섯균사체 또는 버섯균사체배양액의 이용방법 기술이 개발되었다.

다. 소득을 증대시킬 수 있는 고기능성 소재 및 제품이 개발 되었다.

라. 버섯소비를 촉진시킬 수 있는 방법이 연구되었다.



## 제5장 연구개발결과의 활용계획

### 제1절 연구개발 효과

#### 1. 기술적 측면

- 가. 버섯균액배양법을 이용하여 생리활성이 강한 천연 t10,c12 CLA 생산기술개발이 기대된다.
- 나. 버섯균을 이용하여 c9,t11 CLA와 t10,c12 CLA를 동시 생산하는 기술개발이 기대된다.
- 다. 생리활성이 보강된 CLA버섯균사체 및배양액을 이용한 기능성 제품의 개발이 기대된다.
- 라. 고기능성 CLA함유 버섯균사체 및 버섯균사체 배양물을 대량으로 생산할 수 있는 기술의 개발이 기대된다.
- 마. 짧은 배양기간중에 CLA를 대량으로 생성할 수 있는 균주의 선발이 기대된다.
- 바. 최적배지조성과 배양조건 확립으로 최대수율의 CLA를 생성시킬 수 있는 기술의 개발이 기대된다.
- 사. 버섯균사체 배양물로부터 CLA생성 효소를 정제하여 반응시킴으로서 c9,t11 CLA와 t10,c12 CLA를 대량 생성시킬 수 있는 기술의 개발이 기대된다.

#### 2. 경제.산업적 측면

##### 가. 수입대체효과

항암성을 비롯한 여러 가지 생리활성을 갖는 기능성 소재 및 제품이 고가로 수입되어 사용되고있다. 버섯균사체배양액으로부터 제조된 AHCC, arabinoxylane등은 일본에서 수입되어 고가로 판매되고있다. 주로 암 환자를 대상으로 판매되고있으며 가격은 약 60만원대 (1개월분)이다. 본 기술의 개발은 버섯균사체가 가지고있는 기능성외에 CLA의 기능이 부가됨으로써 기존의 제품에 비해 뛰어난 기능성을 가진 소재를 대량생산하는 것이 국내에서 가능하게 함으로써 수입대체효과를 기대할 수 있다.

나. 천연 CLA 소재로서의 산업화효과

현재, 미생물에 의해 생성된 c9,t11 CLA가 쇠고기나 우유에 소량함유되어 있다. 버섯균액배양법을 이용하여 생산되는 CLA중에는 기능성이 우수한 천연 t10,c12 CLA를 함유하고 있어 새로운 기능성소재로써의 산업화가 기대된다.

다. 수출효과

다양한 생리활성을 갖는 CLA는 미국, 유럽, 일본 등에서 경제적·산업적으로 고부가가치를 갖는 신 기능성 물질로 인정받고있다. 현재, 전량 화학적 합성방법으로 생산되는 이 CLA는 여러 가지 이성체가 혼합되어 있으며, 이러한 CLA제품 시장은 수 천억원 대이다. 그러나, 여러 가지 이성체의 혼합물인 합성 CLA보다는 천연 CLA의 생산이 요구되고있어, 버섯균사체를 이용한 t10,c12 CLA의 생산은 외국의 기존 CLA제품 시장을 잠식할 수 있을 것이다.

라. 국민건강보호에 기여

지금까지 상품화된 버섯균사체를 이용한 기능성 제품은 고가여서, 일반인들에게 널리 보급되지 못했으며, 암환자의 경우에도 지속적인 복용이 어렵다. 그러나, 본 기술로 저가로 기능성이 검증된 CLA 버섯균사체 및 배양액을 생산할 수 있어 국민건강에 기여할 것이다.

마. 버섯재배농가의 소득증대

본 기술을 CLA버섯 생산을 위한 기반기술로 활용하여 고기능성 버섯을 생산함으로써 버섯에 대한 인식을 제고와 버섯소비를 촉진하여 버섯재배 농가의 소득을 증대시킬 수 있을 것이다.

## 제2절 연구개발 활용방안효과

1. 본 연구과제는 세계에서 최초로 수행되는 연구로서 이 연구의 결과는 국내 및 국제특허를 출원할 것이다.
2. 본 연구결과의 특허권을 해외 이전하거나 생산된 소재를 원료로 수출할 것이다.
3. 산업화는 TICBMI의 생산용 장비 (발효조 및 포장기 등)를 활용하여 시제품을 생산하고, 경남무역이나 본 사의 영업망을 통하여 유통할 것이다.
4. CLA버섯자실체를 생산하는 기초자료로 활용할 것이다.

## 제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

### 제1절 CLA의 산업화

#### 1. 국외

가. CLA의 다양한 기능성에도 불구하고 현재 상품화가 된 분야는 "다이어트 및 근육 강화"이다. 1987년 최초로 발견된 이래 많은 연구를 거듭하면서 1995년부터 북유럽, 미국을 중심으로 10여건의 인체 임상실험이 이루어졌고, 안전성과 체지방 감소의 기능성을 확인하면서 1998년 미국에서 최초의 CLA 제품이 탄생하였다.

나. CLA에 대한 포괄적인 특허권은 최초로 개발한 위스칸신대학에서 소유하고 으며, 다이어트 분야의 상표권은 미국 Cognis사의 "Tonalin"이며, 최근에는 사용권 확대로 EAS등 많은 회사 및 브랜드로 출시되고 있다.

다. 최근에는 항암 및 면역력 등의 기능성에 대한 임상실험이 진행되고 있어 향후 다양한 기능성 식·의약품의 소재 및 제품으로 개발될 수 있을 것으로 전망된다.

#### 2 국내

가. CLA의 최초 개발자가 한국인임에도 불구하고 국내에서는 아직 허가되지 않은 품목으로 국내 생산은 물론 수입판매도 불가능한 상태이다.

나. 2003년 하반기 한국보건산업진흥원의 2004년 건식 품목확대 후보로 지정된 바 있어 금년 중 허가될 것으로 기대된다.

##### 1) 허가 가능성

가) 최초 34개 후보군 선정 (아가리쿠스, 녹차추출물, 동충하초, N-아세틸글루코사민 등)

나) 최종 검토품목 8종 (10개품목)으로 선정 (프락토올리고사카라이드, 식물스테롤, 3품목의 동충하초, 녹차추출물, 홍국, 대두단백 등)

다) 최근 업계의 관심증대와 학계의 연구활동, 해외에서의 6년전 상품화, 인체

임상실험 등 과학적 근거 등을 고려 할 때 최종 허가품목으로 지정될 것으로 전망함.

2) 허가 시기

최초 34개 후보군에 대한 검토가 2004년 중 허가 대상으로 이루어졌기 때문에 최소한 연말 이전엔 허가될 것으로 예상됨. 관련 업계 및 일부 전문지에 의하면 9~10월 중 허가될 것이란 전망이 우세하다.

3) 허가 기준 및 규격 (안)

가) 품목명 : 공액 리놀레산(CLA : Conjugated linoleic acid)

나) 보건기능효과

(1) 주요기능 : 체지방 감소

(2) 표시문장 : 본 제품의 섭취시 체지방을 감소시키는 효과가 있습니다.

다) 섭취량 및 섭취 방법

(1) 섭취량 : 공액리놀레산 제품 기준으로 일일 섭취 권장량 2.5g

(2) 섭취방법 : 1일 3회 / 식후 매회 850mg 기준으로 섭취

라) 주의 사항

(1) 12세 미만의 어린이 : 성인의 1/2 섭취

(2) 영.유아 및 임산부 : 의사와 상의

(3) 어린이의 손이 닿지 않는 건조한 냉암소에 보관

마) 기능 물질 또는 성분

(1) 공액리놀레산 제품 : 최종 제품의 총 공액리놀레산 함량이 70% 이상

(2) 공액리놀레산 함유제품: 최종제품의 총 공액리놀레산 함량이 50%이상

바) 기준.규격 (원료 및 제품)

구 분	공액리놀레산 제품	공액리놀레산 함유제품
1) 정상	고유의 색택과 향미를 가지고 이미,이취가 없어야 함.	
2) CLA(%) C18:2,c9,t11 (30%이상)+t10,c12 (30%이상)	60.0 이상이어야 함	30.0 이상이어야 함
3) 총 CLA함량	70.0 이상이어야 함.	50.0 이상이어야 함. (공액리놀레산제품의함량)
4) CLA(%) (trans,trans)	3.0 이하이어야 함	3.0 이하이어야 함.
5) 수분(%)	-	5.0 이하이어야 함
6) 과산화물가 (meg/kg)	3.0 이하이어야 함	15.0 이하이어야 함.
7) 대장균군	음성이어야 함.	
8) 봉해시험	적합하여야 함(단, 칼슘제품에 한함.)	

## 제2절 CLA 시장성

### 1. CLA의 해외시장

#### 가. CLA다이어트제품출시국가

미국 (1998), 노르웨이 (1999), 스웨덴, 영국, 일본 (2000), 벨기에, 네델란드, 남아공 (2001), 대부분의 선진국으로 확대 (2001~)

나. 주요 생산업체 및 제품 현황

순	국가	제조회사	제품명	형태
1	USA	Biogenic Therapies	Cell Trim	
2	USA	Nature's Plus	Fat Busters shake	
3	USA	Cytodine Technologies	Xenadrine	Bar
4	U.K	Health span Limited	Health span CLA	Gelatin, Capsule
5	U.K	Biocare	Lipotone Mainfenance	
6	U.K	Marshtech ltd	Power lean	Capsule
7	Finland	HankitatuKKu Oy	CLA Figurel	
8	Estonia	Estonia	CLA Figurel,Kromi	
9	France	Eguilibre Attitude	Pure CLA soo	Salt gel,Capsule
10	Germany	Glicko pharma GmSH	Mega 80	
11	Germany	TuTTI FruTTI	Bio-CLA	
12	Japan		리노-루베루구CLA	Tablet
13	World Wide	Cognis	Tonalin	Soft Capsule

\* 원료 제조업체 : Natural 사 / Ioders Croclaan 사

다. 시장규모

- 1) 현재 전세계 비만인구는 약5억5천만명으로 날로 증가하고 있으며, WHO는 비만을 각종 질병, 장애 및 사망의 핵심적인 원인으로 규명하고 있으며, 2010년에는 미국인구의 약40%가 비만이 될 것이라는 예측과 함께 그 심각성 날로 심화되고 있다. 이에 따라 비만관련 시장(비만치료제, 의료기, 다이어트식품)의 규모도 급격하게 증가하고 있다.
- 2) 세계적으로 비만치료를 위한 다이어트 방법도 약2만가지에 이르나, 대부분 과학적으로 입증된 방법이 아님. 이와 같은 상황에서 임상실험을 거쳐 출현한 CLA는 관련산업의 주목을 받고 있으며, 출시된 이후 매년 폭발적인 성장세를 보이고 있는 추세이다.

- 3) 2000년 35백만불 시장에서 2002년 125백만불시장으로 출시된 1998년 이후 년평균 약 200%의 성장세를 보여 왔으며, 향후에도 매년 2배이상의 증가세를 시현으로 2004년 약 500백만불 시장을 형성할 것으로 추정하고 있다.



## 2. 국내 시장

### 가. 업계동향

- 1) CLA의 기능(체지방 감소)에 대한 시장성의 기대로 군소 생산 업체, 수입업체 뿐만 아니라 제약, 식품 등 대기업에서도 관련 사업을 준비하거나 많은 관심을 보이고 있다.
- 2) 영세 업체 외 허가 시 상당 수 중견 제약업체 및 식품회사들의 시장 진입이 예상되고 있고, 국내 브랜드 및 수입제품, 타 다이어트 제품 등과의 복합적 경쟁 관계가 치열하게 일으날 것으로 전망된다.



3) 업체 현황 (인터넷 자료 정리)

업체명	주요 내용
1.HK바이오텍	- 세계원천 기술 및 최초 개발자 보유 - 최고의 생산기술 보유 - 기능성 식품의 원료 공급 등 관련 특허권 13건 보유 - 경남 진주 대곡농공단지 내 공장 - 버섯 균사체 배양에 의한 천연 CLA 추출 기술
2.리포젠	- CLA 등 불포화 지방산 전문 업체 - 독일 유명제약사와 제휴 - 결정화 기술 및 크로마토그래피기술을 활용한 지방산 분리기술 보유 - 2002년 11월 평택 포승공단 내 공장
3.케비젠	- 식.의약품 소재 전문업체 - 현 레티놀 사업 중이나 허가시 CLA 계획
4.라이브맥스	- 한국식품개발연구원 실험실 벤처업체 - CLA를 생산할 수 있는 새로운 미생물을 체내에서 찾음.
5.건국우유	- 건국대학교 산하 - CLA강화 우유
6.화인코리아	- 한국식품 개발연구원에서부터 CLA함유 닭과 오리고기 생산기술 이전받음 (윤칠석 박사) - 전남 나주 소재
7.대성식품	- CLA포그,CLA치킨 경상대학(하영래교수)로부터 기술이전 - 고려산업(주)가 사료 공급
8.Bluebonnet	- On-line 수입판매 (불법)
9.애건용	- 이뮤노믹스(면역증강,변비 및 설사 예방,소화촉진 등)

나. 시장동향 (Diet 제제를 중심으로)

1) 시장 규모

가) 국내 다이어트 시장은 최근 비만 인구의 폭발적인 증가와 외모 중시 풍조에 의해 최근 급격하게 성장하여 그 규모가 연간 2조원을 상회할 것으로 추정된다..

나) 비만인구의 증가

구 분	1995년	2001년
남 자	11.7%	26.5%
여 자	18.0%	25.9%

## 2) 시장구성

- 가) 비만치료제, 치료보조제 시장 : 식욕을 억제하는 기전 (리덕틸)과 내장에서 지방흡수를 차단하는 기전 (제니칼)을 연구하였다.
- 나) 의료기기 시장 : 체지방 분석기의 보급 확대 되었다.
- 다) 식품.음료시장 : 대부분의 관련기업들이 다이어트를 기본개념으로 잡고 제품을 출시하고 있으며, 풀무원 다이어트를 시작으로 CJ의 팻다운, 로누들, 롯데칠성의 플러스마이너스 등 수많은 종류가 판매되고 있다.

## 3) 시장동향:

가) 국내 다이어트 시장은 비만인구의 증가와 그 심각성에 대한 인식의 확산에 따라 년20% 이상 꾸준한 성장세가 기대되는 산업임. 제약회사, 식품회사 뿐만 아니라 최근에는 네트워크 업체들이 건강식품시장에서의 성공을 바탕으로 대부분 진입하고 있어 향후 엄청난 경쟁이 이루어질 것으로 분석된다.

- (1) 유니시티 코리아 : "린 컨트롤 플러스" 비만도체크프로그램 무료제공
- (2) 한국암웨이 : "다이어트 식단" 뷰티 칼로리 컨트롤 프로그램 2003
- (3) 한국허벌라이프 : "뉴트리셔널 푸로틴" "허벌알로에"
- (4) 4라이프 리서치 코리아 : 20 여종의 다이어트 식품군을 패키지로 구성
- (5) 타이티안 노니 코리아 : "타히티 트림 플랜 40"
- (6) 그 외 국내 토종 네트워크 업체들도 진출 : 제이유네트워크, 엘트웰, 하이리빙, 다이어너스트 등

## 4) CLA의 경쟁 요인

- 가) 인체 임상을 거친 과학적 근거가 명확한 소재의 제품이다.
- 나) 식·의약품 당국으로부터 소재의 기능성을 "체지방 감소"로 공식 인정된 제품이다.
- 다) 현재 국내 다이어트 식품 시장은 검증되지 않은 다양한 제품들의 남발, 심각한 부작용 등으로 소비자들의 신뢰를 잃은 상태이다  
→ CLA의 상대적 우위 확보 용이
- 라) 허가 초기 다양한 제품의 출시에 의한 동시 다발적 시장진입 예상

## 제7장 참고문헌

Bradford, M.M. A Rapid and sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976).

Chin, S.F., Storkson, J.M., Albright, K.J., Cook, M.E., and Pariza, M.W. Conjugated linoleic acid is a growth factor for rats as shown by enhanced weight gain and improved feed efficiency. *J. Nutr.* 124:2344-2349 (1994).

Cook, M.E., Miller, C.C., Park, Y., and Pariza, M.W. Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression. *Poult. Sci.* 72:1301-1305 (1993).

Gaterette, E.C. and Friedman, M.P. Black, M.M., and Schwartz, H.M. The estimation of chitin nitrogen in crawfish waste and derived products. *Analyst* 75:185, (1950).

Ha, Y.L., Grimm, N.K., and Pariza, M.W. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 8:1881-1887 (1987).

Ha, Y.L., Park, C.W., Park, W.S. and Park, K.A. Influence of conjugated linoleic acid on the extension of mouse ascites cancer induced by S-180 cancer cells. (*In preparation*)

Ha, Y.L., Storkson, J., and Pariza, M.W. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res.* 50:1097-1101 (1990).

Hackerman, R.H. Studies on chitin 1. Enzyme degradation of chitin and chitin esters. *Aust. J. Biol. Sci.* 7:168, (1954).

Hammes, W. P., N. Weiss, and W. Holzapfel. The genera *Lactobacillus* and *carnobacterium*. In: *The prokaryotes (2nd ed.)* Balows, A., H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (eds.) Springer-Verlag (1992).

Hong,J.S., Lee,J.Y., Kim,H.K., Kim,M.K., Jung,G.T., and Lee,K.R. Studies on the volatile aroma components of *Pleurotus ostreatus*. *Korea J. Mycology* 14(1):31-36 (1986).

Houseknecht,K.L., Vanden Heuvel,J.P., Moya-Camarena,S.Y., Portocarrero,C.P. Peck,L.W., Nickel,K.P., and Belury,M.A. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 244:678-682 (1998).

Ip,C., Chin,S.F., Scimeca,J.A., and Pariza,M.W. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res.* 51:6118-6124 (1991).

Ip,C., Scimeca,J.A., and Thompson,H.J. Conjugated linoleic acid. A powerful anticarcinogen from animal fat sources. *Cancer* 74:1050-1054 (1994).

Ip,C., Singh,M., Thompson,H.J., and Scimeca,J.A. Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. *Cancer Res.* 54:1212-1215 (1994).

Jordi Folch, Lees,M., and Sloane stanley, G.H. A simple method for the isolation purification of normal lipids from animal tissues. *J. Bio. Chem.* 497-509 (1956).

Kepler, C. R. , and Tove, S. B. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. III. Purification and properties of a linoleate  $\Delta^{12}$ -cis,  $\Delta^{11}$ -trans -isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* 242:5685-5692 (1967).

Kim,S.J., Park,K.A., Yoon,J.H., Kim,J.O. and Ha,Y.L. Preparation of a large quantity of *cis*-9,*trans*-11 conjugated linoleic acid (CLA) and *trans*-10,*cis*-12 CLA isomers from linoleic acid. *Kor. J. Food Sci. Nutri.* 5, 86 (2000).

Park,S.J., Park,C.W., Kim,S.J., Kim,J.K., Kim,Y.R., Park,K.A., Kim,J.O. and Ha,Y.L. Methylation methods for quantitative analysis of conjugated linoleic acid (CLA) isomers in various lipid samples. *J. Agric. Food Chem.* 50, 989-996 (2002).

Lee,K.N., Kritchevsky,D., and Pariza,M.W. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis.* 108:19-25 (1994).

Liew,C., Schut,H.A.J., Chin,S.F., Pariza,M.W., and Dashwood,R.H. Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-induced colon carcinogenesis in the F344 rat -- a study of inhibitory mechanisms. *Carcinogenesis* 16:3037-3043 (1995).

Miller,C.C., Park,Y., Pariza,M.W., and Cook,M.E. Feeding conjugated linoleic acid to animals partially overcomes catabolic responses due to endotoxin injection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198:1107-1112 (1994).

Nicolosi,R.J., Rogers,E.J., Kritchevsky,D., Scimeca,J.A., and Huth,PJ. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery.* 22:266-277 (1997).

Park Y, Albright KJ, Liu W, Storkson JM, Cook ME, Pariza MW. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids* 32:853-858 (1997).

Park, Y., Storkson, J. M., Albright, K. J., Liu, W., Cook, M. E. and Pariza, M. W. Evidence that the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids*, 34, 235 (1999).

Park,G.B., Lee,J.I., Ha,Y.L., Kang,S.J., Jin,S.K., and Joo,S.T. Effect of conjugated linoleic acid on fatty acid composition and lipid oxidation of egg yolks. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* 18:339-347 (1998).

Park,G.B., Lee,J.I., Park,T.S., Kim,J.H., Shin,T.S., Kang,S.J., Ha,Y.L., and Joo,S.T. Effects of dietary conjugated linoleic acid (CLA) in cholesterol and CLA content of egg yolks. *Kor. J. Anim. Sci.* 41:65-74 (1999).

Park,M.H., Oh,K.Y., Lee,B.W. Anti-cancer activity of *Letinus edoeds* and *Pleurotus astreatus*. *Kor J. Food Sci. Tech.* 30(3);702-708 (1998).

Park,S.J., Park,K.A., Park,C.W., Park,W.S., Kim,J.O. and Ha,Y.L. Purification and amino acid sequence of the linoleate isomerase produced from *B. fibrisolvans* A-38. *J Food Sci. Nutr.* 1, 244-251 (1996).

Park,Y.H., Byun,M.O., and Fujii Hiroshi Comparison of electrophoretic isozyme band pattern of *Pleurotus* spp. in Korea. *Korea J. Mycology* 16(2);87-94 (1998).

Thom,E. A pilot study with the aim of studying the efficacy and tolerability of Tonalin CLA in the body composition in humans. *Medstat Research Ltd*, Lillestrom, Norway (1997).

Visonneau,S., Cesano,A., Tepper,S.A., Scimeca,J.A., Santoli,D., and Kritchevsky, D. Conjugated linoleic acid suppresses the growth of human breast adenocarcinoma cells in scid mice. *Anticancer. Res.* 17:969-973 (1997).

Wang,L.L., and Johnson,E.A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:624-629 (1992).